

**Quality by Design basierte Prozessintegration der  
Präzipitation von Monoklonalen Antikörpern und  
Antikörperfragmenten sowie die Entwicklung eines  
Digitalen Zwillings zur Unterstützung der PAT-gestützten  
autonomen Prozessführung**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Ingenieurwissenschaften

vorgelegt von  
Lara Julia Lohmann, M. Sc.  
aus Sprockhövel

genehmigt von der Fakultät für Mathematik/Informatik und Maschinen-  
bau der Technischen Universität Clausthal

Tag der mündlichen Prüfung  
23.09.2022

**Vorsitz der Prüfungskommission**

Prof. Dr.-Ing. Gunther Brenner  
Institut für Technische Mechanik  
Technische Universität Clausthal

**Hauptberichterstatter:**

Prof. Dr.-Ing. Jochen Strube  
Institut für Thermische Verfahrens- und Prozesstechnik  
Technische Universität Clausthal

**1. Mitberichterstatter:**

Prof. Dr. rer. nat. Alfred Weber  
Institut für Mechanische Verfahrenstechnik  
Technische Universität Clausthal

Institut für Thermische Verfahrens- und Prozesstechnik

**Lara Julia Lohmann**

**Quality by Design basierte Prozessintegration der  
Präzipitation von Monoklonalen Antikörpern und  
Antikörperfragmenten sowie die Entwicklung eines  
Digitalen Zwillings zur Unterstützung der PAT-gestützten  
autonomen Prozessführung**

D 104 (Diss. TU Clausthal)

Shaker Verlag  
Düren 2023

## Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Thermische Verfahrens- und Prozesstechnik der TU Clausthal. An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen herzlich bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt und zum erfolgreichen Abschluss der Arbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr.-Ing Jochen Strube für die Möglichkeit im Bereich Bioverfahrenstechnik zu promovieren und tiefer ins Reich der Zellen und Proteine einzutauchen. Vielen Dank für die Betreuung und die zahlreichen, konstruktiven Diskussionen, ohne die meine Arbeit so nicht hätte entstehen können. Ein weiterer Dank gilt Prof. Dr. rer. nat. Alfred Weber für die Zweitkorrektur und die konstruktive Kritik an meiner Arbeit. Danken möchte ich ebenfalls Prof. Dr.-Ing. Gunther Brenner für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes und die angenehme Moderation während meiner Prüfung.

Ebenso möchte ich mich bei den Technischen Mitarbeitern Frank Steinhäuser und Thomas Knebel bedanken, die stets eine Lösung für die auftretenden Probleme im Labor parat hatten und immer sofort zur Stelle gewesen sind. Vielen Dank an Volker Strohmeier und Nils Hoffmann aus der Werkstatt, die mit kreativen Lösungen bei der Anfertigung neuer Anlagen und Versuchsstände unterstützt haben. Herrn Uwe Halling danke ich für die Hilfe bei der Vorbereitung im Labor. Ein weiterer Dank gilt Frau Claudia Lacheta für die Hilfe bei sämtlichen administrativen und organisatorischen Fragen. Vielen Dank auch für die vielen netten Gespräche, wenn mal eine Pause notwendig war.

Ohne die Mitarbeit und die fachlichen Unterstützung der Kollegen am ITVP wäre die Arbeit so nicht möglich gewesen. Mein Dank gilt Dr.-Ing. Axel Schmidt, Dr.-Ing. Stefan Zobel-Roos, Dr.-Ing. Martin Kornecki, Dr.-Ing. Maximilian Huter, Heribert Helgers und Colin Herzberger, die meinen Alltag im Institut maßgeblich mitbestimmt

und durch ihr Feedback meine Forschung bereichert haben. Ein weiterer Dank gilt Dr.-Ing. Lukas Uhlenbrock, für die langjährige Begleitung während des gemeinsamen Studiums und der Promotion. Ein herzlicher Dank gilt Florian Vetter, Christoph Jensch und Alex Juckers für die vielen schönen Mittags- und Kaffeepausen, aber auch die konstruktiven Diskussionen und vor allem die gute Zusammenarbeit an gemeinsamen Projekten. Ein besonderer Dank gilt Mourad Mouellef, der mich nicht nur fachlich sondern auch freundschaftlich sehr unterstützt hat. Außerdem möchte ich mich für das Korrekturlesen herzlich danken. Ein weiteres Dankeschön gilt meiner Studentin und späteren Kollegin Larissa Knierim, die mir mit ihrer Arbeit als Bachelorandin und anschließend als Hilfwissenschaftlerin viel Laborarbeit abgenommen und meine Arbeit dadurch vereinfacht hat.

Herzlich bedanken möchte ich mich zudem bei Marina Unseld, die mir als gute Freundin zur Seite stand, immer ein offenes Ohr für mich hatte und mich am Ende durch wertvolles Korrekturlesen unterstützt hat.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir meinen Werdegang und das Studium erst ermöglicht haben. Vielen Dank, dass ihr immer an mich geglaubt habt!

Zu guter Letzt gilt mein liebevoller Dank meinem Partner Maxim Scheck, der mir unermüdlich und mit viel Geduld zur Seite stand, mich mit zahlreichen Diskussionen immer wieder aufs Neue unterstützt hat und mein Ruhepol in besonders stressigen Phasen gewesen ist. Ich danke dir, dass du immer an meiner Seite bist.

Clausthal im Januar 2023

Lara Lohmann



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung und Motivation</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Stand der Technik</b> .....	<b>4</b>
2.1 Grundlagen der Protein Präzipitation .....	4
2.1.1 Präzipitationsmechanismen.....	6
2.1.2 Modellierung der Präzipitation.....	10
2.2 Grundlagen der Filtration.....	13
2.2.1 Membranverfahren .....	16
2.2.2 Prozessführung und Modul Design .....	17
2.2.3 Modellierung des Stofftransports an Membranoberflächen.....	22
2.3 Quality by Design .....	34
2.4 Process-Analytical-Technology für die Präzipitation.....	36
2.5 Untersuchte Biologische Stoffsysteme .....	37
2.5.1 Monoklonale Antikörper.....	37
2.5.2 Antikörper Fragmente .....	39
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>40</b>
3.1 Stoffsystem monoklonale Antikörper .....	40
3.2 Stoffsystem Antikörper Fragmente .....	45
3.3 Spektroskopische Methoden .....	48
3.4 Weitere Analytik Methoden .....	51
<b>4. Ergebnisse zur Präzipitation von monoklonalen Antikörpern</b> .....	<b>52</b>

4.1	Charakterisierung der Präzipitate .....	54
4.2	Präzipitationsprozesse .....	56
4.2.1	Absatzweiser Präzipitationsprozesses .....	56
4.2.2	Halbkontinuierlichen Präzipitationsprozess.....	59
4.2.3	Kontinuierlicher Präzipitationsprozess .....	60
4.3	Risikoidentifizierung und Bewertung .....	63
4.4	Modellierung des kontinuierlichen Präzipitationsprozesses .....	75
4.4.1	Implementierung des Modelles .....	76
4.4.2	Simulationsstudien zur Modell Validierung.....	77
4.4.3	Konzept zur Bestimmung der Modellparameter .....	92
4.4.4	Experimente zur Modellvalidierung.....	102
4.5	Entwicklung einer Kontrollstrategie .....	106
4.5.1	Identifikation geeigneter Detektoren und Sensoren .....	106
4.5.2	Regelungsstrategie für den halbkontinuierlichen Prozess.....	115
4.5.3	APC Simulationsstudie.....	117
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse zur Präzipitation von Antikörperfragmenten.....</b>	<b>121</b>
5.1	Anpassung der Prozessführung .....	121
5.2	Experimente zur Modellvalidierung.....	123
5.3	Bestimmung der Modellparameter .....	124
5.4	Modellierung der Präzipitation von Antikörperfragmenten .....	127
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>131</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>134</b>



<b>8. Symbolverzeichnis.....</b>	<b>164</b>
8.1 Abkürzungen.....	164
8.2 Parameter .....	165
<b>9. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>167</b>
<b>10. Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>172</b>
<b>11. Anhang .....</b>	<b>174</b>



## 1. Einleitung und Motivation

Der biopharmazeutische Sektor wächst und entwickelt sich in einem Tempo, das kaum zu übertreffen ist. Im Jahr 2022 hatten biotechnologisch hergestellte Arzneimittel einen Anteil von zirka 34% des weltweiten Umsatzes (127 Mrd. US Dollar) an verschreibungspflichtigen und OTC-Arzneimitteln (*engl.: over-the-counter*, verschreibungsfrei) [EvaluatePharma 2021]. Ein Anhalten der Wachstumstendenz gilt branchenweit als gesetzt. Zusätzlich verändert sich die biopharmazeutische Industrie hin zu stärker individualisierten und patientenorientierten Medizin (Präzisionsmedizin), sodass bestehende Routinen, wie die Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern (mAb), für ein neues Portfolio von Biomolekülen wie zum Beispiel mRNA, VLPs, Exosome, Enzyme, etc. ausgedehnt werden [Kornecki 2019a, Subramanian 2017]. Besonders in pandemischen Zeiten ist die Nachfrage nach diesen Plattformprozessen groß, um neuartigen Krankheiten zeitnah entgegenzutreten und eine schnelle Zulassung zu ermöglichen [Kumar 2021]. Durch die hohen Reinheits- und Qualitätsanforderung in diesem Sektor sind kontinuierliche Produktqualitätskontrollen und Prozessüberwachung während des Betriebes unerlässlich. Des Weiteren ist im Rahmen der Prozessintensivierung der kontinuierliche und autonome Betrieb angestrebt [Walther 2015], um Handhabungsfehler, Ausfälle und Schichtarbeit zu reduzieren. Eine robuste Prozessüberwachung und -regelung im Störfall erfordert jedoch ein tiefes Prozessverständnis, welches bisher meist durch zeitaufwendige und kostenintensive Experimente erlangt wurde. Eine weitere Möglichkeit zum Aufbau dieses Wissens bietet die Entwicklung von rigorosen Prozessmodellen, die auf physikalischen und chemischen Begebenheiten basieren [Sixt 2018, Subramani 2003]. Diese Modelle sind als allgemeines Ingenieurwerkzeug zu verstehen, die zum einen in der Entwicklung neuer Prozesse und zum anderen als Beobachter in der Prozessregelung und -steuerung verwendet werden können. In der vorliegenden Arbeit werden die Entwicklung eines Prozessmodells und die darauf basierende Prozessregelung am Beispiel der Präzipitation von monoklonalen Antikörpern demonstriert. Der bisherige

## 1. Einleitung und Motivation

---

Plattformprozess zur Reinigung von monoklonalen Antikörpern umfasst hauptsächlich Chromatographie-Schritte, da diese eine hohe Ausbeute (> 95%) und Reinheit (> 95%) gewährleisten können. Lange Zeit war das Upstream Processing (USP) durch geringe Titer und lange Prozesszeiten der limitierende Faktor in der Produktion. Durch die Fortschritte, die in den letzten Jahrzehnten im USP erzielt wurden, sind jedoch die Produktionsengpässe vom USP in das Downstream Processing (DSP) verlagert worden. In dem Herstellungsprozess von monoklonalen Antikörpern wurde der Capture-Schritt (Protein A Chromatographie) als kritischer Punkt identifiziert [Glynn 2017]. Das liegt zum einen in der limitierten Kapazität des Chromatographie Harzes begründet und zum anderen an der Empfindlichkeit des darauf immobilisierten Protein A. Gleichzeitig sind die Kosten für das Harz (5.000-14.000 €/L) und den Pufferverbrauch (0,3 - 2 Mio.€/Batch) während des Prozesses enorm [Dos Santos 2017]. Aus den genannten Gründen liegt das höchste Optimierungspotential im DSP, auf den der größte Anteil der Gesamtkosten von mehr als > 90% anfällt und es besteht die Notwendigkeit, alternative Grundoperationen zu finden oder bereits bestehende zu reaktivieren [Singh 2018]. Die Präzipitation ist eine bestehende und relativ alte Technik, die zur Probenvorbereitung bis heute häufig Anwendung findet, jedoch noch nicht weit in der Herstellung von Biopharmazeutika verbreitet ist [Lain 2010]. Dabei bietet die Präzipitation einige Vorteile um die genannten Kritikpunkte zu minimieren [Dos Santos 2017]. Zum einen ist die Fällung ein von der Anfangskonzentration unabhängiger Prozess [Matheus 2009], wodurch steigenden Antikörpertiter und Volumina aus den optimierten Upstream Prozessen verarbeitet werden können. Dies ist nicht zu verwechseln mit dem Fällungsschritt an sich, bei dem die lokale Übersättigung erst zur Bildung von Präzipitaten führt. Des Weiteren sind zum anderen keine komplexen Komponenten für die Fällung notwendig. Viel mehr ist das benötigte Equipment, bestehend aus einer Mischstrecke und einem Filter zur Fest-Flüssig-Trennung, bereits industrieller Standard und als Single-Use Technologie verfügbar. Diese Komponenten sind zudem skalierbar, sodass eine Umstellung auf einen anderen Maßstab flexibel ist.

Das Ziel dieser Arbeit sind die Erstellung eines validierten Prozessmodells und die Entwicklung einer Regelung für den autonomen Betrieb der Anlage am Beispiel der Grundoperation Präzipitation.

## 2. Stand der Technik

In diesem Kapitel werden die allgemeinen Grundlagen für die Proteinpräzipitation als auch die Filtration zusammengefasst. Des Weiteren wird der Quality by Design Ansatz (QbD) zur Prozessentwicklung erläutert, der sich zum neuen Standard der Prozessentwicklung in der Industrie entwickelt hat. Anschließend wird der aktuelle Stand zur Prozessanalysetechnik (*engl.: Process analytical Technology, PAT*), welche eng mit dem QbD Ansatz verbunden ist, für die Präzipitation vorgestellt. Abschließend werden die untersuchten Stoffsysteme eingeführt.

### 2.1 Grundlagen der Protein Präzipitation

Im Allgemeinen ist die Präzipitation eng mit der Kristallisation verknüpft und bedeutet die spontane Ausfällung amorpher Strukturen, in Form von Partikeln oder Flocken, aus einer flüssigen Phase [Karpinski 2019]. Dabei wird der Fällungsprozess durch äußere Einflüsse herbeigeführt und geht mit der Veränderung der Proteinlöslichkeit einher [Borisenko 2012]. Diese Reduktion kann durch Zugabe eines geeigneten Fällungsmittels (Präzipitant) erfolgen, welches die Eigenschaften des Lösungsmittels oder die Struktur des Proteins verändert. Ähnlich wie in der Kristallisation kann die Präzipitation durch eine schnelle Temperatur- oder Druckänderung verursacht werden [Scopes 1994]. Die Triebkraft der Präzipitation ist die Abweichung des chemischen Potentials von dessen Minimum, welches sich durch die Veränderung eines thermodynamisch instabilen Zustands zu einem Gleichgewichtszustand hin verschiebt [Tutomu Arakawa and Serge N. Timasheff 1985]. Um die Präzipitation einzuleiten, ist eine starke Übersättigung notwendig, sodass sich das System durch die Ausfällung bestimmter Komponenten wieder ins thermodynamische Gleichgewicht zurückbringt. Zum besseren Verständnis und zur Abgrenzung der Präzipitation von der Kristallisation ist in Abbildung 2-1 mit der durchgezogenen Linie eine schematische

Löslichkeitskurve für ein Protein in Abhängigkeit der Fällungsmittelkonzentration dargestellt.

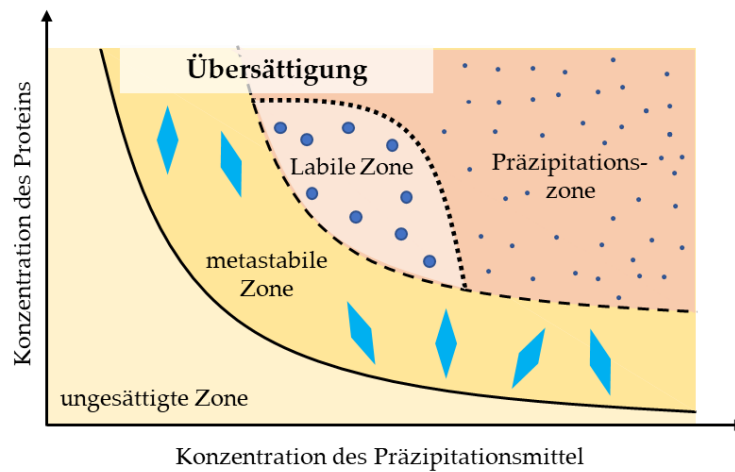


Abbildung 2-1: Typische schematische Löslichkeitskurve für ein Protein als Funktion der Präzipitantkonzentration. --- = Löslichkeitskurve, - - - = 1. Überlöslichkeitskurve, ··· = 2. Überlöslichkeitskurve. Adaptiert von Dos Santos et al. [Dos Santos 2017].

Jeder Punkt auf der Löslichkeitskurve spiegelt einen Gleichgewichtspunkt zwischen Proteinkonzentration und Fällungsmittels wieder. Die Löslichkeitskurve teilt das Diagramm in zwei Bereiche, die ungesättigte und die übersättigte Zone. In der ungesättigten Zone findet weder Kristallisation noch Präzipitation statt. Der übersättigte Bereich lässt sich weiter in die metastabile, labile Zone und die Präzipitationszone unterteilen [Borisenko 2012]. Im metastabilen Bereich findet die Kristallbildung nicht spontan, sondern nur durch mechanisch Energieeintrag oder Hinzufügen von Kristallisationskeime, als sogenannte sekundäre Keimbildung, statt. Wird die Lösung stärker übersättigt und in die labile Zone überführt, bilden sich Kristallisationskeime im System (Primäre Keimbildung), welche bei konstanten Kristallisationsbedingungen schnell zu größeren Kristallen heranwachsen. Die Bildung der Kristallisationskeime benötigt eine bestimmte Aktivierungsenergie und ist deshalb der geschwindigkeitsbestimmende Schritt während der Kristallisation. Ist die Lösung sehr stark übersättigt kommt es zur instantanen Fällung der Proteine in der Präzipitationszone. Es werden keine kristallinen, sondern amorphe Partikel und Aggregate gebildet. Aus diesem Grund wird die Präzipitation häufig auch als reaktive Kristallisation bezeichnet

[Karpiński 2019]. Präzipitate sind zudem, im Vergleich zu Kristallen, deutlich kleiner und liegen im Bereich von 0,1-100  $\mu\text{m}$  vor [Karpiński 2019].

### 2.1.1 Präzipitationsmechanismen

Die Proteinfällung ist eins der ersten Verfahren zur Proteinreinigung [Lottspeich 2006], da durch die Mischung verschiedener Flüssigkeiten sichtbare Partikel entstehen, welche durch Filtration leicht abgetrennt werden konnten [Scopes 1994]. Zur Fällung der Proteine werden üblicherweise Säuren, Basen, Salze [Kunz 2004, Zhang 2006], Alkohole [Cohn 1925], sowie Polymere eingesetzt [Juckes 1971, Polson 1977]. Die Auswahl des Fällungsmittels richtet sich nach dem zu fällenden Protein und der möglicherweise denaturierenden Wirkung des Präzipitantes. Werden NebenkompONENTEN gefällt, ist die Denaturierung der Proteine nicht relevant, da diese keine Wertkomponente darstellen. Wird hingegen das Wertprodukt gefällt, muss ein schonendes Präzipitationsmittel ausgewählt werden [Glynn 2017]. Proteine sind aus einer Vielzahl aus Aminosäuren aufgebaut, welche auf die 20 proteinogenen Aminosäuren zurückzuführen sind [Christen 2015]. Die unterschiedlichen chemischen Eigenschaften der Aminosäuren führen dazu, dass Proteine Oberflächenregionen aufweisen, die unpolar/ hydrophob, polar/neutral, sauer oder basisch sind [Clark 2009]. Durch die sauren, basischen und polaren Eigenschaften resultieren zusätzlich Ladungen innerhalb eines Proteins [Lottspeich 2006]. Die Summe der einzelnen Ladungen ergibt die Nettoladung des gesamten Proteins. Ein charakteristischer Wert eines Proteins ist der Isoelektrische Punkt (IP), an dem die Nettoladung des Moleküls Null ergibt. Sowohl die Ladungen als auch die Anordnung der hydrophoben Bereiche auf der Proteinoberfläche sind für die komplexe 3D-Struktur der Proteine verantwortlich. Eine weitere Besonderheit ist, dass es sich bei Proteinen um amphotere Moleküle handelt [Gey 2015], welche ihre Ladung, auf Grund des umgebenden Milieus (pH-Wert), verändern [Christen 2015]. Bei der Proteinpräzipitation können folgende Methoden angewandt werden [Chmiel 2011]:



1. Veränderung der Eigenschaften des Lösungsmittels (Löslichkeit)
2. Veränderung der Proteineigenschaften (Ladung und Struktur)
3. Zugabe von Liganden (Affinität)

Die Veränderungen des Lösungsmittels gehen mit einer reduzierten Löslichkeit des Proteins einher und können durch Zugabe von Salzen, organischen Lösungsmitteln oder durch Polymere durchgeführt werden. Die Veränderung der Proteineigenschaften beruht auf einer Änderung der Oberflächenladung oder der Proteinstruktur bis hin zur Denaturierung [Lottspeich 2006]. Ausgelöst wird dieser Effekt durch die Zugabe geringer Mengen von Säuren oder Basen. Die Zugabe von Affinitätsliganden führt zu einer selektiven Bindung des Zielproteins. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich Polyethylenglykol (PEG) als Fällungsmittel genutzt. Auf Grund des hohen Salzgehaltes im Feed [Schmidt 2017] wird zusätzlich die Präzipitation mit Salzen thematisiert. Abschließend wird die Präzipitation am isoelektrischen Punkt erläutert, da für eine vollständige Auflösung und Stabilität des Antikörpers der Puffer, hinsichtlich Ionenstärke und pH-Wert, eingestellt wird [Thompson 2016]. Die Effekte bei der Verwendung von organischen Lösungsmitteln, Säuren und Basen, Affinitätspräzipitationsmitteln sowie Druck und Temperatur werden in dieser Arbeit nicht weiter betrachtet.

### **Präzipitation mit Polymeren**

Die Präzipitation mit Polyethylenglykol ist nicht vollständig verstanden, es existieren jedoch zwei Theorien zu dessen Beschreibung. Zum einen die Theorie des ausgeschlossenen Volumens [Ingham 1978, Iverius 1967, Polson 1977] und zum anderen die Entstehung von Verarmungszonen [Ingham 1978, Odijk 1997, Odijk 2009]. Die Theorie des ausgeschlossenen Volumens geht davon aus, dass Polymere von einer Zone umgeben sind, welche, auf Grund von sterischen Effekten, den Aufenthalt eines weiteren Moleküls nicht toleriert [Hermans 1982]. Diese Theorie geht von der Annahme aus, dass Polymere ein kugelförmiges oder lineares Partikel in Lösung ausbilden [Ogston

## 2. Stand der Technik

---

1958, Ogston 1973]. In Abbildung 2-2 (a) ist eine schematische Darstellung [Aumiller 2014] der Theorie des ausgeschlossenen Volumens gezeigt. Das absolute Volumen ist in Form des Kastens dargestellt, die Makromoleküle in Schwarz und das ausgeschlossene Volumen in Weiß. Zur Lösung des Makromoleküls verbleibt lediglich das zugängliche Volumen (grau). Es ist deutlich zu erkennen, dass bei freier Dissoziation der Makromoleküle das zugängliche reduziert ist, dass zu einem erhöhten chemischen Potential führt. Assoziieren die Makromoleküle auf Grund der lokalen Übersättigung in Form von Präzipitation [Laurent 1963], ist das zugängliche Volumen größer und das chemische Potential reduziert sich [Aumiller 2014]. Das System befindet sich danach in einem stabileren Zustand als zuvor. Experimentelle Ergebnisse haben zudem eine Abhängigkeit zwischen der Proteingröße, Polymerkettenlänge und der resultierenden Präzipitationseffizienz gezeigt [Iverius 1967]. Je länger die Kettenlänge des Makromoleküls ist, desto stärker sind dessen Aggregation und darüber hinaus die Effektivität Proteine zu fällen [Asakura 1958, Davis Knoll 1983] (siehe Abbildung 2-2 (b)).

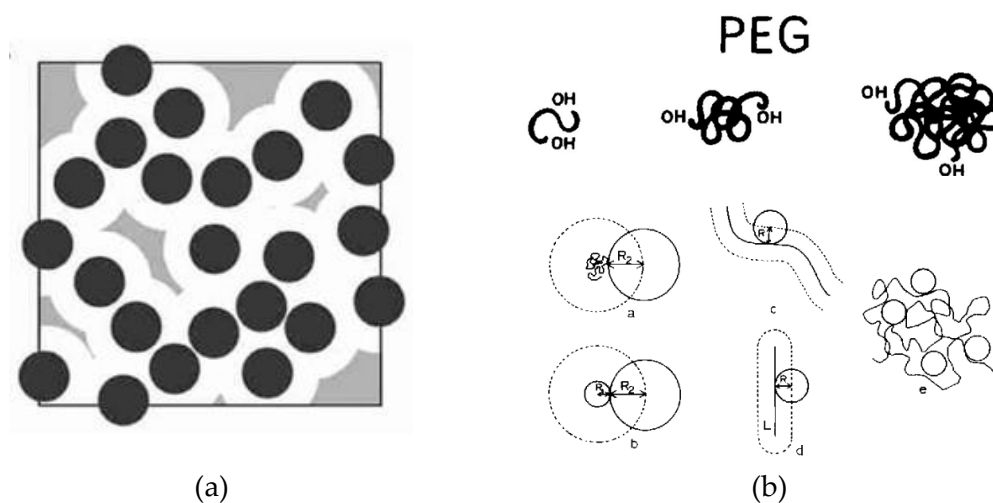


Abbildung 2-2: (a) Volumenausschlusseffekt bei der Verwendung Polymeren [Aumiller 2014], (b) oben, gelöste PEG Moleküle liegen in gewundenen Ketten vor [Polson 1977], (b) unten, schematische Darstellung der sterischen Ausschlusszone von gelösten Polymeren nach[Hermans 1982].

Oelmeier et al. haben mit modernen Simulationsmethoden ähnliche Erkenntnisse erlangt [Oelmeier 2012]. Polson beschreibt, dass eine sterische Ausschlusszone um das PEG Molekül existiert, jedoch durch die Windungen des Polymers kleine Zwischenräume entstehen [Polson 1977]. Sind die Proteinmoleküle klein genug, stellt sich ein

Gleichgewicht zwischen Hin- und Rückdiffusion des inneren PEG Moleküls und des freien Volumens außerhalb ein [Polson 1977]. Dies kann über einen Verteilungskoeffizienten beschrieben werden. Größere Proteine, welche nicht mit den Polymermolekülen in Wechselwirkung stehen, neigen zur Präzipitation durch die lokale Übersättigung [Tsutomu Arakawa and Serge N. Timasheff 1985]. Die Theorie der attraktiven Verarmung führt zusätzlich den PEG-induzierten osmotischen Druck als Triebkraft für den Fällungsprozess ein [Asakura 1958, Odijk 1997, Odijk 2009]. In diesem Theorieansatz werden die PEG-Moleküle auf Grund von sterischen Effekten aus der Umgebung der Proteine ausgeschlossen. Die Zonen, welche die Proteine umgeben, werden Verarmungszonen genannt. Nähern sich zwei Proteine an, sodass sich die Verarmungszonen überlappen, entsteht ein PEG freier Bereich [Asakura 1958]. Dadurch entsteht ein Konzentrationsgradienten des PEGs zwischen den überlappten Verarmungszonen und der Bulk-Phase [Thompson 2016]. Dieser Gradient führt zu einem osmotischen Druck, welcher als Triebkraft der Präzipitation fungiert. Die Wechselwirkung zwischen den Proteinen und die resultierende Fällung führt zu einer Steigerung der Entropie des Systems [Odijk 1997]. In beiden Theorien werden keine direkten Wechselwirkungen zwischen Protein und Polymer beschrieben [Thompson 2016].

### **Einfluss von Ionenstärke und Isoelektrischen Punkt**

Die Fällung mit Salzen sowie am isoelektrischen Punkt (IP) sind eng miteinander verknüpft und werden daher zusammen thematisiert [Scopes 1994]. Der isoelektrische Punkt (IP) ist der pH-Wert, bei dem sich die positiven und negativen Ladungen eines Proteins, zu einer Nettoladung von Null, aufheben [Clark 2009]. Durch die fehlende Polarität ist die Stabilisierung der Proteine in polaren Lösungsmitteln minimal und resultiert in der Präzipitation [Lottspeich 2006]. Ähnlich wie der isoelektrische Punkt, können Salze ebenfalls eine stabilisierende oder destabilisierende Wirkung auf Proteine ausüben [Ruckenstein 2006]. Unter natürlichen Bedingungen, wie zum Beispiel in

Zellen, weisen Proteine eine hohe Löslichkeit bei einem geringen Salzgehalt (0,15-0,2 M) und neutralem pH-Wert auf [Scopes 1994]. Dieser Effekt wird „Einsalzen“ genannt und tritt bei einer Ionenstärke von bis zu 0,5 M auf [Scopes 1994]. Ab einer Salzkonzentration von 1-2 M haben die meisten Salze einen Aussalz-Effekt [Melander 1977]. Dieser Effekt ist jedoch zusätzlich von dem verwendeten Salz abhängig [Collins 2004, Salis 2014]. Zudem weist nicht jedes Salz eine einsalzende beziehungsweise aussalzende Wirkung auf [Zhang 2014]. Die Hofmeister Reihe klassifiziert kosmotrope und chaotrope Salze nach ihrem Vermögen Proteine zu stabilisieren oder zu denaturieren [Collins 2004, Kunz 2004].

### 2.1.2 Modellierung der Präzipitation

Auf Grund der Ähnlichkeit zwischen Präzipitation und Kristallisation ist die Ableitung eines Modellansatzes aus der Kristallisation naheliegend [Roland 2010]. Einige Arbeiten verwenden Populationsbilanzen zur Vorhersage der Anzahl- und Partikelgrößenverteilung sowohl als auch der Keimbildung, des Wachstums und des Bruchs der Präzipitate [Mersmann 2002, Schmok 1988, Segets 2012] sowie der Protein Aggregation [Amin 2014, Wang 2010, Wang 2018]. Erweiterte Modelle sind darüber hinaus in der Lage die Form der Partikel vorherzusagen [Iggländ 2012]. Ein anderer Ansatz ist die Vorhersage durch Beschreibung der Proteinlöslichkeit [Arakawa 1985, Cohn 1925]. Cohn liefert einen mathematischen Zusammenhang zwischen Ionenstärke und Proteinkonzentration [Cohn 1925], welche später von Juckes speziell auf die Präzipitation mit Polyethylenglykol erweitert wurde [Juckes 1971]. Mit dieser Beziehung können Präzipitationskurven vorhergesagt werden, welche die Gleichgewichtskonzentration bei einem bestimmten Anteil an Fällungsmittel widerspiegeln. Die zur Beschreibung notwendigen Parameter können in Abhängigkeit des hydrodynamischen Radius von Protein und Polymer berechnet [Sim 2012] oder mit der multivariaten Auswertung von Strukturdaten geschätzt werden [Bauer 2017, Hämmerling 2017]. Die Auswahl der geeigneten Gleichungen zur Erstellung eines

Prozessmodells richtet sich vor allem nach der notwendigen Modelltiefe. Das Prozessmodell für die Grundoperation Präzipitation soll in der Lage sein, die Ausbeute und Reinheit des Wertproduktes vorherzusagen. Da die Präzipitation der Zielkomponente ein Zwischenschritt ist und die Auflösung der Präzipitate direkt in den Prozess integriert ist, stellt das eigentliche Präzipitat nicht das Endprodukt dar. Aus diesem Grund ist die Vorhersage der Anzahl- und Größenverteilung sowie der Präzipitat Form sekundär. Die Form und Größe der Präzipitate würde dann eine Rolle spielen, sobald die Auflösung nicht mehr spontan abläuft. In diesem Fall würde das Oberflächen-zu-Volumenverhältnis die Auflösung der Partikel beeinflussen. Dies ist in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht der Fall gewesen. Es wird das Modell zur Beschreibung der Löslichkeit nach Juckes verwendet (Gleichung (2-1)), welches die zeitliche Konzentrationsabnahme bei Anwesenheit des Präzipitanten vorhersagen kann [Juckes 1971]. Dabei steht  $S$  für die Proteinlöslichkeit [mg/ml],  $\beta$  für die Präzipitationseffizienz [(mg/ml)/ wt% PEG],  $\omega$  für den PEG Anteil in Gewichtsprozent [wt%] und  $\kappa$  für die intrinsische Proteinlöslichkeit [mg/ml] in Abwesenheit von PEG.

$$\log(S) = -\beta \omega + \kappa \quad (2-1)$$

Die Präzipitationseffizienz wird experimentell bestimmt und zusätzlich mit der berechneten aus Gleichung (2-2) verglichen. Dazu wird das von Sim et al. aufgestellte Modell, welches die Theorien der attraktiven Verarmungszonen und des ausgeschlossenen Volumens während der PEG Präzipitation berücksichtigt, verwendet [Sim 2012].

$$\beta = \gamma r_{h,PEG}^{0,211} r_{h,Protein} + \delta r_{h,Protein} \quad (2-2)$$

Die Faktoren  $\gamma$  und  $\delta$  sind Konstanten, die für die PEG Präzipitation von Proteinen bestimmt worden sind ( $\gamma = 0,076$  und  $\delta = -0,045$ ) [Sim 2012].  $r_{h,Protein}$  steht für den hydrodynamischen Radius des Proteins [nm], wodurch eine Selektion des Antikörpers auf Grund dessen Größe durch das PEG erfolgt. Der Größenunterschied zwischen Zielprotein und Nebenkomponten führt zur selektiven Fällung des Antikörpers

[Polson 1977]. Die Berechnung des hydrodynamische Proteinradius und des Polyethylenglykols erfolgt über Gleichung (2-3) [Atha 1981].

$$r_{h,i} = \left( \frac{3\eta M_i}{4 * \pi * 2,5 * N_A} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (2-3)$$

Ein weiterer allgemeingültiger Zusammenhang zur Bestimmung von hydrodynamischen Radien ist über die Korrelation von Erickson et al. möglich (Gleichung (2-4)). Dabei wird die molare Masse in Dalton angegeben, sodass der hydrodynamische Radius in Nanometer resultiert [Erickson 2009].

$$R_{min} = 0,066 M^{\frac{1}{3}} \quad (2-4)$$

Die Geschwindigkeit, mit der sich die Präzipitate formieren, liegt im Bereich von wenigen Sekunden [Chan 1986], sodass von einem spontanen und diffusionslimitierten Prozess ausgegangen werden kann [Sommer 2014]. Die Konzentrationsänderung des Zielproteins im Überstand wird mit einer Reaktionskinetik erster Ordnung nach Gleichung (2-5) berechnet.

$$r_{prec} = -k_{prec} (c_{protein} - c_{eq}) \quad (2-5)$$

Dabei steht  $r_{prec}$  für die Reaktionsrate [mg/(ml\*s)],  $k_{prec}$  ist der Kinetik Parameter [1/s],  $c_{protein}$  ist die aktuelle Proteinkonzentration des Proteins [mg/ml] und  $c_{eq}$  gibt die Gleichgewichtskonzentration des Proteins [mg/ml] wieder. Der Kinetik Parameter  $k_{prec}$  wurde in einer vorherigen Arbeit von Lohmann et al. experimentell bestimmt [Lohmann 2020]. Dabei wurde gezeigt, dass die Präzipitation eine Funktion der Durchmischung ist. Der in der vorliegenden Arbeit entwickelten Prozess nutzt einen statischen Mischer zur Durchmischung von Feed und Präzipitant. Die Modellierung der Konzentrationsänderung im statischen Mischer erfolgt über das axiale Dispersionsmodell [Kraume 2020], dass in Gleichung (2-6) angegeben ist.

$$\epsilon \frac{\partial c_i(z,t)}{\partial t} = D_{ax} \frac{\partial^2 c_i(z,t)}{\partial z^2} - u \frac{\partial c_i(z,t)}{\partial z} - a k_{eff,prec} (c_i(t) - c_{i,eq,prec}) \quad (2-6)$$

Der erste Summand gibt die axiale Dispersion im Mischer an. Dabei steht  $D_{ax}$  für den axialen Dispersionskoeffizient [cm<sup>2</sup>/s]. Im zweiten Summanden wird die Konvektion auf Grund der Strömung durch den Mischer berücksichtigt. Die Strömungsgeschwindigkeit [cm/min] ist mit  $u$  angegeben. Im letzten Summanden wird die Reaktion, in diesem Fall die Präzipitation, berücksichtigt. Der effektive Stoffübergangskoeffizient im Mischer wird aus dem Kinetik Parameter der Präzipitation ( $k_{prec}$ ) und der Strömungsgeschwindigkeit ( $u$ ) auf einen effektiven Stoffübergangskoeffizienten in axialer ( $z$ ) Richtung umgerechnet. Die Berechnung der Auflösung erfolgt ebenfalls in einem Mischer und ist in Gleichung (2-7) angegeben.

$$\epsilon \frac{\partial c_i(z, t)}{\partial t} = D_{ax} \frac{\partial^2 c_i(z, t)}{\partial z^2} - u \frac{\partial c_i(z, t)}{\partial z} - a k_{eff, diss} (c_i(t) - c_{i_{eq, diss}}) \quad (2-7)$$

Durch die Veränderung der umgebenden Lösung wird der restliche PEG Anteil verdünnt, sodass die thermodynamische Proteinlöslichkeit steigt und sich die Präzipitate spontan zurücklösen. Hier werden lediglich der axiale Dispersionskoeffizient ( $D_{ax}$ ), der effektive Stoffübergangskoeffizient sowie die Gleichgewichtskonzentration ( $c_{i_{eq, diss}}$ ) unter den veränderten Bedingungen (Auflösung) angepasst.

## 2.2 Grundlagen der Filtration

Die Filtration stellt, aufgrund der notwendigen Abtrennung der Präzipitate, einen essentiellen Bestandteil in der Grundoperation Präzipitation dar. Die Präzipitation erfolgt mit PEG, welches eine erhöhte Viskosität aufweist. Die Filtrationsaufgabe daher nicht trivial. In diesem Kapitel wird ein Überblick zu Membranen und den verschiedenen Membranverfahren gegeben. Des Weiteren werden unterschiedliche Betriebsführungen erläutert und mögliche Modultypen vorgestellt. Abschließend wird der mathematische Zusammenhang des Stofftransports an Membranen thematisiert, welcher zur Modellbildung notwendig ist. Allgemein stellen Membranen eine Barriere zwischen zwei Phasen dar, deren Hauptfunktion der selektive Austausch zwischen einem beliebigen Kompartiment und dessen Umgebung ist. Dieser findet

statt, indem die Membran für bestimmte Komponenten permeable und für andere Bestandteile undurchlässig ist. Eine Membran kann entweder molekular homogen sein, das heißt Struktur und Zusammensetzung sind einheitlich, oder sie ist strukturell oder chemisch heterogen, indem Poren vorhanden sind oder die Membran aus einer Schichtstruktur aus unterschiedlichen Materialien besteht. Herkömmliche Filter erfüllen diese Kriterien, sind aber meistens in der Größenordnung der zu filtrierenden Partikelgröße von ca.  $> 10 \mu\text{m}$  limitiert. Die wichtigsten Arten von Membranen sind schematisch in Abbildung 2-3 dargestellt und werden im Weiteren kurz erklärt.

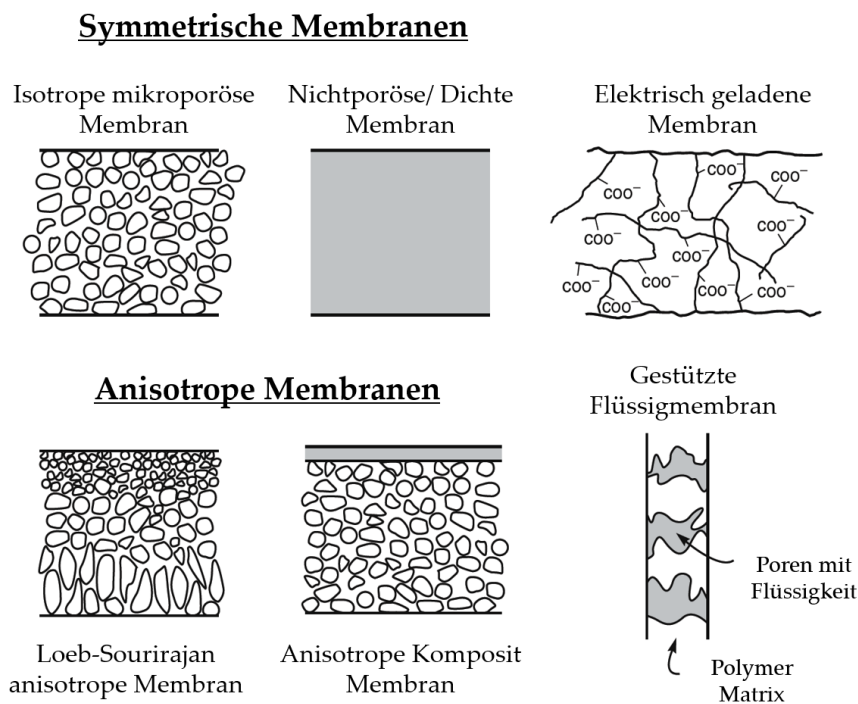


Abbildung 2-3: Überblick von synthetischen Polymermembranen [Baker 2012]

Nichtsdestotrotz unterscheiden sie sich in der Porengröße, welche zwischen  $0,01-10 \mu\text{m}$  liegen. Partikel, die größer als die größten Poren in der Membran sind, werden vollständig zurückgehalten. Auf Grund der Porengrößenverteilung der Membran, werden Partikel, welche zwischen der größten und der kleinsten Pore liegen, teilweise zurückgehalten. Partikel die kleiner als die kleinste Porengröße sind, passieren die Membran vollständig. Mikroporöse Membranen werden hauptsächlich für die Mikro- und Ultrafiltrationsprozesse verwendet. Nicht-poröse oder auch dichte Membranen genannt, verfügen nicht über Poren, sondern die Permeation erfolgt auf Grund von



Diffusion. Die Filtrierbarkeit einer Komponente ist somit direkt abhängig von deren Diffusionsfähigkeit und Löslichkeit im Membranmaterial. Dichte Membranen finden Anwendung in der Gasseparation (Pervaporation) und in der Umkehrosmose [Melin 2007]. Elektrisch geladene Membranen können als poröse oder dichte Membranen vorliegen und verfügen über immobilisierte Ladungen auf der Membranoberfläche. Sie dienen dem Austausch von entweder Kationen oder Anionen, je nach immobilisierter Ladung. Elektrisch geladene Membranen werden für die Elektrodialyse eingesetzt. Um eine kosteneffiziente Filtration zu ermöglichen, müssen hohe Transportraten durch Membranen erreicht werden. Dies kann durch die Reduzierung der Membrandicke erreicht werden. Anisotrope Membrane bestehen aus einer sehr dünnen aktiven Schicht, welche eine Dicke von ca. 20  $\mu\text{m}$  aufweist, die auf einer groben porösen Stützschicht aufgebracht ist. Die aktive Schicht kann dabei entweder eine mikroporöse oder eine dichte Membran sein. Die Effizienzsteigerung der Filtrationsprozesse durch diese Herstellungsweise überwiegt dermaßen, dass fast alle kommerziellen Prozesse anisotrope Membranen verwenden. Als Membranmaterialien werden eine Bandbreite von Polymeren verwendet [Melin 2007]. Hohlfasermembranen, welche ausschließlich in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, werden beispielsweise aus Polyethersulfon (PES), Polysulfon (PS), Polypropylen (PP), Polyvinylidenfluorid (PVDF) oder aus gemischten Cellulose Estern (ME) hergestellt [van Reis 2007]. Die Membranen sind asymmetrisch und haben die aktive Schicht auf der innen Seite (Lumen) der Fasern. Die Auswahl des richtigen Membranmaterials basiert auf den Anforderungen der Trennaufgabe. Diese müssen thermisch, chemisch und mechanisch beständig sein, als auch eine sehr gute Permeabilität des Polymers hinsichtlich bestimmter Komponenten haben [Melin 2007]. In Herstellungsprozessen von Biologics finden vielfach PES, ME und PS Membranen Anwendung [Knoell 1999, van Reis 2007, Ye 2005, Zhao 2013, Zydney 2021].

2.2.1 Membranverfahren

Eine Einteilung der Membranverfahren lässt sich anhand der Triebkraft vornehmen. Als Triebkraft eignet sich die Druck-, Konzentrations- oder Partialdruckdifferenz zwischen Feed- und Permeatseite. Zusätzlich kann ein elektrisches Feld als Triebkraft verwendet werden, um Ionen abzutrennen. Die Anzahl der druckbetriebenen Membranverfahren wird zusätzlich nach der Porengröße der Membran in Mikro-, Ultra- und Nanofiltration sowie die Umkehrosmose unterteilt. Abbildung 2-4 gibt einen Überblick, welche Komponenten oder Verunreinigungen mit Mikro-, Ultra- oder Nanofiltration sowie der Umkehrosmose abgetrennt werden können. In der pharmazeutischen Industrie werden hauptsächlich druckgetriebene Prozesse eingesetzt [Baker 2012]. Die Partikel- beziehungsweise Molekülgröße der zurückgehaltenen Komponenten nimmt von links nach rechts ab. In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit der Mikrofiltration gearbeitet, da die zu erwartende Größe der Präzipitate im Größenbereich von 0,1-100 µm liegen [Karpiński 2019].

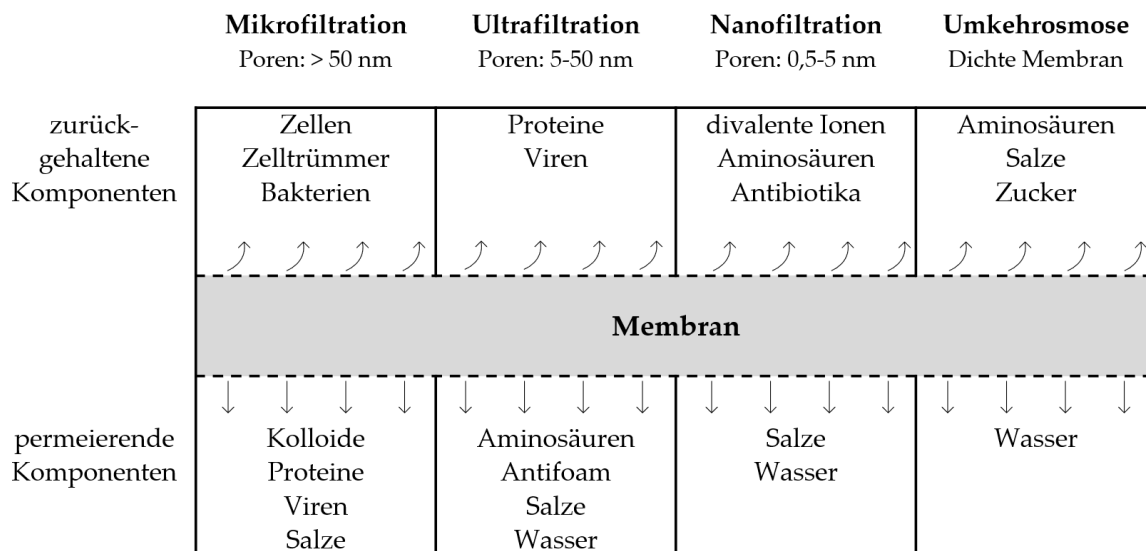


Abbildung 2-4: Übersicht der Abtrennung von Molekülen, die häufig in der Bioprozesstechnik anfallen (Adaptiert nach [van Reis 2007]).

### 2.2.2 Prozessführung und Modul Design

Die Membran selbst ist nur ein Teil des vollständigen Filtrationsprozesses, zudem ebenfalls Pumpen, der Feed Tank, die Schläuche und Ventile gehören sowie die notwendige Mess- und Regelungstechnik. Zudem ist ein Modul notwendig, welches die Einhausung der eigentlichen Membran darstellt. Allgemein muss ein Membranmodul bestimmten physikalischen, hydrodynamischen und ökonomischen Anforderungen genügen. Physikalisch muss eine effektive Separation gewährleistet werden und die Membran gegebenenfalls mit einer Stützschrift stabilisiert werden. Des Weiteren sollte ein geringer Druckverlust über die Membran abfallen und der Stofftransport der gelösten Komponenten optimiert sein. Darüber hinaus müssen Effekte wie das Konzentrieren einer gelösten Komponente an der Membranoberfläche (Konzentrationspolarisation) und das Verstopfen der Poren durch Partikel minimiert werden. Zuletzt müssen Membranmodule hinsichtlich Verpackung und Fertigung ökonomische Aspekte erfüllen sowie in der Handhabung einfach sein. Nicht alle Anforderungen können gleichermaßen berücksichtigt werden, sodass ein Priorisieren für den jeweiligen Membranprozess notwendig ist. Membranmodule können beispielsweise als Einwegartikel (Single-Use) verwendet werden, indem die Membran fest in einer Einhausung installiert und verklebt ist. Es sind aber auch Membranhaltungen erhältlich, bei denen lediglich die aktive Membran ausgetauscht werden kann. Grundsätzlich wird zwischen Normalflussfiltration (NFF, engl.: *Dead-End Filtration*) und Tangentialflussfiltration (TFF, engl.: *Cross-Flow Filtration*) unterschieden. Beide Filtrationsführungen sind in Abbildung 2-5 schematische dargestellt. Bei der Normalflussfiltration wird der Feedstrom direkt auf die Membran geleitet, sodass der Feedstrom dem Permeatstrom entspricht. Diese Filtrationstechnik ist anfällig für Kuchenbildung auf der Membran oder das vollständige Verblocken. Bei der Tangentialflussfiltration hingegen wird die Membran tangential überströmt und der Permeatstrom senkrecht dazu angezogen.

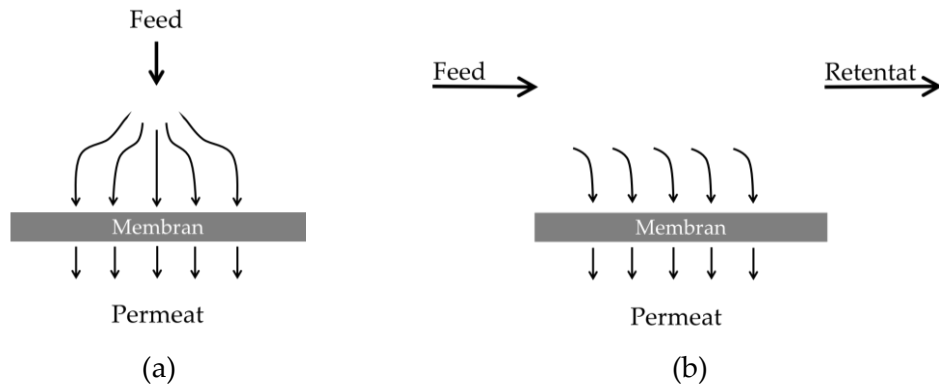


Abbildung 2-5: Schematische Darstellung der (a) Normalflussfiltration und der (b) Tangentialflussfiltration [Zeman 1996].

Der eintretende Strom teilt sich somit in einen Permeat- und einen Retentatstrom auf. Durch diese Art der Filtration kann die Kuchenbildung an der Membranoberfläche und die resultierende Verblockung reduziert werden. Es stellt sich ein Gleichgewichtszustand ein, sodass ein kontinuierlicher Betrieb ermöglicht wird. Die Filtrationsführung, ob NFF oder TFF, richtet sich nach Beschaffenheit des Feed Materials und dessen Verunreinigungen, sowie nach eventuell enthaltenen Partikel. Die NFF wird häufig für partikelfreie Feeds mit geringen Verunreinigungen verwendet. Die TFF wird verwendet, um Ablagerungen auf der Membran entgegenzuwirken. Durch die Einstellung hoher Flussraten im Membranmodul stellt sich ein Steady State zwischen Ablagerung und Mitreißen der Partikel ein. In Abbildung 2-6 sind schematisch die möglichen Prozessführungen aufgezeigt.

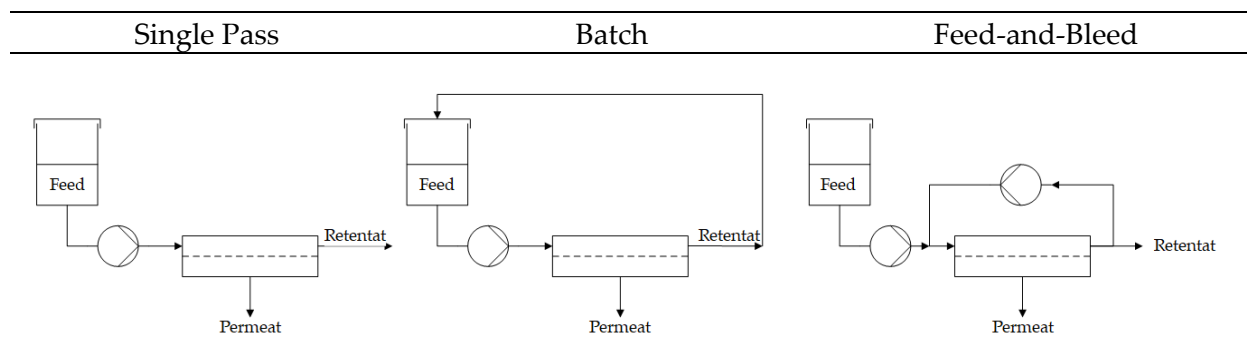


Abbildung 2-6: Schematische Darstellung der möglichen Prozessführungen einer TFF Membran (adaptiert nach [Zeman 1996]).

Die Single-Pass Konfiguration ist die einfachste Prozessführung. Hierbei wird der Feedstrom einmal über die Membranfläche geleitet und verlässt das Modul anschließend als Retentatstrom. Diese Prozessführung wird häufig angewendet, wenn das

Produkt im Permeat vorliegt und der Retentatstrom einen geringen Wert besitzt sowie einfach zu entsorgen ist. Um eine hohe Ausbeute zu erreichen, muss der Permeatfluss groß sein, wodurch eine entsprechende Membranfläche benötigt wird. Die Verweilzeit im Membranmodul ist vergleichsweise kurz. Grundsätzlich kann ein TFF Modul ebenfalls im Dead-End Modus betrieben werden, in dem die Retentatseite geschlossen wird [Zeman 1996]. Die Single-Pass Konfiguration hat in der Filtration von Bioprozessen jedoch eine geringe Bedeutung und wird hauptsächlich für die Wasseraufbereitung als Umkehrosmose betrieben [Zeman 1996]. Im klassischen Batch-Prozess wird der Retentatstrom vollständig zurück in den Feed Tank geleitet und das System im Kreis betrieben, bis die gewünschte Konzentration des Zielproduktes erreicht ist. Durch die Rückführung kann der Permeatstrom pro Überströmung geringgehalten werden, so dass die Belastung der Membran geringer ausfällt als im Single-Pass Prozess. Die Verweilzeit in der Batch Konfiguration ist jedoch durch die reduzierte Membranfläche sehr lang. Zusätzlich führt die Konzentrationssteigerung der gelösten Stoffe und Partikel im Feed Tank zu Limitierungen und daraus resultierend zu einer kontinuierlichen Reduktion des Permeatfluss. Als dritte Prozessführung steht die Feed-and-Bleed Konfiguration zur Verfügung, die meistens in Großtechnischen, kontinuierlich betriebenen Anlagen eingesetzt wird. Hierbei wird ein Teil des Retentatstroms (Feed) zum Membranmodul zurückgeführt, um eine definierte Flussrate im Modul einzustellen. Der zweite Teil des Retentatstroms (Bleed) wird kontinuierlich zum nächsten Prozessschritt oder Tank weitergeleitet. Durch die kurze Verweilzeit im Membranmodul muss die Membranfläche sehr groß sein, damit einen ausreichender Permeatstrom gewährleistet wird. Wird die Feed-and-Bleed Konfiguration im mehrstufigen Betrieb verwendet, lässt sich die Membranfläche der einzelnen Module reduzieren, da die jeweilige Belastung der Membran verringert wird. In Tabelle 2-1 sind die genannten Prozessführungen in Bezug auf Membranfläche und Verweilzeit gegenübergestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass für einen kontinuierlichen Betrieb eine mehrstufige Feed-and-Bleed Prozessführung am sinnvollsten ist. Allgemein kann gesagt werden, dass alle beschriebenen Filtrationsprozesse (Dead-

## 2. Stand der Technik

End oder Cross-Flow) mit konstantem Druck oder konstantem Fluss durchgeführt werden können [Miller 2013]. Die Prozesse in der vorliegenden Arbeit wurden mit einem konstanten Fluss betrieben.

Tabelle 2-1: Vergleich der Prozesskonfigurationen in Bezug auf die Membranfläche und die Verweilzeit [Zeman 1996].

Konfiguration	Membranfläche	Verweilzeit
Single-Pass	Moderat	Sehr kurz
Batch	Gering	Sehr lang
Feed-and-Bleed	Hoch	Kurz
Feed-and-Bleed (mehrstufig)	Gering	kurz

Jeder Membranprozess hat seine eigenen Anforderungen, wonach sich das jeweilige Moduldesign richtet. Allgemein muss aus technischer Sicht eine hohe Packungsdichte der Membran erreicht werden, um die aktive Fläche zu maximieren. Beim Eintragen von Partikeln durch den Feedstrom, muss eine gute Modulspülbarkeit beziehungsweise eine geringe Verblockungsneigung gegeben sein. Dies kollidiert unter Umständen mit einer maximalen Packungsdichte. Außerdem spielen die kostengünstige Fertigung und ein ökonomischer Membranwechsel zwischen zwei Prozessen eine große Rolle. Außerdem müssen Polarisierungseffekte an der Membran und ein geringer Druckverlust berücksichtigt werden. Abschließend sollen die Module chemisch, thermisch und physikalisch stabil sein und eine gleichmäßige Überströmung der Membran gegeben sein. Grundsätzlich werden Membranmodule in Flach- und Schlauchmembranen unterteilt. Abbildung 2-7 gibt einen kurzen Einblick in mögliche Bauformen von Membranmodulen.



Abbildung 2-7: Übersicht der verfügbaren Bauformen von Membranmodulen (adaptiert nach [Melin 2007])

Dabei nehmen die Packungsdichte und die kostengünstige Fertigung für alle Module von oben nach unten zu. Im Gegensatz dazu nehmen die Modulspülbarkeit sowie die Kapazität der Feststoffbeladung von unten nach oben zu. Dies verdeutlicht anschaulich, dass für jeden Prozess das individuelle Optimum gefunden werden muss. In der vorliegenden Arbeit werden ausschließlich Hohlfasermodule verwendet, da sie eine hohe Packungsdichte aufweisen und damit eine große Membranfläche zur Verfügung stellen. Die Präzipitate sind im Verhältnis zum Hohlfaserdurchmesser so gering, dass eine ausreichende Modulspülbarkeit für diesen Prozess ebenfalls erreicht wird. Aus diesem Grund wird im Folgenden ein kurzer Überblick über den Aufbau von Hohlfasermodulen gegeben. Die Anderen Bauformen werden nicht weiter thematisiert. Hohlfasermodule sind ein Bündel aus mehreren Fasern, die am Kopf der Einhausung fest verklebt sind (siehe Abbildung 2-8 (a)).

