



Validierung und Versuchsplanung

Dohm Pharmaceutical Engineering

Autor



Dr. Stefan Schenderlein

stefan.schenderlein@dphe.de

Februar 2007, 2.korrigierte Auflage

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung des Reports außerhalb der Grenzen des Urheberrechtsgesetzes ist unzulässig und strafbar. Das gilt insbesondere für Übersetzungen, Nachdrucke, Mikroverfilmungen oder vergleichbare Verfahren sowie für die Speicherung und Bearbeitung in Datenverarbeitungsanlagen.

Ein Warenzeichen kann urheberrechtlich geschützt sein, auch wenn ein Warenzeichen fehlt.

Validierung und Versuchsplanung

Die Biotechnologie ist einer der innovativsten Industriezweige in Deutschland. Ob in der Entwicklung neuer Wirkstoffe oder der Herstellung von so genannten Validierungschargen für die Zulassung neuer Arzneimittel, täglich werden viele Versuche durchgeführt. Ein effizienter Einsatz von Zeit, verfügbaren Rohstoffen und Personal ist unabdingbar für den Erfolg des Unternehmens. Über den Aufwand für die Validierung herrschen unterschiedliche Auffassungen, welche hier angesprochen werden.

Wie viele Validierungschargen sind notwendig?

Die Meinung, dass man genau drei Validierungschargen herstellen müsste, ist weit verbreitet. Woher stammt diese Zahl? Man findet bei der EMEA (1) den Hinweis, dass für nicht standardisierte Verfahren, insbesondere wenn Sterilisationsschritte oder aseptische Arbeitsweisen angewendet werden, mindestens drei aufeinander folgende Chargen im Produktionsmaßstab herzustellen sind. Für andere nicht standardisierte Verfahren können ein bis zwei Chargen im Produktionsmaßstab ausreichen, wenn aus der vorhergehenden Pilotphase ausreichend Daten vorhanden sind.

Die FDA hat in ihrem „Validation Guide“ (2) grundsätzlich drei Chargen für die Validierung gefordert. Und auch im EG-Leitfaden der Guten Herstellungspraxis wird im zutreffenden Anhang 15, „Zulassungsprüfung und Validierung“ (3), eine Anzahl von drei

aufeinander folgenden Chargen als „allgemein zulässig“ beschrieben.

Bei den Validierungschargen wird immer davon ausgegangen, dass diese unter routinemäßigen Bedingungen hergestellt werden. Gleichzeitig wird jedoch in den genannten Texten immer darauf verwiesen, dass die Parameter bekannt sein müssen und „die Zahl der durchgeführten Prozessläufe und die entsprechenden Beobachtungen ausreichen, um das normale Maß an Variationen und Trends feststellen zu können und um ausreichend Daten für die Bewertung zu erhalten.“(3) In den Guidelines der FDA findet man weiter den Hinweis „worst case“ Bedingungen in die Untersuchungen einzuschließen.

An dieser Stelle tritt ein deutlicher Widerspruch zu Tage. Einerseits sollen Variationen und Trends festgestellt werden, welche die kritischen Prozessparameter betreffen, andererseits werden 1 bis 3 Chargen gefordert.

In der Praxis wird daher häufig der Weg gegangen, dass drei Chargen hergestellt, aber keine kritischen Parameter verändert werden, auch wenn für diese in den Zulassungsunterlagen Bereiche angegeben wurden. Die Aussagekraft dürfte bei drei Untersuchungen jedoch begrenzt sein. Es ist also dem Hersteller selbst überlassen, vorab oder erst nach den Validierungschargen umfangreichere Tests zu fahren, welche die Bereiche tatsächlich abdecken und eine Aussage über Trends erlauben.

