

Quantitative Analyse der Proteinadsorption an  
Primärpackmittel  
-unter Verwendung von statistischer  
Versuchsplanung-

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der  
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Julia Rager  
aus Augsburg

2013

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Johannes Peter Surmann vom Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin in der Abteilung Special Technologies & Application Systems der Bayer Pharma AG angefertigt und vor Ort von Herrn Dr. Jörg Zürcher betreut.

1. Gutachter: Prof. Dr. Johannes Peter Surmann

2. Gutachter: Prof. Dr. Maria Kristina Parr

Disputation am: 15.05.2013

*“The task of the scientist is not just to see what nobody has yet seen. It is also to see what everybody has seen and to think what nobody has thought.”*

Arthur Schopenhauer

## Danksagung

Herrn Professor Dr. Johannes Peter Surmann gilt mein besonderer Dank für die Annahme des Promotionsthemas, die fachliche Betreuung sowie die anregenden wissenschaftlichen Diskussionen und Ratschläge.

Frau Professor Dr. Maria Kristina Paar danke ich für die freundliche Übernahme und Anfertigung des Zweitgutachtens.

In großem Maße möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Jörg Zürcher für die Überlassung dieses spannenden Themas, die immerwährende engagierte Betreuung sowie die Diskussionsbereitschaft bedanken. Danke auch für die stets aufbauenden und motivierenden Worte und das Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit.

Bei Herrn Georg Lautner sowie Herrn Dr. Heiko Kranz bedanke ich mich für die großzügige Unterstützung bei Bereitstellung aller erforderlichen Arbeitsmaterialien.

Bei Herrn Dr. Klaus Gerbling und Herrn Dr. Michael Pfeffer der analytischen Entwicklungsabteilungen PL1 und PL2 möchte ich mich für die Bereitstellung und die ermöglichte Mitbenutzung der Laborgerätschaften bedanken. Weiterhin danke ich Herrn Jürgen Scholz für die wortwörtlichen „Einblicke“ in die HPLC und die Klärung aller die HPLC betreffenden Fragen.

Danke an die gesamte Abteilung Special Technologies & Application Systems für die freundliche Aufnahme in die Abteilung. Frau Christiane Lowke und Herrn Soundararajah Raj Ruban sei an dieser Stelle für die schöne gemeinsame Bürozeit gedankt, wodurch der eine oder andere Labortag viel erträglicher wurde.

Frau Dr. Waltraud Kessler von der Hochschule Reutlingen möchte ich für die Unterstützung und Hinweise bei der Anwendung der Methodik der statistischen Versuchsplanung danken.

Ferner danke ich den Firmen Schott AG und West Pharmaceutical Services für die großzügige Bereitstellung verschiedener, untersuchter Primärpackmittel.

Der Pharmaziepraktikantin Frau Anna Hain danke ich für die Anfärbung der Primärpackmittel mit Coomassieblau.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitdoktoranden der Bayer Pharma AG für das angenehme Arbeitsklima und die anregenden sowie aufmunternden Gespräche bedanken. Vor allem danke ich Julia Meier, Svenja Lünse, Roberta Schmieder, Katharina Schulz und Christian Lechner für die schönen Unternehmungen auch nach Feierabend. Mein Dank gilt zudem Robert Adams für die Einführung in  $\text{\LaTeX}$  und die schnelle Hilfe bei auftauchenden Problemen.

Vielen Dank an Herrn Dr. Jonas Winter und Frau Anja Fincke für die ausführlichen fachlichen Diskussionen, unerschöpflichen Anregungen und das kritische Korrekturlesen. Weiterhin danke ich Frau Anja Zucker für das Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit.

Herzlichst möchte ich auch dem „Kochclub & friends“ für die Abwechslung neben der Doktorarbeit danken und dafür, dass ihr meinen Fokus immer wieder auf das Wesentliche im Leben gelenkt habt.

Mein tiefster Dank gilt meiner Familie, vor allem meinen Eltern, für die immerwährende, liebevolle Unterstützung in allen Lebensbereichen und das Verständnis, wenn ich mal nicht über die Doktorarbeit sprechen wollte. Danke, dass ihr mich in allen Lebenslagen durch alle Höhen und Tiefen begleitet und immer an mich glaubt.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben.

Bei der Verfassung der Dissertation wurden keine anderen als die im Text aufgeführten Hilfsmittel verwendet.

Ein Promotionsverfahren wurde zu keinem früheren Zeitpunkt an einer anderen Hochschule oder bei einem anderen Fachbereich beantragt.

Berlin, 2013

Julia Rager

## Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung und Zielstellung</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Theoretische Grundlagen</b>	<b>5</b>
2.1	Adsorption von Proteinen an Oberflächen . . . . .	5
2.1.1	Effekte durch die Proteinadsorption an Oberflächen . . . . .	5
2.1.2	Ablauf der Proteinadsorption an Oberflächen . . . . .	6
2.1.3	Struktur von Proteinen in Lösung und adsorbiert an Oberflächen . . . . .	8
2.1.4	Ursachen für die Proteinadsorption an Oberflächen . . . . .	9
2.1.5	Methoden zur Messung der Proteinadsorption an Oberflächen . . . . .	12
2.2	Primärpackmittel . . . . .	13
2.2.1	Glasvials mit und ohne Beschichtung . . . . .	13
2.2.2	Kunststoffvials . . . . .	15
2.3	Statistische Versuchsplanung . . . . .	16
2.3.1	Grundbegriffe der statistischen Versuchsplanung . . . . .	16
2.3.2	Erstellung von zentral zusammengesetzten Versuchsplänen . . . . .	17
2.3.3	Statistische Auswertung von zentral zusammengesetzten Versuchsplänen . . . . .	20
<b>3</b>	<b>Auswahl und Charakterisierung der Reaktionspartner</b>	<b>25</b>
3.1	Auswahl und Charakterisierung des Modellproteins . . . . .	25
3.1.1	Auswahlkriterien für die Verwendung von Bovinem Serum Albumin als Modellprotein . . . . .	25
3.1.2	Struktur und chemische Eigenschaften von Bovinem Serum Albumin . . . . .	25
3.1.3	Bestimmung des isoelektrischen Punkts von Bovinem Serum Albumin . . . . .	26
3.1.3.1	Messprinzip . . . . .	26
3.1.3.2	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	27
3.2	Auswahl und Charakterisierung der Primärpackmittel . . . . .	27
3.2.1	Auswahlkriterien für die Verwendung der untersuchten Primärpackmittel . . . . .	27
3.2.2	Bestimmung der Oberflächenrauheit . . . . .	28
3.2.2.1	Messprinzip . . . . .	28
3.2.2.2	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	29

3.3	Zusammenfassung . . . . .	30
3.4	Geräte und Materialien . . . . .	31
<b>4</b>	<b>Methodenentwicklung zur Bestimmung der adsorbierten Proteinmenge an Primärpackmittel</b>	<b>32</b>
4.1	Auswahl geeigneter Bestimmungsmethoden . . . . .	33
4.2	Visualisierung und Bestimmung der adsorbierten Proteinmenge mittels Coomassieblau . . . . .	34
4.2.1	Messprinzip . . . . .	34
4.2.2	Visualisierung der adsorbierten Proteinmenge . . . . .	35
4.2.3	Vorversuche und Grenzen des Coomassieblau-Assays . . . . .	37
4.3	Bestimmung der adsorbierten Proteinmenge mittels Micro BCA-Assay . . . . .	40
4.3.1	Messprinzip . . . . .	40
4.3.2	Vorversuche . . . . .	41
4.3.3	Entwicklung einer Micro BCA-Assay Methode zur Bestimmung der adsorbierten Proteinmenge an Primärpackmittel . . . . .	43
4.4	Bestimmung der adsorbierten Proteinmenge mittels SE-HPLC . . . . .	46
4.4.1	Messprinzip . . . . .	46
4.4.2	Bestimmung der kritischen Mizellbildungskonzentration . . . . .	47
4.4.3	Vorversuche . . . . .	48
4.4.4	Entwicklung einer SE-HPLC Methode zur Bestimmung der adsorbierten Proteinmenge an Primärpackmittel . . . . .	49
4.5	Vergleich der entwickelten Methoden . . . . .	51
4.6	Zusammenfassung . . . . .	54
4.7	Geräte und Materialien . . . . .	56
<b>5</b>	<b>Validierung des Micro BCA-Assays und der SE-HPLC zur Bestimmung der adsorbierten Proteinmenge an Primärpackmittel</b>	<b>58</b>
5.1	Validierungsparameter . . . . .	58
5.1.1	Linearität . . . . .	58
5.1.2	Präzision . . . . .	58
5.1.3	Richtigkeit . . . . .	59
5.1.4	Bestimmungs- und Nachweisgrenze . . . . .	60

5.2 Validierung des Micro BCA-Assays und der SE-HPLC zur Bestimmung der adsorbierten Proteinmenge an Primärpackmittel . . . . .	61
5.2.1 Linearität . . . . .	61
5.2.2 Präzision . . . . .	62
5.2.3 Richtigkeit . . . . .	62
5.2.4 Bestimmungs- und Nachweisgrenze . . . . .	63
5.3 Zusammenfassung . . . . .	63
<b>6 Ermittlung signifikanter Faktoren auf die Proteinadsorption mittels statistischer Versuchsplanung</b>	<b>65</b>
6.1 Auswahl der Faktoren . . . . .	65
6.2 Erstellung und Durchführung des Versuchsplans . . . . .	69
6.3 Ergebnisse und Diskussion . . . . .	71
6.4 Zusammenfassung . . . . .	83
6.5 Geräte und Materialien . . . . .	85
<b>7 Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>87</b>
<b>8 Summary and Outlook</b>	<b>90</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>92</b>
<b>Veröffentlichungen</b>	<b>102</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>103</b>
<b>A Anhang</b>	<b>104</b>

## I Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	Sternpunktabstand
ANOVA	ANalysis Of VAriance (Varianzanalyse)
$b_0$	mittlere Zielgröße
$b_{1,2,\dots,i}$	Regressionskoeffizient
BCA	bicinchoninic acid (Bicinchoninsäure)
BSA	Bovines Serum Albumin
BSG	Bestimmungsgrenze
CMC	critical micelle concentration (kritische Mizellbildungskonzentration)
COC	Cycloolefin-Copolymer
COP	Cycloolefinpolymer
$\Delta_{ads}$	Änderung der jeweiligen Variablen durch Adsorptionsvorgänge
$\varepsilon$	dielektrische Konstante
$f(k_a)$	Henrys Funktion
$f(x)$	Funktion der Abweichung des Profils von der glatten Oberfläche
FG	Freiheitsgrad
$G$	Gibbs Energie
$H$	Enthalpie
HPLC	high performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
IEP	isoelektrischer Punkt
IgG	Immunglobulin G
$k$	Anzahl der Faktoren
$l$	Messstrecke
$\mu_e$	elektrophoretische Mobilität
$m$	Anzahl der Faktorstufenkombinationen im Versuchsplan
$MQ$	Mittlere Quadratsumme
$\eta$	Viskosität
$n$	Anzahl der Bestimmungen
$n'$	Anzahl der Stufen eines Faktors
$N$	Gesamtanzahl der Einzelversuche
$N_0$	Anzahl der Zentralpunktversuche
$N_{St}$	Anzahl der Sternpunktversuche
$N_W$	Anzahl der Würfelpunktversuche
NWG	Nachweisgrenze
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PEG	Polyethylenglykol
PICVD	Plasma Impulse Chemical Vapor Deposition
$r$	Korrelationskoeffizient
$R_a$	arithmetischer Mittenrauhwert

RP-HPLC	reversed phase-high performance liquid chromatography (Umkehrphasenchromatographie)
$S$	Entropie
$s$	Standardabweichung
$s^2$	Versuchsstreuung
$\sigma^2$	Varianz
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SE-HPLC	size exclusion-high performance liquid chromatography (Größenausschlusschromatographie)
$SQ$	Summe der Quadrate zur Berechnung der mittleren Quadratsumme
$SQ'$	Summe der Quadrate zur Erstellung der Regressionsgeraden
$T_{absolut}$	absolute Temperatur
VIF	Varianz-Inflations-Faktor
$V_k$	Variationskoeffizient
WW	Wechselwirkung
$x_i$	Einzelmesswerte der Bestimmungen
$x'_{1,2,\dots,i}$	Faktor
$\bar{x}$	Mittelwert der Einzelmesswerte
$y_{1,2,\dots,i}$	Zielgröße
$\bar{y}$	Mittelwert der $y$ -Werte
$\bar{y}_i$	Mittelwert von $y_i$
$\hat{y}_i$	berechneter Modellwert für $y_i$
$\zeta$	Zetapotential

## 1 Einleitung und Zielstellung

Vor über 25 Jahren kam das rekombinant hergestellte humane Insulin als erstes Proteintherapeutikum auf den Markt. Seitdem nimmt die Anzahl der therapeutischen Proteine und Antikörper auf dem Markt von Jahr zu Jahr stetig zu. Heutzutage gibt es mehr als 130 zugelassene Proteintherapeutika, die für Umsätze in Milliardenhöhe sorgen. Weitere Protein Arzneimittel sind bereits in der Entwicklung [1, 2].

Aufgrund ihrer komplexen Struktur werden Proteine häufig in lyophilisierter Form gelagert, um deren Stabilität und eine lange Haltbarkeit zu gewährleisten. Vor Applikation in den Patienten ist die Rekonstitution des Lyophilisats nötig. Das Proteintherapeutikum kommt während des Rekonstitutionsprozesses bis zur Verabreichung in den Patienten mit verschiedenen Oberflächen in Kontakt. Die amphiphile Struktur der Proteine begünstigt die Adsorption an verschiedenste Oberflächenmaterialien [3]. Ein Problem für die pharmazeutische Industrie als auch für den Therapieerfolg stellt daher die Proteinadsorption an Primärpackmittel bzw. Materialien, die zu Applikationszwecken eingesetzt werden, dar.

Bei therapeutischen Proteinen handelt es sich um hochpotente Wirkstoffe, die meist in geringeren Konzentrationen als chemische Wirkstoffe eingesetzt werden. Somit haben Konzentrationsverluste durch beispielsweise Adsorption an Primärpackmittel, die im  $\mu\text{g}/\text{ml}$ -Bereich liegen, eine stärkere Auswirkung als bei höher konzentrierten chemischen Wirkstoffen [4, 5]. Dem Patienten steht in diesem Falle eine geringere Proteinkonzentration zur Applikation zur Verfügung, was bei diesen hochpotenten, niedrig dosierten Wirkstoffen einen hohen Einfluss auf den Therapieerfolg haben kann. Folglich müssen aufgrund der Abnahme der Proteinkonzentration Therapieschemata angepasst werden [4, 6]. Auch für die pharmazeutische Industrie hat der Proteinverlust einen nachteiligen Effekt, da entweder durch Abfüllung einer höheren Proteinkonzentration oder durch Zugabe verschiedener Hilfsstoffe versucht werden muss, die Konzentrationsabnahme auszugleichen bzw. zu unterbinden. Resultierend führt der durch die Adsorption bedingte Proteinverlust zu steigenden Kosten für die pharmazeutische Industrie [7].

Bereits 1956 konnte Bull eine messbare Adsorption von Albumin an Glas ermitteln [8]. Die meisten Untersuchungen der Proteinadsorption an Primärpackmittel bzw. Materialien, die zu Applikationszwecken eingesetzt werden, existieren für Insulin, da rekombinantes humanes Insulin schon viele Jahre auf dem Markt erhältlich ist und die Problematik der Proteinadsorption bereits seit längerer Zeit beobachtet wurde [9, 10, 11, 12]. Darüber hinaus zeigte sich auch für weitere therapeutische Proteine ein deutlicher Konzentrationsverlust durch Adsorption an Materialien, die als Primärpackmittel [4, 7, 13, 14] oder zu Applikationszwecken genutzt werden [6, 15]. Hierbei konnte ein Einfluss der Primärpackmitteloberfläche sowie verschiedener Formulierungsparameter auf die adsorbierte Proteinmenge nachgewiesen werden. Neben diesen Effekten spielt die Komplexität der Proteinstruktur für Adsorptionsprozesse eine essentielle Rolle. Da verschiedene Proteine unter gleichen Bedingungen eine unterschiedliche Adsorptionsneigung zeigen, kann keine Vorhersage über die adsorbierte Proteinmenge getroffen werden [4].

Da es sich bei der Entwicklung von Proteinanzneimitteln um einen lang andauernden und kostspieligen Prozess handelt, wird heutzutage verstärkt die statistische Versuchsplanung zur Produkt- und Prozessoptimierung eingesetzt. Damit kann durch gleichzeitige Variation der Einstellung der untersuchten Parameter der Einfluss verschiedener Faktoren beispielsweise auf die Proteinadsorption untersucht werden. Auch mögliche Wechselwirkungen zwischen den untersuchten Faktoren können somit identifiziert werden, was bei klassischer Versuchsdurchführung, bei der jeweils nur ein Faktor pro Versuch variiert wird, nicht möglich ist [16]. Für die Pharmaindustrie von Interesse sind hierfür die ICH Richtlinien Q8 (R2), Q9 und Q10 [17, 18, 19], die ein systematisches Vorgehen beschreiben, um Produkte und Prozesse zu verbessern. Das "Quality by design"-Konzept soll festlegen, innerhalb welches Versuchsraums die Qualität für ein Produkt oder einen Prozess gewährleistet ist.

Ziel dieser Arbeit ist es, unter Einsatz eines Modellproteins Methoden zu entwickeln, die zur Messung der nach Rekonstitution adsorbierten Proteinmenge an Primärpackmitteloberflächen eingesetzt werden können. Da die adsorbierten Mengen im  $\mu\text{g}/\text{ml}$ -Bereich liegen, muss es sich hierbei um hochsensitive Methoden handeln. Diese Methoden sollen zukünftig angewandt werden, um bereits während der Entwicklung der Proteinanzneimittel diese Konzentrationsverluste zu ermitteln und durch geeignete Packmittelwahl oder veränderte Formulierungsparameter die Adsorption einzuschränken. Somit können frühzeitig eventuelle Wirkverluste, die aus der Konzentrationsabnahme der Proteinlösung durch Adsorption resultieren, für den Patienten ausgeschlossen werden. Finalisierend soll die Anwendbarkeit der entwickelten Methoden im Rahmen der statistischen Versuchsplanung unter Beweis gestellt werden, da diese eine schnelle Möglichkeit liefert, den Einfluss verschiedener Faktoren auf die gebundene Proteinmenge zu untersuchen. Wie bereits erwähnt, existieren Hinweise darauf, dass die Proteinadsorption sowohl von der Packmitteloberfläche als auch von den Formulierungsparametern abhängig ist. Mittels statistischer Versuchsplanung sollen daher signifikante Faktoren und Wechselwirkungen auf die adsorbierte Proteinmenge identifiziert werden.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Adsorption von Proteinen an Oberflächen

#### 2.1.1 Effekte durch die Proteinadsorption an Oberflächen

Proteinadsorption an Oberflächen kann positive als auch negative Auswirkungen haben. Durch Adsorption kann es zu Konformationsänderungen, Denaturierung, Aggregation und Verlust an biologischer Aktivität der Proteine kommen. Aber auch die Oberflächen können durch die adsorbierten Proteine beeinträchtigt werden [6, 20].

Neben der unerwünschten Adsorption von therapeutischen Proteinen an Primärpackmittel oder Materialien, die zu Applikationszwecken eingesetzt werden, taucht die Proteinadsorption in vielen weiteren Bereichen auf. Die Adsorption von körpereigenen Proteinen auf künstliche Implantate führt zur Auslösung der Blutgerinnungskaskade, was in der Folge zur Bildung von Thromben führen kann [21]. Daher war die Proteinadsorption an Materialien, die als künstliche Implantate zum Einsatz kommen, bereits Gegenstand vieler Untersuchungen [22, 23]. Ein weiteres Beispiel für unerwünschte Proteinadsorption zeigt sich anhand der Ablagerung körpereigener Proteine (v.a. Lysozym) auf Kontaktlinsen, die bereits kurze Zeit nach Einsetzen von Kontaktlinsen in das menschliche Auge auftritt. Dies kann sowohl zur Auslösung von Entzündungsreaktionen des Auges führen als auch die Transparenz und die Qualität der Kontaktlinse beeinflussen [24].

Aus diesen Gründen gibt es verschiedene Ansätze, um die Adsorptionsneigung von Proteinen an Oberflächen zu verringern. Es konnte gezeigt werden, dass durch Beschichtung von Oberflächen mit beispielsweise Albumin andere Proteine in Lösung eine geringe Tendenz zur Adsorption zeigen. Denn somit sind durch Albumin die Bindungsstellen auf der Oberfläche bereits abgesättigt, was zu keiner weiteren Adsorption anderer Proteine führt [25, 26]. Andererseits stellte sich heraus, dass Albumin durch andersartige Proteine aus der Lösung von der Oberfläche verdrängt werden kann [27, 28]. Ein weiterer Ansatz, um eine verminderte Proteinadsorption an Oberflächen zu erreichen, findet sich durch die PEGylierung von Oberflächen, wie durch Hansson et al. am Beispiel von PEGyliertem Titanium gezeigt [21]. Auch werden grenzflächenaktive Stoffe zur Reduktion der Proteinadsorption eingesetzt, wie unter 2.1.4 näher erläutert wird.

Bei Durchführung von Immunassays hingegen ist die Proteinadsorption an Oberflächen sogar gewünscht. Dabei wird je nach Aufbau des Assays zunächst ein Antigen oder Antikörper an eine Oberfläche adsorbiert. Über die nachfolgende Bindung von Antikörper oder Antigen lassen sich Aussagen über die Menge an zu untersuchendem Analyt oder die Kinetik der jeweiligen Reaktion treffen. Beispiele hierfür sind der “Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) oder der Nachweis von humanem Choriongonadotropin im Rahmen von Schwangerschaftstests [29].

### 2.1.2 Ablauf der Proteinadsorption an Oberflächen

Die Proteinadsorption wird nicht durch einen bestimmten Faktor allein getrieben. Aufgrund unterschiedlicher Eigenschaften von Protein und Oberfläche liegen verschiedene Möglichkeiten der Interaktion zwischen diesen beiden vor. Dabei können auch mehrere Vorgänge gleichzeitig eine Rolle für die Proteinadsorption spielen. Allgemein begünstigen all diejenigen Gegebenheiten die Proteinadsorption an Oberflächen, die zur Erniedrigung der Gibbs Energie des Systems führen. Der Zusammenhang zwischen Gibbs Energie, Enthalpie, Entropie und absoluter Temperatur unter Konstanthaltung von Temperatur und Druck ist in Gleichung 2.1 wiedergegeben [30].

$$\Delta_{ads}G (= \Delta_{ads}H - T_{absolut} \cdot \Delta_{ads}S) < 0 \quad (2.1)$$

mit

$G$ : Gibbs Energie

$H$ : Enthalpie

$T_{absolut}$ : absolute Temperatur

$S$ : Entropie

$\Delta_{ads}$ : Änderung der jeweiligen Variablen durch Adsorptionsvorgänge

Somit fördern diejenigen Vorgänge die Proteinadsorption an Oberflächen, die entweder zu einer Zunahme der Entropie oder zu einer Abnahme der Enthalpie führen und somit die Gibbs Energie des Systems senken. Sowohl die enthalpischen als auch die entropischen Triebkräfte der Proteinadsorption an Oberflächen sind im Folgenden näher erläutert [31]:

- **Wechselwirkungskräfte zwischen Protein und Oberfläche:**

Oberflächen als auch Proteine werden von einer elektrischen Doppelschicht, der sogenannten Sternschicht, umgeben. Nähern sich Protein und Oberfläche einander an, kommt es zur Überlappung der beiden elektrischen Doppelschichten. Dies kann sowohl zu anziehenden als auch zu abstoßenden elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Protein und Oberfläche führen, wodurch die Adsorption gefördert beziehungsweise vermindert wird [32].

Weiterhin sind die Dispersionskräfte, die van der Waals Wechselwirkungen, als Triebkraft der Adsorption aufzuführen. Durch Ausbildung von Dipol-Dipol Wechselwirkungen zwischen Protein und Oberfläche kommt es wie durch Coloumb Wechselwirkungen zur Erniedrigung der Enthalpie.

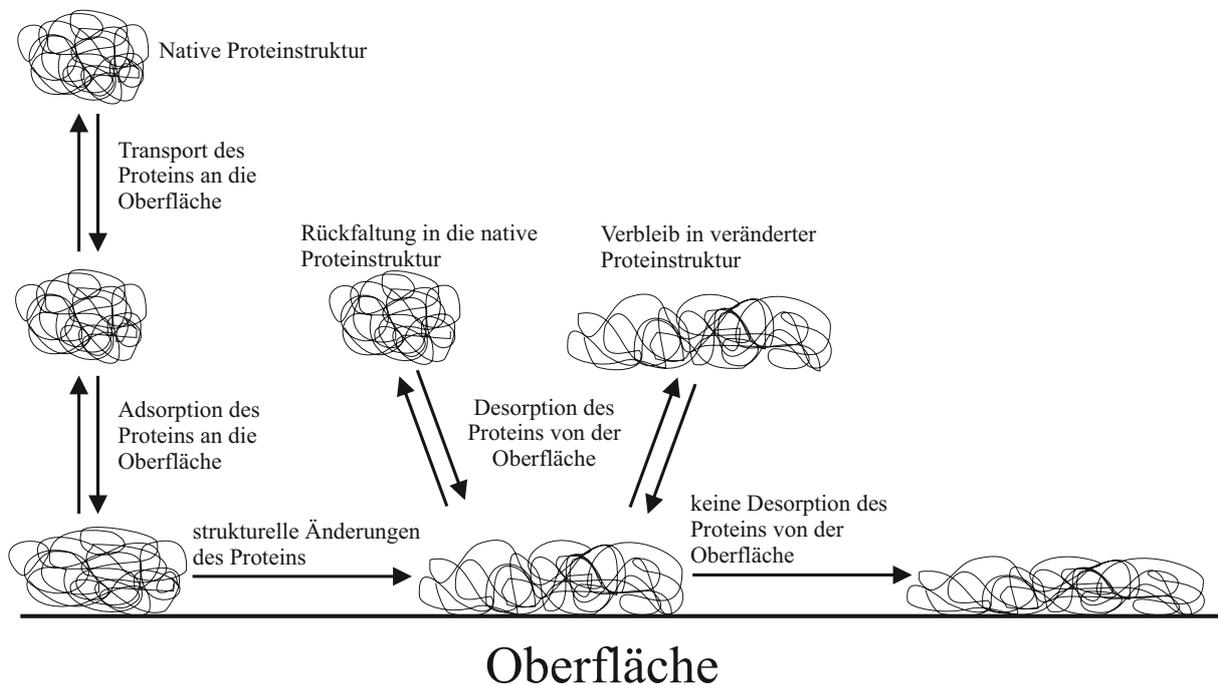
- **hydrophober Effekt:**

Hydrophile Bereiche des Proteins sind in wässriger Lösung nach außen gekehrt und bilden wie hydrophile Oberflächen Wasserstoffbrückenbindungen mit der wässrigen Umgebung aus, wodurch das Protein und die Oberfläche von einer Hydrathülle beziehungsweise von Gegenionen umgeben sind. Dagegen befinden sich die hydrophoben Bereiche meist abgeschirmt im Inneren des Proteins. Dennoch kommen auch hydrophobe Bereiche des Proteins mit der wässrigen Lösung in Kontakt. Aufgrund mangelnder Fähigkeit Wasserstoff-

brückenbindungen mit der wässrigen Umgebung auszubilden, ordnen sich die Hydrathülle beziehungsweise die Gegenionen in geordneter, käfigartiger Struktur um die hydrophoben Bereiche des Proteins sowie um hydrophobe Oberflächen an. Durch Adsorption kommt es zur Störung dieser geordneten Struktur und es werden Wasser beziehungsweise Ionen vom Protein sowie von der Oberfläche abgespalten. Daraus resultiert eine Zunahme der Entropie [20, 33].

- **Konformationsänderungen des Proteins:**

Häufig kommt es durch Adsorption an Oberflächen zu strukturellen Änderungen innerhalb des Proteins. Diese Änderungen gehen häufig mit einem Verlust an geordneter Sekundärstruktur einher, was eine Zunahme der Entropie zur Folge hat [34].



**Abbildung 2.1:** Ablauf der Proteinadsorption an eine feste Oberfläche (modifiziert nach [30, 31]).

Eine Übersicht über die Phasen der Adsorption liefert Abbildung 2.1. Die Proteine erreichen zunächst über Diffusion oder Konvektion die Oberfläche und adsorbieren anschließend in zufälliger Art und Weise an die Oberfläche. Die verantwortlichen Triebkräfte wurden bereits oben erwähnt. Im Folgenden kommt es je nach Protein zu mehr oder minder stark ausgeprägten Konformationsänderungen, was in Kapitel 2.1.3 näher ausgeführt wird. Die strukturellen Änderungen führen zu erhöhter Entropie und begünstigen somit den Adsorptionsprozess [35].

Das Protein kann reversibel oder irreversibel an die Oberfläche adsorbiert sein. Von irreversibler Adsorption spricht man, wenn die adsorbierten Proteine bei unveränderten Umgebungsbedingungen innerhalb von Stunden oder Tagen nicht von der Oberfläche desorbieren. Jedoch ist es möglich, durch Zugabe verschiedener Substanzen oder Änderungen der Umgebungsbedingungen das Protein von der Oberfläche abzulösen [36]. Bereits Bull [8] zeigte, dass ein vollständiges

Ablösen der Proteinschicht durch reinen Puffer nicht möglich ist. Jedoch konnte nachgewiesen werden, dass je weiter der pH-Wert der Lösung vom isoelektrischen Punkt des Proteins entfernt ist, desto größer war der Prozentsatz an abgelöstem Protein. Kommt es zur Desorption kann das Protein entweder durch strukturelle Änderungen wieder seine native Struktur annehmen oder es behält die veränderte Sekundärstruktur bei [37]. Je länger das Protein jedoch mit der Oberfläche in Kontakt tritt, umso stärker kann es sich entfalten und umso mehr Bindungsstellen können sich zwischen Protein und Oberfläche ausbilden. Somit wird die Desorption erschwert und nach längerer Verweildauer des Proteins auf der Oberfläche immer unwahrscheinlicher [38].

Der Grad der Desorption ist aber auch von der Hydrophilie beziehungsweise der Hydrophobizität der Oberfläche abhängig, worauf in 2.1.4 näher eingegangen wird.

Bei höheren Ausgangskonzentrationen konnte in manchen Fällen eine Zunahme der adsorbierten Proteinmenge, die über die maximal mögliche Proteinmenge bei Annahme einer einschichtigen Adsorption hinausging, beobachtet werden. Es wurde daher eine mehrschichtige Adsorption angenommen [39, 40]. Jedoch gibt es auch gegenteilige Theorien, die die erhöhte Adsorptionsmenge der Neuorientierung der Proteine zuschreiben und eine mehrschichtige Adsorption für unwahrscheinlich halten [41, 42].

### 2.1.3 Struktur von Proteinen in Lösung und adsorbiert an Oberflächen

Zur Bestimmung der Sekundärstruktur werden, wie näher unter 2.1.5 erläutert, vor allem spektroskopische Methoden wie der Circular dichroismus oder die Infrarotspektroskopie genutzt. Ist das aktive Zentrum von Proteinen durch Adsorption an Oberflächen nicht mehr zugänglich, kann dies zu einer verminderten Aktivität führen [43].

Wie bereits unter 2.1.2 erwähnt, kommt es durch Adsorption zu strukturellen Änderungen des Proteins. Proteine adsorbieren in unterschiedlicher Ausrichtung an Oberflächen. Dabei gibt es Proteine, wie beispielsweise Albumin und Fibrinogen, die bevorzugt seitlich und somit mit dem größten Teil ihrer Oberfläche adsorbieren. Dagegen adsorbiert  $\gamma$ -Globulin meist mit seinem Ende voran, wodurch weniger Platz auf der Oberfläche verbraucht wird und somit mehr Protein adsorbieren kann. Bei all den genannten Proteinen geht die Bindung an die Oberfläche mit einem Verlust an geordneten Sekundärstrukturen einher [41, 44]. Konformationsänderungen sind vom jeweiligen Protein und der jeweiligen Oberfläche abhängig. Daher kann man keine allgemeinen Aussagen über die strukturellen Änderungen der adsorbierten Proteine treffen [45].

Proteine in Lösung sind frei beweglich und drehbar. Dagegen adsorbieren sie auf die Oberfläche in einer bestimmten Orientierung und nehmen dabei eine veränderte Sekundärstruktur an [46]. Kommt es zu keiner Desorption, erfahren die adsorbierten Proteine stärkere strukturelle Änderungen, umso länger sie auf der Oberfläche adsorbiert sind. Durch stärkere Entfaltung des Proteins können sich mehr Bindungsstellen zwischen Protein und Oberfläche ausbilden. Bei niedrigen Proteinkonzentrationen adsorbieren die Proteine in zufälliger Orientierung an die Oberfläche. Bei hochkonzentrierten Proteinlösungen dagegen adsorbieren mehr Proteine an die Oberfläche, wobei diese aber weniger Bindungsstellen mit der Oberfläche ausbilden. Denn hierfür ist nun zu wenig

Platz auf der Oberfläche vorhanden. Es kommt zu Wechselwirkungen der adsorbierten Proteine untereinander, wodurch die Proteine weitere strukturelle Änderungen durchlaufen [38, 47].

Die Struktur von Proteinen auf hydrophilen Oberflächen variiert von der auf hydrophoben Oberflächen. Auf hydrophoben Oberflächen konnten im Vergleich zu hydrophilen Oberflächen stärkere Konformationsänderungen nachgewiesen werden [48, 49, 50].

Des Weiteren werden durch strukturelle Änderungen häufig hydrophobe Bereiche nach außen gekehrt, wodurch das Protein durch hydrophobe Wechselwirkungen stärker auf die Oberfläche gebunden werden kann [44].

#### 2.1.4 Ursachen für die Proteinadsorption an Oberflächen

Die Proteinadsorption wird sowohl durch Eigenschaften der Proteine und der Oberfläche als auch durch die Umgebungsbedingungen beeinflusst. Der Einfluss der einzelnen Parameter wird im Folgenden genauer erläutert:

- **Eigenschaften des Proteins:**

- Stabilität der Proteine:

Man unterscheidet weiche (“soft“) und harte (“hard“) Proteine. Weiche Proteine weisen eine geringe strukturelle Stabilität auf, wodurch es zu strukturellen Änderungen durch Adsorption kommt. Sie adsorbieren sowohl an hydrophile als auch an hydrophobe Oberflächen, ungeachtet dessen, ob Protein und Oberfläche die gleiche Ladung tragen und somit ungünstige elektrostatische Wechselwirkungen vorhanden sind. Durch die vorliegenden Konformationsänderungen kommt es zu einer Entropiezunahme, die wiederum die uneingeschränkte Adsorption von weichen Proteinen auf Oberflächen auch unter ungünstigen Bedingungen erklärt. Durch starkes Entfalten der weichen Proteine können sich zudem vermehrt Bindungsstellen mit der Oberfläche ausbilden, was die feste Bindung zwischen Protein und Oberfläche weiter fördert.

Harte Proteine hingegen sind stabile Proteine, deren Konformation auch durch Adsorption kaum eine Änderung erfährt. Sie adsorbieren bevorzugt an hydrophobe Oberflächen, wohingegen die Adsorption an hydrophile Oberflächen nur unter günstigen elektrostatischen Bedingungen erfolgt.

Beispiele für weiche Proteine bieten Albumin oder die Familie der Immunglobuline. Bei Lysozym oder  $\beta$ -Lactoglobulin handelt es sich dagegen um Vertreter der harten Proteine [30, 32, 43, 46].

- Ladung des Proteins:

Die Stabilität der Proteine wird auch durch ihre Ladung beeinflusst. Stärker geladene Proteine weisen eine schwächere Stabilität auf, wodurch sie dazu neigen, sich zu entfalten und auf der Oberfläche auszubreiten. Durch größeren Platzbedarf der entfalteten Proteine kann weniger Protein binden. Befindet sich der pH-Wert der Lösung aber am isoelektrischen Punkt des Proteins, so trägt das Protein die Nettoladung null und

die Proteine weisen eine höhere strukturelle Stabilität auf. Die Proteine neigen daher vermindert zur Entfaltung. So ist auch erklärbar, warum am isoelektrischen Punkt des Proteins die maximale Menge an Protein adsorbiert [51]. Dies konnte anhand von verschiedenen Proteinen auf variierenden Oberflächen gezeigt werden [32, 52, 53]. Auch der Einfluss der Wechselwirkung zwischen bereits adsorbierten Proteinen mit freien Proteinen aus der Lösung wurde in diesem Zusammenhang diskutiert. Da Proteine am isoelektrischen Punkt die Nettoladung null tragen, führt dies zu einer verminderten Interaktion zwischen den einzelnen Proteinen. Somit kann am isoelektrischen Punkt mehr Protein auf die Oberfläche adsorbieren [35]. Des Weiteren entscheidet die Ladung des Proteins über die möglichen Wechselwirkungen zwischen Protein und Oberfläche, wie bereits in Abschnitt 2.1.2 dargestellt.

– Größe des Proteins:

Kleinere Proteine diffundieren schneller als größere Proteine und erreichen somit als erstes die Oberfläche. Häufig ist zu beobachten, dass in einer Lösung mit verschiedenen Proteinen zunächst die kleineren Proteine adsorbieren und diese anschließend gegen größere Proteine, die eine höhere Affinität für die Oberfläche aufweisen, ausgetauscht werden. Außerdem verfügen größere Proteine über mehr mögliche Bindungsstellen als kleinere Proteine, wodurch mehr Interaktionen mit der Oberfläche zustande kommen können [36, 43].

• **Eigenschaften der Oberfläche:**

– chemische Zusammensetzung der Oberfläche:

Die chemische Zusammensetzung und die daraus resultierende Ladung der Oberfläche bestimmen, welche Arten von Wechselwirkungen mit Proteinen möglich sind. Viele Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass auf hydrophoben Oberflächen mehr Protein adsorbiert als auf hydrophilen Oberflächen [35, 41, 54]. Doch Ziegler et al. erhielt bei ihren Untersuchungen gegenteilige Ergebnisse. Hierbei konnte gezeigt werden, dass mehr BSA auf hydrophilen Oberflächen im Vergleich zu hydrophoben Oberflächen adsorbierte [50].

Darüber hinaus hat die Beschaffenheit der Oberfläche einen Einfluss auf die Reversibilität des Adsorptionsvorganges. Denn auf hydrophoben Oberflächen kommt es meist zu irreversibler Adsorption, wobei häufig auch durch beispielsweise Verschiebung des pH-Wertes keine Desorption zu erreichen ist. Es ergaben sich in diesem Zusammenhang auch Hinweise, dass eine steigende Hydrophobizität der Oberfläche mit stärkeren strukturelle Änderungen von BSA einhergeht [49, 50]. Dagegen ist auf hydrophilen Oberflächen sowohl reversible als auch irreversible Adsorption möglich [36, 37, 55].

– Ladung der Oberfläche:

Ungeladene Oberflächen binden weniger Protein als geladene Oberflächen, da auf ungeladenen Oberflächen im Vergleich zu geladenen Oberflächen kaum elektrostatische Wechselwirkungen möglich sind. Dadurch fehlt hier ein wichtiger Auslöser der Adsorption, der auf geladenen Oberflächen in großem Maße zum Tragen kommt [46].

- Rauheit der Oberfläche:  
Raue Oberflächen bieten eine größere Adsorptionsfläche, wodurch mehr Protein adsorbieren kann. Jedoch korreliert die Vergrößerung der Oberfläche nicht immer mit der Zunahme der adsorbierten Proteinmenge [56, 57]. Rechendorff et al. konnten weiterhin zeigen, dass das Ausmaß der Rauheit auf die Adsorption auch von der Art des Proteins selbst abhängt [58].
- Homogenität der Oberfläche:  
Häufig liegen heterogene Oberflächen vor, wodurch auf unterschiedlich beschaffenen Stellen einer Oberfläche Proteine über unterschiedliche Wechselwirkungen, wie in Kapitel 2.1.2 erwähnt, binden können [38].

- **Umgebungsbedingungen:**

- Temperatur:  
In der Literatur finden sich unterschiedliche Ergebnisse über den Einfluss der Temperatur auf die Proteinadsorption. Es existieren sowohl Hinweise auf verstärkte, aber auch auf verminderte Adsorption bei erhöhten Temperaturen. Jedoch konnte auch ein Fehlen des Temperatureinflusses auf die Proteinadsorption gezeigt werden. Dies scheint abhängig von den Eigenschaften des Proteins zu sein [37, 41].
- Ionenstärke des Puffers:  
Die Ionenstärke beeinflusst die bereits erwähnte elektrische Doppelschicht, die sich um Partikel jeglicher Art ausbildet. Verschiedene Arbeitsgruppen erhielten unterschiedliche Ergebnisse bezüglich des Einflusses der Ionenstärke auf die Proteinadsorption. So konnte gezeigt werden, dass die adsorbierte Proteinmenge bei erhöhter Ionenstärke zu- oder abnimmt oder aber kaum einen Einfluss auf die Proteinadsorption zeigt [13, 44, 59]. Der Effekt der Ionenstärke ist jedoch teilweise auch von der eingesetzten Ionenart [23] oder von der vorliegenden Oberfläche abhängig [51].  
Zudem kann die Ionenart einen stabilisierenden oder destabilisierenden Einfluss auf das Protein haben, wodurch das Protein kompakter oder stärker entfaltet vorliegt [60].
- pH-Wert der Lösung:  
Der pH-Wert der Lösung beeinflusst die Ladung des Proteins sowie der Oberfläche. Die Auswirkungen sind bereits oben näher ausgeführt.
- grenzflächenaktive Zusätze:  
Die Bindung von grenzflächenaktiven Stoffen an die Oberfläche überwiegt die Adsorption der Proteine an die Oberfläche. Grenzflächenaktive Stoffe wie SDS oder Polysorbitat 20 besetzen die Bindungsstellen auf der Oberfläche und somit können Proteine nicht mehr binden. Sie können entweder eingesetzt werden zum Ablösen der bereits adsorbierten Proteine oder aber auch, um die Proteine von der Adsorption auf die Oberfläche abzuhalten. Abhängig von der Art der Wechselwirkungen zwischen Protein und Oberfläche sind unterschiedliche grenzflächenaktive Stoffe wirksam [61, 62, 63].

### 2.1.5 Methoden zur Messung der Proteinadsorption an Oberflächen

Trotz des Einsatzes identischer Formulierungs- und Inkubationsparameter erhielten verschiedene Arbeitsgruppen nicht immer die gleichen Ergebnisse. Eine mögliche Ursache hierfür kann durch den Einsatz unterschiedlicher Messmethoden begründet sein.

