

**Trocknung und Stabilisierung von Proteinen  
mittels Warmlufttrocknung und  
Applikation von Mikrotropfen**

**Dissertation**

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

vorgelegt von

**Anke Stabenau**  
aus München

**München 2003**



## Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs.3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herr Prof. Dr. G. Winter betreut.

## Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 2. Juni 2003



.....  
(Anke Stabenau)

Dissertation eingereicht am: 30. Mai 2003  
1. Gutachter: Prof. Dr. G. Winter  
2. Gutachter: Prof. Dr. W. Frieß

Mündliche Prüfung am: 1. Juli 2003

## Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Prof. Dr. G. Winter am Department für Pharmazie – Zentrum für Pharmaforschung der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. G. Winter danke ich für die Auswahl des kreativen Themas, seine wissenschaftliche Anleitung, anregende Kritik und wohlwollende Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Den Kollegen am Institut danke ich für die zahlreichen fachlichen Diskussionen, Anregungen und die freundschaftliche Zusammenarbeit, sowie die Unterstützung in Arbeit und Freizeit.

Mein außerordentlicher Dank gilt Silke Mohl, für die gewissenhafte und unermüdliche Durchsicht der Arbeit und die fachliche Unterstützung. Besonders danken möchte ich auch Ingo Presser, für die unersetzliche Computerunterstützung und die angenehme Zusammenarbeit.

Ganz besonders danken möchte ich meinen Eltern für die sorgfältige Durchsicht der Arbeit und die private Unterstützung.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Jake Reder vom Arbeitskreis Bein (physikalische Chemie, LMU München) für die Einarbeitung in die Bedienung des Mikrotropfenrobotersystems und bei U. Eichenlaub von der Fa. Roche in Tutzing für die Einführung in die Bedienung des Microdropgerätes und für die Möglichkeit mit diesem Gerät die ersten Versuche auszuführen.

Für die Durchführung der Röntgenbeugungsuntersuchungen danke ich Sascha Correl vom Arbeitskreis Schnick (anorganische Chemie, LMU München).

Fr. Mintova vom Arbeitskreis Bein (physikalische Chemie, LMU München) danke ich für die mit Rasterelektronenmikroskop erstellten Aufnahmen.

**Meinen Eltern  
in Liebe und Dankbarkeit  
gewidmet**

Durch euch erhielt ich die Kraft  
zu werden was ich bin,  
zu sehen und zu verstehen.



## ABKÜRZUNGSVERZEICHNISS

C <sub>P</sub>	spezifische Wärmekapazität
CF	Carboxyfluorescein
DSC	Differential Scanning Calorimetrie
EC	Ethylcellulose
Epo	Erythropoietin
Epo +SPT	Rezeptur aus Epo und SPT (siehe SPT)
G-CSF	Granulozyten Kolonie Stimulierender Faktor
G-CSF +ST	Rezeptur aus G-CSF und ST (siehe ST)
G70+B50	Temperaturen bei der Warmlufttrocknung: G = Gastemperatur in °C, B = Blockheizung in °C Zahlen entsprechen der jeweiligen Temperatur
HEC	Hydroxyethylcellulose
HPC	Hydroxypropylcellulose
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie (siehe SE-HPLC)
MC	Methylcellulose
PA	Polyacrylat
PE	Polyethylen low density
PP	Polypropylen
REM	Rasterelektronenmikroskopie
SDS-PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SE-HPLC	Größenausschlusschromatographie
SPT	Rezepturzusammensetzung: 5 % Saccharose, 2 % Phenylalanin und 0,01 % Polysorbate 80
ST	Rezeptur: 5 % Saccharose und 0,01 % Polysorbate 80
T <sub>G</sub>	Glasübergangstemperatur
T <sub>0</sub>	„zero mobility temperature“
T <sub>mc</sub>	kritischen Temperatur ab der Lorentzian Relaxation auftritt
T <sub>M</sub>	Schmelztemperatur der Proteine
Tween 80	Polysorbat 80
UV	Ultraviolett
XRD	Röntgenpulverdiffraktometrie
γ <sub>c</sub>	Oberflächenspannung

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>A.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>A-1</b>
<b>1.</b>	<b>Einführung in die Proteinstabilisierung.....</b>	<b>A-2</b>
1.1.	Aufbau von Proteinen .....	A-2
1.2.	Instabilität.....	A-3
1.3.	Möglichkeiten der Stabilisierung .....	A-4
	1.3.1. Lagerung bei tiefen Temperaturen.....	A-5
	1.3.2. Optimierte Rezeptur.....	A-5
<b>2.</b>	<b>Stabilisierung von Proteinen mittels Trocknungsverfahren .....</b>	<b>A-8</b>
2.1.	Trocknungsverfahren.....	A-10
	2.1.1. Trocknungsverfahren im Einzelnen.....	A-12
2.2.	Stabilisierung in trockenen Matrices .....	A-19
	2.2.1. Einfrierstress und Einfluss des pH-Wertes.....	A-19
	2.2.2. Aufkonzentrierung.....	A-20
	2.2.3. Dehydratisierung .....	A-24
	2.2.4. Hilfsstoffe zur Stabilisierung beim Trocknen .....	A-24
<b>3.</b>	<b>Neue Trocknungs- und Applikationsverfahren .....</b>	<b>A-30</b>
3.1.	Trocknung mittels Warmluftbegasung .....	A-30
	3.1.1. Gerät und Einsatzgebiet.....	A-30
	3.1.2. Trocknungsverlauf der Konvektionstrocknung.....	A-32
3.2.	Applikation und Trocknung mittels Mikrotropfen.....	A-34
	3.2.1. Geräte zur Bildung und Applikation von Mikrotropfen .....	A-35
	3.2.2. Verwendung der Mikrotropfengeräte .....	A-40
<b>4.</b>	<b>Nutzung von Mikrotropfen auf Implantaten .....</b>	<b>A-42</b>
<b>5.</b>	<b>Einsatz von festen Proteinen .....</b>	<b>A-44</b>
<b>6.</b>	<b>Ziele der Arbeit .....</b>	<b>A-51</b>



<b>B.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>B-53</b>
<b>1.</b>	<b>Material .....</b>	<b>B-53</b>
1.1.	Proteine.....	B-53
1.1.1.	<i>Granulozyten Kolonie Stimulierender Faktor (rh G-CSF)</i> .....	B-53
1.1.2.	<i>Erythropoietin (rh Epo)</i> .....	B-53
1.1.3.	<i>Enzyme</i> .....	B-53
1.2.	Hilfsstoffe.....	B-54
1.2.1.	<i>Zucker und andere Hilfsstoffe</i> .....	B-54
1.2.2.	<i>für Xerogele</i> .....	B-54
1.2.3.	<i>für Überzüge</i> .....	B-54
1.3.	Packmittel.....	B-55
1.4.	Trägermaterialien für Mikrotropfen.....	B-55
1.5.	Chemikalien und Reagenzien.....	B-55
<b>2.</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>B-56</b>
2.1.	Analytik.....	B-56
2.1.1.	<i>Größenausschlusschromatographie (SE-HPLC)</i> .....	B-56
2.1.2.	<i>Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i> .....	B-57
2.1.3.	<i>Restfeuchte mittels Karl-Fischer-Titration</i> .....	B-57
2.1.4.	<i>Differential Scanning Calorimetrie (DSC)</i> .....	B-58
2.1.5.	<i>Partikelbestimmung (PAMAS)</i> .....	B-60
2.1.6.	<i>Röntgenpulverdiffraktometrie (XRD)</i> .....	B-60
2.1.7.	<i>Rasterelektronenmikroskopie (REM)</i> .....	B-61
2.1.8.	<i>Lichtmikroskopie</i> .....	B-61
2.1.9.	<i>Haftung</i> .....	B-61
2.1.10.	<i>Freisetzung aus Mikrotropfen-Trägern</i> .....	B-62
2.1.11.	<i>Freisetzung aus überzogenen Mikrotropfen-Trägern oder aus festen Trägern</i> .....	B-63
2.1.12.	<i>Freisetzung aus Xerogelen</i> .....	B-64
2.1.13.	<i>Bestimmung der Oberflächenspannung</i> .....	B-66
2.2.	Prozessanlagen.....	B-66
2.2.1.	<i>Warmluftbegasungsgerät</i> .....	B-66
2.2.2.	<i>Mikrotropfenroboter</i> .....	B-67
2.2.3.	<i>Vakuumentrockenschrank</i> .....	B-70
2.3.	Herstellungsmethoden.....	B-70
2.3.1.	<i>Trocknung mittels Warmluftbegasung</i> .....	B-70
2.3.2.	<i>Applikation und Trocknung von Mikrotropfen (Biodotmethode)</i> .....	B-71
2.3.3.	<i>Vakuumentrocknung</i> .....	B-73

<b>C.</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSION.....</b>	<b>C-75</b>
<b>C.I.</b>	<b>Teil I: Trocknung mittels Warmluftbegasung (evaporative drying).....</b>	<b>C-75</b>
<b>1.</b>	<b>Einfluss von Geräteparametern .....</b>	<b>C-76</b>
1.1.	Einfluss der Gaszufuhr.....	C-76
1.2.	Einfluss der Temperatur.....	C-77
<b>2.</b>	<b>Trocknungsverlauf.....</b>	<b>C-80</b>
2.1.	Restfeuchte, Glasübergangstemperatur .....	C-80
2.2.	Proteinstabilität .....	C-83
2.3.	Optimierung der Temperaturprogramme .....	C-87
<b>3.</b>	<b>Einfluss der Rezeptur .....</b>	<b>C-88</b>
3.1.	Einfluss der Rezeptur auf die Restfeuchte .....	C-88
3.2.	Einfluss der Rezeptur auf Kristallinität und Aussehen der Proben .....	C-92
3.3.	Einfluss der Rezeptur auf die Proteinstabilität.....	C-95
<b>4.</b>	<b>Stabilitätsuntersuchungen .....</b>	<b>C-102</b>
4.1.	Restfeuchte und optische Veränderungen .....	C-104
4.2.	Stabilität der Proteine.....	C-112
<b>5.</b>	<b>Vergleich zur Vakuumtrocknung, Bewertung des neuen Verfahrens .....</b>	<b>C-117</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung „Trocknung mittels Warmluftbegasung“ .....</b>	<b>C-124</b>
<b>C.II.</b>	<b>Teil II: Applikation und Trocknung mittels Mikrotropfen.....</b>	<b>C-128</b>
<b>1.</b>	<b>Entwicklung der Methode .....</b>	<b>C-128</b>
1.1.	Einfluss der Tropfengröße.....	C-128
1.2.	Einfluss der Temperatur.....	C-129
1.3.	Einfluss der Vakuumnachttrocknung .....	C-131
<b>2.</b>	<b>Einfluss verschiedener Rezepturen .....</b>	<b>C-134</b>
2.1.	Einfluss auf die Restfeuchte.....	C-134
2.2.	Einfluss auf die gebildeten Muster .....	C-137
2.3.	Einfluss auf die Proteinstabilität.....	C-138
<b>3.</b>	<b>Vergleich zur Vakuumtrocknung .....</b>	<b>C-138</b>

<b>4.</b>	<b>Stabilitätsuntersuchungen.....</b>	<b>C-140</b>
4.1.	Restfeuchte .....	C-141
4.2.	Proteinstabilität .....	C-142
<b>5.</b>	<b>Einfluss verschiedener Oberflächen.....</b>	<b>C-145</b>
5.1.	Aussehen, Tropfengröße .....	C-145
5.2.	Restfeuchte .....	C-148
5.3.	Haftung.....	C-154
5.4.	Adsorption.....	C-158
5.5.	Proteinstabilität .....	C-166
5.6.	Untersuchung der Ablösung adsorbierter Proteine .....	C-167
<b>6.</b>	<b>Dotierung von Xerogelen.....</b>	<b>C-176</b>
6.1.	Aussehen, Restfeuchte .....	C-176
6.2.	Freisetzung und Proteinstabilität.....	C-177
<b>7.</b>	<b>Retardierung und Schutz durch Überzüge .....</b>	<b>C-182</b>
7.1.	Aussehen überzogener Proben.....	C-182
7.2.	Einsatz schnell löslicher Überzüge.....	C-185
7.3.	Einsatz verschiedener retardierender Filmbildner .....	C-186
<b>8.</b>	<b>Trennung inkompatibler Stoffe .....</b>	<b>C-197</b>
<b>9.</b>	<b>Zusammenfassung „Applikation und Trocknung mittels Mikrotropfen“ ....</b>	<b>C-200</b>
<b>D.</b>	<b>RESÜMEE UND AUSBLICK.....</b>	<b>D-204</b>
<b>E.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>E-206</b>



## A. EINLEITUNG

„Proteine - die Herausforderung des Jahrhunderts“. Dies oder Ähnliches steht in fast jeder Einleitung eines Artikels über Proteine aus den neunziger Jahren. Und auch wenn wir uns nun seit drei Jahren bereits im nächsten Jahrtausend befinden, so sind die Probleme und Aufgaben die Gleichen geblieben. Noch immer stellt die Entwicklung stabiler Proteinanzwemittel eine große Herausforderung dar.

Bereits vor zweitausend Jahren war in Vorderasien das Auflegen gekauter Feigen zur Therapie offener Wunden üblich und auch im mittelalterlichen Europa brachte man den Saft von Wolfsmilchgewächsen auf Furunkel und Warzen auf (1). Doch erst im 18. Jahrhundert begann man zu verstehen, dass die Wirkung dieser Pflanzen auf ihren Gehalt an Proteinen, genaugenommen an Proteasen, zurückzuführen ist. Um die enorme Bedeutung der Proteine für Medizin und das Leben allgemein zu würdigen, wurde in dieser Zeit (1838) von J. Berzelius die Bezeichnung „Proteine“ nach dem griechischen Wort für „das erste, das wichtigste“ (Proteios) eingeführt (2). Seit 1788 wusste man auch um den Einfluss der Produkte der Bauchspeicheldrüse auf den Diabetes, doch heilen konnte man diese Krankheit noch lange nicht. Erst als 1921 das erste Insulin, Isletin genannt, von Forschern der Universität Toronto (Frederick Banting, Charles Best und James Collip) aus der Bauchspeicheldrüse von Hunden isoliert wurde, war an eine gezielte Therapie zu denken (3, 4). Nur ein Jahr später wurde Isletin das erste Mal einem Menschen injiziert. Der 13 jährige Leonhard Thomas konnte so vor dem sicheren Tod bewahrt werden. Ab 1923 stand dann das Wissen um die großtechnische Gewinnung und Aufreinigung von pharmazeutischen Proteinen zur Verfügung und das erste Protein, ein aus Schweinen isoliertes Insulin (Iletin®), wurde von Lilly vermarktet. So groß der Erfolg auch wahr, bald zeigten sich erste Probleme. Durch die gestiegenen Patientenzahlen war es nicht möglich genug Insulin zu isolieren. Für den Jahresbedarf eines Diabetikers benötigte man die Bauchspeicheldrüsen von 100 Schweinen. Außerdem kam es aufgrund des tierischen Ursprungs der Proteine in 5 % der Fälle zu allergischen Reaktionen der Patienten. Erst Mitte der 80iger Jahre konnte dieses Problem mit Hilfe der rekombinanten DNA-Technologie überwunden werden und ein neuer Abschnitt in der Produktion von pharmazeutischen Proteinen begann (5). Anstatt humane Proteine in teuren und wenig effektiven Verfahren aus Zellen oder Urin von Spendern zu extrahieren, wurden diese großtechnisch rekombinant in Bakterien oder eukaryontischen Zellen hergestellt. Bereits 1982 wurde mit Insulin (Huminsulin® von Lilly) das erste rekombinant hergestellte therapeutische Protein von der FDA für den medizinischen Gebrauch zugelassen. Der weiteren Verbreitung von humanen Proteinen zur medizinischen Therapie stand nichts mehr im Wege, so dass bis zum Jahre 2002 88 Produkte auf Basis von rekombinanten Proteinen oder monoklonalen Antikörpern in der Europäischen Union zugelassen wurden. Dies entspricht 36 % aller neuen Arzneimittel seit 1995. Während es zu Beginn das Ziel war natürliche humane Proteine

rekombinant nachzubauen, gehen neuere Trends inzwischen dahin, bekannte Proteine zu modifizieren um ihre pharmakokinetische und pharmakodynamische Wirkung zu verändern. Dazu werden einzelne Aminosäuren vertauscht (Lispro-Insulin), ganze Domänen durch andere Strukturen ersetzt (chimaeric antibodies) oder einfach weggelassen (Retepase als Variation von tPA). Auch die Pegylierung von Proteinen findet immer weitere Verbreitung. Neben Peginterferon sind bereits drei andere pegylierte Proteine auf dem amerikanischen Markt und einige weitere in klinischen Studien. All diese Veränderungen dienen dazu, die Immunogenität der Proteine zu verändern, ihre biologische Halbwertszeit zu erhöhen, schneller oder langsamer reagierende Produkte oder völlig neue Hybride zu kreieren. Insgesamt kann man, laut G. Walsh (5), die Herstellung von rekombinanten therapeutischen Proteinen durchaus als die erste wahre industrielle Anwendung der DNA-Technologie ansehen. Innerhalb der letzten Jahrzehnte kam es durch die rasante Entwicklung der DNA-Technologie und aufgrund immer besserer analytischer Aufreinigungstechniken, zu einem enormen Anstieg in der Zahl pharmazeutisch nutzbarer Proteine. Es liegt an der hohen physikalischen und chemischen Instabilität der Proteine, dass die Zulassung neuer Protein Arzneimittel nicht im selben Maße mit deren rekombinater Herstellung Schritt gehalten hat. Trotz Jahrzehnten an intensiver Forschung stellt die Stabilisierung von Proteinen immer noch eine große Herausforderung dar.

## 1. Einführung in die Protein stabilisierung

### 1.1. Aufbau von Proteinen

Bei Proteinen handelt es sich um natürliche Stoffe, welche in den Ribosomen der Zellen gebildet und teilweise im Golgiapparat glykosiliert werden. Sie bestehen aus bis zu 20 verschiedenen Aminosäuren, deren Aneinanderreihung zu einer Kette als Primärstruktur bezeichnet wird. Die räumliche Ausrichtung dieser Aminosäurenkette wird als Sekundärstruktur bezeichnet und kommt durch die Wechselwirkung der Aminosäuren untereinander zustande. Man unterscheidet drei verschiedene Formen:  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt und Bereiche größerer Flexibilität, auch loop genannt. In manchen Proteinen kommen diese Formen mehrfach vor, in anderen Proteinen sind bestimmte Formen dagegen überhaupt nicht enthalten. Zusammen bilden sie die proteinspezifische dreidimensionale Anordnung eines Proteins. Diese als Tertiärstruktur bezeichnete Anordnung wird durch hydrophobe Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken, und elektrostatische Interaktionen der Aminosäuren untereinander, sowie durch intramolekulare, kovalente Bindung zwischen den Seitengruppen zweier Cysteine (Disulfidbrücken) ermöglicht. Obwohl sowohl G-CSF als auch Erythropoietin, welche beide in dieser Arbeit verwendet wurden, zu den „helical bundle proteins“ gehören und

somit vier  $\alpha$ -Helices und zwei Disulfidbrücken besitzen, bilden sie doch aufgrund ihrer unterschiedlichen Primärstruktur völlig verschiedene Tertiärstrukturen aus (Abb. 1). Durch die Faltung eines Proteins zur nativen Tertiärstruktur werden 80 % der unpolaren Seitenketten im Proteininneren eingeschlossen und damit vor dem energetisch ungünstigen Kontakt mit Wasser geschützt.



Abb. 1: 3-D-Darstellung von Erythropoietin (links) und G-CSF (rechts). Die  $\alpha$ -Helices der Moleküle sind als Spiralen dargestellt.

Manche Proteine bestehen aus mehreren Aminosäureketten, deren korrekte Anordnung zueinander als Quartärstruktur bezeichnet wird. Wieder andere Proteine, wie z.B. G-CSF und Erythropoietin, gehören zur Gruppe der Glykoproteine. Bei diesen Proteinen sind Kohlenhydratketten an die Aminosäuren gebunden. Im Fall von Epo machen diese 40 % des gesamten Molekulargewichtes aus. Da die Bindung von Zuckern nur in eukaryontischen Zellen, nicht jedoch in den Zellen von Prokaryonten erfolgen kann, ergeben sich in diesem speziellen Fall Unterschiede zwischen aus Bakterienzellen gewonnenen, rekombinanten Produkte und natürlichen Proteinen. Für die Stabilität der Proteine und ihre biologische Aktivität sind die Zucker meist von entscheidender Bedeutung. Erythropoietin verliert bei Deglykosylierung seine biologische Aktivität vollständig (6) und neigt unter Temperaturstress zu verstärkter Aggregation (7, 8). Auch G-CSF weist ohne Zuckerketten eine geringere Stabilität bei neutralen pH-Werten auf, allerdings bewahrt es auch in dieser Form seine Aktivität vollständig (9, 10, 11).

## 1.2. *Instabilität*

Die volle biologische Aktivität eines Proteins ist nur bei Aufrechterhaltung der nativen Tertiärstruktur gewährleistet. Wie ein Schlüssel zum Schloss muss ein Protein zu seinem Wirkort, z.B. einem Rezeptor, bzw. ein Enzym zu seinem Substrat passen. Bereits geringe Abweichungen in der Tertiärstruktur können eine Anlagerung an den Rezeptor verhindern und damit die Wirkung des Proteins einschränken oder ganz unterbinden. Die Erhaltung der korrekten Tertiärstruktur ist jedoch nicht immer ohne weiteres gegeben. Trotz der großen Anzahl an Wechselwirkungen innerhalb eines Proteins, weisen nativ gefaltete Proteine nur eine geringfügig höhere Stabilität auf als entfaltete Proteine (Änderung der Freien Energie zwischen gefalteten und aufgefalteten Protein: 5-20 kJ/Mol

aus 12; 21-63 kJ/Mol aus 13). Somit ist es nicht erstaunlich, dass Proteine selbst in ihrer natürlichen Umgebung nur eingeschränkt stabil sind (14). Ein fragiles Gleichgewicht zwischen intermolekularen Protein-Wasser und intramolekularen Protein-Protein Wechselwirkungen hält die Proteine in ihrer nativen Form (15). Kommt es zu geringfügigen Veränderungen der Umgebung, seien es pH-Verschiebungen, Änderungen der Temperatur oder Ionenstärke, oder zur Einwirkung von Scherstress - um nur wenige Faktoren zu nennen - so kann dies zur reversiblen oder irreversiblen Entfaltung des Proteins führen (Abb. 2). Die Entfaltung eines Proteins bezeichnet man als Denaturierung, wodurch eine thermodynamisch unvorteilhafte Interaktion zwischen Wasser und den nun exponierten hydrophoben Seitenketten entsteht. Um diese zu minimieren, kommt es zur Zusammenlagerung mehrerer denaturierter Proteine (16). Diese Zusammenlagerung nennt man Aggregation. Sie kann nur zwei oder drei Moleküle umfassen, oder auch zu großen Agglomeraten führen, welche unlöslich sind und ausfallen. Gewöhnlich weisen Aggregate keine oder eine stark reduzierte Aktivität auf, dafür aber eine erhöhte Immunogenität (12). Neben dieser physikalischen Instabilität kann auch die chemische Instabilität der Proteine zu ihrer Inaktivierung führen. Häufig auftretende Phänomene sind Hydrolyse, Deamidierung, Isomerisierung, Deglykosilierung, Oxidation und damit eng verbunden die Ausbildung neuer Disulfidbrücken. Ein spezifisches Problem der Aminosäuren ist die Tendenz mit reduzierenden Zuckern die Maillardreaktion einzugehen.

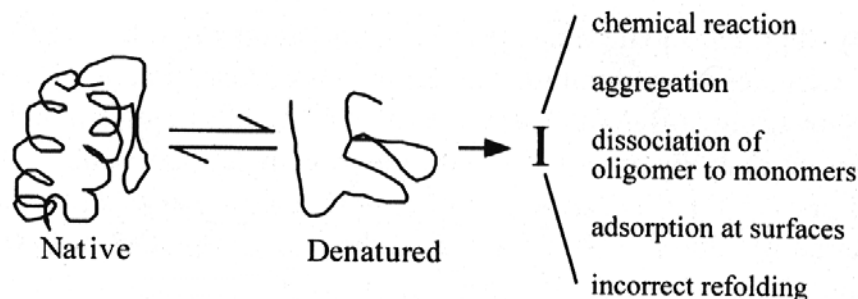


Abb. 2: Schematische Darstellung der reversiblen Proteindenaturierung und möglicher irreversibler Folgen. (entommen aus 17)

### 1.3. Möglichkeiten der Stabilisierung

Proteine sind also höchst empfindliche Moleküle, aber auch hochspezifische, potente Arzneistoffe, so dass es - wie W. Wang schreibt (18) - „eine der schwierigsten und herausforderndsten Aufgaben in der Entwicklung flüssiger Proteinarzneimittel ist, mit ihren physikalischen und chemischen Instabilitäten fertig zu werden“. Grundsätzlich bieten sich dazu drei Möglichkeiten an: Erstens die Lagerung der Proteinlösung bei möglichst niedrigen Temperaturen, um die Reaktionsgeschwindigkeit zu verringern, zweitens die Entwicklung einer optimierten Rezeptur, welche die Instabilität



verursachenden Einflüsse ausgleicht (thermodynamische Stabilisierung), und drittens die Trocknung der Proteine unter Einschluss in eine stabilisierende Matrix.

### 1.3.1. Lagerung bei tiefen Temperaturen

Nach Arrhenius verdoppelt sich die Reaktionsgeschwindigkeit bei Erhöhung der Temperatur um 10 °K. Zur Verlangsamung aller chemischen, physikalischen und biologischen Reaktionen bietet sich demnach die Lagerung bei niedrigen Temperaturen an. Während bei Lagerung im Kühlschrank alle Reaktionen nur verlangsamt sind und mikrobielles Wachstum immer noch möglich ist, werden durch Einfrieren auf – 80 °C alle Reaktionen unterbunden. Diese tiefe Temperatur ist nötig, da aufgrund der sehr niedrigen eutektischen Temperatur von Proteinrezepturen nur so ein vollständiges Gefrieren der Lösung gewährleistet werden kann (19, 20, 21, 22). Derart tiefgefrorene Produkte weisen jedoch einige Nachteile auf. Nach der Gibbs-Helmholtz-Gleichung erhalten Proteine ihre höchste Stabilität nur innerhalb von – 10 °C bis + 35 °C (17), wobei W. Wang aufgrund von praktischen Erfahrungen für mesophile Proteine sogar einen noch höheren Temperaturbereich angibt: + 5 °C bis + 50 °C (18). Durch das Einfrieren kann es aufgrund der Temperatur (23, 24, 15) zur Kältedenaturierung der Proteine kommen. Auch der Einfrierprozess (siehe Nachteile Gefriertrocknung, A.I.1.1) verursacht einige Probleme und kann zur Destabilisierung der Proteine führen. Nicht zu vernachlässigen ist des Weiteren die schwierige Handhabung gefrorener Produkte, für welche während der Distribution eine geschlossene Kühlkette unbedingt erforderlich ist. Vor jeder Anwendung muss die Lösung kontrolliert aufgetaut werden, da zu schnelles Auftauen wiederum zur Denaturierung der Proteine führen kann. Wenn es sich bei dem eingefrorenen Produkt um ein Mehrfachdosenpräparat handelt, tritt noch das Problem hinzu, bei welcher Temperatur der angebrochene Rest zu lagern ist. Soll er wieder eingefroren werden, wobei bei wiederholten Auftau-, Einfrierzyklen die Aggregationsgefahr überproportional ansteigt, oder soll er von nun an im Kühlschrank gelagert werden und muss dementsprechend innerhalb einer kurzen Zeitspanne aufgebraucht werden? Aufgrund all dieser Überlegungen, hat sich das Einfrieren von Proteinlösungen nur für die Lagerung von Bulklösungen bei den pharmazeutischen Herstellern durchgesetzt, während die meisten Handelsprodukte bei 2 – 8 °C, also im Kühlschrank, gelagert werden.

### 1.3.2. Optimierte Rezeptur

Um im Kühlschrank gelagerte Produkte, trotz der nur verlangsamteten Reaktionskinetik, für mehrere Jahre lagerfähig zu machen, setzt man den Rezepturen verschiedene Hilfsstoffe zu (12, 18, 25). An dieser Stelle soll darauf nur oberflächlich eingegangen werden, da der Schwerpunkt der Arbeit auf trockenen Formulierungen liegt.

Grundsätzlich handelt es sich bei der Stabilisierung in Lösungen meist um „Preferential interaction“ (18), also um die bevorzugte Interaktion des Proteins entweder mit Wasser oder dem Excipient. In der Gegenwart eines stabilisierenden Hilfsstoffs „umgibt“ sich das Protein bevorzugt mit Wassermolekülen (preferential hydration), da der Hilfsstoff aus der Umgebung des Proteins bevorzugt ausgeschlossen (preferential exclusion) wird. Dies stellt für native Proteine einen thermodynamisch günstigen Zustand dar, so dass die physikalische Denaturierung unterbunden wird (siehe auch A.2.2.4). Beispiele für solche Stabilisatoren sind Zucker, Polyole, Aminosäuren und Polymere. Polymere, wie z.B. PEG, stabilisieren zusätzlich über eine sterische Behinderung der Aggregation, Dextran bewirkt eine Erhöhung der Schmelztemperatur ( $T_M$ ) der Proteine, und Humanes Serumalbumin (HSA) erniedrigt die Adsorption anderer Proteine an Oberflächen. Gerade die Adsorption an Oberflächen stellt ein grundsätzliches Problem aller Protein arzneistoffe dar. Sie ist sowohl von der Oberfläche als auch vom Protein abhängig und verläuft in der Regel extrem schnell und direkt proportional zur vorhandenen Konzentration (26, 27). Bis zum Erreichen eines Monolayers kommt es zur vollständigen Anlagerung der Proteine an der Oberfläche (28). Gerade bei geringen Konzentrationen kann dies zu einem Verlust bis zu 100 % führen. Der hydrophobe Charakter einer Oberfläche veranlasst die adsorbierten Proteine zur Entfaltung ihrer hydrophoben Seitenketten aus dem Inneren. Dies führt zur Denaturierung und schließlich zur Aggregation mit anderen angelagerten oder freien Proteinen. Tzannis et al. zeigten 1996, dass eine Interleukin-2-Lösung (0,1 mg/ml) ihre Aktivität beim Pumpen durch Silikonkatheter zu 90 % verlor (29). Um die Aggregation und den Verlust von adsorbierten Proteinen zu verhindern, hat sich der Zusatz geringer Mengen an oberflächenaktiven Substanzen - wie Polysorbat - als hilfreich erwiesen (30, 27, 12, 18). Üblicherweise reichen bereits Konzentrationen im Bereich der kritischen Micellbildungskonzentration (cmc) aus, was bei Tween 80 einer Konzentration von ca. 0,01 % entspricht. Um eine Bindung dieser Hilfsstoffe an polare Gruppen des Proteins zu unterbinden, werden normalerweise nicht ionische Tenside eingesetzt. Gerade bei sehr hydrophoben Proteinen kann es dennoch zur direkten Interaktion und Destabilisierung des Proteins kommen, so dass in diesem Fall auf den Zusatz von Tensiden verzichtet werden muss. Ein weiteres Problem der Tenside sind die oft, als Verunreinigung, enthaltenen Peroxide, welche die Oxidation der Proteine fördern. Eine Aufreinigung der Tenside und der Zusatz von Antioxidantien (31), wie Methionin, oder die Begasung der Lösung mit Inertgas schafft hier Abhilfe und schützt gleichzeitig vor Luftoxidation.

Grundsätzlich muss bei jeder Proteinlösung – egal ob sie nun gefroren, getrocknet oder als Lösung auf den Markt kommt – das Puffersystem und der pH-Wert optimiert werden. Auch hier kann keine allgemeingültige Regel aufgestellt werden. Für jedes Protein existieren andere optimale Salz- und Pufferkombinationen und Konzentrationen. Auch in Bezug auf den pH-Wert unterscheiden sich die meisten Proteine, wenn auch für fast alle gilt, dass ihre Stabilität nur in einem sehr engen Bereich gewahrt werden kann. Dieser

Bereich kann im Sauren liegen, wie bei G-CSF, oder im Neutralen, wie bei Erythropoietin. Außerhalb dieses Bereiches kommt es zur Ausbildung geladener Gruppen, zu elektrostatischen Abstoßungen und zu falschen Salzbrücken (32), was zur Denaturierung der Proteine führt. Auch chemische Instabilitäten können durch den pH-Wert verstärkt werden, wobei hier gegensätzliche Effekte möglich sind. Ein niedriger pH-Wert reduziert zwar die Gefahr der Deamidierung, erhöht jedoch die Möglichkeit der Spaltung und Zyklisierung von Asp-X-Gruppen. Während ein pH-Wert von  $> 8$  Oxidation,  $\beta$ -Eliminierung, Hydrolyse, Razemisierung und Disulfidbrückenaustausch katalysiert (12). Neben der Beachtung aller chemischen und physikalischen Instabilitäten muss auch die Applizierbarkeit der Lösung im Auge behalten werden, da nicht jeder pH-Wert vom Patienten toleriert wird. Sowohl parenterale als auch pulmonale Lösungen sollten möglichst nahe am physiologischen pH-Wert von 7,4 liegen. Während bei intravenöser Applikation, aufgrund der schnellen Verdünnung, gewisse Abweichungen akzeptiert werden können, müssen intramuskulär oder subkutan zu verabreichende Lösungen isohydrisch sein. Meist stellt der im Produkt vorhandene pH-Wert einen Kompromiss zwischen Verträglichkeit und Lagerstabilität dar. Sollte der für die Lagerstabilität nötige pH-Wert jedoch zu weit vom physiologisch verträglichen pH-Wert entfernt sein, so muss das Produkt kurz vor Verwendung mit Pufferlösung an diesen angepasst werden.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, auf welchem Wege das Protein in den Körper gelangen soll. Von der FDA sind zur Zeit nur drei Applizierungswege zugelassen, zum einen die weitverbreitete parenterale und zum anderen die noch relativ neue pulmonale und nasale (bisher nur für Peptide) Verabreichung (12). Aufgrund ihrer schlechten Bioverfügbarkeit und ihrer Zerstörung durch Enzyme und Säure des Magens, können Proteine zur Zeit nicht oral eingenommen werden. Daran wird sich auch trotz diverser Untersuchungen zu oralen Applikationsformen in nächster Zeit nichts ändern (33, 34, 35, 36, 37, 38). Grundsätzlich wäre eine lokale, topische Anwendung oder nasale Verabreichung von Proteinen ebenfalls denkbar. Allerdings ergeben sich bei der systemischen Gabe größerer Moleküle über die Nase einige Probleme (17, 39, 40). Zum einen können nur sehr geringe Volumina, 25 –200  $\mu$ l, verabreicht werden, zum anderen weisen die Nasenschleimhäute eine hohe proteolytische Aktivität auf und sind mit Cilien ausgekleidet, welche jeden Fremdkörper sofort wieder hinaustransportieren. Des weiteren stellt die Nasenschleimhaut eine erhebliche Absorptionsbarriere dar, welche nur durch Zusatz von „permeation enhancer“ überwunden werden kann. Egal für welchen Applikationsweg man sich am Ende entscheidet, die grundsätzliche Frage nach der physikochemischen Stabilität der Proteine während der Lagerung, bis zur Verabreichung bleibt bestehen.

## 2. Stabilisierung von Proteinen mittels Trocknungsverfahren

Trocknen ist sicher eines der ältesten Verfahren zur Erhöhung der Lagerstabilität. Bereits unsere Vorfahren im Altertum nutzten sie um ihre Lebensmittelvorräte vor dem Verderb zu schützen und auch heute noch ist die Entfernung von Wasser die effektivste Methode zur Erhaltung der Proteinstabilität. Aufgrund des Einschlusses der Proteine in einer trockenen Hilfsstoffmatrix kommt es zur Proteinstabilisierung. Durch diese Immobilisierung der Proteine und der anderen Rezepturbestandteile werden alle Reaktionen derart verlangsamt, dass sie während der Lagerung praktisch nicht mehr auftreten (21, 41, 42, 43, 44). Entscheidend ist dabei eine amorphe Matrix mit möglichst hoher Glasübergangstemperatur. Amorph sollte die Matrix sein, um einen direkten Kontakt der Hilfsstoffmoleküle mit den Proteinen über Wasserstoffbrücken zu ermöglichen. Dies ist für die Stabilisierung entscheidend, wie unter A.2.2.4 näher erläutert werden wird. Die Glasübergangstemperatur ( $T_G$ ) bestimmt die Temperatur, unterhalb der alle Bewegungen extrem verlangsamt sind, so dass der Zeitrahmen molekularer Bewegungen ( $\tau$ ) weit über 100 Sekunden liegt (45). Oberhalb kommt es, aufgrund des größeren freien Volumens und des erhöhten Grades an Translationalen- und Rotationsfreiheitsgraden, zu einem schnellen Anstieg der Beweglichkeit, wodurch Denaturierung und chemische Reaktionen möglich werden (46). B.C. Hancock, S.L. Shablin und G. Zografi bemerkten jedoch, dass auch unterhalb des  $T_G$  je nach Probe noch merkliche Molekülbewegungen möglich sind (47). Der bis dato postulierte Zusammenhang zwischen physikalischer Stabilität und der Temperatur des Glasübergangs kann also nur als Anhaltswert dienen. Eine genauere Aussage lässt sich mit Hilfe der  $T_{mc}$ , der kritischen Temperatur ab welcher Lorentzian Relaxation auftritt, treffen (48, 21, 49). Diese oft auch  $T_0$ , „zero mobility temperature“ genannte Temperatur liegt etwas unterhalb des  $T_G$  und hängt neben der Restfeuchte davon ab, ob ein starker oder schwacher Glasbildner verwendet wurde (49). Schwache Glasbildner weisen einen geringen „fragility parameter  $D$ “ und damit eine kleinere Temperaturdifferenz zwischen  $T_G$  und  $T_0$  auf als starke Glasbildner. Zur Proteinstabilisierung eignen sich demnach besonders schwache Glasbildner, wie z.B. Trehalose oder Saccharose. Da  $T_0$  bedeutend komplizierter zu bestimmen ist, als die Glasübergangstemperatur  $T_G$ , wird diese üblicherweise auch weiterhin als Anhaltswert für die Stabilität einer Formulierung angesehen. Grundsätzlich sollten zur Bildung einer stabilisierenden Matrix Hilfsstoffe verwendet werden, welche Gläser mit möglichst hohem  $T_G$  bilden. Des Weiteren sollten alle Produkte mindestens 20 °C unterhalb der Glasübergangstemperatur gelagert werden (50).

Neben der Bildung einer festen Matrix hat auch der Entzug von Wasser eine stabilisierende Wirkung. Die meisten chemischen Reaktionen sind nur in Gegenwart von Wasser möglich und somit in getrockneten Produkten zumindest deutlich reduziert. Während Deamidierung und Hydrolyse in Lösungen eines der Hauptprobleme darstellen, spielen sie in getrockneten Proben nur eine untergeordnete Rolle (17). Oxidation tritt

zwar auch in trockenen Produkten auf, ihre Häufigkeit nimmt jedoch mit abnehmender Restfeuchte ab (51, 52).

Eine völlige Entfernung von Wasser ist dagegen nicht empfehlenswert, da auch zu geringe Feuchten Aggregation hervorrufen können. Um die native Faltung eines Proteins zu erhalten, bedarf es der Simulation der natürlichen wässrigen Umgebung. Obwohl die Hilfsstoffmatrix über Wasserstoffbrücken die meisten Bindungen mit dem Wasser ersetzen kann, ist eine minimale Hydrathülle in der Umgebung polarer Gruppen der Proteine dennoch erforderlich (53, 41, 43, 54, 55). Als generelle Richtlinie für die minimal benötigte Wassermenge wird oft die Ausbildung eines Monolayers um die Proteine angesehen (56, 44). Oberhalb dieser festgebundenen Menge Wasser, kommt es zur lockeren Adsorption, wodurch die Viskosität abnimmt, die Beweglichkeit der Reaktanten zunimmt und sich die allgemeine Reaktionsgeschwindigkeit – sei es von chemischen oder physikalischen Reaktionen – beschleunigt. Allerdings zeigten M.J. Pikal, M. Dellermann und M.L. Roy, dass dieser Effekt von der verwendeten Rezeptur abhängt. Bei manchen Formulierungen kam es, der Theorie entsprechend, erst oberhalb des BET-Monolayers zur Aggregation, bei anderen trat diese jedoch unabhängig vom Wassergehalt auf (52). Welches die optimale Restfeuchte ist, variiert also für jedes Protein und jede Formulierung und kann nicht verbindlich festgesetzt werden. Zum Beispiel war lyophilisiertes bFGF nur unterhalb von 2 % stabil (57), wohingegen BGG-Formulierungen bei 10 % eine höhere Stabilität aufwiesen als bei 1 % Restfeuchte (58). Häufig besitzt eine Proteinformulierung auch mehrere Restfeuchtenoptima (56, 44, 52, 58, 21, 59). In diesen Fällen spiegelt eine glockenförmige Kurve die Relation zwischen Restfeuchte und Aggregation wieder, was auch in Abb. 3 dargestellt ist.

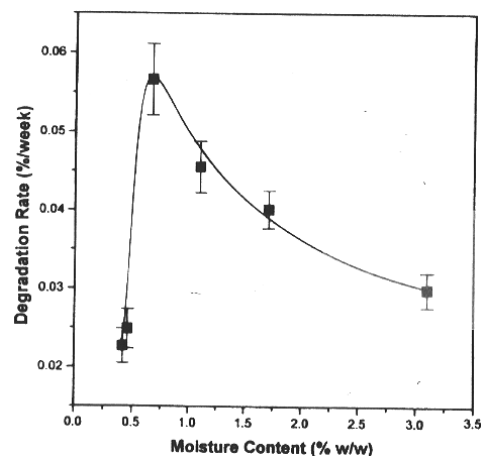


Abb. 3: Einfluss der Restfeuchte (Moisture Content) auf die Lagerstabilität von lyophilisiertem rhIL-1ra, dargestellt als Geschwindigkeit der Destabilisierung (Degradation Rate) bei 30 °C. (entnommen aus 59)

Unabhängig von der optimalen Restfeuchte gilt, dass Proteine in getrockneten Formulierungen grundsätzlich eine deutlich höhere thermische Stabilität aufweisen, als in Lösungen. Dieser besonders für die Lagerung wichtige Aspekt wird in Abb. 4, anhand des

Vergleiches der Thermostabilität von Chymotrypsin in Lösung und als Feststoff verdeutlicht. Auch aus Abb. 5 geht der Zusammenhang zwischen Proteinaggregation und steigender Produktfeuchte aufgrund erhöhter Luftfeuchte hervor. Die Aggregation von Insulin setzte erst ab einer relativen Luftfeuchte von 70 % und dem damit verbundenen Anstieg der Restfeuchte ein, während das Protein davor (bei konstanter Restfeuchte) sogar bei 50 °C Lagertemperatur stabil blieb.

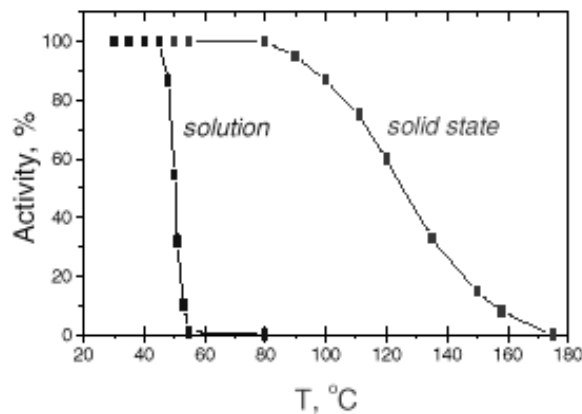


Abb. 4: Aktivität von Chymotrypsin in Lösung (solution) und als Feststoff (solid state) nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen für 90 Minuten. (entnommen aus 60)

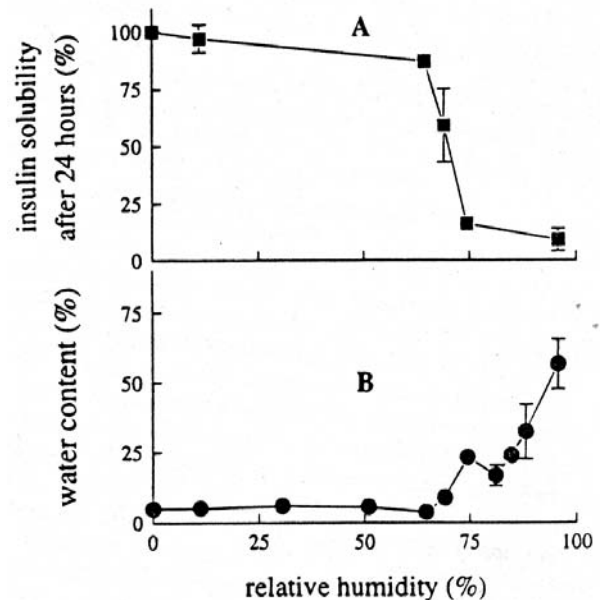


Abb. 5: Aggregation von lyophilisiertem, bovinen-Zn-Insulin in Abhängigkeit von der Luftfeuchte bei Lagerung bei 50 °C für 24 h. Oben: Löslichkeit von Insulin als Parameter für die Stabilität. Unten: Restfeuchte der Probe. (entnommen aus 61)

## 2.1. Trocknungsverfahren

Zur Trocknung bieten sich verschiedene Verfahren, die aus der Lebensmittel-, Chemie- oder Pharmaindustrie bekannt sind, an. Um zu entscheiden, welche sich wozu besonders eignen und welche zur Trocknung von Proteinen im Speziellen gewählt werden können, sollte man folgende Parameter bedenken (62): Wie sieht mein zu trocknendes Gut aus? Liegt es als Lösung, Suspension oder Paste vor? Welche Mengen will ich trocknen? Welche Spezifikationen soll mein Produkt aufweisen? Will ich eine fertig abgeteilte Einzeldosis herstellen, oder Bulkware? Muss mein Produkt unter aseptischen Bedingungen getrocknet werden und welche Restfeuchte darf es aufweisen? Sehr wichtig für die Wahl der Trocknungstechnik sind auch die tolerierbaren Prozessparameter. Verträgt meine Substanz hohe Temperaturen, Einfrierstress oder Druck? Und schließlich stellt sich noch die Frage, wieviel Zeit man für die Trocknung zur Verfügung hat und wie hoch demnach die Trocknungsgeschwindigkeit sein sollte.

Mit diesen Fragen im Hinterkopf betrachten wir zunächst die grundsätzlichen Möglichkeiten Wasser aus einer Probe zu entfernen. Prinzipiell muss dazu Wasserdampf erzeugt und aus der Probe abtransportiert werden. Aufgrund der physikalischen Grundgesetze bieten sich drei Möglichkeiten um Wasser in Wasserdampf zu verwandeln (Abb. 6): Erstens die Verdampfung bei Temperaturen oberhalb des Siedepunktes, zweitens die Verdunstung unterhalb des Siedepunktes, aber oberhalb des Tripelpunktes von Wasser und drittens die Sublimation aus Eis bei niedrigen Drücken. Üblicherweise werden die ersten beiden Varianten genutzt, wobei die Zweite deutlich produkt-schonender ist. Das letzte Prinzip findet nur bei der Gefriertrocknung Anwendung. Um den entstandenen Wasserdampf abzuführen, bieten sich wiederum mehrere Möglichkeiten an. Zum einen kann das über dem Gut befindliche Gas in Bewegung versetzt und aus der Trocknungszone entfernt werden. Dies ist möglich durch die Verwendung von Ventilatoren, durch Einblasen trockener Gase, bei gleichzeitiger Absaugung der wasserdampfgesättigten Luft oder durch Evakuierung der Kammer. Zum anderen kann dafür gesorgt werden, dass sich der Wasserdampf gezielt an einer Stelle abseits des Gutes niederschlägt, was durch Einsatz von Trockenmitteln oder eines Eiskondensators verwirklicht wird.

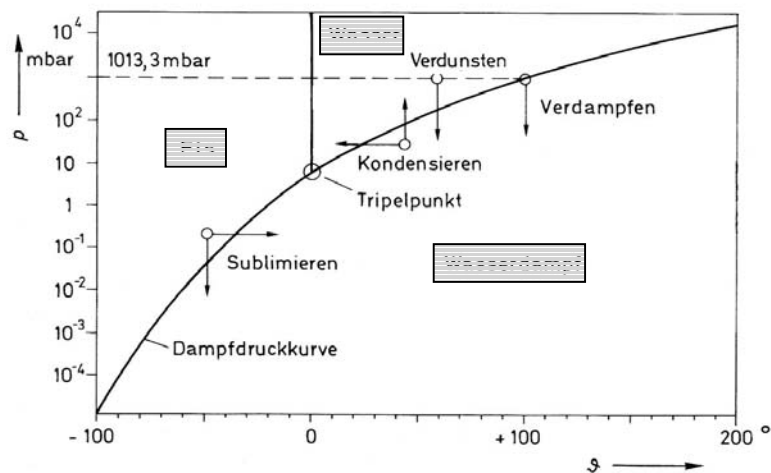


Abb. 6: Dreiphasendiagramm. Dargestellt sind verschiedene Möglichkeiten des Phasenübergangs.

Aus diesen Prinzipien geht hervor, wodurch die Geschwindigkeit einer Trocknung bestimmt wird und wie man sie effizienter gestalten kann. Je höher die Temperatur während der Trocknung ist und je höher damit der Energieeintrag in das System ist, um so mehr Wassermoleküle erlangen die Energie zum Wechsel der Phasengrenze und um so mehr Wasser geht in den Gaszustand über. Je größer außerdem das Partialdruckgefälle zwischen dem umgebenden Gasraum und dem Gasraum direkt im oder über dem Gut ist, um so schneller ist die Trocknung. Durch einen zügigen Abtransport des freigesetzten Wasserdampfes kann man ein hohes Partialdruckgefälle erreichen.

Im Folgenden werden einige Trocknungsvarianten dargestellt und ihre Verwendung für die Trocknung von Proteinen näher erläutert. Bereits 1946 teilte man die bekannten Geräte zur Trocknung in drei große Gruppen ein (22). Erstens die „Infrarot- und Mikrowellentrocknungsverfahren“, welche besonders in neuerer Zeit auch mit den anderen beiden Varianten kombiniert werden. Zweitens die „Direkten Trocknungsverfahren“, bei welchen der Wärmetransfer auf das Gut direkt durch den Kontakt mit heißem Trocknungsgas erfolgt und bei welchen der Wasserdampf durch das Trocknungsmedium abtransportiert wird. Zu diesen zählen z.B. die Konvektions- und Sprühtrocknung. Und drittens die „Indirekten Trocknungsverfahren“, bei welchen Wärme durch eine Wand auf das Gut übertragen wird und der Wasserdampf unabhängig vom erwärmenden Medium entfernt wird. Hierzu gehören die Kontakt-, Gefrier- und Vakuumtrocknung. Grundsätzlich ist jedes dieser drei Trocknungsverfahren sowohl zur kontinuierlichen Herstellung als auch zur Produktion eines Batches geeignet. Aufgrund der geringen Volumina von Proteindarreichungsformen und der hohen Anforderung an die Sterilität, kommt für Proteine allerdings nur die diskontinuierliche Herstellung einzelner Chargen in Frage. Ein weiteres grundsätzliches Unterscheidungskriterium ist die Bewegung des Gutes (22). Für Proteine sind sowohl Trocknungsverfahren, bei denen die zu trocknende Lösung statisch bleibt, wie Gefrier- oder Vakuumtrocknung, als auch Verfahren, bei denen es zur Durchmischung des Gutes kommt geeignet. Obwohl sich die Letzteren durch eine schnellere Trocknung, aufgrund der größeren Oberfläche, auszeichnen, sind hier ausführliche Vorversuche zur Scherstressempfindlichkeit der Proteine durchzuführen. Sprühtrocknung und Vibrations- oder Rotationsvakuumtrocknung gehören zu diesen Verfahren, die jedoch nicht für alle Proteine - oder nur nach Zusatz stabilisierender Hilfsstoffe - geeignet sind.

### 2.1.1. Trocknungsverfahren im Einzelnen

#### *2.1.1.1. Infrarot- oder Mikrowellentrocknung*

Die Trocknung mittels Infrarotstrahlung ( $\lambda > 760$  nm) ist wenig effektiv und wird nur im Labormaßstab verwendet. Dagegen findet der Einsatz von Mikrowellenstrahlung (915 – 2450 Mhz) als Wärmequelle immer weitere Verbreitung. Ihr Funktionsprinzip beruht darauf, dass Dipole des Wassers oder anderer polarer Moleküle durch ständig wechselnde Felder in Schwingung versetzt werden und sich hierdurch erwärmen. Die zur Verdunstung benötigte Wärme entsteht also direkt am Ort des Geschehens, wodurch eine sehr effektive (63) und meist auch gleichmäßige Wärmeverteilung, ohne Ausbildung heißer Punkte, gewährleistet wird (64). 1968 wurde diese Methode aufgrund der hohen Kosten der Ausrüstung, noch für unökonomisch und nur für Proben mit geringer Wasserbeladung und niedriger Trocknungsrate als realisierbar angesehen. Aufgrund des technischen Fortschrittes der letzten Jahre wird die Kombination der Mikrowellentechnik



mit anderen Standardverfahren inzwischen in einigen Veröffentlichungen als besonders schnelle und schonende Methode angesehen (65, 66, 64). Während dies für viele Chemikalien und niedermolekulare Arzneistoffe zutreffend ist, muss der Einsatz von Mikrowellenstrahlung zur Trocknung von Proteinen differenzierter betrachtet werden. Proteine enthalten ebenfalls Dipole und könnten eventuell durch die Strahlung so stark in Schwingung versetzt werden, dass es zur Entfaltung und Denaturierung kommen könnte. Tatsächlich wurde in einigen Veröffentlichungen die Zerstörung von Proteinen und die Forcierung der Maillardreaktion durch Mikrowellen beobachtet (67, 68, 69).

#### 2.1.1.2. *Kontakt-trocknung*

Die älteste und einfachste Methode zu Trocknen ist die Kontakt-trocknung. Dazu wird das zu trocknende Gut auf einem Träger ausgebreitet und erwärmt. Dieses Verfahren ist jedoch vorrangig für feuchte Feststoffe und nicht für Lösungen geeignet. Außerdem ist kein kontrollierter Abtransport des Wasserdampfes möglich, wodurch die Effektivität der Methode sehr gering ist. Bei den sogenannten Filmtrocknern („Thin-Film-Dryer“) konnte zwar, durch Ausnutzung der Schwerkraft und durch Einsatz von Förderwerkzeugen, die Verdunstungsstrecke und Durchmischung erhöht werden (62), dennoch findet diese Methode in der Proteintrocknung keine Verbreitung.

#### 2.1.1.3. *Konvektionstrocknung*

Wird die Luft über dem Gut in Bewegung versetzt, zum Abtransport des Wasserdampfes und gleichzeitig zur Übertragung der Verdunstungswärme genutzt, spricht man von Konvektionstrocknung. Dieses Verfahren findet in einem Trockenschrank mit Ventilator, aber auch in Trommel- oder Wirbelschichttrocknern ihre Anwendung. In der klassischen Ausführung dieser Trocknungsmethode werden große Mengen an feuchtem Gut auf einer teilweise porösen, gasdurchlässigen Unterlage aufgebracht und durch vorbeistreichende, bzw. durch das Gut hindurchstreichende warme Luft getrocknet. Eine Spezialanwendung stellt die Wirbelschichttrocknung dar, bei welcher das zu trocknende Gut von der eingeleiteten Luft aufgewirbelt wird. Hierdurch ist eine sehr gleichmäßige und rasche Wärmeübertragung ohne Bildung heißer Stellen, eine gute Durchmischung und schnelle Trocknung möglich (22). Allerdings sollte über die Rückgewinnung der eingeleiteten Luft nachgedacht werden, da das Verfahren aufgrund des Einsatzes großer Mengen erwärmter Luft aus Energie- und Umweltüberlegungen umstritten ist (70). Gerätetechnische Varianten der Konvektionstrocknung kommen bei der Trocknung von Pflanzen, Nahrungsmitteln und in der Papierindustrie zum Einsatz (22, 71, 72). Für die Trocknung von Proteinlösungen sind diese Geräte aufgrund ihrer Größe und der problematischen Sterilisation eigentlich ungeeignet. Außerdem können üblicherweise keine Lösungen, sondern nur feuchte Feststoffe getrocknet werden. Da das Trocknungsprinzip jedoch eine sehr effektive und schnelle Trocknung erwarten lässt, wird eine ähnliche Technik in dieser Arbeit zur Trocknung von Proteinen eingesetzt.

Die klassischen Verfahren zur Trocknung von Proteinen sind Gefrier- Vakuum- und Sprühtrocknung. Alle drei Verfahren stellen eine schonende Möglichkeit dar, thermosensitive Stoffe zu trocknen. Während durch die ersten Beiden feste, sterile Einzeldosen gebildet werden, erhält man durch Sprühtrocknung pulverförmige Bulkware. Neben einigen verfahrenstechnischen Vor- und Nachteilen wird es also vor allem von der geplanten Verwendung abhängen, für welche der Varianten man sich entscheidet.

#### *2.1.1.4. Sprühtrocknung*

Bei der Sprühtrocknung (73, 74) wird die Proteinlösung über verschiedenartige Düsen in viele winzige Tropfen in eine Trocknungskammer versprüht und durch erwärmtes Trocknungsgas im Gleich- oder Gegenstrom getrocknet. In einem nachgeschalteten Zyklon werden die trockenen Partikel vom Gas separiert und aufgefangen. Die entstandenen Partikel sind sphärisch, hohl, amorph und zeichnen sich durch eine enge Korngrößenverteilung und gute Fließeigenschaften aus. Nachteilig ist ihre hohe Hygroskopie, die Neigung zur Rekrystallisation und ihre geringe Dichte (75). Die Teilchengröße der Partikel lässt sich über den Verstäubungsdruck und die Viskosität der Lösung einstellen, was für eine pulmonale Verwendung der Produkte entscheidend ist.

Aufgrund der schonenden Herstellung großer Mengen leichtlöslicher Pulver fand die Sprühtrocknung schon früh weite Verbreitung zur Trocknung von Lebensmitteln, Chemikalien und seit den vierziger Jahren auch von pharmazeutischen Hilfsstoffen (74, 73). Des Weiteren wird die Technik bei der Herstellung von Pulvern zur inhalativen Anwendung, bei der Komplexbildung und Granulierung, sowie bei der Herstellung von PLA- und PLGA- Mikrokapseln verwendet (76, 77). Auch zur Trocknung von pharmazeutischen Hilfsstoffen, wie Lactose, sowie von hitzeempfindlichen Stoffen wird sie eingesetzt. Vor allem thermosensitive Stoffe, wie Proteine, profitieren von den kurzen Trocknungszeiten dieser Technik. Nur längstens 5 bis 30 Sekunden sind die Proben den Maximaltemperaturen ausgesetzt, während sie die restliche Zeit durch Verdunstungskälte vor höheren Temperaturen geschützt werden (78, 79, 75). Deshalb und aufgrund der für inhalative Anwendungen optimal geeigneten Partikelgröße der Produkte, finden sich in der Literatur in den letzten Jahren immer mehr Untersuchungen zur Sprühtrocknung von Proteinen.

Unproblematisch ist jedoch auch diese Technik nicht. Der direkte Kontakt mit großen Mengen an Luft, erfordert den Zusatz von Antioxidantien oder die Verwendung von Stickstoff als Trocknungsgas. Sehr oft kommt es, abhängig von den zugesetzten Hilfsstoffen und vom Verfahren, zur Aggregation der Proteine. Besonders die großen Flüssig-Gas-Grenzflächen führen zur Anreicherung der Proteine auf den Tropfenoberflächen und zur Denaturierung. Auch der beim Versprühen wirkende Scherstress, die verwendeten hohen Temperaturen und die Dehydratisierung können die Stabilität der Proteine negativ beeinflussen, wenn sie nicht durch Zusatz von Stabilisatoren ausgeglichen werden. Obwohl die Gaseinlasstemperatur meist nur für wenige Sekunden

im Produkt erreicht wird, kann diese Zeit aufgrund der extrem hohen Temperaturen (80 °C – 140 °C) ausreichen um die Proteine zu denaturieren. Da die Produkte nach der Trocknung zunächst als Bulk vorliegen, müssen sie vor Verwendung portioniert und abgepackt werden. Für Proteinarzneistoffe muss dies unter aseptischen Bedingungen erfolgen, was einen nicht unerheblichen Aufwand darstellt. Nicht zu vernachlässigen sind auch die Kosten des Verfahrens. Trotz der Weiterentwicklung der Geräte entstehen aufgrund des benötigten Equipments, der schlechten thermischen Effizienz des Verfahrens und der geringen Ausbeuten, welche vor allem in der Entwicklungsphase auftreten, noch immer hohe Kosten (80, 79, 75).

#### 2.1.1.5. *Gefriertrocknung*

Das in der Pharmaindustrie eingesetzte Standardverfahren stellt die Gefriertrocknung dar (81, 82). Alle auf dem Markt befindlichen Proteinarzneimittel in fester Form werden durch Gefriertrocknung hergestellt. Die Lyophilisation fand bereits im zweiten Weltkrieg zur Konservierung von Blutplasma erste industrielle Verbreitung. Ab den siebziger Jahren begann man die Geräte und das Verfahren zu vereinfachen und zur Trocknung von größeren Mengen an Lebensmitteln einzusetzen (71). Aus derselben Zeit stammen auch die ersten Veröffentlichungen zu Methoden der Sterilisation von Gefriertrocknern.

Das Verfahren der Gefriertrocknung gliedert sich in drei Schritte (83, 19, 84, 21). Es beginnt mit dem Einfrieren der Proteinlösung, gefolgt von der Haupttrocknung, welche unter Vakuum bei niedrigen Temperaturen erfolgt, und schließt mit der Nachtrocknung bei Temperaturen oberhalb von 0 °C. Die Entfernung des Wassers erfolgt während der Haupttrocknung durch Sublimation des Eises und während der Nachtrocknung durch Verdunstung. Der entstandene Wasserdampf wird aus dem Probenraum durch Resublimation an einem Eiskondensator abgeleitet.

Dieses Trocknungsprinzip wird durch viele Faktoren beeinflusst. Zu nennen seien hier nur die Einfriergeschwindigkeit, welche die Größe der Eiskristalle und damit den Sublimationswiderstand bestimmen, die Einfriertemperatur, welche von der eutektischen Temperatur der Rezeptur abhängt, die Bedingungen (Temperatur und Vakuum) bei der Haupt- und Nachtrocknung, die Art des Primärpackmittels (Vial-, Stopfenform) und natürlich die Zusammensetzung und das Volumen der zu trocknenden Lösung. Um möglichst kurze Prozesszeiten, aber dennoch stabile Produkte zu erhalten, muss jeder dieser Parameter optimiert und an die jeweilige Rezeptur angepasst werden. Aufgrund der intensiven Forschung in den letzten 10 Jahren sind viele Einflussfaktoren auf die Trocknung und Stabilität der Produkte bekannt und können gezielt beeinflusst werden, aber oft bedarf es dennoch des „Trial and Error Prinzips“.

Mittels Gefriertrocknung hergestellte Produkte zeichnen sich durch eine geringe Dichte und hohe Porosität aus. Aufgrund ihrer Porosität und ihres zumeist voll- oder teilamorphen Zustandes können sie bei Wasserzugabe extrem schnell rekonstituiert werden. Gewöhnlich weisen die entstandenen, sehr gleichmäßigen Produkte bei

Raumtemperatur eine lange Lagerdauer auf (20). Aufgrund der schonenden Trocknung bei niedrigen Temperaturen und der Möglichkeit aseptisch zu arbeiten eignet sich das Verfahren besonders zur Trocknung empfindlicher Proteine. Inzwischen ist nicht nur die Gefriertrocknung von Einzeldosen in Vials oder Fläschchen möglich, sondern auch die sterile Herstellung von Zweikammersystemen, welche gleichzeitig das lyophilisierte Produkt und das Wasser zur Rekonstitution enthalten (Vetter Lyo-Ject<sup>®</sup>). Eine Vereinzelnung der Dosis vor dem Trocknungsschritt wird vor allem von der pharmazeutischen Industrie angewandt, während die Lebensmittelindustrie auch die Technik der Bulklyophilisation und der kontinuierlichen Gefriertrocknung nutzt. Durch den immer intensiver erforschten Einsatz von Proteinaerosolen zur pulmonalen Anwendung wird vermutlich der Bedarf an stabilen, pulmonal applizierbaren Proteinpartikeln in Zukunft steigen. Als Alternative zur Sprühtrocknung könnte die Gefriertrocknung zusammen mit einem nachträglichen Mahlschritt auch auf diesem Gebiet ihre Anwendung finden.

Trotz seiner weiten Verbreitung birgt auch dieses Trocknungsverfahren einige Nachteile. Im Vergleich zu allen bisher vorgestellten Techniken stellt die Gefriertrocknung zwar das schonendste, aber auch mit Abstand langsamste Verfahren dar. Übliche Lyophilisationsprozesse dauern zwischen einem Tag und einer Woche. Außerdem handelt es sich um ein extrem energie- und kostenintensives Verfahren (85, 20). Die Entwicklung eines geeigneten Lyophilisationsprogrammes und die Optimierung der Rezeptur stellen keine Routineaufgaben dar, sondern verlangen viel Erfahrung. Wenn bisher von einer schonenden Technik die Rede war, so stimmt dies nur in Bezug auf die bei der Haupt- und Nach Trocknung verwendeten, niedrigen Temperaturen, während der Einfriervorgang einen ganz erheblichen Stressfaktor für Proteine darstellt. Hierbei kann es durch Eiskristalle, Aufkonzentrierungseffekte, Erhöhung der Ionenstärke, Phasentrennung, Änderungen des pH-Wertes - hervorgerufen durch die Auskristallisation von Pufferbestandteilen - oder durch die niedrigen Temperaturen selbst (Cold denaturation) zur Denaturierung der Proteine kommen. Auch der anschließende Dehydratisierungsschritt stellt einen Stressfaktor dar, der jedoch nicht spezifisch auf die Gefriertrocknung beschränkt ist, sondern bei allen Trocknungsvarianten beachtet werden muss. Durch Zusatz geeigneter Hilfsstoffe (siehe A.I.1.1) können die meisten Proteine vor beiden Stressfaktoren geschützt werden.

#### *2.1.1.6. Vakuumtrocknung*

Die Vakuumtrocknung bietet sich als Alternative zur Lyophilisation an, wenn eine Umgehung des Einfriervorgangs gewünscht ist. Bei der Vakuumtrocknung erfolgt die Trocknung aus Lösung oberhalb des Gefrierpunktes von Wasser, meist bei Temperaturen zwischen 10 oder 50 °C. Übliche Prozesszeiten betragen allerdings auch bei dieser Trocknungsvariante einen bis zwei Tage. Während bei klassischen Vakuumtrockenschritten die zur Verdunstung nötige Energie über die Stellfläche zugeführt wird, nutzen

moderne Geräte Mikrowellen- (86, 87, 88, 89) oder Infrarotstrahlung (IR-Dancer von Hettich-Zentrifugen). Ein großes Problem der Vakuumtrocknung stellt das Auftreten von Siedeverzügen dar, da im Gegensatz zur Gefriertrocknung die Proben beim Anlegen des Vakuums nicht gefroren vorliegen. Dies versucht man durch extrem langsame Absenkung des Druckes oder durch Durchführung der Vakuumtrocknung in einer Zentrifuge (Rotationsvakuumkonzentrator von Christ) zu vermeiden. Die auf die Probe einwirkenden Zentrifugalkräfte wirken dabei dem Dampfdruck entgegen und verhindern einen Siedeverzug bei geringen Drücken. Ein weiterer Nachteil der Vakuumtrocknung sind die kompakten Strukturen der Produkte. Während der Trocknung kommt es zu einer fortschreitenden Aufkonzentrierung der Lösung, bis diese schließlich amorph erstarrt. Aus diesen erstarrten, sehr kompakten Produkten kann eingeschlossenes Wasser nur schwer entweichen, wodurch die Restfeuchte von vakuumgetrockneten Proben zumeist deutlich über der von gefriergetrockneten Proben liegt. In Abb. 7 wird dieses Phänomen anhand der Daten von Miller et al. (90) verdeutlicht. Vakuumgetrocknete Proben wiesen aufgrund einer Restfeuchte von 8 % bis 10 % einen um 90 °C niedrigeren Glasübergang auf als gefriergetrocknete Proben. Bei Anwesenheit zusätzlicher Plastiziser, wie z.B. Glycerol, ist es teilweise überhaupt nicht mehr möglich feste Produkte mittels Vakuumtrocknung zu bilden (91, 92, 93). Zur Auflockerung der Proben während der Trocknung wurden bereits früh sogenannte „Vakuum tumble dryers“ (Vakuumtaumeltrockner, 22, 94) eingeführt. Eine neuere Variante stellt der IR-Dancer von Hettich-Zentrifugen dar, bei welchem die Proben auf einer Platte aufgestellt werden, welche programmierbare, unterschiedlich starke Schüttelbewegungen ausführt. Hierdurch werden die Proben während der Trocknung aufgelockert und eingeschlossenes Wasser kann entweichen. Allerdings ist es möglich, dass der durch die Schüttelbewegungen verursachte Scherstress zur Aggregation der Proben führt. Neben dem Einsatz der Schüttelbewegungen (Abb. 7) kann auch der Zusatz schwerlöslicher Stoffe zu den Rezepturen deutliche Verbesserungen erzielen. Die zu Beginn der Trocknung ausfallenden, schwerlöslichen Zusätze bilden ein Kristallgerüst, auf dem sich die restlichen Rezepturbestandteile ablagern. Hierdurch entsteht ein poröses Produkt, welches gut trocknet (95, 96).

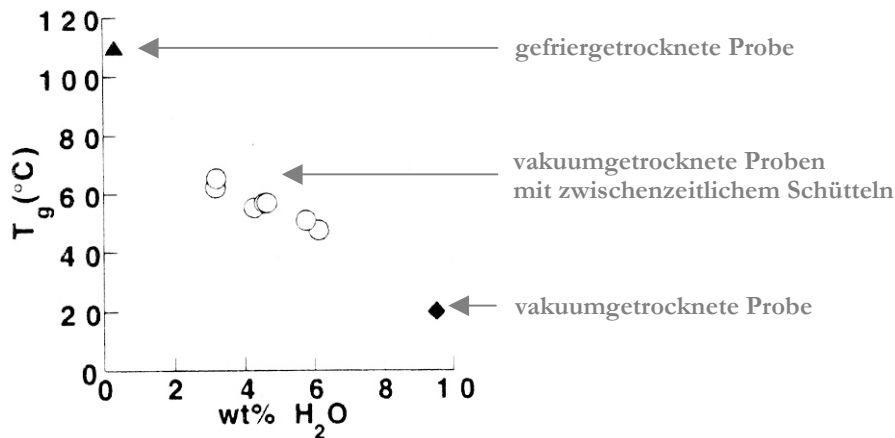


Abb. 7: Glasübergänge ( $T_g$ ) von Trehalose/Na Tetraborat/Tris/LDH-Mischung, welche auf verschiedene Weisen getrocknet wurden. Vakuumgetrocknete Proben wiesen eine deutlich höhere Restfeuchte (8-10 %) und damit einen deutlich niedrigeren  $T_G$  auf. (aus 90)

Noch findet die Vakuumtrocknung keine industrielle Verwendung in der Herstellung von Proteinanzemitteln. In der Lebensmittelherstellung findet man jedoch einige Anwendungen, so z.B. die Produktion von Proteintabletten zur Nahrungsergänzung (97) oder die Trocknung von Peperoni (98). Auch in der pharmazeutisch-biologischen Forschung wird die Vakuumtrocknung gelegentlich zur Untersuchung von Trocknungsstress und dem Einfluss von Stabilisatoren genutzt (90, 91, 92, 93, 99, 100, 101, 102, 103). Teilweise kommt es dabei zu ungewöhnlichen Kombinationen mehrerer Trocknungsmethoden, so z.B. bei Crowe et al., welcher an eine mehrere Tage dauernde Dehydratisierung mittels  $\text{CaSO}_4$ , eine 2 - 3 stündige Trocknung bei 125 –130 °C und eine 24 stündige Vakuumtrocknung anschloss. Wie auch in diesem Fall lassen sich aus den veröffentlichten Daten nur sehr selten direkte Aussagen zum Einfluss der Vakuumtrocknung im Vergleich zu anderen Methoden treffen. Meist wird die Vakuumtrocknung nur als Mittel zum Zweck, z.B. zur Erforschung von Hilfsstoffen, eingesetzt und nicht selber untersucht. Selbst wenn in einer Arbeit verschiedene Trocknungsverfahren parallel verwendet werden, findet sich selten ein direkter Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Methoden. So auch bei P.B. Conrad et al. (104), welcher zwar in einer Tabelle den Verlust an lebenden Zellen beim Einfrieren/Auftauen, Vakuumtrocknen und Lyophilisieren nebeneinander stellte, jedoch nicht auf die Ursachen der erheblichen Unterschiede der zwei Trocknungsmethoden einging. Abhängig vom pH-Wert wiesen in dieser Veröffentlichung Gefrier- und Vakuumtrocknung sehr verschiedene Ergebnisse auf. Während im Säuren mittels Vakuumtrocknung 82 % der Zellen verloren wurden, trat bei Lyophilisation nur ein Verlust von 28 % auf. Im Basischen lieferten beide Methoden in etwa gleich schlechte Ergebnisse (92 % bzw. 83 % Verlust).

### 2.1.1.7. *Andere Verfahren*

Des Weiteren gibt es noch einige andere Methoden um trockene, feste Proteinproben herzustellen. Diese befinden sich jedoch alle noch in Erforschung und es bleibt abzuwarten, inwiefern und wofür sie sich eignen werden. Zu nennen seien hier nur die Trocknung mit superkritischen Gasen (105), welche bisher vielversprechende Ergebnisse lieferte, die gezielte Kristallisation von Proteinen (106), welche vielseitige Anwendung bietet, aber bei einigen Proteinen zur vollständigen Denaturierung führt, und die Sprühgefriertrocknung (107, 109), bei der abzuwarten ist, ob sie sich gegen die gerätetechnisch weniger aufwendige Sprühtrocknung oder die Gefriertrocknung mit nachgeschaltetem Mahlschritt durchsetzen wird.

## 2.2. *Stabilisierung in trockenen Matrices*

Zumeist lässt sich die Stabilität von Proteinen durch Trocknung erhöhen, dennoch bedarf es einiger Vorkehrungen um zu verhindern, dass die Trocknung selber zur Denaturierung der Proteine führt. In diesem Absatz wird näher darauf eingegangen, welche Faktoren destabilisierend, bzw. stabilisierend auf die Proteine bei der Trocknung und während der Lagerung einwirken. Je nach Trocknungstechnik treten dabei sehr unterschiedliche Stressfaktoren auf. Bei der Gefriertrocknung (21) kommt es, neben dem bei allen Techniken auftretenden Dehydratisierungsstress, noch zum Einfrierstress, während Proteine bei der Sprühtrocknung zusätzlichem Scher- und Oberflächenstress ausgesetzt sind.

### 2.2.1. *Einfrierstress und Einfluss des pH-Wertes*

Eine Denaturierung der Proteine beim Einfrieren wird durch die niedrigen Temperaturen (siehe „Cold denaturation“ A.1.3), durch die Anlagerung der Proteine an der Eis/Wasser-Grenzfläche (110) und durch alle Veränderungen der Rezeptur beim Einfrieren hervorgerufen. Während des Abkühlens der Probe kommt es zunächst zur Phasentrennung. Wasser kristallisiert als Eis aus, während die anderen Bestandteile der Rezeptur in Lösung bleiben, sich aufkonzentrieren und nach und nach ebenfalls auskristallisieren, bzw. ab Erreichen der eutektischen Temperatur zusammen erstarren. Hierdurch kann es zu großen pH-Verschiebungen kommen. Phosphatpuffer weisen einen signifikanten Abfall von fast vier pH-Einheiten während der Trocknung auf (111, 85), da  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  früher ausfällt als  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,5 bei 20 °C, pH 3,8 bei – 25 °C). Umgekehrt kann es bei Verwendung von Acetatpuffern zur Erhöhung des pH-Wertes durch die Verdunstung von Essigsäure während der Trocknungsphase kommen. Solche pH-Veränderungen können nicht nur während der Trocknung zur Destabilisierung der

Proteine führen, sondern auch während der Lagerung (Abb. 8), da sie den pH-Wert der Mikroumgebung der immobilisierten Proteine bestimmen (112, 113).

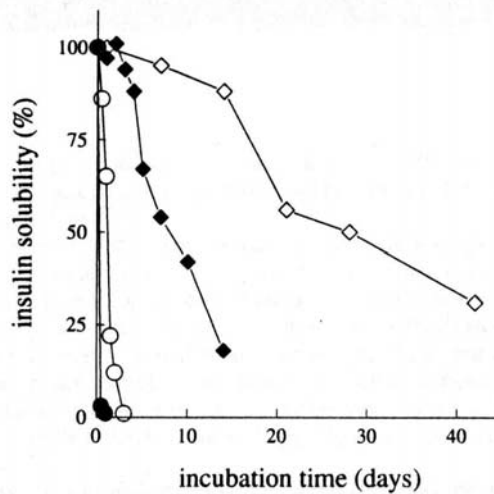


Abb. 8: Abhängigkeit der Aggregation von lyophilisiertem Insulin vom pH-Wert der Lösung vor der Gefriertrocknung. Alle Proben wurden bei 50 °C und 96 % relative Feuchte eingelagert. ◇ pH 7,3 ◆ pH 8,0 ○ pH 9,0 ● pH 10,0. (entnommen aus 61)

### 2.2.2. Aufkonzentrierung

Ein weiterer bei allen Trocknungstechniken vorkommender Stressfaktor ist die Aufkonzentrierung. Diese tritt bei der Gefriertrocknung in der Einfrierphase und bei allen anderen Varianten während der Trocknungsphase auf. Die Aufkonzentrierung kann dabei ganz erhebliche Ausmaße erreichen. Kleine Kohlenhydrate können z.B. eine errechnete Konzentration in Lösung von bis zu 80 % erreichen (114), und auch beim Einfrieren von 0,9 %iger Kochsalzlösung kommt es bis zum Erreichen des eutektischen Gefrierpunktes zu einer Erhöhung der Salzkonzentration um das 24 fache. Aufgrund von Aufkonzentrierung und selektiver Kristallisation entstehen veränderte Rezepturen in Bezug auf Ionenstärke oder Hilfsstoff-Wirkstoff-Verhältnis, wodurch es zur Denaturierung oder chemischen Destabilisierung der Proteine kommen kann. Chemische Reaktionen verlaufen mit zunehmender Konzentration der Reaktanten schneller ab, allerdings verlangsamen sie sich mit zunehmender Aufkonzentrierung aufgrund der Erhöhung der Viskosität wieder (115). Nicht immer muss sich eine höhere Hilfsstoffkonzentration negativ auf die Proteinstabilität auswirken. Besonders dann, wenn es nicht zu unkontrollierter Kristallisation und Phasenveränderung kommt, kann eine hohe Konzentration auch stabilisierend wirken.

Carpenter et al. konnten 1987 einen Einfluss der Zuckerkonzentration auf die nach der Trocknung erhaltene Aktivität von Phosphofruktokinase feststellen (116). Je höher die eingesetzte Zuckerkonzentration war, desto mehr Aktivität erlangte das Protein nach Rekonstitution der trockenen Probe zurück (Abb. 9). Kristallisierten die eingesetzten Zucker jedoch während der Trocknung aus, ließ der stabilisierende Einfluss drastisch



nach. Anhand von schlechtlöslicher Lactose wird dieser Effekt in der rechten Graphik verdeutlicht.

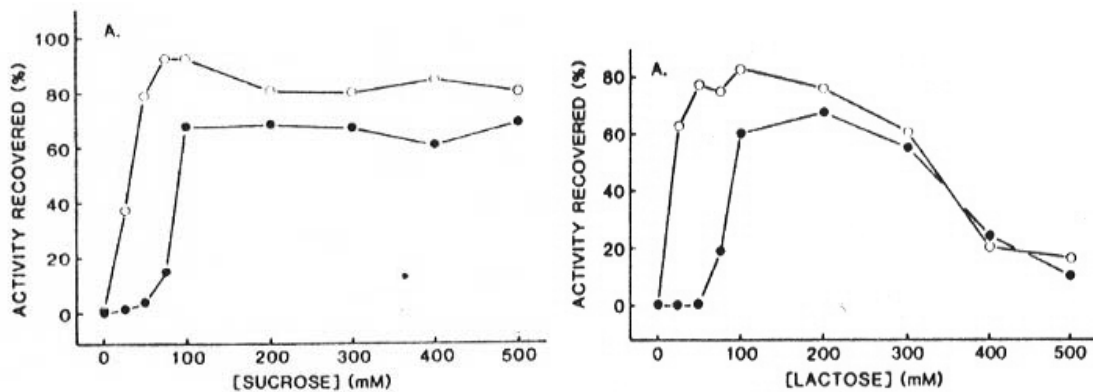


Abb. 9: Einfluss der Zuckerkonzentration auf die Proteinaktivität. Mit steigender Zuckerkonzentration steigt die Stabilität von Phosphofruktokinase an, solange bis es zur Kristallisation des Zuckers kommt (Abfall bei Lactose). ○ mit 0,6 mmol Zink, ● Zucker allein, A: Schnelle Luft-Trocknung. (aus 116)

Wie stark der stabilisierende Einfluss war, und ab welcher Konzentration er durch Auskristallisation nachließ, hängt von den verwendeten Zuckern und der eingesetzten Methode ab. Während Lactose in diesen Versuchen (Abb. 9) eine maximale Stabilisierung bei 100 mM erreichte und bereits ab 300 mM eine nachlassende Wirkung aufwies, blieb bei Saccharose der stabilisierende Effekt bis mindestens 500 mM erhalten. Zum Ausgleich verschiedener Stressfaktoren werden verschiedene Mengen an Zucker benötigt. Während Carpenter et al. durch „air-drying“ 68 % der Aktivität der Phosphofruktokinase wiedergewinnen konnten (Abb. 9 rechts), wurde von Carpenter et Crowe nach Gefriertrocknung nur noch 40 % Aktivität wiedergefunden, trotz Zusatz von 100 mM Lactose in beiden Fällen (Abb. 10 rechts). Diese Ergebnisse verdeutlichen das Stabilisierungspotential verschiedener Zucker in Abhängigkeit vom Trocknungsverfahren, sowie die Überlegenheit von Trocknungsmethoden bei denen kein zusätzlicher Einfrierstress ausgeübt wird. Um den durch Einfrier-Auftau-Zyklen verursachten Stress durch „Preferential Exclusion“ auszugleichen, bedarf es ungleich höherer Zuckerkonzentrationen, als zur Behebung der durch Dehydratation verursachten Instabilitäten mittels „Water Replacement“ (Abb. 10, siehe auch 2.2.4) (117, 118, 119, 120, 59).

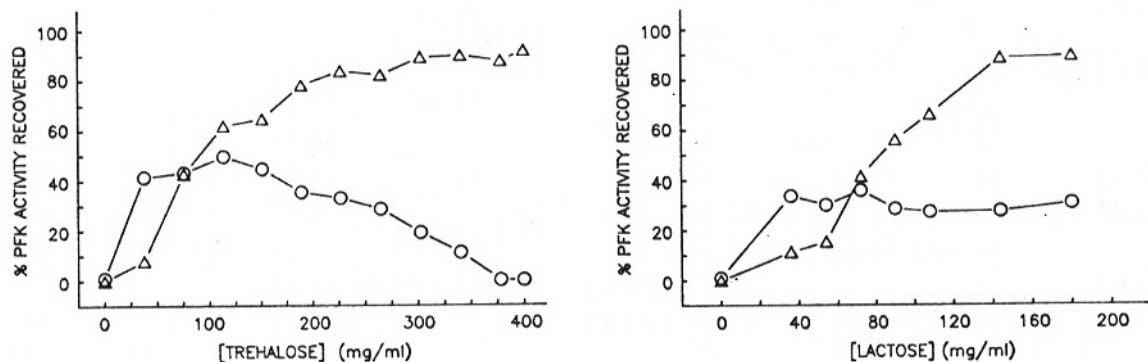


Abb. 10: Einfluss der Zuckerkonzentration auf die Stabilität von Phosphofruktokinase nach Einfrieren/Auftauen (△) und Gefriertrocknung (○). (entnommen aus 118)

Während der Trocknung kommt es nicht nur zur Aufkonzentrierung der Zucker, sondern auch zur Aufkonzentrierung der eingesetzten Proteine. Aus dem Review von W. Wang geht hervor, dass höherkonzentrierte Proteine in Lösungen zur Aggregation neigen (21). Andererseits ist aus zahlreichen Untersuchungen bekannt, dass höhere Proteinkonzentrationen beim Trocknen und Einfrieren/Auftauen förderlich sind (121, 122, 123, 124, 116, 125, 21). Höhere Konzentrationen ermöglichten die Wiedererlangung von höheren Enzymaktivitäten (siehe auch Abb. 11, Abb. 12) und verhinderten die Auskristallisation der Zucker (124). Nach Alison et al. lag die konzentrationsabhängige Stabilisierung beim Einfrieren entweder an einer sterischen Behinderung der Nachbarmoleküle, oder an der prozentual verringerten Proteinmenge, welche an der Wasser-Eis-Grenzfläche angelagert und denaturiert wurde (126, 21). Zumindest die erste Hypothese dürfte auch auf Trocknungsmethoden, welche nicht von Einfrierprozessen begleitet werden, zutreffen.