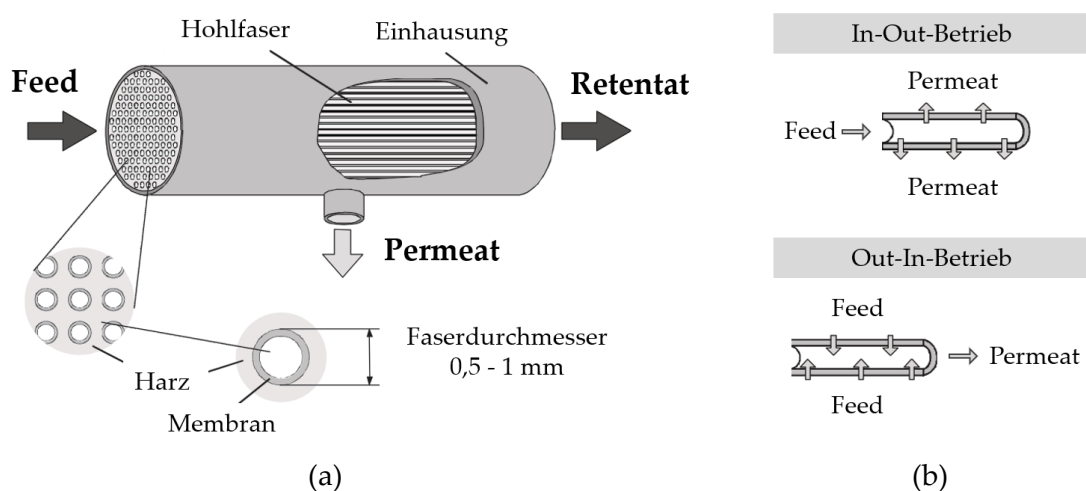


Abbildung 2-8: Schematische Darstellung (a) Aufbaus sowie (b) der möglichen Betriebsweisen eines Hohlfaser- bzw. Kapillarmoduls (adaptiert von [Melin 2007]).

Die einzelnen Fasern verhalten sich Fluidodynamisch wie ein Rohr, mit Faserdurchmesser im Bereich von 0,5 - 1 mm [Repligen 2022]. Der Betrieb der Fasern richtet sich nach der Positionierung der aktiven Schicht der Membran. Module, welche die aktive Schicht der Membran auf der Innenseite der Fasern angebracht haben, werden im In-Out-Betrieb verwendet. Eine Rückspülung wird von außen nach innen durchgeführt, um Reste auf der Membranoberfläche zu entfernen. Es ist ebenfalls möglich die aktive Schicht außen auf den Fasern anzubringen. Dementsprechend wird das Modul dann

im Out-in betrieb verwendet (siehe Abbildung 2-8 (b)) [Melin 2007, Zeman 1996].

### 2.2.3 Modellierung des Stofftransports an Membranoberflächen

Ein häufig beobachtetes Phänomen in der Filtration, gleichermaßen beim Normalfluss und Tangentialfluss, ist die Limitierung des Permeatflusses im Verlauf des Prozesses. Zum verbesserten Verständnis und zur mathematischen Beschreibung dieses physikalischen Effektes existieren in der Literatur mehrere empirische und theoretische Modellvorstellungen [Belfort 1994, Chew 2020]. Allgemein lassen sich die bekannten Modelle auf Grund ihrer physikalischen Effekte entweder den Diffusions- oder den hydrodynamischen Modellen zuordnen [Melin 2007]. Zu den Diffusionsmodellen gehören die Konzentrationspolarisation, das Modell des Osmotischen Drucks und das Gelschicht-Modell [Pradanos 1992, Song 1995, van den Berg 1990, Vilker 1984, Wijmans 1984, Zydney 1986]. Dabei ist der Einfluss von Diffusion bzw. Hydrodynamik abhängig von der Molekül- bzw. Partikelgröße im Filtrationsfeed. In Ultrafiltrationsprozessen überwiegen Diffusionseffekte, sodass der Permeatfluss mit steigender Molekülgröße abnimmt [Fane 1984]. Das liegt in dem geringen Diffusionsvermögen größerer Moleküle begründet, wodurch ein Rücktransport von der Membran in die Bulkphase ebenfalls absinkt. Ab einer Partikelgröße  $> 0,1 \mu\text{m}$  steigt der Permeatfluss wieder an und hydrodynamische Effekte überwiegen, welches in der Mikrofiltration der Fall ist [Fane 1984, Melin 2007]. Bei den hydrodynamischen Modellen sind das Deckschicht- und Ablagerungsmodell zu nennen [Gernedel 1981]. Die Selektivitäts- und Permeabilitätsanalyse eignet sich sowohl für Mikro- als auch die Ultrafiltration, da diese die Porengrößenverteilung der Membran mit dem der zu filtrierenden Komponenten vergleicht [Kanani 2010, Mehta 2005, Mochizuki 1993, Siddiqui 2016, Zeman 1996]. In druckbetriebenen Filtrationsprozessen, wie der Ultra- und Mikrofiltration, wird der volumetrische Permeatfluss ( $J_v$ ) in  $[\text{ml}/(\text{min} \cdot \text{cm}^2)]$  allgemein durch das Gesetz von Darcy (Gleichung (2-8)) beschrieben und ist abhängig von



dem Druck als Triebkraft ( $\Delta p$ ) in [Pa], der Viskosität ( $\eta$ ) in [Pa\*s] sowie dem Membranwiderstand ( $R_m$ ) in [1/cm] [Darcy 1856].

$$J_v = \frac{\Delta p}{R_m \eta} \quad (2-8)$$

Zudem sind die Eigenschaften der verwendeten Membran essentiell. Jedes Membranmaterial besitzt eine spezifische hydraulische Permeabilität ( $L_p$ ) in [cm/(Pa\*s)], welche durch die Membrandicke ( $\delta_m$ ) in [cm], die Porengröße ( $r_p$ ) in [cm] und die Porosität ( $\epsilon$ ) in [-] der Membran beeinflusst wird [Pradanos 1992]. Die hydraulische Permeabilität entspricht dem reziproken Membranwiderstand und wird mit Gleichung (2-9) berechnet.

$$L_p = \frac{J_v}{\Delta p} = \frac{\epsilon r_p^2}{8 \eta \delta_m} = \frac{1}{R_m \eta} \quad (2-9)$$

### Konzentrationspolarisation

Einen möglichen Berechnungsansatz für den abnehmenden Permeatfluss bieten Diffusionsmodelle, welche die Filmtheorie nutzen, um reale Stofftransportvorgänge an der Membran zu beschreiben. Bei einer überströmten Fläche oder einem durchströmten Rohr bildet sich ein parabolisches Geschwindigkeitsprofil aus. Die Strömungsgeschwindigkeit an der Wand ist, auf Grund von Reibungseffekten minimal, und ergibt sich zu Null. An dieser Stelle bildet sich eine laminare Grenzschicht aus, dessen Dicke ( $\delta$ ) von den vorherrschenden Strömungsbedingungen beeinflusst wird. Die Filmtheorie geht davon aus, dass innerhalb dieser Grenzschicht der Stofftransport ausschließlich durch Diffusion stattfindet. Der Stofftransport zur Wand erfolgt durch Konvektion, hervorgerufen durch die Strömung. Abbildung 2-9 (a) zeigt die schematische Entwicklung des parabolischen Geschwindigkeitsprofils in Röhren, zu denen die Hohlfasern gehören, sowie die laminare Grenzschicht an der Wand (gestrichelte Linie). Sobald die Membran teilweise oder vollständig undurchlässig für eine Komponente  $i$  ist, erfolgt der Stofftransport zur Membran schneller als der Abtransport durch den Permeatstrom. Als Resultat kommt es zu einer Konzentrationsüberhöhung der

Komponente an der Membran, welche in Abbildung 2-9 (b) dargestellt ist.

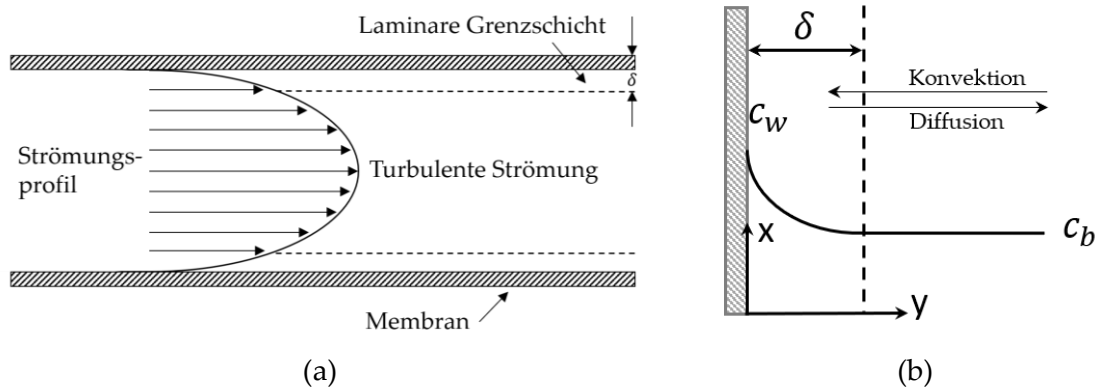


Abbildung 2-9: (a) schematische Darstellung des Strömungsprofils in einem Rohr und der sich ausbildenden laminaren Grenzschicht  $\delta$ . (b) zeigt die Konzentrationspolarisation an der Membran abgeleitet durch die Filmtheorie (adaptiert von [Baker 2004]).

Dieser Effekt wird als Konzentrationspolarisation bezeichnet. Die Konzentrationsdifferenz zwischen Wand und Bulk-Phase dient als Triebkraft für den diffusiven Rücktransport der akkumulierten Komponente in der Grenzschicht.  $c_b$  ist die Konzentration in der vollständig durchmischten Bulk-Phase und  $c_w$  die überhöhte Wandkonzentration. Die Filmtheorie legt eine Stoffmengenbilanz zur Berechnung der Vorgänge an der Membran zu Grunde. Der Stoffmengenstrom ( $\dot{n}_{i,TM}$ ) in [mol/s] über die Membran ergibt sich aus dem konvektiven Strom ( $\dot{n}_{i,konv}$ ) hin zur Membranoberfläche und dem diffusiven Rücktransport ( $\dot{n}_{i,diff}$ ) von der Membran zurück in die durchmischte Bulk-Phase (siehe Gleichung (2-10)).

$$\dot{n}_{i,TM} = \dot{n}_{i,konv} + \dot{n}_{i,diff} \quad (2-10)$$

Dabei ergibt sich der Stoffmengenstrom im Permeat ( $\dot{n}_{i,TM}$ ) aus dem Gesamtfluss ( $J_v$ ) und der Konzentration im Permeat ( $c_{i,p}$ ) der Komponente i (siehe Gleichung (2-11)). Ähnliches gilt für den konvektiven Stoffstrom der sich aus dem Gesamtfluss und der Konzentration ( $c_i$ ) im Feed zusammensetzt (siehe Gleichung (2-12)). Für den diffusiven Stoffstrom in der laminaren Grenzschicht wird das erste Fick'sche Gesetz aus Gleichung (2-13) herangezogen.

$$\dot{n}_{i,TM} = J_v c_{i,p} \quad (2-11)$$

$$\dot{n}_{i,konv} = J_v c_i \quad (2-12)$$

$$\dot{n}_{i,diff} = -D_i \frac{dc_i}{dy} \quad (2-13)$$

Das Vorzeichen gibt die Flussrichtung der Diffusion an [Baker 2012]. Werden die Gleichungen (2-11) – (2-13) in Gleichung (2-10) eingesetzt, resultiert nach Trennung der Variablen der in Gleichung (2-14) beschriebene Zusammenhang:

$$\int_{y=0}^{y=\delta} \frac{J_v}{D_i} dy = \int_{c_b}^{c_w} \frac{1}{(c_i - c_{i,p})} dc_i \quad (2-14)$$

Die linke Seite wird über die Grenzschichtdicke integriert und die rechte Seite über die örtliche Konzentrationsänderung in der Grenzschicht ( $\delta$ ) von der Wandkonzentration bis zur Konzentration in der durchmischten Bulk-Phase. Für den Permeatfluss resultiert der Zusammenhang in Gleichung (2-15) [Zydney 1997]:

$$J_v = \frac{D_i}{\delta} \ln \left( \frac{c_w - c_{i,p}}{c_b - c_{i,p}} \right) \quad (2-15)$$

Die Grenzschichtdicke ( $\delta$ ) ist meistens eine schwer zugängliche Größe [Ohlrogge 2005]. Aus diesem Grund wird der Massentransferkoeffizient  $k$  als Verhältnis des diffusiven Stofftransports zur Konzentrationstriebkraft in der Grenzschichtdicke angegeben [Zydney 1986], wie in Gleichung (2-16) angegeben ist. Die Bestimmung von  $k$  wird im nachfolgenden Abschnitt erläutert.

$$k = \frac{D_i}{\delta} \quad (2-16)$$

$$J_v = k \ln \left( \frac{c_w - c_{i,p}}{c_b - c_{i,p}} \right) \quad (2-17)$$

## Gelschicht Modell

Bei der Tangentialflussfiltration wird zusätzlich zwischen der membrankontrollierten und der deckschichtkontrollierten Filtration unterschieden. Die membrankontrollierte Filtration erzielt einen konstanten Permeatfluss, da Komponenten, die durch die Filtration an die Membran herangeführt, durch die Überströmung wieder abtransportiert werden. Der Rücktransport der akkumulierten Komponente wird hauptsächlich durch die Überströmung beeinflusst. Erreicht die Wandkonzentration

die maximale spezifische Konzentration der zurückgehaltenen Komponente, die sogenannte Gelkonzentration ( $c_g$ ), kommt es zu einer lokalen Präzipitation der Komponente und es bildet sich eine Gelschicht auf der Membranoberfläche. Eine weitere Erhöhung der transmembranen Druckdifferenz hat die Bildung einer dickeren Gelschicht zur Folge, wodurch der Permeatfluss nach dem Gesetz von Darcy unverändert bleibt. Es stellt sich somit, ein, vom Transmembrandruck unabhängiger, limitierender Permeatfluss ( $J_V^{\text{lim}}$ ) ein (siehe Gleichung (2-18)).

$$J_V^{\text{lim}} = k \ln \left( \frac{c_g}{c_b} \right) \quad (2-18)$$

Der Stofftransportkoeffizient ( $k$ ) bleibt in diesem Fall konstant. Um die Gelschichtbildung auf der Membran zu verhindern, ist der Betrieb unterhalb des kritischen Transmembrandrucks (TMP) zu empfehlen.

### **Osmotischer Druck**

Eine weitere Modellvorstellung der Diffusionsmodelle ist das des osmotischen Drucks. Durch die Akkumulation an der Membranoberfläche im Zuge der Konzentrationspolarisation kann ein osmotischer Druck ( $\Delta\pi$ ) in [Pa] ausgebildet werden, welcher dem angelegten Transmembrandruck entgegengesetzt ist. Der osmotische Druck bewirkt eine Reduzierung der TMP, woraus ein geringerer Transmembranfluss resultiert (Gleichung (2-19)).

$$J_v = L_p (\Delta p - \Delta\pi) \quad (2-19)$$

Für die Bestimmung des osmotischen Drucks sind Korrelationen in der Literatur zu finden [van den Berg 1990, Vilker 1984, Wijmans 1984]. Eine osmotische Druckdifferenz tritt häufig bei kleinen Molekülen auf, wie zum Beispiel Salzen. Proteine können ebenfalls die Ursache für einen hohen osmotischen Druck sein.

### Bestimmung des Stofftransportkoeffizienten

Die Bestimmung vom Stofftransportkoeffizienten ( $k$ ) spielt eine zentrale Rolle im Filtrationsprozess. Um eine Verbesserung des Permeatflusses auf Basis von Gleichung (2-17) herbeizuführen, muss der Stoffübergangskoeffizient maximiert werden. Das kann auf unterschiedliche Weisen erfolgen: Durch eine stärkere Durchströmung der Röhre wird die Turbulenz im Inneren erhöht, wodurch die Grenzschichtdicke verringert wird. Des Weiteren hat eine verringerte Grenzschicht eine Verringerung der Konzentrationspolarisation zur Folge. Der gleiche Effekt kann durch die Verbesserung des Diffusionskoeffizienten ( $D_i$ ) in  $[\text{cm}^2/\text{s}]$  erreicht werden [Baker 2004]. Eine Erhöhung des Transmembrandrucks wirkt sich negativ auf den Permeatfluss aus, da ein größerer Stoffstrom der nicht permierenden Komponente zur Oberfläche der Membran transportiert wird, wodurch eine Verstärkung der Konzentrationspolarisation folgt. Zur Bestimmung des Stoffübergangskoeffizienten eignen sich dimensionslose Kennzahlen (Gleichung (2-20)), welche physikalische Vorgänge charakterisieren, die sich aus der Dimensionsanalyse ergeben haben.

$$k = \frac{D_i Sh}{d_h} \quad (2-20)$$

Demnach ergibt sich der Stoffübergangskoeffizient  $k$  aus der Sherwood-Zahl ( $Sh$ ), dem Diffusionskoeffizienten ( $D_i$ ) und dem hydraulischen Durchmesser ( $d_h$ ), welche bei Hohlfasermodulen dem Innendurchmesser ( $d$ ) der Fasern entspricht. Die Sherwood-Zahl beschreibt das Verhältnis der effektiv übertragenen Stoffmenge zur diffusiv übertragenen Stoffmenge (siehe Gleichung (2-21)).

$$Sh = a Re^b Sc^c \left( \frac{d_h}{L_{ch}} \right)^d \quad (2-21)$$

Zur Bestimmung der Sherwood-Zahl gibt es in der Literatur mehrere Korrelationen, welche über die Konstanten  $a$ ,  $b$ ,  $c$  und  $d$  auf die vorliegenden Strömungsbedingungen im Prozess angepasst werden [Cheryan 1998, Zeman 1996]. Die Konstanten  $a$ ,  $b$ ,  $c$  und  $d$  sind in Tabelle 2-2 aufgeführt.

## 2. Stand der Technik

---

Tabelle 2-2: Korrelationen zur Bestimmung des Massentransfer Koeffizienten aus der Literatur [Cheryan 1998, Zeman 1996]

Konditionen	a	b	c	d	Ansatz	Quelle
Laminar (Röhre)	1,62	0,33	0,33	0,33	Theoretisch	[Lévêque 1928]
Laminar (Spalt)	1,86	0,33	0,33	0,33	Theoretisch	[Lévêque 1928]
Übergangsbereich	0,664	0,50	0,33	0,50	Theoretisch	[Grober 1961]
Turbulent	0,023	0,80	0,33	-	Momentum	[Gekas 1987]
Turbulent	0,023	0,875	0,25	-	Theoretisch	[Deissler 1954]

Einfluss haben dabei sowohl das vorliegende Strömungsregime (laminar oder turbulent) als auch die Geometrie des Strömungskanals. Zur Berechnung der Sherwood-Zahl werden zunächst die Reynolds-Zahl und die Schmidt-Zahl bestimmt. Darüber hinaus muss die charakteristische Länge ( $L_{ch}$ ) der Fasern bekannt sein, welche der Länge der einzelnen Faser entspricht. Die Reynolds-Zahl in Gleichung (2-22) gibt das Strömungsregime an, welches in den Fasern vorherrscht. Bei einer Reynolds-Zahl von  $> 4000$  liegt eine turbulente Strömung vor. In die Reynolds-Zahl geht die Strömungsgeschwindigkeit ( $u$ ), die Dichte ( $\rho$ ) und die Viskosität ( $\eta$ ) des Fluids mit ein.

$$Re = u \frac{\rho}{\eta} \quad (2-22)$$

Die Schmidt-Zahl gibt das Verhältnis des Impulsdiffusionsvermögens, durch das Strömende Fluid mit der kinematischen Viskosität ( $\nu$ ), zur Massendiffusion über den molekularen Diffusionskoeffizienten an (siehe Gleichung (2-23)).

$$Sc = \frac{\eta}{\rho D_i} = \frac{\nu}{D_i} \quad (2-23)$$

Der molekulare Diffusionskoeffizient für eine gelöste Komponente  $i$  wird durch die Korrelation von Young et al. in Gleichung (2-24) berechnet [Young 1980].

$$D_i = 8,34 \cdot 10^{-8} \frac{T}{\eta M_i^{\frac{1}{3}}} \quad (2-24)$$

Diffusionskoeffizienten für Partikel und Kolloide werden mit der Stokes-Einstein-Beziehung, unter Annahme kugelförmiger Partikel mit dem Durchmesser ( $d_p$ ), abgeschätzt. Es gilt Gleichung (2-25):

$$D_i = \frac{k_B T}{3 \pi \eta d_p} \quad (2-25)$$

Es gehen die Boltzmann-Konstante ( $k_B$ ), die Viskosität ( $\eta$ ) und die Temperatur ein. Die Gleichung geht von der Brown'schen Molekularbewegung aus, welche mit zunehmenden Partikelradius abnimmt. Diese Beschreibung ist nur bis zu einer bestimmten Partikelgröße zulässig [Fane 1984]. Es konnte gezeigt werden, dass ab einer Partikelgröße von  $> 0,1 \mu\text{m}$  andere Gesetzmäßigkeiten für die Diffusion der Partikel gelten [Fane 1984, Ripperger 1993]. Aus diesem Grund wurde der scherinduzierte Diffusionskoeffizient eingeführt (Gleichung (2-26)), welcher die Schubspannung ( $\tau_w$ ) auf ein Partikel, durch die Tangentialströmung mitberücksichtigen.  $B$  ist eine versuchsabhängige Konstante. Durch  $f(c_K)$  wird die Konzentrierung der zurückgehaltenen Komponente im Konzentrat berücksichtigt [Zydney 1986].

$$D_{eff} = \frac{B d_p^2 \tau_w}{\eta} f(c_K) \quad (2-26)$$

Die Wandschubspannung wird über das Newton'sches Gesetz aus Gleichung (2-27) berechnet. Diese ergibt sich aus dem Produkt der Viskosität ( $\eta$ ) und der Scherrate ( $\dot{\gamma}_w$ ).

$$\tau_w = \eta \dot{\gamma}_w \quad (2-27)$$

Die Scherrate im Hohlfasermodule ist abhängig von dem Volumenstrom ( $\dot{V}$ ), der die Membran tangential überströmt, der Anzahl der angeströmten Fasern ( $n_{fiber}$ ) und deren Durchmesser ( $r_{fiber}$ ) [Li 2020] (siehe Gleichung (2-28)).

$$\dot{\gamma}_w = \frac{4 \dot{V}}{n_{fiber} \pi r_{fiber}^3} \quad (2-28)$$

### Deckschichtmodell

Eine weitere Modellvorstellung zur Beschreibung des Stofftransports an Membranen geht davon aus, dass sich durch die Konzentrationspolarisation der hydraulische Widerstand ( $R_m$ ) der Membran um den Deckschichtwiderstand ( $R_D$ ) nach Gleichung (2-29) erhöht. In Analogie zur Elektrotechnik addieren sich in Reihe geschaltete Widerstände. Nach dem Gesetz von Darcy führt auch dieser Effekt zu einer Reduktion

des Transmembranflusses [Belfort 1994]. Dieser Effekt tritt häufig bei Systemen mit kleinen Partikeln auf, welche eine feste Schicht auf der Membranoberfläche bilden.

$$J_v = \frac{\Delta p}{\eta (R_m + R_D)} \quad (2-29)$$

Die Bestimmung des Deckschichtwiderstandes kann über die empirische Korrelation von Gernedel et al. nach Gleichung (2-30) erfolgen [Gernedel 1981].

$$R_D = \frac{\eta_K c_K}{\tau_w \rho_K} B(\Delta P_{TM}) \quad (2-30)$$

B ist ein dimensionsbehafteter und druckabhängiger Modellparameter, welcher durch Versuchsdaten bestimmt wird. Die Übertragbarkeit auf andere Stoffsysteme ist begrenzt [Ripperger 1993]. Beim erweiterten Deckschichtmodell hingegen werden der konvektive Transport zur Membran  $\dot{m}_{zu}$  und den Rücktransport ( $\dot{m}_{ab}$ ) in die Bulkphase berücksichtigt (siehe Gleichung (2-31) und (2-32)).

$$\dot{m}_{zu} = J_v \frac{\rho_P c_K}{\rho_P - c_K} \quad (2-31)$$

$$\dot{m}_{ab} = \frac{k_1 \lambda h \rho_K (\rho_P - c_K) u^2}{8 c_K \eta_F f(c_K)} \quad (2-32)$$

Zusätzlich werden die Dichte des abgetrennten Stoffs ( $\rho_P$ ) und die Konzentration des Retentats ( $c_K$ ) mitberücksichtigt [Ripperger 1992, Ripperger 1993]. Die Deckschichthöhe ( $h$ ), die in Abhängigkeit der Triebkraft, der Viskosität, des spezifischen Deckschichtwiderstandes und des Permeatflusses bestimmt werden kann, ist in Gleichung (2-33) angegeben. Der spezifische Deckschichtwiderstand ( $r_D = \frac{R_D}{h}$ ) wird, unter Berücksichtigung der Deckschichteigenschaften, mit der Carman-Kozeny-Gleichung (2-34) abgeschätzt.

$$h = \frac{\Delta p}{\eta_F r_D J_v} \quad (2-33)$$

$$r_D = \frac{160 (1 - \epsilon_D)^2}{d_p^2 \epsilon_D^3} \quad (2-34)$$



## Selektivitäts- und Permeabilitätsanalyse von Membranen

Zur Beschreibung von Membranprozessen existieren, wie bereits in den vorangegangenen Unterkapiteln aufgeführt, eine Vielzahl von Modellansätzen. Die zuverlässige Beschreibung von realen Membranen muss letztendlich trotzdem über Parameter, meistens empirisch, angepasst werden. Mehta und Zydney et al. haben einen weiteren Ansatz zur Beschreibung der Selektivitäts- und Permeabilitätsprozesse für die Ultrafiltration aufgestellt [Mehta 2005]. Dieser Ansatz berücksichtigt die Porengröße der Membran und ihrer Selektivitäts- und Permeabilitätseigenschaften und ist für zylindrische Poren aufgestellt worden. Kanani et al. haben diesen für schlitzförmige Poren erweitert [Kanani 2010]. Siddiqui et al. haben den Ansatz für die Mikro- und Ultrafiltration verwendet und als Ausgangspunkt genutzt, um das Modell für Veränderung der Porengeometrie während des Filtrationsprozesses abzubilden [Siddiqui 2016]. Bei der Herangehensweise der Selektivitäts- und Permeabilitätsanalyse wird der Porenradius der Membran mit dem hydrodynamischen Radius der Komponenten verglichen. Daraus resultiert ein, vom Porenradius abhängiger, Siebkoeffizient ( $S_a(r_p)$ ) der Membran, der mit Gleichung (2-35) berechnet wird [Mehta 2005, Siddiqui 2016, Zeman 1996].

$$S_a(r_p) = \left(1 - \frac{r_s}{r_p}\right)^2 \left(2 - \left(1 - \frac{r_s}{r_p}\right)^2\right) \exp\left(-0,7146 \left(\frac{r_s}{r_p}\right)^2\right) \quad (2-35)$$

Die hydrodynamischen Radien der gelösten Komponenten werden über Gleichung (2-4) bestimmt [Zeman 1996]. Der Siebkoeffizient liegt zwischen null und eins, sodass sich das Rückhaltevermögen der Membran für die jeweiligen Komponenten aus  $R = 1 - S_a(r_p)$  ergibt. Der beschriebene Siebkoeffizient wird als tatsächlicher Siebkoeffizient bezeichnet, welcher mit dem beobachteten und häufig verwendeten Siebkoeffizienten in folgendem Zusammenhang steht:

$$S_o = \frac{c_p}{c_b} = \left(\frac{c_w}{c_b}\right) S_a \quad (2-36)$$

### **Membran Fouling**

Der letzte Effekt, welcher den Permeatfluss limitieren kann, ist das Fouling der Membran. In der Mikro- und Ultrafiltration ist dies der Hauptfaktor für die Limitierungen des Permeatflusses [Ho 1999, Kelly 1995, Palacio 2002, Polyakov 2013]. Es beschreibt die irreversible Alterung einer Membran, die durch chemische Interaktion von Makromolekülen untereinander oder mit dem Membranmaterial auftreten [Zeman 1996]. Dabei werden die Membraneigenschaften bezüglich Porengröße und Selektivität signifikant verändert und erfordern im Nachgang des Prozesses ein intensives Reinigen oder Austauschen der Membran [Mehta 2005, Siddiqui 2016, Zeman 1981]. Die Veränderungen der Membran in Bezug auf Trennfähigkeit und Selektivität wird über den Siebkoeffizienten ausgedrückt [Kanani 2010, Mehta 2005, Zeman 1981]. Die Konzentrationspolarisation hingegen ist ein reversibles Stofftransport Phänomen in der laminaren Grenzschicht an der Membran, welches, durch Veränderungen der hydrodynamischen Betriebsparameter, umkehrbar ist [Zeman 1996]. Die Gleichungen zur Beschreibung des Membran Fouling richten sich nach der Betriebsweise „konstanter Fluss“ oder „konstanter Druck“. Wird ein konstanter Fluss eingestellt, wird mathematisch die Entwicklung des Transmembrandrucks im Prozessverlauf beschrieben. Bei der Betriebsweise „konstanter Druck“ wird die Veränderung des Membranwiderstands abgebildet, woraus ebenfalls im Prozessverlauf ein abnehmender Permeatfluss resultiert. In der Literatur werden vier hauptsächliche Gesetzmäßigkeiten für Verblockungsmechanismen beschrieben, welche für die Normalfluss- und Tangentialflussfiltration gleichermaßen anwendbar sind [Hermia 1985, Sampath 2014]. Die vier Verblockungsmuster sind schematisch in Abbildung 2-10 dargestellt und werden kurz erläutert.

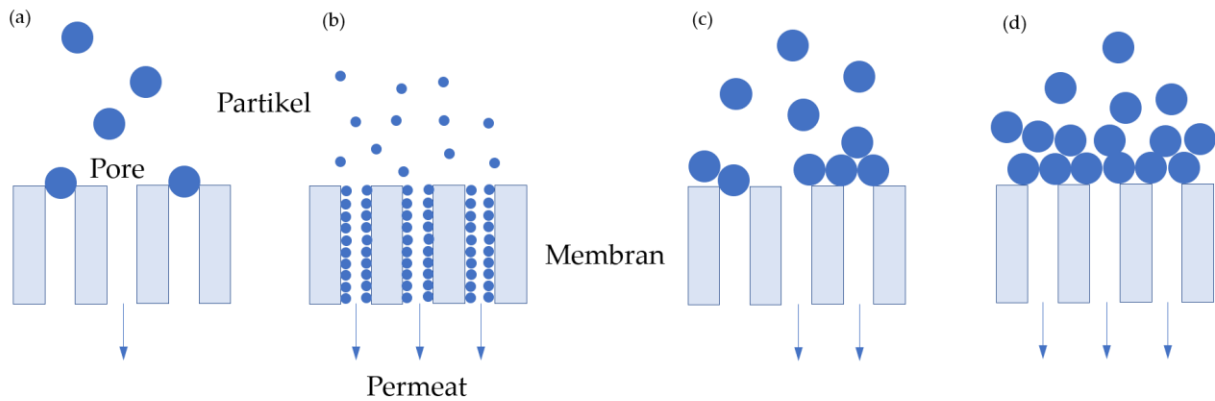


Abbildung 2-10: Schematische Darstellung der Verblockungsmechanismen von Membranen. (a) Vollständiges Blocking, (b) Standard Blocking, (c) Intermediate Blocking und (d) Kuchenbildung.

Abbildung 2-10 (a) zeigt die vollständige Verblockung der Membran, hervorgerufen durch Partikel, die eine ähnliche Größe aufweisen wie die Poren der Membran. Die Partikeln setzen sich auf den Poren ab und verstopfen diese vollständig, sodass sich die aktive Membranfläche reduziert. In (b) ist das Standard Blocking gezeigt, welches auftritt sobald die Partikel kleiner als die Porengröße der Membran sind und sich Aufgrund von Wechselwirkungen im Inneren der Poren ablagern. Bei der Kuchenfiltration lagern sich die Partikel auf der Membran ab und erhöhen den hydraulischen Widerstand. Dieser Mechanismus hat keine Reduktion der Porenanzahl zur Folge. Das Intermediate Blocking ist eine Kombination aus einer Kuchenbildung auf der Membran und dem Verstopfen einzelner Poren, wie bereits bei der vollständigen Verblockung der Poren beschrieben ist. In der vorliegenden Arbeit wird ausschließlich die betriebsweise „konstanter Fluss“ verwendet. Diese vier Verblockungsmechanismen mathematisch mit der allgemeingültigen Gleichung (2-37) beschrieben werden [Iritani 2016]. Es wird die Druckänderung in Abhängigkeit des filtrierten spezifischen Volumens  $v$  beschrieben. Dabei sind  $K$  und  $n$  Konstanten.

$$\frac{dp}{dv} = K p^n \quad (2-37)$$

Der Exponent  $n$  beschreibt den Verblockungsmechanismus der Membran (siehe Tabelle 2-3), welcher gleichermaßen für die Prozessführung mit konstantem Druck oder konstanten Fluss gültig ist. Die Filtrationskonstanten  $K_b$ ,  $K_s$ ,  $K_i$  und  $K_c$  werden aus

## 2. Stand der Technik

experimentellen Daten bestimmt. Durch die Auftragung der Druckdaten, wie in Tabelle 2-3 gezeigt, können die Werte für die unterschiedlichen Filtrationskonstanten aus der Steigung der Versuchsdaten ermittelt werden. Die Korrelation, welche die beste Übereinstimmung mit den experimentellen Daten zeigt, wird als Verblockungsmechanismus angenommen. In weiteren Arbeiten ist gezeigt worden, dass häufig eine Überlagerung der Effekte auftritt. Die Verknüpfung der vier Modelle hat entsprechend zu einer besseren Vorhersage geführt [Ho 2000, Iritani 2016, Sampath 2014].

**Tabelle 2-3:** Übersicht der mathematischen Beschreibung der gängigen vier Verblockungsmechanismen von Membranen [Iritani 2016].

Vollständiges Blocking	Standard Blocking	Intermediate Blocking	Kuchenfiltration
$n = 2$	$n = 1,5$	$n = 1$	$n = 0$
$\frac{p_0}{p} = 1 - \frac{K_b}{J_0} * v$	$\left(\frac{p_0}{p}\right)^{\frac{1}{2}} = 1 - \frac{K_s}{2} * v$	$\ln\left(\frac{p}{p_0}\right) = K_i * v$	$\frac{p}{p_0} = 1 + K_c * J_0 * v$
<p>(a)</p>	<p>(b)</p>	<p>(c)</p>	<p>(d)</p>

### 2.3 Quality by Design

Quality-by-Design (QbD) ist ein systematischer Ansatz zur Prozessentwicklung und Herstellung von Medikamenten [Yu 2014], der sich als neuer Standard in der Pharmazeutischen Industrie etabliert hat. Schwerpunkt liegt dabei auf einem umfangreichen Risikomanagement und der Entwicklung einer Kontrollstrategie, um das definierte Qualitätsziel zu erreichen. Die Vorteile des QbD Ansatzes sind ein höheres Produkt- und Prozessverständnis, wodurch die Prozessstabilität verbessert wird und weniger Schwankungen zwischen einzelnen Chargen auftreten [ICH 2009]. Qualitätskontrollen während des Prozesses gewährleisten die frühzeitige Erkennung von

Abweichungen und beugen Vernichtung von Chargen vor. Des Weiteren können nachträgliche Optimierungen an einem zugelassenen Prozess vorgenommen werden, ohne eine erneute Zulassung durch Regulierungsbehörden beantragen zu müssen [ICH 2009]. Die Voraussetzung ist, dass sich die Verbesserungen im bereits zugelassenen Betriebsbereich befinden. Dies bietet ein erhöhtes Maß an Flexibilität im Betrieb des jeweiligen Prozesses. Auf globaler Ebene haben sich die Aufsichtsbehörden der Vereinigten Staaten (*U.S. Food and Drug Administration, FDA*), Japans (*Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, PMDA*) und der Europäischen Union (*European Medicines Agency, EMA*) mit Experten aus der pharmazeutischen Industrie zusammenschlossen und das Projekt „*International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceutical for Human Use*“ (ICH) zur Harmonisierung der Herstellungsverfahren ins Leben gerufen. In diesem Zusammenhang wurden mehrere Richtlinien (Q8/Q9/Q10/Q11) veröffentlicht, welche die zentralen Punkte der QbD-Prinzipien hinsichtlich Prozessentwicklung, Risikomanagement und Qualität beschreiben [FDA 2013, ICH 2006, ICH 2008, ICH 2009, ICH 2012]. Uhlenbrock et al. haben den QbD Ansatz in einem Workflow zusammengefasst, welcher in Abbildung 2-11 gezeigt ist.

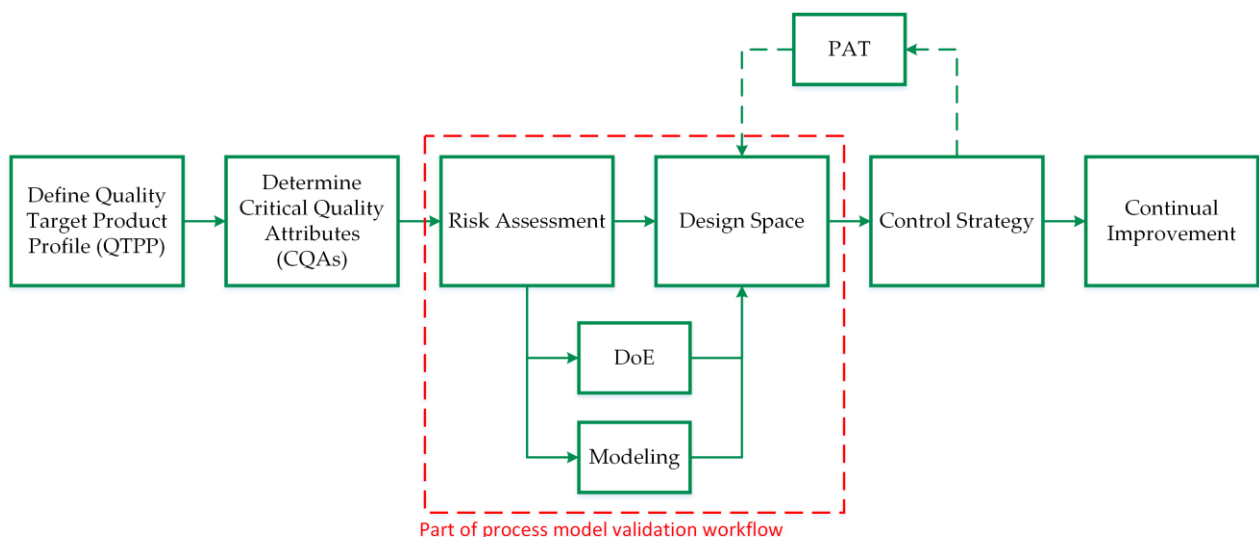


Abbildung 2-11: Quality by Design Workflow als Ansatz zur Sicherstellung des Qualitätsprofils während der Entwicklung des Prozesses [Uhlenbrock 2017]. Der rot umrandete Modell-Validierungs-Workflow basiert auf der Arbeit von Sixt et al. [Sixt 2018] und wird im späteren Verlauf detailliert erläutert.

Der QbD Ansatz startet mit der Definition eines Qualitätsprofils des Produktes (*engl, Quality Target Product Profile, QTPP*). Anschließend werden aus dem QTPP die kritischen Qualitätsattribute (*engl, Critical Quality Attributes, CQA*) abgeleitet, welche Einfluss auf die Prozess- und Produktqualität gezeigt haben. Darauf folgt die Identifizierung von Risiken und deren Bewertung. FDA und EMA schlagen dazu Tools wie das Ishikawa-Diagramm und die Auswirkungsanalyse (Failure-Mode-Effect-Analysis, FMEA) vor. Basierend auf der Risikobewertung wird letztlich ein geeigneter, multidimensionaler Betriebsbereich (Design Space) abgeleitet, indem sich die Prozessparameter bewegen dürfen, während trotzdem die zu Beginn definierte Qualität eingehalten wird. Die Ableitung erfolgt entweder im Rahmen eines experimentellen Versuchsplans (Design of Experiments, DoE) oder über Simulationen mit validierten physiko-chemischen Prozessmodellen. Aufbauend auf dem Design Space wird eine Kontrollstrategie entwickelt, welche das Einhalten des Betriebsbereichs gewährleistet. Um die Kontrollstrategie anwenden zu können, ist eine leistungsstarke Onlinemess-technik notwendig, damit Schwankungen während des Prozesses überwacht werden können. Dazu hat die FDA zusammen mit dem Center for Drug Evaluation and research (CDER), dem Center for Veterinary Medicine (CVM) und dem Office of Regulatory Affairs (ORA) die Process-Analytical-Technology (PAT) Initiative ins Leben gerufen [FDA 2004]. Sind die benötigten Prozessgrößen messtechnisch nicht zugänglich, kann alternativ ein Prozessmodell, ein sogenannter Digitaler Zwilling, herangezogen werden, um Prozessparameter zu schätzen.

### 2.4 Process-Analytical-Technology für die Präzipitation

Die Präzipitation wird bisher noch wenig zur Herstellung von Biologics verwendet. Aufgrund dessen sind bisher nur wenige Arbeiten zur Online-Messtechnik im Zusammenhang mit der Fällung veröffentlicht worden. PAT-bezogene Arbeiten wurden für die Alkoholpräzipitation [Huang 2011, Huang 2018, Jin 2013, Sirivat 2014, Sun 2018, Wu 2012, Xu, Xu 2012] die Fällung mit Säuren [Sun 2020], und für die PEGylierung [Hebbi 2021] veröffentlicht. Die meisten dieser Arbeiten verwendeten NIR als

spektroskopische Methode und nur wenige haben sich mit FTIR und Raman [Meyer-Kirschner 2016, Schöll 2007] beschäftigt. Darüber hinaus wurden Fokusstrahl-Reflexionsmessung (FBRM) und Partikel-Vision-Messung (PVM) verwendet, um die Partikel während der Präzipitation hinsichtlich ihrer Anzahlverteilung und Form zu untersuchen [Wu 2011]. Andere Spektroskopische Methoden wie Raman [Buckley 2017, Feidl 2019, Meyer-Kirschner 2016], FTIR (Fourier-Transformierte Infrarotspektroskopie) [Boulet-Audet 2016, Großhans 2018, Walther 2014, Wang 2008], DAD (Dioden-Array-Detektor) [Brestrich 2018, Zobel-Roos 2017] und Fluoreszenz [Moore-Kelly 2019, Sauer 2019] sind bisher für andere Grundoperationen erfolgreich zur Überwachung von CQAs eingesetzt worden [Brestrich 2014, Kornecki 2018, Zobel-Roos 2017] und bieten einen vielversprechenden Ausgangspunkt um weitere Untersuchungen für die Präzipitation daraus abzuleiten.

## **2.5 Untersuchte Biologische Stoffsysteme**

In diesem Abschnitt werden die zwei verwendeten Stoffsysteme eingeführt und deren Besonderheiten sowie Wirkungsweisen erläutert.

### **2.5.1 Monoklonale Antikörper**

Im lebenden Organismus übernimmt das adaptive Immunsystem die Funktion, Antigene zu identifizieren und zu eliminieren [Christen 2015]. Die am häufigsten vorkommenden Antikörper sind vom Typ Immunglobulin G (IgG), welche ca. 75% des Immunsystems im Blutserum ausmachen [Clark 2009]. Diese Antikörper haben stets denselben Y-förmigen Aufbau und bestehen aus vier Polypeptidketten: zwei identischen leichten und zwei schweren Ketten, welche über Disulfid-Brücken miteinander verknüpft sind (siehe Abbildung 2-12). Des Weiteren bestehen die schweren und leichten Ketten jeweils aus einem konstanten Fc-Fragment und einem variablen Fab-Fragment [Lottspeich 2006]. Das variable Fab-Fragment besteht ebenfalls aus einer konstanten Region und dem variablen Teil (Fv-Fragment), welcher die spezifische Bindungsstelle für ein Antigen enthält [Clark 2009].

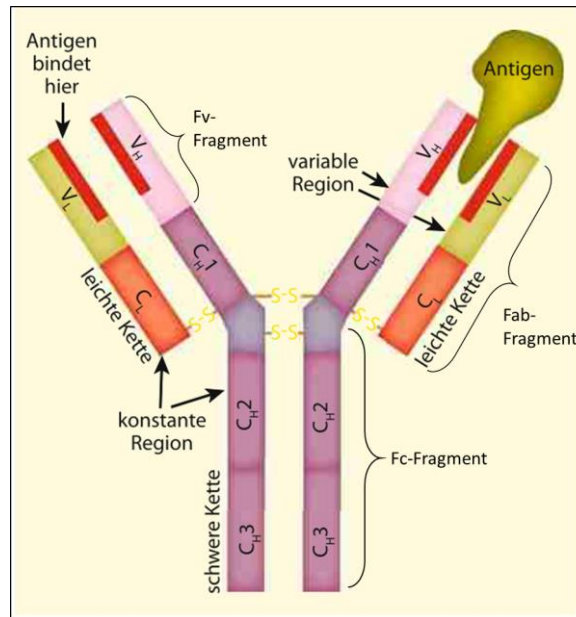


Abbildung 2-12: Aufbau eines Immunglobulins des Typs IgG 1 [Clark 2009].

Monoklonale Antikörper (mAb) sind Immunglobuline, welche auf einen einzigen B-Lymphozyten zurückzuführen sind, sodass sie über die gleiche, variable Bindungsstelle verfügen. Das bedeutet, dass sie gegen ein spezifisches Epitop eines Erregers gerichtet sind. Bei einer natürlichen Immunantwort des Körpers kommt es zu einer polyklonalen Immunreaktion, dessen Antikörper auf mehrere B-Lymphozyten zurückzuführen sind, sodass sich die Immunantwort gegen mehrere Epitope des Erregers richtet. Die Herstellung von gezielten monoklonalen Antikörpern ist besonders für die moderne Medizin und die Diagnostik [Clark 2009] von großem Interesse [Gaughan 2016, Posner 2019]. Um monoklonale Antikörper mit der gleichen, variablen Bindungsstelle in größeren Mengen herzustellen, müssen die entsprechenden B-Lymphozyten isoliert und kultiviert werden. Diese sind in Zellkultur jedoch nur begrenzt überlebensfähig. Durch die Hybridomatechnik [Köhler 1975], welche die Fusion eines B-Lymphozyten mit einer Tumorzelle bedeutet, erlangen die sogenannten Hybridomazellen eine unbegrenzte Teilbarkeit, solange ausreichend Nährstoffe zur Verfügung stehen. Derzeit werden monoklonale Antikörper beispielsweise gegen Rheumatische Erkrankungen [Schmid 2016], Autoimmun- und Entzündungserkrankungen [Bielekova 2010, Chun 2020, Kotsovilis 2014, Posner 2019], Asthma [Catley 2011], Osteoporose [Faienza 2018] sowie in der Krebstherapie [Galluzzi 2012, Jelinek 2016,



Kimiz-Gebologlu 2018, Mehren 2003, Tol 2010] eingesetzt. Außerdem stehen geeignete Kandidaten gegen das Coronavirus im Interesse der Wissenschaft [Kumar 2021].

## 2.5.2 Antikörper Fragmente

Als zweites Stoffsystem ist ein scFv-Fragment (engl.: single chain fragment variable), mit einem Molekulargewicht von ca. 27 kDa, untersucht worden. Es handelt sich dabei um ein künstlich hergestelltes Fv-Fragment [Chmiel 2011], welches ausschließlich über die variablen Bindungsstelle des vollständigen Antikörpers (IgG) verfügt [Holt 2003]. Auf Grund des fehlenden, konstanten Teiles des Fab-Fragments, sind die  $V_L$ - und die  $V_H$ -Domäne mit einem Linker verknüpft (siehe Abbildung 2-13) [Holliger 2005]. Die Herstellung von scFv-Fragmenten erfolgt in gentechnischen veränderten Zellen, indem die Gene der  $V_L$ - und die  $V_H$ -Domäne in ein Plasmid kloniert und anschließend in einer Bakterienzelle exprimiert werden [Clark 2009]. Die Produktion erfolgt periplasmatisch in E.Coli [Helgers 2022, Korz 1995].

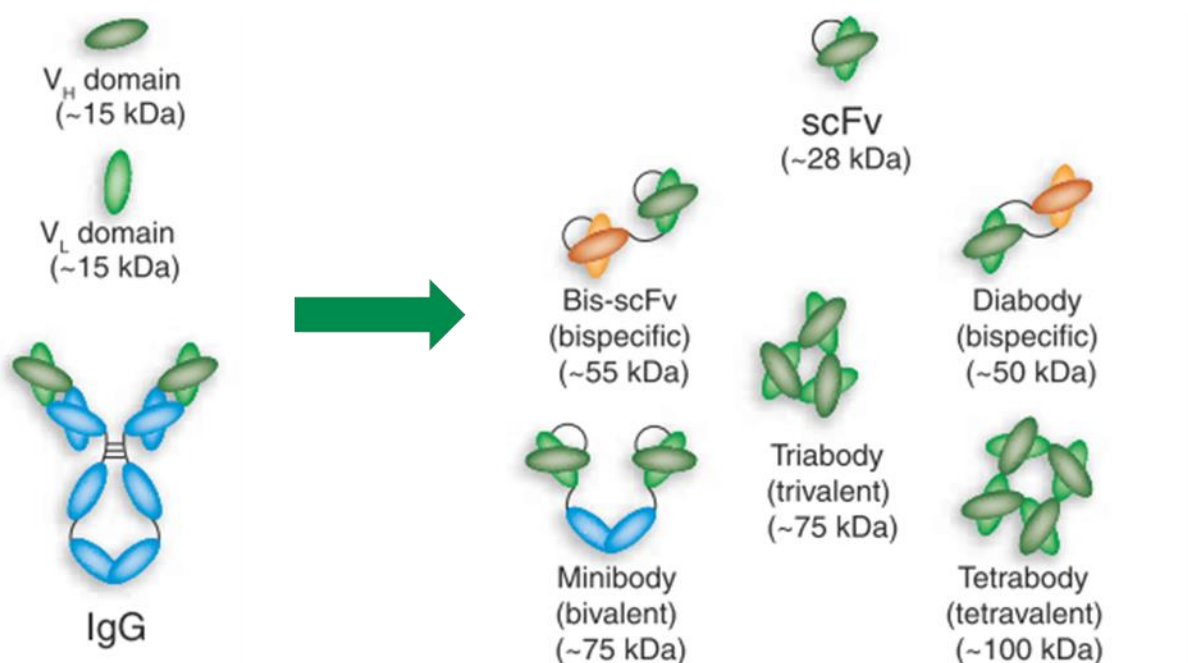


Abbildung 2-13: Mögliche sc-Fragmente abgeleitet von einem Immunoglobulin Typ IgG. Bis-scFv (orange) verfügen über unterschiedliche variable Regionen um zwei Epitope zu erkennen. Adaptiert nach [Holliger 2005].

## 3. Material und Methoden

In diesem Abschnitt werden die verwendeten Materialien und Methoden aufgeführt, welche für die durchgeführten Experimente in der vorliegenden Arbeit notwendig gewesen sind. Das Kapitel wird in zwei Teile unterteilt, welche die unterschiedlichen Methoden für die zwei Stoffsysteme widerspiegeln. Methoden, welche für beide Stoffsysteme eingesetzt worden sind, werden einmalig am Ende des Kapitels beschrieben.

### 3.1 Stoffsystem monoklonale Antikörper

#### Zellkultur

Die Produktion eines Immunoglobulin von Typ IgG1 wird durch die hausinterne Kultivierung von CHO-Zellen (Chinese hamster ovary) hergestellt. Es wird der Zellklon CHO DG44 [Urlaub 1980, Urlaub 1983, Urlaub 1986] in serumsfreien Medium (Cellca-CHO Expression Plattform, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Germany) im Bioreaktor (Biostat® B-DCU, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Germany) mit einem Fassungsvermögen von 2 L kultiviert. Über die B-DCU werden folgende Zellkulturbedingungen eingestellt und während des Prozesses online überwacht:  $T = 37\text{ °C}$ ,  $\text{pH} = 7.1$ , Sauerstoffsättigung ( $p_{\text{O}_2} = 60\%$ ), Rührerdrehzahl  $n = 433\text{ rpm}$ . Der Fed-Batch Betrieb wird durch Zugabe der Fütterungsmedien (Feed A und Feed B) nach 72 h gestartet. Die Zellzahl wird durch eine Trübungssonde online überwacht und gibt eine erste Einschätzung über den Kultivierungsverlauf. Zur detaillierten Analyse wird täglich eine Probe entnommen und auf Produkttiter, Nebenkomponenten, Aminosäuren, Glukose, Laktat und Zellzahl untersucht. Die Offline-Bestimmung der Zellzahl ist notwendig, da mit der Trübung nicht zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden kann. Die Kultivierungsdauer beträgt zehn Tage.

### **Wässrige Zweiphasenextraktion**

Die wässrige Zweiphasenextraktion (*engl.: Aqueous two-phase extraction, ATPE*) wird nach der Kultivierung als Kombination aus Zellernte und Capture Schritt durchgeführt [Schmidt 2017, Schmidt 2018]. Als phasenbildende Komponenten werden die Kultivierungsbrühe, Polyethylenglykol (PEG) mit einem mittleren Molekulargewicht von 400 Da (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) und eine 40 wt% Phosphatlösung eingesetzt. Diese besteht aus 262,09 g di-Natriumphosphatdihydrat (Merck, Darmstadt, Germany), 198,39 g Kaliumdihydrogenphosphat (Merck, Darmstadt, Germany) und 539,52 g Reinstwasser. Die Mischung wird im Inkubator bei 100 rpm für 5 min geschüttelt und die Phasen anschließend im Scheidetrichter getrennt. Das Gemisch trennt sich in eine leichte und schwere Phase als auch eine Interphase in der die Zellen verbleiben. Die Verteilung des Antikörpers findet vollständig in die leichte Phase statt, welche den Feed für die nachfolgenden Präzipitationsexperimente darstellt.

### **Präzipitation**

Als Präzipitationsmittel wird im Rahmen der Antikörperstudie Polyethylenglykol mit unterschiedlichem Molekulargewicht von 1450, 4000, 6000, 8000 und 12000 g/mol (Pellets, Sigma Aldrich) zur Bestimmung der Löslichkeitskurven verwendet. Im weiteren Verlauf hat sich gezeigt, dass für die Präzipitation des Antikörpers PEG 4000 (Pellets, Sigma Aldrich) am sinnvollsten ist, da es bei einem Gewichtsanteil von 12 wt% den Antikörper vollständig fällt und gleichzeitig > 80% der Nebenkomponten in Lösung bleiben [Lohmann 2020]. Während des Präzipiationsprozesses werden zwei PEG 4000 Lösungen verwendet (12 wt% und 40 wt%). Die 40 wt%ige Lösung ist das Präzipitationsmittel und die 12 wt%ige Lösung dient zum Waschen der Präzipitate, um oberflächliche Verunreinigungen zu entfernen. Die Präzipitationsbedingungen von 12 wt% PEG 4000 werden während des Waschschriffs gehalten, so dass sich der Antikörper nicht zurück lösen kann. Präzipitationsexperimente werden zum einen für die Ermittlung der Löslichkeitskurve durchgeführt und zum anderen

### 3. Material und Methoden

---

im halbkontinuierlichen und kontinuierlichen Betrieb. Die verschiedenen Durchführungen werden im Folgenden beschrieben. Für die Screening-Experimente zur Ermittlung der Löslichkeitskurve werden kleine Ansätze in Zentrifugen Vials angesetzt. Es werden jeweils 5 g leichte Phase verwendet und der Gewichtsanteil (1 wt% – 17 wt%) für die variierenden PEGs (1450 - 12000 Da) berechnet. Die Vials werden anschließend bei 4000 g zentrifugiert und eine Probe des Überstands genommen. Dieser wird in der Protein A Chromatographie auf die Antikörperkonzentration und in der SEC auf die Nebenkomponenten untersucht. Im Batch Betrieb findet die Präzipitation in einem Rührkessel (600 mL) und einer Rührerdrehzahl von  $n = 300$  rpm statt. Die leichte Phase aus der ATPE wird im Rührkessel vorgelegt. Zur Initiation der Präzipitation wird die PEG 4000 Lösung (40 wt% PEG 4000) hinzugefügt und die Mischung einheitlich in allen Experimenten für zehn Minuten gerührt, um eine vollständige Mischung zu gewährleisten [Lohmann 2020, Lohmann 2021]. Im kontinuierlichen Betrieb findet die Präzipitation in einem statischen Mischer statt (Innendurchmesser: 48mm/ Länge: 130mm/ 32 Helix Mischelemente). Die benötigten Lösungen im kontinuierlichen Prozess sind identisch zum Batch-Prozess. Das Verhältnis der leichten Phase zum Präzipitationsmittel (40 wt% PEG 4000) wird über die geförderten Volumenströme in den Mischer eingestellt.

#### **Filtration**

Die Filtration wird zur Fest-Flüssig-Trennung der Präzipitate und des Überstands verwendet. Der Filtrationsschritt ist notwendig um das Zielprodukt, welches bei korrekt eingestelltem Verhältnis von Präzipitationsmittel zu Feed, zu 100% im Präzipitat vorliegt. Es wird im Batch als auch im kontinuierlichen Betrieb ein Hohlfasermodule mit einer Porengröße von  $0,2 \mu\text{m}$  (Membranfläche:  $88 \text{ cm}^2 / 470 \text{ cm}^2$ , Midikros/Micros, Repligen Corporation, Rancho Dominguez, CA, USA) eingesetzt, da es aufgrund seiner Geometrie Vorteile beim Auflösen der Präzipitate bietet. Im Batch-Prozess werden die Präzipitate durch eine Dead-End Filtration auf der Membranoberfläche

abgeschieden, indem die Retentatseite abgeklemmt wird. Die Auflösung erfolgt in einem zweiten Schritt durch Öffnen der Retentatseite und Überströmung der Membranfläche mit dem Auflösungspuffer. Im kontinuierlichen Betrieb wird die Suspension aus Überstand und Feststoff im Tangentialfluss aufkonzentriert. Durch eine Rückführung von der Retentatseite zur Feed Seite wird über eine zusätzliche Pumpe das Strömungsregime im Modul eingestellt und eine hohe Scherrate im Modul erzeugt. Diese sorgt dafür, dass sich die Präzipitate verlangsamt auf der Membranoberfläche ablagern. Die Druckdifferenz über die Membran wird durch eine weitere Pumpe auf der Permeatseite erzeugt.