Es existieren eine Vielzahl an Methoden, um die Konzentration von Proteinen in Lösung zu bestimmen. Hierzu zählen unter anderem verschiedene kolorimetrische Proteinassays wie der Bradford-, Lowry- oder Bicinchoninsäure (BCA)-Assay [64, 65, 66]. Des Weiteren bieten spektroskopische Methoden eine Alternative zu den kolorimetrischen Proteinassays. Hierzu sind zum einen die Absorptionsmessung aromatischer Aminosäuren bei 280 nm oder der Peptidbindungen bei 205 nm und zum anderen die Messung der intrinsischen Fluoreszenz zu erwähnen. Auch verschiedene Trennprinzipien der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography, HPLC) wie beispielsweise die Umkehrphasenchromatographie (reversed phase (RP)- HPLC) oder die Größenausschlusschromatographie (size exclusion (SE)-HPLC) finden Anwendung in der Konzentrationsbestimmung von Proteinen [29, 67]. Es eignen sich jedoch nicht alle dieser Methoden, um die an Oberflächen adsorbierte Proteinmenge zu ermitteln.

Häufig werden radioaktiv markierte Proteine eingesetzt, um die an Oberflächen adsorbierte Menge zu bestimmen. In der Literatur finden sich Hinweise, dass Proteine trotz Markierung die gleichen Adsorptionseigenschaften innehaben wie unmarkierte Proteine [68, 69]. Andere Publikationen gehen dagegen aber davon aus, dass durch Markierung der Proteine die Adsorptionsneigung verändert wird [27, 70, 71]. Holmberg et al. [72] konnten zeigen, dass dies aber auch von der jeweils angewandten Markierungsmethode abhängt.

Neben der radioaktiven Markierung bietet auch die Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen eine Alternative zur Konzentrationsbestimmung adsorbierter Proteine [53]. Auch neuere Methoden wie die Markierung des Proteins mit Fluoresceinisothiocyanat und anschließende Vermessung mittels "total internal reflection fluorescence" kommt zur Anwendung [73]. Darüber hinaus finden Farbstoffe, die durch Reaktion mit Proteinen eine messbare Farbreaktion eingehen, bei dieser Fragestellung Anwendung. Waxman und Vilivalam [74] bestimmten mithilfe von Coomassieblau die adsorbierte Proteinmenge. Auch der Lowry-, der BCA- und der Bradfordassay fanden Anwendung bei der Untersuchung der adsorbierten Proteinmenge, indem durch Messung der gesunkenen Proteinkonzentration in Lösung auf die adsorbierte Menge geschlossen wurde [14, 23, 75].

Chromatographische Methoden finden auch ihren Einsatz bei der Bestimmung der adsorbierten Proteinmenge. Es kamen zur Untersuchung der Adsorption verschiedener Proteine an unterschiedliche Oberflächen sowohl RP-HPLC Methoden als auch SE-HPLC Methoden zum Einsatz. Dabei wurden die Proteine entweder von der Oberfläche abgelöst und anschließend die Konzentration ermittelt oder die Konzentrationsabnahme der Proteine in Lösung bestimmt [13, 14, 76].

Doch nicht nur die in dieser Arbeit untersuchte adsorbierte Proteinmenge ist von wissenschaftlichem Interesse, sondern auch die Konformation der adsorbierten Proteine, die Schichtdicke und welche Kräfte zwischen Protein und Oberfläche wirken.

Strukturelle Änderungen lassen sich mithilfe spektroskopischer Methoden wie dem Circular dichroismus oder der Infrarotspektroskopie nachweisen [6, 77, 78, 79].

Die Ellipsometrie bietet eine Möglichkeit, um zerstörungsfrei die Dicke einer adsorbierten Proteinschicht zu bestimmen. Ellipsometrische Messungen benötigen aber flache und reflektierende Oberflächen [73, 80, 81]. Des Weiteren werden hierfür trockene Oberflächen vorausgesetzt, was aber nicht den tatsächlichen Adsorptionsbedingungen entspricht. Dies kann zu veränderten Eigenschaften des Proteins führen [82].

Die Rasterkraftmikroskopie wird beispielsweise zur Messung der Kräfte genutzt, die zwischen Oberfläche und Protein wirken [83]. Außerdem kann sie aber auch zur Messung der Oberflächenrauheit und zur Abbildung der Oberfläche eingesetzt werden [52].

Auch neuere, spektroskopische Methoden wie die Röntgenphotoelektronenspektroskopie oder die “optical waveguide lightmode spectroscopy“ kommen zur Untersuchung der Proteinadsorption an Oberflächen zum Einsatz [84, 85]. Auch mithilfe von nicht-spektroskopischen Methoden lässt sich die adsorbierte Proteinmenge beispielsweise mittels “Quartz crystal microbalance“ direkt auf der Oberfläche bestimmen. Ein Problem stellt hierbei aber dar, dass keine Unterscheidung zwischen adsorbierten Proteinen und gebundenem Wasser möglich ist. Wie die Ellipsometrie verlangt diese Methodik zudem transparente und reflektierende Oberflächen [58].

## 2.2 Primärpackmittel

Primärpackmittel stehen in direktem Kontakt mit der Arzneistoffzubereitung. Sie stellen eine Barriere gegenüber äußeren Einflüssen (z.B. Licht oder Feuchtigkeit) dar, die die Qualität der Formulierung beeinträchtigen können. Eine Permeation von Bestandteilen aus der Lösung oder Gasen der Umgebung durch die Wandung hindurch sollte durch die Beschaffenheit des Primärpackmittels unterbunden werden. Des Weiteren sollte es zu keinerlei Interaktion zwischen Zubereitung und Primärpackmittel kommen und eine gute Entnehmbarkeit der flüssigen Zubereitung gewährleistet sein [86, 87].

### 2.2.1 Glasvials mit und ohne Beschichtung

Glas dient in der pharmazeutischen Industrie seit Langem als Primärpackmittel unter anderem für Ampullen, Vials und vorgefüllte Spritzen. Dabei zeichnet sich Glas durch eine hohe Undurchlässigkeit gegen Wasserdampf und Gase aus. Auch kann es extremen Temperaturen standhalten, was beispielsweise während Sterilisationsverfahren von Nutzen ist [86, 87].

Je nach Beschaffenheit der Arzneistoffzubereitung werden verschiedene Anforderungen an die Glasoberfläche gestellt. Aus diesem Grunde gibt es verschiedene Arten von Beschichtungen, die zu veränderten Glaseigenschaften führen. Die in dieser Arbeit verwendeten Glasart I Vials sowie deren Beschichtungen werden im Folgenden näher erläutert:

- **Glasart I Vials:**

Die unterschiedlichen Glasqualitäten werden nach dem Europäischen Arzneibuch [88] durch Bestimmung ihrer hydrolytischen Resistenz in die Klassen I-III eingeteilt. Die hydrolytischen Klassen geben Auskunft darüber, wie viel basische Bestandteile sich durch den Kontakt mit Wasser aus der Glaswand herauslösen. Typ I Gläser zeichnen sich dabei durch die höchste hydrolytische Resistenz der drei Klassen aus und kommen daher als Standardprimärpackmittel für parenterale Zubereitungen zum Einsatz.

- **silikonisierte Glasart I Vials:**

Die Silikonisierung von Glasoberflächen kann zum einen durch die Reaktion von freien Silanolgruppen auf der Glasoberfläche und der mit der Oberfläche assoziierten Wasserschicht mit Dichlordimethylsilan erreicht werden, wodurch sich ein dünner Dimethylsilanolfilm auf der Oberfläche ausbildet. Zum anderen kann auch ausgehend von dimethylsiloxanhaltigen Lösungen und Emulsionen durch thermische Behandlung eine Silikonschicht auf der Glasoberfläche erzeugt werden.

Die durch Silikonisierung erreichte Hydrophobisierung der Glasoberfläche bedingt eine verbesserte Entnehmbarkeit im Vergleich zu unsilikonisierten Gläsern, wodurch ein geringeres Restvolumen im Behältnis verbleibt. Darüber hinaus wird durch Silikonisierung die Haft- und Gleitreibung zwischen Stopfen und vorgefüllten Spritzen vermindert [87, 89].

Die Silikonisierung erfolgt jedoch nicht immer vollständig. Proteine, die auf die nicht silikonisierten Bereiche der Oberfläche adsorbieren, können durch Goldnanopartikel angefärbt und somit die ungleichmäßige Silikonisierung sichtbar gemacht werden [90]. Außerdem gibt es Hinweise, dass sich nicht vollständig gebundenes Silikonöl von der Oberfläche ablösen und in der Lösung zur Aggregation von Proteinen führen kann [91, 92].

- **Glasart Typ I plus<sup>®</sup> Vials:**

Schott entwickelte das automatisierte "Plasma Impulse Chemical Vapor Deposition"-Verfahren, um eine quarzähnliche, homogene Siliciumdioxidschicht auf die Innenoberfläche handelsüblicher Glasart I Vials aufzubringen. Dabei werden die gewaschenen Glasart I Vials mit einem Gemisch aus reinem Sauerstoff und Silicium begast. Durch Bestrahlung mit Mikrowellenenergie wird ein Plasma entfacht. Dabei kommt es zur Bildung von Siliciummonooxid-Ionen, die mit überschüssigem Sauerstoff an der Innenoberfläche der Vials zu einer Siliciumdioxidschicht reagieren. Der gesamte Vorgang beginnt daraufhin erneut und somit kommt es zur Ausbildung weiterer Siliciumdioxidschichten, bis eine Schichtdicke von 100-200 nm erreicht ist.

Durch derartige Beschichtung der Innenoberfläche wird das Herauslösen von Ionen aus der Packmitteloberfläche unterbunden und die chemische Beständigkeit der Oberfläche erhöht. Daher sind Glasart Typ I plus<sup>®</sup> Vials für Produkte geeignet, die empfindlich auf pH-Verschiebungen reagieren oder mit Ionen aus der Glasoberfläche interagieren. Durch diese inerte Beschichtung kommt es somit zu einer Verringerung der Wechselwirkung zwischen Produkt und Primärpackmittel, was vor allem einen Vorteil für gering konzentrierte Wirkstoffe bietet [93, 94, 95].

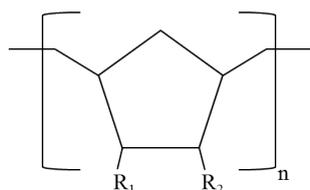
- **Glasart I TopLyo<sup>®</sup> Vials:**

Die Innenoberfläche der Glasart I TopLyo<sup>®</sup> Vials wird durch ein ähnliches Verfahren wie die Glasart Typ I plus<sup>®</sup> Vials beschichtet. Doch durch veränderte Steuerung des Beschichtungsprozesses sowie durch geänderte stöchiometrische Zusammensetzung des Gemisches aus Sauerstoff und Silicium kommt es hierbei zur Bildung einer 40-100 nm dicken Beschichtung der Innenoberfläche, die in diesem Falle zur Hydrophobisierung der Oberfläche führt. Glasart I TopLyo<sup>®</sup> Vials kommen häufig als Primärpackmittel für Lyophilisate zum Einsatz, da die Beschichtung eine homogene und glatte Oberfläche liefert und somit weniger Lyophilisat an der Wandung haften bleibt. Des Weiteren wird durch die Hydrophobizität der Innenoberfläche eine verbesserte Entnehmbarkeit der beinhalteten Lösung erreicht [93, 94].

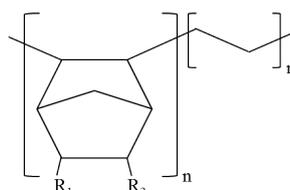
### 2.2.2 Kunststoffvials

Glasvials werden standardmäßig für parenterale Zubereitungen eingesetzt, jedoch kann es beispielsweise durch Ionenfreisetzung aus der Glasoberfläche zu Problemen mit der Arzneistoffformulierung kommen. Daher wird nach Alternativen für Glas gesucht. Mögliche Alternativen sind Kunststoffvials, wie beispielsweise aus Cycloolefinpolymeren (COP, z.B.: CZ<sup>®</sup>) oder Cycloolefin-Copolymeren (COC, z.B. Topas<sup>®</sup>).

Bei der COP-Synthese werden ausschließlich ringförmige Monomere polymerisiert. Die Synthese läuft in einem zweistufigen Prozess ab, wobei es zunächst zu einer ringöffnenden Metathese Polymerisation mit darauffolgender Hydrierung kommt. Die Strukturformel ist Abbildung 2.2a zu entnehmen [96]. COC dagegen wird aus Norbornen und Ethylen durch eine einstufige Polyadditionsreaktion hergestellt. Dabei erhält man die in Abbildung 2.2b dargestellte Strukturformel.



(a) Cycloolefinpolymer (COP)



(b) Cycloolefin-Copolymer (COC)

**Abbildung 2.2:** Strukturformeln des Cycloolefinpolymers (COP) sowie des Cycloolefin-Copolymers (COC) (modifiziert nach [97]).

COP- sowie COC-Vials zeichnen sich aufgrund ihres chemischen Aufbaus im Vergleich zu Glas durch eine verbesserte Stabilität gegenüber Säuren und Basen aus. Außerdem werden keine Ionen aus der Oberfläche derartiger Kunststoffe freigesetzt, wodurch keine chemische Interaktion zwischen Oberfläche und Lösung stattfinden kann. Weitere Vorteile gegenüber Glasvials sind sowohl die Bruchfestigkeit als auch die Anwendungsmöglichkeit dieser Kunststoffe über einen breiten pH-Bereich. Die Hydrophobizität der beiden Olefine bedingt eine gute Entleerbarkeit der beinhalteten Lösungen. Bei all den Vorteilen die derartige Kunststoffe bieten, ist dennoch zu

erwähnen, dass sie im Vergleich zu Glas stärker durchlässig für Gase und Wasserdampf sind, was zu einem Verlust von Lösungsbestandteilen beziehungsweise zur Permeation von Gasen aus der Umgebung durch das Vial hindurch führen kann. Zudem ist Glas im Vergleich zu COC- und COP-Kunststoffen kratzfester [7, 98, 99].

## 2.3 Statistische Versuchsplanung

### 2.3.1 Grundbegriffe der statistischen Versuchsplanung

Unternehmen müssen heutzutage ständig ihre Produkte und Prozesse verbessern, um wettbewerbsfähig zu bleiben. Dies soll im besten Fall auch noch mit geringen Kosten verbunden sein. Häufig gestalten sich diese Verbesserungen schwierig, da der Einfluss einer Vielzahl von Parametern entscheidend ist [16].

R.A. Fisher legte bereits Anfang des 20. Jahrhunderts die Grundlagen für die statistische Versuchsplanung. Dennoch dauerte es bis in die achtziger Jahre hinein, bis diese Methodik weltweit ihren Durchbruch schaffte [100, 101].

Beim klassischen Versuchsaufbau wird pro Versuchsreihe jeweils ein Faktor variiert, wobei die anderen Faktoren konstant gehalten werden. Somit kann ein beobachteter Effekt eindeutig einem Faktor zugeordnet werden. Bei der statistischen Versuchsplanung hingegen werden nun aber mehrere Faktoren gleichzeitig variiert, was zu einer Verringerung der Versuchsanzahl führt. Dennoch erhält man auch hierbei eine klare Aussage durch welchen Faktor der Effekt erzielt wurde, wenn die Faktoren unabhängig voneinander einstellbar sind [16, 101].

In Vorversuchen werden zunächst die Faktorgrenzen ausgetestet und die technische Realisierung der verschiedenen Faktorstufenkombinationen überprüft. Anschließend wird das Untersuchungsziel genau definiert, wofür die Festlegung der Faktoren und Zielgrößen nötig ist. Innerhalb eines Versuchsplans können eine oder mehrere Zielgrößen untersucht werden.

Als Zielgrößen bezeichnet man diejenigen Größen, die eine Veränderung durch unterschiedliche Einstellungen von Faktoren erfahren und durch Versuche bestimmt werden. Faktoren sind Parameter, deren Einstellungen auf mindestens zwei Stufen im Versuchsplan verändert werden. Die Faktorstufen werden in kodierten Einheiten angegeben, um trotz unterschiedlicher Einheiten der Faktoren die Effekte direkt vergleichen zu können. Der Versuchsraum wird durch die untere und obere Stufe, die in kodierten Einheiten als -1 und +1 bezeichnet werden, eingegrenzt. Faktoren lassen sich weiterhin in quantitative und qualitative Faktoren unterteilen. Quantitative Faktoren lassen sich durch eine numerische Kenngröße beschreiben, qualitative Faktoren hingegen nicht [16, 100, 101].

Um zu beschreiben, in welchem Maße und mit welchem Vorzeichen behaftet sich die Zielgröße ändert, wenn der Faktor von Stufe -1 auf +1 variiert wird, wird der Begriff Effekt eingeführt. Man unterscheidet Haupteffekte, die einem bestimmten Faktor zuzuordnen sind, und Wechselwirkungen, wobei die Einstellung eines Faktors den Effekt eines anderen Faktors beeinflusst [100, 101].

Nach Durchführung aller Versuche lässt sich ein mathematisch-statistisches Modell aufstellen, das näherungsweise den Zusammenhang zwischen den untersuchten Faktoren und den Zielgrößen innerhalb des Versuchsraums wiedergibt. Durch das Modell lassen sich Werte für beliebige Punkte innerhalb des Versuchsraums berechnen. Bei Vorhandensein von qualitativen Faktoren wird der Versuchsplan für jeden dieser qualitativen Faktoren erneut durchgeführt. Man erhält dabei für jeden qualitativen Faktoren ein eigenes mathematisches Modell [100].

### 2.3.2 Erstellung von zentral zusammengesetzten Versuchsplänen

Sollen viele Faktoren untersucht werden, so eignen sich Faktorenversuchspläne, bei denen die Faktoren auf zwei Stufen variiert werden. Gleichung (2.2) liefert die Anzahl an möglichen Faktorstufenkombinationen.

$$m = 2^k \quad (2.2)$$

mit

$m$ : Anzahl der Faktorstufenkombinationen im Versuchsplan

$k$ : Anzahl der Faktoren

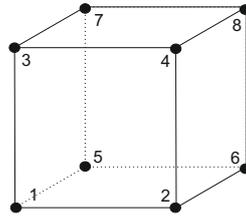
Ausgehend von der Anzahl an Faktorstufenkombinationen können  $2^{k-1}$  Effekte und zusätzlich noch der Gesamtmittelwert aller Ergebnisse berechnet werden. Bei Durchführung aller nach Gleichung (2.2) berechneten Faktorstufenkombinationen erhält man einen vollständigen faktoriellen Versuchsplan.

Bei Untersuchung von beispielsweise drei Faktoren A, B und C auf zwei Stufen erhält man somit  $2^3 = 8$  Faktorstufenkombinationen. In Tabelle 2.1 sind die acht möglichen Faktorstufenkombinationen sowie ihre Wechselwirkungen in kodierten Einheiten in einer Planmatrix abgebildet.

**Tabelle 2.1:** Planmatrix in kodierten Einheiten für einen vollständigen faktoriellen Versuchsplan mit drei Faktoren, die auf jeweils zwei Stufen variiert werden. Daraus ergeben sich  $2^3$ -Faktorstufenkombinationen sowie die Wechselwirkungen AB, BC, AC und ABC.

systematische Nummer	Faktoren			Wechselwirkungen			
	A	B	C	AB	BC	AC	ABC
1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
2	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1
3	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1
4	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1
5	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1	-1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1
8	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1

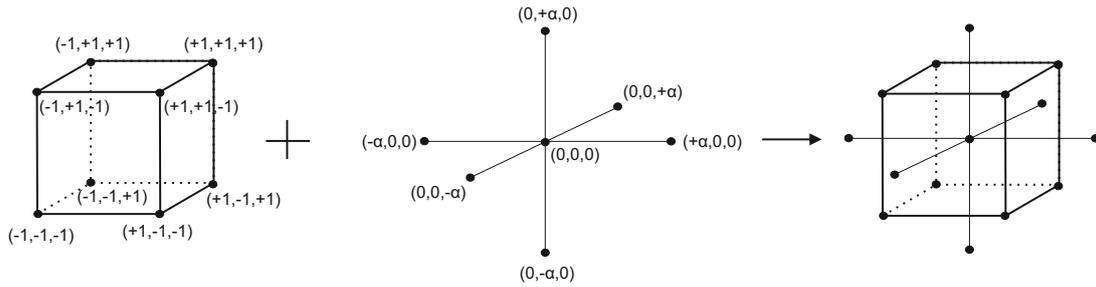
Als Versuchspunkte erhält man hierbei die Ecken eines Würfels, wie in Abbildung 2.3 dargestellt. Bei  $k$ -Faktoren untersucht man die Eckpunkte eines  $k$ -dimensionalen Würfels [16, 100].



**Abbildung 2.3:** Versuchspunkte eines vollständigen  $2^3$ -Plans (modifiziert nach [16]).

Die Versuchsanzahl nimmt bei steigender Anzahl von zu untersuchenden Faktoren im vollständigen faktoriellen Versuchsplan rasch zu und man erhält Informationen über dreifache oder höhere Wechselwirkungen, die sich aber meist kaum von der Versuchsstreuung unterscheiden. Aus diesem Grund gibt es die sogenannten fraktionellen faktoriellen Versuchspläne, bei denen nur ein Teil der nach Gleichung (2.2) möglichen Faktorstufenkombinationen, untersucht wird. Dies wird erreicht, indem höhere Wechselwirkungen mit Faktoren vermengt werden. Zwischen den vermengten Faktoren und Wechselwirkungen ist nun aber keine Effektunterscheidung mehr möglich. Da höhere Wechselwirkungen aber meist vernachlässigbar sind, kann man auch bei Teilfaktorenplänen den berechneten Effekt meist trotzdem einem Faktor zuweisen. Da dem Versuchsplan dieser Arbeit ein vollständiger faktorieller Versuchsplan zugrunde liegt, wird an dieser Stelle nicht weiter auf die Eigenheiten von Teilfaktorenplänen eingegangen [16].

Nimmt man einen linearen Zusammenhang zwischen Faktor und Zielgröße an und will man eine Vielzahl an Faktoren untersuchen, so eignen sich die vollständigen oder fraktionellen Faktorenvorsuchspläne. Geht man aber von einem nichtlinearen Zusammenhang aus, so müssen die Faktoren auf mehr als zwei Stufen variiert werden, um den quadratischen Zusammenhang zwischen Faktoren und Zielgröße beschreiben zu können. Häufig werden dafür zentral zusammengesetzte Versuchspläne eingesetzt. Diesen Plänen liegt ein vollständiger oder fraktioneller Faktorenvorsuchsplan zugrunde, der zusätzlich durch Sternpunkte und den Zentralpunkt ergänzt wird. Die Faktoren werden somit auf fünf Stufen variiert. Bei bis zu vier Faktoren wählt man meist einen vollständigen Faktorenvorsuchsplan als Grundlage. Werden jedoch fünf oder mehr Faktoren untersucht, greift man auf einen Teilfaktorenvorsuchsplan zurück, da sonst die Versuchsanzahl zu groß wird. Am Beispiel eines zentral zusammengesetzten Plans für drei Faktoren ergeben sich die in Abbildung 2.4 gezeigten Versuchspunkte. Die Sternpunkte, deren Stufen mit  $\pm\alpha$  angegeben werden, ragen aus dem Würfel heraus. Der Zentralpunkt erhält die Kodierung 0 [16, 100, 101].



**Abbildung 2.4:** Versuchspunkte eines zentral zusammengesetzten Versuchsplans mit drei Faktoren. Die jeweiligen Stufen sind in kodierten Einheiten angegeben (modifiziert nach [16, 100]).

Zur Berechnung der Gesamtanzahl der Einzelversuche  $N$  in einem zentral zusammengesetzten Plan, dessen Grundlage ein vollständiger Faktorenplan bildet, bedient man sich Gleichung (2.3) [100].

$$N = N_W + N_{St} + N_0 \tag{2.3}$$

mit

- $N$ : Gesamtanzahl der Einzelversuche
- $N_W = 2^k$ : Würfelpunktversuche
- $N_{St} = 2k$ : Sternpunktversuche
- $N_0$ : Zentralpunktversuche

Um Versuchspläne mit Hilfe der Regressionsanalyse auswerten zu können, sollte man Pläne auswählen, die sowohl orthogonal als auch drehbar sind.

Sind die Faktoren unabhängig voneinander einstellbar und sind somit die Effekte einzeln auswertbar, dann liegt ein orthogonaler Plan vor. Stellt man für den Sternpunktabstand  $\alpha$  den aus Gleichung (2.4) berechneten Wert ein, erhält man einen orthogonalen Plan [16, 100].

$$\alpha^2 = \frac{1}{2}(\sqrt{N \cdot N_W} - N_W) \tag{2.4}$$

mit

- $N_W = 2^k$ : Würfelpunktversuche
- $N$ : Gesamtanzahl der Einzelversuche

Durch den Varianz-Inflations-Faktor (VIF) wird verdeutlicht, in welchem Maße sich die Varianz des Modells vergrößert, wenn man einen nicht orthogonalen Plan gewählt hat [101].

Drehbare Pläne haben den Vorteil, dass die Modellwerte für alle Versuchspunkte im Versuchsraum mit derselben Varianz behaftet sind. Dabei ist nur die Entfernung des Versuchspunktes vom Zentralpunkt entscheidend und nicht, in welcher Richtung vom Zentralpunkt er sich be-

findet [101, 100]. Um drehbare Pläne zu erhalten, wird für den Sternpunktabstand  $\alpha$  der nach Gleichung (2.5) berechnete Wert eingestellt.

$$\alpha^2 = \sqrt{2^{k-p}} \quad (2.5)$$

Die Auswirkung der unterschiedlichen Entfernung des Versuchspunktes zum Zentralpunkt lässt sich über den Hebelwert (leverage) charakterisieren. Bei größerer Entfernung vom Zentralpunkt hat dieser Punkt auch einen größeren Einfluss auf die Regressionsgerade. Er hat somit eine größere Hebelwirkung als Versuchspunkte, die näher am Zentralpunkt liegen [16, 101].

Durch geeignete Wahl der Wiederholungen des Zentralpunktes kann man den Versuchsumfang so anpassen, dass die gewählten Einstellungen für  $\alpha$  einen orthogonalen und drehbaren Plan ergeben [16]. Auch die Power ist von der Größe des Stichprobenumfangs abhängig. Als Power  $(1 - \beta)$  wird die Fähigkeit bezeichnet, einen signifikanten Effekt auch als solchen zu erkennen [101].

Um systematische Fehler nicht mit in die Berechnung der Versuchsstreuung oder des Modells miteinzubeziehen, bedient man sich sowohl der Blockbildung als auch der Randomisierung.

Versuche mit systematischen, nicht vermeidbaren Störgrößen oder schwierig zu ändernden Faktorstufen werden in Blöcken zusammengefasst. Störgrößen können beispielsweise die Verwendung von unterschiedlichen Chargen oder die Durchführung der Versuche an mehreren Tagen sein. Diese können zu einer systematischen Veränderung der Ergebnisse führen. Hierbei errechnet sich die Versuchsstreuung nur aus den Schwankungen innerhalb der Blöcke, wodurch sich die Versuchsstreuung, die andernfalls durch mögliche Störgrößen beeinflusst wird, minimiert [16, 100, 101].

Eine weitere Möglichkeit, um systematische, vorher unbekannte Fehler nicht mit in die Modellberechnung einzubeziehen ist die Randomisierung. Dies beschreibt die Durchführung der Versuche in zufälliger Reihenfolge. Die Versuche werden dabei aber nicht in einer beliebigen Reihenfolge durchgeführt, sondern die Abfolge der Versuche wird beispielsweise mittels eines Zufallsgenerators ermittelt. Durch Randomisierung wird erreicht, dass alle Versuche mit der gleichen Wahrscheinlichkeit durch eine mögliche Störgröße beeinflusst werden [16, 101].

Doch nicht bei allen Plänen ist Blockbildung und Randomisierung erforderlich. Zum einen wenn gewährleistet ist, dass alle Versuche unter konstanten Bedingungen durchgeführt werden oder die Faktoren genau und reproduzierbar einstellbar sind. Zum anderen können auch Zeit- oder Kostengründe gegen eine Blockbildung und Randomisierung sprechen [16].

### 2.3.3 Statistische Auswertung von zentral zusammengesetzten Versuchsplänen

Zur Berechnung des Effekts von beispielsweise Faktor A wird die Summe der Mittelwerte der einzelnen Versuche berechnet, sowohl wenn Faktor A auf der +1 Stufe als auch wenn er auf der -1 Stufe eingestellt ist. Dies geschieht unter Berücksichtigung des jeweiligen Vorzeichens, das in der wie in Abschnitt 2.4.2 gezeigten Planmatrix festgelegt ist. Die Differenz dieser beiden Summen wird anschließend durch die Anzahl der Stufenpaare  $(\frac{m}{2})$  dividiert und man erhält den Effekt

für Faktor A. Allgemein berechnen sich Haupteffekte als auch Wechselwirkungseffekte wie in Gleichung 2.6 dargestellt [16, 100].

$$Effekt = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m (Vorzeichen \cdot \bar{y}_i) \quad (2.6)$$

mit

$m$ : Anzahl der Faktorstufenkombinationen  
 $\bar{y}_i$ : Mittelwerte der Zielgröße  $y_i$

Wahre Effekte sind reproduzierbar, wohingegen scheinbare Effekte nicht wiederholbar sind und nur ein zufälliges Ergebnis der Versuchsstreuung sind. Durch scheinbare Effekte wird der Zusammenhang zwischen Faktor und Zielgröße verfälscht, was zu einem schlechter angepassten mathematischen Modell führt. Um wahre Effekte von scheinbaren Effekten zu trennen, bedient man sich der Varianzanalyse (ANalysis Of VAriance, ANOVA). Deren Grundlage bildet die Berechnung der Summe der Quadrate (SQ) der Abweichungen zwischen den Versuchsergebnissen und dem Mittelwert der Versuchsergebnisse (Gleichung 2.7).

$$SQ = \sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2 \quad (2.7)$$

mit

$N$ : Anzahl der Einzelversuche  
 $y_i$ : Wert der Zielgröße  
 $\bar{y}$ : Mittelwert aller  $y$ -Werte

Die Summe der Quadrate setzt sich aus der Summe der Quadrate zwischen den Gruppen (SQ(zwischen)) und der Summe der Quadrate innerhalb der Gruppe (SQ(innerhalb)) zusammen (Gleichung 2.8). SQ(zwischen) beschreibt dabei den Anteil an der Summe der Quadrate, der durch die Effekte erklärbar ist, wohingegen SQ (innerhalb) den Teil der Varianz beschreibt, der nicht den Effekten zuzuordnen ist und auf die Versuchsstreuung zurückzuführen ist [100, 101].

$$SQ = SQ(zwischen) + SQ(innerhalb) \quad (2.8)$$

Wichtig für das weitere Vorgehen ist die Anzahl der Freiheitsgrade (FG). Ein Faktor mit  $n$ -Stufen verfügt über  $n-1$  Freiheitsgrade. Die Freiheitsgrade, die nicht den im Modell verwendeten Faktoren zuzuordnen sind, dienen der Berechnung der Versuchsstreuung.

Die Versuchsstreuung wird meist dadurch bestimmt, dass einzelne Versuche im Versuchsplan mehrfach realisiert werden und ihre Varianz berechnet wird. Ist eine mehrfache Durchführung aus Kosten- oder Zeitgründen nicht möglich, kann man die Versuchsstreuung auch aus höheren Wechselwirkungen schätzen. Denn meistens sind höhere Wechselwirkungen auf zufällige Versuchsstreuung zurückzuführen [16, 100, 101].

Weiterhin wird die mittlere Quadratsumme (MQ) eingeführt, die sich allgemein nach Gleichung 2.9 berechnet.

$$MQ = \frac{SQ}{FG} \quad (2.9)$$

Die berechnete mittlere Quadratsumme, die einem Faktor zuzuordnen ist (MQ (zwischen)), wird mit der mittleren Quadratsumme der Versuchsstreuung  $s^2$  (MQ(innerhalb)) verglichen. Aus diesem Verhältnis erhält man den F-Wert (Gleichung 2.10), mit dessen Hilfe man eine Aussage über die Signifikanz eines Effektes treffen kann.

$$F = \frac{MQ(zwischen)}{MQ(innerhalb)} \quad (2.10)$$

Man geht zunächst davon aus, dass die einzelnen Faktoren keinen Effekt auf die Zielgröße haben (Nullhypothese). Mittels F-Test wird überprüft, ob eine aufgestellte Nullhypothese im Bezug auf das vorher festgelegte Signifikanzniveau  $\alpha$  zu verwerfen ist oder nicht. Hierfür werden die mittleren Quadratsummen der einzelnen Faktoren mit der Signifikanzgrenze  $F_{tab} \cdot s^2$  verglichen. Bei Überschreitung der Signifikanzgrenze wird die Nullhypothese zum Signifikanzniveau  $\alpha$  verworfen und ein signifikanter Effekt des Faktors angenommen. Ein üblicher Wert für  $\alpha$  liegt bei 0,05. Der Wert für  $F_{tab}$  wird unter Berücksichtigung der beiden Freiheitsgrade  $f_1$  (FG zur Bestimmung der Faktoren im Modell) und  $f_2$  (FG zur Berechnung der Versuchsstreuung) sowie des Signifikanzniveaus  $\alpha$  einer Tabelle entnommen. Analog zum F-Wert kann auch der p-Wert zur Testentscheidung genutzt werden. Bei Zutreffen der Nullhypothese gibt der p-Wert die Wahrscheinlichkeit an, den berechneten F-Wert oder einen extremeren Wert zu beobachten. Ist der berechnete p-Wert kleiner als das Signifikanzniveau, geht man von einem signifikanten Effekt aus [16, 100, 101].

Das mathematische Modell soll den Zusammenhang zwischen Faktor  $x'$  und Zielgröße  $y$  so gut wie möglich beschreiben. Die Regressionskoeffizienten  $b_i$  bzw.  $b_{ij}$  quantifizieren diesen Zusammenhang.  $b_0$  beschreibt weiterhin die mittlere Zielgröße. Bei Vorliegen eines linearen Zusammenhangs errechnet sich dieses Modell mittels Gleichung 2.11.

$$\hat{y} = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i x'_i + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_j^k b_{ij} x'_i x'_j \quad (2.11)$$

mit

$\hat{y}$ :	berechneter Modellwert
$b_0$ :	mittlere Zielgröße
$b_{1,2,\dots,i}$ :	Regressionskoeffizient

Bei Vorliegen von quadratischen Effekten erweitert sich Gleichung 2.11 zu Gleichung 2.12.

$$\hat{y} = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i x'_i + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_j^k b_{ij} x'_i x'_j + \sum_{i=1}^k b_{ii} x'^2_i \quad (2.12)$$

Die Regressionsgerade wird so erstellt, dass die Summe der Quadrate ( $SQ'$ ) der Abweichungen zwischen dem Versuchswert und dem berechneten Modellwert möglichst klein ist (Gleichung 2.13) [16, 100].

$$SQ' = \sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (2.13)$$

Um zu beurteilen, wie gut die Regressionsgerade an die Versuchsergebnisse angepasst ist, verwendet man das Bestimmtheitsmaß  $R^2$ . Dieses drückt aus, zu welchem Maß  $SQ'$  durch die Regressionsgerade erklärt wird. Im Idealfall stimmen alle Versuchsergebnisse mit den Modellwerten überein und man erhält ein Bestimmtheitsmaß von 1. Dennoch sollte man sich nicht allein auf die rechnerischen Ergebnisse verlassen, sondern auch immer die grafische Auswertung zu Rate ziehen [16].

Der Lack of fit dient zur Überprüfung des aufgestellten Modells, ob dieses signifikant von den Versuchsergebnissen abweicht. Auch hierbei wird wie bei der Prüfung der Effekte auf Signifikanz geprüft. Dafür wird die Abweichung der Mittelwerte von der Regressionsgeraden (Lack of fit) mit der Versuchsstreuung (Pure Error) verglichen. Es sollte sich ein nicht signifikanter Lack of fit errechnen, da die Daten andernfalls schlecht durch das Modell beschrieben werden [16, 100].

Zur Prüfung auf mögliche Abweichungen zwischen Versuchsergebnissen und Modellwerten bedient man sich der sogenannten Residuenplots. Residuen sind Abweichungen der Messwerte von der Regressionsgeraden ( $y_i - \hat{y}_i$ ). Sie können auch Hinweise auf den Ursprung beobachteter Ausreißer liefern. Im Folgenden werden vier Plots vorgestellt [16, 100, 101]:

- **Auftragen der Modellwerte gegen die tatsächlich gemessenen Werte:**

Bei Vorliegen eines geeigneten Modells liegen die Punkte hierbei näherungsweise auf einer Ausgleichsgeraden. Mögliche Ausreißer folgen der Geraden nicht.

- **Auftragen der Residuen in der durchgeführten Reihenfolge:**

Ausreißer lassen sich auch hierbei schnell erkennen und sich eindeutig einem bestimmten Versuch zuordnen. Man erkennt auch Veränderungen, die während des Versuchsplans auftreten und die Versuchsergebnisse beeinflussen (z.B. nachlassende Intensität einer UV-Lampe zur Detektion). Dies ist aber nur dann möglich, wenn die Versuche randomisiert durchgeführt wurden. Andernfalls geht dieser Trend mit in den Effekt ein, wie bereits unter 2.4.2 beschrieben. Ist kein Ausreißer vorhanden, schwanken die aufgetragenen  $y$ -Werte gleichmäßig um 0.

- **Auftragen der Residuen gegen die berechneten Modellwerte:**

Dieser Plot zeigt an, ob die Varianz von der Größe der  $y$ -Werte abhängt und wird daher genutzt, um auf Varianzenhomogenität in den einzelnen Versuchspunkten zu prüfen, die eine Voraussetzung statistischer Analysen ist. Bei gleichen Varianzen liegen die Punkte um die x-Achse herum verteilt und Punkte mit abweichenden Varianzen sind schnell zu erkennen. Sollte eine Abhängigkeit erkennbar sein, kann dies in manchen Fällen durch eine geeigne-

te Transformation der  $y$ -Werte gelöst werden. Um herauszufinden, welche Transformation geeignet ist, verwendet man den nach seinen Erfindern benannten Box-Cox-Plot.

- **Wahrscheinlichkeitsnetz (Normal-Plot):**

Eine weitere Voraussetzung statistischer Analysen ist neben der Varianzenhomogenität die Normalverteilung der Zielgröße  $y$ , die mittels dieses Plots überprüft werden kann. Zufällige Schwankungen sind normalverteilt und liegen im Wahrscheinlichkeitsnetz auf einer Ausgleichsgeraden. Systematische Schwankungen hingegen weichen von dieser Ausgleichsgeraden ab.

## 3 Auswahl und Charakterisierung der Reaktionspartner

### 3.1 Auswahl und Charakterisierung des Modellproteins

#### 3.1.1 Auswahlkriterien für die Verwendung von Bovinem Serum Albumin als Modellprotein

Albumin wird in verschiedensten Fragestellungen als Modellprotein herangezogen. Dazu gehören neben elektrophoretischen und chromatographischen Methoden auch die Anwendung im Rahmen kolorimetrischer Assays, wie beispielsweise dem BCA Assay [66, 102]. Weiterhin diente Albumin bereits als Modellprotein zur Untersuchung der Proteinadsorption an verschiedene Oberflächen. Dabei wurde die Adsorption von Albumin auf verschiedene Polymere wie beispielsweise Polystyren, Polymethylmethacrylat [59] und Polyurethan [103] untersucht. Aber auch andere Oberflächen wie Glas [8] oder Metalloberflächen [22] waren Gegenstand der Untersuchungen. Dabei konnte stets eine messbare Proteinadsorption ermittelt werden.

Darüber hinaus werden Albumine, wie bereits unter 2.1.5 erwähnt, zu Proteinformulierungen hinzugegeben, um die Proteinadsorption von therapeutischen Proteinen an Primärpackmittel zu unterbinden. Die Verhinderung der Proteinadsorption durch Albumin ist jedoch nicht immer erfolgreich [25, 26, 27]. Zudem bewahrt Bovines Serum Albumin (BSA), aufgrund seiner tensidartigen Eigenschaften, Proteine in Lösung vor der Aggregation. Ein Beispiel für die Anwendung von BSA als Hilfsstoff in Proteinformulierungen stellt Kogenate<sup>®</sup> dar [104].

Da Albumin ein sehr gut charakterisiertes Protein darstellt, das bereits zur Untersuchung der Proteinadsorption an Oberflächen eingesetzt wurde und weiterhin weltweit verfügbar und günstig zu erstehen ist, wurde es in der vorliegenden Arbeit als Modellprotein ausgewählt.

#### 3.1.2 Struktur und chemische Eigenschaften von Bovinem Serum Albumin

Bei Albumin, das eine herzförmige Struktur aufweist, handelt es sich um einen Vertreter der globulären Proteine, wozu auch beispielsweise die Namensgeber dieser Familie, die Globuline, gehören. Die Bildung von Albumin, dem am häufigsten vorkommenden Plasmaprotein, erfolgt in der Leber. Es liegt im Vergleich zu den meisten Plasmaproteinen nicht glykosyliert vor.

Albumine, deren Sekundärstruktur sich zu großen Teilen aus  $\alpha$ -Helix zusammensetzt, bestehen aus jeweils drei homologen Domänen. Jede dieser Domänen verfügt über unterschiedliche Bindungsaffinitäten für verschiedenartige Liganden. Daraus ergibt sich eine Hauptfunktion von Albumin im Körper. Es bindet und transportiert sowohl endogene (z.B. Fettsäuren, Calcium oder Steroide) als auch exogene Substanzen (z.B. therapeutische Wirkstoffe). Neben der Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks, ist der Beitrag zur puffernden Wirkung der Plasmaproteine eine weitere Funktion von Albumin im Körper.

BSA hat eine molekulare Masse von 66,411 kDa und besteht aus 583 Aminosäuren. Durchschnittliche Proteine verfügen über 6 Tryptophane in ihrer Aminosäuresequenz, BSA hingegen besitzt

nur zwei. Aus diesem Grund verfügt BSA über eine schwächere Absorptionsintensität als viele Proteine bei Anregung der intrinsischen Fluoreszenz [105].

Bei neutralem pH-Wert liegt die Normalform vor. Im Vergleich dazu ändert sich bei sauren pH-Werten der Entfaltungsgrad sowie der helikale Anteil der Sekundärstruktur. Eine veränderte Bindungsaffinität für verschiedene Liganden liegt bei basischem pH-Wert vor. Bei Änderung des pH-Wertes sind die pH-abhängigen Isomerisationen jedoch reversibel [105, 106, 107].

Ausgehend von der Molekülstruktur von humanem Serumalbumin, das eine ähnliche Molekülstruktur wie BSA besitzt, konnte die maximale Menge berechnet werden, die auf Oberflächen pro Quadratmeter adsorbieren kann. Dabei ergab sich für eine Adsorption mit dem Ende voran (end-on) eine Menge von  $9,0 \text{ mg/m}^2$ , bei einer seitlichen Adsorption (side-on), wobei mehr Platz auf der Oberfläche verbraucht wird, können maximal  $3,6 \text{ mg/m}^2$  adsorbieren [5].