PAT

Im September 2004 veröffentlichte die FDA eine Empfehlung, welche u.a. auch dieses Problem angeht. Unter dem Begriff *Process Analytical Technologies* wird ein regulatorischer Rahmen geschaffen, welcher die freiwillige Integration innovativer Technologien in die Ent-

wicklung, Produktion und Qualitätskontrolle von Arzneimitteln fördern soll (4). Hier wird u.a. auch auf die Strategie zur Durchführung von Versuchen eingegangen und die Anwendung der Versuchsplanung (DOE - Design of Experiments) empfohlen. Die Richtlinie über die Validierung befindet sich daher zurzeit in Revision. Eine ausführliche Empfehlung existiert daher noch nicht.

Jedoch sozusagen als Reaktion auf die PAT-Initiative wurde im CFR 490.100 (5) der Begriff Konformitätsschargen (*conformance batches*) geprägt:

„Before commercial distribution begins, a manufacturer is expected to have accumulated enough data and knowledge about the commercial production process to support post-approval product distribution. Normally, this is achieved after satisfactory product and process development, scale-up studies, equipment and system qualification, and the successful completion of the initial conformance batches. Conformance batches (sometimes referred to as “validation” batches and demonstration batches) are prepared to demonstrate that, under normal conditions and defined ranges of operating parameters, the commercial scale process appears to make acceptable product. Prior to the manufacture of the conformance batches the manufacturer should have identified and controlled all critical sources of variability.“

Für Arzneimittelhersteller, die für den US-Markt produzieren wollen, entfällt damit die spezifische Forderung nach drei Konformitätsschargen. Nun müssen die vorhandenen Untersuchungen so für die Beweisführung eingesetzt werden, dass die kritischen Parameter und alle Ursachen ihrer Variabilität erkannt wurden und beherrscht werden. Damit

Validierung und Versuchsplanung

sind die Entwicklung und die Produktion wieder näher zusammengerückt, denn Validierung kann nur noch als abschließender Teil der Produktentwicklung angesehen werden. Eine der Konsequenzen ist, dass die Durchführung und Planung in ein Gesamtkonzept eingeordnet wird, welches auch eine statistisch begründete Versuchsplanung enthält.

Versuchsplanung

Zum Verständnis der Vorgehensweise für die Validierung soll das Prinzip der Versuchsplanung kurz vorgestellt werden. In jedem Prozess gibt es wichtige und weniger wichtige Einflussfaktoren. Betrachtet man beispielsweise einen Fermentationsprozess, so werden beispielsweise folgende Parameter einen Einfluss ausüben:

- Temperatur,
- pH-Wert im Nährmedium,
- Zusammensetzung des Nährmediums,
- Verhältnis Inoculum/Medium,
- Durchmischung (z.B. Rührerdrehzahl),
- Sauerstoffzufuhr.

Je nachdem, ob die Einflussgrößen variiert werden können oder nicht, spricht man von Steuergrößen bzw. Störgrößen. Letztere müssen betrachtet werden, wenn robuste Prozesse entwickelt werden.

Für jeden Einflussfaktor ergibt sich ein Gültigkeitsbereich innerhalb erlaubter Grenzen. Berücksichtigt man im Versuch nur bestimmte Werte innerhalb dieser Grenzen, spricht man von Faktorstufen.

Nehmen wir an, dass nur die Temperatur und der pH-Wert als kriti-

TIPP!

Gerade ist die zweite Auflage des Klassikers von E.P. Box, J.S. Hunter und W.G. Hunter, „Statistics for Experimenters“, bei Wiley-Interscience erschienen.

sche Parameter identifiziert wurden. Wie könnten beide Faktoren in einer Validierung eingestellt werden? Um den Bereich abzudecken, entscheiden wir uns für die obere und untere Bereichsgrenze. Berücksichtigt man jetzt alle möglichen Kombinationen, so erhält man vier Versuche.

Zunächst soll demonstriert werden, wie der entsprechende Plan konstruiert wird. Dazu wird in einer Tabelle für jeden Faktor eine Spalte angelegt. Tabelle 1 enthält zuerst so viele Zeilen wie Versuche notwendig sind.