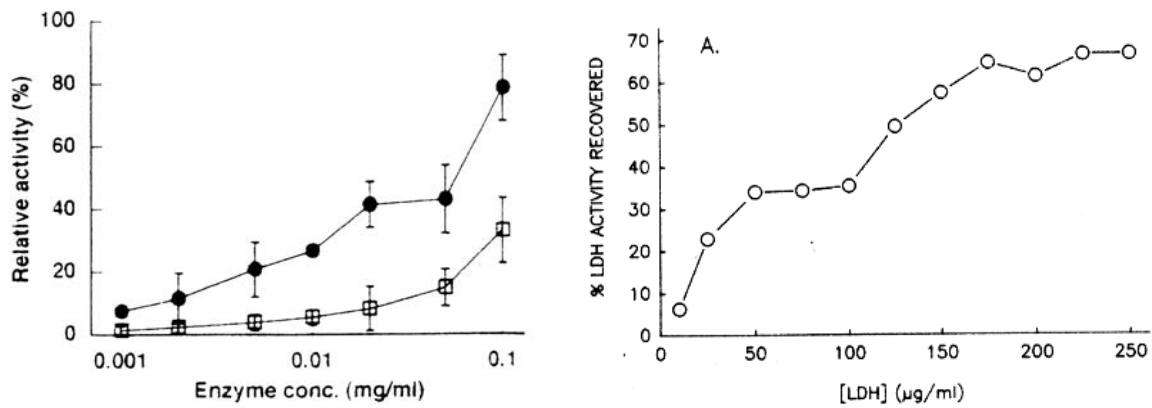


Abb. 11: Einfluss der Enzymkonzentration auf die Stabilität von LDH. Links nach Einfrieren/Auftauen (□) und Gefriertrocknung (●). Rechts nach Einfrieren/Auftauen (○). (links: Entnommen aus 121, rechts: Entnommen aus 122)

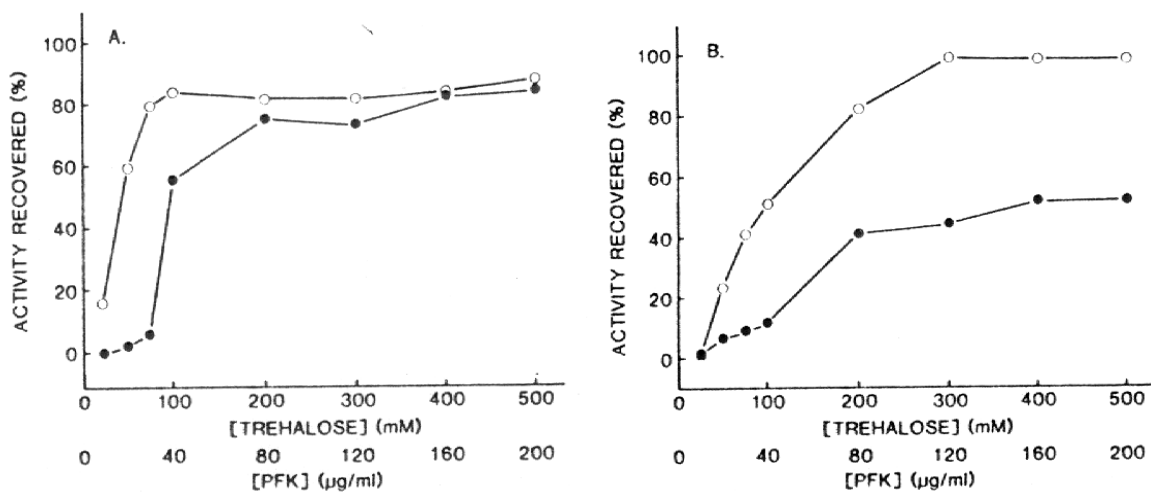


Abb. 12: Einfluss der Protein-Zucker-Konzentration auf die Proteinstabilität. Bei gleichbleibendem Massenverhältnis zwischen Zucker und Protein (Phosphofruktokinase) erhöht sich die Proteinstabilität mit zunehmenden Konzentrationen. ○ Zucker + 0,6 mmol Zink, ● Zucker allein. Links (A): Schnelle Trocknung. Rechts (B): Langsame Trocknung. (entnommen aus 116)

Zunehmende Konzentrationen an Zucker und an Protein ermöglichen also die Wiedererlangung einer höheren Proteinstabilität nach Trocknung. Carpenter et al. (116) zeigten, dass bei gleichbleibendem Massenverhältnis die Lösung mit der höchsten Konzentration an Zucker und Protein das Produkt mit der höchsten Stabilität bildete (Abb. 12). Ebenfalls aus dieser Untersuchung ging hervor, dass die Geschwindigkeit der Trocknung einen enormen Einfluss hatte. Die schnellere Trocknung lieferte dabei die stabileren Produkte. Die Erkenntnis, dass sich ein schneller Wasserentzug positiv auf die Proteinstabilität auswirken kann, war besonders für die hier vorgelegte Arbeit entscheidend, da von uns eine noch schnellere Trocknungsmethode untersucht wurde. Besonders interessant waren in diesem Zusammenhang auch die Ergebnisse von W.F. Wolkers et al., welcher 1998 zeigen konnte, dass die native Struktur von Lysin bei besonders schneller Lufttrocknung bereits ohne Zusatz eines Stabilisators erhalten werden konnte (127), während es mit abnehmender Trocknungsgeschwindigkeit zur Zunahme an  $\beta$ -Faltblattstrukturen und damit zur Denaturierung kam (Abb. 13).

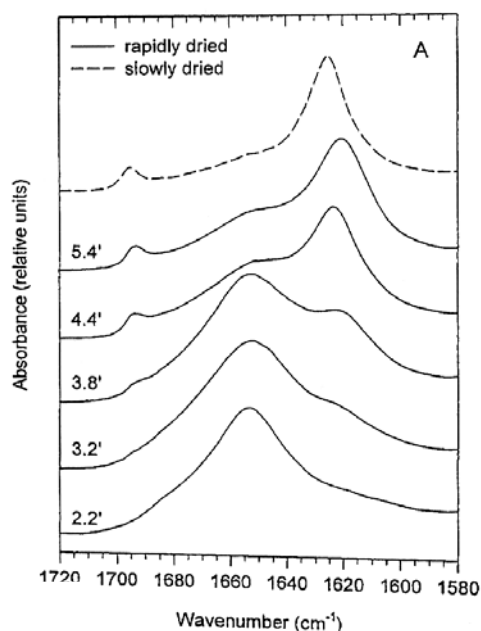


Abb. 13: FTIR-Absorptionsspektren von langsam und schnell getrockneten Tropfen aus Poly-L-Lysin-Lösung (Tris-Puffer + NaCl). Von unten nach oben nimmt die Trocknungsgeschwindigkeit aufgrund zunehmender Tropfengröße (5 – 25  $\mu$ l) ab. Die Zahlen links geben die Trocknungszeit in Minuten an. Der Peak bei 1660  $\text{cm}^{-1}$  repräsentiert nativ gefaltetes Protein, während die Peaks bei 1700 und 1630  $\text{cm}^{-1}$  auf  $\beta$ -Faltblattstrukturen hinweisen. (entnommen aus 127)

Hohe Konzentrationen an Zucker und Protein wirken sich demnach positiv auf die Stabilität von Proteinen aus. Bei der Gefriertrocknung müssen diese Konzentrationen direkt eingesetzt werden, da es während der Trocknung zu keiner weiteren Aufkonzentrierung kommt. Evaporative Trocknungstechniken, wie die Vakuum- oder Warmlufttrocknung, konzentrieren die Proben dagegen ununterbrochen weiter auf, so dass hier geringere Anfangskonzentrationen den gleichen Effekt erzielen können.

### 2.2.3. *Dehydratisierung*

Außerdem kann auch die Dehydratisierung zur Destabilisierung der Proteine führen. Wie bereits unter A.I.1. erläutert wurde, ist jedes native, vollständig hydratisierte Protein mindestens von einem Monolayer Wasser umgeben (128). In einer wasserarmen Umgebung tendieren Proteine dazu Protonen auf ionisierte Carboxylgruppen auf der Außenseite zu übertragen, um die Anzahl hydrophiler, geladener Gruppen zu verringern (128). Diese reduzierte Ladungsdichte kann zu hydrophoben, intermolekularen Protein-Protein Interaktionen und damit zur Aggregation führen. Des Weiteren können Wassermoleküle einen integralen Bestandteil bioaktiver Gruppen eines Proteins darstellen (129), so dass es bei deren Entzug zum vollständigen Verlust der biologischen Aktivität kommen kann.

### 2.2.4. *Hilfsstoffe zur Stabilisierung beim Trocknen*

Durch Hinzufügen von Hilfsstoffen lassen sich die meisten der oben genannten Probleme beheben. Der Zusatz von oberflächenaktiven Substanzen, wie Polysorbat, verhindert die Adsorption der Proteine an Grenzflächen, seien es Wasser/Eis- oder Wasser/Gas-Grenzflächen, effektiv. Gegen Einfrierstress helfen sogenannte „Cryoprotektoren“ und auch die bei der Dehydratisierung auftretende Aggregation kann durch ähnliche Stoffe (teilweise „Lyoprotektoren“ genannt) abgewendet werden.

Bei Cryoprotektoren handelt es sich überwiegend um Zucker, Polyole oder Aminosäuren, welche über den Mechanismus der „Preferential Exclusion“ stabilisierend wirken (130, 131, 132, 133, 134). In Gegenwart solcher Hilfsstoffe halten sich überproportional mehr Wassermoleküle als Hilfsstoffmoleküle in der Umgebung eines Proteins auf, da diese thermodynamisch aus der Umgebung des Proteins ausgeschlossen werden (Preferential Exclusion).

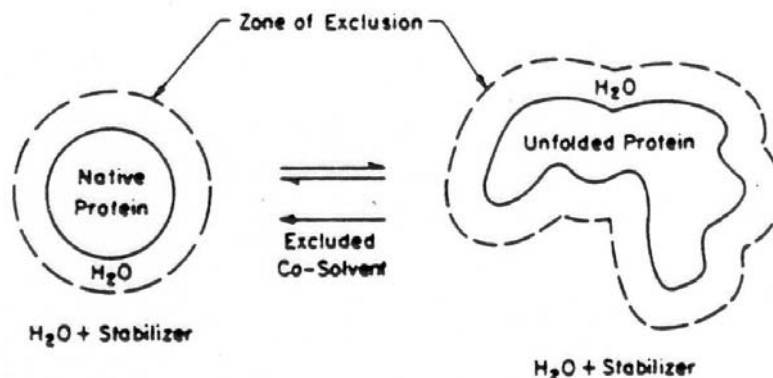


Abb. 14: Prinzip der Stabilisierung mittels „Preferential Exclusion“ (entnommen aus 54)

Da ein denaturiertes Protein eine deutlich größere Oberfläche aufweist als ein natives Protein, muss in diesem Fall mehr Hilfsstoff aus der Proteinumgebung ausgeschlossen werden (Abb. 14), was energetisch ungünstiger ist als der Ausschluss aus der Umgebung eines nativen Proteins. Die Stabilisierung der Proteine resultiert demnach eigentlich aus

der Destabilisierung des denaturierten Zustandes. Abb. 15 macht deutlich, dass durch Zusatz von Hilfsstoffen zwar ein im Vergleich zu reiner Proteinlösung minimal ungünstigerer Energiezustand herbeigeführt wird, dass in diesem Fall der denaturierte Zustand des Proteins jedoch überproportional stärker destabilisiert wird und das Protein somit in den nativen Zustand gezwungen wird (135, 136, 137, 138, 139).

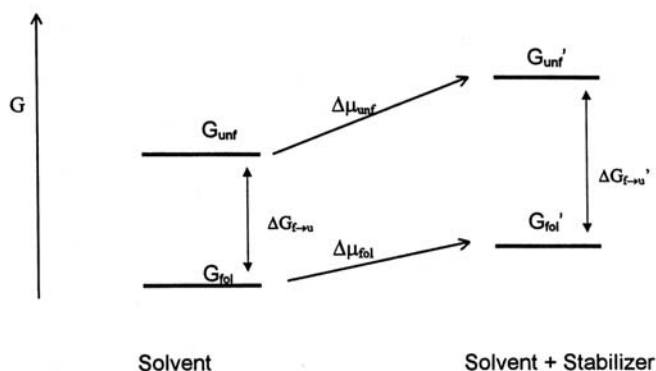


Abb. 15: Darstellung der Änderung der freien Energie  $G$  in Gegenwart von Stabilisatoren, welche bevorzugt aus der Umgebung eines Proteins ausgeschlossen werden (Pref. Exclusion). (entnommen aus 18)

Die für diese Arbeit wichtige Stabilisierung der Proteine im dehydrierten Zustand erfolgt über zwei verschiedene Mechanismen, welche sich gegenseitig ergänzen. Zum einen über den Einschluss der Proteine in eine amorphe Matrix, welche alle Bewegungen und Reaktionen stark verlangsamt (siehe Stabilisierung mittels Trocknungsverfahren, A.I.1), und zum anderen über den Ersatz der entzogenen Wassermoleküle. Hierbei kommt es zu Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Hilfsstoff und polaren Gruppen des Proteins, wodurch die natürliche Konformation des Proteins auch ohne Hydrathülle aufrechterhalten werden kann. Diese als „water replacement“ bezeichnete Stabilisierungstheorie wurde formuliert als man feststellte, dass nur Proteine, welche in Gegenwart von Zuckern getrocknet wurden, ihre Aktivität nach Rekonstitution zurückerlangten. Da Zucker beim Trocknen ein anderes Stabilisierungspotential aufweisen als beim Einfrieren, konnte diese Stabilisierung nicht wie in Lösung über „Preferential Exclusion“ erfolgen. Zuckerkonzentrationen, welche beim Einfrieren/Auftauen noch keine Stabilisierung hervorriefen, bewirkten bereits einen deutlichen Schutz beim Trocknen (125, 116, 140, 119). Des weiteren erkannte man, dass der Erhalt der nativen Tertiärstruktur auch im getrockneten Zustand essentiell für die Wiedererlangung der Aktivität war (141, 142, 143), und bestätigte diese - zunächst theoretische Überlegung - mit Hilfe der Infrarotspektroskopie. Hierdurch konnte die direkte Interaktion der Proteine mit den Stabilisatoren bewiesen werden (144, 145, 146). IR-Spektren von Proteinen, welche in Gegenwart von Zuckern getrocknet wurden, weisen in etwa die selbe Form auf wie Spektren von Proteinen in wässriger Lösung (Abb. 16 rechts). Dagegen kommt es zur deutlichen Veränderung des Spektrums von ohne Hilfsstoffzusatz getrockneten Proteinen (Abb. 16 links).

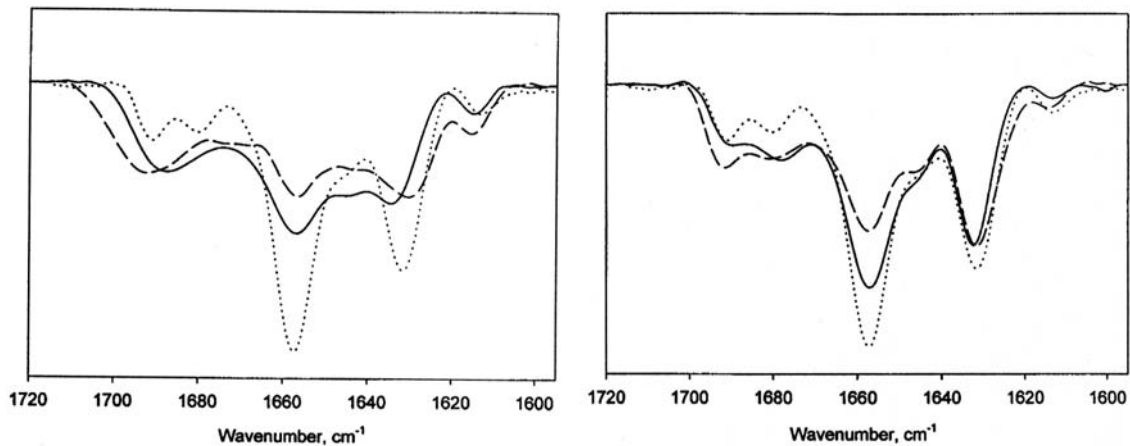


Abb. 16: Zweite Ableitung eines IR-Spektrums von Actin in wässriger Lösung (gepunktete Linie) und nach Trocknung mittels Lyophilisation (schwarze Linie), bzw. Lufttrocknung (gestrichelte Linie). Links: Ohne Zusatz von Stabilisatoren. Rechts: Mit Zusatz von 1 % (m/v) Saccharose. (entnommen aus 147)

Die Zucker bilden an Stelle des entzogenen Wassers H-Brücken zum Protein aus und wirken somit als „Wasserersatz“. Hierzu muss ein direkter Kontakt zwischen Protein und Hilfsstoff bestehen, welcher nur im amorphen Zustand möglich ist. Deshalb verlieren viele Stabilisatoren ihre Wirkung, wenn sie in zu hohen Konzentrationen eingesetzt werden und es zur Kristallisation kommt (21, 141). Allerdings reicht auch die Ausbildung amorpher Strukturen alleine nicht aus, um Proteine vollständig zu schützen. Dextran z.B. bildet zwar Gläser mit sehr hoher Glasübergangstemperatur, versagt jedoch darin, Proteine zu stabilisieren, da es keine ausreichenden Wasserstoffbrücken ausbildet (148, 147). Neuere Untersuchungen sind sich einig, dass nur die Kombination beider Maßnahmen, also die Formung einer amorphen Matrix und die Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen Protein und Hilfsstoff, eine vollständige Stabilisierung der Proteine ermöglicht (149).

Um Proteine beim Trocknen in allen Phasen zu schützen, eignen sich vor allem Polyole und Zucker (116, 150, 151), wobei für eine vollständige Stabilisierung relativ hohe Konzentrationen benötigt werden. Die optimalen Konzentrationen sind vom verwendeten Zucker abhängig und unterscheiden sich je nach Trocknungsvariante. Für die „Cryoprotektion“ benötigt man höhere Konzentrationen, als zum Schutz vor Dehydratisierung. Meistens gilt jedoch, je mehr desto besser, so lange der Zucker nicht auskristallisiert (siehe Konzentrationseffekte, 2.2.2), da die Hilfsstoffe bei Kristallisation ihre Möglichkeit zur H-Brückenbindung verlieren. Deshalb eignen sich auch Disaccharide besser als höhermolekulare Kohlenhydrate. Bei diesen behindern die sperrigen Glucoseketten die Ausbildung von Wasserstoffbrücken. Auch Aminosäuren und Polymere dienen als Lyo- und Cryoprotektanten, wobei Polymere durch mehrere ihrer Eigenschaften zur Stabilisierung beitragen. Sie wirken über „Preferential Exclusion“, sind oberflächenaktiv, erhöhen die Viskosität und die Glasübergangstemperatur, verhindern die Auskristallisation der Zucker und den pH-Abfall beim Einfrieren. Außerdem

behindern sie aufgrund ihrer Größe Protein-Protein-Interaktionen. Da sie andererseits die Ausbildung von H-Brücken inhibieren, finden sie nur bedingt Einsatz als alleiniger Hilfsstoff und werden oft mit Disacchariden kombiniert. Die meisten Rezepturen setzen sich aus einer Vielzahl von Hilfsstoffen zusammen. Bei der Gefriertrocknung werden z.B. reine Cryostabilisatoren mit Lyostabilisatoren kombiniert, um in beiden Phasen der Trocknung eine optimale Stabilisierung zu erreichen. Neben diesen klassischen, in der Industrie eingesetzten Stabilisatoren, befinden sich einige weitere Stabilisatoren in der Erforschung, so z.B. Protein-Polyelektrolyt-Komplexe (152), Polymeradditive (153, 137, 154), amphiphile Stoffe (155, 121), Dextrane (147), Cyclodextrine (156, 157, 158, 159) und Ionen wie Calcium oder Zink (160, 161, 116), welche den stabilisierenden Effekt von Zuckern verstärken.

Um die Anlagerung der Proteine an Grenzflächen (Wasser/Luft, Wasser/Eis oder Wasser/Vialwand) und die sich daran anschließende Denaturierung zu verhindern, werden üblicherweise geringe Konzentrationen an Tensid zugesetzt (30, 27, 12, 18). Nicht ionische Tenside, wie Tween, Brij oder Pluronic, schützen die in den Formulierungen enthaltenen Proteine meist schon unterhalb der kritischen Mizellarkonzentration sehr effektiv vor Denaturierung (siehe auch A.1.3.2). Bei Verwendung höherer Konzentrationen kann es jedoch zur Aggregation, aufgrund der oft als Verunreinigung enthaltenen Oxidationsprodukte, kommen. Diese Aggregation tritt teilweise direkt bei der Herstellung, teilweise auch erst bei Einlagerung der Proben auf. Letztere Möglichkeit wurde z.B. von M. Adler und G. Lee (162) beschrieben und wird in Abb. 17 graphisch wieder gegeben. Mit steigender Tensidkonzentration wiesen die getrockneten Proben eine geringere thermische Stabilität auf (links: 0,001 % Polysorbat 80 gegenüber rechts: 0,1 % Tensid).

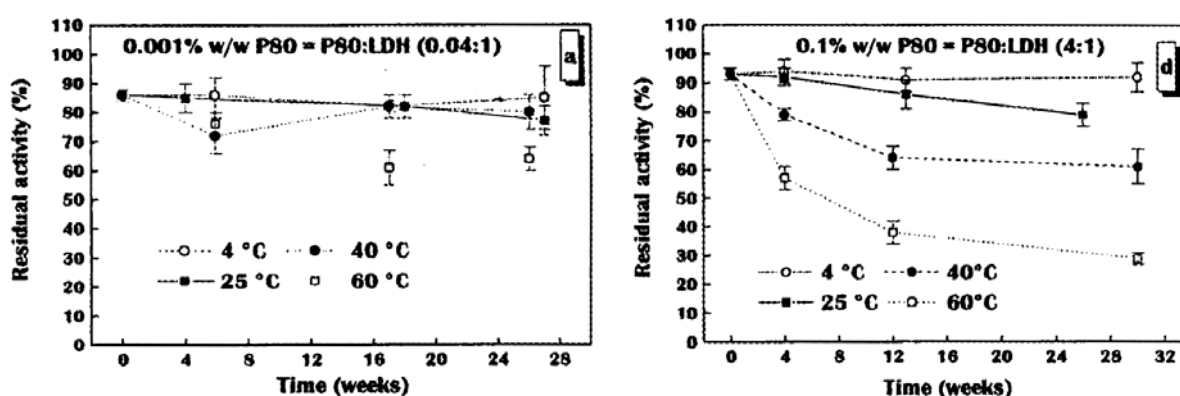


Abb. 17: Einfluss verschiedener Polysorbat 80 Konzentrationen auf die Lagerstabilität von LDH in sprühtrockneten Proben. Bei niedriger Konzentration (links: 0,01 % Polysorbat 80) ist kein Effekt detektierbar, bei hoher Konzentration (rechts: 0,1 % Polysorbat 80) dagegen kommt es mit zunehmender Lager Temperatur zur abnehmenden Aktivität des Enzyms. (entnommen aus 162)

Des weiteren kann es auch aufgrund direkter Interaktionen der höher konzentrierten Tenside mit den Proteinen zur Senkung der Schmelztemperatur  $T_m$  der Proteine kommen (30). Auch bezüglich der physikalischen Struktur der getrockneten Produkte erweisen sich

höhere Tensidkonzentrationen als problematisch. R.L. Seitakari et al. (163) konnte mittels Röntgenpulverdiffraktometrie (XRD) zeigen, dass lyophilisierte Produkte ab einer Tweenkonzentration von 0,1 % nicht mehr amorph sondern kristallin vorliegen (Abb. 18). Insgesamt lässt sich feststellen, dass geringe Konzentrationen an nichtionischen Tensiden die Qualität von getrockneten Produkten positiv beeinflussen, während höhere Konzentrationen aufgrund von Denaturierungs- und Kristallisierungstendenzen vermieden werden sollten.

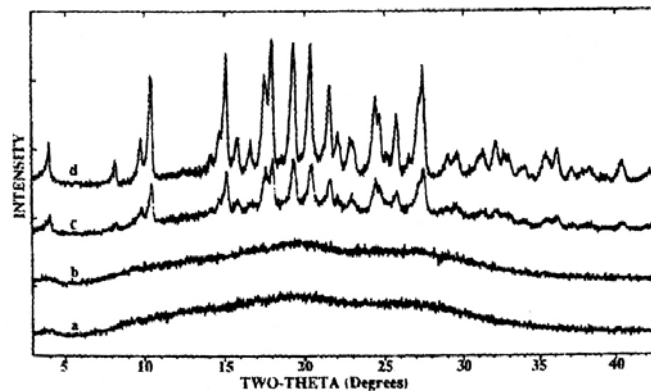


Abb. 18: XRD-Chromatogramme von lyophilisiertem Diltiazemhydrochlorid (a) ohne Zusatz, (b) mit 0,001 %, (c) 0,1 % und (d) 1 % Polysorbat 80. (entnommen aus 163)

Um eine Stabilisierung auch während der Lagerung aufrecht zu erhalten, dürfen die verwendeten Hilfsstoffe nicht auskristallisieren. Dies wird am besten von Stoffen gewährleistet, welche einen hohen  $T_G$  aufweisen, wenig hygroskopisch sind und ein langsames Kristallisationsverhalten offenbaren. Da wenigen Stoffen all diese Eigenschaften zueigen sind, werden verschiedene Hilfsstoffe kombiniert. So kann z.B. der Zusatz von Polymeren, wie PVP oder Dextran – Stoffe die selbst wenig zur Reduzierung von Dehydratisierungsstress geeignet sind – die Kristallisation kleinerer Zucker verhindern und damit zur Stabilisierung beitragen (153, 137, 154). Da die Kristallisation auch durch hohe Restfeuchten forciert wird, sollte es während der Lagerung nicht zur Wasseraufnahme der Proben kommen. Diese wird wesentlich von den Primärpackmitteln bestimmt. Falls keine speziellen Devices, wie Pulverinhalatoren oder PowderJet, verwendet werden, sollten grundsätzlich nur Glasvials der Qualität I benutzt werden. Um eine Wasserabgabe aus den Stopfen zu vermeiden, sollten diese vor Verwendung getrocknet werden. Darauf wird im nächsten Absatz noch genauer eingegangen. Auch eine Begasung der Vials mit trockenem Inertgas kann die Luftfeuchte in den Vials reduzieren. Außerdem minimiert diese Vorgehensweise die Gefahr der Oxidation in den Proben, welche durch Bildung von Disulfidbrücken aus freier Sulfhydryl-Gruppen der Cysteine die Hauptursache für kovalente Aggregation darstellt. Grundsätzlich tritt jede chemische Destabilisierung, allen voran Hydrolyse und Deamidierung, in trockenen Proben deutlich seltener auf als in Lösung, dennoch kann sie niemals völlig außer Acht gelassen werden. Bei der Maillardreaktion z.B. wird im Verlauf der mehrere Schritte umfassenden Reaktionskette Wasser abgespalten, so dass der Entzug von Wasser diese



Reaktion sogar beschleunigen kann. Da es sich bei der Maillardreaktion um eine Reaktion von Aminosäuren mit reduzierenden Zuckern handelt, kann sie durch Einsatz nicht reduzierender Zucker verhindert werden. Dabei sollte man jedoch beachten, dass auch nicht reduzierende Disaccharide unter extremen pH-Bedingungen zu reduzierenden Zuckern gespalten werden können.

Den größten Einfluss auf die Restfeuchte des Produktes während der Lagerung hat neben der Zusammensetzung der Rezeptur, die Feuchte der Stopfen. In diesem Zusammenhang sei auf die Erkenntnisse von M.J. Pikal et al. (164), sowie Le Meste et al. (165), welche den Wassertransfer aus den Stopfen in die Produkte untersucht haben, verwiesen. Auch W. Wang beschreibt die enorme Bedeutung der Feuchte der Stopfen auf die Lagerstabilität der Produkte (21), wobei er drei grundsätzliche Möglichkeiten angibt, wie Wasser in das Produkt gelangen kann: Erstens durch Transfer aus dem Stopfen, zweitens durch Diffusion oder Transmission durch den Stopfen hindurch und drittens aufgrund von Mikrolecks im Stopfen-Vial-Verschluss. Normalerweise überwiegt die erste Möglichkeit. Besonders bei einer großen Massendifferenz zwischen Stopfen und kleiner Probenmenge, spielt diese eine erhebliche Rolle. Wenn auch nur ein Bruchteil der Wassermenge des Stopfens in die Probe hinein diffundiert, erhöht sich die Restfeuchte der Probe überproportional. Die Trocknung der Stopfen sollte also einen messbaren Effekt ausmachen (166, 167, 168), was von M.J. Pikal und S. Shay anhand von verschiedenen getrockneter Stopfen belegt wurde (Abb. 19).

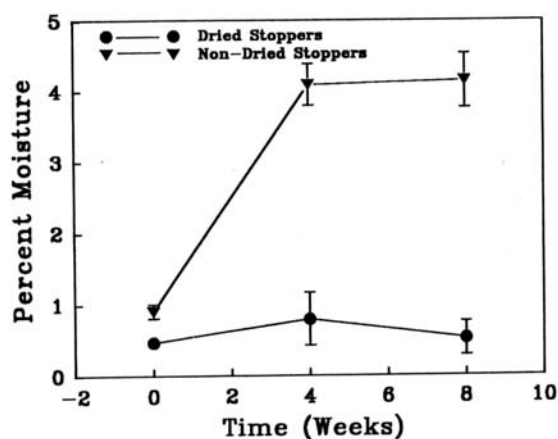


Abb. 19: Entwicklung der Restfeuchte bei 37 °C Lagerung von Produkten mit getrockneten (●) und nicht getrockneten Stopfen (▲). (entnommen aus 167)

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es viele Faktoren gibt, welche auf die Stabilität eines Proteins Einfluss nehmen können. Die meisten Faktoren sind jedoch aufgrund der intensiven Forschungen der letzten Jahre bekannt und können durch Wahl geeigneter Hilfsstoffe kontrolliert werden.

### 3. Neue Trocknungs- und Applikationsverfahren

Je nach Verwendungszweck haben sich in der Lebensmittel-, Biotech- und Pharmaindustrie verschiedene Methoden zur Trocknung empfindlicher Moleküle etabliert. All diese Trocknungsmethoden wurden in den letzten Jahrzehnten intensiv erforscht, so dass deren Potential, aber auch deren Schwächen weitgehend bekannt sind (siehe A.2.1.1). An dieser Stelle sei nur zusammenfassend darauf hingewiesen, dass die Gefriertrocknung zwar fast universal einsetzbar, jedoch besonders energie- und zeitaufwendig ist. Während die Sprühtrocknung zwar schneller durchzuführen ist, jedoch ebenfalls sehr viel Energie benötigt und nur Bulkware liefert, welche danach weiterverarbeitet werden muss. Ziel dieser Arbeit war es, alternative Trocknungsverfahren für Proteinzubereitungen zu suchen, wobei der Grundgedanke stets der war, relativ konzentrierte Lösungen zu trocknen und somit nur geringe Wassermengen zu entfernen. Da es sich bei Proteinen um hochpotente Wirkstoffe handelt, werden diese üblicherweise in geringen Dosierungen eingesetzt, so dass bei Verwendung von konzentrierten Rezepturen nur ca. 10 bis 500 µl Lösung zu trocknen sind. Bisher stellt die Verdünnung von konzentrierter Proteinbulklösung vor der Trocknung einen gängigen Verfahrensschritt dar, der jedoch nicht zwingend notwendig ist. Eigentlich sollte es möglich sein, alle nötigen Hilfsstoffe direkt in die Bulklösung einzubringen und nur zur pH-Einstellung eine geringe Verdünnung vorzunehmen. Auf diese Weise könnte es zur Reduzierung der zu trocknenden Lösung um ca. 90 % kommen, wodurch es möglich sein sollte, zum einen in deutlich kürzeren Zeiten trockene Produkte zu erhalten und zum anderen völlig andere Geräte zu verwenden.

#### 3.1. *Trocknung mittels Warmluftbegasung*

##### *3.1.1. Gerät und Einsatzgebiet*

Ein alternatives Trocknungsgerät stellt das Warmluftbegasungsgerät der Fa. Barkey GmbH & Co. KG dar. Dabei handelt es sich um einen Vertreter einer Gruppe von Geräten, welche zur Einengung von organischen Lösungen konzipiert wurden (Abb. 21). Gerade in der Analytik fallen nach Festphasenextraktion, Flüssig-Flüssig-Extraktion oder Soxhletbenutzung oft größere Mengen organischer Lösung an, welche vor der nachfolgenden Analytik aufkonzentriert werden müssen. Nur so kann beim Nachweis von Spurenelementen die analytische Nachweisgrenze erreicht werden. Im Grunde handelt es sich bei all diesen Geräten um abgewandelte Konvektionstrockner. In unterschiedlicher Weise leiten sie trockenes Gas über Düsen in Reagenzgläser, Mikrotiterplatten oder Vials ein, wobei teilweise zusätzlich die Gefäße und das Gas erwärmt werden (Abb. 20). Durch den Wärmeeintrag und den deutlich niedrigeren Partialdruck des trockenen Gases kommt es zur Verdunstung der leicht flüchtigen

Lösungsmittel, welche vom vorströmenden Gas aus den Gefäßen abgeführt werden. Einige der Hersteller versuchen die Verdunstungsgeschwindigkeit durch ständiges Nachführen der Gasdüsen zu erhöhen. Hierdurch wird der Abstand des vorbeistreichenden Gases zur Verdunstungsfront konstant gehalten (SLS 03 aus 169). Andere versetzen den Gasstrom in eine rotierende Bewegung, um einen längeren Kontakt der Wasseroberfläche mit dem Gas zu gewährleisten (Abb. 20, TurboVap<sup>®</sup>, Fa. Zymark, D-Idstein/Ts.). Von 384 well-plates bis zu Kolben mit mehreren Millilitern Fassungsvermögen können alle Gefäßvarianten in die Geräte eingebracht werden. Von den Herstellern der Geräte werden Tabellen zur Abdampfgeschwindigkeit für verschiedene Lösungsmittel angegeben. 10 ml Aceton können z.B. vom SLS 03 (169) innerhalb von acht Minuten verdampft werden, während der UltraVap<sup>®</sup> von Porvair für 0,5 ml Methanol sechs Minuten benötigt. Leider beziehen sich all diese Angaben zumeist nur auf organische, leicht flüchtige Lösungsmittel. Uns stellte sich also die Frage, ob man das Prinzip, welches erfolgreich mit leichtflüchtigen Lösungsmitteln funktioniert, auch auf Wasser anwenden könnte.

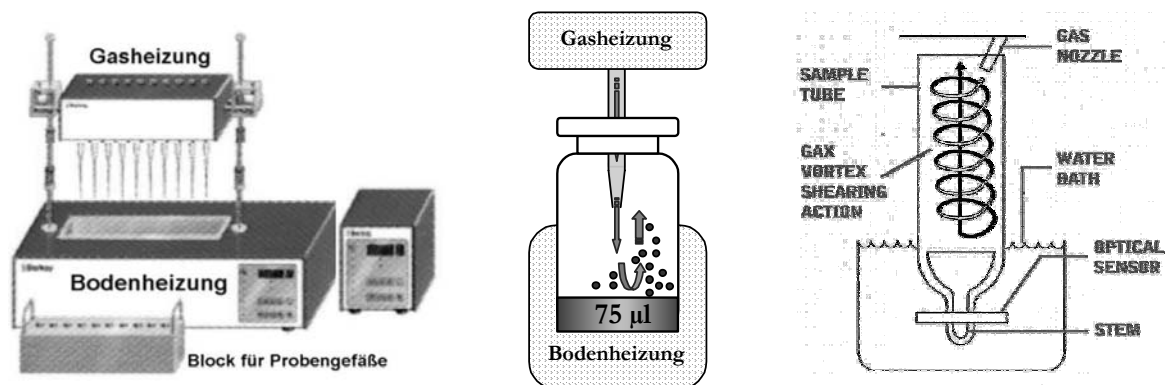


Abb. 20: Schematische Darstellung der Trocknung mittels Warmlufttrocknung. Links und Mitte: Gerät der Fa. Barkey GmbH & Co. KG, rechts: Trocknungsprinzip des TurboVap<sup>®</sup> von Zymark.

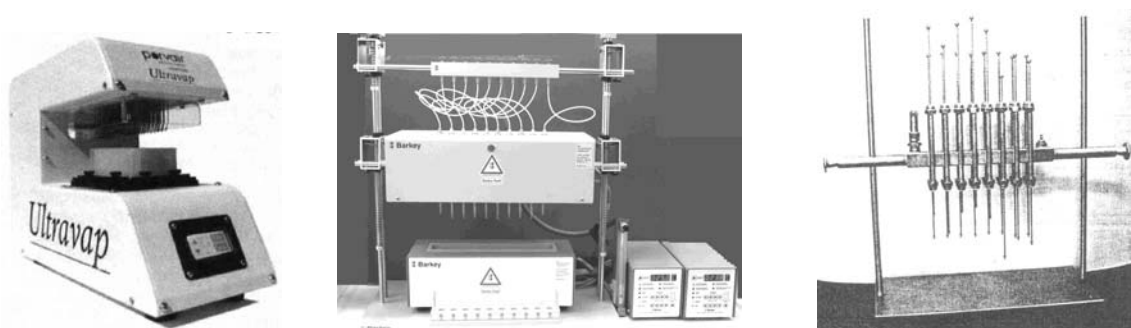


Abb. 21: Einige typische Vertreter der Warmluftbegasungsgeräte. Von links nach rechts: Ultravap von Porvair, das verwendete Gerät von Fa. Barkey GmbH & Co. KG und SLS 03 (Bilder aus den Herstellerkatalogen, bzw. eigene Photographie)

Bei dieser Trocknungsmethode handelt es sich um eine Abwandlung der Konvektionstrocknung. Man könnte sie auch als „Miniatur-Einzeldosen-Konvektionstrocknung“ bezeichnen. Anstatt das gesamte, feuchte Gut in großen Mengen auf Horden auszubreiten, zu erwärmen und durch darüber strömende Luft zu trocknen, werden in diesem Fall kleine Einzeldosen in Vials „ausgebreitet“ und das zur Trocknung verwendete Gas direkt in die Vials eingeleitet. Da die normale Konvektionstrocknung bereits seit langem zur Trocknung wässriger Güter eingesetzt wird, sollte es auch möglich sein, mit der Miniaturvariante wässrige Proteinlösungen zu trocknen.

Weitverbreitete Anwendung findet die klassische Konvektionstrocknung in der Chemie- und Lebensmittelindustrie. Bereits in den siebziger Jahren wurden zahlreiche Untersuchungen zu Variationen an Warmlufttrocknern durchgeführt. Erwähnt seien hier nur ein paar exotische Techniken: Continuous Try Dryer, Rotary Dryer, Through-Circulation Dryer, Tunnel Dryer, Pneumatic Conveying Dryer oder Open-mesh Fabrics Dryer (22, 71). Zwar gibt es in der pharmazeutischen Technologie kaum neuere Veröffentlichungen zu diesem Gebiet, doch zur Trocknung von Lebensmitteln, Papier, Farben und Pflanzen wird die Technik routinemäßig eingesetzt. Im Jahr 2000 wurde ein koreanisches Patent zur Herstellung von Instant-Reis-Kuchen basierend auf einer Warmlufttrocknung angemeldet (170) und 2001 erschien ein Artikel über die Trocknung von Ananasstücken mittels Lufttrocknung im Buch „Drying Technology“ (171). Veröffentlichungen über die Verwendung der Technik zur Trocknung von Proteinen findet man nur im Zusammenhang mit Untersuchungen von Trocknungseinflüssen. B.S. Murray und H-J. Liang verwendeten ein selbstgebautes Gerät, welches das gleiche Trocknungsprinzip wie die Miniatur-Einzeldosen-Konvektionstrocknung nutzt, zur Untersuchung der Schaumbildungsfähigkeit von Proteinen bei Trocknung in Gegenwart von Zuckern (172). Auch S.D. Allison et al. (147) benutzte zur Stabilisierung von Proteinen durch Zucker ein Warmlufttrocknungsgerät. Dazu setzte er 100 µl wässrige Proteinlösung ein und trocknete diese unter Begasung mit trockenem Stickstoff bei Raumtemperatur für zwei Stunden. Allerdings schloss sich daran eine weitere Trocknung über Nacht im Vakuum an, so dass nicht von einer vollständigen Trocknung mittels Konvektion gesprochen werden kann.

### 3.1.2. *Trocknungsverlauf der Konvektionstrocknung*

Da die in dieser Arbeit eingesetzte „Miniatur-Einzeldosen-Konvektionstrocknung“ das gleiche Trocknungsprinzip verwendet wie die normale Konvektionstrocknung, gilt auch für diese die seit langem bekannten Theorien zum Ablauf der Trocknung (22). Eine Konvektionstrocknung gliedert sich in vier Phasen (Abb. 22). Sie beginnt mit der Angleichungsphase – auch „lag-Phase“ genannt –, in welcher es zur Erwärmung der Lösung auf die Gastemperatur kommt. Daran schließt sich eine Phase mit konstanter Trocknungsgeschwindigkeit an. Hierbei wird angelagertes und in Kapillaren eingelagertes

Wasser entfernt. Für den Fall, dass eine Lösung eingesetzt wurde, kommt es zunächst zur Einengung der Lösung und erst danach zur Entfernung von Kapillarfeuchte. Dieser Trocknungsschritt ist, abgesehen von der Oberfläche des Gutes, nur von der Temperaturdifferenz zwischen Flüssigkeit/Gut und Gas abhängig und erfolgt relativ schnell. Die nächste Phase beginnt ab dem Moment, ab dem keine kapillar gebundene Feuchte mehr vorhanden ist und das Gut eine hygroskopische Feuchte (maximale Feuchte welche sich durch Sorption bei 100 % rel. Feuchte einstellt) aufweist, und zeichnet sich durch eine Abnahme der Trocknungsgeschwindigkeit aus. Von nun an verläuft die Trocknung kontinuierlich langsamer, da nun neben der Temperaturdifferenz auch die Wärmeleitfähigkeit und Dampfdurchlässigkeit des Gutes einen Einfluss auf die Trocknung haben. Verdunstendes Wasser muss durch bereits trockenes Gut hindurch zur Oberfläche der gebildeten Matrix diffundieren. Je nach Porosität der Matrix erfolgt dies unterschiedlich schnell. Der letzte Schritt läuft noch etwas langsamer ab, da nun auch adsorptiv gebundenes Wasser entfernt werden muss. Diese Geschwindigkeit ist also abhängig von der Wasserbindungsstärke des Produktes.

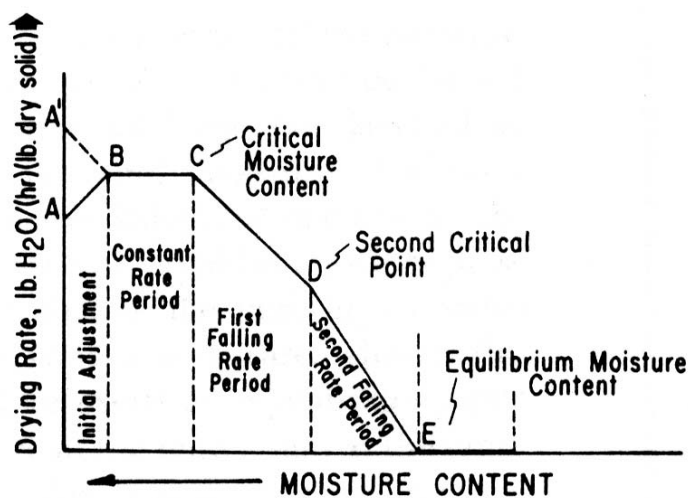


Abb. 22: Trocknungsgeschwindigkeit einer Konvektionstrocknung. Die gesamte Trocknung ist in vier Phasen eingeteilt. (entnommen aus 22)

Obige Abbildung (Abb. 22) gibt den theoretischen Trocknungsverlauf bei der Konvektionstrocknung wieder, während Abb. 23 (72) den tatsächlichen Verlauf anhand der Trocknung von Tarhanateig (anhand des Restfeuchtegehalts) darstellt. Zunächst ist ein linearer Abfall der Restfeuchte, entsprechend dem zweiten Teil der Trocknungstheorie, zu erkennen. Abhängig von der Schichtdicke geht die Kurve danach mehr oder minder schnell in einen langsamen, nicht linearen Verlauf über (links  $\circ$   $\square$   $\triangle$ ). Der ausgeprägte Einfluss der Porosität und der Dampfdurchlässigkeit der Matrix geht aus den verschiedenen Trocknungsgeschwindigkeiten je nach Vorbehandlung und Schichtdicke hervor (rechts  $\circ$   $\bullet$ ). Je dicker und kompakter die zu trocknende Masse ist, desto langsamer erfolgt die Trocknung. Diese Kurven wurden mit Hilfe eines klassischen Konvektionstrockners („pilot plant tray dryer“) erstellt, im Laufe der Arbeit wird jedoch

gezeigt, dass auch mit dem verwendeten Miniatur-Einzeldosen-Konvektionstrockner – dem Begasungsgerät von Barkey – ähnliche Kurven erhalten werden (siehe C.I.2, C.I.5).

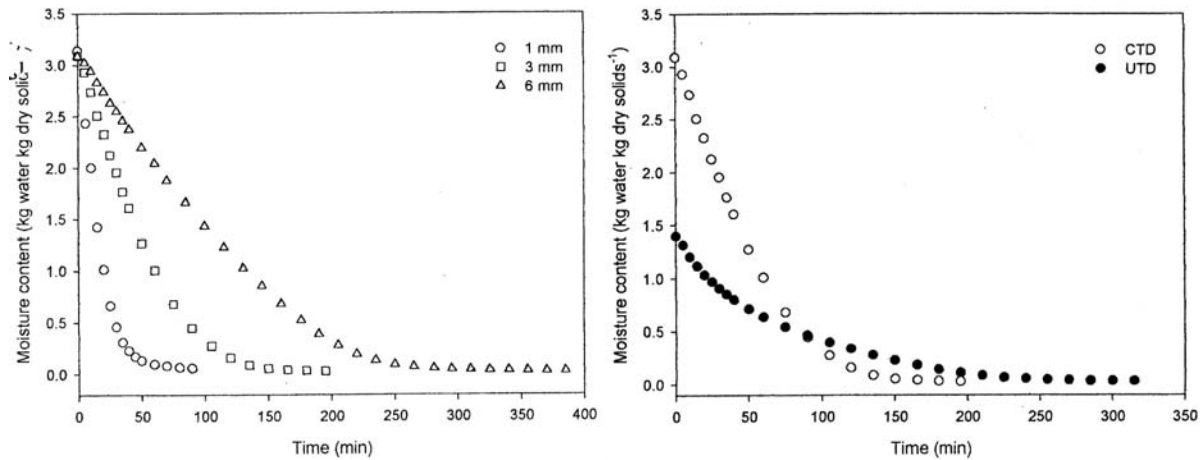


Abb. 23: Trocknungsverhalten von Tarhanateig in Abhängigkeit von Dicke und Vorbehandlung. Angegeben sind die Restfeuchten (kg/kg) während der Konvektionstrocknung bei 80 °C und 1,86 m/s Luftgeschwindigkeit von Tarhanateig mit unterschiedlichen Dicken (links), bzw. vor und nach Kochen (rechts). Durch das Kochen kommt es zur Gelatinisierung des Materials und damit zur Spalten- und Porenbildung. Links:  $\triangle$  6 mm,  $\square$  3 mm,  $\circ$  1 mm Schichtdicke. Rechts:  $\circ$  3 mm gekochter Teig,  $\bullet$  3 mm roher Teig. (entnommen aus 72)

### 3.2. Applikation und Trocknung mittels Mikrotropfen

Im zweiten Teil dieser Arbeit wird die Grundidee, die zu trocknenden Volumina zu reduzieren, noch weiter ausgearbeitet. Während bei der Warmlufttrocknung ca. 100  $\mu\text{l}$  Lösung getrocknet wurden, verringerten wir nun die Volumina auf ca. 20  $\mu\text{l}$ . Für die meisten hochpotenten, niedrig dosierten Proteine sollte es möglich sein, in diesem Volumen eine relevante Dosis unterzubringen.

Durch diese Volumenreduktion kann die Trocknungsgeschwindigkeit deutlich erhöht werden. Um jedoch eine noch weitergehende Verkürzung der Trocknungszeit und eine merkliche Verdunstung bereits bei Raumtemperatur zu erreichen, müssen die Volumina noch stärker erniedrigt werden. Wässrige Tropfen im Nano- oder Picoliterbereich verdunsten bereits bei Raumtemperatur innerhalb weniger Minuten, diese Volumina sind allerdings zu gering, als dass damit therapeutisch relevante Mengen der meisten Proteine appliziert werden könnten. Eine Lösung bietet die Sprühtrocknung, bei der größere Volumina in viele winzige Tröpfchen versprüht und nach Trocknung wieder zu einer Dosis vereint werden. Die kleinen Tropfen weisen eine so große Oberfläche auf, dass die Trocknung im vorbeistreichenden Gas bei nicht allzu hohen Temperaturen innerhalb kurzer Zeit möglich wird. Allerdings muss die hierdurch erhaltene lose Bulkware danach aseptisch weiter verarbeitet werden. In dieser Arbeit wurde das Prinzip der Verteilung einer Dosis in viele winzige Tropfen aufgegriffen, aber kontrolliert eingesetzt. Mit Hilfe

eines Mikrotropfendispensierroboters wurden 20 µl Proteinlösung in 1000 Tropfen, welche ein Volumen von je 20 nl aufweisen, aufgeteilt und in vorprogrammierten Mustern auf einer Oberfläche appliziert (Abb. 24). Hierdurch wurde eine Oberflächenvergrößerung um das zehnfache gegenüber einem nicht aufgeteilten 20 µl Tropfen erzielt und die Verdunstung durch Kontakttrocknung bei moderaten Temperaturen ermöglicht. Durch den Verzicht auf unkontrolliertes Versprühen der Lösung und Trocknungsluft, erfolgte die Trocknung zwar langsamer als bei der Sprühtrocknung, dafür aber gleichzeitig mit einer kontrollierten Applizierung der Proteine auf Oberflächen. Auf diese Weise war es möglich Protein gezielt an bestimmten Stellen aufzubringen, während andere Stellen freigelassen wurden. Dies kann z.B. bei der Beschichtung von Implantaten oder Nanorobotern wichtig sein (siehe A.4). Des weiteren können miteinander unverträgliche Stoffe nebeneinander aufgebracht werden, ohne dass es zum Kontakt kommt. Es ist somit denkbar, Lösungen von Proteinen, welche bei unterschiedlichen pH-Werten stabil sind, hintereinander aufzutropfen, oder Proteine, welche in Lösung miteinander reagieren würden, in mehreren Tropfenreihen getrennt voneinander aufzubringen. Außerdem kann mit dieser Technik, im Gegensatz zum Besprühen oder Tränken von Oberflächen, eine genau definierte Dosis aufgebracht werden. Es hängt also nicht mehr von der Porosität oder dem Wasserbindevermögen der Oberfläche ab, wieviel Proteinlösung aufgebracht werden kann.

Abb. 24 stellt das Grundprinzip der Dispensierung von Proteinlösung in kleine Tropfen und der Aufbringung in vorgegebenen Mustern auf einer Oberfläche dar:

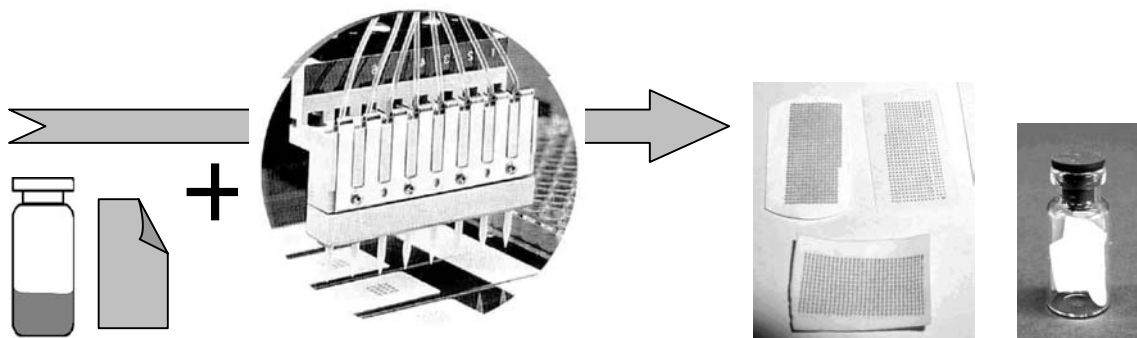


Abb. 24: Grundprinzip der Applikation und Trocknung mittels Mikrotropfen (zum genauen Vorgehen siehe Ergebnisse und Diskussion C II).

### 3.2.1. Geräte zur Bildung und Applikation von Mikrotropfen

Zur Verwirklichung dieses Prinzips benötigt man ein Dispensiersystem, welches in der Lage ist, mindestens eine Dosis – also ca. 20 µl – aufzunehmen und in nanolitergroße Tropfen zu verteilen. Des weiteren muss daran ein Robotersystem gekoppelt werden, welches die genaue Platzierung der gebildeten Tropfen gewährleistet (Abb. 30).

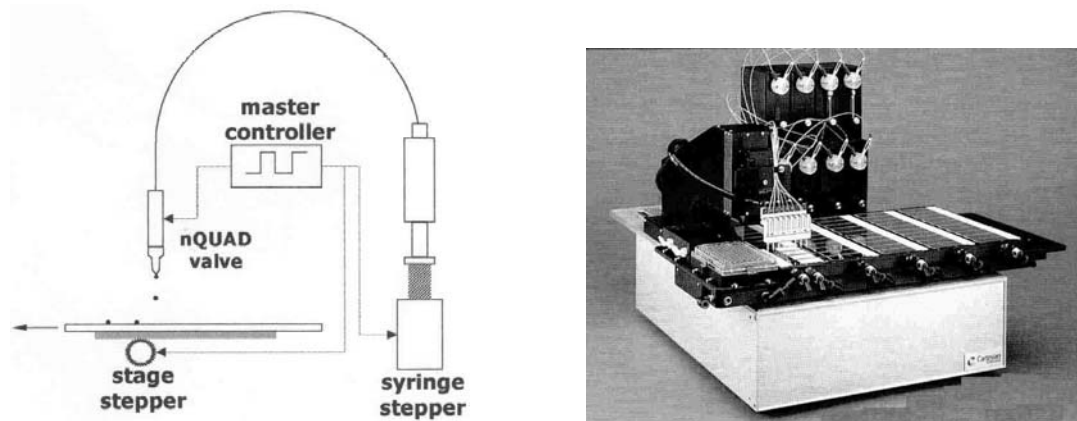


Abb. 25: Schematische Darstellung der Kombination von Dispensiereinheit mit einem Roboterplatzierungssystem (links) und Photographie des verwendeten Dispensiersystems von Cartesian Technologies. (entnommen aus dem Herstellerkatalog)

Zur Dispensierung von kleinen Tropfen befinden sich unterschiedliche Systeme auf dem Markt. Für unsere Anwendung benötigen wir Tropfen im nl Bereich, welche nicht von üblichen Laborpipetten, wie z.B. von Eppendorf, abgegeben werden können. Grundsätzlich stehen zur Herstellung von Tropfen im Bereich zwischen einigen Picolitern und 20  $\mu\text{l}$  drei Techniken zur Verfügung (173, 174, 175). Jede dieser Techniken ist nur für einen kleinen Volumenbereich einsetzbar und soll im Folgenden kurz vorgestellt werden. Für kleine Volumina bieten sich die Piezo- und Inkjet-Systeme, für große die Air-Displacement-Systeme, und dazwischen die Pintool-Systeme an.

#### 3.2.1.1. *Air-Displacement-Systeme*

Für Volumen zwischen 0,1  $\mu\text{l}$  und 20  $\mu\text{l}$  eignen sich Kolbenhubpipetten, welche nach dem Luftpolsterprinzip arbeiten, auch „Air-Displacement-Systeme“ genannt. Diese Geräte benötigen eine exakte Feinmechanik und sind nicht kontaktfrei zu benutzen, da der dosierte Tropfen nur bei Kontakt mit der Gefäßwand abfließt. Aufgrund der mit fallenden Volumina steigenden Adhäsions- und Kapillarkräfte kommt es vor allem im unteren Dosierungsbereich, unter 0,5  $\mu\text{l}$ , zu großen Dosierungsschwankungen (18 % und mehr). Obwohl diese Technik im oberen Volumenbereich sehr robust arbeitet und gut automatisiert werden kann, ist sie für die oben beschriebene Anwendung, zur Applikation und Trocknung von Proteinlösungen, nicht geeignet. Hierbei werden kleinere Tropfen benötigt, um eine schnelle Trocknung bei moderaten Temperaturen zu gewährleisten.

#### 3.2.1.2. *Pintool-Systeme*

Zur Dispensierung von kleinen Volumina stehen sogenannte „Pintool“-Systeme zur Verfügung. Diese arbeiten nach dem Kontaktdosierverfahren, wobei drei verschiedene Varianten möglich sind. Die am weitesten verbreitete Technik ist das „contact tip printing“ (Abb. 26). Hierbei nehmen Nadeln, welche einen winzigen Schlitz enthalten, über Kapillarkräfte Flüssigkeit auf und geben diese an anderer Stelle, bei Kontakt mit der Oberfläche, aufgrund von Adhäsionskräften wieder ab. Je nach Nadeldurchmesser



können so 2 nl bis 200 nl dosiert werden. Das Verfahren ist zwar billig und stellt das Standardverfahren für DNA-Arrays dar, ist aber aufgrund der sehr schlechten Reproduzierbarkeit nicht für unsere Anwendung geeignet. Andere Kontaktverfahren sind verschiedene Stempeltechniken (Micro Contact Printing und Micro Fluid Networks, Abb. 27 rechts) und die „Ring und Pin Technik“ (Abb. 27 links), bei welcher die Flüssigkeit als Film über einen Ring gespannt ist und von einer durch den Ring gestochenen Nadel mitgenommen und auf einer Oberfläche abgelegt wird.

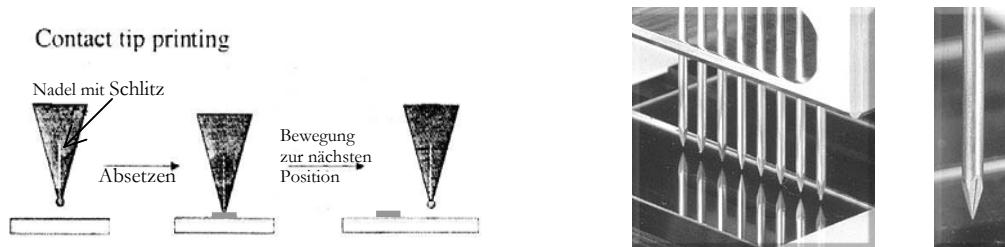


Abb. 26: Links: Darstellung der Funktionsweise des „contact tip printing“ (entnommen aus 174). Rechts: PinArray Technologie von Cartesian Technologies als Beispiel für ein Gerät, welches nach der contact tip printing arbeitet (entnommen von der Homepage des Herstellers).

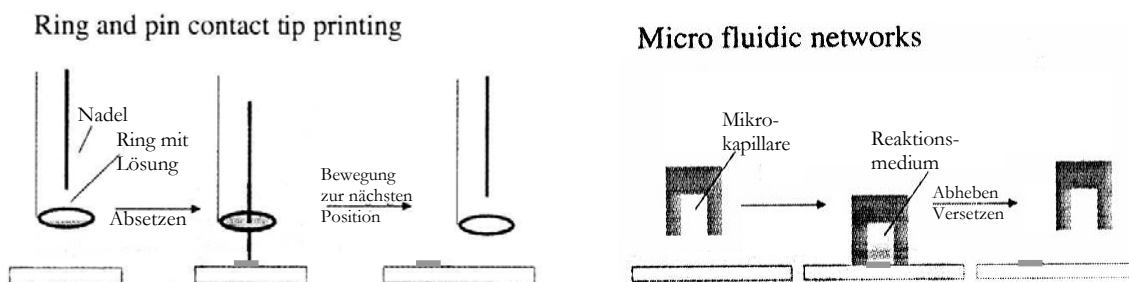


Abb. 27: Darstellung der Funktionsweise der „Ring und Pin Technik“ (links) sowie der „Micro fluidic networks“ (rechts). (entnommen aus 174)

### 3.2.1.3. Piezo- und Inkjet-Systeme

Der für uns interessante Volumenbereich (Picoliter bis Nanoliter) wird von kontaktlosen Piezo- und Inkjet-Systemen abgedeckt. Diese Technik stammt ursprünglich aus der Druckertechnologie und ist nach technischer Weiterentwicklung inzwischen in sehr vielen verschiedenen Varianten erhältlich. Diese Varianten basieren darauf, dass auf die im System befindliche Flüssigkeit ein kurzer Druckimpuls oder Überdruck ausgeübt wird, welche die Lösung beschleunigt und dazu führt, dass ein Tropfen vorne aus der Düse herausschießt. Nach der Art und Weise, wie die Lösung beschleunigt wird, unterscheidet man drei Systeme: Thermische-, Piezo- und Inkjettechnik. Bei erster kommt es durch punktuelle Erwärmung zur Verdampfung des Lösungsmittels und zur Bildung einer Gasblase, welche die Lösung in Bewegung versetzt. Aufgrund der hohen Temperaturen ist diese Technik nicht für Proteine geeignet. Bei der Piezotechnik ist ein kleiner Piezokristall um die flüssigkeitsführende Kapillare angeordnet (Abb. 28). Sobald ein Spannungsimpuls an den Piezo angelegt wird, verändert dieser seine Form und verursacht einen Druckimpuls in der Lösung. Aufgrund dessen kommt es zur Beschleunigung der

Lösung, welche als kleiner Tropfen vorne aus der Öffnung der Kapillare herausschießt. Typische Tropfengrößen liegen zwischen einigen Picolitern und wenigen Nanolitern. Sie hängen sowohl von der angelegten Spannung und Frequenz, als auch von Viskosität und Oberflächenspannung der Lösung ab. Trotz der hohen Präzision ( $< 10\%$ ) dieser Geräte werden sie nur langsam in der Industrie akzeptiert. Dies liegt in der rezepturabhängigen Dosierung und der extremen Anfälligkeit der Systeme für Luftblasen begründet. Einige Gerätebeispiele für diese Art der Dosierung sind: Microdropsystem von Microdrop (Hamburg), Nano-Plotter von GeSiM (Großberkmannsdorf), Microjet von MicroFab Technologies (USA-TX-Planto), BioChip Arrayer von Perkin Elmer life sciences (Boston USA) und Nanozyme Technik von HSG-IMIT (Villingen-Schwenningen), bei welcher etwas größere Volumina (10 - 100 nl) ausgestoßen werden, die dann in der Luft in kleinere Tropfen zerfallen.

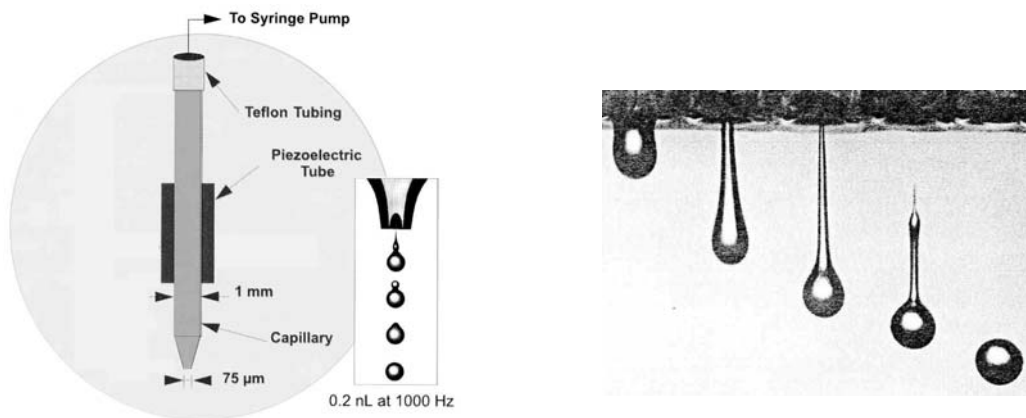


Abb. 28: Prinzip der Dosierung mittels Piezo-Technik. (links, entnommen aus dem Herstellerkatalog der Fa. Packard Instrument Co.) und Photographie der Tropfenentstehung (rechts, aus dem Katalog der Fa. microdrop).

Eine Abwandlung der Technik wird beim „TopSpot“ Printing von HSG-IMIT genutzt. Das Gerät besteht aus einem Kapillarsystem, welches in der Mitte in mehreren (24 oder 96) Mikrodüsen endet (Abb. 29). Über den Düsen befindet sich ein, von einer Folie abgeschlossener, Hohlraum, auf welchen ein kurzer pneumatischer Druckimpuls ausgeübt werden kann, wodurch es zur Ablösung der Tropfen kommt. Die Größe der Tropfen ist in diesem Fall nur vom Druckimpuls und der Struktur der Mikrodüse abhängig. Für die Applikation variabler Muster eignet sich dieses Gerät jedoch nicht, da die Anordnung der Mikrodüsen bereits ein festes Raster vorgibt.

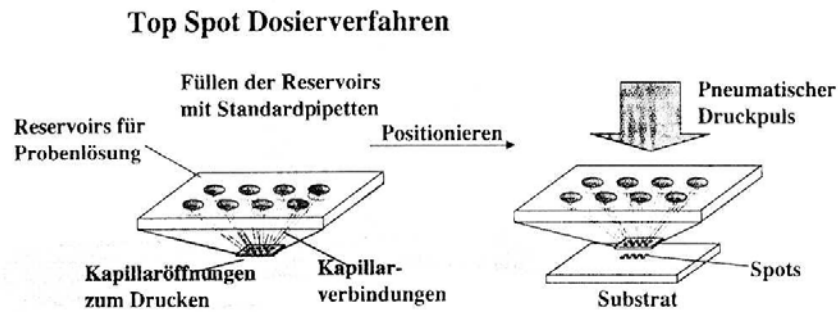


Abb. 29: Darstellung der Funktionsweise der Top Spot Technik, welche eine Abwandlung der Piezodrucktechnik darstellt. (entnommen aus 174)

Die dritte Grundvariante stellt die Inkjettechnik dar (Abb. 30). Bei dieser erzeugt eine Spritzenpumpe in einem Schlauchsystem einen leichten Überdruck, welcher beim Öffnen eines Magnetventils am Ende des Dosierkopfes zum Herausschießen einer bestimmten Menge Flüssigkeit führt. Die Öffnungszeit des Ventils und der durch die Spritzenpumpe aufgebaute Druck definieren hierbei die Tropfengröße, welche unabhängig von der verwendeten Rezeptur ist. Je nach Einstellung werden Tropfen zwischen 1 nl und 500 nl gebildet. Insgesamt handelt es sich um ein hochpräzises und gleichzeitig variables System. Aufgrund der Spritzendosierung können verschiedene Volumina hintereinander abgegeben werden, ohne dass es eines Umbaus bedarf. Auch verschiedene Rezepturen können mit ähnlichen Einstellungen dosiert werden. Zwar ist auch hier eine Empfindlichkeit des Systems gegenüber Luftblasen innerhalb der Kapillaren vorhanden, welche jedoch geringer ausgeprägt ist als bei den Piezosystemen. Ein Problem stellt die Füllung der Schläuche und Kapillaren mit Flüssigkeit dar. Diese ist nötig, da nur aufgrund der Flüssigkeit eine gleichmäßige Druckverteilung im gesamten System gewährleistet wird. In den meisten Fällen dürfte es nicht möglich sein, das gesamte System mit Rezeptur zu füllen, so dass man statt dessen Wasser (Abb. 30, hellgrau) verwendet und nur die benötigte Menge Arzneistofflösung (schwarz) aufsaugt. Im Gegensatz zur Abbildung bildet sich an der Grenzfläche zwischen Wasser und Proteinlösung keine klare Phasengrenze aus. Statt dessen tritt eine Vermischung auf, wodurch es zur Verdünnung der Rezeptur kommt. Durch Wahl geeigneter Geräteparameter und durch Aufnahme von mehr Rezeptur als abgegeben werden soll, lässt sich dieses Problem jedoch gut kontrollieren.

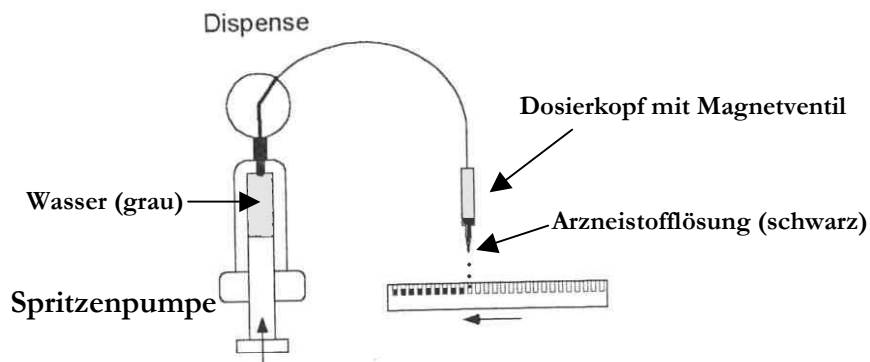


Abb. 30: Schematische Darstellung eines Inkjetsystems.

Eine individuelle Dosierung und Applikation in Mustern ist durch die Kombination der Inkjettechnik mit einem Robotersystem möglich (Abb. 25). Die vom System gebildete Tropfengröße von 2 - 20 nl ermöglicht zwar keine extrem schnelle, jedoch akzeptable Verdunstung und erlaubt eine gute Handhabung. Bei Wahl noch kleinerer Tropfen, z.B. im Picoliterbereich, wären zur Bildung einer Dosis extrem viele Tropfen nötig, welche zu dispensieren eine erhebliche Zeit in Anspruch nimmt. Die Tropfengröße im unteren Nanoliterbereich stellt einen guten Kompromiss zwischen Dosierungszeit und Verdunstungszeit dar.

Aufgrund dieser Überlegungen wurde von uns ein Inkjetsystem (das Biodot-System von Cartesian Technologies Inc.) zur Erprobung der neuen Trocknungs- und Applikationstechnik von Proteinen gewählt.

### 3.2.2. Verwendung der Mikrotropfengeräte

Die Idee Proteine mit Hilfe dieser Geräte in Mustern auf Oberflächen aufzubringen und dort zu trocknen, ist zwar für therapeutische Proteine neu, wird jedoch in ähnlicher Form in Diagnostik und Arzneistoffforschung bereits eingesetzt. Viele der oben genannten Geräte finden ihre Anwendung in der Dispensierung kleinster Mengen hochpreisiger Enzyme, neu entdeckter Proteine und anderer nur in kleinen Mengen verfügbarer Stoffe zur nasschemischen Biomolekülanalytik in Mikrotiterplatten. Dies ermöglicht eine Ersparnis von Material und Reagenzien, bei gleichzeitiger Erhöhung der Geschwindigkeit, Durchsatzrate, Effizienz und Präzision durch Synchronisierung und Miniaturisierung. Eine noch weitere Miniaturisierung stellt die Platzierung der Proben auf Chips dar - eine Methode der molekularbiologischen Analytik, bei welcher auf einem Träger aus Glas oder anderen Materialien Biomoleküle in hoher Anzahl und Dichte in definierter Mikroanordnung („Microarray“) fixiert werden. Je nach Fragestellung befinden sich auf der Oberfläche wenige hundert bis mehrere tausend Punkte mit gekoppelten Biomolekülen, wobei jeder Messpunkt ("Spot") einer konventionellen Analyse im Reagenzglas entspricht. Die Auswertung dieser Arrays erfolgt mittels UV-, Fluoreszenz-, oder Chemilumineszens aufgrund direkter Farbreaktionen oder mittels Antikörper-ELISA-Test und ist durch die schnelle Weiterentwicklung der Scannertechnologien vollautomatisch möglich (176, 177). Die Benutzung solcher Microarrays zur Erbgutanalyse, Pathogen- und Infektionsanalytik, sowie zur Lebensmittel-, Umwelt- und Arzneistoffanalytik stellt einen schnell wachsenden Markt mit hoch bewerteten Marktchancen dar. Im Frost & Sullivan Report 639206/02 wird für 2004 ein Umsatz von 3,3 Mrd. Dollar und ab 2005 eine Wachstumsrate von weiterhin 20 % bis 30 % vorhergesagt (178, 179).

Die Platzierung von Gensonden auf DNA-Biochips dient neben der Grundlagenforschung, auch der patientenspezifischen Identifizierung von Arzneimittelwirkungen,

hervorgerufen durch Polymorphismen des Stoffwechsels. Während DNA-Biochips bereits weit verbreitet sind und sich zahlreiche Produkte auf dem Markt befinden (Pharm-o-Kin von GeneScan Europe AG, NutriChip von Biochip Technologies, siehe auch [www.biospace.com/articles/060799\\_array\\_players.cfm](http://www.biospace.com/articles/060799_array_players.cfm)), befindet sich die Herstellung von Proteinchips noch im Anfangsstadium. Die Notwendigkeit der Erhaltung der Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine und deren schwierige Oberflächenhaftung, macht die Entwicklung von Proteinchips zu einer höchst anspruchsvollen, aber auch vielversprechenden Aufgabe (180).

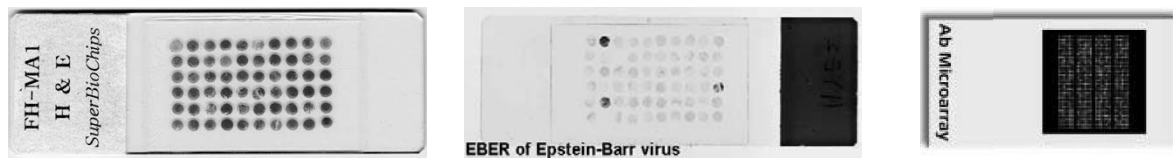


Abb. 31: Darstellung von zwei Biochips im „low density“ Bereich (10 – mehrere 100 Punkte) und eines Microarrays mit 500 immobilisierten Antikörpern von BD Biosciences (rechts).

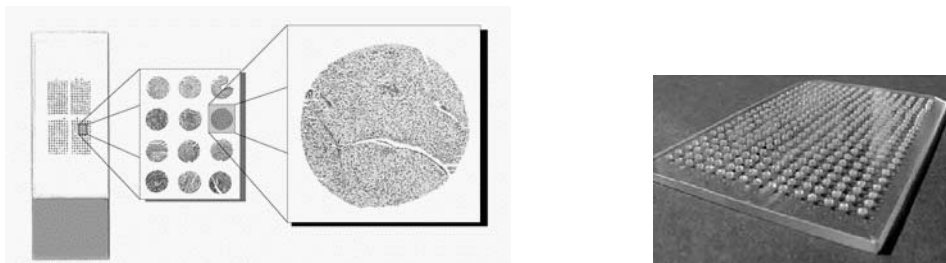


Abb. 32: Gewebe-Array von UCLA tissue array core facility ([links](#)) und Biochip auf Glas von Prot@gen. (rechts). (alle Abbildungen von der Homepage der Hersteller)

Während in der medizinischen Diagnostik die Applikation in Mikrotropfen auf Oberflächen bereits weit verbreitet ist, befindet sich der Einsatz von Mikrotropfen in anderen pharmazeutisch-medizinischen Gebieten noch im Forschungsstadium. Einige Ideen und Visionen sollen hier kurz erwähnt werden. Auf der „Tenth Annual Conference on Biomedical Engineering Research“ 1992 in Houston wurde über die Vorteile der Aufbringung von Mikrotropfen auf Gewebe diskutiert. Hierdurch könnten winzige Mengen färbender Reagenzien und Antikörper direkt auf einzelne Zellen getropft werden. Um eine Erhöhung des Energietransfers bei der Laserchirurgie zu erreichen, wäre es möglich, photoabsorbierende Stoffe auf Gewebe aufzubringen (181). Auch in der pharmazeutischen Technologie wäre es möglich, Mikrotropfen zu nutzen. So könnten z.B. getrocknete Protein-Zuckerpartikel, welche auf einer Membran aufgebracht sind, mit Hilfe nadelloser Systeme, wie dem Powder Jet oder der „Sling Shot Technik“ (182) intradermal verabreicht werden (siehe auch A.I.1.). Des Weiteren bestünde die Möglichkeit trockene Tropfen, entsprechend einem Patent über „Dry drops“, lokal am Auge einzusetzen (183, 184). Hierbei handelt es sich um trockene Xerogeltropfen, welche auf biegsame Träger aufgebracht werden (Abb. 33). Bei Kontakt mit Tränenflüssigkeit löst sich der Tropfen auf und dient als künstliche Tränenflüssigkeit oder zur Einbringung verschiedener Arzneistoffe. Im Gegensatz zu herkömmlichen Augentropfen gewährleistet

die trockene Lagerform eine erhöhte Wirkstoffstabilität. Die Art der Applikation ermöglicht eine genauere Dosierung bei Minimierung von Verletzungen, welche bei fehlerhafter Applikation mittels Tropfenflasche auftreten können. Anstelle des im Patent beschriebenen einzelnen großen Tropfens wären auch viele kleine Mikrotropfen denkbar. Hierdurch könnte die Auflösungs geschwindigkeit erhöht werden, oder auch mehrere nicht kompatible Arzneistoffe nebeneinander aufgebracht werden.



Abb. 33: Dry Drop System. Dargestellt sind der auf einen beweglichen Träger aufgebrachte Xerogeltropfen und die Einbringung des Tropfens ins Auge durch Übersteichen des Lids. (entnommen aus 183)

#### 4. Nutzung von Mikrotropfen auf Implantaten

Grundsätzlich können Mikrotropfen, mit der in dieser Arbeit vorgestellten Technik, auf jeder beliebigen Oberfläche aufgebracht werden. Die Applikation auf glatten Oberflächen ist ebenso möglich, wie die auf porösen Trägern, wodurch diese Technik eine potente Alternative zum Besprühen oder Tränken von porenhaltigen Trägermaterialien darstellt. Besonders vorteilhaft ist ihre Nutzung immer dann, wenn spezifische Muster erwünscht sind oder eine genau definierte Menge Protein aufgebracht werden soll. Die Nutzung exakter Muster könnte z.B. beim Tissue Engineering eine Rolle spielen. Unter Tissue Engineering versteht man die *in vitro* Züchtung von Gewebe, Organen oder anderen Teilen des menschlichen Körpers zu Transplantationszwecken. Künstliche Prothesen gewährleisten meist nicht dieselbe Qualität, Langlebigkeit und Funktionalität wie natürliche Körperteile, während Spenderorgane zwar natürlichen Ursprungs sind, aber eine lebenslange Immunsuppression erfordern. Außerdem können Xenotransplantate zu speziesübergreifenden Infektionen führen. Am besten eignen sich körpereigene, nachgezüchtete Transplantate. Bis diese jedoch routinemäßig hergestellt werden können, ist es noch ein langer Weg (185, 186). Bisher gelingt nur die Herstellung einfacher Gewebe, wie Haut, welche seit 1981 zur Behandlung von Brandopfern im klinischen Einsatz sind. Die Züchtung von komplizierteren Organen befindet sich dagegen noch in der Grundlagenforschung (Bauchspeicheldrüse) oder im präklinischen Stadium (Herzklappen). Problematisch beim Tissue Engineering sind vor allem die mangelnde Verfügbarkeit proliferierender Zellen, deren schlechte Kultivierbarkeit, sowie die mangelhafte Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der *in vitro* hergestellten Gewebe, und die deshalb notwendige Vaskularisierung komplexer Gewebesysteme. Um vorgegebene

äußere Organstrukturen auszubilden, verwendet man üblicherweise biokompatible, poröse, dreidimensionale Trägermaterialien, in welchen die neuen Zellen wachsen und welche dem neuen Gewebe als Stütze dienen. Sobald das neue Gewebe stabil genug ist, werden die Trägermaterialien von körpereigenen Prozessen abgebaut. Um in Zukunft auch komplexe Organe nachzuzüchten, könnte es notwendig werden, an einigen Stellen des verwendeten Trägers gezielt Wachstumsfaktoren aufzubringen und andere Stellen zunächst frei von Zellen zu halten. Die kontrollierte Betropfung des Trägers mittels Mikrotropfen könnte dies gewährleisten.

Auch für die Grundlagenforschung kann es entscheidend sein, Zellen in bestimmten Anordnungen und getrennt voneinander zu untersuchen. Um Wachstum von Zellen an einigen Stellen zu fördern, an anderen zu verhindern und unspezifische Adsorption zu eliminieren, eignet sich die Aufbringung von zelladsorptionsfördernden Proteinen in vorgegebenen Mustern. Verwirklicht wurde dies von S. Zhang et al. (187) durch „Micro Contact Printing“ (188) von bioadhäsiven Oligopeptiden (Abb. 34). Um solche „vorprogrammierte“ Unterlagen haltbar zu machen, müssen die aufgetragenen Proteine getrocknet werden (siehe A.I.1), wozu sich die in dieser Arbeit entwickelte Mikrotropfentechnik anbieten würde.

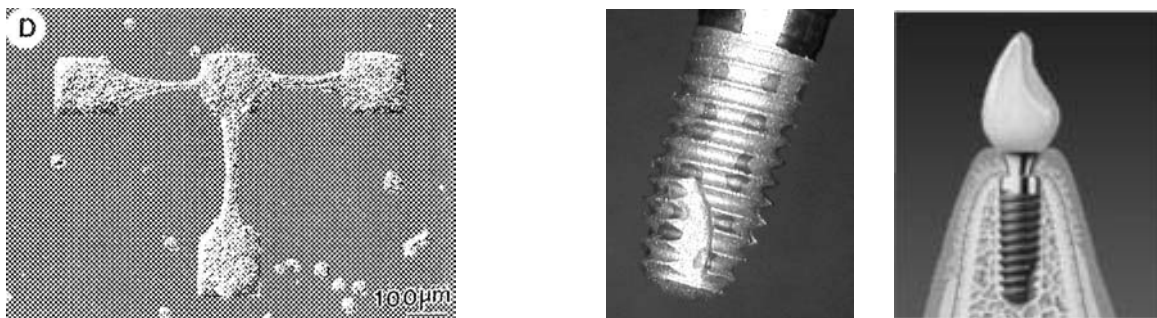


Abb. 34: **Links:** Gezielter Zellwachstum an Stellen, auf welche bioadhäsive Peptide mittels Micro Contact Printing aufgebracht wurden. (entnommen aus 187) **Rechts:** Beispiel für ein mit Placebofarbstofflösung betroffenes Zahnimplantat und schematische Darstellung eines Zahnimplantates (entnommen aus der Homepage von Dr. Dufentester: [www.zahnarztpraxis-unna.de](http://www.zahnarztpraxis-unna.de)).