### 3.1.3 Bestimmung des isoelektrischen Punkts von Bovinem Serum Albumin

#### 3.1.3.1 Messprinzip

Partikel werden in Lösung von einer elektrischen Doppelschicht umgeben. Direkt auf der Oberfläche kommt es zur Anlagerung einer monomolekularen Schicht von Gegenionen, der sogenannten inneren Helmholtzschicht. Auf diese innere Helmholtzschicht lagert sich eine zweite Schicht aus Ionen, die die entgegengesetzte Ladung wie die erste Schicht trägt (äußere Helmholtzschicht). Die innere und äußere Helmholtzschicht werden als Sternschicht zusammengefasst. Entfernt man sich nun weiter von der Oberfläche des Partikels, wird es von einer diffusen, locker gebundenen Schicht aus Ionen positiver sowie negativer Ladung umgeben. Bewegt sich nun das Partikel in Lösung, bewegt sich die Sternschicht in die gleiche Richtung. Die diffuse Schicht jedoch bewegt sich dabei nicht mit und es kommt zur Abscherung von Ionen an der Grenzfläche zwischen Sternschicht und diffuser Schicht. Das an dieser Scherschicht entstehende Potential wird als Zetapotential bezeichnet [87, 108].

Das Zetapotential berechnet sich allgemein nach der Henry Gleichung, die in Gleichung 3.1 dargestellt ist. Die Henry Funktion  $f(k_a)$  beschreibt dabei die Relation der Doppelschichtdicke zur Teilchengröße [109].

$$\mu_e = \frac{2\varepsilon\zeta f(k_a)}{3\eta} \quad (3.1)$$

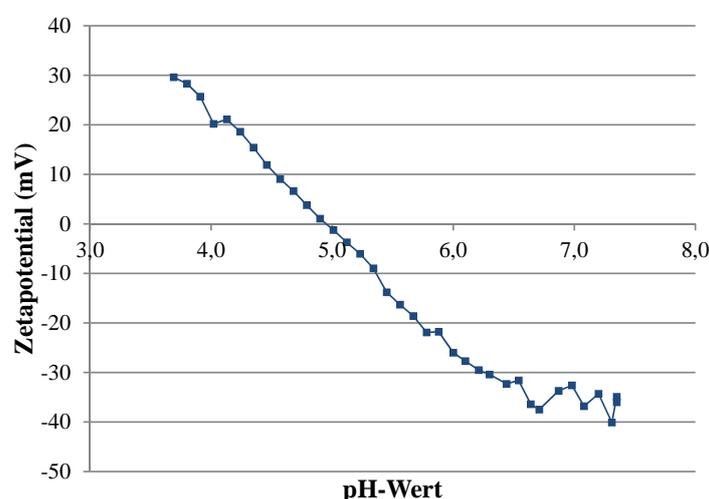
mit

- $\mu_e$ : elektrophoretische Mobilität
- $\varepsilon$ : dielektrische Konstante
- $\zeta$ : Zetapotential
- $f(k_a)$ : Henrys Funktion
- $\eta$ : Viskosität

Die Bestimmung des Zetapotentials erfolgte indirekt durch Messung der elektrophoretischen Mobilität, die durch die Laser-Doppler-Elektrophorese ermittelt wurde. Der Detektor erfasst die Fluktuationsrate der Lichtintensität, die proportional zur Geschwindigkeit der Partikel sind. Die Messung des Zetapotentials kann zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes von Proteinen genutzt werden, wobei das Zetapotential bei diesem pH-Wert einen Wert von null annimmt [109].

### 3.1.3.2 Ergebnisse und Diskussion

Laut Literatur befindet sich der isoelektrische Punkt von BSA zwischen 4,7 und 5,0 [61, 105]. Zur genauen Bestimmung des isoelektrischen Punktes wurde eine 10 mg/ml konzentrierte BSA Lösung hergestellt, die mit 0,01 N Salzsäure titriert wurde. Der isoelektrische Punkt konnte aus dem Schnittpunkt der Zetapotentialkurve mit der x-Achse aus Abbildung 3.1 abgelesen werden. Somit ergab sich ein isoelektrischer Punkt von  $\text{pH } 4,98 \pm 0,03$  für das verwendete BSA.



**Abbildung 3.1:** Messung des Zetapotentials zur Ermittlung des isoelektrischen Punktes von BSA. Der isoelektrische Punkt befindet sich bei einem Zetapotential von null.

## 3.2 Auswahl und Charakterisierung der Primärpackmittel

### 3.2.1 Auswahlkriterien für die Verwendung der untersuchten Primärpackmittel

Die unter 2.2 beschriebenen Primärpackmittel dienen als Oberflächen zur Untersuchung der adsorbierten BSA-Menge, da diese Vialarten in der pharmazeutischen Industrie als Primärpackmittel für therapeutische Proteine eingesetzt werden. Bei den Glasart I Vials handelt es sich um das Standardpackmittel für parenterale Zubereitungen, wie beispielsweise Betaferon<sup>®</sup>. Glasart I plus<sup>®</sup>-Vials, die als Primärpackmittel für Kogenate<sup>®</sup> eingesetzt werden, verfügen ebenso über eine hydrophile Innenoberfläche, woraus aufgrund einer aufgetragenen Siliciumdioxidschicht kaum Ionen aus der Oberfläche wie bei Glasart I Vials herausgelöst werden. Da sowohl hydrophile als auch hydrophobe Oberflächen mit in die Untersuchungen einbezogen werden sollten,

wurden auch silikonisierte Glasart I- sowie Glasart I TopLyo<sup>®</sup> Vials untersucht, die jeweils eine hydrophobisierte Innenoberfläche aufweisen. Zudem werden Glasart I TopLyo<sup>®</sup> Vials häufig als Primärpackmittel für Lyophilisate gewählt, was den Einsatz in der untersuchten Fragestellung sinnvoll macht. Die Untersuchung von Kunststoffvials aus COP (z.B. CZ<sup>®</sup>) und COC (z.B. Topas<sup>®</sup>) komplettierte die Primärpackmittelauswahl. Denn es gab bereits Hinweise, dass es auf derartigen Kunststoffvials zu geringerer Proteinadsorption als auf Glasart I Vials kommt [7].

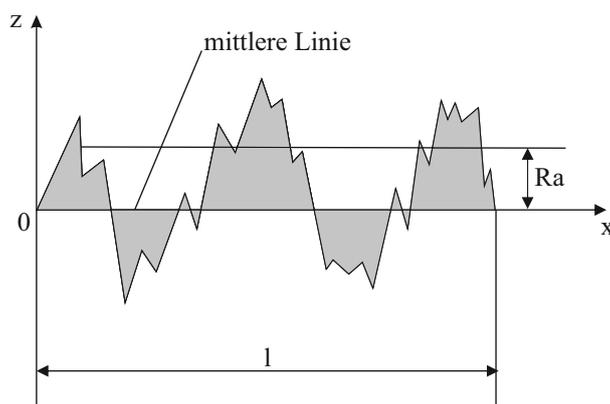
### 3.2.2 Bestimmung der Oberflächenrauheit

#### 3.2.2.1 Messprinzip

Die Oberflächenrauheit beeinflusst, wie bereits unter 2.1.4 beschrieben, die adsorbierte Proteinmenge. Meist nimmt die adsorbierte Proteinmenge in dem Maße zu, in welchem sich die Oberfläche durch die vorhandene Rauheit vergrößert. Jedoch korreliert die Vergrößerung der Oberfläche nicht immer mit der Zunahme der adsorbierten Menge [56, 57, 58].

Ursprünglich wurde die Oberflächenrauheit zur Beurteilung der Oberfläche von Werkstücken eingesetzt. Heutzutage findet sie unter anderem auch Einsatz bei der Untersuchung des Einflusses auf die Proteinadsorption an Oberflächen [56, 58]. Gemessen wird hierbei die Abweichung des Profils von einer glatten Oberfläche. Man kann zwischen taktilen und optischen Geräten unterscheiden, wobei die Rauheit entweder durch Abtasten der Oberfläche oder berührungslos bestimmt wird.

Zur Auswertung der Oberflächenrauheit können verschiedene Kennwerte herangezogen werden. Bei  $R_a$  handelt es sich um den arithmetischen Mittenrauhwert, der weltweit angewandt wird. Dabei wird eine Linie derart in das Profil gelegt, so dass die Standardabweichung der Oberfläche von der Linie minimal ist (Abbildung 3.2). Dadurch ist  $R_a$  weniger empfindlich gegenüber Ausreißern, was zu geringen Schwankungen der Werte führt. Den mathematischen Zusammenhang liefert Gleichung 3.2. Weitere ermittelbare Rauheitskennwerte sind  $R_z$ ,  $R_q$  sowie  $R_{max}$ . [110, 111].



**Abbildung 3.2:** Bestimmung des arithmetischen Mittenrauhwertes  $R_a$  über die Standardabweichung des Profils von der mittleren Linie (modifiziert nach [110]).

$$R_a = \frac{1}{l} \int_0^l |f(x)| dx \quad (3.2)$$

mit

$f(x)$ : Funktion der Abweichung des Profils von der glatten Oberfläche

$l$ : Messstrecke

$R_a$ : arithmetischer Mittenrauhwert

Für die Messung werden kleine, möglichst plane Probenstücke benötigt. Daher wurden aus den Vials mittels Glas- bzw. Trennschneider definierte Stücke aus dem Boden sowie aus den Seitenwänden herausgeschnitten. Pro Packmittel wurden verschiedene Bruchstücke der Seitenwände sowie des Bodens analysiert. Dazu wurden sie unter dem Sensor platziert und jeweils ein Bildausschnitt von 500 x 500 µm abgerastert. Bei dem FRT CWL Sensor handelt es sich um einen Weißlichtsensor, der die Probe mit weißem Licht bestrahlt. Durch Reflektion des Lichts kann die Entfernung des Sensors zur Probe gemessen werden. Unter Verwendung der FRT Mark III Software wurde für jedes Bruchstück der jeweilige  $R_a$ -Wert ermittelt.

Die Messparameter des FRT MicroProf<sup>®</sup> sowie die eingestellten Parameter für die durchgeführten Messungen sind im Folgenden wiedergegeben:

#### **FRT MicroProf<sup>®</sup> MPR 20000**

xy-Bereich	200 x 200 mm <sup>2</sup>
Minimaler Punktbereich	0,6 µm

#### **FRT CWL Sensor**

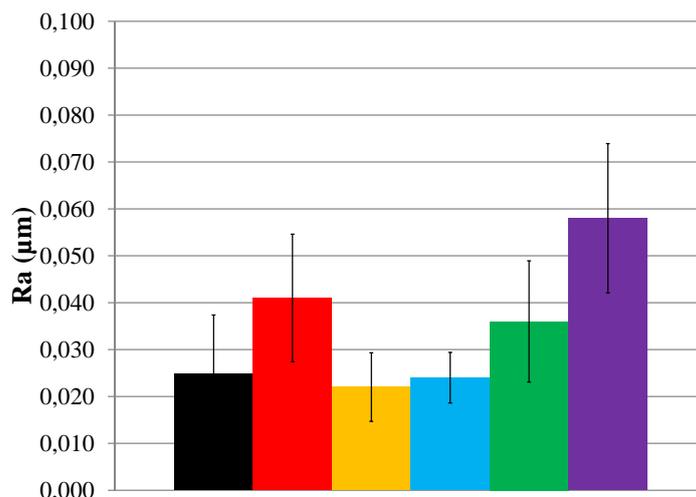
Messbereich	300 µm
Lichtquelle	Weißlicht, Halogen
Maximale Messrate	1000 Hz
Arbeitsabstand	ca. 5 mm

#### **Messung**

Gemessener Bildausschnitt	500 x 500 µm
Messrate	100 Hz
Punktabstand	2 µm

#### **3.2.2.2 Ergebnisse und Diskussion**

Zur Bestimmung des Mittenrauhwertes wurden je drei Bruchstücke von den Seitenwänden und dem Boden vermessen. Auf jedem Bruchstück wurden drei unterschiedliche Bildausschnitte untersucht. Zur Anwendung kamen Glasart I-, Glasart I TopLyo<sup>®</sup>-, Glasart I plus<sup>®</sup>-, COC (Topas<sup>®</sup>)- und COP (CZ<sup>®</sup>) Vials. In Abbildung 3.3 ist eine Übersicht über die erhaltenen  $R_a$ -Werte gegeben.



**Abbildung 3.3:** Untersuchung der Oberflächenrauheit von Glasart I Vials (■), Glasart I TopLyo<sup>®</sup> Vials (■), silikonisierten Glasart I Vials (■), Glasart I plus<sup>®</sup> Vials (■), CZ<sup>®</sup> Vials (■) sowie von Topas<sup>®</sup> Vials (■). Dazu wurde jeweils ein Bildausschnitt von 500 x 500  $\mu\text{m}$  untersucht und der Rauheitswert  $R_a$  bestimmt ( $n=4$ ).

Je nach Rauigkeit der Werkstücke werden diese in die Klassen N1 bis N11 eingeteilt, was Rauigkeiten von 0,025  $\mu\text{m}$  bis 25  $\mu\text{m}$  umfasst [111]. Diese Einteilung findet aber in der Beurteilung von Packmitteloberflächen keine Anwendung, da in diesem Fall die Unterschiede in der Rauigkeit so gering sind. Alle üblichen Primärpackmittel würden daher in dieselbe Klasse fallen oder aufgrund von geringeren  $R_a$ -Werten gar nicht von der Klasseneinteilung erfasst werden.

Die  $R_a$ -Werte der untersuchten Vialarten lagen zwischen 0,022  $\mu\text{m}$  für silikonisierte Glasart I Vials und 0,058  $\mu\text{m}$  für Topas<sup>®</sup> Vials. Bezieht man die jeweiligen Standardabweichungen mit ein, zeigten die erhaltenen  $R_a$ -Werte kaum einen Unterschied. Daher wird kein Einfluss der Oberflächenrauheit auf die Proteinadsorption bei den untersuchten Primärpackmitteln erwartet.

### 3.3 Zusammenfassung

Bei BSA handelt es sich um ein gut charakterisiertes Protein, das unter anderem bereits zur Untersuchung der Proteinadsorption an Oberflächen eingesetzt wurde. Daher wurde es als Modellprotein ausgewählt. Der isoelektrische Punkt des verwendeten BSA wurde durch Zetapotentialmessung mit einem pH-Wert von  $4,98 \pm 0,03$  bestimmt.

Als Primärpackmittel wurden sowohl hydrophile Oberflächen (Glasart I- und Glasart I plus<sup>®</sup> Vials) als auch hydrophobe Oberflächen (silikonisierte Glasart I- und Glasart I TopLyo<sup>®</sup>-Vials) ausgewählt. Auch kamen zwei verschiedene Kunststoffvials (CZ<sup>®</sup>- und Topas<sup>®</sup>-Vials) zum Einsatz.

Die ermittelten Oberflächenrauheiten der verschiedenen Primärpackmittel lagen im gleichen Größenbereich. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Oberflächenrauheit der untersuchten Primärpackmittel keinen Einfluss auf die adsorbierte Proteinmenge zeigt.

### 3.4 Geräte und Materialien

#### Geräte

<b>Analysenwaage</b>	Analysenwaage Genius, Sartorius AG
<b>Millipore Anlage</b>	Milli-Q <sup>®</sup> -Advantage A10 <sup>®</sup> , Merck Millipore
<b>Oberflächenrauheitsmessung</b>	FRT MicroProf <sup>®</sup> 20000, FRT GmbH
<b>Zetapotentialmessung</b>	Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments
Software	FRT Mark III, Version 3.8.15

#### Materialien

Bovines Serum Albumin	Sigma Aldrich, Steinheim A3059
Omniflex 3G Stopfen, 10 ml	Helvoet Pharma, Ittersbach V9396
Vials aus COC (Topas <sup>®</sup> ), 10 ml	Schott AG, Mainz
Vials aus COP (CZ <sup>®</sup> ), 10 ml	Daikyo Seiko Ltd., Tokyo
Vials Glasart Typ I, 10 ml	Schott AG, Mainz
Vials Glasart Typ I plus <sup>®</sup> , 10 ml	Schott AG, Mainz
Vials Glasart Typ I silikonisiert, 30 ml	Schott AG, Mainz
Vials Glasart Typ I TopLyo <sup>®</sup> , 10 ml	Schott AG, Mainz

## 4 Methodenentwicklung zur Bestimmung der adsorbierten Proteinmenge an Primärpackmittel

Sowohl kolorimetrische Proteinassays, wie der Coomassieblau- und der Micro BCA-Assay, als auch die SE-HPLC wurden zur Quantifizierung der adsorbierten BSA-Menge eingesetzt. Zur Einstellung des pH-Wertes von 4,98 wurde BSA, wenn nicht anders erwähnt, jeweils in einem 50 mM Natriumacetatpuffer gelöst. Zum Erlangen eines pH-Wertes von 7,4 diente jeweils Dulbecco's PBS-Puffer (phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung), dessen Zusammensetzung wie folgt war:

Natriumchlorid:	136,9 mM
Kaliumchlorid:	2,7 mM
Dinatriumhydrogenphosphat:	8,1 mM
Kaliumdihydrogenphosphat:	1,5 mM
Magnesiumchlorid(alsHexahydrat):	0,5 mM
Calciumchlorid:	0,9 mM

Wenn nicht anders vermerkt, wurden die Proteinlösungen im Rahmen der Vorversuche und zur Entwicklung der verschiedenen Methoden jeweils für 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Ausgehend von den Kalibriergeraden der im Folgenden entwickelten Methoden wurden die adsorbierten Proteinkonzentrationen in  $\mu\text{g}/\text{ml}$  erhalten. Durch unterschiedlichen geometrischen Aufbau wurde bei Befüllung der verschiedenen Primärpackmittel mit je 10,0 ml Lösung eine variierende Innenoberfläche benetzt. Zur besseren Vergleichbarkeit erfolgte eine Umrechnung der ermittelten Probenwerte in  $\text{mg}/\text{m}^2$ . Die verwendeten Primärpackmittel sowie deren errechnete, benetzte Innenoberfläche bei Befüllung mit 10,0 ml sind in Tabelle 4.1 aufgeführt.

**Tabelle 4.1:** Übersicht der verwendeten Primärpackmittel unter Angabe der benetzten Innenoberfläche bei Befüllung mit 10,0 ml Lösung

verwendete Primärpackmittel	Befüllung mit [ml]	benetzte Oberfläche [ $\text{cm}^2$ ]
Glasart I Vials	10,0	24,05
Glasart I plus <sup>®</sup> Vials	10,0	24,05
Glasart I TopLyo <sup>®</sup> Vials	10,0	24,05
COC Vials (Topas <sup>®</sup> )	10,0	21,88
COP Vials (CZ <sup>®</sup> )	10,0	21,64

#### 4.1 Auswahl geeigneter Bestimmungsmethoden

Wie bereits in Kapitel 2.1.5 erwähnt, gibt es viele Möglichkeiten, die adsorbierte Proteinmenge an Oberflächen zu bestimmen. Da das Risiko, die Adsorptionseigenschaften der Proteine durch radioaktive Markierung oder Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen zu verändern, zu groß erschien, wurde dieser Methodenansatz nicht weiter verfolgt. Auch war der Einsatz der Ellipsometrie in der vorliegenden Fragestellung nicht möglich, da dazu plane und reflektierende Oberflächen vorausgesetzt werden. Viele neuere Technologien verlangen zudem das Vorliegen trockener Proteinfilme, was aber nicht den natürlichen Bedingungen entspricht. Ziel dieser Arbeit war es, die Proteinadsorption an Primärpackmitteloberflächen unter natürlichen Bedingungen zu bestimmen.

Die Literatur zeigt, dass nur einige Milligramm Protein pro Quadratmeter Oberfläche adsorbieren [4, 5]. Daher wurde nach Möglichkeiten gesucht, das Protein direkt auf der Oberfläche zu bestimmen oder es von der Oberfläche abzulösen und anschließend zu vermessen.

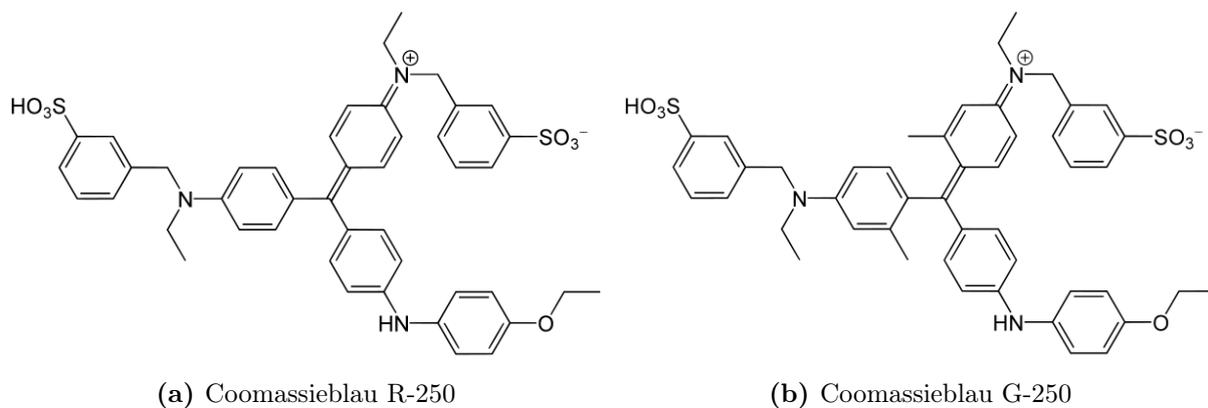
Proteinassays liefern eine schnelle und preisgünstige Möglichkeit, die adsorbierte Proteinkonzentration zu bestimmen. Dabei reagieren Proteine mit verschiedenen Farbstoffen, was zu veränderten, spektroskopisch messbaren Absorptionseigenschaften dieser Farbstoffe führt. Eine Zunahme der Proteinkonzentration zeigt sich dabei in steigender Farbstoffintensität. Biuret-, Lowry- und BCA-Assay laufen im Alkalischen ab, wohingegen der Bradford-Assay ein saures Milieu benötigt. Jeder dieser Assays interferiert mit verschiedenen, störenden Substanzen, weshalb bei Auswahl eines Proteinassays auf die Zusammensetzung der Probenlösung zu achten ist. Dabei ist das Folin-Ciocalteu Reagenz des Lowry-Assays im Vergleich zu den Farbstoffen der anderen kolorimetrischen Assays besonders anfällig für eine Vielzahl von Substanzen, die regelmäßig in der Proteinanalytik zum Einsatz kommen. Aus diesem Grund wurde der Lowry-Assay für die Proteinmengenbestimmung in dieser Arbeit nicht eingesetzt. Jedoch schienen Coomassieblau und die Bicinchoninsäure des BCA-Assays geeignet, um die adsorbierte Proteinmenge in den vorliegenden Formulierungen zu erfassen [29, 64, 66, 112]. Auch konnte bereits die Anwendbarkeit von Coomassieblau und dem BCA-Assay zur Bestimmung der adsorbierten Proteinmenge an Primärpackmittel gezeigt werden [14, 74].

Einen weiteren Ansatz zur Bestimmung der adsorbierten Proteinmenge stellt die HPLC dar. Dabei handelt es sich um eine reproduzierbare und schnelle Methode, um selbst geringe Mengen an Protein zu bestimmen. Zudem kann diese analytische Methode zur Bestimmung verschiedenster Proteine eingesetzt werden, beispielsweise durch unterschiedliche chromatographische Trennmodi oder durch Auswahl verschiedener Säulen und Elutionsmittel. Es konnte weiterhin bereits gezeigt werden, dass mittels RP- und SE-HPLC eine Bestimmung der adsorbierten Proteinmengen an Primärpackmittel möglich ist [7, 13, 14]. Daher wurde die Anwendung der HPLC bei der Bearbeitung der vorliegenden Fragestellung weiterverfolgt.

## 4.2 Visualisierung und Bestimmung der adsorbierten Proteinmenge mittels Coomassieblau

### 4.2.1 Messprinzip

Bei Coomassieblau R-250 und G-250 handelt es sich um anionische Triphenylmethanfarbstoffe. Coomassieblau R-250 wird seit Beschreibung durch Fazekas de St. Groth et al. [113] häufig für das Anfärben von Elektrophoresegelen verwendet. Coomassieblau G-250 hingegen, das zwei Methylgruppen mehr als Coomassieblau R-250 aufweist, kommt beispielsweise im Bradford-Assay zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen zum Einsatz [64]. Die Strukturformeln sind den Abbildungen 4.1a und 4.1b zu entnehmen.



**Abbildung 4.1:** Strukturformeln von Coomassieblau R-250 und Coomassieblau G-250 [114]

Zunächst liegt der Farbstoff in seiner ungebundenen, kationischen Form vor. Das Absorptionsmaximum von Coomassieblau wird durch Bindung an Proteine unter sauren Milieubedingungen von 465 nm auf 595 nm verschoben, wodurch sich die Farbe von rot nach blau verändert. Durch Bindung an Proteine wird vermutlich die unprotonierte, anionische Sulfatform des Farbstoffes stabilisiert. Coomassieblau bindet dabei vor allem an Arginin, in geringerem Ausmaß aber auch an Lysin, Histidin, Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin [29, 64, 112].

Des Weiteren kann Coomassieblau auch zum Anfärben von adsorbierten Proteinen an Primärpackmittel genutzt werden. Dabei lassen sich durch visuellen Vergleich der angefärbten Packmittel relative Unterschiede der adsorbierten Menge feststellen, jedoch erhält man keine quantitative Angabe der adsorbierten Menge [74].

### Visualisierung der adsorbierten Proteinmenge:

Es wurden BSA-Lösungen mit den Konzentrationen 1000,0 µg/ml und 10 000,0 µg/ml hergestellt. Als pH-Wert der Lösung wurde der isoelektrische Punkt von BSA (pH 4,98) gewählt, da somit im Vergleich zu einem anderen pH-Wert mehr Proteinadsorption erwartet wurde, wie bereits in Kapitel 2.1.4 näher erläutert. Die verschiedenen Primärpackmittel wurden mit 10,0 ml BSA-Lösung befüllt, mit Stopfen verschlossen, verbördelt und anschließend für 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationsdauer wurden die Proteinlösungen ent-

leert und die Vials dreimal mit dem Inkubationspuffer und daraufhin zehnmal mit Millipore-Wasser gewaschen, um lose adsorbierte Proteine abzuspülen. Zu jedem Vial wurden anschließend 10,0 ml Coomassieblau G-250 Lösung gegeben, die Vials mit Stopfen verschlossen, verbördelt und für weitere 24 Stunden bei 50 Runden/Minute auf den Rühr Tisch gestellt. Nach Ablauf der 24 Stunden wurde die Coomassieblaulösung aus den Vials entfernt und die Vials fünfmal mit Millipore-Wasser gewaschen, um nicht gebundenes Coomassieblau abzuspülen. Der nun erhaltene, angefärbte Zustand der Vials wurde anhand von Fotos dokumentiert und die Intensität der gefärbten Vialoberflächen visuell verglichen.

#### **Bestimmung der adsorbierten Proteinmenge (Coomassieblau-Assay):**

Waxman und Vilivalam [74] ermittelten die adsorbierte BSA- und IgG-Menge auf Glasart I- und CZ<sup>®</sup>-Vials, indem sie die adsorbierte Proteinschicht mit Coomassieblau anfärbten. Darauf aufbauend wurde in der vorliegenden Arbeit die adsorbierte BSA-Menge auf ausgewählte Primärpackmittel quantifiziert.

Die Vials, die zur Kalibrierung genutzt wurden (Kalibriervials), wurden mit 10,0 ml BSA-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen bei einem pH-Wert von 4,98 bzw. 7,4 befüllt, offen bei 100°C in den Trockenschrank gestellt und bis zur Trockne eingedampft. Somit konnte angenommen werden, dass sich die gesamte Proteinmenge auf der Packmitteloberfläche befand.

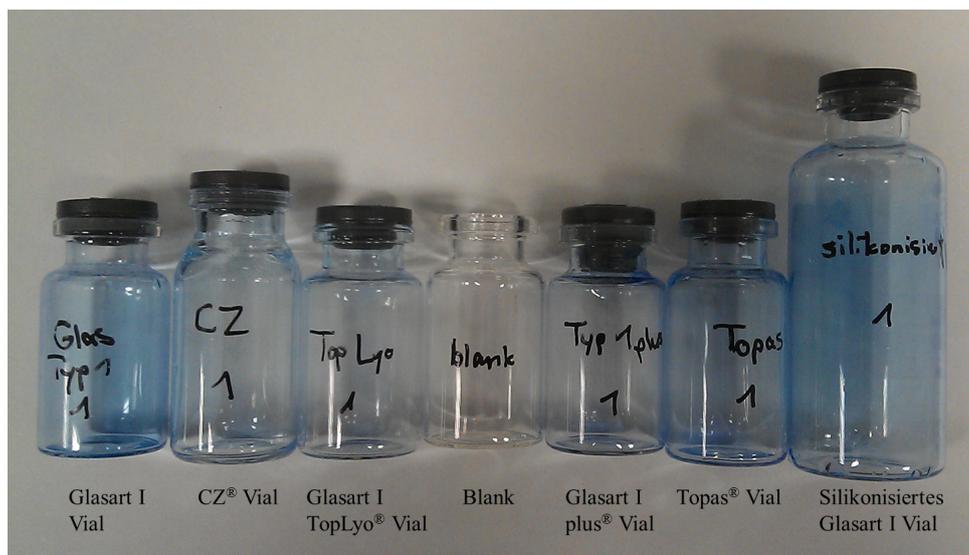
Die Proben vials wurden mit 10,0 ml BSA-Lösungen unterschiedlicher Konzentration befüllt, mit Stopfen verschlossen und anschließend verbördelt. Die Vials wurden nun für eine unterschiedliche Dauer mit der jeweiligen BSA-Lösung inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationsdauer wurden die Proteinlösungen entleert und die Vials dreimal mit dem Inkubationspuffer und daraufhin zehnmal mit Millipore-Wasser gewaschen, um lose adsorbierte Proteine abzuspülen. Diese Vials wurden nun für fünf Minuten bei 100°C im Trockenschrank eingelagert, um die gebundene Proteinschicht in den Proben vials der gleichen Temperatur wie in den Kalibriervials auszusetzen und somit mögliche strukturelle Änderungen des adsorbierten Proteins durch die erhöhte Temperatur zu berücksichtigen.

Das weitere Vorgehen war für Kalibrier- und Proben vials identisch. Zu jedem Vial wurden 10,0 ml Coomassieblau G-250 Lösung gegeben, die Vials mit Stopfen verschlossen und für 24 Stunden bei 50 Runden/Minute auf den Rühr Tisch gestellt. Daraufhin wurde die Coomassielösung aus den Vials entfernt und die Vials wurden fünfmal mit Millipore-Wasser gewaschen, um nicht gebundenes Coomassieblau abzuspülen. Zum Ablösen der nun noch gebundenen Farbstoffschicht wurden die Vials zweimal nacheinander mit 1%iger Ammoniaklösung inkubiert. Die erhaltenen Lösungen wurden vereinigt und die Farbstoffintensität bei 599 nm mittels eines UV/Vis-Spektrometers vermessen.

#### **4.2.2 Visualisierung der adsorbierten Proteinmenge**

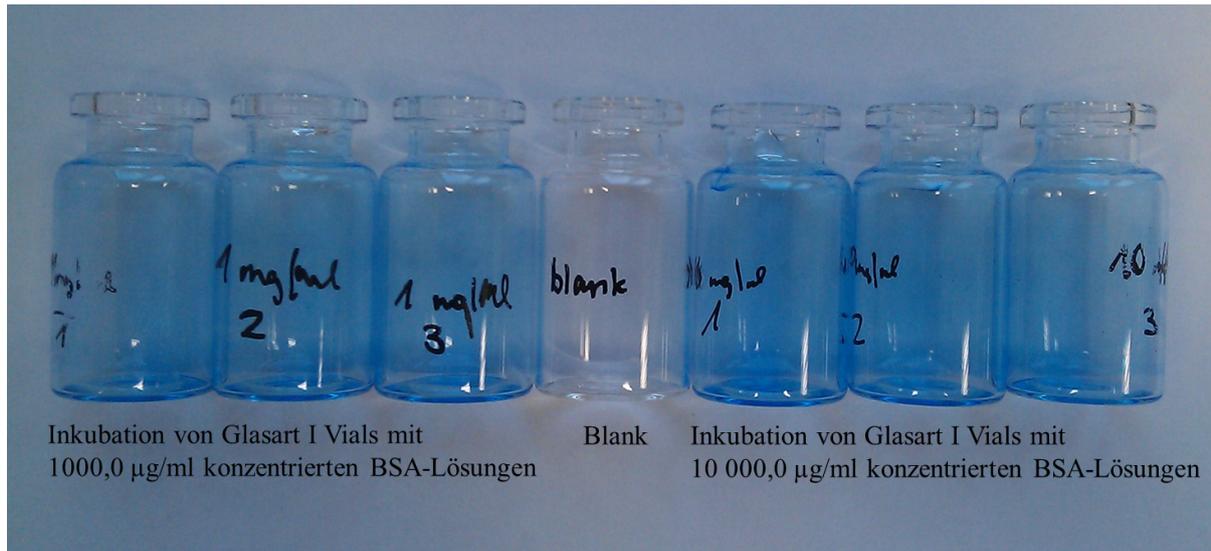
Zur Visualisierung der adsorbierten Menge an BSA wurden alle unter 3.2 untersuchten Primärpackmittel in Dreifachbestimmung mit Coomassieblau G-250 angefärbt. Abbildung 4.2 zeigt eine Übersicht der angefärbten Packmittel. Es ist zu erkennen, dass das klassische wie auch das sili-

konisierte Glasart I Vial stärker angefärbt wird, was bedeutet, dass hier mehr Protein als an die anderen Packmittel adsorbiert. Dies bestätigt die unter 2.1.4 erwähnte bevorzugte Proteinadsorption an geladene Oberflächen. Denn beim vorliegenden pH-Wert von 4,98 liegt die Glasoberfläche negativ geladen vor. Durch Überlagerung der elektrischen Doppelschichten von positiv geladenen Bereichen des Proteins und der Packmitteloberfläche kommt es somit zur elektrostatischen Anziehung, wodurch die Adsorption an die Packmitteloberfläche begünstigt wird. Für silikonisierte Oberflächen gilt diese Erklärung gleichermaßen, da eine Silikonisierung von Oberflächen meist ungleichmäßig verläuft und an einigen Stellen somit die reine Glasart I Oberfläche vorliegt. Die übrigen Primärpackmittel hingegen sind nahezu ungeladen und somit entfällt die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Protein und Oberfläche als eine treibende Kraft der Proteinadsorption. Dabei kommt es zwar unter anderem zwischen Protein und hydrophober Oberfläche zu hydrophoben Wechselwirkungen, die aber wahrscheinlich eine geringere Triebkraft für die Adsorption von BSA im Vergleich zum Auftreten von elektrostatischen Anziehungskräften darstellen [14, 115]. Die Auswertung der angefärbten Topas<sup>®</sup> Vials gestaltete sich schwierig, da diese von vornherein bläulich gefärbt sind.



**Abbildung 4.2:** visueller Vergleich der adsorbierten Proteinmenge auf verschiedenen Arten von Vials durch Anfärbung mittels Coomassieblau

Am Beispiel von Glasart I Vials ist in Abbildung 4.3 gezeigt, dass die Farbstoffintensität nach Inkubation mit 1000,0 µg/ml und 10 000,0 µg/ml konzentrierten BSA-Lösungen visuell kaum einen Unterschied zeigte. Diese Methode kann also lediglich zu Vergleichszwecken von verschiedenen Packmitteln eingesetzt werden, wobei nur visuell stärker voneinander abweichende adsorbierte Proteinmengen erkennbar sind.



**Abbildung 4.3:** visueller Vergleich der adsorbierten, mittels Coomassieblau angefärbten Proteinmenge auf Glasart I Vials, die mit 1000,0 µg/ml bzw. 10 000,0 µg/ml konzentrierten BSA-Lösungen inkubiert wurden.

#### 4.2.3 Vorversuche und Grenzen des Coomassieblau-Assays

Es wurde zunächst die Anwendbarkeit dieser Methode zur Bestimmung der adsorbierten Proteinmenge untersucht. Wie bereits unter 2.1.4 erwähnt, führt ein Vorherrschen des pH-Wertes am isoelektrischen Punkt des Proteins kombiniert mit dem Vorliegen einer hydrophoben Oberfläche zur stärksten Proteinadsorption (worst case). Dahingegen wird auf hydrophilen Oberflächen bei einem pH-Wert, der abweichend vom isoelektrischen Punkt ist, weniger Proteinadsorption erwartet. Zur Überprüfung dieses Sachverhalts wurden drei Ausgangskonzentrationen (1000,0 µg/ml, 10,0 µg/ml und 1,25 µg/ml) jeweils in Zweifachbestimmung untersucht. Die jeweils adsorbierte BSA-Menge wurde unter den folgenden Bedingungen verglichen und die Ergebnisse unter Angabe des jeweiligen Variationskoeffizienten ( $V_k$ ) in Tabelle 4.2 zusammengefasst:

- hydrophobe Oberfläche, pH-Wert am isoelektrischen Punkt von BSA (worst case):  
Glasart I TopLyo<sup>®</sup> Vials, pH 4,98
- hydrophile Oberfläche, pH-Wert abweichend vom isoelektrischen Punkt von BSA:  
Glasart I Vials, pH 7,4

Für jedes Packmittel wurde dafür eine eigene Kalibriergerade erstellt.

Es war ein deutlicher Unterschied bezüglich der adsorbierten BSA-Menge zwischen den beiden untersuchten Gruppen feststellbar. Bei einer Ausgangskonzentration von 1000,0 µg/ml adsorbierte an Glasart I TopLyo<sup>®</sup> Vials am IEP von BSA 9,6 mg BSA/m<sup>2</sup>, wohingegen auf Glasart I Vials bei einem pH-Wert von 7,4 nur 6,1 mg BSA/m<sup>2</sup> adsorbierte. Weiterhin war eine Proteinmengenbestimmung auf Glasart I Vials bei einem pH-Wert von 7,4 bei Ausgangskonzentrationen von 10,0 µg/ml und 1,25 µg/ml nicht mehr möglich, da sich die gemessenen Absorptionswerte in der

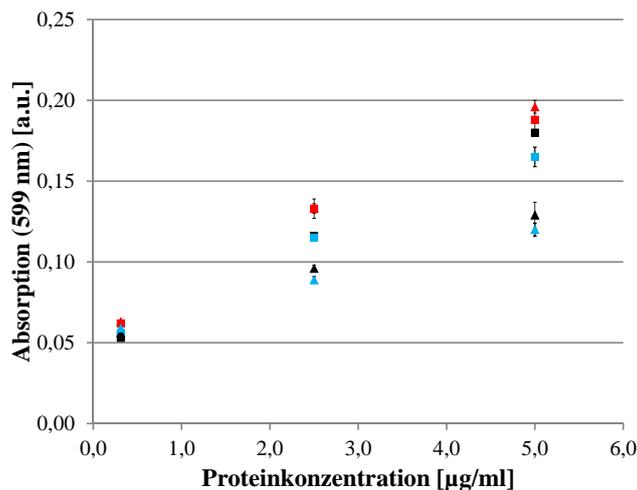
**Tabelle 4.2:** Vergleich der adsorbierten BSA-Menge an Glasart I TopLyo<sup>®</sup> Vials und einem pH-Wert der Lösung von 4,98 mit der adsorbierten BSA-Menge an Glasart I Vials bei einem pH-Wert der Lösung von 7,4

Glasart I TopLyo <sup>®</sup> Vials, pH 4,98 (n=2)		Glasart I Vials, pH 7,4 (n=2)	
Adsorbierte Proteinmenge [mg/m <sup>2</sup> ]	V <sub>k</sub> [%]	Adsorbierte Proteinmenge [mg/m <sup>2</sup> ]	V <sub>k</sub> [%]
	Ausgangskonzentration 1000,0 µg/ml		
9,6	8,3	6,1	13,0
	Ausgangskonzentration 10,0 µg/ml		
6,3	3,1	—*	—*
	Ausgangskonzentration 1,25 µg/ml		
4,7	12,8	—*	—*

\* Die gemessenen Absorptionswerte lagen in der Nähe des Leerwertes, weshalb eine Quantifizierung der adsorbierten BSA-Menge nicht möglich war.

Nähe des Leerwertes befanden. Die Ergebnisse der Literatur [35, 51] konnten somit dahingehend bestätigt werden, dass bei Vorliegen einer hydrophoben Oberfläche gepaart mit dem pH-Wert am isoelektrischen Punkt des Proteins mehr Protein adsorbiert als an eine hydrophile Oberfläche bei einem pH-Wert, der sich nicht am isoelektrischen Punkt des Proteins befindet. Nachdem die adsorbierte Proteinmenge an die beiden Packmittel jeweils nur bei einem, voneinander abweichendem pH-Wert bestimmt wurde, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die gering adsorbierten Proteinmengen durch die hydrophile Oberfläche, den vom isoelektrischen Punkt abweichenden pH-Wert oder einer Kombination aus beidem begründet sind. Jedoch scheint eine elektrostatische Abstoßung zwischen der negativ geladenen Glasart I Oberfläche und dem negativ geladenen Protein bei einem pH-Wert von 7,4 zu den geringen adsorbierten Proteinmengen zu führen. Außerdem liegt das Protein bei pH 7,4 weniger kompakt vor als am isoelektrischen Punkt. Daher benötigt es mehr Platz auf der Oberfläche, wodurch weniger Protein an die Oberfläche adsorbieren kann.

Da sich weiterhin voneinander abweichende Kalibriergeraden für Glasart I TopLyo<sup>®</sup> Vials und Glasart I Vials ergaben, wurde im Folgenden der Einfluss sowohl von verschiedenen pH-Werten als auch von verschiedenen Primärpackmitteloberflächen auf die erhaltenen Kalibriergeraden untersucht. Dazu wurde zum einen der pH-Wert am isoelektrischen Punkt von BSA (pH 4,98) gewählt und zum anderen ein pH-Wert von 7,4 untersucht. Die ausgewählten Primärpackmittel in diesem Fall waren Glasart I-, Glasart I TopLyo<sup>®</sup>- sowie Glasart I plus<sup>®</sup>-Vials, um sowohl hydrophile als auch hydrophobe Oberflächen in die Untersuchung miteinzubeziehen. Die Absorptionswerte der verschiedenen Kalibrierlösungen sind in Abbildung 4.4 wiedergegeben.



**Abbildung 4.4:** Durchführung der Kalibrierversuche (jeweils  $n=3$ ) jeweils bei pH 4,98 ( $\square$ ) und pH 7,4 ( $\triangle$ ) in drei verschiedenen Primärpackmitteln. Untersucht wurden Glasart I Vials ( $\blacksquare$ ,  $\blacktriangle$ ), Glasart I TopLyo<sup>®</sup> Vials ( $\blacksquare$ ,  $\blacktriangle$ ) sowie Glasart I plus<sup>®</sup> Vials ( $\blacksquare$ ,  $\blacktriangle$ ).