#### **Waschen der Präzipitate**

Die vorangehende Präzipitation wird für alle Screening-Experimente, zur Bestimmung einer geeigneten Waschlösung, identisch durchgeführt. Es wird jeweils 10 g Brühe und 4,29 g PEG 4000 (40 wt%) verwendet. Die Präzipitate werden durch schonende Zentrifugation bei 500 g vom Überstand getrennt und dieser anschließend dekantiert. Die niedrige Zentrifugalbeschleunigung ist notwendig, damit ein Kompaktieren der Präzipitate verhindert wird, welche die Auflösung erschwert. Die beschriebenen Waschlösungen werden volumengleich zum Feed auf die Präzipitate gegeben und mit einem Vortexer dispergiert. Anschließend werden die Präzipitate wieder vom Überstand durch die Zentrifugation bei 500 g getrennt. Die Überstände werden dekantiert und jeweils in der Protein A Chromatographie auf den Antikörper Titer untersucht. Zur Auflösung wird erneut volumengleich zum Feed der Auflösungspuffer (Natrium/Phosphat-Puffersystem mit pH = 5,5) auf die Präzipitate gegeben und für fünf Minuten inkubiert.

#### **Auflösung der Präzipitate**

Zur Auflösung der Präzipitate wird ein Natrium/Phosphat-Puffersystem mit pH = 5,5 und einer Salzkonzentration von 50 mM verwendet. Es ist der Puffer identisch mit dem Laufpuffer der in der nachfolgenden Ionenaustausch Chromatographie, welches einen Pufferwechsel nach der Präzipitation nicht erforderlich macht. Im Batch-Prozess

### 3. Material und Methoden

---

wird der Auflösungspuffer im Verhältnis 1:2 entlang der Hohlfasern für sechs Stunden durch das Hohlfasermodule im Kreis gefahren. Dabei wird eine Ausbeute von > 90% erreicht. Durch das vollständige Entfernen des polymerreichen Überstandes wirkt der PEG Gehalt nicht limitierend auf die Auflösung des Antikörpers. Im kontinuierlichen Prozess wirkt ein Restpolymergehalt von < 3 wt% nicht mehr limitierend auf die Auflösung des Antikörpers. Dafür wird ein Verdünnungsverhältnis von 1:5 des Prozessvolumen zum Auflösungspuffer eingestellt.

#### **Analytische Methoden**

Zur Charakterisierung und Bewertung der Präzipitationsexperimente werden die Konzentration der Zielkomponente und dessen Reinheit im Feed und im Produkt offline mit Chromatographie Methoden analysiert. Die Probenahme in den Batchexperimenten erfolgt im Feed (2 mL), im Überstand (2 mL) und im aufgelösten Produkt. Im kontinuierlichen Betrieb werden, mit einem Intervall von fünf Minuten, Proben aus dem Produktbehälter entnommen. Die Produktkonzentration wird mit der Protein A Chromatographie (PA ID Sensor Cartridge, Applied Biosystems, Bedford, MA, USA) mit einer Gradienten Methode durchgeführt. Es wird ein Phosphat-Puffersystem (PBS) eingesetzt (Puffer A), welcher mit 80% Phosphorsäure auf einen pH-Wert von 2,6 abgesenkt wird (Puffer B). Die Beladung findet mit Puffer A bei pH 7,4 und die Elution mit Puffer B bei pH 2,6 statt. Zur Bestimmung der Reinheit wird die Yarra™ 3000 (3 µm, SEC Säule, Phenomenex Ltd., Aschaffenburg, Germany) eingesetzt. Die Methode wird isokratisch durchgeführt. Dabei wird ein Natrium-Phosphat Puffersystem bestehend aus 0,1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,05 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 0,05 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck KGaA, Germany) verwendet. Bei beiden Methoden ist die Absorption bei 280 nm gemessen worden. Die Aminosäuren werden mit der RP-Chromatographie (Poroshell HPH-C18/3 x 100 mm/ 2,7 µm, Agilent Technologies) und der passenden Vorsäule (Poroshell HPH-C18, Vorsäule, Agilent Technologies) quantifiziert. Es wird eine Gradienten Methode verwendet [Agilent Technologies, Inc. 2007, Jason Greene]. Die Mobile Phase A besteht aus 10 mM Natriumhydrogenphosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 10 mM

di-Natriumtetraborat ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ), und 5 mM Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ). Der pH-Wert wird mit konzentrierter Salzsäure auf 8,2 eingestellt. Die mobile Phase B, die zur Elution verwendet wird, beinhaltet 70 vol% Acetonitril und 30 vol% Wasser. Die Derivatisierung der Aminosäuren wird in die Methode der HPLC Anlage hinterlegt und unmittelbar vor der Messung durchgeführt. Die detaillierte Programmierung der Anlage (Agilent 1100 Series HPLC Value System) ist in der Applikation Notiz von Agilent Technologies zu finden [Long]. Als Derivatisierungsreagenz wird ortho-Phthalaldehyde (OPA) verwendet. Die unterschiedlichen Chromatographie Methoden sind auf einer HPLC Anlagen (Agilent 1100 Series HPLC Value System, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) durchgeführt worden. Die Anlage verfügt über zwei Binärpumpen (G1312A; G1312A), einen Vakuum Degasser (G1312A), einen Autosampler (G1329 A; G1313A) und einen Säulenofen (G1316A; G1316A). Als Detektor wird ein Dioden Array Detektor (DAD; G1330B; G1315B) verwendet. Zur Steuerung der Anlage und zur Darstellung der Ergebnisse wird die Software Chem Station Rev. B.01.03 verwendet. Die Glukose- und Laktatkonzentrationen werden durch enzymatisch perometrische Messungen mit dem LaboTRACE compact (TRACE Analytics GmbH, Braunschweig, Germany) durchgeführt.

#### **Biologische Analytik Methoden**

Der Erhalt der biologischen Aktivität des Antikörpers nach erfolgreicher Auflösung der Präzipitate ist mit einem spezifischen ELISA (ELISA Assay, Eagle Bioscience, NH, USA) für den monoklonalen Antikörper nachgewiesen worden. Die Durchführung erfolgte nach Beschreibung des ELISA Kits.

### **3.2 Stoffsystem Antikörper Fragmente**

#### **Zellkultur**

Produktion der scFvs erfolgt durch hausinterne Kultivierung mit dem *Escherichia coli* (*E. coli* BL21 (DE3) pET-22b(+)-scFv-  $\Delta$ His6) in serumsfreien Medium [Helgers 2022], welches nach der Vorschrift von Riesenberg hergestellt wurde [Riesenberg 1991]. Die

### 3. Material und Methoden

---

Kultivierung wird im Bioreaktor (Biostat® B-DCU, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Germany) mit einem Fassungsvermögen von 2 L durchgeführt. Folgende Kultivierungsbedingungen werden durch die BDC eingestellt und während des Prozesses kontrolliert:  $T = 37^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH} = 6,9$  und eine Sauerstoffsättigung von  $p_{\text{O}_2} = 20\%$ . Die Rührerdrehzahl ist variabel im Bereich  $300 < n < 1500 \text{ rpm}$  und abhängig von der Sauerstoffsättigung, welche konstant gehalten wird. Der Fed-Batch Betrieb wird sobald die anfänglich vorgelegte Glukose verbraucht ist, durch Zugabe des Fütterungsmediums gestartet. Die Fütterung ist exponentiell und proportional zur Zellzahl, sodass die spezifische Wachstumsrate bei  $\mu = 0,15 \text{ h}^{-1}$  konstant gehalten wird. Zur Aufzeichnung des Kultivierungsverlaufs werden alle drei bis vier Stunden eine Probe entnommen, während der Fütterung verkürzt sich das Probenintervall auf eine Stunde. Die Proben werden auf Produkttiter, Nebenkomponenten, Glukose, Biofeuchtmasse und Biotrockenmasse untersucht. Die Zellzahl wird online durch die Trübungssonde aufgenommen und über eine empirische Korrelation in eine Zellzahl umgerechnet [Helgers 2022]. Die Kultivierungsdauer beträgt ein bis zwei Tage und ist abhängig von der Wachstumsrate ( $\mu$ ).

#### **Zellaufschluss**

Für den Zellaufschluss der E.Coli Zellen wird ein Hochdruckhomogenisator der Firma Constant Systems verwendet (Multi Cycle Cell Disruptor). Für den optimalen Zellaufschluss der E.Coli Zellen werden fünf Zyklen mit 500 bar durchgeführt.

#### **Wässrige Zweiphasenextraktion**

Die wässrige Zweiphasenextraktion wird analog zum Stoffsystem der monoklonalen Antikörper durchgeführt. Die Entfernung der Zelltrümmer erfolgt in einem Schritt mit der Extraktion, welche sich in einer Interphase zwischen leichter und schwerer Phase ansammeln.



### **Präzipitation**

Für die Antikörper Fragmente wird die Präzipitation mit PEG 8000 und PEG 12000 getestet (Pellets, Sigma Aldrich). Die Wahl für ein höhermolekulares PEG liegt in der Größe der Fragmente von 27 kDa begründet. Kleinere Proteine können mit langkettigen PEG Molekülen effizienter gefällt werden. Es werden für beide PEGs Löslichkeitskurven bei 4, 8, 12, 16,20 und 30 wt% PEG aufgenommen. Für die Präzipitationsexperimente im kontinuierlichen Aufbau wird PEG 8000 gewählt, welches bei 4 wt% ca. 45% der Nebenkompenten fällt. Die Antikörperfragmente bleiben bei diesem PEG 8000 Anteil fast vollständig (> 96%) in Lösung. Dadurch beinhaltet der Prozess keine Fällung der Hauptkomponente mehr wie bei dem monoklonalen Antikörper, sondern es wird eine Nebenkompentenfällung durchgeführt.

### **Filtration**

Durch die Nebenkompenten Fällung, entfallen die zweite Filtration und der Auflösungsschritt, da das Produkt im ersten Permeat vorliegt. Es wird weiterhin ein Hohlfasermodule mit einer Feed and Bleed Prozessführung verwendet, um die Suspension, welche die präzipitierten Nebenkompenten enthält, zu konzentrieren. Ein partikelreicher Bleed wird aus dem System ausgeführt, sodass einer starken Akkumulation der Präzipitate im Modul vorgebeugt wird.

### **Analytische Methoden**

Zur Bestimmung der Produktkonzentration wird die Protein L Chromatographie (HiTrap™ Cytiva 17-5478-15, von Cytiva Marlborough, Massachusetts, USA) eingesetzt. Die Bestimmung der Konzentration erfolgt rechnerisch, da kein Standard zur Kalibrierung der Methode zur Verfügung steht. Gill et al. haben gezeigt, dass die Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Cystein hauptsächlich zum Messsignal der optischen Dichte bei 280 nm beitragen [Gill 1989]. Aus der Anzahl dieser Aminosäuren ist es mit der Aminosäuresequenz des Zielproteins möglich den molaren Extinktionskoeffizienten zu berechnen. Des Weiteren kann daraus und dem Lambert-Beer'schen

### 3. Material und Methoden

---

Gesetz die Protein Konzentration anhand der Aminosäuresequenz bestimmt werden. Die Konzentration ist für die Modellierung notwendig, da diese für die Berechnung benötigt wird. Die SEC Chromatographie, zur Beurteilung des Nebenkomponenten Profils kann für das zweite Stoffsystem nicht verwendet werden. Der Produktpeak ist zum einen nicht intensiv genug und zum anderen liegt das Fragment im selben Größenbereich wie ein großer Teil der Verunreinigungen, sodass der Produktpeak überdeckt wird.

#### Aminosäure Sequenz des scFv-Fragmentes:

```
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSDIADTGTSTNYADSVKG  
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYGAGFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS  
TDIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYSASYLQSGVPSRFSGSGSGT  
DFTLTISLQPEDFATYYCQQAGYYPATFGQGTKVEIKRAAALEVLFGQPAS
```

### 3.3 Spektroskopische Methoden

Die Spektroskopischen Methoden können für beide Stoffsysteme gleichermaßen verwendet werden. Für die Online Analytik stehen die Raman-Spektroskopie (785-nm-Laser/ 1,5 mW/ Ocean Insight/ Ostfildern, Deutschland/ Raman-Sonde von InPhotonics), die IR-Spektroskopie (Alpha II, Bruker, Billerica, MA, USA), die UV-Vis-Spektroskopie (Smartline DAD 2600, Knauer Wissenschaftliche Geräte GmbH, Berlin, Deutschland) und die Fluoreszenzspektroskopie (Jasco FP-2020 Fluoreszenzdetektor) zur Verfügung. Die jeweiligen Detektoren werden im Durchfluss betrieben und als Analytikstrecke inline in Reihe geschaltet.

#### **Datenerfassung**

Die Datenerfassung bei der Raman-Spektroskopie erfolgt mit einer Integrationszeit von einer Sekunde und der automatischen Mittelung von drei aufgenommen Spektren. Für jede Probe sind mindestens drei Spektren aufgenommen worden, die vor der partiellen Regression der kleinsten Fehlerquadrate (*engl.: Partial least squares regression, PLSR*) erneut gemittelt worden sind. Die verwendete Raman Sonde besitzt einen Messbereich

4200 – 400  $\text{cm}^{-1}$ . Die Datenerfassung der FTIR-Spektroskopie erfolgt ebenfalls mit der Integrationszeit von einer Sekunde und der Mittelung von insgesamt 24 Spektren. Das FTIR deckt einen Messbereich von 4200 – 400  $\text{cm}^{-1}$  ab. Die Datenerfassung des DAD findet kontinuierlich mit einer Abtastrate 0,2  $\text{s}^{-1}$  statt. Dabei hat jedes Spektrum eine Integrationszeit von 32 ms. Es wird die Absorption im Bereich von 190 – 520 nm gemessen. Die Datenerfassung in der Fluoreszenzspektroskopie wurde mit einem Verstärkungsfaktor von 1 eingestellt. Für jede Probe werden ebenfalls mindestens drei Spektren gemessen und vor der PLSR gemittelt. Die Datenerfassung in der Fluoreszenzspektroskopie wurde mit einer Verstärkung von 10 gemessen. Der Messbereich für das Fluoreszenzspektrum wird auf 280 – 900 nm eingestellt. Die Auswertung der Spektren erfolgt mit dem Programm Unscrambler<sup>®</sup> X (Camo Analytics AS, Oslo, Norwegen).

### **Preprocessing**

Die Spektroskopischen Rohdaten müssen vor der Auswertung bearbeitet werden, um Artefakte zu eliminieren. Dafür werden die Raman- und FTIR- Spektren auf den Fingerprintbereich für Proteine von 1800 – 400  $\text{cm}^{-1}$  limitiert [Helgers 2021]. Fluoreszenz und DAD Spektren werden nicht vorher bearbeitet. Die darauffolgende Bearbeitung der Daten ist unterschiedlich für die verschiedenen Spektroskopischen Analysen und abhängig von den jeweiligen Datensätzen. Als Beurteilungskriterium wird die deskriptive Statistik verwendet (Siehe Abbildung 3-1). Es ist das Probenspektrum über einem gemittelten Spektrum dargestellt. Die verschiedenen Farben in Abbildung 3-1 spiegeln unterschiedliche Spektraldaten wieder. Dabei können sich folgende Streuungsmuster ergeben: (a) additive Effekte, (b) Streuungseffekte, (c) Überlagerung von additiven und Streuungseffekten und (d) komplexe Effekte [Esbensen 2018]. Additive Effekte werden durch eine Basislinien-Korrektur oder die erste Ableitung eliminiert. Multiplikative Streuungseffekte wurden durch Anwendung der Methode der Standardnormalvariante (*engl.: standard normal variate, SNV*) oder der multiplikativen Streuungskorrektur (*engl.: multiplicative scatter correction, MSC*) entfernt.

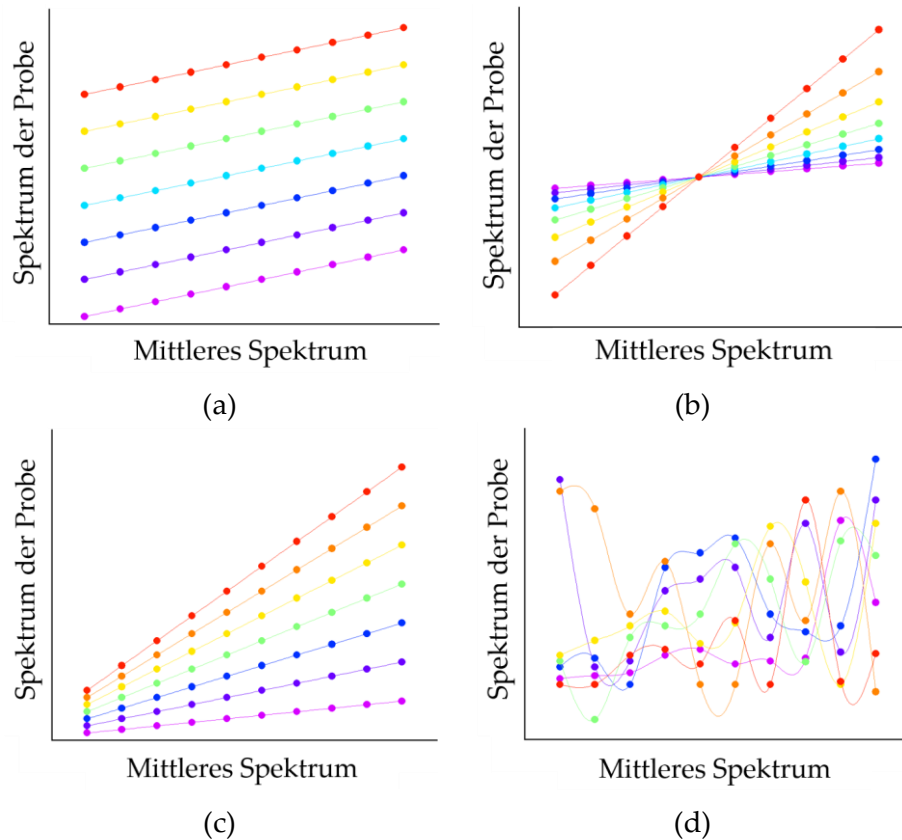


Abbildung 3-1: Beispielhafte Streuungseffektdiagramme [Lohmann 2021]: (a) zeigt additive Effekte, (b) Streuungseffekte, (c) eine Kombination aus additiven und Streuungseffekten und (d) zeigt komplexe Effekte [Esbensen 2018].

Kombinationen aus additiven und multiplikativen Effekten können durch eine Kombination aus Basislinienkorrektur und Streuungskorrektur eliminiert werden. Effekte des komplexen Typs wurden nicht beobachtet, können jedoch durch die Anwendung der erweiterten multiplikativen Streuungskorrektur (*engl.: extended multiplicative scatter correction, EMSC*) eliminiert werden [Esbensen 2018]. Die bearbeiteten Spektren sind anschließend genutzt worden, um die Konzentrationsänderungen in den offline gemessenen Proben mit den Intensitätsveränderungen in den spektralen Daten über eine PLS-Regression zu korrelieren. Eine maximale Anzahl von vier Hauptkomponenten der Regression wurde zugelassen um die experimentellen Daten nicht zu stark anzupassen. Die Qualität des PLS Modells wird anhand der Regressionskoeffizienten, dem RMSE (*engl.: Root mean square error*) in Kombination mit dem Bestimmtheitsmaß  $R^2$  und der Auftragung der erklärten Varianz gegen die Anzahl der benötigten Hauptkomponenten bewertet.

### 3.4 Weitere Analytik Methoden

Die Dichten (DMA 500, Anton Paar GmbH, Graz, Österreich), der pH-Wert (InoLab pH 720, WTW, Weilheim, Deutschland) und die Leitfähigkeit (InoLab pH 720, WTW, Weilheim, Deutschland) werden für alle Systeme gemessen. Die dynamische Viskosität (Rotationsviskosimeter vom Typ R180, proRheo, Althengstett, Deutschland) wird ebenfalls bestimmt. Die Trübung während der Präzipitation ist mit einer Trübungssonde aufgezeichnet worden (Transmission, 880 nm, HiTec Zang GmbH, Herzogenrath, Deutschland).

## 4. Ergebnisse zur Präzipitation von monoklonalen Antikörpern

In diesem Kapitel werden die erbrachten Ergebnisse zur Fällung der monoklonalen Antikörper präsentiert und diskutiert. Die Präzipitation wird als Grundoperation in den alternativen Herstellungsprozess, welcher am Institut für Thermische Verfahrens- und Prozesstechnik der TU Clausthal entwickelt worden ist, integriert. Als Vergleich sind der industrielle Benchmark sowie der alternative Prozess in Abbildung 4-1 gegenübergestellt. Die Verwendung der Protein A Chromatographie im Benchmark zu Beginn des Aufreinigungsprozesses ist ökonomisch ineffektiv [Dos Santos 2017], so dass hier das größtes Optimierungspotential besteht.

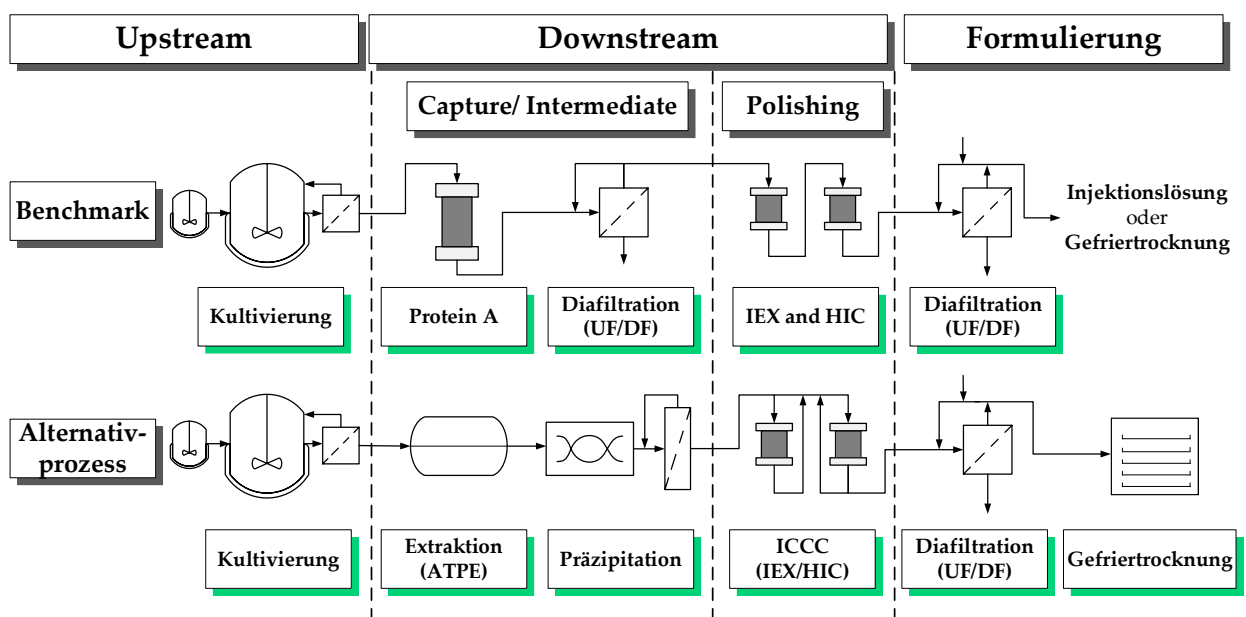


Abbildung 4-1: Benchmark Prozess zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern im Vergleich zu dem entwickelten Alternativprozess.

Im alternativen Prozess wird daher die Protein A Chromatographie durch die wässrige Zweiphasenextraktion ersetzt [Gronemeyer 2016, Schmidt 2017]. Die resultierende leichte Phase, welche das Zielprotein beinhaltet, enthält einen hohen Salzgehalt, der für die nachfolgende Ionenaustauscher Chromatographie (IEX) problematisch ist. Der notwendige Pufferwechsel wird mit Hilfe der Präzipitation realisiert, da sich der Laufpuffer der IEX zur Auflösung der Präzipitate anbietet. Das übergeordnete Ziel dieser

Arbeit ist der autonome Betrieb der Grundoperation Präzipitation, welches nur durch vorherige Definition von geeigneten Zwischenzielen erreicht werden kann. Die genannten Zwischenziele sind im Folgenden zusammengefasst:

1. Charakterisierung der Fällung von Monoklonalen Antikörpern
2. Prozessentwicklung (Batch/ halbkontinuierlich/ kontinuierlich)
3. Definition der Qualitätsattribute und Identifikation der Risikofaktoren
4. Entwicklung und Validierung eines Prozessmodells
5. Etablierung einer Regelungsstrategie

Da zu Beginn der Arbeit keine belastbaren Vorarbeiten zur Präzipitation der Hauptkomponente zur Verfügung standen, erfolgte zunächst die Charakterisierung der Präzipitate. Im weiteren Verlauf werden die Ergebnisse der entwickelten Prozesse vorgestellt. Die Entwicklung des absatzweisen Prozesses ist notwendig gewesen, um die auftretenden Effekte in Präzipitation, Filtration und Auflösung getrennt voneinander untersuchen zu können und ein tiefes Prozessverständnis für die anschließende Modellierung aufzubauen. Aus diesem Wissen werden ein halbkontinuierlicher und ein kontinuierlicher Prozess weiterentwickelt, welche individuelle Vorteile bieten, die an entsprechender Stelle diskutiert werden. Anschließend wird die Risikoanalyse nach dem etablierten Quality by Design Ansatz vorgenommen, um die Einflussfaktoren auf die Qualitätsattribute zu identifizieren. Dieser Ansatz wird von Institutionen und Autoritäten wie FDA, EMA und ICH gefordert, um die Zulassung neuer Prozesse zu vereinheitlichen und zu vereinfachen. Anschließend werden die Ergebnisse zur Entwicklung des Prozessmodells vorgestellt, welches auf Basis von rigorosen physikochemischen Modellgleichungen basiert. Die nachfolgende Validierung des Prozessmodells erfolgt am Beispiel des kontinuierlichen Prozesses und ist in Anlehnung an den Workflow von Sixt et al. durchgeführt worden [Sixt 2018]. Abschließend wird das Kapitel mit den Ergebnissen des entwickelten Regelkonzepts, welches den autonomen Betrieb ermöglicht, abgerundet.

### 4.1 Charakterisierung der Präzipitate

Zur ersten Charakterisierung der Präzipitate sind nach der Präzipitation mittels eines Mikroskops Aufnahmen mit einer (a) 10 - fachen und einer (b) 50 - fachen Vergrößerung aufgenommen worden. Es ist zu sehen, dass sich kugelförmige Strukturen bilden, die sich wiederholen und zu Agglomeraten unterschiedlicher Größe zusammenlagern. Die Bildauswertung hat ergeben, dass sich die Größe der Präzipitate über einen Größenbereich von 20 – 100  $\mu\text{m}$  verteilt. Das deckt sich mit Angaben aus der Literatur [Satzler 2020].

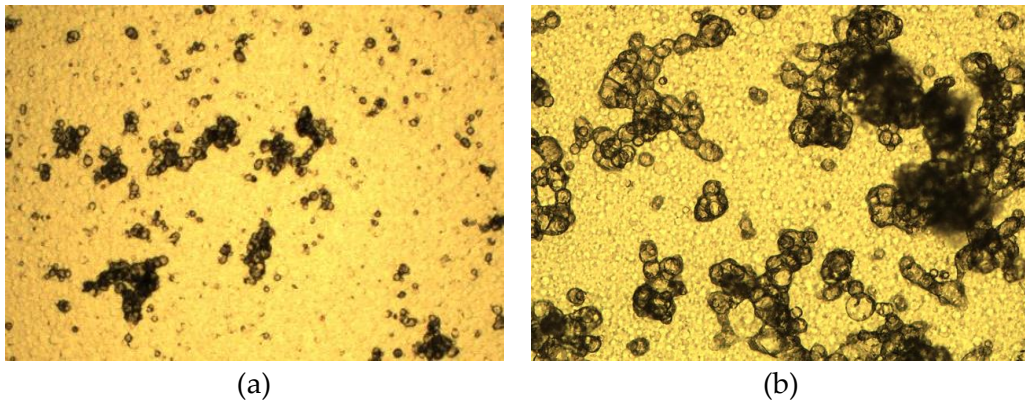


Abbildung 4-2: Mikroskop Aufnahmen der Präzipitate. (a) zeigt eine 10-fache Vergrößerung und (b) eine 50-fache Vergrößerung. Die Durchmesser der Präzipitate und der Agglomerate liegen zwischen 20 – 100  $\mu\text{m}$  [Lohmann 2021].

Zusätzlich ist die Präzipitation mit der SOPAT Sonde untersucht worden, welche ebenfalls Aufschluss über die Partikelgröße bietet, jedoch auch die Anzahl - und Volumenverteilung der Partikel angeben kann. Darüber hinaus wird die Kinetik der Fällung durch die Messung abgebildet, welche eine erste Einschätzung der Reaktionszeit von Fällungsmittel und Feed gibt. Die SOPAT Sonde ist zudem ein bildgebendes Verfahren, sodass eine Aussage über die Form der Partikel getroffen werden kann. In Tabelle 4-1 ist die Verteilung des mittleren Feret-Durchmessers angegeben. Es wird deutlich, dass die Ergebnisse von denen des Lichtmikroskops abweichen. Der von der SOPAT Sonde detektierte Partikeldurchmesser von 3 – 20  $\mu\text{m}$  stimmt mit der mikroskopischen Messung überein. Abweichungen treten jedoch bei kleinen Durchmessern auf. Diese Abweichung ist dadurch zu erklären, dass die Messung mit der SOPAT



---

#### 4. Ergebnisse zur Präzipitation von monoklonalen Antikörpern

---

Sonde unter ständigem Rühren durchgeführt wird. Beim Lichtmikroskop hingegen, wird die Probe auf einen Objektträger aufgebracht, welches in einer stärkeren, sichtbaren Agglomeration der Primärpartikel resultiert. Zusätzlich wird mit dem Mikroskop lediglich ein Bildausschnitt gemessen, dessen Aussagekraft gegenüber der Messung mit der SOPAT Sonde deutlich begrenzt ist. Demnach sind die Werte der SOPAT Sonde, im Hinblick auf den späteren Prozess, realistischer als die Aufnahmen mittels Lichtmikroskop.

Tabelle 4-1: Verteilung des mittleren Feret Durchmesser während der absatzweisen Präzipitation.

	Durchmesser ( $\mu\text{m}$ )
d <sub>10</sub>	3,02
d <sub>50</sub>	6,29
d <sub>90</sub>	14,18
d <sub>95</sub>	19,93

#### **Biologische Aktivität:**

Die biologische Aktivität ist ein Maß für die Wirksamkeit des Proteins, welche durch eine prozessbedingte Strukturänderung eingeschränkt werden kann [Abès 2010, Del Val 2010, Hodoniczky 2005, Jefferis 2005, Kayser 2011, Raju 2008, Wright 1997]. Die weitere Verwendung des Proteins ist nur bei Erhalt der biologischen Aktivität möglich. Da sich bei der Fällung der Aggregatzustand von gelöst zu fest verändert, ist es möglich, dass die Proteinstruktur dabei in Mitleidenschaft gezogen wird. Eine Untersuchung der biologischen Aktivität ist daher essentiell. Der Nachweis erfolgt mit einem, für das Zielprotein spezifischen, Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). Es sind die Proben nach jeder Grundoperation des alternativen Prozesses gezeigt, um nachzuweisen, dass die entwickelten Prozessschritte keinen Einfluss auf die Wirksamkeit des Proteins haben. In Abbildung 4-3 wird sichtbar, dass nach der Präzipitation der Antikörper vollständig erhalten ist. Die großen Fehlerbalken und die Ausbeute, von zum Teil über 100%, liegen in dem Maßstab des Assay begründet. Die Proben für den ELISA werden stark verdünnt, da nur ein gewisser Anteil an Antigenen auf der Mikrotiterplatte immobilisiert werden können. Zusätzlich fallen

## 4. Ergebnisse zur Präzipitation von monoklonalen Antikörpern

---

Ungenauigkeiten durch wiederholtes Pipettieren bei Volumina im Mikrolitermaßstab stark ins Gewicht.

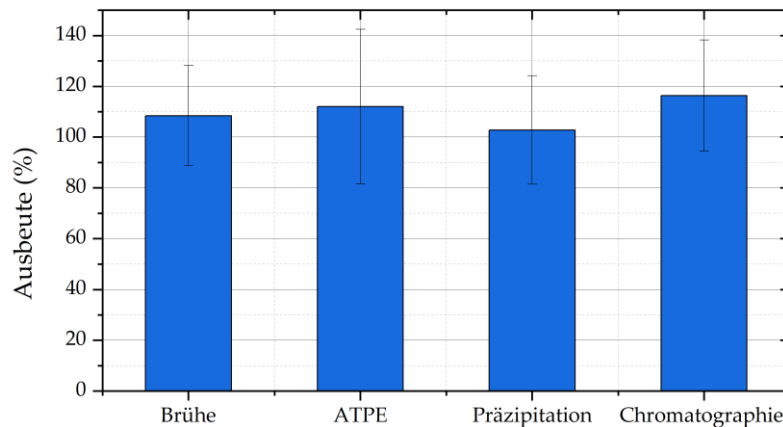


Abbildung 4-3: Nachweis der erhaltenen Biologischen Aktivität des Antikörpers.

### 4.2 Präzipitationsprozesse

In diesem Unterkapitel werden die entwickelten Prozesse zur Präzipitation des Antikörpers dargestellt. Es ist sowohl ein Batch, ein halbkontinuierlicher als auch ein kontinuierlicher Prozess entwickelt worden. Zu Beginn der Prozessentwicklung stellt sich die Frage, ob Haupt- oder NebenkompONENTEN gefällt werden sollen. Denkbar ist ebenfalls ein zweistufiger Fällungsprozess, in dem zuerst NebenkompONENTEN und anschließend die Hauptkomponente gefällt wird. In diesem Fall wird jedoch ein einstufiger Fällungsprozess gewählt, indem die Hauptkomponente als Zielprotein für die Präzipitation gewählt wird. Auf diese Weise müssen die Präzipitationsbedingungen nur für ein Protein festgelegt werden. Die Fällung erfolgt mit Polyethylenglykol 4000, weil es als besonders schonendes Präzipitationsmittel für Proteine gilt und nicht denaturierend auf diese wirkt [McRee 1999].

#### 4.2.1 Absatzweiser Präzipitationsprozesses

Der absatzweise Prozess ist aus Gründen der Effekttrennung von Präzipitation, Filtration und Auflösung entwickelt worden und ist vereinfacht in Abbildung 4-4 dargestellt. Die leichte Phase aus der ATPE wird in den Rührkessel überführt, in dem die Präzipitation stattfindet.

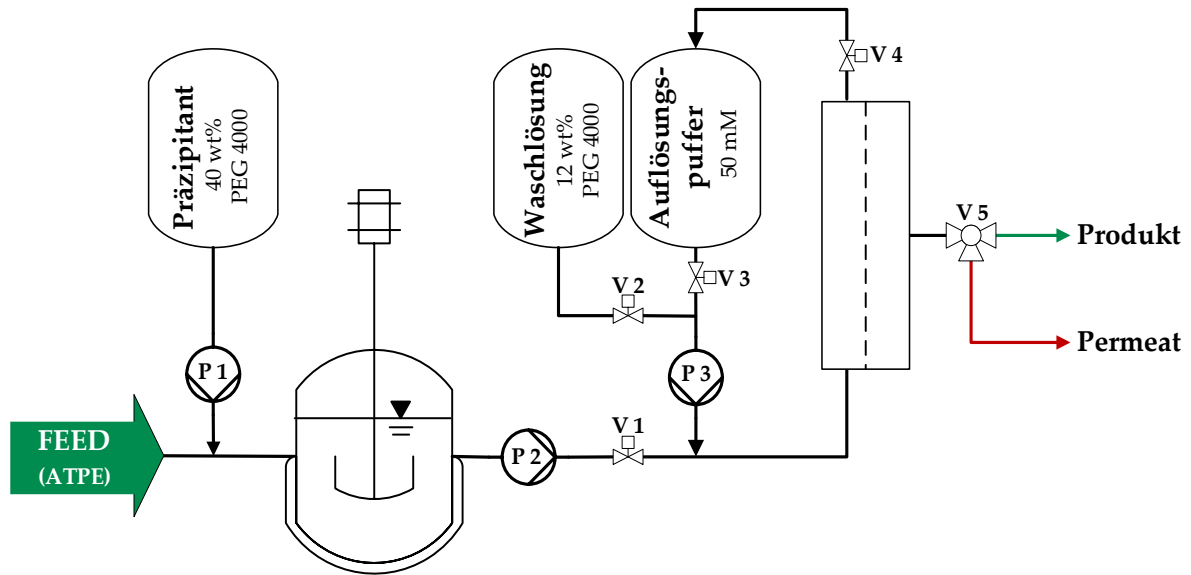


Abbildung 4-4: Vereinfachte Darstellung des absatzweisen Präzipitationsprozess.

Anschließend wird das Präzipitationsmittel PEG 4000 hinzugefügt und das Gemisch für zehn Minuten im Rührkessel inkubiert. Für den Filtrationsschritt wird das Ventil V1 geöffnet und die Pumpe P2 eingeschaltet. Die Ventile V2, V3 und V4 sind geschlossen. Das Ventil V5 ist auf Permeat eingestellt. Die Präzipitate und der Überstand werden durch das Hohlfasermodule im Dead-End Modus filtriert, sodass sich die Präzipitate im Inneren auf der Membran abscheiden. Im Waschschrift wird V1 geschlossen und V2 geöffnet. Die anderen Ventile bleiben unverändert. Die Waschlösung aus PEG 4000 (12 wt%) wird ebenfalls durch den Filter im Dead-End Modus filtriert und in das Permeat geleitet. Im letzten Schritt findet das Auflösen der Präzipitate auf der Membran statt. Dazu werden die Ventile V1, V2 und V5 geschlossen und durch das Öffnen der Ventile V3 und V4 ein Kreislauf erzeugt. Der Auflösungspuffer wird mehrmals durch das Hohlfasermodule gepumpt und die Präzipitate von der Membranoberfläche gelöst. Nach zehn Auflösungszyklen wird V4 geschlossen und V5 auf Polishing eingestellt. Ein Auflösungszyklus entspricht der Zeitspanne, welche benötigt wird, um das Prozessvolumen einmal im Kreis zu fahren. Das Produkt wird erneut durch den Filter filtriert und mit dem gelösten Antikörper zur nächsten Grundoperation (Polishing) weitergegeben. Der Vorteil dieser Prozessführung ist, dass eine

#### 4. Ergebnisse zur Präzipitation von monoklonalen Antikörpern

---

hohe Ausbeute von > 90% und eine gute Reinheit von 80%, bezogen auf die Zielkomponente, erreicht wird. Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 4-5 zwei SEC-Chromatogramme, Feed (grau) Vergleich zu den im Puffer aufgelösten Präzipitaten (Grün), gezeigt.

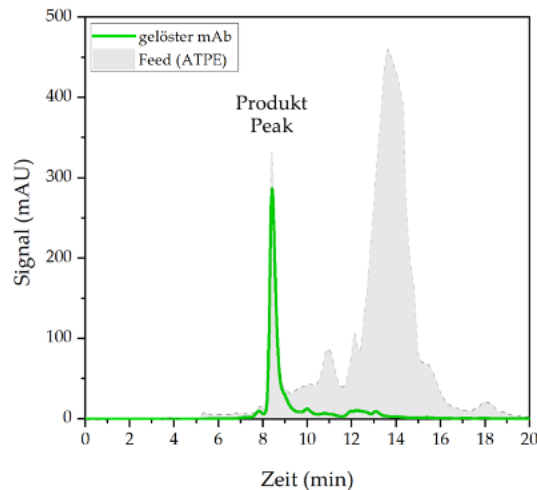


Abbildung 4-5: SEC Chromatogramm von Feed (grau) und dem Produkt nach der Grundoperation „Präzipitation“.

Die Elution des Produktes ist im Chromatogramm des Feed Materials nach ca. acht Minuten zu sehen. Links vom Produkt-Peak eluieren höhermolekulare Verunreinigungen, die sogenannten HMWs (*engl: High molecular weight impurities*) und rechts davon niedermolekulare Verunreinigungen, die sogenannten LMWs (*engl: light molecular weight impurities*). Es ist deutlich zu erkennen, dass der Großteil der Nebenkomponenten kleiner als das Zielprotein ist. In dem SEC-Chromatogramm nach der Auflösung (grün) wird deutlich, dass eine selektive Fällung des Antikörpers mit PEG 4000 stattgefunden hat, sodass der überwiegende Teil der kleineren Nebenkomponenten stark reduziert worden ist. Gleichzeitig ist das Zielprotein fast vollständig aus den Präzipitaten zurückgewonnen worden. Der Nachteil der Prozessführung ist eine lange Prozesszeit durch die Auflösung der Präzipitate (> 6h). Die Filtration, welche im Dead-End-Modus durchgeführt wird, komprimiert die Präzipitate, sodass die Kinetik der Auflösung stark verlangsamt wird.

### 4.2.2 Halbkontinuierlichen Präzipitationsprozess

Um den absatzweisen Prozess kontinuierlich zu betreiben, sind mehrere der zuvor beschriebenen Einheiten notwendig (siehe Abbildung 4-4), welche im weiteren Verlauf Sub Units genannt werden. Diese sind in einer zeitlichen Abfolge getaktet, sodass ein kontinuierlicher Feedstrom aus der ATPE in der Grundoperation Präzipitation aufbereitet werden kann. Der halbkontinuierliche Prozess ist in Abbildung 4-6 gezeigt.

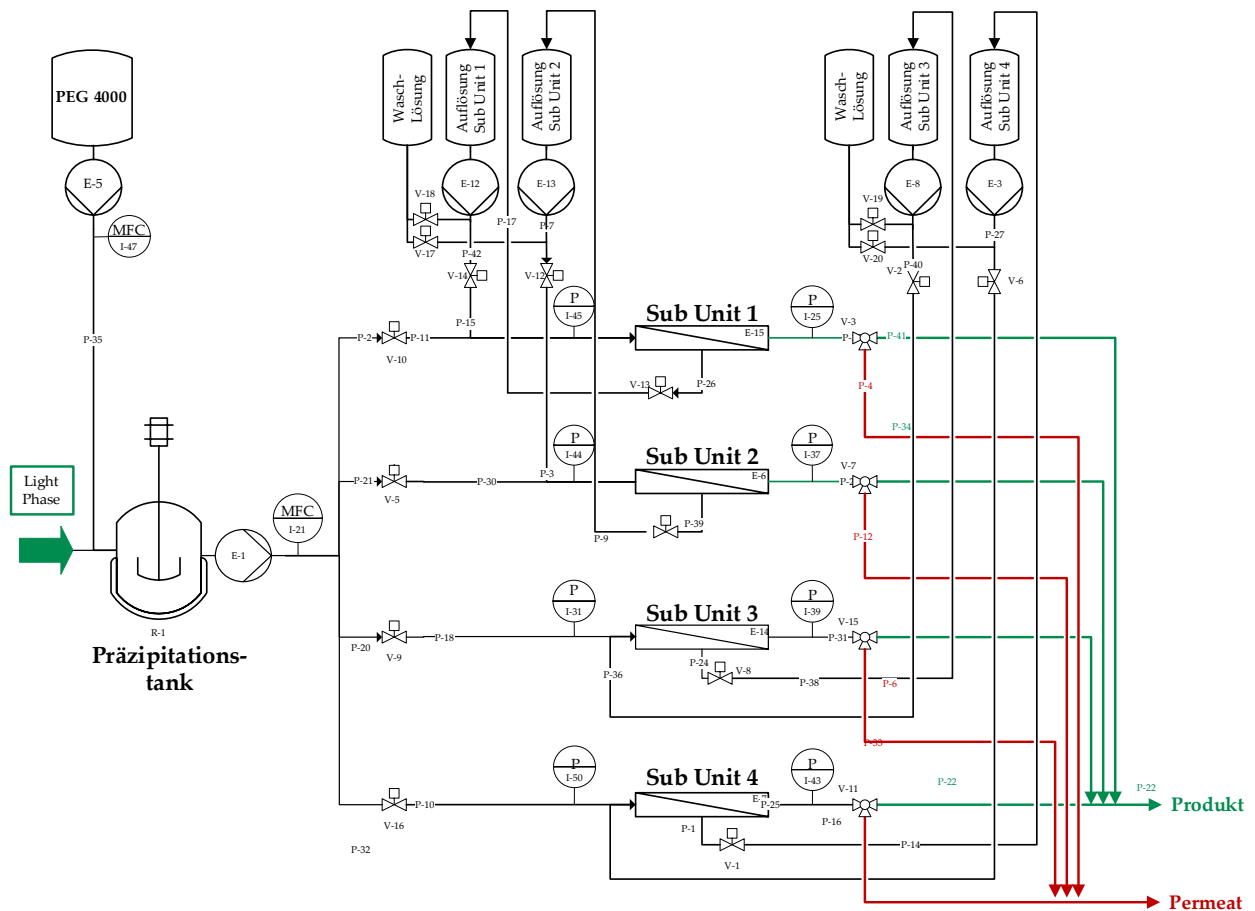


Abbildung 4-6: Halbkontinuierlicher Präzipitationsprozess für monoklonale Antikörper

In diesem Aufbau sind die Präzipitationstanks der einzelnen Sub Units in einem Tank zusammengeführt. Während des Prozesses durchläuft jede Sub Unit unterschiedliche Phasen in wiederkehrender Reihenfolge. Zu Beginn findet die Filtration der Präzipitate statt, danach das Waschen der Präzipitate und anschließend die Auflösung der selbigen. Abschließend wird das Modul gereinigt und regeneriert. Die einzelnen Sub Units

## 4. Ergebnisse zur Präzipitation von monoklonalen Antikörpern

---

durchlaufen diese Phasen zeitversetzt. Sobald das erste Filtrationsmodul mit den Präzipitaten beladen ist, wird der Waschvorgang initiiert und das zweite Modul übernimmt die Filtration. Auf diese Weise werden die einzelnen Phasen in den Sub Units durchgereicht und finden im stationären Zustand parallel statt. Somit wird ein kontinuierlicher Eingangsstrom aufbereitet und ein kontinuierlicher Ausgangsstrom für die nachstehende Grundoperation generiert. Es sind vier Sub Units eingesetzt, da die Phasen verschieden lange andauern. Der Vorteil dieser Prozessführung ist, dass die hohe Ausbeute und der Reinheitsgewinn aus dem absatzweisen Prozess beibehalten werden können, trotzdem aber eine kontinuierliche Aufbereitung möglich ist. Durch die Taktung der einzelnen Phasen ist eine aufwendige Steuerung und Regelung notwendig, als auch eine Online Messtechnik, welche die aktuellen Zustände im Prozess überwachen kann.

### 4.2.3 Kontinuierlicher Präzipitationsprozess

Ein kontinuierlicher Prozess bietet mehrere Vorteile in Bezug auf Agilität, Flexibilität, Qualität und Kosteneffizienz, sodass diese Prozessführung für den industriellen Maßstab bevorzugt wird. Im Bereich der Präzipitation wurden bereits Arbeiten zur kontinuierlichen Präzipitation von monoklonalen Antikörpern durchgeführt. Dabei werden verschiedene Präzipitationsmittel, wie PEG 6000 [Hammerschmidt 2016] und PEG 6000 in Kombination mit Zinkchlorid verwendet [Burgstaller 2019, Li 2019]. Eine weitere Arbeit verwendet ausschließlich Zinkchlorid zur selektiven Fällung des Antikörpers [Dutra 2020]. Zum Teil sind zweistufige Prozesse entwickelt worden, in der zunächst Nebenkomponenten und dann die Hauptkomponente gefällt werden [Hammerschmidt 2016]. Des Weiteren unterscheiden sich die Prozesse in der Prozessführung. Hämmerling et al. und Burgstaller et al. betrachten die Auflösung der Präzipitate nicht als Teil der Grundoperation [Burgstaller 2019, Hammerschmidt 2015, Hammerschmidt 2016], sodass eine konzentrierte Dispersion mit Partikeln als

Produkt der Grundoperation anfällt. Li et al. hingegen integrieren die Auflösung der Präzipitate [Li 2019, Li 2020]. Dieser zusätzliche Schritt ist sinnvoll und auch zur Grundoperation zugehörig, da der Antikörper für die nachfolgende Chromatographie gelöst vorliegen muss. Die Überführung des Zielproduktes in die Präzipitat Form stellt lediglich einen Zwischenschritt dar, welcher die Trennung von Verunreinigungen und Zielkomponente durch Filtration ermöglicht.

Der in dieser Arbeit entwickelte kontinuierliche Prozess ist in Anlehnung an die Prozesse von Burgstaller et al. und Li et al. [Burgstaller 2019, Li 2019] entwickelt worden und verbindet die Vorteile aus beiden Prozessen. Der Prozess von Burgstaller et al. besteht aus einem zweistufigen Prozess aus Fällung und Waschen der Präzipitate. Die Vorteile des Prozesses sind der kontinuierliche Aufbau mit einer Produktionskapazität 0,32 L/h. Des Weiteren eignet sich die Feed-and-Bleed Prozessführung sehr gut zur Konzentrierung der Präzipitate und hat den Vorteil, dass die Filterfläche auf Grund des zweistufigen Aufbaus weniger stark belastet wird. Nachteile sind ein zusätzlicher Retentatbehälter, der fehlende Auflösungsschritt und der lange Anfahrvorgang von  $> 60$  min. Li et al. haben ebenfalls einen kontinuierlichen Prozess entwickelt, sich direkt mit dem Prozess von Burgstaller et al. verglichen und konkrete Verbesserungsvorschläge gemacht [Li 2019, Li 2020]. Im Anschluss ist die Auflösung des Antikörpers integriert. Der Aufbau ist vollkontinuierlich, besitzt eine kurze Anfahrphase von ca. zwei Minuten und kann mit einer vergleichbaren Flussrate von 0,3 L/h betrieben werden. Dabei wird auf die zusätzliche Retentatbehälter verzichtet. Nachteilig ist der Waschschrift, welcher aus zwei Hohlfasermodulen besteht sowie die daraus resultierenden hohen Produktverluste ( $> 20\%$ ). Aus diesem Grund ist eine Rückführung der Waschlösung hinzugefügt worden. Ein Vorteil beider Prozesse ist die Feed-and-Bleed Prozessführung der Filtration. Diese druckarme Filtration ist besonders schonend, daraus resultiert eine geringe Komprimierung und eine beschleunigte Auflösung der Präzipitate [Burgstaller 2019, Li 2019, Li 2020]. Darüber hinaus ist die Filtrationszeit im Feed-and-Bleed deutlich kürzer als im Dead-End

#### 4. Ergebnisse zur Präzipitation von monoklonalen Antikörpern

Betrieb. Der Prozess, welcher während der Arbeit am Institut für Thermische Verfahrens- und Prozesstechnik der TU Clausthal entstanden ist, vereint die Vorteile beider Prozesse. Dieser umfasst die Prozessabschnitte Präzipitation, Waschen und Auflö- sung. Dieser ist in Abbildung 4-7 schematisch gezeigt.

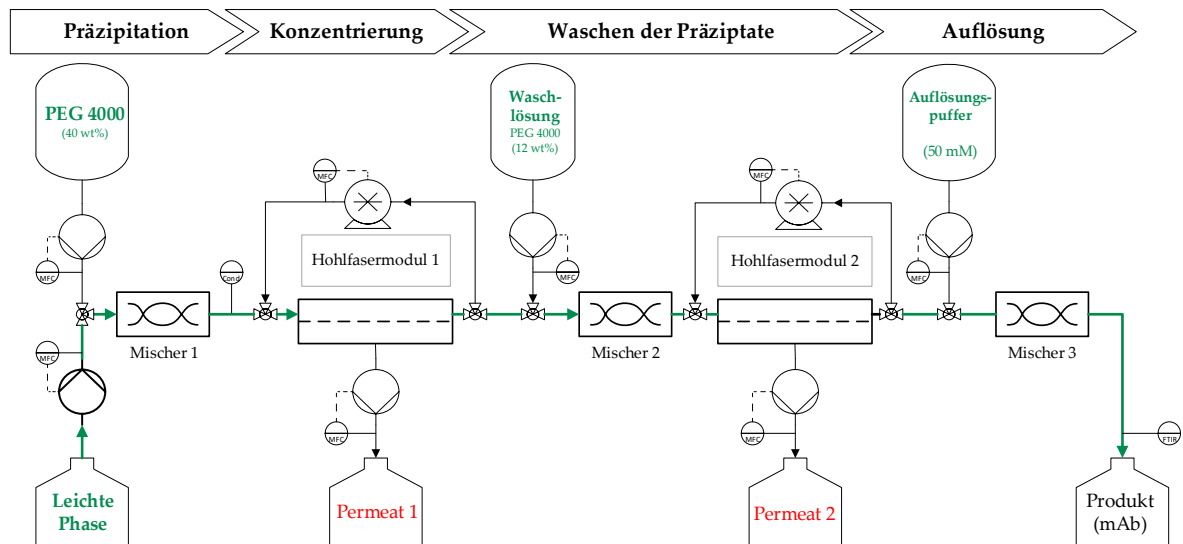


Abbildung 4-7: Kontinuierlicher Präzipitationsprozess.

Es wird eine Feed-and-Bleed Prozessführung für die Filtration gewählt. Als Präzipitationsmittel wird eine PEG 4000 Lösung (40 wt%) verwendet, welche im Prozess auf einen Anteil von 12 wt% verdünnt wird, um die definierten Präzipitationsbedingungen einzustellen. Als Waschlösung wird ebenfalls eine PEG 4000 Lösung (12 wt%) verwendet, welche die Präzipitationsbedingung aufrechterhält und so einen Produktverlust während des Waschens verhindert. Aus diesem Grund ist im Waschschritt ebenfalls nur ein Hohlfasermodul. Der Auflösungspuffer ist in diesem Fall der Laufpuffer der nachfolgenden Chromatographie, ein zusätzlicher Pufferwechsel nach der Präzipitationseinheit entfällt. Dieser Prozess bietet den Vorteil, dass die Prozesszeiten drastisch verkürzt werden im Vergleich zum absatzweisen Prozess. Im Labormaßstab liegt die mittlere Verweilzeit bis zum aufgelösten Produkt bei ca. 8-10 min. Dabei werden vergleichbaren Flussrate (0,3 L/h) wie bei Burgstaller et al. und Li et al. erreicht. Außerdem kann der Prozess leicht an höhere Durchsätze angepasst werden, dazu muss lediglich die Membranfläche der Hohlfasermodule auf den jeweiligen Durchsatz



neu dimensioniert werden. Zusätzlich ist der Steuer- und Regelungsaufwand im Vergleich zum halbkontinuierlichen Prozess deutlich geringer, da die Taktung der einzelnen Prozessphasen entfällt. Nachteilig hingegen sind die geringere Ausbeute mit ca.  $> 80\%$  und eine reduzierte Reinheitssteigerung auf  $> 60\%$ . Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 4-8 (a) der Vergleich von Feed (grau) und Produkt (grün) gezeigt, sowie in (b) der Vergleich von Feed und Permeat 1 (rot) und Permeat 2 (orange). Die Selektivität, welche bereits in dem absatzweisen Prozess gezeigt wurde, wird ebenfalls im kontinuierlichen Prozess erreicht. Die geringere Reinheitssteigerung ist akzeptabel, da die Optimierung des gesamten Herstellungsprozesses angestrebt wird. Die nachfolgende Ionenaustauscher Chromatographie erbringt die erforderliche Reinheitssteigerung [Vetter 2021].

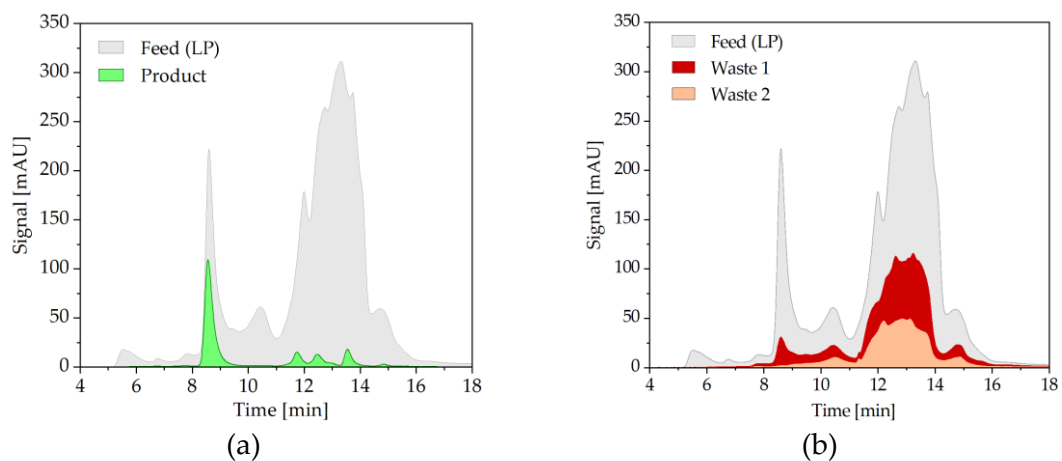


Abbildung 4-8: SEC-Chromatogramm von (a) Feed und Produkt. (b) zeigt den Vergleich von Feed zu den Permeatbehältern 1 und 2. Es ist zu berücksichtigen, dass das Produkt mit dem Faktor 1,5 verdünnt ist.