Tabelle 1: Beispiel für einen vollständigen Faktorenplan

	A	B	R1
1	25 °C	4,6	19 g/l
2	35 °C	4,6	11 g/l
3	25 °C	6,7	23 g/l
4	35 °C	6,7	12 g/l

Weiter nehmen wir folgende Werte an: Temperatur (Faktor A) im Bereich von 25 °C bis 35 °C; pH-Wert (Faktor B) im Bereich 4,6 bis 6,7. In der jeweiligen Zeile kann man nun die Faktorstufenkombination ablesen. In die letzte Spalte wurde außerdem ein Ergebnis (R1) für die Ausbeute eingetragen. Bei der Realisierung der Versuche ist darauf zu achten, dass die Reihenfolge randomisiert wird. Zum Beispiel erhalten wir durch Auslösen die Reihenfolge: 2, 1, 3, 4

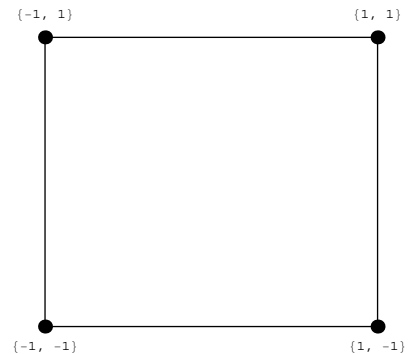


Abbildung 1: Verteilung der Versuche als Faktorstufenkombination

Die Abbildung 1 zeigt, wie die Punkte im Versuchsraum verteilt sind. Hier wurden die Faktorstufen allgemein mit -1 für die untere und +1 für die obere kodiert. Man erkennt, dass je zwei Versuche zur Verfügung stehen, die bei einem niedrigen und einem hohen Level des betrachteten Faktors durchgeführt wurden. Will man den Effekt nun quantitativ erfassen, wird auf der unteren und der oberen Faktorstufe jeweils der Mittelwert der gemessenen Ergebnisse gebildet. Anschließend bildet man die Differenz der Mittelwerte. Vergleicht man die Differenzen für die einzelnen Effekte, so erhält man eine Reihenfolge. Je größer die Differenz, desto größer war auch der Einfluss des zugehörigen Faktors.

$$\text{Diff A} = (11+12)/2 - (19+23)/2 = -9$$

$$\text{Diff B} = (23+12)/2 - (19+11)/2 = 3$$

Damit folgt, dass der Einfluss des Faktors A größer ist als der des Faktors B. Weiter sieht man, dass A die Ausbeute verschlechtert, während B die Ausbeute erhöht.

Tabelle 2 zeigt die allgemeine Kodierung der Effekte und stellt gleichzeitig eine Art Rechenschema dar. Man geht so vor, dass man die kodierten Werte aus einer Spalte jeweils mit der Ergebnisspalte multipliziert, danach die Ergebnisse aufsummiert. Die Summen müssen

Validierung und Versuchsplanung

durch die Anzahl der Werte geteilt werden, welche für die Mittelwertbildung verwendet wurden. In MS Excel lässt sich diese Berechnung schnell mit der Funktion „Summenprodukt“ ermitteln.

Tabelle 2: Kodierte Faktorstufen

	A	B	AB
1	-1	-1	+1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	+1

Die Tabelle zeigt eine weitere Spalte. Die Spalte AB ergibt sich durch die Multiplikation der Spalten A und B. Mit dem Spaltenvektor AB kann man nun die Wechselwirkungen zwischen den Faktoren nach dem gleichen Schema berechnen. Wechselwirkungen sind immer dann von Bedeutung, wenn die Veränderung eines Faktors auch einen Einfluss auf einen anderen Faktor hat. Genau dies sieht man in **Abbildung 2**.

Aufwandsbetrachtung

Unser Beispiel hat nur zwei Faktoren betrachtet, für welche wir ei-

nen vollständigen Faktorenplan aufgestellt haben. Will man mehr Faktoren berücksichtigen, wächst die Anzahl der Versuche exponentiell. Man kann die Anzahl der Versuche reduzieren, indem man so genannte fraktionelle Faktorenpläne aufstellt.