Es wurden unterschiedliche Absorptionswerte für die Kalibrierlösungen in dem gleichen Primärpackmittel bei variierendem pH-Wert erhalten, wodurch ein Einfluss der verschiedenen Ionenarten der beiden Puffer auf die zugrunde liegende Farbreaktion denkbar ist. Jedoch erklärt dies nicht die abweichenden Absorptionswerte der verschiedenen Primärpackmittel bei Vorliegen des gleichen Puffersystems. Eine mögliche Erklärung hierfür ist ein unterschiedlich gutes Ablöseverhalten der adsorbierten Farbstoffschicht durch eine 1%ige Ammoniaklösung auf verschiedenen Primärpackmitteln. Somit scheint neben dem pH-Wert auch das Primärpackmittel einen Einfluss auf die Reaktion von Coomassieblau und Protein zu haben, was in abweichenden Absorptionswerten für die vermessenen Kalibrierlösungen resultiert.

Die variierenden Kalibriergeraden liefern weiterhin einen Hinweis darauf, dass BSA unter verschiedenen Bedingungen in unterschiedlicher Art und Weise an die Oberfläche adsorbiert, was mit variierenden Sekundärstrukturen einhergeht. Somit können die Aminosäuren, die für die Reaktion mit Coomassieblau verantwortlich sind, durch Adsorption besser oder schlechter erreichbar sein, was zu unterschiedlich starken Reaktionen von Coomassieblau mit dem gebundenen Protein führt.

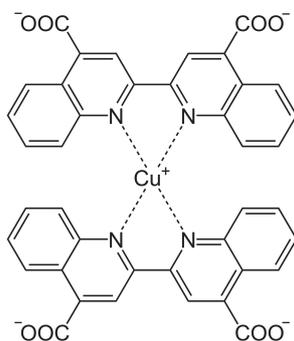
Auch die thermische Behandlung der Kalibriervials kann zu veränderten Sekundärstrukturen der adsorbierten Proteine führen. Zwar werden alle Vials der gleichen Temperatur ausgesetzt, jedoch ist es trotzdem möglich, dass die erhöhte Temperatur die Sekundärstruktur der adsorbierten Proteine auf verschiedenen Primärpackmitteln in unterschiedlicher Weise beeinflusst.

Die erhaltenen, variierenden Kalibriergeraden zeigen, dass für jede Oberfläche und für jeden variierenden Formulierungsparameter eine neue Kalibriergerade erstellt werden müsste, was in der Praxis durch den damit verbundenen hohen Aufwand nicht realisierbar ist. Daher wurde nach Alternativen für den Coomassieblau-Assay gesucht.

### 4.3 Bestimmung der adsorbierten Proteinmenge mittels Micro BCA-Assay

#### 4.3.1 Messprinzip

Der erste Schritt des Micro BCA-Assays beruht auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$ . Durch Reaktion von zwei Molekülen Bicinchoninsäure mit  $\text{Cu}^+$  entsteht der in Abbildung 4.5 angegebene farbige Komplex, der bei 562 nm vermessen werden kann. Diese Reaktion zeigt ein pH-Optimum im stark alkalischen Bereich. Smith et al. postulierten, dass die Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  über zwei Wege möglich ist. Zum einen durch temperaturunabhängige Oxidation von Cystein, Tyrosin und Tryptophan. Zum anderen durch die temperaturabhängige Reaktion von Peptidbindungen mit  $\text{Cu}^{2+}$  [66].



**Abbildung 4.5:** Strukturformel des Komplexes von  $\text{Cu}^+$  mit zwei Molekülen Bicinchoninsäure [116]

Mittels des BCA-Assays lassen sich Konzentrationen über einen Bereich von 20 bis 2000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Protein vermessen. Um geringere Proteinkonzentrationen zu bestimmen, wurde der Micro BCA-Assay entwickelt. Dabei kommen im Vergleich zum BCA-Assay stärker konzentrierte Reagenzien, eine verlängerte Inkubationsdauer wie auch eine erhöhte Temperatur während der Inkubation zum Einsatz, wodurch Konzentrationen zwischen 0,5 bis 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Protein nachgewiesen werden können. Die Zusammensetzung des Micro BCA-Reagenz ist Smith et al. zu entnehmen [66, 117].

Zur Bestimmung der adsorbierten Proteinmenge wurden 10,0 ml BSA-Lösung unterschiedlicher Konzentrationen in das jeweilige Primärpackmittel pipettiert, mit Stopfen verschlossen und verbördelt. Nach Ende der Inkubationsdauer wurden die Proteinlösungen aus den Vials entleert und die Vials jeweils dreimal mit dem Inkubationspuffer und anschließend zehnmals mit Millipore-Wasser gespült. In die Probenvials wurden jeweils 5,0 ml 50 mM Natriumacetatpuffer (Assaypuffer) und Micro BCA-Reagenz gegeben, dessen Herstellung dem Standardprotokoll entsprach [118]. Somit wurde die gesamte zuvor benetzte Oberfläche mit Reagenz bedeckt und das Micro BCA-Reagenz konnte direkt mit dem auf der Oberfläche gebundenen Protein reagieren. Eine Verwendung von Glasart I-, Glasart I TopLyo<sup>®</sup>- und CZ<sup>®</sup>-Vials im Vergleich zu Polypropylen-Tubes zur Inkubation der Kalibrierlösungen ergab keine variierenden Absorptionswerte. Daher wurde für die Erstellung der Kalibriergeraden jeweils 1,0 ml der entsprechenden Standardlösung und des Micro BCA-Reagenz in Polypropylen-Tubes (Kalibriertubes) pipettiert. Anschließend wurden Probenvials und Kalibriertubes für 2 Stunden bei 37°C im Trockenschrank inkubiert

und nach Ablauf dieser Zeit sofort im Eisbad gekühlt, um eine weitere Farbentwicklung zu unterbinden. Mittels UV/Vis-Spektrometer wurden die Lösungen bei 562 nm vermessen.

### 4.3.2 Vorversuche

Die Kalibriertubes wurden zunächst dem Standardprotokoll folgend [118] für eine Stunde bei 60°C inkubiert. Dabei ergaben sich deutliche Schwankungen der Absorptionswerte bei der Doppelbestimmung. Daraufhin wurden die Standards alternativ für zwei Stunden bei 37°C inkubiert, wodurch sich im Vergleich zur Inkubation bei 60°C geringere Standardabweichungen für die verschiedenen vermessenen Konzentrationen ergaben. Die Absorptionswerte bei 562 nm nach einer Stunde bei 60°C lagen jedoch bei höheren Werten als nach zwei Stunden bei 37°C, wie auch schon in der Literatur berichtet. Daraus ist ersichtlich, dass die Reaktion nach zwei Stunden bei 37°C noch nicht beendet ist. Dies hängt damit zusammen, dass Tryptophan, Tyrosin und die Peptidbindungen bei 37°C nicht ausreichend oxidiert werden, was bei 60°C wiederum der Fall ist. Wiechelman et al. zeigten zudem, dass die Kalibriergeraden bei 60°C im Vergleich zu 37°C von Protein zu Protein weniger variieren [66, 117]. Da es in dieser Arbeit aber nur BSA als einziges Protein zu bestimmen galt und die Proben nach Inkubation bei 37°C sofort ins Eisbad eingestellt wurden, wodurch eine weitere Farbentwicklung unterbunden wurde, wurden die Inkubationsparameter auf zwei Stunden bei 37°C festgelegt.

Die Anwendbarkeit des Micro BCA-Assays zur Bestimmung der adsorbierten Proteinmenge wurde durch den Einfluss unterschiedlicher Packmittel und pH-Werte auf die Proteinadsorption untersucht. Dafür wurde der Unterschied der adsorbierten BSA-Menge auf Glasart I TopLyo<sup>®</sup> Vials bei einem pH-Wert der Lösung von 4,98 und Glasart I Vials bei einem pH-Wert der Lösung von 7,4 ermittelt. Unter 4.2.3 wurde dies bereits mithilfe des Coomassieblau-Assays untersucht. Die Ergebnisse für die drei vermessenen Ausgangskonzentrationen (1000,0 µg/ml, 10,0 µg/ml und 1,25 µg/ml) sind Tabelle 4.3 zu entnehmen.

Es zeigte sich ein deutlicher Unterschied der adsorbierten Proteinmengen zwischen den beiden untersuchten Gruppen, wobei an Glasart I TopLyo<sup>®</sup> Vials am IEP von BSA im Vergleich zu Glasart I Vials bei einem pH-Wert der Lösung von 7,4 deutlich mehr BSA adsorbierte. Die adsorbierte BSA-Menge an Glasart I TopLyo<sup>®</sup> Vials bei einem pH-Wert der Lösung von 4,98 konnte ausgehend von verschiedenen BSA-Konzentrationen problemlos quantifiziert werden. Dagegen konnte die adsorbierte BSA-Menge an Glasart I Vials bei einem pH-Wert von 7,4 nur bei einer Ausgangskonzentration von 1000,0 µg/ml BSA bestimmt werden, da andernfalls die gemessenen Absorptionswerte in der Nähe des Leerwertes lagen. Dies spiegelt die Ergebnisse des Coomassieblau-Assays (Kapitel 4.2.3) wider.

**Tabelle 4.3:** Vergleich der adsorbierten BSA-Menge an Glasart I TopLyo<sup>®</sup> Vials und einem pH-Wert der Lösung von 4,98 mit der adsorbierten BSA-Menge an Glasart I Vials bei einem pH-Wert der Lösung von 7,4

Glasart I TopLyo <sup>®</sup> Vials, pH 4,98 (n=3)		Glasart I Vials, pH 7,4 (n=3)	
Adsorbierte Proteinmenge [mg/m <sup>2</sup> ]	V <sub>k</sub> [%]	Adsorbierte Proteinmenge [mg/m <sup>2</sup> ]	V <sub>k</sub> [%]
Ausgangskonzentration 1000 µg/ml			
10,0	15,6	5,1	25,8
Ausgangskonzentration 10 µg/ml			
5,1	7,6	—*	—*
Ausgangskonzentration 1,25 µg/ml			
3,3	3,4	—*	—*

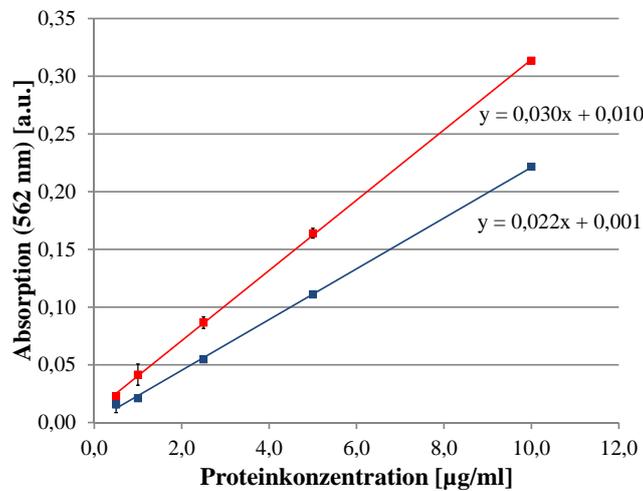
\* Die gemessenen Absorptionswerte lagen in der Nähe des Leerwertes, weshalb eine Quantifizierung der adsorbierten BSA-Menge nicht möglich war.

Weiterhin wurde mittels Micro BCA-Assay versucht, eine Erklärung für die variierenden Kalibriergeraden bei Anwendung des Coomassieblau-Assays, wie unter 4.2.3 gezeigt, zu erhalten. Dazu wurden die Kalibriergeraden zum einen analog des Micro BCA-Protokolls (Kapitel 4.3.1) und zum anderen durch Eindampfen der Kalibrierlösungen (Kapitel 4.2.1) aufgenommen. Letztere wurden jedoch nicht, wie unter 4.2.1 erläutert, mit Coomassieblau angefärbt, sondern die gebundene Proteinmenge mittels Micro BCA-Assay quantifiziert. Als Primärpackmittel kamen Glasart I TopLyo<sup>®</sup> Vials bei einem pH-Wert der BSA Lösung von 4,98 zum Einsatz. Einen Vergleich der beiden erhaltenen Kalibriergeraden zeigt Abbildung 4.6.

Bei Vergleich der erhaltenen Kalibriergeraden für die mittels Micro BCA-Assay vermessenen Kalibrierlösungen und die Glasart I TopLyo<sup>®</sup> Standardvials, auf die die gewünschte Proteinmenge durch Eindampfen aufgebracht wurde, konnte eine Abweichung voneinander festgestellt werden. Diese zeigte sich vor allem in der Steigung der beiden Kalibriergeraden, wobei die y-Achsenabschnitte sehr ähnliche Werte aufwiesen. Somit variiert die Zunahme der bestimmten, adsorbierten Proteinmengen über den untersuchten Konzentrationsbereich nicht immer um den gleichen Faktor.

Die Kalibriergerade des Micro BCA-Assays wurde hierbei, wie unter 4.3.1 beschrieben, mittels Reaktion von Bicinchoninsäure mit BSA in Lösung erhalten. Zur Bestimmung der adsorbierten Proteinmenge reagiert das Farbreagenz jedoch anders als bei der Kalibrierung mit dem Protein direkt auf der Oberfläche. Durch Adsorption oder durch Temperatureinfluss kann es zu strukturellen Veränderungen des Proteins kommen, was zu veränderter Reaktivität mit der Bicinchoninsäure im Vergleich zu BSA in Lösung führen kann. Somit können die abweichenden

Kalibriergeraden durch strukturelle Änderungen verursacht werden, die entweder durch die Adsorption an die Oberfläche oder die Temperatur während des Eindampfens verursacht werden.

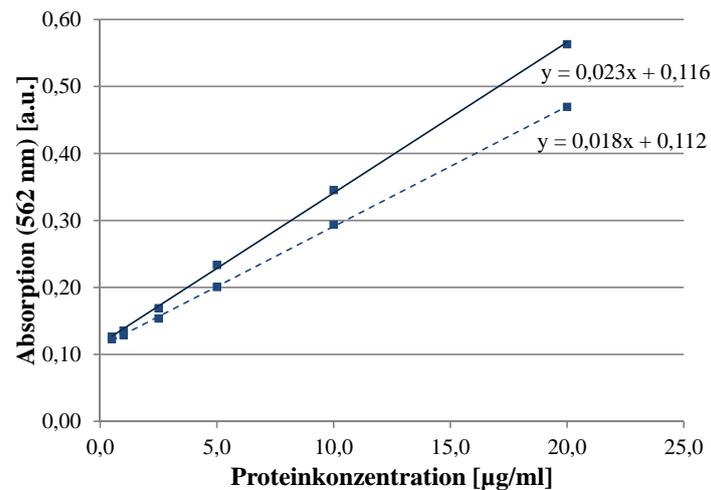


**Abbildung 4.6:** Vergleich der Kalibriergeraden (jeweils  $n=2$ ), die ausgehend von Micro BCA-Standards (—) und eingebraunten Glasart I TopLyo<sup>®</sup> Standardvials (—) aufgenommen wurden.

Da man davon ausgehen kann, dass BSA unter gleichen Bedingungen in ähnlicher Art und Weise an die gleiche Primärpackmitteloberfläche adsorbiert und somit eine vergleichbare Reaktion der Bicinchoninsäure mit dem gebundenen BSA erwartet wird, deutet dies auf einen Einfluss der Temperatur auf die Sekundärstruktur des adsorbierten BSA hin. Um den Einfluss der Temperatur zu vermeiden, wurden im Rahmen des Coomassieblau-Assays die Probenvials ebenfalls für kurze Zeit den gleichen Temperaturen wie die Kalibriervials ausgesetzt. Neben dem pH-Wert und dem jeweiligen Primärpackmittel hat somit auch die Temperatur einen Einfluss auf die veränderte Sekundärstruktur auf der Oberfläche.

#### 4.3.3 Entwicklung einer Micro BCA-Assay Methode zur Bestimmung der adsorbierten Proteinmenge an Primärpackmittel

Um den Einfluss der Molarität des Puffers auf die adsorbierte Proteinmenge auszutesten, wurden 1000,0 µg/ml konzentrierte BSA-Lösungen bei einem pH-Wert der Lösung von 4,98 in 10 mM und 90 mM Natriumacetatpuffer in Glasart I TopLyo<sup>®</sup> Vials inkubiert. Die Kalibriergeraden wurden jeweils mit Kalibrierlösungen, die in 10 mM und 90 mM Natriumacetatpuffer hergestellt wurden, erstellt. Dabei zeigte sich der in Abbildung 4.7 dargestellte Unterschied der Kalibriergeraden bei Verwendung unterschiedlich molarer Puffer. Es ist bekannt, dass der Natriumacetatpuffer bei höheren Konzentrationen mit dem Micro BCA-Assay interferiert [118]. Durch Erhöhung der Molarität von 10 mM auf 90 mM ist dabei zwar noch keine Beeinträchtigung der Messergebnisse, jedoch aber eine verminderte Farbreaktion feststellbar.



**Abbildung 4.7:** Vergleich der Kalibriergeraden, die durch Kalibrierlösungen in 10 mM (—) bzw. 90 mM (- - -) Natriumacetatpuffer (jeweils  $n=2$ ) erhalten wurden.

Da es zu variierenden Kalibriergeraden bei verschiedenen molaren Natriumacetatpuffern kommt, wurde getestet, ob ein 50 mM Natriumacetatpuffer für alle Proben als Assaypuffer verwendet werden kann. Hierfür wurden Glasart I TopLyo<sup>®</sup> Vials in 10 mM und 90 mM Natriumacetatpuffer (jeweils pH-Wert 4,98) inkubiert. Für diese Untersuchung wurde jeweils eine Ausgangskonzentration von 1000,0 µg/ml BSA gewählt.

**Tabelle 4.4:** Vergleich der ermittelten adsorbierten Proteinmengen bei Anwendung des jeweiligen Inkubationspuffers oder eines 50 mM Natriumacetatpuffers als Assaypuffer für den Micro BCA Assay.

Inkubation in	Desorption in	adsorbierte	
		Proteinmenge [mg/m <sup>2</sup> ]( $n=2$ )	$V_k$ [%]
10 mM	10 mM	13,7	14,2
10 mM	50 mM	12,9	9,7
90 mM	90 mM	9,2	24,9
90 mM	50 mM	9,3	7,4

Es wurde überprüft, ob ein signifikanter Unterschied in der ermittelten adsorbierten Proteinmenge besteht, je nachdem ob als Assaypuffer der jeweilige Inkubationspuffer oder ein 50 mM Natriumacetatpuffer verwendet wurde. Dazu wurde unter Aufstellung der Nullhypothese, dass kein signifikanter Effekt zwischen den beiden Assaypuffern besteht, ein Zwei-Stichproben-t-Test durchgeführt. Mittels F-Test wurde zuvor sichergestellt, dass die Messergebnisse, die durch Verwendung der verschiedenen Assaypuffer erhalten wurden, dieselben Standardabweichungen auf-

wiesen. Für die Überprüfung der Anwendbarkeit des jeweiligen Assaypuffers wurde die gleiche Anzahl an Einzelmessungen durchgeführt. Daher errechnet sich die Prüfgröße  $t_{Prüf}$  nach Gleichung 4.1. Der tabellarische t-Wert ( $t_{tab}$ ) wurde unter Berücksichtigung des Freiheitsgrades (Freiheitsgrad für die Anzahl der Einzelmessungen) und des Signifikanzniveaus  $\alpha$  einer Tabelle entnommen. Für das Signifikanzniveau  $\alpha$  wurde ein Wert von 0,05 festgelegt [119].

$$t_{Prüf} = |\bar{x}_1 - \bar{x}_2| \cdot \sqrt{\frac{n}{s_1^2 + s_2^2}} \quad \text{mit } n = n_1 = n_2 \quad (4.1)$$

mit

- $\bar{x}_1$ : Mittelwert der Einzelergebnisse der ersten Stichprobe
- $\bar{x}_2$ : Mittelwert der Einzelergebnisse der zweiten Stichprobe
- $n$ : Anzahl der Einzelmessungen
- $s_1$ : Standardabweichung der ersten Stichprobe
- $s_2$ : Standardabweichung der zweiten Stichprobe

Der tabellarische t-Wert war sowohl im Falle des Vergleichs von 10 mM wie auch 90 mM Natriumacetatpuffer mit dem 50 mM Natriumacetatpuffer größer als die errechnete Prüfgröße  $t_{Prüf}$ . Somit wurde mit dem Signifikanzniveau  $\alpha$  von 0,05 die Nullhypothese angenommen, dass kein signifikanter Unterschied zwischen der ermittelten adsorbierten Proteinmenge besteht, je nachdem ob als Assaypuffer der Inkubationspuffer oder ein 50 mM Natriumacetatpuffer zum Einsatz kam. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wurde der 50 mM Natriumacetatpuffer für alle weiteren Messungen als Assaypuffer eingesetzt, ungeachtet in welchem molaren Natriumacetatpuffer die Proben zuvor hergestellt und inkubiert wurden.

Neben den bereits beschriebenen Methoden, wurde weiterhin eine SE-HPLC Methode zur Proteinmengenbestimmung entwickelt (Kapitel 4.4), wobei die adsorbierte BSA-Schicht durch 0,05%ige SDS-Lösung von der Oberfläche entfernt wurde. Im Vergleich der adsorbierten Proteinmengen nach Bestimmung mittels Micro BCA-Assay und SE-HPLC (Kapitel 4.5) ergaben sich deutlich variierende Werte. Daher wurde überprüft, ob ein Ablösen der adsorbierten BSA-Schicht mittels 0,05%iger SDS-Lösung bei Anwendung des Micro BCA-Assays zu anderen ermittelten Werten führt. Dafür wurde die adsorbierte Proteinmenge ausgehend von 1000,0  $\mu\text{g/ml}$  konzentrierten BSA-Lösungen in 50 mM Natriumacetatpuffer bei pH 4,98 auf Glasart I TopLyo<sup>®</sup> Vials überprüft. Die adsorbierte BSA-Menge wurde sowohl mittels Micro BCA-Assay als auch durch die SE-HPLC Methode bestimmt, wobei sich kaum ein Unterschied der durch die beiden Methoden ermittelten Werte zeigte. In Kapitel 4.5 sind die Ergebnisse in Tabelle 4.8 zusammengefasst.

Dies sollte durch die adsorbierte BSA-Menge auf Glasart I Vials in einer sechsfach-Bestimmung erneut nachgewiesen werden. Um eine weitere Farbentwicklung der Probenlösungen jedoch zu unterbinden, kommen die Vials im Rahmen des Micro BCA-Assays direkt nach Inkubation bei 37°C ins Eisbad. Da man sich bei 0,05 % SDS aber deutlich oberhalb der CMC von SDS in 50 mM Natriumacetatpuffer befindet, wie in Kapitel 4.4.2 gezeigt, und bekannt ist, dass SDS oberhalb seiner CMC unterhalb von 15°C ausfällt, konnte die Absorption der Farbreaktion somit

nicht bestimmt werden. Aus diesem Grund wurde dieser Ansatz nicht weiterverfolgt. Für weitere Interpretationen der Ergebnisse muss daher berücksichtigt werden, dass durch den Micro BCA-Assay höhere Adsorptionsmengen als durch die SE-HPLC bestimmt werden.

## 4.4 Bestimmung der adsorbierten Proteinmenge mittels SE-HPLC

### 4.4.1 Messprinzip

Die Größenausschlusschromatographie ist eine Form der HPLC, bei der Moleküle nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Im Vergleich zu den restlichen flüssigchromatographischen Methoden erfolgt dabei aber keine chemische oder physikalische Wechselwirkung zwischen Analyt und stationärer Phase. Die Auftrennung erfolgt durch die unterschiedlich ausgeprägte Permeation und Eindringdauer der verschieden großen Moleküle in die Poren definierter Größe. Moleküle bestimmter Größe können dabei nicht mehr in die Poren hineindiffundieren und werden somit von den Poren ausgeschlossen. Diese Verbindungen eluieren daher gleich zu Beginn. Im Gegensatz dazu vermögen Moleküle, die kleiner als die Poren sind, in die Poren einzudringen. Je kleiner der Analyt desto länger verweilt er in den Poren der Säule und desto später eluiert dieser (inverser Siebeffekt) [29, 120, 121].

Mathes [13] entwickelte eine SE-HPLC Methode, um die adsorbierte IgG Menge an Vialoberflächen nachzuweisen. Dabei lieferte er die Begründung des Einsatzes von SDS zum Ablösen des gebundenen Proteins von der Oberfläche sowie den Zusatz von SDS zum Elutionsmittel. Aufbauend auf diese Methode wurde eine SE-HPLC Methode für die bearbeitete Fragestellung erarbeitet, da sowohl ein anderes Protein als auch eine andere Pufferzusammensetzung vorlag.

Zur Untersuchung der adsorbierten Proteinmenge wurden 10,0 ml BSA-Lösung unterschiedlicher Konzentrationen in das jeweilige Primärpackmittel pipettiert, mit Stopfen verschlossen und verbördelt. Nach Ende der Inkubationsdauer wurden die Proteinlösungen aus den Vials entleert und die Vials jeweils dreimal mit dem Inkubationspuffer und anschließend zehnmal mit Millipore-Wasser gespült. Die entleerten Vials wurden daraufhin für weitere drei Stunden mit jeweils 10,0 ml 0,05 %iger SDS-haltiger Lösung (in 50 mM Natriumacetatpuffer) inkubiert. Diese SDS-haltigen Lösungen wurden anschließend unter den in Tabelle 4.5 angegebenen Parametern vermessen.

**Tabelle 4.5:** Übersicht der eingestellten Parameter für die SE-HPLC Methode

Parameter	eingestellter Wert
Säule	Tosoh TSKgel G3000PWWL
Flussrate	1,0 ml/min
Laufdauer	15 min
Eluent	PBS Dulbecco + 0,05% SDS
Injektionsvolumen	500 µl
Anregungswellenlänge	278 nm
Emissionswellenlänge	335 nm
Temperatur der Säule	25°C
Temperatur des Autosamplers	20°C

#### 4.4.2 Bestimmung der kritischen Mizellbildungskonzentration

Wie bereits durch Mathes beschrieben [13], bedarf es einer SDS-Konzentration oberhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration (critical micelle concentration, CMC), um das gebundene Protein von der Oberfläche abzulösen. Unterhalb der CMC bindet SDS lediglich an die gebundene Proteinschicht, löst das Protein aber nicht ab. Da mittels statistischer Versuchsplanung (Kapitel 6.1) der Einfluss verschiedener Ionenstärken auf die adsorbierte BSA-Menge untersucht werden sollte, wurde die CMC von SDS unter Verwendung von 10 mM und 90 mM Natriumacetatpuffer bestimmt. Denn bei steigender Molarität des Puffersystems kommt es zu sinkenden CMC-Werten [122].

Die kritische Mizellbildungskonzentration wurde durch Messung der Oberflächenspannung bestimmt. Durch Anreicherung von SDS an der Oberfläche kommt es unterhalb der CMC zu einem stetigen Absinken der Oberflächenspannung bei steigender Tensidkonzentration. Bei Erreichen der CMC ist die Oberfläche mit Tensidmolekülen abgesättigt und es kommt zur Ausbildung von Mizellen. Eine weitere Tensidzugabe führt nun zu keiner weiteren Absenkung der Oberflächenspannung [87].

Laut Literatur erhält man für die CMC von SDS in Wasser Werte im Bereich von 8,1 mM (0,23%) [61, 122]. Die CMC von SDS in 10 mM Natriumacetatpuffer wurde mit  $1,14 \text{ mM} \pm 0,03 \text{ mM}$  (0,033%) bestimmt, für den 90 mM Natriumacetatpuffer lag sie bei  $0,64 \text{ mM} \pm 0,02 \text{ mM}$  (0,019%). Daher wurde der Einfluss von 0,05%iger und 0,1%iger SDS-Lösung sowohl auf das Ablöseverhalten der gebundenen BSA-Schicht wie auch im Elutionsmittel untersucht. Eine Erhöhung der SDS-Konzentration führte in beiden Fällen zu einer geringeren Schärfe des BSA-Peaks. Dies kann durch überschüssige SDS-Mizellen bei zu hohen SDS-Konzentrationen begründet sein [123]. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine 0,05%ige SDS-Lösung gewählt, um das gebundene BSA von der Primärpackmitteloberfläche abzulösen und mittels SE-HPLC zu vermessen.

### 4.4.3 Vorversuche

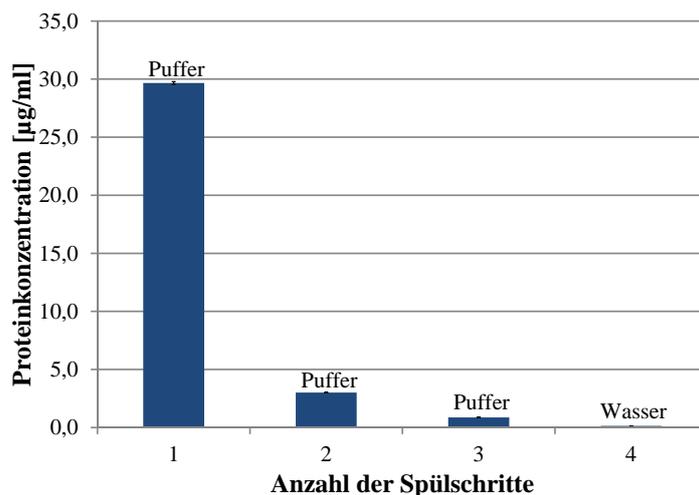
Zur Auswahl der geeigneten SE-HPLC Säule wurde sowohl die häufig zum Einsatz kommende Kieselgelsäule TSK Gel G3000SWXL als auch die Polymersäule TSK Gel G3000PWXL getestet. Bei Vergleich der beiden Säulen mittels einer Konzentration von 1,0 µg/ml BSA in 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 4,98), erhielt man auf der Kieselgelsäule sowohl einen Monomer- als auch einen Dimerpeak, auf der Polymersäule hingegen nur einen Peak für BSA, was eine einfachere Auswertung ermöglichte. Zwar lassen sich mittels der Kieselgelsäule Monomere, Dimere und Polymere voneinander trennen, jedoch ist dies für die vorliegende Fragestellung nicht nötig. Einen weiteren Vorteil bietet die Polymersäule, da im Vergleich zu einer Kieselgelsäule eine größere Anzahl an Analysen durchgeführt werden kann [124]. Aus den genannten Gründen wurde für die folgenden Messungen eine TSK Gel G3000PWXL Polymersäule verwendet.

Mathes [13] beschrieb, dass durch Einsatz des Formulierungspuffers im Vergleich zu einem anderen Puffer als Elutionsmittel eine verbesserte Auftrennung erreicht werden konnte. Natriumacetatpuffer jedoch, der in den zu analysierenden Proben zum Einsatz kam, zeigte keine ausreichende Elutionskraft, um BSA von der Säule zu eluieren. Außerdem sollte der Einfluss von verschiedenen molaren Natriumacetatpuffern auf die Proteinadsorption, wie unter Kapitel 6.1 beschrieben, untersucht werden. Daher wurde nach einem Standardelutionsmittel für alle Trennungen gesucht, das in Form des Dulbecco's PBS-Puffers gefunden wurde. Dieser Puffer wurde bereits unter Zusatz von SDS in der SEC als Elutionsmittel angewendet [125].

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, um Proteine im Eluat zu detektieren. Häufige Anwendung finden dabei die UV- und die Fluoreszenzdetektion. Daher wurde zunächst die BSA-Konzentration mittels Messung der UV-Absorption bei 280 nm ermittelt, wobei vor allem Tryptophan und Tyrosin absorbieren, zu geringem Maße aber auch Phenylalanin. Da BSA, wie unter 3.1.2 erwähnt, nur zwei Tryptophane innerhalb seiner Aminosäuresequenz aufweist, war die UV-Absorption von BSA bei 280 nm zu gering, um solch geringe BSA Konzentrationen nachzuweisen. Auch wurde die Absorption der BSA Lösung bei 220 nm untersucht, wobei es zur Absorption von Peptidbindungen kommt. Bei dieser Wellenlänge absorbieren aber auch verschiedene Puffer und einige Aminosäuren, was somit zu keiner eindeutigen Aussage über die BSA-Konzentration führte. Da es weiterhin zur Störung der Absorptionsmessung bei 280 nm und 220 nm durch SDS kommt, war die UV-Detektion in der vorliegenden Fragestellung nicht möglich. Die Fluoreszenzdetektion stellt dahingegen eine sensitivere Methode dar, um auch geringe Proteinmengen zu bestimmen [29]. Moriyama et al. untersuchten bereits den Einfluss von SDS auf die Anregungs- und Emissionswellenlänge von BSA [126]. Daher wurde die BSA Konzentration im Eluat mittels Fluoreszenzdetektion bei einer Anregungs- und Emissionswellenlänge von 278 nm bzw. 335 nm bestimmt. Ein Injektionsvolumen von 500 µl sowie eine Flussrate von 1,0 ml/min lieferte dabei das beste Verhältnis zwischen Peakfläche und Präzision.

#### 4.4.4 Entwicklung einer SE-HPLC Methode zur Bestimmung der adsorbierten Proteinmenge an Primärpackmittel

Es wurde überprüft, wie viele Spülschritte nach Entleeren der inkubierten Vials nötig waren, um lose adsorbierte Proteinmengen zu entfernen. Dafür wurden Glasart I- und Glasart I TopLyo<sup>®</sup>-Vials mit jeweils 10,0 ml einer 2500,0 µg/ml konzentrierten BSA-Lösung inkubiert. Als Pufferlösung diente ein 50 mM Natriumacetatpuffer mit dem pH-Wert 4,98. Aufbauend auf die verschiedenen Spülschritte bei Waxman und Vilivalam [74] wurden die Proteinlösungen nach Ablauf der Inkubationsdauer entleert, dreimal mit dem Inkubationspuffer und anschließend fünfzehnmal mit Millipore-Wasser gespült. Die in den einzelnen Spüllösungen enthaltene Proteinkonzentration wurde anschließend mittels SE-HPLC bestimmt. Es war eine deutliche Abnahme der Proteinkonzentration in den Spüllösungen im Verlauf des dreimaligen Spülens mit dem Inkubationspuffer zu erkennen. Lediglich im ersten der fünfzehn Spülgänge mit Millipore-Wasser war Protein nachzuweisen. Daher wurden in Abbildung 4.8 am Beispiel von Glasart I TopLyo<sup>®</sup> Vials nur diejenigen Spülschritte aufgetragen, in denen Protein mittels SE-HPLC bestimmbar war. Glasart I Vials zeigten vergleichbare Ergebnisse.

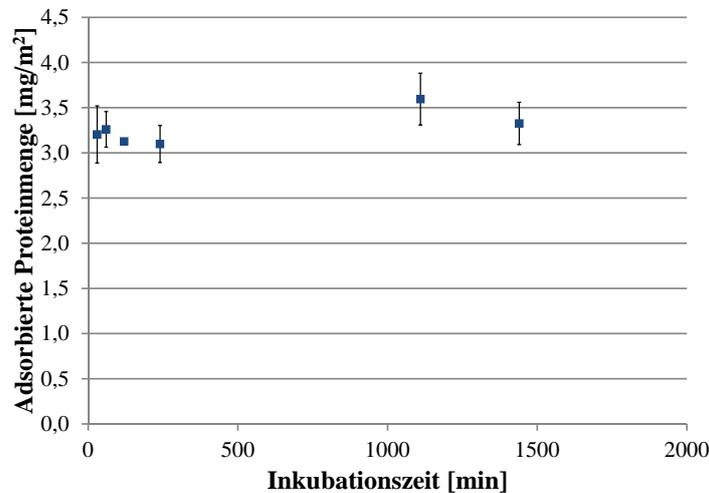


**Abbildung 4.8:** Ermittlung der Proteinkonzentration in den verschiedenen Spüllösungen. Glasart I TopLyo<sup>®</sup> Vials wurden nach Entleeren der inkubierten Proteinlösung mit dem Inkubationspuffer bzw. Millipore-Wasser gespült, um lose adsorbierte Proteinreste abzuspielen.

Um sicherzustellen, dass die gesamte lose gebundene Proteinschicht abgespült wird, wurden die Vials nach Inkubation und Entleeren der BSA-Lösung bei allen entwickelten Methoden dreimal mit dem jeweiligen Inkubationspuffer und anschließend zehnmal mit Millipore-Wasser gespült.

Außerdem wurde weiterhin die nötige Inkubationsdauer mit 0,05%iger SDS-Lösung (in 50 mM Natriumacetatpuffer) überprüft, um ein vollständiges Ablösen der adsorbierten Proteinschicht sicherzustellen. Dazu wurden BSA-Lösungen der Konzentration 1000,0 µg/ml in Glasart I TopLyo<sup>®</sup> Vials inkubiert. Als Puffer diente in diesem Fall ein 50 mM Natriumacetatpuffer mit dem pH-Wert 4,98. Als Untersuchungszeitpunkte wurden Inkubationsdauern zwischen 30 Minuten und

24 Stunden gewählt. Abbildung 4.9 zeigt die abgelöste, adsorbierte Proteinmenge über unterschiedlich lange Kontaktzeiten mit 0,05%iger SDS-Lösung in 50 mM Natriumacetatpuffer.



**Abbildung 4.9:** Ermittlung der nötigen Inkubationsdauer mit 0,05 %iger SDS-Lösung zur vollständigen Entfernung der adsorbierten BSA-Schicht. Untersucht wurden hierbei Glasart I TopLyo<sup>®</sup> Vials (jeweils n=2).

Bereits nach 30 Minuten wurde in vergleichbarem Maße so viel BSA von der Oberfläche wie nach 24 Stunden abgelöst. Für jeden ermittelten Zeitpunkt wurden neue Vials untersucht. Wie sich bereits bei Bestimmung der adsorbierten Proteinmenge mittels Micro BCA-Assay (Kapitel 4.3.3) gezeigt hatte, kommt es bei Mehrfachbestimmung unter den selben Bedingungen stets zu Schwankungen der adsorbierten Proteinmenge. Somit sind die leicht schwankenden Messergebnisse nach unterschiedlichen Zeitpunkten wahrscheinlich dadurch begründet.

Darauf aufbauend wurde weiterhin untersucht, ob durch mehrmalige, aufeinanderfolgende Inkubation mit jeweils 10,0 ml 0,05%iger SDS-Lösung mehr Protein von der Oberfläche abgelöst werden kann. Dazu wurden erneut 1000,0 µg/ml konzentrierte BSA-Lösungen in Glasart I TopLyo<sup>®</sup> Vials inkubiert. Als Puffer diente hierbei ebenfalls ein 50 mM Natriumacetatpuffer bei einem pH-Wert von 4,98. Zum einen erfolgte zunächst eine dreistündige Inkubation, der sich zwei weitere Inkubationen mit 0,05%iger SDS-Lösung von zwei und einer Stunde anschlossen. Zum anderen wurden die Vials fünf Stunden mit 0,05%iger SDS-Lösung inkubiert, woraufhin eine weitere einstündige Inkubation mit 0,05%iger SDS-Lösung erfolgte. Als Referenz dienten Glasart I TopLyo<sup>®</sup> Vials, die in nur einem Inkubationsschritt für sechs Stunden mit 0,05%iger SDS-Lösung inkubiert wurden. Dabei zeigten die zuerst inkubierten SDS-haltigen Lösungen jeweils ähnliche Proteinkonzentrationen, ungeachtet der unterschiedlichen Kontaktzeiten mit den Glasart I TopLyo<sup>®</sup> Vials. Dies bestätigte somit den vorangegangenen Versuch, dass bereits nach 30 Minuten die Proteinschicht in dem Maße von der Oberfläche abgelöst wird, wie es durch eine 0,05%ige SDS-Lösung möglich ist, und auch durch längere Inkubationsdauer keine weitere Ablösung erfolgt. Die zweiten und dritten Inkubationslösungen hingegen zeigten keinen auswertbaren BSA-Peak. Somit wird entweder bereits durch den ersten Inkubationsschritt die gesamte Proteinschicht von

der Oberfläche abgelöst oder es verbleibt auf der Oberfläche ein Rest der zuvor gebundenen Proteinschicht, der sich auch durch mehrmalige Inkubation mit 0,05%ige SDS-Lösung nicht weiter von der Oberfläche ablösen lässt.

Für BSA-Lösungen, die in unterschiedlichen molaren Natriumacetatpuffern hergestellt wurden, wurden mittels des Micro BCA-Assays (Kapitel 4.3.3) unterschiedliche Kalibriergeraden erhalten. Dies war auch bei Anwendung der SE-HPLC Methode der Fall, weshalb die Anwendung eines 50 mM Natriumacetatpuffers als Assaypuffer für alle Messungen auch bei dieser Methode überprüft wurde. Dazu wurden 1000,0 µg/ml konzentrierte BSA-Lösungen in 10 mM sowie 90 mM Natriumacetatpuffer jeweils bei einem pH-Wert von 4,98 in Glasart I TopLyo<sup>®</sup> Vials inkubiert. Als Assaypuffer wurde anschließend sowohl der Inkubationspuffer als auch ein 50 mM Natriumacetatpuffer verwendet. Tabelle 4.6 liefert einen Überblick über die erhaltenen Ergebnisse.

**Tabelle 4.6:** Vergleich der abgelösten, adsorbierten Proteinmenge durch eine 0,05 %ige SDS- Lösung, die in dem jeweiligen Inkubationspuffer oder einem 50 mM Natriumacetatpuffer hergestellt wurde.

Inkubation in	Desorption in	adsorbierte	
		Proteinmenge [mg/m <sup>2</sup> ](n=2)	V <sub>k</sub> [%]
10 mM	10 mM	4,5	5,1
10 mM	50 mM	4,6	28,2
90 mM	90 mM	3,1	7,2
90 mM	50 mM	3,3	9,4

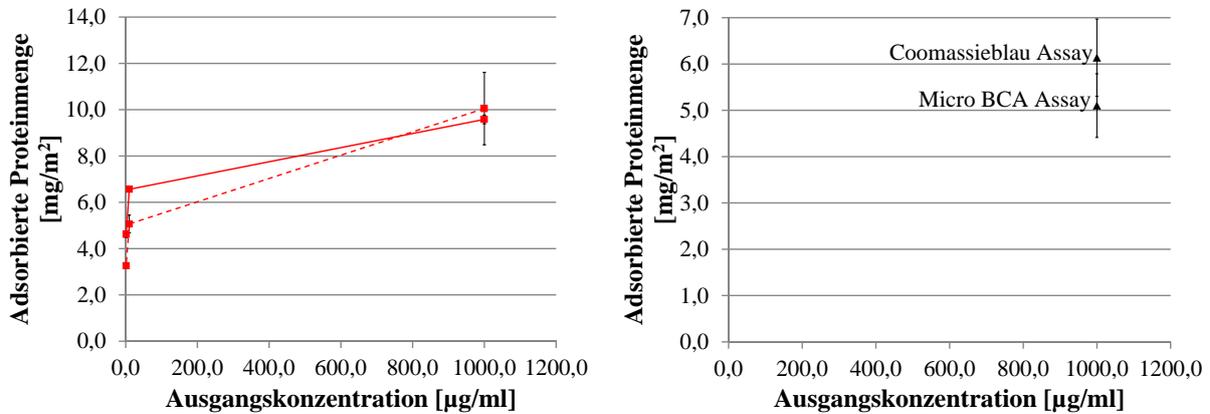
Die Überprüfung, ob ein signifikanter Unterschied zwischen der Verwendung des Inkubationspuffers oder eines 50 mM Natriumacetatpuffers als Assaypuffer besteht, wurde mittels Zweistichproben-t-test durchgeführt, der bereits ausführlich unter 4.3.3 beschrieben wurde. Auch hierbei wurde die Nullhypothese unter Berücksichtigung des Signifikanzniveaus  $\alpha$  von 0,05 bestätigt, da die errechneten Prüfwerte  $t_{Prüf}$  bei Vergleich sowohl des 10 mM als auch des 90 mM Natriumacetatpuffers mit einem 50 mM Natriumacetatpuffer niedrigere Werte als der tabellarische t-Wert  $t_{tab}$  zeigten.