### 4.3 Risikoidentifizierung und Bewertung

Der erste Schritt in der QbD basierten Prozessentwicklung, ist die Definition der Zielkomponente und deren Eigenschaften. Hierbei handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper des Typs IgG1, welcher aus der Kultivierung von CHO-Zellen gewonnen wird. Des Weiteren werden Limits zur Bewertung der Leistungsfähigkeit festgelegt. Als kritische Qualität Attribute wird zum einen die Ausbeute nach der Auflösung der Präzipitate und zum anderen die Reinheit in Bezug auf die Hauptkomponente eingeführt. Die Ausbeute des Prozesses soll  $> 90\%$  betragen und eine

#### 4. Ergebnisse zur Präzipitation von monoklonalen Antikörpern

---

Reinheit von mindestens 50% erreicht werden. Zusätzlich ist der zurückbleibende PEG Anteil ein Qualitätsattribut, da dieser für die nächste Grundoperation in der Prozesskette problematisch ist. Die Salzkonzentration des Auflösungspuffers ist ebenfalls mit einem Bereich von 10 – 150 mM vorgegeben, da eine hohe Salzkonzentration (>150 mM) die Bindungskapazität der nachfolgenden IEX stark mindert. Zur Identifikation der Einflussgrößen, wird ein Ishikawa Diagramm mit der Problemstellung einer unzureichenden Ausbeute, Reinheit oder Prozessierbarkeit erstellt. Dazu werden standardmäßig die Kategorien Material, Management, Prozessparameter und Umwelteinflüsse verwendet. Der Zweig mit den Umwelteinflüssen wird in diesem Fall vernachlässigt, weil der Prozess vollständig im Laborumfeld stattfindet und keinen Umwelteinflüssen unterliegt. Der Zweig Prozessparameter beinhaltet die Einflussfaktoren auf die Präzipitation des Antikörpers (rot gestrichelte Linie). Des Weiteren wird die Kategorie Material in Feed Eigenschaften und in Löslichkeitseigenschaften aufgeteilt. Letztes bezieht sich auf die Einflussgrößen, welche die Rückgewinnung des Antikörpers aus den Präzipitaten beeinflusst (grün gestrichelte Linie). Das Ishikawa Diagramm ist in Abbildung 4-9 gezeigt. Außerdem wird im Vorfeld eine Fehlermöglichkeits- und Einflussanalyse (*engl: Failure-Mode-Effect-Analysis, FMEA*) durchgeführt, welche die Risiken im Prozess hinsichtlich der Schwere, der Häufigkeit und der Detektionsmöglichkeit bewertet. Dabei wird den einzelnen Risiken ein Zahlenwert von 1-10 in den Kategorien Schwere (*engl: Severity*), Häufigkeit (*engl: Occurance*) und der Detektionsmöglichkeit (*engl: detection*) zugeordnet (siehe Tabelle 11-1 im Anhang). Aus diesen Zahlen werden die Kennzahlen Kritikalität und Risikoprioritätszahl (*engl: risc priority number, RPN*) abgeleitet. Die Auftragung der Risikoprioritätszahl über der Kritikalität zeigt eine übersichtliche Visualisierung der Hauptrisiken im Prozess und dient als Entscheidungshilfe der Priorisierung zur Eliminierung der Risikofaktoren (siehe Abbildung 4-9). Der Hauptrisikofaktor ist demnach die Zielkomponente, welche durch die Präzipitation und die Auflösung beeinflusst wird. Während den einzelnen Prozessschritten muss die biologische Aktivität erhalten bleiben, da diese zu einem unwirksamen Produkt führen kann.

## 4. Ergebnisse zur Präzipitation von monoklonalen Antikörpern

Wenn die biologische Aktivität während Präzipitation und Auflösung gegeben ist, kann dennoch der größte Produktverlust, durch eine unvollständige Präzipitation und/ oder eine limitierte Auflösung entstehen.

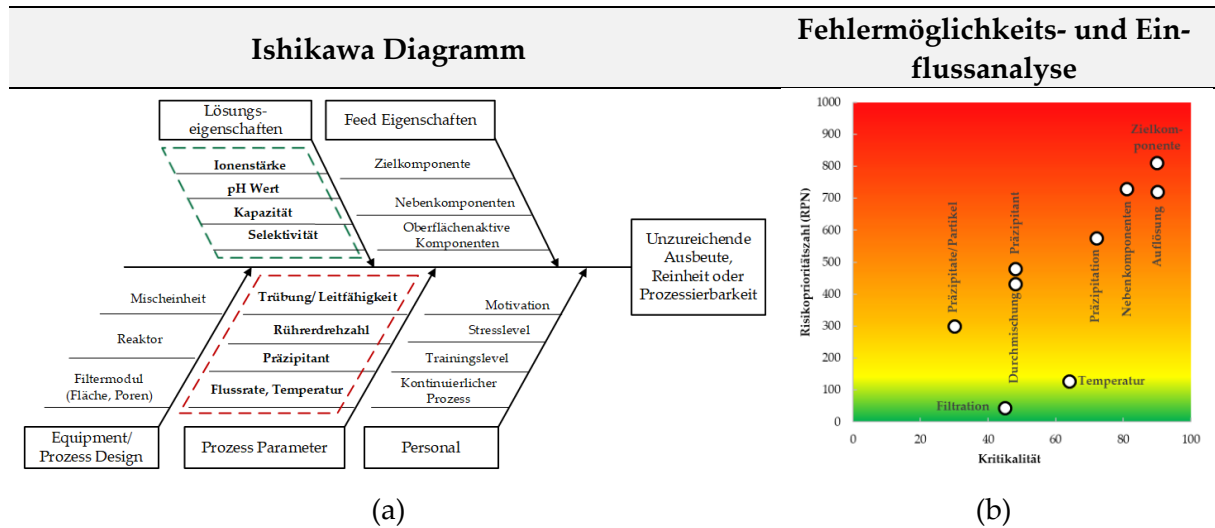


Abbildung 4-9: (a) Ishikawa Diagramm mit den potentiellen Einflussgrößen, die zu einer unzureichenden Ausbeute, Reinheit oder Prozessierbarkeit führen können. (b) zeigt das Ergebnis der Fehlermöglichkeits- und Einflussanalyse [Lohmann 2020].

Des Weiteren sind Ko-präzipitierende Nebenkomponenten kritisch, da diese zu einer verminderten Reinheit führen und die Integration der Präzipitation an dieser Stelle im Prozess in Frage stellen. Zur Risikoidentifizierung sind zwei Versuchspläne durchgeführt worden, die sich separat mit der Präzipitation und der Auflösung beschäftigen. Während der Präzipitation sind die Faktoren Präzipitationsmittel (Präzipitant), Temperatur, Durchmischung und Waschen der Präzipitate hinsichtlich der Ausbeute und Reinheit der Zielkomponente interessant. Bei der Auflösung sind besonders die Eigenschaften des Auflösungspuffers wichtig, wodurch die Ionenstärke und der pH-Wert eine große Rolle spielen. Darüber hinaus ist die Auswirkung des Auflösungsverhältnisses untersucht worden, welches das Volumenverhältnis zwischen Feed und Produktvolumen der Grundoperation bezeichnet. Generell ist im fortschreitenden Prozess eine Volumenreduktion anzustreben, um einen kosteneffizienten Prozess zu entwickeln. Es werden nachfolgend die Ergebnisse der Experimente zur Präzipitation und anschließend die Versuchsergebnisse zur Auflösung diskutiert.

##### Präzipitant:

Zur Auswahl des Präzipitanten wird ein Screening mit Polyethylenglykol in verschiedenen Molekulargewichten (1450 – 12000 Da) durchgeführt. Zur Bestimmung der Effizienz des Präzipitationsmittels werden Gleichgewichtsexperimente durchgeführt, welche separat in Doppelbestimmung angesetzt werden. In Abbildung 4-10 (a) ist der Verlauf der normierten Antikörperkonzentration im Überstand in Anwesenheit unterschiedlicher PEG Anteile in Gewichtsprozent gezeigt. In Abbildung 4-10 (b) ist die Konzentration der Nebenkomponenten im Überstand derselben Proben dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass mit zunehmendem Molekulargewicht weniger PEG ausreichend ist, um eine vollständige Fällung des Proteins zu erreichen. Je größer das PEG Molekül ist, desto effizienter wird das Zielprotein gefällt.

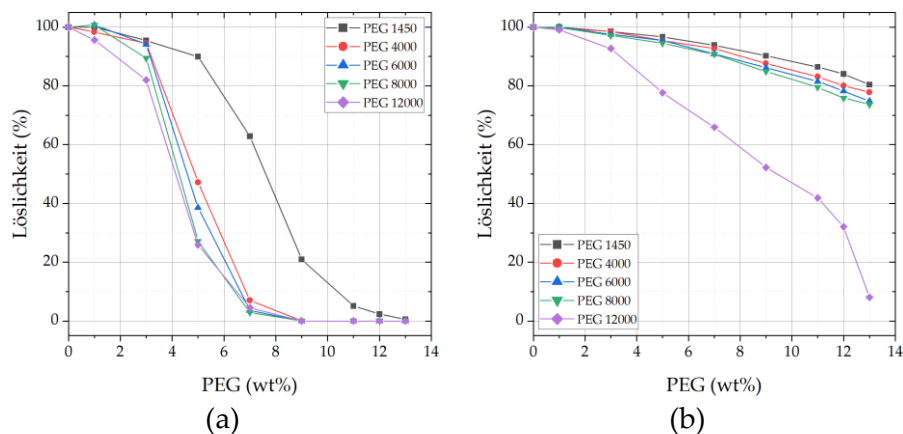


Abbildung 4-10: Screening zur Bestimmung des Präzipitationsmittels. (a) zeigen die Löslichkeitskurven des Antikörpers und (b) zeigt die der Nebenkomponenten [Lohmann 2020].

Gleichzeitig nimmt die Präzipitation der Nebenkomponenten mit steigendem Molekulargewicht ebenfalls zu (Abbildung 4-10 (b)). Für PEG Molekülen mit einem Molekulargewicht von 1450 bis 8000 sind lediglich kleine Unterschiede der Löslichkeit der Nebenkomponenten im Überstand zu beobachten. Diese bleiben überwiegend in Lösung ( $\geq 80\%$ ). Bei PEG 12000 hingegen werden schon bei geringen PEG Konzentrationen die Nebenkomponenten deutlich ausgefällt. Daraus lässt sich schließen, dass PEG mit einem Molekulargewicht von 12000 Da ungeeignet ist, da es nur noch eine geringe Selektivität gegenüber dem Antikörper besitzt. Der Antikörper ist mit einer Größe von 150 kDa deutlich größer als die Nebenkomponenten mit einer Größe

< 50 kDa. Unter Berücksichtigung der Präzipitationsmechanismen, lässt sich schließen, dass größere Moleküle bei gleichbleibender Molekülgröße des PEG mit zunehmendem Gewichtsanteil schneller präzipitieren als kleinere. Es wird PEG 4000 als Präzipitationsmittel gewählt, da die Nebenkomponten in Lösung gehalten werden sollen. Bei einem PEG Anteil von 12 wt% sind reproduzierbare Fällungsergebnisse bezüglich des Antikörpers von 100% erzielt worden. Gleichzeitig konnten mehr als 80% der Nebenkomponten in Lösung gehalten werden. Damit ist eine höhere Selektivität gegenüber dem Antikörper gegeben als bei der Verwendung von PEG 6000 und PEG 8000. Die Kettenlänge des PEG 1450 ist sichtlich zu kurz, da auch bei 12 wt% keine vollständige Fällung beobachtet wird. Diese Beobachtungen decken sich mit Angaben in der Literatur [Oelmeier 2013]. Im Prozess wird ein Gewichtsanteil von 12 wt% gewählt, um die vollständige Präzipitation bei eventuellen Prozessschwankungen sicherzustellen.

#### Temperatureinfluss:

Im Allgemeinen wirkt sich die Temperatur auf die Löslichkeit der Proteine aus, das als allgemeines Wissen aus Kristallisationsprozessen bekannt ist [McRee 1999]. Als Temperaturstufen werden die Raumtemperatur im Labor (25 °C), des Kühlraums (10°C) und der Kühlschränke (4°C) untersucht. In Abbildung 4-11 ist der Temperatureinfluss auf die Proteinlöslichkeit gezeigt.

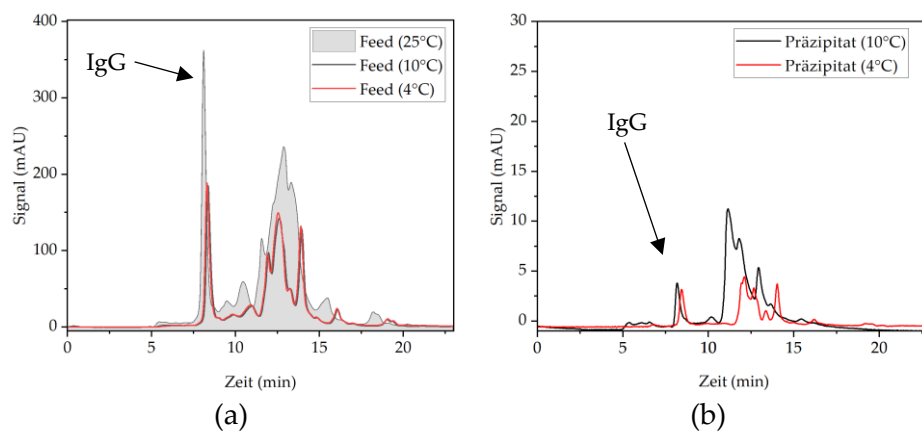


Abbildung 4-11: Temperatureinfluss als Risikofaktor in der Prozessentwicklung. (a) Darstellung des SEC-Chromatogramms der Leichten Phase (Feed) bei 25 °C und der Veränderung der Löslichkeit bei 10°C und 4°C. (b) aufgelöste Präzipitate in PBS- Puffer bei pH = 7.4.

#### 4. Ergebnisse zur Präzipitation von monoklonalen Antikörpern

Abbildung 4-11 (a) zeigt die leichte Phase (Feed) bei den jeweiligen Temperaturstufen. Bei Raumtemperatur findet keine Präzipitation statt. Bei 10°C und 4°C hingegen verringert sich sowohl die Proteinlöslichkeit für das Zielprodukt als auch die der Nebenkomponten. Die Präzipitate werden durch Zentrifugation abgetrennt (200 g) und in einem PBS-Puffer wieder aufgelöst. Das SEC-Chromatogramm der aufgelösten Präzipitate ist in Abbildung 4-11 (b) gezeigt. Es ist zu erkennen, dass sich sowohl Antikörper als auch Nebenkomponten in dem Präzipitat finden. Für die Risikobeurteilung der Temperatur während des Präzipitationsprozess bedeutet das, dass die Temperatur die Fällung zwar unterstützt, aber nicht selektiv ist. Deshalb ist ein Kühlen während der Präzipitation nicht zu empfehlen. Des Weiteren wirkt sich eine geringere Temperatur < 10°C limitierend auf den Auflösungsprozess aus. Aus den Ergebnissen wird abgeleitet, dass der Prozess bei Raumtemperatur durchgeführt wird und ein Kühlen keinen prozesstechnischen Vorteil bringt.

##### Bestimmung der Mischzeit:

Die benötigte Mischzeit der Präzipitation konnte ebenfalls mit der SOPAT Sonde aufgezeichnet werden. In Abbildung 4-12 ist die Entwicklung der Partikelanzahl als auch des mittleren Feret-Durchmessers graphisch über der Reaktionszeit gezeigt. Beide Graphen zeigen einen ähnlichen logarithmischen Verlauf und erreichen nach ca. 20 s ein Gleichgewichtszustand, indem sich die Partikelanzahl und Durchmesser der Präzipitate nicht mehr verändert.

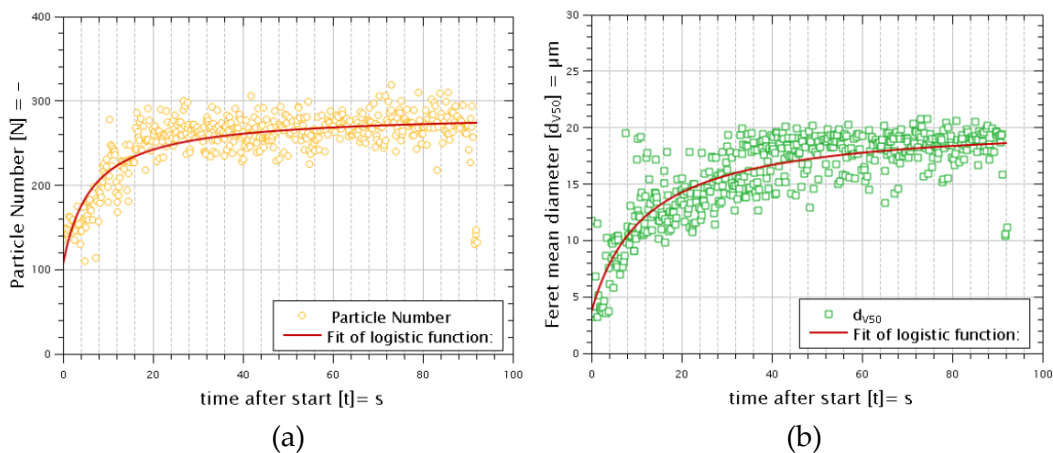


Abbildung 4-12: (a) Partikelanzahl- und der (b) mittlere Feret Durchmesser während der Präzipitation.

---

## 4. Ergebnisse zur Präzipitation von monoklonalen Antikörpern

Das spricht ebenfalls für einen spontanen Prozess und stützt die Vermutung des reaktionslimitierten Prozesses [Satzler 2020]. Die Analytik bestätigt, dass nach einer Mischzeit von 20 s kein gelöster Antikörper mehr im Überstand (rot) zu erkennen ist (siehe Abbildung 4-13).

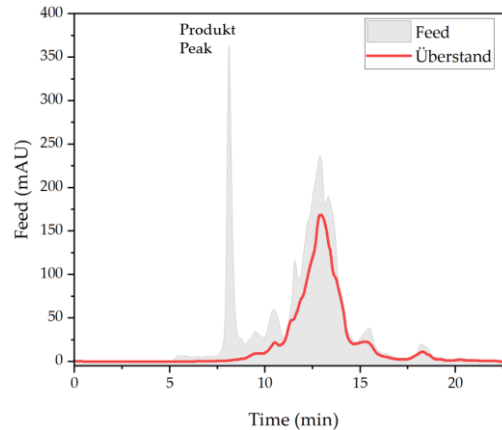


Abbildung 4-13: SEC Chromatogramm des Überstandes im Vergleich zum Feed.

### Waschen der Präzipitate:

Um oberflächliche Verunreinigungen von den Präzipitaten, zu entfernen wird untersucht wie sich ein Waschschriff auf die Reinheit und Ausbeute auswirkt. Es wird nach einer Waschlösung gesucht, welche die Präzipitationsbedingungen aufrechterhält und die Löslichkeit des Proteins minimiert, damit es in der präzipitierten Form bestehen bleibt. Aus diesem Grund werden Lösungen untersucht, die normalerweise zur Präzipitation genutzt werden, wie zum Beispiel gesättigte Ammoniumsulfat- und Natriumsulfat-Lösung. Des Weiteren wird eine 50 mM HEPES-Lösung mit pH 7 verwendet (HEPES: 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure), da dieses Puffersystem vielversprechende Ergebnisse in den Arbeiten von Li et al. ergeben hat [Li 2019, Li 2020]. Als vierte Lösung wird eine PEG 4000-Lösung (12 wt%) eingesetzt, weil diese zuvor als geeignetes Präzipitationsmittel identifiziert wurde. Der Waschvorgang mit Ammoniumsulfat ist auf Grund der starken Flockung nicht praktikabel und zeigt sehr schlechte Eigenschaften beim Auflösen. Für einen optimalen Waschschriff sollte kein Produktpeak im Überstand gelöst sein. Nach dem Waschen mit den genannten Lösungen ist jeweils der Überstand auf die Antikörperkonzentration

#### 4. Ergebnisse zur Präzipitation von monoklonalen Antikörpern

---

analysiert worden um den Produktverlust durch aufgelöste Präzipitate zu evaluieren. Bei der PEG Lösung ist ein Verlust von ca. 4,75% ermittelt worden, bei dem HEPES-Puffer von ca. 51,38% und bei der gesättigten Natriumsulfat-Lösungen von ca. 22,14%. Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass sich weder der HEPES-Puffer noch die Natriumsulfat-Lösungen zum Waschen der Präzipitate eignet, da sie die geringe Löslichkeit des Antikörpers nicht aufrechterhalten. Aus den Screening-Experimente ergibt sich, dass PEG 4000 mit einem Gewichtsanteil von 12 wt% am besten zum Waschen der Präzipitate geeignet ist. Ein weiteres Ergebnis der Screening-Experimente ist, dass die Durchführung eines Waschschrift äußerst sinnvoll ist. In Abbildung 4-14 (a) ist das Produkt aus der Präzipitation ohne zusätzlichen Waschschrift zu sehen. Es ist erkennbar, dass sowohl HMWs als auch LMWs in dem Produkt enthalten sind. Die Reinheit konnte durch den Waschschrift von 47,13% auf 78,74% gesteigert werden. Dies bedeutet eine Reinheitsgewinn der HMWs von 87,07 % auf 97,15 % und von 50,68% auf 80,61% für die LMWs. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Präzipitation mit PEG 4000 eine hohe Selektivität gegenüber dem Antikörper besitzt. Des Weiteren lässt sich daraus schließen, dass sich die Verunreinigungen überwiegend außerhalb und oberflächlich auf den Präzipitaten befinden (Abbildungsteil (b)), da sie sich durch einen Waschschrift zum Großteil entfernen lassen.

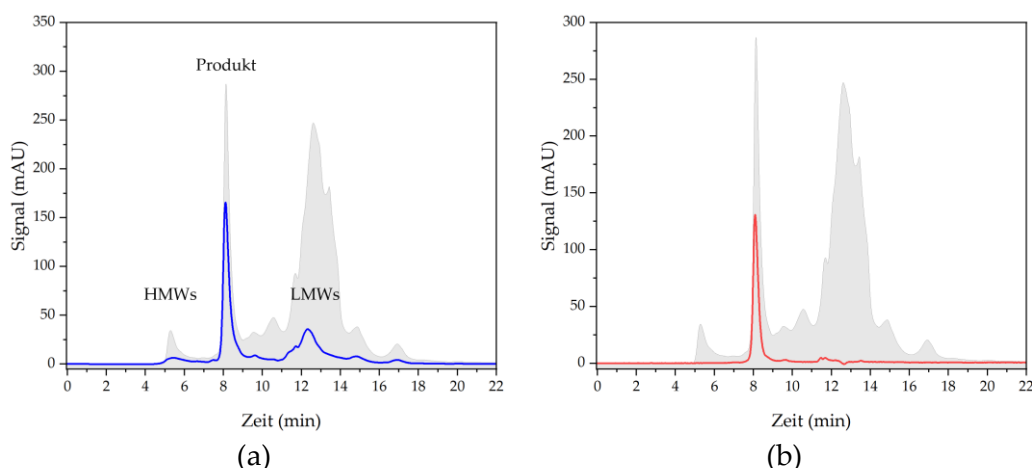


Abbildung 4-14: Vergleich des vorhandenen Nebenkomponenten mit und ohne Waschschrift. (a) zeigt das Produkt der Präzipitation ohne zusätzliches Waschen. (b) Präzipitationsprodukt mit Waschschrift.



### **Fazit zur Risikobewertung der Präzipitation**

Die Versuchsreihe zum Risikofaktor Präzipitation hat ergeben, dass eine vollständige und selektive Präzipitation mit PEG 4000 herbeigeführt werden kann, solange der PEG Gehalt bei 12 wt% liegt. Bei diesen Präzipitationsbedingungen verbleiben > 80% der Verunreinigung in Lösungen und können über eine Filtration abgetrennt werden. Des Weiteren hat eine geringe Temperatur von <10°C einen positiven Effekt auf die Präzipitation, da diese die Löslichkeit des Proteins zusätzlich herabsetzt, jedoch nicht selektiv ist. Aus diesem Grund wird von einer zusätzlichen Kühlung während der Präzipitation abgesehen. Für eine unlimitierte Auflösung muss die Löslichkeit maximiert werden, um Produktverluste zu verhindern. Das bedeutet konkret, dass der PEG Anteil auf ein Niveau von < 3 wt% gebracht werden muss [FDA 2021], welches im nächsten Abschnitt detaillierter thematisiert wird. Die Kontaktzeit von Präzipitant und Zielprotein ist eine Funktion der Mischzeit, da die Fällung spontan erfolgt. Drüber hinaus ist ein Waschschrift sinnvoll, da dieser eine Reinheitsgewinn ca. 30% des IgG bezogen auf den Gesamtproteingehalt ausmacht. Die Bewertung der Versuchsergebnisse hinsichtlich der Risikofaktoren für die Präzipitation ist in Tabelle 11-2 zusammengefasst und befindet sich im Anhang.

Im Folgenden werden die Versuchsergebnisse des Versuchsplans der Risikobewertung der Auflösung dargelegt. Es werden die Ionenstärke und der pH-Wert des Auflösungspuffers, der Einfluss des verbleibenden PEG Gehalts und das Auflösungsverhältnis untersucht.

### **Ionenstärke und pH-Wert:**

Zu Bestimmung des Einflusses von Ionenstärke und pH-Wert wird ein DoE mit unterschiedlichen Auflösungspuffern durchgeführt, welche in Ionenstärke (20 – 100 mM) und pH-Wert (3,5 – 6,5) variieren. Aus der Literatur ist bekannt, dass eine Salzkonzentration bis 1M in Abhängigkeit des verwendeten Salzes einen einsalzenden Effekt aufweist [Scopes 1994], welcher für die Auflösung ausgenutzt wird. Die

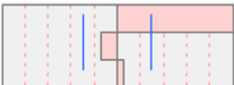
#### 4. Ergebnisse zur Präzipitation von monoklonalen Antikörpern

---

obere Salzkonzentration orientiert sich an den Vorgaben der nachfolgenden Ionenaustausch Chromatographie, da ein erhöhter Salzgehalt eine Herabsetzung der Bindungskapazität zur Folge hat. Der pH-Wert Bereich wird ausgehend vom Isoelektrischen Punkt (IP) gewählt, an dem die Löslichkeit des Proteins minimal wird. Der IP beträgt für das untersuchte Stoffsystem ca.  $\text{pH} \approx 8,45$  [Helgers 2021, Kornecki 2019b]. Je weiter der pH-Wert des Puffers vom IP des Proteins entfernt ist, desto besser wird dieses in der Lösung stabilisiert [Thompson 2016]. Es erfolgt eine statistische Auswertung der Daten, um die Effektauswirkung von Ionenstärke und pH-Wert auf die Ausbeute und Reinheit zu beurteilen. In Tabelle 4-2 ist die Auswertung der Effekte Ionenstärke und pH-Wert auf die Ausbeute gezeigt.

Tabelle 4-2: statistische Auswertung der Effekte von Ionenstärke und pH-Wert auf die Ausbeute

Term	Schätzung	Std Error	t-Wert	Prob >  t
Ionenstärke	0,308728	0,039246	7,87	<0,0001*
pH-Wert	-2,544885	2,2608	-1,13	0,2929
(Ionenstärke)*(pH-Wert)	0,0191978	0,04558	0,42	0,6847



Die blauen Linien visualisieren das Signifikanzniveau der Auswertung. Wird dieser überschritten, wie im Fall des Effektes Ionenstärke, besteht ein signifikanter Einfluss. Der pH-Wert hingegen hat keinen signifikanten Einfluss auf die Ausbeute. Der Ausschlag nach rechts oder links gibt an, ob sich der Effekt positiv oder negativ auf das Ergebnis auswirkt. Im Fall der Ausbeute hat die Zunahme der Ionenstärke einen positiven Einfluss. Das ist plausibel auf Grund des einsalzenden Effekts. Diese Auswertung wird ebenfalls für die Zielgröße Reinheit durchgeführt. In diesem Fall hat die Ionenstärke keinen signifikanten Effekt, jedoch der pH-Wert. Je geringer der pH-Wert desto besser ist die Reinheit der Produktlösung. Dieses Ergebnis ist ebenfalls plausibel, da sich die Löslichkeit der Nebenkomponenten bei geringen pH-Werten minimiert. Aus diesem Grund werden häufig Säuren zur Fällung von Nebenkomponenten eingesetzt [Brodsky 2012, Bull 1967, Parkkinen 2006].

### PEG Gehalt:

Der verbleibende PEG Anteil in der Produktlösung ist ein entscheidender Prozessparameter, welcher starken Einfluss auf die Ausbeute des Antikörpers nimmt. Die Auflösung funktioniert wie eine rückwärtige Präzipitation. Wird der PEG Anteil in der Lösung verringert, nimmt die Löslichkeit des Antikörpers zu. In Abbildung 4-15 ist in Grau die theoretische Gleichgewichtskonzentration des Antikörpers über dem PEG 4000 Anteil dargestellt.

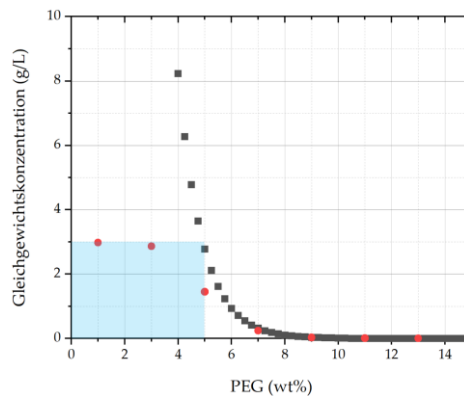


Abbildung 4-15: Gleichgewichtskonzentration des Antikörpers bei zunehmenden PEG Anteil (schwarz). Antikörperkonzentration in der Leichten Phase in Abhängigkeit des PEG Anteils (rot). Das Blaue Fenster gibt den Betriebsbereich an [Lohmann 2021].

Je geringer der verbleibenden PEG Anteil in der Produktlösung ist, desto höhere Antikörpertiter können in dem Produkt zurückgewonnen werden. Der Feed in Abbildung 4-15 hatte einen Titer von ca. 3 g/L und ist in Rot dargestellt. Bis zu einem Gewichtsanteil von 3 wt% findet kaum Präzipitation statt. Ab einem Anteil von 5 wt% beginnt der Antikörper auszufallen. Der geringe Offset zwischen dem berechneten Wert bei 5 wt% in grau und den experimentellen Daten in Rot ist durch die Anwesenheit von PEG 400 in der leichten Phase zu erklären, welches ebenfalls eine leicht präzipitierende Wirkung hat. Für die unlimitierte Auflösung muss für den untersuchten Laborprozess ein PEG Anteil von < 4 wt% in der Produktfraktion erreicht, da die Ausgangskonzentration mit 3 g/L vergleichsweise gering ist gegenüber industriellen Prozessen. Das zulässige Betriebsfenster für den PEG Anteil nach der Auflösung, ist in Blau gekennzeichnet.

### Auflösungsverhältnis:

Das Auflösungsverhältnis beschreibt das Verhältnis zwischen dem Feed Volumen, und dem Produktvolumen nach der Auflösung. Es beschreibt demnach ob in der Grundoperation eine Volumenreduzierung oder Vervielfältigung stattfindet. In Abbildung 4-16 ist die Ausbeute nach jeden Auflösungszyklus gezeigt.

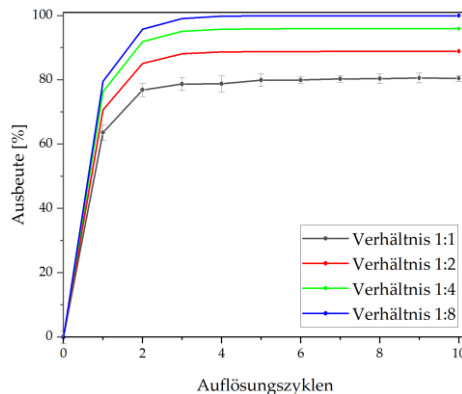


Abbildung 4-16: Ausbeutezuwachs während des Auflösungsprozesses [Lohmann 2020].

Ein Auflösungszyklus beschreibt die Zeit, welche benötigt wird, um das Prozessvolumen einmal im Kreis zu führen. Dabei ist zu beachten, dass die Abbildung unterschiedliche Volumen-verhältnisse während der Auflösung der Präzipitate zeigt. In dem Verhältnis von 1:1 (Schwarze Linie), welches keiner Volumenveränderung vor und nach der Grundoperation entspricht, ist deutlich zu erkennen, dass der größte Konzentrationsgewinn in den ersten drei Zyklen (ca. 60 min) stattgefunden hat. Danach stagniert die Auflösung weitestgehend. In dem vorherigen Abschnitt zum PEG Gehalt ist deutlich geworden, dass dieser limitierend auf die Auflösung wirken kann. In den Proben war ein zurückbleibender PEG Anteil von ca. 4 wt% gemessen worden, welches laut der Löslichkeitskurve in Abbildung 4-10 einer thermodynamisch möglichen Ausbeute von ca. 75-80% des Zielproteins entspricht. Durch die Erhöhung des Auflösungsverhältnisses kann der zurückbleibende PEG Anteil stärker reduziert werden. Aus diesem Grund sind weitere Verdünnungen untersucht worden. Das Auflösungsverhalten ist in mehreren Experimenten beobachtet worden und hat mehrere Male denselben Verlauf gezeigt. Deshalb sind für die Verdünnungsverhältnisse 1:2/1:4/1:8 jeweils die Endpunkte bestimmt worden. Mit der steigenden Verdünnung

wird auch der zurückgebliebene PEG Anteil in den Proben weiter verdünnt und es kann eine Ausbeute von bis zu 100% erreicht werden. Dieses Ergebnis zeigt sehr deutlich, dass die Auflösung, der durch PEG 4000 geformten Präzipitate, eine Funktion des verbleibenden PEG Anteils ist. Die Ergebnisse zum Risikofaktor Auflösung haben ergeben, dass der Puffer eine essentielle Rolle bei der Stabilisierung des Proteins spielt. Ein saurerer pH-Wert (pH 5) stabilisiert den Antikörper besser als ein pH-Wert in der Nähe des IP des Proteins. Zudem hat die untersuchte Ionenstärke bis 100 mM Salz einen einsalzenden und stabilisierenden Effekt auf das Protein. Des Weiteren ist der PEG Anteil für die Auflösung limitierend, wenn dieser sich nicht in dem Betriebsfenster von  $< 4$  wt% Restanteil PEG liegt. Die detaillierten Ergebnisse befinden sich in Tabelle 11-3 im Anhang.

### 4.4 Modellierung des kontinuierlichen Präzipitationsprozesses

Die Modellierung des Digitalen Zwillings erfolgt am Beispiel des kontinuierlichen Präzipitationsprozesses mit dem Programm Aspen Custom Modeler (ACM) von Aspen Technology, Inc. Das Programm ist dafür ausgelegt, schnell maßgeschneiderte Prozessmodelle zu erstellen. Es ist modular aufgebaut, sodass einzelne Modellblöcke zu einem komplexen Prozess zusammengefügt und leicht verändert werden können. Zur Entwicklung eines Prozessmodells wurde von Sixt et al. ein Workflow erstellt, welcher als Ergebnis ein validiertes Modell sicherstellt [Sixt 2018]. Zunächst wird die Modellaufgabe definiert, um festzulegen, welche Größen durch das Modell abgebildet werden müssen. Im Falle der Präzipitation soll das Modell in der Lage sein die Qualitätsattribute Konzentration, Ausbeute und Reinheit der Zielkomponente vorherzusagen. Die geeigneten mathematischen Zusammenhänge werden durch Literaturrecherche und *Prior Knowledge* zusammengetragen und in ACM implementiert. Im zweiten Schritt wird das allgemeingültige Modell verifiziert und auf seine Plausibilität geprüft. Dazu werden erste Modellstudien durchgeführt, die zeigen, dass das Modell die auftretenden Effekte realistisch abbildet. Zusätzlich werden Tools wie charakteristische Kennzahlen und die Massenbilanz genutzt, um die richtige

## 4. Ergebnisse zur Präzipitation von monoklonalen Antikörpern

---

Größenordnung der Vorhersage zu verifizieren. Ist das Modell plausibel, werden Sensitivitätsstudien durchgeführt, um das Verhalten des Modells weiter zu untersuchen. Eine allgemeine Sensitivitätsstudie dient zur Identifizierung der Parameter im Modell, die einen signifikanten Einfluss auf das Simulationsergebnis haben. Daraus wird ein Konzept zur Bestimmung der Modellparameter abgeleitet, welches zur experimentellen Determination der sensitiven Modellparameter dient. Dieses Konzept dient ebenfalls dazu, die Anpassung des allgemeingültigen Modells auf ein neues Stoffsystem durch wenige Laborexperimenten zu gewährleisten. Sobald die Modellparameter bestimmt sind, wird mit der Fehlerfortpflanzung der experimentelle Fehler der Bestimmungsexperimenten ermittelt. Um die Auswirkung dieser fehlerbehafteten Bestimmung auf die Simulationsergebnisse darzustellen, werden die Kriterien Genauigkeit (*engl.: accuracy*) und Präzision (*engl.: precision*) eingeführt. Die Genauigkeit gibt die Fähigkeit zur Vorhersage der experimentellen Daten im Rahmen eines vorgegebenen Datensatz an Modellparametern an. Die Präzision hingegen beschreibt, welche Auswirkung die Fehler und Unsicherheiten während der Modellparameterbestimmung auf die Simulationsergebnisse haben. Die Präzision des Modells ist dann ausreichend, wenn der Modellfehler innerhalb des Fehlers der Reproduzierbarkeit der Experimente liegt.

### 4.4.1 Implementierung des Modelles

Das allgemeingültige Modell ist modular aus mehreren Untermodellen aufgebaut, die je nach Prozessführung miteinander verbunden werden können. Die Validierung des Modells wird am Beispiel des kontinuierlichen Prozesses gezeigt. Das Modell besteht aus sieben Tanks, zwei Hohlfasermodulen und drei statischen Mischern, entsprechend dem Aufbau der kontinuierlichen Einheit (siehe Abbildung 4-7). Die einzelnen Modellteile sind mit dem Port „Material“ verbunden, welcher den Gesamtmassenfluss, die Massenströme der Komponenten IgG (eq), PEG 4000 (eq), HCP (eq), Präzipitat IgG (s) und Präzipitat HCP (s) sowie die mittlere Dichte und die

mittlere Viskosität beinhaltet. Das Modell ist aus vier Tanks zur Bilanzierung der eintretenden Ströme Leichte Phase, PEG 4000, Waschlösung und Auflösungspuffer, sowie drei weitere Tanks für die austretenden Ströme Produkt, Permeat 1 und 2 aufgebaut. Im statischen Mischer wird eine Massenbilanz zur Bestimmung des austretenden Stroms gelöst. Der Mischer ist in  $x$ -Richtung entlang der Länge diskretisiert, um die Durchmischung im statischen Mischer mit dem axialen Dispersionsmodell aus Gleichung (2-7) zu berechnen. Der Reaktionsterm im axialen Dispersionsmodell entspricht Gleichung (2-7), welche die Präzipitation von Haupt- und Nebenkomponente beschreibt. Im Hohlfasermodul ist die Selektivitäts- und Permeabilitätsanalyse implementiert, welche die Selektivität der Membran gegenüber den enthaltenen Komponenten mit dem porenabhängigen Siebkoeffizienten ausdrückt. Die Verblockung der Membran und auch der Filtrationswiderstand ( $R$ ) sind über den Intermediate Blocking Ansatz implementiert. Des Weiteren ist die relative hydraulische Permeabilität implementiert, welche die aktuelle Permeabilität mit der Permeabilität zum Zeitpunkt  $t=0$  ins Verhältnis setzt. Wird die relative hydraulische Permeabilität nahezu null, gleichen die Fasern einem Rohr ohne poröse Wand. Der Transmembrandruck steigt nicht weiter an, da die Druckdifferenz zwischen Einlass der Fasern und Auslass geringer ist als der Transmembrandruck über die Membran. Die Filtration kommt zum Erliegen, da der Strom den Weg des geringsten Widerstands geht und die Triebkraft durch die Membran nicht ausreichend ist. Die Abnahme des Permeatflusses bei dem konstanten Transmembrandruck wird klassisch über das Gesetz von Darcy berechnet.

### 4.4.2 Simulationsstudien zur Modell Validierung

In diesem Kapitel werden die durchgeführten Simulationsstudien zur Modellvalidierung präsentiert und die Ergebnisse auf ihre Plausibilität evaluiert. Es werden insgesamt drei Simulationsstudien durchgeführt, welche 1. die Veränderung eines Parameters berücksichtigt, 2. die Variation mehrerer Parameter zur selben Zeit und 3. eine zufällige Variation der Modellparameter beinhaltet.

**Sensitivitätsstudie I (One Parameter)**

Zur Validierung des aufgestellten Modells wird zunächst eine *One-Parameter-at-a-time-Study* durchgeführt, welche zur Überprüfung der Plausibilität dient. Des Weiteren wird durch diese Studie gezeigt, ob das allgemeingültige Modell die physikalischen Effekte richtig abbildet und dem erwarteten Verhalten entspricht. Die Modellparameter werden zunächst aus Literaturdaten abgeschätzt, beziehungsweise im Labor für das vorliegende Stoffsystem bestimmt. Die Fehlerrechnung der Größen, beziehungsweise die Fehlerangaben aus den Literaturquellen, werden als minimal und maximal Werte für die Variation der Modellparameter in der Sensitivitätsstudie verwendet. Die relevanten Modellparameter für die Präzipitation sowie Auflösung sind in Tabelle 4-3 aufgeführt. Es werden die Parameter Präzipitationseffizienz ( $\beta_{IgG}$ ), die intrinsische Proteinlöslichkeit ( $\kappa_{IgG}$ ), Kinetik der Präzipitation ( $k_{prec}$ ) und der Auflösung ( $k_{diss}$ ) untersucht. Außerdem spielt die Geometrie der Mischelemente, in Form der volumenspezifischen Oberfläche ( $a$ ), als auch die Reduzierung des Mischer Volumens durch die statischen Mischelemente ( $eps$ ) eine entscheidende Rolle.

Tabelle 4-3: Relevante Modellparameter für die statischen Mischer

Parameter	Symbol	Wert (± Fehlerintervall)	Einheit
Präzipitationseffizienz mAb	$\beta_{IgG}$	0,55 (± 0,0385)	-
Intrinsische Proteinlöslichkeit mAb	$\kappa_{IgG}$	2,801 (± 0,1961)	-
Kinetik Präzipitation	$k_{prec}$	4,6154 (± 0,2917)	1/s
Kinetik Dissolution	$k_{diss}$	0,75 (± 0,0342)	1/s
Vol. spez. Oberfläche Mischers	$a$	110 (± 2,2)	1/cm
Hold-up Mischer	$eps$	0,77 (± 0,0253)	-

Präzipitation und Auflösung finden in den statischen Mixchern statt, sodass die Veränderungen dieser Parameter im Konzentrationsverlauf der Zielkomponente in den Mixchern sichtbar werden. Die Konzentrationsverläufe sind in Abbildung 4-17 über der dimensionslosen Länge des Mischers aufgetragen. Zudem ist von den jeweiligen Profilplots eine vergrößerte Ansicht dargestellt, um die Effekte für die Beurteilung besser sichtbar zu machen. Der vergrößerte Bereich ist jeweils in den Abbildung 4-17 (a), (c), (e) mit einem gestrichelten Kasten gekennzeichnet.



## 4. Ergebnisse zur Präzipitation von monoklonalen Antikörpern

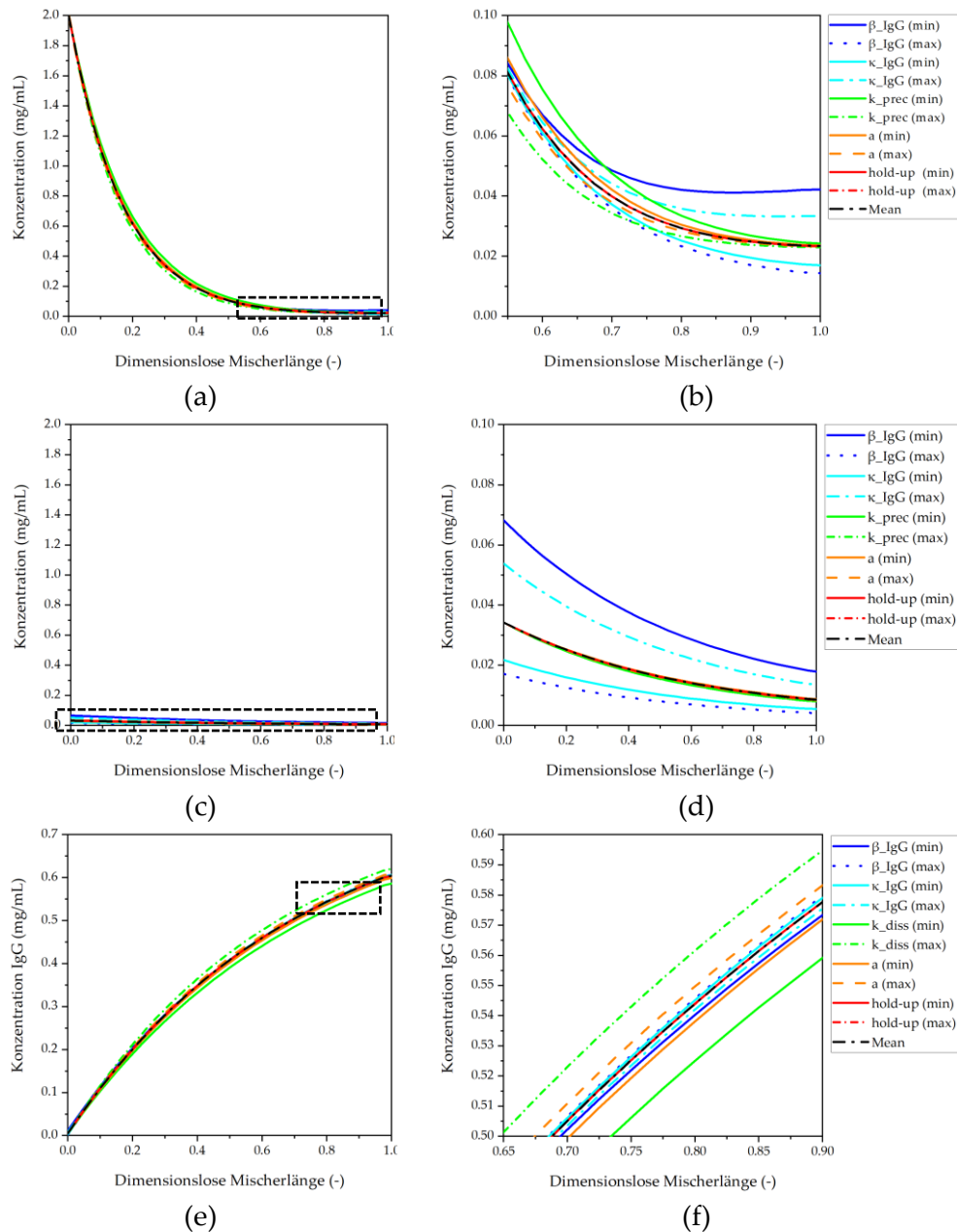


Abbildung 4-17: One-Parameter Studie der Modellparameter in den Mischern. (a) stellt Mischer 1 in dem die Präzipitation stattfindet, (b) Mischer 2, in dem das Waschen der Präzipitate und (c) Mischer 3 in dem die Auflösung stattfindet.

Es wird deutlich, dass während der Präzipitation vor allem der Kinetik Parameter ( $k_{prec}$ ) einen Einfluss auf die Präzipitationskurve hinsichtlich der Reaktionsgeschwindigkeit hat. Je größer  $k_{prec}$  ist, desto stärker ist die Konzentrationsänderung der Zielkomponente gekrümmt und desto schneller läuft die Präzipitation ab. Einen weiteren deutlichen Einfluss haben die Präzipitationseffizienz und die intrinsische Löslichkeit auf die Präzipitationskurve. Das ist ebenfalls plausibel, da diese Werte den Gleichgewichtszustand der Proteinlöslichkeit bei Anwesenheit eines bestimmten PEG

#### 4. Ergebnisse zur Präzipitation von monoklonalen Antikörpern

Anteils beschreiben. In den untersuchten Simulationen liegt der PEG Anteil bei 12 wt%, sodass eine vollständige Fällung des Antikörpers gewährleistet wird. Ist die Präzipitationseffizienz reduziert, verbleibt ein kleiner Anteil an Antikörper im Überstand, sodass es zu einem Produktverlust kommt. Beide Werte sind abhängig voneinander, da sie anhand einer Gleichgewichtskurve bestimmt werden. Im zweiten Mischer haben, ähnlich wie bei Mischer 1, die Präzipitationseffizienz und die intrinsische Proteinlöslichkeit den größten Einfluss auf den Konzentrationsverlauf. Der Kinetik Parameter  $k_{prec}$  hat in diesem Fall einen geringen Einfluss, da die Präzipitation im Mischer 2 bereits abgeschlossen ist. Die hinzugefügte Waschlösung besteht aus einer PEG-Wasser-Lösung mit einem PEG Anteil von 12 wt%, sodass die Präzipitationsbedingungen aufrecht gehalten werden. Eine spontane Auflösung wird auf diese Weise verhindert. Die Konzentrationsabnahme über die Länge des zweiten Mixers resultiert aus der Zugabe der Waschlösung. Im dritten Mischer, in dem durch Absenkung des PEG Anteils die Auflösung eingeleitet wird, ist hauptsächlich der Einfluss des Kinetik Parameters relevant. Die Veränderung der Präzipitationseffizienz und der intrinsischen Proteinlöslichkeit beeinflusst wie bereits in den vorherigen Mixern den Gleichgewichtswert, dessen Abweichungen am Ausgang des Mixers am größten sind. Um die Bedeutung des Gleichgewichtswerts zu verdeutlichen, ist der Einfluss der Präzipitationseffizienz bei unterschiedlichen PEG Anteilen für die Präzipitation und die Auflösung in Abbildung 4-18 gezeigt.

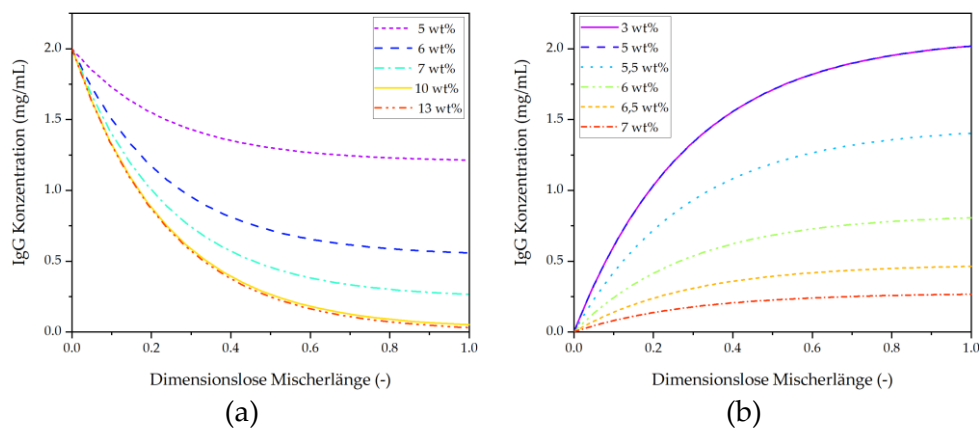


Abbildung 4-18: Einfluss des PEG Anteils auf die Präzipitation (a) und die Dissolution (b).

#### 4. Ergebnisse zur Präzipitation von monoklonalen Antikörpern

Alle anderen Parameter werden gleich gehalten. Die Thermodynamische Limitierung ist anhand der Gleichgewichtslinien zu erkennen. Ab einem PEG Anteil < 10wt% ist mit deutlichen Produktverlusten während der Präzipitation zu rechnen. Derselbe Effekt ist bei der Auflösung zu sehen, bei der ab einem PEG Anteil von > 5 wt% die Auflösung der Präzipitate durch den Gleichgewichtswert limitiert wird. Für industrielle Prozesse gilt bereits ein PEG Anteil < 3 wt% als limitierend, da mit deutlich höheren Titern (bis zu 25 - 50 g/L) gearbeitet wird. Matheus et al. haben für einen Antikörpertiter von 100 g/L einen Grenzwert von < 1,5 wt% PEG 4000 als nicht limitierend ermittelt [Matheus 2009]. Die FDA hat zudem Grenzwerte für erlaubte inaktive Bestandteile in Pharmazeutika festgelegt, die für PEG 4000 in einer Injektionslösung bei einem Wert von 3wt%/v liegen. [FDA 2021]. Analog zu den Modellparametern für Präzipitation und Auflösung, werden die Modellparameter, welche die Filtration beeinflussen, in Tabelle 4-4 zusammengefasst. Die Membranwiderstände ( $R_0$ ) zum Zeitpunkt  $t = 0$ , sowie die Filtrationskonstante ( $K_i$ ), wirken sich auf den Transmembrandruck und die Verblockung der Membran während des Filtrationsprozesses aus.

Tabelle 4-4: Relevante Modellparameter für die Filtration mit Hohlfasermodule

Parameter	Symbol	Wert (± Fehlerintervall)	Einheit
Filtrationskonstante	$K_i$	0,45 (± 0,0293)	-
Membranwiderstand (HF 1)	$R_{0HF1}$	1,55E+11 (± 4,50E+10)	1/cm
Membranwiderstand (HF 2)	$R_{0HF2}$	2,5E+10 (± 7,50E+9)	1/cm
Dicke der Membran	$\delta_{Mem}$	0,5 (± 0,25)	$\mu\text{m}$
Porosität der Membran	$\epsilon_{Mem}$	0,5 (± 0,25)	-
Masse IgG im Filterkuchen (HF 1)	$m_{\text{Cake}_{HF1}}$	33,75 (± 1,401)	mg
Masse IgG im Filterkuchen (HF 2)	$m_{\text{Cake}_{HF2}}$	47,20 (± 1,42)	mg

Die Membranwiderstände sind bei baugleichen Hohlfasermodule beim Start des Prozesses unterschiedlich, da die Membranen zum einen verschieden belastet werden ( $LMH_{HF1} = 12 \frac{L}{m^2h}$  und  $LMH_{HF2} = 60 \frac{L}{m^2h}$ ) und zum anderen das zu filtrierende Medium eine unterschiedliche Viskosität aufweist. Beide Größen haben gemäß dem Gesetz von Darcy Einfluss auf den Widerstand. Des Weiteren haben die Parameter Dicke ( $\delta_{Mem}$ ) und Porosität ( $\epsilon_{Mem}$ ) der Membran eine Auswirkung auf die Filtration,

#### 4. Ergebnisse zur Präzipitation von monoklonalen Antikörpern

da diese zur Berechnung der hydraulischen Permeabilität genutzt werden. Diese gibt den Zeitpunkt an, ab dem die Fasern nicht mehr als Membranmaterial funktionieren, sondern als Strömungsröhre. Dies tritt als Folge einer vollständig verblockten Membran auf. Die Beschreibung des steigenden Transmembrandrucks auf Basis des zunehmenden Filtrationswiderstandes ist ausreichend zur Beschreibung der Filtration, allerdings nicht für das Schließen der Massenbilanz der Zielkomponente. Es konnte in Experimenten gezeigt werden, dass sich ein Teil der Präzipitate irreversibel auf der Membranoberfläche ablagert und es zum Membran Fouling kommt. Um die Massenbilanz der Zielkomponente im Modell schließen zu können, muss der Massenstrom an IgG zur Membran berücksichtigt werden. Der Einfachheit halber wurde zunächst eine lineare Transportrate des IgG zur Membran angenommen. Dazu ist die absolute Masse an IgG auf den jeweiligen Membranmodulen ( $m_{Cake_{HF1}}$  und  $m_{Cake_{HF2}}$ ) am Versuchsende bestimmt worden. In Abbildung 4-19 sind die Druckverläufe von (a) dem ersten Hohlfasermodule, in dem die Konzentrierung der Präzipitate stattfindet, und (b) dem Hohlfasermodule in welchem die Präzipitate gewaschen werden, dargestellt.

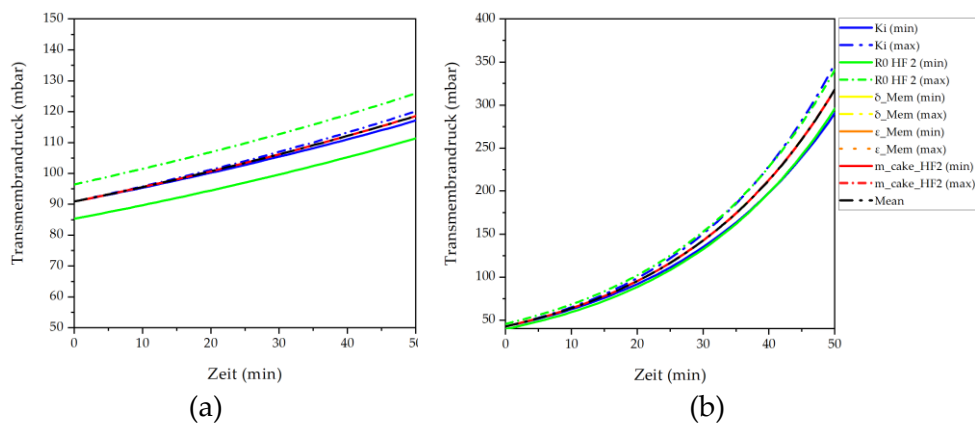


Abbildung 4-19: One-Parameter Studie der Modellparameter, welche die Filtration beeinflussen. (a) zeigt den Transmembrandruck im ersten Hohlfasermodule und (b) den im zweiten.

Von den betrachteten Modellparametern haben hauptsächlich die Filtrationskonstante ( $K_i$ ) und der Membranwiderstand zu Beginn der Filtration einen Einfluss auf den Druckverlauf. Die Filtrationskonstante wurde für beide Hohlfasermodule separat aus den Druckverläufen bestimmt, hat allerdings für beide Filtrationen denselben Wert

ergeben ( $K_i = 0,45$ ). Da der Transmembrandruck vom spezifischen Volumen abhängig ist, ist der lineare Anstieg im ersten Modul im Vergleich zum zweiten Modul plausibel. Durch die unterschiedliche Belastung bei gleicher Membranfläche (ca. Faktor fünf), beträgt das spezifische Volumen am Ende des Experiments im ersten Modul ca. ein Fünftel des spezifischen Volumens gegenüber dem zweiten Modul. Dadurch ist die Verblockung der Membran im ersten Modul deutlich langsamer als im zweiten. Hier ist ebenfalls erkennbar, dass der Transmembrandruck in den ersten zehn Minuten linear ansteigt und danach in den exponentiellen Anstieg des Drucks übergeht, welches auf eine baldige Verblockung der Membran hindeutet. Für eine Verlängerung der Prozessdauer müsste an dieser Stelle ein anderes Membranmodul mit einer größeren Membranfläche gewählt werden.

#### **Sensitivitätsstudie II (Multiparameter)**

Im nächsten Schritt wird eine *Multiparameter-at-a-time Study* durchgeführt, um die Parameter zu identifizieren, welche einen signifikanten Einfluss auf das Modellergebnis der Qualitätsattribute „Ausbeute“ und „Reinheit“ haben. Dazu werden zu den Modellparametern aus der One-Parameter-at-a-time Studie die Betriebsparameter hinzugenommen. Als Betriebsparameter werden die einstellbaren Massenflüsse der Pumpen Feed, PEG, Waschlösung, Auflösungspuffer sowie, Permeat 1 und 2 definiert. Zur Variation der Betriebsparameter wird ein teilfaktorieller Versuchsplan erstellt, welcher nachfolgend ebenfalls im Labor durchgeführt wird. Des Weiteren wird die Faseranzahl der Hohlfasermodule als Betriebsparameter festgelegt. Diese Größe hat einen direkten Einfluss auf die Membranfläche und ist damit ein essentieller Parameter für die Filtration. Kommerziell erwerbliche Hohlfasermodule sind darüber hinaus in Faserlänge und Faserdurchmesser variabel. Da in der experimentellen Studie lediglich die Faseranzahl verändert worden ist, werden die Faserlänge und der Faserdurchmesser nicht weiter betrachtet. Beide Größen wirken sich ebenfalls auf die Membranfläche aus. Daher wird der Effekt einer größeren Membranfläche stellvertretend durch die Variation der Faseranzahl untersucht. Die verwendeten Größen für die

#### 4. Ergebnisse zur Präzipitation von monoklonalen Antikörpern

---

Multi-Parameter-at-a-time Studie sind in Tabelle 4-5 zusammengefasst. Die Auswertung der Sensitivitätsstudie II erfolgt statistisch mit dem Programm JMP von SAS. Das Ziel der Studie ist die Identifikation der sensitiven Parameter, welche einen signifikanten Effekt auf das Modellergebnis haben. Als Zielgrößen werden die Ausbeute, Reinheit und der PEG Anteil im Produkt herangezogen. Zusätzlich werden die Transmembrandrücke im ersten und zweiten Hohlfasermodule als Zielgröße ausgewertet. Da die Hohlfasermodule nicht über eine Stützschiicht an der Membran verfügen, fällt der zulässige Druck mit einem maximalen Druck von 2000 mbar gering aus.