Ein weiteres Einsatzgebiet der Mikrotropfen stellt die Beschichtung von Implantaten dar. Gerade Titanprothesen zum Einbringen in Knochen und Zähne müssen perfekt mit dem natürlichen Grundmaterial verwachsen, um optimalen Halt zu bieten. Es hat sich gezeigt, dass der Zusatz von Wachstumsfaktoren, wie das „Bone Morphogenetic Protein“ BMP-7, über direkte Steuerung der Knochenzellen und über chemotaktische Wirkung die Proliferation und Differenzierung der umgebenden Knochen fördert (189). Im Vergleich zur Einbringung von Wirkstofflösung neben das Implantat, ist bei einem beschichteten Implantat die Neubildung von Knochen und die Osteointegration, also die Überbrückung des Spaltes zwischen Implantat und Gewebe, deutlich verbessert. Auf diese Weise verwächst das Implantat gewöhnlich fest mit dem alten Knochen, ohne dass es in anderen Teilen des Körpers, durch frei diffundierendes BMP, zur Bildung ectopischer Knochen käme (190, 191, 192). Zumeist wird eine kovalente Immobilisierung der

Wachstumsfaktoren auf der Oberfläche des Implantates vorgenommen, obwohl dies zu strukturellen Veränderungen des Proteins und damit zur Einschränkung der Aktivität führen kann (193). Deshalb befassen sich neuere Untersuchungen mit nicht kovalenter Bindung von Proteinen auf Oberflächen, z.B. über ionische- oder hydrophobe Wechselwirkungen (194). Grundsätzlich bietet sich auch hier die kontrollierte Betropfung mit Mikrotropfen als Alternative an. Auf diese Weise könnte die aufgebrauchte Menge Protein genau festgelegt werden, was aufgrund des dosisabhängigen Effekt von BMP vorteilhaft wäre (192). Außerdem ließen sich bestimmte Stellen des Implantates mit verschiedenen Proteinen beschichten. Bei Untersuchung der Bildung und Mineralisierung von Zähnen nach Injektion von osteogenen Proteinen (OP) stellte man fest, dass diese an verschiedenen Stellen unterschiedlich wirken (189). Demnach eignet sich OP-1 besonders für Zahnwurzelkanalbehandlungen, während BSP Vorteile beim Bedecken der oberen Schichten aufweist. Es wäre also denkbar, ein Zahnimplantat oben und unten mit unterschiedlichen Proteinen zu beschichten, was durch die Mikrotropfenmethode gewährleistet werden könnte. Durch die gleichzeitige Trocknung der aufgetragenen Stoffe könnte außerdem eine ausreichende Lagerstabilität der Produkte garantiert werden.

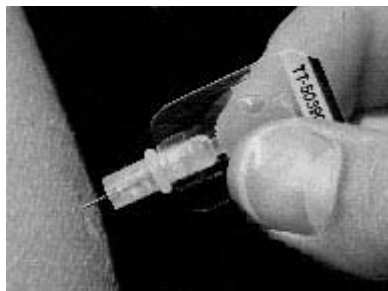
## 5. Einsatz von festen Proteinen

Trockene, feste Proteinzubereitungen zeichnen sich durch eine längere Haltbarkeit und verbesserte Lagerstabilität aus. Des Weiteren können feste Proteinpartikel in Trägermaterialien eingebettet werden – Implantate aus PLGA und Mikrosuspensionen –, wodurch eine kontrollierte Wirkstoffabgabe über Wochen und Monate erzielt werden kann. Andere intensiv erforschte Alternativen für die Applikation von festen Proteinen beinhalten die transdermale und besonders die pulmonale Route, wie z.B. die Pulverinhalation von Insulin.

Obwohl die Anzahl der Publikationen zur Untersuchung neuer Applikationswege für Proteine fast unüberschaubar ist, bleibt die parenterale Injektion bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt in der Praxis unumgänglich. Injektionen werden jedoch von vielen Patienten als unangenehm oder schmerzhaft empfunden. Außerdem stellen sie ein nicht unerhebliches Gesundheitsrisiko dar. 15 bis 40 % der 1997 verabreichten Injektionen – weltweit waren es immerhin 12 Billionen Injektionen – werden von der WHO als unsicher angesehen (195). Das größte Risiko (> 30 %) stellen dabei wiederverwendete, unsterile Spritzen dar, welche zu Abszessen und zur Übertragung von Krankheitserregern, allen voran Hepatitis B und C sowie HIV, führen können. In Ostafrika gab es 1994 in 37 % aller Haushalte mindestens eine Person, welche nach Injektion einen Abszess entwickelte. Auch das Gesundheitspersonal ist durch Nadelstichverletzungen von der Übertragung von Bluterkankungen betroffen (196). Des Weiteren stellt die Kühlpflicht vieler flüssiger



Injektionslösungen ein großes logistisches, finanzielles und medizinisches Problem dar. Die Aufrechterhaltung adäquater Temperaturen – nicht zu warm, aber auch unter Vermeidung von Gefrieren – erfordert vor allem in der Dritten Welt hohe Ausrüstungskosten und logistische Vorbereitung. Immer wieder kommt es vor, dass Impfstoffe aufgrund falscher Lagerung wirkungslos werden. Die WHO empfiehlt deshalb in ihrem Konzept von 1998 bevorzugt Trockensubstanzen zu entwickeln, welche bei höheren Temperaturen gelagert werden können (195). Die bereits heute auf dem Markt befindlichen, trockenen Mehrdosenpräparate erweisen sich in diesem Zusammenhang jedoch als problematisch. Zum einen ergeben sich bei Impfprogrammen in Entwicklungsländern logistische Probleme, da zu jedem Trockenpräparat das passende Rekonstitutionsmedium und Injektionssystem in ausreichender Menge vorrätig sein muss, zum anderen weisen rekonstituierte Lösungen meist nur eine geringe Lagerstabilität auf, so dass von Mehrdosenbehältnissen oft größere Anteile - laut WHO sogar über 50 % - unbenutzt entsorgt werden müssen. Eine Lösung hierfür stellen nicht wiederverwendbare, Einzeldosensysteme, bei welchen das Vorratsgefäß mit der Injektionssubstanz oder Lösung fest mit der Injektionsnadel verbunden ist. Der Ausschluss der Wiederverwendbarkeit garantiert die Entsorgung des gebrauchten Systems und verhindert eine illegale, nichtsterile Weiterverwendung. Mit dem UniJect™ wurde von Becton Dickinson and Company (B-D) ein Einzeldosensystem entwickelt, welches den Anforderungen der WHO gerecht wird (Abb. 35). Hierbei handelt es sich um ein kleines Plastikgefäß mit integrierter Nadel, kaum größer als ein Daumen und ohne Füllung nicht teurer als 0,2 US-Dollar. Durch Druck mit Daumen und Zeigefinger auf das Gefäß wird die enthaltene Lösung injiziert. Das zusammengedrückte System kann nicht wieder befüllt werden.



**Abb. 35:** UniJect™ von Becton Dickinson and Company. Ein Beispiel für ein prefilled, single dose Injektionssystem, welches die Anforderungen der WHO erfüllt.

Zur Verlängerung der Lagerstabilität bei höheren Temperaturen könnte man das gleiche Prinzip als Doppelkammersystem, mit Arzneifeststoff in der einen und Rekonstitutionsmedium in der anderen Kammer, entwickeln. Diese Möglichkeit wird von BD in einem USAID (United States Agency for International Development) unterstützten HealthTech Projekt weiterverfolgt. Um dieses System herzustellen, würde sich auch eine Kombination aus Bottle-Pack-Verfahren und Warmluftbegasung anbieten. Dabei könnte zunächst die eine Hälfte des Gefäßes tiefgezogen, mit Lösung befüllt und unter erwärmten Stickstoff getrocknet und danach die zweite Hälfte des Gefäßes durch Tiefziehen angeschweißt, mit Rekonstitutionsmedium befüllt und verschlossen werden.

Auf diese Weise ließen sich in einem Arbeitsschritt sterile Zweikammersysteme im Sinne der WHO herstellen. Diese Arbeit liefert einen potentiellen Beitrag zur Verwirklichung des Trocknungsschrittes mittels Warmluftbegasung.

Um alle im Zusammenhang mit Injektionsnadeln stehenden Probleme zu umgehen, bieten sich nadellose Systeme („needle-free systems“) an. Neben der Vermeidung von Nadelstichverletzungen, bieten diese Systeme den Vorteil auch von Kindern und ängstlichen Patienten akzeptiert zu werden. Bereits im zweiten Weltkrieg wurden nadellose Injektoren, sogenannte Vaccination Guns, für militärische und zivile Zwecke genutzt. Allerdings kam es aufgrund der Verwendung eines Systems für mehrere Personen zur Übertragung von Infektionen (197), so dass diese neuartige Technik noch einiger Weiterentwicklung bedurfte. Inzwischen befinden sich zahlreiche Devices auf dem Markt, welche entweder zur einmaligen Anwendung gedacht sind oder austauschbare Injektorspitzen (Vitajet™, Biojector®, Coolclick™, SerJet™, Injex, J-Tip, MediJect) besitzen. Einige dieser Systeme werden von CO<sub>2</sub> Gaspatronen, andere von Federn angetrieben, allen gemeinsam ist, dass sie eine Arzneistofflösung mit hoher Geschwindigkeit durch eine feine Düse beschleunigen und in die oberen Hautschichten schießen. Hierdurch werden subcutane, aber auch intramuskuläre Injektionen möglich. Die meisten dieser Systeme enthalten den Arzneistoff in flüssiger Form, beim Penjet® (Abb. 36) jedoch können sowohl Lösungen, als auch Feststoffe in das System eingebracht werden. Vor Gebrauch werden diese miteinander gemischt, so dass der Arzneistoff erst kurz vor der Applikation im Rekonstitutionsmedium dispergiert wird.

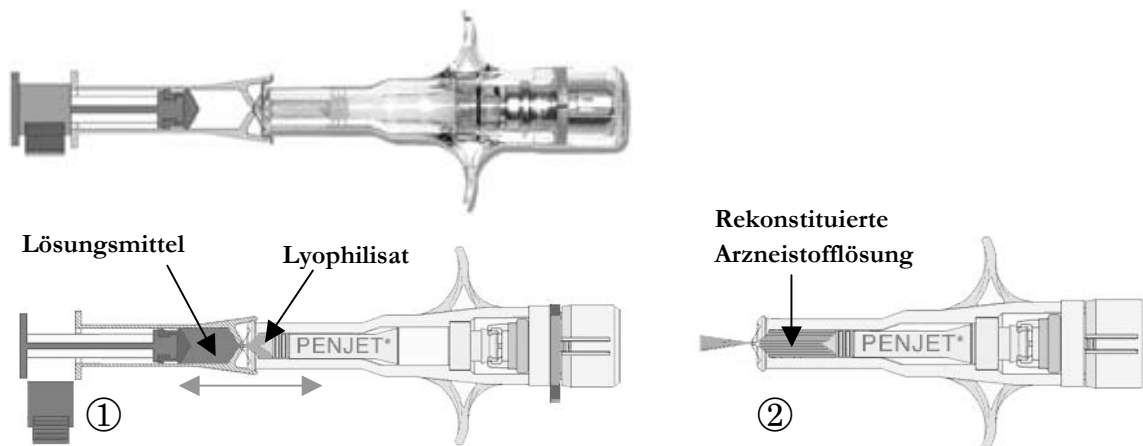


Abb. 36: Abbildung des Penjet® (oben) und schematische Darstellung des Arbeitsprinzips (unten): 1) Mischen von Lösung und Feststoff mit Hilfe des Kolbens im Aufsatz, 2) Injektion der rekonstituierten Arzneistofflösung (entnommen von der Homepage des Herstellers Penjet Corporation, [www.penjet.com](http://www.penjet.com))

Die Injektion von Lösungen ist allerdings selbst bei Verwendung eines nadellosen Systems nicht völlig schmerzlos. Im Gegensatz zur Flüssiginjektion kommt es bei ballistischer Pulverinjektion, aufgrund der um das 50 – 500 fache niedrigeren injizierten Menge, nicht zu Gewebeschäden, so dass Pulverpartikel völlig schmerzfrei appliziert

werden können (198, 199). Das einzige System, welches nach diesem Prinzip arbeitet, ist der PowderJect von PowderJect Pharmaceuticals PLC, entwickelt als single use, reusable und orales System. Die Systeme bestehen aus einer Energiequelle, einem Helium-Mikrozylinder, einem Silencer mit Düse und einer Kassette, welche mit dem zu applizierenden Pulver gefüllt und durch zwei zerreibare Plastikmembranen verschlossen ist (Abb. 37, Abb. 38). Das System wird im 90 ° Winkel auf die Haut aufgesetzt und der Auslöser betätigt. Durch den Druckimpuls des freigesetzten Heliumgases zerreißen die Membranen der Pulverkartusche, die Partikel verlassen mit einer Geschwindigkeit von ca. 200 bis 800 m/s das System und durchdringen die oberen Hautschichten. Je nach Form der Düse, nach Gasdruck und Partikelgröße, -dichte und -festigkeit werden unterschiedlich große Eindringtiefen erzielt. Das System soll für jede Art von kleinen Molekülen, Peptiden, Proteinen, Vaccinen und DNA verwendbar sein. Die eingesetzten Partikel müssen möglichst kompakt sein und in einem Größenbereich von 2 – 100 µm liegen (200, 201). Ein Problem stellt die relativ geringe Bioverfügbarkeit dar. Bereits 1996 wurden von Sarphe et al. eine Bioverfügbarkeit (im Vergleich zu subcutaner Injektion) von Inulinpartikeln der Größe 39 – 52 µm von nur 33 % festgestellt (202) und bis heute konnte keine deutliche Verbesserung erzielt werden. Der Beschuss mit größeren Partikeln führt zwar, aufgrund der größeren Eindringtiefe, zu etwas besseren Bioverfügbarkeiten (202, 203), allerdings kommt es dabei zu Hautirritationen. Die ausgelösten Mikroblutungen können neben der Auswaschung der Arzneistoffe, zu Entzündungs- bzw. Wundheilprozessen führen, welche sich nachteilig auf die Wirkstoffresorption auswirken. Des weiteren können mit dem PowderJect insgesamt nur 2 - 4 mg Substanz abgegeben werden, so dass sich das System nur für hochpotente, niedrig dosierte Wirkstoffe eignet. Dennoch birgt es besonders für Impfungen, bei welchen eine etwas niedrigere Bioverfügbarkeit toleriert werden kann, ein vielversprechendes Potential. Erste klinische Versuche an zwölf Probanden zur Hepatitis B-Impfung scheinen diese Annahme zu bestätigen. Für 2003 hat der Hersteller in Zusammenarbeit mit dem Pharmakonzern GlaxoSmithKline erste klinische Versuche zur intradermalen Applizierung von DNA-Impfstoffen gegen die Immunschwächekrankheit AIDS angekündigt.

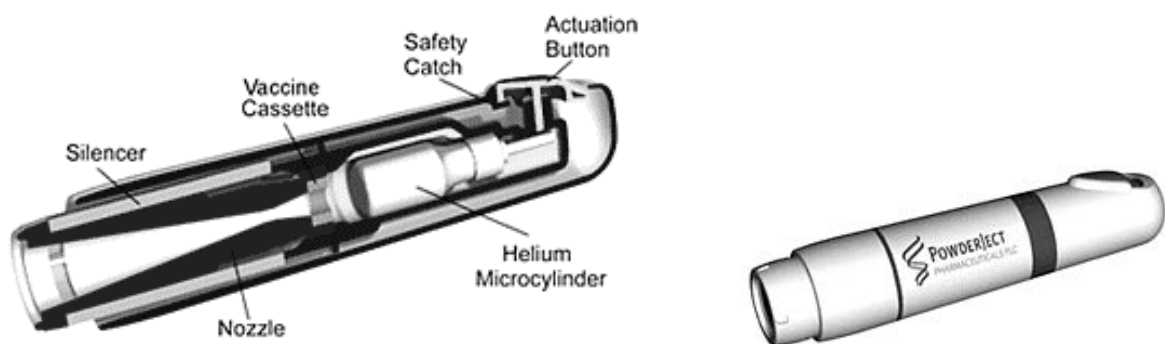


Abb. 37: Bestandteile des PowderJect bei der single-use Ausstattung (links) und Abbildung eines Prototypen (rechts). (entnommen von der Homepage des Herstellers)

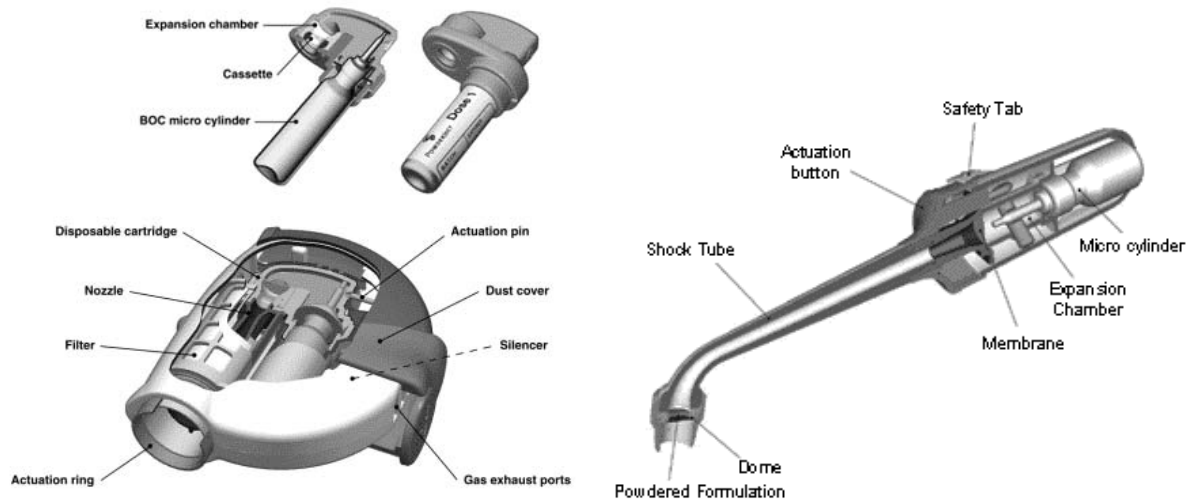


Abb. 38: Bestandteile des Powderject bei wiederverwendbarer Ausstattung (links) und für orale Anwendung (rechts). (von der Homepage des Herstellers)

Eine Alternative zur pulvergefüllten Kartusche (s.o.) könnte die direkte Platzierung von festen Partikeln auf den Membranen darstellen. Durch den Druckimpuls des Heliumgases würden die anhaftenden Partikel abgelöst und beschleunigt, wodurch eine direktere Kraftübertragung auf die Partikel erfolgen würde. Es wäre denkbar mehrere verschweißte Einzeldosen wie bei einem Pulverinhalator (Diskhaler) in das System einzulegen und erst bei Gebrauch durch Drehung die jeweilige Dosis in die „Schussposition“ zu bringen. Um die Übertragung von Krankheitserregern zu unterbinden, könnte ein System konstruiert werden, bei dem Silencer und Arzneistoffmembran in einem Teil zusammengefasst sind, welches für jede Injektion in das ansonsten wiederverwendbare Gerät eingelegt wird. Die Herstellung dieser Membranen wäre mit Hilfe der Biodotmethode (siehe C.II) denkbar. Partikel, welche auf diese Weise gebildet werden, weisen im Gegensatz zu sprüh- oder gefriergetrockneten Partikeln eine größere Dichte auf, wodurch größere Eindringtiefen und damit höhere Bioverfügbarkeiten erzielt werden könnten.

Eine andere Variante Partikel intradermal zu applizieren, stellt die patentierte „Sling Shot Technologie“ dar (182). Dabei wird ein (oder mehrere) auf einer Schlaufe aufgebrachte Partikel mit Hilfe einer Art „Miniatur Steinschleuder“ in die Haut geschleudert (Abb. 39). Die Schleuder wird über elektromagnetische Abstoßungskräfte, hervorgerufen durch einen Stromimpuls, ausgelöst. Auch hier könnten die Partikel auf der Schleuder durch die Biodotmethode aufgebracht werden.

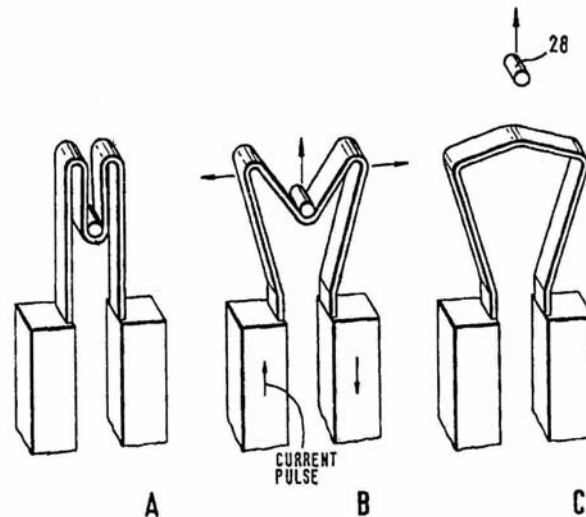


Abb. 39: Prinzip der Sling Shot Technik. Der Arzneistoffpartikel ist mit „28“ bezeichnet. Durch einen Stromimpuls kommt es zur elektromagnetischen Abstoßung der zwei Schenkel der Schleuder. (entnommen aus Patent, 182)

Eine weitere Methode zur transdermalen Applikation wird in der Veröffentlichung von G.G.P. van de Wijdeven (204) beschrieben. Hierbei handelt es sich um aus thermoplastischem Starch hergestellte Miniprojektile, welche mit Arzneistoff befüllt und mittels Druckluft in Versuchstiere geschossen werden. Die dabei verursachten Hautverletzungen entsprachen den in der Veterinärpraxis üblichen Nadelstichen (Abb. 40).

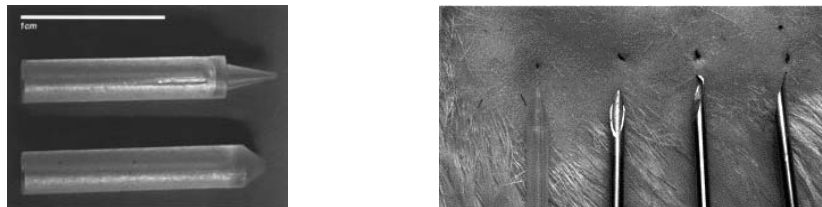


Abb. 40: Photographie von PLA-Miniprojektilen (links) und von Einstichverletzungen in Rinderhaut hervorgerufen durch das Miniprojektile und verschiedenen scharfe Nadeln (14 Gauge) (rechts). (entnommen aus 204)

Die Projektile sind 17 mm lang, 2,95 mm breit mit einer Wanddicke von 0,4 mm und wiesen ein Füllvolumen von ca. 20  $\mu$ l auf. Zur Füllung der Projektile wurden drei verschiedene Methoden verwendet. Entweder wurden die Projektile mit auf 39 °C erwärmter Arzneistoff-Fettemulsion gefüllt und abgekühlt, oder sie wurden mit wässriger Arzneistofflösung im Tiefkühlschrank befüllt und gefriergetrocknet. Bei der dritten Variante wurde ein sprühgetrockneter Arzneistoffpartikel in die Projektilhülse gelegt und diese mit Triglyceridlösung verschlossen. Besonders die letzten beiden Methoden erscheinen aufgrund des getrennt auszuführenden Trocknungsschrittes relativ aufwendig. Deutlich rationeller wäre die Trocknung der eingefüllten Lösungen mittels Warmluftbegasung. Dazu müssten die auf dem Markt befindlichen Geräte lediglich auf die Größe der Projektile umgebaut werden. Aufgrund der Größe der Projektile erscheint

es allerdings fraglich, ob sich diese zur Behandlung von Menschen durchsetzen werden, für die Behandlung oder Impfung von Herden- bzw. Wildtieren versprechen sie jedoch einige Vorteile.

Proteinarzneimittel in fester, trockener Form ermöglichen also nicht nur längere Lagerzeiten bei höheren Temperaturen, sondern auch den Einsatz innovativer Applikationsmethoden.

## 6. Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, zwei neue Verfahren zur Herstellung von Proteindarreichungsformen zu entwickeln. Dabei sollten höher konzentrierte Formulierungen getrocknet werden, ohne zunächst eine Verdünnung der ProteinbULKlösung vorzunehmen. Auf diese Weise verringerte sich das zu trocknende Volumen deutlich, was zur Verkürzung der Trocknungszeiten führen und den Einsatz anderer Trocknungsverfahren ermöglichen sollte.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde das Potential des Warmluftbegasungsgerätes der Fa. Barkey zur Trocknung von 75 µl Proteinlösung untersucht. Da das Gerät üblicherweise zum Abdampfen von organischen Lösungsmitteln eingesetzt wird, sollte im Rahmen dieser Arbeit erprobt werden, ob es möglich ist, mit diesem Verfahren Wasser aus Rezepturen so zu entfernen, dass innerhalb eines vernünftigen Zeitrahmens Produkte mit Restfeuchten unter 2 % herzustellen sind. Dazu wurde der Einfluss verschiedener Geräteparameter auf den Trocknungsprozess, sowie auf die Qualität der Produkte untersucht. Des weiteren wurde untersucht, wie die Stabilität der Proteine während der Trocknung gewährleistet werden kann. Nach Optimierung der Trocknungsmethode wurden zwei Proteinformulierungen getrocknet und deren Lagerstabilität untersucht. Die Qualität dieser Produkte wurde mit Produkten, welche auf klassische Weise (Gefrier- und Vakuumtrocknung) hergestellt wurden, verglichen.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der kontrollierten Beschichtung von Oberflächen durch Applizierung und Trocknung geringer Volumina konzentrierter Proteinlösung. Mit Hilfe des Robotersystems von Cartesian Technologies wurde eine Dosis von 20 µl in 20 nl große Tropfen dispensiert, und diese in vorprogrammierten Mustern auf verschiedenen Oberflächen aufgebracht. Ziel der Arbeit war es, herauszufinden, ob es auf diese Weise möglich ist, Proteinrezepturen unter Erhalt der Proteinstabilität zu trocknen. Im Rahmen der Versuche wurden verschiedene Geräteeinstellungen und Rezepturen erprobt. Mit Hilfe der optimierten Methode wurden unterschiedliche Oberflächen dotiert und deren Einfluss auf die Qualität der Produkte hinsichtlich Restfeuchte, Haftung, Adsorption und Proteinstabilität untersucht. Weiterhin wurde das Freisetzungverhalten von betropften Xerogelen und überzogenen Produkten analysiert. Zur Erlangung einer kontrollierten, retardierten Freisetzung wurden verschiedene Polymerüberzüge mit unterschiedlichen Techniken aufgebracht und untersucht. Auch in diesem Fall wurden optimierte Produkte eingelagert und deren Lagerstabilität analysiert.





## B. MATERIAL UND METHODEN

### 1. Material

#### 1.1. Proteine

##### 1.1.1. Granulozyten Kolonie Stimulierender Faktor (rh G-CSF)

Das rekombinant in *Escherichia coli* hergestellte Protein wurde von Fa. Roche Diagnostics GmbH (D-Penzberg) als Geschenk erhalten. Es ist in einem 20 mM Natriumphosphatpuffer in einer Konzentration von 4,2 mg/ml und einem pH-Wert von 4,2 gelöst. Zur Herstellung von Rezepturen für Versuche mit dem Biodotgerät (Kapitel C.II.) wurden die Hilfsstoffe in entsprechender Menge in dieser Bulklösung gelöst und danach der pH-Wert eingestellt. Für Rezepturen für die Warmlufttrocknung (Kapitel C.I.) wurden die Hilfsstoffe in Reinstwasser gelöst und danach die Proteinbulklösung zugefügt.

##### 1.1.2. Erythropoietin (rh Epo)

Das Glykoprotein (rekombinant hergestellt in Ovarialzellen des Hamsters) wurde von Fa. Roche Diagnostics GmbH (D-Penzberg) als Geschenk erhalten. Es ist in einem 10 mM NaK<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Puffer mit 100 mM Natriumchlorid in einer Konzentration von 2,38 mg/ml und einem pH-Wert von 7,5 gelöst. Für einige Versuchsreihen wurde Natriumchlorid durch viermaliges Umpuffern mit 10 mM NaK<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer in einer Zentrifugendialysezelle (Biomax 5 K NMWL Membran, 0,5 ml Vol. Ultrafree UFV5BCC00, von Millipore D-Schwalbach) abgetrennt. Für Rezepturen zur Untersuchung des Biodotgerätes (Kapitel C.II.) wurden die Hilfsstoffe in der entsprechenden Menge direkt in der umgepufferten Bulklösung gelöst und danach der pH-Wert eingestellt. Für Rezepturen für die Warmlufttrocknung (Kapitel C.I.) wurden die Hilfsstoffe in Reinstwasser gelöst und danach die Proteinbulklösung zugefügt.

##### 1.1.3. Enzyme

Proteinase K (vom *Tritirachium album*, Lyophilisat, 30 mAnsoU/mg, EC 3.4.21.14, 1.24568.0100, Fa. Merck Eurolab GmbH, D-Darmstadt) wurde für die Versuche zur Untersuchung der Inkompatibilität mehrerer Proteine (Kapitel C.II.1.8.) verwendet. Das Lyophilisat wurde in Reinstwasser in einer Konzentration von 1 mg/ml Proteinase K gelöst.

Kollagenase (Sigma Blend™ Collagenase Type H, eine Mischung aus sieben bekannten Unterformen, Clostridiopeptidase, Prod.Nr. C8051, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München) wurde zur Spaltung von Kollagenschwämmen verwendet. Die tiefgefrorenen Lösung (0,1 mg/ml) wurde in einer Verdünnung von 1/10 eingesetzt.

## 1.2. *Hilfsstoffe*

### 1.2.1. *Zucker und andere Hilfsstoffe*

Maltose–Monohydrat (ID-Nr.: 229416222211), Mannit p.a. und Saccharose reinst (1.07653.1000) wurden von Fa. Merck Eurolab GmbH (D-Darmstadt) bezogen. D-(+)-Trehalose-Dihydrat (Order-Nr.: 1-800-854-0530) wurde von Fa. ICN Biomedicals GmbH (D-Eschwege) bezogen.

L-Phenylalanin (Art.-Nr.7256) und L-Arginin (SA 16486) wurden von Fa. Merck Eurolab GmbH (D-Darmstadt) bezogen. Um eine Verunreinigung mit Peroxiden auszuschließen, wurde Polysorbat 80 mit höchstem Reinheitsgrad eingesetzt (Serva, D-Heidelberg).

### 1.2.2. *für Xerogelee*

Xerogelee wurden aus 2 % igen Hydrogelen durch Gefriertrocknung hergestellt. Als Gelbildner wurden Ethylcellulose, Hydroxyethylcellulose, Hydroxypropylcellulose, Methylcellulose und Polyacrylat (Merck Eurolab GmbH, D-Darmstadt) eingesetzt. Die Hydrogelbildner wurden mit Reinstwasser angerieben und über Nacht quellen gelassen. Jeweils acht Gramm dieser Gellösung wurden in Plastikpetrischalen mit einem Durchmesser von 5,5 cm gefüllt und mittels Gefriertrocknung getrocknet. Folgendes Gefriertrocknungsprogramm wurde verwendet:

Einfrieren: mit 0,5 °C pro Minute auf –45 °C  
Haupttrocknung: 28 Stunden bei – 30 °C und 0,47 mbar  
Nachttrocknung: 12 Stunden bei 20 °C und 0,001 mbar

Die erhaltenen Xerogelee waren weiß und hatten eine styroporartige Konsistenz. Aus jedem Xerogelkuchen wurden vier runde Stücke mit einem Durchmesser von 2 cm und einer Höhe von 3 mm herausgestanzt und bis zu ihrer Verwendung in einem Exsikkator bei Raumtemperatur gelagert.

### 1.2.3. *für Überzüge*

Die Überzüge wurden als wässrige Dispersion oder organische Lösung aufgesprüht oder aufgetropft. Als Weichmacher wurde 15 % (m/m Filmbildner) Dibutylsebacat (Fluka, 84346, Ch-Buchs SG) eingesetzt. Als organisches Lösungsmittel diente eine Mischung von Aceton und Isopropanol im Verhältnis 1:1. Eudragit RS (Röhm, D-Darmstadt) wurde als 30 % ige wässrige Dispersion verwendet. Eudragit NE (Röhm, D-Darmstadt) wurde sowohl als 30 % ige wässrige Dispersion als auch als 2 % ige organische Lösung aufgetragen. Ethylcellulose (Ethocel premium, CAS-Nr. 009004-57-3, The Dow Chemical Company, Michigan USA) und Hydroxypropylcellulose HPC (Typ SL, Nippon Soda Co. Ltd Tokyo Japan) wurden als 2 % ige organische Lösung verwendet.

Zum Versprühen der Überzüge wurde eine Sprühdose für dünn-schichtchromatographische Anfärbungen, eine „spray gun“ (Partikeldurchmesser des Sprühnebels 15 – 20 µm, Desaga GmbH D-Heidelberg) verwendet.

### **1.3. Packmittel**

Es wurden nicht silikonisierte 2 R und 10 R Vials der Glasqualität I und nicht silikonisierten GT-Stopfen (keine Teflonisierung, keine Silikonisierung,) verwendet. Für die Stabilitätsuntersuchungen wurden die Vials verbördelt.

### **1.4. Trägermaterialien für Mikrotropfen**

Die Mikrotropfen wurden auf verschiedene plane Träger aufgebracht. Folien waren aus Polyethylen low density (PE), Nylon (PA 66) oder Teflon (PTFE, High-Tech-Teflon-Folie 0,25 mm Dicke, Reichelt Chemietechnik, Heidelberg). Teflongewebeband stammte von Fa. PTFE Spezialvertrieb (0,08 mm Dicke, Stuhr). Filter wurden von Fa. Pall (D-Dreieich) bezogen und waren aus Nylon (Nylaflo® 0,45 µm, 47 mm Durchmesser, P/N 66608), aus PVDF (FP-200, FP-Vericel™ Membrane Filter, 0,2 µm, 47 mm Durchmesser, P/N 66477) oder aus Glasfaser (Glas Fiber Filter Type A/C, 37 mm Durchmesser, P/N 66214). PTFE Filter wurden von Sartorius bezogen (PTFE Filter 0,45 µm, 47 mm Durchmesser, Order-No. 11806-47-N, D-Göttingen). Es wurden lebensmittelechte Gelatine-Platten von DGF Stoess (Gelita Gelatine weiß, reines kollagenes Eiweiß, D-Eberbach) verwendet. Kollagen-Schwämme wurden von Skin & Health Care Dr. Suwelack (HOV-Schwamm Unterspalt KA 01-023, D-Billerbeck) gestellt. Metallträger bestanden aus handelsüblicher Aluminiumfolie oder Stahl (1.4435, 2 mm Dicke). Es wurden Standardglasobjektträger (gereinigt, Kanten geschnitten, 1 mm Dicke, No. 1000000, Marienfeld) verwendet.

### **1.5. Chemikalien und Reagenzien**

Als Pufferbestandteile wurden di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat zur Analyse (1.06580.5000), Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat zur Analyse (1.06346.1000) und Natriumchlorid p.a. von Fa. Merck Eurolab GmbH (D-Darmstadt) verwendet. Zur pH-Wert Einstellung wurde 1 M Phosphorsäure oder 0,5 M Natronlauge benutzt. Reinstwasser wurde aus einer Anlage des Typs Purelab Plus® (USF Deutschland GmbH, D-Ransbach-Baumbach) gewonnen.

Für die Karl-Fischer-Titration wurden folgende Reagenzien eingesetzt. Hydranal Methanol dry (34741, maximal 0,01% Wasser) und Hydranal Coulomat AG (34836) wurden von Riedel-de-Haën über Sigma Aldrich Laborchemikalien GmbH (D-Seelze) bezogen.

## 2. Methoden

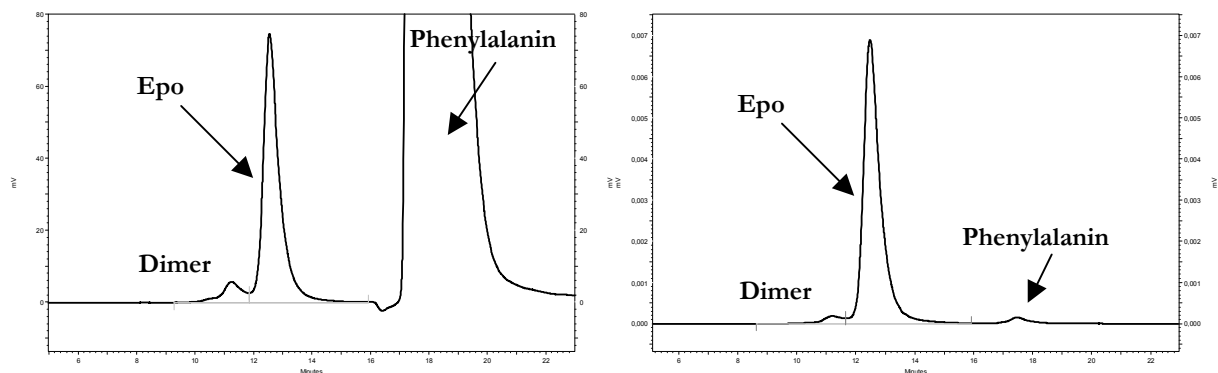
### 2.1. Analytik

#### 2.1.1. Größenausschlusschromatographie (SE-HPLC)

Die Stabilität der Proteine, speziell die Bildung von Dimeren, Aggregaten und Fragmenten wurde mittels SE-HPLC auf einer Anlage der Fa. Thermoquest (D-Darmstadt) mit einer Pumpe der Fa. Pharmacia untersucht. Die Raumtemperatur lag konstant bei 20 °C. Als Trennsäule wurde eine TSK-Gelsäule G3000SW<sub>XL</sub> (7,8 mm ID x 30 cm) der Firma Tosio Biosep (D-Stuttgart) verwendet. Die Detektion der getrennten Moleküle erfolgte photometrisch durch UV-Detektion (Spektra Series UV 100) bei 215 nm und in einigen Analysen zusätzlich durch Fluoreszenzdetektion (Spektra System Fl3000, Excitation 280 nm und Emmission 344 nm). Als Fließmittel wurde 0,1 M Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,0 und Zusatz von 0,2 M Natriumchlorid verwendet. Die Flussrate betrug 0,7 ml/min und das Injektionsvolumen 50 µl. Zur Auswertung wurde ChromQuest3-Software der Fa. Thermoquest verwendet. Es wurden area und area % aller Aggregate, Dimere, des Monomers und der Fragmente erfasst.

Alle Proben wurden vor der Analyse mit Reinstwasser gelöst und auf 1/30 der Bulkkonzentration verdünnt. Dies entspricht einer Konzentration von 0,14 mg/ml für G-CSF und einer Konzentration von 0,08 mg/ml für Epo. Proben aus der Warmlufttrocknung wurden mit 225 µl Reinstwasser und Proben aus der Applikation mittels Biodotgerät mit 600 µl Reinstwasser durch leichtes Schütteln rekonstituiert (siehe auch 2.1.10). Die Auflösung der Protein-Zucker-Matrix erfolgte innerhalb weniger Sekunden bis maximal einer Minute.

Die folgenden Abbildungen (Abb. 41, Abb. 42) zeigen typische SE-HPLC-Chromatogramme. Epo weist eine Retentionszeit von ca. 12,5 Minuten auf. Die dargestellte Epo-Probe enthielt 3 % Dimere (Retentionszeit 11,5) und keine Aggregate (Retentionszeit 8,7). G-CSF weist eine Retentionszeit von ca. 15 Minuten auf. Die dargestellte G-CSF-Probe enthielt 7,3 % Dimere (Retentionszeit 13,4) und keine Aggregate (Retentionszeit 8).



**Abb. 41: Typische SE-HPLC-Chromatogramme einer Epo-Rezeptur (mit Saccharose, Polysorbat 80 und Phenylalanin). Links: UV-Detektion, rechts: Fluoreszenzdetektion**

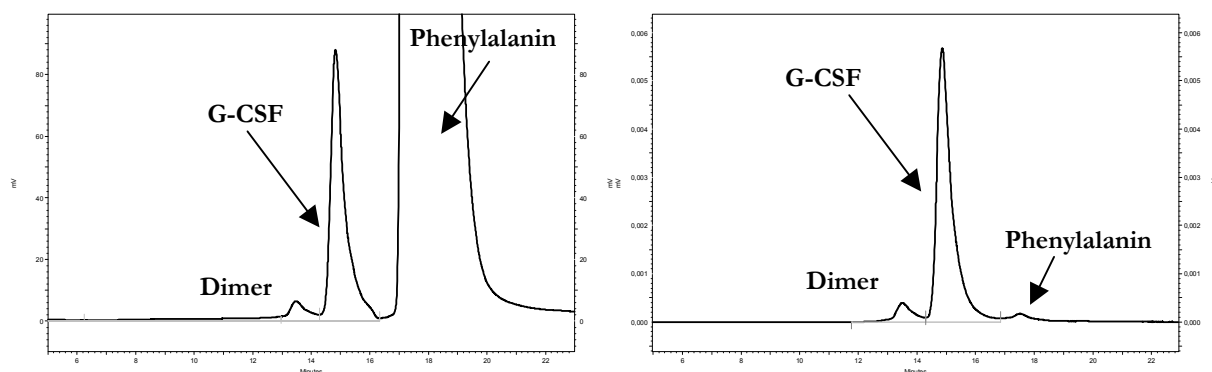


Abb. 42: Typische SE-HPLC-Chromatogramme einer G-CSF-Rezeptur (mit Saccharose, Polysorbat 80 und Phenylalanin). Links: UV-Detektion, rechts: Fluoreszenzdetektion

### 2.1.2. Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Erfassung von höhermolekularen Aggregaten und zur qualitativen Bewertung wurden die Proben mittels Gelelektrophorese untersucht. Die Proteine wurden unter reduzierten (DTT 1mg/ml Probenpuffer) und nicht reduzierten Laufbedingungen im SDS-Polyacrylamidgel (10 % ige Novex®, NUPAGE-Gele, Invitrogen GmbH, D-Karlsruhe) anhand ihres Molekulargewichtes aufgetrennt und durch Silberfärbung (SilverXpress® Silver Staining Kit, Invitrogen GmbH, D-Karlsruhe) sichtbar gemacht. Alle Proben wurden auf eine Konzentration von 1 bis 2 µg pro Bande mit Probenpuffer (0,25 mol/l Tris, 4 % SDS, 20 % Glycerin, 0,001 % Bromphenolblau, pH-Wert 6,8) verdünnt. Als Referenz wurde auf jedes Gel frisches Protein (Epo oder G-CSF) und ein Molekulargewichtsmarker (Mark™ 12) aufgetragen. Als Laufpuffer wurde MES-Puffer (Invitrogen GmbH, D-Karlsruhe) verwendet. Die entwickelten Gele wurden auf Nebenbanden, hervorgerufen durch Dimere, höhermolekulare Aggregate oder Fragmente, untersucht. Die Auswertung der elektronisch eingescannten Gele erfolgte mittels Biometra ScanPack® Software 3.0.

### 2.1.3. Restfeuchte mittels Karl-Fischer-Titration

Die Restfeuchte der Proben wurde mittels coulometrischer Karl-Fischer-Titration mit einem Coulometer ohne Diaphragma der Fa. Metrohm (KF 373, Metrohm GmbH & Co, D-Filderstadt) bestimmt. Da die Aufnahme von Feuchte aus der Umgebungsluft gerade bei Proben mit sehr geringer Masse einen großen prozentualen Unterschied ausmachte, wurde folgendes Verfahren entwickelt:

Die Proben wurden mit ca. 1 ml wasserfreiem Methanol durch Injektion durch die Stopfen befüllt und soweit möglich gelöst. Proben, in denen sich auch nach Einsatz des Vortexers und 15 minütiger Ultraschallbehandlung der Bodensatz nicht vollständig auflöste, wurden zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich das gesamte Wasser gelöst hatte, wurde weiter verwendet. Die Injektion von Methanol in die Proben musste unter

Stickstoffbegasung in einer Glove Box erfolgen, da es sonst während der Befüllung zu einem starken Anstieg der Restfeuchte des Methanols (Abb. 43) und damit zu verfälschten Werten gekommen wäre. In der Glove Box wurde mit Hilfe von Stickstoff 5.0 aus der Hausleitung eine relative Luftfeuchte von 9 % eingestellt. Der nächste Schritt der Analyse, die Einspritzung der Lösung in das Karl-Fischer-Gerät, wurde aus praktischen Erwägungen wieder an Raumluft durchgeführt. Solange die Lösung sofort nach Öffnung des Vials entnommen wurde und keine zweite Einspritzung aus dem selben Vial erfolgte, kam es hierbei zu keiner Verfälschung der Werte durch die Feuchte der Luft. Es wurden ca. 500 µl der Probenlösung oder des Überstandes in das Coulometer eingespritzt. Der Wassergehalt der eingespritzten Probe wurde vom Gerät automatisch gemessen und in µg ausgegeben. Daraus wurde die Restfeuchte der Probe mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$\left[ \left( \frac{\text{Wasser}(\text{Einspritzung})}{m(\text{Einspritzung})} \right) \times m(\text{Methanol}) - [\text{Feuchte}(\text{Methanol}) \times m(\text{Methanol})] \right] / m(\text{Probe}) \times 100$$

Alle in der Formel enthaltenen Massen wurden durch Differenzwägung (z.B. vor/nach der Einspritzung) bestimmt. Die Feuchte des Methanols (Blindwert) wurde mit Hilfe von fünf genauso befüllten und vermessenen leeren Vials (Blindvials) bestimmt. Da es unerheblich war, welcher Vorbehandlung die Blindvials unterzogen wurden, wurden normale leere Vials aus dem Vorrat verwendet. Wichtig war lediglich, dass die Befüllung unter der Glove Box bei definierter relativer Luftfeuchte von 9 % erfolgte (Abb. 43).

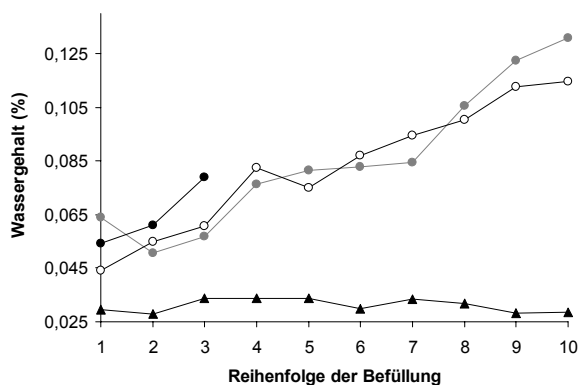


Abb. 43: Einflüsse auf die Restfeuchte von Methanol in Blindvials. Mehrere Vials wurden hintereinander mit wasserfreiem Methanol aus einem offenen Becherglas befüllt und die Feuchte des Methanols bestimmt. Die Befüllung erfolgte an Raumluft: ● normales Vial, ○ mit N<sub>2</sub> begastes Vial, ● lyophilisiertes Vial. Die Befüllung dieser Vials erfolgte unter der Glove Box bei konstant 9 % rel. Feuchte ▲ normales Vial.

#### 2.1.4. Differential Scanning Calorimetrie (DSC)

Die thermodynamische Charakterisierung der Proben bezüglich ihrer Glasübergangstemperatur und ihres physikalischen Zustandes erfolgte mittels Differential Scanning Calorimetrie. Die Proben wurden mit einem Spatel aus den Vials gekratzt bzw. von den Trägern abgekratzt und in Aluminiumtiegel (Netzsch) überführt. Die Tiegel wurden mit

einer Universalpresse (Netzsch) verschlossen. Um eine Probenmasse von 2 - 10 mg zu erhalten, mussten die Proben mehrerer Vials vereinigt werden. Üblicherweise wurde die Probenvorbereitung unter Normalbedingungen an Raumluft durchgeführt, wodurch jedoch die Restfeuchte von sehr trockenen Produkten durch Wasseraufnahme aus der Raumluft leicht anstieg. Dieser Anstieg der Restfeuchte führte zu einer minimalen Erniedrigung der Glasübergangstemperatur  $T_G$  und wurde als „worst case“ in Kauf genommen. Zur exakten Bestimmung der Glasübergangstemperaturen  $T_G$  einiger Produkte wurden diese unter Stickstoffbegasung in einer Glove Box abgefüllt.

Im Folgenden sind die Geräteparameter aufgeführt:

Gerät:	Netzsch DSC 204 Phoenix, Netzsch GmbH (D-Selb)
Sensor:	DSC 204 t-sensor /E
Spülgas:	Stickstoff 5.0
Kühlung:	Flüssiger Stickstoff
Tiegel:	Alutiegel (ohne Lochung)
Auswertung:	Thermal Analysis Software Version 4.1.2
Temperaturprogramm:	Schnelle Abkühlung auf -50 °C Aufheizung von - 65 °C bis + 90 °C Isotherm für 2 min bei 90 °C
Heizrate:	10 K/min (bzw. 20 K/min für einige ST-Proben)

Zur Beurteilung ihres physikalischen Zustandes wurden die Proben auf das Vorhandensein eines Glasübergangs untersucht. Nur voll- oder teilamorphe Proben wiesen einen charakteristischen sigmoiden Kurvenverlauf, infolge  $\Delta C_p$  Änderung, auf (Abb. 44). Die Glasübergangstemperatur  $T_G$  der Proben wurde durch die Halbumwandlungstemperatur, die Temperatur bei der  $C_p$  genau zwischen der extrapolierten Wärmekapazität des Glases und des flüssigen Zustandes liegt (205), bestimmt.

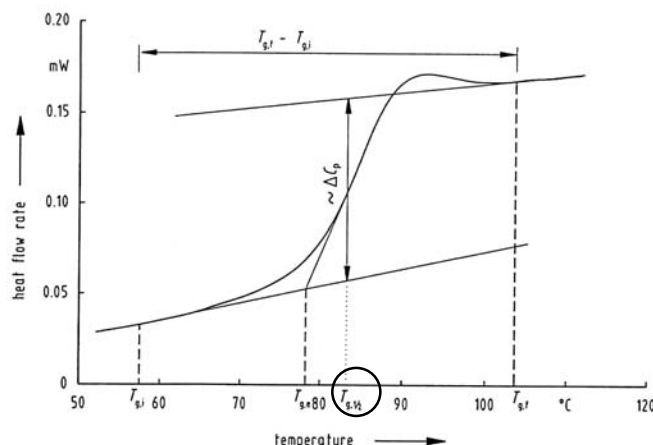


Abb. 44: Darstellung der charakteristischen sigmoiden Kurve eines Glasübergangs und Bestimmung der Halbumwandlungstemperatur  $T_G$  (206).

Zur Charakterisierung des Trocknungsverlaufes der Warmluftbegasung wurden während der Trocknung zu unterschiedlichen Zeiten Proben entnommen und mittels DSC untersucht. Alle Proben wurden nach der Existenz eines Wasserschmelzpeaks und hinsichtlich der Größe dieser Peaks charakterisiert. In Proben aus dem späteren Verlauf der Trocknung wurde die Glasübergangstemperatur  $T_G$  bestimmt.

#### 2.1.5. Partikelbestimmung (PAMAS)

Zur Bestimmung nicht sichtbarer Partikel wurde das Lichtblockadegerät der Fa. Partikelmess- und Analysysteme GmbH (PAMAS-SVSS-C, Sensor HCB-LD-25/25, D-Rutesheim) verwendet. Nicht sichtbare Partikel können unlösliche Proteinaggregate, feinste Staubteilchen oder Absplitterungen des Primärpackmittels sein. Letztere Beiden werden durch Spülen der Vials und Filtration der Rezeptur vor Abfüllung minimiert, so dass mit dieser Methode – nach Abzug des Blindwertes von Wasser - hauptsächlich Proteinaggregate erfasst werden.

Alle Proben wurden mit 3 ml Reinstwasser unter vorsichtigem Schwenken rekonstituiert, 10 Minuten stehen gelassen um eventuell vorhandene Luftblasen zu entfernen und vermessen. Folgende Messeinstellungen wurden verwendet:

Vorlaufvolumen: 0,3 ml	Spülvolumen: 0,3 ml	Messvolumen: 0,5 ml
Füllrate: 7 ml/min	Leerrate: 10 ml/min	Spülrate: 7 ml/min

Zur Auswertung wurde die Software PMA (Partikelmess- und Analysenprogramm Version 1.28 der Fa. Pamas) verwendet. Alle Daten resultieren aus dem Mittelwert dreier hintereinander ausgeführter Messungen.

#### 2.1.6. Röntgenpulverdiffraktometrie (XRD)

Für die Röntgenbeugungsuntersuchungen wurde ein STOE-Pulverdiffraktometer Stadi P mit parafokussierender Transmissionsgeometrie (Debye-Scherrer-Geometrie) verwendet. Die Proben wurden mit Cu-K $\alpha_1$ -Strahlung ( $\lambda = 154,05 \text{ pm} = 1,5405 \text{ \AA}$ ) vermessen. Als Primärmonochromator diente Germanium (111). Die Proben wurden aus jeweils 2 bis 3 Vials herausgekratzt, miteinander vermischt und in Kapillarröhrchen aus Lindemannglas (Fa. Hilgenberg) mit einem Innendurchmesser von 0,3 mm eingeschmolzen. Um eine zufällige Orientierung der Kristallite sicherzustellen, wurde die Probe zur Messung in Rotation versetzt. Die Detektion erfolgte mittels linearem PSD-Flächendetektor (OED = ortsempfindlicher Detektor). Die Auswertung der Pulverdiffraktogramme erfolgte mit dem Programm WinXPOW (Fa. STOE).



### 2.1.7. Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die Rasterelektronenmikroskopaufnahmen wurden an einem „Field Emission Scanning Electron Microscope“ JSM-6500 F (Jeol, D-Ebersberg) durchgeführt. Die Proben wurden auf Plättchen immobilisiert und mit Gold beschichtet. Die maximale Auflösung betrug 1,5 nm.

### 2.1.8. Lichtmikroskopie

Neben der optischen Kontrolle mit dem Auge wurden die betroffenen Träger auch unter dem Mikroskop (Nikon SMX-2T, D-Düsseldorf) betrachtet. Für undurchsichtige Träger und um einen Überblick über die gesamten Tropfenreihen zu erhalten wurde ein Auflichtmikroskop mit einer Vergrößerung von 0,5 x (Stufe 1) bis 2 x (Stufe 4) verwendet. Tropfen auf durchsichtigen Trägermaterialien (PP-Folie oder Glas) wurden zusätzlich mit einem Durchlichtmikroskop und in stärkerer Vergrößerung (4 x) betrachtet. Auf diese Weise war die Struktur der einzelnen Tropfen, die Form der enthaltenen Kristalle oder der voll amorphen und damit durchsichtige Charakter der Tropfen erfassbar. Von allen Bildern wurden digitale Abbildungen mittels einer Farbvideo-Digitalkamera (Digital Camera 1/2 inch CCD, JVC,TK-C1380) und dem Programm Lucia erstellt. Die Kamera verursachte eine zusätzliche Vergrößerung von 10. Die getrockneten Kuchen aus der Warmlufttrocknung wurden direkt in den Vials untersucht. Die Gefäße wurden umgedreht und die getrockneten Proben durch den Glasboden hindurch mit dem Auflichtmikroskop aufgenommen. Es wurde das Aussehen der Proben, der Unterschied zwischen voll amorphen und kristallinen Proben und die Veränderung der Struktur während der Einlagerung der Proben analysiert.

### 2.1.9. Haftung

Um die Haftung der Tropfen auf verschiedenen Trägern zu charakterisieren wurden die Träger mit Hilfe eines eigens dafür gebauten „Fallapparates“ (Abb. 45) untersucht. In den oberen Teil der Apparatur, die sogenannte Fallzelle, wurden die Träger mit der betropften Seite nach unten eingespannt. Diese Fallzelle wurde, beschwert mit 382 g Gewicht, aus 1 Meter Höhe fallengelassen und kurz vor dem Bodenkontakt durch zwei Metallklötze abrupt abgebremst. Hierdurch kam es zu einer starken Beschleunigung der an dem Träger anhaftenden Tropfen und schließlich zum Abfall weniger gut haftender Tropfen. Die Anzahl der abgefallenen Tropfen wurde optisch durch Vergleich von Mikroskopaufnahmen (Auflichtmikroskop siehe 2.1.8) der Träger vor und nach dem Fall ausgewertet. Alle Träger wurden mehrmals (1 bis 10 Mal) fallengelassen.

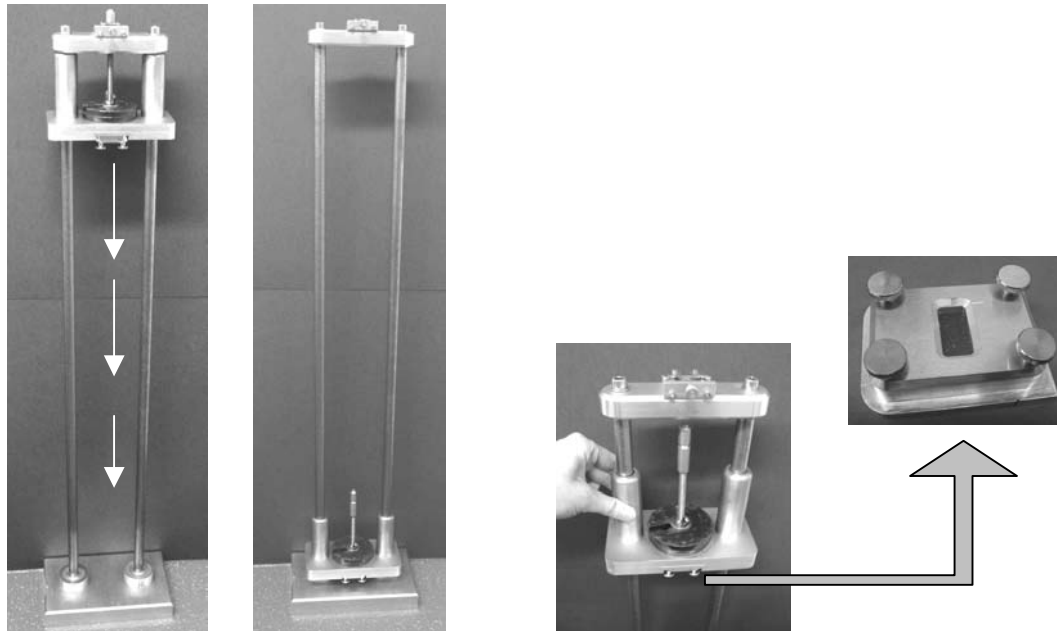


Abb. 45: Photographien der Fallapparatur. Von links nach rechts: Fallzelle oben, unten, Fallzelle in Großaufnahme und Kammer für Träger (schwarze Fläche) in der Fallzelle

#### 2.1.10. Freisetzung aus Mikrotropfen-Trägern

Zur Untersuchung der Proteinfreisetzung aus Mikrotropfen auf biegsamen Trägern (Träger in 2R-Vials) wurde 0,6 ml Reinstwasser in die Vials pipettiert (Abb. 46), die Vials geschüttelt bis alle Tropfen optisch aufgelöst waren und die Lösung mittels SE-HPLC oder SDS-PAGE untersucht. Die Auflösung der Protein-Zucker-Tropfen erfolgte innerhalb weniger Sekunden bis maximal einer Minute.

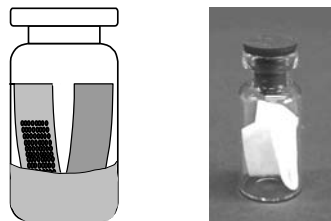


Abb. 46: Schematische und tatsächliche Darstellung der Freisetzung von Mikrotropfen auf einem Träger (im Foto Kollagen) in einem 2R-Vial

Die in der Lösung befindlichen Träger störten die Analyse üblicherweise nicht. Bei Gelatine und Kollagenschwämmen kam es jedoch zu einer Herauslösung von Kollagenfasern, welche durch ihre starke UV-Absorption die Proteinpeaks in der SE-HPLC Analytik überlagerten (Abb. 47 links). Da Kollagen nur eine minimale Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm aufweist, kann diese Überlagerung der Proteinpeaks durch Detektion mittels Fluoreszenz minimiert, wenn auch nicht völlig aufgehoben werden (Abb. 47 rechts). Da in der verwendeten Gelatine sowohl nieder- als auch hochmolekulare Gelatine enthalten war, kam es zur Überlagerung

des gesamten Chromatogrammes (Abb. 48). Deshalb war es hier nicht möglich die Protein stabilität zu untersuchen.

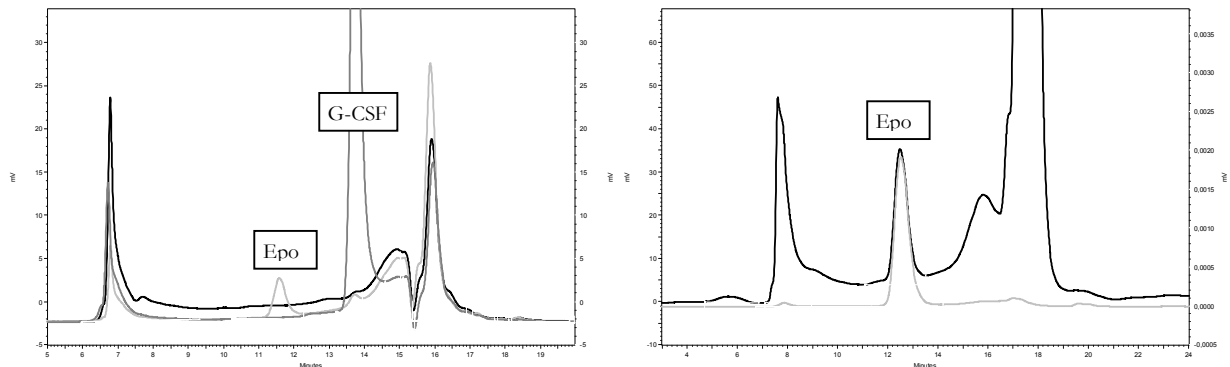


Abb. 47: SE-HPLC Chromatogramme von kollagenhaltigen Proben.

Links: Überlagerung der Peaks bei UV-Detektion. Dargestellt sind folgende Proben: Kollagenschwamm in Wasser (schwarz), und Kollagenschwamm mit G-CSF (dunkelgrau) oder mit Epo (hellgrau).

Rechts: Epo-Peak neben Kollagenpeaks bei UV-Detektion (schwarz) und Fluoreszenzdetektion (hellgrau)

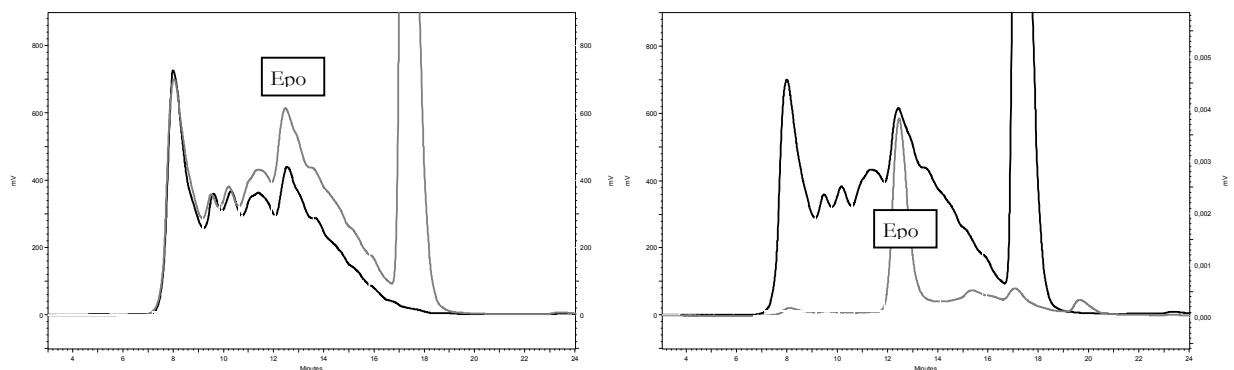


Abb. 48: SE-HPLC Chromatogramme von gelatinehaltigen Proben.

Links: Überlagerung der Peaks bei UV-Detektion. Dargestellt sind folgende Proben: Gelatine in Wasser (schwarz) und Gelatine mit Epo (grau).

Rechts: Epo-Peak neben Gelatinepeaks bei UV-Detektion (schwarz) und Fluoreszenzdetektion (grau)

### 2.1.11. Freisetzung aus überzogenen Mikrotropfen-Trägern oder aus festen Trägern

Zur Untersuchung der Proteinfreisetzung aus überzogenen Trägern oder aus Mikrotropfen auf festen Trägern (Stahl, Glasobjektträger) wurde eine eigens gebaute Freisetzungszelle verwendet (Abb. 49, Abb. 50). Die Abmessungen der Variante 1 betragen 5 cm x 1,5 cm x 0,5 cm, mit einem Volumen von 3,75 ml. Die Abmessungen der Variante 2 betragen 4 cm x 2,5 cm x 0,5 cm. Diese Kammer besitzt ein Volumen von 5 ml. Die Plastikzelle besteht aus einer von einem Dichtungsring abgeschlossenen Kammer (in der Abbildung mit "H<sub>2</sub>O" bezeichnet), welche über 4 Schrauben auf einer Stahlplatte befestigt ist. In diese Kammer wurde das Freisetzungsmittel Reinstwasser eingebracht. Die zu untersuchende Probe wurde auf die Stahlplatte aufgebracht. Je nachdem auf welchem Träger sich die Mikrotropfen befanden, erfolgte diese Aufbringung auf unterschiedliche Weise. Handelte es sich um einen Stahlträger, so wurde dieser direkt an

die Kammer geschraubt. Ein Glasobjektträger wurde in eine Aussparung innerhalb der Stahlplatte gelegt (Abb. 50 rechts), während eine überzogene PP-Folie auf eine zweite PP-Folie und dann auf die Stahlplatte gelegt wurde (Abb. 49). Durch die zweite Folie wurde ein einheitlicher Untergrund geschaffen und eine Aggregation durch die Stahlplatte verhindert.

Die Kammer wurde mit 1,5 ml Reinstwasser befüllt, wenn es sich um eine Freisetzung von Protein aus Tropfen auf festen Trägern handelte. Die Zelle wurde leicht geschwenkt bis alle Tropfen optisch gelöst waren. Die Bewegung erfolgte möglichst vorsichtig, um eine Aggregation durch Scherstress am Zellenboden und an der Zellenwand zu unterbinden. Die gelöste Probe wurde mittels SE-HPLC oder SDS-PAGE untersucht.

Sollte die Freisetzung aus überzogenen Proben über einen längeren Zeitraum hinweg untersucht werden, so wurde die Kammer mit 3 ml Reinstwasser befüllt. In regelmäßigen Abständen wurden 100 µl aus dem FreisetzungsmEDIUM der Kammer entnommen und durch frisches Medium ersetzt. Vor und nach jeder Entnahme wurde die Zelle vorsichtig geschwenkt, um eine Durchmischung der Medien zu erreichen. Der Proteingehalt in den entnommenen Proben wurde per SE-HPLC oder SDS-PAGE untersucht. Die Freisetzung wurde über ein bis vier Tage bei Raumtemperatur (ca. 25°C) untersucht.

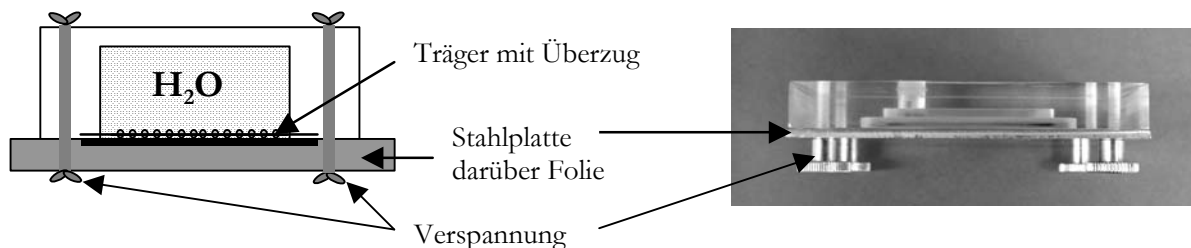


Abb. 49: Schematische Darstellung der Freisetzungszelle für überzogene Träger

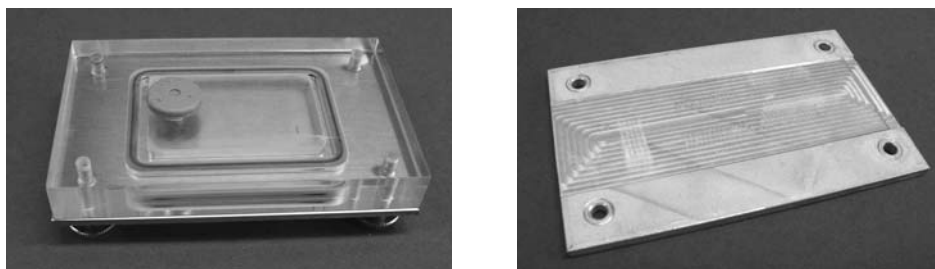


Abb. 50: Photographie der Freisetzungszelle (links) und der Metallschiene für Glasobjektträger (rechts)

### 2.1.12. Freisetzung aus Xerogelen

Zur Untersuchung der Proteinfreisetzung aus dotierten Xerogelen wurde eine von R. Schmidt entwickelte Freisetzungszelle verwendet (Abb. 51). Die Plastikzelle besteht aus zwei durch eine Membran getrennte Kammern. In einer Kammer befand sich das rekonstituierte Xerogel, in die andere Kammer wurde das FreisetzungsmEDIUM Reinstwasser eingebracht (Höhe jeweils: 1 cm, Durchmesser: 2 cm, Volumen der

Mediumkammer: 0,4 ml). In regelmäßigen Abständen (20, 30 oder 60 Minuten) wurde das Freisetzungsmedium über den Zu- und Abfluss mit einer Insulinspritze entfernt und die Kammer mit frischem Medium befüllt. Der Proteingehalt im entnommenen Freisetzungsmedium wurde per SE-HPLC oder SDS-PAGE untersucht. Die Freisetzung erfolgte bei Raumtemperatur (ca. 22 °C).

Abstandshalter auf der unteren Seite der Kammer garantierten einen direkten Kontakt des Xerogels zur Membran. Das Xerogel wurde kurz vor dem Versuch in der Kammer rekonstituiert. Dazu wurde genau die gleiche Menge Reinstwasser verwendet, welche vor der Trocknung im Hydrogel enthalten war. Um eine weitere Wasseraufnahme des Gels aus dem Freisetzungsmedium zu verhindern, wurde die Mediumkammer durch eine massive Platte mit Löchern von der Gelkammer abgetrennt. Diese Platte begrenzte das dem Gel zur Verfügung stehende Volumen und verhinderte dadurch eine Aufquellung des Gels durch weitere Wasseraufnahme.

Die Membran (11106-25-N, Sartorius AG, D-Göttingen) bestand aus Celluloseacetat und hatte eine Porenweite von 0,45 µm. Sie garantierte einen ungehinderten Durchtritt von gelösten Proteinen, hielt aber ungelöstes gequollenes Gelmaterial zurück. Geringe Mengen an gelöstem Gelmaterial konnten die Membran zwar passieren, störten die SE-HPLC Analytik jedoch nicht. Um vergleichbare Bedingungen zu erhalten, wurde die Membran vor jedem Versuch über Nacht zum Quellen in Reinstwasser eingelegt. In Vorversuchen wurde eine Adsorption von 20 % Protein (m adsorbiert / m eingesetztes Protein) an der Membran festgestellt. Innerhalb des verwendeten Konzentrationsbereiches lag die Adsorption immer konstant bei 20 %. Deshalb wurde in allen Freisetzungsuntersuchungen ein Verlust von 20 % Protein eingerechnet.

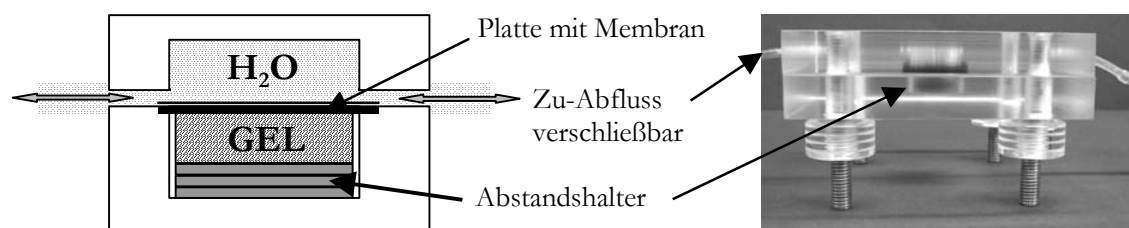


Abb. 51: Schematische Darstellung der Freisetzungszelle für Xerogele

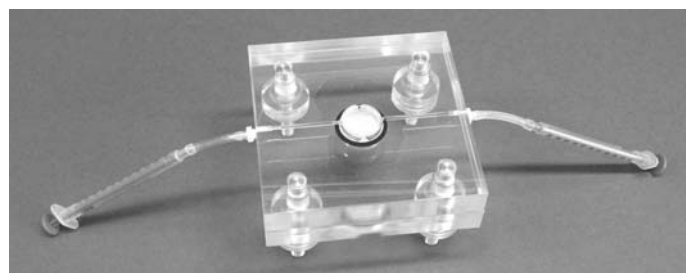


Abb. 52: Photographie der Freisetzungszelle für Xerogele

### 2.1.13. Bestimmung der Oberflächenspannung

Die Oberflächenspannung der Rezepturen (jeweils 4 ml) wurde mit Hilfe eines Ringtensiometers mit Platin-Iridiumring (Nr.1245, Fa. Krüss, D-Hamburg) nach der Methode von Lecomte du Noüy bestimmt. Es wurden mindestens drei Messungen durchgeführt und der Mittelwert berechnet.

## 2.2. Prozessanlagen

### 2.2.1. Warmluftbegasungsgerät

Zur Warmlufttrocknung wurde ein Gerät der Fa. Barkey GmbH & Co. KG (D-Leopoldshöhe) verwendet, eine Kombination aus „Flowtherm FN 4604500“ (Begasung) und „Labotherm“ (Heizblock) (Abb. 53, Abb. 54).

Das Gerät besitzt 10 beheizbare Stellplätze für 2-R-Vials. In die Vials wurde trockener, erwärmter Stickstoff 5.0 über abgeschnittene Eppendorfspitzen eingeleitet. Der Druck des Stickstoffs wurde auf 0,5 bar und die Durchflussmenge auf 1,1 Liter/Minute/Vial eingestellt. Sowohl die Heizung der Vials, als auch die des Stickstoffs wurden getrennt geregelt. Es wurden verschiedene Kombinationen getestet, für die Bodenheizung wurden Temperaturen zwischen Raumtemperatur (ca. 25 °C) und 60 °C und für die Gasheizung Temperaturen zwischen Raumtemperatur (ca. 25 °C) und 250 °C eingestellt. Die für das Gas eingestellte Temperatur wurde nur innerhalb des Heizkopfes erreicht, bereits am Ende der Düsen stellte sich eine deutlich geringere, aber konstante Temperatur ein (Tab. 1). Um eine Abkühlung des Gases beim Austritt aus den Spitzen – aufgrund der Expansion des Gases durch die Verengung der Eppendorfspitzen – zu verhindern, wurden diese auf 2,5 cm gekürzt. Dies ermöglichte einen Öffnungsdurchmesser der Spitzen von 3 mm (Abb. 53).

Die innerhalb der Vials erreichte Temperatur lag durch die Wärmezufuhr des Gases immer etwas höher als die durch die Bodenheizung allein erreichte Temperatur. Innerhalb der zehn Stellplätze kam es zu Temperaturschwankungen von  $\pm 1^\circ\text{C}$ . Um reproduzierbare Bedingungen an verschiedenen Tagen zu erhalten, waren identische Umgebungsbedingungen nötig. Deshalb wurde das Gerät an einer geschützten Stelle im Abzug aufgestellt.

Eingestellte Temperatur °C	50	100	150	250
Gemessene Temperatur an der Düse °C	30	41	50	70

**Tab. 1: Gegenüberstellung von eingestellter Gastemperatur und am Gasaustritt der Eppendorfspitzen erreichter Temperatur**

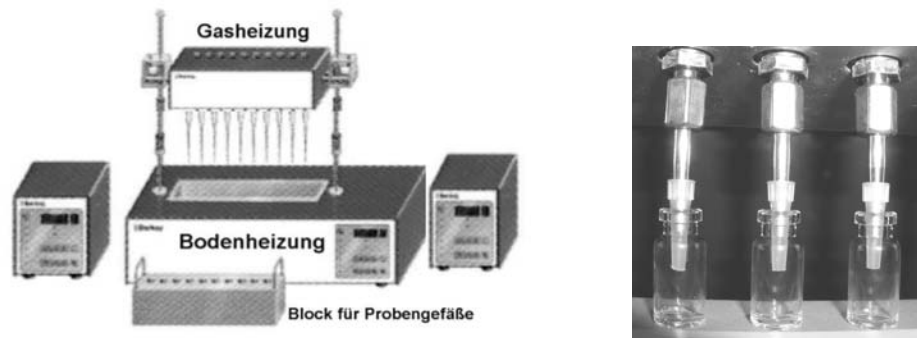


Abb. 53: Links: Schematische Darstellung der Warmluftbegasungsanlage. Rechts: Großaufnahme der Metalldüsen mit aufgesteckten, abgeschnittenen Eppendorfspitzen

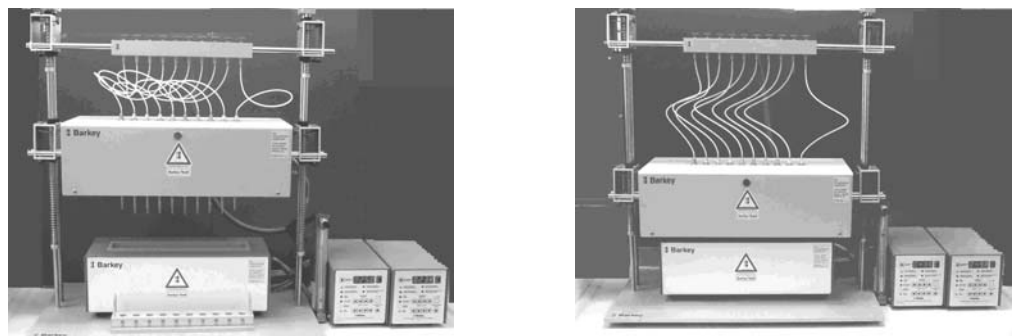


Abb. 54: Photographien der Warmluftbegasungsanlage. Links: Der Begasungsblock ist hochgefahren und der Block für die Vials vor der Bodenheizung platziert. Rechts: Anlage im Funktionszustand

### 2.2.2. Mikrotropfenroboter

Zur Applikation und Trocknung von Mikrotropfen wurde ein Roboterdosiersystem verwendet (Abb. 55). Es besteht aus dem Biodotsystem („BioJetQuanti 3000 Dispenser“ (nQuat™) mit „PixSys 3200 platform“) der Firmen Cartesian Technologies Inc. und Biodot Ltd (Huntingdon GB) und einer heizbaren Bodenplatte (Eigenbau, angeschlossen an ein Wasserbad).

Die technische Einstellung des Gerätes wurde wie folgt gewählt:

Achsgeschwindigkeit:	5 – 20 mm/s	(Beschleunigung: 500 mm/s <sup>2</sup> )
Spritzengeschwindigkeit zum Befüllen:	1 – 6 µl/s	(Beschleunigung: 45 µl/s <sup>2</sup> )
Spritzengeschwindigkeit beim Tropfen:	10 – 20 µl/s	(Beschleunigung: 500 µl/s <sup>2</sup> )
Befüllungsvolumen	50 µl	
Predispense:	zuerst 50 x 44 nl, danach 50 x 22 nl	
Dispense:	üblicherweise 900 Tropfen (unterschiedliche Raster)	
Tropfengröße:	üblicherweise 22 nl	
Abstand der Tropfen:	1 mm	
Temperatur der Bodenplatte:	30 °C bis 50 °C	

Die Reproduzierbarkeit und Genauigkeit des Systems lässt sich folgendermaßen bewerten:

Platzierungsreproduzierbarkeit der Plattform: 0,05 mm (laut Hersteller)

Dosierungsreproduzierbarkeit:                    5 % von Tropfen zu Tropfen (laut Hersteller)  
     3,6 % von Düse zu Düse (eigene Versuche)  
     1,2 % innerhalb einer Düse (eigene Versuche)

Genauigkeit der Dosierung:                         $\pm 7\%$  (laut Hersteller)

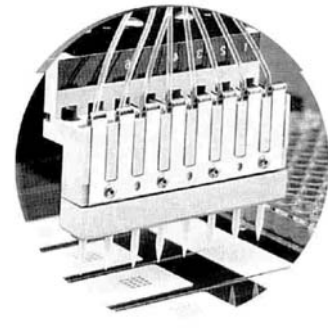
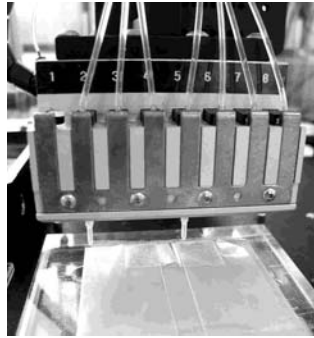
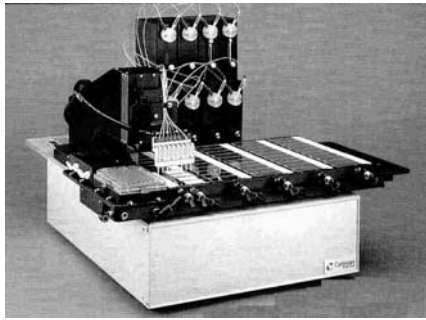


Abb. 55: Darstellung des Mikrotropfenrobotersystems. Abbildungen aus dem Herstellerkatalog (links: Gesamtes System, rechts: Dispensierkopf), Photographie der eigenen Bodenplatte mit zwei Trägern und Dispensierkopf (Mitte).

Vom System wurden Tropfen im nl Bereich gebildet und in einem programmierten Muster auf einer Oberfläche platziert. Die Tropfengröße wurde dabei von einem Schrittmotor, der eine 100  $\mu$ l Spritze antreibt, bestimmt. Ein Magnetventil in der Düse des Dispensiersystems bewirkte die Ausformung und das formgenaue Abreißen der Tropfen. Durch die Synchronisation der Roboterplattform mit dem Dispensierer konnte die Position, an der jeder einzelne Tropfen platziert wurde, bestimmt und komplizierte Muster getropft werden (Dispensierprogramm). Das System wurde zunächst mit mehr als der zu vertropfenden Dosis befüllt. Nachdem zur Konditionierung des Systems einige Tropfen in den Abfall abgegeben wurden (das sogenannte „Predispense“), wurde das eigentliche Dispensierprogramm abgearbeitet. Beim Standardprogramm wurden 20  $\mu$ l verteilt auf 450 Tropfen der Größe 22 nl in einem Muster von 30 x 15 Tropfen zweimal hintereinander abgegeben. In einem anderen Programm wurden die 900 Tropfen auf ein Muster von zweimal 10 x 45 abgegeben.



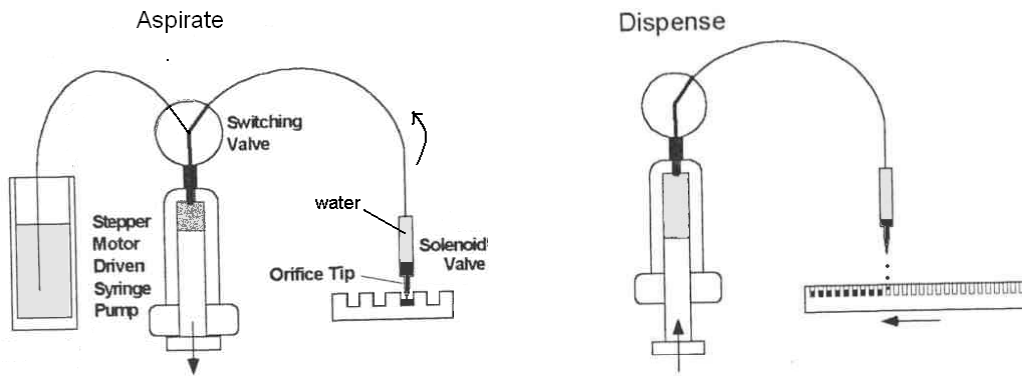


Abb. 56: Schematische Darstellung der Dispensiereinheit. Wasser ist hellgrau, Rezeptur schwarz eingefärbt. Aufsaugen der Rezeptur (links) und Dispensieren in eine Mikrotiterplatte (rechts)

Um bereits kleinste Volumina aufnehmen zu können und kein Totvolumen zu erzeugen, ist das gesamte Schlauchsystem der Anlage mit Wasser gefüllt (Abb. 56). Dadurch kam es jedoch beim Aufsaugen der Rezeptur zur Vermischung mit Wasser und damit zu einer Verdünnung der Rezeptur. Um dennoch reproduzierbare Tropfen in der eingesetzten Konzentration zu erzeugen, waren einige Vorgaben zu beachten. Es wurde grundsätzlich mindestens das Doppelte des benötigten Volumens ( $50\ \mu\text{l}$  aufgesaugt,  $20\ \mu\text{l}$  abgegeben) aufgenommen. Außerdem wurde die Geschwindigkeit der Spritze beim Aufsaugen der Rezeptur minimiert, um Verwirbelungen zu reduzieren. Durch das Predispensieren, das Abgeben von gleich großen Tropfen in den Abfall kurz bevor das eigentliche Dispensieren beginnt, wurde ein beim Aufsaugen entstandener Unterdruck ausgeglichen und das System konditioniert. Abb. 57 verdeutlicht, dass es mit den oben genannten Einstellungen nur zur Verdünnung der zu viel aufgenommenen Rezeptur kam, während die Konzentration der abgegebene Dosis ( $\blacktriangle$ ) in etwa gleich blieb.