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wurde der 50 mM Natriumacetatpuffer für alle weiteren Messungen als Assaypuffer eingesetzt, ungeachtet in welchem molaren Natriumacetatpuffer die Proben zuvor hergestellt und inkubiert wurden.

#### 4.5 Vergleich der entwickelten Methoden

Abbildungen 4.10a und 4.10b zeigen einen Vergleich der durch den Coomassieblau- und den Micro BCA-Assay ermittelten, adsorbierten BSA-Mengen. Dabei wurden in Abbildung 4.10a

Glasart I TopLyo<sup>®</sup> Vials bei einem pH-Wert der Lösung von 4,98 verglichen. Abbildung 4.10b liefert die erhaltenen Ergebnisse für die adsorbierten Proteinmengen auf Glasart I Vials und einem pH-Wert der Lösung von 7,4.



(a) Glasart I TopLyo<sup>®</sup> Vials, pH 4,98  
(Coomassieblau Assay (—) (n=2),  
Micro BCA-Assay (- - -) (n=3))

(b) Glasart I Vials, pH 7,4  
(Coomassieblau Assay (n=2), Micro BCA-Assay  
(n=3))

**Abbildung 4.10:** Vergleich der adsorbierten BSA-Mengen, die zum einen durch den Coomassieblau-Assay und zum anderen durch den Micro BCA-Assay ermittelt wurden.

Da die Durchführung der Methoden an unterschiedlichen Tagen mit jeweils unterschiedlichen Proben erfolgte, kann man trotz geringer Schwankungen von vergleichbaren Werten für die adsorbierte BSA-Menge unter beiden gezeigten Bedingungen von Coomassieblau- und Micro BCA-Assay sprechen.

Die gemessenen Absorptionswerte für die Ausgangskonzentrationen 10,0 und 1,25 µg/ml auf Glasart I Vials bei pH 7,4 lagen in der Nähe des Leerwertes und waren somit weder mittels Coomassieblau- noch mittels Micro BCA-Assay auswertbar.

Der Coomassieblau-Assay wurde aufgrund variierender Kalibriergeraden nicht weiterverfolgt. Daher wurde nach einer Alternative gesucht, um die mittels Micro BCA-Assay bestimmten Adsorptionsmengen mit einer Referenzmethode zu vergleichen. Zu diesem Zweck wurde die SE-HPLC Methode entwickelt. Zum Vergleich des Micro BCA-Assay und der SE-HPLC wurde die adsorbierte BSA-Menge auf Glasart I TopLyo<sup>®</sup> Vials bestimmt. Dazu wurden 1000,0 µg/ml konzentrierte BSA-Lösungen in 90 mM Natriumacetatpuffer (pH 4,98) hergestellt und die Ergebnisse in Tabelle 4.7 erfasst.

Es zeigte sich bei beiden Methoden der gleiche Trend, an welchen Primärpackmitteln mehr oder weniger BSA adsorbiert. Jedoch lagen die mittels Micro BCA-Assay ermittelten Adsorptionsmengen bei allen verwendeten Primärpackmitteln deutlich über den für die SE-HPLC erhaltenen Werten. Nimmt man dabei an, dass der Micro BCA-Assay die Proteinmenge exakt quantifiziert, deutet dies darauf hin, dass mittels 0,05%iger SDS-Lösung nicht die gesamte BSA-Schicht von der Packmitteloberfläche abgelöst werden kann [50, 74]. Andernfalls können aber auch die Werte, die durch die SE-HPLC erhalten wurden, die genaueren Werte darstellen. Dies könnte durch die ver-

**Tabelle 4.7:** Vergleich der adsorbierten BSA-Mengen an Glasart I-, Glasart I TopLyo<sup>®</sup>- und CZ<sup>®</sup> Vials, die mittels Micro BCA-Assay und SE-HPLC ermittelt wurden.

Micro BCA Assay (n=2)		SE-HPLC (n=2)	
Adsorbierte Proteinmenge [mg/m <sup>2</sup> ]	V <sub>k</sub> [%]	Adsorbierte Proteinmenge [mg/m <sup>2</sup> ]	V <sub>k</sub> [%]
Glasart I Vials			
18,3	0,8	11,1	12,8
Glasart I TopLyo <sup>®</sup> Vials			
10,2	21,8	4,8	15,4
CZ <sup>®</sup> Vials			
14,5	25,4	6,2	4,4

änderte Sekundärstruktur von adsorbierten Proteinen begründet sein, wodurch eine verbesserte Reaktionsfähigkeit des Farbreagens mit dem gebundenen Protein gegeben ist. Die Kalibrierung erfolgt im Rahmen des Assays nämlich durch BSA in Lösung, das zuvor aber an keine Oberfläche adsorbiert war.

Die Kalibriergerade des Coomassieblau-Assay wird auch durch adsorbierte Proteine bestimmt, diese werden jedoch durch Eindampfen der Proteinlösung bei 100°C auf die Oberfläche aufgebracht. Die Probenvials werden hierbei zwar auch für fünf Minuten Temperaturen von 100°C ausgesetzt, um den Einfluss der Temperatur auf die strukturellen Änderungen im Protein gleich zu halten, jedoch kann eine Dauer von fünf Minuten zu gering sein, um vergleichbare strukturelle Änderungen zu erhalten. Somit kann es beim Coomassieblau-Assay zu veränderten Reaktivitäten von Coomassieblau mit der adsorbierten BSA-Schicht und der durch Eindampfen aufgetragenen BSA-Schicht kommen. Auch beim Micro BCA-Assay sind Unterschiede in der Bestimmung der adsorbierten Proteinmenge durch abweichende Bedingungen zwischen den Kalibrierlösungen und den Probenlösungen möglich. Da die Kalibrierung beim Micro BCA-Assay mittels BSA-haltiger Lösungen erfolgt, können die Werte für die adsorbierte BSA-Menge falsch bestimmt werden. Denn, wie in 2.1.3 erläutert, kommt es durch Adsorption zu strukturellen Änderungen des Proteins, was zu veränderter Reaktivität des Farbreagens mit dem gebundenen BSA führen kann.

Albumin adsorbiert, wie bereits unter 2.1.3 erwähnt, bevorzugt seitlich (side-on) an die Oberfläche, wobei auch eine end-on Adsorption möglich ist. Dies scheint von der Ausgangskonzentration des Proteins abhängig zu sein [127]. Bei niedrigen Konzentrationen kommt es zur seitlichen Adsorption, bei hohen Konzentrationen adsorbiert Albumin jedoch mit seinem Ende voran, wodurch mehr Protein an die Oberfläche adsorbieren kann. Im Falle der end-on Adsorption kann, wie unter 3.1 beschrieben, maximal 9,0 mg Albumin/m<sup>2</sup> bei einschichtiger Adsorption an die Oberfläche gebunden werden. Bei seitlicher Adsorption verbraucht Albumin mehr Platz auf der Oberfläche, wodurch sich die maximale adsorbierte Proteinmenge auf 3,6 mg/m<sup>2</sup> begrenzt [5]. Die mittels Micro BCA-Assay ermittelten Werte liegen dabei deutlich höher als es durch die theoretischen

Werte möglich ist. Dies ist möglicherweise der bereits beschriebenen, veränderten Reaktivität des Micro BCA-Reagenz mit BSA in Lösung, das zu Kalibrierzwecken verwendet wurde, und mit BSA, das direkt an die Oberfläche gebunden ist, geschuldet. Auch eine mehrschichtige Adsorption, wie bereits unter 2.1.2 erwähnt, scheint denkbar [39, 40]. Die SE-HPLC liefert hingegen Werte, die zwischen den maximalen Adsorptionen für die side-on und end-on Adsorption liegen. Dadurch wurde eine Mischung aus side-on und end-on Adsorption angenommen.

Aufgrund der variierenden Ergebnisse für die adsorbierte BSA-Menge, die durch den Micro BCA-Assay und die SE-HPLC bestimmt wurden, wurde, wie unter 4.3.3 beschrieben, versucht, die adsorbierte Proteinschicht auch im Falle des Micro BCA-Assays mittels 0,05%iger SDS-Lösung von der Oberfläche abzulösen. Dafür wurde die adsorbierte BSA-Menge auf Glasart I TopLy<sup>®</sup> Vials bei einem pH-Wert der Lösung von 4,98 mittels Micro BCA-Assay und SE-HPLC bestimmt. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 4.8 dargestellt.

**Tabelle 4.8:** Vergleich der adsorbierten BSA-Mengen an Glasart I TopLy<sup>®</sup> Vials, die sowohl im Fall des Micro BCA-Assays als auch für die SE-HPLC mittels 0,05%iger SDS-Lösung von der Oberfläche abgelöst wurden.

		Micro BCA-Assay	SE-HPLC
Adsorbierte Proteinmenge [mg/m <sup>2</sup> ]	Probe 1	4,3	4,7
	Probe 2	6,3	6,2

Die ermittelten BSA-Mengen lagen nach Ablösen durch 0,05%ige SDS-Lösung deutlich niedriger als bei normaler Durchführung des Micro BCA-Assay. Beim Vergleich der Werte, die durch den Micro BCA-Assay sowie die SE-HPLC erhalten wurden, zeigte sich kaum ein Unterschied. Die Ursache über die zugrunde liegenden Mechanismen kann hierdurch final aber nicht ermittelt werden. Eine verbesserte Reaktionsfähigkeit von BCA mit der adsorbierten Proteinschicht im Vergleich zu BSA in Lösung, wie in Kapitel 2.1.3 beschrieben, scheint ebenso denkbar, wie ein unvollständiges Ablösen der BSA-Menge durch 0,05%ige SDS-Lösung. Obwohl die Farbreaktion beim Coomassieblau- und dem Micro BCA-Assay über unterschiedliche Bereiche im Protein erfolgt, wurden vergleichbare Ergebnisse für beide Assays erhalten. Jedoch wichen sowohl für den Coomassieblau- als auch für den Micro BCA-Assay die Bedingungen zur Erstellung der Kalibriergeraden von der Aufarbeitung der vermessenen Proben ab. Dies lässt darauf schließen, dass durch strukturelle Änderungen des adsorbierten BSA eine veränderte Reaktion mit Coomassieblau und Bicinchoninsäure im Vergleich zur Ermittlung der Kalibriergeraden möglich ist.

## 4.6 Zusammenfassung

Es wurden drei verschiedene Methoden entwickelt, um die adsorbierte Proteinmenge an verschiedene Primärpackmittel zu bestimmen.

Der **Coomassieblau Assay** wurde unter anderem eingesetzt, um die adsorbierte Proteinmenge an verschiedene Primärpackmittel zu visualisieren. Dabei zeigte sich eine verstärkte Prote-

inadsorption an Glasart I Vials, die durch das Vorherrschen von elektrostatischer Anziehung zwischen BSA und Glasoberfläche, bei einem pH-Wert der Lösung von 4,98, begründet ist. An unzureichend silikonisierte Bereiche von silikonisierten Glasart I Vials adsorbierte BSA aus eben genannten Gründen in vergleichbarem Maße. Die weiteren, nahezu ungeladenen Primärpackmitteloberflächen (Glasart I plus<sup>®</sup>-, Glasart I TopLyo<sup>®</sup>-, CZ<sup>®</sup>- und Topas<sup>®</sup>-Vials) zeigten aufgrund des Fehlens von elektrostatischer Anziehung deutlich geringere adsorbierte BSA-Mengen. Die elektrostatische Anziehung scheint daher eine stärkere Adsorption von BSA zu veranlassen als die auf hydrophoben Oberflächen unter anderem vorherrschenden hydrophoben Wechselwirkungen. Die Visualisierung kann jedoch nur eingesetzt werden, um stark unterschiedliche BSA-Konzentrationen voneinander zu unterscheiden. Eine quantitative Aussage konnte erst dann erhalten werden, als die mit Coomassieblau angefärbte Proteinschicht mittels 1%iger Ammoniaklösung abgelöst wurde und spektroskopisch vermessen wurde. Dabei zeigte sich jedoch, dass die erhaltenen Kalibriergeraden sowohl vom jeweiligen Primärpackmittel als auch vom pH-Wert der Formulierung abhängig waren. Somit müsste für jeden veränderten Parameter eine neue Kalibriergerade erstellt werden, was durch den hohen Aufwand in der Praxis nicht realisierbar ist. Weiterhin konnte die adsorbierte Proteinmenge an Glasart I Vials nach Inkubation mit einer BSA-Lösung, deren pH-Wert bei 7,4 lag, nur bei 1000,0 µg/ml bestimmt werden. Bei Ausgangskonzentrationen von 10 µg/ml und 1,25 µg/ml lagen die ermittelten Absorptionswerte jedoch in der Nähe des Leerwertes, wodurch keine Bestimmung der adsorbierten Menge möglich war. Aus den genannten Gründen wurde nach Alternativen für den Coomassieblau-Assay gesucht.

Der **Micro BCA Assay** bot einen weiteren Ansatz mittels kolorimetrischer Messung die an verschiedene Primärpackmittel adsorbierte BSA-Menge zu bestimmen. Sowohl beim Coomassieblau Assay als auch beim Micro BCA-Assay erfolgte die Farbreaktion direkt mit dem auf der Oberfläche gebundenen Protein. Einen Vorteil bot im Falle des Micro BCA-Assay, dass die Reaktion des gebundenen Proteins direkt mit dem Micro BCA-Farbreakenz in Lösung erfolgte und dabei kein Ablösen der gebundenen Farbstoffschicht wie beim Coomassieblau-Assay nötig war. Jedoch konnte, wie bereits beim Coomassieblau-Assay, auch mittels Micro BCA-Assay die adsorbierte BSA-Menge an Glasart I Vials bei einem pH-Wert der Lösung von 7,4 nur bei einer Ausgangskonzentration von 1000,0 µg/ml, jedoch nicht bei Ausgangskonzentrationen von 10,0 und 1,25 µg/ml, ermittelt werden.

Weiterhin wurde die adsorbierte BSA Menge mittels **SE-HPLC** in Kombination mit Fluoreszenzdetektion bestimmt. Dazu musste zunächst die CMC von SDS in 10 mM und 90 mM Natriumacetatpuffer ermittelt werden, da zum Ablösen der gebundenen BSA Schicht SDS-Konzentrationen oberhalb der CMC benötigt werden. Als nötige SDS-Konzentration wurde daher 0,05% gewählt, da man somit ausreichend oberhalb der CMC von SDS in 10 mM (0,033%) und 90 mM Natriumacetatpuffer (0,019%) lag. Bereits nach 30 Minuten war nach Inkubation mit 0,05%iger SDS-Lösung die vergleichbare Menge wie nach 24 Stunden von der Vialoberfläche abgelöst. Durch Festlegung der Inkubationsdauer mit SDS-Lösung auf drei Stunden wurde eine ausreichende Ablösung der adsorbierten Proteinmenge sichergestellt.

Sowohl beim Micro BCA-Assay als auch bei der SE-HPLC kam es zur Ermittlung abweichender Kalibriergeraden in unterschiedlich molaren Natriumacetatpuffern. Mittels statistischer Versuchsplanung (Kapitel 6) sollten BSA-Lösungen in unterschiedlich molaren Natriumacetatpuffern hergestellt werden und somit der Einfluss der Ionenstärke auf die adsorbierte Proteinmenge bestimmt werden. Daher wurde untersucht, ob unterschiedliche Adsorptionsmengen ermittelt werden, je nachdem ob als Assaypuffer der jeweilige Inkubationspuffer oder ein 50 mM Natriumacetatpuffer verwendet wurde. Dabei konnte bei beiden Methoden mittels Zwei-Stichproben-t-Test kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, weshalb ein 50 mM Natriumacetatpuffer standardmäßig als Assaypuffer für den Micro BCA-Assay und die SE-HPLC zum Einsatz kam.

Die adsorbierten BSA-Mengen, die durch den Coomassieblau Assay sowie den Micro BCA-Assay ermittelt wurden, wiesen ähnliche Werte auf. Jedoch zeigte sich, dass diese Werte deutlich höher lagen, als die durch die SE-HPLC ermittelten Daten. Um diesen Sachverhalt weiter zu überprüfen, wurde die adsorbierte BSA-Menge auch beim Micro BCA-Assay mittels 0,05%iger SDS-Lösung von der Oberfläche abgelöst. Dabei zeigten sich vergleichbare Ergebnisse der ermittelten adsorbierten BSA-Menge für den Micro BCA-Assay und die SE-HPLC. Die schwankenden Ergebnisse zwischen dem konventionellen Micro BCA-Assay und der SE-HPLC deuten zum einen auf eine veränderte Reaktivität des Micro BCA-Reagenz mit der gebundenen BSA-Schicht und zum anderen auf ein unvollständiges Ablösen der BSA-Schicht durch 0,05%ige SDS-Lösung hin.

Die Kalibriergerade für den Micro BCA-Assay wurde mittels BSA verschiedener Konzentration in Lösung ermittelt. Jedoch kann es, wie in 2.1.3 erläutert, zu strukturellen Änderungen der adsorbierten Proteine kommen, wodurch die BSA-Menge durch die Kalibriergerade falsch bestimmt wird. Die strukturellen Änderungen können zur sterischen Hinderung der für die Farbreaktionen verantwortlichen Bereiche führen, was zu veränderter Reaktionsbereitschaft der Proteine mit den Farbregenzien führen kann. Eine weitere Erklärung für die variierenden Messergebnisse ist das möglicherweise nicht vollständige Ablösen der adsorbierten Proteinschicht durch 0,05%ige SDS-Lösung. Es löste sich auch nach mehrmaliger Inkubation mit 0,05%iger SDS-Lösung nicht mehr BSA von der Oberfläche ab. Jedoch kann dies auch darauf hindeuten, dass von der Oberfläche eine gewisse BSA-Menge auch durch mehrmalige Inkubation mit 0,05%iger SDS Lösung nicht abgelöst werden kann.

## 4.7 Geräte und Materialien

### Geräte

<b>Analysenwaage</b>	Analysenwaage Genius, Sartorius AG
<b>Horizontalschüttler</b>	WT 12, Biometra
<b>HPLC</b>	1200 Series, Agilent Technologies
Binäre Pumpe	1200 Series G1312A, Agilent Technologies
FLD-Detektor	1200 Series G1321A, Agilent Technologies
Probengeber	1200 Series G1329A, Agilent Technologies
Software	Chemstation, Version B.02.01-SR2

Thermostat	1200 Series G1316A, Agilent Technologies
<b>HPLC-Säule</b>	TSKgel G3000PWXL, 7,8 mm x 30,0 cm, Tosoh Bioscience
<b>Millipore Anlage</b>	Milli-Q <sup>®</sup> -Advantage A10 <sup>®</sup> , Merck Millipore
<b>pH-Meter</b>	Professional Meter PP-15, Sartorius AG
<b>Tensiometer</b>	K100 MK2 Tensiometer, Krüss GmbH
<b>Trockenschrank</b>	UT6060, Heraeus GmbH
<b>UV/Vis-Spektrometer</b>	BioTek Instruments, Uvikon XL

**Materialien**

Bördelkappen	West Pharmaceutical Services GmbH & Co. KG, Eschweiler 5920-3457
Bovines Serum Albumin	Sigma Aldrich, Steinheim A3059
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	GIBCO, Invitrogen Corporation, Karlsruhe 21600-010
GelCode Blue Safe Stain (Coomassieblau G-250)	Thermo Scientific Fisher, Karlsruhe 24594
Micro BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe 23235
Natriumacetat-Trihydrat	Sigma Aldrich, Steinheim S8625
Natriumdodecylsulfat Lösung (SDS) 20% in Wasser	Fluka Analytical, Buchs 05030
Omniflex 3G Stopfen	Helvoet Pharma, Ittersbach V9396
Vials aus COC (Topas <sup>®</sup> ), 10 ml	Schott AG, Mainz
Vials aus COP (CZ <sup>®</sup> ), 10 ml	Daikyo Seiko Ltd., Tokyo
Vials Glasart Typ I, 10 ml	Schott AG, Mainz
Vials Glasart Typ I plus <sup>®</sup> , 10 ml	Schott AG, Mainz
Vials Glasart Typ I TopLyo <sup>®</sup> , 10 ml	Schott AG, Mainz

## 5 Validierung des Micro BCA-Assays und der SE-HPLC zur Bestimmung der adsorbierten Proteinmenge an Primärpackmittel

### 5.1 Validierungsparameter

Validierungen analytischer Methoden werden durchgeführt um deren Qualität zu überprüfen. Dabei wird untersucht, ob eine Methode für eine vorliegende Fragestellung präzise, richtige und reproduzierbare Ergebnisse über einen festgelegten Bereich liefert und somit geeignet ist.

Die ICH Guideline Q2 (R1) [128] liefert einen Überblick über die Anforderungen an die Validierung analytischer Methoden. Je nachdem, ob es sich um eine Identitäts-, Reinheits- oder Gehaltsprüfung handelt, werden unterschiedliche Validierungsparameter untersucht. Bei Gehaltsbestimmungen, wie in der vorliegenden Arbeit, werden die in den folgenden Abschnitten erläuterten Parameter bestimmt. Auf Nachweis der Selektivität wurde verzichtet, da in den untersuchten Lösungen BSA als einzige Komponente vorlag. In der Regel wird bei Gehaltsprüfungen keine Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze gefordert. Da es sich in der vorliegenden Fragestellung aber um eine sehr geringe nachzuweisende Proteinmenge handelt, wurde Nachweis- und Bestimmungsgrenze dennoch bestimmt.

#### 5.1.1 Linearität

Zur Überprüfung der Linearität wird untersucht, ob der Zusammenhang zwischen Messergebnissen und eingesetzten Probenkonzentrationen innerhalb eines definierten Bereichs durch eine lineare Kalibrierfunktion zu beschreiben ist. Der untersuchte Bereich sollte so gewählt werden, dass die zu erwartenden Konzentrationen im mittleren Bereich der Kalibriergeraden liegen. Über die Methode der kleinsten Fehlerquadrate wird die Kalibriergerade an den vorliegenden Zusammenhang angepasst und man erhält eine Kalibrierfunktion. Die Steigung der erhaltenen Kalibriergeraden gibt Auskunft über die Empfindlichkeit der Methode. Eine Methode gilt bei Vorliegen einer großen Steigung als empfindlich, da sich auch geringe Konzentrationsunterschiede durch messbare Werteänderungen nachweisen lassen. Der Korrelationskoeffizient  $r$  gibt die Güte des angepassten Modells an den Zusammenhang zwischen Messwert und Probenkonzentration an. Er gibt aber keine Auskunft über das Vorhandensein eines linearen Zusammenhangs. Die ICH fordert für den Korrelationskoeffizienten Werte größer 0,980 [121, 128, 129].

Zur Untersuchung der Linearität wurden Dreifachbestimmungen bei mindestens fünf verschiedenen konzentrierten Probenlösungen durchgeführt. Diese Anzahl an Konzentrationen ist mindestens nötig, um einen möglichen nicht-linearen Zusammenhang auszuschließen.

#### 5.1.2 Präzision

Bei der Präzision handelt es sich um Abweichungen der Einzelergebnisse vom Mittelwert, die durch zufällige Fehler verursacht werden. Kenngrößen der Präzision stellen die Standardabweichung  $s$  (Gleichung 5.1) und der Variationskoeffizient  $V_k$  (relative Standardabweichung) (Glei-

chung 5.2) dar. Zum Vergleich verschiedener Analysenmethoden wird der Variationskoeffizient herangezogen, da dieser in Prozent angegeben wird und die Größe der Messwerte somit keinen Einfluss hat [121, 129].

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (5.1)$$

$$V_k = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\% \quad (5.2)$$

mit

$x_i$ : Einzelmesswerte der Bestimmungen

$\bar{x}$ : Mittelwert der Einzelmesswerte

$n$ : Anzahl der Bestimmungen

Man unterscheidet die Wiederhol-, Vergleichs- und Systempräzision. Auf die Bestimmung der Vergleichspräzision wurde in der vorliegenden Arbeit verzichtet, da die Analysen zunächst nur vom selben Bearbeiter unter Verwendung der selben Gerätschaften durchgeführt wurden.

#### **Wiederholpräzision:**

Zur Bestimmung der Wiederholpräzision wird eine definierte Analysenlösung mehrfach hergestellt und unter gleichen Bedingungen, von der selben Person und am selben Gerät vermessen. Aus den Abweichungen der Messwerte vom Mittelwert wird die Standardabweichung bzw. der Variationskoeffizient bestimmt. Laut Kromidas ist bei Vermessen der Hauptkomponente ein Variationskoeffizient bis zu 3% zulässig [129].

Hierfür wurden Probenlösungen, deren Konzentration im jeweiligen Bereich der Bestimmungsgrenze lag, unabhängig voneinander sechsmal hergestellt. Denn gerade bei niedrigen Konzentrationen erweist es sich als kritisch, präzise Ergebnisse zu erhalten.

#### **Systempräzision:**

Mittels Systempräzision wird überprüft, in welchem Maße Schwankungen durch das jeweilige Messgerät verursacht werden. Zum einen wurde die UV/Vis-Detektion der Farbreaktion beim Micro BCA-Assay und zum anderen das SE-HPLC System überprüft.

Hierfür wurde eine Probenlösung sechsfach vermessen und die Standardabweichung bzw. der Variationskoeffizient der erhaltenen Messwerte berechnet. Bei chromatographischen oder photometrischen Methoden ist mit einem Variationskoeffizienten für die Systempräzision von  $< 1\%$  zu rechnen [129].

### **5.1.3 Richtigkeit**

Durch systematische Fehler kommt es zu Abweichungen zwischen dem Mittelwert der Messergebnisse und dem wahren Wert. Da der wahre Wert meist nicht bekannt ist, untersucht die Richtigkeit die Übereinstimmung zwischen dem Mittelwert und einem als richtig angesehenen

Wert. Ursachen für systematische Fehler können in allen Schritten des Analyseverfahrens begründet sein. Dazu zählen Verunreinigungen der Reagenzien, Fehler am Gerät oder aber auch eine variierende Aufarbeitung der Proben [121].

Bei Validierung der vorliegenden Methoden wurde dazu die Wiederfindungsrate bestimmt. Dafür wurden Probenlösungen bei drei Konzentrationen, die den kompletten untersuchten Bereich abdeckten, hergestellt und jeweils einer Dreifachbestimmung unterzogen. Diese Lösungen wurden mit Referenzlösungen der gleichen drei Konzentrationen verglichen. Die gemessenen Konzentrationen der Referenzlösungen wurden als 100% angenommen. Durch Vergleich der gemittelten Messwerte von Proben- und Referenzlösungen wurde die Wiederfindungsrate (Gleichung 5.3) bestimmt.

$$\text{Wiederfindungsrate} = \frac{\bar{x}_{ist}}{\bar{x}_{soll}} \cdot 100\% \quad (5.3)$$

mit

$\bar{x}_{ist}$ : gemittelttes Messergebnis der Probelösung

$\bar{x}_{soll}$ : gemittelttes Messergebnis der Referenzlösung

Bei Bestimmung der Hauptkomponente einer Lösung wird eine Wiederfindungsrate von  $100 \pm 2\%$  gefordert. Aber auch eine Wiederfindungsrate, die mit dem vierfachen  $V_k$  von 100% entfernt liegt, wird laut Kromidas als ausreichend bezeichnet [129].

#### 5.1.4 Bestimmungs- und Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze (NWG) wird zur qualitativen Entscheidung eingesetzt, bei welcher Grenzkonzentration ein Analyt noch nachweisbar ist. Die Bestimmungsgrenze (BSG) dagegen gibt die kleinste, noch quantifizierbare Menge an Analyt an.

Beim Micro BCA-Assay wurde die Nachweis- und Bestimmungsgrenze über Gleichungen 5.4a und 5.4b bestimmt [128, 129].

$$NWG = \frac{3,3 \cdot s_{niedrig}}{m} \quad (5.4a)$$

$$BSG = \frac{10 \cdot s_{niedrig}}{m} \quad (5.4b)$$

mit

$s_{niedrig}$ : Standardabweichung von 6 sehr niedrig konzentrierten Probenlösungen

$m$ : Steigung der Kalibriergeraden

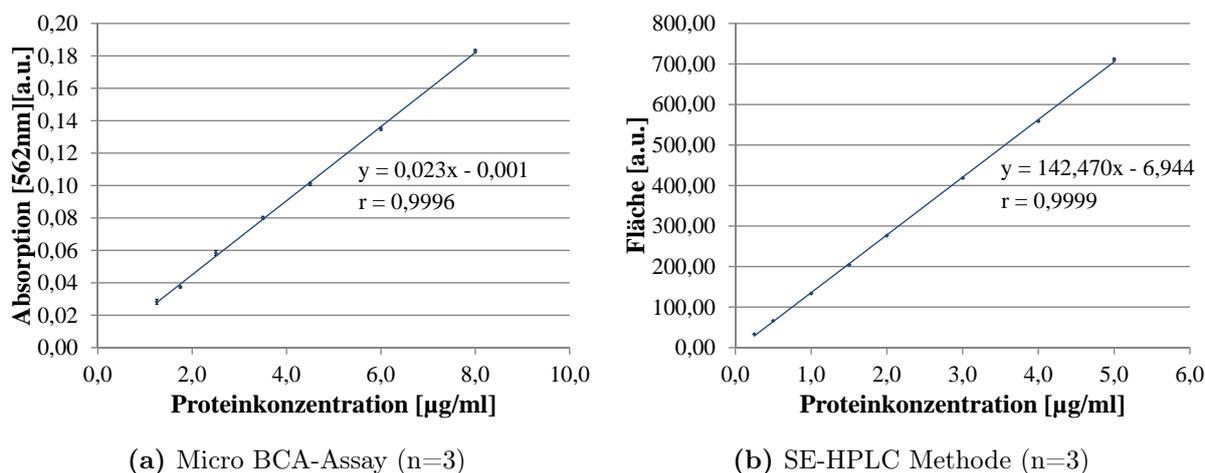
Dazu wurden Probenlösungen hergestellt, die etwa 50% niedriger konzentriert waren als die erwartete Nachweisgrenze. Die Standardabweichung ( $s_{niedrig}$ ) wurde aus 6 unabhängig hergestellten Lösungen ermittelt.

Im Falle der SE-HPLC wurde die Nachweis- und Bestimmungsgrenze über das Signal/Rausch-Verhältnis ermittelt. Die Nachweisgrenze wurde über ein Signal/Rausch-Verhältnis von 3:1 definiert, die Bestimmungsgrenze über ein Verhältnis von 10:1.

## 5.2 Validierung des Micro BCA-Assays und der SE-HPLC zur Bestimmung der adsorbierten Proteinmenge an Primärpackmittel

### 5.2.1 Linearität

Zunächst wurde die Linearität der beiden Methoden überprüft. Da sich in Vorversuchen (Kapitel 4.5) gezeigt hatte, dass mittels Micro BCA-Assay höhere Adsorptionen bestimmt wurden als mittels SE-HPLC, wurden bei der Validierung der Methoden unterschiedliche Konzentrationsbereiche definiert. Der untersuchte Konzentrationsbereich erstreckte sich bei dem Micro BCA-Assay über 1,25 - 8,0  $\mu\text{g/ml}$  BSA (7 Kalibrierpunkte), bei der SE-HPLC über 0,25 - 5,0  $\mu\text{g/ml}$  BSA (8 Kalibrierpunkte). Es wurden hierfür jeweils in Dreifachbestimmung beim Micro BCA-Assay sieben, bei der SE-HPLC acht Konzentrationen gleichmäßig über den untersuchten Bereich verteilt. Abbildungen 5.1a zeigt die blank-korrigierte Kalibriergerade des Micro BCA-Assay und Abbildung 5.1b die erhaltene Kalibriergerade für die SE-HPLC. Ebenfalls aufgeführt sind sowohl die Kalibrierfunktion als auch der Korrelationskoeffizient  $r$ .



**Abbildung 5.1:** Erhalt der abgebildeten Kalibriergeraden unter Verwendung von BSA durch den Micro BCA-Assay bzw. die SE-HPLC Methode

Sowohl der Micro BCA-Assay ( $r=0,9996$ ) als auch die SE-HPLC Methode ( $r=0,9999$ ) liefern in den untersuchten Konzentrationsbereichen Korrelationskoeffizienten, die deutlich oberhalb dem von der ICH mindestens geforderten Korrelationskoeffizienten von 0,980 liegen.

### 5.2.2 Präzision

Es wurden BSA-Lösungen so, wie unter 5.1.2 beschrieben, hergestellt. Die Messpräzision wurde bei gering konzentrierten BSA-Lösungen untersucht, da der Erhalt präziser Ergebnisse für geringe Konzentrationen kritischer einzuschätzen ist als bei höher konzentrierten Lösungen. Sowohl zur Bestimmung der Wiederhol- als auch der Systempräzision wurden für den Micro BCA-Assay eine BSA-Konzentration von 1,5 µg/ml verwendet. Bei der SE-HPLC kam jeweils eine BSA-Konzentration von 0,25 µg/ml zum Einsatz.

**Tabelle 5.1:** Bestimmung der Präzision unter Verwendung von BSA durch den Micro BCA-Assay bzw. die SE-HPLC Methode

	Micro BCA-Assay (n=6)	SE-HPLC (n=6)
Systempräzision		
$V_k$ [%]	0,4	1,6
Wiederholpräzision		
$V_k$ [%]	2,0	5,3

Die Systempräzision der UV/Vis-Detektion beim Micro BCA-Assay lag unterhalb der geforderten Grenze von 1%. Bei der SE-HPLC hingegen erhielt man eine Systempräzision von 1,6%, wobei die leicht erhöhte Messpräzision aufgrund der Konzentrationsmessung nahe der Bestimmungsgrenze voll akzeptabel ist.

Der erhöhte  $V_k$  für die Systempräzision der SE-HPLC erklärt auch den im Vergleich zum Micro BCA-Assay höheren  $V_k$  für die Wiederholpräzision. Die geforderte Grenze von 3% wurde im Falle des Micro BCA-Assays erreicht. Doch auch die SE-HPLC liefert bei solch gering konzentrierten BSA-Lösungen noch ausreichend präzise Ergebnisse.

### 5.2.3 Richtigkeit

Die Wiederfindungsraten wurden bei jeweils drei verschiedenen konzentrierten BSA-Lösungen bestimmt. Die verwendeten Konzentrationen sowie die erhaltenen Wiederfindungsraten für den Micro BCA-Assay bzw. die SE-HPLC sind Tabelle 5.2 zu entnehmen. Alle Wiederfindungsraten befinden sich innerhalb der unter 5.1.3 genannten Grenze von  $100 \pm 2\%$ . Nur die höchste Konzentration des Micro BCA-Assays von 8,0 µg/ml BSA zeigt etwas erhöhte Werte bei der Wiederfindung. Da die im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Konzentrationen zum größten Teil in der Mitte des validierten Bereichs liegen, kann man diese geringfügige Abweichung tolerieren. Darüber hinaus liegen alle Wiederfindungsraten in der Vorgabe mit dem vierfachen  $V_k$  von 100% entfernt zu liegen.

**Tabelle 5.2:** Bestimmung der Richtigkeit unter Verwendung von BSA durch den Micro BCA-Assay bzw. die SE-HPLC Methode

(a) Micro BCA-Assay		(b) SE-HPLC Methode	
Proteinkonzentration	Wiederfindung	Proteinkonzentration	Wiederfindung
[ $\mu\text{g/ml}$ ]	[%]	[ $\mu\text{g/ml}$ ]	[%]
8,00	105,1	5,00	98,7
3,50	101,5	2,50	98,9
1,25	101,9	0,25	102,4

#### 5.2.4 Bestimmungs- und Nachweisgrenze

Es wurden sechsfach und unabhängig voneinander gering konzentrierte BSA-Lösungen hergestellt und vermessen. Aus der Steigung der Kalibriergeraden sowie aus der Standardabweichung der niedrig konzentrierten BSA-Lösungen wurden nach den unter 5.1.4 dargestellten Formeln die Bestimmungs- und Nachweisgrenze berechnet.

Für die SE-HPLC wurden die BSA-Lösungen solange verdünnt, bis sich ein Signal/Rausch-Verhältnis von 3:1 für die Nachweisgrenze beziehungsweise von 10:1 für die Bestimmungsgrenze ergab. Die erhaltenen Konzentrationswerte für die Nachweis- und Bestimmungsgrenze liefert Tabelle 5.3.

**Tabelle 5.3:** Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze unter Verwendung von BSA durch den Micro BCA-Assay bzw. die SE-HPLC Methode

	Micro BCA-Assay	SE-HPLC
NWG [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0,4	0,1
BSG [ $\mu\text{g/ml}$ ]	1,2	0,2

Der Micro BCA-Assay zeigt eine höhere Nachweis- und Bestimmungsgrenze im Vergleich zur SE-HPLC Methode. Dennoch sind beide Methoden zur Bestimmung der geringen adsorbierten Proteinmengen geeignet.

### 5.3 Zusammenfassung

Sowohl der Micro BCA-Assay als auch die SE-HPLC Methode wurden validiert, um die Qualität beider Methoden im Hinblick auf Linearität, Präzision und Richtigkeit zu überprüfen. Des Weiteren wurde für beide Methoden die Nachweis- und Bestimmungsgrenze ermittelt. Als Modellprotein diente BSA.

Es wurde gezeigt, dass sowohl der Micro BCA-Assay als auch die SE-HPLC Methode präzise und richtige Ergebnisse im jeweils untersuchten Bereich liefern und somit für die Bestimmung der adsorbierten Proteinmenge eingesetzt werden können. Der Zusammenhang zwischen Messergebnis und eingesetzter Probenkonzentration konnte beim Micro BCA-Assay im Arbeitsbereich zwischen 1,25 und 8,0 µg/ml durch eine lineare Annäherung beschrieben werden. Dies galt ebenfalls bei der SE-HPLC für den untersuchten Bereich von 0,25 - 5,0 µg/ml. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen lagen im Falle des Micro BCA-Assays erwartungsgemäß bei höheren Konzentrationen als bei der SE-HPLC.

## 6 Ermittlung signifikanter Faktoren auf die Proteinadsorption mittels statistischer Versuchsplanung

### 6.1 Auswahl und Festlegung des Untersuchungsbereichs der Faktoren

Im Rahmen der Methodenentwicklung (Kapitel 4) hatte sich gezeigt, dass verschiedene Faktoren einen Einfluss auf die adsorbierte BSA-Menge haben. Um einen quantitativen Zusammenhang zwischen den Faktoren und den Zielgrößen zu ermitteln, wurde der Ansatz der statistischen Versuchsplanung gewählt. Zunächst musste festgelegt werden, welche Faktoren im Rahmen dieser Versuchsplanung untersucht werden sollten. Die Erstellung und Durchführung des statistischen Versuchsplans ist in Kapitel 6.2 wiedergegeben.

- **Primärpackmittel:**

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Primärpackmittel auf die Menge an adsorbiertem BSA sollten Primärpackmittel mit unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften zum Einsatz kommen. Glasart I Vials stellen das Standardpackmittel für parenterale Zubereitungen dar und wurden als Vertreter der hydrophilen Oberfläche gewählt. Im Gegensatz zu den Glasart I Vials, weisen die Glasart I TopLyo<sup>®</sup> Vials eine hydrophobisierte Innenoberfläche auf, deren Beschichtungsprozess in Kapitel 2.2.1 beschrieben wurde. Zudem kommen diese Vials häufig als Primärpackmittel für Lyophilisate zum Einsatz, was die nähere Betrachtung dieser Vialart begründet. Auch sollten Kunststoffvials mit in die Untersuchungen einbezogen werden, da es bereits Hinweise gab, dass auf diese Art von Vials weniger Protein als auf klassische Glasart I Vials adsorbiert [7, 90]. Als Vertreter der Kunststoffvials wurden CZ<sup>®</sup> Vials, die aus COP bestehen, gewählt.

- **pH-Wert der BSA-Lösung:**

In Kapitel 4.3.2 zeigte sich bereits in Vorversuchen des Micro BCA-Assays ein Einfluss des pH-Wertes der BSA-Lösung auf die adsorbierte Proteinmenge. Darauf aufbauend wurde der Einfluss des pH-Wertes, der abweichend vom isoelektrischen Punkt von BSA eingestellt wurde, auf die Proteinadsorption auf hydrophilen und hydrophoben Oberflächen untersucht. Als Primärpackmittel kamen dazu Glasart I Vials und Glasart I TopLyo<sup>®</sup> Vials zum Einsatz. Der pH-Wert der BSA-Lösungen mit den Ausgangskonzentrationen 1000,0 µg/ml, 10,0 µg/ml sowie 1,25 µg/ml wurde jeweils auf 7,4 eingestellt. Tabelle 6.1 zeigt die mittels Micro BCA-Assay bestimmten adsorbierten Proteinmengen, die durch Dreifachbestimmung erhalten wurden. Lediglich bei einer Ausgangskonzentration von 1000,0 µg/ml konnte eine Proteinmengenbestimmung erfolgen, da bei den niedrigeren Ausgangskonzentrationen die gemessenen Absorptionswerte bereits in der Nähe des Leerwertes lagen.