Tabelle 4-5: Betriebsparameter für die Multiparameter -Studie

Betriebsparameter	Symbol	Wert (± Fehlerintervall)	Einheit
Massenfluss LP	$\dot{m}_{LP}$	5140 (± 770)	mg/min
Massenfluss PEG (40 wt%)	$\dot{m}_{PEG}$	1470 (± 220)	mg/min
Massenfluss PEG (12 wt%)	$\dot{m}_{Wash}$	6850 (± 1030)	mg/min
Massenfluss (Permeat 1)	$\dot{m}_{Per 1}$	2160 (± 325)	mg/min
Massenfluss (Permeat 2)	$\dot{m}_{Per 2}$	8300 (± 1250)	mg/min
Massenfluss (Auflösung)	$\dot{m}_{diss}$	6230 (± 930)	mg/min
Faseranzahl	$n_{fiber}$	14 / 75	-

Mit dem vollständigen Datensatz aus Eingangs- und simulierten Ausgangsgrößen wird zunächst ein Effektscreening durchgeführt, wodurch signifikante Parameter identifiziert werden. Ausschließlich die signifikanten Parameter werden im nächsten Schritt genutzt, um ein statistisches Modell zu erzeugen, welches die simulierten Daten anhand der gegebenen Eingangsgrößen schätzt. Dieses statistische Modell wird als Grundlage für die weitere Auswertung mit JMP verwendet. Für jede Zielgröße wird ein eigenes statistisches Modell erzeugt, da jeweils andere Parameter signifikant sind. Die Darstellung erfolgt im Detail für die Zielgrößen „Ausbeute“ und „Reinheit“. In Abbildung 4-20 ist das Paritätsdiagramm für die Zielgröße „Ausbeute“ und „Reinheit“ gezeigt. Hier werden die beobachteten Werte, die in JMP als Ergebniswerte aus der Simulation mit ACM hinterlegt sind, mit den Werten aus dem statistischen Modell verglichen. Idealerweise liegen die Werte auf der Winkelhalbierenden (rote Linie). Die Blaue Gerade stellt den Mittelwert der gegebenen Zielgröße dar. Für einen signifikanten statistischen Effekt muss die rote die blaue Gerade schneiden.

## 4. Ergebnisse zur Präzipitation von monoklonalen Antikörpern

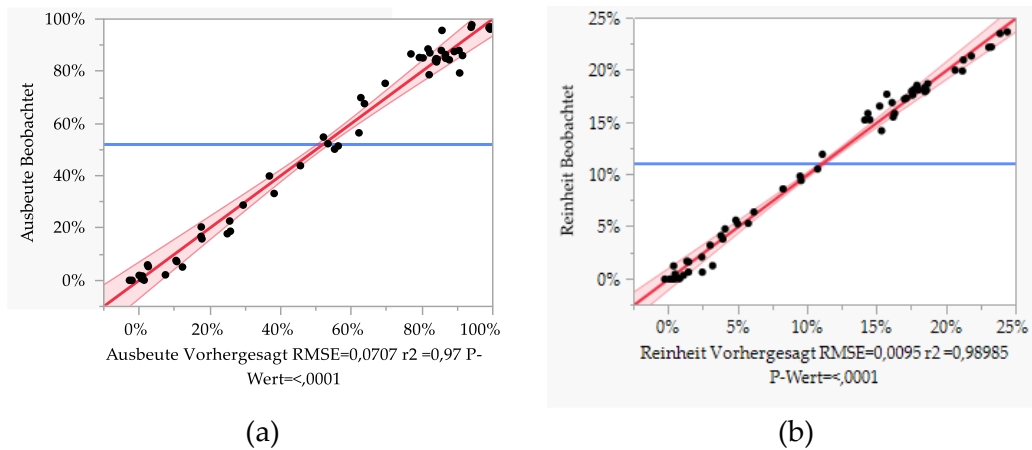


Abbildung 4-20: Diagramm zur Beurteilung der Güte des statistischen Modells unter Angabe von RMSE, Bestimmtheitsmaß und p-Wert. (a) zeigt die Auswertung für die Zielgröße Ausbeute und (b) für die Zielgröße Reinheit.

Die gestrichelte rote Linie, dessen Fläche um die Paritätsgerade schraffiert ist, stellt das Signifikanzniveau der Vorhersage dar. Für die gezeigten Ergebnisse wurde ein Signifikanzniveau von 0,05 gewählt. Zusätzlich sind unter dem Diagramm die Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung (engl.: *RMSE*, *root mean square error*) der Vorhersage ( $RMSE_{Ausbeute} = 0,0707$  und  $RMSE_{Reinheit} = 0,0095$ ), das Bestimmtheitsmaß ( $R^2_{Ausbeute} = 0,97$  und  $R^2_{Reinheit} = 0,98$ ) und der Signifikanzwert (P-Wert), welcher für beide Zielgrößen mit  $\leq 0,0001$  angegeben ist. Diese Werte geben eine Einschätzung der Güte der statistischen Modellvorhersage. Sobald der p-Wert  $< 0,05$  ist, liegt ein signifikanter Effekt vor. Die Analyse der Residuen der Zielgrößen „Ausbeute“ und „Reinheit“ ist in Abbildung 4-21 dargestellt.

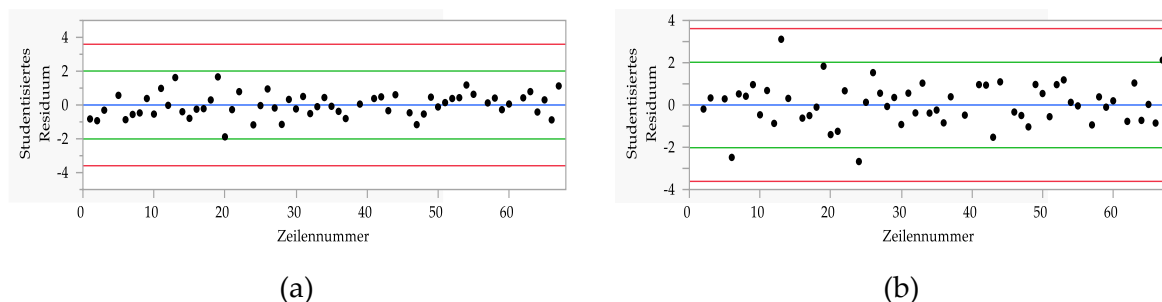


Abbildung 4-21: Bewertung der studentisierten Residuen für (a) die Ausbeute und (b) die Reinheit. Extern studentisierte Residuen mit 95% simultanen Bonferroni-Grenzen in Rot, Einzelwertgrenzen durch die Fehlerrechnung in Grün.

Diese wird durchgeführt, um Trends oder Muster in den Daten zu erkennen. Eine zufällige Streuung der Residuen unter- und oberhalb des Mittelwerts (blauen Linie) ist

#### 4. Ergebnisse zur Präzipitation von monoklonalen Antikörpern

wünschenswert, da andernfalls die Vermutung naheliegt, dass nicht alle vorliegenden Effekte von dem statistischen Modell abgebildet werden. Die Zusammenfassung der Effekte der einzelnen Modell- und Betriebsparameter auf das Gesamtergebnis sind in Tabelle 4-6 und Tabelle 4-7 angegeben. In dieser Darstellung ist ablesbar ob sich ein Parameter positiv oder negativ auf die jeweilige Zielgröße auswirkt. In beiden Fällen sind die Präzipitationseffizienz ( $\beta$ ), die intrinsische Proteinlöslichkeit ( $\kappa$ ), die Massenströme von PEG, Wash und des Auflösungspuffers relevant für das Modellergebnis. Des Weiteren spielt der Kinetik Parameter der Auflösung eine Rolle für die Reinheit, welches sich mit den Ergebnissen aus Simulationsstudie I deckt. Es fällt auf, dass sich dieselben Parameter auf das Ergebnis der Ausbeute und Reinheit auswirken, sodass von einer richtigen mathematischen Implementierung der Effekte ausgegangen werden kann.

Tabelle 4-6: Effektzusammenfassung der Modellparameter auf das Ergebnis der Zielgröße Ausbeute.














Term	Schätzer	Std.-Fehler	t-Wert		p-Wert
$\beta_{IgG}$	-0,087071	0,007555	-11,53		<,0001*
$\dot{m}_{Diss}$	0,0687071	0,007555	9,09		<,0001*
$\kappa$	0,0667571	0,007555	8,84		<,0001*
$\dot{m}_{wash}$	-0,044271	0,007555	-5,86		<,0001*
$\dot{m}_{PEG}$	-0,043414	0,007555	-5,75		<,0001*
$k_{diss}$	0,02025	0,007555	2,68		0,0134*

Tabelle 4-7: Effektzusammenfassung der Modellparameter auf das Ergebnis der Zielgröße Reinheit.

Term	Schätzer	Std.-Fehler	t-Wert		p-Wert
$\beta_{IgG}$	-0,014188	0,001117	-12,71		<,0001*
$\dot{m}_{Diss}$	0,010333	0,001117	9,25		<,0001*
$\kappa$	0,0097759	0,001117	8,75		<,0001*
$\dot{m}_{PEG}$	-0,00869	0,001117	-7,78		<,0001*
$\dot{m}_{wash}$	-0,00726	0,001117	-6,50		<,0001*
$\dot{m}_{LP}$	-0,00601	0,001117	-5,38		<,0001*
$k_{diss}$	0,0036741	0,001117	3,29		0,0035*

Dies bedeutet, dass bei einem gleichbleibenden PEG Anteil, die Löslichkeit des Zielproteins geringer ausfällt und es bereits bei niedrigeren PEG Anteilen zur vollständigen Präzipitation des Antikörpers kommt. Des Weiteren kann die Aussage gemacht werden, je effizienter der Antikörper gefällt wird, desto weniger Produktverlust entsteht durch die nachfolgenden Filtrationsschritte. Dies liegt darin begründet,



dass die Porengröße der Membran um ein Vielfaches größer ist als der hydrodynamische Radius des Antikörpers. Das führt dazu, dass dieser im gelösten Zustand vollständig permeiert. Demensprechend wirkt sich eine ineffiziente Fällung direkt negativ auf die Ausbeute und die Reinheit aus. Je weniger Antikörper im Produkt ist, desto geringer wird die Reinheit, wenn der Anteil der Nebenkomponten sich nicht verändert. Die Erhöhung von  $\kappa$  hingegen hat einen negativen Effekt auf das Ergebnis, da diese Erhöhung eine höhere intrinsische Proteinlöslichkeit bedeutet. Diese bewirkt, dass die Präzipitationskurve mathematisch in y-Richtung verschoben wird. Eine Veränderung der intrinsischen Löslichkeit des Proteins ist ohne Anpassung von Beta jedoch nicht plausibel, da beide Größen nicht unabhängig voneinander sind, und nur zusammen bestimmt werden können. Der Massenstrom des Auflösungspuffers hat einen positiven Effekt auf Ausbeute und Reinheit, da eine Erhöhung mit einer stärkeren Verdünnung des zurückbleibenden PEG Anteils einhergeht, sodass keine thermodynamische Limitierung der Auflösung stattfindet. Der Kinetik Parameter der Auflösung hat ebenfalls einen positiven Effekt, da eine Erhöhung von  $k_{\text{diss}}$  zu einer schnelleren Auflösung der Präzipitate führt. Der Einfluss ist jedoch deutlich geringer als der des Massenstroms  $\dot{m}_{\text{diss}}$ . Die Erhöhung der Massenströme von Präzipitant ( $\dot{m}_{\text{PEG}}$ ) und der Waschlösung ( $\dot{m}_{\text{wash}}$ ) führen beide zu einem negativen Effekt auf Ausbeute und Reinheit. Je mehr PEG im System ist, desto mehr PEG muss ebenfalls durch die Filtrationsschritte entfernt oder bei der Auflösung stärker verdünnt werden. Eine stärkere Entfernung geht mit einer höheren Belastung der Hohlfasermodule einher, welche dadurch schneller zusetzen können. Eine Erhöhung des PEG Massenstroms, bei gleichbleibendem Feed Massenstrom, führt ebenfalls dazu, dass sich das Verhältnis zwischen Feed und PEG verschiebt und mehr PEG (> 12 wt%) zur Fällung zur Verfügung steht. Dieses ist zunächst nicht schädlich für die Präzipitation des Antikörpers, sondern hat eine stärkere Co-Präzipitation der Nebenkomponten zur Folge. Das deckt sich mit dem negativen Effekt des PEG Massenstroms auf die Zielgröße Reinheit in Tabelle 4-7. Abschließend hat die Erhöhung des Feed Massenstroms einen

#### 4. Ergebnisse zur Präzipitation von monoklonalen Antikörpern

negativen Effekt auf die Reinheit. Auch dieser Effekt ist plausibel, da durch einen größeren Feed Massenstrom absolut mehr Nebenkomponten ins System gelangen. Bei einem gleichbleibenden Anteil an Ausbeuteverlusten wirkt sich eine höhere absolute Masse an Nebenkomponten negativ auf die Reinheit aus. Die Gewichtung der Signifikanz der einzelnen Parameter wird im Pareto Diagramm über dem standardisierten Effekt dargestellt, wie in Abbildung 4-22 dargestellt.

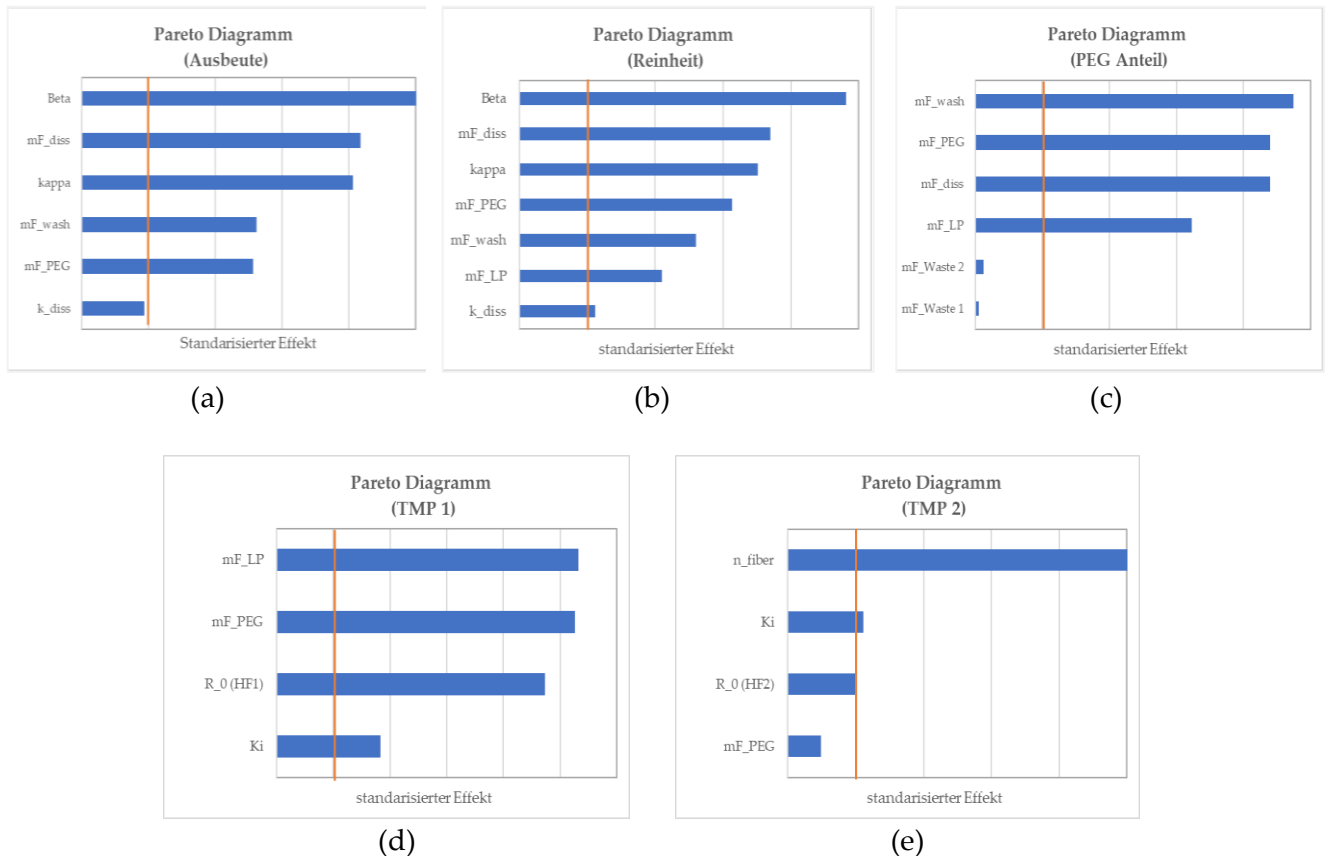


Abbildung 4-22: Pareto Diagramme zur Visualisierung der gewichteten Signifikanz der einzelnen untersuchten Modell- und Betriebsparameter. (a) zeigt das Pareto Diagramm für die Zielgröße Ausbeute, (b) für die Reinheit, (c) für den im Produkt zurückbleibenden Anteil an PEG und (d-e) die signifikanten Parameter für die Transmembrandrucke in den Hohlfasernmodulen 1 und 2.

Die Balken, welche die orangene Linie schneiden, weisen einen signifikanten Effekt auf das Modellergebnis auf. Es sind die Pareto Diagramme der Zielgrößen Ausbeute, Reinheit, und PEG Anteil sowie die Diagramme der Transmembrandruck in den Hohlfasernmodulen gezeigt. Die detaillierte statistische Auswertung des PEG Anteils und der Transmembrandrucke ist analog zu der Auswertung von Ausbeute und Reinheit durchgeführt worden und befindet sich im Anhang (Kapitel 11). Im Hohlfasernmodul 1

sind besonders die eingehenden Ströme signifikant, da diese den Massenfluss des Permeat 1 bestimmen, sodass die Präzipitate weiterhin ausreichend konzentriert werden. Des Weiteren ist der Membranwiderstand relevant und die Filtrationskonstante. In einigen Experimenten wurde das zweite Hohlfasermodule, auf Grund der stärkeren Belastung, mit einem nächst größerem Modul ausgetauscht. Die vergrößerte Membranfläche (470 cm<sup>2</sup>), welche vom Hersteller vorgegeben ist, beträgt ca. Faktor fünf gegenüber dem vorherigen Modul (88 cm<sup>2</sup>). Das Modul variiert ausschließlich in der Faseranzahl, weshalb dieser Parameter in die statistische Auswertung mit aufgenommen wurde. Es wird deutlich, dass die Membranfläche die stärkste Auswirkung auf den Transmembrandruck ausübt, welches sehr plausibel ist. Auf Basis der ermittelten, signifikanten Modellparameter, wird in Kapitel 4.4.3 ein Parameterbestimmungskonzept präsentiert, welches für die Anpassung des Modells auf ein neues Stoffsystem notwendig ist. Es wird die Vorgehensweise zur Bestimmung der Parameter gezeigt, welche neu bestimmt werden müssen. Alle weiteren Parameter des Modells sind allgemein gültig und können unverändert bleiben.

#### **Sensitivitätsstudie III (Monte Carlo):**

Zur Beurteilung der Präzision des Modells und zur Bestimmung des Modellfehlers wird abschließend eine Monte-Carlo Simulationsstudie durchgeführt. Aufgrund der Vielzahl an Parametern werden, für ein aussagekräftiges Ergebnis, 300 Simulationen durchgeführt. Anschließend werden die Ergebnisse statistisch mit der PLS-Regression ausgewertet, um Zusammenhänge zwischen den Eingabegrößen (Prädiktoren) und den Ergebnissen (Responses) zu erkennen und auf ihre Plausibilität zu evaluieren. Zu den Eingabegrößen gehören die Modellparameter, die normalverteilt zufällig in dem jeweiligen Fehlerintervall variieren können, als auch die einstellbaren Betriebsparameter, wie zum Beispiel die Massenströme. Als Ergebnisgrößen werden erneut die Ausbeute, Reinheit, PEG Anteil und die Transmembrandrucke TMP 1 und TMP 2 untersucht. Bei der PLS Regression werden sogenannte Hauptkomponenten (*engl.: PC, Principal Components*) ermittelt, welche die Varianz im Ergebnisraum

#### 4. Ergebnisse zur Präzipitation von monoklonalen Antikörpern

(Responses) erklären (siehe Abbildung 4-23 (a)). Das Ziel dieser Analyse ist, möglichst viel Varianz durch wenige PCs zu erklären, da auf diese Weise eine Reduktion der Daten auf die Haupteinflüsse geschieht. Zufällige Effekte haben eine geringe Varianz und werden aus diesem Grund nicht in der Regression berücksichtigt.

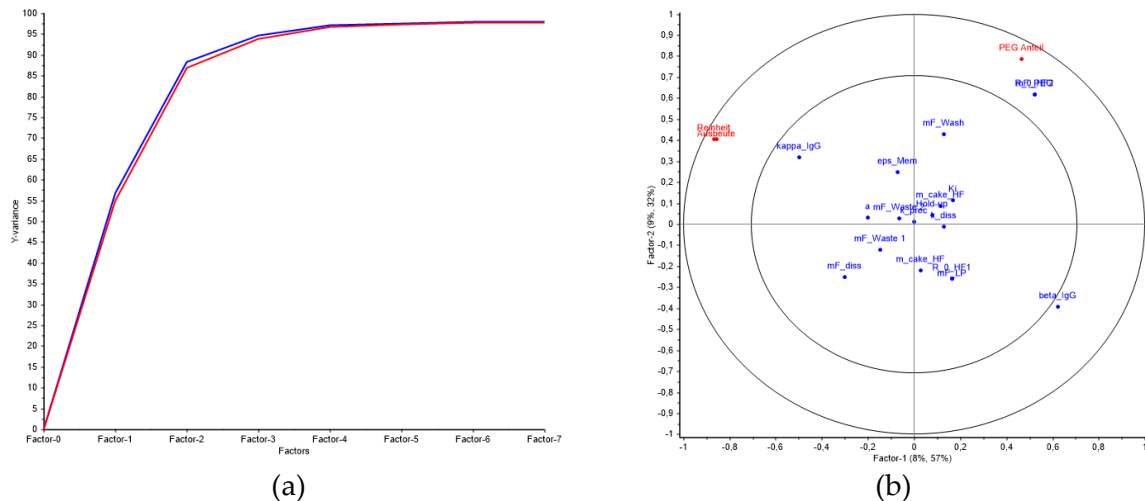


Abbildung 4-23: (a) Erklärte Varianz durch Faktoren und (b) der Korrelation Loadings Plot, welcher die Zusammenhänge von Ein- und Ausgangsgrößen visualisiert.

Bei der Verwendung von zu vielen PCs kann es zu dem zum Over Fitting der Daten kommen. Der Korrelation Loadings Plot in Abbildung 4-23 (b) zeigt die Stärke der Korrelation zwischen den einzelnen Eingangs- (blau) und Ausgangsgrößen (rot) auf den Hauptkomponenten eins und zwei. Es werden nur PC 1 und PC 2 betrachtet, da diese bereits 87% der Gesamtvarianz erklären. Größen korrelieren dann signifikant, wenn sie zwischen dem äußeren und dem inneren Kreis liegen. Eingangs- und Ausgangsgrößen, welche sich gegenüber liegen sind antiproportional und Größen, die sich überlagern sind proportional zueinander. Orthogonal zueinanderstehende Größen korrelieren nicht untereinander. In Abbildung 4-23 (b) sind Ausbeute und Reinheit antiproportional zur Präzipitationseffizienz. Je geringer die Präzipitationseffizienz ist, desto weniger PEG wird zum Fällen der Zielkomponente benötigt. Im Umkehrschluss bedeutet das für die Auflösung, dass bereits bei geringeren PEG Anteilen im Produkt eine Limitierung der Auflösung besteht, welche eine reduzierte Ausbeute zur Folge hat. Aus diesem Grund ist die antiproportionale Auswirkung auf die Ausbeute plausibel. Gleichzeitig sinkt die Reinheit, sobald die Ausbeute der Zielkomponente sinkt,

---

#### 4. Ergebnisse zur Präzipitation von monoklonalen Antikörpern

---

da die Verunreinigungen unverändert bleiben. Dieses Ergebnis ist konsistent, da sich bereits in der zweiten Simulationsstudie die Signifikanz der Präzipitationseffizienz gezeigt hat. Der PEG Anteil im Produkt ist proportional abhängig von dem PEG Massenstrom und dem Membranwiderstand. Sind beide Eingangsgrößen erhöht, durch Änderung des Massenfluss oder der Membranfläche, erhöht sich ebenfalls der PEG Anteil im Produkt. Eine Erhöhung des Massenstroms hat zur Folge, dass mehr PEG im System ist, welches über die Filtration entfernt werden muss. Dementsprechend muss ein größerer Permeatfluss eingestellt werden. Wird die Belastung der Membran dadurch zu hoch, kommt es schneller zu einer Verblockung der selbigen, sodass das PEG nicht mehr effizient aus dem System entfernt werden kann und resultiert in einem erhöhten PEG Anteil im Produkt. Dieser Effekt ist ebenfalls plausibel. Des Weiteren ist zu sehen, dass die Transmembrandrücke in dem Betriebspunkt nicht signifikant sind. Das bedeutet, dass die ausgewählten Membranmodule eine ausreichend große Membranfläche für den untersuchten Laborprozess aufweisen. Darüber hinaus wird der Modellfehler anhand der Monte-Carlo Simulationen bestimmt. Dazu werden der Mittelwert, die Standardabweichung und der resultierende Fehler für Ausbeute und Reinheit berechnet. Die Daten sind aus Tabelle 4-8 zu entnehmen. Das Modell hat einen geringen Modellfehler von 0,61%. Daraus wird geschlussfolgert, dass der Bestimmungsfehler der Modellparameter keinen signifikanten Einfluss auf das Modellergebnis zeigt. Der experimentelle Fehler dieses Betriebspunktes liegt bei 2,23%. Somit ist der Modellfehler kleiner als der experimentelle Fehler, sodass sich das entwickelte Modell zu Substitution von Laborexperimenten eignet.

Tabelle 4-8: Ergebnisse der Modellfehlerbestimmung anhand der Monte-Carlo Simulation

	<b>Ausbeute</b>	<b>Reinheit</b>
Mittelwert ( $\bar{x}$ )	70,05 %	12,47%
Standardabweichung ( $\sigma$ )	10,63%	1,66%
Modellfehler	0,61 %	0,10%

### 4.4.3 Konzept zur Bestimmung der Modellparameter

Als Ergebnis der Simulationsstudie II sind die Präzipitationseffizienz in Verbindung mit der intrinsischen Löslichkeit, sowie die Kinetik Parameter für Präzipitation und Auflösung als relevante Modellparameter bestimmt worden. Des Weiteren sind der Membranwiderstand und die Filtrationskonstanten, welche den Mechanismus der Verblockung beschreiben, als signifikant determiniert worden. Abschließend wird die absolute Masse an Zielkomponente auf dem Filtermaterial bestimmt. Diese Größe ist zwar nicht als signifikant in der Sensitivitätsstudie determiniert worden, ist allerdings notwendig, um die Massenbilanz der Zielkomponente im Modell schließen zu können.

#### Bestimmung der Präzipitationsparameter

Zur Simulation der Präzipitationskurve sind die Präzipitationseffizienz und die intrinsische Löslichkeit von entscheidender Bedeutung. Beide Parameter werden anhand der Löslichkeitskurve des Zielproteins und der Nebenkompenten bei Anwesenheit von PEG 4000 bestimmt. Dazu werden Gleichgewichtsexperimente durchgeführt. Es wird begonnen bei 1 wt% mit einer Steigerung des PEG Anteils um jeweils 2 wt%. Ab einem PEG Anteil von 9 wt% wird erwartet [Matheus 2009], dass die vollständige Präzipitation stattgefunden hat, sodass die Steigerung des PEG Anteils der nachfolgenden Gleichgewichtspunkte auf das Intervall von 1 wt% verringert wird. Alle Gleichgewichtspunkte werden über dem PEG Anteil aufgetragen, wie in Abbildung 4-24 (a) gezeigt ist. Die schwarze Linie stellt die Präzipitation des Antikörpers dar und die rote die Co-Präzipitation der Nebenkompenten. Auf der y-Achse ist die relative Löslichkeit in Prozent aufgetragen, welche auf die Anfangskonzentration des Feed normiert ist. Die Ergebnisse für die PEG 4000 Präzipitation sind vergleichbar mit Arbeiten aus der Literatur [Matheus 2009, Oelmeier 2013]. Hämmerling et al. haben gezeigt, dass die allgemeine Gleichung zur Beschreibung des Aussalz-Effekts von Cohn et al. [Cohn 1925] ebenfalls auf die PEG Präzipitation übertragen werden kann [Hämmerling 2017]. Demnach besteht eine schematische Präzipitationskurve aus dem

#### 4. Ergebnisse zur Präzipitation von monoklonalen Antikörpern

Diskontinuitätspunkt, an dem die Präzipitation einsetzt, der Präzipitationseffizienz, welche die Steigung der Präzipitationskurve vorgibt und der intrinsischen Proteinlöslichkeit, welche bei Abwesenheit von PEG vorliegt. Um die Präzipitation ausreichend beschreiben zu können, müssen laut Hämmerling et al. mindestens zwei dieser drei Parameter bestimmt werden. Cohn beschreibt den Zusammenhang zwischen der logarithmierten Protein Löslichkeit als linear [Cohn 1925]. Die logarithmierte Proteinkonzentration wird über dem Verhältnis aus Präzipitant und Protein aufgetragen. Daraus wird die Steigung der Gerade bestimmt, wie in Abbildung 4-24 (b) dargestellt.

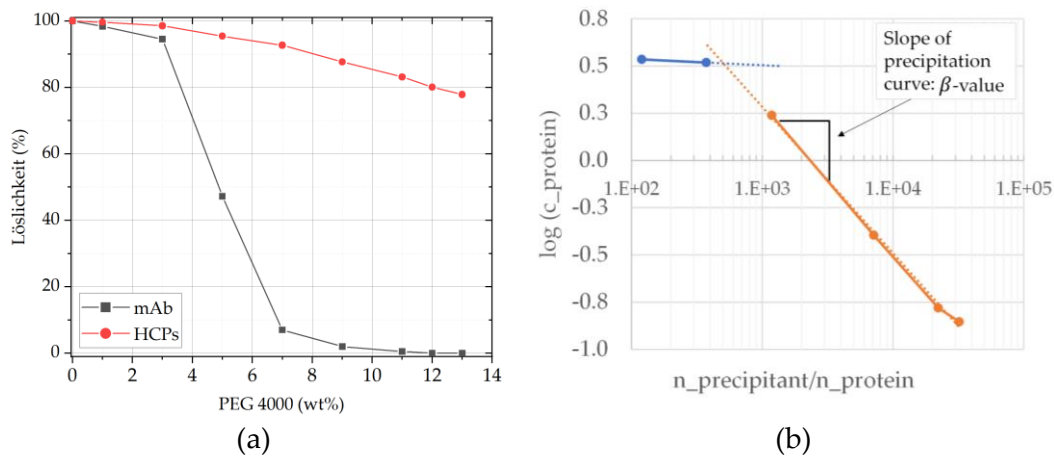


Abbildung 4-24: Gleichgewichtskurve zur Bestimmung der Präzipitationsparameter. (a) prozentuale Löslichkeit über dem PEG Anteil. (b) logarithmierte Konzentration der Zielkomponente über dem Stoffmengenverhältnis von Präzipitant (PEG 4000) zu Protein.

Für die Präzipitationseffizienz ergibt sich  $\beta = 0,48$ . Für die logarithmierte intrinsische Protein Löslichkeit in Abhängigkeit der Anwesenheit von PEG ergibt sich  $\kappa = 2,802$ . Sim et al. haben gezeigt, dass die Präzipitationseffizienz  $\beta$  ebenfalls, unter Berücksichtigung der hydrodynamischen Radien von Protein und PEG Molekül, berechnet werden kann [Sim 2012]. Die verwendete Gleichung (2-2) ist in Kapitel 2.1 angegeben. Das Ergebnis der berechneten Präzipitationseffizienz von  $\beta = 0,471$  stimmt sehr gut mit dem experimentell ermittelten Ergebnis überein.

### Bestimmung der Präzipitationskinetik

Zur Bestimmung der Präzipitationskinetik wird ein Batch Experiment durchgeführt. Es wird in einem Becherglas der Feed mit gelöstem Antikörper vorgegeben und mit einem Magnetrührer gerührt. Anschließend wird von der 40 wt% PEG-Lösung so viel hinzugefügt, dass nach der Zugabe ein PEG 4000 Anteil von 12 wt% vorliegt. Während der Präzipitation wird in einem Probenintervall von 20 s eine Probe vom Überstand genommen. Ein kleineres Probenintervall ist wegen des experimentellen Handlings nicht möglich. Diese Probe wird anschließend mit einem 0,2 µm Filter filtriert, um die Partikel vor der HPLC Analytik zu entfernen. Des Weiteren wird die Probe direkt im HPLC Vial verdünnt, um eine weitere Präzipitation zu unterbinden. Aus der Risikoidentifizierung in Kapitel 4.2 und der Bestimmung der Mischzeit ist bekannt, dass die Präzipitation spontan eintritt und eine Funktion der Durchmischung darstellt. Der Kinetik Parameter drückt dementsprechend die Geschwindigkeit der Konzentrationsabnahme pro Zeit aus. Die Konzentrationsmessung gestaltet sich allerdings sehr schwierig, da das Zeitintervall der Probenahme zu lang ist, um die spontane Konzentrationsabnahme während der Präzipitation aufzuzeichnen. Bei dem beschriebenen Experiment ist bereits in der ersten Probe (nach 20 s) kein Antikörper im Überstand gelöst. Durch kontinuierliche Zugabe über 60 s konnte die Konzentrationsabnahme aufgezeichnet werden (siehe Abbildung 4-25).

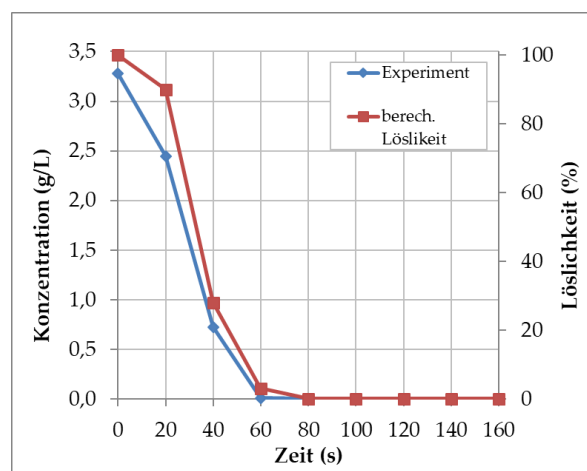


Abbildung 4-25: kontinuierliche Zugabe des Präzipitanten über eine Pumpe mit definierten Volumenstrom.



#### 4. Ergebnisse zur Präzipitation von monoklonalen Antikörpern

In Blau ist die Antikörperkonzentration, die mit der HPLC (Protein A) gemessen wurde gezeigt und in rot ist die berechnete Löslichkeit, welche zu dem jeweiligen Zeitpunkt der Probenahme im Becherglas vorliegen müsste. Die Löslichkeit wird über den PEG Anteil, welcher mit dem eingestellten Volumenstrom des Präzipitanten und dem Ausgangsvolumen des Feeds berechnet werden kann, bestimmt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die gemessene Konzentration des Antikörpers, jeweils dem der Löslichkeit entspricht, die durch den aktuellen PEG Anteil vorgegeben ist. Das bedeutet ebenfalls, dass die Präzipitation abgeschlossen ist sobald Präzipitant und Feed vollständig vermischt sind. Da die Konzentrationsabnahme spontan erfolgt werden aus diesem Grund eine Leitfähigkeits- und eine Trübungssonde eingesetzt, um den Verlauf während der Präzipitation online zu messen. Beide Messtechniken sind nicht geeignet, um die Konzentration des Zielproteins zu bestimmen, sie sind jedoch in der Lage den Zeitpunkt anzugeben, an dem die Präzipitation abgeschlossen ist. Eine konstante Leitfähigkeit beschreibt den vollständig durchmischten Zustand. In Abbildung 4-26 (a) ist der Verlauf der Leitfähigkeit über die Versuchszeit gezeigt (grün). Im Vergleich dazu ist die Präzipitationskurve in blau gezeigt. Sobald die Leitfähigkeit konstant ist, ist auch die Konzentration des Antikörpers im Überstand Null. Mit der Trübungssonde ist ein ähnlicher Verlauf zu erkennen. Die Kurve der Trübung ist am steilsten, solange die Präzipitation des Antikörpers stattfindet.

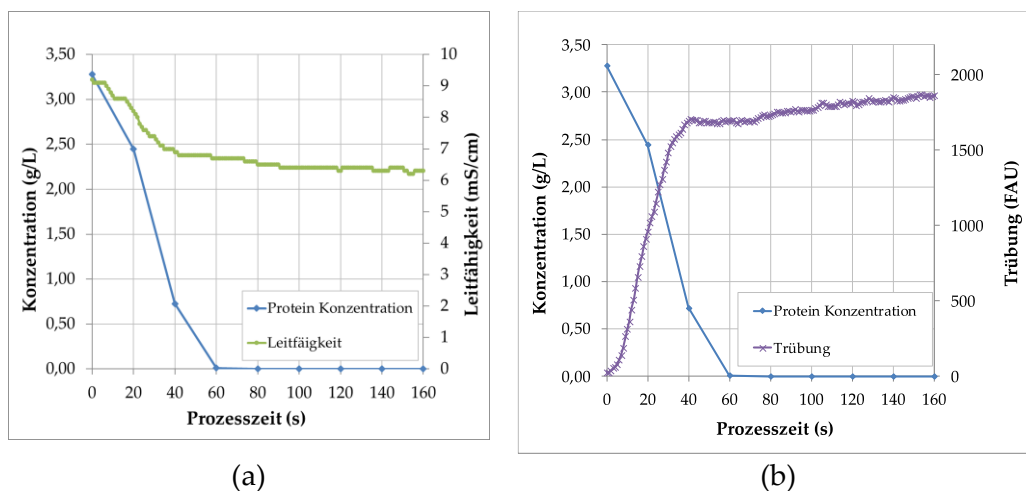


Abbildung 4-26: Verlauf der (a) Leitfähigkeit und der (b) während eines Batch Präzipitationsexperiments.

#### 4. Ergebnisse zur Präzipitation von monoklonalen Antikörpern

---

Anschließend steigt die Trübung leicht weiter an, was auf eine verzögerte Präzipitation von Nebenkomponenten oder den Zerfall größerer Präzipitate in mehrere kleinere hindeutet. Die Trübung zeigt somit indirekt den Verlauf der Partikelbildung an. Der Kinetik Parameter für die Präzipitation ergibt sich nach dieser Bestimmungsmethode zu einem Wert von  $k_{prec} = 0,0769 \frac{1}{s}$ .

#### Bestimmung der Auflösungskinetik

Die Bestimmung des Kinetik Parameters der Auflösung erfolgt analog zu dem experimentellen Aufbau des Präzipitationsparameters. In diesem Fall ist die Auflösung jedoch langsamer als die Präzipitation, sodass die Bestimmung mit der Konzentrationsmessung mit der At-line Analytik (Protein A) möglich ist. Die Auflösung ist nicht direkt an die Durchmischung gekoppelt, wodurch die Verwendung der Trübungs- oder Leitfähigkeitssonde nicht zielführend ist. Es wird wieder ein Batch Experiment durchgeführt in dem alle 20 s eine Probe genommen wird. Die Rückgewinnung des gelösten Antikörpers ist in Abbildung 4-27 gezeigt. Die gelöste Masse Antikörper ist auf die Ausgangsmasse normiert, sodass die Auflösung in Prozent angegeben wird. Der Kinetik Parameter für die Auflösung ergibt sich nach dieser Bestimmungsmethode zu einem Wert von  $k_{diss} = 0,0125 \frac{1}{s}$ .

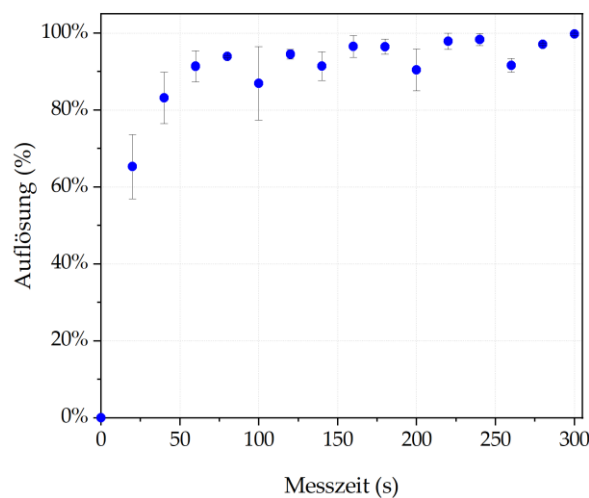


Abbildung 4-27: Bestimmung des Kinetik Parameters während der Auflösung.

### Bestimmung des Membranwiderstandes

Der Membranwiderstand wird mit einem unbenutzten Membranmodul bestimmt. Da der Versuchsaufbau zu Beginn mit einer 12 wt% PEG Lösung gefüllt wird, wird der Membranwiderstand auch bei diesen Bedingungen gemessen. Es werden unterschiedliche Flussraten eingestellt und der resultierende Transmembrandruck gemessen. Zusätzlich wird die dynamische Viskosität der PEG-Waschlösung bestimmt. Über das Gesetz von Darcy (siehe Gleichung (2-8)) wird der Widerstand berechnet.

### Bestimmung des Verblockungsmechanismus

Der Verblockungsmechanismus der Membranen wird separat aus den Druckprofilen der beiden Hohlfasermodule bestimmt. Dazu wird der Transmembrandruck über dem spezifischen Volumen aufgetragen, wie in Tabelle 2-3 gezeigt. Für das vollständige  $\left(\frac{1}{p}\right)$ , Standard  $\left(\frac{1}{\sqrt{p}}\right)$  und Intermediate Blocking  $(\ln(p))$  wird der Transmembrandruck, nach der angegebene Vorschrift, umgerechnet und über das spezifische Volumen ( $v$ ) aufgetragen. Für die Kuchenfiltration wird  $p$  über  $v$  aufgetragen. Das spezifische Volumen stellt die Membrankapazität dar, welche als Kenngröße zur Vergleichbarkeit von Filtrationsprozessen mit unterschiedlichen Membranflächen genutzt wird. Die aufgetragenen Druckdaten werden durch eine Trennlinie gefittet und aus dessen Steigung die Verblockungskonstanten  $K_b$ ,  $K_s$ ,  $K_i$  und  $K_c$  berechnet. Es wird der Verblockungsmechanismus zur Modellierung ausgewählt, welcher graphisch und rechnerisch, über das Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ), die experimentellen Daten am besten abbildet. In Abbildung 4-28 sind die Druckdaten des ersten Hohlfasermoduls (Konzentration der Präzipitate) dargestellt. Die Schwarzen Punkte sind die Messdaten aus dem Experiment und die rote Line stellt den linearen Fit dar. In den gezeigten Daten fällt auf, dass alle Verblockungsmechanismen eine gute Übereinstimmung mit den experimentellen Daten haben, da das Bestimmtheitsmaß für alle vier Mechanismen zwischen  $0,94 < R^2 < 0,95$  liegt.

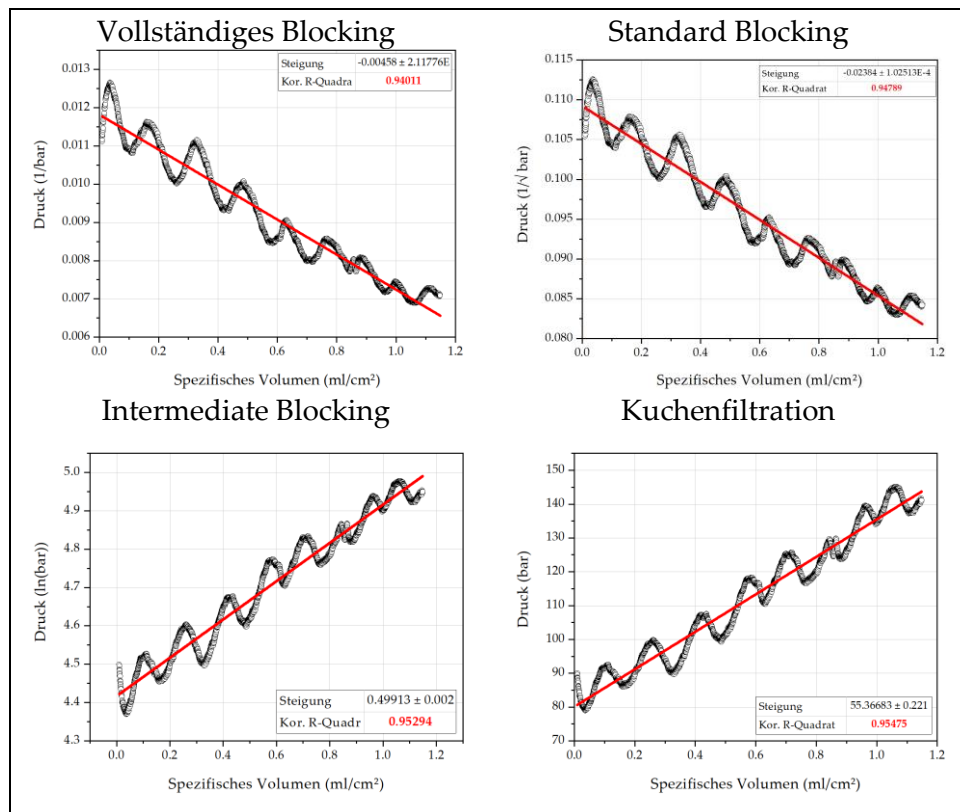


Abbildung 4-28: Identifikation des Verblockungsmechanismus im ersten Hohlfasermodule (PES Membran  $0,2 \mu\text{m}$  /  $A=88\text{cm}^2$  /  $L=20 \text{cm}$  / Repligen).

Die beste Übereinstimmung mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,954$  weist die Kuchenbildung auf. Das Intermediate Blocking ist mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,952$  ein unwesentlich schlechterer Fit. Die Schwingung in den Druckverläufen in Abbildung 4-28 resultiert aus der Verwendung einer Schlauchpumpe, die über mehreren Rollen zum Verdrängen des Schlauchvolumens verfügt. Bei der verwendeten Pumpe sind diese Rollen im Abstand von  $120^\circ$  angebracht, sodass sie einen relativ großen Abstand zueinander aufweisen. Eine konstante Verdrängung ist durch den Aufbau nicht zu jedem Zeitpunkt vollständig gegeben. Die Schwankung ist in dem untersuchten Prozess jedoch nicht problematisch, da es sich um eine Schwankung im Bereich von  $\pm 10 \text{mbar}$  handelt. Die Schwankung wird deshalb vernachlässigt. Analog dazu werden die Druck Daten des zweiten Moduls aufgetragen (Abbildung 4-29). Zur Bestimmung des Blocking Mechanismus sind im kontinuierlichen Prozess baugleiche Filtermodule verwendet worden, die über eine Filterfläche von  $88 \text{cm}^2$  und eine Porengröße von  $0,2 \mu\text{m}$  verfügen.

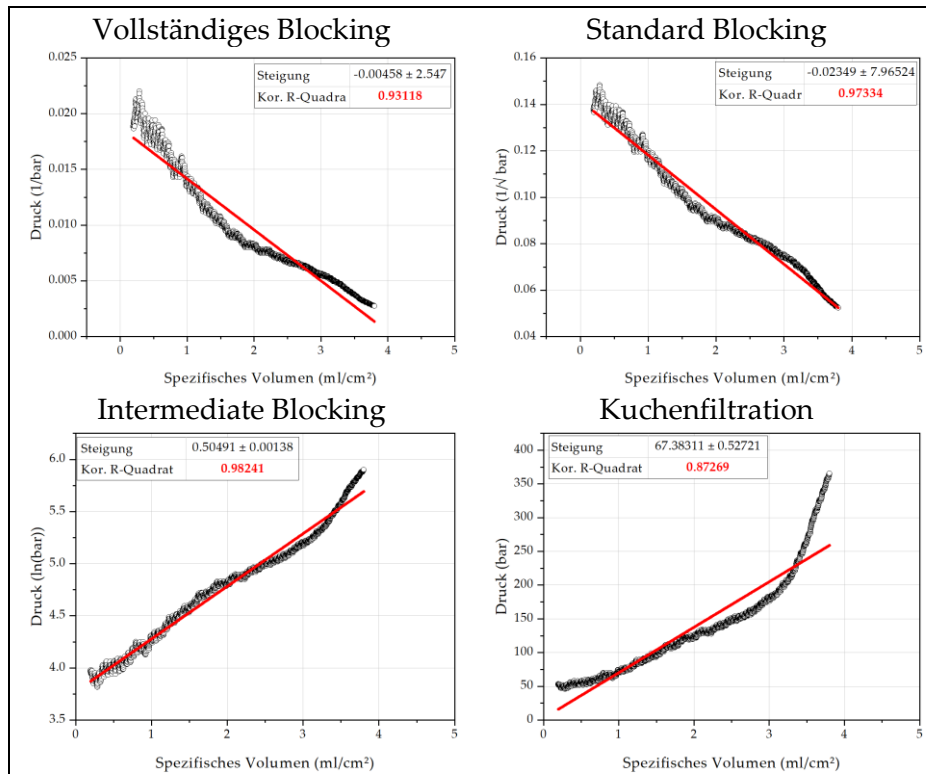


Abbildung 4-29: Identifikation des Verblockungsmechanismus im zweiten Hohlfasermodule (PES Membran 0,2  $\mu\text{m}$  /  $A=88\text{cm}^2$  /  $L=20\text{ cm}$  / Repligen).

Durch die höhere Belastung des zweiten Moduls, ist der tatsächlich vorliegende Blocking Mechanismus deutlicher zu erkennen als im ersten Hohlfasermodule. Hieraus wird die Schlussfolgerung gezogen, dass es sich bei dem Membran Fouling nicht nur um die Bildung eines Kuchens auf der Membran handelt ( $R^2 = 0,87$ ) sondern, dass es tatsächlich um einen Verlust der Membranfläche durch verstopfte Poren kommt. Aus diesem Grund wird für das zweite Hohlfasermodule das Intermediate Blocking als Mechanismus identifiziert. Da es sich um baugleiche Module handelt, wird ebenfalls für das erste Membran Module das Intermediate Blocking im Modell implementiert. Es ist zu erwarten, dass bei längerem Betrieb, bzw. einer ähnlichen Belastung auch im Hohlfasermodule 1 ein Verblocken auftreten wird. Die Filtrationskonstante für das Intermediate Blocking ergibt sich für beide Module nach unabhängiger Auswertung zu  $K_i = 0,45$ .

##### Massenbilanz und Bestimmung des Filterkuchenaufbaus

Die globale Massenbilanz des Modells wird kontrolliert, indem die absoluten Massen von Antikörper (IgG), PEG und den Nebenkomponten (HCPs) in den eintretenden Strömen mit den berechneten absoluten Massen in den austretenden Strömen verglichen werden. Die globale Massenbilanz gilt als geschlossen, da die Abweichungen der einzelnen Komponenten weniger als 1% betragen (siehe Tabelle 4-9). Für die leichte Phase ist ein Antikörpertiter von 2 g/L und einer Konzentration der Nebenkomponten von 12 g/L angenommen worden. Diese Angaben sind Mittelwerte der hausinternen Kultivierungen. Im nächsten Schritt ist ermittelt worden, welche absolute Masse des Antikörpers in der Anlage nach dem Abschalten der Pumpen verbleibt.

**Tabelle 4-9:** Berechnung der globalen Massenbilanz des Modells. Eintretende und austretende Ströme sind gekennzeichnet.

	Tank	Masse IgG [mg]	Masse PEG 4000 [mg]	Masse HCPs [mg]
in	Feed	447,682	0	2.685,77
	PEG 4000 (40 wt%)	0	40.000	0
	PEG 4000 (12 wt%)	0	48.000	0
out	Permeat 1	0,331	19.332	1.298,03
	Permeat 2	0,664	61.423,2	1.241,31
	Produkt	446,633	7.244,86	
	Differenz	0,054	-0,060	0,002
	Abweichung	0,012%	-6,82 E-05%	-7,45 E-05%

Dieser Wert ist zum einen wichtig für die Bestimmung der Versuchsausbeute und zum anderen zur Bestimmung der Transportrate des Zielproteins in den Filterkuchen. Um die Werte berechnen zu können, muss das Totvolumen der Anlage bekannt sein, welches gravimetrisch bestimmt wird. Dazu wird die Anlage trocken gewogen, anschließend mit Wasser gefüllt und erneut gewogen. Daraus resultiert bei dreifacher Wiederholung ein Anlagenvolumen von  $60,2 \pm 0,3$  mL. Um den Anteil des Antikörpers zu bestimmen, welcher in der Anlage verblieben ist, wird die Anlage einem definierten Volumen gespült und auf diese Weise das restliche Volumen mit Wasser verdrängt. Diese Fraktion wird im Verhältnis 1:5 verdünnt, um den Antikörper aufzulösen und für die weitere Analytik vorzubereiten. Über das Volumen der Spülfraktion kann die

#### 4. Ergebnisse zur Präzipitation von monoklonalen Antikörpern

Masse an Antikörper ermittelt werden, die noch in den Leitungen der Anlage zurückgeblieben ist. Aus den Ergebnissen der Protein A Chromatographie ergeben sich die absolute Masse des Antikörpers in den Fraktionen Feed, Permeat 1 und 2 sowie Produkt. Des Weiteren wird die absolute Masse an mAb im Systemvolumen bestimmt. Es ergibt sich eine Differenz von 82,40 mg die selbst nach dem Spülen der Anlage im System verblieben ist. Die gemessenen Massen sind in Tabelle 4-10 aufgeführt.

**Tabelle 4-10:** Versuchsdaten zur Bestimmung Massenbilanz des Antikörpers während dem Experiment.

Fraktionen	Masse IgG [mg]
Feed	311,93
Permeat 1	57,47
Permeat 2	40,32
Produkt	113,62
System	18,13
Differenz	82,40

Dieses Vorgehen wird wiederholt, um die Reproduzierbarkeit zu zeigen. Zusätzlich wird das Experiment in zwei Teile aufgeteilt, sodass eine Aussage darüber getroffen werden kann, wieviel Antikörper sich auf den jeweiligen Filtern befindet. Abbildung 4-30 zeigt die Unterteilung des Versuchsaufbaus.

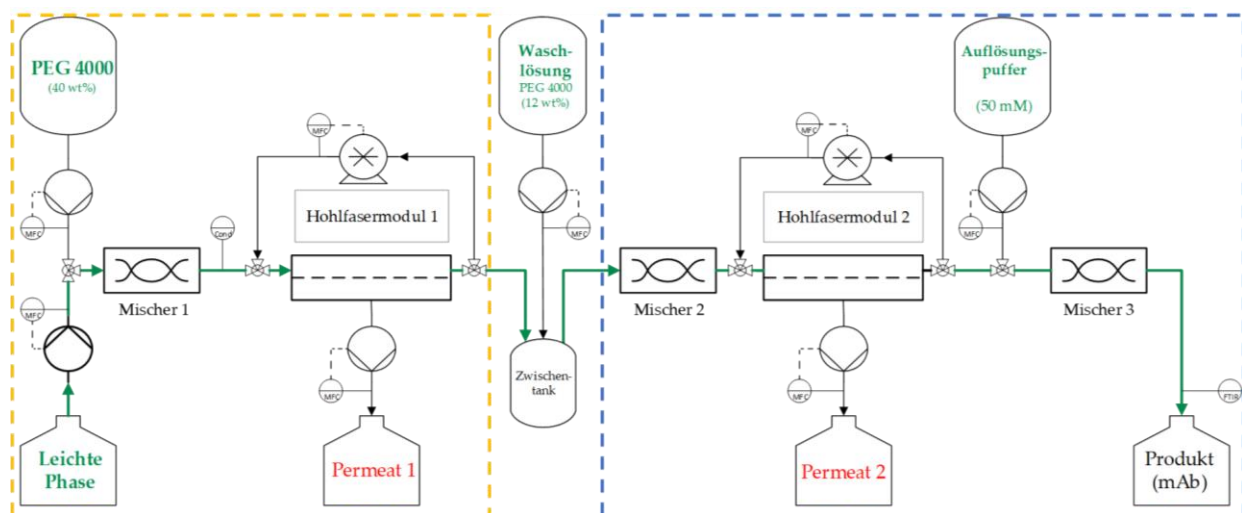


Abbildung 4-30: Aufteilung des Versuches in zwei Teile. Teil I ist mit einem gelben Rahmen und Teil II mit einem Rahmen in Blau gekennzeichnet. Beide Versuchsteile werden nacheinander durchgeführt.

Der erste Versuchsteil (gelb) wird für die üblich Versuchsdauer von 50 min durchgeführt und der Zwischentank sowie der Tank Permeat 1 auf die Zielkomponente

#### 4. Ergebnisse zur Präzipitation von monoklonalen Antikörpern

---

analysiert. Die verbleibende Masse auf dem Filter wird analog wie zuvor beschrieben berechnet. Es verbleiben ca. 33,75 mg Antikörper im ersten Hohlfasermodule. Anschließend wird die benötigte Menge an Wasch-Lösung für den zweiten Versuchsteil (blau) über den eingestellten Massenstrom ( $\dot{m}_{\text{Wash}}$ ) bestimmt. Die Masse an Waschlösung wird direkt in den Zwischentank hinzugefügt. Das Volumen des Zwischentanks wird mit einer Pumpe dem Gesamtsystem erneut zugeführt und der zweite Versuchsteil mit derselben Versuchsdauer (50 min) durchgeführt. Am Ende des Experiments, wird auch der zweite Teil gespült und das Systemvolumen, die Tanks Permeat 2 und Produkt auf den Antikörper analysiert. Die Auswertung ergibt, dass auf dem zweiten Hohlfasermodule eine Masse von 47,20 mg Antikörper zurückbleibt. Die Gesamtmasse an Antikörper, welche in diesem Experiment auf den Membranflächen verbleibt, ergibt sich zu 80,95 mg. Dieses Ergebnis passt sehr gut zu dem vorherigen bestimmten Wert von 82,40 mg. Daraus ergibt sich ein Mittelwert mit einem Fehler von  $81,68 \pm 0,73$  mg.