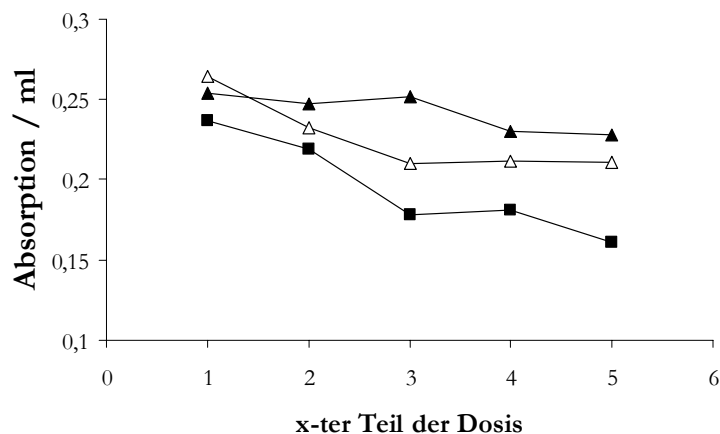


Abb. 57: Einfluss verschiedener Befüllungsmethoden auf die Gleichförmigkeit der abgegebenen Dosis.

$\blacksquare$   $30\ \mu\text{l}$  schnell aufgesaugt,  $\triangle$   $40\ \mu\text{l}$  langsam aufgesaugt,  $\blacktriangle$   $50\ \mu\text{l}$  langsam aufgesaugt. Die übliche Dosis von  $20\ \mu\text{l}$  wurde in  $4\ \mu\text{l}$  Einheiten abgegeben und jeweils der Gehalt an Fluoreszenzfarbstoff bestimmt.

### 2.2.3. Vakuumtrockenschrank

Sowohl bei der Gefriertrocknung der Xerogele, als auch bei den Vakuumtrocknungen kam die Gefriertrocknungsanlage  $\epsilon 12G$  von Fa. Christ (D-Osterode) zum Einsatz. Bei den Versuchen zur Vakuumtrocknung wurde die Anlage nur zum Anlegen von Vakuum und zur Resublimation des verdunsteten Wassers am Eiskondensator genutzt, ohne dass es zum Einfrieren der Proben kam.

Des weiteren wurden einige Versuche zu Vergleichszwecken mit einem Vakuumtrockenschrank (VTS-2, Fa. Memmert, D-Schwabach) mit Kühlfalle (Alpha 2-4, Fa. Christ, D-Osterode) und Drehschieberpumpe (Model DUO 005M, Pfeiffer, D-Asslar) durchgeführt.

## 2.3. Herstellungsmethoden

### 2.3.1. Trocknung mittels Warmluftbegasung

75  $\mu\text{l}$  Rezeptur wurden in 2R Vials gefüllt und mit dem Warmluftbegasungsgerät (siehe B.2.2.1) je nach Temperaturbedingungen innerhalb von 1,5 bis 4 Stunden getrocknet. Die Vials wurden danach sofort verschlossen. Abhängig von der Rezeptur ergab sich ein absolut klarer und durchsichtiger Belag am Boden der Gefäße oder ein gleichmäßig weißlicher Ring. Der Ring reichte 3 bis 4 mm weit am Gefäßrand nach oben und sparte den leicht erhöhten Mittelpunkt des Gefäßbodens aus (Abb. 58 rechts).

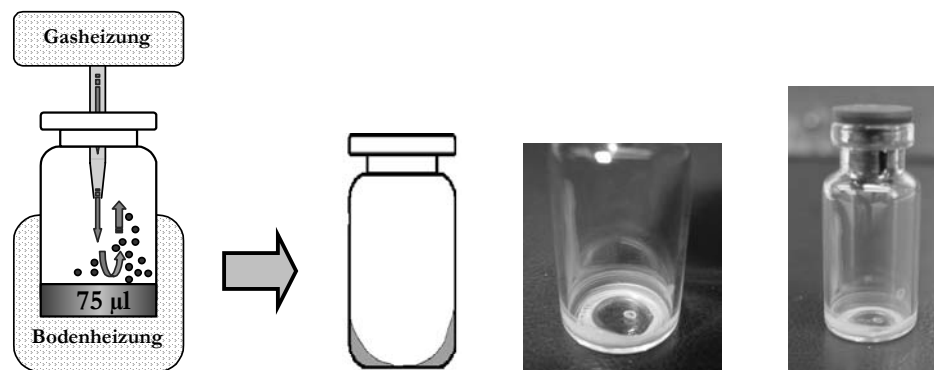


Abb. 58: Links: Schematische Darstellung der Trocknung mit dem Warmluftbegasungsgerät. Rechts: Darstellung der getrockneten Proben.

Die Erwärmung der Vials durch die Bodenheizung und durch den erwärmten eingeleiteten Gasstrom beschleunigte die Verdunstung des Wassers. Wasserdampf wurde von vorbeiströmenden, trockenem Stickstoff abgeführt (Abb. 58 links).

Um gleichbleibende reproduzierbare Bedingungen zu erhalten, wurde das Gerät immer zwei Stunden vor Beginn der Trocknung eingeschaltet und konditioniert.

Es wurden verschiedene Standardprozeduren durchgeführt:

- Trocknung für 1,5 Stunden:  
Gastemperatur: 70 °C, Bodenheizung: 50°C (G70+B50)
- Trocknung für 4 Stunden  
Gastemperatur: 40 °C, Bodenheizung: 30°C (G30+B30)  
(verwendet für alle Einlagerungen)
- Kombination aus verschiedenen Temperaturen (siehe C.I.2.3)

### 2.3.2. Applikation und Trocknung von Mikrotropfen (Biodotmethode)

Bei der „Biodotmethode“ handelt es sich um eine aus Applikation, Vortrocknung und Nachtrocknung zusammengesetzte Methode. Die ersten beiden Schritte wurden mit dem Mikrotropfenroboter (siehe B.2.2.2), der letzte Schritt in der Gefriertrocknungsanlage (siehe B.2.2.3) ausgeführt.

Während die Applikation den verschiedenen Trägern angepasst wurde, wurde die Nachtrocknung unter Vakuum immer auf die gleiche Weise ausgeführt. Nur während der Entwicklung der Methode wurde die Länge der Nachtrocknung und das angelegte Vakuum variiert. Als Standard wurde folgendes Vakuumprogramm etabliert:

Der Druck in der Kammer wurde innerhalb von 1,5 Stunden in fünf Schritten auf 0,001 mbar abgesenkt und dort für insgesamt 15 Stunden (über Nacht) bei 20 °C gehalten. Nach Beendigung der Trocknung wurde die Kammer mit trockenem Stickstoff belüftet und die Vials verschlossen.

#### *2.3.2.1. Standardmethode*

Die Standardmethode wurde für alle Träger außer für Xerogele verwendet. Die gewünschten Träger wurden gereinigt und auf die passende Größe zugeschnitten. Normalerweise wurde eine Fläche von 3,5 cm x 2 cm verwendet. Objektträger und Stahlplatten wurden in ihrer Originalgröße belassen (Abb. 59 rechts). Jeweils zwei Träger wurden nebeneinander auf der beheizten Bodenplatte angebracht und betropft.

Pro Träger wurde eine Dosis von 18 µl konzentrierter, flüssiger Proteinformulierung aufgebracht. Die Dosis wurde dazu in 22 nl große Tropfen aufgeteilt und diese in vorprogrammierten Mustern auf den Trägern appliziert. Üblicherweise wurde dabei eine rechteckige Fläche von 3 x 1,5 cm zweimal hintereinander mit 450 Tropfen betropft. Bereits während der Applikation kam es zur Trocknung und zur Anhaftung der Tropfen auf der Oberfläche. Um gleichbleibende Bedingungen zu schaffen, wurden alle Träger nach Abschluss der Betropfung noch fünf Minuten auf der erwärmten Bodenplatte liegen gelassen, danach gegebenenfalls gefaltet und in 2R-Vials verpackt.

Auf der verwendeten Anlage dauerte die Applikation einer Dosis, einschließlich Befüllung, Konditionierung und Online-Reinigung des Systems, insgesamt sieben Minuten. Einschließlich Nachtrocknung auf der Bodenplatte dauerte es 12 Minuten um

zwei „Biodotproben“ parallel herzustellen, wobei in den letzten 5 Minuten bereits die nächsten Proben betroffen werden konnten.



Abb. 59: Dotierung von zwei Xerogelen (links) und Dispensierung auf Stahlplättchen (rechts).

### 2.3.2.2. Applikation von Mikrotropfen auf Xerogele

Xerogele wurden ähnlich der Standardmethode dotiert. Die styroporartigen, runden Xerogelkuchen wurden entweder direkt in der Petrischale betropft (Abb. 59 links) oder aus der Schale herausgenommen und auf die Bodenplatte gelegt. Da die Xerogele Flüssigkeit sehr gut aufsaugten, wurde die Tropfengröße auf 25 nl erhöht. Um trotz der geringen Fläche der Xerogele eine Dosis von 19,6 µl aufzubringen, wurden die Gele viermal hintereinander mit 196 Tropfen betropft. Dies ergab eine Fläche von 1,4 x 1,4 cm. Nach der Applikation wurden die Gele ohne Nachrocknung auf der Bodenplatte weggepackt und im Vakuum zu Ende getrocknet. Die trockenen, betropften Gele wurden bis zur Analyse im Exsikator bei 4 – 8 °C gelagert.

### 2.3.2.3. Applikation von Mikrotropfen mit Überzug

Nach der Standardmethode betropfte PP-Folien wurden wie folgt mit Überzügen versehen. Die Überzüge wurden teilweise nach Vakuumtrocknung mittels einer Sprühdose aufgesprüht oder direkt am Mikrotropfenroboter, durch Applikation einer weiteren Tropfenreihe über der ersten, hergestellt (Abb. 60). Um die erste Tropfenreihe, die Protein-Zucker-Tropfen, vollständig zu überdecken, wurden für die Überzugstropfen größere Tropfenvolumina (30 nl) gewählt. Diese Methode wurde für Filme aus Eudragit R und Eudragit NE getestet. Die so übertropften Folien wurden danach im Vakuum nachgetrocknet.

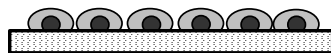


Abb. 60: Mittels Mikrotropfenroboter hergestellte Überzüge. Protein-Zucker-Tropfen sind schwarz, die größeren Überzugstropfen grau dargestellt.

Filme aus Ethylcellulose, Hydroxypropylcellulose und teilweise auch Eudragit NE wurden auf andere Weise hergestellt. Über die nach der Standardmethode betropften und im Vakuum vollständig getrockneten PP-Folien wurden die Überzüge mit Hilfe einer Sprühdose für dünn-schichtchromatographische Anfärbungen (Desaga GmbH, D-Heidelberg) gesprüht und mit einem Föhn (ohne Erwärmung) getrocknet. Eine anschließende zweite Vakuumtrocknung war nicht nötig.

### 2.3.3. Vakuumtrocknung

Zum Vergleich mit den in der Arbeit entwickelten Methoden wurde eine Standardvakuumtrocknung durchgeführt. Es wurden die gleichen Rezepturen und Mengen wie bei den „neuen Trocknungsmethoden“ eingesetzt, also 20 µl konzentrierte Rezeptur aus den Biodotversuchen, bzw. 75 µl Rezeptur aus der Warmlufttrocknung. Der Druck in der Kammer wurde innerhalb von 1,5 Stunden in 5 Schritten auf 0,001 mbar abgesenkt und dort gehalten. Nach insgesamt 48 Stunden Trocknung bei einer Temperatur von 20 °C wurden die Vials unter Stickstoffatmosphäre in der Anlage verschlossen.



## C. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### C.I. Teil I: Trocknung mittels Warmluftbegasung (evaporative drying)

Schon seit geraumer Zeit bemühen sich Pharma- Biotech- und Diagnostikindustrie empfindliche Moleküle, wie z.B. Proteine, zur Erhöhung der Lagerstabilität zu trocknen. Inzwischen haben sich je nach Verwendungszweck unterschiedliche Methoden etabliert, welche alle in den letzten Jahrzehnten intensiv beforscht wurden, so dass sowohl deren Potential, als auch deren Schwächen inzwischen weitgehend bekannt sind. Ausgehend von dem Grundgedanken, relativ konzentrierte Lösungen zu trocknen und somit nur geringe Wassermengen zu entfernen, sollten in dieser Arbeit Alternativen zu den herkömmlichen Methoden gefunden werden. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde dazu das Warmluftbegasungsgerät der Fa. Barkey GmbH & Co. KG verwendet. Von diesem Gerät wird zur Verdunstung des Wassers trockenes, erwärmtes Gas über Düsen in Vials eingeleitet, wobei die Vials zusätzlich erwärmt werden. Uns stellte sich nun die Frage, ob es auf diese Weise tatsächlich möglich ist Proteinlösungen zu trocknen und dabei die Proteinstabilität zu gewährleisten.

Dabei galt es zu bedenken, dass die Technik der Warmlufttrocknung nur entfernt mit herkömmlichen Methoden zu vergleichen ist. Im Gegensatz zur Vakuum- und Gefriertrocknung erfolgt die Trocknung unter Normalatmosphäre. Es wird also weder Vakuum angelegt, noch werden die Proben eingefroren. Auch mit der Sprühtrocknung gibt es nur wenige Gemeinsamkeiten, obwohl sich diese Trocknungsprinzipien entfernt ähneln. In beiden Fällen ermöglicht vorbeiströmendes erwärmtes Gas die Trocknung, dennoch unterscheiden sich beide Methoden grundsätzlich. Bei der Warmluftbegasung werden die Rezepturen nicht versprüht, sondern bereits vor der Trocknung als Lösung in Vials vereinzelt und in diesen begast. Die erhaltenen Produkte liegen nicht pulverförmig, sondern als kompakte feste Matrix vor. Insofern lassen sich die gebildeten Produkte am ehesten mit Produkten vergleichen, welche durch Vakuumtrocknung erhalten werden. Rein optisch weisen die Produkte dieser zwei Methoden einige Gemeinsamkeiten auf. In beiden Fällen handelt es sich um fertige Einzeldosen in Form von festen, dünnen Kuchen. Deshalb wurde im Laufe der Arbeit die Warmlufttrocknung ins Verhältnis zur Vakuumtrocknung gesetzt und die jeweils gebildeten Produkte verglichen.

## 1. Einfluss von Geräteparametern

### 1.1. Einfluss der Gaszufuhr

Das eingeleitete Gas hat einen entscheidenden Einfluss auf die Trocknung mittels Warmluftbegasung (207), weshalb zunächst die Art des Gases, der Druck und die Durchflussrate, sowie die Gasdüse am Gerät variiert wurden. Einige dieser Parameter konnten unabhängig voneinander verändert werden, während andere sich gegenseitig beeinflussten. Die Erhöhung der Durchflussrate führt z.B. automatisch zur Erhöhung des Druckes. Je mehr trockenes Gas an der Rezeptur vorbei strömte, desto mehr verdunstendes Wasser konnte aufgenommen und abgeführt werden und um so höher war auch die Geschwindigkeit und Effizienz der Trocknung. Für die Trocknungseffizienz wäre demnach eine möglichst hohe Durchflussrate empfehlenswert. Da eine höhere Durchflussrate jedoch direkt einen höheren Gasdruck bewirkte und dieser von Seite des Gerätes auf 0,5 bar limitiert war, wurde für unsere Versuche eine maximale Durchflussrate von 11 Liter/Minute (für alle 10 Stellplätze) gewählt.

Auch die Art des Gases und damit dessen Wärmeleitfähigkeit und Wasseraufnahmevermögen beeinflussten die Trocknung entscheidend. Um für die Proteine Oxidationsschutz zu gewährleisten und um bewährte Standards beizubehalten, wurde trockener Stickstoff 5.0 verwendet.

Des weiteren wurde der Austritt des Gases am Ende des Heizblockes untersucht. Der Stickstoff wurde innerhalb des Gerätes erwärmt und strömte aus den Metalldüsen am Ende des Gasheizblockes durch aufgesteckte Eppendorfspitzen in die Vials (Abb. 61).

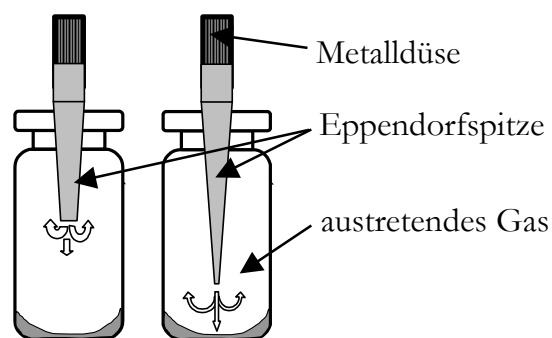


Abb. 61: Schematische Darstellung verschiedener Längen der Eppendorfspitzen

Die aufgesteckten Eppendorfspitzen wurden eingesetzt, um das Produkt vor „Cross-Contamination“ zu schützen. Sie wurden nach jedem Versuch ausgetauscht. Wurden Spitzen in ihrer Originalform und Länge verwendet, kam es zur Expansion des Gases beim Austritt aus der Spitze und dadurch zur Abkühlung des Gases. Folglich war es nötig, die Eppendorfspitzen in der Mitte abzuschneiden, um eine größere Austrittsöffnung zu schaffen. Wurde die Verkürzung zu groß gewählt, bestand aufgrund des großen Abstandes kein direkter Kontakt des Gases mit der Flüssigkeitsoberfläche und die Trocknung verzögerte sich. Wurde der Abstand dagegen zu klein gewählt, bestand die



Gefahr des Verspritzens der Rezeptur, verursacht durch den hohen Druck des austretenden Gasstromes. Als Optimum wurde eine Spitzenlänge von 2 cm gewählt, welche nicht zur Abkühlung des Gases, nicht zum Verspritzen der Rezeptur, wohl aber zum direkten Überstreichen der Lösung, erkennbar an einer leichten Verdrängung der Lösung aus der Vialmitte hinauf zu den Vialrändern, führte.

## 1.2. Einfluss der Temperatur

Mit den genannten Standardeinstellungen für Druck und Durchfluss wurde der Einfluss der Temperatur auf die Effizienz der Trocknung bestimmt. Sowohl durch das Gas als auch durch den Boden-Heizblock konnte dem Vial Wärmeenergie zugeführt werden. Die am Vialboden gemessene Temperatur ergab sich aus den Einflüssen beider Temperaturen, wobei die Mindesttemperatur immer vom Heizblock definiert wurde. Davon ausgehend kam es je nach Gastemperatur zur weiteren Erwärmung (Tab. 2). Durch Kombination einer Blocktemperatur von 30 °C und einer Gastemperatur von 30 °C (gemessener Richtwert) erhöhte sich die Temperatur in den Vials z.B. auf 43 °C. Bei der angegebenen Gastemperatur handelt es sich um einen in den Spitzen (in der Expansionszone) gemessenen Wert, welcher nur als Anhaltswert und zum Vergleich verschiedener Trocknungsbedingungen dient, jedoch nicht die tatsächliche Gastemperatur widerspiegelt. Das mit 30 °C bezeichnete Gas bewirkte also eine Erwärmung um 13 °C. Wurde dagegen Gas von 70 °C eingeleitet, kam es zur Erwärmung um 38 °C. Die Gastemperatur selber wurde in den Vials zunächst nicht erreicht. Erst im Verlauf der Trocknung kam es zur weiteren Erwärmung, so dass schließlich auch die Temperatur des eingeleiteten Gases erreicht wurde.

Temperatur (Gas) °C	30			70		
Temperatur (Block) °C	20	30	70	30	50	70
Temperatur im Vial °C	<b>n.b.</b>	<b>43</b>	<b>72</b>	<b>68</b>	<b>81</b>	<b>97</b>
Restfeuchte (%)	3,5	3,1	2,6	2,2	1,9	1,9

Tab. 2: Einfluss der Gas- und Blocktemperatur auf die im Vial erreichte Temperatur und auf die Restfeuchte der Produkte (nach 1,5 Stunden Trocknung, Rezeptur: Epo + SPT [siehe Abkürzungsverzeichnis]).

Aus Tab. 2 geht hervor, dass die Trocknung grundsätzlich um so effektiver war und die Restfeuchten der Produkte um so niedriger waren, je mehr Wärmeenergie den Proben zugeführt wurde. Der Einfluss der Gastemperatur im Verhältnis zur Blocktemperatur lässt sich in einfacher Weise anhand der eingekreisten Daten der Tabelle (siehe Kreis, Tab. 2) bewerten. Durch beide Kombinationen (G30+B70 und G70+B30, siehe Abkürzungsverzeichnis) wurde in etwa die gleiche Temperatur im Vial erreicht, d.h.

beiden Proben wurde in etwa die gleiche Wärmeenergie zugeführt. Dennoch wiesen Proben mit höherer Gastemperatur eine niedrigere Restfeuchte auf. Dies lässt sich durch die erhöhte Wasseraufnahmekapazität des wärmeren Gases erklären. Im Fall des auf 70 °C erwärmten Gases konnte mehr verdunstendes Wasser pro Zeiteinheit aufgenommen und aus dem Vial abtransportiert werden, als im Fall des auf 30 °C erwärmten Gases.

Zur Stabilisierung von Proteinen sollte die Restfeuchte der Produkte möglichst gering sein, da Wasser sowohl direkt als Reaktant, als auch indirekt als Plastiziser oder Reaktionsmedium auf die Proteininstabilität bei der Lagerung einwirken kann. Andererseits können auch zu geringe Feuchten durch „overdrying“ Aggregation verursachen. Die optimale Restfeuchte variiert für jedes Protein und kann nicht verbindlich festgesetzt werden (siehe A.2). Da jedoch im Review von W. Wang als generelle Richtlinie eine Restfeuchte von maximal 2 % erwähnt wird (21), und auch J.K. Towns einen Bereich von 1 - 3 % Restfeuchte angibt (41), soll für diese Arbeit eine Restfeuchte von 2 % und weniger als zielführend angesehen werden.

Bei der Verwendung von optimierten Rezepturen (siehe auch C.I.3.1) und relativ hohen Temperaturen (Gas 70 °C und Boden 50 °C) konnten innerhalb von nur 1,5 Stunden Proben hergestellt werden, welche dieser Zielrestfeuchte entsprachen (Tab. 2). Allerdings lag die Vermutung nahe, dass es während der Trocknung aufgrund der Temperatur von 80 °C in den Vials zur Aggregation der Proteine kam. Tab. 3 bestätigt diese Annahme.

Temperatur (°C)		Dauer (h)	Proteinmonomer (%)	Restfeuchte (%)
Gas	Block			
70	50	1,5	93,2	2,0
30	80	1,5	91,1	2,4
30	30	1,5	n.b.	3,4
40	30	3	93,9	1,5
<b>30</b>	<b>30</b>	<b>4</b>	<b>99,2</b>	<b>2,0</b>
<b>20</b>	<b>30</b>	<b>6</b>	<b>99,5</b>	<b>2,0</b>

**Tab. 3: Einfluss verschiedener Trocknungsparameter (Temperatur und Zeit) auf die Stabilität von G-CSF (Rezeptur G-CSF + SPT) und die Restfeuchte der Produkte.**

Nach 1,5 Stunden Trocknung bei hohen Temperaturen (G70+B50) wiesen die Proben zwar nur noch eine Restfeuchte von 2 % auf, gleichzeitig enthielten diese jedoch neben 93,2 % Monomer auch 6,8 % Dimere und höhermolekulare Aggregate. Andere Temperaturkombinationen, welche auch eine Temperatur von 80 °C in den Vials bewirkten, führten ebenfalls zur Aggregation der Proteine. Eine Erhöhung der Blocktemperatur bei gleichzeitiger Erniedrigung der Gastemperatur, destabilisierte die Proteine sogar noch stärker (G30+B80, Tab. 3). Woraus geschlossen werden kann, dass die Aggregation verstärkt durch die vom Boden zugeführte Wärme hervorgerufen wurde.

Eine ausreichende Stabilität der Proteine konnte nur durch Absenkung der Temperatur gewährleistet werden. Um dennoch Produkte mit niedriger Restfeuchte zu erhalten, musste im Gegenzug die Trocknungsdauer verlängert werden. Eine Absenkung der in den Vials erreichten Temperatur auf ca. 40 °C konnte durch die Kombination von 30 °C Gastemperatur und 30 °C Blockheizung erreicht werden (2. Zeile von unten, Tab. 3). Nach 4 Stunden Trocknung erhielt man bei diesen Bedingungen trockene und stabile Produkte. Es stellte sich heraus, dass es für die Proteinestabilität unerheblich war wie lange die Trocknung dauerte, solange eine für das Protein verträgliche Temperatur nicht überschritten wurde (unterste Zeile).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass für thermostabile Stoffe eine Trocknung mittels Warmluftbegasung innerhalb von nur 1,5 Stunden möglich ist (Tab. 4). Innerhalb dieser kurzen Zeitspanne werden Restfeuchten unter 2 % erreicht. Auch thermoempfindliche Proteine können durch Senkung der Temperatur und Verlängerung der Trocknungsdauer unter Wahrung ihrer Stabilität getrocknet werden. Ausgehend von tiefen Temperaturen und langer Trocknungsdauer, sollte es grundsätzlich möglich sein für jedes Protein eine schonende Trocknung zu finden. Durch anschließende langsame Temperatursteigerung, bis zur Stabilitätsgrenze des jeweiligen Proteins, kann die Dauer der Trocknung reduziert werden. Eine andere Möglichkeit schonende Trocknungen innerhalb weniger Stunden abzuschließen, ist die Verwendung von Temperaturprogrammen. Diese kombinierten während der Trocknung verschiedene Temperaturen je nach Stabilisierungszustand der Proteine (zur Entwicklung dieser Programme siehe C.I.2.3). Tab. 4 gibt einen Überblick über einige Standardtrocknungsvarianten und deren gesamte Trocknungsdauer.

		für empfindliche Proteine geeignet		
Gastemperatur (°C)	70	30	20	Temperaturprogramme
Blocktemperatur (°C)	50	30	30	siehe C.I.2.3
<b>Trocknungsdauer (h)</b>	<b>1,5</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>2</b>

Tab. 4: Angegeben sind mögliche Temperaturkombinationen und die benötigte Gesamtdauer der Trocknung, um stabile und trockene G-CSF oder Epo Proben herzustellen. (zu den Temperaturprogrammen siehe C.I.2.3; die Trocknung wird dabei bei niedrigen Temperaturen begonnen und bei hohen Temperaturen abgeschlossen, die Gesamtdauer beträgt 2h)

## 2. Trocknungsverlauf

Um den Verlauf der Warmlufttrocknung besser zu verstehen, wurde die Trocknung nach verschiedenen Zeiten abgebrochen. Die bis dahin erhaltenen Proben wurden auf Konsistenz, Restfeuchte und Protein stabilität untersucht.

### 2.1. Restfeuchte, Glasübergangstemperatur

Innerhalb der ersten Minuten der Begasung kam es zu einer starken Einengung und Aufkonzentrierung der Proben. Während die zu Beginn entnommenen Proben noch flüssig waren, bildete sich bereits nach 5 Minuten ein zäher Rubber, der im weiteren Verlauf der Trocknung völlig erstarrte. Entsprechend zeigte sich innerhalb der ersten fünf bis zehn Minuten der Trocknung ein extrem steiler linearer Abfall der Probenmasse (Abb. 62).

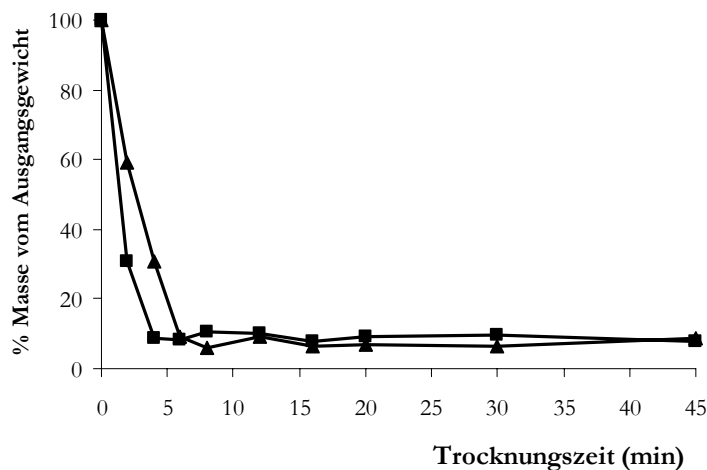
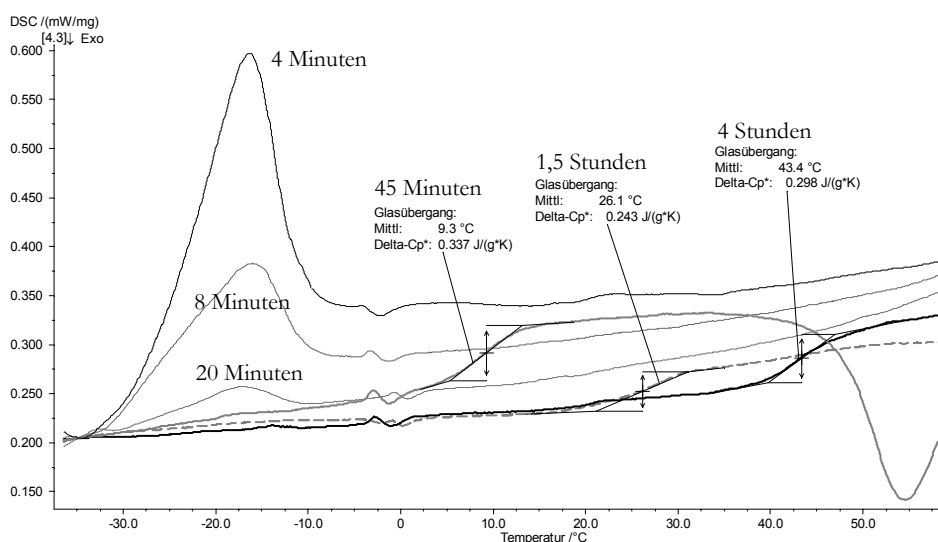


Abb. 62: Abnahme der eingesetzten Masse (SPT + Protein) durch verdunstendes Wasser bei verschiedenen Trocknungstemperaturen. ▲ Gas 30 °C + Block 30 °C, ■ Gas 70 °C + Block 50 °C.

Die eingesetzten, geringen Probenvolumina bildeten eine so große Oberfläche mit geringer Schichtdicke, dass eine schnelle Verdunstung des Wassers ermöglicht wurde. Nach zehn Minuten Trocknung wiesen die Proben, bezogen auf die Produktmasse, nur noch eine Restfeuchte von ca. 10 % und nach weiteren 20 Minuten von 6 % auf. Innerhalb von nur fünf Minuten wurde ca. 90 % des enthaltenen Wassers entfernt. Im Vergleich zu dieser ersten schnellen Trocknung erfolgte die weitere Trocknung relativ langsam. Von nun an musste das in der schon festen Zuckermatrix eingeschlossene Restwasser entfernt werden. Die erwünschte endgültige Restfeuchte von 2 % wurde je nach Trocknungstemperatur nach weiteren 1,25 bis 5 Stunden erreicht. Durch Anlegen von Vakuum in dieser Phase der Trocknung wäre eine Verkürzung der „Nachtrocknungszeit“ denkbar. Hierdurch könnte das eingeschlossene Wasser effektiver abgezogen werden. Da die Proben zu diesem Zeitpunkt bereits zu 90 % getrocknet vorliegen, besteht bei Anlegen des Vakuums keine Gefahr, dass es zu Siedeverzügen

kommt. Diese Nachtrocknungs-variante könnte durch Erweiterung des verwendeten Begasungsgerätes von Barkey GmbH & Co KG mit einer Vakuumbaube realisiert werden (für 96 well plate Geräte ist diese Variante bereits im Handel erhältlich). In dieser Arbeit wurde sie jedoch nicht weiter verfolgt.

Mit Hilfe von DSC-Untersuchungen ließ sich der Trocknungsverlauf ebenfalls verfolgen (Abb. 63). Proben aus den ersten 20 Minuten der Trocknung enthielten noch so viel Wasser, dass unterhalb von 0 °C, beim eutektischen Punkt des Gemisches, ein endothermer Wasserschmelzpeak detektiert wurde. Die Höhe dieses Peaks nahm mit zunehmender Trocknungszeit ab, bis schließlich nur noch eine Gerade über den gesamten Messbereich detektiert wurde. Nach 45 Minuten Trocknung bei niedrigen Temperaturen (G30+B30) waren die Proben so trocken, dass ein erster Glasübergang bei 9 °C erfasst wurde. Mit zunehmender Trocknungsdauer sank der Wassergehalt der Proben weiter, wodurch die Temperatur des Glasübergangs auf bis zu 60 °C anstieg.



**Abb. 63:** DSC-Graphen von Placeboprobe (110 µl SPT), aufgenommen nach verschiedenen langen Trocknungszeiten (4 Minuten bis 4 Stunden bei G30+B30).

Der aus der Literatur (45, 208, 21) bekannte Zusammenhang zwischen T<sub>G</sub> und Restfeuchte wird in Abb. 64 links anhand der Versuchsdaten noch einmal verdeutlicht. Aus dem rechten Diagramm der Abb. 64 geht hervor, dass es innerhalb der ersten Hälfte der Trocknung zu einem schnellen Anstieg der Glasübergangstemperatur kam, während sich der T<sub>G</sub> danach kaum noch veränderte. Eine Erklärung dafür liefert die Restfeuchte der Produkte. Innerhalb der ersten Stunden der Trocknung kam es zur schnellen Absenkung der Restfeuchte auf 2,5 %. Die weitere Entfernung des Wassers war danach nur noch sehr langsam möglich, wodurch sich der T<sub>G</sub> ebenfalls nur noch langsam erhöhte.

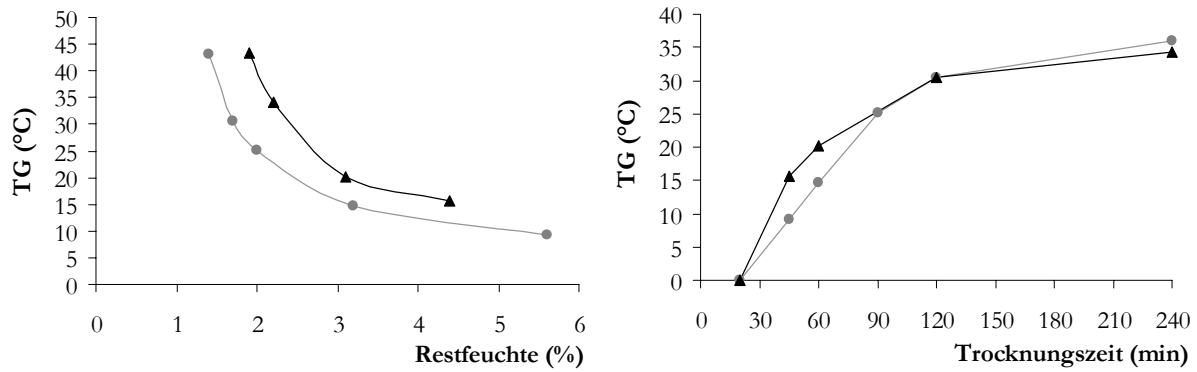


Abb. 64: Zusammenhang zwischen Glasübergangstemperatur  $T_G$  und Restfeuchte (links) bzw. Trocknungsdauer (rechts, G30+B30). Durch Aufnahme von Luftfeuchte bei der Probenvorbereitung und Einsatz von 110  $\mu\text{l}$  statt 75  $\mu\text{l}$  Probenvolumen liegen im rechten Diagramm alle  $T_G$  10  $^{\circ}\text{C}$  unter dem tatsächlichen Wert. ▲ G-CSF + SPT, ● SPT

Einige typische Glasübergangstemperaturen vollständig getrockneter Produkte gibt Tab. 5 wieder. Diese Temperaturen liegen höher als die zuvor im Text diskutierten Daten. Für die Ermittlung der Trocknungskinetik wurden aus versuchstechnischen Erwägungen 110  $\mu\text{l}$  getrocknet, während für alle Standardversuche nur 75  $\mu\text{l}$  verwendet wurden. Durch das kleinere zu trocknende Volumen ergaben sich zum selben Trocknungszeitpunkt niedrigere Restfeuchten und höhere Glasübergänge. Der grundsätzliche Trocknungsverlauf blieb jedoch gleich. Aussagen über den Trocknungsverlauf lassen sich somit aus den obigen Daten ablesen, während Aussagen über das Endprodukt anhand der Daten der unteren Tabelle getroffen werden sollten.

	Glasübergangstemperatur ( $^{\circ}\text{C}$ )
G-CSF + SPT	55
G-CSF + ST	45
Epo + SPT	58

Tab. 5: Glasübergangstemperaturen  $T_G$  einiger Endprodukte nach Trocknung unter Standardbedingungen (G30+B30, 4h).

Auffällig ist die höhere Glasübergangstemperatur von phenylalaninhaltigen Proben, was an der grundsätzlich etwas niedrigeren Restfeuchte dieser Produkte lag. Im Vergleich zu Literaturdaten über reine, absolut trockene Saccharose (75  $^{\circ}\text{C}$ ) erscheinen die gemessenen  $T_G$ -Werte auf den ersten Blick relativ niedrig, unter Berücksichtigung der Restfeuchte der Proben von ca. 2 % ist dies jedoch plausibel. Insgesamt lagen alle Glasübergänge deutlich (20 – 30  $^{\circ}\text{C}$ ) oberhalb der üblichen ICH-Lagertemperatur von 25  $^{\circ}\text{C}$  und waren damit akzeptabel.

## 2.2. Proteininstabilität

Entsprechend der extrem schnellen Aufkonzentrierung in den ersten 10 Minuten und dem damit verbundenen Stress für die Proteine, kam es innerhalb dieser Zeitspanne zur Aggregation der Proteine (Abb. 65). Während der folgenden Trocknung wurde, unabhängig von der Dauer der nachfolgenden Trocknung, kein weiterer Verlust an Monomer detektiert. Die Stabilität der Proteine wurde ab dem Moment erhalten, ab dem es zur Einbettung der Proteine in rubberartige Strukturen kam. Die Temperatur in den ersten 10 Minuten bestimmte das Ausmaß der insgesamt aufgetretenen Aggregation. Je höher die Temperatur in diesen Minuten war, um so höher war auch die Aggregation der Proteine. Bei niedrigen Temperaturen (G20 oder 30 + B30) konnte die Stabilität der Proteine über den gesamten Trocknungsverlauf gewährleistet werden.

Folgende Graphik (Abb. 65) gibt die beschriebenen, charakteristischen Stabilitätsverläufe für G-CSF, in einer Rezeptur mit Saccharose, Tween und Phenylalanin, wieder. Sowohl für G-CSF als auch für Erythropoietin wurden die gleichen Kurvenverläufe beobachtet, wenn auch mit unterschiedlich starkem Ausmaß an Aggregation.

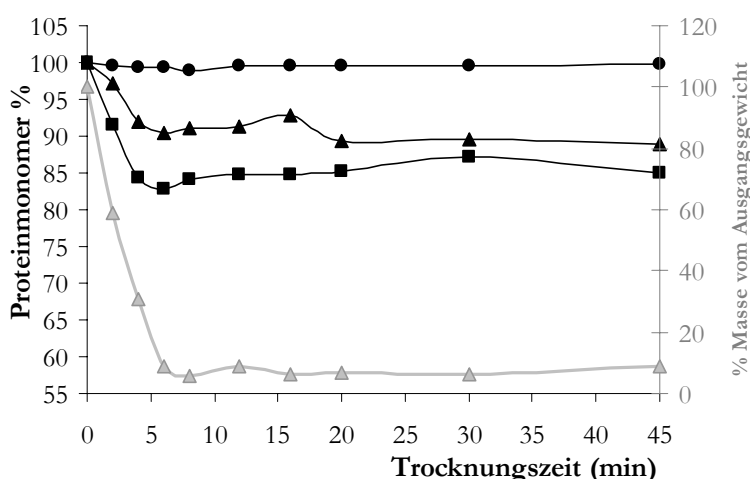


Abb. 65: Verlauf der Proteininstabilität, dargestellt als area % Proteinmonomer, während der ersten 45 Minuten der Trocknung bei verschiedenen Temperaturen. ● niedrigste Temperatur (G20+B30), ▲ mittlere Temperatur (G40+B30), ■ höchste Temperatur (G70+B50), ▲ Abnahme der eingesetzten Masse bei G40+B30 (rechte y-Achse).

Um das Stabilisierungspotential der rubberartigen Zuckermatrix zu bestätigen, wurde die Stabilität der Proteine während des Trocknens mit der Stabilität von Proteinlösungen ohne Aufkonzentrierung verglichen. Identische Rezepturen wurden über 45 Minuten steigenden Temperaturen ausgesetzt, einmal in offenen Gefäßen, so dass es dabei zur Aufkonzentrierung und Trocknung kam, und einmal in geschlossenen Gefäßen. Steigende Temperaturen wurden verwendet, da es gerätetechnisch bedingt beim Trocknen mittels Warmluftbegasung immer zu einer kontinuierlichen Aufheizung der Vials kam. Nachfolgende Abbildungen (Abb. 66) geben die Ergebnisse wieder. Aus den Graphen der linken Abbildung geht hervor, dass die Abnahme an Proteinmonomer in den ersten

sieben Minuten in Lösung genauso stark war, wie beim Trocknen mit niedrigen Temperaturen. Ab dem Moment, ab dem sich während der Trocknung ein rubberartiger Zustand ausbildete, liefen die Kurven jedoch auseinander. Nur noch die Proteine in Lösung wurden weiter aggregiert, während der Proteinmonomergehalt beim Trocknen gleich blieb. Wurde die Trocknung bei höheren Temperaturen durchgeführt, war der Unterschied zwischen Stabilität in Lösung und Stabilität beim Trocknen noch deutlicher (Abb. 66 rechts). Bereits nach fünf Minuten lagen die Proteine in Lösung vollständig aggregiert vor, während die Stabilität von Proteinen beim Trocknen deutlich höher war. Scheinbar kam es beim Trocknen ab der ersten Minute, bereits während der Aufkonzentrierung, zur Verzögerung der Aggregation durch die eindickende Zuckerlösung. Sobald sich aus der zähen Lösung ein Rubber bildete und die Proteine vollständig in diesem eingeschlossen wurden, wurde jede weitere Aggregation völlig unterbunden. Bemerkenswert dabei war, dass die Vials während der Trocknung für eine Stunde sogar Temperaturen von 84 °C aufwiesen und die eingebetteten Proteine dennoch relativ stabil blieben.

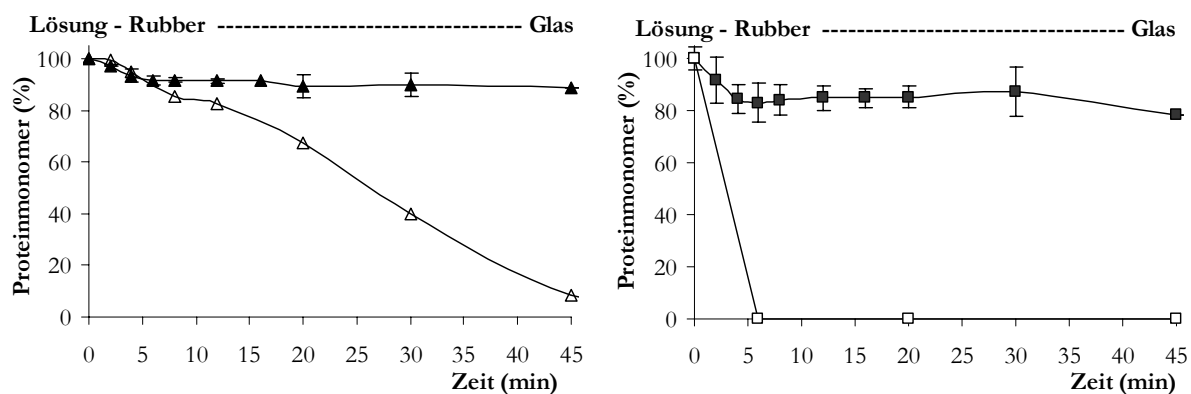


Abb. 66: Vergleich der Stabilität von G-CSF in Lösung zu G-CSF bei der Trocknung mittels Warmluftbegasung bei entsprechenden Temperaturverläufen. ▲ bei der Trocknung mit Gas 30 °C + Boden 30 °C, ▽ in Lösung bei entsprechenden Temperaturen (42 °C bis 51 °C), ■ bei der Trocknung mit Gas 70 °C + Boden 50 °C, □ in Lösung bei entsprechenden Temperaturen (77 °C bis 84 °C).

Mit Hilfe von Partikelmessungen konnte das beschriebene Phänomen bestätigt werden. In Lösung kam es mit steigender Temperatur zur Zunahme der Gesamtzahl gemessener Partikel und zur Entstehung von größeren Partikeln (Abb. 67 links). Dies deutet auf die Entstehung unlöslicher Proteinaggregate hin. Dagegen wurde eine gleichbleibend niedrige Partikelzahl in den getrockneten Proben nach Rekonstitution detektiert (Abb. 67 rechts). Auch durch Untersuchungen der Endprodukte mittels SDS-PAGE konnte gezeigt werden, dass warmluftgetrocknete Proben keine unlöslichen Aggregate enthalten (Abb. 68).



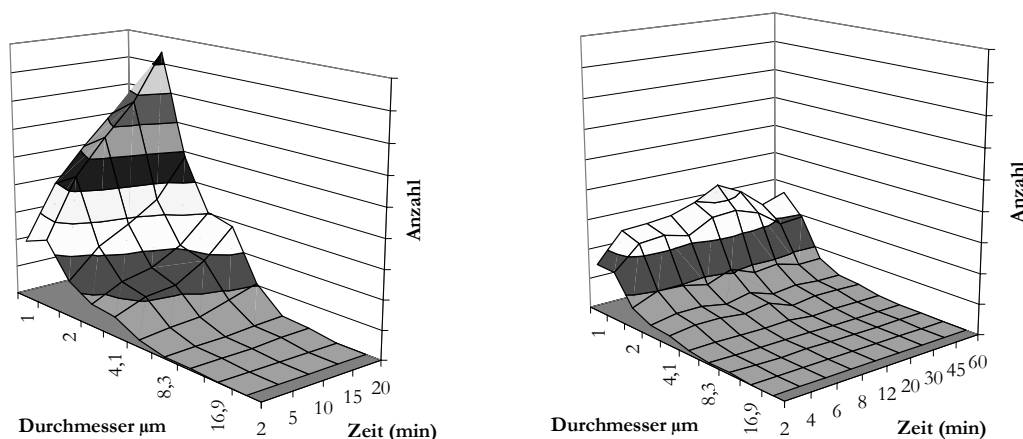


Abb. 67: Vergleich der Zunahme an Partikeln bei Thermostress in Lösung (links) und beim Trocknen mittels Warmluftbegasung (rechts, G70+B50) von G-CSF +SPT Rezeptur

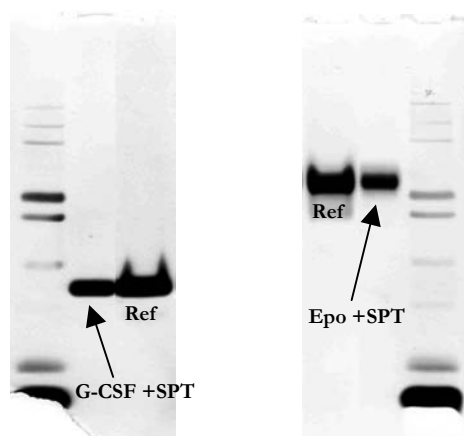


Abb. 68: SDS-PAGE von Endprodukten, Proteingrößenmarker und frisch aufgetautem Referenzprotein (Ref). Links: G-CSF + SPT, rechts: Epo + SPT.

Eine konzentrationsabhängige Stabilisierung kann durch mehrere Literaturstellen belegt werden (siehe auch A.2.2.2), während die hier beobachtete, bereits im Rubberzustand erfolgende Stabilisierung von anderen Arbeitsgruppen bisher nicht beschrieben wurde. Carpenter et al. stellte 1987 einen Einfluss der Zuckerkonzentration auf die nach der Trocknung erhaltene Aktivität von Phosphofruktokinase fest (116). Je höher die eingesetzte Zuckerkonzentration war, desto mehr Aktivität erlangte das Protein nach Rekonstitution der trockenen Proben zurück. Kristallisierten die eingesetzten Zucker jedoch während der Trocknung aus, ließ der stabilisierende Einfluss deutlich nach. Der stabilisierende Einfluss von Zuckern während der Trocknung basiert auf der Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen Protein und Hilfsstoff. An Stelle des entzogenen Wassers geht der Zucker Bindungen mit dem Protein ein und ermöglicht so die Erhaltung der nativen Proteinstruktur („water replacement“, siehe A.2.2.4). Diese Bindungen sind jedoch nur in einer amorphen Matrix und nicht in kristallinen Strukturen möglich. Wie stark der stabilisierende Einfluss der Zucker jeweils ist und ab welcher Konzentration er durch Auskristallisation nachlässt, hängt demnach von den verwendeten Zuckern und der eingesetzten Trocknungsmethode ab. Je nach Methode wirken verschiedene Stress-

faktoren auf die Proteine ein, zu deren Ausgleich verschiedene Mengen an Zucker benötigt werden (siehe A.2.2.4). Bei der in dieser Arbeit untersuchten Warmlufttrocknung wurden Rezepturen mit 146 mM Saccharose eingesetzt. Diese Konzentration liegt genau in dem von Carpenter et al. (116) festgestellten Stabilitätsplateau (100 mM bis mindestens 500 mM). Während der Trocknung kam es innerhalb der ersten Minuten zur weiteren starken Aufkonzentrierung der Probe, so dass nach 15 Minuten eine theoretische Konzentration von ca. 1,5 M Saccharose erreicht wurde, ohne dass es dabei zur Kristallisation des Zuckers gekommen wäre. Diese hohen Zuckerkonzentrationen dürfte, entsprechend der genannten Literatur, die Stabilität der eingeschlossenen Proteine fördern.

Allerdings kam es während der Trocknung nicht nur zur Aufkonzentrierung der Zucker, sondern auch zur Aufkonzentrierung der eingesetzten Proteine. Aus dem Review von W. Wang (21) geht hervor, dass höherkonzentrierte Proteine in Lösungen zu Aggregation neigen. Dementsprechend stellte sich die Frage, ob der beobachtete Stabilitätsverlust zu Beginn der Warmlufttrocknung durch die sich erhöhende Proteinkonzentration oder durch die sich extrem schnell verändernden Umgebungsbedingungen hervorgerufen wurde. Aus zahlreichen Untersuchungen zum Einfluss der Proteinkonzentration geht hervor, dass beim Trocknen und Einfrieren/Auftauen höhere Proteinkonzentrationen meistens stabilitätsförderlich sind (siehe A.2.2.2). Nach Alison et al. liegt die konzentrationsabhängige Stabilisierung beim Einfrieren entweder an einer sterischen Behinderung der Nachbarmoleküle oder an der prozentual verringerten Proteinmenge, welche an der Wasser-Eis-Grenzfläche angelagert und denaturiert wird (126, 21). Zumindest die erste Hypothese dürfte auch auf Trocknungsmethoden, welche nicht von Einfrierprozessen begleitet werden, zutreffen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich hohe Konzentrationen an Zucker und Protein positiv auf die Stabilität von Proteinen auswirken. Bei der Gefriertrocknung müssen diese Konzentrationen direkt eingesetzt werden, da es während der Trocknung zu keiner weiteren Aufkonzentrierung kommt. Evaporative Trocknungstechniken, wie die Vakuum- oder Warmlufttrocknung, dagegen konzentrieren die Proben ununterbrochen weiter auf. Besonders schnell erfolgte die Aufkonzentrierung bei der Trocknung mittels Warmluftbegasung, so dass bereits nach wenigen Minuten der stabilisierende Effekt der zunehmenden Konzentration gegenüber dem negativen Effekt der schnellen Dehydratisierung überwiegt. Carpenter et al. (116) zeigte, dass die Geschwindigkeit der Trocknung einen enormen Einfluss auf die Stabilität der Proteine hat, wobei die schnellere Trocknung stabilere Produkte lieferte. In Hinblick auf die noch schnellere Trocknung mittels Warmluftbegasung, waren dies sehr erfreuliche Daten. Auch wenn es sich um ein anderes Protein und eine andere Trocknungsmethode handelte, zeichnete sich doch ab, dass sich ein schneller Wasserentzug positiv auf die Proteinstabilität auswirken kann (siehe auch A.2.2.2). Dieser Grundgedanke wurde von W.F. Wolkers et al. (127)

anhand der Untersuchung einzelner Tropfen bestätigt und von uns durch die Warmluftbegasungstechnik zur schnellen Herstellung stabiler Proteinproben genutzt.

### 2.3. Optimierung der Temperaturprogramme

Aufgrund der Erkenntnis, dass Proteine bei der Warmlufttrocknung nur innerhalb der ersten Minuten aggregiert werden, war es möglich zeitsparende Temperaturprogramme zu entwickeln. Anfänglich niedrige Trocknungstemperaturen wurden mit nachfolgend hohen Temperaturen kombiniert. Durch die zunächst niedrigen Temperaturen wurden die Proteine geschont, sobald jedoch eine feste Zuckermatrix vorlag und die Proteine sicher darin eingeschlossen waren, wurde die Trocknung mit höheren Temperaturen fortgesetzt. Anstatt also die Restfeuchte bei niedrigen Temperaturen innerhalb von mehreren Stunden langsam auf 2 % zu senken, wurde die Trocknung bei höheren Temperaturen innerhalb viel kürzerer Zeit abgeschlossen. Das Endergebnis war in allen Fällen dasselbe, ein trockenes Produkt mit stabilen Proteinen.

Tab. 6 gibt einige der möglichen Temperaturkombinationen wieder. In allen Fällen wurden Restfeuchten unter 2 % und hohe Proteinstabilitäten erzielt. Innerhalb von nur zwei Stunden konnten auf diese Weise empfindliche Proteine unter Erhalt von 99,7 % Monomer getrocknet werden. Als besonders praktische Variante stellte sich die Erhöhung der Bodentemperatur bei gleichbleibender Gastemperatur heraus (grau unterlegte Zeile). Da das Gerät über keinerlei Kühlvorrichtung verfügt, war eine Absenkung der Gastemperatur sehr zeitaufwendig. Mit Hilfe von Kühlaggregaten konnte der Heizblock jedoch schnell wieder auf die Ausgangsbedingungen gekühlt und die Trocknung einer zweiten Charge gestartet werden. Mit diesen Temperatureinstellungen konnte die Prozesszeit um die Hälfte reduziert werden, bei gleichzeitiger Erhaltung der Produktqualität.

Schritt 1		Schritt 2			Restfeuchte (%)	Proteinmonomer (area %)	Gesamtdauer (h)	
Temp. (°C)		Temp. (°C)		Dauer (h)				
Gas	Boden	Gas	Boden					
30	30	4	---		---	1,5	99,7	4
		1,5	40	30	1,5	1,6	99,6	3
		1	50	30	1,25	1,1	99,7	2,25
		1	30	60	1	1,5	99,7	2
70	50	1,5	---		---	1,5	94,6	1,5

Tab. 6: Einige der möglichen Temperaturkombinationen. Angegeben sind die Einstellungen für Schritt 1 und 2 (Gas-, Bodentemperaturen und Trocknungsdauer) und die damit erzielten Resultate für G-CSF + SPT Rezepturen (pH 4).

### 3. Einfluss der Rezeptur

Neben den Geräteparametern hatte auch die Zusammensetzung der Rezeptur einen entscheidenden Einfluss auf die Restfeuchte und Proteinstabilität der Produkte. In A.2.2.4 wurden zahlreiche in der Literatur vorgeschlagene Zusätze referiert. Dabei wurden mehr oder weniger vielversprechende Ergebnisse in Bezug auf die Erhöhung der Glasübergangstemperatur oder auf das Stabilisierungspotential erzielt. Auch die Bewertung von Saccharose versus Trehalose verlief bisher uneinheitlich. Teilweise wurde Trehalose der Saccharose vorgezogen, teilweise auch gleichgestellt und die höhere Stabilisierung von trehalosehaltigen Formulierungen dem stabilisierende Effekt der ebenfalls enthaltenen Zinkionen zu geschrieben (150, 116, 209, 210, 211, 101).

Für diese Arbeit wurde beschlossen eine optimale Rezeptur auf Basis von Saccharose zu entwickeln, da diese preisgünstig und leicht zu beschaffen ist. Des weiteren sind bereits zahlreichen Präparate auf Basis von Saccharose von der FDA zugelassen, so dass einer universellen, späteren Verwendung der entwickelten Produkte nichts entgegenstehen sollte. Zu Vergleichszwecken wurden einige Versuche mit anderen Zuckern durchgeführt, der Schwerpunkt der Arbeit lag jedoch auf Saccharose.

#### 3.1. Einfluss der Rezeptur auf die Restfeuchte

Im folgenden wird der Einfluss verschiedener Rezepturen auf die Restfeuchte betrachtet. Dabei wurden zunächst nur Placeborezepturen untersucht und danach der Einfluss der Proteine mit einbezogen.

	Restfeuchte (%)
Trehalose 15 %	8,7
Saccharose 15 %	8,9
Mannitol 5 %	0,8
Saccharose 5 % + Phenylalanin 2 %	6,0
Saccharose 5 % + Tween 80 0,01 %	<b>1,9</b>
Saccharose 5 % + Phenylalanin 2 % + Tween 80 0,01 %	<b>1,6</b>

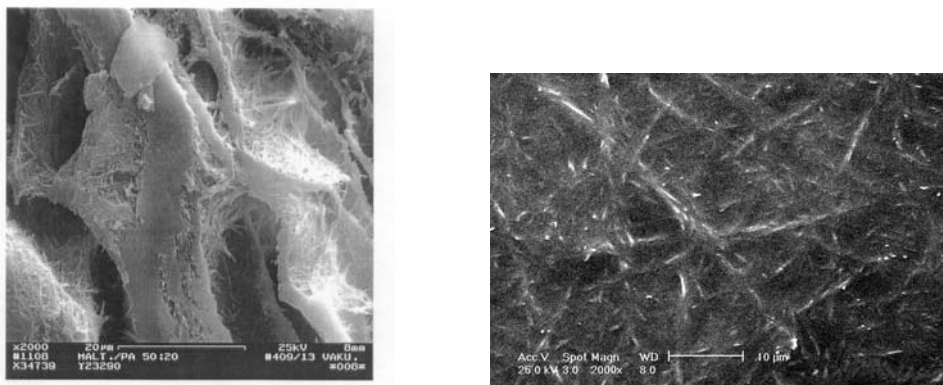
Tab. 7: Einfluss verschiedener Zucker und Hilfsstoffe auf die Restfeuchte. Die Trocknung erfolgte bei 70 °C Gas- und 50 °C Bodentemperatur (G70+B50) für 1,5 Stunden.

Tab. 7 veranschaulicht die Restfeuchte verschiedener Zuckermassen mit und ohne weitere Hilfsstoffe. Zucker alleine wiesen, selbst bei Trocknung mit hohen Temperaturen, noch Restfeuchten von ca. 9 % auf. Dieser aus der Vakuumtrocknung bekannte Effekt (212) beruht auf der Struktur der gebildeten Produkte. Während der Warmlufttrocknung konzentrierten die Zuckerlösungen durch verdunstendes Wasser immer weiter auf, bis sie

schließlich zu einer festen, kompakten Zuckermatrix erstarrten. Aus diesen kompakten Produkten konnte eingeschlossenes Wasser nicht mehr herausdiffundieren, so dass relativ hohe Restfeuchten resultierten. Daraus ergaben sich zwei grundsätzliche Möglichkeiten dennoch trockene Produkte zu erhalten. Entweder mussten Poren in der Zuckermatrix geschaffen werden, durch die Wasser entweichen konnte, oder die Dicke der Matrix musste verringert werden, um die Diffusionsstrecke für das eingeschlossenen Wasser zu verringern.

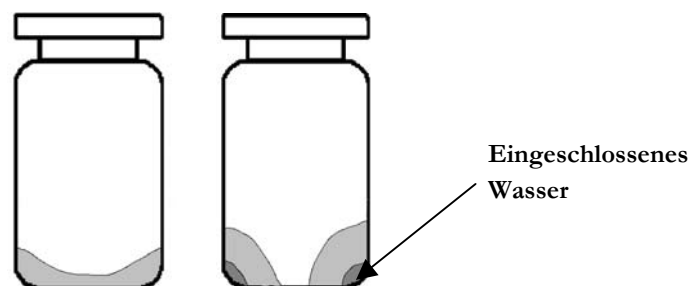
Zunächst zur ersten Variante. Eine Möglichkeit Poren zu bilden, ist die Verwendung von Zuckern, welche bei der Trocknung auskristallisieren. Entlang der Kristalle sollte verdunstendes Wasser sehr gut entweichen können, so dass Produkte mit sehr geringer Restfeuchte zu erwarten waren. Tatsächlich wiesen die aus 5 % iger Mannitollösung entstandenen Produkte nur noch eine Restfeuchte von 0,8 % auf und waren vollständig kristallin (Tab. 7). Allerdings bildeten sich sehr ungleichmäßige Produkte mit einer von vereinzelt großen Kristallhaufen durchsetzten Matrix (Abb. 71 rechts). Auch die Proteinestabilität war deutlich geringer als bei Produkten mit amorpher Matrix (siehe C.I.3.3), was durch zahlreiche Veröffentlichungen über die Notwendigkeit des amorphen Zustandes der Hilfsstoffe zur Stabilisierung von Proteinen bestätigt wird (A.2.2, A.2.2.4). In dieser Arbeit wurde deshalb im weiteren auf Mannitol verzichtet und nur Zucker verwendet, die amorphe Strukturen ausbilden.

Eine andere Möglichkeit Poren in ansonsten amorphen Strukturen zu erhalten wurde von M. Mattern (212) entwickelt. Geringe Mengen einer schwerlöslichen Substanz, z.B. Phenylalanin, werden einer Zuckerlösung zugesetzt und fallen zu Beginn der Trocknung beim ersten Aufkonzentrieren kristallin aus. Auf diesem Kristallgerüst lagern sich danach die Zucker amorph ab. Das erhaltene Produkt besteht also nicht aus einer kompakten Zuckermatrix, sondern aus einem gerüstartigen, durchlässigen Kuchen (Abb. 69), welcher aufgrund der vielen Poren die Verdunstung von Wasser erleichtert und die Trocknung beschleunigt. Trotz der Kristalle liegt die eigentliche Zuckermatrix amorph vor und ist somit gut geeignet um Proteine zu stabilisieren.



**Abb. 69:** Aufnahmen mittels Rasterelektronenmikroskop von phenylalaninhaltigen Rezepturen (SPT). Die Nadeln stammen von Phenylalanin, die glatten Flächen vom amorphen Zucker. Links: Aus der Arbeit von M. Mattern (96), rechts: Eigene Aufnahme.

Mit Hilfe dieser Methode konnte M. Mattern ebenso trockene Produkte mit Vakuumtrocknung herstellen, wie mit Gefriertrocknung. Mittels Gefriertrocknung können auch pure Zuckerlösungen getrocknet werden, da in diesem Fall Eiskristalle die Rolle von Phenylalanin übernehmen. Bei der Warmlufttrocknung waren keine Eiskristalle vorhanden, so dass hier - genauso wie bei der Vakuumtrocknung - auf den „Trick“ mit Phenylalanin zurückgegriffen werden musste. Allerdings war der Effekt in unseren Untersuchungen nicht ganz so stark ausgeprägt. Ein Zusatz von 2 % Phenylalanin zu 5 % Saccharose erniedrigte die Restfeuchte nur um 3 %, auf 6 % (Tab. 7), was wohl an der ungleichen Verteilung der Rezeptur im Vial lag. Die eingesetzten 75 µl Rezeptur genügten nicht, um den gesamten Boden des Vials zu bedecken. Anstatt jedoch einen gleichmäßig dünnen Film auszubilden, floss die Lösung zu einigen großen Tropfen in der Vertiefung des Randes zusammen (Abb. 70 rechts). Dadurch vergrößerte sich die Schichtdicke der Matrix und die Diffusionstrecke für verdunstendes Wasser wurde so stark erhöht, dass eingeschlossenes Wasser nicht mehr vollständig entweichen konnte. Für unsere Versuche günstiger wären Vials ohne Erhöhung des Bodens in der Vialmitte. Da die bisher verwendete Vialart jedoch dem Standardprimärpackmittel der Pharmaindustrie entspricht, wurde sie weiterhin eingesetzt.



**Abb. 70:** Schematische Darstellung des Einflusses von Polysorbat 80 auf die Verteilung der Rezeptur innerhalb der Vials. Mit 0,01 % Tween 80 breitet sich die Rezeptur über den gesamten Boden gleichmäßig aus (links). Ohne Tween 80 bilden sich zwei Tropfen in den Ecken (rechts).

Aus dieser Beobachtung ergab sich als weitere Maßnahme zur Senkung der Restfeuchte, die Verringerung der Schichtdicke der Zuckermatrix. Dies konnte durch Zusatz von geringen Mengen an Polysorbat 80 erzielt werden. Das Tensid erniedrigte die Oberflächenspannung der Rezeptur, wodurch es zur Ausbreitung der Rezeptur in einer hauchdünnen Schicht über den gesamten Vialboden kam (Abb. 70 links). Neben der Verkürzung der Diffusionswege, wurde hierdurch auch eine Vergrößerung der Oberfläche erzielt, was in Gesamtheit zur Trocknung auf Restfeuchten von 1,9 % führte (Tab. 7). Durch die Kombination beider Varianten, d.h. durch Zusatz an Polysorbat 80 und Phenylalanin, konnte die Restfeuchte noch weiter herabgesetzt werden. Produkte aus 5 % Saccharose, 2 % Phenylalanin und 0,01 % Polysorbat 80 wiesen nur noch eine Restfeuchte von 1,6 % auf.

Abb. 71 veranschaulicht die unterschiedlichen Ausformungen der Zuckermatrix am Vialboden. Das Vial ganz rechts enthält nur Mannitol ohne Polysorbatzusatz. Das gebildete Produkt bedeckt eine Hälfte der Vertiefung am Vialrand, es ist eine ungleichförmige, große Kristallrosette zu erkennen. Das Produkt links daneben, eine Mischung aus Saccharose und Phenylalanin, bildet einen dünnen Streifen am Rand. Auch hier kam es nicht zur Bedeckung einer größeren Fläche des Bodens. Wohingegen die Produkte in den beiden linken Vials deutlich größere Flächen einnehmen. Die größte Ausbreitung wies die durchsichtige, getrocknete Schicht aus Saccharose und 0,01 % Tween auf (1. Vial links), während die Matrix aus Saccharose, Phenylalanin und Tween schneller eindickte und deshalb eine etwas geringere Fläche einnahm. Der aus Rezepturen mit Tensidzusatz gebildeten Ring (ersten zwei Vials) reichte grundsätzlich weiter in die Vialmitte hinein, als der Zuckerring von Produkten ohne Tween.

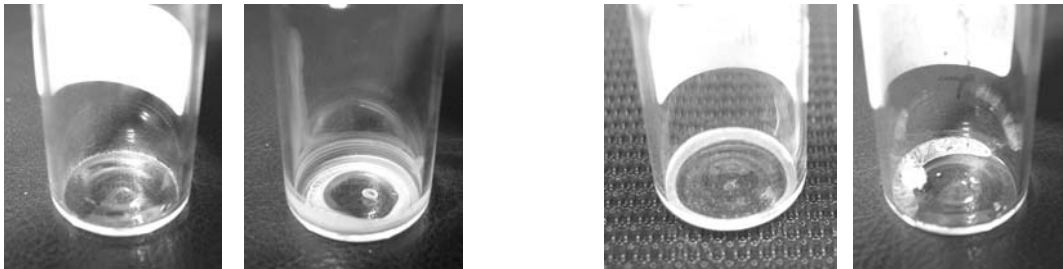


Abb. 71: Photographien von getrockneten Proben. Dargestellt sind die vergrößerten Ansichten der Zuckermatrixes. Von links nach rechts: ST und SPT, diese bedecken eine große Fläche; danach SP und M, diese bildeten nur schmale Ringe aus. S=Saccharose, T=Tween, P=Phenylalanin, M=Mannitol

Bisher wurde die Restfeuchte nur von Placebomischungen bestimmt. Proteinrezepturen enthielten jedoch neben der Placebomischung ca. 10 % Proteinbulk, welcher aufgrund der enthaltenen Salze einen Einfluss auf die Restfeuchte haben könnte. Der verwendete G-CSF-Bulk enthielt zwar 20 mmol Phosphatpuffer, hatte jedoch keine Veränderung des Trocknungsverhalten und der Restfeuchten der Produkte zur Folge. Rezepturen aus G-CSF und SPT trockneten ebenso wie reine Placeboprodukte (SPT) auf Restfeuchten von ca. 1,7 %. Dahingegen enthielt der Epo-Bulk neben 10 mmol Phosphatpuffer auch 10 mmol Natriumchlorid. Natriumchlorid ist ein äußerst hygroskopischer Stoff mit einer hohen Wasserbindungskapazität, wodurch die Trocknung behindert wurde. Produkte, welche aus Placebomischungen (SPT) und Epo-Bulk hergestellt wurden, wiesen eine deutlich höhere Restfeuchte auf, als reine Placeboprodukte (Abb. 72). Dieselbe Erhöhung der Restfeuchte wurde auch durch Zusatz von 1,5 % Natriumchlorid zur Placeborezeptur hervorgerufen, während der Zusatz von 20 mmolaren Phosphatpuffer keine Veränderung verursachte. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass Natriumchlorid und nicht der Phosphatpuffer die Ursache für die hohe Restfeuchte war. Durch dreimalige Umpufferung mit 10 mmol Phosphatpuffer wurde Natriumchlorid aus dem Bulk entfernt und eine Epo-Lösung geschaffen aus der Produkte mit niedriger Restfeuchte hergestellt

werden konnten (Abb. 72). Im Proteinbulk enthaltener Phosphatpuffer konnten zur pH-Wert-Einstellung und Isotonisierung in der Rezeptur verbleiben.

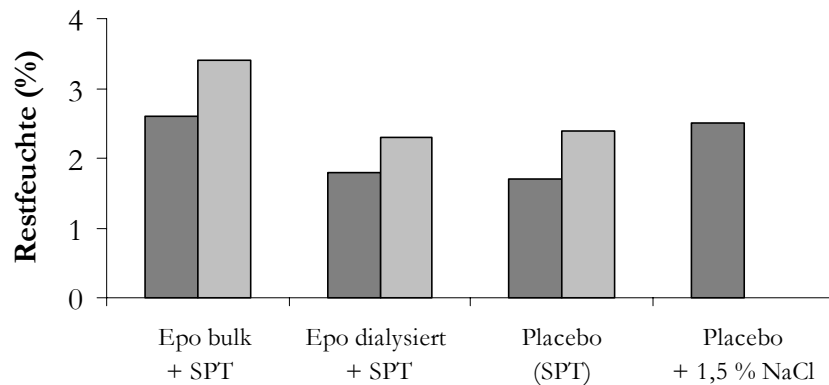


Abb. 72: Einfluss der Bulk-Bestandteile (NaCl und Phosphatsalze) auf die Restfeuchte der Produkte. Die Trocknung erfolgte bei verschiedenen Temperaturen: ■ G70+B50, □ G20+B30.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es bei der Warmlufttrocknung keiner außergewöhnlichen Hilfsstoffe bedarf um Restfeuchten unter 2 % zu erhalten. Als besonders geeignet stellte sich eine Mischung aus 5 % Saccharose, 0,01 % Polysorbat 80 und 2 % Phenylalanin heraus. Ohne Phenylalanin lagen die Restfeuchten minimal höher, jedoch immer noch im gewünschten Zielbereich unter 2 %.

### 3.2. Einfluss der Rezeptur auf Kristallinität und Aussehen der Proben

Im vorherigen Absatz wurde dargestellt, dass sich die Restfeuchte durch Zusatz von Phenylalanin und Polysorbat auf unter 2 % erniedrigen lässt. Da die gebildeten Produkte, zur Stabilisierung der eingeschlossenen Proteine (siehe C.I.3.1), zumindest teilamorph vorliegen sollten, wurde das Aussehen und der physikalische Zustand der Matrix untersucht. Die optische Struktur der trockenen Zuckermatrizes wurde mittels Mikroskopie detektiert. Dazu wurde der Zuckerkuchen direkt im Vial, durch den Boden hindurch betrachtet. Abb. 73 stellt das Aussehen verschiedener Produkte gegenüber. Bezüglich der Ausbildung amorpher oder kristalliner Strukturen wurden die Proben mit Hilfe von Differential Scanning Calorimetrie (DSC) und Röntgenpulverdiffraktometrie (XRD) untersucht.



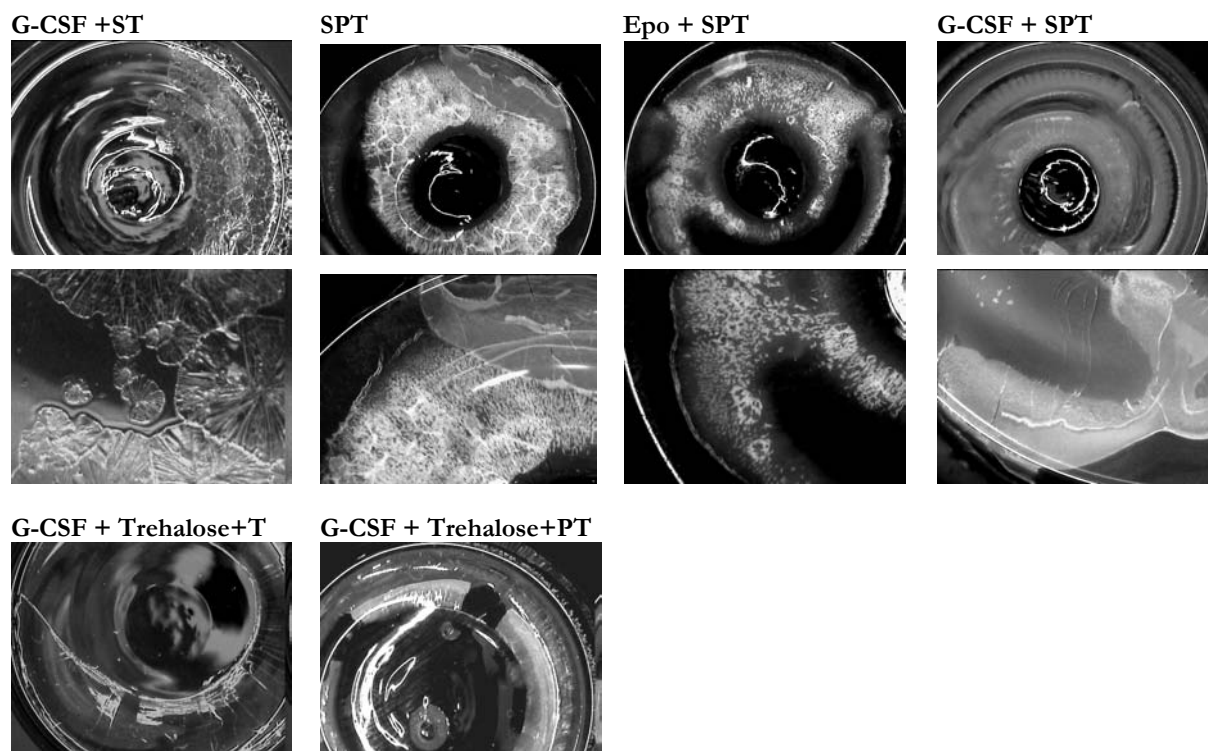


Abb. 73: Struktur der Produkte aus verschiedenen Rezepturen. Die Photographien wurden mittels Auflichtmikroskop mit fünffacher Vergrößerung (obere und untere Bildreihe), bzw. zehnfacher Vergrößerung (Mitte) in den Vials aufgenommen. S = Saccharose, P = Phenylalanin, T = Polysorbat 80.

Saccharose-Polysorbat-Mischungen bildeten völlig durchsichtige klare Filme (Abb. 73, 1. Spalte). Vereinzelt wurden kleine Rosetten in der Vergrößerung erkannt (Abb. 73, rechte Hälfte des Vials und Vergrößerung). Durchsichtige Filme deuten auf einen amorphen Zustand der Probe hin. Tatsächlich wurde mittels DSC ein deutlich ausgeprägter Glasübergang bei ca. 41 °C detektiert. XRD-Untersuchungen wiesen jedoch auf das Vorhandensein von kristallinen Strukturen hin. Neben einem „amorphen“ Bauch in der Basislinie wurden zusätzliche Peaks von kristalliner Saccharose detektiert (Abb. 74 rechts).

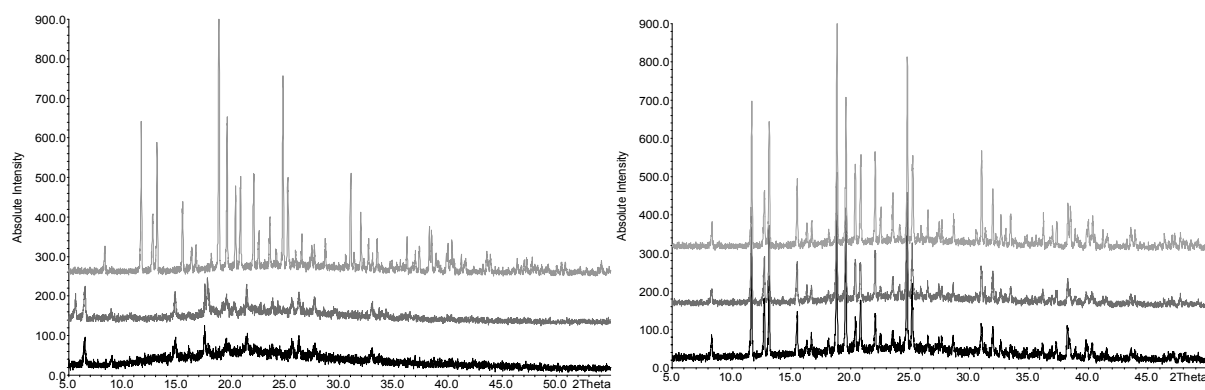


Abb. 74: Pulverdiffraktometerchromatogramme (XRD) der Produktmatrix nach Trocknung mittels Warmluftbegasung (G30+B30).

Links: G-CSF + SPT (unten), nur Phenylalanin (Mitte), kristalline Saccharose aus dem Vorrat (oben)

Rechts: G-CSF + ST (unten), nach Lagerung (Mitte), kristalline Saccharose aus dem Vorrat (oben)

Da kristalline Strukturen in der XRD-Analytik grundsätzlich sehr viel stärkere Reflexe hervorrufen als amorphe Strukturen, ließ sich aus dem Chromatogramm keine quantitative Aussage über den prozentualen Anteil der Kristalle treffen. Auf jeden Fall lagen Rezepturen aus Saccharose und Polysorbat nach Warmlufttrocknung sowohl zum Teil amorph, als auch zum Teil kristallin vor. Hiermit erklärte sich die große Erniedrigung der Restfeuchte von Saccharose-Polysorbat-Mischungen (1,9 %) im Vergleich zu reiner Saccharose (9 %). Die Verdunstung von Wasser wurde demnach sowohl durch die vom Tween verursachte Oberflächenvergrößerung, als auch durch die gebildeten Saccharosekristalle beschleunigt. Eine Erniedrigung der Restfeuchte durch Ausbildung kristalliner Strukturen, aufgrund des Zusatzes größerer Mengen an Polysorbat 80, wurde ebenfalls von R.L. Seitakari, V.P. Tanninen und J. Yliruusi beobachtet (163). Deren XRD-Untersuchungen zeigten, dass Proben mit 0,001 % Polysorbat 80 vollständig amorph vorlagen, während bei Zusatz von 0,1 % Polysorbat 80 kristalline Strukturen vorhanden waren. In unseren Versuchen wurde eine Konzentrationen von 0,01% Polysorbat 80 eingesetzt, so dass sich die Bildung kristallinen Strukturen mit den Erkenntnissen der Arbeitsgruppe Seitakari et al. deckt.

Für die Stabilisierung von Proteinen reicht die Ausbildung amorpher Matrixbestandteile, solange die Proteine in den amorphen Teil eingelagert werden. Durch unsere Untersuchungen zur Proteinstabilität (siehe C.I.3.3.1) wird genau dies für unsere Produkte bestätigt.

Beim Zusatz von Phenylalanin kam es beabsichtigter Weise zur Ausbildung von teilamorphen Strukturen. Das schwerlösliche Phenylalanin fiel bereits zu Beginn der Trocknung aus und bildete ein Kristallgerüst, auf dem sich der amorphe Zucker ablagerte. Das Vorhandensein amorpher Zucker konnte sowohl durch DSC-, als auch XRD-Untersuchungen bestätigt werden. Bei der DSC-Analytik wiesen alle Proben einen von amorphen Strukturen hervorgerufenen Glasübergang bei 55 °C bis 60 °C auf und mit Hilfe der XRD-Analytik wurden sowohl amorphe Zucker, als auch Phenylalaninkristalle detektiert. Die auf die gewölbte Basislinie aufgesetzten kleinen Peaks konnten eindeutig kristallinem Phenylalanin zugeordnet und von kristalliner Saccharose unterschieden werden (Abb. 74 links). Auch optisch unterschieden sich diese Proben stark von den völlig durchsichtigen Proben ohne Phenylalanin. In die durchsichtige Zuckermatrix wurden viele kleine weiße Phenylalaninkristalle eingelagert. Die Form dieser Kristalle unterschied sich je nach zugesetztem Protein. Während Epo-haltige Proben deutliche Kristallnester enthielten, erstarrten G-CSF-haltige Proben zu einer gleichmäßig weißlichen Matrix mit vielen winzigen Kristallen (Abb. 73 3. und 4. Spalte).

Rezepturen, in denen Saccharose gegen Trehalose ausgetauscht wurde, trockneten zu optisch mit Saccharose identischen Produkten (Abb. 73 unten)

### 3.3. Einfluss der Rezeptur auf die Proteinstabilität

Um den Einfluss der Rezeptur auf die Stabilität der Proteine zu untersuchen, wurden trockene Proben mit Reinstwasser rekonstituiert und mittels Größenausschlusschromatographie und SDS-Page untersucht. Obwohl durch Warmlufttrocknung keine Lyokuchen entstanden, sondern relativ kompakte Zuckermatrices, lösten sich diese sehr gut wieder auf. Innerhalb weniger Sekunden, bis maximal einer Minute entstanden unter leichtem Schütteln klare Lösungen. Diese Lösungen wurden auf lösliche Aggregate, Fragmente und unlösliche Aggregate untersucht.

#### 3.3.1. Einfluss verschiedener Zucker auf die Proteinstabilität

Grundsätzlich lag der Schwerpunkt dieser Arbeit auf dem Einsatz von Saccharose, dennoch soll hier kurz auf andere Zucker eingegangen werden. Abb. 75 und Abb. 76 stellen die Qualität von Produkten aus Saccharose, Trehalose und Mannitol gegenüber. Die ersten drei Proben in beiden Graphen wurden aus Zucker-Polysorbat 80-Mischungen hergestellt. Während die Restfeuchten (▲) der Saccharose und Trehalose Proben in etwa gleich hoch lagen, kristallisierte Mannitol aus und trocknete dadurch auf deutlich niedrigere Feuchten. Wie bereits in der Einleitung (siehe A.2 und A.2.2.4) besprochen wurde, ist für Proteinstabilisierung der amorphe Zustand nötig, was durch den Gehalt an Proteinmonomer (Balken) in den rekonstituierten Proben bestätigt wird. Kristalline Mannitol Proben wiesen nur 97,5 area % G-CSF-Monomer Gehalt auf, wohingegen amorphe Proben aus Saccharose oder Trehalose 99,6 % G-CSF-Monomer enthielten (Abb. 75). Nach 1,5 Monaten Kühlschrankschlagerung verschlechterte sich die Proteinstabilität der Mannitolprobe noch weiter auf 96,4 %. Die Saccharose Proben hingegen bewahrten ihre Stabilität. Auch bei erythropoietinhaltigen Proben wurde ein um 5 % erniedrigter Monomergehalt in Proben mit kristalliner Matrix festgestellt (99 % bei ST zu 94 % bei MT, Abb. 76). Dieser kleine Datensatz zeigt exemplarisch, wie wichtig der amorphe Zustand für die Stabilisierung und Erhaltung der Stabilität von Proteinen ist. Dabei konnte durchaus auch eine etwas höhere Restfeuchte in Kauf genommen werden.