Hierbei zeigte sich jedoch ein anderes Bild als in Vorversuchen bei einem pH-Wert der Lösung von 4,98 (Kapitel 4.5), wobei Glasart I Vials im Vergleich zu Glasart I TopLyo<sup>®</sup>- und CZ<sup>®</sup>-Vials eine höhere adsorbierte BSA-Menge aufwiesen. Bei einem pH-Wert der Lösung von 7,4 zeigten Glasart I TopLyo<sup>®</sup> Vials im Vergleich zu Glasart I Vials höhere

**Tabelle 6.1:** Vergleich der adsorbierten Proteinmenge an Glasart I TopLyo<sup>®</sup> Vials und Glasart I Vials bei einem pH-Wert der Lösung von 7,4 und einer Ausgangskonzentration von 1000,0 µg/ml

Glasart I Vials (n=3)		Glasart I TopLyo <sup>®</sup> Vials (n=3)	
Adsorbierte Proteinmenge [mg/m <sup>2</sup> ]	V <sub>k</sub> [%]	Adsorbierte Proteinmenge [mg/m <sup>2</sup> ]	V <sub>k</sub> [%]
3,5	17,5	6,6	3,6

Adsorptionswerte. Wie bereits unter 2.1.4 erwähnt, liegt BSA bei einem pH-Wert abweichend vom isoelektrischen Punkt stärker entfaltet vor. Somit kann weniger Protein auf die Oberfläche adsorbieren, da durch das stärker entfaltete Protein mehr Platz auf der Oberfläche verbraucht wird. Der erhöhte Platzbedarf von BSA auf der Oberfläche aufgrund von Entfaltung erklärt zwar die insgesamt geringeren adsorbierten BSA-Mengen im Vergleich zu den adsorbierten Mengen am IEP. Für die unterschiedlich adsorbierten Mengen auf Glasart I TopLyo<sup>®</sup>- und Glasart I-Vials müssen jedoch andere Erklärungen gefunden werden. Glasart I TopLyo<sup>®</sup> Vials sind nahezu ungeladen, wodurch elektrostatische Wechselwirkungen als Triebkraft für die Adsorption von BSA nahezu entfallen. Treibende Kraft für die Proteinadsorption scheinen dabei vor allem hydrophobe Wechselwirkungen zu sein. Van der Waalsche Kräfte tragen sowohl zur Proteinadsorption auf Glasart I TopLyo<sup>®</sup>- als auch auf Glasart I- Vials bei. Auf Glasart I Vials kommen aufgrund der geladenen Oberfläche zudem elektrostatische Wechselwirkungen zum Tragen, die bei einem pH-Wert von 7,4 zur elektrostatischen Abstoßung zwischen Protein und Oberfläche führen. Somit scheint die Proteinadsorption durch Coulombsche Wechselwirkungen stärker beeinflusst zu werden als durch hydrophobe Wechselwirkungen. Es hatte sich bereits in Kapitel 4.5 gezeigt, dass bei Vorherrschen von elektrostatischer Anziehung zwischen einer hydrophilen, geladenen Oberflächen und BSA bei einem pH-Wert der Lösung von 4,98 mehr adsorbiert als auf hydrophobe, ungeladene Oberflächen, wobei die Adsorption vor allem durch hydrophobe Wechselwirkungen getrieben wird. Weiterhin verdeutlichen diese Ergebnisse, dass BSA als "soft protein" (Kapitel 2.1.4) auch unter diesen ungünstigen, elektrostatisch abstoßenden Bedingungen in geringem Maße auf die Glasoberfläche adsorbiert.

Es hatte sich zudem, wie auch schon in Kapitel 4.3.2, gezeigt, dass die adsorbierte BSA-Menge mittels Micro BCA-Assay nicht unter allen Bedingungen ermittelt werden konnte. Bei einem pH-Wert der Lösung von 7,4 konnte dabei die gebundene BSA-Menge auf Glasart I Vials ausgehend von 10,0 µg/ml und 1,25 µg/ml konzentrierten BSA-Lösungen nicht mehr bestimmt werden, da die Absorptionswerte in der Nähe des Leerwertes lagen. Selbst bei einer Ausgangskonzentration von 1000,0 µg/ml lagen die ermittelten Werte nur geringfügig oberhalb der Bestimmungsgrenze. Zwar lagen die ermittelten Adsorptionsmengen auf Glasart I TopLyo<sup>®</sup> Vials bei Ausgangskonzentrationen von 10,0 µg/ml und 1,25 µg/ml und einem pH-Wert der Lösung von 4,98 auch in der Nähe bzw. unterhalb der Bestimmungs-

grenze, jedoch konnte ausgehend von einer 1000,0 µg/ml konzentrierten BSA-Lösung die adsorbierte BSA-Menge quantifiziert werden. Nachdem sich in Versuchen in Kapitel 4.5 gezeigt hatte, dass auf Glasart I Vials mehr BSA und auf CZ<sup>®</sup> Vials eine vergleichbare BSA Menge wie auf Glasart I TopLyo<sup>®</sup> Vials adsorbiert, konnte aufbauend auf die erhaltenen Ergebnisse von einer messbaren Proteinadsorption auf allen drei Packmitteln ausgegangen werden. Zur Untersuchung der Proteinadsorption im Rahmen der statistischen Versuchsplanung wurde daher als pH-Wert der BSA-Lösung der IEP von BSA festgelegt, um auf allen ausgewählten Primärpackmitteln eine ausreichend messbare adsorbierte Proteinmenge sicherzustellen.

- **BSA-Ausgangskonzentration:**

Zur Festlegung, welche maximale Ausgangskonzentration im Rahmen des Versuchsplans untersucht werden sollte, wurde zunächst mittels SE-HPLC die adsorbierte BSA-Menge auf Glasart I TopLyo<sup>®</sup> Vials bei einer Ausgangskonzentration von 9000,0 µg/ml gemessen. Dabei erhielt man durch Dreifachbestimmung deutlich schwankende Werte. Weiterführend wurde die adsorbierte BSA-Menge auf Glasart I TopLyo<sup>®</sup> Vials in Dreifachbestimmung mittels Micro BCA-Assay bestimmt. Als Ausgangskonzentration kamen 1000,0 µg/ml, 5000,0 µg/ml und 7000,0 µg/ml zum Einsatz. Der pH-Wert aller Lösungen betrug 4,98. Dabei zeigte sich, dass es bei steigenden Ausgangskonzentrationen auch zu einer Zunahme der Variationskoeffizienten kam.

Des Weiteren wurden bei einer Ausgangskonzentration von 5000,0 µg/ml auf allen drei ausgewählten Primärpackmitteln hohe Variationskoeffizienten erhalten. Die Überprüfung erfolgte in Dreifachbestimmung mittels Micro BCA-Assay. Der pH-Wert der Lösungen lag in allen Untersuchungen bei 4,98. Jedoch wurden bei einer Ausgangskonzentration von 2500,0 µg/ml auf den drei ausgewählten Primärpackmitteln ähnliche Variationskoeffizienten wie bei einer Ausgangskonzentration von 1000,0 µg/ml erhalten. Die adsorbierte BSA-Menge wurde auch in diesem Falle in Dreifachbestimmung mittels Micro BCA-Assay bestimmt. Somit wurde eine Ausgangskonzentration von 2500,0 µg/ml als maximale BSA-Ausgangskonzentration für den statistischen Versuchsplan festgelegt.

Die beobachteten Schwankungen bei höheren Ausgangskonzentrationen sind möglicherweise durch die komplexe Proteinstruktur begründet. Bei niedrigen Proteinkonzentrationen adsorbieren Proteine zunächst aufgrund von den unter 2.1.2 beschriebenen Triebkräften in derjenigen Konformation auf die Oberfläche, die entropisch gesehen die günstigste darstellt. Adsorbieren jedoch weitere Proteine auf die Oberfläche kommen auch Protein-Protein-Wechselwirkungen zum Tragen, die zu veränderter Sekundärstruktur der gebundenen Proteine führen. Die adsorbierten Proteine nehmen weniger Platz auf der Oberfläche ein und es kann zur Aggregation der Proteine kommen, wodurch eine größere Proteinmenge auf die Oberfläche gebunden werden kann. Auch eine Ausbildung einer zweiten Proteinschicht scheint denkbar, deren Anordnung und Ausbildung, im Vergleich zur ersten Proteinschicht, wohlmöglich weniger reproduzierbar auftritt und es somit zu schwankenden Adsorptionswerten kommt [130].

Bei Auswahl der niedrigsten Ausgangskonzentration für die Untersuchung im statistischen Versuchsplan zeichnete sich bereits in Kapitel 4.3.2 eine Grenze ab. Dabei lagen die adsorbierten BSA-Mengen ausgehend von beispielsweise 10,0 µg/ml oder 1,25 µg/ml konzentrierten BSA-Lösungen bei Bestimmung mittels Micro BCA-Assay bereits unterhalb der Bestimmungsgrenze. Jedoch lag die adsorbierte BSA-Menge auf Glasart I TopLyo® Vials ausgehend von einer 500 µg/ml konzentrierten BSA-Lösung in Zweifachbestimmung sowohl bei Anwendung der SE-HPLC als auch des Micro BCA-Assay oberhalb der jeweiligen Bestimmungsgrenzen, weshalb diese Konzentration als untere Grenze im statistischen Versuchsplan definiert wurde.

- **Ionenstärke des Puffers:**

Lösungen therapeutischer Proteine werden in verschiedenen Puffersystemen hergestellt, wobei die Auswahl nach der Stabilität und Löslichkeit der Proteine in diesen Puffersystemen erfolgt [131]. Im Rahmen dieses statistischen Versuchsplans wurde, wie bereits oben erwähnt, ein pH-Wert aller Lösungen am isoelektrischen Punkt von BSA (pH 4,98) festgesetzt. Die pH-Einstellung erfolgte durch einen Natriumacetatpuffer mit Konzentrationen zwischen 10 mM und 90 mM. Dieser Puffer wurde bereits für die Untersuchung der BSA Adsorption auf verschiedene Oberflächen angewandt [8, 47]. Somit wurde der Einfluss der Ionenkonzentration und nicht der Einfluss der Ionenart auf die adsorbierte BSA-Menge untersucht.

- **Inkubationstemperatur:**

In Fachinformationen verschiedener Proteinanzneimittel ist eine Lagerung der Proteinlösung beziehungsweise der rekonstituierten Proteinlösung zwischen 2°C und 8°C empfohlen [132, 133, 134]. Es wurde daher 4°C als niedrigste Temperatur gewählt, um die vorgeschriebene Lagerungstemperatur miteinzubeziehen. Des Weiteren wurde der Einfluss von Temperaturen bis zu 36°C untersucht, das den “worst case“ in einer Klinik ohne Klimaanlage bei sommerlichen Temperaturen darstellte.

- **Inkubationsdauer:**

Waxman und Vilivalam untersuchten die Adsorption von BSA über einen Zeitraum von 24 Stunden. Dabei zeigte sich, dass bereits nach 2 Stunden die maximale BSA-Menge auf Glasart I Vials adsorbiert war [74]. Auch weitere Quellen bestätigten, dass bereits nach wenigen Stunden die maximale Proteinmenge auf verschiedene Oberflächen adsorbiert war und auch nach 24 Stunden keine weitere Zunahme der adsorbierten Menge festgestellt werden konnte [4, 68, 52]. Nach Rekonstitution wird für Proteinanzneimittel eine sofortige Applikation in den Patienten empfohlen, wenn auch die rekonstituierte Lösungen über wenige Stunden hin stabil bleibt [132]. Aufbauend auf die Ergebnisse der Literatur wurde daher ein Zeitraum von 15 Minuten bis hin zu 24 Stunden untersucht. Zudem wird nicht davon ausgegangen, dass rekonstituierte Proteinlösungen erst nach 24 Stunden oder längerer Standdauer zum Einsatz kommen.

## 6.2 Erstellung und Durchführung des zentral zusammengesetzten Versuchsplans

Um auch einen möglichen nichtlinearen Zusammenhang zwischen Faktoren und Zielgrößen zu erfassen, mussten die Faktoren, wie unter 2.3.2 erläutert, auf mehr als zwei Stufen variiert werden. Zu diesem Zweck wurde ein zentral zusammengesetzter Versuchsplan ausgewählt, wobei die Faktoren auf fünf Stufen verändert wurden. Die Festlegung, in welchem Bereich der Einfluss der einzelnen Faktoren untersucht wurde, sind Kapitel 6.1 zu entnehmen. Tabelle 6.2 gibt einen Überblick über die untersuchten Faktoren und die jeweils eingestellten Stufenwerte. Als Modellprotein diente in allen Fällen, das unter 3.1 ausgewählte, BSA. Der pH-Wert der Lösungen wurde bei allen Versuchen auf den isoelektrischen Punkt von BSA (pH 4,98) eingestellt.

**Tabelle 6.2:** Übersicht der untersuchten numerischen und qualitativen Faktoren im zentral zusammengesetzten Versuchsplan

<b>numerische Faktoren</b>						
Faktor	Einheit	Stufe $-\alpha$	Stufe -1	Stufe 0	Stufe +1	Stufe $+\alpha$
A, Ausgangskonzentration	$\mu\text{g/ml}$	500,0	1000,0	1500,0	2000,0	2500,0
B, Ionenstärke	mM	10	30	50	70	90
C, Inkubationsdauer	h	0,25	6,19	12,13	18,06	24,00
D, Inkubationstemperatur	$^{\circ}\text{C}$	4	12	20	28	36
<b>qualitative Faktoren</b>						
E, Vialart (Glasart I-, Glasart I TopLyo <sup>®</sup> -, CZ <sup>®</sup> - Vial)						

Die  $\pm\alpha$ -Einstellungen des zentral zusammengesetzten Versuchsplans dienen der Absicherung des mathematischen Modells. Gültigkeit besitzt das mathematische Modell innerhalb des Versuchsraumes, der durch die -1 und +1 Stufe eingegrenzt wird.

Wie unter 2.3.2 erläutert, erhält man durch eine geeignete Anzahl der Wiederholungen des Zentralpunktes einen gleichzeitig orthogonalen und drehbaren Plan. Zu diesem Zwecke wäre im vorliegenden Versuchsplan eine zwölfmalige Wiederholung des Zentralpunktes nötig gewesen. Um die Versuchsanzahl zu begrenzen, wurde der Zentralpunkt viermal wiederholt. Dies stellte einen guten Kompromiss dar, um einen drehbaren und annähernd orthogonalen Plan und eine realisierbare Versuchsanzahl zu erhalten. Für den Sternpunktabstand  $\alpha$  wurde ein Wert von 2 gewählt. Die zugrunde liegenden Formeln zur Berechnung des Sternpunktabstandes  $\alpha$  sind in Kapitel 2.3.2 beschrieben.

Wie Tabelle 6.2 zu entnehmen ist, sollte der Einfluss von vier numerischen Faktoren auf die Proteinadsorption an Primärpackmittel untersucht werden. Als Grundlage des zentral zusam-

mengesetzten Versuchsplans diente dabei ein vollständiger faktorieller Versuchsplan, woraus sich unter Berücksichtigung der viermaligen Wiederholung des Zentralpunktes 28 Versuche ergaben. In die Untersuchungen wurden, wie unter 6.1 erläutert, Glasart I-, Glasart I TopLyo<sup>®</sup>- und CZ<sup>®</sup>-Vials miteinbezogen. Für jeden dieser drei qualitativen Faktoren musste der Versuchsplan, wie unter 2.3.1 beschrieben, erneut durchgeführt werden. Dies führte ausgehend von 28 Versuchen pro Versuchsplan zu einer Anzahl von 84 Versuchen, die randomisiert durchgeführt wurden. Für jeden qualitativen Faktor wurde dabei ein eigenes mathematisches Modell erhalten.

Als Zielgröße diente die in mg/m<sup>2</sup> angegebene, adsorbierte BSA-Menge, die zum einen durch den Micro BCA-Assay und zum anderen durch die SE-HPLC ermittelt wurden. Im Folgenden werden die beiden Zielgrößen als "Micro BCA-Assay" und "SE-HPLC" bezeichnet. Die Methodenentwicklung der beiden angewandten Methoden wurde bereits unter 4.3 und 4.4 beschrieben und in Kapitel 5 der Erhalt von präzisen und richtigen Ergebnissen bestätigt. Es erfolgte für beide Methoden eine tägliche Vierpunkt-Kalibrierung.

Eine Blockbildung war im vorliegenden Versuchsplan nicht nötig, da alle Lösungen für jeden Versuch neu hergestellt wurden und gleichbleibende Einstellungen der verschiedenen Parameter gewährleistet werden konnten.

Durch Wahl des Versuchsumfanges von 28 Versuchen besitzt der vorliegende zentral zusammengesetzte Versuchsplan die in Tabelle 6.3 angegebene Power, um signifikante Einfachwirkungen sowie Zweifach-Wechselwirkungen (WW) auch als solche zu erkennen. Dabei ist entscheidend, ob der quantitative Zusammenhang zwischen Faktoren und Zielgröße in der Größenordnung einer halben, einer oder zwei Standardabweichungen ( $s$ ) liegt. Die Power wurde unter Annahme eines Signifikanzniveaus  $\alpha$  von 0,05 erhalten.

**Tabelle 6.3:** Übersicht über die jeweilige Power bei Vorliegen eines quantitativen Zusammenhangs zwischen Faktoren und Zielgrößen, die im Bereich von einer halben bis zu zwei Standardabweichungen ( $s$ ) liegen

	Power		
	0,5 $s$	1 $s$	2 $s$
numerische Faktoren	55,0 %	98,7 %	99,9 %
qualitative Faktoren	35,3 %	91,4 %	99,9 %
Zweifach-WW zwischen numerischen Faktoren	39,9 %	92,6 %	99,9 %
Zweifach-WW zwischen numerischen und qualitativen Faktoren	30,7 %	86,6 %	99,9 %

Die Herstellung der BSA-Lösungen erfolgte in Glasflaschen (Schott Duran<sup>®</sup>). Es ist bekannt, dass Proteine an Glasgeräte adsorbieren [26]. Da die Herstellung stets in der gleichen Art von Glasflaschen erfolgte, geht man davon aus, dass es zu einem gleichbleibenden Konzentrationsverlust kommt und die gleiche Ausgangskonzentration zur Adsorption an die verschiedenen Primärpack-

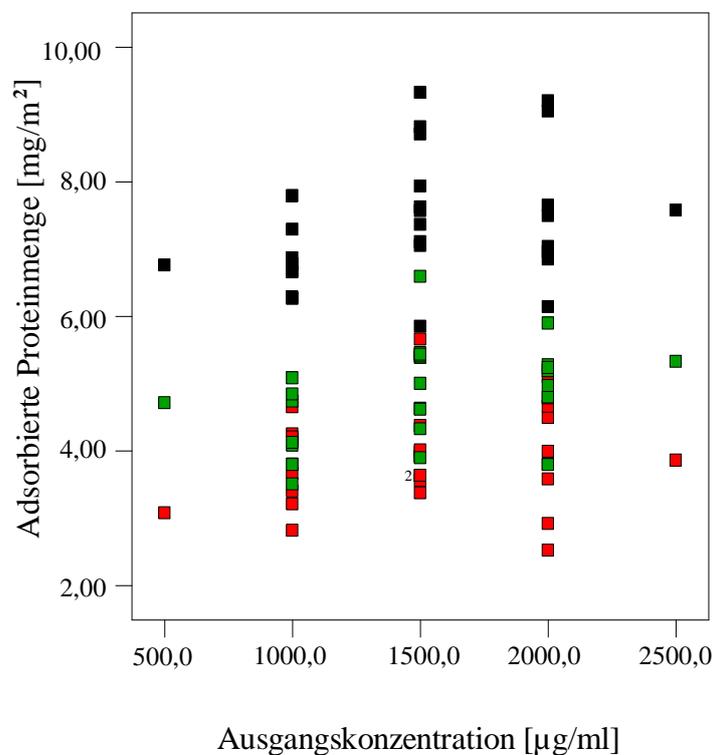
mittel zur Verfügung steht. Somit stellte die Adsorption an die verwendeten Glasgeräte keinen zusätzlichen, zu untersuchenden Faktor dar.

Die Software Design Expert<sup>®</sup> diente sowohl zur Aufstellung als auch zur Auswertung des vorliegenden statistischen Versuchsplans.

### 6.3 Ergebnisse und Diskussion des zentral zusammengesetzten Versuchsplans

Wie sich bereits im Rahmen der Methodenentwicklung (Kapitel 4) gezeigt hatte, kommt es aufgrund der Komplexität der Proteinstruktur auch unter gleichen Bedingungen zu schwankender Adsorption. Daher wurde die adsorbierte BSA-Menge, die mittels Micro BCA-Assay bzw. SE-HPLC erhalten wurde, jeweils durch Dreifachbestimmung ermittelt. Die Daten der 84 Versuche nach jeweiliger Dreifachbestimmung sind der im Anhang befindlichen Tabelle A.1 zu entnehmen.

Überprüft man beispielsweise den Einfluss der Ausgangskonzentration auf die adsorbierte BSA-Menge nach Durchführung aller 84 Versuche zeigte sich graphisch kein eindeutiger Trend (Abbildung 6.1). Jedoch ergab sich nach statistischer Auswertung ein signifikanter Einfluss der Ausgangskonzentration auf die adsorbierte Proteinmenge. Dieses Beispiel verdeutlicht warum die Aufstellung, Durchführung und statistische Auswertung dieses Versuchsplanes sinnvoll war. Die aufgetragene Proteinmenge wurde mittels SE-HPLC bestimmt.



**Abbildung 6.1:** Die Ausgangskonzentration wurde gegen die adsorbierte Proteinmenge aufgetragen, die mittels SE-HPLC bestimmt wurde. Untersucht wurden Glasart I- (■), Glasart I TopLyo<sup>®</sup>- (■) und CZ<sup>®</sup>-Vials (■).

Die Vorgehensweisen zur Identifizierung von signifikanten Faktoren sowie zur Aufstellung des mathematischen Modells wurden ausführlich in 2.3.3 beschrieben. In dem für den Micro BCA-Assay erhaltenen Modell sind nur die signifikanten Faktoren mit den dazugehörigen F- und p-Werten dargestellt (Tabelle 6.4). Es errechnete sich ein nicht signifikanter Lack of fit, was eine gute Beschreibung der Daten durch das quadratische Modell anzeigte. Die Güte der Beschreibung der Messwerte durch das aufgestellte Modell wurde weiterhin im Rahmen der Residuenplots überprüft, auf die später näher eingegangen wird.

**Tabelle 6.4:** Übersicht über die signifikanten Modellparameter unter Angabe des zugehörigen F- und p-Wertes für die Zielgröße Micro BCA-Assay. Die Werte wurden durch logarithmische Transformation erhalten.

Modellart	Modellparameter	FG	F-Wert	p-Wert
quadratisch	Modell	7	77,33	< 0,0001
$R^2=0,8769$	A, (Ausgangskonzentration)	1	9,23	0,0033
	B, (Ionenstärke)	1	22,18	< 0,0001
	E, (Vialart)	2	249,08	< 0,0001
	BE, (WW zwischen Ionenstärke und Vialart)	2	3,85	0,0255
	$B^2$ , (Ionenstärke <sup>2</sup> )	1	4,06	0,0473
	Lack of fit	67	2,29	0,0897

Die Faktoren A (Ausgangskonzentration), B (Ionenstärke) sowie E (Vialart) zeigten einen signifikanten Einfluss auf die adsorbierte BSA-Menge, die mittels Micro BCA-Assay ermittelt wurde. Weiterhin war eine signifikante Wechselwirkung zwischen der Ionenstärke und der Vialart (Wechselwirkung BE) zu erkennen. Quadratische Effekte, wie in diesem Falle  $B^2$  (Ionenstärke<sup>2</sup>), haben keinerlei chemischen oder physikalischen Hintergrund, sondern dienen lediglich der Anpassung des mathematischen Modells an den untersuchten Zusammenhang. Es zeigte sich eine Abhängigkeit der Residuen von der Größe der ermittelten adsorbierten BSA-Menge. Dies konnte durch eine logarithmische Transformation behoben werden, deren Eignung sich im Box-Cox-Plot zeigte. Das erhaltene mathematische Modell in kodierten Einheiten ist in Gleichung 6.1 dargestellt.

$$\begin{aligned} \log_{10} \hat{y}_{(\text{Micro BCA-Assay})} = & +1,050 + 0,019 \cdot A - 0,030 \cdot B + 0,180 \cdot E_1 - 0,120 \cdot E_2 \\ & + 0,021 \cdot BE_1 - 0,022 \cdot BE_2 + 0,012 \cdot B^2 \end{aligned} \quad (6.1)$$

Die Regressionskoeffizienten geben an, in welchem Maße sich die Zielgröße ändert, wenn man den numerischen Faktor von der -1 Stufe auf die +1 Stufe verändert. Die ausführliche Vorgehensweise zur Berechnung der Effekte ist bereits in 2.3.3 erläutert. Faktor E (Vialart) stellt jedoch einen qualitativen Faktor dar, wobei keine Einstellung auf die -1 oder +1 Stufe möglich ist, da es sich

hierbei um keine numerisch beschreibbaren Größen handelt. Aus diesem Grund erfolgt die Kodierung anders als bei den numerischen Faktoren, deren Kodierung bereits unter 2.3.2 beschrieben wurde. Eine Vialart erhält die Bezeichnung  $E_1$  mit der Kodierung [1 0], eine weitere Vialart die Bezeichnung  $E_2$  mit der Kodierung [0 1]. Der Regressionskoeffizient der dritten Vialart errechnet sich aufgrund der Kodierung von [-1 -1] aus den Regressionskoeffizienten von  $E_1$  und  $E_2$  unter Berücksichtigung der Vorzeichen der Kodierung. Bei  $E_1$  handelt es sich in dem vorliegenden Versuchsplan um Glasart I-, bei  $E_2$  um Glasart I TopLyo<sup>®</sup>- Vials. Der Regressionskoeffizient für die CZ<sup>®</sup> Vials errechnet sich somit aus  $-(E_1)-(E_2)$ , wodurch sich im vorliegenden Fall ein Regressionskoeffizient von -0,06 errechnet. Die gleiche Vorgehensweise diente auch zur quantitativen Beschreibung der Zweifach-Wechselwirkung BE (WW zwischen Ionenstärke und Vialart). Für CZ<sup>®</sup> Vials ergab sich somit ein Regressionskoeffizient von +0,001 für die WW zwischen Ionenstärke und Vialart. Der Einfluss der Ionenstärke auf die verschiedenen Vialarten errechnet sich nun aus der Summe des Regressionskoeffizienten der Ionenstärke (-0,030) und den jeweiligen Regressionskoeffizienten für die WW zwischen der Ionenstärke und der Vialart (Glasart I: +0,021, Glasart I TopLyo<sup>®</sup>: -0,022, CZ<sup>®</sup>: +0,001). Ausgehend davon errechneten sich für den Einfluss der Ionenstärke auf Glasart I-, Glasart I TopLyo<sup>®</sup>- und CZ<sup>®</sup>-Vials Regressionskoeffizienten von -0,009, -0,052 und -0,029.

Eine Erhöhung der Ausgangskonzentration führte zur Zunahme der adsorbierten Proteinmenge, wohingegen eine Zunahme der Ionenstärke in einer verminderten, gebundenen BSA-Menge resultierte. Faktor E (Vialart) weist aufgrund der Größe seiner Regressionskoeffizienten den größten Einfluss auf die BSA-Adsorption auf, wobei auf Glasart I Vials mehr BSA als auf Glasart I TopLyo<sup>®</sup>- und CZ<sup>®</sup>-Vials adsorbierte. Eine leicht verstärkte Adsorption zeigte sich für CZ<sup>®</sup> Vials im Vergleich zu Glasart I TopLyo<sup>®</sup> Vials. Für die Einfachwirkungen wie auch für die Wechselwirkung BE (WW zwischen Ionenstärke und Vialart) zeigen sich im Vergleich zu Faktor E (Vialart) deutlich geringere quantitative Zusammenhänge zur adsorbierten BSA-Menge. Die Wechselwirkung zwischen der Ionenstärke und der Vialart führte bei steigender Ionenstärke für alle drei untersuchten Primärpackmittel zu einer Abnahme der adsorbierten BSA-Menge.

Des Weiteren wurde das mathematische Modell für die Zielgröße SE-HPLC erstellt. In Tabelle 6.5 sind die signifikanten Faktoren mit den dazugehörigen F- und p-Werten dargestellt. Es zeigte sich, wie schon beim Micro BCA-Assay, ein nicht signifikanter Lack of fit, wodurch eine gute Beschreibung der Daten durch das quadratische Modell gegeben ist. Eine weitere Überprüfung der Güte der Beschreibung der Messwerte durch das aufgestellte Modell erfolgte durch die Residuenplots, auf die später näher eingegangen wird.

Der Einfluss der Faktoren A (Ausgangskonzentration), B (Ionenstärke) sowie E (Vialart) zeigte den gleichen Trend auf die adsorbierte BSA-Menge, wie beim Micro BCA-Assay. Jedoch konnte mittels SE-HPLC zusätzlich ein signifikanter Effekt durch Faktor D (Inkubationsdauer) festgestellt werden. Faktor C (Inkubationstemperatur) wurde trotz eines p-Wertes von 0,9487, der auf einen nicht signifikanten Effekt schließen lässt, in das mathematische Modell aufgenommen, da dieser in eine signifikante Wechselwirkung mit Faktor B (Ionenstärke) (Wechselwirkung BC) involviert war. Diese Wechselwirkung findet sich jedoch im Micro BCA-Assay nicht. Effekte werden

**Tabelle 6.5:** Übersicht über die signifikanten Modellparameter unter Angabe des zugehörigen F- und p-Wertes für die Zielgröße SE-HPLC. Die Werte wurden durch eine Wurzel-Transformation erhalten.

Modellart	Modellparameter	FG	F-Wert	p-Wert
quadratisch	Modell	11	53,17	< 0,0001
$R^2=0,8904$	A, (Ausgangskonzentration)	1	10,75	0,0016
	B, (Ionenstärke)	1	35,99	< 0,0001
	C, (Inkubationstemperatur)	1	0,0042	0,9487
	D, (Inkubationsdauer)	1	10,03	0,0023
	E, (Vials)	2	253,70	< 0,0001
	BC,(WW zwischen Ionenstärke und Inkubationstemperatur)	1	5,39	0,0231
	BE,(WW zwischen Ionenstärke und Vialart)	2	3,09	0,0517
	$A^2$ , (Ausgangskonzentration <sup>2</sup> )	1	4,59	0,0356
	$C^2$ , (Inkubationstemperatur <sup>2</sup> )	1	6,09	0,0159
	Lack of fit	63	1,84	0,1402

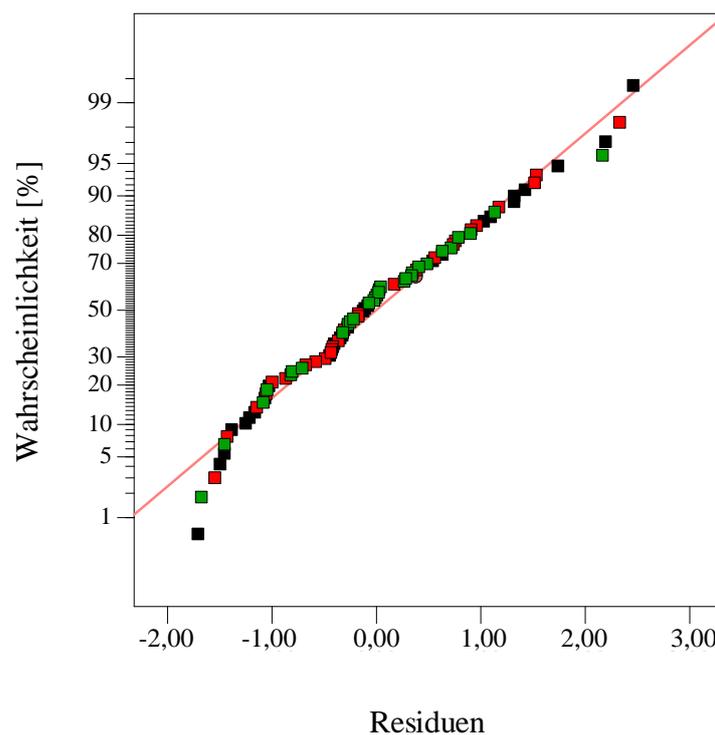
nur dann als solche erkannt, wenn sie größer als die auftretende Standardabweichung sind. Da die durch die SE-HPLC ermittelten Werte einen geringeren  $V_k$  als die durch den Micro BCA-Assay ermittelten Werte aufweisen, können auch geringere Effekte erkannt werden. Dies erklärt, warum im Rahmen der SE-HPLC mehr signifikante Effekte als beim Micro BCA-Assay identifiziert wurden.

Die Wechselwirkung zwischen Faktor B (Ionenstärke) und Faktor E (Vialart) (Wechselwirkung BE) wurde im Micro BCA-Assay erfasst. Für die SE-HPLC lag der p-Wert dieser Wechselwirkung mit 0,0517 gerade an der Entscheidungsgrenze, ob es sich um einen signifikanten Effekt handelt und wurde in das mathematische Modell aufgenommen. Die quadratischen Faktoren  $A^2$  (Ausgangskonzentration<sup>2</sup>) und  $C^2$  (Inkubationstemperatur<sup>2</sup>) dienten erneut der Anpassung des mathematischen Modells an den vorliegenden Zusammenhang zwischen den Faktoren und der Zielgröße. Wie beim Micro BCA-Assay zeigte sich auch bei der SE-HPLC eine Abhängigkeit der Residuen von der Größe der ermittelten BSA-Menge. In diesem Falle konnte dies durch eine Wurzel Transformation gelöst werden. Das erhaltene mathematische Modell in kodierten Einheiten ist in Gleichung 6.2 dargestellt.

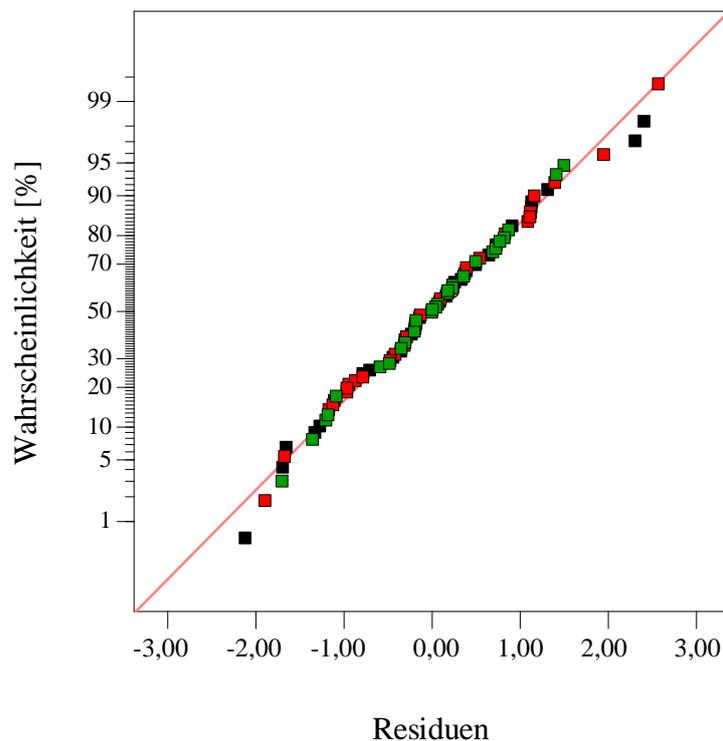
$$\begin{aligned}
 \sqrt{\hat{y}_{(SE-HPLC)}} = & +2,340 + 0,049 \cdot A - 0,090 \cdot B + 9,680 \cdot 10^{-4} \cdot C + 0,047 \cdot D \\
 & + 0,430 \cdot E_1 - 0,320 \cdot E_2 - 0,043 \cdot BC + 0,053 \cdot BE_1 - 0,024 \cdot BE_2 \\
 & - 0,030 \cdot A^2 - 0,035 \cdot C^2
 \end{aligned} \quad (6.2)$$

Für die SE-HPLC zeigte sich, wie bereits beim Micro BCA-Assay, eine Zunahme der adsorbieren Proteinmenge bei steigenden Ausgangskonzentrationen und eine Abnahme der gebundenen

BSA-Menge bei steigender Ionenstärke. Der Einfluss der Inkubationstemperatur auf die adsorbierte Proteinmenge wurde nicht weitergehend betrachtet, da dieser Faktor nur aufgrund der Involvierung in die Wechselwirkung BC in das mathematische Modell aufgenommen wurde. Weiterhin kommt es bei längerer Inkubationsdauer zu einer Zunahme der adsorbierten BSA-Menge. Auch bei der SE-HPLC zeigte sich anhand der Regressionskoeffizienten, wie bereits beim Micro BCA-Assay, dass die Vialart den größten Einfluss auf die adsorbierte Proteinmenge zeigt. Dabei ergab sich für CZ<sup>®</sup> Vials, ausgehend von der beim Micro BCA-Assay erklärten abweichenden Kodierung für qualitative Faktoren, ein Regressionskoeffizient von -0,11. Der Regressionskoeffizient für die WW zwischen der Ionenstärke und CZ<sup>®</sup> Vials errechnete sich analog zu -0,029. Die Berechnung des Einflusses der Ionenstärke auf die verschiedenen Vialarten wurde bereits bei Auswertung des Micro BCA-Assays näher erläutert. Die Regressionskoeffizienten für Glasart I- Glasart I TopLyo<sup>®</sup>- und CZ<sup>®</sup>-Vials errechneten sich somit zu -0,037, -0,114 und -0,119. Wie beim Micro BCA-Assay, zeigte sich für alle drei Primärpackmittel eine Abnahme der gebundenen Proteinmenge bei steigender Ionenstärke. Diese Abnahme war auf Glasart I TopLyo<sup>®</sup>- und CZ<sup>®</sup>-Vials stärker ausgeprägt als auf Glasart I Vials.



**Abbildung 6.2:** Überprüfung der Residuen aller 84 Versuche, die mittels Micro BCA-Assay erhalten wurden, auf Normalverteilung. Untersucht wurden dabei Glasart I- (■), Glasart I TopLyo<sup>®</sup>- (■) und CZ<sup>®</sup>-Vials (■). Die Werte wurden durch logarithmische Transformation erhalten.



**Abbildung 6.3:** Überprüfung der Residuen aller 84 Versuche, die mittels SE-HPLC erhalten wurden, auf Normalverteilung. Untersucht wurden dabei Glasart I- (■), Glasart I TopLyo<sup>®</sup>- (■) und CZ<sup>®</sup>-Vials (■). Die Werte wurden durch Wurzel-Transformation erhalten.

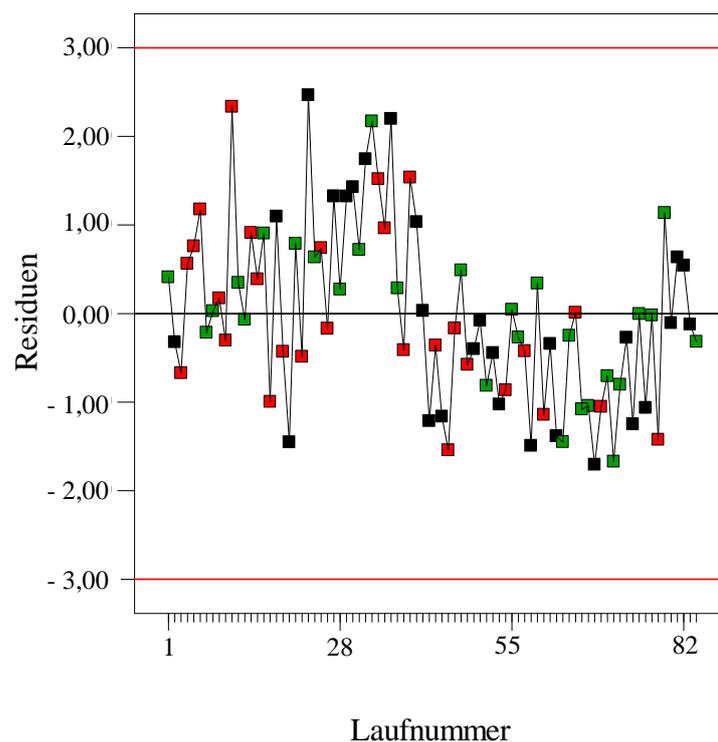
Zur Überprüfung auf Abweichungen zwischen Versuchsergebnissen und den berechneten Modellwerten, wurden Residuenplots angewandt, die bereits in 2.3.3 ausführlich erläutert wurden. Bei den aufgetragenen Residuen handelt es sich in allen Fällen um intern studentisierte Residuen. Man geht davon aus, dass studentisierte Residuen, die innerhalb der Grenzen von  $\pm 3$  liegen, durch zufällige Schwankungen hervorgerufen werden und kein systematischer Fehler vorliegt [16].

Zunächst wurde anhand des Wahrscheinlichkeitsnetzes überprüft, ob die adsorbierten BSA-Mengen, die zum einen durch den Micro BCA-Assay (Abbildung 6.2) und zum anderen durch die SE-HPLC (Abbildung 6.3) ermittelt wurden, normalverteilt sind. Die aufgetragenen Werte wurden im Falle des Micro BCA-Assays durch logarithmische Transformation und im Falle der SE-HPLC durch Wurzel-Transformation erhalten.

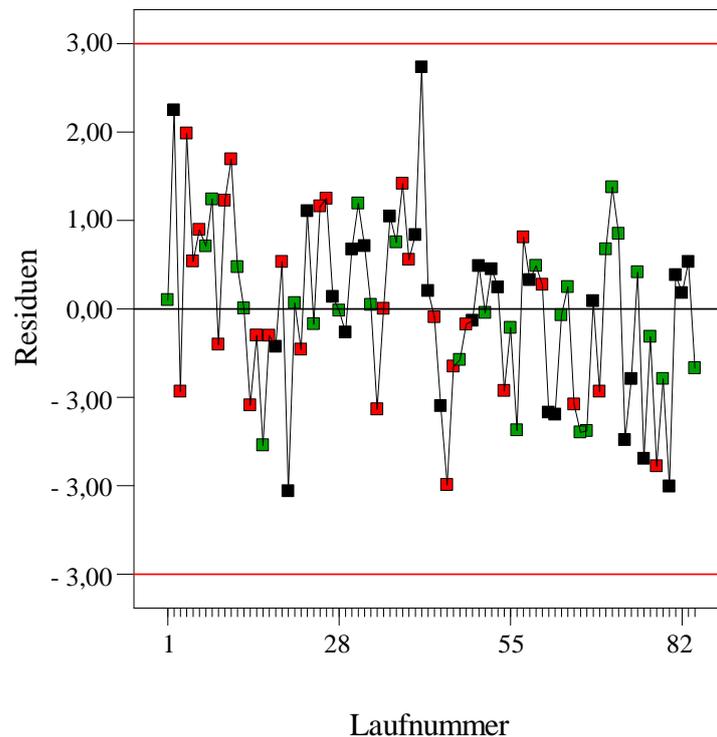
Die Residuen beider Zielgrößen folgten einer Ausgleichsgeraden, wodurch man von zufälligen Schwankungen ausgehen kann und eine Normalverteilung der erhaltenen Messergebnisse angenommen werden kann. Neben der Normalverteilung der Messergebnisse ist die Varianzenhomogenität eine weitere Voraussetzung statistischer Analysen. Dies konnte durch Auftragen der Residuen gegen die berechneten Modellwerte überprüft werden. Die Ergebnisse lagen sowohl durch Bestimmung mittels Micro BCA-Assay als auch durch Bestimmung mittels SE-HPLC um die x-Achse herum verteilt, wodurch eine Varianzenhomogenität sichergestellt werden konnte.

Weiterhin wurden die Modellwerte gegen die tatsächlich gemessenen Werte aufgetragen, um die Güte des Modells zur Beschreibung des Zusammenhangs zwischen Faktoren und Zielgrößen zu überprüfen. Dabei zeigte sich sowohl für den Micro BCA-Assay als auch für die SE-HPLC, dass die Punkte annähernd auf einer Ausgleichsgeraden lagen und somit das Modell gut an den untersuchten Zusammenhang angepasst ist.