#### 4.4.4 Experimente zur Modellvalidierung

Die Validierung des Modells erfolgt anhand eines statistischen Versuchsplans (DoE). Dabei werden mehrere Parameter gleichzeitig in einem definierten Bereich variiert. Die Massenflüsse von Feed, PEG, Waschlösung, Permeat 1 und 2 werden als einstellbare Prozessgrößen gewählt und um  $\pm 15\%$  verändert. Das durchgeführte DoE wurde anschließend mit der offline Analytik evaluiert und mit dem aufgestellten Prozessmodell simuliert. Die aus Kostengründen erfolgte, mehrfache Nutzung der Single-Use Hohlfasermodule erfordert eine gründliche Reinigung der Membranfläche. Die Reinigung wird durch Inkubation der Hohlfasermodule mit einer 0,1 M Natronlauge über  $> 20$  Stunden durchgeführt. Trotz der Inkubation treten zum Teil Probleme in der Membranreinigung auf. In diesem Fall verblockt die Membran frühzeitig und der Permeatstroms fällt deutlich vor Ablauf der Versuchszeit von 50 Minuten ab. Diese



#### 4. Ergebnisse zur Präzipitation von monoklonalen Antikörpern

unerwünschten Zusammenhänge werden nicht im Modell abgebildet, da eine korrekte Verwendung der Single-Use Membranen dieses Problem eliminiert. Experimente mit frühzeitiger Verblockung einer Membran werden aus diesem Grund nicht zur Validierung herangezogen. Der Vergleich zwischen Experiment und Simulation ist in den nachfolgenden Paritätsdiagrammen dargestellt, in denen der simulierte über dem experimentellen Wert aufgetragen ist. Abbildung 4-31 zeigt die Ergebnisse für die Zielgrößen Ausbeute und Reinheit des Antikörpers. Die Fehlerbalken entsprechen den mittels Centerpoint Experimenten ermittelten Fehlern. Die gestrichelten Linien geben eine Abweichung von  $\pm 10\%$  an. Es wird sichtbar, dass die simulierten Ergebnisse für Ausbeute und Reinheit in guter Übereinstimmung mit den experimentellen Daten sind. Die starken Abweichungen in der Reinheit sind auf die Mehrfachverwendung der Hohlfasermodule zurückzuführen.

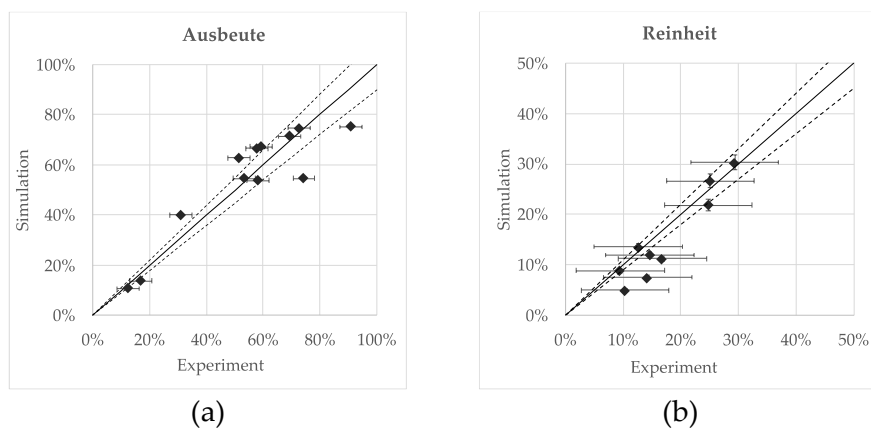


Abbildung 4-31: Paritätsdiagramme zum Vergleich von Simulation und Experiment der Qualitätsattribute Ausbeute und Reinheit der Zielkomponente

Die Kontrolle der Modellierung erfolgt mittels Bilanzierung der ein- und austretenden Massen im Prozess. Die tiefgreifende und exakte Modellierung resultiert in einem breiten Gültigkeitsbereich. Abbildung 4-32 (a) bis (d) zeigen die Massen der im Experiment und der Simulation eintretenden Komponenten Feed, Präzipitant, Waschlösung und Auflösungspuffer.

#### 4. Ergebnisse zur Präzipation von monoklonalen Antikörpern

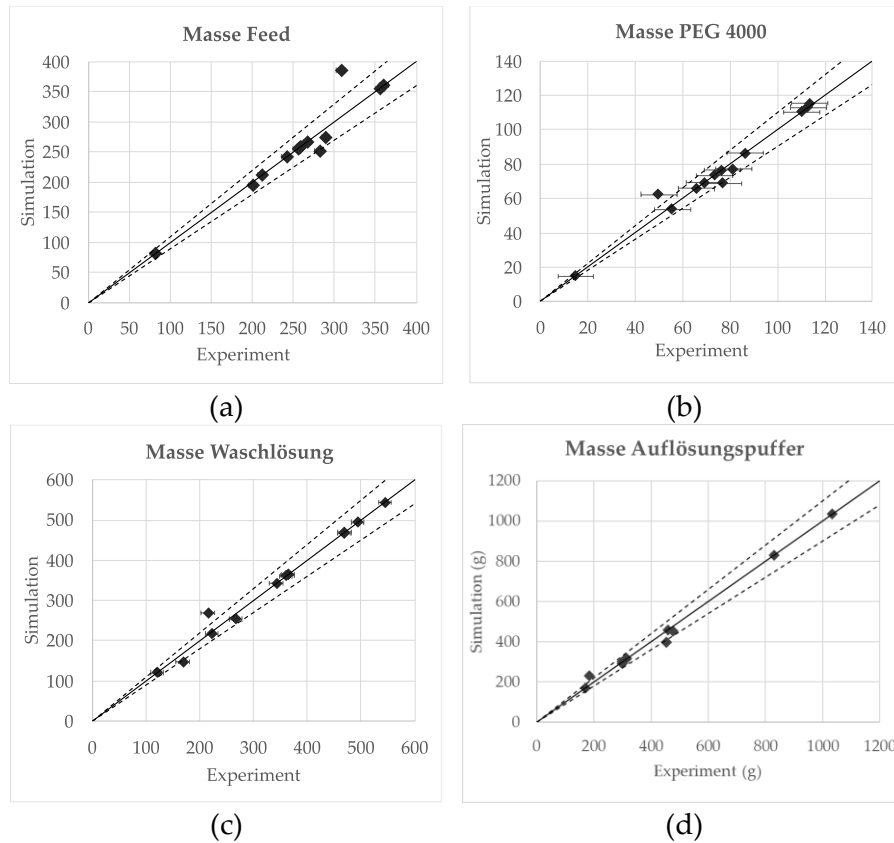


Abbildung 4-32 Paritätsdiagramme von Experiment und Simulation zum Vergleich verbrauchten Masse der Ströme die in den Prozess eintreten. Die Fehlerbalken resultieren aus den Centerpoint Experimenten, die nur zum Teil sichtbar sind, da die Messabweichungen in den Experimenten sehr gering gewesen ist.

In Abbildung 4-33 sind die Massen der austretenden Komponenten Permeat 1 und 2 sowie die Produktmasse gezeigt. Es wird erneut der simulierte Wert über dem experimentell gemessenen Wert aufgetragen.

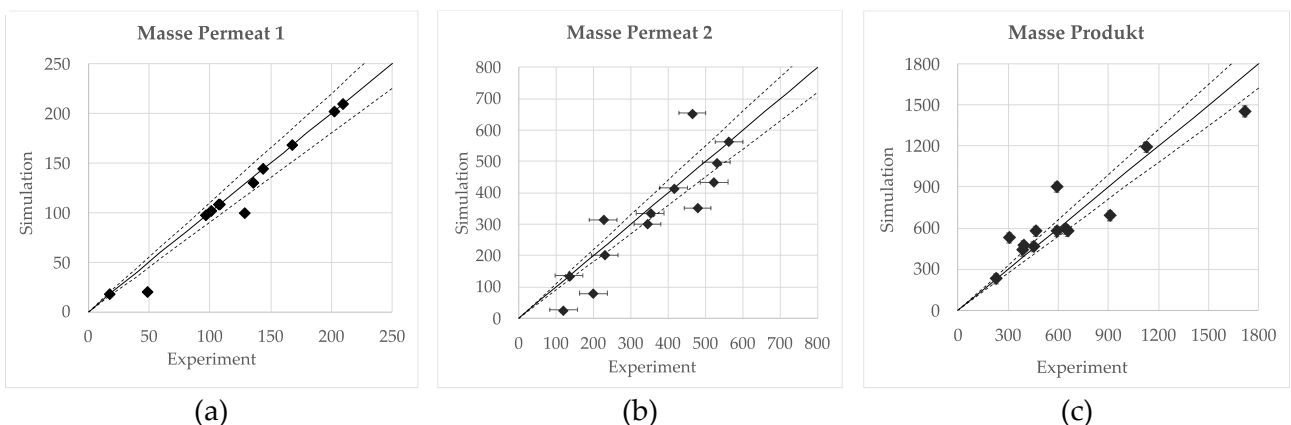


Abbildung 4-33: Paritätsdiagramme von Experiment und Simulation zum Vergleich der austretenden Ströme

Die Ergebnisse der statistischen Auswertung bestätigen die Gültigkeit des Betriebsbereichs während der Experimente. Exemplarisch wird dies im Folgenden

#### 4. Ergebnisse zur Präzipitation von monoklonalen Antikörpern

anhand von Konturplots in Abbildung 4-34 gezeigt. Als Eingangsparameter dienen die Massenströme der Waschlösung und des Auflösungspuffers, da diese Eingangsgrößen maßgeblich das Prozessvolumen und die Dimensionierung des zweiten Filtermoduls beeinflussen. Dabei sind ein erhöhtes Prozessvolumen nach der Grundoperation und eine unnötig vergrößerte Membran durch eine ungünstige Wahl dieser Ströme zu vermeiden. Dargestellt ist der Einfluss auf die (a) Ausbeute, (b) die Reinheit und (c) den PEG Anteil im Produkt. Eine Produktausbeute von 85% wird bei einem geringen Massenstrom der Waschlösung (5500 mg/min) und einem erhöhten Massenstrom des Auflösungspuffers (7500 mg/min) erreicht.

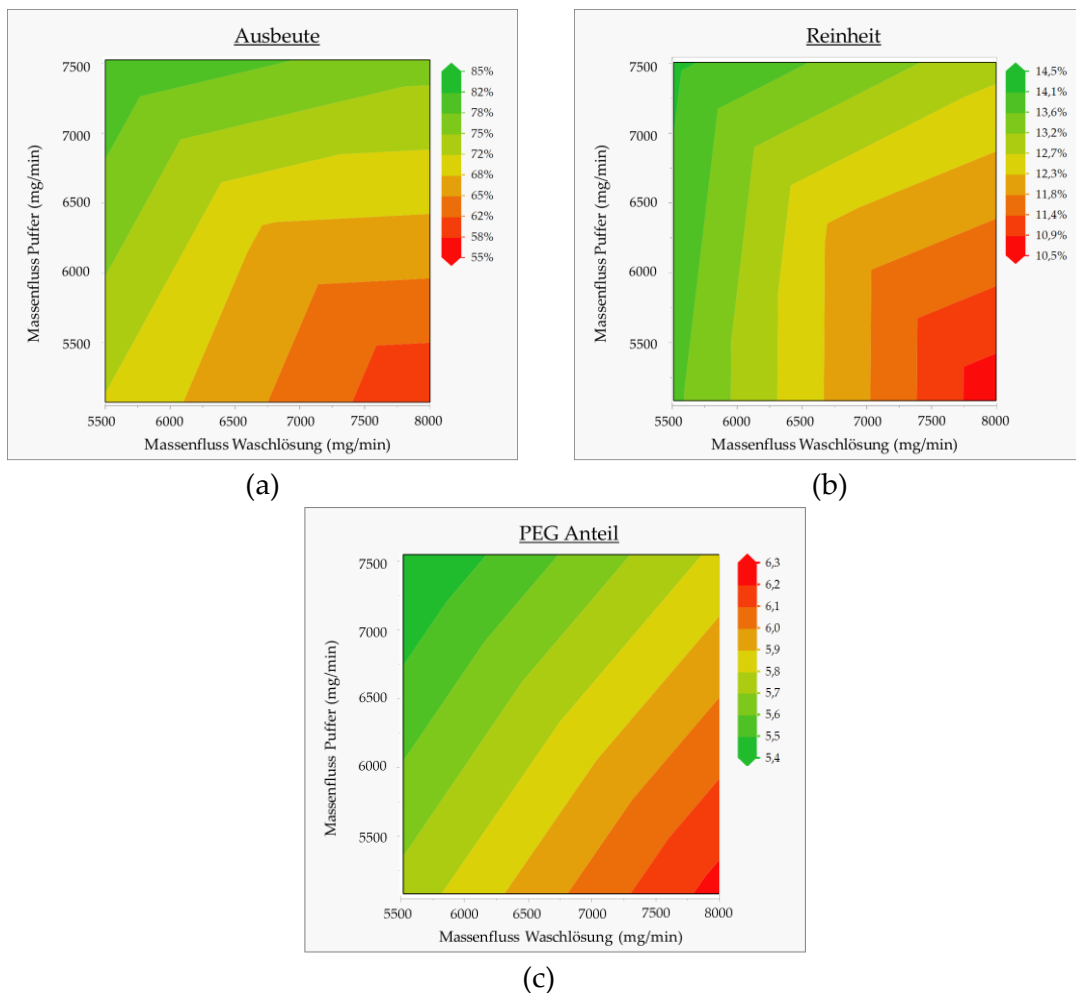


Abbildung 4-34: Konturplots für Ausbeute, Reinheit und dem PEG Anteil im Produkt.

### 4.5 Entwicklung einer Kontrollstrategie

Die präsentierte Regelungsstrategie erfolgt für den halbkontinuierlichen Prozess, welcher auf Grund der Verschaltung mehrerer Sub Units einem erhöhten Regelungs- und Steuerungsaufwand bedarf. Für das übergeordnete Ziel einer autonomen Prozessführung, ist die Etablierung einer Kontrollstrategie unbedingt notwendig, da zum einen der optimale Betriebspunkt eingehalten wird als auch die Qualitätsattribute kontinuierlich kontrolliert werden. Dazu müssen folgende Zwischenziele erreicht werden:

- Identifikation einer geeigneten Onlinemesstechnik
- Training der Auswertungsalgorithmen
- Festlegung der notwendigen Detektoren und Messstellen im Prozess

Abschließend wird in diesem Kapitel eine Empfehlung gegeben, welche Detektoren und Sensoren sich am besten für die Grundoperation Präzipitation eignen. Die Kontrollstrategie wird modellbasiert mit einer Simulationsstudie überprüft.

#### 4.5.1 Identifikation geeigneter Detektoren und Sensoren

Der Betriebsbereich für die Qualitätsattribute wurde mit Hilfe des Design Spaces im vorherigen Abschnitt festgelegt. Um die Einhaltung dieser Größen zu gewährleisten, ist eine geeignete Messtechnik notwendig, welche in der Lage ist, diese Größen inline und in Echtzeit zu erfassen. Diese Anforderung wird unter dem Begriff RTRT (*engl. Real-time-release Testing*) zusammengefasst. Der Engpass in der Produktion ist meist die Probenentnahme, die damit verbundene Probenvorbereitung sowie die Messung und Auswertung der Daten. Da der Prozess kontinuierlich läuft und die Proben nur eine Momentaufnahme zeigen, kann sich der Prozess, sobald die Ergebnisse vorliegen, bereits in einem anderen Betriebspunkt befinden, wodurch eine Regelung unmöglich wird. Aus diesem Grund ist nach einer Messtechnik gesucht, die in der Lage ist nicht-invasiv zu messen, um die Probenahme und -vorbereitung zu umgehen, sowie ein Ergebnis in Echtzeit bereitstellen kann.

#### 4. Ergebnisse zur Präzipitation von monoklonalen Antikörpern

Als nicht-invasive Messtechnik eignen sich besonders spektroskopische Methoden, die in Form von In situ Sonden oder mit Durchflusszellen in den Prozess eingebracht werden. Die Messung und Auswertung der Spektren kann mit geeigneten Programmen innerhalb von Sekunden bis wenigen Minuten erfolgen, sodass ein Ergebnis in Echtzeit erzielt wird. Als mögliche spektroskopische Methoden sind die Fourier-transformierte Infrarot Spektroskopie (FTIR), die Raman Spektroskopie, die UV/Vis Spektroskopie (Dioden-Array Detektor, DAD) und die Fluoreszenzspektroskopie getestet worden. In Tabelle 4-11 ist eine Übersicht der üblichen Messparameter.

**Tabelle 4-11:** Übersicht der Messparameter für FTIR, Raman, DAD und Fluoreszenz aus Literatur und Herstellern [Boulet-Audet 2016, Buckley 2017, Dziadosz 2012, Helgers 2021, JASCO Deutschland GmbH, Moore-Kelly 2019, Sauer 2019, Sellick 2010].

Detektor	Messbereich	In situ Sonde	Unteres Detektionslimit	Messzeit	Gemittelte Scananzahl
FTIR	4000-400 cm <sup>-1</sup>	Ja	>50 mg/L	10 s	75
Raman	4000-400 cm <sup>-1</sup>	Ja	>700 mg/L	4 s	16-64
UV/Vis	190-520 nm	Nein	>10mg/L	0,1 s	-
Fluoreszenz	280-900 nm	Nein	>40 fg/L	3 s	10

Die hohe Sensitivität der Fluoreszenzmessung (12 Größenordnungen) im Vergleich zu den anderen Methoden ist durch die Messmethode selbst zu erklären, bei der als einzige kein Hintergrundsignal gemessen wird. Es wird erst ein Messsignal vom Detektor aufgenommen, sobald sich eine fluoreszierende Probe im Messkanal befindet. Die gewählten Messparameter für die vier aufgeführten Messgeräte sind im Kapitel Material und Methoden nachzulesen. Die Auswertung der Spektren erfolgt mit dem Programm Unscrambler, welches über eine geeignete OPC UA Schnittstelle für die Integration in die Prozessleittechnik verfügt. Die Voraussetzung für diese Auswertung, ist ein trainierter PLS-Algorithmus (*engl.: partial least squares, PLS*), welcher Unterschiede in den Spektren erkennt und diese zum Beispiel auf Konzentrationsänderungen von vorgegeben Komponenten zurückführen kann. Der PLS-Algorithmus wird auf die Qualitätsattribute Konzentration und die Reinheit trainiert. Hierbei wird die Reinheit der LMW, HMW und der Zielkomponente unterschieden, um zusätzliche Aussagen über die Art der Verunreinigung zu treffen. Es werden pro Spektroskopie Methode zwei PLS-Algorithmen, jeweils separat für Präzipitation und Auflösung, trainiert. Der

#### 4. Ergebnisse zur Präzipitation von monoklonalen Antikörpern

Hintergrund dafür ist, dass die Matrix der Proben während Präzipitation und Auflösung stark unterschiedlichen Spektren aufweisen. Es ist nicht zu erwarten, dass ein kombinierter PLS-Algorithmus zufriedenstellende Ergebnisse für beide Prozessschritte liefert. Das Training erfolgt mit einem Datensatz, der aus offline gemessenen Proben mehrerer Versuche generiert wird. Zur Validierung des PLS-Modells wird ein zusätzlicher Datensatz generiert, welcher die Zielgrößen mit dem trainierten Algorithmus vorhergesagt. Die Vorhersage wird anschließend mit den zugehörigen Offlinedaten verglichen. Hieraus wird das Bestimmtheitsmaß der validierten Vorhersage aus der PLS-Regression genutzt und die Vorhersagen als sehr gut ( $1 > R^2 > 0,9$ ), moderat ( $0,9 > R^2 > 0,8$ ) und schlecht ( $0,8 > R^2$ ) klassifiziert. Diese Klassifizierung ist die Grundlage für die spätere Empfehlung für einen Sensor zur Prozessüberwachung.

Für diese Studie ist der absatzweise Prozess verwendet worden, da hier Präzipitation und Auflösung getrennt voneinander stattfinden und keine Überlagerung der Effekte zustande kommt. Der Aufbau ist unter Berücksichtigung der integrierten Messstellen in Abbildung 4-35 dargestellt.

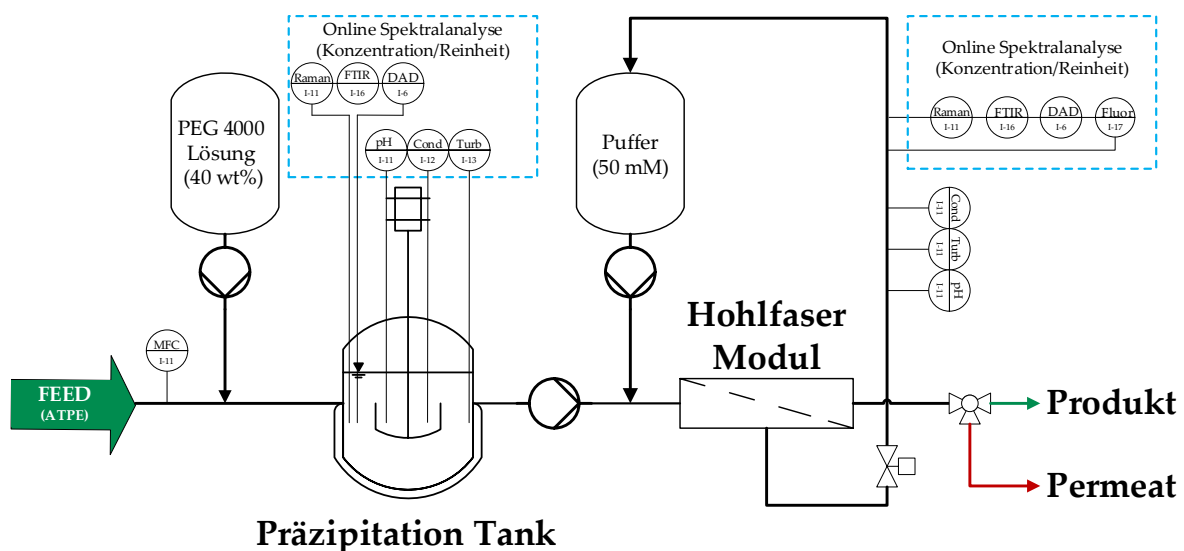


Abbildung 4-35: Vereinfachte Darstellung einer Untereinheit des absatzweisen Präzipitationsprozesses mit integrierter Messtechnik.

Im Präzipitationstank werden Raman, FTIR und DAD gemessen. Der Fluoreszenzdetektor wird nicht für die Präzipitation verwendet, da die Messzelle stark anfällig

gegenüber Partikeln und Luftblasen ist, sodass unzureichende Messdaten aufgenommen werden. Im Bereich der Auflösung werden alle Spektroskopischen Messmethoden verwendet. Neben den genannten Sensoren sind zusätzlich Leitfähigkeit, Trübung und pH-Wert als mögliche Prozessmesstechnik für Präzipitation und Auflösung untersucht worden.

Im Folgenden werden die Vorhersagen für die einzelnen Detektoren FTIR, Raman, DAD und Fluoreszenz einzeln für die Präzipitation und die Auflösung diskutiert. Die Ergebnisse werden anhand der Spektren sowie dem Vergleich von Vorhersage und gemessenem Referenzwert evaluiert. Allgemein kann gesagt werden, dass die Konzentration der Nebenkomponten (HCPs) in Form von LMWs während der Präzipitation zufriedenstellend messbar sind, welche Aufschluss über den Reinheitsgewinn geben. Das PLS-Modells wird dementsprechend während der Präzipitation hauptsächlich auf die Nebenkomponten trainiert, da sich kaum bis keine Antikörper im Überstand befindet. In der anschließenden Auflösung der Präzipitate ist dies entgegengesetzt. Während der Auflösung ist das Zielprotein besonders gut zu detektieren, da die Präzipitation darauf ausgelegt ist, dass der Antikörper vollständig gefällt wird und die Nebenkomponten weitestgehend in Lösung bleiben. Durch die vollständige Entfernung des Überstands während der Dead-End Filtration, ist die Abreicherung der Verunreinigungen hoch. Das Training des PLS-Modells fokussiert sich demnach auf das Zielprotein, wodurch die Vorhersage für die Nebenkomponten schlechter wird. Das konnte gleichermaßen in der Verwendung von allen Detektoren beobachtet werden.

In den nachfolgenden Abbildungen sind die sind zunächst die Spektren getrennt für die Präzipitation und die Auflösung gezeigt. Es sind jeweils die unbearbeiteten Spektren (Rohdaten), die bearbeiteten Daten, welche zur Modellbildung verwendet werden, sowie die Regression der Vorhersage gezeigt. Hierbei handelt es sich

#### 4. Ergebnisse zur Präzipitation von monoklonalen Antikörpern

um die Vorhersage des Validierungsdatensets, welche über den Referenzwerten der offline gemessenen Proben aufgetragen sind. Die Bearbeitung der Spektren ist notwendig um die Spektren auf die relevanten Informationen zu reduzieren. Das Vorgehen ist detailliert im Abschnitt Material und Methoden (3.3 Spektroskopische Methoden) beschrieben.

In Abbildung 4-36 sind die Spektren der Experimente für (a)-(c) Raman, (d)-(f) FTIR, (g)-(i) DAD während der Präzipitation gezeigt.

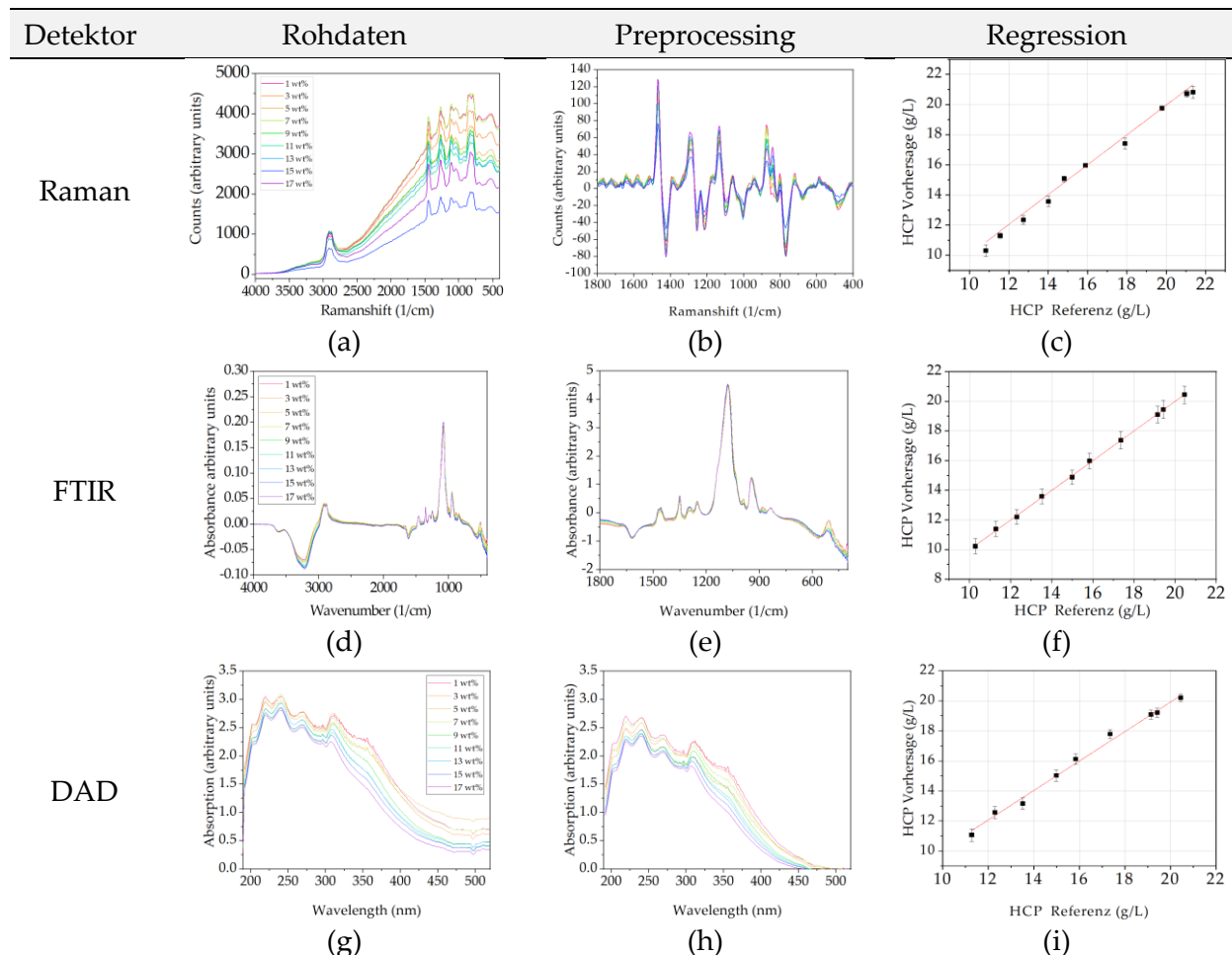


Abbildung 4-36: Spektren von FTIR, Raman und DAD während der Präzipitation [Lohmann 2021].

Die Ergebnisse für die Auflösung sind in Abbildung 4-37 dargestellt. Zusätzlich zu den Ergebnissen von Raman ((a)-(c)), FTIR ((d)-(f)) und DAD ((g)-(i)) sind die Ergebnisse der Fluoreszenzmessung ((j)-(l)) gezeigt.



## 4. Ergebnisse zur Präzipitation von monoklonalen Antikörpern

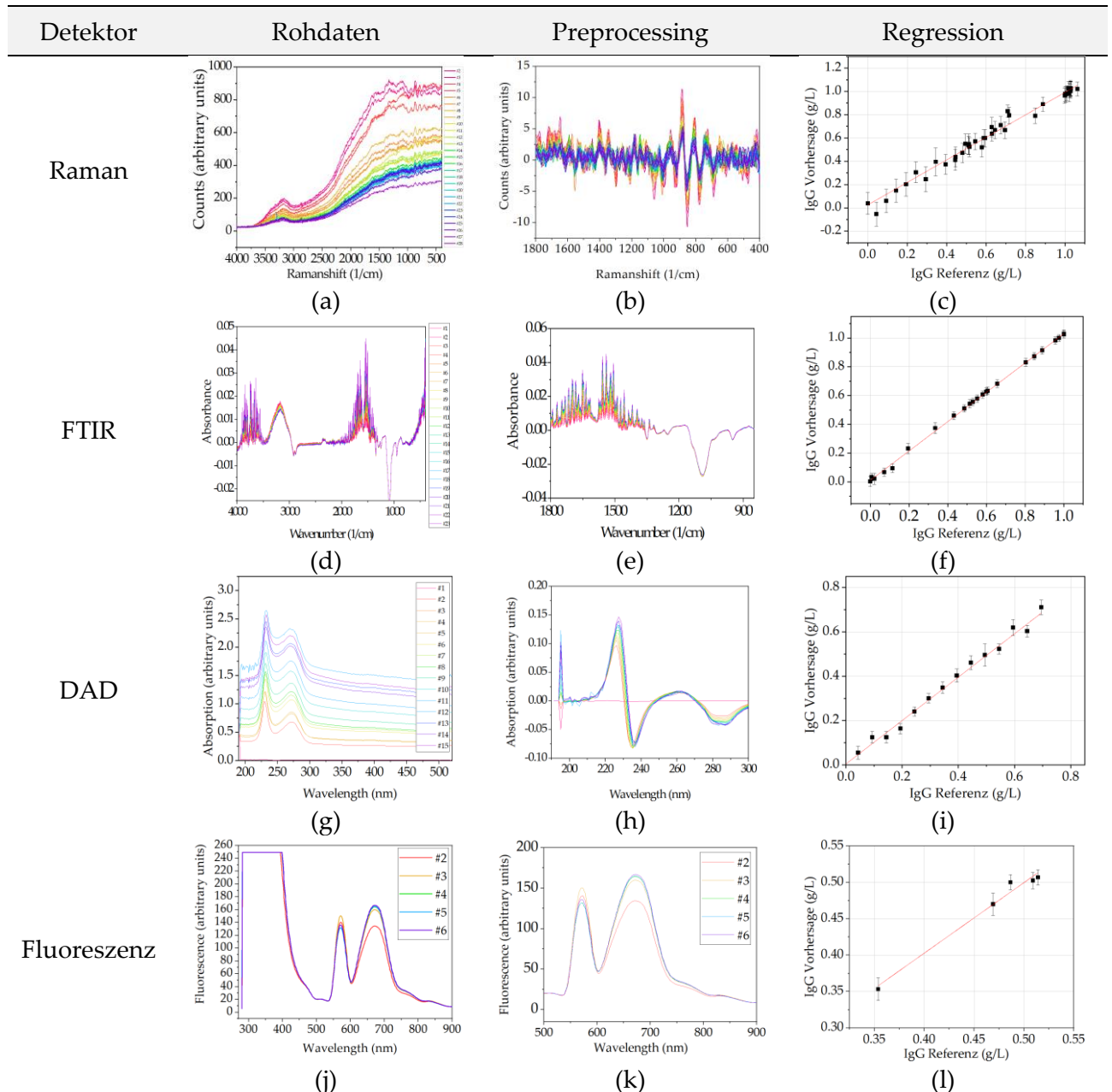


Abbildung 4-37: Spektren während der Auflösung der Präzipitate [Lohmann 2021].

Die Raman Messung liefert sehr gute Ergebnisse ( $R^2 = 0,95$ ) für die Vorhersage der LMWs während der Präzipitation. In Bezug auf die HMWs ( $R^2 = 0,62$ ) und die Zielkomponente ( $R^2 = 0,63$ ) konnten jeweils nur schlechte Korrelationen gefunden werden. Durch die ATPE vor der Präzipitation werden hauptsächlich HMWs aus der Kultivierungsbrühe entfernt. Dementsprechend sind weniger HMWs in dem Feed der Präzipitation vorhanden, wodurch die schlechte Vorhersage der HMWs nicht überraschend ist. Gleiches gilt für den Antikörper. In der Auflösung ist die Vorhersage für das Zielprotein mit ein  $R^2$  von 0,85 moderat. Für die LMWs und HMWs konnte keine

#### 4. Ergebnisse zur Präzipitation von monoklonalen Antikörpern

---

zufriedenstellende Korrelation gefunden werden. Die Vorhersage der Reinheit in Bezug auf die Zielkomponente, lieferte während der Präzipitation mit einem  $R^2$  von 0,66 schlechte Ergebnisse. Für die Vorhersage der Reinheit während der Auflösung hingegen konnten moderate Ergebnisse mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,85$  erreicht werden. Das Fazit zur Raman Spektroskopie ist, dass diese gut eignet ist zur Vorhersage der LMWs während der Präzipitation. Des Weiteren sind zufriedenstellende Ergebnisse zur Prädiktion der Reinheit als auch der Konzentration der Zielkomponente während der Auflösung erzielt worden. Damit eignet sich die Raman Spektroskopie für das Monitoring der Qualitätsattribute Reinheit und Konzentration der Zielkomponente während der Auflösung.

Bei den FTIR Messungen liegt ein ähnliches Ergebnis vor. Die Prädiktion der Konzentration der LMWs in den Präzipitationsproben konnte mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,94$  sehr gut vorhergesagt werden. Für die HMWs ( $R^2 = 0,43$ ) und die Zielkomponente ( $R^2 = 0,42$ ) ist die Vorhersage der Konzentration während der Präzipitation nicht zufriedenstellend. In der Auflösung hingegen lieferte die Vorhersage der Konzentration der Zielkomponente mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,91$  sehr gute Ergebnisse. Eine Korrelation der Reinheit war weder in den Proben der Präzipitation noch der Auflösung möglich. Durch die sehr gute Prädiktion der LMWs während der Präzipitation können jedoch Rückschlüsse auf die Reinheit gezogen werden. Außerdem bietet das FTIR die Möglichkeit den PEG Anteil während der Auflösung zu bestimmen, welcher als limitierender Faktor während der Auflösung der Präzipitate identifiziert werden konnte. Außerdem bietet das FTIR die Möglichkeit die Struktur des Antikörpers zu analysieren, welches online auf die Biologische Aktivität des Antikörpers hinweist [Oelmeier 2013]. Die Verwendung eines FTIRs vereint somit mehrere Offline Analytik Methoden und deren Vorteile, sodass es ein starkes Tool zur Prozesskontrolle darstellt.

Der DAD Detektor ist in der Lage geringe Proteinkonzentrationen zu bestimmen. Eine Unterscheidung zwischen Zielkomponente und Nebenkomponente ohne eine

vorherige Säulentrennung wie in der Chromatographie ist jedoch nicht möglich, da Proteine allgemein ein Absorptionsmaximum bei ca. 280 nm besitzen. Aus diesem Grund können während der Präzipitation hauptsächlich die LMWs sehr gut vorhergesagt werden ( $R^2 = 0,97$ ) und während der Auflösung die Zielkomponente ( $R^2 = 0,93$ ). Hierbei wird allerdings nur der Gesamtproteingehalt gemessen. Die Bestimmung der Reinheit der Zielkomponente hat zu nicht zufriedenstellenden Ergebnissen ( $R^2 = 0,59$ ) geführt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich der DAD Detektor für Präzipitation als auch Auflösung eignet. Während der Auflösung kann gut dargestellt werden, wie sich der Antikörper zurücklöst und ab welchem Zeitpunkt keine weitere Auflösung mehr stattfinden. Das ist besonders für den halbkontinuierlichen Prozess relevant, da es den Zeitpunkt zum Umschalten der Ventile anzeigt. Die Auflösung ist dabei der Zeitaufwändigste Schritt.

Die Fluoreszenzmessungen sind ausschließlich während der Auflösung durchgeführt worden. Der beobachtete Peak zwischen 570 und 675 nm beschreibt den Zuwachs des zurückgelösten Antikörpers während der Auflösung sehr gut ( $R^2 = 0,90$ ). Zu Beginn findet die Auflösung schneller statt und erreicht dann ein Gleichgewichtszustand. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Fluoreszenzdetektor zwar einen sehr genauen Messbereich besitzt, um auch kleinste Produktmengen zu detektieren, für die Anwendung der Präzipitation ist der Detektor jedoch zu empfindlich. Der Vorteil der niedrigen unteren Detektorgrenze ist für diesen Prozess nicht notwendig.

Des Weiteren wurde der Einsatz einer Trübung-, Leitfähigkeits- und pH-Sonde getestet. Die Sonden werden ebenso wie die Detektoren in den Prozessabschnitten Präzipitation und Auflösung eingesetzt (siehe Abbildung 4-35). Bei der Trübungsmessung in Abbildung 4-38 (a) ist ein starker Anstieg in den ersten Sekunden sichtbar, der anschließend abflacht und sich nach ca. fünf Minuten ein Gleichgewichtszustand einstellt. Ähnliches ist bei der Leitfähigkeitsmessung in Abbildung 4-38 (b) zu beobachten, allerdings stellt sich der Gleichgewichtszustand wesentlich früher ein und stimmt mit den Messungen der SOPAT Sonde überein.

#### 4. Ergebnisse zur Präzipitation von monoklonalen Antikörpern

---

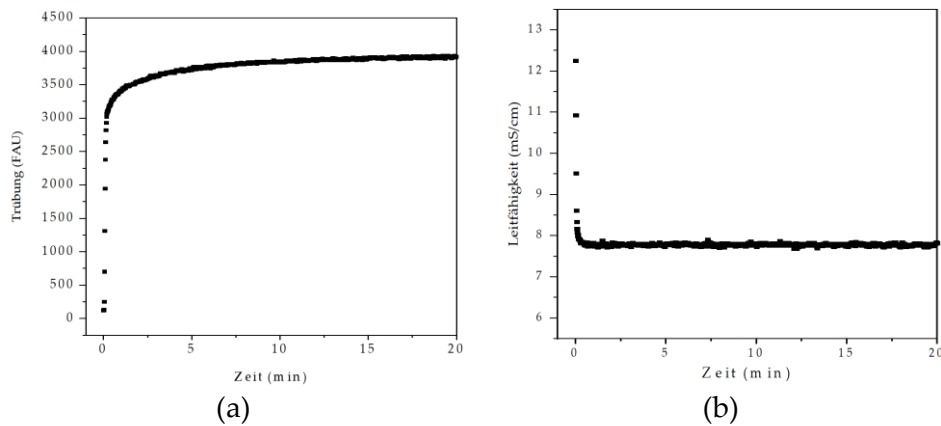


Abbildung 4-38: Verläufe der (a) Trübung, (b) Leitfähigkeit während der Präzipitation.

Da die SOPAT Sonde nur begrenzt zur Verfügung stand, ist der Ersatz durch die Leitfähigkeitssonde sehr nützlich. Hierbei wird die Eigenschaft ausgenutzt, dass das Feed Material durch den Salzgehalt der leichten Phase eine vergleichsweise hohe Leitfähigkeit von ca. 12 mS/cm gegenüber der Lösung aus PEG 4000 und Wasser aufweist (0 mS/cm). Das Mischungsverhältnis zwischen Feed und PEG Lösung (40 wt% PEG 4000) beträgt für die vollständige Präzipitation ca. 70:30 (g/g), wodurch ein Gewichtsanteil von 12 wt% für das Protein resultiert. Die Leitfähigkeit der Mischung sinkt nach Zugabe der PEG-Lösung ebenfalls um ca. 30%. Damit kann die Leitfähigkeit im Prozess als Onlinemesstechnik zur Überwachung des Verhältnisses zwischen Präzipitant und Feed eingesetzt werden. Das Monitoring des Verhältnisses ist unbedingt notwendig, da dieses direkt mit einem Produktverlust in der Filtration einhergeht. Die pH-Wert Messung hat keine Änderung während des Experiments gezeigt, wodurch diese Messung als mögliche Prozesskontrollsonde ausgeschlossen wird.

#### **Ergebnis der PAT Studie:**

Abschließend lässt sich sagen, dass die Hauptmessstelle für das Einhalten der Qualitätsattribute Reinheit und Produktkonzentration bei der Auflösung lokalisiert sind, da die Präzipitation nur einen Zwischenzustand darstellt. Das korrekte Mischungsverhältnis, aus Feed und Präzipitant ist jedoch ausschlaggebend für die Ausbeute der Grundoperation und muss kontinuierlich kontrolliert werden. Die Kontrolle des Verhältnisses kann mit einer Leitfähigkeitssonde durchgeführt werden. Für

die Kontrolle des Qualitätsattributs Produktkonzentration wird ein FTIR empfohlen. Dieses kann neben der Bestimmung der Konzentration der Zielkomponente ebenfalls den Restgehalt an PEG in dem Produkttank bzw. dem Produktstrom im kontinuierlichen Betrieb bestimmen. Ist der PEG Anteil zu hoch, führt es zu einer Limitierung der Auflösung der Präzipitate. Des Weiteren kann mit dem FTIR bestimmt werden, ob die Biologische Aktivität des Antikörpers noch intakt ist. Die Vorhersage des Qualitätsattributs Reinheit hat mit dem FTIR leider keine zufriedenstellenden Ergebnisse geliefert. Zur Vorhersage der Reinheit kann die Raman Spektroskopie genutzt werden. In Abbildung 4-39 ist die Untereinheit des halbkontinuierlichen Prozesses erneut gezeigt, jedoch mit den konkreten Messstellen sowie den benötigten Detektoren und Sonden, welche sich laut der präsentierten Studie am besten für die Präzipitation geeignet haben.

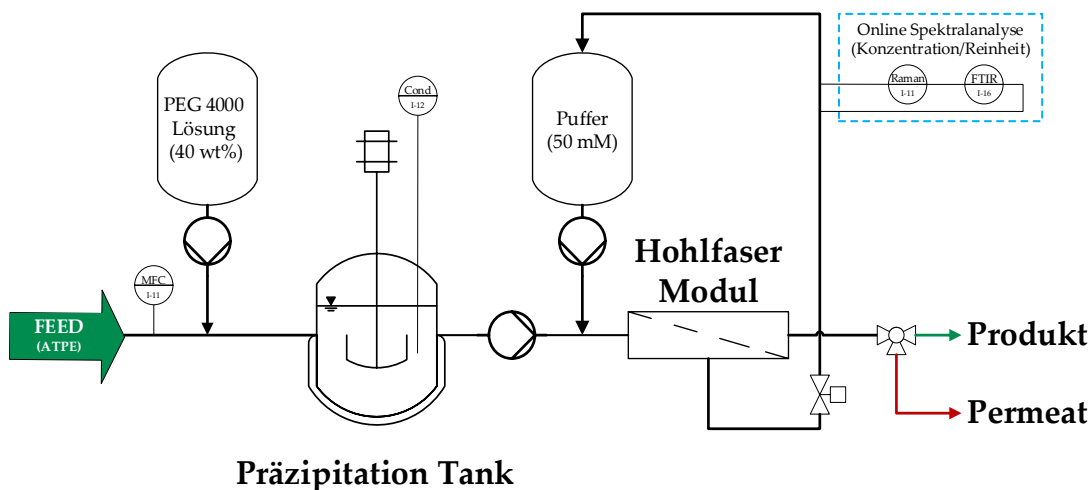


Abbildung 4-39: Darstellung des absatzweisen Prozesses.

#### 4.5.2 Regelungsstrategie für den halbkontinuierlichen Prozess

Produktionsschwankungen hinsichtlich Konzentration und Reinheit sind in Bioproduktionen zu erwarten, da es sich um die Herstellung einer Zielkomponente im Organismus handelt. Diese Schwankungen können beispielsweise auf eine veränderte Wachstumsrate der Zellkultur zurückgeführt werden oder auf Substratlimitierung

#### 4. Ergebnisse zur Präzipitation von monoklonalen Antikörpern

beziehungsweise -inhibierung beruhen. Die Ursachen für derartige Schwankungen sind mannigfaltig und nicht immer eindeutig zu erklären. Die Frage ist, ob die vorgestellte Grundoperation „Präzipitation“ in der Lage ist auf solche Variationen durch ein geeignetes Regelungskonzept zu reagieren und diese auszugleichen. Das Ziel der Regelung ist eine einheitliche Produktkonzentration und -reinheit, welche Chargen übergreifend gewährleistet werden kann. Mit Hilfe des Digitalen Zwillings und der Echtzeitprozessdaten, wird der aktuelle Zustand des Prozesses geschätzt und neue Prozessparameter berechnet, welche anschließend in den Prozess zurückgeführt werden. Der Informationsfluss ist schematisch in Abbildung 4-40 dargestellt. Die gestrichelten blauen Pfeile repräsentieren den Informationsfluss und dessen Richtung während des Prozesses. Die jeweiligen Boxen an den Pfeilen zeigen an, welche Parameter zwischen Prozess und Modell ausgetauscht werden. Als Inputdaten werden Konzentrations- und Reinheitsdaten als auch der eintretende Massenfluss aus der ATPE geliefert. Diese Daten werden als Initialwerte benötigt, um den Massenstrom des Präzipitantes, sowie die Drehzahl der Pumpen zu bestimmen. Des Weiteren werden die einzelnen Ventilstellungen an den Prozess zurückzugeben.

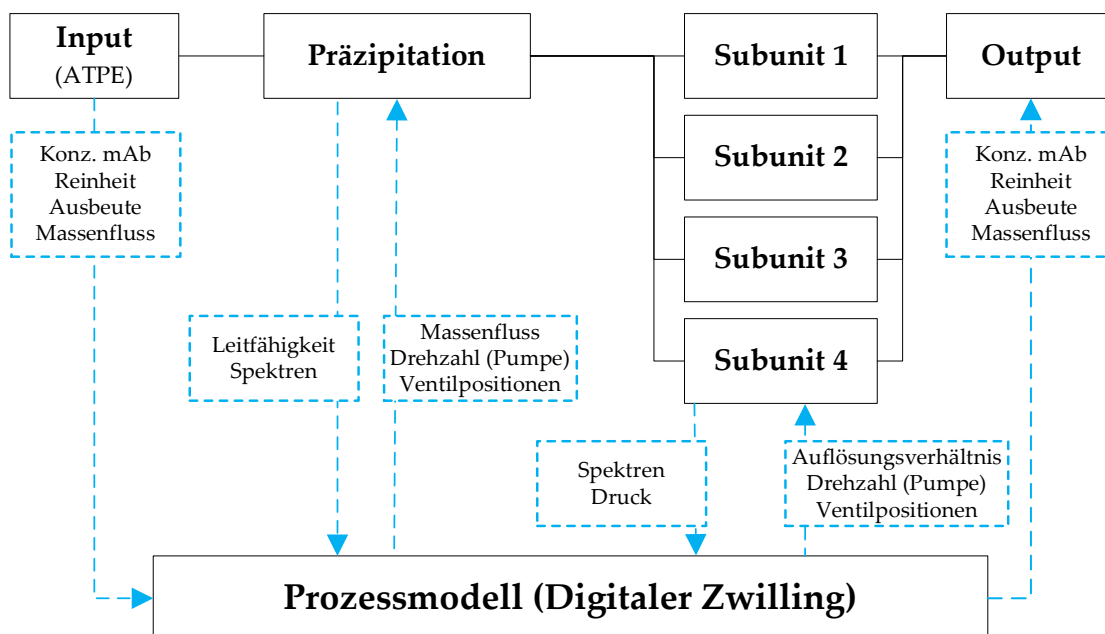


Abbildung 4-40 Vereinfachte Darstellung der Prozesskontrollstrategie.

### 4.5.3 APC Simulationsstudie

Zur Überprüfung des Regelkonzeptes wird eine Simulationsstudie durchgeführt mit dem Ziel die Reaktionsfähigkeit der Grundoperation auf definierte Prozessschwankungen zu zeigen. Dazu werden drei theoretische Szenarien untersucht und bewertet:

1. variierende Feedkonzentration
2. Variation des eintretenden Massenstroms aus der ATPE
3. variierende Reinheit im Feed

Diese Szenarien sind deshalb relevant, da Veränderungen der Konzentration und Reinheit durch die Kultivierung entstehen können. Die Änderung des Massenflusses kann durch Störungen der involvierten Pumpen auftreten oder durch die vorangehende Grundoperation ausgelöst werden. Die erwarteten Prozesswerte im Feed sind ein Antikörpertiter von 2 g/L mit einer Reinheit von  $15 \pm 2\%$  sowie einem eintretenden Massenfluss von 1 g/min. Als Zielkonzentration soll in allen drei Szenarien ebenfalls ein Titer von 2 g/L nach der Auflösung erreicht werden. Die Ergebnisse der Studie werden erneut separat für die Präzipitation und die Auflösung präsentiert.

#### **Szenario 1: Variierende Feedkonzentration**

Es wird zunächst allgemein untersucht, ob die Grundoperation für das Ausgleichen von Konzentrationsschwankungen in der Lage ist. Die Präzipitation an sich ist ein Prozess der unabhängig von der Feedkonzentration ist [Matheus 2009]. Das bedeutet, dass die Fällung eintritt sobald die richtigen Präzipitationsbedingungen eingestellt werden. Es ist demnach unabhängig wie hoch die Konzentration im Feed ist. Für eine variierende Eingangskonzentration ist dementsprechend der Schritt der Auflösung entscheidend, da die Konzentration durch das Auflösungsverhältnis eingestellt. Abbildung 4-41 (a) zeigt die Simulationsergebnisse einer periodischen Konzentrationsänderung (graue Linie) als Eingangssignal, welche einen variierenden Titer zwischen

#### 4. Ergebnisse zur Präzipitation von monoklonalen Antikörpern

2,5 auf 1,5 g/L aufweist. Durch das integrierte Regelungskonzept kann die Grundoperation eine konstante Ausgangskonzentration von  $1,85 \pm 0,03$  g/L liefern (rote Linie). Dafür ist das Auflösungsverhältnis proportional zur Konzentrationsschwankung angepasst worden, welches in Abbildung 4-41 (b) veranschaulicht ist. Bei einer erhöhten Feedkonzentration wird dementsprechend ein höheres Auflösungsverhältnis gewählt, um die Konzentration im Produkt zu verdünnen. Bei einer geringeren Konzentration als die erwartete wird, durch die Verringerung des Auflösungsverhältnisses, die Zielkomponente konzentriert. Damit verbunden ist die Veränderung des zurückbleibenden PEG Anteils (orangefarbene Säulen), der aufgrund des thermodynamischen Gleichgewichts limitierend werden kann. Für den untersuchten Fall ist der PEG Anteil jedoch nicht kritisch, da er lediglich bis zu einem Anteil von 4 wt% ansteigt. Dazu ist in Abbildung 4-41 (c) erneut das zulässige Betriebsfenster (blau schraffiert) für den untersuchten Laborprozess gezeigt (siehe Kapitel 4.3). Bei einer Zielkonzentration von 2 g/L ist der resultierende PEG Anteil von  $< 4$  wt% nicht limitierend während der Auflösung.

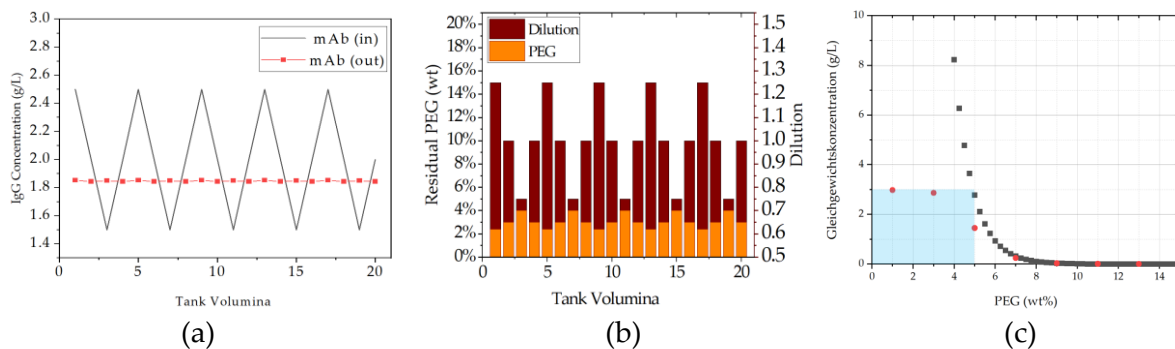


Abbildung 4-41: Simulationsergebnisse der APC-Studie von Szenario 1 [Lohmann 2021].

#### Szenario 2:

In Szenario zwei wird der variierende Eingangsmassenstrom aus der ATPE untersucht. Erste Simulationen haben gezeigt, dass ein variierender Massenfluss hauptsächlich den Präzipitationsschritt beeinflusst. Dies liegt daran, dass bei einem erhöhten Feed und gleichbleibendem Präzipitant Massenstrom der benötigte PEG Anteil von 12 wt% nicht mehr erreicht wird, sodass ein Anteil des Antikörpers gelöst bleibt. Der Überstand wird durch die anschließende Filtration entfernt, sodass durch



#### 4. Ergebnisse zur Präzipitation von monoklonalen Antikörpern

den Restanteil an gelöstem Antikörper ein Produktverlust entsteht. Durch erlangtes Prozesswissen ist bekannt, dass ein höherer PEG Anteil  $> 12$  wt% während der Präzipitation keine Auswirkung auf die Ausbeute des Antikörpers hat. Auf Grund dessen werden nur die Simulationsergebnisse im Falle eines unzureichenden PEG Anteiles gezeigt. Dieser Fall ist in Abbildung 4-42 (a).

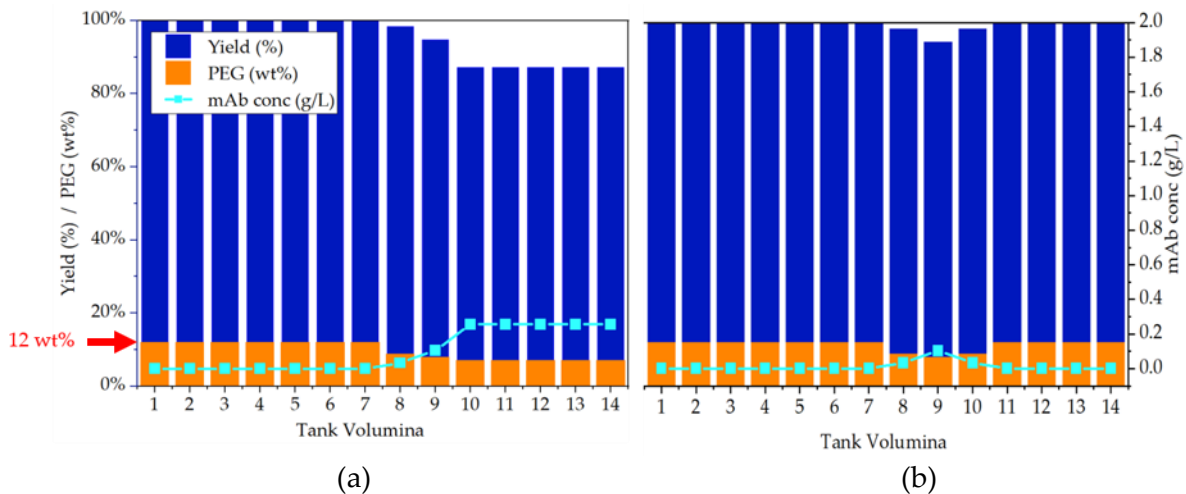


Abbildung 4-42: Simulationsergebnisse für Szenario 2. (a) Prozess ohne APC gezeigt und (b) mit eingreifender Regelung [Lohmann 2021].

Tritt die Störung des erhöhten Feed Massenstroms über einen längeren Zeitraum als wenige Sekunden auf, stellt sich ein falsches Verhältnis zwischen PEG und leichter Phase im Präzipitationstank ein. Während des Betriebs kann der erforderliche PEG Anteil von 12 wt% nicht mehr eingehalten werden (orange Säulen), was zu einem Anstieg der Gleichgewichtskonzentration des Antikörpers führt (hellblaue Linie). Dies hat zur Folge, dass ein Teil der Zielkomponente gelöst vorliegt. Dieser Produktverlust zeigt sich durch die verminderte Ausbeute im Fällungsschritt (blaue Säulen). In Abbildung 4-42 (b) ist der gleiche Fall gezeigt, allerdings mit integriertem Regelungskonzept. Durch die Leitfähigkeitssonde wird das falsche Verhältnis detektiert, die Pumpe des Präzipitanten angesteuert und neu eingestellt. Der PEG Anteil steigt wieder auf 12 wt%, sodass die Präzipitationsbedingungen erneut gegeben sind.