Auch Saccharose und Trehalose Rezepturen konnten, durch Zusatz von Phenylalanin, auf Restfeuchten unter 2 % getrocknet werden, dargestellt in den letzten zwei Datensätzen. Trotz des kristallinen Anteils an Phenylalanin sollten Proteine theoretisch in die ansonsten amorphe Zuckermatrix eingebettet und stabilisiert werden. Es lag an einer spezifischen Reaktion von G-CSF mit Phenylalanin, auf welche unter C.I.3.3.2 näher eingegangen wird, dass es bei diesen zwei Proben dennoch zur Entstehung von Aggregaten kam (Abb. 75 gestreifte Balken). Epo-haltige Proben wurden dagegen - entsprechend der Theorie - durch den teilamorphen Anteil der Matrix stabilisiert (Abb. 76 gestreifte Balken). Mit Hilfe von Saccharose, Polysorbat 80 und Phenylalanin konnten Produkte mit

weniger als 2 % Restfeuchte und 99 % (Abb. 76) bis 99,6 % (anderer Datensatz Tab. 8) Monomer Epo gebildet werden.

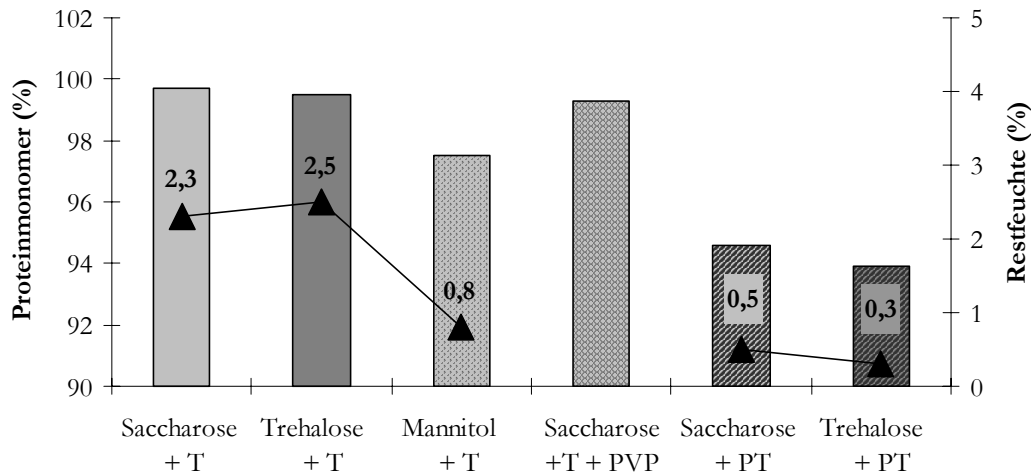


Abb. 75: Einfluss verschiedener Zucker auf die Proteinstabilität (G-CSF pH 4, Balken) und die Restfeuchte (▲ genaue Werte über den Balken angegeben) der Produkte nach Trocknung bei G70+B50.

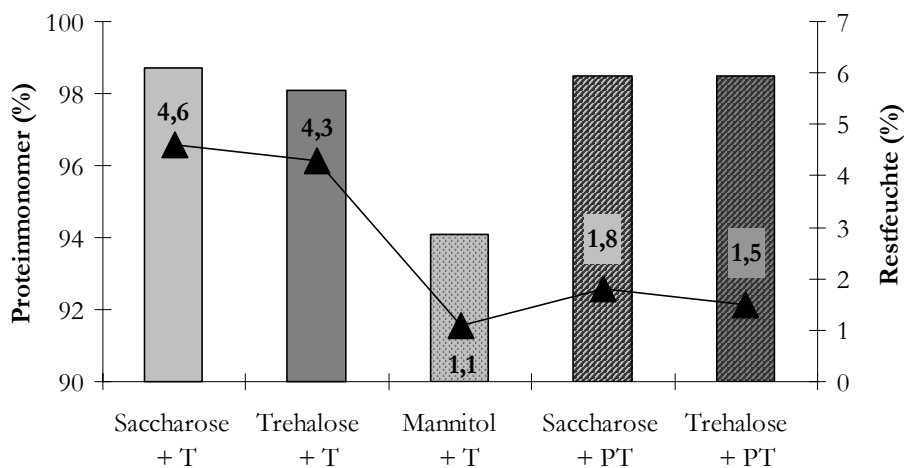


Abb. 76: Einfluss verschiedener Zucker auf die Proteinstabilität (Epo pH 7,4, Balken) und die Restfeuchte (▲ genaue Werte über den Balken angegeben) der Produkte nach Trocknung bei G30+B30/B60 für 2 h.

Zusammenfassend lässt sich über die verwendeten Zucker und Zuckeralkohole folgendes aussagen. Mannitol, ein kristalliner Zuckeralkohol, bildete Produkte mit sehr geringer Restfeuchte, aber niedriger Proteinstabilität. Trehalose und Saccharose formten amorphe Produkte, welche schlechter trockneten, aber eine sehr gute Proteinstabilität aufwiesen. Aus der Kombination von kristallinem Phenylalanin und amorphen Zuckern (Saccharose oder Trehalose) konnten Produkte mit niedriger Restfeuchte und hoher Proteinstabilität für Epo hergestellt werden. Zwischen den beiden amorphen Zuckern konnte kein nennenswerter Unterschied festgestellt werden (siehe auch Abb. 77). Unabhängig vom pH-Wert und von den Trocknungstemperaturen wurden für beide Zuckern in etwa die gleichen Ergebnisse erzielt. (Zur Erklärung der verschiedenen Proteinstabilitäten in Abb. 77 siehe C.I.3.3.2). Für alle weiteren Versuche wurde deshalb nur Saccharose verwendet.

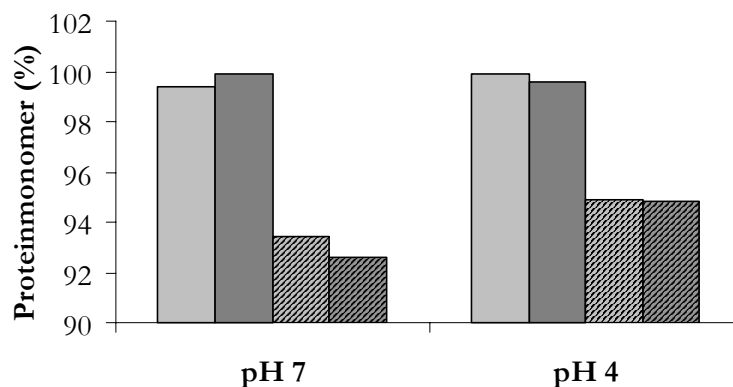


Abb. 77: Vergleich von Saccharose und Trehalose. Einfluss der Zucker auf die Stabilität von G-CSF bei der Trocknung mit hohen Temperaturen (G70+B50). □ Saccharose + T, ■ Trehalose + T, ▨ Saccharose + PT, ▩ Trehalose + PT. T=Polysorbat 80, P=Phenylalanin

### 3.3.2. Einfluss verschiedener Hilfsstoffe auf die Proteininstabilität im Überblick

Bevor auf den Einfluss von Phenylalanin und Tween im Speziellen eingegangen wird, sollen im Folgenden die grundsätzlichen Einflüsse der Hilfsstoffe im Überblick dargestellt werden (Tab. 8). Wenn Proteine ohne Hilfsstoffe, nur mit den Bulkbestandteilen, getrocknet wurden, kam es zu deutlichen Verlusten an Monomer. Entsprechend den Stabilisierungstheorien (siehe A.2.2.4, preferential exclusion, water replacement und vitrification) bewirkte der Zusatz von 5 % Saccharose eine Verbesserung der Stabilität, bis hin zur vollständigen Wiederfindung der Proteine. Diese Produkte trockneten jedoch sehr schlecht und wiesen Restfeuchten um 9 % auf. Um die Restfeuchte zu senken, wurde Polysorbat 80 zugesetzt. Abhängig von der Konzentration an Polysorbat 80 kam es zu leichten Verlusten an Proteinmonomer, welche jedoch akzeptiert werden konnten. Näheres dazu wird unter C.I.3.3.4 erläutert. Eine noch stärkere Absenkung der Restfeuchte wurde durch Zugabe von Polysorbat 80 und Phenylalanin erreicht. Auf die Stabilität von Epo hatte der Zusatz von Phenylalanin eine positive Wirkung, während die Stabilität von G-CSF dadurch drastisch verringert wurde. Genaueres dazu wird im nächsten Abschnitt dargestellt (C.I.3.3.2).

	Epo Rezepturen (pH 7,4)		G-CSF Rezepturen (pH 6)	
	Proteinmonomer (%)	Restfeuchte < 2%	Proteinmonomer (%)	Restfeuchte < 2%
nur Protein	99,3	-	95,8	-
+ S	100,0	-	98,0	-
+ S T	99,2	+	<b>97,2</b>	<b>+</b>
+ S T Phe	<b>99,6</b>	<b>++</b>	94,4	<b>++</b>

Tab. 8: Einfluss verschiedener Hilfsstoffe auf die Stabilität der Proteine. Die Trocknung erfolgte bei niedrigen Temperaturen (G30+B30) innerhalb von 4 Stunden. S = Saccharose, T = Polysorbat 80, Phe = Phenylalanin

### 3.3.3. Einfluss von Phenylalanin auf die Proteinstabilität

Phenylalanin fällt während der Trocknung kristallin aus, wodurch in der Zuckermatrix Poren gebildet werden, durch welche Wasser leichter verdunsten kann (siehe C.I.3.1). Während die hierdurch erzielte Erniedrigung der Restfeuchte unabhängig vom verwendeten Protein beobachtet wurde, kam es in Bezug auf die Proteinstabilität für verschiedene Proteine zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. Epo-Proben erlangten in Gegenwart von Phenylalanin eine höhere Stabilität, während G-CSF durch Phenylalanin stärker aggregiert wurde.

Wodurch dieser unterschiedliche Effekt des Phenylalanins auf die Proteinstabilität verursacht wurde, war zunächst unklar. Die Produkte beider Proteine lagen teilmorph vor, beide erlangten ähnliche Restfeuchten und wiesen ähnlich hohe Glasübergänge auf. Allerdings unterschieden sie sich im Aussehen. Während sich Epo-Proben durch eine klare Zuckermatrix mit eingelagerten Kristallhaufen auszeichneten, erschienen die Matrices von G-CSF-Proben gleichmäßig milchig. Scheinbar kam es hier zu einer feineren Verteilung von Phenylalanin, so dass dieses in engem Kontakt mit Zucker und Protein als Mischmatrix ausfiel. Eventuell führte dieser direkte Kontakt zwischen G-CSF und Phenylalanin besonders bei höheren Temperaturen zur Aggregation.

Um mehr über die Ursachen der Aggregation von G-CSF zu erfahren, wurde der Einfluss von Phenylalanin unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Abb. 78 gibt die Ergebnisse wieder.

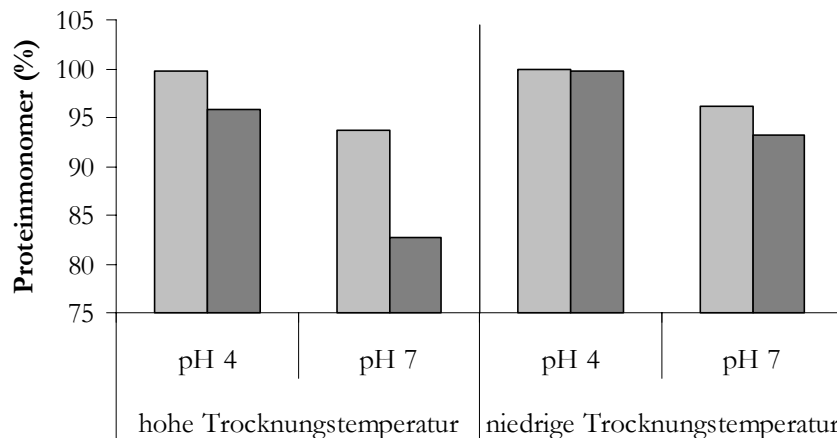


Abb. 78: Einfluss von Phenylalanin auf die Stabilität von G-CSF bei zwei pH-Werten (4 und 7) und Trocknung bei zwei verschiedenen Temperaturen (hoch: G70+B50 und niedrig: G30+B30).  ohne Phenylalanin,  mit Phenylalanin

Neben dem grundsätzlichen Einfluss des pH-Wertes auf die Stabilität von G-CSF (siehe auch C.I.3.3.5) konnten deutliche Unterschiede zwischen Rezepturen mit und ohne Phenylalanin festgestellt werden. Phenylalaninhaltige Proben wiesen immer eine geringere Proteininstabilität auf, als gleich hergestellte Proben ohne Aminosäure. Je höher die zur Trocknung verwendete Temperatur war, desto deutlicher war der aggregationsfördernde Effekt des Phenylalanins. Während bei niedrigen Temperaturen und einem pH-Wert von 4 Produkte mit gleicher Stabilität gebildet wurden, wiesen bei hohen Temperaturen

getrocknete Produkte bereits einen Stabilitätsunterschied von 4 area % auf. Durch die Verwendung eines für G-CSF ungünstigen pH-Wertes von 7, wurde der destabilisierende Effekt von Phenylalanin noch deutlicher.

Insgesamt schien die verstärkte Aggregation durch Phenylalanin besonders dann aufzutreten, wenn aufgrund anderer Stressfaktoren bereits metastabiles (denaturiertes) Protein vorlag, so z.B. bei Einstellung auf einen ungünstigen pH-Wert oder unter hoher thermischer Belastung. Da herkömmliche Trocknungsmethoden (wie z.B. die Lyophilisation) üblicherweise bei niedrigeren Temperaturen durchgeführt werden, ist es möglich, dass der aggregierende Effekt des Phenylalanins von anderen Arbeitskreisen bisher nicht beobachtet wurde. Selbst während der Warmlufttrocknung bei niedrigen Temperaturen (G30+B30) wurden in den Vials Temperaturen von 42 °C bis 51 °C erreicht. Diese Temperaturen stellten für das empfindliche G-CSF einen erheblichen Stressfaktor dar, der zusammen mit Phenylalanin die Aggregation auslöste.

Eventuell lässt sich der Effekt von Phenylalanin auch mit der schnelle Änderung der Konsistenz, während des raschen Aufkonzentrierens zu Beginn der Warmlufttrocknung in Zusammenhang bringen. Phenylalaninfreie Rezepturen wiesen in den ersten Minuten der Trocknung zwar einen ebenso hohen Wasserverlust, aber eine völlig andere Konsistenz, wie phenylalaninhaltige Rezepturen auf. Ohne Aminosäurezusatz blieben die Proben für acht Minuten flüssig, wurden ab der neunten Minute klebrig und erstarrten danach amorph. Mit Phenylalanin enthielten die Proben bereits ab der zweiten Minute einen ersten festen weißen Ring, wurden nach vier Minuten klebrig und erstarrten teilamorph. Tatsächlich erfolgte die stärkere Aggregation von G-CSF-Proben mit Phenylalanin vor allem in den ersten Minuten der Trocknung, während die Stabilitätskurven danach parallel zu Kurven ohne Phenylalanin verliefen. Zusätzlich zur temperaturabhängigen Aggregation kam es also bei G-CSF in den ersten Trocknungsminuten noch zur phenylalaninabhängigen Aggregation (Abb. 79 links). Bei Epo-Rezepturen wurde diese zusätzliche Aggregation nicht festgestellt. Hier kam es mit und ohne Phenylalanin nur zur temperaturabhängigen Aggregation (Abb. 79 rechts), welche außerdem weniger stark ausgeprägt war.

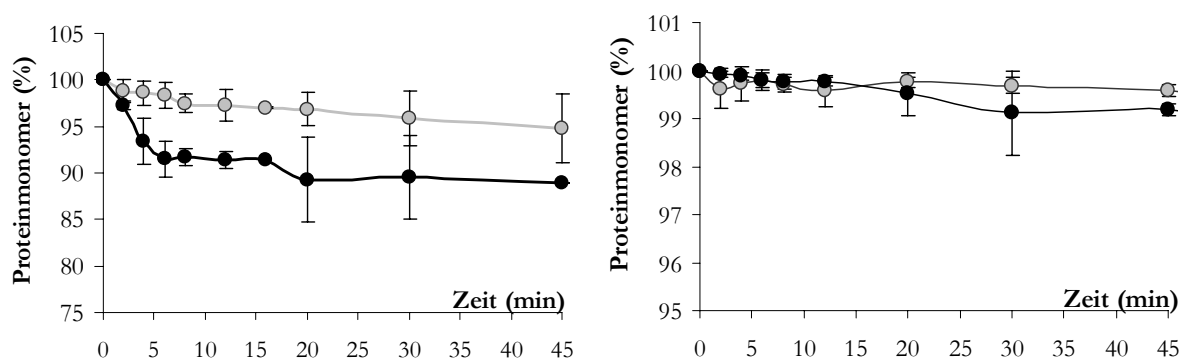
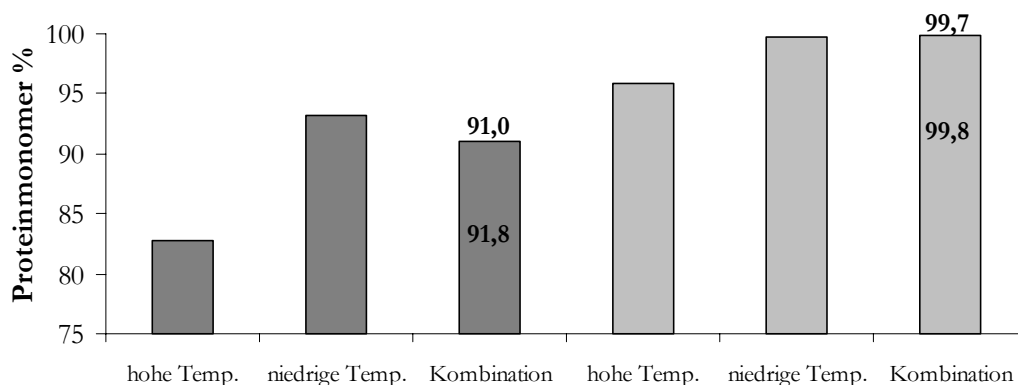


Abb. 79: Vergleich der Stabilität von G-CSF (links) und Epo (rechts) mit und ohne Phenylalaninzusatz während der Trocknung bei hohen Temperaturen (G70+B50). Achtung: Zur besseren Veranschaulichung der Einzelkurven wurden für beide Abbildungen unterschiedliche Achsen gewählt. ○ Protein + ST, ● Protein + SPT, alle pH 7.

Unabhängig davon, wodurch die hohe Aggregation von G-CSF in Gegenwart von Phenylalanin hervorgerufen wurde, boten sich drei Möglichkeiten an dennoch stabile G-CSF Produkte herzustellen. Erstens der Verzicht auf Phenylalanin, zweitens die Trocknung bei niedrigen Temperaturen unter Verwendung von pH 4 und drittens der Einsatz von Temperatur-Kombinations-Programmen. Da Phenylalanin verstärkt bei hohen Temperaturen und in den ersten Minuten der Trocknung zur Aggregation führte, sollte es möglich sein diese zu umgehen, indem auf eine schonende Grundtrocknung bei niedrigen Temperaturen eine schnelle Resttrocknung bei höheren Temperaturen aufgesetzt wird. Produkte, welche mit Hilfe dieser Kombinationstrocknung hergestellt wurden, wiesen annähernd die gleiche Stabilität auf, wie Produkte aus einer Trocknung bei ausschließlich niedrigen Temperaturen (Abb. 80). Dabei konnten gegen Ende der Trocknung wieder hohe Temperaturen eingesetzt werden, ohne dass es zu einem erneuten Abfall in der Proteinstabilität kam.



**Abb. 80:** Einfluss der Trocknungstemperatur auf die Stabilität von phenylalaninhaltigen Proben. Bei hohen Temperaturen entstanden mehr Aggregate. Durch Einsatz von Temperatur-Kombinations-Programmen konnten ähnlich hohe Stabilitäten erzielt werden, wie durch Trocknung bei niedrigen Temperaturen. Die Zahl im Balken gibt den Proteinmonomergehalt nach dem ersten Trocknungsschritt (1h bei G30+B30), die Zahl über den Balken nach Abschluss der Kombinationsprogramme (bei G70+B50) wieder.

■ pH 7, □ pH 4.

#### 3.3.4. Einfluss von Tween auf die Proteinstabilität

Um die Restfeuchte der Produkte auf 2 % oder weniger zu erniedrigen, war der Zusatz von Polysorbat 80 nötig. Besonders durch höhere Konzentrationen an Polysorbat 80 kam es jedoch zur Aggregation der Proteine (Abb. 81). Dieses bekannte Stabilitätsproblem könnte durch im Polysorbat enthaltene Oxidationsprodukte verursacht worden sein (162, 18, 12). Auch M. Adler und G. Lee beobachteten bei der Lagerung von sprühgetrockneten Produkten mit zunehmender Polysorbatkonzentration eine temperaturabhängige Aktivitätsabnahme von LDH (162). Sie führen diesen, erst bei der Lagerung und nicht bereits bei der Herstellung auftretenden, Effekt auf die im Polysorbat enthaltenen Peroxide zurück.

Zur Erniedrigung der Restfeuchte der Produkte unter 2 % erwiesen sich in unserem Fall 0,01 % Polysorbat 80 als ausreichend. Diese geringen Tensidmengen verursachten noch



keine Aggregation. Selbst bei einem pH-Wert von 6 wurden in Proben mit 0,01 % Polysorbat 80 nur 0,8 % Aggregate detektiert, unter schonenderen Bedingungen (pH 4) blieb die Proteininstabilität noch besser erhalten. Deshalb wurde weiterhin jeder Rezeptur 0,01 % Polysorbat 80 zugesetzt

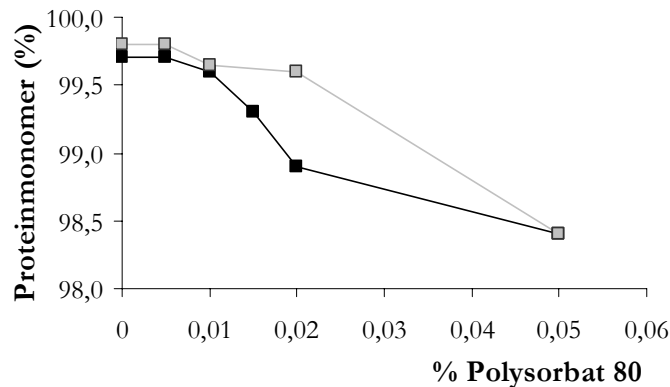


Abb. 81: Einfluss der Konzentration von Polysorbat 80 auf die Stabilität von G-CSF (pH4). ■ Trocknung bei G70+B50, □ Trocknung bei G30+B30.

### 3.3.5. Einfluss des pH-Wertes auf die Stabilität von G-CSF

Bereits aus den oben präsentierten Daten geht hervor, dass die Stabilität von G-CSF stark pH-Wert abhängig ist. Da es sich bei G-CSF um ein parenteral zu applizierendes Protein handelt, spielt der pH-Wert bei der Entwicklung einer Formulierung eine wichtige Rolle. Die zu applizierende Lösung sollte annähernd isohydrisch sein, also in etwa dem physiologische pH-Wert des Blutes 7,4 entsprechen. Während für intravenös zu applizierende Lösungen gewisse Abweichungen von diesem pH-Wert aufgrund der schnellen Verdünnung akzeptiert werden können, sollten intramuskulär oder subkutan zu verabreichende Produkte möglichst nahe am physiologischen pH-Wert liegen. Zu große Abweichungen können beim Patienten neben schmerzhaften Reaktionen, auch lokale Gewebereizungen hervorrufen.

Allerdings weist G-CSF gerade im neutralen pH-Bereich eine geringe Stabilität auf. Aus Abb. 82 geht klar die ausgeprägte Abnahme der Stabilität oberhalb von pH 6 hervor. Diese aus rekonstituierten Proben der Warmlufttrocknung gewonnenen Daten finden ihre Entsprechung in Daten anderer Arbeitskreise (213, 214, 215, 216, 217). Mittels Fluoreszenzanalyse von Tryptophan und Tyrosin wurde von Narhi et al. festgestellt, dass sich bei neutralem pH-Werten die Sekundärstruktur von G-CSF verändert (214). Hsieng et al. fanden mittels Circular dichroismus eine Erniedrigung der Schmelztemperatur  $T_m$  um 6 °C im neutralen pH-Bereich, verglichen zu Proteinlösungen mit sauren pH (217). Gomez-Orellana et al. zeigten, dass die thermische Auffaltung von G-CSF nur unterhalb von pH 3,5 reversibel ist, während es darüber zur irreversiblen Aggregation kommt (213).

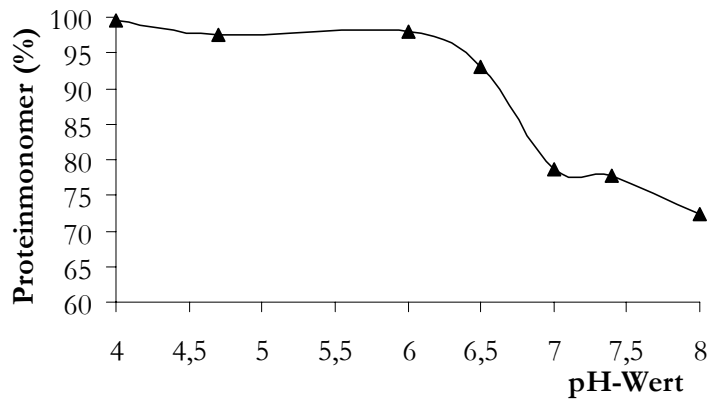


Abb. 82: Einfluss des pH-Wertes auf die Stabilität von G-CSF (+ST) bei Trocknung mit hohen Temperaturen (G70+B50).

Bisher befindet sich nur eine einzige Formulierung mit pH 6,5 auf dem Markt, das Lyophilisat von Chugai Pharma, Granocyte<sup>®</sup>. Nach Rekonstitution steht es zur subkutanen Injektion oder intravenösen Infusion zur Verfügung. Das andere auf dem europäischen Markt befindliche Produkt, Neupogen<sup>®</sup> von Amgen, ist eine Lösung und weist einen pH-Wert von 4,0 auf. Diese Lösung darf nur im Kühlschrank gelagert werden, wohingegen das Lyophilisat bei 25 °C aufbewahrt werden kann.

Für die eigenen Versuche wurden sowohl G-CSF Formulierungen bei pH 6,0 als auch bei pH 4,0 verwendet.

#### 4. Stabilitätsuntersuchungen

Mit Hilfe optimierter Geräteparameter und Rezepturen wurden zwei Modellproteine, G-CSF und Epo, mittels Warmlufttrocknung getrocknet und deren Lagerstabilität getestet. Dazu wurden zwei Proteine mit unterschiedlicher Molmasse und Stabilität gewählt. Zum einen das „große“ Erythropoietin mit 38 kD, welches bei pH 7,4 eine gute Stabilität aufweist, und zum anderen das „kleinere“ G-CSF mit 19 kD, welches nur im Sauren stabil ist. Beide Proteine gehören zu den so genannten „helical bundle cytokine“, d.h. sie enthalten vier  $\alpha$ -Helices und zwei Disulfidbrücken. Natürlicherweise handelt es sich bei beiden um Glycoproteine. Von uns wurde jedoch das rekombinant in *Escherichia coli* hergestellte rh G-CSF verwendet, welches nicht glykosiliert ist. Wohingegen das eingesetzte rh Erythropoietin in den Ovarialzellen des Hamsters gebildet wurde, und damit Zuckerketten aufweist. Diese bestehen vor allem aus Sialinsäure. Für die in vitro Stabilität und in vivo Aktivität von Epo ist die Existenz der Zuckerketten essentiell. Auch G-CSF weist in deglykosilierter Form eine erhöhte Neigung zur Aggregation, besonders bei neutralen pH-Werten, auf. Erlangt aber ansonsten seine normale Aktivität. Für beide

Proteine ist des weiteren die korrekte Sekundär- und Tertiärstruktur von entscheidender Bedeutung. Da es mit unseren Labortechniken nicht möglich war, die Aktivität der Proteine direkt zu bestimmen, wurde die strukturelle Integrität der Proteine als Maß für ihre Stabilität gewertet. Mittels Größenausschlusschromatographie und SDS-Gelelektrophorese wurden die Proben auf Bildung von Dimeren, höher molekularen Aggregaten oder Fragmenten untersucht. Beide Proteine wurden in annähernd therapeutischen Mengen eingesetzt. Für die folgenden Untersuchungen enthielt ein Vial 18 µg Epo bzw. 32 µg G-CSF.

Aufgrund der geringen Stabilität von G-CSF bei neutralen pH-Werten, wurden zwei Rezepturen mit unterschiedlichen pH-Werten eingesetzt: Zum einen G-CSF mit 5 % Saccharose, 2 % Phenylalanin und 0,01% Polysorbat 80 bei einem pH-Wert von 4 und zum anderen die gleiche Rezeptur ohne Phenylalanin bei einem pH-Wert von 6. Wie unter C.I.3.3.2 (Einfluss verschiedener Hilfsstoffe auf die Proteinestabilität) ausführlich beschrieben wurde, muss bei neutralen pH-Werten auf den Zusatz von Phenylalanin verzichtet werden, da es zu verstärkter Aggregation von G-CSF führt. Für Erythropoietin wurde die Standardrezeptur, bestehend aus Saccharose, Phenylalanin und Polysorbat 80 beim physiologischer pH-Wert (pH 7,4) verwendet.

Da zum Zeitpunkt der Einlagerung noch keine optimierten, kurzen Temperaturprogramme zur Verfügung standen, wurden die Proben mittels langsamer, aber schonender Niedrigtemperaturtrocknung hergestellt. Dazu wurden die Rezepturen innerhalb von 4 Stunden bei 30 °C Gastemperatur und 30 °C Blocktemperatur getrocknet, die Vials verschlossen, verbördelt und bei verschiedenen Temperaturen eingelagert. Es wurden Temperaturen gewählt, bei welchen auch die auf dem Markt befindlichen Produkte gelagert werden müssen (Neupogen® im Kühlschrank; Granocyte® bei 2 – 25 °C). Da es nicht möglich war, die eigenen Proben für 2 Jahre (garantierte Lagerdauer laut Beipackzettel der Handlesprodukte) einzulagern, wurden neben der Lagerung im Kühlschrank (4 – 8 °C) und bei Raumtemperatur (25 °C), noch zusätzliche Einlagerungen bei erhöhten Temperaturen (30 °C und 40 °C) vorgenommen.

Alle Proben wurden direkt nach der Herstellung und nach verschiedenen Intervallen sowohl optisch, als auch auf Restfeuchte und Stabilität der Proteine untersucht. Tab. 9 gibt die Qualität der Produkte direkt nach der Herstellung wieder.

Rezeptur	pH	Proteinmonomer (%)	Restfeuchte (%)	T <sub>G</sub> (°C)
Epo + SPT	7,4	100	1,8	58
G-CSF +ST	6	99,2	2,2	40
G-CSF +SPT	4	99,9	1,9	44

Tab. 9: Qualität der Produkte zu Beginn der Einlagerung, nach Trocknung bei niedrigen Temperaturen (G30+B30, 4 h).

Auch aus den SDS-PAGE Gelen in Abb. 83 geht die Qualität der hergestellten Proben hervor. In keinem Fall wurden zusätzlich zur Monomerbande höhermolekulare Nebenbanden angefärbt.

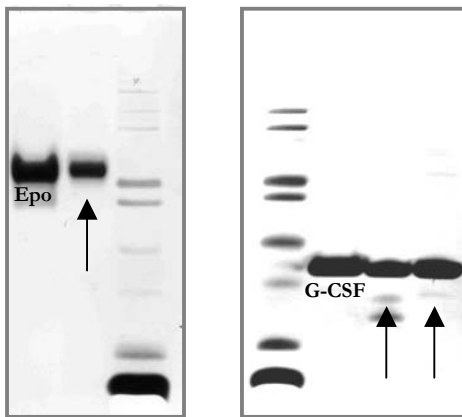


Abb. 83: SDS-PAGE von Epo (links) und G-CSF (rechts, zuerst +ST, daneben +SPT) Proben direkt nach der Herstellung (Pfeile). Zusätzlich sind ein Größenmarker und frisch aufgetautes Protein als Referenz aufgetragen.

#### 4.1. Restfeuchte und optische Veränderungen

Betrachten wir zunächst die Veränderung der Restfeuchte während der Einlagerung. In den Abbildungen Abb. 84, Abb. 87 und Abb. 90 sind die Restfeuchten der drei verwendeten Rezepturen nach Einlagerung bei unterschiedlichen Temperaturen dargestellt. Aus dem Diagramm in Abb. 84 geht der grundsätzliche Trend aller Rezepturen hervor. Nach anfänglichem Anstieg der Restfeuchten kam es im weiteren Verlauf der Einlagerung zu einer kontinuierlichen Abnahme der Restfeuchte.

##### 4.1.1. *G-CSF + ST*

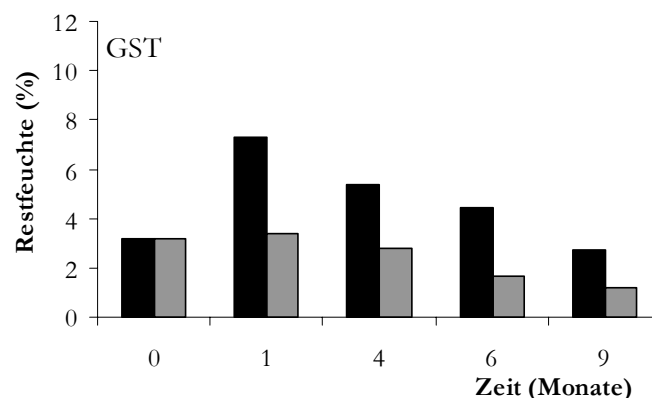


Abb. 84: Veränderung der Restfeuchte von G-CSF + ST bei Einlagerung bei verschiedenen Temperaturen. G = G-CSF, S = Saccharose, T = Polysorbat 80. ■ 4 °C, ■ 25 °C.

Dies erschien auf den ersten Blick überraschend und ließ einen Messfehler vermuten. Weiterhin auffällig war, dass Produkte, welche bei höheren Temperaturen eingelagert wurden, durchgängig eine niedrigere Feuchte aufwiesen, als Produkte welche bei 4 °C

aufbewahrt wurden. Unter Berücksichtigung der optischen Veränderungen der Matrix ließ sich jedoch eine logische Erklärung finden. Folgende Bilder geben das Aussehen der Saccharose-Polysorbitat-Matrix (G-CSF +ST) wieder (Abb. 85).

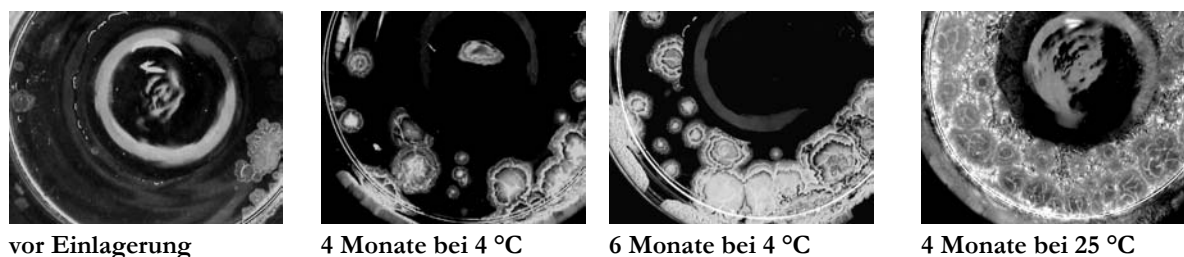


Abb. 85: Aufnahmen der Matrix von G-CSF + ST Proben vor und nach Einlagerung.

Während die Zuckermatrix direkt nach der Herstellung fast völlig durchsichtig vorlag, kam es mit zunehmender Lagerzeit zu immer stärkerem Kristallwachstum. Nach vier Monaten waren die bei 25 °C gelagerten Proben bereits völlig kristallin. Auch bei Lagerung bei 4 °C kam es nach 4 Monaten zu vereinzelt Kristallrosetten, deren Häufigkeit und Anzahl im Laufe der weiteren Einlagerung zunahm. Durch die Kristallisation der Saccharose kam es zur Freisetzung von Wasser, welches durch Diffusion zunächst in den amorphen Teil der Matrix und bei weiterer Kristallisation durch Verdunstung aus der Matrix in den Luftraum der Vials und in die Stopfen überführt wurde. Dies war möglich, da an kristalline Strukturen adsorbiertes Wasser sehr viel leichter abgegeben werden kann, als in amorphe Gläser eingeschlossenes Wasser (45). Mittels Karl-Fischer-Titration wurde nur das in der Matrix enthaltene und nicht das in der Luft befindliche Wasser bestimmt, so dass es mit zunehmender Kristallisation zur Abnahme der Restfeuchte der Proben kam. Aufgrund dieser Erkenntnis und in Übereinstimmung mit Literaturdaten (218) lassen sich die erhaltenen Kurven erklären. Je höher die Lagertemperatur war, desto höher war zunächst die Wasseraufnahme durch Diffusion aus den Stopfen und der Umgebungsluft. Sobald ein bestimmter Wassergehalt in den Proben erreicht wurde, kam es zur Kristallisation der Saccharose und dadurch zur Abnahme der Restfeuchte. Die maximal aufgenommene Menge an Wasser konnte dabei eine Restfeuchte von 10 % in den Proben hervorrufen, da amorphe Gläser grundsätzlich in der Lage sind sehr große Mengen an Wasser aufzunehmen. Laut B. C. Hancock und G. Zografi (45) ist selbst eine Wasseraufnahme von 100 % des Eigengewichts keine Ausnahme. Ab welcher Restfeuchte die Kristallisation tatsächlich beginnt, hängt neben dem Zucker und den vorhandenen Hilfsstoffen auch von der Proteinkonzentration ab. J.M. Sarciaux und M. Hageman konnten zeigen, dass die Kristallisation von Saccharose durch steigende Konzentrationen an bovines Somatotropin (rbSt) verzögert und ab 30 % rbSt ganz verhindert werden konnte (124). Die in dieser Arbeit verwendeten Proben enthielten nur 0,6 % G-CSF bzw. 0,4 % Epo, wodurch die Kristallisation nicht unterbunden wurde.

Auf den ersten Blick schienen Proben (G-CSF+ST), welche bei 25 °C gelagert wurden, kein Wasser aufgenommen zu haben (Abb. 85 ■). Vermutlich war die maximale

Wasseraufnahme jedoch bereits im ersten Monat erfolgt, so dass sich danach durch Kristallisation ein neuer niedrigerer Restfeuchtelevel eingestellt hatte. Diese Annahme wurde durch Mikroskopaufnahmen (Abb. 85) und durch Untersuchungen mittels Pulverdiffraktometer (Abb. 74) bestätigt. Der bereits mit bloßem Auge deutlich ersichtliche Kristallwachstum fand seine Entsprechung in immer stärker ausgeprägten Kristallreflektionen.

Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass Saccharose-Polysorbat-Proben keine gute Lagerstabilität aufweisen, obwohl sie direkt nach der Herstellung noch innerhalb der Spezifikationen lagen. Offenbar dienten die Saccharosekristalle, die bereits während der Trocknung gebildet wurden (siehe C.I.3.2), als Kristallisationskeime für eine weitere Kristallisation der Proben.

#### 4.1.2. *Epo + SPT*

Ähnlich, aber deutlich vielversprechender, waren die Ergebnisse für phenylalaninhaltige Proben. Betrachten wir zunächst die Restfeuchten von Erythropoietin-Rezepturen (Epo+SPT), dargestellt in Abb. 87 und die dazugehörigen Mikroskopaufnahmen (Abb. 86). Zwar kam es auch hier bei höheren Temperaturen zur zunehmenden Kristallisation der Proben, bei Kühlschranklagerung blieben die Proben optisch jedoch weitgehend unverändert. Dies spiegelt sich in den Restfeuchten wieder. Bei 4 °C gelagerte Epo-Proben wiesen einen kontinuierlichen Anstieg der Restfeuchte auf, welche nach einem Monat ein Plateau bei ca. 4 – 5 % erreichte (■). Auf die relativ hohe Feuchte von 4 % wird später noch näher eingegangen.

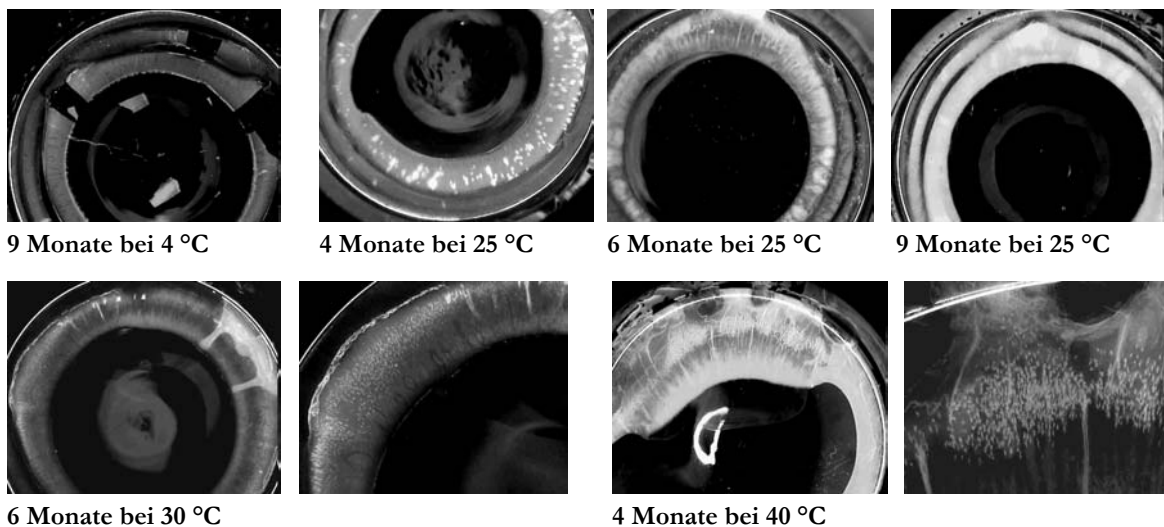


Abb. 86: Aufnahmen der Matrix von Epo + SPT Proben vor und nach Einlagerung.

Bei 25 °C gelagerte Proben wiesen dagegen den typischen Verlauf einer Restfeuchtekurve mit Kristallisation auf, Anstieg der Restfeuchte auf 10 % und danach Abnahme der Restfeuchte (■). Auffällig war die durchgehend niedrigere Restfeuchte von bei 30 °C (□) und 40 °C (≡) gelagerten Proben. Entsprechend den Mikroskopaufnahmen dürfte

es auch bei diesen beiden Lagertemperaturen zur leichten Kristallisation gekommen sein, wenn auch zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Abb. 86, Kristallisation bei 30 °C nach sechs Monaten und bei 40 °C nach 4 Monaten). Dennoch wiesen die bei diesen Temperaturen gelagerten Proben eine deutlich langsamere und geringere Wasseraufnahme auf, als bei 25 °C aufbewahrte Proben. B. Hancock und G. Zografi erwähnen zwar, dass die Wasserdampfadsorption von amorphen Gläsern mit fallenden Temperaturen aufgrund des exothermen Lösungsmodells ansteigt, gleichzeitig schätzen sie den Effekt der Temperatur jedoch als gering ein (45). Auch war die Temperaturdifferenz zwischen 25 °C und 30 °C nicht so groß, als dass damit der große Restfeuchteunterschied erklärt werden könnte. Wahrscheinlicher ist, dass die Wasseraufnahme und das Kristallisationsverhalten der 30/40 °C Proben tatsächlich anders erfolgte, als die von den bei 4 °C und 25 °C gelagerten Proben. Die Daten der vier Einlagerungen stammten von zwei verschiedenen Chargen, welche mit unterschiedlichen Stopfen und zu unterschiedlichen Jahreszeiten hergestellt wurden. In einem späteren Abschnitt dieses Kapitels wird der Einfluss dieser zwei Parameter im Detail erklärt (C.I.4.1.4). Demnach wäre es möglich, dass die im Mai hergestellte Charge eine geringere Luftfeuchte enthielt, als die im November produzierte Charge. Hierdurch und durch die Verwendung von möglicherweise feuchteren Stopfen war in der Novembercharge mehr Wasser in den Vials enthalten, und es kam trotz Lagerung bei niedrigeren Temperaturen (4 und 25 °C) zur schnelleren Wasseraufnahme und Kristallisation der Proben.

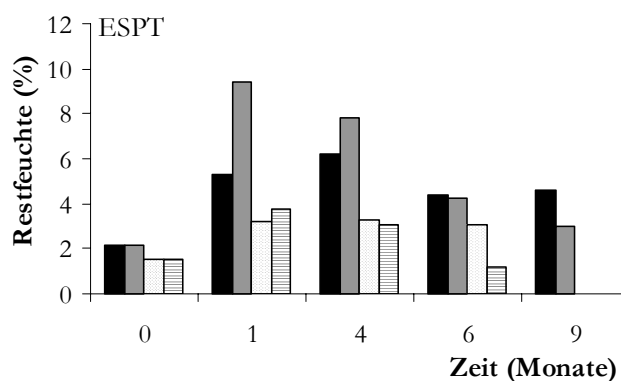


Abb. 87: Veränderung der Restfeuchte von Epo + SPT bei Einlagerung bei verschiedenen Temperaturen. E = Epo, S = Saccharose, P = Phenylalanin, T = Polysorbat 80. ■ 4 °C, ■ 25 °C, ▨ 30 °C, ▤ 40 °C.

Zusammenfassend lässt sich aufgrund der unterschiedlichen Chargenqualität folgendes festhalten. Bei 4 °C gelagerte Proben kristallisierten nicht aus, es kam aber zum Anstieg der Restfeuchte auf 4 - 5 %. Dieser Anstieg ließe sich durch Verwendung von getrockneten Stopfen und durch Befüllung der Vials mit getrockneter Luft oder Inertgas verhindern (siehe Tab. 13). Proben, welche unter etwas „trockeneren“ Bedingungen bei 30 °C über sechs Monate eingelagert wurden, wiesen lediglich einen Anstieg der Restfeuchte auf 3 % auf, wobei es erst nach 6 Monaten zu ersten minimalen Kristallisationseffekten kam (probenabhängig, teilweise auch keine Kristallisation). Dies entspricht den aus der Literatur bekannten Erwartungen. R. Hatley beschreibt die

Zunahme der Restfeuchte auf 2 - 3 % nach 1 – 2 Monaten Lagerung aufgrund des Wasserübergangs aus dem Stopfen in das Produkt als typisch (49).

#### 4.1.3. *G-CSF + SPT*

Die bereits bei der Erythropoietin-Einlagerung diskutierten Effekte traten auch bei der G-CSF–Rezeptur mit Phenylalanin auf (Abb. 90 links). Bei 4 °C und 25 °C eingelagerte Chargen (■ ■) adsorbierten mehr und schneller Wasser, als bei höheren Temperaturen aufbewahrte Chargen (□ ▨). Auch in diesem Fall lag dies an der Herstellung der Proben. Die für die 4 °C und 25 °C Einlagerung verwendete, im November hergestellte Charge enthielt feuchtere Stopfen und feuchtere Luft. Entsprechend der beobachteten Kristallisation (Abb. 88) kam es bei den verschiedenen Proben zu unterschiedlichen Zeiten zur Abnahme der Restfeuchte. Während der Vergleich aller vier Temperaturen aufgrund der unterschiedlichen Chargenqualität nicht möglich war, ließ sich innerhalb jeder Charge feststellen, dass der Zeitpunkt der Kristallisation mit steigender Einlagerungstemperatur früher stattfand (4 °C: 9. Monat / 25 °C: 1-4 Monat bzw. 30 °C: 4-6 Monat / 40 °C: 1-4 Monat). Bemerkenswert war auch, dass die sich nach der Kristallisation einstellenden Restfeuchten mit der Zeit einen konstanten Level erreichten, welcher bei nur 1 % lag.

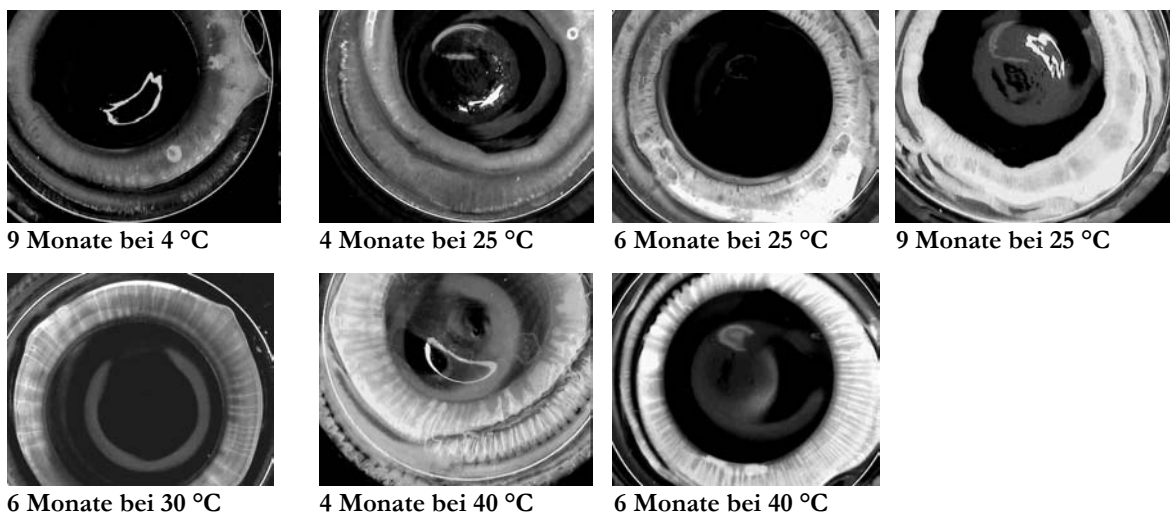


Abb. 88: Aufnahmen der Matrix von G-CSF+SPT Proben nach Einlagerung bei verschiedenen Temperaturen.

Bei Lagerung bei 4 °C konnte die G-CSF Charge ca. 6 – 9 Monate aufbewahrt werden ohne dass es zur Kristallisation kam. Dagegen kam es bei Lagerung bei 25 °C bereits nach einem Monat zum Abfall der Restfeuchte und zur Kristallisation. Diese Ergebnisse konnten auch durch pulverdiffraktometrische Untersuchungen bestätigt werden (Abb. 89). Das linke Diagramm zeigt die Kurven von im Kühlschrank gelagerten Proben. Es besteht kein Unterschied, zwischen der sofort nach der Herstellung vermessenen Probe und den nach einer Woche und zwei Monaten analysierten Proben. In allen drei



Fällen wurde nur die Kurve einer amorphen Matrix detektiert (Abb. 89 links). Im Gegensatz dazu kam es bei Proben, welche bei 25 °C gelagert wurden zu immer deutlicher ausgeprägteren Peaks im Chromatogramm, hervorgerufen durch kristalline Saccharose (Abb. 89 rechts). Bereits nach einer Woche überlagerten die Kristallreflexionen der Probe fast völlig den durch amorphe Strukturen hervorgerufenen „Berg“ in der Basislinie (mittlere Kurve).

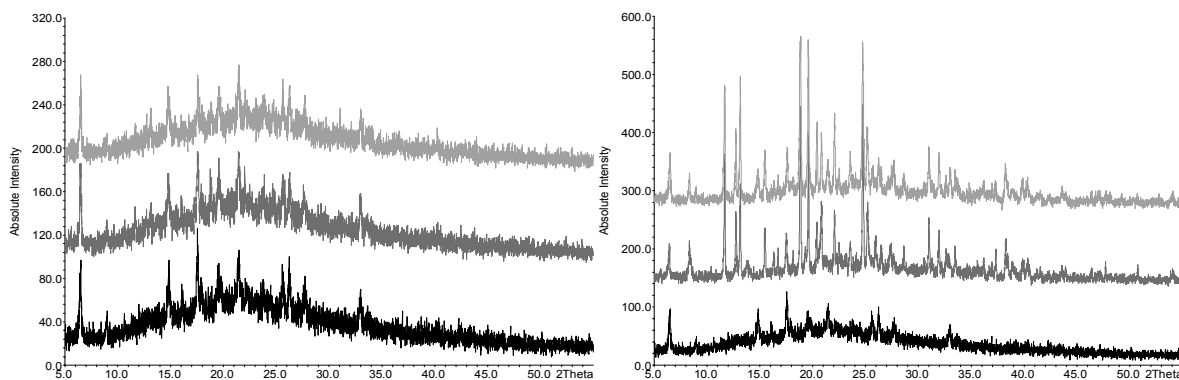


Abb. 89: Pulverdiffraktometerchromatogramme (XRD) von G-CSF Proben vor und nach Einlagerung bei 4 °C (links) und 25 °C (rechts). Innerhalb eines Diagramms sind jeweils von unten nach oben folgende Proben dargestellt: Vor Einlagerung, nach 1 Woche und nach längerer Einlagerung (links nach 1 Monat und rechts nach 7 Monaten).

#### 4.1.4. Einfluss der Packmittel und der Vialatmosphäre auf die Restfeuchte

Aufgrund der unterschiedlichen Lagerstabilität der zwei Chargen lag die Vermutung nahe, dass geringe Änderungen der relativen Luftfeuchte bei der Herstellung große Auswirkungen auf die Wasseraufnahme der Probe hatten. Bei der Warmlufttrocknung wurden die Proben zwar unter Inertgas getrocknet, jedoch vor dem Verschließen aus der Anlage entnommen, so dass es zu einer Vermischung mit der Raumluft des jeweiligen Tages kam. Je nach Klimabedingungen waren Schwankungen der relativen Luftfeuchte zwischen 20 % und 90 % durchaus denkbar. Um dies auszugleichen, wurde eine weitere Charge

G-CSF + SPT getrocknet und die Vials vor dem Verschließen mit Inertgas befüllt. Auch diese Vials wurden bei verschiedenen Temperaturen eingelagert und die Restfeuchte nach definierten Zeiten bestimmt. Das Diagramm in Abb. 87 rechts gibt die Ergebnisse wieder. Durch die geringere Luftfeuchte im Vial konnte die Wasseraufnahme so weit herabgesetzt werden, dass es erst nach 6 Monaten zum Beginn der Kristallisation kam. Wie zu erwarten war, stiegen die Restfeuchten aller Proben zunächst kontinuierlich an. Bei 4 °C Lagertemperatur wurde nach 4 Monaten ein Plateau von 4 - 5 % erreicht (■). Die bei höheren Temperaturen eingelagerten Proben nahmen weiter Wasser auf, bis schließlich die bei 30 °C aufbewahrten Proben nach 6 Monaten eine Feuchte von über 10 % erreichten und auskristallisierten (▨ ▩).

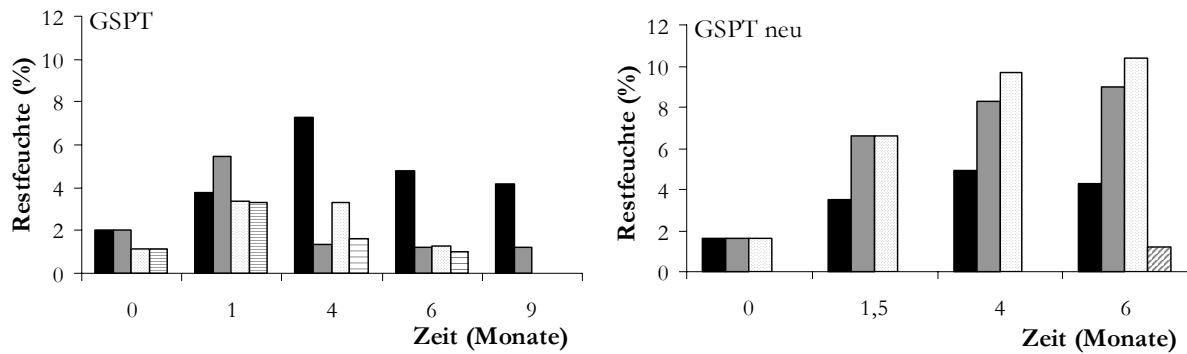


Abb. 90: Veränderung der Restfeuchte von Proben bei Einlagerung bei verschiedenen Temperaturen. Dargestellt sind GSPT aus der Novembercharge (links) und GSPT aus einer erneuten Einlagerung, bei der die Proben mit trockenem Stickstoff überschichtet wurden (rechts). G = G-CSF, S = Saccharose, P = Phenylalanin, T = Polysorbat 80. ■ 4 °C, ■ 25 °C, □ 30 °C, ▨ 40 °C, ▩ 30 °C kristallisierte Probe

Aus dieser Untersuchung ging klar hervor, dass die Wasseraufnahme um so größer war und um so schneller erfolgte, je höher die Lagertemperatur war. Durch Vergleich von Einlagerung 1 und 2 lässt sich hinzufügen, dass die Wasseraufnahme außerdem um so schneller erfolgte, je höher die Feuchte der umgebenden Luft war. Abb. 91 stellt den Verlauf der Restfeuchte während der Einlagerung von mit Raumluft gefüllten (gefülltes Symbol, Kristallisationspfeile) und von mit trockenem Stickstoff gefluteten (nicht gefülltes Symbol) Proben dar.

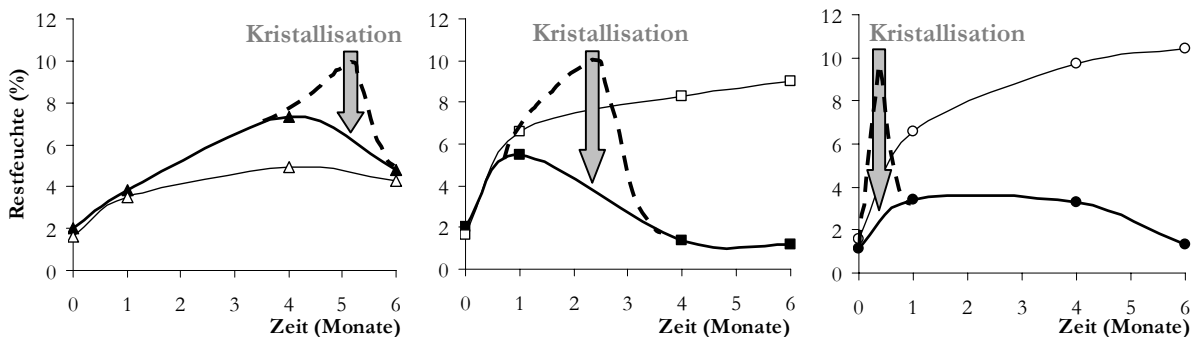


Abb. 91: Vergleich der Restfeuchte von mit Stickstoff überschichteten Proben (nicht gefülltes Symbol z.B. △) und mit Raumluft befüllten Proben (gefülltes Symbol z.B. ▲). Die Proben (G-CSF + SPT) wurden bei verschiedenen Temperaturen eingelagert. Links: 4 – 8 °C, Mitte: 25 °C, Rechts: 30 °C.

Da die Kristallisation der Proben erst nach Erreichen einer Restfeuchte von ca. 10 % erfolgte, diese Restfeuchte jedoch aufgrund der wenigen Probenzeitpunkte nicht immer erfasst wurde, wurde in die Graphik der angenommene Zeitraum der Kristallisation durch Pfeile markiert. Um die Kurvenverläufe zwischen den Datenpunkten zu vervollständigen, muss ausgehend vom „Kristallisationspfeil“ einen Anstieg der Kurven auf 10 % und danach einen abrupten Abfall auf den nächsten Kurvenpunkt eingefügt werden (gestrichelte Linie). Hierdurch wird deutlich, dass die Wasseraufnahme der mit Raumluft gefüllten Proben sehr viel schneller erfolgte und zur Kristallisation der Proben führte. Auch die unterschiedlich starke Wasseraufnahme je nach Umgebungstemperatur geht aus dem Vergleich der drei Graphiken, links 4 °C, Mitte 25 °C und rechts 30 °C, sehr gut

hervor. Die begasten Vials (hohle Symbole) weisen nach 4 Monaten Lagerung bei 4 °C eine Feuchte von 5 %, bei 25 °C von 8 % und bei 30 °C bereits von 10 % auf.

Aus den obigen Untersuchungen ging die Bedeutung der relativen Feuchte der Luft in den Vials hervor. Die erreichten Ergebnisse waren jedoch weiterhin nicht zufriedenstellend. Durch Begasen mit trockenem Stickstoff konnte die Wasseraufnahme der Proben zwar verlangsamt werden, dennoch erreichten selbst die bei 4 °C gelagerte Proben noch Restfeuchten von 5 %. Die Aufnahme von Wasser bewirkt eine Erniedrigung der Glasübergangstemperatur, was zu einer erhöhten Beweglichkeit der in das Glas eingeschlossenen Proteine führt. Hierdurch nimmt die Wahrscheinlichkeit der Denaturierung und Aggregation der Proteine zu. Um dies zu verhindern, wurde über weitere Möglichkeiten zur Erniedrigung der Wasseraufnahme nachgedacht. R. Hatley (49) verweist in diesem Zusammenhang auf die Erkenntnisse von M.J. Pikal, M.L. Roy und S. Shay (164), welche die Wasserabgabe aus den Stopfen in den Luftraum der Vials und damit den Wassertransfer aus den Stopfen in die Produkte untersucht haben. Auch W. Wang beschreibt die enorme Bedeutung der Feuchte der Stopfen auf die Lagerstabilität der Produkte (21). Dabei gibt er drei grundsätzliche Möglichkeiten an, wie Wasser in das Produkt gelangen kann: Erstens durch Transfer aus dem Stopfen, zweitens durch Diffusion oder Transmission durch den Stopfen hindurch und drittens aufgrund von Mikrolecks im Stopfen-Vial-Verschluss. Normalerweise überwiegt die erste Möglichkeit. Aufgrund der großen Massendifferenz zwischen schweren Stopfen und der bei der Warmlufttrocknung erhaltenen winzigen Probenmenge, dürfte dies auch hier eine erhebliche Rolle spielen. Selbst unter der Annahme, dass Stopfen und Probe zu Beginn der Einlagerung die gleiche Restfeuchte von 2 % aufwiesen, was für einen ungetrockneten Stopfen höchst optimistisch ist, enthielt der Stopfen absolut gesehen 3 x so viel Wasser wie die kleine Probenmatrix. Sollte auch nur ein Bruchteil dieser Wassermenge in die Probe hinein diffundieren, würde sich die Restfeuchte der Probe überproportional erhöhen. Die Trocknung der Stopfen sollte also einen messbaren Effekt ausmachen, was auch von M.J. Pikal und S. Shay anhand von verschiedenen getrockneter Stopfen festgestellt wurde (166, 167, 168). Tatsächlich konnte auch in unserem Fall, durch Verwendung von vorgetrockneten Stopfen und durch Befüllung der Vials mit trockenem Stickstoff, die Wasseraufnahme völlig unterbunden werden. Selbst Proben, welche bei 25 °C gelagert wurden, wiesen nach einem Monat noch immer eine Restfeuchte von nur 1,3 % auf und lagen nicht kristallisiert vor (Tab. 10).

	normale Stopfen		getrocknete Stopfen	
	ohne Gas	begast	ohne Gas	begast
Restfeuchte (%)	5,5	6,6	2,8	1,3

Tab. 10: Vergleich der Restfeuchte von verschiedenen behandelten Proben (G-CSF +SPT) nach Einlagerung bei 25 °C für einen Monat. Mit trockenem Stickstoff überschichtete Proben wurden als „begast“, unter Raumluft verschlossene Proben mit „ohne Gas“ bezeichnet.

Unter Berücksichtigung der bisherigen Ergebnisse lässt sich eine gute Haltbarkeit für Proben, welche unter Verwendung von getrockneten Stopfen und nachträglicher Stickstoffüberschichtung hergestellt wurden, bei 4 °C, 25 °C und eventuell sogar bei 30 °C erwarten. Erythropoietinproben wiesen bereits unter nicht optimierten Bedingungen (Inertgas, aber nicht getrocknete Stopfen) eine ausreichende Stabilität bei Lagerung bei 30 °C auf.

#### 4.2. Stabilität der Proteine

Die Qualität der Produkte wurde während der Einlagerung auch in Bezug auf die Stabilität der Proteine bewertet. Dazu wurden die Proben mit Reinstwasser rekonstituiert und mittels Größenausschlusschromatographie und SDS-Gelelektrophorese analysiert. Die Auswertung der HPLC-Chromatogramme in Bezug auf enthaltene Dimere und höhermolekulare Aggregate (insgesamt als Aggregate bezeichnet) geben Abb. 92 und Abb. 94 wieder. Mit Ausnahme von zwei gekennzeichneten Fällen kam es nie zur Bildung von Spaltprodukten. Insgesamt kann man die erhaltenen Daten durchweg als sehr vielversprechend ansehen. Erythropoietinhaltige Proben (Abb. 92) wiesen selbst bei 40 °C Lagerung nach 6 Monaten nur 3 % Aggregate auf. Bei Lagerung bei niedrigeren Temperaturen stiegen die Aggregate maximal auf 1 %. Obwohl es bei allen Proben zum deutlichen Anstieg der Restfeuchten und sowohl bei 40 °C, als auch bei 25 °C zur Kristallisation der Proben gekommen war, wirkte sich dies nicht negativ auf die Stabilität von Erythropoietin aus. Scheinbar reagiert Epo nicht empfindlich auf etwas höhere Restfeuchten. Eine ebenso gute Stabilisierung dürfte auch für feuchteempfindliche Proteine erreicht werden, wenn diese unter optimierten Bedingungen (so dass es nicht zum Restfeuchteanstieg kommt, siehe Tab. 10) hergestellt werden.

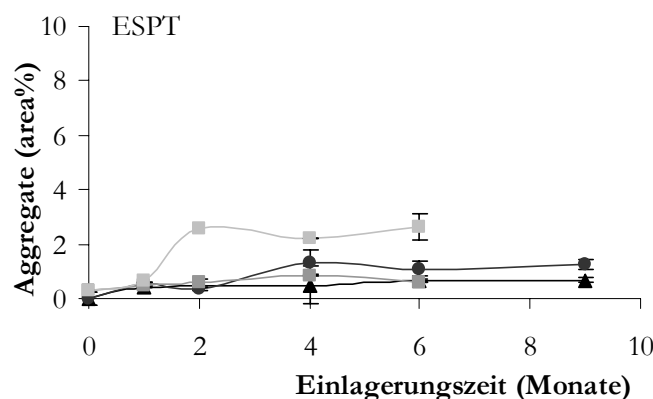


Abb. 92: Veränderung der Stabilität (dargestellt als Zunahme aller Aggregate) von Epo bei Einlagerung bei verschiedenen Temperaturen. E = Epo, S = Saccharose, P = Phenylalanin, T = Polysorbat 80. ▲ 4 – 8 °C, ● 25 °C, ■ 30 °C, ■ 40 °C.

G-CSF reagierte im Gegensatz zu Erythropoietin empfindlich auf eine Kristallisation der Zuckermatrix. Das Diagramm links in Abb. 93 vergleicht die Proteinestabilität von G-CSF aus zwei unterschiedlichen Chargen (mit SPT) bei 30 °C Lagerung. Während es bei der ersten Charge (■) mit zunehmender Kristallisation von Saccharose zur vermehrten Aggregation kam, erhöhte sich der Aggregatgehalt in der zweiten Charge (□), welche während Einlagerung kaum Kristallisation aufwies, deutlich langsamer. Auch bei Lagerung bei 25 °C wurde eine kristallisationsabhängige Zunahme der Aggregation beobachtet (Abb. 93 rechts), auch wenn der Unterschied zwischen kristallisierten (●) und nicht auskristallisierten Proben (○) deutlich geringer war. Da es bei Einlagerung bei 4 °C bei keiner Charge zur Kristallisation kam, wiesen alle Proben in diesem Fall ein identisches – praktisch nicht existent – Aggregationsverhalten auf (▲–△Abb. 93 rechts).

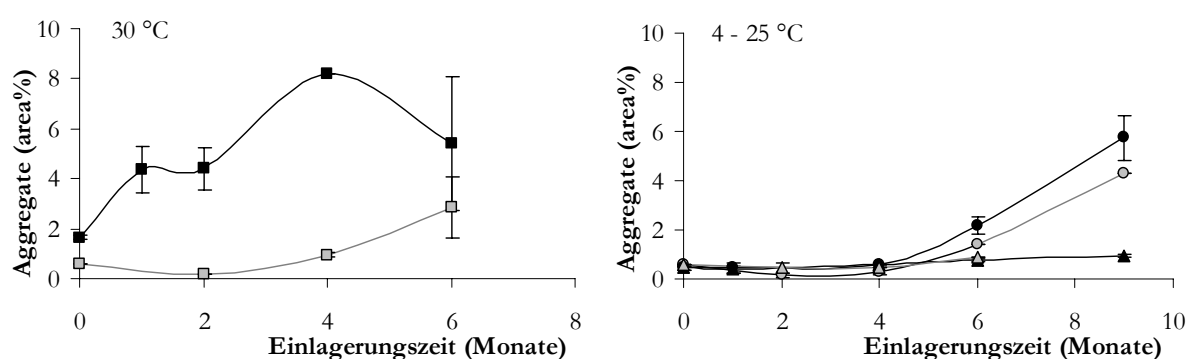


Abb. 93: Vergleich Stabilität von G-CSF (+SPT) in zwei verschiedenen Chargen bei Einlagerung bei unterschiedlichen Temperaturen. ▲–○–□ Proben aus optimierter Herstellung (kaum Restfeuchteanstieg), ▲–●–■ Proben aus kristallisierter Charge. ▲–△ 4 - 8°C, ●–○ 25 °C, ■–□ 30 °C.

Die Kristallisation verstärkte eine grundsätzlich vorhandene, temperaturabhängige Aggregation. Mit zunehmender Lagertemperatur kam es zum schnelleren Anstieg der Aggregation des Proteins (Abb. 94 links). Bei einer Lagertemperatur von 40 °C wurde G-CSF nicht nur stark aggregiert, sondern ab dem vierten Monat der Einlagerung zusätzlich in Fragmente gespalten (10,2 % nach 4 Monaten und 23,5 % nach 6 Monaten). Insgesamt wiesen Proben aus G-CSF, Polysorbat 80 und Phenylalanin eine akzeptable Stabilität auf. Sie konnten im Kühlschrank für neun Monate unter Erhalt der Anfangsstabilität gelagert werden und enthielten auch nach neunmonatiger Lagerung bei 25 °C nicht mehr als 4,3 % Aggregate. All diese Proben wurden unter nicht optimalen Bedingungen hergestellt (Proben mit Restfeuchteanstieg, aber ohne Kristallisation). Da G-CSF empfindlich auf die Kristallisation der Zuckermatrix reagiert, sollten Proben, welche unter optimierten Bedingungen (siehe Tab. 10) hergestellt wurden und bei welchen kein Anstieg der Restfeuchte vorkommen sollte, deutlich bessere Lagerstabilitäten aufweisen. Eventuell wäre sogar eine Lagerung bei 30 °C möglich.

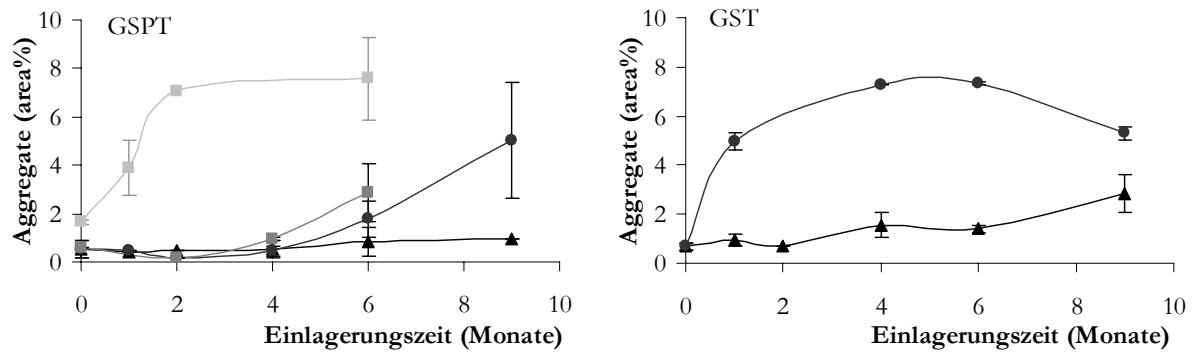


Abb. 94: Veränderung der Proteininstabilität (dargestellt als Zunahme aller Aggregate) bei Einlagerung bei verschiedenen Temperaturen. Dargestellt sind verschiedene Rezepturen: G-CSF + SPT (links) und G-CSF + ST (rechts). G = G-CSF, S = Saccharose, P = Phenylalanin, T = Polysorbat 80. ▲ 4 – 8°C, ● 25 °C, ■ 30 °C, ■ 40 °C.

G-CSF-Rezepturen mit einem pH-Wert von 6 (Abb. 94 rechts) wiesen bei höheren Temperaturen grundsätzlich eine stärkere Aggregationsneigung auf als Rezepturen bei einem pH-Wert von 4. Bereits bei Lagerung bei 25 °C kam es zur verstärkten Aggregation in den Proben. Das Ausmaß der Aggregation entsprach in etwa der Aggregation, welche bei Einlagerung bei 40 °C auftrat, wenn zur Herstellung der Proben eine Formulierung mit pH-Wert 4 verwendet wurde (Abb. 94 Vergleich rechts/links). Auch Proben mit einem pH-Wert von 6 konnten über neun Monate hinweg bei 4 °C aufbewahrt werden, wobei maximal 2,8 % Aggregate entstanden.

#### 4.2.1. SDS-PAGE von eingelagerten Proben

Um die Bildung unlöslicher Aggregate, welche mittels HPLC nicht erfasst werden können, auszuschließen, wurden alle Proben zusätzlich mittels Gelelektrophorese untersucht. In keinem Fall wurden höhermolekulare, nichtlösliche Aggregate detektiert. Auch die Bildung von Dimeren und anderen Aggregaten entsprach grundsätzlich den HPLC-Daten. Direkt nach der Herstellung wurden auf keinem Gel Nebenbanden angefärbt, wie aus Abb. 83 ersichtlich ist.

Während Gele von Epo-Proben auch nach neun Monaten Einlagerung bei 4 °C oder 25 °C nur eine Monomerbande und keine Nebenbanden aufwiesen, kam es bei höheren Temperaturen (30 °C und 40 °C) nach 6 Monaten Lagerzeit das erste Mal zur Detektion von Nebenbanden (Abb. 95). Aus dem Vergleich der Nebenbanden in den Gelen mit reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen (Gele „6 Monate“) geht hervor, dass die entstandenen Dimere nicht kovalent über Disulfidbrücken verbunden waren.

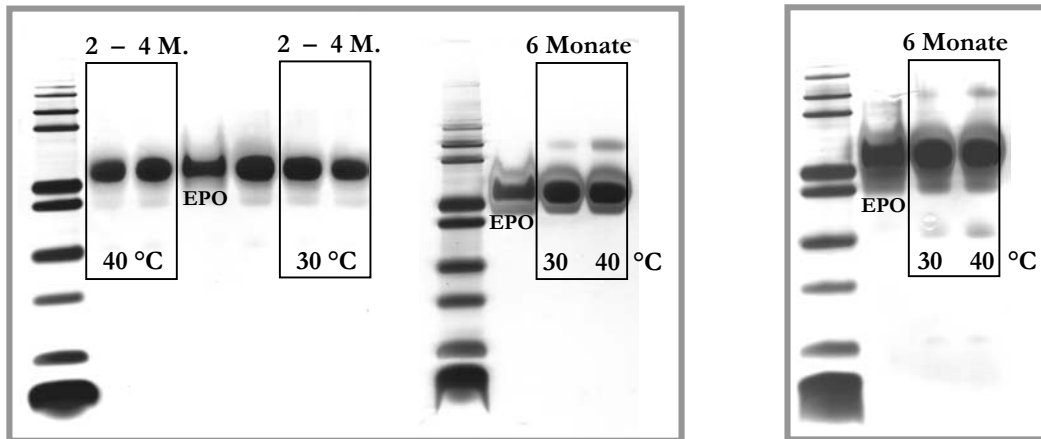


Abb. 95: Nicht reduzierende SDS-Page von Epo-Proben nach Einlagerung für 2, 4 und 6 Monaten bei 30 °C bzw. 40 °C. Das Gel ganz rechts wurde unter reduzierenden Bedingungen hergestellt. Nicht gekennzeichnete Banden enthalten einen Größenmarker bzw. Epo als Referenz.

Dagegen entstanden aus G-CSF zumindest zum Teil über Disulfidbrücken verbundene Aggregate, wie aus Abb. 96 hervorgeht. Unter reduzierenden Bedingungen (Gel rechts 6 Monate) wurden deutlich weniger Banden detektiert, als unter nicht reduzierenden Bedingungen (Gel Mitte 6 Monate). Für G-CSF-Rezepturen wäre demnach der Zusatz von Methionin als Oxidationsschutz zu empfehlen (219, 220, 18, 12). Die Effizienz dieses Stabilisierungszusatzes wurde in dieser Arbeit jedoch nicht überprüft. Auf den Gelen ist des weiteren die mit ansteigender Temperatur zunehmende Aggregation zu erkennen. In Abb. 96 links sind pro Probenzeitpunkt G-CSF-Proben (+SPT) aus Einlagerungen mit steigenden Temperaturen nebeneinander angeordnet.

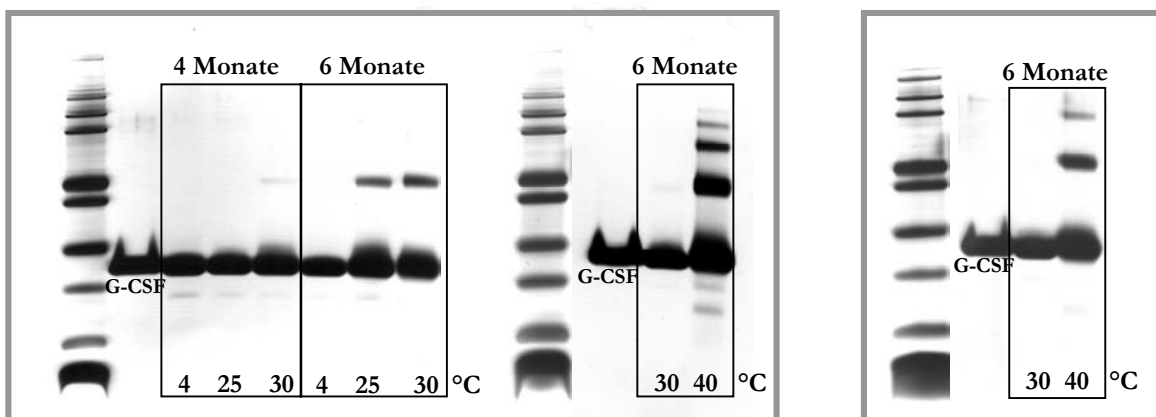


Abb. 96: Nicht reduzierende SDS-Page von G-CSF-Proben (+SPT pH 4) nach Einlagerung für 4 oder 6 Monaten bei 4 °C, 25 °C, 30 °C und 40 °C. Das Gel ganz rechts wurde unter reduzierenden Bedingungen hergestellt. Nicht gekennzeichnete Banden enthalten einen Größenmarker oder G-CSF als Referenz.

Beim Vergleich mit HPLC-Daten fällt auf, dass die Silberfärbung der Gele grundsätzlich eine geringere Sensitivität aufwies, als die Fluoreszenzdetektion der HPLC-Analytik. Das Entstehen von Aggregaten konnte mit Gelen erst deutlich später erkannt werden. Auch wenn keine absolute Quantifizierung möglich war, so konnten doch verschiedene Temperaturen und Probenzeitpunkte verglichen werden. So z.B. die bei 4 °C, 25 °C und

30 °C gelagerten Proben im Gel links. Nach 4 Monaten wies nur die bei 30 °C gelagerte Probe eine Dimerbande auf. Nach 6 Monaten enthielten sowohl die 25 °C als auch die 30 °C Probe Nebenbanden, während die bei 4 °C gelagerte Probe noch immer nur Monomer aufwies. Der Vergleich der Bandenstärke der 25 °C und 30 °C Probe machte die unterschiedlich starke Aggregation deutlich. Innerhalb eines Gels war der Vergleich der Bandenintensitäten möglich, zwischen verschiedenen Gelen und Herstellungstagen kam es allerdings zu Abweichungen. Im ersten abgebildeten Gel z.B. war nach sechs Monaten Lagerung bei 30 °C eine deutlich ausgeprägte Dimerbande zu erkennen, im zweiten Gel (andere Probe, anderer Tag) wurde dagegen nur eine schwach ausgeprägte Nebenbande detektiert. Dennoch war die Gelelektrophorese für grundsätzliche Aussagen, zum Vergleich mehrerer Proben auf einem Gel und zur Untersuchung auf unlösliche Aggregate unerlässlich.

Entsprechend der geringeren Stabilität der Formulierung aus G-CSF mit Saccharose und Polysorbat 80 bei einem pH-Wert von 6 (G-CSF +ST) wurden auf Gelen dieser Proben bereits bei Einlagerung bei 25 °C Nebenbanden detektiert (Abb. 97). Wie bei allen anderen Produkten wiesen Gele von Proben, welche bei 4 °C eingelagert wurden, keine Nebenbanden auf.

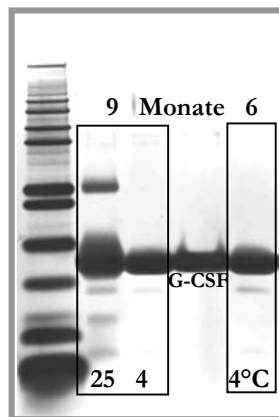


Abb. 97: SDS-Page von G-CSF-Proben (+ST pH 6) nach Einlagerung für 6 und 9 Monaten bei 4 °C und 25 °C.

Als weitere Kontrolle zur Bildung unlöslicher Aggregate wurden die bei 30 °C und 40 °C gelagerten Proben auf Partikelbildung mittels Lichtstreuung untersucht. Auch nach vier Monaten Lagerung wurden die vom Europäischen Arzneibuch 2002 geforderten Werte nicht überschritten. Erlaubt wären 6000 Partikel größer 10 µm und 600 Partikel größer 25 µm. Tatsächlich gemessen wurden für beide Proteine weniger als 200 Partikel größer 10 µm und weniger als 10 Partikel größer 25 µm. Diese Werte bestätigen eindrucksvoll die gute Qualität der Proben, selbst nach Einlagerung bei 40 °C.



		2 Monate		4 Monate	
		> 10 µm	> 25 µm	> 10 µm	> 25 µm
<b>Epo + SPT</b>	30 °C	12	2	80	1
	40 °C	26	2		
<b>G-CSF + SPT</b>	30 °C	74	0	176	6
	40 °C	72	2	127	1

Tab. 11: Entwicklung der Partikelzahlen von Epo und G-CSF Produkten während der Einlagerung bei 30 °C und 40 °C. Angegeben sind die insgesamt in einem Vials gemessenen Partikelzahlen (Mittelwert aus drei Messungen)

## 5. Vergleich zur Vakuumtrocknung, Bewertung des neuen Verfahrens

Da bei der Warmlufttrocknung nur geringe Volumina eingesetzt wurden, stellte sich die Frage, ob diese kleinen Mengen nicht auch durch Vakuum- oder Gefriertrocknung zu ähnlich geringen Feuchten getrocknet werden könnten. Zur Beantwortung wurden identische Rezepturen mittels verschiedener Standardmethoden getrocknet und hinsichtlich Restfeuchte, Aussehen der Produkte und Proteinstabilität untersucht. Für die Gefriertrocknung wurde dazu ein Standardprogramm von drei Tagen gewählt. Da Produkte der Warmlufttrocknung die meiste Ähnlichkeit mit Produkten der Vakuumtrocknung aufweisen, wurde auf dieses Verfahren der besondere Augenmerk gelegt. In Anlehnung an das von M. Mattern in seiner Dissertation verwendete Programm wurde in fünf Schritten ein Vakuum von 0,001 mbar angelegt und für 14 bzw. 48 Stunden bei 20 °C gehalten (96).

Aufgrund der unterschiedlichen Herstellungstechniken war anzunehmen, dass sich die gebildeten Produkte optisch unterscheiden. Während bei der Vakuum- und Warmlufttrocknung kompakte Proben zu erwarten waren, sollten bei der Gefriertrocknung voluminöse Lyokuchen entstehen. Aufgrund des geringen Volumens und eines nicht optimalen Lyophilisierungsprogramms kollabierten jedoch die Produktkuchen, welche aus der Rezeptur ohne Phenylalanin gebildet wurden (Abb. 98 Mitte). Auch bei der Vakuumtrocknung verlief die Trocknung nicht optimal, durch einen Siedeverzug kam es zur unkontrollierten Blasenbildung im Produkt (Abb. 98 links).