Trägt man zudem die Residuen in der durchgeführten Reihenfolge auf, so lassen sich ebenfalls Abweichungen vom Modell schnell erkennen und einem bestimmten Versuch zuordnen. Abbildung 6.4 zeigt dies für den Micro BCA-Assay, in Abbildung 6.5 wurden die Ergebnisse der SE-HPLC auf Ausreißer überprüft. Die erhaltenen Werte wurden beim Micro BCA-Assay einer logarithmischen Transformation und bei der SE-HPLC einer Wurzel-Transformation unterzogen. Es zeigten sich in beiden Fällen keine Ausreißer, jedoch konnte beobachtet werden, dass die Residuen des Micro BCA-Assays zu Beginn höher waren als gegen Ende des Versuchplans. Da in die Bestimmung der adsorbierten BSA-Menge mittels Micro BCA-Assay viele Einzelschritte involviert sind, ist die Abnahme der Schwankungen wahrscheinlich durch eine reproduzierbarere Aufarbeitung nach mehrmaliger Durchführung begründet.



**Abbildung 6.4:** Die Residuen bei Ermittlung der Messwerte durch den Micro BCA-Assay wurden in der durchgeführten Reihenfolge aufgetragen. Untersucht wurden Glasart I- (■), Glasart I TopLyos<sup>®</sup>- (■) und CZ<sup>®</sup>-Vials (■).



**Abbildung 6.5:** Die Residuen bei Ermittlung der Messwerte durch die SE-HPLC wurden in der durchgeführten Reihenfolge aufgetragen. Untersucht wurden Glasart I- (■), Glasart I TopLyo<sup>®</sup>- (■) und CZ<sup>®</sup>-Vials (■).

Weiterhin wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen den Variationskoeffizienten, die durch Dreifachbestimmung für den Micro BCA-Assay sowie die SE-HPLC erhalten wurden, und den untersuchten Faktoren existiert. Dabei konnte für beide Zielgrößen kein mathematisches Modell an den Zusammenhang zwischen Faktoren und Variationskoeffizienten angepasst werden. Somit handelt es sich um zufällige Schwankungen innerhalb des Versuchsplans.

Mögliche mechanistische Erklärungen für den Einfluss der verschiedenen Faktoren auf die adsorbierte BSA-Menge werden im Folgenden erläutert:

- **BSA-Ausgangskonzentration:**

Liegt eine höhere Proteinkonzentration in Lösung vor, kann folglich mehr Protein an die Oberfläche binden als bei geringeren Proteinkonzentrationen in Lösung. Innerhalb des Versuchsraumes von 1000,0 - 2000,0  $\mu\text{g/ml}$  ergab sich ein leichter Anstieg der adsorbierten Proteinmenge bei steigenden Ausgangskonzentrationen, wie den Regressionsgleichungen beider Zielgrößen zu entnehmen war. Unter 2.1.3 wurde bereits erläutert, dass je nachdem, ob BSA mit seinem Ende voran (end-on) oder seitlich (side-on) auf die Oberfläche adsorbiert, mehr oder weniger Protein auf der Oberfläche gebunden werden kann. Bei Annahme einer einschichtigen Proteinadsorption kann end-on maximal 9,0  $\text{mg/m}^2$  Albumin auf die Oberfläche adsorbieren, side-on maximal 3,6  $\text{mg/m}^2$  Albumin [5].

Im Falle der SE-HPLC lagen alle ermittelten Werte unterhalb von  $9,0 \text{ mg/m}^2$ , jedoch bei den meisten Versuchen oberhalb von  $3,6 \text{ mg/m}^2$ . Zwar adsorbiert BSA bei geringen Konzentrationen bevorzugt side-on (Kapitel 2.1.3), jedoch legen diese Ergebnisse eine Mischung aus side-on und end-on Adsorption nahe. Denn bei steigenden Ausgangskonzentration adsorbiert BSA verstärkt mit seinem Ende voran [127]. BSA-Mengen, die durch den Micro BCA-Assay ermittelt wurden, lagen meist oberhalb von  $9,0 \text{ mg/m}^2$ . Eine mögliche Erklärung dafür wurde bereits in Kapitel 4.5 diskutiert.

Bei höheren als in diesem Versuchsplan untersuchten Ausgangskonzentrationen kommt es zu stark schwankenden Werten innerhalb der Dreifachbestimmung, wie in Kapitel 6.1, erwähnt. Dies weist darauf hin, dass es oberhalb des untersuchten Bereichs noch zu weiterer Adsorption kommt und die Sättigung möglicherweise noch nicht erreicht ist. Auch wurde bereits unter 2.1.2 berichtet, dass bei höheren Ausgangskonzentrationen höhere Proteinmengen ermittelt wurden, als durch einschichtige Proteinadsorption möglich sind. Dies wurde häufig für Albumin gezeigt [39, 40, 41]. Als mögliche Erklärungen dienten sowohl die Ausbildung einer zweiten adsorbierten Proteinschicht als auch strukturelle Änderungen innerhalb der adsorbierten Schicht.

Zur Absicherung, ob BSA in einer oder in mehreren Schichten auf die untersuchten Primärpackmittel adsorbiert, müssten die Oberflächen mikroskopisch untersucht werden. Dafür sind jedoch häufig trockene Proteinfilm nötig, die wie unter 2.1.5 erwähnt, nicht den natürlichen Zustand wiedergeben und somit eine Veränderung des adsorbierten Proteinfilms nicht ausgeschlossen werden kann [82].

- **Ionenstärke und WW zwischen der Ionenstärke und der Vialart:**

Auf allen drei Packmitteln kam es zu einer Abnahme der adsorbierten BSA-Menge bei steigender Ionenstärke. Dieser Effekt war auf den beiden ungeladenen Vialarten (Glasart I TopLyo<sup>®</sup> und CZ<sup>®</sup>) stärker ausgeprägt als auf den geladenen Glasart I Vials.

Mathes [13] Ergebnisse bestätigen die geringer adsorbierte Adsorption bei steigender Ionenstärke auf Glasart I Vials am isoelektrischen Punkt des Proteins. Hingegen wurde keine Veränderung der adsorbierten Proteinmenge auf Kunststoffvials beobachtet.

Auf Glasart I Vials scheint die Abnahme der adsorbierten Proteinmenge bei steigender Ionenstärke aus einer zunehmenden Abschwächung der elektrostatischen Anziehung zwischen Oberfläche und Protein zu resultieren [49, 135]. Jedoch erklärt dies nicht, warum auch auf den beiden ungeladenen Vialarten, Glasart I TopLyo<sup>®</sup> und CZ<sup>®</sup>, ein Einfluss auf die adsorbierte Proteinmenge zu beobachten ist. Denn das Auftreten von elektrostatischen Wechselwirkungen ist für diese Vialarten zu vernachlässigen, da deren Oberflächen keine freien Ionen tragen. Hierbei erfolgt die Adsorption über hydrophobe Wechselwirkungen sowie Van der Waalsche Kräfte.

Die Literatur zeigte, dass verschiedene Proteine bei steigender Ionenstärke besser stabilisiert werden, wodurch die Proteine kompakter vorliegen und weniger Platz auf der Oberfläche verbrauchen. Somit kann bei steigender Ionenstärke mehr Protein auf die Oberfläche

adsorbieren. Des Weiteren wird bei erhöhter Ionenstärke die Protein-Protein Wechselwirkungen abgeschwächt, was zudem in einer steigenden gebundenen Proteinmenge resultiert [49, 59]. Am isoelektrischen Punkt liegt das Protein in seiner kompaktesten Form vor, weshalb, wie bereits unter 6.1 gezeigt, eine größere Menge an Protein auf die Oberfläche adsorbieren kann. Da im Rahmen des statistischen Versuchsplans der pH-Wert stets auf den IEP eingestellt wurde, liegt BSA bereits kompakt vor und der erwähnte Erklärungsansatz verschiedener Arbeitsgruppen zeigt keinen Einfluss auf die erhaltenen Ergebnisse. Vielmehr scheint die Stabilisierung des Proteins bei steigender Ionenstärke aber zu einer verminderten Adsorption auf ungeladenen Oberflächen zu führen. Bei Natrium- und Acetationen handelt es sich um Ionenarten, die das Protein stabilisieren [60]. BSA stellt ein hydrophiles Protein dar [105]. Durch Stabilisierung von BSA bei steigender Ionenstärke ist mehr Energie zur Entfaltung nötig [3, 136], weshalb die Entfaltung von BSA behindert wird. Somit können sich die hydrophoben Bereiche des Proteins schlechter nach außen kehren, um hydrophobe Wechselwirkungen mit den beiden hydrophoben Oberflächen, Glasart I TopLyo<sup>®</sup>- und CZ<sup>®</sup> Vials, einzugehen.

Die Beeinflussung der hydrophoben Wechselwirkungen durch Stabilisierung des Proteins scheint eine stärkere Auswirkung als die Abschwächung der elektrostatischen Wechselwirkung durch hohe Ionenstärken auf die adsorbierte BSA-Menge zu haben. Denn es zeigte sich für Glasart I TopLyo<sup>®</sup>- und CZ<sup>®</sup> Vials, dass eine steigende Ionenstärke in einer stärker verminderten BSA-Adsorption im Vergleich zu Glasart I Vials resultierte.

- **Inkubationstemperatur und WW zwischen der Ionenstärke und der Inkubationstemperatur:**

Es zeigte sich im untersuchten Temperaturbereich sowohl beim Micro BCA-Assay als auch bei der SE-HPLC kein Einfluss der Inkubationstemperatur auf die adsorbierte BSA-Menge. Norde et al. [41] bestätigten, dass die Inkubationstemperatur am isoelektrischen Punkt keinen Einfluss auf die adsorbierte Proteinmenge zeigt. Hier wurde die Adsorption von HSA auf negativ geladene Polystyrol Oberflächen in einem Temperaturbereich zwischen 5°C und 37°C untersucht. Bei Temperaturen über 80°C ergab sich jedoch eine deutliche Zunahme der adsorbierten Proteinmenge [43]. In dieser Arbeit wurde aber nur ein geringer Temperaturbereich untersucht, wobei es sich um moderate Temperaturen und keine stark erhöhten Temperaturen handelte. Denn Untersuchungsgrundlage waren die natürlichen Bedingungen nach Rekonstitution des Lyophilisats, bevor die rekonstituierte Proteinlösung in den Patienten appliziert wird.

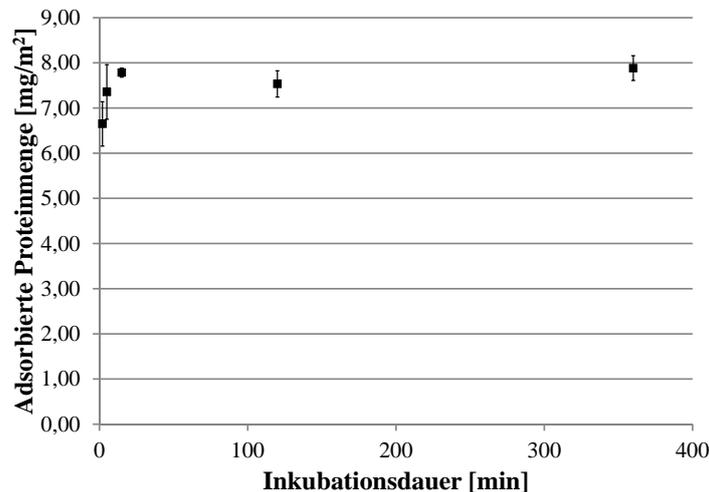
Die Inkubationstemperatur wurde dennoch in das mathematische Modell der SE-HPLC aufgenommen, da diese in eine signifikante Wechselwirkung mit der Ionenstärke involviert war. Ausgehend von der Regressionsgleichung würde somit bei Erhöhung der Inkubationstemperatur der Effekt, dass es bei steigender Ionenstärke zu verminderter Adsorption kommt, verstärkt. Jedoch sollten statistische Aussagen stets in Bezug auf ihre wissenschaftliche Begründung hinterfragt werden. Bei dem untersuchten Temperaturbereich handelt es sich um moderate und keine stark erhöhten Temperaturen. Zudem zeigte der Faktor der In-

kubationstemperatur keinen signifikanten Einfluss auf die adsorbierte Proteinmenge. Somit wurde diese WW nicht weiter betrachtet.

- **Inkubationsdauer:**

Wie bereits unter 6.1 erläutert, konnten verschiedene Arbeitsgruppen die maximale Proteinadsorption auf unterschiedlichen Oberflächen nach wenigen Stunden bestätigen. Im Micro BCA-Assay ließ sich kein Zusammenhang zwischen der Inkubationsdauer und der adsorbierten BSA-Menge erkennen, in der SE-HPLC hingegen zeigte sich ein signifikanter Einfluss der Inkubationsdauer. Eine mögliche Erklärung hierfür ist der kurze gewählte Inkubationszeitraum zwischen 15 Minuten und 24 Stunden, woraus ein geringer Unterschied der dabei ermittelten Werte resultiert. Wie bereits erwähnt konnte mittels SE-HPLC, aufgrund geringerer Variationskoeffizienten, Effekte erkannt werden, die mittels Micro BCA-Assay nicht festzustellen waren. Somit bedarf es weiterer Untersuchungen, um eine eindeutige Aussage über den Einfluss der Inkubationsdauer treffen zu können.

In einem auf den Versuchsplan aufbauenden Versuch zeigte sich, dass bereits nach fünf Minuten annähernd die gleiche BSA-Menge auf Glasart I Vials adsorbierte wie nach 6 Stunden. Somit ist davon auszugehen, dass der Einfluss der Inkubationsdauer auf die adsorbierte BSA-Menge gering ist und es auch in einem größeren Inkubationszeitraum zu keiner wesentlichen Zunahme der adsorbierten BSA-Menge kommt, wie bereits durch verschiedene Arbeitsgruppen gezeigt wurde [52, 74]. Die Untersuchung erfolgte mittels SE-HPLC ausgehend von einer 1500,0 µg/ml konzentrierten BSA Lösung bei einem pH-Wert der Lösung von 4,98 auf Glasart I Vials. Die erhaltenen Ergebnisse nach einer Inkubationsdauer zwischen 2 Minuten und 6 Stunden sind in Abbildung 6.6 dargestellt.



**Abbildung 6.6:** Ermittlung der adsorbierten BSA-Menge an Glasart I Vials in einem Inkubationszeitraum zwischen 2 Minuten und 6 Stunden. Die Quantifizierung erfolgte mittels SE-HPLC.

- **Vialart:**

Es zeigte sich, wie bereits schon im Rahmen der Methodenentwicklung (Kapitel 4.5), dass es bei einem pH-Wert der Lösung am isoelektrischen Punkt von BSA (pH 4,98) zu verstärkter BSA-Adsorption auf Glasart I Vials im Vergleich zu Glasart I TopLyo<sup>®</sup>- und CZ<sup>®</sup>-Vials kommt. Qadry et al. [7] konnten ebenfalls zeigen, dass auf CZ<sup>®</sup> Vials geringere Proteinmengen als aus Glasart I Vials adsorbieren. Weitere Arbeitsgruppen ermittelten weiterhin eine stärkere Adsorption auf Glasart I Vials als auf verschiedene Polymere. Diese Beobachtungen wurden der stärkeren Auswirkung von elektrostatischen Anziehungskräften auf die Proteinadsorption im Vergleich zu hydrophoben Wechselwirkungen zugeschrieben [4, 14].

Glasart I Vials verfügen bei einem pH-Wert von 4,98 über eine negativ geladene Oberfläche. Durch Überlagerung der elektrischen Doppelschichten der Glasart I Oberfläche und positiv geladenen Bereichen von BSA kommt es zur Ausbildung von elektrostatischen Anziehungskräften. Da es sich bei Glasart I TopLyo<sup>®</sup>- und CZ<sup>®</sup>-Vials um ungeladene, hydrophobe Oberflächen handelt, kommt es hierbei nahezu zu keiner Ausbildung von elektrostatischen Wechselwirkungen. Die auf hydrophoben Oberflächen wirkenden hydrophoben Wechselwirkungen [32] führen jedoch zu geringer adsorbierten BSA-Mengen als es durch Auftreten von elektrostatischen Anziehungskräften auf den geladenen Glasart I Vials der Fall ist. Dies bestätigte erneut die Annahme, dass elektrostatische Anziehungskräfte eine stärkere Triebkraft darstellen als die auf hydrophoben Oberflächen auftretenden hydrophoben Wechselwirkungen [14, 115]. Van der Waalsche Wechselwirkungen trugen in beiden Fällen vermutlich zusätzlich zur BSA-Adsorption bei. Da Proteine an ihrem IEP kompakt vorliegen, konnte mehr BSA auf die Oberfläche adsorbieren als bei pH-Werten, die vom IEP abweichen. Eine geringer adsorbierte Proteinmenge bei einem pH-Wert von 7,4 auf Glasart I- und Glasart I TopLyo<sup>®</sup>-Vials konnte bereits in Abschnitt 6.1 gezeigt werden. Ziegler et al. konnten weiterhin zeigen, dass auf hydrophoben Oberflächen zwar weniger Protein adsorbierte, dieses jedoch stärker auf die Oberfläche gebunden war als im Falle von hydrophilen Oberflächen. Wie bereits unter 2.1.4 erwähnt, ist auf hydrophoben Oberflächen die Adsorption meist mit stärkeren strukturellen Änderungen des Proteins als auf hydrophilen Oberflächen verbunden [49, 50].

Fitzpatrick et al. [84] postulierten zudem, dass BSA auf hydrophilen Oberflächen verstärkt end-on und auf hydrophoben Oberflächen side-on adsorbiert. Dies könnte zusätzlich einen Beitrag leisten, weshalb auf hydrophile Glasart I Vials mehr Protein adsorbiert als auf hydrophobe Glasart I TopLyo<sup>®</sup>- und CZ<sup>®</sup>-Vials.

Auf stärker hydrophoben Oberflächen kommt es vermehrt zu hydrophoben Wechselwirkungen, was in einer erhöhten adsorbierten BSA-Menge resultiert [137]. Bei den Glasart I TopLyo<sup>®</sup> Vials handelt es sich, wie bereits unter 2.2.1 beschrieben, um Vials, die im Vergleich zu klassischen Glasart I Vials eine hydrophobere Innenoberfläche aufweisen. Jedoch sind CZ<sup>®</sup> Vials aufgrund ihres polymerischen Aufbaus hydrophober als Glasart I TopLyo<sup>®</sup>-Vials, wodurch hydrophobe Wechselwirkungen auf CZ<sup>®</sup> Vials stärker zum

Tragen kommen und somit auch in geringem Umfang mehr BSA auf CZ<sup>®</sup> Vials adsorbiert. Dies zeigte sich an den Regressionskoeffizienten beider Zielgrößen für diese beiden Vialarten.

In der Literatur finden sich verstärkt Hinweise, dass es auf hydrophoben Oberflächen im Vergleich zu hydrophilen Oberflächen zu verstärkter Proteinadsorption aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen kommt. Dabei wurden aber vor allem ungeladene Polymeroberflächen oder Bedingungen, bei denen es zu elektrostatischer Abstoßung zwischen Protein und Oberfläche kommt, betrachtet [41, 54]. Auf geladenen Oberflächen sind vor allem elektrostatische Wechselwirkungen für die Proteinadsorption verantwortlich [50]. Sie können zur Anziehung als auch zur Abstoßung zwischen Protein und Oberfläche führen. Somit muss stets berücksichtigt werden, ob es sich um geladene oder ungeladene Oberflächen handelt und welche Triebkräfte zwischen Protein und Oberfläche vorherrschen [138].

Wie bereits unter 3.2.2 erwähnt, liegen die ermittelten Rauheitwerte unter Berücksichtigung der Standardabweichung alle nahe beieinander. Eine Korrelation zwischen den erhaltenen Rauheitswerten für die untersuchten Primärpackmittel und den adsorbierten BSA-Mengen konnte nicht festgestellt werden.

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Faktoren auf die adsorbierte BSA-Menge diente BSA in Lösung. Nach Rekonstitution lyophilisierter Proteintherapeutika erhält man sowohl Monomere als auch Dimere und Aggregate in Lösung [139]. Giacomelli et al. zeigten, dass am isoelektrischen Punkt verstärkt Dimere und Polymere von BSA auf die Oberfläche adsorbieren und Monomere im Vergleich eine geringere Adsorptionstendenz zeigen [32]. Ein unterschiedliches Adsorptionsverhalten von rekonstituierten Proteintherapeutika und dem in dieser Arbeit verwendeten BSA in Lösung kann somit nicht ausgeschlossen werden. Das Ziel dieser Arbeit aber lag auf der Methodenentwicklung zur Quantifizierung der adsorbierten Proteinmenge. Aus diesem Grund wurde ein zusätzlicher Effekt, der durch unterschiedliche Adsorptionsneigung von Monomeren und Aggregaten auftritt, vernachlässigt.

## 6.4 Zusammenfassung

Zur Ermittlung des Einflusses verschiedener Faktoren auf die adsorbierte BSA-Menge wurde die statistische Versuchsplanung angewandt. Um auch einen möglichen nichtlinearen Zusammenhang zu erfassen, wurde ein zentral zusammengesetzter Versuchsplan gewählt.

Untersucht wurde der Einfluss der BSA-Ausgangskonzentration, der Ionenstärke des Puffers, der Inkubationstemperatur und der Inkubationsdauer auf die adsorbierte BSA-Menge. Neben diesen numerischen Faktoren wurde zusätzlich die Vialart als qualitativer Faktor untersucht. Glasart I-, Glasart I TopLyo<sup>®</sup>- und CZ<sup>®</sup>-Vials kamen hierbei zum Einsatz, um sowohl hydrophile als auch hydrophobe Oberflächen miteinzubeziehen. Der pH-Wert der untersuchten Lösungen wurde in allen Fällen auf den isoelektrischen Punkt von BSA eingestellt, da bei diesem pH-Wert

im gewählten BSA-Konzentrationsbereich (500,0 - 2500,0 µg/ml) eine messbare Proteinmenge auf den verschiedenen Primärpackmitteln sichergestellt werden konnte.

Als Zielgrößen wurde die adsorbierte BSA-Menge definiert, die jeweils mittels Micro BCA-Assay und SE-HPLC ermittelt wurde. Der Versuchsraum, innerhalb dessen das mathematische Modell gilt, wird durch die - 1 und + 1 Stufe eingegrenzt. Die  $\pm\alpha$ -Einstellungen dienten der Absicherung des mathematischen Modells.

Durch die Regressionsgleichung war eine Zunahme der adsorbierten Proteinmenge innerhalb des Versuchsraumes von 1000,0 bis 2000,0 µg/ml erkennbar. Eine Sättigung der Oberfläche scheint aber noch nicht erreicht, da steigende Ausgangskonzentrationen in einer erhöhten adsorbierten BSA-Menge resultierten. Bei Annahme einer side-on Adsorption kann maximal 3,6 mg/m<sup>2</sup>, bei einer end-on Adsorption maximal 9,0 mg/m<sup>2</sup> Albumin auf die Oberfläche adsorbieren. Die erhaltenen Ergebnisse der SE-HPLC legen eine Mischung aus beiden Orientierungen nahe. Die durch den Micro BCA-Assay ermittelten Werte liegen meist oberhalb von 9,0 mg/m<sup>2</sup>. Mögliche Gründe hierfür wurden bereits in Kapitel 4.5 erläutert.

Eine steigende Ionenstärke hingegen führt innerhalb des Versuchsraumes (30 - 70 mM) zu verminderter Proteinadsorption. Dieser Effekt war auf den verschiedenen Vialarten unterschiedlich stark ausgeprägt, was der signifikanten Wechselwirkung zwischen der Ionenstärke und der Vialart entnommen werden konnte. Bei einem pH-Wert von 4,98 erfährt die elektrostatische Anziehung zwischen positiv geladenen Bereichen des Proteins und der negativ geladenen Glasart I Oberfläche bei steigender Ionenstärke eine Abschwächung. Dies erklärt aber nicht die Abnahme der adsorbierten BSA-Menge auf die beiden ungeladenen Vialarten (Glasart I TopLyo<sup>®</sup>- und CZ<sup>®</sup>-Vials). Das hydrophile BSA wird durch steigende Natrium- und Acetationenkonzentration besser stabilisiert, wodurch hydrophobe Bereiche schlechter nach außen gekehrt werden können. Somit werden die hydrophoben Wechselwirkungen, eine Haupttriebkraft auf hydrophoben Oberflächen, vermindert. Dies resultiert auf Glasart I TopLyo<sup>®</sup>- und CZ<sup>®</sup>-Vials in einer abnehmenden adsorbierten BSA-Menge bei steigender Ionenstärke. Der Einfluss der Abschwächung der elektrostatischen Anziehungskräfte scheint jedoch geringer zu sein, was in einer geringeren Abnahme der adsorbierten BSA-Menge bei steigender Ionenstärke auf Glasart I Vials resultiert.

Die Inkubationstemperatur zeigte im untersuchten Temperaturbereich weder beim Micro BCA-Assay noch bei der SE-HPLC einen signifikanten Einfluss auf die adsorbierte BSA-Menge. Jedoch war sie im Falle der SE-HPLC in eine signifikante Wechselwirkung mit der Ionenstärke involviert. Diese WW scheint sich möglicherweise aus der Statistik zu ergeben und keine naturwissenschaftliche Begründung zu haben. Daher wurde diese WW nicht weiter betrachtet.

Mithilfe der SE-HPLC konnten aufgrund eines geringeren Variationskoeffizienten mehr signifikante Einflussfaktoren identifiziert werden. Denn Effekte werden nur dann als solche erkannt, wenn sie größer als die Standardabweichung sind. Daher wurde mittels SE-HPLC auch eine Zunahme der adsorbierten BSA-Menge bei längerer Inkubationsdauer als signifikant identifiziert. Jedoch zeigte sich in einem aufbauenden Versuch, dass bereits nach 5 Minuten Inkubation annähernd soviel BSA wie nach 6 Stunden auf Glasart I Vials adsorbierte. Dies zeigte erneut, dass es sich

bei der Proteinadsorption um einen schnellen Vorgang handelt. Eine weitere stetige Zunahme über 18,06 Stunden hinaus ist somit nicht zu erwarten.

Den größten Einfluss auf die Proteinadsorption zeigte sowohl beim Micro BCA-Assay als auch bei der SE-HPLC die Vialart. Auf Glasart I Vials adsorbierte mehr BSA als auf Glasart I TopLyo<sup>®</sup>- und CZ<sup>®</sup>-Vials. Bei einem pH-Wert von 4,98 liegt die Glasart I Oberfläche negativ geladen vor, wodurch es zur elektrostatischen Anziehung mit positiv geladenen Bereichen von BSA kommt. Auf den nahezu ungeladenen Glasart I TopLyo<sup>®</sup>- und CZ<sup>®</sup>-Vials hingegen führen vor allem hydrophobe Wechselwirkungen zur Adsorption auf die Primärpackmitteloberflächen. Van der Waalsche Kräfte stellen vermutlich auf allen untersuchten Primärpackmitteln eine zusätzliche Triebkraft dar. Die elektrostatische Anziehung veranlasst wahrscheinlich eine stärkere BSA-Adsorption auf Oberflächen als es durch hydrophobe Wechselwirkungen möglich ist. Daher sollte stets beachtet werden, ob es sich um eine geladene oder ungeladene Oberfläche handelt.

Es zeigte sich eine leicht verstärkte BSA-Adsorption auf CZ<sup>®</sup> Vials im Vergleich zu Glasart I TopLyo<sup>®</sup> Vials, die durch die höhere Hydrophobizität von CZ<sup>®</sup> Vials und die damit verbundenen verstärkten hydrophoben Wechselwirkungen begründet sind.

## 6.5 Geräte und Materialien

### Geräte

<b>Analysenwaage</b>	Analysenwaage Genius, Sartorius AG
<b>Horizontalschüttler</b>	WT 12, Biometra GmbH
<b>HPLC</b>	1200 Series, Agilent Technologies
Binäre Pumpe	1200 Series G1312A, Agilent Technologies
FLD-Detektor	1200 Series G1321A, Agilent Technologies
Probengeber	1200 Series G1329A, Agilent Technologies
Software	Chemstation, Version B.02.01-SR2
Thermostat	1200 Series G1316A, Agilent Technologies
<b>HPLC-Säule</b>	TSKgel G3000PWXL, 7,8 mm x 30,0 cm, Tosoh Bioscience
<b>Klimakammer</b>	KBF 720, Binder GmbH
<b>Millipore Anlage</b>	Milli-Q <sup>®</sup> -Advantage A10 <sup>®</sup> , Merck Millipore
<b>pH-Meter</b>	Professional Meter PP-15, Sartorius AG
<b>Trockenschrank</b>	UT6060, Heraeus GmbH
<b>UV/Vis-Spektrometer</b>	BioTek Instruments, Uvikon XL
<b>Design Expert</b>	Stat-Ease, Inc. Version 8.0.7.1

**Materialien**

Bördelkappen	West Pharmaceutical Services GmbH & Co. KG, Eschweiler 5920-3457
Bovines Serum Albumin	Sigma Aldrich, Steinheim A3059
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	GIBCO, Invitrogen Corporation, Karlsruhe 21600-010
Micro BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe 23235
Natriumacetat-Trihydrat	Sigma Aldrich, Steinheim S8625
Natriumdodecylsulfat Lösung (SDS) 20% in Wasser	Fluka Analytical, Buchs 05030
Omniflex 3G Stopfen	Helvoet Pharma, Ittersbach V9396
Vials aus COP (CZ <sup>®</sup> ), 10 ml	Daikyo Seiko Ltd., Tokyo
Vials Glasart Typ I, 10 ml	Schott AG, Mainz
Vials Glasart Typ I TopLyo <sup>®</sup> , 10 ml	Schott AG, Mainz

## 7 Zusammenfassung und Ausblick

Proteintherapeutika werden häufig in lyophilisierter Form gelagert, um die Stabilität über eine längere Dauer zu gewährleisten. Vor Applikation in den Patienten wird durch Rekonstitution die fertige Proteinlösung erhalten. Durch Adsorption des Proteins an das Primärpackmittel kann es zu einem Konzentrationsverlust in Lösung kommen. Dies stellt sowohl für den Therapieerfolg als auch für die pharmazeutische Industrie ein Problem dar. In der Literatur wurde bereits die Adsorption verschiedener therapeutischer Proteine an verschiedene Primärpackmittel beschrieben. Dabei konnten zum einen Einflüsse verschiedener Primärpackmitteloberflächen sowie variierender Formulierungsparameter auf die adsorbierte Proteinmenge aufgezeigt werden. Zum anderen wich die adsorbierte Menge unterschiedlicher Proteine aufgrund der komplexen Proteinstruktur auch unter gleichen Bedingungen voneinander ab, was eine Vorhersage zur adsorbierten Proteinmenge somit unmöglich macht. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit unter Einsatz des Modellproteins BSA drei analytische Methoden entwickelt, um die adsorbierte Proteinmenge an verschiedenen Primärpackmitteln zu quantifizieren.

Mittels **Coomassieblau** konnte die adsorbierte BSA-Schicht angefärbt werden und somit die adsorbierte Menge visuell verglichen werden. Dabei konnten aber nur deutliche Proteinmengenunterschiede visuell erkannt werden. Eine Quantifizierung war erst nach Ablösen der gebundenen, angefärbten BSA-Schicht durch eine 1%ige Ammoniaklösung und darauffolgende UV/Vis-spektroskopische Messung möglich. Es zeigte sich jedoch, dass die erhaltenen Kalibriergeraden sowohl von dem untersuchten Primärpackmittel als auch vom pH-Wert der inkubierten Lösung abhängig waren. Da somit für jeden variierenden Formulierungsparameter sowie für unterschiedliche Primärpackmittel stets neue Kalibriergeraden aufgestellt werden müssten, wurde dieser Ansatz aufgrund des hohen Arbeitsaufwandes nicht weiterverfolgt.

Der **Micro BCA-Assay** stellte eine weitere Möglichkeit dar, gebundenes BSA mittels kolorimetrischer Messung zu quantifizieren. Dabei erfolgte die Reaktion des gebundenen Proteins direkt mit dem Micro BCA-Farbreagenz in Lösung.

Auch die **SE-HPLC** wurde genutzt, um die adsorbierte BSA-Menge an verschiedene Primärpackmittel zu bestimmen. Nach Ablösen der adsorbierten Schicht mittels 0,05%iger SDS-Lösung wurde die zuvor adsorbierte BSA-Menge durch Fluoreszenzdetektion ermittelt.

Bei Vergleich der durch den Micro BCA-Assay und die SE-HPLC ermittelten Adsorptionsmengen, bestimmte der Micro BCA-Assay unter gleichen Bedingungen stets höhere Mengen an adsorbiertem BSA. Zur Kalibrierung des Micro BCA-Assays wurde BSA in Lösung eingesetzt. Durch strukturelle Änderungen des gebundenen BSA kann es zu einer veränderten Erreichbarkeit der für die Farbreaktion verantwortlichen Bereiche kommen, wodurch die Proben durch die Kalibriergerade falsch bestimmt werden. Die abweichenden Messergebnisse können aber auch deswegen erhalten werden, da möglicherweise kein vollständiges Ablösen der gebundenen BSA-Schicht durch SDS erreicht werden kann.

Die Validierung des Micro BCA-Assays sowie der SE-HPLC Methode zeigte, dass diese beiden Methoden präzise und richtige Ergebnisse im untersuchten Bereich lieferten, um die adsorbierte

BSA-Menge zu ermitteln. Der Zusammenhang zwischen Probenkonzentration und Messergebnis konnte für den Micro BCA-Assay zwischen 1,25 und 8,0 µg/ml und für die SE-HPLC zwischen 0,25 und 5,0 µg/ml durch eine lineare Annäherung beschrieben werden.

Die statistische Versuchsplanung stellt durch gleichzeitige Variation verschiedener Faktoren eine schnelle und effiziente Methode dar, um beispielsweise den Einfluss der Faktoren auf die adsorbierte BSA-Menge zu untersuchen. Außerdem ist es mittels statistischer Versuchsplanung möglich, Aussagen über Wechselwirkungen von Faktoren zu machen. Dies ist ein weiterer Vorteil gegenüber dem klassischen Versuchsaufbau, bei dem nur ein Faktor pro Versuch variiert wird. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit ein zentral zusammengesetzter Versuchsplan genutzt, um signifikante Faktoren und Wechselwirkungen auf die adsorbierte BSA-Menge zu identifizieren. Zudem konnte in diesem Rahmen die Anwendbarkeit der entwickelten Methoden bestätigt werden.

Es wurde der Einfluss der BSA-Ausgangskonzentration, der Ionenstärke des Puffers, der Inkubationstemperatur sowie der Inkubationsdauer auf die adsorbierte BSA-Menge analysiert. Als qualitativer Faktor wurde zudem die Vialart untersucht, wobei unterschiedlich beschaffene Primärpackmittel zum Einsatz kamen. Als Zielgröße diente die adsorbierte BSA-Menge, die sowohl mittels Micro BCA-Assay als auch mittels SE-HPLC quantifiziert wurde. Der pH-Wert wurde für alle Versuche auf den isoelektrischen Punkt von BSA (pH 4,98) eingestellt, um eine durch beide Methoden messbare, adsorbierte BSA-Menge sicherzustellen.

Mithilfe der statistischen Analyse konnten sowohl mittels Micro BCA-Assay als auch mittels SE-HPLC die Faktoren BSA-Ausgangskonzentration, Ionenstärke des Puffers sowie die Vialart als wichtige Einflussgrößen auf die adsorbierte BSA-Menge identifiziert werden. Die Vialart zeigte dabei den größten Einfluss auf die adsorbierte BSA-Menge. Zusätzlich zeigte sich eine Wechselwirkung zwischen der Ionenstärke und der Vialart. Diese Einflüsse können unter anderem mit der Anwesenheit von hydrophoben Wechselwirkungen, van der Waalschen Kräften oder elektrostatischen Anziehungskräften zwischen Protein und Oberfläche erklärt werden.

Aufgrund des geringeren  $V_k$  der SE-HPLC ermöglichte diese Methode im Vergleich zum Micro BCA-Assay eine sensitivere Identifikation von Einflussfaktoren auf die Proteinadsorption. Somit konnte auch ein Einfluss der Inkubationsdauer als auch eine Wechselwirkung zwischen der Ionenstärke und der Inkubationstemperatur auf die adsorbierte BSA-Menge identifiziert werden.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit Methoden, um die Proteinadsorption an Primärpackmittel schnell und kosteneffizient zu untersuchen. Darüber hinaus stellt die statistische Versuchsplanung einen effektiven Ansatz zur Identifizierung eventueller Einflussfaktoren auf die Proteinadsorption dar.

Im Falle des Modellproteins BSA adsorbieren nur einige mg BSA/m<sup>2</sup> an die Primärpackmitteloberfläche, jedoch kann diese geringe Abnahme bei hochpotenten therapeutischen Proteinen oder Antikörpern bereits zur Beeinträchtigung der Therapie führen. Eine Vorhersage der adsorbierten Proteinmenge an Primärpackmittel ist aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften von Protein und Oberfläche bzw. der vielfältigen Triebkräfte nicht möglich. Die Untersuchung neuer Protein-

formulierungen hinsichtlich ihrer adsorbierten Proteinmenge an verschiedene Primärpackmittel sollte daher bereits in die Formulierungsentwicklung integriert werden. Somit kann schon in einer frühen Entwicklungsphase ausgeschlossen werden, dass es zu einem Verlust der Proteinkonzentration durch das verwendete Primärpackmittel kommt. Verminderte Therapiesicherheit für den Patienten als auch steigende Herstellungskosten können somit vermieden werden.

Zusätzlich können die in dieser Arbeit entwickelten Methoden genutzt werden, um durch weitere Untersuchungen den bisher nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus der Proteinadsorption an Oberflächen weiter zu erforschen.

Da die rekonstituierte Lösung nicht nur mit der Primärpackmittellinnenwand in Kontakt kommt, sollten in aufbauenden Arbeiten zudem die Adsorptionsneigung an Stopfenmaterialien oder Materialien, die Teil des Applikationssystems sind, untersucht werden.

## 8 Summary and Outlook

Protein therapeutics are often stored as lyophilisate to guarantee the stability over a longer period. To obtain the solution applicable into the patient, the lyophilisate has to be reconstituted. Protein adsorption to primary packaging can lead to a loss in protein concentration in solution. The decreasing protein content is an issue for the therapy success as well as for the pharmaceutical industry. The adsorption of various therapeutic proteins to different kinds of primary packaging has already been described in literature. On the one hand the influence of various primary packaging surfaces as well as of different formulation parameters on the adsorbed protein amount was shown. On the other hand different adsorbed amounts for different proteins under equal conditions were observed. Therefore, a prediction of the adsorbed amount could not be made. Using the model protein BSA, in the presented work three analytical methods were developed to quantify the adsorbed protein amount to different primary packaging.

A visual comparison of the adsorbed amount could be made after coloring the adsorbed BSA layer with **Commassieblue**. However, only clearly varying protein amounts could be distinguished. In contrast, quantification could be achieved after detachment of the adsorbed and colored BSA layer with a 1% ammonia solution and measurement of this solution in a UV-/Vis-spectrometer. Thereby it became clear that the calibration curves not only depended on the used primary packaging but also on the pH value of the incubated solution. For this reason, a new calibration curve would be necessary for every varying primary packaging or for every differing formulation parameters. Due to the high effort, alternative methodical approaches were considered.

The **Micro BCA Assay** presented another colorimetric method to quantify the adsorbed BSA amount. The bound BSA reacted directly with the BCA color reagent in solution.

As well, the **SE-HPLC** was used to determine the adsorbed BSA amount to different primary packaging containers. Following the detachment of the bound layer using 0,05% SDS solution, the adsorbed amount was quantified via fluorescence detection.

Comparing the determined BSA values using the Micro BCA Assay or the SE-HPLC, the Micro BCA Assay always revealed higher protein concentrations for the adsorbed BSA amount under the same conditions. For the calibration of the Micro BCA Assay, BSA was used in solution. Due to structural changes of BSA, parts of the protein, which are responsible for the color reaction, could have a different accessibility. Therefore, the determination of the adsorbed amount for the samples is inaccurate. Another reason for the varying results could be that SDS is not able to completely displace the bound BSA layer.

As the validation showed, the Micro BCA Assay as well as the SE-HPLC provided precise and accurate results to quantify the adsorbed BSA amount in the studied range. The correlation between sample concentration and measurement could be described by a linear approximation, for the Micro BCA Assay in the range 1,25 µg/ml to 8,0 µg/ml and for the SE-HPLC between 0,25 µg/ml and 5,0 µg/ml.

Owing to the simultaneous variation of different factors, the statistical tool “design of experiments“ represents a fast and efficient approach to analyse for example the influence of factors on

the adsorbed amount of BSA. Moreover, the statistical experimental design can identify interactions of factors. This is another advantage compared to the conventional experimental planning, where only one factor is varied at a time. Thus, in the presented work a central composite design was used to identify significant factors and interactions on the adsorbed BSA amount. Furthermore, using the statistical design of experiments, the practicability of the developed methods could be confirmed.

The effects of the BSA initial concentration, the ionic strength of the buffer, the incubation temperature as well as the incubation time on the adsorbed BSA amount were analysed. The vial type served as a qualitative factor, whereas different constituted primary packaging were used. The adsorbed BSA amount, measured by the Micro BCA Assay as well as the SE-HPLC, was applied as target value. In all experiments the pH value was adjusted to the isoelectric point of BSA (pH 4,98) to guarantee measureable adsorbed amounts for both methods.

By the use of statistical experimental design, the Micro BCA Assay as well as the SE-HPLC could identify the significant influence of the initial BSA concentration, the ionic strength of the buffer and the vial type on the adsorbed BSA amount. The vial type had the biggest impact on the adsorbed value. In addition, an interaction between the ionic strength and the vial type was detected. Amongst others, the presence of hydrophobic interactions, van der Waals forces and electrostatical interaction could explain the mentioned influences.

Showing a smaller coefficient of variation, the SE-HPLC compared to the Micro BCA Assay identified more significant effects on the adsorbed BSA amount. Thus, an influence of the incubation time as well as an interaction between the ionic strength and the incubation temperature could also be identified.

Summing up, this work presents methods for the fast and cost-effective determination of the protein adsorption to primary packaging. Moreover, the “design of experiments“ is an effective approach to identify potential influence factors on the protein adsorption.

In the case of the model protein BSA, only a few mg BSA/m<sup>2</sup> adsorbed on the primary packaging, but this small loss can already affect the therapy with high potential proteins or antibodies. Due to the different properties of the protein and the surface as well due to the manifold driving forces, a prediction of the adsorbed protein amount on to primary packaging could not be made. Therefore, the analysis of new protein formulations, regarding the adsorbed protein amount to primary packaging, should already be integrated into the formulation development. Thus, the loss of protein concentration caused by the primary packaging could be eliminated in an early stage of the development. Reduced safety for the patient as well as increasing manufacturing costs could be avoided.

Additionally, the presented methods can be used to further elucidate the mechanism of the protein adsorption to surfaces, which is not completely understood yet.

Further work should also include the investigation of the protein adsorption to stoppers as well as to all different kinds of the device, because the reconstituted solution not only contacts the primary packaging surface.