##### **Szenario 3:**

Die Kompensation der Reinheit ist nicht möglich mit der Grundoperation Präzipitation. Das liegt darin begründet, dass sich während des Fällungs- und Auflösungs-schrittes sich jeweils ein Gleichgewichtszustand einstellt. Es ist demnach nicht möglich, durch die von außen einstellbaren Prozessgrößen, den Anteil an Nebenkomponenten zu beeinflussen die präzipitiert oder aufgelöst werden ohne die Zielkomponente gleichzeitig zu beeinflussen. Da die Reinheit global im Polishing optimiert werden kann, ist eine optimale Ausbeute der optimalen Reinheit vorzuziehen. Nichtsdestotrotz ist der Reinheitsgewinn der Grundoperation enorm, da die anfängliche Reinheit von  $15 \pm 2\%$  durch die Grundoperation auf  $85 \pm 5\%$  gesteigert wird. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl Konzentrations- als auch Massenstromänderungen in der Fällungsanlage innerhalb einer kurzen Zeitspanne von wenigen Sekunden kompensiert werden können. Dies wird durch die Integration der vorgeschlagenen APC erreicht. Allerdings können nicht beide Fehlerarten gleichzeitig ausgeglichen werden, da eine konstante Ausgangskonzentration mit einer Schwankung des Ausgangsmassenstroms einhergeht. Daher kann entweder die Konzentration oder der Massenstrom kompensiert werden. Die Grundoperation Präzipitation hat keinen Einfluss auf die Reinheit gezeigt.

## 5. Ergebnisse zur Präzipitation von Antikörperfragmenten

Zur Demonstration der Übertragbarkeit des Prozesses und des entwickelten Modells, müssen folgende Schritte durchgeführt werden:

1. Anpassung der Prozessführung im Labor und Modell
2. Modellparameter Bestimmung
3. Modellvalidierung

Die Anpassung der Prozessführung ist notwendig, sobald sich der Fällungsschritt von der Hauptkomponente zur Nebenkomponten Präzipitation ändert. Dazu werden Gleichgewichtsexperimente durchgeführt. Die Fällung der Hauptkomponente umfasst einen zweistufigen Prozess, da ein Waschschrift und eine anschließende Auflösung erforderlich ist. Bei einer Fällung der Nebenkomponten ist ein einstufiger Prozess ausreichend, da das Permeat in der ersten Filtrationsstufe bereits das Produkt enthält. Der Umbau des Modells erfolgt durch die Bestimmung der neuen Modellparameter. Abschließend wird das Modell für die Antikörperfragmente mit Experimenten validiert. Als Analytik wird die Protein L Chromatographie genutzt, um die Produktkonzentration des scFv-Fragments zu bestimmen. Die SEC-Chromatographie eignet sich in diesem Fall nicht zur Bestimmung der Nebenkomponten, da kein expliziter Produktpeak von den Nebenkomponten zu unterscheiden ist. Des Weiteren wird die FTIR Spektroskopie zur Bestimmung des PEG 8000 Anteils verwendet.

### 5.1 Anpassung der Prozessführung

Die Integration der Präzipitation erfolgt, wie bei den Antikörpern, nach der Flüssig-Flüssig Extraktion. Als Feed für die Präzipitation dient erneut die leichte Phase. Der schematische Reinigungsprozess ist in Abbildung 5-1 gezeigt. Durch ein Screening der Präzipitationsmittel wird bestimmt, ob eine Haupt- oder Nebenkompontenfällung durchgeführt wird sowie ob eine Anpassung der

## 5. Ergebnisse zur Präzipitation von Antikörperfragmenten

Prozessführung notwendig ist. Zur Eingrenzung möglicher Präzipitanten wird das bereits dargelegte Wissen aus dem Antikörperprozess genutzt.

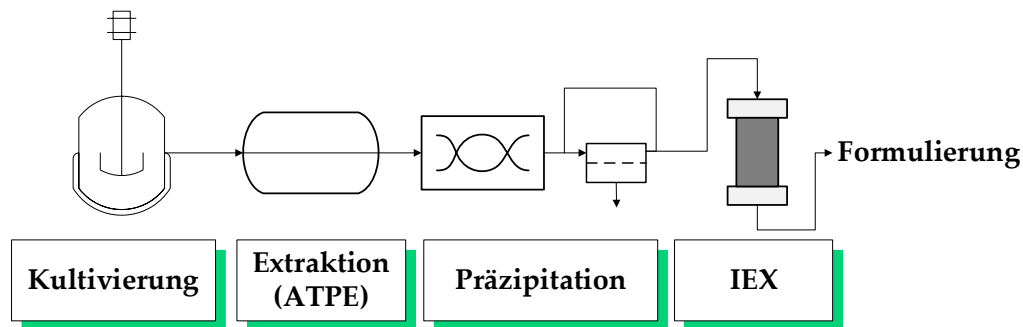


Abbildung 5-1: Aufreinigungsprozess für die Antikörperfragmente.

Die PEG Präzipitation funktioniert nach dem Größenausschluss-Prinzip, nach dem bei gleichbleibenden PEG Anteil größere Proteine früher präzipitieren als kleinere [Polson 1977]. Die Antikörperfragmente sind mit einer Größe von 27 kDa deutlich kleiner als die Antikörper (150 kDa). Eine Präzipitation der kleineren Fragmente durch PEG 4000 erfordert somit ein höherer Anteil an PEG 4000, der anschließend wieder zu reduzieren ist. Um diese Überhöhung zu vermeiden werden PEG 8000 und 12000 in den Experimenten untersucht. Die Gleichgewichtskurven sind in Abbildung 5-2 dargestellt. Die Löslichkeit der Fragmente ist in Schwarz und die der Nebenkomponente in Rot gezeigt.

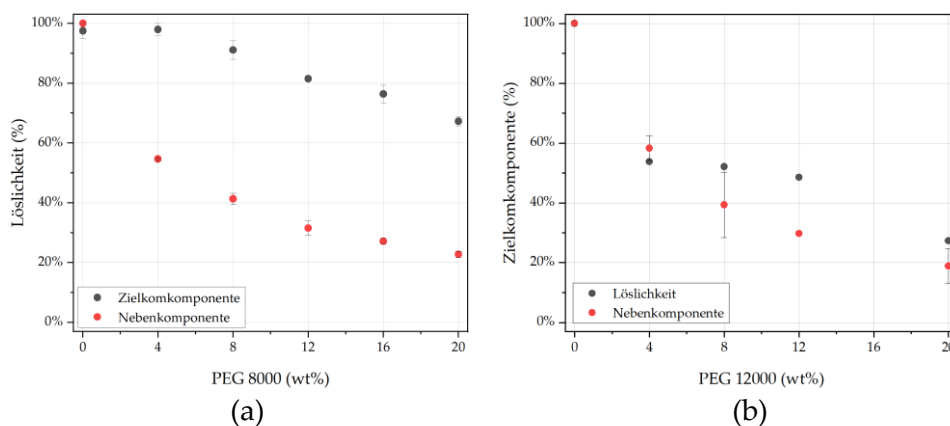


Abbildung 5-2: Löslichkeitskurven der Antikörperfragmente (Schwarz) und der Nebenkomponenten (rot). Es sind die Gleichgewichtskurven für (a) PEG 8000 und in (b) für PEG 12000 gezeigt.

Abbildung 5-2 (a) zeigt, dass bei diesem Stoffsystem ein Unterschied der Löslichkeit zwischen Haupt- und Nebenkomponenten besteht. Bei einem Gewichtsanteil von ca.

4 wt% an PEG 8000 sind die scFv-Fragmente zu 96% in Lösung, die Nebenkomponten hingegen nur noch reduziert mit einer Löslichkeit von 55%. Diese Lücke der Löslichkeit bietet sich für eine Nebenkompontenfällung an. PEG 12000 eignet sich nicht als Präzipitationsmittel, da Haupt- und Nebenkomponten nicht selektiv ausgefällt werden (siehe Abbildung 5-2 (b)). Als Ergebnis des Screenings wird PEG 8000 mit einem Gewichtsanteil von 4 wt% als geeignetes Präzipitationsmittel festgelegt. Des Weiteren wird der kontinuierliche Prozess auf einen einstufigen Prozess reduziert, da sich das Produkt im Permeat der ersten Filtrationsstufe befindet. Der schematische Aufbau der Grund-operation ist in Abbildung 5-3 gezeigt.

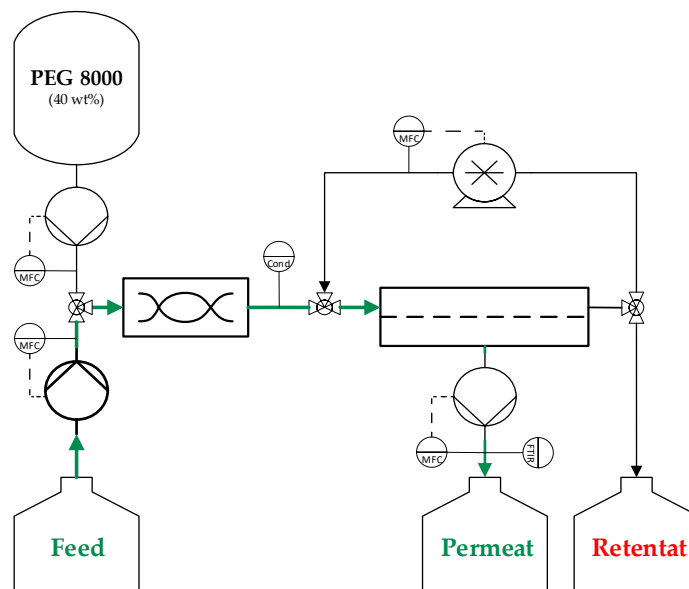


Abbildung 5-3: Prozess zur Fällung der Antikörper Fragmente.

### 5.2 Experimente zur Modellvalidierung

Die Validierung des Prozessmodells mit den scFv Fragmenten erfolgt in drei Experimenten. Zwei der Experimente werden als Doppelbestimmung durchgeführt um die Reproduzierbarkeit sicherzustellen. Der Massenstrom des Feed wird auf ca. 6 g/min eingestellt. Durch den vorgegebenen Gewichtsanteil von 4 wt% resultiert daraus ein Massenstrom der PEG-Lösung (40wt%) von ca. 0,6 g/min. Zudem soll der Retentatstrom minimal sein, da die scFv Fragmente als Wertprodukt im Überstand gelöst

## 5. Ergebnisse zur Präzipitation von Antikörperfragmenten

---

bleiben und das Retentat somit den Abfallstrom darstellt. Als Filtermodul wird ein Hohlfasermodule mit einer Polyethersulfon Membran und einer Fläche von 88 cm<sup>2</sup> verwendet. Da es während der ersten Experimente zu starken Verblockung des Filters gekommen ist, wurde anschließend ein Experiment mit einer größeren Membranfläche (0,2 µm/ 470 cm<sup>2</sup>/ PES) durchgeführt. Die grobe Ähnlichkeit der beiden Stoffsysteme zeigt sich in der Übereinstimmung des Prozessverhaltens. Nach ca. 35 min tritt jedoch eine vollständige Verblockung des Filters auf, sodass das Experiment frühzeitig beendet werden muss. Dabei ist die Belastung der Membran mit einem LMH von 7,5 L/m<sup>2</sup>\*h ca. 50% geringer als im Antikörper Prozess (LMH= 14,2 L/m<sup>2</sup>\*h) Die schnellere Verblockung ist durch die Verwendung von PEG 8000 zu erklären, welches die Viskosität des Systems erhöht und sich in einer schlechteren Filtrierbarkeit äußert. Eine versuchsweise eingestellte, hohe Überströmrate im Hohlfasermodule führt ebenfalls zu einer schnellen Verblockung. Die Ursache liegt in dem dilatantem Verhalten bei steigender Scherrate begründet. Dazu wurde die Viskosität der Suspension in der Rückführung analysiert.

### 5.3 Bestimmung der Modellparameter

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Modellparameterbestimmung dargestellt. Es werden die relevanten Modellparameter nach dem Bestimmungskonzept aus Kapitel 4.4.3 determiniert. Zur Prozesscharakterisierung wird die Protein L Chromatographie genutzt, um die Produktkonzentration zu bestimmen. Die SEC-Chromatographie eignet sich nicht mehr zur Bestimmung der Nebenkomponenten, da kein expliziter Produktpeak erkennbar ist. Des Weiteren wird die FTIR Spektroskopie in Verbindung mit einem trainierten PLS-Modell zur Bestimmung des PEG 8000 Anteils verwendet.

#### Bestimmung der Löslichkeitskurven

Aus der Löslichkeitskurve mit PEG 8000 werden separat die Präzipitationseffizienz und die intrinsische Proteinlöslichkeit für die Haupt- und Nebenkomponenten

bestimmt. Aus der Steigung der logarithmierten Daten ergibt sich die Präzipitationseffizienz für die Hauptkomponente zu  $\beta_{SCFV} = 0,12$  und für die intrinsische Löslichkeit zu  $\kappa_{SCFV} = 1,84$ . Die Präzipitationseffizienz für die Nebenkomponenten ergibt einen Wert von  $\beta_{HCPs} = 0,25$  und die intrinsische Löslichkeit von  $\kappa_{HCPs} = 0,17$ . Die logarithmierte Auftragung der Daten ist in Schwarz für die Hauptkomponenten und in Rot für die Nebenkomponenten gezeigt (siehe Abbildung 5-4).

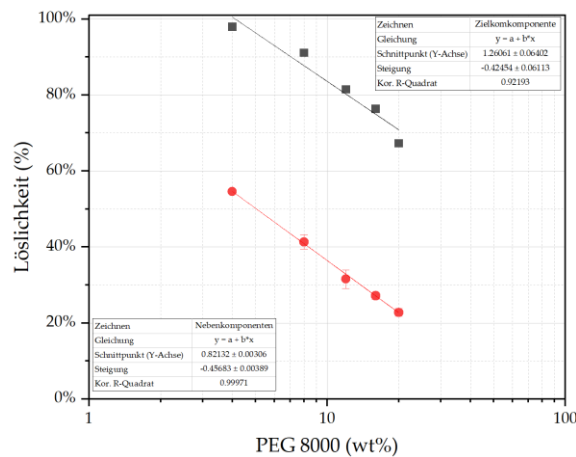


Abbildung 5-4: Löslichkeitskurven der Fragmente (■) und der Nebenkomponenten (●).

### Bestimmung der Präzipitationskinetik

Die Kinetik der Präzipitation wurde mit der Leitfähigkeitssonde durchgeführt, da wieder der Vorteil der unterschiedlichen Leitfähigkeit von Feed und Präzipitant-Lösung ausgenutzt werden kann. Der Einsatz der Trübungssonde ist ebenfalls möglich. In Abbildung 5-5 ist der Verlauf von Leitfähigkeits- und Trübungsdaten über der Zeit gezeigt. Beide Sonden können zur Bestimmung der Präzipitationskinetik eingesetzt werden. Es ist zu sehen, dass die Präzipitationsdauer etwas kürzer ist als bei den Antikörpern (ca. fünf Sekunden). Das ist dennoch plausibel, da durch den geringeren PEG Anteil (4 wt%) eine geringere Menge an PEG 8000 Lösung hinzugefügt werden muss. Die Durchmischung erfolgt schneller, da ein kleineres Volumen mit der leichten Phase vermischt wird. Die Präzipitationskinetik ergibt einen Wert von  $k_{prec} = 0,2 \frac{1}{s}$ . Die Bestimmung der Auflösung entfällt, da es sich um die Fällung der Nebenkomponente handelt und das Zielprotein in Lösung bleibt.

## 5. Ergebnisse zur Präzipitation von Antikörperfragmenten

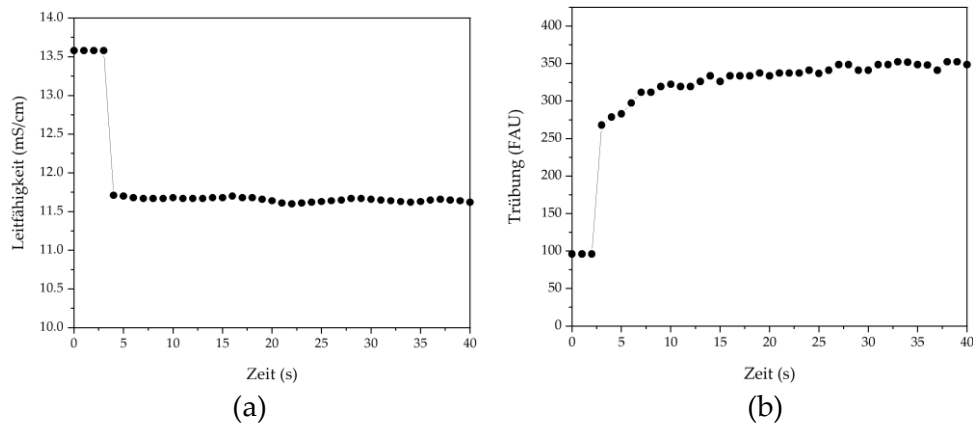


Abbildung 5-5: Bestimmung der Präzipitationskinetik mit Hilfe von (a) Leitfähigkeit und (b) Trübung

### Bestimmung des Verblockungsmechanismus

Die Bestimmung des Verblockungsmechanismus zeigt eine deutlich geringere Kapazität der Membran von ca. 40 % im Vergleich zum Antikörperprozess. Die Daten zur Identifizierung des vorliegenden Mechanismus sind in Abbildung 5-6 dargestellt.

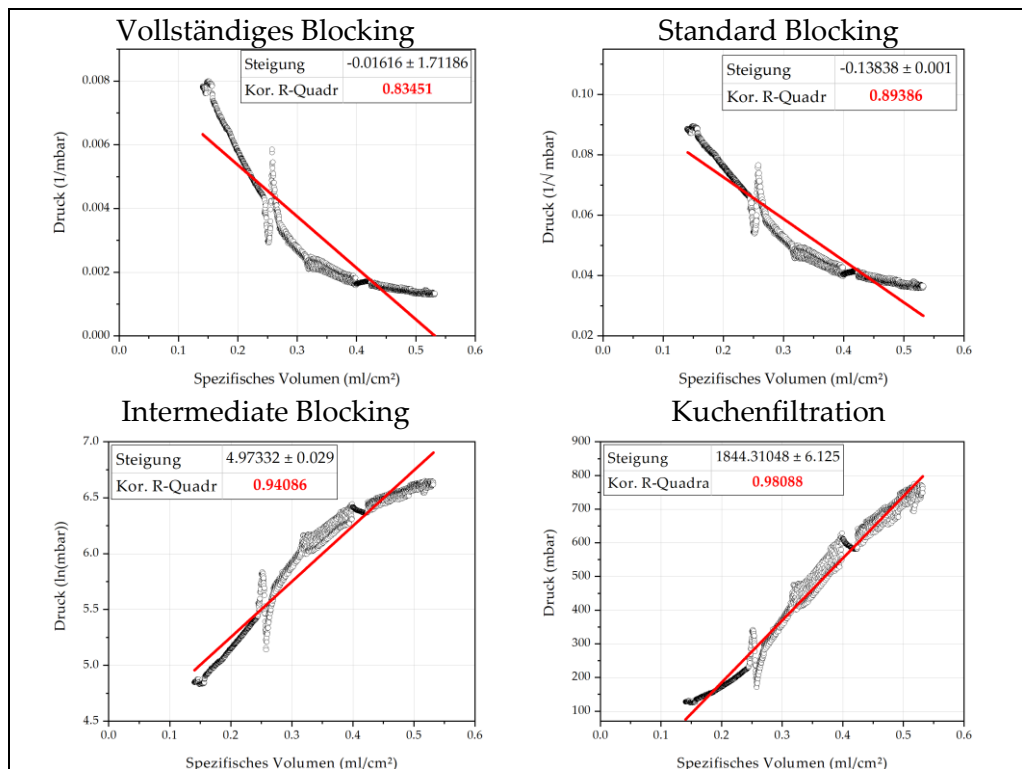


Abbildung 5-6: Identifikation des Verblockungsmechanismus im Hohlfasermembranmodul des Prozesses zur Reinigung von scFv-Fragmenten (Modul: PES-Membran  $0,2 \mu\text{m}$  /  $A=88\text{cm}^2$  /  $L=20 \text{cm}$  / Repligen).

Durch die Verwendung PEG 8000 anstatt PEG 4000 liegt die Viskosität des zweiten Stoffsystems allgemein höher als bei dem Antikörperprozess. Diese beeinflusst nach dem Gesetz von Darcy (Gleichung (2-8)) die Filtration enorm. Des Weiteren ist durch



die Messungen der Viskosität determiniert worden, dass dieses Stoffsystem ein leicht scherverdickendes Verhalten aufweist. Dieses stoffspezifische Verhalten erschwert die Filtration zusätzlich. Die aufgenommenen Druckdaten sind in Abbildung 5-6 gezeigt. Das Vollständige und Standard Blocking bieten keine realistische Übereinstimmung mit den aufgezeichneten Druckdaten auf Grund des Bestimmtheitsmaßes. Die Kuchenbildung als auch das Intermediate Blocking bieten eine solide Regression. Es wird, auf Grund des Prozesswissens aus der Fällung der monoklonalen Antikörper, erneut das Intermediat Blocking gewählt. Die Verblockungskonstante für die Kuchenfiltration beträgt  $K_i = 4,8 \frac{1}{cm}$ .

#### 5.4 Modellierung der Präzipitation von Antikörperfragmenten

Um die Allgemeingültigkeit des aufgestellten Prozessmodells in ACM zu zeigen, werden die neu bestimmten Modellparameter eingefügt und die durchgeführten Laborexperimente an Hand der Inputdaten (Massenströme von Feed, PEG, Permeat und Retentat) simuliert. Die Ergebnisse werden wie bereits in Kapitel 4.4.4 in Paritätsplots gezeigt. Dabei ist das Ergebnis der Simulation über dem offline gemessenen Wert aufgetragen. In Abbildung 5-7 sind die Ergebnisse für die Zielgrößen Ausbeute und Reinheit gezeigt.

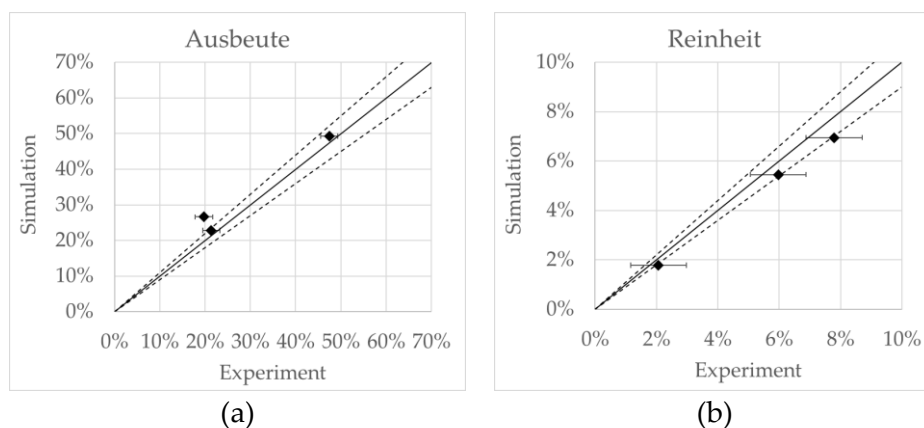


Abbildung 5-7: Simulationsergebnis der Zielgrößen Ausbeute und Reinheit der Experimente mit den Antikörperfragmenten im Vergleich zu den offline gemessenen Daten.

Die gestrichelten Linien geben wieder eine Abweichung von  $\pm 10\%$  an. Es ist zu sehen, dass die simulierten Werte gut mit den experimentell ermittelten übereinstimmen.

## 5. Ergebnisse zur Präzipitation von Antikörperfragmenten

Darüber hinaus wird deutlich, dass dieser Prozess nur eine geringe Ausbeute sowohl als auch eine niedrige Reinheit zur Folge hat. Die Kontrolle der Modellierung erfolgt, wie zuvor für die Antikörper, mittels Bilanzierung der ein- und austretenden Massen im Prozess. Der Gültigkeitsbereich ist trotz der tiefgreifenden und exakten Modellierung auf Grund der schnelleren Verblockung der Membranen geringer. Abbildung 5-8 (a) und (b) zeigen die Massen der im Versuch und der Simulation eintretenden Massen, Abbildung 5-8 (c) und (d) die austretenden Massen.

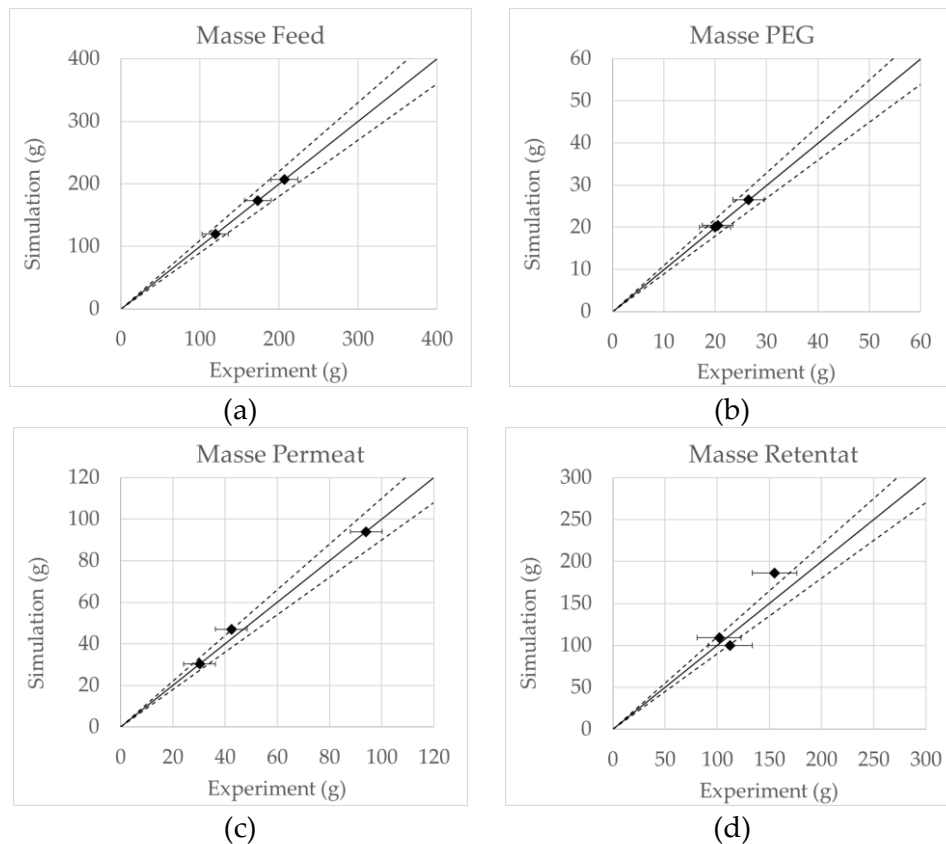


Abbildung 5-8: Simulationsergebnisse im Vergleich zu den experimentell gemessenen Daten für die Massen der ein- und austretenden Ströme.

Die, im Vergleich zum ersten Stoffsystem, frühzeitige Verblockung ist in Abbildung 5-9 dargestellt, dabei ist der Druckverlauf der Simulation rot und des Experiments in blau dargestellt. Nach ca. 35 Minuten bleibt der Transmembrandruck konstant, die Triebkraft ist nicht mehr ausreichend, so dass der Permeatstrom zum Erliegen kommt. Die Pumpe erhöht den Transmembrandruck, um den angestrebten, konstanten Volumenstrom trotz vermehrter Verblockung der Membran einzustellen.

Die Modellbeschreibung der hydraulischen Permeabilität ist in der Lage, nach Anpassung der Modellparameter auch diesen Zusammenhang abzubilden.

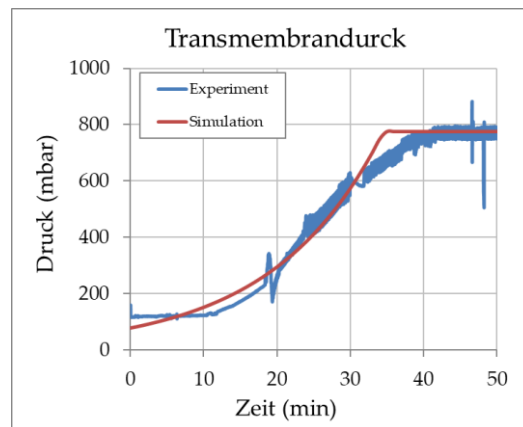


Abbildung 5-9: Vergleich des Transmembrandrucks während des Prozesses.

### Fazit: Antikörper Fragmente

Die Experimente mit dem zweiten Stoffsystem zeigen anschaulich, dass der entwickelte Präzipitationsprozess für die Hauptkomponenten- als auch für die NebenkompONENTENFÄLLUNG genutzt werden kann. Durch den modularen Aufbau, ist der Laborprozess flexibel und lässt sich schnell auf ein anderes Stoffsystem umrüsten. Dasselbe gilt für das Prozessmodell, dessen Modellbestandteile (Tanks, Mischer, Hohlfaser, etc...), getreu den Bestandteilen im Labor, ebenfalls modular in mehreren Untermodellen aufgebaut ist. Je nach Prozessführung können diese beliebig miteinander kombiniert werden kann. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Modell allgemeingültig ist und die auftretenden physikalischen Effekte korrekt abbildet, da es nur durch Variation weniger Modellparameter auf ein neues Stoffsystem angepasst werden kann. Aus verfahrenstechnischer Sicht ist die Integration der Präzipitation nach der ATPE jedoch nicht sinnvoll. Das liegt darin begründet, dass die Proteinkonzentration des scFv- Fragment im Feed mit  $7,88 \mu\text{g/mL}$  sehr gering ausfällt, bei gleichzeitig starker Verunreinigung durch die NebenkompONENTEN ( $1279,80 \mu\text{g/mL}$ ). Die Reinheit nach der ATPE liegt demnach bei lediglich  $0,61\%$ , welche durch die Präzipitation um ca. den Faktor vier auf eine Reinheit von  $2,1\%$  gesteigert werden kann.

## 5. Ergebnisse zur Präzipitation von Antikörperfragmenten

Aus diesem Grund wurde statt der ATPE eine Ultra- und Diafiltration (UF/DF) durchgeführt um die Produktkonzentration zu steigern. Anschließend wird erneut die Präzipitation durchgeführt. Der veränderte Prozess ist schematisch in Abbildung 5-10 dargestellt.

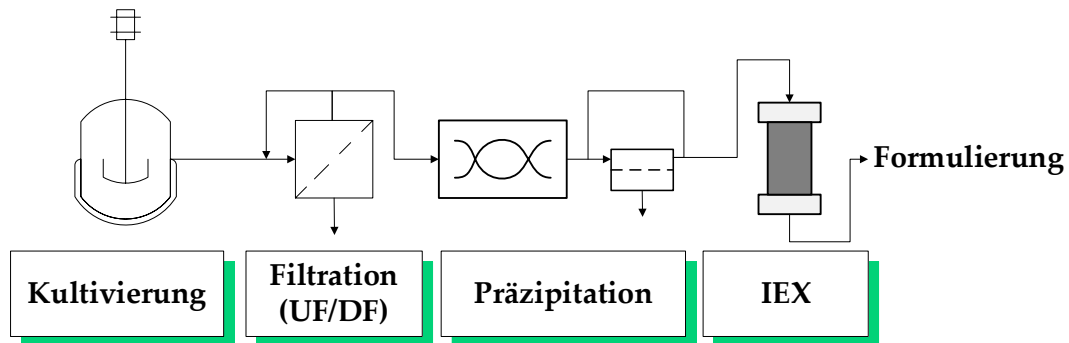


Abbildung 5-10: Veränderter Aufreinigungsprozess für die scFv-Fragmente.

Die Ergebnisse der erneuten Screening-Experimente mit PEG 8000 hat jedoch ergeben, dass die Konzentrierung der scFvs und der Pufferwechsel in der UFDF nicht zu dem erwarteten Ergebnis geführt haben. Die Ergebnisse der Gleichgewichtsexperimente sind in Abbildung 5-11 gezeigt.

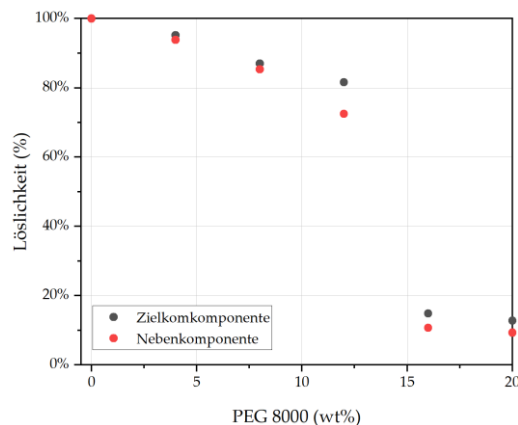


Abbildung 5-11: Gleichgewichtskurve der scFvs (schwarz) und der Nebenkomponenten (rot) mit dem Feed aus der UF/DF. Die Präzipitation ist nach der UF/DF nicht mehr selektiv.

Durch die UF/DF und den Pufferwechsel werden bereits einige Nebenkomponenten entfernt, welche ähnliche zu sein scheinen, wie die Nebenkomponenten, welche durch die Präzipitation mit PEG 8000 gefällt werden. Das Resultat ist eine nicht selektive der Haupt- und Nebenkomponenten. Aus diesem Grund ist die Präzipitation nach der UF/DF nicht nutzbar.

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

In der Vorliegenden Arbeit hat sich die Präzipitation als robuste und geeignete Grundoperation zur Aufreinigung von Biomolekülen herausgestellt. Es wurde am Beispiel von monoklonalen Antikörpern der Quality by Design Ansatz zur Prozessentwicklung genutzt, da sich dieser in den letzten Jahren zum Standard in der Industrie entwickelt hat und zudem die Zulassung bei den zuständigen Aufsichtsbehörden erleichtert. Es wurde eine selektive Hauptkomponentenfällung mit Polyethylenglykol 4000 etabliert, welche die biologische Aktivität nicht beeinträchtigt. Die Prozessentwicklung erfolgte für einen absatzweisen, einen halbkontinuierlichen und einen kontinuierlichen Betrieb, welche jeweils ihre Vorteile besitzen. Die Prozesse umfassen einen Präzipitationsschritt, einen Waschschrift der Präzipitate und die abschließende Auflösung. Bei einem PEG Anteil von 12 wt% wird in der Präzipitation eine Ausbeute von 100% erzielt, im Waschschrift eine von etwa 95% und die abschließende Auflösung erreicht, je nach Prozessführung, eine Ausbeute von 80-90%. Die Reinheit des Produktes kann von anfänglich  $15 \pm 2\%$  im Feed auf ca. 80% in dem halbkontinuierlichen und auf ca. 65% im kontinuierlichen Prozess gesteigert werden. Die Ausbeuteverluste im Auflösungsschritt ist auf einen erhöhten PEG Anteil ( $> 3\text{wt}\%$ ) im Produkt zurückzuführen. Dieser kann durch kontinuierliche Kontrolle des PEG Anteils und entsprechendes Gegensteuern eliminiert werden, sodass auch im kontinuierlichen Prozess theoretisch eine Ausbeute von  $> 90\%$  denkbar ist. In dem Produkt der Grundoperation Präzipitation befinden sich hauptsächlich LMWs, die in der nachfolgenden IEX problemlos im Durchfluss abgetrennt werden können [Vetter 2021].

Des Weiteren wurde ein Prozessmodell erstellt, welches, in Anlehnung an den Workflow von Sixt et al. validiert wurde [Sixt 2018]. Die durchgeführten Laborexperimente (DoE) waren in guter Übereinstimmung mit den simulierten Ergebnissen und lagen innerhalb eines Konfidenzintervall von 0,9.

Als Eingangsgrößen der Simulationen wurden lediglich die im Labor eingestellten Massenflüsse der Pumpen Feed, Präzipitant, Waschlösung und Auflösungspuffer als auch der Pumpen für Permeat 1 und 2 benötigt. Außerdem ist im Rahmen der Modellvalidierung ein Bestimmungskonzept für Modellparameter entwickelt worden, welches es ermöglicht das Modell, durch Determinierung der relevanten Modellparameter, auf ein neues Stoffsystem anzupassen.

Anschließend wurden in einer PAT-Studie mögliche Messmethoden zur Online Messung der Qualitätsattribute Ausbeute und Reinheit untersucht, um die Grundlage für ein Regelungskonzept des Prozesses zu legen. Hierbei eignen sich besonders Spektroskopische Methoden wie FTIR und Raman, da diese nicht-invasiv messen und mit einem trainierten Auswertungsalgorithmus das Ergebnis in Echtzeit vorliegt. Dieses Kriterium ist für eine modellbasierte Regelung essentiell. Das FTIR ist ein mächtiges Messinstrument für Präzipitation, welches nicht nur die Konzentration der Zielkomponenten, sondern auch die Struktur des Antikörpers abbilden kann [Oelmeier 2013]. Die Struktur gibt einen Aufschluss darüber, ob die Biologische Aktivität des Proteins noch gewährleistet ist [Helgers 2021]. Zudem kann mit dem FTIR der Restanteil an PEG 4000 im Produkt bestimmt werden. Die HPLC Methodik erfordert hier auf Grund der fehlenden UV Aktivität des Polyethylenglykols die Verwendung spezieller SEC-Säulen. Das Raman konnte eingesetzt werden um das Qualitätsattribut Reinheit zu verfolgen. Darüber hinaus eignet sich eine Leitfähigkeitssonde zur Überwachung des Verhältnisses zwischen Feed und Präzipitant, welches eine direkte Auswirkung auf Ausbeuteverluste hat. FTIR und Raman lassen sich zu dem qualitätsfokussiertes PAT zusammenfassen, wohingegen die Leitfähigkeitssonde dem regelungsfokussiertes PAT angehört. Die ermittelte Onlinemesstechnik wurde zur Prozessüberwachung in einem Regelungskonzept zusammengefasst. Die Evaluation erfolgte anschließend in einer APC-Simulationsstudie. Es konnte gezeigt werden, dass die Grundoperation Präzipitation in der Lage ist auf realistische Prozessschwankungen zu reagieren und diese auszugleichen. Durch die Etablierung eines

Regelungskonzept konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Ausbeuteverlusten sowohl in der Präzipitation als auch der Auflösung eliminiert werden können. Dieses Ergebnis sollte in einer folgenden Arbeit im Versuchsaufbau validiert werden.

Abschließend wurde ein zweites Stoffsystem, die Antikörperfragmente, im kontinuierlichen Aufbau untersucht. Diese sind ca. um den Faktor fünf kleiner als die Antikörper, sodass durch die Fällung mit PEG 8000 eine NebenkompONENTENFÄLLUNG realisiert wurde. Dadurch verändert sich der Prozess zu einem einstufigen kontinuierlichen Prozess. Die Universalität des Prozessmodells konnte durch die Übertragbarkeit auf ein anderes Stoffsystem gezeigt werden. Die Grundoperation Präzipitation ist jedoch aus mehreren verfahrenstechnischen Gründen für das zweite Stoffsystem nicht gut geeignet, sodass lediglich die erfolgreiche Übertragung des Modells als positives Ergebnis gewertet werden kann. Die Machbarkeit der Übertragung zeigt zudem die Flexibilität des Prozessaufbaus, der zum einen für die Fällung der Hauptkomponenten und zum anderen auch für die NebenkompONENTEN genutzt werden kann, wodurch die beiden Hauptstrategien der Präzipitation abgedeckt werden. Da die PEG Präzipitation nur einen möglichen Präzipitationsmechanismus ausnutzt, sollte in einer nachfolgenden Arbeit eine alternative Präzipitationsmethode gewählt werden. Zudem wäre es interessant zu sehen, ob der Prozess ebenfalls im Bereich der Phytoextraktion, welche häufig Präzipitationsschritte beinhaltet, genutzt werden kann.

## 7. Literaturverzeichnis

- [Agilent Technologies, Inc. 2007] Agilent Technologies, Inc.: *High-Speed Amino Acid Analysis (AAA) on 1.8  $\mu\text{m}$  Reversed-Phase (RP) Columns* <<https://docplayer.net/25325234-High-speed-amino-acid-analysis-aaa-on-1-8-um-reversed-phase-rp-columns-application.html>> (07.03.2022)
- [Amin 2014] Amin, S., Barnett, G. V., Pathak, J. A., Roberts, C. J., Sarangapani, P. S. (2014): *Protein aggregation, particle formation, characterization & rheology*, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 19 (5), 438–449, DOI: 10.1016/j.cocis.2014.10.002
- [Arakawa 1985] Arakawa, T., Timasheff, S. N. (1985): *Theory of protein solubility*, 114, 49–77, DOI: 10.1016/0076-6879(85)14005-x
- [Asakura 1958] Asakura, S., Oosawa, F. (1958): *Interaction between particles suspended in solutions of macromolecules*, *J. Polym. Sci.*, 33 (126), 183–192, DOI: 10.1002/pol.1958.1203312618
- [Atha 1981] Atha, D. H., Ingham, K. C. (1981): *Mechanism of precipitation of proteins by polyethylene glycols. Analysis in terms of excluded volume*, *Journal of Biological Chemistry*, 256 (23), 12108–12117, DOI: 10.1016/S0021-9258(18)43240-1
- [Aumiller 2014] Aumiller, W. M., Davis, B. W., Keating, C. D. (2014): *Phase separation as a possible means of nuclear compartmentalization*, *International review of cell and molecular biology*, 307, 109–149, DOI: 10.1016/B978-0-12-800046-5.00005-9



- [Baker 2004] Baker, R. W. (2004): *Concentration Polarization*. 2nd, J. Wiley, Chichester, New York
- [Baker 2012] Baker, R. W. (2012): *Membrane technology and applications*. 3rd edition, Wiley, Chichester, U.K
- [Bauer 2017] Bauer, K. C., Hämmerling, F., Kittelmann, J., Dürr, C., Görlich, F., Hubbuch, J. (2017): *Influence of structure properties on protein-protein interactions-QSAR modeling of changes in diffusion coefficients, Biotechnology and bioengineering*, 114 (4), 821–831, DOI: 10.1002/bit.26210
- [Belfort 1994] Belfort, G., Davis, R. H., Zydney, A. L. (1994): *The behavior of suspensions and macromolecular solutions in crossflow microfiltration, Journal of Membrane Science*, 96 (1-2), 1–58, DOI: 10.1016/0376-7388(94)00119-7
- [Bielekova 2010] Bielekova, B., Becker, B. L. (2010): *Monoclonal antibodies in MS: mechanisms of action, Neurology*, 74 Suppl 1, S31-40, DOI: 10.1212/WNL.0b013e3181c97ed3
- [Borisenko 2012] Borisenko, E. (2012): *Crystallization and Materials Science of Modern Artificial and Natural Crystals, Alternative Protein Crystallization Technique: Cross-Influence Procedure (CIP)*, IntechOpen, Erscheinungsort nicht ermittelbar
- [Boulet-Audet 2016] Boulet-Audet, M., Kazarian, S. G., Byrne, B. (2016): *In-column ATR-FTIR spectroscopy to monitor affinity chromatography purification of monoclonal antibodies, Scientific reports*, 6, 30526, DOI: 10.1038/srep30526
- [Brestrich 2014] Brestrich, N., Briskot, T., Osberghaus, A., Hubbuch, J. (2014): *A tool for selective inline quantification of co-eluting*

- proteins in chromatography using spectral analysis and partial least squares regression, Biotechnology and bioengineering, 111 (7), 1365–1373, DOI: 10.1002/bit.25194*
- [Brestrich 2018] Brestrich, N., Rüdts, M., Büchler, D., Hubbuch, J. (2018): *Selective protein quantification for preparative chromatography using variable pathlength UV/Vis spectroscopy and partial least squares regression, Chemical Engineering Science, 176, 157–164, DOI: 10.1016/j.ces.2017.10.030*
- [Brodsky 2012] Brodsky, Y., Zhang, C., Yigzaw, Y., Vedantham, G. (2012): *Caprylic acid precipitation method for impurity reduction: an alternative to conventional chromatography for monoclonal antibody purification, Biotechnology and bioengineering, 109 (10), 2589–2598, DOI: 10.1002/bit.24539*
- [Buckley 2017] Buckley, K., Ryder, A. G. (2017): *Applications of Raman Spectroscopy in Biopharmaceutical Manufacturing: A Short Review, Applied spectroscopy, 71 (6), 1085–1116, DOI: 10.1177/0003702817703270*
- [Bull 1967] Bull, H. B., Breese, K. (1967): *Denaturation of proteins by fatty acids, Archives of Biochemistry and Biophysics, 120 (2), 309–315, DOI: 10.1016/0003-9861(67)90244-5*
- [Burgstaller 2019] Burgstaller, D., Jungbauer, A., Satzer, P. (2019): *Continuous integrated antibody precipitation with two-stage tangential flow microfiltration enables constant mass flow, Biotechnology and bioengineering, 116 (5), 1053–1065, DOI: 10.1002/bit.26922*
- [Catley 2011] Catley, M. C., Coote, J., Bari, M., Tomlinson, K. L. (2011): *Monoclonal antibodies for the treatment of asthma,*

- Pharmacology & therapeutics*, 132 (3), 333–351, DOI:  
10.1016/j.pharmthera.2011.09.005
- [Chan 1986] Chan, M. Y., Hoare, M., Dunnill, P. (1986): *The kinetics of protein precipitation by different reagents*, *Biotechnology and bioengineering*, 28 (3), 387–393, DOI:  
10.1002/bit.260280312
- [Cheryan 1998] Cheryan, M. (1998): *Ultrafiltration and microfiltration handbook*, Technomic Pub. Co, Lancaster, Pa.
- [Chew 2020] Chew, J. W., Kilduff, J., Belfort, G. (2020): *The behavior of suspensions and macromolecular solutions in crossflow microfiltration: An update*, *Journal of Membrane Science*, 601, 117865, DOI: 10.1016/j.memsci.2020.117865
- [Chmiel 2011] Chmiel, H. (2011): *Bioprozesstechnik*. 3., neu bearb. Aufl., Spektrum Akademischer Verl., Heidelberg
- [Christen 2015] Christen, P., Jaussi, R., Benoit, R. (2015): *Biochemie und Molekularbiologie, Eine Einführung in 40 Lerneinheiten*. 1. Aufl. 2016, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
- [Chun 2020] Chun, P. I. F., Lehman, H. (2020): *Current and Future Monoclonal Antibodies in the Treatment of Atopic Dermatitis*, *Clinical reviews in allergy & immunology*, 59 (2), 208–219, DOI: 10.1007/s12016-020-08802-9
- [Clark 2009] Clark, D. P., Pazdernik, N. J. (2009): *Molekulare Biotechnologie, Grundlagen und Anwendungen*, Spektrum Akad. Verl., Heidelberg

- [Cohn 1925] Cohn, E. J. (1925): *THE PHYSICAL CHEMISTRY OF THE PROTEINS*, *Physiological Reviews*, 5 (3), 349–437, DOI: 10.1152/physrev.1925.5.3.349
- [Collins 2004] Collins, K. D. (2004): *Ions from the Hofmeister series and osmolytes: effects on proteins in solution and in the crystallization process*, *Methods (San Diego, Calif.)*, 34 (3), 300–311, DOI: 10.1016/j.ymeth.2004.03.021
- [Darcy 1856] Darcy, H. (1856): *Les Fontaines Publiques de la Ville de Dijon*
- [Davis Knoll 1983] Davis Knoll, Jan Hermans (1983): *Polymer-protein interactions*, *Journal of Biological Chemistry*, 258 (9), 5710–5715, DOI:
- [Deissler 1954] Deissler, R. G. (1954): *Analysis of Turbulent Heat Transfer, Mass Transfer, and Friction in Smooth Tubes at High Prandtl and Schmidt Numbers*, National Advisory Committee for Aeronautics
- [Dos Santos 2017] Dos Santos, R., Carvalho, A. L., Roque, A. C. A. (2017): *Renaissance of protein crystallization and precipitation in biopharmaceuticals purification*, *Biotechnology advances*, 35 (1), 41–50, DOI: 10.1016/j.biotechadv.2016.11.005
- [Dutra 2020] Dutra, G., Komuczki, D., Jungbauer, A., Satzer, P. (2020): *Continuous capture of recombinant antibodies by ZnCl<sub>2</sub> precipitation without polyethylene glycol*, *Engineering in life sciences*, 20 (7), 265–274, DOI: 10.1002/elsc.201900160
- [Dziadosz 2012] Dziadosz, M., Lessig, R., Bartels, H. (2012): *HPLC-DAD protein kinase inhibitor analysis in human serum*, *Journal of*

- chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences, 893-894, 77-81, DOI: 10.1016/j.jchromb.2012.02.037*
- [Erickson 2009] Erickson, H. P. (2009): *Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy, Biological procedures online, 11, 32-51, DOI: 10.1007/s12575-009-9008-x*
- [Esbensen 2018] Esbensen, K. H. et al. (2018): *Multivariate data analysis, An introduction to multivariate analysis, process analytical technology and quality by design. 6th edition, CAMO, Oslo, Magnolia, TX*
- [EvaluatePharma 2021] EvaluatePharma: *World Preview 2021 outlook to 2026...* <[https://info.evaluate.com/rs/607-YGS-364/im-ages/JN%2346%20World%20Preview%20Report\\_Final\\_06-10\\_HR\\_no\\_crops.pdf](https://info.evaluate.com/rs/607-YGS-364/im-ages/JN%2346%20World%20Preview%20Report_Final_06-10_HR_no_crops.pdf)> (29.04.2022)
- [Faienza 2018] Faienza, M. F., Chiarito, M., D'amato, G., Colaianni, G., Colucci, S., Grano, M., Brunetti, G. (2018): *Monoclonal antibodies for treating osteoporosis, Expert opinion on biological therapy, 18 (2), 149-157, DOI: 10.1080/14712598.2018.1401607*
- [Fane 1984] Fane, A. G. (1984): *Ultrafiltration of suspensions, Journal of Membrane Science, 20 (3), 249-259, DOI: 10.1016/S0376-7388(00)82002-5*
- [FDA 2004] FDA: *PAT - A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing and Quality Assurance*

- <<https://www.fda.gov/media/71012/download>>  
(25.10.2021)
- [FDA 2021] FDA: *Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products* <<https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/inactive-ingredients-database-download>>  
(05.04.2022)
- [FDA, EMA 2013] FDA, EMA: *Quality-by-Design applications: lessons learnt and Q&A resulting from the first parallel assessment*  
<[https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/european-medicines-agency-food-drug-administration-pilot-programme-parallel-assessment-quality\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/european-medicines-agency-food-drug-administration-pilot-programme-parallel-assessment-quality_en.pdf)>  
(17.09.2021)
- [Feidl 2019] Feidl, F., Garbellini, S., Vogg, S., Sokolov, M., Souquet, J., Broly, H., Butté, A., Morbidelli, M. (2019): *A new flow cell and chemometric protocol for implementing in-line Raman spectroscopy in chromatography*, *Biotechnology progress*, 35 (5), e2847, DOI: 10.1002/btpr.2847
- [Galluzzi 2012] Galluzzi, L., Vacchelli, E., Fridman, W. H., Galon, J., Sautès-Fridman, C., Tartour, E., Zucman-Rossi, J., Zitvogel, L., Kroemer, G. (2012): *Trial Watch: Monoclonal antibodies in cancer therapy*, *Oncoimmunology*, 1 (1), 28–37, DOI: 10.4161/onci.1.1.17938
- [Gaughan 2016] Gaughan, C. L. (2016): *The present state of the art in expression, production and characterization of monoclonal antibodies*, *Molecular diversity*, 20 (1), 255–270, DOI: 10.1007/s11030-015-9625-z

- [Gekas 1987] Gekas, V., Hallström, B. (1987): *Mass transfer in the membrane concentration polarization layer under turbulent cross flow*, Vol. 30
- [Gernedel 1981] Gernedel, C., Kessler, H. (1981): *Ultrafiltration kolloidaler Systeme und die den Widerstand der Ablagerungsschicht beeinflussenden Faktoren*
- [Gill 1989] Gill, S. C., Hippel, P. H. von (1989): *Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data*, *Analytical Biochemistry*, 182 (2), 319–326, DOI: 10.1016/0003-2697(89)90602-7
- [Glynn 2017] Glynn, J., in *Process Scale Purification of Antibodies* (Eds: U. Gottschalk), John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ, USA **2017**
- [Grober 1961] Grober, H., Erik, S., Grigoll, V. (1961): *Fundamentals of Heat Transfer*, New York
- [Gronemeyer 2016] Gronemeyer, P., Strube, J. (2016): *Implementation of aqueous two-phase extraction combined with precipitation in a monoclonal antibody manufacturing process*, *Chemistry Today*, 34 (3), 66–70, DOI:
- [Großhans 2018] Großhans, S., Rüdts, M., Sanden, A., Brestrich, N., Morgenstern, J., Heissler, S., Hubbuch, J. (2018): *In-line Fourier-transform infrared spectroscopy as a versatile process analytical technology for preparative protein chromatography*, *Journal of chromatography. A*, 1547, 37–44, DOI: 10.1016/j.chroma.2018.03.005

- [Hämmerling 2017] Hämmerling, F., Ladd Effio, C., Andris, S., Kittelmann, J., Hubbuch, J. (2017): *Investigation and prediction of protein precipitation by polyethylene glycol using quantitative structure-activity relationship models*, *Journal of biotechnology*, 241, 87–97, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2016.11.014
- [Hammerschmidt 2015] Hammerschmidt, N., Hintersteiner, B., Lingg, N., Jungbauer, A. (2015): *Continuous precipitation of IgG from CHO cell culture supernatant in a tubular reactor*, *Biotechnology journal*, 10 (8), 1196–1205, DOI: 10.1002/biot.201400608
- [Hammerschmidt 2016] Hammerschmidt, N., Hobiger, S., Jungbauer, A. (2016): *Continuous polyethylene glycol precipitation of recombinant antibodies: Sequential precipitation and resolubilization*, *Process Biochemistry*, 51 (2), 325–332, DOI: 10.1016/j.procbio.2015.11.032
- [Hebbi 2021] Hebbi, V., Thakur, G., Rathore, A. S. (2021): *Process analytical technology application for protein PEGylation using near infrared spectroscopy: G-CSF as a case study*, *Journal of biotechnology*, 325, 303–311, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2020.10.006
- [Helgers 2021] Helgers, H., Schmidt, A., Lohmann, L. J., Vetter, F. L., Juckers, A., Jensch, C., Mouellef, M., Zobel-Roos, S., Strube, J. (2021): *Towards Autonomous Operation by Advanced Process Control – Process Analytical Technology for Continuous Biologics Antibody Manufacturing*, *Processes*, 9 (1), 172, DOI: 10.3390/pr9010172



- [Helgers 2022] Helgers, H., Hengelbrock, A., Schmidt, A., Vetter, F. L., Juckers, A., Strube, J. (2022): *Digital Twins for scFv Production in Escherichia coli*, *Processes*, 10 (5), 809, DOI: 10.3390/pr10050809
- [Hermans 1982] Hermans, J. (1982): *Excluded-volume theory of polymer–protein interactions based on polymer chain statistics*, *The Journal of chemical physics*, 77 (4), 2193–2203, DOI: 10.1063/1.444026
- [Hermia 1985] Hermia, J. (1985): *Mathematical Models and Design Methods in Solid-Liquid Separation*, NATO ASI Series, Series E, Vol. 88, Springer, Dordrecht
- [Ho 1999] Ho, C.-C., Zydney, A. L. (1999): *Effect of membrane morphology on the initial rate of protein fouling during microfiltration*, *Journal of Membrane Science*, 155 (2), 261–275, DOI: 10.1016/S0376-7388(98)00324-X
- [Ho 2000] Ho, Zydney (2000): *A Combined Pore Blockage and Cake Filtration Model for Protein Fouling during Microfiltration*, *Journal of colloid and interface science*, 232 (2), 389–399, DOI: 10.1006/jcis.2000.7231
- [Holliger 2005] Holliger, P., Hudson, P. J. (2005): *Engineered antibody fragments and the rise of single domains*, *Nature biotechnology*, 23 (9), 1126–1136, DOI: 10.1038/nbt1142
- [Holt 2003] Holt, L. J., Herring, C., Jespers, L. S., Woolven, B. P., Tomlinson, I. M. (2003): *Domain antibodies: proteins for therapy*, *Trends in Biotechnology*, 21 (11), 484–490, DOI: 10.1016/j.tibtech.2003.08.007

- [Huang 2011] Huang, H., Qu, H. (2011): *In-line monitoring of alcohol precipitation by near-infrared spectroscopy in conjunction with multivariate batch modeling*, *Analytica chimica acta*, 707 (1-2), 47–56, DOI: 10.1016/j.aca.2011.09.031
- [Huang 2018] Huang, H., Qu, H. (2018): *In-situ monitoring of saccharides removal of alcohol precipitation using near-infrared spectroscopy*, *J. Innov. Opt. Health Sci.*, 11 (05), 1850027, DOI: 10.1142/S179354581850027X
- [ICH 2006] ICH: *Guideline Q9 - Quality Risk Management*  
<<https://www.fda.gov/media/71543/download>>  
(17.09.2021)
- [ICH 2008] ICH: *Guideline Q10 - pharmaceutical quality*  
<[https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human_en.pdf)> (17.09.2021)
- [ICH 2009] ICH: *Guideline Q8 (R2) - Pharmaceutical Development*  
<[https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use\\_en-11.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use_en-11.pdf)> (17.09.2021)
- [ICH 2012] ICH: *Guideline Q11 - Development and manufacture of drug substances* <[https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-q11-development-manufacture-drug-substances-chemical-entities-biotechnological/biological-entities\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-q11-development-manufacture-drug-substances-chemical-entities-biotechnological/biological-entities_en.pdf)>  
(17.09.2021)

- [Iggland 2012] Iggland, M., Mazzotti, M. (2012): *Population Balance Modeling with Size-Dependent Solubility: Ostwald Ripening, Crystal Growth & Design*, 12 (3), 1489–1500, DOI: 10.1021/cg201571n
- [Ingham 1978] Ingham, K. C. (1978): *Precipitation of proteins with polyethylene glycol: Characterization of albumin, Archives of Biochemistry and Biophysics*, 186 (1), 106–113, DOI: 10.1016/0003-9861(78)90469-1
- [Iritani 2016] Iritani, E., Katagiri, N. (2016): *Developments of Blocking Filtration Model in Membrane Filtration, KONA*, 33 (0), 179–202, DOI: 10.14356/kona.2016024
- [Iverius 1967] Iverius, P. H., Laurent, T. C. (1967): *Precipitation of some plasma proteins by the addition of dextran or polyethylene glycol, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, 133 (2), 371–373, DOI: 10.1016/0005-2795(67)90079-7
- [JASCO Deutschland GmbH]: *FP-2020 Fluorescence Detector*  
<<https://www.jasco.de/en/content/FP-2020/~%7B%7Dt%7Dtpl.index/.html>>
- [Jason Greene, John W. Henderson Jr, John P. Wikswo, Agilent Technologies, Inc.]  
Jason Greene, John W. Henderson Jr, John P. Wikswo, Agilent Technologies, Inc.: *Rapid and Precise Determination of Cellular Amino Acid Flux Rates Using HPLC with Automated Derivatization with Absorbance Detection*