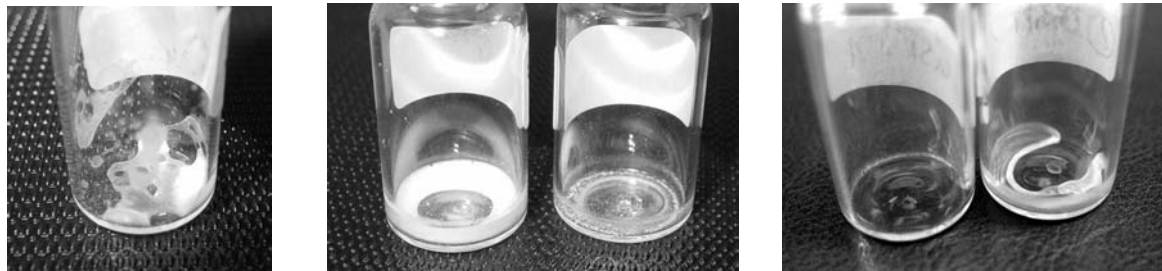


Abb. 98: Aussehen der Proben nach Vakuumtrocknung (Links, SPT), Gefriertrocknung (Mitte, SPT und daneben ST) und Warmlufttrocknung (Rechts, ST und daneben SPT). Es wurden die gleichen Rezepturen und Volumina (75  $\mu$ l) wie bei der Warmlufttrocknung verwendet.

Trotz dieser nicht optimalen Produktkuchen sollte es möglich sein, die Restfeuchte zu vergleichen oder zumindest grundsätzliche Aussagen zu treffen. Aufgrund des Siedeverzuges, während der Vakuumtrocknung, kam es zur Ausbildung einer vergrößerten Oberfläche, so dass eigentlich niedrigere Restfeuchten als bei kompakten Produkten erwartet wurden. Tatsächlich enthielten die Produkte der Vakuumtrocknung jedoch mehr Wasser als die mittels Warmluft getrockneten Proben (Tab. 12). Während die Restfeuchten für phenylalaninhaltige Proben durch längere Trocknungszeiten (48 Stunden) angeglichen werden konnten, war die Restfeuchte von Saccharose-Polysorbat 80-Mischungen bei vakuumgetrockneten Proben stets höher als bei mit Warmlufttrocknung hergestellten Proben. Wie bereits M. Mattern feststellte, ist es mit Vakuumtrocknung nicht möglich pure Zuckerlösung auf niedrige Restfeuchte zu trocknen (96). Auch der Zusatz von 0,01 % Polysorbat ermöglichte bei Vakuumtrocknung keine Erniedrigung der Restfeuchte. Bei Warmlufttrocknung dagegen konnten nach Polysorbatzusatz trockene Produkte erhalten werden. Auch mittels Gefriertrocknung war es – in einem zweiten Ansatz, bei dem es nicht zur Kollabierung der Lyokuchen kam – möglich die Saccharose-Polysorbat-Rezeptur auf Restfeuchten unter 2 % zu trocknen. Aus diesem kleinen Datensatz wird ein Vorteil der Warmlufttrocknung deutlich. Im Gegensatz zur Vakuumtrocknung, ist die Warmluft-trocknung in der Lage Wasser auch aus kompakten Matrices zu entfernen. Dazu ist es, anders als bei der Gefriertrocknung, nicht nötig die Proben einzufrieren.

	Vakuumtrocknung		Gefriertrocknung	Warmlufttrocknung
	14 h	48 h	3 d	4 h
<b>SPT</b>	2,2	1,8	0,4 / 3,1 <sup>x</sup>	1,3 ± 0,3
<b>G-CSF +SPT</b>	n.b.	1,1	0,8	1,4 ± 0,3
<b>G-CSF +ST</b>	6	5,6	1,2 / 6,7 <sup>x</sup>	1,9 ± 0,3

Tab. 12: Restfeuchten (%) verschiedener Rezepturen nach Vakuumtrocknung (14 h , bzw. 48 h bei 0,001 mbar) und Gefriertrocknung (Standardprogramm 3d). <sup>x</sup> Dies Daten stammen aus dem Versuch mit kollabierten Lyokuchen.

In Bezug auf die Stabilisierung der Proteine waren alle drei Methoden gleichwertig. Sowohl die Vakuum- als auch Gefriertrocknung liefern bekannter Maßen sehr stabile Produkte, was auch in diesen Versuchen der Fall war. Die Produkte aller drei Methoden wiesen eine Proteininstabilität über 99 % auf (Tab. 13).

Rezeptur	Proteinmonomer (%)		
	Vakuumtrocknung 40 h	Gefriertrocknung 3 d	Warmlufttrocknung 4 h
Epo +SPT pH 7,4	99,9	99,7	99,8
G-CSF + ST pH 6	98,9	99,6	99,2
G-CSF + SPT pH 4	99,4	99,5	99,5

Tab. 13: Proteininstabilität von Epo und G-CSF Produkten, welche mit verschiedenen Trocknungstechniken hergestellt wurden.

Insgesamt waren die Produkte der Warmlufttrocknung sowohl in Bezug auf ihre Restfeuchte, als auch hinsichtlich der Proteininstabilität, Produkten von Standardmethoden mindestens ebenbürtig. Bei der Bewertung der drei Verfahren sollte man auch die zur Trocknung nötigen Prozesszeiten mitbedenken. Eine übliche Trocknung mittels Warmluftbegasung dauert, je nach Empfindlichkeit der verwendeten Proteine, zwischen 1,5 und 6 Stunden. Dagegen dauern normale Gefriertrocknungsprozesse selten weniger als einen Tag, im Durchschnitt muss man mit einer Dauer von ein bis drei Tagen rechnen. Auch die Vakuumtrocknung ist kaum schneller zu vollenden. Andererseits können im Gefrier- oder Vakuumtrockenschrank sehr viel mehr Proben parallel getrocknet werden, als dies im Warmluftbegasungsgerät zur Zeit möglich ist. Dies liegt jedoch nicht an der Technik, sondern an dem für den Labormaßstab gebauten Gerät. Theoretisch wäre eine Aufrüstung des Gerätes durchaus denkbar. Die Erweiterung des Bodenheizblocks wäre ohne großen Aufwand durchführbar oder eventuell sogar über beheizbare Stellplatten zu verwirklichen. Auch die Begasungseinheit ließe sich ohne weiteres von bisher 10 parallel betriebenen Düsen auf 100 und mehr ausbauen. Gerätetechnisch steht dem großtechnischen Einsatz dieser innovativen Trocknungs-technik nichts entgegen. Ein häufig genannter Nachteil der Gefriertrocknung ist der hohe Energiebedarf, der zum Einfrieren und Sublimieren des Wassers nötig ist. Dieser entfällt bei der Warmlufttrocknung, da hier weder Vakuum aufgebaut werden muss, noch extrem niedrige oder hohe Temperaturen erreicht werden müssen. Der Energiebedarf dürfte also deutlich geringer ausfallen und muss nur für einen Bruchteil der Zeit aufgewendet werden. Einziger Nachteil der neuen Trocknungsmethode ist der relativ hohe Verbrauch an Stickstoff. Dieser ließe sich durch Betrieb des Begasungsgerätes in einer geschlossenen Box reduzieren. Der eingeleitete Stickstoff könnte so zurückgewonnen und nach Passage über einen Kondensator erneut verwendet werden.

Bisher wurde die Warmlufttrocknung nur auf ein einziges Rezepturvolumen (75  $\mu\text{l}$ ) optimiert. Mit Hilfe weniger Vorversuche sollte es jedoch möglich sein, diese Trocknungstechnik auch an etwas größere Volumina anzupassen. In Abb. 99 ist die prozentuale Gewichtsabnahme von verschiedenen eingesetzten Volumina innerhalb der ersten Trocknungsminuten dargestellt.

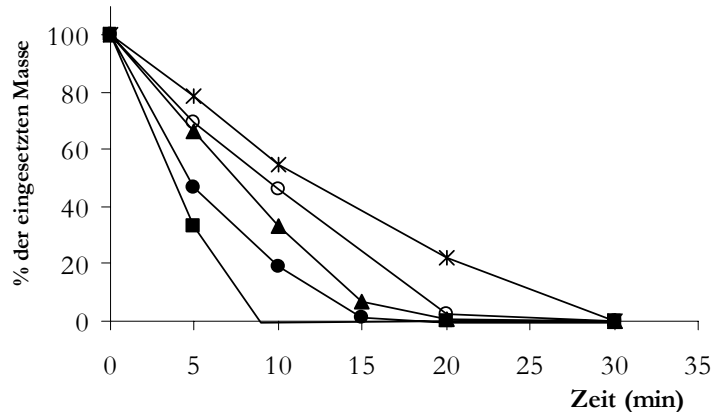


Abb. 99: Prozentuale Abnahme der Probenmasse während der ersten Minuten der Trocknung abhängig vom eingesetzten Volumen. Es wurden keine Rezepturen, sondern nur Wasser getrocknet.

■ 75  $\mu\text{l}$ , ● 150  $\mu\text{l}$ , ▲ 225  $\mu\text{l}$ , ○ 300  $\mu\text{l}$ , ✕ 400  $\mu\text{l}$

Obwohl sich die Dauer der Trocknung mit zunehmendem Volumen geringfügig verlängerte, konnten selbst 400  $\mu\text{l}$  Wasser noch innerhalb von 30 Minuten vollständig entfernt werden. Diese Daten wurden mit Wasser bestimmt, bei Einsatz von Saccharoserezepturen müsste es aufgrund der immer dicker werdenden Matrix und des sich dadurch vergrößernden Diffusionswiderstandes zu etwas schlechteren Ergebnissen kommen (siehe A.3.1.2 Trocknungskinetik 3./4. Phase). Zur Verifizierung des Ausmaßes dieser Verlangsamung wurde die Trocknung von Wasser und Placeborezeptur, anhand von zwei Volumina 225  $\mu\text{l}$  und 400  $\mu\text{l}$ , verglichen. Das Ergebnis ist in Abb. 100 dargestellt.

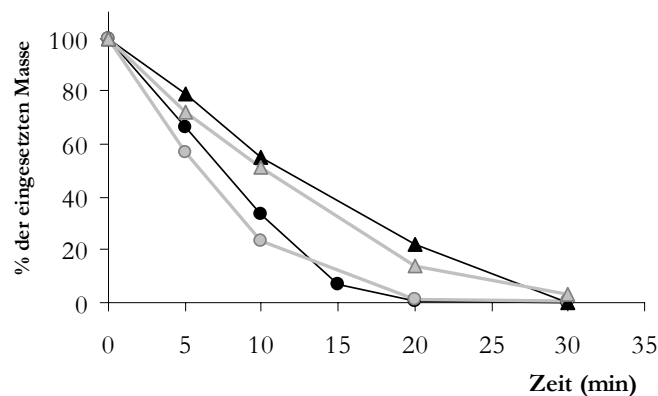


Abb. 100: Vergleich der prozentualen Abnahme der Masse von eingesetztem Wasser (schwarz) und SPT-Rezeptur (grau) während der ersten Minuten der Trocknung. ▲△ 400  $\mu\text{l}$ , ●○ 225  $\mu\text{l}$

Wie zu erwarten war, trat die Diffusionshemmung der Matrix erst gegen Ende der Aufkonzentrierung auf, bei Übergang aus dem linearen in den sich kontinuierlich verlangsamenen Trocknungsabschnitt (Knick in den grauen Trocknungskurven

zwischen vorletztem und letztem Datenpunkt, bei Erreichen der hygroskopischen Feuchte). Im Gegensatz dazu verlief die Verdunstung von Wasser linear bis zur völligen Eintrocknung weiter (schwarze Kurven). Dennoch wurden nach 4 Stunden Gesamttrocknungsdauer auch für Placeborezepturen für alle Volumina Restfeuchten unter 1,1 % erreicht (Tab. 14). Bei Verlängerung der Trocknungsdauer auf 5 bzw. 6 Stunden wurde eine weitere Senkung der Restfeuchte von aus 225 µl getrockneten Proben auf 0,8 % und 0,6 % beobachtet.

	Volumen (µl)				
	150	225	300	400	500
Restfeuchte (%)	1,1	1,1	0,7	0,4	0,2
<i>stand.abw.</i>	0,4	0	0	0,2	0,1

Tab. 14: Restfeuchten von Produkten (SPT), hergestellt aus verschiedenen eingesetzten Volumina. Die Trocknung erfolgt innerhalb von 4 Stunden bei niedrigen Temperaturen (G30+B30). Die Daten stellen Mittelwerte aus mindestens vier (bei 500 µl aus sechs) Versuchen dar.

Selbst 500 µl der Saccharose-Phenylalanin-Polysorbat 80-Mischung konnten innerhalb von vier Stunden auf eine niedrige Restfeuchte getrocknet werden. Vermutlich lag dies an der extrem schnellen Antrocknung der Rezepturen vom Rand her, so dass es nicht zur Aufkonzentrierung der Lösung auf einen hochkompakten Rest kam, sondern sich ein dünner Film über den gesamten benetzten Vialboden und Vialrand ausbildete. Auch B. Vidales et al. (221) postulierten bei der großtechnischen Konvektionstrocknung von Zucker-Aromagemischen die Ausbildung einer semipermeablen Membran durch welche Wasser, aber nicht die Aromastoffe, entweichen kann. In Abb. 101 sind Placeborezepturen während der Aufkonzentrierungsphase (ersten 30 Minuten) abgebildet. Bei beiden dargestellten Volumina ist die Auskristallisation von Phenylalanin und die Erstarrung der restlichen Matrix vom Rand der Lösung aus (bei geringen Volumina aufgrund der nicht vollständigen Benetzung des Vialbodens, auch von der Mitte des Vials aus) zu beobachten. Aufgrund der sehr guten Wärmeübertragung durch das Gas und der in den Gasraum hinein stattfindenden Konvektionstrocknung, kam es bei größeren Volumina (400 µl und 500 µl) als erstes am Rand oben zur Entstehung einer festen Matrix. Durch diese hindurch erfolgte die weitere Verdunstung des Wassers, so dass am Ende der Trocknung eine „schwebende“ Matrix mit darunter befindlichem Hohlraum entstand. Ein solches Produkt wird in Abb. 102 rechts wiedergegeben.

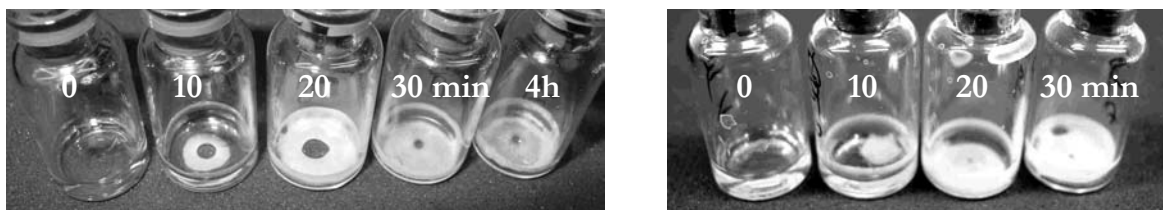


Abb. 101: Dargestellt ist die Aufkonzentrierung von 225 µl (links) bzw. 400 µl SPT-Rezeptur bei der Warmlufttrocknung innerhalb der ersten 30 Minuten (ersten 4 Vials) und nach 4 Stunden (letztes Vial im linken Bild).

Insgesamt entstanden demnach Produkte mit relativ großer und porenhaltiger Oberfläche. Interessanterweise wiesen mit steigenden eingesetzten Volumina die Produkte eine immer weißere Färbung (eventuell aufgrund von größeren Mengen an getrennt ausgefallenem Phenylalanin) und immer häufiger Sprünge in der Matrix auf (Abb. 102 links). Letztere ermöglichten vermutlich den Austritt von darunter eingeschlossenem Wasser, wodurch die extrem niedrigen Restfeuchten möglich wurden. Diese Annahme wurde durch die Beobachtung bestätigt, dass sich bei Zusatz von G-CSF zur Placeborezeptur Produkte ohne Risse, aber mit deutlich höherer Restfeuchte bildeten. Während 500 µl Placebolösung zu risshaltigen Kuchen (Abb. 103 linkes Vial) mit einer Feuchte von 0,2 % trocknete, entstanden aus 500 µl G-CSF + SPT Lösung einheitliche Matrices (Abb. 103 rechtes Vial) mit einer Restfeuchte von 3,1 %. Diese Restfeuchte liegt zwar oberhalb der von uns festgelegten Zielrestfeuchte von 2 %, durch Verlängerung der Trocknungszeit sollte jedoch eine weitere Absenkung der Restfeuchte möglich sein.



Abb. 102: Links: Aufnahmen der Matrix von verschiedenen Volumina. Je größere Volumina eingesetzt wurden, desto mehr schloss sich der Matrixring und desto mehr Kristalle bildeten sich in der Matrix. Von oben links nach rechts unten: 75 µl, 150 µl, 225 µl, 300 µl, 400 µl und 500 µl.

Mitte und rechts: 500 µl getrocknete Rezeptur. Unter der Matrix hat sich ein Hohlraum gebildet.

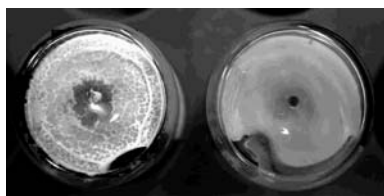


Abb. 103: Matrix von SPT (links) und G-CSF + SPT (rechts) nach Warmlufttrocknung bei G30-B30/60 für zwei Stunden. Die Rezeptur ohne Protein trocknet auf niedrigere Restfeuchten und bildet eine von Rissen durchzogene Matrix.

Bezüglich der Proteinestabilität lieferten alle Proben (mit identischer Hilfsstoff/Protein-Konzentration) unabhängig vom eingesetzten Volumen gute Resultate. Sowohl für G-CSF als auch für Epo war es möglich selbst 500 µl Rezeptur unter Erhalt der vollen Proteinestabilität zu trocknen (Tab. 15). Der relativ geringe Monomergehalt bei allen Epo-Proben wurde durch die Verwendung eines Dimere enthaltenden Proteinbulks bedingt. Innerhalb der Volumenreihe war jedoch auch hier kein Unterschied zu erkennen.

	<b>Proteinmonomer (%)</b>			
	<b>75 µl</b>	<b>200 µl</b>	<b>300 µl</b>	<b>500 µl</b>
G-CSF + SPT	99,6	99,7	99,5	99,1
Epo + SPT	98,5	98,8	98,7	98,4

**Tab. 15: Stabilität von Epo und G-CSF bei Trocknung aus verschiedenen Volumina**

Aus diesen Daten geht hervor, dass es zumindest im unteren Volumenbereich (bis ca. 500 µl) mit Warmlufttrocknung, ebenso wie mit Vakuum- oder Gefriertrocknung, möglich ist trockene Proteinzuckerprodukte unter Erhalt der Proteinstabilität herzustellen. Im Gegensatz zur Vakuumtrocknung können mittels Warmlufttrocknung jedoch auch Saccharose-Polysorbat-Mischungen (in kleinen Volumina) zu kompakten Produkten mit geringer Restfeuchte getrocknet werden. Insgesamt stellt die Warmlufttrocknung sicherlich eine entwicklungsfähige, preisgünstige, zeit- und energiesparende Alternative zur Vakuumtrocknung dar.

## 6. Zusammenfassung „Trocknung mittels Warmluftbegasung“

Ziel dieser Arbeit war es Trocknungsalternativen zu suchen, wobei der Grundgedanke stets der war, relativ konzentrierte Lösungen zu trocknen und somit nur geringe Wassermengen zu entfernen. Im ersten Teil dieser Arbeit konnte diese Idee mit Hilfe eines Warmluftbegasungsgerätes, dessen Funktionsweise einer Konvektionstrocknung entspricht, verwirklicht werden. Es wurde gezeigt, dass es auf diese Weise möglich ist, innerhalb eines vernünftigen Zeitrahmens, proteinhaltige Rezepturen auf niedrige Restfeuchten zu trocknen und gleichzeitig die Stabilität der Proteine zu gewährleisten.

Durch Wahl geeigneter Rezepturen und Geräteeinstellungen (Druck, Durchfluss, Gas- und Bodentemperatur) konnten die eingesetzten Placeborezepturen (75 µl) innerhalb von nur 1,5 Stunden getrocknet werden. Allein durch die temperaturforcierte Verdunstung und den konstanten Strom an trockenem Stickstoff wurden Produkte mit weniger als 2 % Restfeuchte gebildet. Da während dieser schnellen Trocknung Temperaturen von bis zu 80 °C in den Vials erreicht wurden, musste für temperaturempfindliche Proteine eine andere Variante entwickelt werden. Durch Absenkung der Trocknungstemperaturen und gleichzeitige Verlängerung der Trocknungsdauer auf vier Stunden war es möglich auch empfindliche Proteine unter Erhalt einer Stabilität von mindestens 99 % zu trocknen. Im Vergleich zur Vakuum- oder Gefriertrocknung ist selbst eine Trocknungszeit von vier Stunden äußerst kurz. Durch Kombination von niedrigen Temperaturen zu Beginn der Trocknung mit hohen Temperaturen in der zweiten Phase, konnte die Trocknungsdauer auch für empfindliche Proteine auf zwei Stunden reduziert werden. Diese Kombination wurde entwickelt, nachdem gezeigt werden konnte, dass es bei der Warmlufttrocknung vor allem innerhalb der ersten Minuten zur temperaturabhängigen Aggregation der Proteine kam. Wurden zur Schonung der Proteine während dieser ersten Phase niedrige Temperaturen verwendet, war es möglich danach - zur schnelleren Verdunstung des Wassers - hohe Temperaturen einzusetzen, ohne dass es zu Verlusten an Proteinmonomer kam. Kurz gesagt, an eine proteinschonende Vortrocknung wurde eine schnelle Hochtemperaturnach Trocknung angeschlossen. Gegen Ende der Trocknung riefen selbst Temperaturen von 80 °C keine weitere Aggregation hervor. Die Betrachtung der Trocknungskinetik lieferte eine Erklärung, wodurch diese außergewöhnliche Stabilisierung gewährleistet wurde. Bei der Warmlufttrocknung wurden bereits innerhalb der ersten fünf bis zehn Minuten 90 % des enthaltenen Wassers entfernt. Hierdurch entstand aus der eingesetzten Zuckerlösung ein Rubber und schließlich ein amorphes Glas, in welches die Proteine eingeschlossen wurden. Bereits der Rubber stabilisierte die Proteine so gut, dass es im weiteren Verlauf der Trocknung zu keiner weiteren Aggregation kam. Der zu Beginn der Trocknung stattfindende Stabilitätsverlust der Proteine ging einher mit der enorm schnellen Aufkonzentrierung der Proben und endet mit der Entstehung des Rubbers nach ca. sieben Minuten.



Wegen der im Vergleich zur Vakuumtrocknung anderen Trocknungskinetik wurden auch Standardhilfsstoffe auf ihren Einfluss hinsichtlich Restfeuchte und Proteinstabilität untersucht. Aus der Literatur und aus eigenen Vorversuchen ist bekannt, dass zur Stabilisierung von Proteinen amorphe Zucker grundsätzlich besonders geeignet sind. In unserem Fall wurde Saccharose verwendet. Es war mittels Warmlufttrocknung – wie auch mittels Vakuumtrocknung - nicht möglich Saccharose allein auf ausreichend niedrige Restfeuchte zu trocknen, weshalb verschiedene Hilfsstoffe zugesetzt wurden. Zum einen wurde die Oberfläche der zu trocknenden Lösung durch Zugabe von Polysorbat 80 vergrößert, der Diffusionswiderstand der Matrix verringert, und die Verdunstung erhöht. Dies und die partielle Kristallisation der Saccharose – ebenfalls verursacht durch Polysorbat - führte zur gewünschten Restfeuchte von 2 %. Eine weitere Erniedrigung der Restfeuchte konnte durch Zusatz von Phenylalanin erzielt werden, welches zu Beginn der Trocknung kristallin ausfiel. Auf das erhaltene Kristallgerüst lagerte sich im weiteren Verlauf der Trocknung amorphe Saccharose ab. Die dadurch erhaltene poröse Matrix ermöglichte eine leichte Verdunstung von eingeschlossenem Wasser und führte zu sehr trockenen Produkten. Grundsätzlich boten sich also zwei einfache Rezepturen an, um Restfeuchten unter 2 % zu erzielen, zum einen die Kombination von Saccharose und Polysorbat 80 und zum anderen die Mischung aus Saccharose, Polysorbat 80 und Phenylalanin. Mittels DSC- und RXD-Untersuchungen konnte bewiesen werden, dass alle Rezepturen teilamorphe Strukturen ausbildeten. Die Glasübergänge der proteinhaltigen Produkte lagen mit 45 °C bis 60 °C deutlich oberhalb der üblichen ICH-Lagertemperatur von 25 °C. Weiterhin wurde der Einfluss verschiedener Hilfsstoffe auf die Proteinstabilität untersucht. Zur Ausbildung einer stabilisierenden amorphen Matrix wurde jeder Formulierung 5 % Zucker zugesetzt. Da eine Überlegenheit von Trehalose im Vergleich zu Saccharose weder aus der Literatur klar hervorgeht, noch in Vorversuchen bestätigt werden konnte, wurde beschlossen eine Formulierung auf Basis von Saccharose zu entwickeln. Zur Senkung der Restfeuchten war ein Zusatz von 0,01% Polysorbat 80 nötig. Tween könnte aufgrund der eventuell enthaltenen Oxidationsprodukte Aggregation verursachen, die verwendeten geringen Mengen destabilisierten die Proteine jedoch nicht in nennenswerter Weise. In einer zweiten Rezepturvariante wurde zusätzlich 2 % Phenylalanin zugesetzt, um teilkristalline, poröse Strukturen auszubilden und die Restfeuchte zu erniedrigen. Diese Aminosäure hatte sehr unterschiedliche und nicht immer positive Effekte auf die Proteinstabilität. Während die Stabilität von Erythropoietin erhöht wurde, führte Phenylalanin zu unterschiedlich stark ausgeprägter Aggregation von G-CSF. Verstärkt durch einen für G-CSF ungünstigen neutralen pH-Wert und durch hohe Trocknungstemperaturen kam es zu deutlichen Stabilitätsverlusten des Proteins. Phenylalanin schien wie ein Katalysator eine vorhandene Grundinstabilität zu verstärken. Dennoch war es letztendlich möglich für beide Proteine bei physiologischem pH-Wert und für G-CSF zusätzlich bei pH 4 eine Formulierung zu

finden, welche stabile Endprodukte gewährleisten. Direkt nach der Herstellung wiesen diese Produkte eine Proteinstabilität von über 99,2 % auf.

Zur Beantwortung der Frage nach der Lagerstabilität der Produkte wurden Erythropoietin- und G-CSF- Rezepturen unter Verwendung optimierter Temperaturbedingungen und Formulierungen getrocknet und bei verschiedenen Temperaturen eingelagert. Allerdings wurden für die Einlagerung keine getrocknete Stopfen verwendet und die Vials nicht mit trockenem Inertgas gefüllt, so dass es zur Diffusion von Wasser in die Produkte und dadurch zum Anstieg der Restfeuchte kam. Dies führte zur Kristallisation der Matrix. Die Ursache dieser Veränderung lag jedoch nicht in der entwickelten Trocknungsmethode, sondern im Verzicht auf eine Vorbereitung der Packmittel, so dass sich die erhaltenen Produkte nicht mit nach industriellen Standardverfahren getrockneten Proben vergleichen lassen. Unter Beachtung dieser Tatsachen lässt sich folgendes aussagen: Proben ohne Phenylalanin wiesen grundsätzlich eine erhöhte Neigung zur Kristallisation auf. Dies lag an der bereits direkt nach der Herstellung erhaltenen Matrix aus amorphen und kristalliner Saccharose. Die Saccharosekristalle dienten als Initiationskeime und förderten die weitere Kristallisation. Um Saccharose-Polysorbat-Rezepturen dennoch lagerfähig zu machen, ist es nötig jede Kristallisation bereits während der Herstellung zu unterbinden. Dazu sind verschiedene Strategien denkbar. Einerseits müsste herausgefunden werden, in welcher Phase der Trocknung die Kristallisation der Saccharose stattfindet und durch welche Temperaturen sie beschleunigt, bzw. unterdrückt werden könnte, andererseits bieten sich bei der Zusammensetzung der Rezeptur einige Variationsmöglichkeiten. Man könnte z.B. die Polysorbatkonzentration anpassen bzw. kristallisationsverzögernde Stoffe wie Polymere zusetzen. Auch ein Wechsel auf die weniger kristallisationsanfällige Trehalose kann in Erwägung gezogen werden. Insgesamt dürfte es möglich sein dieses Problem zu lösen.

Bei phenylalaninhaltigen Proben sahen die Einlagerungsdaten selbst unter den verwendeten ungünstigen Verhältnissen vielversprechend aus. Erythropoietin-formulierungen konnten für mindestens sechs Monate bei 30 °C gelagert werden, ohne dass es zur Kristallisation kam. Auch bei G-CSF-Proben kam es innerhalb von sechs Monaten bei Lagerung im Kühlschrank nicht zur Kristallisation. Der in einer ersten Charge beobachtete Anstieg der Restfeuchte konnte durch Verwendung von getrockneten Stopfen und durch Füllung der Vials mit Inertgas völlig unterbunden werden. Derart vorbehandelte Proben wiesen auch bei Einlagerung bei 25 °C keinerlei Anstieg der Restfeuchte auf. Dies zeigt anschaulich, dass mittels Warmlufttrocknung hergestellte Proben, bei entsprechender Vorbereitung, eine gute Lagerstabilität aufweisen. In der Praxis kann diese Vorbereitung (Befüllung der Vials mit Stickstoff und Trocknung der Stopfen) ohne besonderen Aufwand vorgenommen werden.

Trotz der noch nicht optimierten Restfeuchten, ergab die Untersuchung der Proteinstabilität, während der Einlagerung, durchwegs positive Ergebnisse. Selbst das aggregationsempfindliche G-CSF bewahrte in Proben mit physiologischem pH-Wert im

Kühlschrank über mindestens neun Monate seine Stabilität. Auch alle anderen Formulierungen konnten im Kühlschrank ohne Aggregationszunahme aufbewahrt werden. Bei Zusatz von Phenylalanin und unter Verwendung eines pH-Wertes von 4 konnte G-CSF sogar bei 25 °C für mindestens sechs Monate gelagert werden. Am stabilsten waren Erythropoietinproben, in welchen nach sechs Monaten Lagerung bei 30 °C bzw. 40 °C keine bzw. nur 2 % Aggregate enthalten waren. Diese Daten lassen eine noch deutlich längere Lagerstabilität erwarten.

Es konnte gezeigt werden, dass die mittels Warmlufttrocknung hergestellten, Produkte qualitativ gleichwertig zu Proben sind, welche mittels Vakuumtrocknung oder Gefriertrocknung hergestellt werden. Außerdem deutete sich an, dass die Trocknung mittels Warmluftbegasung nicht auf kleinste Volumina beschränkt ist. Selbst 500 µl einer Proteinzuckerlösung konnten in einer ersten Versuchsreihe mit annähernd gleich guten Ergebnissen getrocknet werden. Vakuumtrocknung und Gefriertrocknung werden standardmäßig in der Industrie verwendet, obwohl sie einen enormen Zeit- und Energieaufwand beinhalten. Mittels Warmlufttrocknung lässt sich die gleiche Formulierung in einem Bruchteil der Zeit trocknen. Es bedarf meist nur zwei bis vier Stunden um Endprodukte zu erhalten. Dabei muss kein Vakuum angelegt werden und auch keine Energie zum Einfrieren oder Kühlen eines Eiskondensators aufgewandt werden. Ein Standardheizblock für Vials muss auf 30 °C bis 60 °C und das eingeleitete Gas auf ca. 30 °C erwärmt werden. Außerdem wäre es denkbar, durch bauliche Veränderung des verwendeten Grundgerätes, ein Kreislaufsystem zu bilden, mit dem der eingeleitete Stickstoff zurückgewonnen und erneut eingesetzt werden könnte. Auch die Erweiterung vom Labormaßstab auf großtechnische Produktion ließe sich mit dieser Methode verwirklichen.

Die Warmlufttrocknung als anpassungsfähige, energetisch günstige, zeitsparende und qualitativ hochwertige Alternativ zu herkömmlichen Trocknungsmethoden hat auf jeden Fall Potential für weiter Anwendungen.

## **C.II. Teil II: Applikation und Trocknung mittels Mikrotropfen**

Im zweiten Teil dieser Arbeit ging es um eine noch weitergehende Reduzierung der zu trocknenden Volumina. Wir griffen dazu das Prinzip der Verteilung einer Dosis in viele kleine Tropfen auf und verwirklichten es mit Hilfe eines Mikrotropfendispensierroboters. 18  $\mu$ l Proteinlösung wurden in viele nanolitergroße Tropfen aufgeteilt und in vorprogrammierten Mustern auf einer Oberfläche appliziert. Hierdurch kam es nicht nur zur Vergrößerung der Oberfläche und damit zur Erhöhung der Trocknungsgeschwindigkeit, sondern auch zu einer kontrollierten Applikation von Proteinen auf Oberflächen. In der Einleitung wurde dargelegt, wofür solche betropften Träger genutzt werden könnten, hier sei nur noch mal auf Implantate hingewiesen. Wie diese Methode im einzelnen umzusetzen war und welche Geräteeinstellungen nötig waren, um trockene Proteine unter Erhalt der Proteinstabilität herzustellen, wird im Folgenden dargestellt.

Grundsätzlich war die Dotierung jeder beliebigen Oberfläche denkbar, für die Entwicklung einer allgemeingültigen Methode haben wir uns jedoch zunächst auf einen Träger beschränkt. Alle Ergebnisse im ersten Teil der Untersuchungen beziehen sich auf Polyethylenfolie. Später wurde der Einfluss verschiedener Träger auf Restfeuchte und Proteinstabilität untersucht. Grundsätzlich wurde auf alle Träger 18  $\mu$ l Proteinlösung aufgebracht. Sowohl für die zwei untersuchten Proteine, als auch für zahlreiche andere hochpotente Proteine ist es möglich relevante Dosen in diesem Volumen unterzubringen.

### **1. Entwicklung der Methode**

#### ***1.1. Einfluss der Tropfengröße***

Der Einfluss der Dispensierung auf die Trocknung beruht auf der Oberflächenvergrößerung. Diese ist um so ausgeprägter, je kleiner die abgegebenen Volumina sind. Allerdings stand dem Zeitgewinn, welcher durch Verkleinerung der Tropfen und durch die dadurch beschleunigte Verdunstung herbeigeführt wurde, eine verfahrenstechnische Verlangsamung entgegen. Je kleiner die dispensierten Tropfen waren, desto mehr Tropfen mussten abgegeben und platziert werden, und um so länger dauerte die Herstellung einer Probe. Dementsprechend musste ein Kompromiss zwischen Verdunstungszeit und Aufbringungszeit gefunden werden. Aus Tab. 16 gehen die mit unserem Gerät erzielten Restfeuchten abhängig von der verwendeten Tropfengröße, und die dafür benötigte Trocknungsdauer hervor. Durch Reduktion der Tropfengröße von 40 nl auf 20 nl konnte eine Trocknung auf niedrigere Restfeuchten erzielt werden,

während eine weitere Verkleinerung der Volumina auf 10 nl keine zusätzliche Verbesserung brachte. Statt dessen kam es bei Dispensierung von 10 nl zur Erhöhung der Streuung der Ergebnisse und zur Verlängerung der Dispensierungszeit. Für alle zukünftigen Versuche wurde eine Tropfengröße von 20 nl gewählt.

<b>Tropfengröße (nl)</b>	<b>Restfeuchte (%)</b>	<b>rel.Stand.abw. (%)</b>	<b>Fläche x mal betropfen</b>	<b>Dauer (min)</b>
40	9,4	8	1x	7
20	7,7	4	2x	15
10	7,9	15	4x	25

Tab. 16: Zusammenhang zwischen dispensierter Tropfengröße, Restfeuchte und Dauer der Dispensierung. 15 %ige Saccharoselösung wurde auf eine 50 °C warme Bodenplatte getropft. Bei den kleineren Tropfengrößen wurde nach Trocknung der ersten Fläche, auf dieselben Punkte ein weiteres Mal/weitere Male getropft.

## 1.2. Einfluss der Temperatur

### 1.2.1. Einfluss auf die Restfeuchte

Die Temperatur stellt den Haupteinflussfaktor bei einer Kontakttrocknung dar. Bei dem von uns verwendeten Dispensierrobotersystem konnte die Bodenplatte, auf welche die zu betropfenden Träger gelegt wurden, temperiert werden. Wie zu erwarten war, kam es mit steigenden Temperaturen der Träger zur Erniedrigung der Restfeuchte (Tab. 17).

<b>Temperatur °C</b>	<b>Restfeuchte %</b>
30	11,9
40	10,9
50	7,7

Tab. 17: Einfluss der Temperatur der Bodenplatte und damit der Träger auf die Restfeuchte der Proben (15 % Saccharose).

Um die vollständige Trocknung der zuletzt platzierten Tropfen zu gewährleisten, wurden alle Träger nach dem Dispensierschritt, bevor sie verpackt wurden, für einige Zeit auf der erwärmten Bodenplatte belassen. Welchen Einfluss diese Zeit auf die Restfeuchte der Proben ausübte, gibt Tab. 18 wieder. Bereits nach fünf Minuten wurde, aufgrund der geringen Größe der Tropfen, die maximal mögliche Trocknung erreicht. Diese Zeit wurde für alle zukünftigen Versuche verwendet.

Nach Dispensierung entstanden kompakte, durchsichtige, gut auf der Unterlage haftende, kleine (mehr oder minder halbkugelförmig) Erhebungen aus Zucker. Die gebildeten kompakten Strukturen behinderten die vollständige Verdunstung des eingeschlossenen Wassers, so dass die Produkte selbst bei einer Trägertemperatur von 50 °C noch ca. 8 %

Restfeuchte aufwiesen. Eine weitere Erhöhung der Temperatur war nicht sinnvoll, da es bereits bei 50 °C zur deutlichen Aggregation der Proteine kam (siehe nächster Absatz).

Nachtrocknung (min)	Restfeuchte (%)	rel.Stand.abw. (%)
0	10,9	4
5	7,7	2
30	7,7	7

Tab. 18: Einfluss der Nachtrocknungszeit auf die Restfeuchte der Proben (15 % Saccharose). Die Nachtrocknungszeit ist die Zeit, während der die Träger nach Betropfen auf der erwärmten Bodenplatte verblieben.

### 1.2.2. Einfluss auf die Proteinstabilität

Tab. 19 gibt den Einfluss der Temperatur und des Herstellverfahrens auf die Proteinstabilität wieder. Wurde eine Erythropoietinrezeptur (Epo + ST) auf einen 50 °C warmen Träger getropft, kam es zur Bildung von 3 % Aggregaten, wohingegen keine Aggregation auftrat, wenn dieselbe Lösung in wassergefüllte Vials dispensiert wurde. Die Aggregation der Proteine wurde demnach nicht durch den, bei der Dispensierung auftretenden, Scherstress verursacht, sondern durch die Temperatur beim Trocknen hervorgerufen. Durch Absenkung der Temperatur der Träger konnten die Proteine stabilisiert werden (siehe graue Fläche in der Tabelle). Auf einem 30 °C warmen Träger wurden Produkte mit 99,5 % Monomergehalt erhalten, allerdings wiesen die Produkte eine hohe Restfeuchte auf. Selbst optimierte Rezepturen konnten bei 30 °C nicht auf Restfeuchten unter 5 % getrocknet werden. Von uns wurde jedoch eine Restfeuchte von unter 2 % angestrebt (siehe A.2, C.I.1.2), weshalb an die Dispensierung eine Vakuumtrocknung angeschlossen wurde (siehe C.II.1.3). Diese hatte keinen negativen Einfluss auf die Proteinstabilität.

	Proteinmonomer (%)	
	Epo	Epo + ST
Originalrezeptur	100	100
nach Vertropfen in Wasser	100	100
Tropfen auf 50 °C Träger	96,9	97,0
Tropfen auf 40 °C Träger (+ 24h Vakuum)	97,4	98,9
Tropfen auf 30 °C Träger (+ 24h Vakuum)	---	<b>99,5</b>

Tab. 19: Einfluss der Dispensierung und Trocknung bei verschiedenen Trägertemperaturen auf die Proteinstabilität. Die nachträgliche Trocknung im Vakuum verursachte keine zusätzliche Aggregation (Zeile vier und fünf). S = Saccharose, T = Polysorbat 80

### 1.3. Einfluss der Vakuumnachtrocknung

Zur Erhaltung der Proteinstabilität bei gleichzeitiger Trocknung auf unter 2 % Restfeuchte, wurde eine Applikations- und Trocknungsmethode (Biodotmethode) entwickelt, welche sich aus zwei Arbeitsschritten zusammensetzt. Zunächst wurde die Proteinlösung in Mustern dispensiert, um eine kontrollierte Aufbringung zu gewährleisten. Da dieser Schritt bei moderaten Temperaturen (30 °C) erfolgte, konnte die Stabilität der Proteine erhalten werden. Die Restfeuchte der Produkte von ca. 4 bis 8 % ermöglichte eine sehr gute Haftung auf den Trägern und damit eine gute Weiterverarbeitung. Anschließend wurden die Proben mittels kurzer Vakuumtrocknung auf die erwünschte Restfeuchte von unter 2 % getrocknet. Üblicherweise wurden die betroffenen Träger zur leichteren Handhabung vor der Vakuumtrocknung gefaltet und in Vials verpackt. In späteren Versuchen, bei denen größere, nicht flexible Träger (z.B. Metallplättchen) untersucht wurden, wurden die Träger direkt in den Vakuumtrockenschrank gelegt und nach Trocknung im Exsikkator gelagert. Die erreichten Restfeuchten, vor und nach Vakuumtrocknung, werden für einige beispielhaft ausgewählte Rezepturen in Tab. 20 wiedergegeben (weitere Daten unter C.I.3.1). Alle Rezepturen – mit Ausnahme von Proben aus reiner Saccharose - konnten durch Vakuumtrocknung über 24 Stunden auf Restfeuchten unter 1 % getrocknet werden, üblicherweise wurden sogar Restfeuchten von unter 0,5 % erzielt. Die schlechteren Ergebnisse von Proben aus Zucker - ohne weitere Hilfsstoffe - beruhen auf der kompakten Struktur dieser Produkte, worauf unter C.II.2.1 genauer eingegangen wird.

Rezeptur	Restfeuchte (%)	
	nach Dispensierung	nach 24 h Vakuum
Saccharose 15 %	8,9	4,2
Saccharose 5 % + Polysorbat 80 1 %	2,7	0,4
Saccharose 5 % + Phe 2 %	6,0	0,3
Epo + SPT ph 7,4	4,6	0,3

Tab. 20: Effekt der Vakuumnachtrocknung auf die Restfeuchte. Alle Proben wurden auf 50 °C warme Träger dispensiert. Die Vakuumtrocknung erfolgte bei 20 °C.

#### 1.3.1. Einfluss der Dauer der Vakuumtrocknung

Zu Beginn der Arbeit wurde grundsätzlich eine 24 stündige Vakuumtrocknung verwendet, da der Zeitaufwand zur Herstellung einer Probe jedoch wesentlich von der Dauer der Vakuumtrocknung abhing, wurde diese später optimiert. Abb. 104 gibt den Einfluss der Nachtrocknungsdauer auf die Restfeuchte der Produkte wieder. Es stellte sich heraus, dass bereits nach sechs Stunden Trocknung die minimale Restfeuchte erzielt werden konnte. Demnach war es möglich innerhalb nur eines Tages Proteinlösungen zu

dispensieren (15 Minuten pro Probe) und zu trocknen (6 Stunden). Aus praktischen Erwägungen wurde bei den meisten zukünftigen Versuchen eine Vakuumtrocknung über Nacht, also von ca. 15 Stunden, durchgeführt.

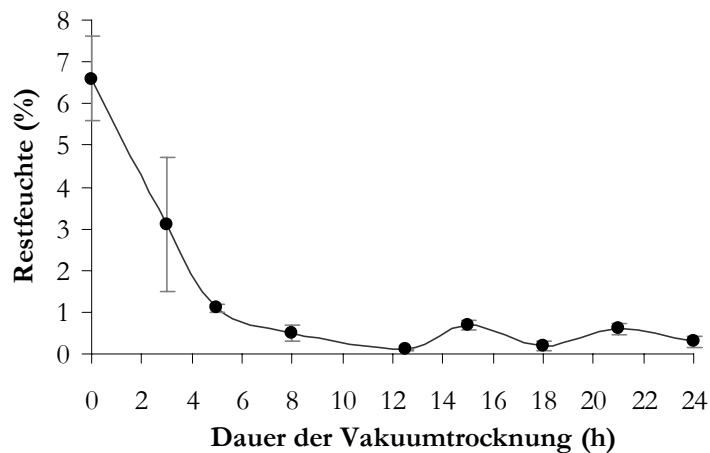


Abb. 104: Einfluss der Dauer der Vakuumnachtrocknung auf die Restfeuchte von G-CSF +SPT Proben. Die Rezeptur wurde auf 30 °C warme Träger dispensiert und bei 20 °C im Vakuum nachgetrocknet.

### 1.3.2. Einfluss der Anlage

Um die optimale Wasserdampfabscheidung am Eiskondensator zu nutzen, wurde die Vakuumtrocknung in einer handelsüblichen Gefriertrocknungsanlage durchgeführt. Hierbei wurde ein Vakuum von 0,001 mbar angelegt. Zur Überprüfung, ob dieselben Resultate auch mit Hilfe eines deutlich billigeren Vakuumtrockenschrankes mit Kühlfalle und Drehschiebervakuumpumpe (maximales Vakuum 0,3 mbar) erzielt werden können, wurden einige Proben in einem solchen Gerät bei 20 °C und 40 °C getrocknet.

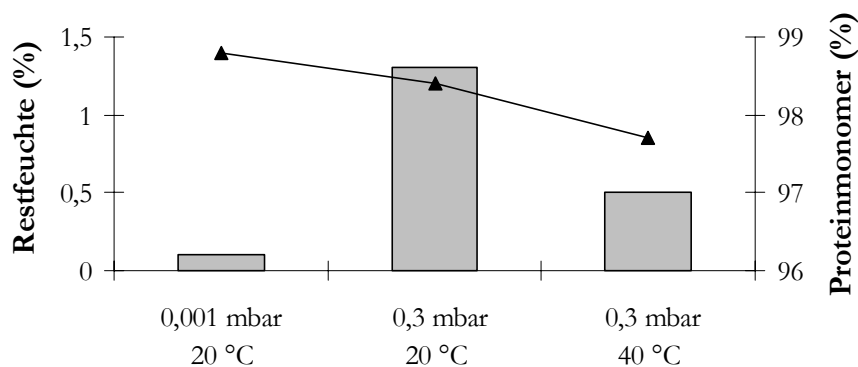


Abb. 105: Einfluss der Einstellungen bei der Vakuumnachtrocknung auf die Restfeuchte (Balken) und Proteinmonomer (Linie, rechte y-Achse) von G-CSF + SPT Proben. Die Rezeptur wurde auf 30 °C warme Träger dispensiert und im Vakuum für 12,5 Stunden nachgetrocknet. Der erste Datensatz (0,001 mbar) stammt von in der GT-Anlage getrockneten Proben, die zwei weiteren Datensätze (0,3 mbar) von im Vakuumtrockenschrank hergestellten Proben.

Wie aus Abb. 105 ersichtlich ist, konnten auf diese Weise ebenfalls Produkte mit Restfeuchten unterhalb der maximalen Zielrestfeuchte von 2 % gebildet werden.



Dennoch lag die Restfeuchte dieser Produkte mit 1,4 % deutlich oberhalb der Restfeuchte von 0,3 %, welche in Produkten bei Trocknung in der Gefriertrocknungsanlage erzielt wurden. Durch Erhöhung der Nachtrocknungstemperatur auf 40 °C kam es zur Absenkung der Restfeuchte, jedoch gleichzeitig zur Erhöhung der Aggregatbildung, so dass dies für empfindliche Proteine nicht empfohlen werden kann.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass ein „normaler“ Vakuumtrockenschrank für die Nachtrocknung von Biodotproben bedingt geeignet ist. Da die dabei erzielten Restfeuchten jedoch etwas höher liegen, muss der Einsatz besonders für stark wasseradsorbierende Proben in jedem Einzelfall überprüft werden.

### **Zwischenüberblick: Optimierte Methode**

An dieser Stelle soll eine kurze Zusammenfassung über die entwickelte Methode gegeben werden (Abb. 106). Im ersten Schritt der Herstellung werden mit Hilfe eines Mikrotropfendispensierroboters 18 µl einer relativ konzentrierten Proteinlösung in 900 Tropfen mit einem Volumen von 20 nl dispensiert und diese Tropfen in vorprogrammierten Mustern auf einer auf 30 °C erwärmten Oberfläche platziert. Hierdurch erhält man Proben mit vorgetrockneten, festhaftenden Mustern. Grundsätzlich ist jedes beliebige Muster zur Applikation der Tropfen auf den Trägern möglich. Um ein Zusammenlaufen der Tropfen zu verhindern, muss ein Mindestabstand zwischen den Tropfen eingehalten werden, wodurch je nach Anzahl der Tropfen eine bestimmte Fläche erforderlich wird. Um diese Fläche möglichst klein zu halten, kann nach Aufbringung eines Teils der Lösung die restliche Lösung in einem zweiten, dritten, oder beliebigen weiteren Schritt über die ersten, bereits trockenen Tropfenreihen dispensiert werden. Alternativ dazu könnten auch größere Volumina dispensiert werden, allerdings würde dies die Trocknungsgeschwindigkeit herabsetzen und größere Tropfen bilden, welche in einem weiterem Abstand zueinander platziert werden müssten. Für unsere Versuche wurden 20 nl große Tropfen zweimal hintereinander auf eine Fläche von 30 x 15 mm dispensiert (insgesamt 900 Tropfen).

In einem zweiten Schritt werden die betropften Träger unter Vakuum innerhalb weniger Stunden auf Restfeuchten unter 2 % getrocknet. Zur Erzielung dieser Restfeuchten sind bereits sechs Stunden Trocknung ausreichend, üblicherweise wurde die Trocknung jedoch aus praktischen Erwägungen über Nacht vorgenommen. Die fertigen Proben werden – sofern es sich um in Vials verpackte Träger handelte – in der Gefriertrocknungsanlage unter leichtem Vakuum verschlossen und bis zur analytischen Untersuchung im Kühlschrank gelagert. Andere Träger werden aus der Anlage entnommen und bis zur weiteren Verwendung in einem Exsikkator aufbewahrt.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird diese Standardmethode als „Biodotmethode“ bezeichnet. Abb. 106 gibt das Prinzip der Methode noch mal schematisch wieder:

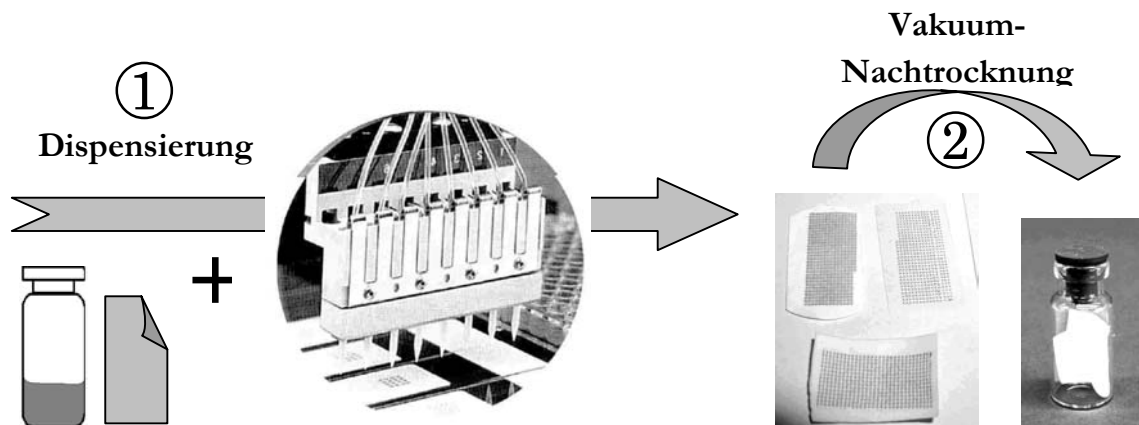


Abb. 106: Grundprinzip der Applikation und Trocknung mittels Mikrotropfen (zum genauen Vorgehen siehe Text).

## 2. Einfluss verschiedener Rezepturen

Wie bei der Warmlufttrocknung erfolgte auch bei dieser Trocknungstechnik eine Optimierung der Rezepturen. Dazu wurden die Proben hinsichtlich Proteinstabilität und Restfeuchte, sowie hinsichtlich der Bildung kontrollierter Tropfenmuster untersucht.

### 2.1. Einfluss auf die Restfeuchte

Der Einfluss der Rezeptur auf die Restfeuchte wurde zunächst anhand von Placebolösungen analysiert. Erst in einem späteren Teil dieser Arbeit wird auf den Effekt von zugesetztem Protein eingegangen. Entsprechend den Erkenntnissen von M. Mattern (212, 96) und den eigenen Erfahrungen bei der Warmlufttrocknung, war es auch mittels Biodotmethode nicht möglich, reine Zuckerlösungen auf niedrige Restfeuchten zu trocknen. Die gebildeten Tropfen erschienen sehr kompakt, so dass eingeschlossenes Wasser während der Trocknung nicht entweichen konnte (Abb. 107 a). Selbst nach 24 Stunden Vakuumtrocknung wiesen diese Produkte noch Restfeuchten von über 4 % auf (Tab. 21). Wurde dagegen der Zuckeralkohol Mannit zur Rezepturherstellung verwendet, bildeten sich kristalline Produkte, aus welchen Wasser sehr gut verdunsten konnte (Abb. 107 b). Trotz der niedrigen Restfeuchte von 3 % bereits vor Vakuumtrocknung wurden diese Produkte nicht weiter verwendet, da aus zahlreichen Untersuchungen in der Literatur bekannt ist, dass zur Stabilisierung von Proteinen in trockenen Produkten amorphe Strukturen essentiell sind (siehe A.2, A.2.2.4). Nur so können die zum „water replacement“ notwendigen Wasserstoffbrücken zwischen Hilfsstoff und Protein ausgebildet werden.

Rezeptur	Restfeuchte (%)		Struktur
	nach Dispensierung	nach 24 h Vakuum	
Trehalose 15 %	8,7	4,5	amorph
Saccharose 15 %	8,9	4,2	amorph
Mannitol 15 %	3,1	n.b.	kristallin
Saccharose 5 % + Polysorbat 80 0,1 %	2,7	0,4	vergrößerte Oberfläche
Saccharose 5 % + Phe 2 %	6,0	0,3	teilkristallin
Saccharose 5 % + Phe 1 % + Arg 1 %	6,3	1,4	teilkristallin
Saccharose 5 % + Phe 2 % + Polysorbat 80 0,01 %	4,4	0,2	teilkristallin

Tab. 21: Einfluss verschiedener Rezepturen auf die Restfeuchte der Produkte. Alle Proben wurden auf eine 50 °C warme Bodenplatte dispensiert. Die Nachtrocknung im Vakuum erfolgte bei 20 °C.

Eine Möglichkeit zur Senkung der Restfeuchte von amorphen Produkten, stellte der Zusatz von Polysorbat 80 dar, welcher die Oberflächenspannung der Tropfen erniedrigte und zur Spreitung auf einer größeren Fläche führte. Aufgrund der vergrößerten Trocknungsfläche wurde die Reduzierung der Restfeuchte bereits vor Vakuumtrocknung auf unter 3 % ermöglicht. Allerdings führte der Zusatz von 0,1 % Tensid zu einer so starken Erniedrigung der Oberflächenspannung, dass die applizierten Tropfen ineinander liefen und keine kontrollierten Muster ausgebildet werden konnten (Abb. 107 d). Außerdem kam es zur partiellen, unkontrollierten Kristallisation der Proben (Abb. 107 e) - ein Effekt von Tensiden, welcher bereits bei der Warmlufttrocknung und von R.L. Seitakari (163) beobachtet wurde.

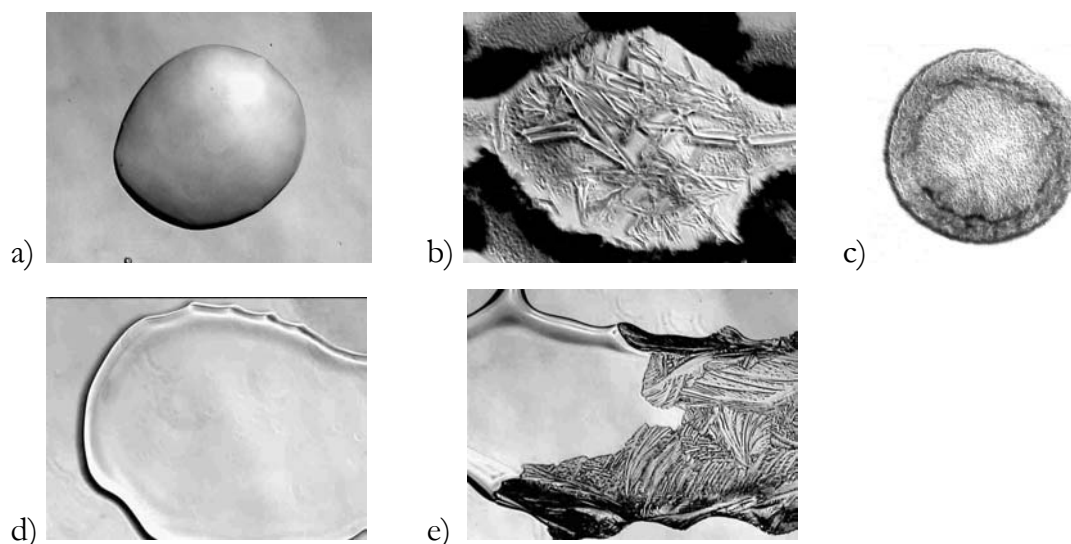


Abb. 107: Mikroskopaufnahmen von Mikrotropfen, gebildet aus verschiedenen Rezepturen.

a) 15 % Saccharose, b) 5 % Mannit, c) 5 % Saccharose + 0,01 % Polysorbat 80 + 2 % Phenylalanin (SPT), d) 5 % Saccharose + 0,1 % Polysorbat 80 (S+0,1T), e) S+0,1T teilweise auskristallisiert.

Deshalb wurde auch hier auf die von M. Mattern (212, 96) entwickelte Methode zur Senkung der Restfeuchte zurückgegriffen. Den Zuckerrezepturen wurde Phenylalanin zugesetzt, welches zu Beginn der Trocknung kristallin ausfiel (Abb. 107 c). Auf dieses Kristallgerüst lagerte sich im weiteren Verlauf der Trocknung der amorphe Zucker ab. Auf diese Weise konnte eine porenhaltige Matrix gebildet werden, welche die Verdunstung von Wasser ermöglichte. Die erreichte Restfeuchte vor Vakuumtrocknung lag bei 6 %. Während sich vor Vakuumtrocknung die Restfeuchte von Proben mit Tensid (2,7 %) und mit Phenylalanin (6,0 %) deutlich unterschied, erreichten beide Produkte nach Vakuumtrocknung die gleiche Restfeuchte (0,4 %, Tab. 21). Das eingeschlossene Wasser konnte demnach aus den kleineren, phenylalaninhaltigen Tropfen - aufgrund des porenhaltigen Gerüsts - ebenso gut entweichen wie aus den großen, tensidhaltigen Tropfen. Als optimale Kombination wurde für alle weiteren Versuche eine Mischung aus 5 % Saccharose, 2 % Phenylalanin und 0,01 % Polysorbat 80 (SPT, Abb. 107 c) verwendet.

Der beschriebene Einfluss verschiedener Hilfsstoffe blieb auch in proteinhaltigen Rezepturen erhalten, dargestellt in Tab. 22. G-CSF-Saccharoselösungen trockneten ohne Vakuumnach Trocknung nur auf 6,3 %, während der Zusatz von Tensid (0,01 %) die Restfeuchte erniedrigte (5,6 %). Auch hier konnte durch die Kombination aus Saccharose, Phenylalanin und Tensid (SPT) das beste Ergebnis erzielt werden.

	<b>Restfeuchte (%)</b>	
	<b>ohne Vakuumtrocknung</b>	
	<b>G-CSF</b>	<b>Epo</b>
Protein allein	8,2	11,8
Protein + 5 % Saccharose	6,3	9,6
Protein + 5 % Saccharose + 0,01% Polysorbat	5,6	9,0
Protein + SPT	4,6	6,7

**Tab. 22: Einfluss der Rezeptur auf die Restfeuchte von proteinhaltigen Proben. Die Dispensierung erfolgte auf Träger von 50 °C.**

Auffällig war die durchgehend höhere Feuchte von Erythropoietinhaltigen Proben (Tab. 22 rechts). Diese wurde von dem im Epo-Bulk enthaltenen Kochsalz verursacht. Durch Umpufferung mit Phosphatpuffer wurde eine Proteinlösung gebildet, aus der Produkte mit niedriger Restfeuchte hergestellt werden konnten. Abb. 108 stellt die vor Vakuumtrocknung erzielten Restfeuchten von Placeboprodukten (SPT) Produkten gegenüber, welche aus Epo-Bulk und dialysierter Epo-Lösung hergestellt wurden. Es wird deutlich, dass die zunächst beobachtete höhere Restfeuchte durch das im Bulk enthaltene Kochsalz verursacht wurde.

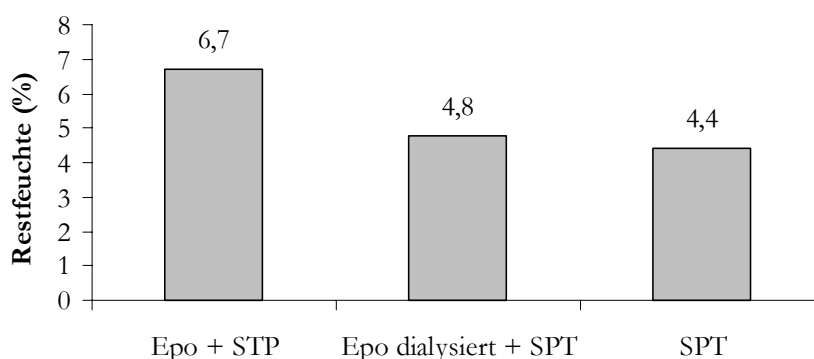


Abb. 108: Einfluss der Bestandteile des Erythropoietinbulks auf die Restfeuchte. Durch Dialyse wurde Kochsalz entfernt und in Phosphatpuffer umpuffert.

## 2.2. Einfluss auf die gebildeten Muster

Abb. 109 veranschaulicht die aus verschiedenen Rezepturen gebildeten Tropfenreihen. Mit Tropfen aus reiner Saccharoselösung (Abb. 109 a) konnten zwar gleichmäßige Muster gebildet werden, allerdings wiesen diese eine sehr hohe Restfeuchte auf. Dagegen ermöglichte die Verwendung von Mannitol (Abb. 109 b) die Bildung sehr trockener Produkte, welche jedoch kristallin vorlagen und keine gute Haftung auf der Unterlage erlangten. Auch der Zusatz von 0,1 % Polysorbat 80 (Abb. 109 c) führte zu „Tropfen“ mit niedriger Restfeuchte, welche allerdings ineinander flossen. Mit dieser Rezeptur war es nicht möglich kontrollierte Muster zu bilden. Die besten Produkte entstanden aus der Kombination Saccharose, Phenylalanin und 0,01 % Polysorbat 80 (Abb. 109 d). Hiermit wurden im Vergleich zu reiner Saccharose etwas größere Tropfen dispensiert, aus welchen dennoch gleichmäßige Muster und Produkte mit niedriger Restfeuchte hergestellt werden konnten. In Abb. 109 unten sind die entstandenen Tropfen aus verschiedenen Saccharoserezepturen nochmals in Vergrößerung dargestellt. Auch durch Zusatz von Protein wurde das Aussehen dieser Produkte nicht verändert.

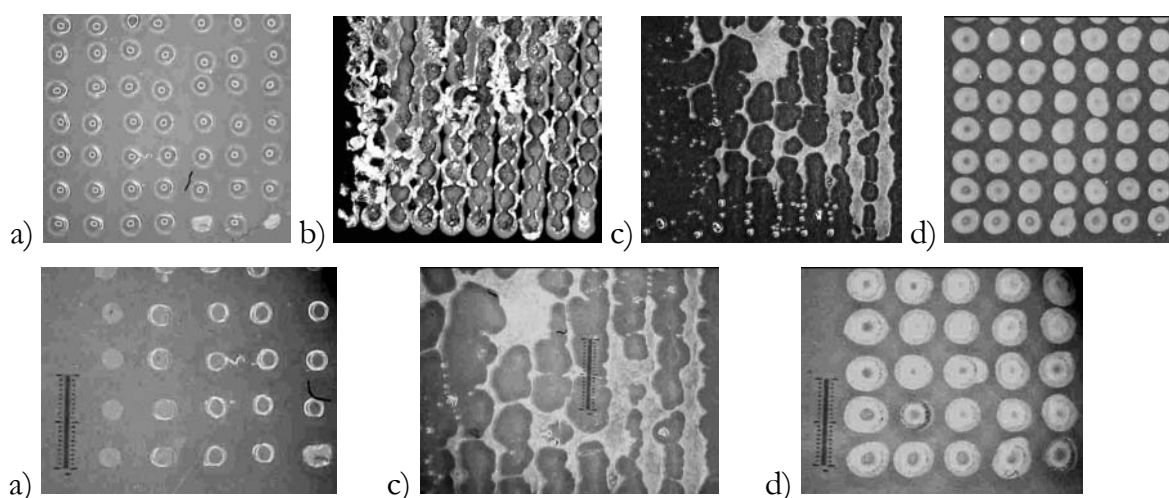


Abb. 109: Überblick über aus verschiedenen Rezepturen gebildete Tropfenreihen. Die Bilder wurden unter dem Auflichtmikroskop aufgenommen. a) 15 % Saccharose, b) 5 % Mannitol, c) ST, d) SPT

### 2.3. Einfluss auf die Proteinstabilität

Um eine amorphe Matrix auszubilden, wurde allen Rezepturen 5 % Saccharose zugesetzt. Diese erhöhte die Stabilität von Erythropoietin bei Trocknung auf Trägern von 50 °C (Tab. 23). Zur Erniedrigung der Restfeuchte enthielten alle Rezepturen außerdem 0,01 % Polysorbat 80. Auch diese Formulierung verringerte die Aggregation des Proteins im Vergleich zu ohne Hilfsstoff getrocknetem Protein. Der Zusatz von 2 % Phenylalanin bewirkte eine zusätzliche Erniedrigung der Restfeuchte und hatte keinen negativen Einfluss auf die Proteinstabilität. Proben, welche aus Erythropoietin und Saccharose-Phenylalanin-Polysorbat 80-Mischungen durch Dispensieren auf einem 30 °C warmen Träger und Vakuumnach Trocknung hergestellt wurden, wiesen einen Monomergehalt von 99,3 % auf. Auch G-CSF Rezepturen konnte unter Erhalt einer Proteinstabilität von über 99 % getrocknet werden.

	Proteinmonomer (%)					
	Epo	Epo + S	Epo + ST	Epo + SPT	G-CSF + ST	G-CSF + SPT
Tropfen auf 50 °C Träger	96,9	97,9	97,0			
Tropfen auf 40 °C Träger + 24 h Vakuum	97,4	---	98,9			
Tropfen auf 30 °C Träger + 24 h Vakuum	---	---	<b>99,5</b>	<b>99,3</b>	<b>99,5</b>	<b>99,4</b>

Tab. 23: Einfluss verschiedener Rezepturen auf die Proteinstabilität. S = 5 % Saccharose, P = 2 % Phenylalanin, T = 0,01% Polysorbat 80.

### 3. Vergleich zur Vakuumtrocknung

Der grundsätzliche Vorteil der Biodotmethode im Vergleich zur Vakuumtrocknung liegt in der kontrollierten Aufbringung. Ohne vorheriges Dispensieren ist die Bildung komplexer, festgelegter Muster auf einer Oberfläche nicht möglich. Mit Hilfe einer normalen Pipette können 20 µl Lösung auf glatte Träger überhaupt nicht aufgebracht und auf poröse Träger nur unkontrolliert – durch Tränkung – appliziert werden. In den folgenden Versuchen wurden die zwei Methoden zusätzlich auf Unterschiede in der Restfeuchte der gebildeten Produkte untersucht. Dazu wurde die Restfeuchte von Produkten, welche aus 20 µl Lösung – platziert am Boden eines Vials - durch Vakuumtrocknung hergestellt wurden, mit der Restfeuchte von Produkten, welche durch Dispensierung in Mikrotropfen und nachträgliche Vakuumtrocknung gebildet wurden, verglichen. Die Ergebnisse gibt Tab. 24 wieder.

Rezeptur	Restfeuchte (%)		
	Mikrotropfen + 24 h Vakuum- trocknung	nur Vakuum- trocknung 24 h	nur Vakuum- trocknung 48 h
Saccharose 15 %	4,2	6,5	4,3
Saccharose 5 % + Polysorbat 80 0,1 %	0,4	1,9	0
Saccharose 5 % + Phe 2 %	0,3	2,5	0
Saccharose 5 % + Phe 1 % + Arg 1 %	1,4	6,7	1,8
G-CSF + ST	0,8	---	5,0
Epo +ST	3,8 <sup>x</sup>	7 <sup>x</sup>	5,4 <sup>x</sup>

Tab. 24: Vergleich der Restfeuchten verschiedener Rezepturen, welche durch die Biodotmethode (erste Spalte) und durch zwei verschieden lange Vakuumtrocknungen - ohne vorheriges Dispensieren - getrocknet wurden. <sup>x</sup>Diese Epo-Proben wurde aus kochsalzhaltigem Bulk hergestellt, wodurch sich die relativ hohen Restfeuchten erklären.

Aufgrund der zehnfach größeren Oberfläche der dispensierten Mikrotropfen wurden bei gleich langer Vakuumtrocknung durch die Biodotmethode deutlich niedrigere Restfeuchten erzielt (Vergleich erster mit zweiter Spalte Abb. 111). Erst bei Verlängerung der Vakuumtrocknung auf 48 Stunden konnte auch ohne vorherige Dispensierung für einige Rezepturen eine ähnlich niedrige Restfeuchte erzielt werden. Rezepturen aus reiner Saccharose oder proteinhaltigen Saccharose-Tensid-Rezepturen (graue Spalten rechts in der Tabelle) wiesen jedoch auch nach dieser Trocknungszeit noch deutlich erhöhte Restfeuchten auf. Durch Zusatz von nur 0,01 % Polysorbat 80 konnte die Oberfläche des Einzeltropfens nicht soweit vergrößert werden, dass eine Trocknung durch Vakuum möglich wurde. Ähnlich wie bei purer Saccharoselösung bildeten sich kompakte Produkte, aus denen das eingeschlossene Wasser nicht entweichen konnte (212). Die mittels Mikrodosierroboter dispensierten, winzigen Tropfen wiesen dagegen eine so geringe Schichtdicke auf, dass bereits der Zusatz von 0,01 % Polysorbat die Bildung von trockenen Produkten gewährleistete. Die im Vergleich zu G-CSF relativ hohen Restfeuchten der Erythropoietin-Proben (unterste Zeile) erklären sich aus der Verwendung von kochsalzhaltigem Proteinbulk. Der Unterschied zwischen Biodotmethode und Vakuumtrocknung geht jedoch auch aus diesen Produkten deutlich hervor.

In Bezug auf die Proteinstabilität erwiesen sich beide Methoden als gleichwertig (Tab. 25). Wie bereits erwähnt wurde, verursachte die Dispensierung keinerlei Aggregation und die nachfolgende Vakuumtrocknung wurde bei beiden Methoden auf die gleiche Art und Weise durchgeführt, so dass keine signifikanten Unterschiede zu erwarten waren. Auf die Stabilität der Produkte hatte es keinen Einfluss, ob diese für 8, 24 oder 40 Stunden im Vakuum getrocknet wurden.

Rezeptur	Proteinmonomer (%)	
	Mikrotropfen + 24 h Vakuumtrocknung	nur 40 h Vakuumtrocknung
Epo +ST	99,1	99,7
Epo +SPT	99,5	99,2
G-CSF + ST	99,2	99,3
G-CSF + SPT	99,1	99,6

Tab. 25: Vergleich der Proteinstabilität verschiedener Rezepturen, welche durch die Biodotmethode (erste Spalte) und durch 40 stündiger Vakuumtrocknung - ohne vorheriges Dispensieren - getrocknet wurden.

#### 4. Stabilitätsuntersuchungen

Optimierte Rezepturen für zwei Modellproteine, G-CSF und Erythropoietin, wurden mittels Mikrotropfenroboter auf PE-Folien dispensiert und im Vakuum nachgetrocknet (Biodotmethode). Pro Träger wurden 18 µl einer konzentrierten Proteinlösung auf einer Fläche von 1,5 x 3 cm platziert. Dies entspricht für beide Proteine einer relevanten therapeutischen Dosis. Alle Proben wurden sofort nach der Herstellung und nach Einlagerung bei verschiedenen Temperaturen auf Restfeuchte und Proteinstabilität untersucht. Zur Lagerung wurden sowohl Standardbedingungen (4 – 8 °C und 25 °C), als auch Stressbedingungen (30 °C, 40 °C und 50 °C) gewählt. Auf diese Weise sollte es möglich sein einen Überblick über den Einfluss der Temperatur auf die Qualität von Proteinen mit verschiedener Charakteristik (G-CSF, Epo) zu erhalten.

Direkt nach der Herstellung wiesen alle Proben eine gute Qualität auf. Die Restfeuchte lag bei ca. 1,0 % und der Proteinmonomergehalt bei ca. 99,2 % (genaue Werte in den jeweiligen Graphen). Auch mittels SDS-PAGE wurde bei allen Proben nur eine Proteinmonomer-bande und keine Nebenbanden angefärbt (Abb. 110, Pfeile).

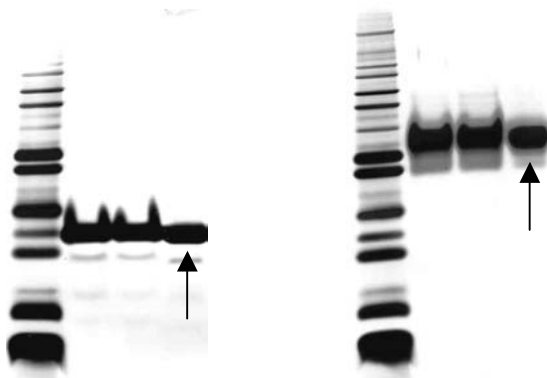


Abb. 110: SDS-PAGE von G-CSF (links) und Epo (rechts) Proben direkt nach der Herstellung. Jedes Gel enthält von links nach rechts folgende Proben: Marker, eingesetzter Bulk, Proteinrezeptur vor Trocknung und eine Probe direkt nach der Herstellung (Pfeil). Die niedermolekularen Nebenbanden bei G-CSF resultieren aus einer zu starken Anfärbung und lassen keinen Rückschluss auf eine Instabilität zu.



#### 4.1. Restfeuchte

Die Restfeuchte ist ein wichtiger Parameter der Probenqualität. Eine Zunahme könnte nicht nur zur Konsistenzänderung der Probe führen, sondern auch die Glasübergangstemperatur unter die Lagertemperatur senken. Dies könnte wiederum die Kristallisation der Proben oder die Denaturierung der eingeschlossenen Proteine aufgrund der erhöhten Beweglichkeit bewirken. Die Entwicklung der Restfeuchte der eingelagerten Proben wird in Abb. 111 wiedergegeben. Selbst nach 9 Monaten Lagerung im Kühlschrank (■) kam es weder bei Erythropoietin, noch bei G-CSF Proben zum Anstieg der Restfeuchte über 1 %. Auch während der Lagerung bei Raumtemperatur (■) und 30 °C (▒) stiegen die Restfeuchten nicht über 2 %.

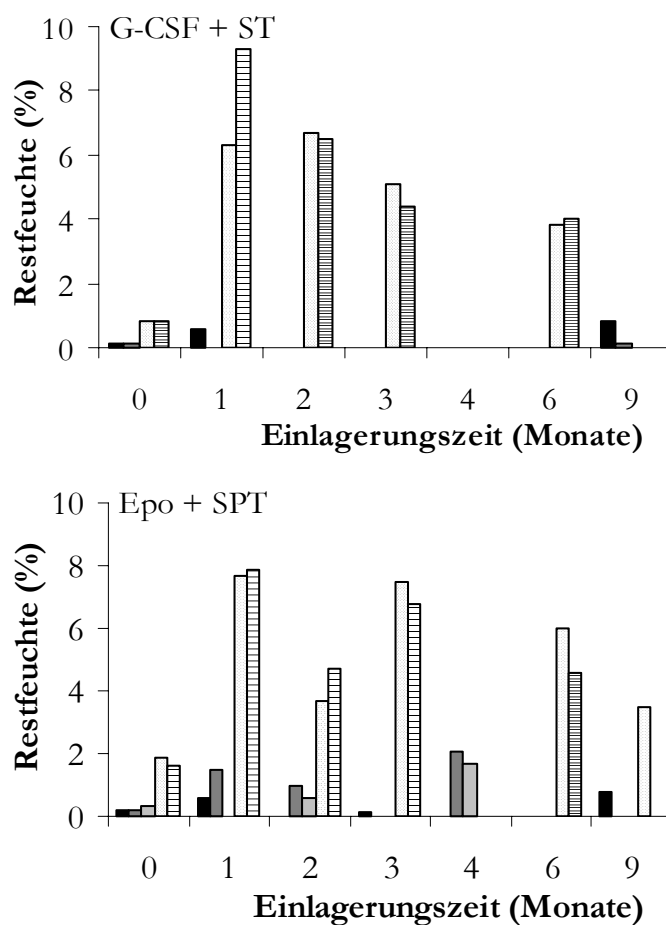







Abb. 111: Restfeuchte von G-CSF (oben) und Epo (unten) Proben während der Einlagerung bei verschiedenen Temperaturen. ■ 4–8 °C, ■ 25 °C, ▒ 30 °C, □ 40 °C, ▨ 50 °C.

Bei Lagerung der Proben unter Stressbedingungen, bei 40 °C und 50 °C (▨ ▩), erhöhten sich die Restfeuchten dagegen stark. Diese Temperaturen führten zur Freisetzung von Wasser aus den (nicht vorgetrockneten) Stopfen in die Vialatmosphäre. Mit steigender Lagertemperatur wurde mehr Wasser von der Luft aufgenommen und an die Proben weitergegeben. Dementsprechend kam es bei Lagerung bei 50 °C schneller zum Anstieg der Restfeuchte als bei 40 °C. Besonders deutlich wird dies bei G-CSF Proben (Abb. 111 oben). Während Proben, die bei 50 °C gelagert wurden, bereits nach

einem Monat eine Restfeuchte von fast 10 % aufwies, stieg die Restfeuchte von bei 40 °C gelagerten Proben erst im zweiten Monat auf den höchsten Wert. Nach Erreichen der maximalen Restfeuchte, üblicherweise ca. 10 %, kam es im weiteren Verlauf der Einlagerung zur Erniedrigung der Restfeuchten. Vermutlich lag dies – wie bereits für mittels Warmlufttrocknung hergestellte Proben berichtet (siehe **C.I.4.1**) – an der Kristallisation der Zucker und der damit verbundenen Wasserabgabe. Da Kristalle eine sehr viel schwächere Wasserbindung aufweisen als amorphe Gläser (45), wurde das freigesetzte Wasser in die Vialatmosphäre abgegeben, so dass es bei der Karl-Fischer-Titration nicht miterfasst wurde (218). Bei den Erythropoietinproben war grundsätzlich derselbe Trend zu erkennen, mit Ausnahme des Wertes nach zwei Monaten (Abb. 111 unten ) . Ob es sich bei diesem um einen Ausreißer handelte, oder ob der Wert nach einem Monat fehlerhaft war und der Restfeuchteanstieg bei diesen Proben etwas langsamer (bis zum dritten Monate) erfolgte, lässt sich im nachhinein nicht mehr feststellen. Entscheidend ist, dass es bei niedrigeren Lagertemperaturen nicht zum Anstieg der Restfeuchte kam. Bei Verwendung vorgetrockneter Stopfen konnte dies auch bei Lagerung bei 30 °C sichergestellt werden. Trotz der enormen Oberfläche der winzigen Tropfen kam es demnach nicht zur Veränderung der Restfeuchte während der Lagerung unter moderaten Bedingungen (4 °C – 30 °C).

#### 4.2. *Proteinstabilität*

Alle Proben wurden nach Einlagerung auch hinsichtlich der Proteinstabilität untersucht. Hierbei wurde die verminderte Stabilität von Produkten mit nicht glykosiliertem, relativ hydrophoben, G-CSF gegenüber Produkten mit glykosiliertem Epo deutlich. Während Epo selbst bei Lagerung bei 40 °C nur sehr langsam aggregierte (Abb. 113 ) , und auch nach zehn Monaten nicht mehr als 6 % Aggregate in den Proben enthalten waren, wurde dieser Aggregatanteil bei G-CSF Proben bereits nach sechs Monaten erreicht (Abb. 112). Bei Lagerung bei 50 °C wurde der Unterschied noch deutlicher. G-CSF wurde bei dieser Temperatur extrem stark aggregiert (14,7 % nach sechs Monaten, ) , wohingegen Epo fast keine Veränderung aufwies. Höchst erfreulich waren die Stabilitätsdaten bei Einlagerung bei niedrigeren Temperaturen. Weder G-CSF noch Epo wurden bei Lagerung bei 4 bis 8 °C () und 25 °C () in nennenswerter Weise aggregiert. Nach neun Monaten enthielten die Produkte beider Proteine nicht mehr als 0,8 % bis maximal 1,8 % Aggregate (mittels SE-HPLC bestimmt).

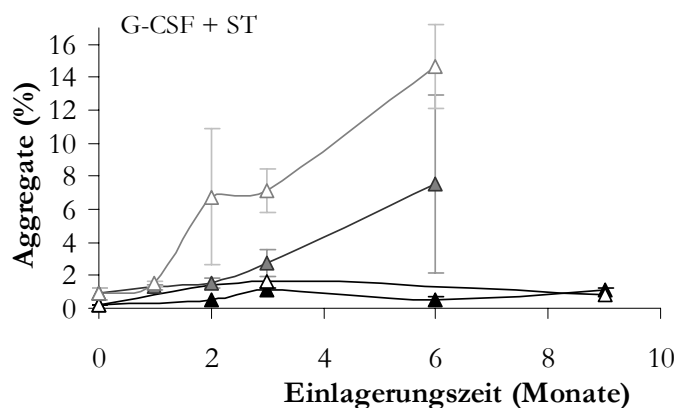


Abb. 112: Stabilität von G-CSF während der Einlagerung bei verschiedenen Temperaturen.

▲ 4 – 8 °C, △ 25 °C, ▲ 30 °C, ▲ 40 °C, △ 50 °C.

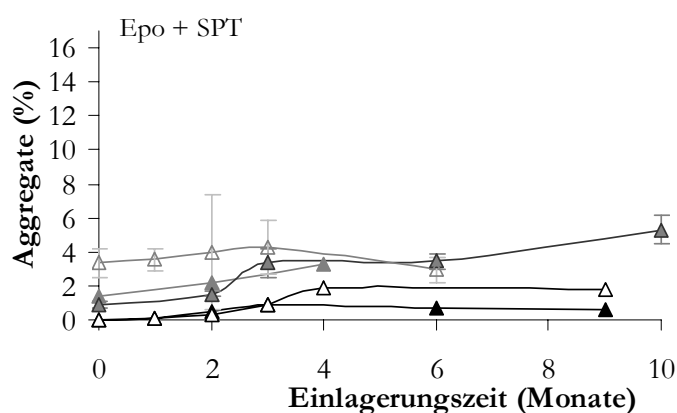


Abb. 113: Stabilität von Epo während der Einlagerung bei verschiedenen Temperaturen.

▲ 4 – 8 °C, △ 25 °C, ▲ 30 °C, ▲ 40 °C, △ 50 °C.

Auch bei Lagerung bei 30 °C kam es nur zu einer langsamen Zunahme der Epo-Aggregate (Abb. 113, ▲ und Abb. 114). In diesem Fall bewahrten sowohl im Vakuum nachgetrocknete, als auch direkt nach der Dispensierung eingelagerte Proben über vier Monate hinweg eine ähnliche Stabilität, obwohl sich die Restfeuchten der zwei Chargen stark unterschieden (Abb. 114). Ohne Vakuumtrocknung wiesen die Proben eine Restfeuchte von ca. 4,6 % auf, wohingegen die Restfeuchte von nachgetrockneten Proben unter der von uns festgelegten Zielrestfeuchte von 2 % lag. Eventuell wurde selbst durch eine Probenrestfeuchte von 5 % der BET-Monolayer für Epo nicht überschritten, so dass die Reaktivität der Moleküle nicht verändert wurde (44). Sicher ist, dass Erythropoietin zumindest bei Raumtemperatur nicht empfindlich auf etwas höhere Restfeuchten reagierte und demnach auch ohne Nach Trocknung gelagert werden könnte. Auch wenn es bei Lagerung bei 30 °C nur zu einer langsamen Aggregatzunahme kam (Abb. 114: 1,4 % auf 3,3 % in 4 Monaten), dürfte diese Temperatur auf lange Sicht etwas zu hoch gewählt sein. Sicherer wäre eine Lagerung bei 4 °C oder 25 °C.