## Literaturverzeichnis

- [1] LEADER, B. ; BACCA, Q. J. ; GOLAN, D. E.: Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. In: *Nature Reviews Drug Discovery* 7 (2008), S. 21–39
- [2] BOSTON CONSULTING GROUP: *Medizinische Biotechnologie in Deutschland 2012- Biopharmazeutika: Wirtschaftsdaten und neue Anwendungsgebiete zum Nutzen für die Patienten*. [www.vfa-bio.de/download/bcg-report-2012.pdf](http://www.vfa-bio.de/download/bcg-report-2012.pdf). Version: 2012
- [3] WANG, W.: Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. In: *International Journal of Pharmaceutics* 185 (1999), S. 129–188
- [4] BURKE, C. J. ; STEADMAN, B. L. ; VOLKIN, D. B. ; TSAI, P.-K. ; BRUNER, M. W. ; MIDDAGH, C. R.: The adsorption of proteins to pharmaceutical container surfaces. In: *International Journal of Pharmaceutics* 86 (1992), S. 89–93
- [5] NAKANISHI, K. ; SAKIYAMA, T. ; IMAMURA, K.: On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. In: *Journal of Bioscience and Bioengineering* 91 (2001), S. 233–244
- [6] TZANNIS, S. T. ; HRUSHESKY, W. J. M. ; WOOD, P. A. ; PRZYBYCIEN, T. M.: Adsorption of a Formulated Protein on a Drug Delivery Device Surface. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 189 (1997), S. 216–228
- [7] QADRY, S. S. ; ROSHDY, T. H. ; CHAR, H. ; DEL TERZO, S. ; TARANTINO, R. ; MOSCHERA, J.: Evaluation of CZ-resin vials for packaging protein-based parenteral formulations. In: *International Journal of Pharmaceutics* 252 (2003), S. 207–212
- [8] BULL, H. B.: Adsorption of bovine serum albumin on glass. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 19 (1956), S. 464–471
- [9] THOMPSON, C.D. ; VITAL-CARONA, J. ; FAUSTINO, E.V.: The effect of tubing dwell time on insulin adsorption during intravenous insulin infusions. In: *Diabetes Technology & Therapeutics* 14 (2012), S. 912–916
- [10] DOGLIETTO, G.B. ; BELLANTONE, R. ; BOSSOLA, M. ; PERRI, V. ; RATTO, C. ; PACELLI, F. ; SOFO, L. ; MIGLIORE, A. ; MANNA, R. ; CRUCITTI, F.: Insulin Adsorption to Three-Liter Ethylen Vinyl Acetate Bags during 24-Hour Infusion. In: *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 13 (1989), S. 539–541
- [11] PETTY, C. ; CUNNINGHAM, N.L.: Insulin adsorption by glass infusion bottles, polyvinylchloride infusion containers, and intravenous tubing. In: *Anesthesiology* 40 (1974), S. 400–404
- [12] SEIFI, A. ; MOWLA, A. ; VAZIRI, M. T. M. ; TALEI, A. R. ; NAMAZY, M. R.: Insulin Adsorbance to Polyvinylchloride (PVC) Surfaces of Fluid Container and Infusion-Set. In: *Middle East Journal of Anesthesiology* 17 (2004), S. 975–981

- [13] MATHES, J.: *Protein Adsorption to Vial Surfaces: Quantification, Structural and Mechanistic Studies*, Ludwig-Maximilians-Universität München, Diss., (2010)
- [14] DUNCAN, M. ; GILBERT, M. ; LEE, J. ; WARCHOL, M.: Development and Comparison of Experimental Assays to Study Protein/Peptide Adsorption onto Surfaces. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 165 (1994), S. 341–345
- [15] MCLEOD, A.G. ; WALKER, I.R. ; ZHENG, S. ; C.P.M., Hayward: Loss of factor VIII activity during storage in PVC containers due to adsorption. In: *Haemophilia* 6 (2000), S. 89–92
- [16] KLEPPMANN, W.: *Versuchsplanung - Produkte und Prozesse optimieren*. 7.Auflage, Carl Hanser Verlag, München Wien, 2011
- [17] ICH-Guideline Q8 (R2): Pharmaceutical Development. (2009)
- [18] ICH-Guideline Q9: Quality Risk Management. (2005)
- [19] ICH-Guideline Q10: Pharmaceutical Quality System. (2008)
- [20] BRONZINO, Joseph D.: *The Biomedical Engineering Handbook: Second Edition*. Bd. 1. CRC Press LLC, Boca Raton, 2000
- [21] HANSSON, K. M. ; TOSATTI, S. ; ISAKSSON, J. ; WETTERÖ, J. ; TEXTOR, M. ; LINDAHL, T. L. ; TENGVALL, P.: Whole blood coagulation on protein adsorption-resistant PEG and peptide functionalised PEG-coated titanium surfaces. In: *Biomaterials* 26 (2005), S. 861–872
- [22] WILLIAMS, R. L. ; WILLIAMS, D. F.: Albumin adsorption on metal surfaces. In: *Biomaterials* 9 (1988), S. 206–212
- [23] WASSELL, D. T. H. ; HALL, R. C. ; EMBERY, G.: Adsorption of bovine serum albumin onto hydroxyapatite. In: *Biomaterials* 16 (1995), S. 697–702
- [24] LEAHY, C. D. ; MANDELL, R. B. ; LIN, S. T.: Initial in Vivo Tear Protein Deposition on Individual Hydrogel Contact Lenses. In: *Optometry and Vision Science* 67 (1990), S. 504–511
- [25] FELGNER, P. L. ; WILSON, J. E.: Hexokinase Binding to Polypropylene Test Tubes. In: *Analytical Biochemistry* 74 (1976), S. 631–635
- [26] GOEBEL-STENGEL, M. ; STENGEL, A. ; TACHÉ, Y. ; JR., J. R. R.: The importance of using the optimal plastic and glassware in studies involving peptides. In: *Analytical Biochemistry* 414 (2011), S. 38–46
- [27] LENSEN, H. G. ; BARGEMAN, D. ; BERGVELD, P. ; SMOLDERS, C. A. ; FEIJEN, J.: High-Performance Liquid Chromatography as a Technique to Measure the Competitive Adsorption of Plasma Proteins onto Latices. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 99 (1984), S. 1–8

- [28] SUELTER, C. H. ; DELUCA, M.: How to prevent losses of protein by adsorption to glass and plastic. In: *Analytical Biochemistry* 135 (1983), S. 112–119
- [29] LOTTSPREICH, F. ; ENGELS, W.: *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, 2. Auflage, 1996
- [30] NORDE, W.: The behavior of proteins at interfaces, with special attention to the role of the structure stability of the protein molecule. In: *Clinical Materials* 11 (1992), S. 85–91
- [31] NORDE, W. ; HAYNES, C. A.: Reversibility and the Mechanism of Protein Adsorption. In: AL., T. H. (Hrsg.): *Proteins at Interfaces II*. ACS Symposium Series, American Chemical Society, 1995
- [32] GIACOMELLI, C. E. ; AVENA, M. J. ; DE PAULI, C. P.: Adsorption of Bovine Serum Albumin onto TiO<sub>2</sub> Particles. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 188 (1997), S. 387–395
- [33] CZESLIK, C.: Erwünscht und unerwünscht-Proteinadsorption an festen Grenzflächen. In: *Chemie in unserer Zeit* 40 (2006), S. 238–245
- [34] NORDE, W. ; MACRITCHIE, F. ; NOWICKA, G. ; LYKLEMA, J.: Protein adsorption at solid-liquid interfaces: Reversibility and conformation aspects. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 112 (1986), S. 447–456
- [35] MALMSTEN, M.: Formation of Adsorbed Protein Layers. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 207 (1998), S. 186–199
- [36] NORDE, W. ; GIACOMELLI, C. E.: BSA structural changes during homomolecular exchange between the adsorbed and the dissolved states. In: *Journal of Biotechnology* 79 (2000), S. 259–268
- [37] NORDE, W.: Adsorption of proteins from solution at the solid-liquid interface. In: *Advances in Colloid and Interface Science* 25 (1986), S. 267–340
- [38] DEE, K. C. ; PULEO, D. A. ; BIZIOS, R.: *An Introduction to Tissue - Biomaterial Interactions*. 1. Auflage. John Wiley&Sons Inc., Hoboken, 2002
- [39] YOUNG, B. R. ; PITT, W. G. ; COOPER, S. L.: Protein Adsorption on Polymeric Biomaterials: II. Adsorption Kinetics. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 125 (1988), S. 246–260
- [40] FAIR, B. D. ; JAMIESON, A. M.: Studies of protein adsorption on polystyrene latex surfaces. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 77 (1980), S. 525–534
- [41] NORDE, W. ; LYKLEMA, J.: The Adsorption of Human Plasma Albumin and Bovine Pancreas Ribonuclease at Negatively Charged Polystyrene Surfaces: I. Adsorption Isotherms. Effects of Charge, Ionic Strength, and Temperature. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 66 (1978), S. 257–265

- [42] SCHMITT, A. ; VAROQUI, R. ; UNIYAL, S. ; BRASH, J. L. ; PUSINERI, C.: Interaction of Fibrinogen with Solid Surfaces of Varying Charge and Hydrophobic-Hydrophilic Balance: I. Adsorption Isotherms. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 92 (1983), S. 25–34
- [43] SCHMIDT, D. R. ; H.WALDECK ; KAO, W. J.: Protein Adsorption to Biomaterials. In: *Biological Interactions on Materials Surfaces*. Springer Science and Business Media, NY, 2009, Kapitel 1, S. 1–18
- [44] SODERQUIST, M. E. ; WALTON, A. G.: Structural changes in proteins adsorbed on polymer surfaces. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 75 (1980), S. 386–397
- [45] CHAN, B. M. C. ; BRASH, J. L.: Conformational change in fibrinogen desorbed from glass surface. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 84 (1981), S. 263–265
- [46] RABE, M. ; VERDES, D. ; SEEGER, S.: Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. In: *Advances in Colloid and Interface Science* 162 (2011), S. 87–106
- [47] WASSELL, D. T. H. ; EMBERY, G.: Adsorption of bovine serum albumin on to titanium powder. In: *Biomaterials* 17 (1996), S. 859–864
- [48] MARSH, R. J. ; JONES, R. A. L. ; SFERRAZZA, M.: Adsorption and displacement of a globular protein on hydrophilic and hydrophobic surfaces. In: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 23 (2002), S. 31–42
- [49] BUIJS, J. ; NORDE, W. ; LICHTENBELT, J. W. T.: Changes in the Secondary Structure of Adsorbed IgG and F(ab')<sub>2</sub> Studied by FTIR Spectroscopy. In: *Langmuir* 12 (1996), S. 1605–1613
- [50] ZIEGLER, C. ; MÜLLER, C.: Proteine auf medizinischen und technischen Substraten. In: *Nachrichten aus der Chemie* 60 (2012), S. 561–565
- [51] KOUTSOUKOS, P.G. ; MUMME-YOUNG, C.A. ; NORDE, W. ; LYKLEMA, J.: Effects of the Nature of the Substrate on the Adsorption of Human Plasma Albumin. In: *Colloids and Surfaces* 5 (1982), S. 93–104
- [52] XU, T. ; FU, R. ; YAN, L.: A new insight into the adsorption of bovine serum albumin onto porous polyethylene membrane by zeta potential measurements, FTIR analyses, and AFM observations. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 262 (2003), S. 342–350
- [53] VARMETTE, E. ; STRONY, B. ; HAINES, D. ; REDKAR, R.: An Assay for Measurement of protein Adsorption to Glass Vials. In: *Journal of Pharmaceutical Science and Technology* 64 (2010), S. 305–315
- [54] ZOUNGRANA, T. ; FINDENEGG, G.H. ; NORDE, W.: Structure, Stability, and Activity of Adsorbed Enzymes. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 190 (1997), S. 437–448
- [55] CHAN, B. M. C. ; BRASH, J. L.: Adsorption of fibrinogen on glass: reversibility aspects. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 82 (1981), S. 217–225

- [56] HAN, M. ; SETHURAMAN, A. ; KANE, R. S. ; BELFORT, G.: Nanometer-Scale Roughness Having Little Effect on the Amount or Structure of Adsorbed Protein. In: *Langmuir* 19 (2003), S. 9868–9872
- [57] WEI, S. ; HONG, C.: Protein adsorption on material surfaces with nano-topography. In: *Chinese Science Bulletin* 52 (2007), S. 3169–3173
- [58] RECHENDORFF, K. ; HOVGAARD, M.B. ; FOSS, M. ; ZHDANOV, V.P. ; BESENBACHER, F.: Enhancement of Protein Adsorption Induced by Surface Roughness. In: *Langmuir* 22 (2006), S. 10885–10888
- [59] SUZAWA, T. ; MURAKAMI, T.: Adsorption of Bovine Serum Albumin on Synthetic Polymer Latices. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 78 (1980), S. 266–268
- [60] HOFMEISTER, F.: Zur Lehre von der Wirkung der Salze: Zweite Mittheilung. In: *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 24 (1888), S. 247–260
- [61] DUNCAN, M. R. ; LEE, J. M. ; WARCHOL, M. P.: Influence of surfactants upon protein/peptide adsorption to glass and polypropylene. In: *International Journal of Pharmaceutics* 120 (1995), S. 179–188
- [62] RUZGAS, T. A. ; RAZUMAS, V. J. ; KULYS, J. J.: Sequential adsorption of  $\gamma$ -interferon and bovine serum albumin on hydrophobic silicon surfaces. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 151 (1992), S. 136–143
- [63] SONESSON, A. W. ; BLOM, H. ; HASSLER, K. ; ELOFSSON, U. M. ; CALLISEN, T. H. ; WIDENGREN, J. ; BRISMAR, H.: Protein-surfactant interactions at hydrophobic interfaces studied with total internal reflection fluorescence correlation spectroscopy (TIR-FCS). In: *Journal of Colloid and Interface Science* 317 (2008), S. 449–457
- [64] BRADFORD, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Analytical Biochemistry* 72 (1976), S. 248–254
- [65] LOWRY, O. H. ; ROSEBROUGH, N. J. ; FARR, A. L. ; RANDALL, R. J.: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. In: *Journal of Biological Chemistry* 193 (1951), S. 265–275
- [66] SMITH, P. K. ; KROHN, R. I. ; HERMANSON, G. T. ; MALLIA, A. K. ; GARTNER, F. H. ; PROVENZANO, M. D. ; FUJIMOTO, E. K. ; GOEKE, N. M. ; OLSON, B. J. ; KLENK, D. C.: Measurement of protein using bicinchoninic acid. In: *Analytical Biochemistry* 150 (1985), S. 76–85
- [67] SEIPKE, G. ; MÜLLNER, H. ; GRAU, U.: Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) von Proteinen. In: *Angewandte Chemie* 98 (1986), S. 530–548

- [68] VAN DULM, P. ; NORDE, W.: The adsorption of human plasma albumin on solid surfaces, with special attention to the kinetic aspects. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 91 (1983), S. 248–255
- [69] BRASH, J. L. ; SAMAK, Q. M.: Dynamics of Interactions between Human Albumin and Polyethylene Surface. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 65 (1978), S. 495–504
- [70] CRANDALL, R.E. ; JANATOVA, J. ; ANDRADE, J.D.: The Effects of Radioiodination and Fluorescent Labelling on Albumin. In: *Preparative Biochemistry* 11 (1981), S. 111–138
- [71] VAN DER SCHEER, A.: *Adsorption of Plasma Proteins - Adsorption Behaviour on Apolar Surfaces and Effect on Colloid Stability*, Technical University Twente, Diss., (1978)
- [72] HOLMBERG, M. ; STIBIUS, K. B. ; NDONI, S. ; LARSEN, N. B. ; KINGSHOTT, P. ; HOU, X. L.: Protein aggregation and degradation during iodine labeling and its consequences for protein adsorption to biomaterials. In: *Analytical Biochemistry* 361 (2007), S. 120–125
- [73] LASSEN, B. ; MALMSTEN, M.: Competitive Protein Adsorption Studied with TIRF and Ellipsometry. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 179 (1996), S. 470–477
- [74] WAXMAN, L. ; VILIVALAM, V.: *Development of Analytical Techniques to Determine Protein Adsorption on Sterilized Parenteral Packaging Containers and Stoppers*. Presented at AAPS National Biotechnology Conference. Seattle, WA. June 21-24 (2009)
- [75] FUKUZAKI, S. ; URANO, H. ; NAGATA, K.: Adsorption of bovine serum albumin onto metal oxide surfaces. In: *Journal of Fermentation and Bioengineering* 81 (1996), S. 163–167
- [76] SREENIVASAN, K. ; NAIR, Prabha D.: An HPLC method for determination of adsorbed proteins on polymer films. In: *Clinical Materials* 6 (1990), S. 277–281
- [77] MCMILLIN, C. R. ; WALTON, A. G.: A circular dichroism technique for the study of adsorbed protein structure. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 48 (1974), S. 345–349
- [78] FINK, D. J. ; HUTSON, T. B. ; CHITTUR, K. K. ; GENDREAU, R. M.: Quantitative surface studies of protein adsorption by infrared spectroscopy : II. Quantification of adsorbed and bulk proteins. In: *Analytical Biochemistry* 165 (1987), S. 147–154
- [79] BUMMER, P. M.: An FTIR study of the structure of human serum albumin adsorbed to polysulfone. In: *International Journal of Pharmaceutics* 132 (1996), S. 143–151
- [80] CUYPERS, P. A. ; HERMENS, W. T. ; HEMKER, H. C.: Ellipsometry as a tool to study protein films at liquid-solid interfaces. In: *Analytical Biochemistry* 84 (1978), S. 56–67
- [81] ELWING, H.: Protein absorption and ellipsometry in biomaterial research. In: *Biomaterials* 19 (1998), S. 397–406

- [82] ORTEGA-VINUESA, J. L. ; TENGVALL, P. ; LUNDSTRÖM, I.: Aggregation of HSA, IgG, and Fibrinogen on Methylated Silicon Surfaces. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 207 (1998), S. 228–239
- [83] SCHWARZENBACH, M. S.: *Oberflächencharakterisierung pharmazeutischer Glasbehältnisse und Messung verschiedener Wechselwirkungen zwischen Interferon  $\alpha$ -2a und Glas*, Universität Basel, Diss., (2001)
- [84] FITZPATRICK, H. ; LUCKHAM, P. F. ; ERIKSEN, S. ; HAMMOND, K.: Bovine serum albumin adsorption to mica surfaces. In: *Colloids and Surfaces* 65 (1992), S. 43–49
- [85] KURRAT, R. ; WÄLIVAARA, B. ; MARTI, A. ; TEXTOR, M. ; TENGVALL, P. ; RAMSDEN, J.J. ; SPENCER, N.D.: Plasma protein adsorption on titanium: comparative in situ studies using optical waveguide lightmode spectroscopy and ellipsometry. In: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 11 (1998), S. 187–201
- [86] RÖSSLER, M.: Behältnisse aus Röhrenglas für flüssige Arzneimittel. In: *pharmind Sonderheft 9a/2003* 65 (2003), S. 945–950
- [87] BAUER, Kurt H. ; FRÖMMING, Karl-Heinz ; FÜHRER, Claus: *Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie, 8. Auflage*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, (2006)
- [88] Europäisches Arzneibuch, 7. Auflage. (2011)
- [89] MUNDRY, T.: *Einbrennsilikonisierung bei pharmazeutischen Glaspackmitteln-Analytische Studien eines Produktionsprozesses*, Humboldt Universität zu Berlin, Diss., (1999)
- [90] EU, B. ; CAIRNS, A. ; DING, G. ; CAO, X. ; WEN, Z.-Q.: Direct Visualization of Protein Adsorption to Primary Containers by Gold Nanoparticles. In: *Journal of Pharmaceutical Sciences* 100 (2011), S. 1663–1670
- [91] JONES, L. S. ; KAUFMANN, A. ; MIDDAGH, C. R.: Silicone Oil Induced Aggregation of Proteins. In: *Journal of Pharmaceutical Sciences* 94 (2005), S. 918–927
- [92] THIRUMANGALATHU, R ; KRISHNAN, S. ; SPEED RICCI, M. ; BREMS, D. N. ; RANDOLPH, T. W. ; CARPENTER, J. F.: Silicone Oil- and Agitation-Induced Aggregation of a Monoclonal Antibody in Aqueous Solution. In: *Journal of Pharmaceutical Sciences* 98 (2009), S. 3167–3181
- [93] BONEWITZ, M.: Schichten schützen sensible Arzneien. In: *Schott solutions* 1 (2008), S. 6–11
- [94] SCHOTT FORMA VITRUM: *Special Solutions - SCHOTT Type I plus® - SCHOTT TopLyo® - SCHOTT TopPac®*. [http://www.schott.com/pharmaceutical\\_packaging/german/download/special\\_solutions.pdf](http://www.schott.com/pharmaceutical_packaging/german/download/special_solutions.pdf). Version: 2010
- [95] SCHOTT AG: *SCHOTT Type I plus® - Container with a quartz-like inner surface*. [http://www.schott.com/korea/korean/download/type1plus\\_eng.pdf](http://www.schott.com/korea/korean/download/type1plus_eng.pdf). Version: 2010

- [96] YAMAZAKI, M.: Industrialization and application development of cyclo-olefin polymer. In: *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 213 (2004), S. 81–87
- [97] SHIONO, T.: Living polymerization of olefins with ansa-dimethylsilylene (fluorenyl)(amido) dimethyltitanium-based catalysts. In: *Polymer Journal* 43 (2011), S. 331–351
- [98] DAIKYO SEIKO, Ltd.: *Daikyo resin CZ*. <http://www.daikyoseiko.jp/english/cz/index.html>. Version: 2010
- [99] TOPAS ADVANCED POLYMERS: *Topas® Cycloolefin Copolymer (COC)*. [http://www.topas.com/topas\\_broschuere\\_d\\_310507.pdf](http://www.topas.com/topas_broschuere_d_310507.pdf). Version: 2010
- [100] SCHEFFLER, E.: *Einführung in die Praxis der statistischen Versuchsplanung*. 2.Auflage, VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, 1986
- [101] SIEBERTZ, K. ; BEBBER, D. van ; HOCHKIRCHEN, T.: *Statistische Versuchsplanung - Design of Experiments (DoE)*. 1.Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 2010
- [102] HAYAKAWA, M. ; HOSOGI, Y. ; TAKIGUCHI, H. ; SHIROZA, T. ; SHIBATA, Y. ; HIRATSUKA, K. ; KIYAMA-KISHIKAWA, M. ; HAMAJIMA, S. ; ABIKO, Y.: Further development of an electroosmotic medium pump system for preparative disk gel electrophoresis. In: *Analytical Biochemistry* 313 (2003), S. 60–67
- [103] SHARMA, C. P. ; SUNNY, M. C.: Albumin adsorption on to aluminium oxide and polyurethane surfaces. In: *Biomaterials* 11 (1990), S. 255–257
- [104] CHAUBAL, M. V.: Human Serum Albumin as a Pharmaceutical Excipient. In: *Drug Development & Delivery* 5 (2005)
- [105] PETERS, T.: *All about albumin: Biochemistry, genetics and medical applications*. Academic Press Inc., 1.Auflage, 1995
- [106] CARTER, D. C. ; HO, J. X.: Structure of Serum Albumin. In: *Advances in Protein Chemistry* 45 (1994), S. 153–203
- [107] HE, X.-M. ; CARTER, D.C.: Atomic structure and chemistry of human serum albumin. In: *Nature* 358 (1992), S. 209–215
- [108] *Zeta Potential*. <http://www.freieck.de/Chemie/Zeta.html>. Version: 2012
- [109] MALVERN INSTRUMENTS: *Zetasizer Nano series User manual*, (2003)
- [110] HAAS, W.: *Oberflächenbeurteilung -Rauheitsmessung-*. [www.ima.uni-stuttgart.de/studium/dt/HFV\\_Oberflaechenbeurteilung.pdf](http://www.ima.uni-stuttgart.de/studium/dt/HFV_Oberflaechenbeurteilung.pdf). Version: 2010
- [111] SORG, H.: *Praxis der Rauheitsmessung und der Oberflächenbeurteilung*. Carl Hanser Verlag, München Wien, (1995)

- [112] COLIGAN, John. E. ; DUNN, Ben M. ; SPEICHER, David W. ; WINGFIELD, Paul T.: *Current Protocols in Protein Science*. John Wiley&Sons Inc., Hoboken, (2007)
- [113] FAZEKAS DE ST. GROTH, S. ; WEBSTER, R. G. ; DATYNER, A.: Two new Staining Procedures for quantitative Estimation of Proteins on Electrophoretic Strips. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 71 (1963), S. 377–391
- [114] WIKIPEDIA, FREIE ENZYKLOPÄDIE IM INTERNET: *Coomassie-Brillant-Blau*. <http://de.wikipedia.org/wiki/Coomassie-Brillant-Blau>. Version: 2012
- [115] MIZUTANI, T. ; MIZUTANI, A.: Estimation of Adsorption of Drugs and Proteins on Glass Surfaces with Controlled Pore Glass as a Reference. In: *Journal of Pharmaceutical Sciences* 67 (1978), S. 1102–1105
- [116] WIKIPEDIA, FREIE ENZYKLOPÄDIE IM INTERNET: *Bicinchoninsäure*. <http://de.wikipedia.org/wiki/Bicinchonins%C3%A4ure>. Version: 2012
- [117] WIECHELMAN, K. J. ; BRAUN, R. D. ; FITZPATRICK, J. D.: Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. In: *Analytical Biochemistry* 175 (1988), S. 231–237
- [118] THERMO SCIENTIFIC: *Instructions - Micro BCA Protein Assay Kit*. <http://www.piercenet.com/instructions/2160412.pdf>. Version: 2012
- [119] WÄTZIG, H. ; MEHNERT, W. ; BÜHLER, W.: *Mathematik und Statistik kompakt*. 1. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, (2009)
- [120] SKOOG ; LEARY: *Instrumentelle Analytik*. 1.Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, (1996)
- [121] RÜCKER, G. ; NEUGEBAUER, M. ; WILLEMS, G. G.: *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*. 3.Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, (2001)
- [122] FUGUET, E. ; RÀFOLS, C. ; ROSÉS, M. ; BOSCH, E.: Critical micelle concentration of surfactants in aqueous buffered and unbuffered systems. In: *Analytica Chimica Acta* 548 (2005), S. 95–100
- [123] TAKAGI, T. ; TAKEDA, K. ; OKUNO, T.: Effect of salt concentration on the elution properties of complexes formed between sodium dodecylsulphate and protein polypeptides in high-performance silica gel chromatography. In: *Journal of Chromatography* 208 (1981), S. 201–208
- [124] WILLMANN, M. A.: *Stabilisierung von pharmazeutischen Proteinlösungen durch Vakuumtrocknung*, Ludwig-Maximilians-Universität München, Diss., (2003)
- [125] WEN, J. ; ARAKAWA, T. ; PHILO, J. S.: Size-Exclusion Chromatography with On-Line Light-Scattering, Absorbance, and Refractive Index Detectors for Studying Proteins and Their Interactions. In: *Analytical Biochemistry* 240 (1996), S. 155–166

- [126] MORIYAMA, Y. ; OHTA, D. ; HACHIYA, K. ; MITSUI, Y. ; TAKEDA, K.: Fluorescence behavior of tryptophan residues of bovine and human serum albumins in ionic surfactant solutions: A comparative study of the two and one tryptophan(s) of bovine and human albumins. In: *Journal of Protein Chemistry* 15 (1996), S. 265–272
- [127] BLOMBERG, E. ; CLAESSON, P.M. ; GÖLANDER, C.G.: Adsorbed Layers of Human Serum Albumin Investigated by the Surface Force Technique. In: *Journal of Dispersion Science and Technology* 12 (1991), S. 179–200
- [128] ICH Guideline Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. (2005)
- [129] KROMIDAS, S.: *Validierung in der Analytik*. Wiley-VCH Verlag GmbH KGaA, Weinheim, 1.Auflage, (1999)
- [130] SOUSA, S.R. ; MORADAS-FERREIRA, P. ; SARAMAGO, B. ; VISEU MELO, L. ; BARBOSA, M.A.: Human Serum Albumin Adsorption on TiO<sub>2</sub> from Single Protein Solution and from Plasma. In: *Langmuir* 20 (2004), S. 9745–9754
- [131] WANG, W. ; SINGH, S. ; ZENG, D. L. ; KING, K. ; NEMA, S.: Antibody Structure, Instability, and Formulation. In: *Journal of Pharmaceutical Sciences* 96 (2007), S. 1–26
- [132] Fachinformation Betaferon® 250 Milligramm/ml, Bayer, *Rote Liste Service GmbH*. (2011)
- [133] Fachinformation Humira® 40 mg Injektionslösung in Fertigspritze, Abbott, *Rote Liste Service GmbH*. (2006)
- [134] Fachinformation Herceptin® 150 mg Pulver zur Herstellung eines Infusionslösungskonzentrats, Roche, *Rote Liste Service GmbH*. (2012)
- [135] JONES, K. L. ; O'MELIA, C. R.: Protein and humic acid adsorption onto hydrophilic membrane surfaces: effects of pH and ionic strength. In: *Journal of Membrane Science* 165 (2000), S. 31–46
- [136] PACE, C. N.: Measuring and increasing protein stability. In: *Trends in Biotechnology* 8 (1990), S. 93–98
- [137] LEE, S. H. ; RUCKENSTEIN, E.: Adsorption of proteins onto polymeric surfaces of different hydrophilicities—a case study with bovine serum albumin. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 125 (1988), S. 365–379
- [138] GIACOMELLI, C. E. ; NORDE, W.: Conformational Changes of the Amyloid  $\beta$ -Peptide (1-40) adsorbed on Solid Surfaces. In: *Macromolecular Bioscience* 5 (2005), S. 401–407
- [139] KLIBANOV, A. M. ; SCHEFILITI, J. A.: On the relationship between conformation and stability in solid pharmaceutical protein formulations. In: *Biotechnology Letters* 26 (2004), S. 1103–1106

## Veröffentlichungen

**Rager, J.;** Zürcher, J.; Surmann P.: *Protein Adsorption to Primary Packaging: Comparison of determination methods*

präsentiert im Rahmen folgender Veranstaltungen:

*Bayer Schering Pharma AG, GPhD Science Day 2011, Berlin*

*Bayer Schering Pharma AG, Young Scientist Poster Session 2011, Berlin*

## Lebenslauf

Gelöscht

## A Anhang

**Tabelle A.1:** Übersicht über die eingestellten Faktoren und die erhaltenen Ergebnisse der 84 durchgeführten Versuche

Lauf- nummer	BSA-	Ionen- stärke	Inkubations- temperatur	Inkubations- dauer	Vialart	Micro BCA	Micro BCA	SE-HPLC	SE-HPLC
	Ausgangs- konzentration					Assay	Assay		
	[µg/ml]	[mM]	[°C]	[Std]		[mg/m <sup>2</sup> ]	[%]	[mg/m <sup>2</sup> ]	[%]
1	2000,0	70	12	18,06	CZ <sup>®</sup>	10,2	8,7	5,0	7,6
2	1500,0	50	20	12,13	Glasart I	16,4	3,3	9,3	15,1
3	1500,0	50	20	12,13	Glasart I TopLyo <sup>®</sup>	7,9	13,3	3,6	6,6
4	1500,0	90	20	12,13	Glasart I TopLyo <sup>®</sup>	8,0	7,2	4,4	22,0
5	2000,0	30	28	6,19	Glasart I TopLyo <sup>®</sup>	11,4	18,4	4,7	21,0
6	1000,0	70	28	6,19	Glasart I TopLyo <sup>®</sup>	8,6	28,0	3,4	5,7
7	1500,0	50	20	12,13	CZ <sup>®</sup>	9,4	1,2	5,4	15,7
8	1500,0	10	20	12,13	CZ <sup>®</sup>	12,3	4,0	6,6	3,2
9	500,0	50	20	12,13	Glasart I TopLyo <sup>®</sup>	8,0	13,3	3,1	9,2
10	1000,0	30	12	6,19	Glasart I TopLyo <sup>®</sup>	9,2	4,5	4,2	11,2
11	2000,0	70	12	6,19	Glasart I TopLyo <sup>®</sup>	10,8	17,1	4,5	12,8
12	2000,0	30	12	6,19	CZ <sup>®</sup>	11,5	4,5	5,2	3,1
13	1500,0	50	20	12,13	CZ <sup>®</sup>	9,5	4,5	5,0	4,5
14	1500,0	50	20	12,13	Glasart I TopLyo <sup>®</sup>	9,6	6,7	3,6	6,2
15	2500,0	50	20	12,13	Glasart I TopLyo <sup>®</sup>	9,8	20,8	3,9	12,0

**Tabelle A.1:** Übersicht über die eingestellten Faktoren und die erhaltenen Ergebnisse der 84 durchgeführten Versuche

Lauf- nummer	BSA-	Ionen- stärke	Inkubations- temperatur	Inkubations- dauer	Vialart	Micro BCA	Micro BCA	SE-HPLC	SE-HPLC
	Ausgangs- konzentration					Assay	Assay		
	[ $\mu\text{g/ml}$ ]	[mM]	[ $^{\circ}\text{C}$ ]	[Std]		BSA-Menge	$V_k$	BSA-Menge	$V_k$
						[ $\text{mg/m}^2$ ]	[%]	[ $\text{mg/m}^2$ ]	[%]
16	2000,0	70	28	18,06	CZ <sup>®</sup>	10,8	11,9	3,8	3,1
17	1000,0	70	28	18,06	Glasart I TopLyo <sup>®</sup>	6,7	1,6	3,2	3,2
18	1500,0	50	20	12,13	Glasart I	19,5	19,4	7,4	11,3
19	1500,0	50	20	0,25	Glasart I TopLyo <sup>®</sup>	8,2	2,6	4,0	8,1
20	1500,0	50	20	0,25	Glasart I	14,3	6,1	5,9	7,1
21	1500,0	50	20	0,25	CZ <sup>®</sup>	10,6	9,8	4,6	2,6
22	1500,0	50	36	12,13	Glasart I TopLyo <sup>®</sup>	8,1	1,3	3,4	6,6
23	1500,0	50	36	12,13	Glasart I	23,0	15,2	7,6	7,9
24	1500,0	50	36	12,13	CZ <sup>®</sup>	10,4	19,0	4,3	2,4
25	1000,0	70	12	18,06	Glasart I TopLyo <sup>®</sup>	8,2	4,5	4,2	3,8
26	2000,0	30	12	18,06	Glasart I TopLyo <sup>®</sup>	10,2	6,1	5,1	5,4
27	2000,0	70	12	18,06	Glasart I	21,0	6,6	7,7	1,5
28	1000,0	70	12	6,19	CZ <sup>®</sup>	9,1	4,8	4,1	3,5
29	1000,0	30	12	6,19	Glasart I	20,0	5,5	6,9	1,9
30	2000,0	70	12	6,19	Glasart I	21,2	1,2	7,5	2,2
31	2000,0	70	28	6,19	CZ <sup>®</sup>	10,5	4,6	4,8	10,7
32	1500,0	50	20	24	Glasart I	21,0	13,0	8,7	6,7

**Tabelle A.1:** Übersicht über die eingestellten Faktoren und die erhaltenen Ergebnisse der 84 durchgeführten Versuche

Lauf- nummer	BSA-	Ionen- stärke	Inkubations- temperatur	Inkubations- dauer	Vialart	Micro BCA	Micro BCA	SE-HPLC	SE-HPLC
	Ausgangs- konzentration					Assay	Assay		
	[ $\mu\text{g/ml}$ ]	[mM]	[ $^{\circ}\text{C}$ ]	[Std]		BSA-Menge	$V_k$	BSA-Menge	$V_k$
						[ $\text{mg/m}^2$ ]	[%]	[ $\text{mg/m}^2$ ]	[%]
33	1500,0	50	20	24	CZ <sup>®</sup>	12,5	2,7	5,5	4,0
34	1500,0	50	20	24	Glasart I TopLyo <sup>®</sup>	10,3	5,1	3,9	0,5
35	2000,0	30	28	18,06	Glasart I TopLyo <sup>®</sup>	11,6	9,7	4,8	7,6
36	1000,0	70	28	18,06	Glasart I	21,3	6,4	7,3	5,1
37	1500,0	50	20	12,13	CZ <sup>®</sup>	10,0	2,7	5,4	1,1
38	1500,0	10	20	12,13	Glasart I TopLyo <sup>®</sup>	11,7	3,8	5,7	5,8
39	1000,0	30	28	18,06	Glasart I TopLyo <sup>®</sup>	11,4	1,6	4,7	4,5
40	2000,0	30	28	18,06	Glasart I	21,1	6,7	9,2	7,3
41	2000,0	70	28	18,06	Glasart I	18,0	12,3	9,0	13,0
42	1000,0	70	12	6,19	Glasart I	14,3	6,7	6,7	22,8
43	2000,0	30	12	6,19	Glasart I TopLyo <sup>®</sup>	10,0	3,8	4,0	6,3
44	2000,0	30	12	6,19	Glasart I	16,3	3,6	6,8	4,6
45	2000,0	70	28	6,19	Glasart I TopLyo <sup>®</sup>	6,8	9,1	2,5	1,8
46	1000,0	30	28	6,19	Glasart I TopLyo <sup>®</sup>	9,3	4,8	3,7	0,8
47	1000,0	70	28	6,19	CZ <sup>®</sup>	9,4	4,4	3,5	1,6
48	1500,0	50	20	12,13	Glasart I TopLyo <sup>®</sup>	8,0	3,5	4,0	3,1
49	1500,0	50	20	12,13	Glasart I	16,3	6,6	7,6	3,4

**Tabelle A.1:** Übersicht über die eingestellten Faktoren und die erhaltenen Ergebnisse der 84 durchgeführten Versuche

Lauf- nummer	BSA-	Ionen- stärke	Inkubations- temperatur	Inkubations- dauer	Vialart	Micro BCA	Micro BCA	SE-HPLC	SE-HPLC
	Ausgangs- konzentration					Assay	Assay		
	[ $\mu\text{g/ml}$ ]	[mM]	[ $^{\circ}\text{C}$ ]	[Std]		BSA-Menge	$V_k$	BSA-Menge	$V_k$
						[ $\text{mg/m}^2$ ]	[%]	[ $\text{mg/m}^2$ ]	[%]
50	500,0	50	20	12,13	Glasart I	15,5	3,4	6,8	7,9
51	2000,0	30	28	6,19	CZ <sup>®</sup>	10,0	0,0	5,3	6,3
52	1000,0	30	28	6,19	Glasart I	16,3	4,2	7,8	21,4
53	1000,0	70	28	6,19	Glasart I	14,6	0,8	6,3	3,3
54	2000,0	70	12	18,06	Glasart I TopLyo <sup>®</sup>	7,4	1,5	3,6	2,6
55	2000,0	30	12	18,06	CZ <sup>®</sup>	11,1	2,2	5,2	2,9
56	1000,0	70	12	18,06	CZ <sup>®</sup>	8,6	2,8	3,8	4,6
57	1500,0	50	4	12,13	Glasart I TopLyo <sup>®</sup>	8,2	3,4	3,9	4,0
58	1500,0	50	4	12,13	Glasart I	14,3	7,8	7,1	9,6
59	1500,0	50	4	12,13	CZ <sup>®</sup>	10,0	4,2	4,6	6,0
60	1000,0	30	12	18,06	Glasart I TopLyo <sup>®</sup>	8,3	2,3	4,2	2,4
61	1000,0	30	12	18,06	Glasart I	16,5	7,5	6,8	0,8
62	1000,0	70	12	18,06	Glasart I	14,0	3,4	6,3	2,7
63	1000,0	70	28	18,06	CZ <sup>®</sup>	7,5	4,3	4,1	4,7
64	2000,0	30	28	18,06	CZ <sup>®</sup>	10,7	3,0	5,9	6,4
65	1000,0	70	12	6,19	Glasart I TopLyo <sup>®</sup>	7,5	4,9	2,8	9,8
66	2000,0	70	12	6,19	CZ <sup>®</sup>	8,5	7,1	3,8	5,7

**Tabelle A.1:** Übersicht über die eingestellten Faktoren und die erhaltenen Ergebnisse der 84 durchgeführten Versuche

Lauf- nummer	BSA-	Ionen- stärke	Inkubations- temperatur	Inkubations- dauer	Vialart	Micro BCA	Micro BCA	SE-HPLC	SE-HPLC
	Ausgangs- konzentration					Assay	Assay		
	[ $\mu\text{g/ml}$ ]	[mM]	[ $^{\circ}\text{C}$ ]	[Std]		BSA-Menge	$V_k$	BSA-Menge	$V_k$
						[ $\text{mg/m}^2$ ]	[%]	[ $\text{mg/m}^2$ ]	[%]
67	1000,0	30	12	6,19	CZ <sup>®</sup>	8,9	4,5	3,8	6,5
68	2500,0	50	20	12,13	Glasart I	15,3	4,8	7,6	5,6
69	1500,0	50	20	12,13	Glasart I TopLyo <sup>®</sup>	7,6	1,5	3,6	1,5
70	1500,0	50	20	12,13	CZ <sup>®</sup>	8,8	2,8	5,4	3,4
71	500,0	50	20	12,13	CZ <sup>®</sup>	7,2	3,2	4,7	6,4
72	2500,0	50	20	12,13	CZ <sup>®</sup>	9,6	0,0	5,3	1,4
73	2000,0	30	28	6,19	Glasart I	18,1	3,1	7,0	4,2
74	2000,0	70	28	6,19	Glasart I	15,5	1,4	6,1	5,5
75	1000,0	30	28	6,19	CZ <sup>®</sup>	10,1	0,0	5,1	3,5
76	2000,0	30	12	18,06	Glasart I	16,5	5,8	7,0	0,8
77	1000,0	30	12	18,06	CZ <sup>®</sup>	10,1	2,1	4,7	1,8
78	2000,0	70	28	18,06	Glasart I TopLyo <sup>®</sup>	6,9	5,3	2,9	7,8
79	1000,0	30	28	18,06	CZ <sup>®</sup>	11,5	4,5	4,8	5,8
80	1000,0	30	28	18,06	Glasart I	16,9	1,9	6,7	5,2
81	1500,0	50	20	12,13	Glasart I	18,4	6,4	7,9	6,3
82	1500,0	10	20	12,13	Glasart I	21,0	8,3	8,8	6,7
83	1500,0	90	20	12,13	Glasart I	18,0	5,5	7,0	2,8

**Tabelle A.1:** Übersicht über die eingestellten Faktoren und die erhaltenen Ergebnisse der 84 durchgeführten Versuche

Lauf- nummer	BSA-	Ionen- stärke	Inkubations- temperatur	Inkubations- dauer	Vialart	Micro BCA	Micro BCA		SE-HPLC	SE-HPLC
	Ausgangs- konzentration					Assay	Assay	BSA-Menge		
	[µg/ml]	[mM]	[°C]	[Std]		BSA-Menge	V <sub>k</sub>	BSA-Menge	V <sub>k</sub>	
						[mg/m <sup>2</sup> ]	[%]	[mg/m <sup>2</sup> ]	[%]	
84	1500,0	90	20	12,13	CZ <sup>®</sup>	9,1	4,9	3,9	1,1	