Man bedient sich in diesem Falle der Wechselwirkungen. Für den Fall, dass keine Wechselwirkung zwischen A und B auftritt, kann man diese mit einem weiteren Faktor C „vermengen“. Aus der **Tabelle 2** kann man in der Spalte AB ablesen, welcher Level für den Faktor C eingestellt werden muss. Auf diese Weise lassen sich 3 Faktoren mit einem Faktorenplan für zwei Faktoren untersuchen. Die Anzahl der Versuche ergibt sich wie folgt:

$$N = 2^2 = 2^{(3-1)} = 4$$

Diese Art der Reduktion ist sehr effizient, wird doch mit dem Vernachlässigen einer Wechselwirkung der gesamte Aufwand halbiert. Es ist jedoch wichtig, die Faktorstufen exakt nach dem Muster in **Tabelle 2** zu ermitteln, da nur auf diese Art eine gleichmäßige Verteilung im Versuchsraum erreicht wird. Folgendes Beispiel soll die Reduktion der Versuche anschaulich

darstellen. Wir gehen von einem vollständigen Plan mit 3 Faktoren aus, so dass 8 Versuche nötig sind. Die Faktorstufen in ihrer kodierten Form kann man durch Punkte eines Würfels darstellen.

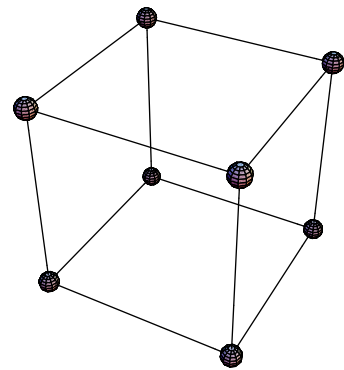


Abbildung 3: Faktorenstufenkombinationen für 3 Faktoren

Auch hier werden die Effekte dadurch ermittelt, dass Mittelwerte von allen Versuchen gebildet werden, die z.B. für Faktor A bei Level -1 und +1 durchgeführt wurden. Man kann sich das so vorstellen, dass die Ergebnisse von zwei gegenüberliegenden Würfelseiten miteinander verglichen werden. Will man nun einen reduzierten Faktorenplan aufstellen, müssen die Versuche gleichmäßig im Versuchsraum verteilt bleiben.

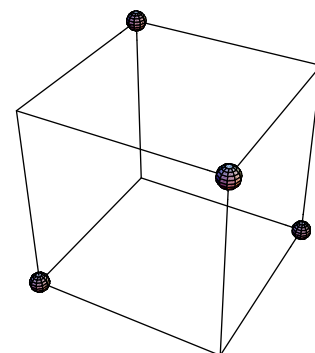


Abbildung 4: Auf jeder Würfel­fläche befindet sich nach der Reduktion die gleiche Anzahl an Versuchen

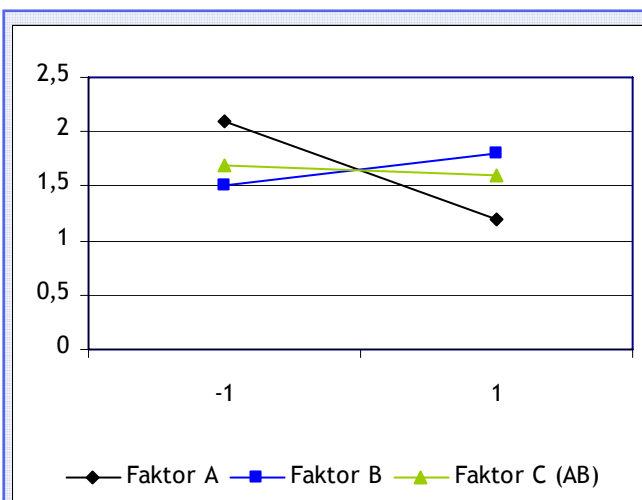


Abbildung 2: Mittelwertvergleich für die Faktoren A, B und C

Validierung und Versuchsplanung

Dadurch wird erreicht, dass die Anzahl der Versuche pro Würfel­fläche auf allen Seiten auch nach der Reduktion gleich ist. Durch Projektion der Würfel­ecken erhält man die Darstellung in Abbildung 1.