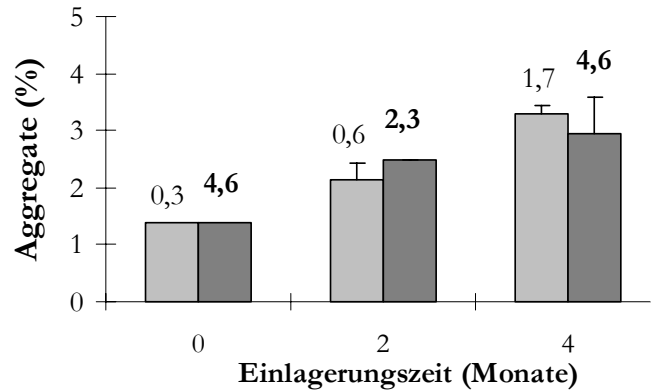


Abb. 114: Stabilität (Balken) und Restfeuchte (Werte über den Balken) von Epo während der Einlagerung bei 30 °C. ■ normale Biodotprobe (dispensiert und im Vakuum getrocknet), ■ Probe ohne nachträgliche Vakuumtrocknung.

Des Weiteren wurden alle Proben mittels SDS-PAGE auf lösliche und unlösliche Aggregate untersucht. Dabei wurden keine Veränderungen auf Gelen von Produkten direkt nach der Herstellung im Vergleich zu Produkten, welche bei bis zu 30 °C eingelagert wurden, festgestellt (Anfang: Abb. 110, Epo: Abb. 115 links, G-CSF: nicht dargestellt). Wohingegen es bei Einlagerung bei 40 °C und 50 °C – in Übereinstimmung mit den SE-HPLC-Daten – zur Aggregation der Proteine und damit zur Anfärbung von Nebenbanden (Abb. 115) kam. Durch Vergleich der Banden der zwei mittleren Gele in Abb. 115 wird deutlich, dass aus Epo entstandene Aggregate nicht über Disulfidbrücken verbunden waren. Unter Zugabe von DTT (reduzierende Bedingungen, drittes Gel von links) wurden dieselben Banden wie unter nicht reduzierenden Bedingungen (zweites Gel) detektiert. Das Gel in Abb. 115 rechts veranschaulicht die zunehmende Aggregation von G-CSF mit steigender Temperatur und Dauer der Einlagerung.

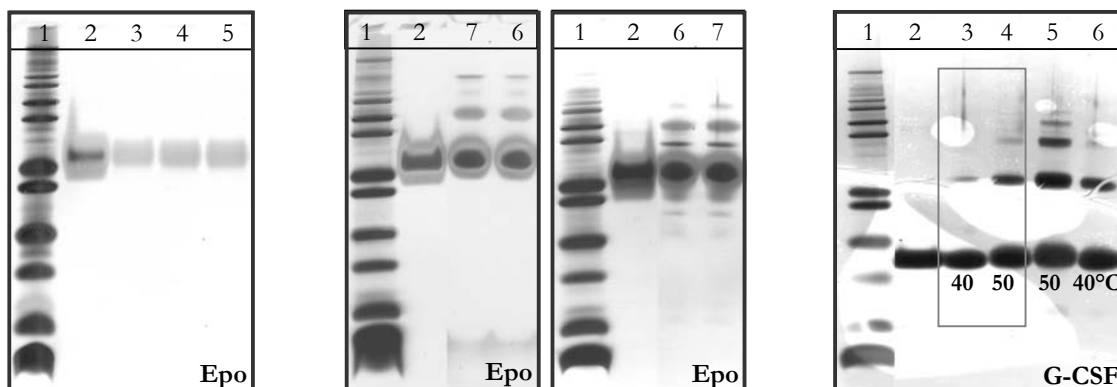


Abb. 115: SDS-PAGE von Epo (links) und G-CSF (rechts) Proben nach Einlagerung.

Ersten drei Gele: Epo Proben bei 30 °C (1. Gel) und bei 40 °C bzw. 50 °C unter nicht reduzierenden Bedingungen (2. Gel) bzw. unter reduzierenden Bedingungen (3. Gel).

Letztes Gel: G-CSF Proben nach Einlagerung für 3 (graue Umrandung) bzw. 6 Monate bei 40 oder 50 °C.

<b>Epo:</b>	4: 2 Monate 30 °C	<b>G-CSF:</b>	3: 3 Monate 40 °C
1: Marker	5: 4 Monate 30 °C	1: Marker	4: 3 Monate 50 °C
2: Epo Referenz	6: 3 Monate 40 °C	2: G-CSF Referenz	5: 6 Monate 50 °C
3: Anfang	7: 6 Monate 40 °C		6: 6 Monate 40 °C

Mit Hilfe der Biodotmethode war es demnach möglich, sowohl für rh G-CSF, als auch für rh Erythropoietin Produkte herzustellen, deren Anfangsqualität bei Einlagerung bei 25 °C erhalten wurde. Während der gesamten Einlagerung lag der Proteinmonomergehalt aller Proben über 98 % und die Restfeuchte stieg nicht über 2 %. Auf PE-Folie applizierte Protein-Zucker-Muster können demnach problemlos bei Raumtemperatur gelagert werden. Zur Verdeutlichung dieser vielversprechenden Daten, wird in Tab. 26 noch einmal der Proteinmonomergehalt von im Kühlschrank und bei Raumtemperatur eingelagerten Epo und G-CSF Proben wiedergegeben.

Lagerzeit (Monate)		Proteinmonomer (%)						
		Anfang	1	2	3	4	6	9
Epo + SPT	4 – 8 °C	100	99,9	99,5	99,1		99,3	99,4
	25 °C	100,0	99,9	99,7	99,1	98,1		98,2
G-CSF +ST	4 – 8 °C	99,8		99,4	98,9	99,4	98,9	
	25 °C	99,8			98,4			99,2

Tab. 26: Proteinstabilität von Epo und G-CSF während der Einlagerung im Kühlschrank und bei Raumtemperatur.

## 5. Einfluss verschiedener Oberflächen

Nachdem alle bisherigen Untersuchungen auf Polyethylenfolien als Trägermaterial beruhten, soll nun der Einfluss verschiedener Träger untersucht werden. Zur Herstellung der Proben wurde auch hierfür die Biodotmethode (siehe Seite C-133) verwendet. Da mit dieser Arbeit eine grundsätzliche Methode zur Applikation und Trocknung von Mikrotropfen entwickelt wurde, kann nicht vorhergesehen werden, auf welcher Art von Oberflächen diese Technik später einmal Verwendung findet. Deshalb wird hier ein Überblick über verschiedene hydrophile und hydrophobe Träger und deren Einfluss auf Restfeuchte, Proteinstabilität, Adsorption und Aussehen der Produkte gegeben.

### 5.1. Aussehen, Tropfengröße

Grundsätzlich können Tropfen auf jede Art von Trägermaterial aufgebracht werden, seien es glatte Flächen oder poröse Materialien. Selbst unebene Oberflächen lassen sich betropfen. Die geringe Größe der Tropfen und deren schnelle Antrocknung gewährleisten eine gute Haftung, ohne Verlaufen auf den meisten Oberflächen. Dennoch sollten diese optimalerweise möglichst plan sein, um eine gute Wärmeübertragung durch die beheizbare Bodenplatte sicherzustellen. Solange sehr unebene Materialien relativ porös sind und die dispensierten Tropfen sofort aufgesaugt werden, können auch diese betropft werden. Alternativ lässt sich eine kontrollierte Platzierung auf nicht ebenen Flächen auch

durch Wahl sehr kleiner Tropfengrößen und durch Erhöhung des Tropfenabstandes im gebildeten Muster erreichen.

Auf das Aussehen der getrockneten Muster haben die Eigenschaften der Oberfläche einen entscheidenden Einfluss. Besonders wichtig sind hierbei die Oberflächenspannung und Polarität des Materials sowie die Struktur der Oberfläche. Die Kenngrößen einiger Materialien sind in Tab. 27 wiedergegeben.

	<b>Oberflächenspannung mN/m</b>	<b>Dielektrizitäts- konstante</b>
Teflon PTFE	18 / 22,5	2,1
Stahl	29	
Aluminium	33	9,1 <sup>x</sup>
Polyethylen PE	33	2,4
Glas	37	
PVDF	33,7 °	8,5
Nylon PA 66	42,5	4 - 8

Tab. 27: Dielektrizitätskonstante (Herstellerangaben Kern GmbH) und Oberflächenspannung (Homepage der Münzing Chemie GmbH und 258) von einigen der verwendeten Trägern. Je nach Datenquelle und Bestimmungsmethode werden etwas unterschiedliche Werte angegeben. <sup>x</sup> Dielektrizitätskonstante für Aluminiumoxid, ° der verwendete PVDF-Filter wurde von Pall hydrophilisiert, so dass eine im Vergleich zu Literaturwerten höhere Oberflächenspannung zu erwarten ist.

Während hydrophile Oberflächen mit großer Oberflächenspannung eine gute Benetzung durch wässrige Tropfen ermöglichen und somit große, flache Tropfen entstehen, werden beim Auftreffen der Lösung auf hydrophobe Oberflächen kleine Tropfen mit geringem Kontakt zum Träger gebildet. Verdeutlicht wird dies anhand der entstandenen Partikel auf hydrophilem Nylonfilter im Vergleich zu hydrophobem Teflonfilter (Abb. 116 links) sowie durch den Vergleich von normalem zu silikonisiertem Stahl (Abb. 116 rechts).

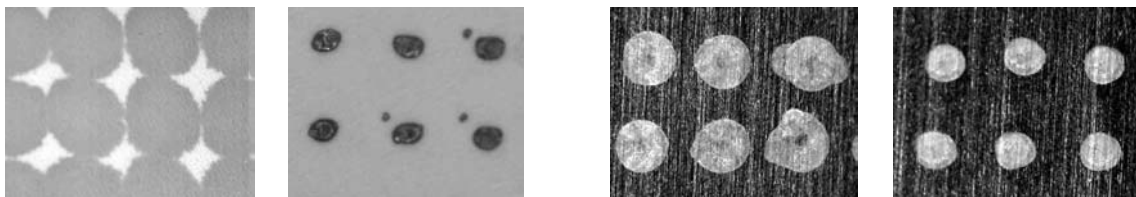


Abb. 116: Mikroskopaufnahmen von Mikrotropfen aus SPT + Carboxyfluorescein auf verschiedenen Oberflächen. Von links nach rechts: Nylonfilter, Teflonfilter, normaler Stahl, silikonisierter Stahl.

Aufgrund der schlechten Benetzung hydrophober Oberflächen ändert sich in Abhängigkeit von der Struktur der Träger am Erscheinungsbild dieser Produkte wenig (Abb. 117 links). Dagegen saugen hydrophile, poröse Oberflächen auftreffende Tropfen sofort auf, wodurch im Vergleich zu hydrophilen, glatten Oberflächen eine größere benetzte Fläche entstehen kann. Dieser Effekt ist aus den auf Teflungewebe und Teflonfolie bzw. Nylonfilter und Nylonfolie getrockneten Proben ersichtlich (Abb. 117).

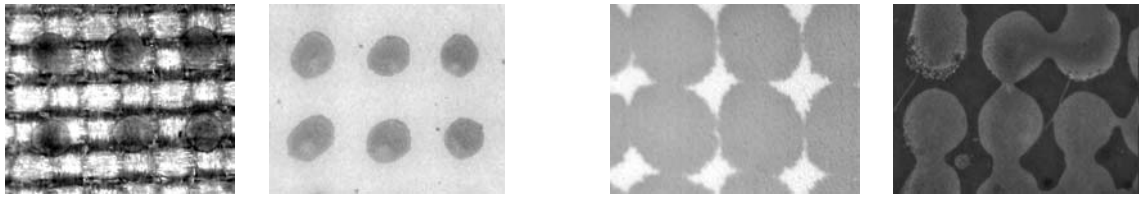


Abb. 117: Mikroskopaufnahmen von Mikrotropfen aus SPT + Carboxyfluorescein auf verschiedenen Oberflächen. Von links nach rechts: Teflongewebe, -filter, Nylonfilter, -folie.

Aus dem Vergleich von Glasplatte und Glasfaserfilter geht ein weiterer Einflussfaktor hervor. Durch die schnelle Antrocknung der Lösung und die sich damit erhöhende Viskosität, kommt es nur innerhalb einer sehr geringen Zeitspanne zum Auseinanderlaufen der Tropfen. Dadurch kann die Größe von auf sehr glatten Oberflächen gebildeten Tropfen, der Größe von Tropfen auf porösen Unterlagen entsprechen (Abb. 118 links), oder diese sogar übertreffen (Abb. 118 rechts). Des weiteren ist es möglich, dass die Proteinlösung eher in tiefere Schichten der porösen Materialien eindringt, als sich zur Seite auszubreiten. Bei wasserlöslichen Trägermaterialien kann es außerdem zur Auflösung des Trägers und damit zur Entstehung kleiner Vertiefungen kommen (Abb. 119).

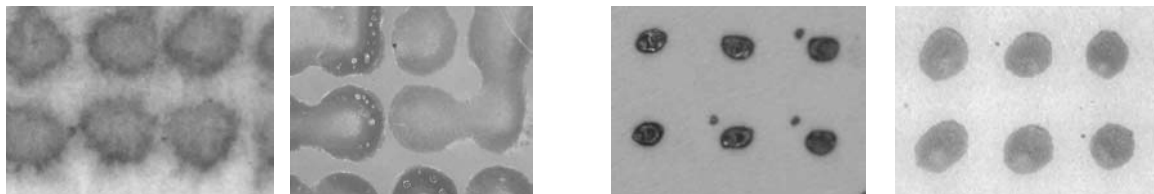


Abb. 118: Mikroskopaufnahmen von Mikrotropfen aus SPT + Carboxyfluorescein auf verschiedenen Oberflächen. Von links nach rechts: Glasfaserfilter, Glasplatte, Teflonfilter, -folie.



Abb. 119: Mikroskopaufnahmen von Mikrotropfen aus SPT + Carboxyfluorescein auf verschiedenen Oberflächen. Von links nach rechts: Kollagenschwamm, Kollagen ohne Vergrößerung.

Einen Überblick über die entstandenen Tropfen und die daraus getrockneten Partikel gibt Tab. 28. In Übereinstimmung mit der Hydrophilie/Hydrophobie der Materialien wurden aus zwei übereinander getropften 20 nl großen Tropfen Partikel mit einem Durchmesser zwischen 0,3 und 1 mm gebildet. Da für eine intradermale Applikation mittels ballistischer Injektion Partikel von 20  $\mu\text{m}$  bis 100  $\mu\text{m}$  benötigt werden (siehe A.5), wurden in weiteren Versuchen geringere Volumina dispensiert. Mit Hilfe von Inkjetsystemen können üblicherweise minimale Volumina von 1 nl abgegeben werden, mit dem von uns verwendete Gerät war es jedoch nur möglich minimal 10 nl zu dispensieren. Bereits mit diesem Tropfenvolumen konnten, bei Applikation auf Teflonfilter, Partikel von 80  $\mu\text{m}$  Durchmesser gebildet werden. Grundsätzlich ist es also möglich, mit Hilfe der

Biodotmethode Partikel herzustellen, welche aufgrund ihrer Größe für eine intradermalen Applikation geeignet sind. Die hohe Dichte dieser Zuckerpartikel dürfte sich außerdem positiv auf deren Eindringtiefe und damit auf deren Bioverfügbarkeit auswirken.

<b>hydrophobe Materialien</b>					
<b>PE-Folie</b>	<b>Aluminium Platte</b>	<b>Stahl Platte</b>	<b>Stahl silikonisiert</b>	<b>PTFE Folie</b>	<b>PTFE Filter</b>
0,65	0,5	0,65	0,5	0,5	0,3
<b>hydrophile Materialien</b>					
<b>Nylonfolie</b>	<b>Nylonfilter</b>	<b>PVDF Filter</b>	<b>Glas Filter/Platte</b>	<b>Kollagen Schwamm</b>	<b>Gelatine Platte</b>
0,8	1	1,0	0,9	0,7	0,7

Tab. 28: Durchmesser der entstandenen Partikel bzw. benetzten Flächen (in mm) in Abhängigkeit vom Trägermaterial, nach Dispensierung auf 30 °C warme Träger und Trocknung im Vakuum. Zur besseren Identifizierung wurde der SPT-Rezeptur Carboxyfluorescein zugesetzt.

## 5.2. Restfeuchte

Auch auf die Verdunstungsgeschwindigkeit und damit auf die erzielte Restfeuchte hatte die, je nach Oberfläche, unterschiedliche Tropfengröße einen Einfluss. Des weiteren wurde die Restfeuchte der Produkte auch durch das unterschiedliche Wasseraufnahmevermögen der Materialien beeinflusst. Um eine Rückbefeuchtung des Produktes durch die Träger zu unterbinden, sollten diese selber keine Feuchte enthalten. Das war jedoch nicht immer gegeben. Wie aus Tab. 29 hervorgeht, wiesen vor allem hydrophile Materialien eine nicht unerhebliche Restfeuchte auf. In Korrelation mit dem hohen Wasserbindevermögen von Nylonmaterialien, wurde für diese Träger – ohne Produkt - eine Restfeuchte von 3 % festgestellt. Wichtiger noch sind die Restfeuchten der Träger nach Vakuumtrocknung. Während bei Glasfaserfilter nach Trocknung keine Feuchte mehr detektiert wurde, wiesen Nylon-, Kollagen- und Gelatineträger noch immer eine nennenswerte Feuchte auf. Aufgrund des Massenunterschiedes zwischen Träger und aufgetropfter Probe von bis zu 1/150 können selbst geringe prozentuale Restfeuchten der Träger zur überproportionalen Wasseraufnahme durch die Proben führen. Des weiteren kam es durch die gleichzeitige Bestimmung von Träger und Probe bei der Karl-Fischer-Titration, trotz Einberechnung der Trägerfeuchte, zu großen Schwankungen in den Ergebnissen.



	Restfeuchte (%) der Träger	Wasseraufnahmevermögen DIN 53495 / ISO 62 (%)	
		Normklima	Wasserlagerung
<b>Träger ohne Vorbehandlung</b>			
PE-Folie	0	< 0,01	0,1
PTFE- Filter/Folie	0,1	---	< 0,1
PVDF-Filter	0	0,01	0,04
Glasfilter	<b>0,3</b>		
Nylonfilter	<b>3,0</b>	3,5	9,5
Kollagenschwamm	<b>13,8</b>		<b>+++</b>
<b>Nach 14 h Vakuumtrocknung</b>			
Glasfilter	0		
Nylon-Filter	0,05		
Nylon-Folie	<b>0,2</b>		
Kollagenschwamm	<b>0,5</b>		
Gelatineplatte	<b>1,6</b>		

Tab. 29: Restfeuchte und Wasseraufnahmevermögen (entnommen aus den Herstellerangaben Kern GmbH und von [www.fbv.fh-frankfurt.de/mhwww/KUT/Eigenschaften/KU-Eigenschaften.html](http://www.fbv.fh-frankfurt.de/mhwww/KUT/Eigenschaften/KU-Eigenschaften.html)) der Träger.

### 5.2.1. *Abhängigkeit der Restfeuchte von Hydrophilie/Hydrophobie der Träger*

Zur Bestimmung des Einflusses der Hydrophilie/Hydrophobie der Träger auf die Restfeuchte der Produkte wurde eine G-CSF Rezeptur (G-CSF + SPT) auf verschiedene Oberflächen dispensiert und im Vakuum nachgetrocknet. Die linke Spalte von Tab. 30 gibt die Restfeuchte der gebildeten Produkte wieder. Alle Proben auf hydrophoben Oberflächen wiesen ähnlich niedrige Restfeuchten um 1 % auf. Auffällig war der extrem niedrige Wert von auf Aluminiumfolie aufgebrachtener Probe. Aufgrund der im Vergleich zu Kunststoffen besseren Wärmeleitfähigkeit des Metalls und der damit verbesserten Energiezufuhr kam es vermutlich zu einer beschleunigten Verdunstung der Proben. Eine Erklärung dafür, dass auf Stahloberflächen kein ähnlich niedriger Wert erzielt wurde, bietet die Analysetechnik. Auf Stahl aufgebraute Proben konnten nicht nach der übliche Wasserbestimmungsmethode (in Vials) vermessen werden, sondern wurden stattdessen in einer Freisetzungszelle (siehe Methoden, B.2.1.11) untersucht. Diese Zelle wies für Methanollösung keine optimale Dichtigkeit auf, so dass es zu erhöhten Werten kam.

Die Restfeuchte von Proben auf hydrophilen Oberflächen unterschied sich stark, je nach Wasserbindevermögen der Träger. Während PVDF- und Glasfaserfilter nach Vakuumtrocknung selbst keine Restfeuchte mehr aufwiesen und deshalb auch die aufgebrauchten Proben getrocknet werden konnten, enthielten andere Träger auch nach Trocknung noch Wasser. Dieses Wasser wurde bei der Karl-Fischer-Titration mitbestimmt und verfälschte

die Messwerte der Produkte. In Spalte zwei sind deshalb die errechneten theoretischen Restfeuchten, nach Abzug der Feuchte der Träger, angegeben. Durch die Umrechnung zeigte sich, dass auch diese Produkte auf theoretische Restfeuchten von unter 2 % getrocknet werden konnten. Allerdings sollte beachtet werden, dass diese Werte nur unter der Annahme Gültigkeit haben, dass die Feuchte gleichmäßig in Probe und Träger verteilt ist und dass die Trocknung von Trägern ohne aufgetropfte Probe der Trocknung von betropften Trägermaterialien entspricht. Wenn dies gegeben ist, kann die Restfeuchte von alleine getrockneten Trägern von der Restfeuchte, welche für Träger und Probe zusammen bestimmt wurde, abgezogen werden. Hierdurch erhält man die theoretische Restfeuchte der Probe. Für genau Aussagen waren diese Werte nicht geeignet, lediglich grundsätzliche Trendanalysen konnten damit durchgeführt werden (umgerechnete Werte werden in der folgenden Arbeit in Klammern angegeben). Wegen der Neigung der Träger Wasser zu binden, weisen diese Proben vermutlich eine geringere Lagerstabilität aufweisen. Über die Rückbefeuchtung der Träger könnte es auch zur Rückbefeuchtung der aufgetropften Proben kommen.

		Restfeuchte (%)	
		Messwert	umgerechneter Wert
<b>hydrophob</b>	PE	1	identisch
	PTFE	0,9	identisch
	Stahl	1,3	identisch
	Aluminium	<b>0,3</b>	identisch
<b>hydrophil</b>	PVDF	1,3	identisch
	Glas	1,6	identisch
	Nylon	<b>6,0</b>	[ 1,0 ]
	Kollagen	<b>3,7</b>	[ 1,4 ]
	Blattgelatine	<b>&gt; 100</b>	[ 0 ]

Tab. 30: Vergleich der Restfeuchte von G-CSF + SPT Proben abhängig von der Hydrophilie/Hydrophobie der Träger (alles Folien oder Platten, außer PVDF-Filter und Glasfaserfilter). Die Trocknung erfolgte nach der Biodotmethode (Dispensierung auf 30 ° warme Träger und Vakuumtrocknung für 24 h). Die zweite Spalte gibt die Restfeuchte abzüglich der Feuchte der Träger wieder (umgerechneter Wert).

Bei Kollagenträgern lag außerdem der Gedanke nahe, dass die hohe Restfeuchte durch den sauren pH-Wert der Rezeptur verursacht worden sein könnte, da sich Kollagenfasern im Säuren auflösen. Wie jedoch der Vergleich von Proben mit unterschiedlichen pH-Werten (Tab. 20) verdeutlichte, konnte durch Rezepturen mit neutralem pH-Wert nur eine minimale Erniedrigung der Restfeuchte erzielt werden. Auch hier wurden die hohen Restfeuchten der Proben durch die Restfeuchte des Trägers hervorgerufen. Zieht man diesen von den direkt bestimmten Werten ab, erhält man wiederum Restfeuchten von ca. 1 % (Zahlen in den Balken).

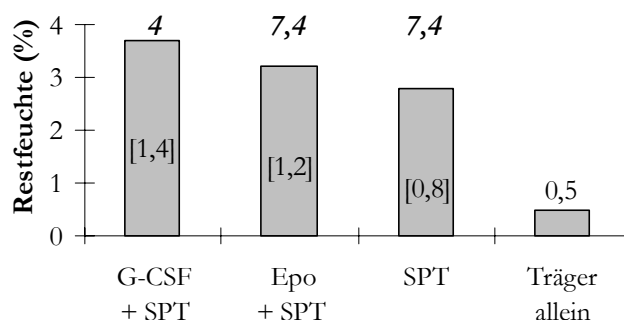


Abb. 120: Restfeuchte von Proben auf Kollagenschwämmen bei verschiedenen pH-Werten. Die Zahlen über den Balken geben den pH-Wert an; die Zahlen in den Balken die theoretische Restfeuchte nach Abzug der Restfeuchte des Trägers (nur Näherungswerte, siehe Kommentar oben).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass unabhängig von der Hydrophilie/Hydrophobie und der gebildeten Tropfengröße alle Produkte in etwa die gleiche Restfeuchte aufwiesen. Scheinbar war die Kombination aus Dispensierung und Vakuumtrocknung so effektiv, dass aus allen untersuchten Tropfengrößen das Wasser vollständig entfernt werden konnte. Ein Unterschied wäre eventuell nach der Dispensierung zu erkennen gewesen, die fertigen Produkte waren jedoch alle gleichwertig. Im Gegensatz dazu konnte durch Vakuumtrocknung ohne vorheriges Dispensieren nur leicht gebundenes Wasser entfernt werden. Produkte auf stark wasserbindenden Oberflächen – wie Kollagen – konnten auf diese Weise nicht getrocknet werden (Tab. 31, in Klammern sind die errechneten theoretischen Restfeuchten angegeben). Besonders deutlich wird dieser Unterschied bei Rezepturen, welche grundsätzlich nicht gut im Vakuum getrocknet werden können, wie z.B. Saccharose-Polysorbat-Mischungen (unterer Teil der Tabelle).

Rezeptur	Oberfläche	Restfeuchte (%)	
		Biodotmethode	nur Vakuumtrocknung
G-CSF + SPT	kein Träger	---	1,9
	PVDF-Filter	1,3	0,3
	Glasfaserfilter	1,6	1,3
	Kollagen	3,7 [1,4] <sup>x</sup>	14,7 [9,0] <sup>x</sup>
G-CSF + ST	kein Träger	---	6,3
	Glasfaserfilter	0,4	2,7
	Kollagen	3,7 [1,3] <sup>x</sup>	28,2 [20,2] <sup>x</sup>

Tab. 31: Vergleich der Restfeuchten von Proben auf verschiedenen Trägern nach Trocknung mittels Biodotmethode und nach 24 h Vakuumtrocknung ohne vorherige Dispensierung in Mikrotropfen. Zum Vergleich wurden die Rezepturen zusätzlich in Vials pipettiert (ohne Träger). <sup>x</sup>In Klammer sind die theoretischen Restfeuchten der Proben nach Abzug der Restfeuchte der Träger angegeben (nur Näherungswerte, siehe Kommentar vorherige Seite)

### 5.2.2. *Abhängigkeit der Restfeuchte von der Struktur der Träger*

Nachdem gezeigt wurde, dass die Hydrophilie/Hydrophobie der Träger keinen Einfluss auf die Restfeuchte der mittels Biodotmethode hergestellten Produkte hatte, stellte sich die Frage, ob Unterschiede zwischen verschiedenen Oberflächenstrukturen zu erkennen waren. Obwohl die nach außen feststellbaren Tropfendurchmesser auf allen Trägern fast identisch waren, lag die Vermutung nahe, dass es bei auf Filtern aufgebracht Lösung - aufgrund der nach innen aufgenommenen Lösung - dennoch zur Oberflächenvergrößerung kam. Gleichwohl war weder bei hydrophoben, noch bei hydrophilen Oberflächen ein großer Unterschied in der Restfeuchte zwischen Proben zu belegen, welche auf glatte (Folie) oder auf porenhaltige (Filter) Oberflächen aufgebracht wurden (Tab. 32).

		Restfeuchte (%)	
		Filter	Folie
<b>hydrophob</b>	PTFE	0,7 ± 0,5	0,9 ± 0,5
<b>hydrophil</b>	Nylon	1,25	6
		[ 0,5 ] <sup>x</sup>	[ 1,0 ] <sup>x</sup>

**Tab. 32: Vergleich der Restfeuchte von G-CSF +SPT Proben abhängig von der Struktur der Träger. Filter weisen eine poröse, Folien eine glatte Oberfläche auf. <sup>x</sup> Restfeuchte abzüglich der Feuchte des Trägers**

Die scheinbare Differenz bei den auf Nylon aufgetragenen Proben (2. Zeile von unten), erklärt sich mit der höheren Restfeuchte der Träger aus Nylonfolie im Vergleich zu Trägern aus Nylonfilter. Verrechnet man die Restfeuchte der Träger mit der Restfeuchte der Produkte, ergeben sich ähnliche Werte (unterste Zeile), wobei zu beachten ist, dass es sich hierbei nur um Näherungswerte handelt. Bei Einberechnung einer Restfeuchte der Nylonfolie von 0,05 % ergibt sich der dargestellte Wert von 1,0 % für die Proteinprobe, rechnet man jedoch nur mit einer Restfeuchte des Trägers von 0,03 %, erhält man bereits eine Restfeuchte von 4,2 % für das Produkt! Selbst bei sorgfältigstem Arbeiten und bei Untersuchung mehrerer Träger konnte eine auf die zweite Nachkommastelle exakte Bestimmung der Feuchte der Träger nicht gewährleistet werden, so dass es nicht möglich war, in Bezug auf Nylonträger signifikante Aussagen zu machen.

Hinsichtlich des Einflusses der Oberflächenstruktur von Teflonmaterialien auf die Restfeuchte der Produkte ließ sich folgendes beobachten. Während Produkte auf Folien und Filtern direkt nach der Herstellung keine signifikanten Unterschiede in der Restfeuchte aufwiesen (Tab. 32), kam es bei Lagerung der Produkte an Raumluft zu Differenzen. Proben auf porenhaltigen Materialien adsorbierten deutlich stärker Wasser und wiesen einen schnelleren Anstieg der Restfeuchte auf, als Proben auf glatten Oberflächen (Abb. 121).

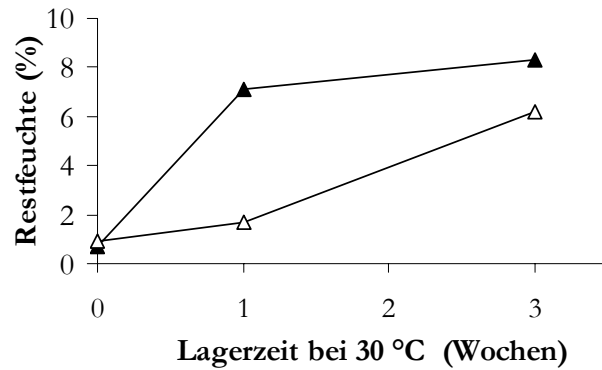


Abb. 121: Anstieg der Restfeuchte von G-CSF + SPT Proben auf Teflonträgern während der Lagerung bei 30 °C an Raumluft. ▲ Filter, △ Folie.

Derselbe Effekt wurde auch für hydrophile Oberflächen beobachtet. Tab. 33 gibt die erhaltenen Daten wieder. Da bei Nylon die Wasseraufnahme der Träger mitberücksichtigt wurde und hydrophobe Träger keine Veränderung der Restfeuchte bei Lagerung an Raumluft aufwiesen, musste es sich bei dem beobachteten Anstieg der Restfeuchte um eine Wasseraufnahme der Proben selbst handeln.

Material	Restfeuchte (%)			
	Filter		Folie/Platte	
	Start	3 Wochen	Start	3 Wochen
PTFE	0,7	8,3	0,9	6,2
Nylon	[ 0,5 ] <sup>x</sup>	[ 11,4 ] <sup>x</sup>	[ 1 ] <sup>x</sup>	[ 5,4 ] <sup>x</sup>
Glas	1,6	6,1 <sup>o</sup>	1	4,4 <sup>o</sup>

Tab. 33: Vergleich der Restfeuchte von G-CSF +SPT Proben abhängig von der Struktur der Träger nach drei Wochen Lagerung an Raumluft. <sup>x</sup> Bei Nylonträgern wurde die Restfeuchte der Träger eingerechnet (siehe auch Text unten). <sup>o</sup> kürzer eingelagerte Probe (1,5 Wochen).

Eine Erklärung für den unterschiedlich starken Anstieg je nach Oberflächenstruktur kann nicht über die Tropfengröße erfolgen, da die Tropfen auf PTFE-Filtern kleiner waren als auf Folie, während es auf Nylonträgern genau umgekehrt war. In beiden Fällen wiesen jedoch die auf Filter aufgebrachten Proben den stärkeren Restfeuchteanstieg auf ( $\Delta$ -Filter: 7,6 % bzw. 10,9 % zu  $\Delta$ -Folie: 5,3 % bzw. 4,4 %). Eventuell förderten die großen Oberflächen der porenhaltigen Träger die Adsorption von Wasserdampf, auch wenn dieser nicht von den Trägern selbst aufgenommen wurde.

In Bezug auf den relativ großen Anstieg der Restfeuchte innerhalb einer kurzen Zeitspanne und die daraus zu schließende schlechte Lagerstabilität, gilt zu beachten, dass es sich bei diesen Versuchen um bewusst mit Raumluft befüllte Probengefäße handelte. Bei Füllung der Vials mit trockenem Inertgas sollte die Aufnahme von Luftfeuchte deutlich reduziert sein und die Restfeuchten weniger stark ansteigen.

### 5.3. Haftung

Um die vorgegebenen Muster beizubehalten, sollten die applizierten Partikel nicht von den Trägern abfallen, sondern eine gute Oberflächenhaftung aufweisen. Des weiteren darf sich die Haftung während der Lagerung nicht verändern, um eine gleichbleibende Qualität der Produkte zu gewährleisten. Für die Verwendung der aufgetropften Partikel bei der ballistischen Injektion z.B. mit Hilfe eines Slingshot Devices (siehe **A.5**) wird neben einer guten Haftung während der Lagerung, eine schnelle Ablösung von den Membranen unter Einfluss des Heliumdruckimpulses benötigt.

Grundvoraussetzung für eine gute Haftung der Tropfen ist eine gute Benetzung der Oberfläche. Diese wird durch die Oberflächenspannung des Untergrundes und der Rezeptur bedingt. Je höher die Oberflächenspannung des Untergrundes und je niedriger die Oberflächenspannung der Rezeptur ist, desto besser ist die Benetzung und desto größer die Kontaktfläche zwischen Rezeptur und Träger. Rezepturpartikel haften aufgrund unterschiedlicher Phänomene auf einer Oberfläche. Zu nennen seien hier mechanische Verankerung der Moleküle in den Strukturen der Oberfläche, Diffusion in den Untergrund und Grenzflächenadhäsion aufgrund chemisch-physikalischer Bindungen zwischen Molekül und Untergrund. Die Haftung wird überwiegend durch Adhäsion hervorgerufen, auf porenhaltigen Filtermaterialien hat jedoch auch die Diffusion in die Träger einen Einfluss. Einige ausgewählte Werte für die Oberflächenspannung und Dielektrizitätskonstante, welche ein Maß für den Dipolcharakter der Oberfläche darstellt, sind in Tab. 27 wiedergegeben.

Zur Untersuchung der Haftung wurden verschiedene Materialien mit Placebolösung (SPT) betropft, im Vakuum getrocknet und anschließend in einer Fallapparatur untersucht. Dazu wurde ein 2 x 1 cm großes Stück der Proben in eine Metallhalterung eingespannt und aus einem Meter Höhe fallen gelassen. Beim Aufschlag auf zwei Blöcke am Boden kam es zur abrupten Abbremsung der Träger, wodurch leicht anhaftende Partikel abgelöst wurden und herunterfielen. Die Anzahl der abgefallenen Partikel wurde nach mehrmaliger Wiederholung der Fallversuche bestimmt. Beim Aufschlag am Boden erreichten die Träger eine Geschwindigkeit von 4,4 m/s, bzw. 16 km/h und waren einer Kraft von 37 kN (bei einem theoretische Bremsweg von 0,1 mm) ausgesetzt. Diese Geschwindigkeit entspricht zwar nur einem Bruchteil der bei der ballistischen Injektion erreichten Geschwindigkeit, dennoch konnte auf diese Weise zumindest ein Anhaltswert für die Haftung der Partikel bestimmt werden. Zur Veranschaulichung der Beobachtungen sind in Abb. 122 Teflonfilter nach steigender Anzahl von Fallversuchen dargestellt.

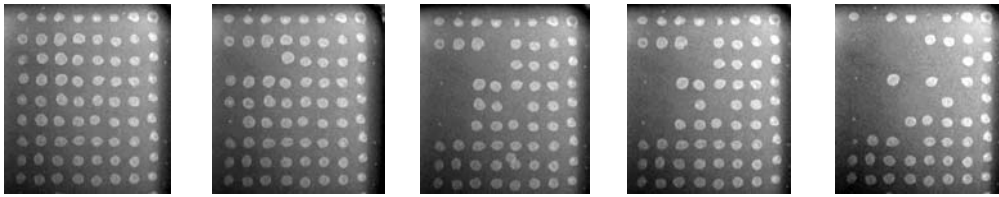


Abb. 122: Aufnahmen von SPT-Partikeln auf Teflonfilter vor (links) und nach mehreren Fallversuchen (1x, 3x, 5x und 10x).

Die Ergebnisse der Untersuchungen gibt Abb. 123 wieder. Direkt nach der Herstellung wiesen die Proben auf allen Trägern eine gute Haftung auf, wobei auf Teflonfilter - aufgrund der geringen Oberflächenspannung und großen Hydrophobie der Träger, sowie der resultierenden kleinen Berührungsfläche der Partikel - insgesamt die schlechteste Haftung zu beobachten war (Abb. 123 links oben). Auch nach 1,5 Monaten Lagerung bei 30 °C änderte sich daran nichts. Nach 3 Monaten ließ die Haftung von Partikeln auf Teflonfiltern dann deutlich nach, während sie auf Polyethylen- und Alufolie weiterhin gleich blieb (Abb. 123 unten). Von bei 30 °C gelagerten Teflonfiltern fielen Partikel nun bereits beim ersten Fallversuch fast vollständig ab. Ohne Belastung hafteten die Partikel jedoch auf allen Trägern unverändert gut und auch bei der Probenvorbereitung traten keine Haftungsprobleme auf.

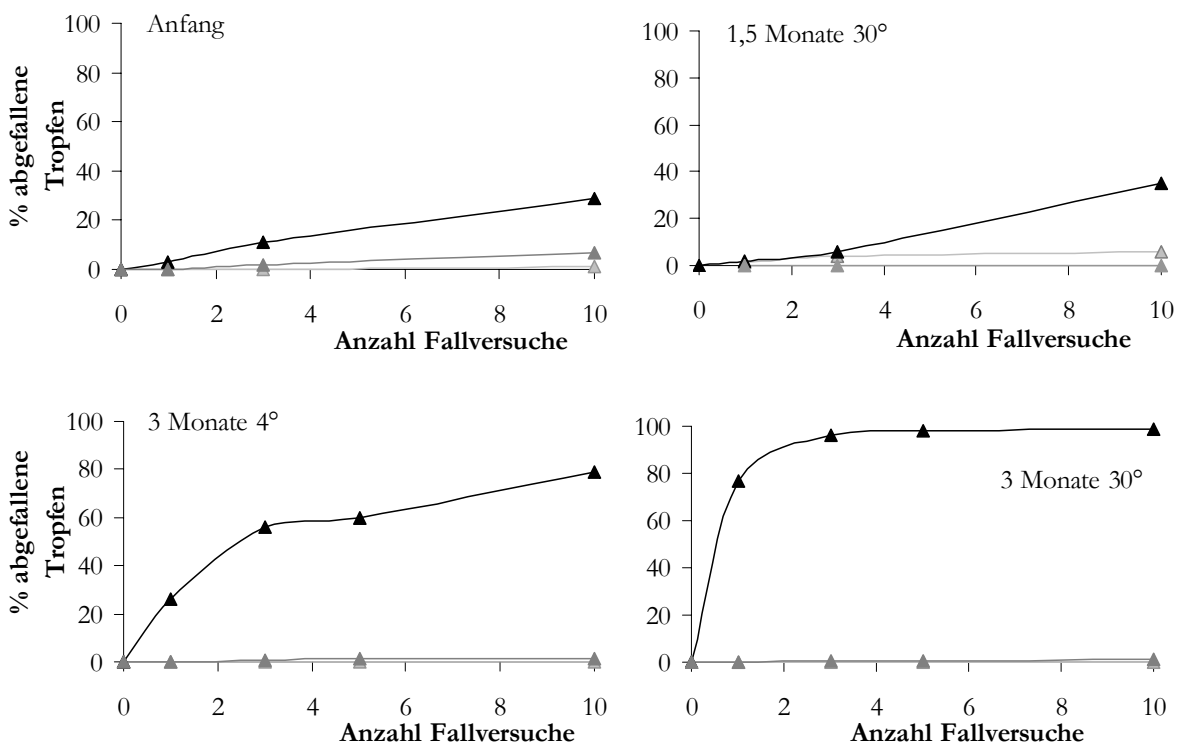


Abb. 123: Haftung von Placebopartikeln auf verschiedenen Oberflächen während Lagerung bei 4 °C und 30 °C. ▲ auf Teflonfilter, ▲ auf PE-Folie, ▲ auf Aluminiumfolie. In den unteren zwei Graphen verlaufen die Kurven von PE und Alufolie übereinander.

In Bezug auf eine Benutzung der Teflonfilter in ballistischen Devices sind dies hoffnungsvolle Ergebnisse. Es ist zu erwarten, dass auf Teflonfolie aufgebraute Partikel während der Lagerung gut haften, sich jedoch nach einer Konditionierungsphase bei der

Benutzung des Devices gut ablösen. Die durchgehend sehr gute Haftung auf PE- und Aluminiumfolie, sowie auf jedem porenhaltigen, hydrophilen Träger, bei dem die Lösung aufgesaugt wird (Daten nicht dargestellt), garantiert den universellen Einsatz dieser Träger bei hoher Lagerstabilität.

Zur leichteren Auszählung der anhaftenden Partikel wurden weitere Versuche unter Zusatz von Carboxyfluorescein zur Rezeptur durchgeführt. Bei der Untersuchung der Haftung direkt nach der Herstellung fiel auf, dass Proben ohne Carboxyfluorescein deutlich besser hafteten als mit Carboxyfluoresceinzusatz (Abb. 124). Besonders deutlich wurde dieser Unterschied bei Aluminiumfolie. Während Placebopartikel ( $\blacktriangle$ ) auf diesem Material sehr gut hafteten und überhaupt nicht abfielen, wiesen carboxyfluoresceinhaltige Partikel ( $\bullet$ ) keine Haftung auf. Ähnlich verhielten sich Partikel auf Teflonträgern (schwarze Kurven), während für PE-Folien nur ein geringer Unterschied festgestellt wurde (7 % ohne, 17 % mit Carboxy-fluorescein).

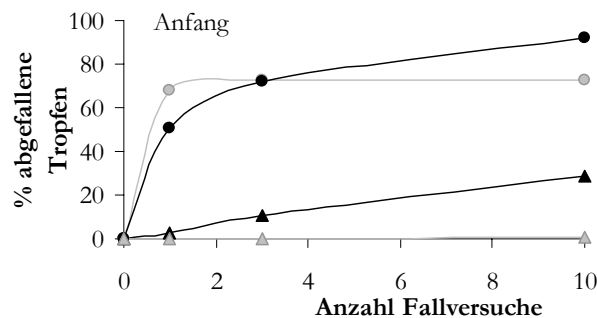


Abb. 124: Haftung von Partikeln mit ( $\bullet$ ) und ohne ( $\blacktriangle$ ) Carboxyfluorescein auf Teflonfilter (schwarz) und Aluminiumfolie (grau) direkt nach der Herstellung.

Auch bei der Untersuchung der Lagerstabilität von carboxyfluoresceinhaltigen Proben wurde ein grundlegender Unterschied deutlich. Während Partikel aus Placeborezepturen auf Teflonfolie bei Lagerung ihre Haftung verloren und verstärkt abfielen, wiesen carboxyfluoresceinhaltige Partikel eine Zunahme der Haftung auf. Abb. 125 stellt dieses Phänomen nach 3,5 Monaten Lagerung dar.

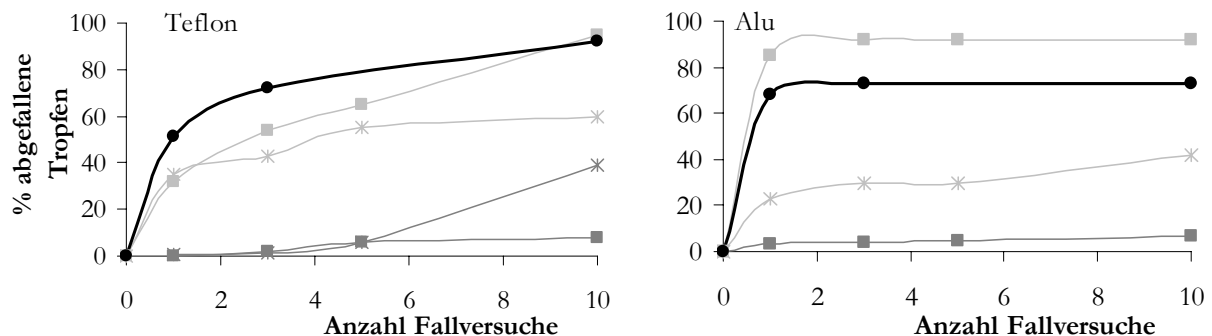


Abb. 125: Haftung von carboxyfluoresceinhaltigen Partikeln auf Teflonfilter und Aluminiumfolie während der Lagerung.  $\bullet$  Anfangsuntersuchung,  $\blacksquare$  4 °C unter Stickstoffatmosphäre gelagert,  $\times$  30 °C unter Stickstoffatmosphäre gelagert,  $\blacksquare$  4 °C bei Raumluft gelagert,  $\times$  30 °C bei Raumluft gelagert.



Unter Stickstoffatmosphäre gelagerte Proben (■ ✕, minimale Restfeuchteerhöhung) wiesen auf Teflonfilter eine geringe, unter Raumluft gelagerte Proben (■ ✕, große Restfeuchteerhöhung) dagegen eine starke Zunahme der Haftung auf. Mit steigender Restfeuchte der Proben kam es zur zunehmenden Haftung. Derselbe Effekt wurde für auf Aluminium aufgebrachte Partikel beobachtet (Abbildung rechts). Die bei höheren Temperaturen, bzw. unter Raumluft gelagerten Proben wiesen auch hier eine mit steigender Restfeuchte zunehmende Haftung auf (■ ✕). Auffällig war, dass Partikel von Aluminium entweder sofort abfielen oder gar nicht, während auf Teflon mit jedem Fallversuch mehr Haftungskräfte überwunden wurden und weitere Partikel abfielen. Die Haftung auf PE-Folie blieb innerhalb der Schwankungen der Analytik gleich (17 % zu Beginn, 21 % nach 1,5 Monaten und 10 bzw. 19 % nach 3 Monaten)

Der Unterschied in der Haftung von Proben mit und ohne Carboxyfluorescein könnte an einer veränderten Benetzung liegen. Allerdings ging aus der Untersuchung der Oberflächenspannung verschiedener Rezepturen (Tab. 34) hervor, dass der Zusatz von Carboxyfluorescein nicht zu einer Erhöhung, sondern zur Erniedrigung der Oberflächenspannung führte und damit eigentlich eine Verbesserung der Benetzung und Haftung zu erwarten wäre.

	Oberflächenspannung mN/m	
	ohne	mit Carboxyfluorescein
Wasser	76	73
SPT	54	53,2
G-CSF + SPT	51,5	50,5

**Tab. 34: Oberflächenspannung verschiedener Rezepturen mit und ohne Carboxyfluorescein. Die Bestimmung erfolgte mit einem Ringtensiometer.**

Trotz der erniedrigten Oberflächenspannung waren die aus carboxyfluoresceinhaltiger Rezeptur gebildeten Partikel geringfügig kleiner, als die der farbstofffreien Rezeptur (Abb. 126). Auffällig war des weiteren die minimal höhere Restfeuchte von carboxyfluoresceinhaltigen Proben (1,3 % im Vergleich zu 0,7 % von SPT-Proben), welche eigentlich auch eine verbesserte Haftung erwarten ließe. Wahrscheinlich kam es zu direkten Wechselwirkungen des Farbstoffes mit den anderen Bestandteilen der Formulierung, wodurch die Polarität und das Adhäsionsverhalten der Rezeptur verändert wurde. Je nach Oberfläche kam es abhängig von der Art und Anzahl der Adhäsionskräfte zu unterschiedlich stark ausgeprägte Effekten. Die Haftungsbindungen zwischen Rezeptur und Aluminium waren davon stärker betroffen, als die zwischen Rezeptur und PE-Folie.

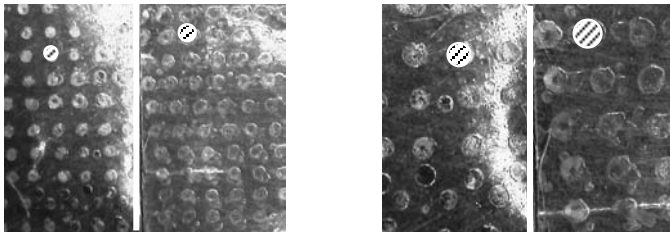


Abb. 126: Größenvergleich von Tropfen mit (linke Reihen) und ohne (rechte Reihen) Carboxyfluorescein bei Darstellung in verschieden starker Vergrößerung.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sehr viele verschiedene Größen auf die Haftung von Partikeln auf Oberflächen Einfluss nehmen, so dass allgemeine Vorhersagen zur Zeit noch nicht möglich sind. Je nach Oberfläche und Rezepturzusammensetzung ergab sich eine unterschiedlich starke Haftung, welche sich während der Lagerung verändern konnte. Durch Erhöhung der Restfeuchte der Proben entstanden aus amorphen Partikeln, rubberförmige, klebende Tropfen, oder bei Überschreiten der Glasübergangstemperatur schlecht haftende Kristalle. Die Haftung auf PE-Folie war jedoch in allen Fällen durchgehend gut.

#### 5.4. Adsorption

Neben der makroskopischen Haftung ganzer Partikel an Oberflächen ist auch das molekulare Adsorptionsverhalten der Proteine von entscheidender Bedeutung. Durch Adsorption kommt es zur Verringerung der Wiederfindung der Proteine in den rekonstituierten Lösungen und damit zur Verabreichung einer geringeren Dosis als vorgesehen. Nur wenn die Adsorption reproduzierbar erfolgt, kann diese bei der Herstellung der Darreichungsform einberechnet werden. Bei Adsorption an zu implantierende Oberflächen müssen des weiteren strukturelle Veränderungen und die Bioaktivität der adsorbierten Proteine beachtet werden. Wie ausgeprägt diese strukturelle Veränderungen sind, hängt von der Flexibilität und Hydrophobie der Proteine ab (222, 223). Besonders sogenannte „soft proteins“ neigen bei Kontakt mit Grenzflächen zur Denaturierung (224, 225, 226, 227), wodurch eine nachfolgend starke Bindung an die Oberfläche verursacht wird (228). Die durch Strukturänderung ausgelöste Bindung kann so stark sein, dass es selbst bei elektrostatischer Abstoßung zur Adsorption von „soft proteins“ kommen kann. Außerdem führt die von Denaturierung begleitete Adsorption oft zum Aktivitätsverlust der angelagerten Proteine (229, 230). Aber auch bei „rigid proteins“, welche keine Strukturveränderungen bei Adsorption aufweisen, kann es zum vollständigem Verlust der Aktivität kommen, wie die Anlagerung von Lysozym an Keramikoberflächen beweist (231). Des weiteren ist es möglich, dass an Implantate adsorbierte Proteine Immun- bzw. Koagulationskettenreaktionen im Körper des Patienten auslösen (227, 230).

Mit den folgenden Versuchen sollte geklärt werden, welchen Einfluss die bisher verwendeten Oberflächen auf die Adsorption von Proteinen haben. Hierfür wurde rh G-CSF verwendet, da es im Vergleich rh Erythropoietin eine höhere Hydrophobie aufweist. Das in *Escherichia coli* produzierte rh G-CSF ist im Gegensatz zu natürlichem G-CSF und zu rh Erythropoietin, welches in Ovarialzellen des Hamsters produziert wird, nicht glykosiliert. Moleküle ohne Zuckerketten weisen eine erhöhte Hydrophobie (232, 233) und damit eine erhöhte Neigung zur Adsorption an Oberflächen auf (234, 235, 229, 222, 223, 235). Des Weiteren handelt es sich bei rh G-CSF um ein Protein, welches zur Denaturierung neigt. Bereits geringe pH-Wert, Temperatur oder sonstige Veränderungen können zur Entfaltung des Proteins führen und dadurch die Hydrophobie weiter erhöhen. Insgesamt sollte die Tendenz zur Adsorption bei rh G-CSF im Vergleich zu rh Epo erhöht sein. Grundsätzlich ist für beide Proteine aus der Literatur eine Neigung zur Adsorption an verschiedene Oberflächen bekannt. Während der Kontakt mit Dialysemembranen nur in einigen Fällen – je nach Material – zur Adsorption führt (236, 237, 238), beobachtete Przylycien et al. 1999 an Katheter aus Silikongummi eine ausgeprägte, irreversible Adsorption (239). Auch an Dialysebeutel und Polypropylenbehältnisse adsorbieren beide Proteine (240, 201, 241).

Zur Bestimmung der Abhängigkeit der Adsorption von den Trägereigenschaften, wurden verschiedene Träger für 15 Minuten in verdünnter rh G-CSF Lösung (+ SPT, pH 5) bei Raumtemperatur eingelegt, der Proteingehalt vor und nach Kontakt mit den Trägern mittels SE-HPLC ermittelt und als prozentuale Wiederfindung berechnet. Da die Adsorption üblicherweise sehr schnell erfolgt (242, 226), reichte diese Kontaktzeit für reproduzierbare Aussagen aus. Johnston et al. stellten für G-CSF bereits nach 10 Minuten eine Adsorption von 97 % der in Lösung enthaltenen Proteine fest (241, 243). Die Einhaltung konstanter Temperaturen während der Versuche war entscheidend, da in mehreren Veröffentlichungen auf eine verstärkte Adsorption von G-CSF bei höheren Temperaturen hingewiesen wird (241, 243). P.L. Wang beobachtete eine um das fünffache verstärkte Adsorption bei 45 °C, im Vergleich zu 22 °C (243), vermutlich aufgrund der bei höheren Temperaturen forcierten Denaturierung und damit Hydrophobisierung des Proteins.

Die mit diesen Versuchen erhaltenen Ergebnisse lassen sich nicht verallgemeinern, da verschiedene Proteine – abhängig von Hydrophobie, Ladung, Größe und thermodynamischer Stabilität (226) – sehr unterschiedlich starke Adsorptionen aufweisen (224).

#### 5.4.1. Abhängigkeit der Adsorption von Hydrophilie/Hydrophobie

Aus zahlreichen Veröffentlichungen geht hervor, dass Proteine bevorzugt an hydrophobe Oberflächen binden (223, 225, 227, 229), weshalb von Herstellern für Filtermaterialien hydrophobe PVDF-Membranen aufgrund ihrer hohen Proteinbindekapazität zum Blotting (Immobilan-P von Millipore) und hydrophile PVDF-Membranen zur Filtration von Proteinlösungen angeboten werden. Bei unseren Versuchen fiel jedoch beim Vergleich der Wiederfindung auf Trägern mit unterschiedlicher Hydrophilie (Oberflächenspannung siehe Tab. 27, Seite C-146) auf, dass rh G-CSF verstärkt an hydrophile Oberflächen bindet (Abb. 127 dunkelgrau).

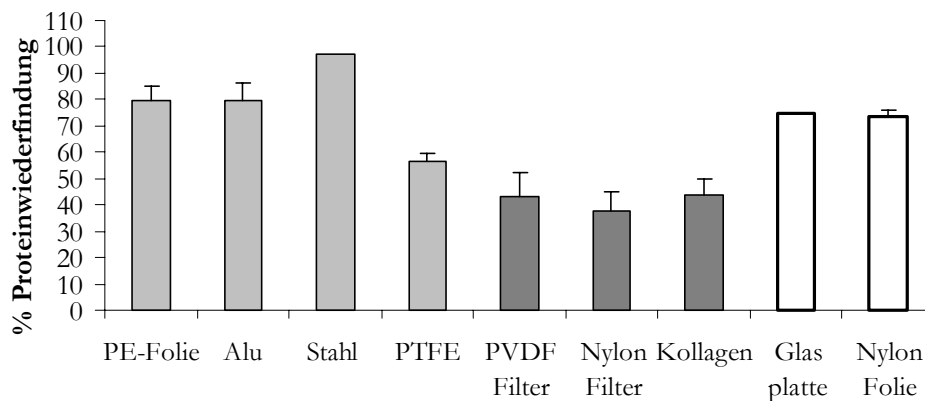


Abb. 127: Wiederfindung von Protein (G-CSF + SPT) auf verschiedenen Trägern. Die Einwirkzeit der Proteinlösungen auf die Träger betrug 15 Minuten. ■ eher hydrophobe, ■ eher hydrophile Oberflächen. □ hydrophile glatte Oberflächen (Folie, Platte).

Der Filterhersteller Sartorius gibt an, dass hydrophile Polyamidfilter (Nylon) mit einer Porenweite von  $0,2\ \mu\text{m}$   $100\ \mu\text{g}$  BSA pro  $\text{cm}^2$  binden, während für hydrophobe PTFE-Filter nur eine Adsorption von  $8\ \mu\text{g}$   $\gamma$ -Globulin pro  $\text{cm}^2$  aufgeführt wird (BSA und  $\gamma$ -Globulin weisen ein ähnliches Adsorptionsverhalten auf, so dass ein Vergleich dieser Daten legitim ist). Aufgrund dieser Angaben ist die in Abb. 127 dargestellte höhere Wiederfindung bei Kontakt mit Teflonfiltern im Vergleich zu Nylonfiltern plausibel. Die Verwendung von PP und PE für die Herstellung von Filtergehäusen und Probengefäßen lässt eine geringe Adsorptionsneigung von Proteinen an diese Materialien erwarten, was durch unsere experimentellen Daten bestätigt wird. Auch eine deutliche Adsorption verschiedener Proteine an PTFE-Materialien wurde bereits von anderen Arbeitskreisen festgestellt (244, 245, 223, 230, 246).

Im Gegensatz zur allgemeinen These, dass Proteine verstärkt an hydrophobe Oberflächen adsorbieren, wurde von G.T. Taylor et al. bei Untersuchung zur Adsorption von Seewasserproteinen festgestellt, dass die Adsorptionsintensität  $1/n$  ( $n =$  „Freundlich isotherm adsorption constant“) bei höheren Konzentrationen (im Gegensatz zu niedrigen Konzentrationen) mit steigender Oberflächenspannung zunahm (244). Dementsprechend beobachtete diese Arbeitsgruppe eine stärkere Adsorption an hydrophile Eisenplatten ( $\gamma_c$  36,2) als an hydrophobes Teflon ( $\gamma_c$  18,4). Dies mag nur eine von vielen

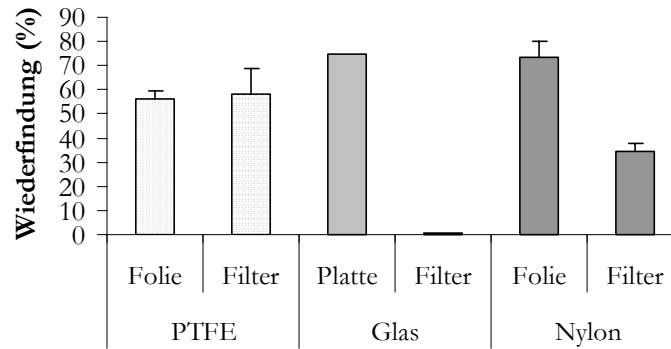
Veröffentlichung sein, dennoch verdeutlicht sie, dass unter bestimmten Versuchsbedingungen eine verstärkte Adsorption an hydrophile Materialien durchaus realistisch ist. Bei allen Proteinen, auch bei rh G-CSF, handelt es sich um amphiphile Moleküle, so dass neben der Adsorption hydrophober Proteinketten an hydrophobe Oberflächen, auch eine Adsorption der hydrophilen Proteingruppen an sehr hydrophile Materialien denkbar ist. H. Elwing und C-G. Gölander (227) konnten z.B. zeigen, dass aus einer Mischung verschiedener Plasmaproteine hochmolekulares Kinogen (HMWK) überwiegend an hydrophilen Oberflächen adsorbierte und von diesen sogar Fibrinogen verdrängte, welches daraufhin verstärkt an hydrophobe Oberflächen angelagert wurde. Während bei der Adsorption an hydrophobe Oberflächen hauptsächlich Van-der-Waals-Kräfte auftreten, kann die Anlagerung an hydrophile Oberflächen zusätzlich durch Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatischen Wechselwirkungen verursacht werden (231, 225). PVDF weist von allen verwendeten Materialien den stärksten Dipolcharakter auf (siehe Tab. 27), so dass es bei diesem Material vermutlich zu Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen Oberfläche und Protein kam. Auch A. Gessner et al. konnte mit steigender Ladungsdichte von Polystyren-Latex-Partikeln eine zunehmende Adsorption von Blutplasmaproteinen feststellen (26). Die geringe Wiederfindung bei Kontakt von rh G-CSF mit Kollagen kann sowohl durch direkte physikochemische Bindungen hydrophiler Natur zwischen den zwei Proteinen, als auch durch eine erschwerte Diffusion aus dem schwammartigen Material verursacht worden sein.

Des Weiteren muss beachtet werden, dass es sich bei den dargestellten Daten um Absolutwerte handelt und nicht um eine pro  $\text{cm}^2$  angegebene Adsorption. Selbst bei gleichen Außenabmessungen lag die benetzbare Oberfläche bei porenhaltigen Materialien (in diesem Fall PTFE-Filter und alle hydrophilen Träger) im Vergleich zu glatten Trägern (PTFE-Folie und PE, Alu und Stahl) deutlich höher, so dass die Vergleichbarkeit der Daten nicht gegeben ist. Deutlich wird dies anhand der Daten von hydrophilen, nicht porenhaltigen Materialien (die zwei Balken rechts in Abb. 127). Bei diesen lag die Wiederfindung annähernd im Bereich der Daten von hydrophoben Trägern.

#### 5.4.2. Abhängigkeit der Adsorption von Struktur und Kontaktfläche

Grundsätzlich hängt das Ausmaß der Adsorption in starkem Maße von der Oberfläche ab, welche in Kontakt mit der Proteinlösung kommt. Bei Filtermaterialien ist dies neben der äußeren auch die in den Poren befindliche Fläche, welche mit abnehmender Porenweite zunimmt. Laut Sartorius adsorbieren z.B. Celluloseacetatfilter mit einer Porenweite von  $0,2 \mu\text{m}$  ca.  $100 \mu\text{g}$   $\gamma$ -Globulin pro  $\text{cm}^2$ , mit einer Porenweite von  $2 \mu\text{m}$  dagegen nur noch  $50 \mu\text{g}$  pro  $\text{cm}^2$ . Den meisten Proteinen unterstellt man, dass sie als Monolayer angelagert werden, dennoch kann es je nach Oberflächenhydrophilie und Protein auch zu inhomogenen oder mehrere Moleküle umfassenden Schichten kommen (228, 242, 223, 227). Von Lysozym ist z.B. bekannt, dass es grundsätzlich Multilayer

ausbildet (28, 27, 231), während aus Fibrinogen auf hydrophoben Oberflächen dreiknotige Strukturen und auf hydrophilen Materialien faserartige Gebilde entstehen. Abgesehen von materialabhängigen Unterschieden, sollte die adsorbierte Schichtdicke sowohl auf glatten als auch auf porösen Trägern eines Materials gleich sein und die gemessene Adsorption sich proportional zur benetzten Oberfläche verhalten. Den in unseren Versuchen beobachteten Effekt der Oberflächen gibt Abb. 128 wieder.



**Abb. 128: Wiederfindung von Protein (G-CSF + SPT) auf verschiedenen Trägern, abhängig von der Struktur der Oberfläche. Folien weisen eine glatte, Filter eine große, porenhaltige Oberfläche auf. Die Einwirkzeit der Proteinlösungen auf die Träger betrug 15 Minuten.**

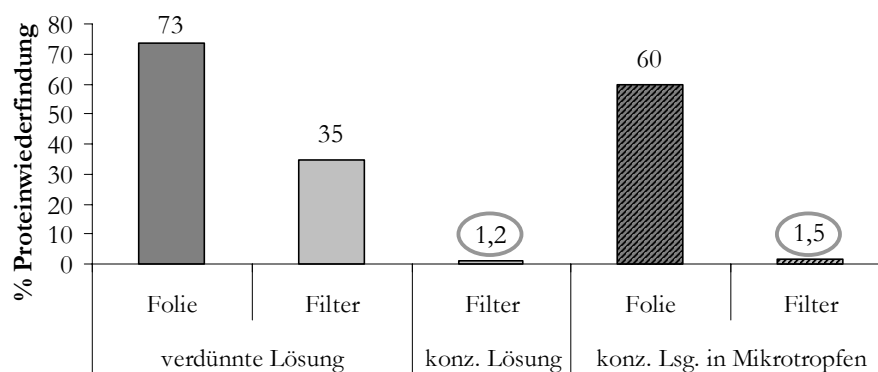
Bei hydrophoben Materialien konnte, aufgrund der geringen Benetzung der in den Poren liegenden Flächen, kein Unterschied in der Menge der adsorbierten Proteine zwischen glatten und porenhaltigen Strukturen festgestellt werden. Bei hydrophilen Materialien dagegen war die Adsorption auf Filtermaterialien deutlich stärker ausgeprägt. Zum Beispiel erfolgte an Glasfaserfilter eine annähernd vollständige Adsorption, während nur 25 % der eingesetzten Proteine bei Kontakt mit glatten Glasoberflächen adsorbiert wurden. Auch bei Nylonmaterialien wurde entsprechend der unterschiedlichen Oberfläche eine Wiederfindung von 70 % bzw. 30 % beobachtet. Der besonders ausgeprägte Unterschied der Glasmaterialien lag vermutlich an der Denaturierung der Proteine bei Kontakt mit Glasfaserfiltern (siehe C.II.5.5), während bei Kontakt mit glatten Glasflächen die Proteinstabilität erhalten blieb.

#### 5.4.3. Abhängigkeit der Adsorption von der Konzentration der Lösung

Aus zahlreichen Literaturstellen ist bekannt, dass die Adsorption an feste Träger ein konzentrationsabhängiger Prozess ist. Bis zum Erreichen eines Plateaus kommt es mit steigender Konzentration der Proteinlösung zur zunehmenden Adsorption (243, 18, 244, 247, 228, 248). Sobald die maximale Menge an Protein – als Monolayer oder auch als Multilayer – auf einer Oberfläche angelagert ist, erfolgt keine weitere Adsorption. Die bisherigen Adsorptionsversuche wurden mit Konzentrationen durchgeführt, welche nach Rekonstitution der Biodotproben entstanden. Während der Applikation und Trocknung der Proteinlösung auf den Trägern wurden jedoch deutlich höhere Konzentrationen

erreicht. Um konzentrationsabhängige Unterschiede in der Adsorption festzustellen, wurden folgende Versuche auf Nylonträgern durchgeführt. Eine identische Menge an G-CSF wurde als stark verdünnte Lösung und als konzentrierte Lösung in Form eines Tropfens oder in Form von Mikrotropfen auf die Träger aufgebracht, und die Proteinwiederfindung nach Verdünnung bestimmt. Das Volumen, welches die Träger befeuchtete, war zunächst für konzentrierte und verdünnte Lösungen unterschiedlich, für die Analytik wurden jedoch alle Proben in der Weise verdünnt, dass sie die gleichen Volumina enthielten.

Trotz der geringeren benetzten Oberfläche bei Applikation von Mikrotropfen im Gegensatz zur Aufbringung von verdünnter Lösung, wiesen die mit Mikrotropfen versehenen Proben eine stärkere Adsorption auf (rechter Datensatz in Abb. 129), als die in verdünnter Lösung eingelegten Proben (linker Datensatz). In gleichkonzentrierten Lösungen kam es dagegen sowohl bei Applikation eines Tropfens (konz. Lösung, mittlerer Datensatz) als auch bei Applikation und Trocknung in Form von Mikrotropfen (rechter Datensatz) zu etwa gleich starken Adsorptionen (eingekreiste Daten). Der Adsorptionsunterschied zu verdünnter Lösung musste demnach durch die Konzentration und nicht durch den Trocknungsschritt verursacht worden sein. Entsprechend den oben zitierten Veröffentlichungen führten auch in unseren Versuchen höhere Konzentrationen zu verstärkter Adsorption.



**Abb. 129: Wiederfindung von Protein (G-CSF + SPT) abhängig von der Kontaktfläche.** Es wurden Nylonträger verwendet. In alle Vials wurde dieselbe Menge Protein eingebracht, einmal als verdünnte Lösung, in welche die Träger hineingelegt wurden, einmal als konzentrierte Lösung, welche in Form eines Tropfens auf die Träger aufgetropft wurde und einmal als konzentrierte Lösung, welche in Mikrotropfen aufgetragen und getrocknet wurde. Die Einwirkzeit der Proteinlösungen auf die Träger nach Verdünnung betrug 15 Minuten.

Während auf Filtermaterialien eine höhere Konzentration zur fast vollständigen Bindung der Proteine führte, kam es auf Folien nur zu einer Erhöhung der Adsorption um ca. 10 % (Abb. 129). Dieser Unterschied lässt sich durch die unterschiedliche Kontaktfläche erklären. Auf hydrophile Filter aufgetropfte Lösung wurde vollständig von den Trägern aufgesaugt, wohingegen nur ein Teil der auf Folien aufgetragenen Tropfen mit den Trägern in direkten Kontakt kam (dunkelgraue Flächen der Tropfen in Abb. 130). Proteine, welche bereits bei Applikation die Oberfläche berührten, wurden aus

konzentrierter Lösung adsorbiert, wohingegen Proteine im äußeren Teil eines auf Folie platzierten Tropfens zunächst keinen Kontakt zum Träger hatten und sich erst nach Rekonstitution und Verdünnung an die Träger anlagerten. Dementsprechend betrug der Adsorptionsunterschied zwischen konzentrierter und verdünnter Lösung auf Folien 10 %, auf Filtermaterialien dagegen 32 %.

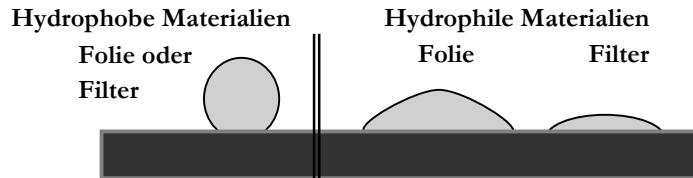


Abb. 130: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Kontaktfläche (dunkelgrau) von Tropfen auf hydrophoben (links) und hydrophilen Materialien (rechts).

Alle untersuchten Materialien konnten zwei Gruppen zugeordnet werden, zum einen Trägern mit großer Kontaktfläche - hydrophile, porenhaltige Materialien (Abb. 131 Pfeil) -, welche eine erhöhte Adsorption von ca. 35 % im Vergleich zu verdünnter Lösung (Konzentration nach Rekonstitution) aufwiesen, und zum anderen Trägern mit geringerer Kontaktfläche - hydrophile, glatte und alle hydrophobe Materialien -, bei welchen nur eine um ca. 10 % verstärkte Adsorption beobachtet wurde.

Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass es, egal welche Materialien verwendet wurden, bei der Biodotmethode immer zur Adsorption kam. Für den zukünftigen Einsatz dieser Technik bedeutet dies, dass für jedes geplante Trägermaterial ausführliche Studien durchzuführen sind, um Bedingungen zu schaffen unter denen die Adsorption reproduzierbar erfolgt und in die Probenherstellung einberechnet werden kann.

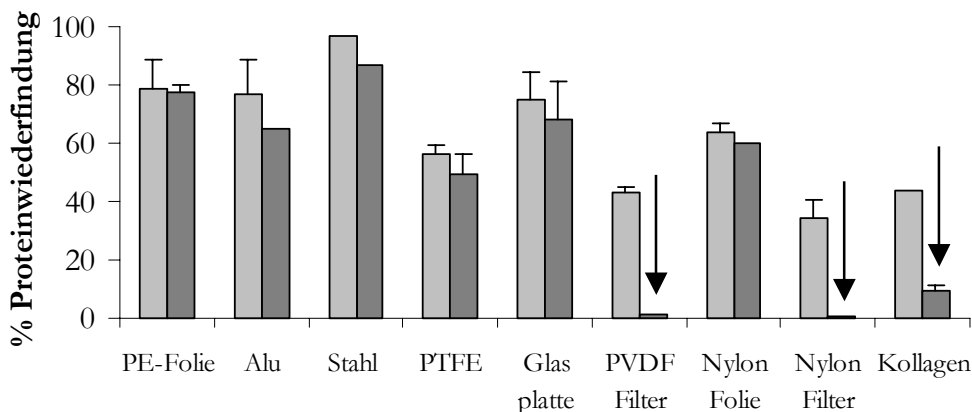


Abb. 131: Vergleich der Wiederfindung von Protein (G-CSF + SPT) nach Trocknung mit der Biodotmethode und nach Kontakt mit wässriger Proteinlösung. ■ Träger mit Mikrotropfen (Biodotmethode), ■ Träger für 15 Minuten in verdünnter Proteinlösung eingelegt. Die Adsorption war bei hydrophilen, porenhaltigen Trägern stärker ausgeprägt (Pfeil).



#### 5.4.4. Abhängigkeit der Adsorption von der Rezeptur

Um eine Adsorption von Proteinen an Oberflächen zu unterbinden, werden üblicherweise Tenside zugesetzt (241, 243, 30, 27, 12, 18), welche entweder bevorzugt an Oberflächen adsorbieren und dadurch die Proteine verdrängen, oder welche mit den Proteinen Wechselwirkungen eingehen und diese hierdurch solubilisieren (243). In unseren Versuchen konnte die Adsorption von G-CSF durch Verwendung einer tensidhaltigen Rezeptur ebenfalls verringert werden (Abb. 132), auch wenn der Effekt bei den eingesetzten Konzentrationen nicht sehr stark ausgeprägt war. Höhere Konzentrationen konnten jedoch nicht genutzt werden, da die Optimierung der Rezepturen hinsichtlich Restfeuchte und Proteininstabilität ergeben hatte, dass die Verwendung höherer Polysorbat 80 Konzentrationen zur Aggregation der Proteine führt.

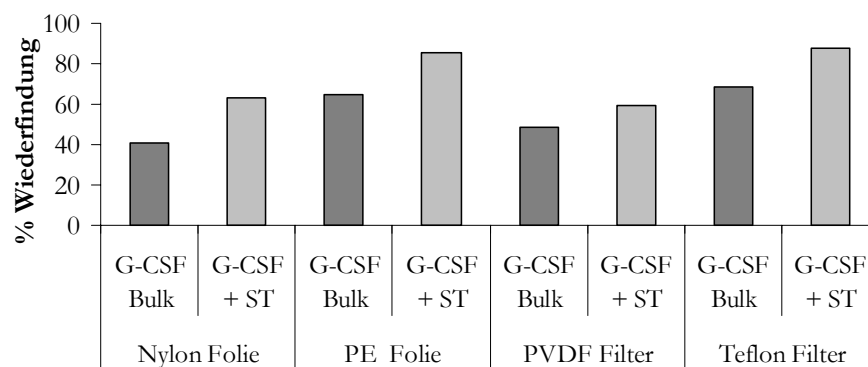


Abb. 132: Wiederfindung von Protein abhängig von der verwendeten Rezeptur (G-CSF allein oder zusammen mit 5 % Saccharose (S) und 0,1 % Polysorbat (T)) und dem Trägermaterial. Die Einwirkzeit der Proteinlösungen auf die Träger betrug 15 Minuten.

In Abb. 133 ist der Einfluss verschiedener Zusätze in Konzentrationen dargestellt, in welchen diese üblicherweise verwendet wurden. Auffällig ist die etwas niedrigere Wiederfindung von G-CSF bei alleiniger Zugabe von Phenylalanin. Bereits bei den Untersuchungen zur Trocknung mittels Warmluftbegasung wurde eine verstärkte Aggregationsneigung von G-CSF in Gegenwart von Phenylalanin beobachtet (siehe **C.I.3.3.3**). Demnach führte Phenylalanin möglicherweise zur reversiblen Entfaltung von G-CSF, wodurch es bei Trocknung durch zusätzlichen Temperaturstress zur irreversiblen Aggregation und bei diesen Versuchen zur stärkeren Adsorption kam.

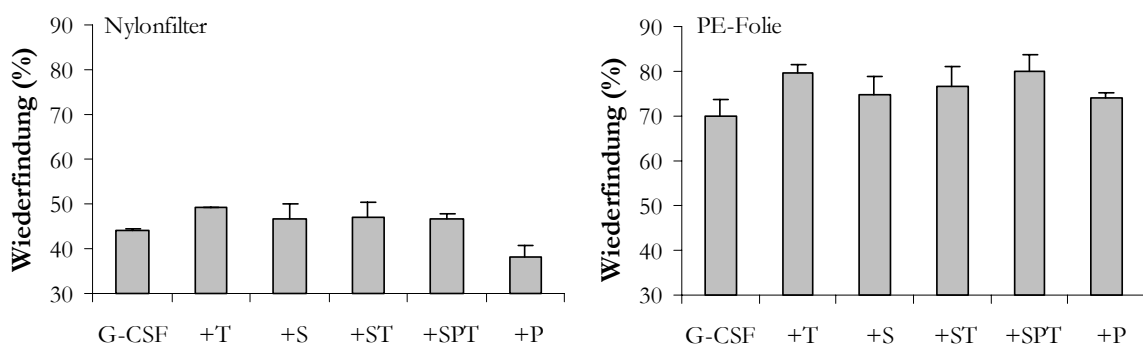


Abb. 133: Wiederfindung von G-CSF auf Nylonfilter (links) und PE-Folie (rechts) in Abhängigkeit von der Rezeptur. Die Einwirkzeit der Proteinlösungen auf die Träger betrug 15 Minuten.

### 5.5. Proteinstabilität

Da eine Adsorption an die Trägermaterialien nicht vermieden werden konnte, war es essentiell, mehr über die Stabilität der bei Rekonstitution abgelösten, sowie der adsorbierten Proteine zu erfahren. Die Stabilität der löslichen Proteine ist in Abb. 134 dargestellt und kann durchgehend als gut bezeichnet werden, einzig silikonisierter Stahl und Glasfaserfilter (62 %) verursachten eine deutliche Aggregation der Proteine. Auf allen anderen Oberflächen kam es weder bei Kontakt einer verdünnten Lösung mit den Trägern (hellgrau) noch nach Applikation und Trocknung (dunkelgrau) zur Destabilisierung der Proteine.

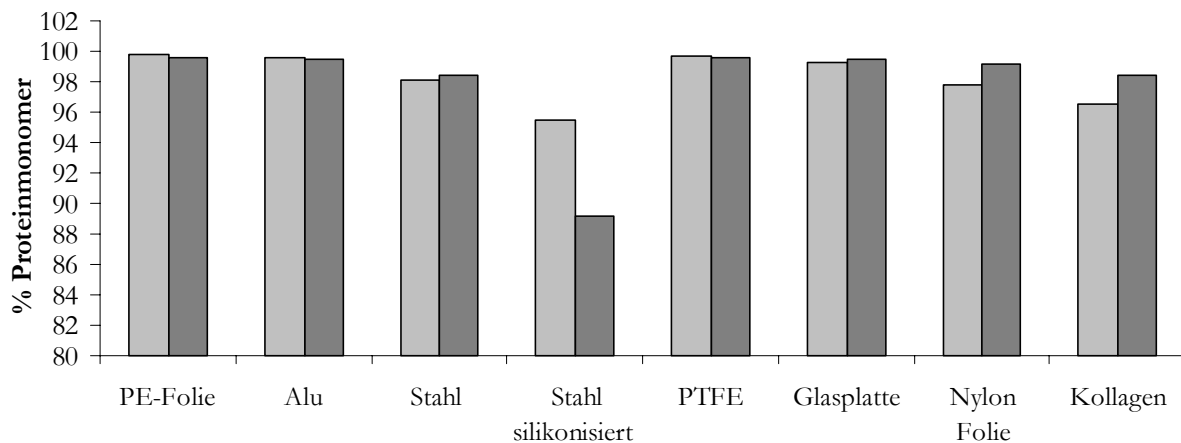


Abb. 134: Vergleich der Proteinstabilität auf verschiedenen Trägern.  Stabilität in Lösung bei Kontakt mit den Trägern, aus den Daten zur Untersuchungen der Adsorption,  Stabilität nach Rekonstitution der trockenen Probe, welche nach dem Biodotverfahren hergestellt wurde.

Die Aggregation auf Glasfaserfilter wurde vermutlich durch große Mengen an im Filter vorhandenen Glasfaserbruchstücken hervorgerufen. Bei Zusatz von Wasser zu diesen Filtern entstand eine trübe, faserhaltige Suspension. Die Silikonschicht auf den Stahlplättchen wurde nach dem Einbrennverfahren unter nicht optimierten Bedingungen in einem Labortrockenschrank hergestellt. Abgelöste Silikontröpfchen könnten durch Interaktion mit den hydrophoben Seitenketten der Proteine zur Aggregation geführt haben. Für auf PVDF, Nylonfilter, Nylonfolie und Kollagenschwämmen applizierte Proteine war aufgrund der geringen Wiederfindung nach Rekonstitution keine und nur eine sehr ungenaue Bestimmung der Proteinestabilität möglich.

Insgesamt konnte die Stabilität der aufgetropften und nach Trocknung wiederabgelösten Proteine auf fast allen getesteten Oberflächen erhalten werden, so dass es kein Problem darstellen sollte, für zukünftige Anwendungen der Biodotmethode, ein geeignetes hydrophiles oder hydrophobes, glattes oder poröses Material auszuwählen.

## 5.6. *Untersuchung der Ablösung adsorbierter Proteine*

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Adsorption an feste Oberflächen bei einigen Proteinen zur Veränderung der Konformation führt, während andere Proteine davon nicht betroffen zu sein scheinen (28, 226, 222, 223, 224, 225, 227). Unabhängig von einer Denaturierung besteht bei Adsorption des Proteins außerdem die Gefahr des vollständigen Aktivitätsverlustes (231, 230, 223, 229).

### 5.6.1. *Adsorption und Desorption von Proteinen von Kollagenträgern*

Bevor die Ablösung von einem Träger untersucht werden kann, muss das Adsorptionsverhalten an dieses Material bekannt sein. Betrachten wir deshalb zunächst betroffene Kollagenschwämme unter dem Rasterelektronenmikroskop (Abb. 135). Die dichte Anlagerung der Zuckermatrix auf die Kollagenfasern lässt eine langsame Wiederauflösung aufgrund von Diffusionshemmung und eine hohe Adsorption erwarten.

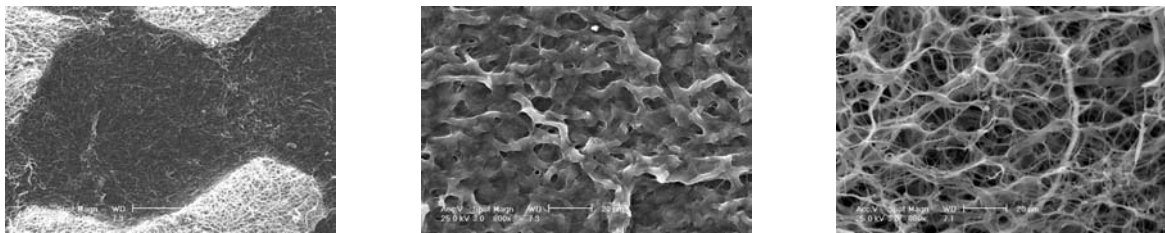


Abb. 135: RE-Mikroskopaufnahmen von betroffenen Kollagenschwämmen. Die Fläche, auf welche ein Tropfen Proteinlösung (dunkel) aufgetropft wurde, ist - umgeben von hellem Kollagenschwamm - im Bild links zu erkennen. Kollagen mit Protein-Zucker-Lösung (Mitte) und Kollagenfasern pur (rechts) sind in starker Vergrößerung dargestellt.