- [Jelinek 2016] Jelinek, T., Hajek, R. (2016): *Monoclonal antibodies - A new era in the treatment of multiple myeloma*, *Blood reviews*, 30 (2), 101–110, DOI: 10.1016/j.blre.2015.08.004
- [Jin 2013] Jin, Y., Wu, Z., Liu, X., Wu, Y. (2013): *Near infrared spectroscopy in combination with chemometrics as a process analytical technology (PAT) tool for on-line quantitative monitoring of alcohol precipitation*, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 77, 32–39, DOI: 10.1016/j.jpba.2013.01.012
- [Juckes 1971] Juckes, I. (1971): *Fractionation of proteins and viruses with polyethylene glycol*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, 229 (3), 535–546, DOI: 10.1016/0005-2795(71)90269-8
- [Kanani 2010] Kanani, D. M., Fissell, W. H., Roy, S., Dubnisheva, A., Fleischman, A., Zydney, A. L. (2010): *Permeability - Selectivity Analysis for Ultrafiltration: Effect of Pore Geometry*, *Journal of Membrane Science*, 349 (1-2), 405, DOI: 10.1016/j.memsci.2009.12.003
- [Karpiński 2019] Karpiński, P. H., Bałdyga, J., in *Handbook of Industrial Crystallization* (Eds: A. S. Myerson, D. Erdemir, A. Y. Lee), Cambridge University Press 2019
- [Kelly 1995] Kelly, S. T., Zydney, A. L. (1995): *Mechanisms for BSA fouling during microfiltration*, *Journal of Membrane Science*, 107 (1-2), 115–127, DOI: 10.1016/0376-7388(95)00108-O
- [Kimiz-Gebologlu 2018] Kimiz-Gebologlu, I., Gulce-Iz, S., Biray-Avci, C. (2018): *Monoclonal antibodies in cancer immunotherapy*, *Molecular*

- biology reports*, 45 (6), 2935–2940, DOI: 10.1007/s11033-018-4427-x
- [Knoell 1999] Knoell, T. (1999): *Biofouling potentials of microporous polysulfone membranes containing a sulfonated polyethersulfone/polyethersulfone block copolymer: correlation of membrane surface properties with bacterial attachment*, *Journal of Membrane Science*, 157 (1), 117–138, DOI: 10.1016/S0376-7388(98)00365-2
- [Köhler 1975] Köhler, G., Milstein, C. (1975): *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*, *Nature*, 256 (5517), 495–497, DOI: 10.1038/256495a0
- [Kornecki 2018] Kornecki, M., Strube, J. (2018): *Process Analytical Technology for Advanced Process Control in Biologics Manufacturing with the Aid of Macroscopic Kinetic Modeling*, *Bioengineering (Basel, Switzerland)*, 5 (1), DOI: 10.3390/bioengineering5010025
- [Kornecki 2019a] Kornecki, M., Strube, J. (2019): *Accelerating Biologics Manufacturing by Upstream Process Modelling*, *Processes*, 7 (3), 166, DOI: 10.3390/pr7030166
- [Kornecki 2019b] Kornecki, M. L. (2019): *Methoden zur Integration von Upstream und Downstream Processing für Biologics hinsichtlich Prozessentwicklung, Digital Twin und Process Analytical Technology*, *Thermische Verfahrens- und Prozesstechnik*
- [Korz 1995] Korz, D. J., Rinas, U., Hellmuth, K., Sanders, E. A., Deckwer, W.-D. (1995): *Simple fed-batch technique for high*

- cell density cultivation of Escherichia coli, Journal of biotechnology, 39 (1), 59–65, DOI: 10.1016/0168-1656(94)00143-Z*
- [Kotsovilis 2014] Kotsovilis, S., Andreakos, E. (2014): *Therapeutic human monoclonal antibodies in inflammatory diseases, Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 1060, 37–59, DOI: 10.1007/978-1-62703-586-6\_3*
- [Kraume 2020] Kraume, M. (2020): *Transportvorgänge in der Verfahrenstechnik, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg*
- [Kumar 2021] Kumar, S., Chandele, A., Sharma, A. (2021): *Current status of therapeutic monoclonal antibodies against SARS-CoV-2, PLoS pathogens, 17 (9), e1009885, DOI: 10.1371/journal.ppat.1009885*
- [Kunz 2004] Kunz, W., Henle, J., Ninham, B. W. (2004): *‘Zur Lehre von der Wirkung der Salze’ (about the science of the effect of salts): Franz Hofmeister’s historical papers, Current Opinion in Colloid & Interface Science, 9 (1-2), 19–37, DOI: 10.1016/j.cocis.2004.05.005*
- [Lain 2010] Lain, B., Zarbis-Papastoitsis, G., Kuczewski, M., Schirmer, E. (2010): *PEG precipitation: A powerful tool for Monoclonal Antibody Purification, 2010 (3), DOI:*
- [Laurent 1963] Laurent, T. C., Ogston, A. G. (1963): *THE INTERACTION BETWEEN POLYSACCHARIDES AND OTHER MACROMOLECULES. 4. THE OSMOTIC PRESSURE OF MIXTURES OF SERUM ALBUMIN AND HYALURONIC ACID, The Biochemical journal, 89, 249–253, DOI: 10.1042/bj0890249*

- [Lévêque 1928] Lévêque, A. (1928): *Les lois de la transmission de chaleur par convection par André Lévêque*, DOI:
- [Li 2019] Li, Z., Gu, Q., Coffman, J. L., Przybycien, T., Zydney, A. L. (2019): *Continuous precipitation for monoclonal antibody capture using countercurrent washing by microfiltration*, *Biotechnology progress*, e2886, DOI: 10.1002/btpr.2886
- [Li 2020] Li, Z., Chen, T.-H., Andini, E., Coffman, J. L., Przybycien, T., Zydney, A. L. (2020): *Enhanced Filtration Performance Using Feed-and-Bleed Configuration for Purification of Antibody Precipitates*, *Biotechnology progress*, DOI: 10.1002/btpr.3082
- [Lohmann 2020] Lohmann, L. J., Strube, J. (2020): *Accelerating Biologics Manufacturing by Modeling: Process Integration of Precipitation in mAb Downstream Processing*, *Processes*, 8 (1), 58, DOI: 10.3390/pr8010058
- [Lohmann 2021] Lohmann, L. J., Strube, J. (2021): *Process Analytical Technology for Precipitation Process Integration into Biologics Manufacturing towards Autonomous Operation – mAb Case Study*, *Processes*, 9 (3), 488, DOI: 10.3390/pr9030488
- [Long, W., Agilent Technologies, Inc.] Long, W., Agilent Technologies, Inc.: *Automated Amino Acid Analysis Using an Agilent Poroshell HPH-C18 Column* <<https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-5571EN.pdf>> (07.03.2022)
- [Lottspeich 2006] Lottspeich, F., Engels, J. W. (2006): *Bioanalytik*. 2. Aufl., aktualisierte u. erw. Neuaufl., SAV Biowissenschaften, Spektrum, München, Heidelberg

- [Matheus 2009] Matheus, S., Friess, W., Schwartz, D., Mahler, H.-C. (2009): *Liquid high concentration IgG1 antibody formulations by precipitation*, *Journal of pharmaceutical sciences*, 98 (9), 3043–3057, DOI: 10.1002/jps.21526
- [McRee 1999] McRee, D. E., MacRee, D. E. (1999): *Practical protein crystallography*. 2. ed., Academic Press, San Diego, Calif.
- [Mehren 2003] Mehren, M. von, Adams, G. P., Weiner, L. M. (2003): *Monoclonal antibody therapy for cancer*, *Annual review of medicine*, 54, 343–369, DOI: 10.1146/annurev.med.54.101601.152442
- [Mehta 2005] Mehta, A., Zydney, A. L. (2005): *Permeability and selectivity analysis for ultrafiltration membranes*, *Journal of Membrane Science*, 249 (1-2), 245–249, DOI: 10.1016/j.memsci.2004.09.040
- [Melander 1977] Melander, W., Horváth, C. (1977): *Salt effects on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: An interpretation of the lyotropic series*, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 183 (1), 200–215, DOI: 10.1016/0003-9861(77)90434-9
- [Melin 2007] Melin, T., Rautenbach, R. (2007): *Membranverfahren, Grundlagen der Modul- und Anlagenauslegung ; mit 76 Tabellen*. 3., aktualisierte und erw. Aufl., Engineering online library, Springer, Berlin, Heidelberg
- [Mersmann 2002] Mersmann, A., Braun, B., Löffelmann, M. (2002): *Prediction of crystallization coefficients of the population balance*, *Chemical Engineering Science*, 57 (20), 4267–4275, DOI: 10.1016/S0009-2509(02)00343-3



- [Meyer-Kirschner 2016] Meyer-Kirschner, J., Kather, M., Pich, A., Engel, D., Marquardt, W., Viell, J., Mitsos, A. (2016): *In-line Monitoring of Monomer and Polymer Content During Microgel Synthesis Using Precipitation Polymerization via Raman Spectroscopy and Indirect Hard Modeling*, *Applied spectroscopy*, 70 (3), 416–426, DOI: 10.1177/0003702815626663
- [Miller 2013] Miller, D. J., Paul, D. R., Freeman, B. D. (2013): *A cross-flow filtration system for constant permeate flux membrane fouling characterization*, *The Review of scientific instruments*, 84 (3), 35003, DOI: 10.1063/1.4794909
- [Mochizuki 1993] Mochizuki, S., Zydney, A. L. (1993): *Theoretical analysis of pore size distribution effects on membrane transport*, *Journal of Membrane Science*, 82 (3), 211–227, DOI: 10.1016/0376-7388(93)85186-Z
- [Moore-Kelly 2019] Moore-Kelly, C., Welsh, J., Rodger, A., Dafforn, T. R., Thomas, O. R. T. (2019): *Automated High-Throughput Capillary Circular Dichroism and Intrinsic Fluorescence Spectroscopy for Rapid Determination of Protein Structure*, *Analytical chemistry*, 91 (21), 13794–13802, DOI: 10.1021/acs.analchem.9b03259
- [Odijk 1997] Odijk, T. (1997): *Depletion around a Protein Sphere Interacting with a Semidilute Polymer Solution*, *Langmuir*, 13 (13), 3579–3581, DOI: 10.1021/la962109j
- [Odijk 2009] Odijk, T. (2009): *Depletion theory and the precipitation of protein by polymer*, *The journal of physical chemistry. B*, 113 (12), 3941–3946, DOI: 10.1021/jp806722j

- [Oelmeier 2012] Oelmeier, S. A., Dismer, F., Hubbuch, J. (2012): *Molecular dynamics simulations on aqueous two-phase systems - Single PEG-molecules in solution*, *BMC biophysics*, 5, 14, DOI: 10.1186/2046-1682-5-14
- [Oelmeier 2013] Oelmeier, S. A., Ladd-Effio, C., Hubbuch, J. (2013): *Alternative separation steps for monoclonal antibody purification: combination of centrifugal partitioning chromatography and precipitation*, *Journal of chromatography. A*, 1319, 118–126, DOI: 10.1016/j.chroma.2013.10.043
- [Ogston 1958] Ogston, A. G. (1958): *The spaces in a uniform random suspension of fibres*, *Trans. Faraday Soc.*, 54, 1754, DOI: 10.1039/TF9585401754
- [Ogston 1973] Ogston, A. G., Prestopn, B. N., Wells, J. D. (1973): *On the transport of compact particles through solutions of chain-polymers*, *Proc. R. Soc. Lond. A*, 333 (1594), 297–316, DOI: 10.1098/rspa.1973.0064
- [Ohlrogge 2005] Ohlrogge, K., Ebert, K. (2005): *Membranen, Grundlagen, Verfahren und industrielle Anwendungen*, WILEY-VCH, Weinheim
- [Palacio 2002] Palacio, L., Ho, C.-C., Zydney, A. L. (2002): *Application of a pore-blockage--cake-filtration model to protein fouling during microfiltration*, *Biotechnol. Bioeng.*, 79 (3), 260–270, DOI: 10.1002/bit.10283
- [Parkkinen 2006] Parkkinen, J., Rahola, A., Bonsdorff, L. von, Tölö, H., Törmä, E. (2006): *A modified caprylic acid method for manufacturing immunoglobulin G from human plasma with high*

- yield and efficient virus clearance, Vox sanguinis, 90 (2), 97–104, DOI: 10.1111/j.1423-0410.2005.00731.x*
- [Polson 1977] Polson, A. (1977): *A theory for the displacement of proteins and viruses with polyethylene glycol, Preparative biochemistry, 7 (2), 129–154, DOI: 10.1080/00327487708061631*
- [Polyakov 2013] Polyakov, Y. S., Zydney, A. L. (2013): *Ultrafiltration membrane performance: Effects of pore blockage/constriction, Journal of Membrane Science, 434, 106–120, DOI: 10.1016/j.memsci.2013.01.052*
- [Posner 2019] Posner, J., Barrington, P., Brier, T., Datta-Mannan, A. (2019): *Monoclonal Antibodies: Past, Present and Future, Handbook of experimental pharmacology, 260, 81–141, DOI: 10.1007/164\_2019\_323*
- [Pradanos 1992] Pradanos, P., Arribas, J. I., Hernandez, A. (1992): *Hydraulic Permeability, Mass Transfer, and Retention of PEGs in Cross-flow Ultrafiltration through a Symmetric Microporous Membrane, Separation Science and Technology, 27 (15), 2121–2142, DOI: 10.1080/01496399208019470*
- [Repligen 2022] Repligen: *Fasereigenschaften* <<https://www.repligen.com/technologies/spectrum-hollow-fibers/hollow-fiber-membranes>>
- [Riesenberg 1991] Riesenberg, D. (1991): *High-cell-density cultivation of Escherichia coli, Current Opinion in Biotechnology, 2 (3), 380–384, DOI: 10.1016/S0958-1669(05)80142-9*
- [Ripperger 1992] Ripperger, S. (1992): *Mikrofiltration mit Membranen, Grundlagen, Verfahren, Anwendungen. 1. Aufl., VCH, Weinheim*
-

- [Ripperger 1993] Ripperger, S. (1993): *Berechnungsansätze zur Crossflow-Filtration*, *Chemie Ingenieur Technik*, 65 (5), 533–540, DOI: 10.1002/cite.330650506
- [Roland 2010] Roland, M. (2010): *Numerische Simulation von Fällungsprozessen mittels Populationsbilanzen*. Dissertation, Universität des Saarlandes
- [Ruckenstein 2006] Ruckenstein, E., Shulgin, I. L. (2006): *Effect of salts and organic additives on the solubility of proteins in aqueous solutions*, *Advances in colloid and interface science*, 123-126, 97–103, DOI: 10.1016/j.cis.2006.05.018
- [Salis 2014] Salis, A., Ninham, B. W. (2014): *Models and mechanisms of Hofmeister effects in electrolyte solutions, and colloid and protein systems revisited*, *Chemical Society reviews*, 43 (21), 7358–7377, DOI: 10.1039/c4cs00144c
- [Sampath 2014] Sampath, M., Shukla, A., Rathore, A. S. (2014): *Modeling of Filtration Processes-Microfiltration and Depth Filtration for Harvest of a Therapeutic Protein Expressed in Pichia pastoris at Constant Pressure*, *Bioengineering (Basel, Switzerland)*, 1 (4), 260–277, DOI: 10.3390/bioengineering1040260
- [Satzler 2020] Satzler, P., Burgstaller, D., Krepper, W., Jungbauer, A. (2020): *Fractal dimension of antibody-PEG precipitate: Light microscopy for the reconstruction of 3D precipitate structures*, *Engineering in life sciences*, 20 (3-4), 67–78, DOI: 10.1002/elsc.201900110
- [Sauer 2019] Sauer, D. G., Melcher, M., Mosor, M., Walch, N., Berkemeyer, M., Scharl-Hirsch, T., Leisch, F., Jungbauer, A.,

- Dürauer, A. (2019): *Real-time monitoring and model-based prediction of purity and quantity during a chromatographic capture of fibroblast growth factor 2*, *Biotechnol. Bioeng.*, 116 (8), 1999–2009, DOI: 10.1002/bit.26984
- [Schmid 2016] Schmid, R. D. (2016): *Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik*. Dritte Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, Weinheim
- [Schmidt 2017] Schmidt, A., Richter, M., Rudolph, F., Strube, J. (2017): *Integration of Aqueous Two-Phase Extraction as Cell Harvest and Capture Operation in the Manufacturing Process of Monoclonal Antibodies*, *Antibodies (Basel, Switzerland)*, 6 (4), DOI: 10.3390/antib6040021
- [Schmidt 2018] Schmidt, A., Strube, J. (2018): *Application and Fundamentals of Liquid-Liquid Extraction Processes: Purification of Biologicals, Botanicals, and Strategic Metals*
- [Schmok 1988] Schmok, K. (1988): *Modelling of mechanism of agglomeration of KCl crystallization*, *Cryst. Res. Technol.*, 23 (8), 967–972, DOI: 10.1002/crat.2170230803
- [Schöll 2007] Schöll, J., Lindenberg, C., Vicum, L., Brozio, J., Mazzotti, M. (2007): *Precipitation of alpha L-glutamic acid: determination of growth kinetics*, *Faraday discussions*, 136, 247-64; discussion 309-28, DOI: 10.1039/B616285A
- [Scopes 1994] Scopes, R. K. (1994): *Protein purification, Principles and practice*. 3. ed., Springer advanced texts in chemistry, Springer, New York, Berlin, Heidelberg

- [Segets 2012] Segets, D., Hartig, M. A., Gradl, J., Peukert, W. (2012): *A population balance model of quantum dot formation: Oriented growth and ripening of ZnO*, *Chemical Engineering Science*, 70, 4–13, DOI: 10.1016/j.ces.2011.04.043
- [Sellick 2010] Sellick, C. A., Hansen, R., Jarvis, R. M., Maqsood, A. R., Stephens, G. M., Dickson, A. J., Goodacre, R. (2010): *Rapid monitoring of recombinant antibody production by mammalian cell cultures using fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics*, *Biotechnol. Bioeng.*, 106 (3), 432–442, DOI: 10.1002/bit.22707
- [Siddiqui 2016] Siddiqui, M. U., Arif, A. F. M., Bashmal, S. (2016): *Permeability-Selectivity Analysis of Microfiltration and Ultrafiltration Membranes: Effect of Pore Size and Shape Distribution and Membrane Stretching*, *Membranes*, 6 (3), DOI: 10.3390/membranes6030040
- [Sim 2012] Sim, S.-L., He, T., Tscheliessnig, A., Mueller, M., Tan, R. B. H., Jungbauer, A. (2012): *Protein precipitation by polyethylene glycol: a generalized model based on hydrodynamic radius*, *Journal of biotechnology*, 157 (2), 315–319, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2011.09.028
- [Singh 2018] Singh, S., Kumar, N. K., Dwiwedi, P., Charan, J., Kaur, R., Sidhu, P., Chugh, V. K. (2018): *Monoclonal Antibodies: A Review*, *Current clinical pharmacology*, 13 (2), 85–99, DOI: 10.2174/1574884712666170809124728
- [Sirivat 2014] Sirivat, A., Petcharoen, K., Pornchaisiriarun, Y., Phansa-Ard, C., Tangboriboon, N. (2014): *Lead zirconate*

- (*PbZrO<sub>3</sub>*) embedded in natural rubber as electroactive elastomer composites, *J. Innov. Opt. Health Sci.*, 07 (06), 1450016, DOI: 10.1142/S1793545814500163
- [Sixt 2018] Sixt, M., Uhlenbrock, L., Strube, J. (2018): *Toward a Distinct and Quantitative Validation Method for Predictive Process Modelling—On the Example of Solid-Liquid Extraction Processes of Complex Plant Extracts*, *Processes*, 6 (6), 66, DOI: 10.3390/pr6060066
- [Sommer 2014] Sommer, R., Satzer, P., Tscheliessnig, A., Schulz, H., Helk, B., Jungbauer, A. (2014): *Combined polyethylene glycol and CaCl<sub>2</sub> precipitation for the capture and purification of recombinant antibodies*, *Process Biochemistry*, 49 (11), 2001–2009, DOI: 10.1016/j.procbio.2014.07.012
- [Song 1995] Song, L., Elimelech, M. (1995): *Theory of concentration polarization in crossflow filtration*, *Faraday Trans.*, 91 (19), 3389, DOI: 10.1039/FT9959103389
- [Subramani 2003] Subramani, H. J., Hidajat, K., Ray, A. K. (2003): *Optimization of reactive SMB and Varicol systems*, *Computers & Chemical Engineering*, 27 (12), 1883–1901, DOI: 10.1016/S0098-1354(03)00159-5
- [Subramanian 2017] Subramanian, G. (2017): *Continuous Biomanufacturing, Innovative Technologies and Methods*, John Wiley & Sons Incorporated, Newark
- [Sun 2018] Sun, Z., Wang, J., Nie, L., Li, L., Cao, D., Fan, J., Wang, H., Liu, R., Zhang, Y., Zang, H. (2018): *Calibration transfer of near infrared spectrometers for the assessment of*

- plasma ethanol precipitation process, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 181, 64–71, DOI: 10.1016/j.chemolab.2018.08.012*
- [Sun 2020] Sun, Z., Fan, J., Wang, J., Wang, F., Nie, L., Li, L., Dong, Q., Li, C., Du, R., Quan, S., Zang, H. (2020): *Assessment of the human albumin in acid precipitation process using NIRS and multi-variable selection methods combined with SPA, Journal of Molecular Structure, 1199, 126942, DOI: 10.1016/j.molstruc.2019.126942*
- [Thompson 2016] Thompson, R. W., Latypov, R. F., Wang, Y., Lomakin, A., Meyer, J. A., Vunnum, S., Benedek, G. B. (2016): *Evaluation of effects of pH and ionic strength on colloidal stability of IgG solutions by PEG-induced liquid-liquid phase separation, The Journal of chemical physics, 145 (18), 185101, DOI: 10.1063/1.4966708*
- [Tol 2010] Tol, J., Punt, C. J. A. (2010): *Monoclonal antibodies in the treatment of metastatic colorectal cancer: a review, Clinical therapeutics, 32 (3), 437–453, DOI: 10.1016/j.clinthera.2010.03.012*
- [Tsutomu Arakawa and Serge N. Timasheff 1985] Tsutomu Arakawa and Serge N. Timasheff (1985): *Mechanism of polyethylene glycol interaction with proteins, DOI:*
- [Uhlenbrock 2017] Uhlenbrock, L., Sixt, M., Strube, J. (2017): *Quality-by-Design (QbD) process evaluation for phytopharmaceuticals on the example of 10-deacetylbaicatin III from yew, Resource-Efficient Technologies, 3 (2), 137–143, DOI: 10.1016/j.refit.2017.03.001*



- [Urlaub 1980] Urlaub, G., Chasin, L. A. (1980): *Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77 (7), 4216–4220, DOI: 10.1073/pnas.77.7.4216
- [Urlaub 1983] Urlaub, G., Käs, E., Carothers, A. M., Chasin, L. A. (1983): *Deletion of the diploid dihydrofolate reductase locus from cultured mammalian cells, Cell*, 33 (2), 405–412, DOI: 10.1016/0092-8674(83)90422-1
- [Urlaub 1986] Urlaub, G., Mitchell, P. J., Kas, E., Chasin, L. A., Funanage, V. L., Myoda, T. T., Hamlin, J. (1986): *Effect of gamma rays at the dihydrofolate reductase locus: deletions and inversions, Somatic cell and molecular genetics*, 12 (6), 555–566, DOI: 10.1007/BF01671941
- [van den Berg 1990] van den Berg, G. B., Smolders, C. A. (1990): *Flux decline in ultrafiltration processes, Desalination*, 77, 101–133, DOI: 10.1016/0011-9164(90)85023-4
- [van Reis 2007] van Reis, R., Zydney, A. (2007): *Bioprocess membrane technology, Journal of Membrane Science*, 297 (1-2), 16–50, DOI: 10.1016/j.memsci.2007.02.045
- [Vetter 2021] Vetter, F. L., Zobel-Roos, S., Strube, J. (2021): *PAT for Continuous Chromatography Integrated into Continuous Manufacturing of Biologics towards Autonomous Operation, Processes*, 9 (3), 472, DOI: 10.3390/pr9030472
- [Vilker 1984] Vilker, V. L., COLTON, C. K., Smith, K. A., Green, D. L. (1984): *The osmotic pressure of concentrated protein and lipoprotein solutions and its significance to ultrafiltration,*

- Journal of Membrane Science*, 20 (1), 63–77, DOI:  
10.1016/S0376-7388(00)80723-1
- [Walther 2014] Walther, C., Mayer, S., Jungbauer, A., Dürauer, A. (2014): *Getting ready for PAT: Scale up and inline monitoring of protein refolding of Npro fusion proteins*, *Process Biochemistry*, 49 (7), 1113–1121, DOI:  
10.1016/j.procbio.2014.03.022
- [Walther 2015] Walther, J., Godawat, R., Hwang, C., Abe, Y., Sinclair, A., Konstantinov, K. (2015): *The business impact of an integrated continuous biomanufacturing platform for recombinant protein production*, *Journal of biotechnology*, 213, 3–12, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2015.05.010
- [Wang 2008] Wang, Y., Boysen, R. I., Wood, B. R., Kansiz, M., McNaughton, D., Hearn, M. T. W. (2008): *Determination of the secondary structure of proteins in different environments by FTIR-ATR spectroscopy and PLS regression*, *Biopolymers*, 89 (11), 895–905, DOI: 10.1002/bip.21022
- [Wang 2010] Wang, W., Nema, S., Teagarden, D. (2010): *Protein aggregation--pathways and influencing factors*, *International journal of pharmaceuticals*, 390 (2), 89–99, DOI:  
10.1016/j.ijpharm.2010.02.025
- [Wang 2018] Wang, W., Roberts, C. J. (2018): *Protein aggregation - Mechanisms, detection, and control*, *International journal of pharmaceuticals*, 550 (1-2), 251–268, DOI:  
10.1016/j.ijPharm.2018.08.043
- [Wijmans 1984] Wijmans, J. G., Nakao, S., Smolders, C. A. (1984): *Flux limitation in ultrafiltration: Osmotic pressure model and gel*

- layer model, Journal of Membrane Science, 20 (2), 115–124, DOI: 10.1016/S0376-7388(00)81327-7*
- [Wu 2011] Wu, H., White, M., Khan, M. A. (2011): *Quality-by-Design (QbD): An integrated process analytical technology (PAT) approach for a dynamic pharmaceutical co-precipitation process characterization and process design space development, International journal of pharmaceutics, 405 (1-2), 63–78, DOI: 10.1016/j.ijpharm.2010.11.045*
- [Wu 2012] Wu, Z., Xu, B., Du, M., Sui, C., Shi, X., Qiao, Y. (2012): *Validation of a NIR quantification method for the determination of chlorogenic acid in Lonicera japonica solution in ethanol precipitation process, Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 62, 1–6, DOI: 10.1016/j.jpba.2011.12.005*
- [Xu] Xu, B., Lin, Z., Shi, X., Qiao, Y., Du, M., Wu, Z.: *NIR Determination of Three Critical Quality Attributes in Alcohol Precipitation Process of Lonicerae Japonicae with Uncertainty Analysis, 1566–1571, DOI: 10.1109/iCBEB.2012.283*
- [Xu 2012] Xu, B., Wu, Z., Lin, Z., Sui, C., Shi, X., Qiao, Y. (2012): *NIR analysis for batch process of ethanol precipitation coupled with a new calibration model updating strategy, Analytica chimica acta, 720, 22–28, DOI: 10.1016/j.aca.2012.01.022*
- [Ye 2005] Ye, Y., Le Clech, P., Chen, V., Fane, A. G. (2005): *Evolution of fouling during crossflow filtration of model EPS solutions, Journal of Membrane Science, 264 (1-2), 190–199, DOI: 10.1016/j.memsci.2005.04.040*
-

- [Young 1980] Young, M. E., Carroad, P. A., Bell, R. L. (1980): *Estimation of diffusion coefficients of proteins*, *Biotechnol. Bioeng.*, 22 (5), 947–955, DOI: 10.1002/bit.260220504
- [Yu 2014] Yu, L. X., Amidon, G., Khan, M. A., Hoag, S. W., Polli, J., Raju, G. K., Woodcock, J. (2014): *Understanding pharmaceutical quality by design*, *The AAPS journal*, 16 (4), 771–783, DOI: 10.1208/s12248-014-9598-3
- [Zeman 1981] Zeman, L. J., WALES, M. (1981): *Polymer Solute Rejection by Ultrafiltration Membranes*, 154, 411–434, DOI: 10.1021/bk-1981-0154.ch023
- [Zeman 1996] Zeman, L. J., Zydney, A. L. (1996): *Microfiltration and ultrafiltration, Principles and applications*, Marcel Dekker, New York
- [Zhang 2006] Zhang, Y., Cremer, P. S. (2006): *Interactions between macromolecules and ions: The Hofmeister series*, *Current opinion in chemical biology*, 10 (6), 658–663, DOI: 10.1016/j.cbpa.2006.09.020
- [Zhang 2014] Zhang, X., Soori, G., Dobleman, T. J., Xiao, G. G. (2014): *The application of monoclonal antibodies in cancer diagnosis*, *Expert review of molecular diagnostics*, 14 (1), 97–106, DOI: 10.1586/14737159.2014.866039
- [Zhao 2013] Zhao, C., Xue, J., Ran, F., Sun, S. (2013): *Modification of polyethersulfone membranes – A review of methods*, *Progress in Materials Science*, 58 (1), 76–150, DOI: 10.1016/j.pmatsci.2012.07.002

- [Zobel-Roos 2017] Zobel-Roos, S., Mouellef, M., Siemers, C., Strube, J. (2017): *Process Analytical Approach towards Quality Controlled Process Automation for the Downstream of Protein Mixtures by Inline Concentration Measurements Based on Ultraviolet/Visible Light (UV/VIS) Spectral Analysis, Antibodies (Basel, Switzerland)*, 6 (4), DOI: 10.3390/antib6040024
- [Zydney 1986] Zydney, A. L., COLTON, C. K. (1986): A CONCENTRATION POLARIZATION MODEL FOR THE FILTRATE FLUX IN CROSS-FLOW MICROFILTRATION OF PARTICULATE SUSPENSIONS, *Chemical Engineering Communications*, 47 (1-3), 1–21, DOI: 10.1080/00986448608911751
- [Zydney 1997] Zydney, A. L. (1997): *Stagnant film model for concentration polarization in membrane systems*, *Journal of Membrane Science*, 130 (1-2), 275–281, DOI: 10.1016/S0376-7388(97)00006-9
- [Zydney 2021] Zydney, A. L. (2021): *New developments in membranes for bioprocessing – A review*, *Journal of Membrane Science*, 620, 118804, DOI: 10.1016/j.memsci.2020.118804

## 8. Symbolverzeichnis

### 8.1 Abkürzungen

Abkürzung	Beschreibung
ACM	Aspen Custom Modeler
APC	Advanced process control
ATPE	Aqueous two-phase extraction
CDER	Center for Drug Evaluation and research
CHO	Chinese Hamster Ovary
CQA	Critical Quality Attributes
CVM	Center for Veterinary Medicine
DAD	Dioden-Array-Detektor
DCU	Digital Control Unit
DF	Diafiltration
DoE	Design of Experiments
DSP	Downstream Processing
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMA	European Medicines Agency
EMSC	extended multiplicative scatter correction
FBRM	Fokusstrahl-Reflexionsmessung
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FMEA	Failure-Mode-Effect-Analysis
FTIR	Fourier-Transformierte Infrarotspektroskopie
Fv	Fragment variable
HCP	Host Cell Protein
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMW	High molecular weight imputities
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceutical for Human Use
IEX	Ionenaustauscher Chromatographie
IgG	Immunoglobulin G
IP	Isoelektrischer Punkt
LMW	Light molecular weight imputities
mAb	Monoclonal Antibody
ME	Mixed Cellulose Ether
MF	Mikrofiltration

---

mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
MSC	Multiplicative scatter correction
NFF	Normalflussfiltration
OPA	ortho-phthalaldehyde
ORA	Office of Regulatory Affairs
OTC	Over the counter
PAT	Process Analytical Technology
PBS	Phosphate buffered saline
PC	Principal Component
PEG	Polyethylenglykol
PES	Polyethersulfon
PLSR	Partial least squares regression
PMDA	Pharmaceuticals and Medical Devices Agency Japan
PP	Polypropylen
PS	Polysulfon
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVM	Partikel-Vision-Messung
QbD	Quality by Design
QTPP	Quality target product profile
RMSE	Root mean square error
RNP	Risc priority number
RTRT	Real-time-release testing
scFv	Single chain fragment variable
SEC	Size exclusion chromatography
SNV	Standard normal variate
TFF	Tangentialflussfiltration
TMP	Transmembrane pressure
UF	Ultrafiltration
USP	Upstream processing
VLP	Virus-like particles

## 8.2 Parameter

Parameter	Beschreibung	Einheit
a	volumenspezifische Oberfläche des Mixers	cm <sup>2</sup> /cm <sup>3</sup>
A <sub>Mem</sub>	Membranfläche	cm <sup>2</sup>
C <sub>eq</sub>	Proteinkonzentration im Gleichgewicht	mg/mL
C <sub>protein</sub>	aktuelle Proteinkonzentration	mg/mL
D <sub>ax</sub>	axialer Dispersionskoeffizient	cm <sup>2</sup> /s
d <sub>fiber</sub>	Durchmesser der Fasern	cm
h	Deckschichthöhe auf der Membran	cm

## 8. Symbolverzeichnis

J	Transmembranfluss	ml/min/cm <sup>2</sup>
K <sub>b</sub>	Konstante für vollständiges Blocking	1/s
K <sub>c</sub>	Konstante für die Kuchenfiltration	s/cm <sup>2</sup>
K <sub>i</sub>	Konstante für Intermediat Blocking	1/cm
K <sub>s</sub>	Konstante für Standard Blocking	1/cm
k <sub>diss</sub>	Kinetik Parameter der Auflösung	1/s
k <sub>prec</sub>	Kinetik Parameter der Präzipitation	1/s
l <sub>fiber</sub>	Länge der Fasern	cm
l <sub>mixer</sub>	Länge des Mixers	cm
L <sub>p</sub>	hydraulischer Permeabilität der Membran	cm/(s*pa)
M	molare Masse	g/Mol
m	Massenstrom	mg/min
n	Exponent des Verblockungsmechanismus	[-]
n <sub>fiber</sub>	Anzahl der Fasern	[-]
R	Rückhaltevermögen der Membran	[-]
r <sub>IgG</sub>	Hydrodynamischer Radius IgG	nm
R <sub>m</sub>	Membranwiderstand	1/cm
r <sub>diss</sub>	Reaktionsgeschwindigkeit der Auflösung	mg/(ml*s)
r <sub>p</sub>	Radius der Membranpore	cm
r <sub>PEG</sub>	Hydrodynamischer Radius PEG	nm
r <sub>prec</sub>	Reaktionsgeschwindigkeit der Präzipitation	mg/(ml*s)
r <sub>s</sub>	Radius der gelösten Komponente	cm
S	Proteinlöslichkeit	mg/mL
S <sub>a</sub>	Siebkoefizient	[-]
u	Strömungsgeschwindigkeit im Mischer	cm/min
V	Volumenstrom	ml/min
v	spezifisches Volumen im Filtrat	ml/cm <sup>2</sup>

Parameter	Beschreibung	Einheit
β	Präzipitationseffizienz	(mg/mL)/wt% <sub>PEG</sub>
Δ p	Druckdifferenz	Pa
δ <sub>Mem</sub>	Dicke der Membran	cm
ε <sub>Mem</sub>	Porosität der Membran	[-]
ε	Lückengrad des Mixers	[-]
η	Viskosität	Pa*s
γ̇	Scherrate an der Membran	1/s
κ	intrinsische Proteinlöslichkeit	mg/mL
ω	Gewichtsanteil PEG	[-]
ρ	Dichte	mg/cm <sup>3</sup>
τ	Schubspannung an der Membran	Pa



## 9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: Typische schematische Löslichkeitskurve für ein Protein als Funktion der Präzipitant-konzentration. --- = Löslichkeitskurve, - - - = 1. Überlöslichkeitskurve, ··· = 2. Überlöslichkeitskurve. Adaptiert von Dos Santos et al. [Dos Santos 2017].	5
Abbildung 2-2: (a) Volumenausschlusseffekt bei der Verwendung Polymeren [Aumiller 2014], (b) oben, gelöste PEG Moleküle liegen in gewundenen Ketten vor [Polson 1977], (b) unten, schematische Darstellung der sterischen Ausschlusszone von gelösten Polymeren nach [Hermans 1982].	8
Abbildung 2-3: Überblick von synthetischen Polymermembranen [Baker 2012]	14
Abbildung 2-4: Übersicht der Abtrennung von Molekülen, die häufig in der Bioprozesstechnik anfallen (Adaptiert nach [van Reis 2007]).	16
Abbildung 2-5: Schematische Darstellung der (a) Normalflussfiltration und der (b) Tangentialfluss-filtration [Zeman 1996].	18
Abbildung 2-6: Schematische Darstellung der möglichen Prozessführungen einer TFF Membran (adaptiert nach [Zeman 1996]).	18
Abbildung 2-7: Übersicht der verfügbaren Bauformen von Membranmodulen (adaptiert nach [Melin 2007]).	20
Abbildung 2-8: Schematische Darstellung (a) Aufbaus sowie (b) der möglichen Betriebsweisen eines Hohlfaser- bzw. Kapillarmoduls (adaptiert von [Melin 2007]).	21
Abbildung 2-9: (a) schematische Darstellung des Strömungsprofils in einem Rohr und der sich ausbildenden laminaren Grenzschicht $\delta$ . (b) zeigt die Konzentrationspolarisation an der Membran abgeleitet durch die Filmtheorie (adaptiert von [Baker 2004]).	24
Abbildung 2-10: Schematische Darstellung der Verblockungsmechanismen von Membranen. (a) Vollständiges Blocking, (b) Standard Blocking, (c) Intermediate Blocking und (d) Kuchenbildung.	33
Abbildung 2-11: Quality by Design Workflow als Ansatz zur Sicherstellung des Qualitätsprofils während der Entwicklung des Prozesses [Uhlenbrock 2017]. Der rot umrandete Modell-Validierungs-Workflow basiert auf der Arbeit von Sixt et al. [Sixt 2018] und wird im späteren Verlauf detailliert erläutert.	35

## 9. Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 2-12: Aufbau eines Immunglobulins des Typs IgG 1 [Clark 2009]. .....	38
Abbildung 2-13: Mögliche sc-Fragmente abgeleitet von einem Immunglobulin Typ IgG. Bis-scFv (orange) verfügen über unterschiedliche variable Regionen um zwei Epitope zu erkennen. Adaptiert nach [Holliger 2005].....	39
Abbildung 3-1: Beispielhafte Streuungseffektdiagramme [Lohmann 2021]: (a) zeigt additive Effekte, (b) Streuungseffekte, (c) eine Kombination aus additiven und Streuungseffekten und (d) zeigt komplexe Effekte [Esbensen 2018]. .....	50
Abbildung 4-1: Benchmark Prozess zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern im Vergleich zu dem entwickelten Alternativprozess.....	52
Abbildung 4-2: Mikroskop Aufnahmen der Präzipitate. (a) zeigt eine 10-fache Vergrößerung und (b) eine 50-fache Vergrößerung. Die Durchmesser der Präzipitate und der Agglomerate liegen zwischen 20 – 100 µm [Lohmann 2021]. .....	54
Abbildung 4-3: Nachweis der erhaltenen Biologischen Aktivität des Antikörpers.....	56
Abbildung 4-4: Vereinfachte Darstellung des absatzweisen Präzipitationsprozess.....	57
Abbildung 4-5: SEC Chromatogramm von Feed (grau) und dem Produkt nach der Grundoperation „Präzipitation“ . .....	58
Abbildung 4-6: Halbkontinuierlicher Präzipitationsprozess für monoklonale Antikörper ....	59
Abbildung 4-7: Kontinuierlicher Präzipitationsprozess. ....	62
Abbildung 4-8: SEC-Chromatogramm von (a) Feed und Produkt. (b) zeigt den Vergleich von Feed zu den Permeatbehältern 1 und 2. Es ist zu berücksichtigen, dass das Produkt mit dem Faktor 1,5 verdünnt ist.....	63
Abbildung 4-9: (a) Ishikawa Diagramm mit den potentiellen Einflussgrößen, die zu einer unzureichenden Ausbeute, Reinheit oder Prozessierbarkeit führen können. (b) zeigt das Ergebnis der Fehlermöglichkeits- und Einflussanalyse [Lohmann 2020]. .....	65
Abbildung 4-10: Screening zur Bestimmung des Präzipitationsmittels. (a) zeigen die Löslichkeitskurven des Antikörpers und (b) zeigt die der Nebenkomponenten [Lohmann 2020].....	66
Abbildung 4-11: Temperatureinfluss als Risikofaktor in der Prozessentwicklung. (a) Darstellung des SEC-Chromatogramms der Leichten Phase (Feed) bei 25 °C und der Veränderung der Löslichkeit bei 10°C und 4°C. (b) aufgelöste Präzipitate in PBS- Puffer bei pH = 7.4. ....	67

Abbildung 4-12: (a) Partikelanzahl- und der (b) mittlere Feret Durchmesser während der Präzipitation.....	68
Abbildung 4-13: SEC Chromatogramm des Überstandes im Vergleich zum Feed. ....	69
Abbildung 4-14: Vergleich des vorhandenen Nebenkomponenten mit und ohne Waschschrift. (a) zeigt das Produkt der Präzipitation ohne zusätzliches Waschen. (b) Präzipitationsprodukt mit Waschschrift.....	70
Abbildung 4-15: Gleichgewichtskonzentration des Antikörpers bei zunehmenden PEG Anteil (schwarz). Antikörperkonzentration in der Leichten Phase in Abhängigkeit des PEG Anteils (rot). Das Blaue Fenster gibt den Betriebsbereich an [Lohmann 2021]......	73
Abbildung 4-16: Ausbeutezuwachs während des Auflösungsprozesses [Lohmann 2020]. ....	74
Abbildung 4-17: One-Parameter Studie der Modellparameter in den Mischern. (a) stellt Mischer 1 in dem die Präzipitation stattfindet, (b) Mischer 2, in dem das Waschen der Präzipitate und (c) Mischer 3 in dem die Auflösung stattfindet. ....	79
Abbildung 4-18: Einfluss des PEG Anteils auf die Präzipitation (a) und die Dissolution (b). 80	
Abbildung 4-19: One-Parameter Studie der Modellparameter, welche die Filtration beeinflussen. (a) zeigt den Transmembrandruck im ersten Hohlfasermodule und (b) den im zweiten.....	82
Abbildung 4-20: Diagramm zur Beurteilung der Güte des statistischen Modells unter Angabe von RMSE, Bestimmtheitsmaß und p-Wert. (a) zeigt die Auswertung für die Zielgröße Ausbeute und (b) für die Zielgröße Reinheit. ....	85
Abbildung 4-21: Bewertung der studentisierten Residuen für (a) die Ausbeute und (b) die Reinheit. Extern studentisierte Residuen mit 95% simultanen Bonferroni-Grenzen in Rot, Einzelwertgrenzen durch die Fehlerrechnung in Grün.....	85
Abbildung 4-22: Pareto Diagramme zur Visualisierung der gewichteten Signifikanz der einzelnen untersuchten Modell- und Betriebsparameter. (a) zeigt das Pareto Diagramm für die Zielgröße Ausbeute, (b) für die Reinheit, (c) für den im Produkt zurückbleibenden Anteil an PEG und (d-e) die signifikanten Parameter für die Transmembrandrucke in den Hohlfasermodule 1 und 2. ....	88
Abbildung 4-23: (a) Erklärte Varianz durch Faktoren und (b) der Korrelation Loadings Plot, welcher die Zusammenhänge von Ein- und Ausgangsgrößen visualisiert. ....	90

## 9. Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 4-24: Gleichgewichtskurve zur Bestimmung der Präzipitationsparameter. (a) prozentuale Löslichkeit über dem PEG Anteil. (b) logarithmierte Konzentration der Zielkomponente über dem Stoffmengenverhältnis von Präzipitant (PEG 4000) zu Protein...	93
Abbildung 4-25: kontinuierliche Zugabe des Präzipitanten über eine Pumpe mit definierten Volumenstrom. ....	94
Abbildung 4-26: Verlauf der (a) Leitfähigkeit und der (b) während eines Batch Präzipitationsexperiments. ....	95
Abbildung 4-27: Bestimmung des Kinetik Parameters während der Auflösung. ....	96
Abbildung 4-28: Identifikation des Verblockungsmechanismus im ersten Hohlfasermodule (PES Membran 0,2 $\mu\text{m}$ / A=88cm <sup>2</sup> / L=20 cm/ Repligen). ....	98
Abbildung 4-29: Identifikation des Verblockungsmechanismus im zweiten Hohlfasermodule (PES Membran 0,2 $\mu\text{m}$ / A=88cm <sup>2</sup> / L=20 cm/ Repligen). ....	99
Abbildung 4-30: Aufteilung des Versuches in zwei Teile. Teil I ist mit einem gelben Rahmen und Teil II mit einem Rahmen in Blau gekennzeichnet. Beide Versuchsteile werden nacheinander durchgeführt. ....	101
Abbildung 4-31: Paritätsdiagramme zum Vergleich von Simulation und Experiment der Qualitätsattribute Ausbeute und Reinheit der Zielkomponente.....	103
Abbildung 4-32 Paritätsdiagramme von Experiment und Simulation zum Vergleich verbrauchten Masse der Ströme die in den Prozess eintreten. Die Fehlerbalken resultieren aus den Centerpoint Experimenten, die nur zum Teil sichtbar sind, da die Messabweichungen in den Experimenten sehr gering gewesen ist. ....	104
Abbildung 4-33: Paritätsdiagramme von Experiment und Simulation zum Vergleich der austretenden Ströme .....	104
Abbildung 4-34: Konturplots für Ausbeute, Reinheit und dem PEG Anteil im Produkt. ....	105
Abbildung 4-35: Vereinfachte Darstellung einer Untereinheit des absatzweisen Präzipitationsprozesses mit integrierter Messtechnik. ....	108
Abbildung 4-36: Spektren von FTIR, Raman und DAD während der Präzipitation [Lohmann 2021].....	110
Abbildung 4-37: Spektren während der Auflösung der Präzipitate [Lohmann 2021]. ....	111
Abbildung 4-38: Verläufe der (a) Trübung, (b) Leitfähigkeit während der Präzipitation. ....	114
Abbildung 4-39: Darstellung des absatzweisen Prozesses. ....	115

Abbildung 4-40 Vereinfachte Darstellung der Prozesskontrollstrategie.....	116
Abbildung 4-41: Simulationsergebnisse der APC-Studie von Szenario 1 [Lohmann 2021]. .	118
Abbildung 4-42: Simulationsergebnisse für Szenario 2. (a) Prozess ohne APC gezeigt und (b) mit eingreifender Regelung [Lohmann 2021].....	119
Abbildung 5-1: Aufreinigungsprozess für die Antikörperfragmente. ....	122
Abbildung 5-2: Löslichkeitskurven der Antikörperfragmente (Schwarz) und der Nebenkompenten (rot). Es sind die Gleichgewichtskurven für (a) PEG 8000 und in (b) für PEG 12000 gezeigt. ....	122
Abbildung 5-3: Prozess zur Fällung der Antikörper Fragmente.....	123
Abbildung 5-4: Löslichkeitskurven der Fragmente ( ) und der Nebenkompenten ( ). ..	125
Abbildung 5-5: Bestimmung der Präzipitationskinetik mit Hilfe von (a) Leitfähigkeit und (b) Trübung .....	126
Abbildung 5-6: Identifikation des Verblockungsmechanismus im Hohlfasermodule des Prozesses zu Reinigung von scFv-Fragmenten (Modul: PES-Membran 0,2 µm / A=88cm <sup>2</sup> / L=20 cm/ Repligen).....	126
Abbildung 5-7: Simulationsergebnis der Zielgrößen Ausbeute und Reinheit der Experimente mit den Antikörperfragmenten im Vergleich zu den offline gemessenen Daten. ....	127
Abbildung 5-8: Simulationsergebnisse im Vergleich zu den experimentell gemessenen Daten für die Massen der ein- und austretenden Ströme. ....	128
Abbildung 5-9: Vergleich des Transmembrandrucks während des Prozesses. ....	129
Abbildung 5-10: Veränderter Aufreinigungsprozess für die scFv-Fragmente.....	130
Abbildung 5-11: Gleichgewichtskurve der scFvs (schwarz) und der Nebenkompenten (rot) mit dem Feed aus der UF/DF. Die Präzipitation ist nach der UF/DF nicht mehr selektiv. ...	130
Abbildung 11-1: Fließbild des halbkontinuierlichen Prozesses inklusive der Onlinemesstechnik. Abkürzungen: MFC = Massenfluss; Cond = Leitfähigkeitssonde; Turb = Trübungssonde; R = Raman; FTIR = Fourier-transformierte Infrarot Spektroskopie; P = Drucksensor; L = Levelsensor. ....	177

## 10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Vergleich der Prozesskonfigurationen in Bezug auf die Membranfläche und die Verweilzeit [Zeman 1996].....	20
Tabelle 2-2: Korrelationen zur Bestimmung des Massentransfer Koeffizienten aus der Literatur [Cheryan 1998, Zeman 1996].....	28
Tabelle 2-3: Übersicht der mathematischen Beschreibung der gängigen vier Verblockungsmechanismen von Membranen [Iritani 2016]. ....	34
Tabelle 4-1: Verteilung des mittleren Feret Durchmesser während der absatzweisen Präzipitation.....	55
Tabelle 4-2: statistische Auswertung der Effekte von Ionenstärke und pH-Wert auf die Ausbeute.....	72
Tabelle 4-3: Relevante Modellparameter für die statischen Mischer.....	78
Tabelle 4-4: Relevante Modellparameter für die Filtration mit Hohlfasermodule.....	81
Tabelle 4-5: Betriebsparameter für die Multiparameter -Studie.....	84
Tabelle 4-6: Effektzusammenfassung der Modellparameter auf das Ergebnis der Zielgröße Ausbeute.....	86
Tabelle 4-7: Effektzusammenfassung der Modellparameter auf das Ergebnis der Zielgröße Reinheit.....	86
Tabelle 4-8: Ergebnisse der Modellfehlerbestimmung anhand der Monte-Carlo Simulation.	91
Tabelle 4-9: Berechnung der globalen Massenbilanz des Modells. Eintretende und austretende Ströme sind gekennzeichnet.....	100
Tabelle 4-10: Versuchsdaten zur Bestimmung Massenbilanz des Antikörpers während dem Experiment.....	101
Tabelle 4-11: Übersicht der Messparameter für FTIR, Raman, DAD und Fluoreszenz aus Literatur und Herstellern [Boulet-Audet 2016, Buckley 2017, Dziadosz 2012, Helgers 2021, JASCO Deutschland GmbH, Moore-Kelly 2019, Sauer 2019, Sellick 2010].....	107
Tabelle 11-1: Auswirkungsanalyse auf die Qualität des Produktes [Lohmann 2020].....	174
Tabelle 11-2: Ergebnis der Auswirkungsanalyse für die Präzipitation. Die Auswirkungen der Einflussgrößen sind mit No, Low, Medium oder High bewertet worden [Lohmann 2020].	175

Tabelle 11-3: Ergebnis der Auswirkungsanalyse für Rückgewinnung des monoklonalen Antikörpers durch Auflösung der Präzipitate ..... 176

## 11. Anhang

Tabelle 11-1: Auswirkungsanalyse auf die Qualität des Produktes [Lohmann 2020].

	Severity (S)	Occurance (O)	Detection (D)	Criticality (SxO)	RPN (SxOxD)	Kommentar
Zielkomponente	10	9	9	90	<b>810</b>	Gute Kontrollierbarkeit erwartet. Der Nachweis offline mittels HPLC. Online Monitoring nicht implementiert, aber notwendig, um Ausbeuteverluste zu vermeiden. <b>Parameter: Ausbeute und Reinheit</b>
Neben-komponente	9	9	9	81	<b>729</b>	Gute Kontrollierbarkeit erwartet. Monitoring offline mittels HPLC. Online Monitoring nicht implementiert, aber notwendig, um Effizienz der Anlage zu gewährleisten. <b>Parameter: Reinheit</b>
Präzipitation	9	6	9	54	<b>486</b>	Fällung => vollständig/unvollständig. Monitoring für effektive Fällung. Die biologische Aktivität muss erhalten bleiben.
Präzipitant	8	6	10	48	<b>480</b>	Geeignetes Fällungsmittel für die selektive Ausfällung. Evtl. schädlich für nachfolgenden Reinigungsschritt. Darf nicht denaturierend für Protein sein. Monitoring Online schwierig
Präzipitate/ Partikel	6	5	10	30	<b>300</b>	Die Form nicht entscheidend (Übergangszustand). Form kann Auswirkung auf Auflösung und Filtration haben. Monitoring Online schwierig
Temperatur	8	8	2	64	<b>128</b>	Gute Kontrollierbarkeit erwartet. Temperaturverschiebungen führen zu unerwünschten Kristallisationen/Ausfällungen. Monitoring online simpel.
Durch-mischung	8	6	9	48	<b>432</b>	Durchmischen ist essentiell für die Fällung. Korrektes Verhältnis zwischen Präzipitant und Protein entscheidend. Online Monitoring des Mischungszustand nicht implementiert. Im Labor geringe Auswirkungen aber im großtechnischen Maßstab relevant. <b>Parameter: Rührgeschwindigkeit, Mischzeit, Gefäßvolumen.</b>
Filtration	9	5	1	45	<b>45</b>	Partikel können Filtration erschweren. Beeinflussung durch Fluss, mAb-Konzentration und Druck. Im kleinen Maßstab weniger relevant. Besonders im großtechnischen Maßstab relevant. <b>Parameter: Filterfläche, Druck, Fluss</b>
Auflösung Präzipitate	10	9	8	90	<b>720</b>	Die Auflösung ist für die Ausbeute des mAb entscheidend. und führt zu hohen Verlusten <b>Parameter: Selektivität, Kapazität, Auflösungspufferverhältnis und Verweilzeit.</b>



Tabelle 11-2: Ergebnis der Auswirkungsanalyse für die Präzipitation. Die Auswirkungen der Einflussgrößen sind mit No, Low, Medium oder High bewertet worden [Lohmann 2020].

<b>Einflussgrößen</b>	<b>Bereich</b>	<b>Einheit</b>	<b>Reinheit (IgG)</b>	<b>Ausbeute (IgG)</b>	<b>Begründung</b>
Temperatur	4 - 25	°C	<b>No</b>	<b>No</b>	Keine Auswirkungen in diesem Bereich, daher wird das Risiko als gering eingestuft und der Prozess bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Ausfällung erfolgt bei niedrigen Temperaturen schneller, hat jedoch keine Auswirkungen auf Reinheit und Ausbeute
Mischzeit	1 - 180	min	<b>Low</b>	<b>Low</b>	Geringe Auswirkung auf Grund der kurzen der Präzipitationsdauer; Präzipitation tritt ein sobald PEG 4000 mit dem Feed Material vermischt ist. Die benötigte Mischzeit kann über die Leitfähigkeit überprüft werden
Rührerdrehzahl	200 - 400	rpm	<b>No</b>	<b>No</b>	Keine Auswirkungen im Labormaßstab, da die Fällung direkt nach der Zugabe von PEG erfolgt. Durchmischung wird in der industriellen Anwendung relevant.
Präzipitant	1450 - 12000	-	<b>High</b>	<b>High</b>	Screening von PEG Molekülen mit unterschiedlicher Kettenlänge. Aufgrund des Vorwissens wurde PEG 1450 als Ausgangspunkt gewählt.
Präzipitant Gewichtsanteil	10 - 16	wt%	<b>High</b>	<b>High</b>	kein mAb im Überstand, bei einem PEG Anteil höher als 12 wt-%; darunter konnte eine vollständige Ausfällung für PEG 4000 nicht garantiert/gesichert werden
Waschen der Präzipitate	Ja/Nein	-	<b>Medium</b>	<b>Low</b>	Waschlösungen: HEPES, Ammoniumsulfat, Natriumsulfat, PEG 4000 Verbesserte Reinheit durch Waschen, aber geringe Auswirkung auf die Wiedergewinnung von mAb aus dem Präzipitat.

## 11. Anhang

Tabelle 11-3: Ergebnis der Auswirkungsanalyse für Rückgewinnung des monoklonalen Antikörpers durch Auflösung der Präzipitate.

Einflussgrößen	Bereich	Einheit	Reinheit (IgG)	Ausbeute (IgG)	Begründung
Ionenstärke	10 - 150	mM	Low	High	Ausnutzung des Einsalzungseffekts. Bis zu einer Salzkonzentration von 100 mM, wirken Salze stabilisierend auf Proteine. Die Stabilisierung variiert mit dem verwendeten Salz. Die Salzkonzentration wirkt sich hauptsächlich auf die Ausbeute aus und gering auf die Reinheit.
pH-Wert	3 to 7	-	High	Low	Mittlere pH-Werte führen zu einer besseren Auflösung von mAb; ein niedriger pH-Wert wirkt sich positiv auf die Reinheit aber wenig auf die Ausbeute aus => gleichzeitige Auflösung von Nebenkomponenten
Auflösungs-verhältnis	1-8	-	Medium	Medium	Das Verhältnis des Auflösungsvolumens hat einen mittleren Einfluss auf die Auflösung. Die Ausbeute an gelöstem IgG ist höher, wenn der Konzentrationsgradient größer ist. Die Reinheit ist im Vergleich zum Volumenverhältnis umgekehrt proportional.
Auflösungszyklus	1-10	-	Medium	Medium	Die Kapazität des Puffers ist wichtig. Für die Auflösung ist ein Konzentrationsgradient erforderlich.



# Lebenslauf

---

---

## Persönliche Daten:

Name: Lara Julia Lohmann  
Geburtsdatum: 11.11.1990  
Geburtsort: Herdecke

---

## Berufserfahrung:

05/2022 - Heute Sartorius Stedim Biotech GmbH  
Scientist/ Process Engineer  
  
07/2018 – 08/2021 Institut für Thermische Verfahrens- und Prozesstechnik  
Technische Universität Clausthal  
Wissenschaftliche Mitarbeiterin

---

## Schulischer/ akademischer Werdegang:

05/2015 – 03/2018 Masterstudium: Chemieingenieurwesen/Verfahrenstechnik  
  
Titel der Masterarbeit:  
„Entwicklung der systematischen Integration von Upstream und  
Downstream Processing von monoklonalen Antikörpern.“  
  
10/2011 – 05/2015 Bachelorstudium: Chemieingenieurwesen/Verfahrenstechnik  
  
Titel der Bachelorarbeit:  
„Plasmaelektrochemische Funktionalisierung von Kohlenstoff-  
nanoröhrchen mit Kupfer.“  
  
07/2010 – 09/2011 Aupair Aufenthalt in Avon, Colorado, USA  
  
08/2001 – 07/2010 Gymnasium Holthausen  
Abitur

---

## Praktikum:

02/2015 – 05/2015 Novartis AG  
Fabrikstrasse 2, 4056 Basel, Schweiz  
Fachpraktikum

---