Auch in Versuchs­plänen mit mehr als drei Faktoren ist diese Reduktion möglich. Es können sogar mehrere Wechselwirkungen mit neuen Faktoren vermengt werden. Zum Beispiel lässt sich mit den anfangs genannten sechs Faktoren ein $2^{(6-3)}$ -Plan konstruieren, der nur 8 Versuche benötigt.

Welche Aussagekraft haben die berechneten Effekte?

Die Höhe der berechneten Effekte ist ein Maß für die Höhe des Einflusses der Faktoren. Statistische Berechnungen werden oft durch so genannte Signifikanztests untermauert. Die Gültigkeit einer Aussage wird dadurch eingeschränkt, dass eine bestimmte Wahrscheinlichkeit angenommen wird, dass die Aussage falsch ist. Oft verwendet man Irrtumswahrscheinlichkeiten von 5, 1 oder 0,1 Prozent. Mit diesen berechnet man die 95, 99 und 99,9-prozentigen Vertrauensintervalle. Für die Berechnung von Vertrauensintervallen arbeitet man beispielsweise mit dem t-Test. Der t-Test ist jedoch nur anwendbar, wenn so genannte Freiheitsgrade existieren. Hinter der Berechnung der Effekte versteckt sich ein mathematisches Modell, welches Parameter schätzt. Verwendet man das Modell für einen 2^3 -Plan, werden 8 Parameter geschätzt, d.h. genau so viele, wie auch Versuche durchgeführt werden. Dadurch bleibt kein Freiheitsgrad übrig.

Erst durch die Wiederholung von Versuchen werden Freiheitsgrade gewonnen. Weit verbreitet ist die vollständige Wiederholung eines Versuchsplans. Damit verdoppelt

sich jedoch der Aufwand. Kennt man seinen Versuchsaufbau sehr gut und kann abschätzen, dass die Streuung zwischen Wiederholungen bei allen Faktorstufenkombinationen gleich ist, lässt sich der Aufwand reduzieren. In diesem Fall wird ein Einzelversuch zweimal wiederholt. Nun lässt sich die Streuung abschätzen und mit den gewonnenen zwei Freiheitsgraden der t-Test durchführen und ein Vertrauensintervall für die Effekte angeben. Liegen die Effekte außerhalb dieser berechneten Vertrauensintervalle für 95, 99 oder 99,9 % kann man die Aussage treffen, dass die Effekte mit dem jeweiligen Niveau signifikant sind. Bleiben die Effekte innerhalb der Vertrauensintervalle, sind die Effekte nicht von zufälligen Fehlern zu unterscheiden.

Beispiel

Für einen Gefriertrocknungsprozess sollen Konformitätschargen hergestellt werden. Es werden 2 Produkte hergestellt und in 5 verschiedenen Dosierungen von 2 bis 20 ml abgefüllt. Der Aufwand wird reduziert, indem hier nur die Abfüllung der größten und kleinsten Menge betrachtet wird. Die Gefriertrocknung erfolgt mit einem Standardprogramm, welches von einer kleineren Anlage übernommen wurde. Für die Dauer der Haupttrocknung wird durch das Scale-Up von einer möglichen Verkürzung der Zeit von 24 h auf 20 h ausgegangen. Die Größe der Chargen variiert nach Bedarf zwischen 10.000 und 20.000 Flaschen. Mit diesen Einflussgrößen wird ein fraktioneller Faktorenplan mit $2^{(4-1)}=8$ Versuchen festgelegt. Nun sind noch weitere Versuche zur Ermittlung der Versuchsstreuung nötig. Hierzu wird eine Faktorstufenkombination gewählt, von der man aus der Prozesskenntnis heraus die größte Streuung bei den untersuchten Ergebnissen erwartet. Diese Faktorstufenkombination wird mind. zweimal zusätzlich zum

Versuchsplan realisiert. Der Versuchsplan enthält nun 10 Versuche. Wichtig ist, dass alle Versuche randomisiert werden, einschließlich der Zusatzversuche.

Als Zielgrößen werden der Wassergehalt, der Wirkstoffgehalt, das Aussehen usw. gewählt. Nach Durchführung erfolgt die Berechnung der Effekte und Wechselwirkungen. Mit Hilfe der t-Statistik werden die Vertrauensgrenzen für die Effekte ermittelt. Jetzt lässt sich beurteilen, ob Effekte auftreten. Im Falle der Validierung sollten die Effekte und Wechselwirkungen alle innerhalb der Vertrauensgrenzen liegen, also keinen signifikanten Einfluss haben. Damit wäre ein robuster Prozess nachgewiesen.

Fazit

Durch den Einsatz der Versuchsplanung zur Festlegung der Validierungsstrategie wird man den regulatorischen Anforderungen nach Berücksichtigung der Variabilität gerecht. Der Aufwand für die Herstellung der Konformitätschargen wird entschädigt durch eine höhere Aussagekraft der ermittelten Daten.

Referenzen

- (1) EMEA, Note for Guidance on Process Validation, 2001
- (2) FDA, Compliance Policy Guide on Process Validation, 1993
- (3) EG-Leitfaden der Guten Herstellungspraxis, Annex15, Qualification & Validation, 2001
- (4) FDA, Guideline on General Principles of Process Validation, 1987
- (5) FDA, PAT - A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing and Quality Assurance, 2004

Autor



Dr. Stefan SCHENDERLEIN hat Verfahrenstechnik an der TU Dresden studiert und an der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität in Kiel im Fachbereich Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie promoviert. Viele Jahre arbeitete Herr Dr. SCHENDERLEIN als Projektleitender Ingenieur für den Bereich pharmazeutische Verfahrenstechnik in der pharmazeutischen Industrie. Seit 2002 ist er als Senior Consultant für Dohm Pharmaceutical Engineering tätig. Neben zahlreichen Engineeringprojekten und Prozeßvalidierungen hat Herr Dr. SCHENDERLEIN seinen Schwerpunkte auf die statistische Versuchsplanung und Prozesskontrolle gelegt. Zu diesen Themen werden In-House Schulungen für Kunden aus der pharmazeutischen und biotechnologischen Industrie angeboten.

Dr. Stefan Schenderlein
Dohm Pharmaceutical Engineering
Machandelweg 7
D-14052 Berlin

Tel. 030 - 300 964 -0
Fax 030 - 300 964 -29
e-mail: stefan.schenderlein@dphe.de

Unser Leistungsspektrum



CONSULTING
ENGINEERING

KONZEPTE
BAULEITUNG
ABNAHMEN

QUALIFIZIERUNGEN

ANLAGEN
HVAC
REINSTMEDIEN

AKKREDITIERTER PRÜFDIENST

REINRAUMQUALIFIZIERUNG
SATTDAMPFPRÜFUNGEN NACH DIN 285
DRUCKGASANALYTIK
KALIBRIERUNG

VALIDIERUNGEN

PROZESS
REINIGUNG
OPTIMIERUNG

TROUBLE SHOOTING

RISIKOANALYSEN
STATISTISCHE VERSUCHSPLANUNG
PROZESSANALYSEN

SCHULUNGEN

DOHM Pharmaceutical Engineering

Machandelweg 7
D-14052 Berlin
Germany

Knollstraße 50
D-67061 Ludwigshafen
Germany

Parkstraße 46
D-61476 Kronberg
Germany

Tel.: +49-30-300 964-0
Fax: +49-30-300 964-29
E-Mail: info@dphe.de

+49-621-589 1554
+49-621-566 4263

+49-6173-325 12-61
+49-6173-325 12-41
www.dphe.de