Tatsächlich kam es bereits nach einer Kontaktzeit von nur einer Minute zur Adsorption von 50 % des in Lösung vorhandenen Proteins. Innerhalb der nächsten Minuten und Stunden stellte sich ein Adsorptionsgleichgewicht von ca. 70 % adsorbiertem Protein ein. Bei dem in Abb. 136 dargestellten Versuch wurde innerhalb der ersten Minuten keine Probe analysiert, weshalb die zu diesem Zeitpunkt stattfindende Adsorption aus einem anderen Versuch übertragen wurde und in der Graphik nur als gestrichelte Linie wiedergegeben ist. Durch Zusatz von Polysorbat 80 (0,05 %) zum Probenmedium konnte nur eine minimale Erhöhung der Wiederfindung bewirkt werden (Abb. 136 ▲ zu ■), während gleichzeitig mehr Aggregate detektiert wurden (Abb. 137 ▲).

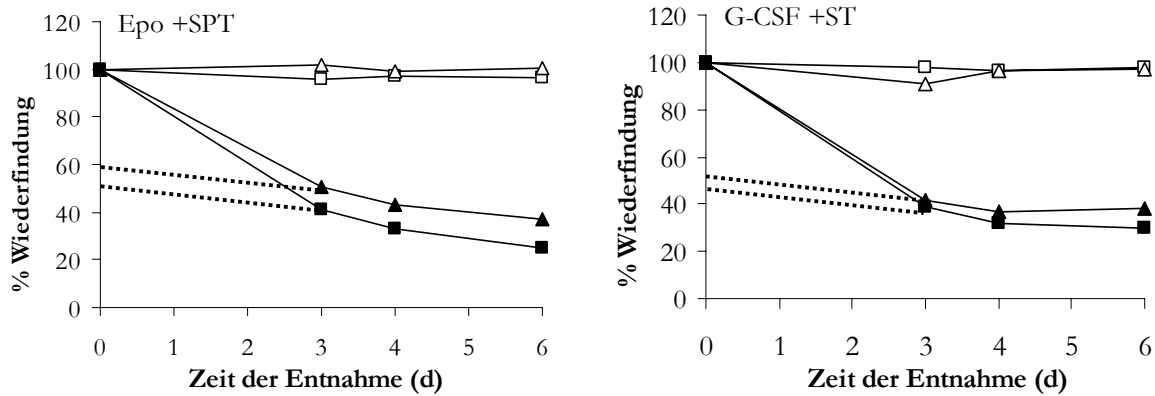


Abb. 136: Wiederfindung von Protein nach unterschiedlich langem Kontakt mit Kollagenschwämmen. Die Freisetzung der Proben aus Kollagen erfolgte  $\blacktriangle$  in Puffer mit 0,05 % Polysorbat,  $\blacksquare$  nur in Puffer. Als Blindwert diente Proteinlösung in Vials ohne Kollagen  $\triangleleft$  in Puffer mit Polysorbat,  $\square$  in Puffer.

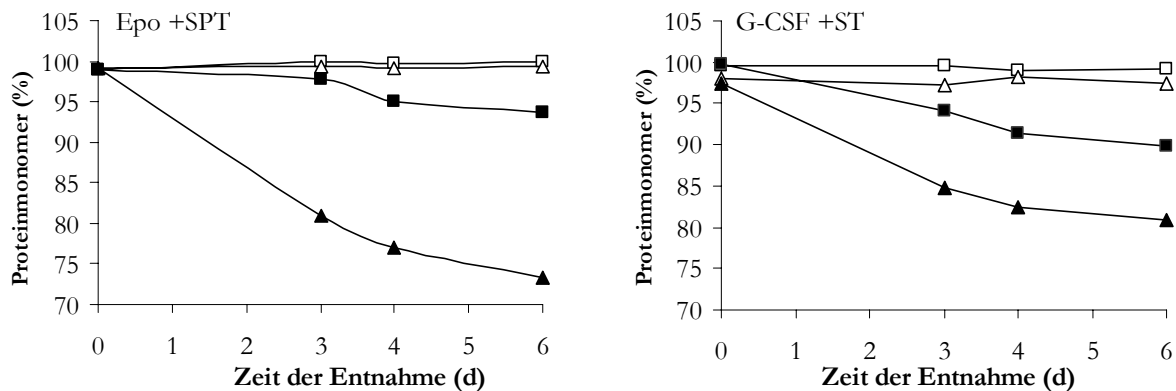


Abb. 137: Stabilität der Proteine nach unterschiedlich langem Kontakt mit Kollagenschwämmen. Die Freisetzung der Proben aus Kollagen erfolgte  $\blacktriangle$  in Puffer mit 0,05 % Polysorbat,  $\blacksquare$  nur in Puffer. Als Blindwert diente Proteinlösung in Vials ohne Kollagen  $\triangleleft$  in Puffer mit Polysorbat,  $\square$  in Puffer.

Da in der Vergleichslösung – Protein mit Puffer/Polysorbat ohne Kollagen – keine derartig starke Zunahme der Aggregation festgestellt wurde (Abb. 137,  $\triangleleft$ – $\square$ ), musste es sich um einen spezifisch in Gegenwart von Kollagen auftretenden Effekt handeln. Tab. 35 fasst die ermittelten Daten zusammen. Besonders ausgeprägt war der Unterschied bei Erythropoietin. Aus diesem entstanden in Gegenwart von Polysorbat und Kollagen Dimere, während G-CSF zu verschiedenen, höhermolekularen Aggregaten zusammengelagert wurde (Abb. 138). Ob die Aggregation durch spezifische Interaktionen von Protein, Kollagen und Tensid verursacht wurde oder ob es bei Anlagerung der Proteine an Kollagen grundsätzlich zur Aggregation kam und die gebildeten Aggregate nur durch die Anwesenheit von Tensid wieder abgelöst wurden, lässt sich anhand dieser Daten nicht feststellen.

Auch ohne Zusatz von Polysorbat kam es mit zunehmender Kontaktzeit zu einem ansteigenden Aggregatanteil in der Lösung (Abb. 137  $\blacksquare$ ). Da es jedoch gleichzeitig zur Herauslösung von niedermolekularem Kollagen kam, welches mittels SE-HPLC ebenfalls

bei der Retentionszeit der Proteinaggregate erfasst wurde, können diese Daten aus einer überlagerten Analytik resultieren.

	Zunahme der Aggregate (area%) bei Freisetzung mit Tensid			
	Epo + SPT		G-CSF + ST	
	ohne Kollagen	mit Kollagen	ohne Kollagen	mit Kollagen
Nach 3 d	0,6	17	2,8	10
Nach 4 d	0,7	18	1,2	6
Nach 6 d	0,6	20	1,6	9

Tab. 35: Zunahme der Aggregate (area%) bei Proben, welche in Puffer mit 0,05 % Polysorbat 80 freigesetzt wurden, im Vergleich zu Proben, welche nur in Puffer freigesetzt wurden.

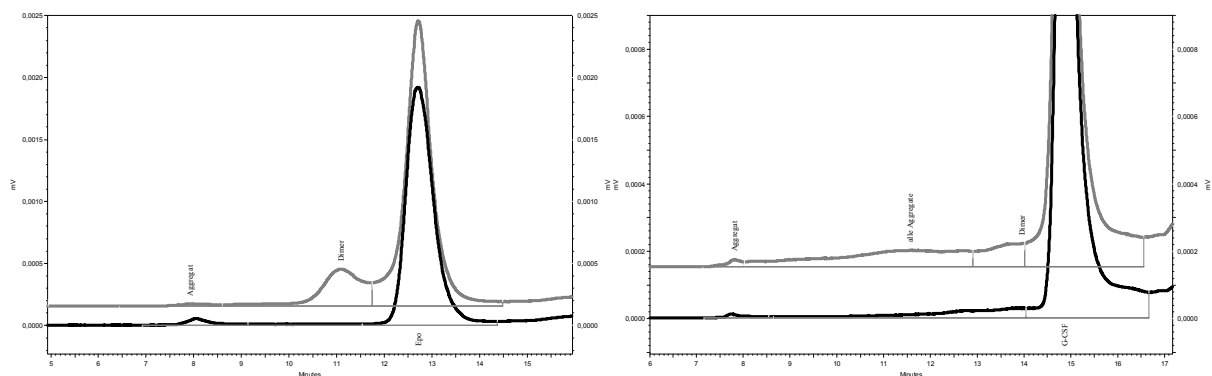


Abb. 138: SE-HPLC Chromatogramme von Protein in Gegenwart von Kollagen und Puffer (schwarz) bzw. Kollagen und Puffer-Polysorbat (grau) nach 3 Tagen Kontaktzeit. Links ist eine Probe aus Epo + SPT, rechts aus G-CSF +ST dargestellt.

Um mehr über die Struktur und Stabilität der adsorbierten Proteine zu erfahren, mussten diese vom Träger abgelöst werden. Dies konnte nicht durch Zugabe von Tensid erfolgen, weshalb dem Rekonstitutionsmedium Kollagenase zugesetzt wurde. Hierdurch sollten die Träger aufgelöst und die adsorbierten Proteine abgelöst werden. Da es nicht möglich war, die bisher verwendeten Kollagenschwämme vollständig zu spalten, wurden für alle weiteren Versuche weniger stark vernetzte Kollagentabletten eingesetzt. Diese zerfielen bei Kontakt mit Wasser bereits nach 45 Minuten in makroskopische Fasern und wurden von Kollagenase in kleinere Bruchstücke gespalten, eine vollständige Auflösung erfolgte jedoch auch hier nicht. Während bei Freisetzung in Wasser nur wenig niedermolekulares Kollagen aus den Trägern herausgelöst wurde, wodurch die HPLC-Analytik nicht gestört wurde, kam es in Gegenwart von Kollagenase zu starken Überlagerungen der Chromatogramme durch verschieden große, niedermolekulare Kollagenmoleküle (Abb. 139 links). Bei G-CSF kam es zur Überlagerung des Monomerpeaks durch Kollagen (Abb. 139 rechts), während Epo aufgrund der kürzeren Retentionszeit abgetrennt werden konnte (Abb. 140 links).

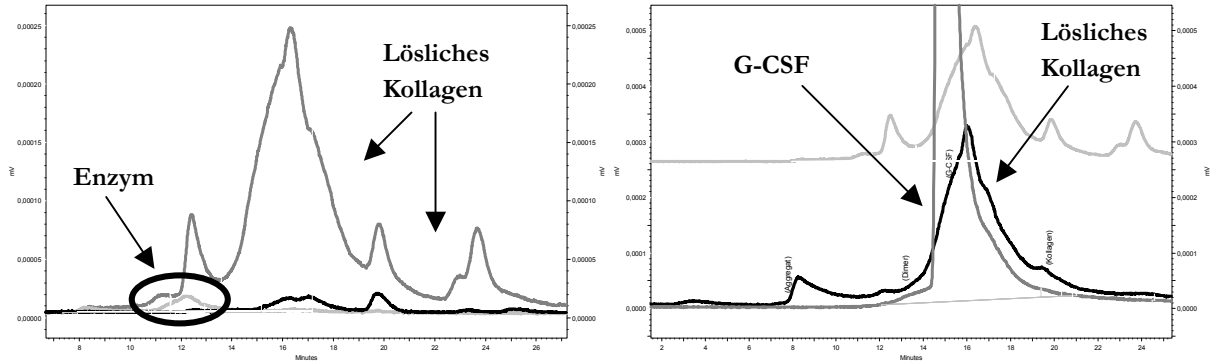


Abb. 139: SE-HPLC-Chromatogramme von Proben in Gegenwart von Kollagenase und Kollagen (Detektion mittels Fluoreszenz). Links: Kollagenase (hellgrau), Kollagen in Wasser (schwarz), Kollagen in Gegenwart von Kollagenase führte zu sehr vielen Peaks (dunkelgrau). Rechts: G-CSF pur (dunkelgrau), Kollagen + Kollagenase (hellgrau), G-CSF auf Kollagen nach 30 minütiger Freisetzung mit Kollagenase (schwarz) führte zu stark überlagerten Chromatogrammen.

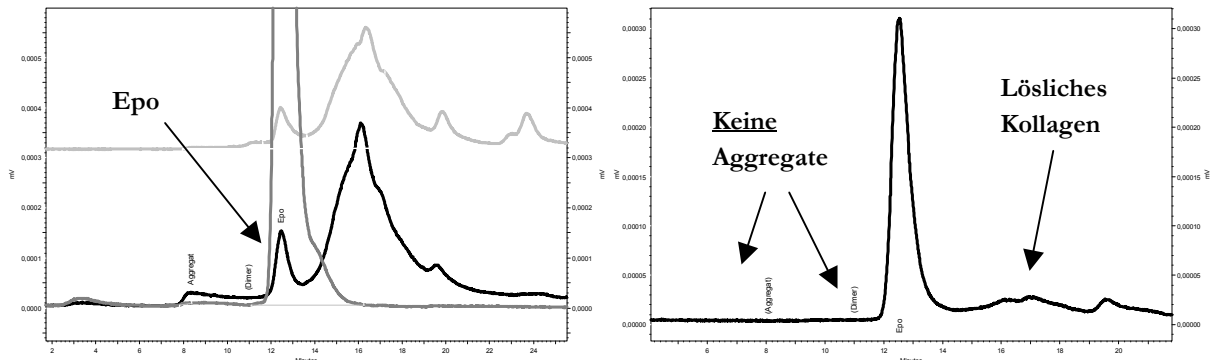


Abb. 140: SE-HPLC-Chromatogramme von Proben in Gegenwart von Kollagenase und Kollagen (Detektion mittels Fluoreszenz). Links: Epo pur (dunkelgrau), Kollagen + Kollagenase (hellgrau), Epo auf Kollagen nach 30 minütiger Freisetzung mit Kollagenase (schwarz) führte zu leicht überlagerten Chromatogrammen. Rechts: Epo auf Kollagen nach fünfminütiger Freisetzung ohne Kollagenase.

Trotz der analytischen Probleme sollte es möglich sein, für Erythropoietin Angaben über die Wiederfindung in Gegenwart von Enzym zu erhalten. Dazu wurde eine Epo-Rezeptur (+SPT) auf Kollagentabletten mittels Biodotmethode aufgetropft, wobei aufgrund der geringen Größe der Tabletten weniger Lösung als üblich und in größeren Tropfen dispensiert wurde. Die Produkte wurden im Vakuum getrocknet und mit einer Wasser-Enzym-Lösung rekonstituiert. Zur Kontrolle aller durch das Enzym verursachten Veränderungen, wurde neben der Freisetzung aus Kollagentabletten auch die Freisetzung von PE-Folie in Gegenwart von Kollagenase untersucht. Des weiteren wurde die Freisetzung ohne Enzym analysiert. Die Ergebnisse gibt Tab. 36 wieder.

Träger	Freisetzungsmedium	Wiederfindung (%)		Proteinmonomer (%)
		nach 2 min	nach 2 h	
Folie	+ Enzym	100	98,5	99,0
Kollagen	+ Enzym	10,1	2,2	100
Kollagen	nur Wasser	10,6	2,5	100

Tab. 36: Wiederfindung und Proteinstabilität von Epo (+SPT) nach unterschiedlich langer Freisetzung aus PE-Folie und Kollagenschwämmen.

Die Daten machen deutlich, dass durch Enzymzugabe keine höhere Freisetzung von Erythropoietin aus Kollagentabletten erzielt werden konnte (graue Felder), da es nicht zur vollständigen Auflösung der Kollagenmatrix kam und Epo verstärkt an niedermolekulares, lösliches Kollagen adsorbierte. Nach einem Tag Lagerung bei Raumtemperatur lag Epo wieder vollständig adsorbiert vor. Um zumindest einen Eindruck von der Stabilität der abgelösten Proteine zu erhalten, wurden alle Proben mittels SE-HPLC (Tab. 36 rechte Seite) und SDS-PAGE (Abb. 142) untersucht. Mit steigender Freisetzungsdauer wurden zunehmende Mengen an Kollagen herausgelöst, während Epo gleichzeitig vermehrt adsorbiert wurde, so dass nur die sofort nach Rekonstitution gewonnene Probe (nach 2 Minuten) ausgewertet werden konnte (Abb. 141).

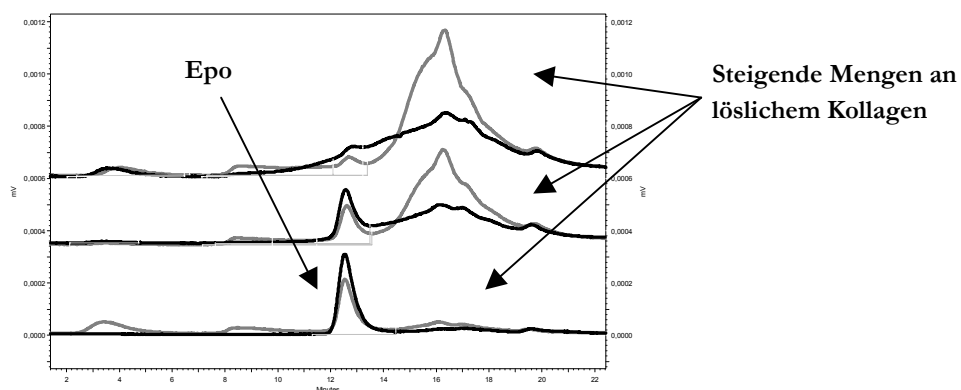


Abb. 141: SE-HPLC Chromatogramme von Epo-Proben auf Kollagentabletten nach Freisetzung mit (grau) und ohne Kollagenase (schwarz) nach verschiedenen Zeiten (von unten nach oben: 5 min, 30 min, 1 h).

Die erhaltenen Daten (Tab. 36 rechte Spalte und Abb. 142) lassen sich folgendermaßen interpretieren. Mittels HPLC wurden sofort nach der Rekonstitution keine Aggregate detektiert und auch auf den SDS-Gelen kam es nicht zur Anfärbung von Proteinaggregaten (in der Abbildung sind wichtige Proben mit einem Pfeil markiert). Teilweise sichtbare zusätzliche Banden (Epo 2. Gel) wurden von gespaltenem Kollagen und nicht von Proteinaggregaten hervorgerufen.

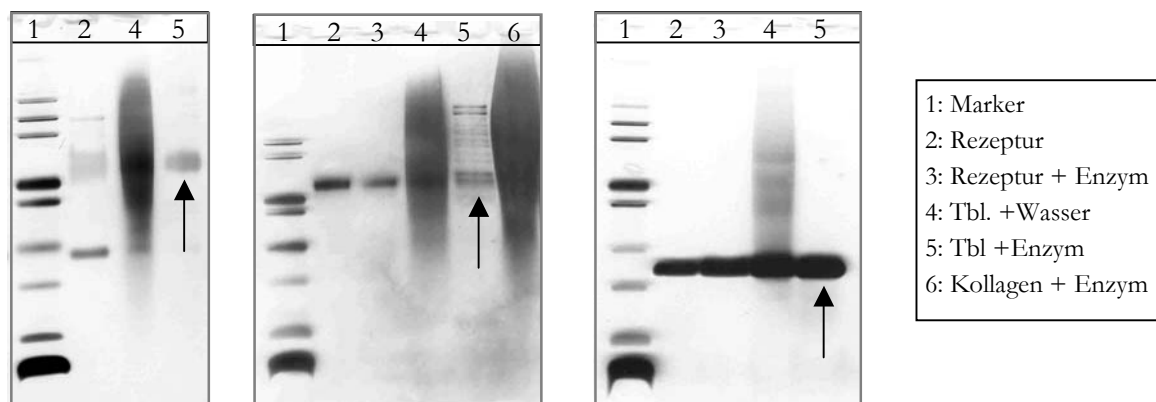


Abb. 142: SDS-PAGE von Epo (ersten zwei Gele) und G-CSF (Gel rechts) Rezepturen (+SPT) und Proben (auf Kollagentabletten getropft und getrocknet, „Tbl.“) nach Freisetzung mit und ohne Anwesenheit von Kollagenase (Enzym). Die Pfeile markieren auswertbare Proben, welche nach einer Freisetzungszeit von zwei Minuten gewonnen wurden.

Von Kollagen wiederabgelöste Proben schienen vollständig stabil zu sein, eine Aussage über die adsorbierten Proben konnte aufgrund der nicht vollständigen Auflösung der Kollagenschwämme nicht getroffen werden. Wenn die betroffenen Kollagenträger direkt an den Wirkort in den Körper eingebracht werden, und wenn die adsorbierten Proteine ihre volle Aktivität besitzen, ist eine Ablösung der adsorbierten Moleküle nicht notwendig.

### 5.6.2. Desorption von verschiedenen Trägern

Um einen Eindruck von der Stärke der Adsorption zu erhalten, wurde G-CSF an hydrophile und hydrophobe Träger adsorbiert und die Desorption untersucht. Zur Ablösung adsorbierter Proteine stehen mehrere Methoden zur Verfügung, welche je nach Protein und Oberfläche unterschiedliche Ergebnisse erzielen können (242, 234, 27). Zum einen können pH-Wert und Ionenstärke der Lösung verändert werden, zum anderen eignet sich der Zusatz von Harnstoff, SDS oder anderen Tensiden. Diese Zusätze wirken auf verschiedene Weise. Entweder kommt es zur bevorzugten Anlagerung der Tenside an die Oberfläche der Träger und damit zur Verdrängung der adsorbierten Proteine, oder die Tenside gehen eine direkte Interaktion mit den Proteinen ein und erhöhen hierdurch deren Solubilität. Entsprechend dem letzteren Mechanismus wirken vor allem anionische Tenside, wie SDS, während nichtionische Stoffe meist über Verdrängung der Proteine ihre Wirkung entfalten (27). Zur Ablösung von hydrophoben Oberflächen sind besonders Tenside mit kleinen Kopfgruppen geeignet, während zur Ablösung von hydrophilen Trägern Tenside benötigt werden, welche solubilisierend wirken. SDS hat sich sowohl zur Ablösung von hydrophilen, als auch von hydrophoben Oberflächen als geeignet herausgestellt (27, 242). Auch zur effektiven Desorption von Proteinen, welche in Form von Multilayern adsorbiert werden, ist SDS aufgrund der direkten Interaktion mit den Proteinen in der Lage. Meist weist es eine deutlich stärkere Wirkung auf als Harnstoff oder Polysorbat, so z.B. bei den Versuchen von D. Sakar und D.K. Chattoraj (56 % Ablösung mit SDS, 12 % mit Harnstoff aus 242).

Aufgrund all dieser Vorteile beschlossen wir SDS in zwei Konzentrationen zur Desorption unserer Proben zu verwenden. Außerdem wurde ein weiterer Versuch mit Harnstoff durchgeführt. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Ablösung von denaturiertem Protein, aufgrund der größeren Hydrophobie und der dadurch verstärkten Bindung an Oberflächen, erst bei höheren Tensidkonzentrationen erfolgt (27, 234, 249, 248). Die zur Ablösung nötige Konzentration sollte also ein Maß für die Stärke der Bindung darstellen. Beachtenswert in diesem Zusammenhang ist die von R.J.Rapoza und T.A. Horbett und K. Wannerberger et al. (228, 248, 229) gemachte Beobachtung, dass mit zunehmender Proteinkonzentration prozentual mehr Proteine adsorbiert werden, welche jedoch eine weniger starke Bindung zur Oberfläche aufweisen und deshalb bei Zugabe



von desorbierenden Agenzien zu einem prozentual größeren Anteil abgelöst werden. Zur Identifizierung unterschiedlicher Bindungsstärken aufgrund verschiedener Materialien ist demnach eine Adsorption aus gleichkonzentrierten Lösungen nötig.

Um eine vollständige Adsorption an allen Materialien zu erhalten, wurden gleich große Stücke von hydrophilen und hydrophoben Trägern über Nacht in rh G-CSF Lösung eingelegt. Am nächsten Tag wurden die Träger aus der Lösung entnommen und 15 Minuten lang mit Wasser gewaschen, wodurch die in den Poren befindliche Proteinlösung vollständig entfernt wurde, so dass nur adsorbiertes Protein auf den Trägern verblieb. Zur Bestimmung der Desorption wurden die abgetrockneten Träger in unterschiedliche Lösungen über Nacht eingelegt und die erhaltenen Proben mittels SDS-PAGE untersucht. In einem Vorversuch wurde verifiziert, dass es durch alleiniges Einlegen in Wasser nicht zur Desorption von zuvor adsorbierten Proteinen kam (entsprechend 225, 242). In wässriger Lösung wurden nach drei Stunden maximal 0,7 % der adsorbierten Proteine wiedergefunden (SE-HPLC). Durch Zusatz von SDS oder Harnstoff konnte dagegen eine deutliche Ablösung der Proteine erzielt werden. Die Stärke der Banden auf nicht reduzierten SDS-PAGE-Gelen ist in Tab. 37 dargestellt. Banden von abgelösten Proben auf reduzierten Gelen unterschieden sich weder in Stärke noch hinsichtlich der Nebenbanden von nicht reduzierten Gelen. Abgelöste Proteine enthielten demnach keine kovalent über Disulfidbrücken verbundenen Aggregate. Dagegen wies Proteinlösung, in welche die Träger zur Adsorption eingelegt wurden, am nächsten Tag kovalente Dimere in geringer Menge auf (Abb. 144, Nebenbanden in Spalte 3). Diese müssen jedoch teilweise durch die Lagerung verursacht worden sein, da durch vorherige Untersuchungen (siehe Adsorptionsversuche C.II.5.5.) gezeigt wurde, dass der Kontakt mit PE und Teflon Materialien nicht zur Aggregation der Proteine führt.

	Adsorption		Stärke der Desorption				
			0,5 % SDS	2 % SDS	2 % SDS nach 0,5%	2% SDS nach 2%	6 M Urea
PE-Folie	+	7 %	+	+	-	-	~
Teflon-Filter	+	40 %	+	+	~	~	~
Nylon-Filter	++	67 %	++	+++	+	(+)	~
PVDF-Filter	+++	72 %	+	+++	+++	++	~

**Tab. 37: Adsorption und Desorption von G-CSF auf verschiedenen Träger. Die Auswertung erfolgte mittels SE-HPLC (% Angabe bei der Adsorption) und mittels SDS-PAGE (die Stärke der Banden ist mit - / ~ / + / ++ / +++ gekennzeichnet).**

Entsprechend den SE-HPLC-Daten (Tab. 37 Adsorption) wurde auch mit dieser Analytik eine geringe Adsorption von G-CSF an hydrophobe Materialien, wie PE-Folien und Teflonfiltern, und eine hohe Adsorption an hydrophile Filter aus Nylon oder PVDF festgestellt (Stärke der Bande in Spalte 3). Mit Harnstoff konnten von allen Oberflächen nur geringe Mengen an Monomer abgelöst werden. Aus den Versuchen mit SDS geht jedoch eindrucksvoll die unterschiedlich starke Desorption von G-CSF von

verschiedenen Oberflächen hervor (Tab. 37). Bei PVDF und Nylonfiltern war die Bindung der adsorbierten Proteine so stark, dass bei erstmaliger Zugabe von SDS nur ein Teil der angelagerten Proteine abgelöst wurde und bei erneuter Zugabe noch mal einige (Nylon) bzw. ebenso viele (PVD) Proteine desorbiert wurden. An PE-Folie adsorbierte Proteine konnten dagegen relativ einfach, bereits mit 0,5 %iger SDS Lösung abgelöst werden. Insgesamt nahm die Stärke der adsorptiven Bindung in folgender Reihenfolge zu: PE-Folie, Teflon-, Nylon-, PVDF-Filter.

Bei Betrachtung der SDS-PAGE-Gele fallen die bei Kontakt mit PVDF-Filtern entstandenen kovalenten Aggregate auf (Abb. 143 rechts Spalte 3). In einigen Artikeln wird ein Fließgleichgewicht zwischen adsorbierten und löslichen Proteinen beschrieben (224, 225), wodurch sich die Entstehung von Aggregaten erklären ließe. Im Gegensatz zu den anderen Materialien führte der Kontakt mit PVDF vermutlich zur Entfaltung und Aggregation der Proteine, welche auch bei erneutem Übergang in Lösung nicht ihre natürliche Struktur zurückerlangten. Eine von Denaturierung begleitete Adsorption erklärt auch die besonders starke Bindung von G-CSF an dieses Material. Aufgrund dieser starken Bindung wurde mit 0,5 %iger SDS-Lösung nur ein geringer Teil der adsorbierten Proteine abgelöst (Spalte 5). Erst durch eine zweite Behandlung mit 2 %iger SDS-Lösung konnte weiteres Protein abgelöst werden (Spalte 7). Des weiteren enthielten die abgelösten Proteinproben immer höhermolekulare Aggregate, welche zwar auf dem abgebildeten linken PVDF-Gel nur schwach zu erkennen sind, in anderen Versuchen aber deutlicher zu sehen waren (rechtes Gel, Spalte 5). Bei höheren SDS-Konzentrationen (Spalte 6) kam es neben der Solubilisierung zur Spaltung der Aggregate, so dass hier ein stärkerer Monomerpeak, aber weniger Aggregate detektiert wurden (30, 250).

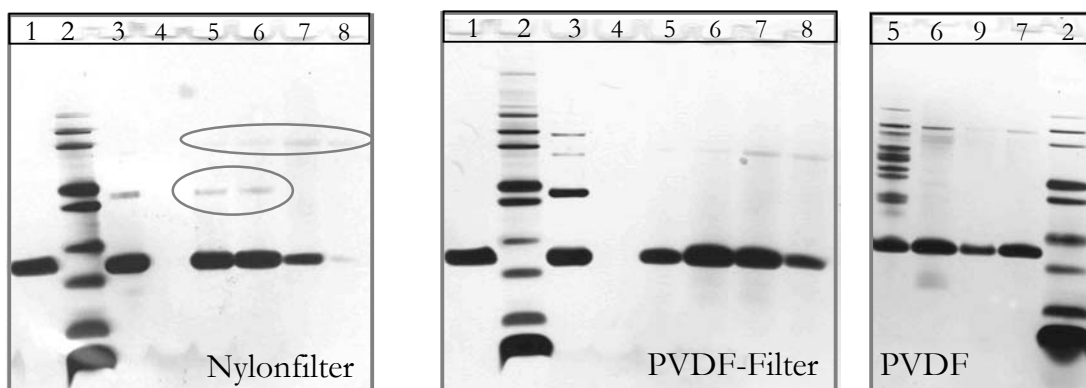
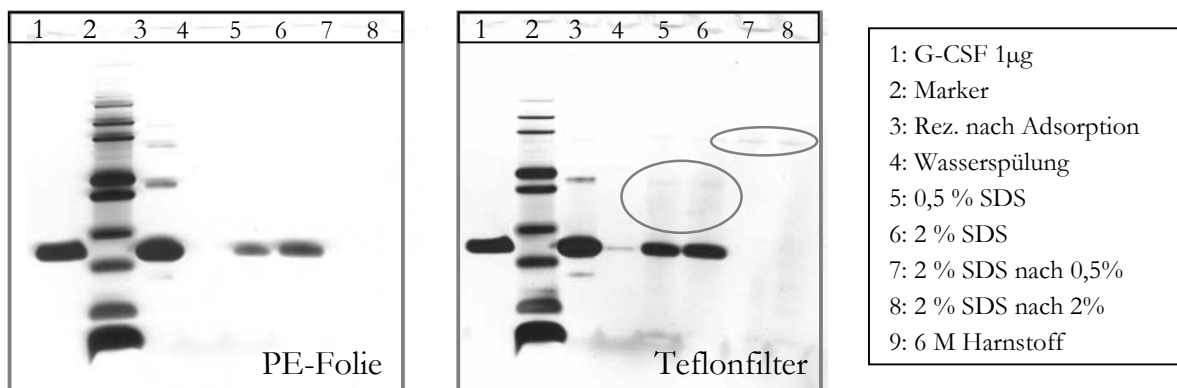


Abb. 143: Nicht reduzierende SDS-PAGE von G-CSF Proben nach Desorption mit verschiedenen Reagenzien (5-9). Zur Beschriftung der Probenreihen siehe Abb. 144.

Die Adsorption an Nylonfilter war ebenfalls so stark ausgeprägt, dass es nicht möglich war im ersten Desorptionsschritt eine vollständige Ablösung zu erhalten (Abb. 143 links). Die im zweiten Schritt von diesem Material abgelösten Proben enthielten jedoch deutlich weniger Protein, als die von PVDF abgelösten Proben. Auch von Nylonfiltern wurde eine geringe Aggregatmenge abgelöst (Kreise). Im ersten Desorptionsschritt handelte es sich dabei überwiegend um Dimere (Spalte 5/6), während durch die zweite SDS-Behandlung

vor allem die stärker adsorbierten höhermolekularen Aggregate abgelöst wurden (Spalte 7/8).

An hydrophobe Materialien adsorbiertes Protein konnte dagegen relativ leicht, bereits mit dem ersten Desorptionsschritt, abgelöst werden (Abb. 144). Sowohl 0,5 %ige als auch 2 %ige SDS-Lösung erzielte bei PE- und Teflonfolie die gleichen Resultate, was auf eine nur schwache Bindung von G-CSF mit diesen Oberflächen hindeutet. Während in den von PE-Folie abgelösten Proben niemals Aggregate detektiert wurden, enthielten die von Teflonfiltern desorbierten Proben einen geringen Aggregatanteil (Kreise), welcher im ersten Desorptionsschritt aus Dimeren (Spalte 5/6) und im zweiten aus höhermolekularen Aggregaten bestand (Spalte 7/8).



**Abb. 144:** Nicht reduzierende SDS-PAGE von G-CSF Proben nach Desorption mit verschiedenen Reagenzien (5-9). Die Proben in Spalte 3 stammen von der Rezeptur nach Einlegen der Träger über Nacht (nach Adsorption). Spalte 4 enthält durch Spülung mit Wasser abgelöste Proteine. Die Proben in Spalte 7 und 8 wurden nach erneuter Desorption von Proben 5/6 erhalten.

Aufgrund der Erkenntnisse aus den Untersuchungen mittels SE-HPLC zur Adsorption, und den Beobachtungen mittels SDS-PAGE zur Desorption, kann zusammenfassend festgestellt werden, dass es an porenhaltige, hydrophile Oberflächen nicht nur zu einer quantitativ stärkeren Adsorption als an hydrophobe Oberflächen kommt, sondern dass diese auch zu stärkeren Bindungen – vermutlich aufgrund von Denaturierungs- und Aggregierungsreaktionen – zwischen G-CSF und Träger führt.

## 6. Dotierung von Xerogelen

In diesem Kapitel geht es um die Dotierung lyophilisierter, organischer Träger. Für die Behandlung chronischer Hautverletzungen hat sich in den letzten Jahren die feuchte Wundversorgung – z.B. mit Hydrogelen - etabliert. Teilweise werden zusätzlich Proteine in diese Gele eingebracht, welche die Wundheilung fördern. Da Proteine jedoch im wässrigen Milieu eines Hydrogels nicht lange lagerfähig sind, wurden sogenannte Xerogele entwickelt. Hierbei handelt es sich um lyophilisierte Hydrogele. Als Alternative zur Trocknung von proteinhaltigen Hydrogelen, ist die Herstellung wirkstofffreier Xerogele und die nachträgliche Aufbringung der Proteine denkbar. Auf diese Weise wären die Proteine nicht dem Lyophilisationsprozess ausgesetzt. Des Weiteren könnte man zur Herstellung der wirkstofffreien Xerogele, im Vergleich zu Proteinxerogelen, ein weniger schonendes, aber sehr viel kürzeres Gefriertrocknungsprogramm verwenden und die Hydrogele problemlos sterilisieren. Zur Aufbringung von Proteinlösung auf trockene Xerogele, ohne diese dabei aufzulösen, bietet sich die Biodotmethode an. Hierdurch können trockene, lagerfähige Xerogele mit aufgetropften Protein-Zucker-Partikeln hergestellt werden. Durch die gesteuerte Dotierung wäre es möglich, Arzneistoff einzusparen und nur bestimmte Stellen oder Seiten des Xerogels mit Proteinen zu versehen.

### 6.1. Aussehen, Restfeuchte

Die für diese Versuche eingesetzten, wirkstofffreien Xerogele wurden von R. Schmidt entwickelt (251) und wiesen eine styroporartige Konsistenz auf. Sie ließen sich auf jede gewünschte Größe zuschneiden und ermöglichten eine gute Handhabung. Dementsprechend ergab die Betropfung nach der Biodotmethode keine Schwierigkeiten. Aufgrund der geringen Größe der applizierten Tropfen kam es nicht zur Auflösung der Xerogele. Je nach Material wurden minimale Einsenkungen an den Stellen, an welchen die Tropfen aufgetroffen waren, festgestellt. Die grundsätzliche Struktur der Xerogele war davon jedoch nicht betroffen. Einige aus verschiedenen Materialien hergestellte und mit Farbstofflösung (SPT+Carboxyfluorescein) betropfte Xerogele sind in Abb. 145 dargestellt.

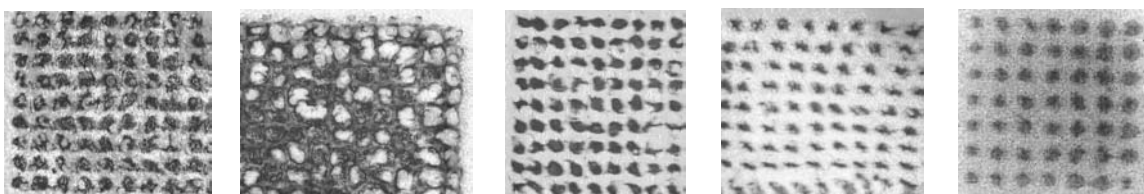


Abb. 145: Aussehen von mit Farbstofflösung betropfte Xerogele aus verschiedenen Materialien. Von links nach rechts: Methylcellulose (MC), Hydroxypropylcellulose (HPC, in diese Xerogele sinken die Tropfen ein), Ethylcellulose (EC), Polyacrylat (PA, diese Xerogele weisen keine einheitliche Oberfläche auf) und Hydroxyethylcellulose (HEC).

Um trockene, lagerfähige Produkte zu erhalten, war es nötig das mit den Tropfen eingebrachte Wasser aus dem Xerogel und aus den Protein-Zucker-Partikeln zu entfernen. Dies wurde – entsprechend der Biodotmethode – durch eine an den Dispensierschritt angeschlossene 15 stündige Vakuumtrocknung erreicht. Sowohl wirkstofffreie Xerogele (PA, MC und HEC) als auch betropfte und vakuumgetrocknete Xerogele wiesen ähnlich niedrige Restfeuchten von 0,7 bis 1,2 % (m Wasser/m Gel) auf. Eine Umrechnung auf die Restfeuchte der Proteinprodukte, abzüglich der Restfeuchte der Xerogele, war aufgrund der Massenunterschiede und der geringen Feuchte der Proteinproben nicht möglich. Trotz der hohen Hygroskopie und des guten Wasserbindevermögens von Xerogelen war es demnach mit der Biodotmethode möglich, trockene Produkte herzustellen.

## 6.2. Freisetzung und Proteinstabilität

Entscheidend für die spätere Verwendung der Produkte ist das Freisetzungsverhalten der applizierten Proteine. Um einen ersten Eindruck vom Rekonstitutionsverhalten der betropften Xerogele zu erhalten, wurden mit Farbstofflösung betropfte Xerogele mit Wasser rekonstituiert und die erhaltenen Proben nach verschiedenen Zeiten fotografiert. Verschiedene Cellulosearten offenbarten dabei ein sehr unterschiedliches Verhalten (Abb. 146).

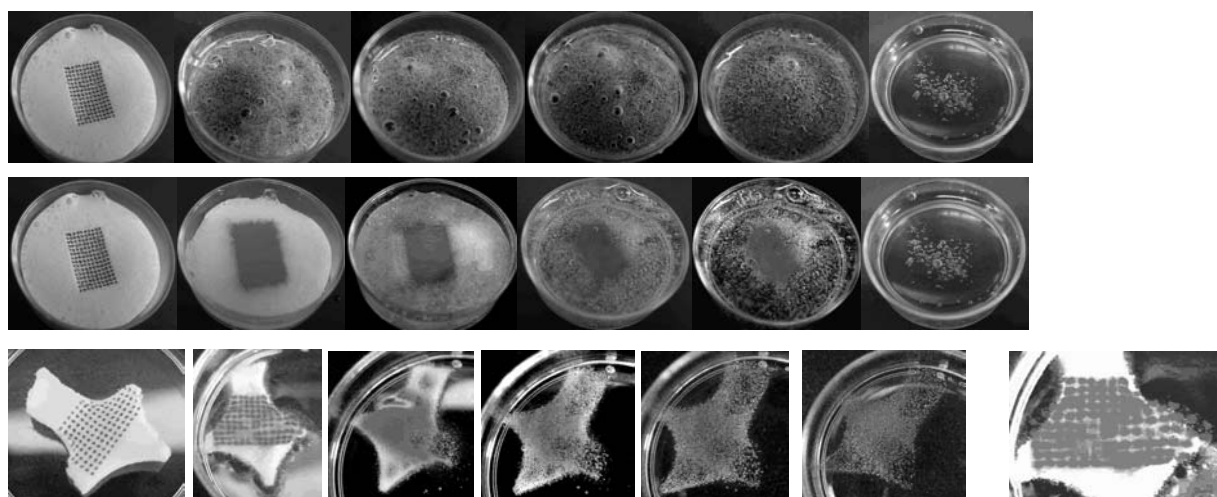


Abb. 146: Rekonstitutionsverhalten von mit Farbstofflösung betropften Xerogelen aus verschiedenen Materialien. Oben: MC, Mitte: EC, unten HEC (0, 15 min, 2 h, 3 h, 5 h, 6 h und 15 min in Vergrößerung).

Xerogele aus Methylcellulose nahmen nur sehr langsam das zugegebene Wasser auf, so dass zunächst die applizierten Zucker-Farbstoffpartikel vollständig aufgelöst wurden und die erhaltene Farbstofflösung erst danach in das Gel diffundierte (Abb. 146 oben). Mit der Zeit entstand ein gleichmäßig gefärbtes Hydrogel. Ethylcellulose saugte dagegen sofort das gesamte Rekonstitutionsmedium auf, und schloss dieses in die aufquellenden Strukturen ein (Abb. 146 Mitte). Die sich auflösenden Farbstoffpartikel wurden von dem

angequollenen Gel eingeschlossen und diffundierten nur sehr langsam in das restliche, sich mit der Zeit ausbildende Hydrogel. Bei Hydroxyethylcellulose war die extrem schnelle Anquellung noch deutlicher zu erkennen. Hierdurch wurde sogar die Diffusion von Wasser in noch trockene Teile des Xerogels unterbunden, so dass während des Versuches noch lange ein trockener, weißer Kern zu erkennen war, und sogar einzelne Farbstofftropfen vom Gel eingeschlossen wurden (Abb. 146, EC 15 min). Spätestens nach einem Tag war in allen Proben ein gleichmäßig gefärbtes Hydrogel entstanden.

Aufgrund zahlreicher Untersuchungen zum Rekonstitutionsverhalten, zur Konsistenz und Lyophilisierbarkeit identifizierte R. Schmidt im Rahmen seiner laufenden Dissertationsarbeit Hydroxyethylcellulose (HEC) als gut geeignet für die Herstellung von wirkstofffreien Xerogelen (persönliche Mitteilung). Deshalb setzten wir für alle weiteren Untersuchungen HEC-Xerogele, welche nach dem von R. Schmidt entwickelten Verfahren hergestellt wurden, ein. Diese wurden mit Proteinlösung betropft, im Vakuum getrocknet und mit Hilfe einer Freisetzungszelle auf ihr Freisetzungverhalten untersucht. Dazu wurde das betropfte Xerogel, welches in eine Seite der Freisetzungszelle eingebracht wurde, mit Wasser rekonstituiert und mit einer Celluloseacetatmembran abgedeckt (Abb. 148 links, siehe auch Methoden, **B.2.1.12**). Die Diffusion der Proteine aus dem Gel, auf die andere Seite der Membran, ins FreisetzungsmEDIUM (ebenfalls Wasser), wurde als Freisetzung definiert. Durch Wechsel des FreisetzungsmEDIUMS nach festgelegten Zeiten konnten sink-Bedingungen geschaffen werden. Die freigesetzten Proben wurden hinsichtlich Fläche und area % des Monomerpeaks analysiert, wobei auffällt, dass es im Laufe der Freisetzung zur stetigen Abnahme des Monomergehaltes aufgrund einer prozentualen Zunahme des Aggregatpeaks kam (Tab. 38).

Zeit (h)	area % Proteinmonomer						
	0,5	1,5	2	3	5	6	8
G-CSF + SPT	96,9	96,9	95,9	91,2	91,5	87,3	86,9
Epo + SPT	96,7	94,8	91,8	92,1	87,0	88,2	87,7

Tab. 38: Proteinmonomergehalt in area% (gemessen im FreisetzungsmEDIUM) während der Freisetzung aus betropften Xerogelen.

Zur Entstehung von Aggregaten könnte es aufgrund der bei der Freisetzung herrschenden Temperatur (RT, ca. 24 °C) gekommen sein. Da jedoch während der gesamten Freisetzung weder in G-CSF noch in Epo Proben ein Dimerpeak detektiert wurde, der Aggregatpeak sein Aussehen nicht veränderte, und lösliches HEC ebenfalls bei der Retentionszeit der Aggregate erfasst wurde, liegt die Vermutung nahe, dass es nicht zur Aggregation der Proteine kam, sondern HEC aus dem Gel herausgelöst und miterfasst wurde. Da die Überlagerung der Chromatogramme durch HPC nur den

Aggregatpeak und nicht den Monomerpeak betraf, war es möglich, die Fläche des Monomerpeaks auszuwerten und die Freisetzungsgeschwindigkeit zu errechnen.

Zur Bewertung der Freisetzung von Proteinen aus betropften, rekonstituierten Xerogelen, wurde deren Freisetzung mit der Freisetzung aus Lösung und aus Xerogelen, in welche die Proteine direkt eingebracht wurden, verglichen. Die erhaltenen Kurven gibt Abb. 147 wieder.

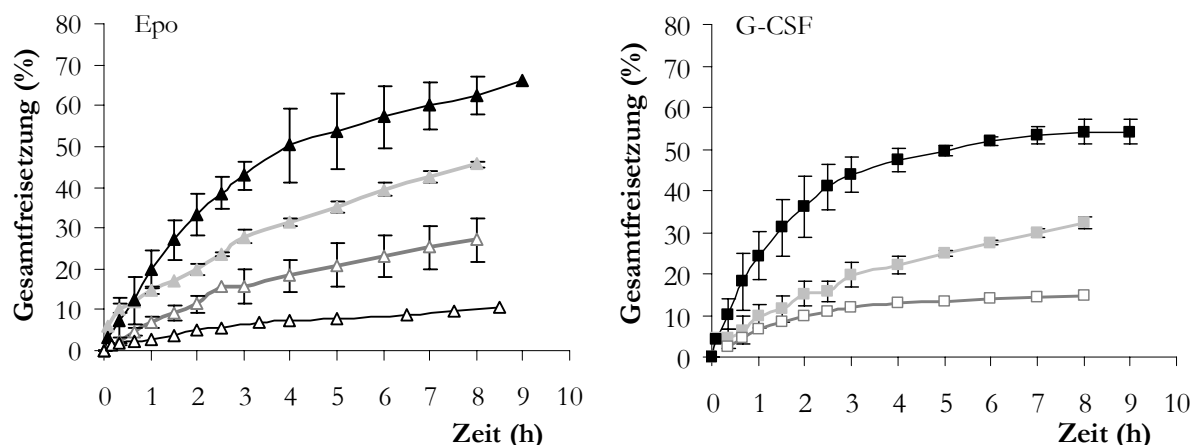


Abb. 147: Freisetzung von Epo (links) und G-CSF (rechts) aus Xerogelen und Lösung.  $\blacktriangle$   $\blacksquare$  aus betropften Xerogelen,  $\blacktriangle$   $\blacksquare$  aus Lösung,  $\triangle$   $\square$  aus Xerogelen, in welche die Proteine direkt eingebracht wurden,  $\triangle$   $\square$  von umgekehrt in die Freisetzungszelle gelegtem, betropften Xerogel.

Am schnellsten erfolgte die Freisetzung aus betropften Xerogelen ( $\blacktriangle$   $\blacksquare$ ), welche sogar noch schneller war als die Freisetzung aus konzentrierter Lösung ( $\blacktriangle$   $\blacksquare$ ). Dieser ausgeprägte Unterschied lag vermutlich an einer im Vergleich zur Lösung höheren Konzentration der aufgelösten Proteinzuckerpartikel und einer gerichteten Diffusion (dargestellt in Abb. 148).

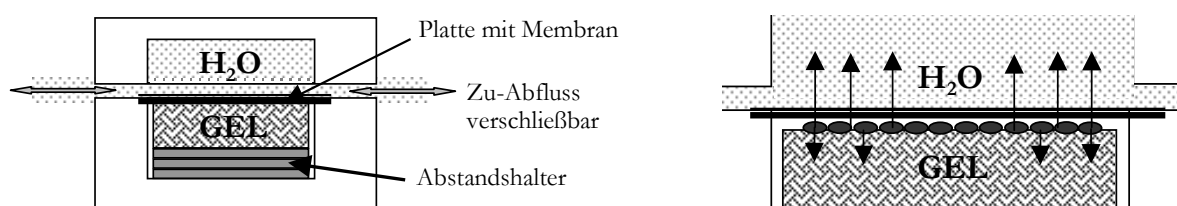


Abb. 148: Schematische Darstellung der Freisetzung aus Xerogelen mittels Freisetzungszelle (links). Vergrößerte Ansicht bei Freisetzung aus betropften Xerogelen (rechts). Die Pfeile verdeutlichen die gerichtete Diffusion.

Obwohl die Konzentration der Lösung bereits so hoch gewählt wurde, dass sie einer Konzentration entsprach, welche entstanden wäre, wenn sich die Mikrotropfen nicht im gesamten Gel, sondern in einer 1 mm dicken Schicht aufgelöst hätten, war die tatsächliche Konzentration der aufgelösten Mikrotropfen scheinbar noch deutlich höher. Des Weiteren kam es bei Zugabe des Rekonstitutionsmediums neben der Auflösung der Protein-Zucker-Partikel auch zur Quellung des Xerogels (siehe Abb. 146), wodurch sich eine extrem hochkonzentrierte, vom angequollenen Gel zusammengehaltene

Proteinlösung bildete. Diese Lösung verteilte sich nicht gleichmäßig im gesamten Gel, sondern diffundierte aufgrund des Gelwiderstandes bevorzugt durch die Membran ins Freisetzungsmittel ( $H_2O$ , Abb. 148).

Die Freisetzung von direkt in Xerogele eingebrachten Proteinen ( $\blacktriangle$   $\square$ ) erfolgte deutlich langsamer als die Freisetzung von Proteinen aus Lösung ( $\blacktriangle$   $\blacksquare$ ), was aufgrund der verlangsamten Diffusion in Hydrogelen erklärbar ist. Betroffene Xerogele, welche mit der nicht betroffenen Seite zur Membran (also verkehrt herum) in die Freisetzungszelle eingelegt wurden, setzten dementsprechend noch langsamer frei ( $\triangle$   $\square$ ). Von B. Amsden wurde anhand der Freisetzung globulärer Proteine aus Calciumalginatgelen einige Faktoren identifiziert, welche die Diffusionsgeschwindigkeit in Hydrogelen beeinflussen (252). Da die Diffusion löslicher Stoffe nur innerhalb der mit Wasser gefüllten Hohlräume eines Hydrogelgeflechtes möglich ist, hängt die Geschwindigkeit der Diffusion stark von der Größe der löslichen Stoffe und dem freien Wasservolumen des Gels ab. Je größer der Gelbildneranteil und je größer der hydrodynamische Durchmesser eines Stoffes ist, desto langsamer ist die Diffusionsgeschwindigkeit. Des Weiteren verlangsamt sich die Geschwindigkeit mit abnehmender Konzentration des löslichen Stoffes. Für direkt in Xerogele eingebrachte Proteine konnte während der ersten zwei Stunden allerdings kein Unterschied in der Freisetzung von G-CSF und Epo beobachtet werden (Abb. 149  $\triangle$   $\square$ ), wohingegen die Freisetzung von auf Xerogele aufgetropften Proteinen diesen Überlegungen entsprach – zumindest innerhalb der ersten drei Stunden ( $\blacktriangle$   $\blacksquare$ ).

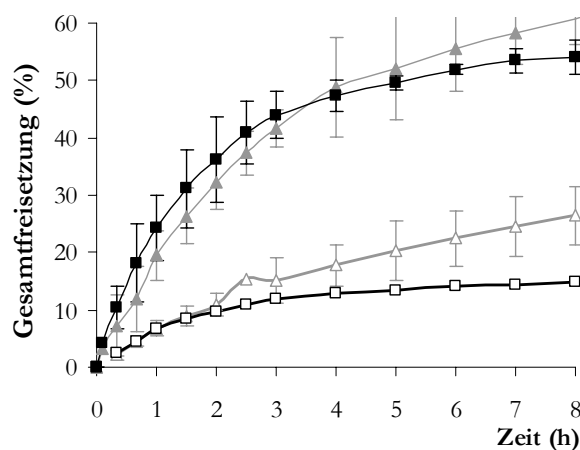


Abb. 149: Vergleich der Freisetzung von Erythropoietin ( $\blacktriangle$   $\triangle$ ) und G-CSF ( $\blacksquare$   $\square$ ) aus betroffenen Xerogelen (gefüllte Symbole) und aus Xerogelen, in welche die Proteine direkt eingebracht wurden (nicht gefüllte Symbole).

Im Vergleich zum größeren Erythropoietinmolekül (38 kD,  $\blacktriangle$  Abb. 149) wurde G-CSF, welches die geringere Molmasse (20 kD) besitzt und in diesem Versuch in höherer Konzentration eingesetzt wurde ( $\blacksquare$  Abb. 149), zunächst etwas schneller freigesetzt. Die Permeabilität der eingesetzten Celluloseacetatmembran war für beide Proteine in gleichem Maße gegeben, so dass die Freisetzungsgeschwindigkeit durch die Diffusion der eingeschlossenen Proteine im Gel bestimmt wurde.



Nach ca. drei Stunden kam es bei allen Versuchen zur leichten Abflachung der Freisetzungskurve von G-CSF, wohingegen Epo weiter freigesetzt wurde. Eventuell kam es während der Freisetzung zur Aggregation und Adsorption von eingelagertem rh G-CSF an das Gel oder an die Membran. Entsprechend der Verlangsamung der Freisetzungsgeschwindigkeit im weiteren Verlauf des Versuches änderte sich die Steigung der Freisetzungsggeraden bei Darstellung im Higuchi-Blot (% Freisetzung gegen Wurzel der Zeit) nach drei Stunden (Abb. 150, Markierung mit schwarzen Pfeilen). Während die Änderung der Geradensteigung bei Freisetzung von G-CSF, welches direkt ins Xerogel eingebracht wurde, nur minimal war, kam es bei betropften Xerogelen zu einer besonders deutlichen Abflachung. Auch bei der Freisetzung von Erythropoietin wurde eine Änderung der Steigung, wenn auch in geringem Umfang beobachtet. Da zu diesem Zeitpunkt keine Änderung der Versuchsdurchführungen stattfand und der Effekt reproduzierbar war, musste es sich um eine Eigenart bei der Freisetzung aus betropften Gelen handeln.

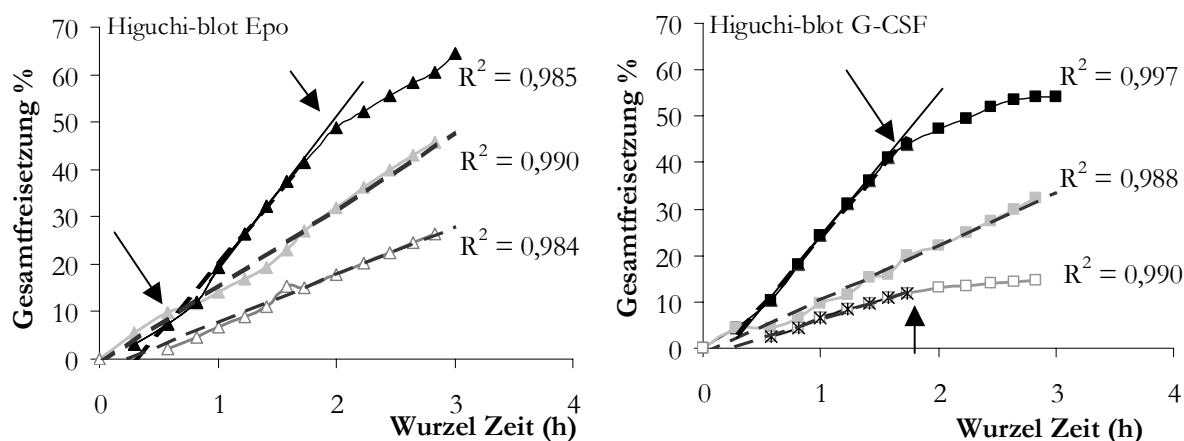


Abb. 150: Freisetzung der Proteine (links: Epo, rechts: G-CSF) aus Xerogelen und Lösung, aufgetragen nach dem Higuchi-Blot (% Freisetzung gegen Wurzel der Zeit). Das Bestimmtheitsmaß der Ausgleichsgeraden (bei der Freisetzung aus betropften Gelen bezieht sich diese nur auf die ersten drei Stunden) ist neben den Graphen angegeben. Die Pfeile markieren eine Änderung in der Steigung. Freisetzung aus betropften Xerogelen (▲■), aus Lösung (■□), aus Xerogelen, in welche die Proteine direkt eingebracht wurden (△□)

Eventuell handelte es sich bei den vor dem Steigungsknick freigesetzten Proteinen um Proteine aus den äußeren Schichten des langsam durchquellenden Xerogels. Solange die Quellung noch nicht vollständig abgeschlossen war, wiesen die Gele große Hohlräume auf und die aus den Proteinzuckerpartikeln entstandene Lösung konnte leicht diffundieren (gerichtete Diffusion). Vermutlich war nach drei Stunden die Quellung des Gels größtenteils abgeschlossen, wodurch von nun an nur noch eine langsame Diffusion möglich war. Für diese Vermutung spricht, dass die Steigung in diesem Teil der Freisetzungskurve in etwa der Steigung von direkt in Xerogele platzierten Proteinen entspricht (△). Des weiteren wurde die Freisetzung im Laufe des Versuchs zunehmend durch Adsorptions- und Aggregationsphänomene verlangsamt. Der zu Beginn der

Freisetzung von Epo aus betropften Xerogelen feststellbare Knick beruhte auf der Anpassungszeit des Systems an die Umgebungsbedingungen und wird auch als „lag-time“ bezeichnet. Insgesamt wiesen alle Proben eine diffusionsgesteuerte Freisetzung auf, erkennbar an der Ausbildung von Geraden im Higuchi-Blot.

Zusammenfassend wurden innerhalb von 9 Stunden insgesamt ca. 64 % Epo und 54 % G-CSF freigesetzt. Diese Daten lassen sich zwar nicht auf in vivo Bedingungen übertragen, dennoch geben sie einen Anhaltswert über das grundsätzliche Verhalten von betropften Xerogelen. Die Freisetzung der Proteine erfolgte aufgrund der erzielten hohen Konzentrationen und der gerichteten Diffusion schneller als aus Gelen, in welche Proteine direkt eingebracht wurden. Unter Ausnutzung dieser Ergebnisse ließe sich, durch die Kombination beider Techniken, ein System entwickeln, welches eine schnell freigesetzte Initialdosis und eine langsame Erhaltungsdosis beinhaltet. Des weiteren wäre es möglich, zwei verschiedene Proteine mit unterschiedlicher Geschwindigkeit freizusetzen.

## **7. Retardierung und Schutz durch Überzüge**

Durch Applikation von wässriger Protein-Zucker-Lösung auf Oberflächen von Trägermaterialien mit Hilfe der Biodotmethode erhält man trockene, stabile Produkte, welche bei Kontakt mit Wasser schnell aufgelöst werden. Um die Freisetzung dieser Produkte zu steuern, bietet sich die Aufbringung von Überzügen an. Grundsätzlich sind verschiedene Arten von Überzügen denkbar, zum einen schnell lösliche Überzüge als Schutz der eingeschlossenen Proteinpartikel, und zum anderen Retardüberzüge. Besonders bei Implantation der Träger, und für Proteine mit kurzer Halbwertszeit bieten retardierte Darreichungsformen viele Vorteile. Auf diese Weise können gleichmäßige Arzneistoffspiegel erzielt und ohne Nachdosierung über lange Zeit aufrecht erhalten werden. Durch Wahl der Dicke und Zusammensetzung des Überzuges sollte es möglich sein, verschiedene Freisetzungskinetiken gezielt einzustellen. Des weiteren könnten Überzüge zur Verbesserung der Haftung applizierter Partikel und zum Schutz vor Wasseraufnahme oder Oxidation verwendet werden.

### **7.1. Aussehen überzogener Proben**

Zur Aufbringung von Überzügen auf betropfte Träger standen zwei verschiedene Techniken zur Verfügung, zum einen die Betropfung mittels Mikrotropfenroboter und zum anderen das Besprühen mit Hilfe einer Sprühpistole. Bei der ersten Variante wurde

die Überzugslösung oder Dispersion über die zuvor aufgetropfte und angetrocknete Protein-Zuckerschicht aufgetragen und im Vakuum getrocknet. Hierdurch war eine kontrollierte Aufbringung – auch über nur einen Teil der Tropfenreihen – möglich. Da die Protein-Zuckerschicht beim Auftropfen der Überzugslösung jedoch noch nicht vollständig getrocknet war, wurde in manchen Fällen kein getrennter Überzug ausgebildet, stattdessen kam es zur Vermischung beider Lösungen. Hierdurch entstand an Stelle eines Überzuges eine retardierende Matrix (Abb. 151 Mitte), bei welcher die Gefahr der Denaturierung der Proteine durch Bestandteile der Überzugsrezeptur (z.B. organische Lösungsmittel) existierte, andererseits aber weitere Retardierungsoptionen ermöglicht wurden.

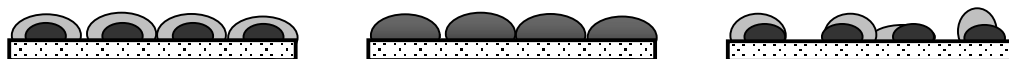


Abb. 151: Mögliche Produkte beim Übertropfen einer angetrockneten Protein-Zucker-Schicht (schwarz) mit Überzugsrezeptur (grau) mittels Mikrotropfenroboter. Von links nach rechts: Perfekter Überzug, Vermischung und Bildung einer Retardmatrix und ungleichmäßiger, lückenhafter Überzug.

Im Rahmen der experimentellen Arbeit erfolgte die Auflösung und Vermischung beider Schichten teilweise nicht reproduzierbar, so dass selbst innerhalb einer Probe unterschiedliche Ausprägungen beobachtet wurden. Teilweise kam es zum Ausfallen einer neuen, homogenen „Rezeptur“ und teilweise entstanden Mischprodukte (Abb. 152).

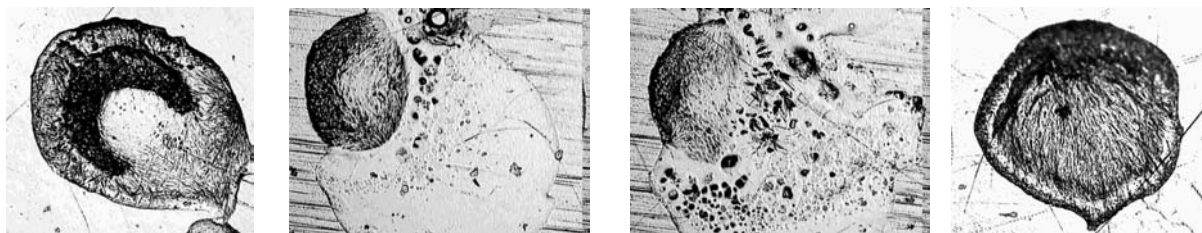


Abb. 152: Aussehen von Placeboprodukten, über welche mit dem Mikrotropfenroboter eine Eudragit NE Dispersion getropft wurde. Teilweise ist der Zuckerpartikel noch zu erkennen, teilweise ist er von der Überzugsschicht überdeckt und teilweise haben sich die zwei Schichten vermischt und sind als neue Mischmatrix ausgefallen.

Auf die Ausbildung des Überzuges hatte auch die Tropfengröße der Überzugsschicht und die Platzierungsgenauigkeit einen entscheidenden Einfluss. Die Tropfen der Überzugsrezeptur mussten exakt über den angetrockneten Tropfen der Protein-Zucker-Schicht platziert werden und etwas größer als die Tropfen der ersten Schicht sein, da sonst keine vollständige Überdeckung möglich war (Abb. 151 rechts und Abb. 153 rechts). Andererseits bestand bei Wahl zu großer Tropfen die Gefahr, dass diese ineinander flossen und es zur unkontrollierten Auflösung der Muster kam (Abb. 153 links). Außerdem wurden mit zunehmender Tropfengröße steigende Mengen an Wasser auf die angetrockneten Protein-Zuckerpartikel aufgebracht, wodurch diese völlig aufgelöst wurden.

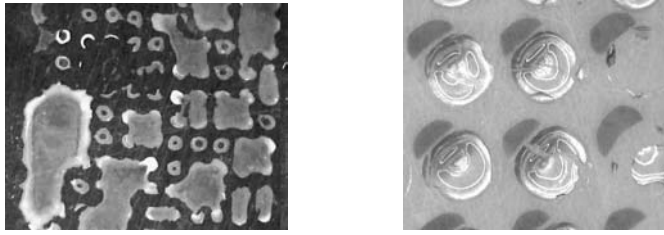


Abb. 153: Einfluss der Tropfengröße der Überzugsschicht auf das Aussehen der Produkte. Zu große Tropfen fließen ineinander und lösen die Proteinpartikel vollständig auf (links), zu kleine Tropfen (hell) bedecken nur einen Teil der Protein-Zucker-Schicht (dunkel, rechts).

Da der verwendete Dispensierroboter nur in begrenztem Umfang zur Abgabe von organischen Lösungen (aufgrund der hohen Viskosität) oder von wässrigen Dispersionen (aufgrund der Teilchengröße) geeignet war, wurde eine zweite Möglichkeit, betropfte Proben mit Überzügen zu versehen, eingesetzt. Diese Variante ging von fertig getrockneten Produkten aus, welche mit wässrigen oder organischen Lösungen mittels Sprühpistole überzogen wurden. Um die Partikel beim Besprühen nicht von den Trägern zu reißen, war ein sehr feiner Sprühstrahl nötig. Dazu wurde ein Gerät zur dünn-schichtchromatographischen Anfärbung, eine sogenannte „Spray gun“ eingesetzt. Hierdurch konnten sehr gleichmäßige Überzüge hergestellt werden, deren Dicke zwischen 0,3 und 1,0 mg/cm<sup>2</sup> steuerbar war. In Abb. 154 sind einige auf verschiedene Weisen und mit unterschiedlichen Mengen besprühte Produkte dargestellt. Die Bilder verdeutlichen die optischen Unterschiede zwischen optimal und nicht optimal überzogenen Proben. Das erste Produkt wies z.B. einen zu dünnen und nicht geschlossenen Überzug auf, wodurch es bei Kontakt mit dem Freisetzungsmedium zur sofortigen Auflösung kam. Der vorletzte Träger hingegen wurde mit einer zu dicken Überzugsschicht versehen, welche ungleichmäßig und nicht reproduzierbar war. Aus dem Vergleich von Produkt zwei und vier geht der Unterschied in der Gleichmäßigkeit der Überzüge bei Verwendung verschiedener Sprühgeräte (Sprühpistole bei zwei und „Spray gun“ bei vier) hervor. Das letzte in der Bilderreihe dargestellte Produkt wurde nach Optimierung der Sprüh-technik mittels „Spray gun“ hergestellt. Es wies einen klaren, geschlossenen, gleichmäßigen und reproduzierbar herstellbaren Film auf.

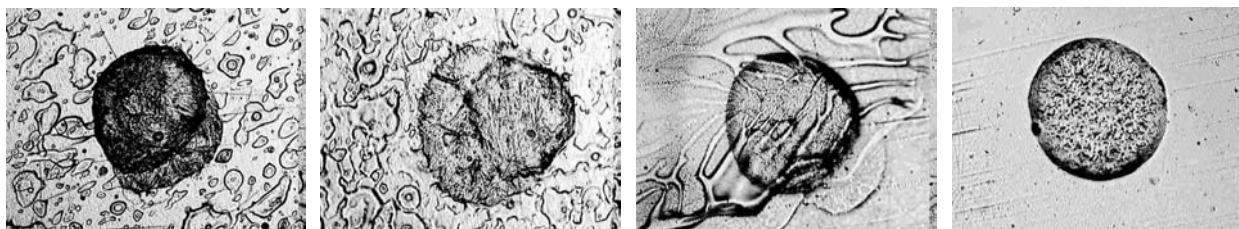


Abb. 154: Aussehen von mittels Sprühpistole nachträglich überzogenen Produkten. Je nach Feinheit des Sprühstrahls und Dicke der Überzugsschicht bilden sich mehr oder minder gleichmäßige Produkte aus. Die zwei Produkte links wurden mit „großtechnischen“ Sprühpistolen, die letzten zwei Produkte rechts mit der „Spray Gun“ überzogen.

## 7.2. Einsatz schnell löslicher Überzüge

Zum Schutz des Produktes vor Feuchte und mechanischer Beanspruchung während der Lagerung, bietet sich die Verwendung eines schnell löslichen Überzugs an. Dieser sollte weder die Freisetzung, noch das Aussehen der Produkte beeinflussen. Für unsere Untersuchungen wurden vollständig getrocknete Biodotproben mit einer organischen Hydroxypropylcelluloselösung (HPC in Aceton/Isopropanol) mittels „Spray gun“ überzogen. Hierdurch entstand ein dünner ( $0,4 \text{ mg/cm}^2$ ), homogener und vollkommen durchsichtiger Film. Die Protein-Zucker-Partikel wurden durch den Überzugsvorgang weder aufgelöst, noch vom Träger abgelöst, noch wiesen sie sonstige optische Veränderungen auf. Selbst leicht lösliches (und gut identifizierbares) Carboxyfluorescein wurde nicht aus den Partikeln herausgelöst (Abb. 155).

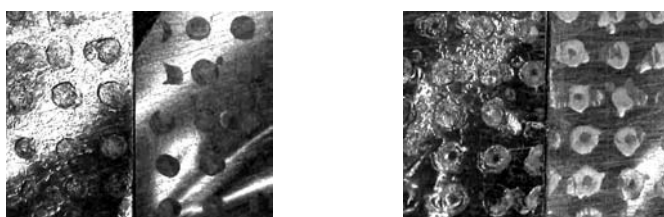


Abb. 155: Optischer Vergleich von mit HPC überzogenen Proben (jeweils links in den Bildern) und nicht überzogenen Proben (jeweils rechts in den Bildern). Weder Protein-Zucker-Partikel (rechtes Bild) noch Placebofarbstoffpartikel (linkes Bild) wiesen nach Überziehen eine optische Veränderung auf.

Die auf diese Weise erhaltenen Produkte wurden auf Haftung und Freisetzung geprüft. Hinsichtlich des Freisetzungsverhaltens in Wasser unterschieden sich überzogene Träger nur minimal von nicht überzogenen Produkten (Abb. 156). Die Freisetzungskurven beider Produkte erreichten nach maximal 15 Minuten ein Plateau, welches auf eine vollständige Freisetzung hindeutete (die geringe Gesamtfreisetzung beider Produkte lag an einer in diesem Versuch auftretenden Adsorption). Eine noch schnellere Freisetzung könnte durch leichte Schüttelbewegungen während der Freisetzung oder durch Schaffung von sink-Bedingungen erreicht werden. Die Stabilität von Erythropoietin wurde durch den HPC-Überzug nicht negativ beeinflusst und konnte während des gesamten Versuches erhalten werden.

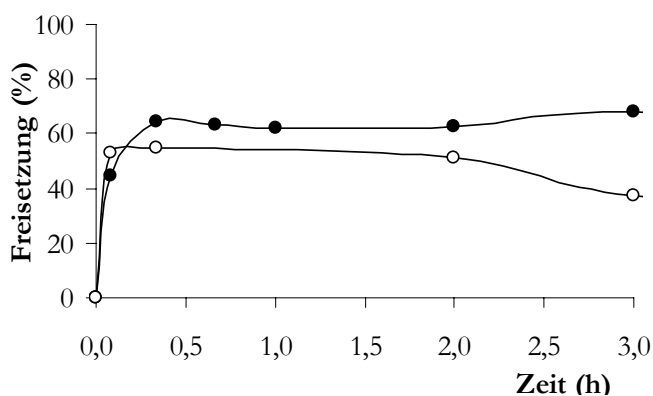


Abb. 156: Freisetzung von Epo + SPT Proben in Wasser mittels Freisetzungszelle. ● mit HPC-Überzug, ○ ohne Überzug, normale Biodotprobe. Die noch nicht optimierte Freisetzungszelle führte aufgrund von Adsorption zu einer verringerte Gesamtfreisetzung beider Proben.

Zur Untersuchung der mechanischen Schutzwirkung des Überzuges wurde die Haftung der applizierten Partikel überprüft. Im Gegensatz zu nicht überzogenen Produkten – welche zu 30 % abfielen – kam es bei überzogenen Proben während der Fallversuche (entsprechend C.II.5.3) zu keiner Ablösung (Tab. 39). Der Überzug bot einen hundertprozentigen mechanischen Schutz, was besonders für Produkte, welche bei Lagerung oder Transport stärkeren Belastungen ausgesetzt sind, oder bei welchen die Proteine auf schlecht haftenden Oberflächen, wie Teflon, appliziert sind, wichtig sein kann.

	% abgefallene Partikel nach x Fallversuchen			
	1 x	3 x	5 x	10 x
<b>SPT</b>	1	7	8	8
<b>SPT überzogen</b>	0	0	0	0
<b>SPT-CF</b>	19	21	26	29
<b>SPT-CF überzogen</b>	0	0	0	0

Tab. 39: Haftung von Placebopartikeln (SPT) und von carboxyfluoresceinhaltigen (CF) Partikeln auf PE-Folie mit und ohne HPC Überzug.

Zusammenfassend ermöglichte der Hydroxypropylcellulose-Überzug einen hervorragenden mechanischen Schutz der Biodotproben. Während sich weder das Aussehen, die Proteinstabilität (siehe auch C.II.7.3.4), noch die Freisetzung der überzogenen Proben im Vergleich zu nicht überzogenen Produkten veränderte, konnte durch den Überzug eine hundertprozentige Haftung der applizierten Proteine erzielt werden.

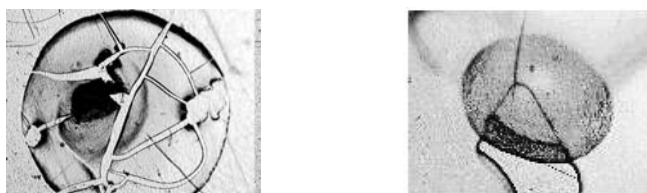
### 7.3. Einsatz verschiedener retardierender Filmbildner

Ziel dieses Teils der Arbeit war es, Biodotproben mit einem retardierenden Überzug zu versehen. Hierbei wurden verschiedene Filmbildner hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit zur Herstellung von Produkten mit gleichmäßigen, geschlossenen Filmen und einer retardierten Freisetzung untersucht.

#### 7.3.1. Eudragit RS

In einem ersten Ansatz wurden Proben, welche zuvor mit G-CSF-Rezeptur betropft wurden, mittels Mikrotropfenroboter mit Eudragit RS überzogen. Dazu wurden sowohl eine wässrige 30 %ige Dispersion (unter Zusatz von 3 % Triethylcitrat als Weichmacher), als auch eine 12 %ige ethanolische Lösung (ebenfalls mit Weichmacher) verwendet. Alle Proben wurden im Vakuum getrocknet und auf optische Integrität der Überzüge und auf Freisetzung der Proteine geprüft. Aus wässriger Dispersion hergestellte Filme wiesen viele, feine Risse auf (Abb. 157 links), wodurch es bei Zugabe von Freisetzungsmedium zur sofortigen Auflösung der Überzüge und zur Bildung einer milchigen Dispersion kam.

Aufgrund der hohen Mindestfilmbildetemperatur dieses Polymers, konnte weder bei der Dispensierung auf 30 °C warme Träger, noch bei Trocknung im Vakuum bei 20 °C ein geschlossener Film ausgebildet werden.



**Abb. 157:** Aussehen von mit Eudragit RS überzogenen Produkten. Links: Das Produkt wurde mit wässriger Dispersion überzogen. Der gebildete Film wies viele, feine Risse auf. Rechts: Dieses Produkt wurde mit organischer Lösung überzogen. Es entstand ein geschlossener Film. Zur besseren Veranschaulichung wurde ein Tropfen wiedergegeben, welcher nur teilweise vom Überzug bedeckt ist.

Bei Verwendung organischer Filmbildnerlösungen entstanden zwar Produkte mit rissfreien Überzügen (Abb. 157 rechts), diese wiesen jedoch noch eine Freisetzung von maximal 1,5 % G-CSF auf. Da die freigesetzte Lösung einen hohen Dimeranteil (10 %) enthielt, wurde die geringe Freisetzung vermutlich durch Denaturierung und Aggregation von G-CSF verursacht. Aggregierte Proteine können aufgrund ihrer Größe nicht durch den gequollenen Überzugsfilm diffundieren. Des Weiteren kann die Denaturierung, aufgrund der zunehmenden Hydrophobie, zur Adsorption der Proteine an den Überzug führen. Eine grundsätzliche Tendenz von G-CSF zur Adsorption verdeutlicht die Tatsache, dass im Gegensatz zum ebenfalls freigesetzten Phenylalanin, die detektierte Menge des im Freisetzungsmedium befindlichen Proteins mit zunehmender Versuchsdauer abnahm. Da es sich um ein geschlossenes System handelte, konnte diese Abnahme nur durch Adsorption hervorgerufen worden sein. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit zahlreichen Veröffentlichungen zur Adsorption diverser Proteine an Eudragit S (253, 254, 255). In diesen wird eine nicht spezifische, aber mit steigendem Polymergehalt sehr starke Adsorption beschrieben, wodurch bis zu 100 % der eingesetzten Proteine gebunden wurden. Da es sich bei Eudragit S und Eudragit RS um den selben Polymergrundkörper handelt, liegt die Vermutung nahe, dass es bei Eudragit RS ebenfalls zur Adsorption von Protein kommt. Zwar weist Eudragit RS im Gegensatz zu Eudragit S keine negativ geladenen Säureanhydritgruppen auf, von A. Kumar und M. Gupta (254) wurde jedoch postuliert, dass die Adsorption von Eudragit S ein rein auf hydrophoben Interaktionen beruhender Prozess ist, der nicht durch elektrostatische Wechselwirkungen zustande kommt. Vermutlich kam es also in unseren Versuchen zur Adsorption von G-CSF an das Überzugspolymer. Des Weiteren konnte von de Brito Amorim und Ferreira (256) mit Eudragit RS-Mikropartikeln keine Retardierung erzielt werden. Das enthaltene Casein wurde bereits nach einer Stunde vollständig freigesetzt. Aufgrund all dieser Beobachtungen erschien uns zur Herstellung retardierender Überzüge, Eudragit RS eher ungeeignet.

### 7.3.2. *Eudragit NE*

In einer weiteren Versuchsreihe untersuchten wir deshalb das Potential von Eudragit NE. Dieses wurde zunächst als wässrige Dispersion mit Hilfe des Mikrotropfenroboters über die Proteinschicht aufgebracht, da die Vertropfung organischer Lösungen aufgrund der hohen Viskosität nicht ausführbar war. Dennoch sollte dieses Mal die Ausbildung geschlossener Filme möglich sein, da die Mindestfilmbildetemperatur von Eudragit NE auch ohne Weichmacherzusatz bei ca. 10 °C liegt. Tatsächlich wurden rissfreie Überzüge gebildet. Allerdings kam es häufig zur Vermischung der zwei Schichten, wodurch eine neue Mischmatrix aus Protein, Zucker und Überzugsbestandteilen ausfiel. Optisch unterschieden sich diese neuen Mischprodukte einzig aufgrund der größeren Fläche und den teilweise längeren Kristallen von Protein-Zucker-Partikeln (Abb. 158).

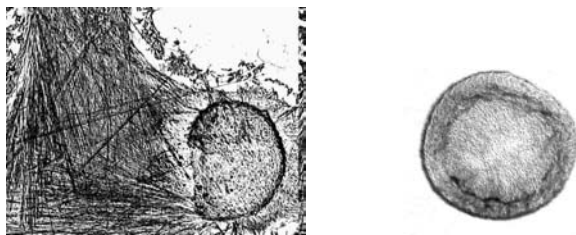


Abb. 158: Aussehen einer durch Vermischung der Proteinschicht mit der Überzugsschicht entstandenen „Mischmatrix“ (links) im Vergleich zu einem nicht überzogenen Partikel (rechts).

Sowohl diese Mischprodukte, als auch überzogene Produkte wiesen eine weniger starke Adsorption auf, als Produkte aus Eudragit RS. Insgesamt wurden bis zu 50 % G-CSF freigesetzt. Die Freisetzung erfolgte jedoch nicht retardiert, sondern innerhalb der ersten fünf Minuten. Proportional zur Überzugsdicke wurden in dieser Zeit unterschiedliche Mengen an Protein freigesetzt (Abb. 159, die Versuche wurden in einer Freisetzungszelle durchgeführt, siehe Methoden **B.2.1.11**). Während aus Produkten, welche durch Übertropfen mit einer einprozentigen Dispersion hergestellt wurden, 45 % der enthaltenen Proteine freigesetzt wurden (▲), setzten Proben mit Überzügen, welche aus einer 3,5 %igen Dispersion entstanden, nur noch 19 % frei (●). Durch Vermischung der hintereinander applizierten Schichten war eine Retardmatrix entstanden, aus welcher nur das in den äußeren Schichten enthaltene G-CSF heraus diffundieren konnte. Je höher der prozentuale Anteil an Polymer in der neuen Mischrezeptur war, desto weniger Protein hielt sich in den äußeren Matrixschichten auf und desto weniger wurde freigesetzt. Für die Entstehung einer Retardmatrix sprach, neben dem optischen Erscheinungsbild der Produkte, auch die nahezu identische Freisetzung von gezielt als Matrix (G-CSF, SPT und Eudragit Mischung) hergestellten Proben (▲).

Da in dieser Arbeit jedoch keine Retardmarix geschaffen werden sollte, wurde in einem nächsten Schritt versucht durch Herstellung von Überzügen mittels Sprühpistole die Struktur der Proteinschicht zu erhalten. Beim Übersprühen von vollständig getrockneten G-CSF-Biodotproben mit wässriger Eudragit NE Dispersion entstanden etwas ungleichmäßige, aber klare Filme. Es kam nicht zur Vermischung mit der Proteinschicht



und es trat keine optische Veränderung der Proteinschicht auf. Dennoch wiesen auch diese Produkte dasselbe, unbefriedigende Freisetzungsverhalten auf. Innerhalb der ersten fünf Minuten kam es, abhängig von der Dicke des Überzuges, zur Freisetzung eines unterschiedlichen Anteils an G-CSF (Abb. 159 rechts).

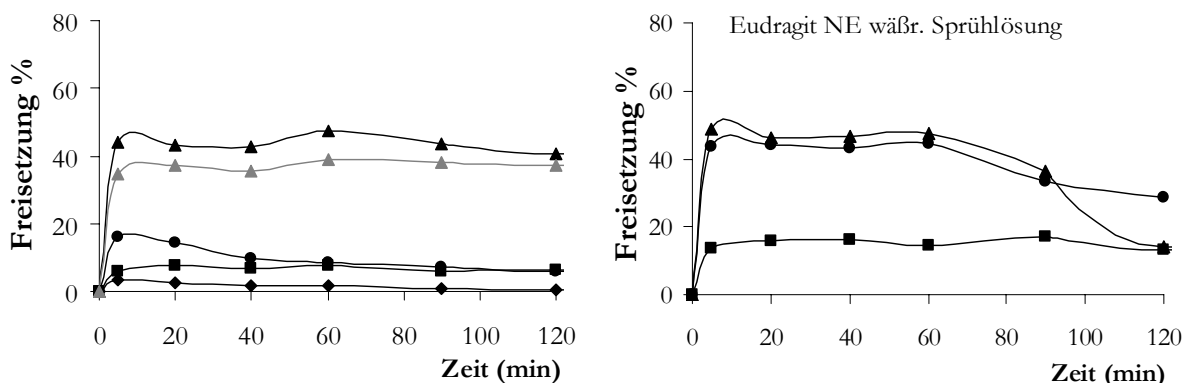


Abb. 159: Freisetzung von G-CSF + SPT Biodotproben, welche mit Überzügen versehen wurden, in einer Freisetzungszelle (siehe Methoden B.2.1.11). **Links:** Mit dem Mikrotropfendispenser aufgebraute wässrige Eudragit NE Dispersion: ▲ 1 %ige, ● 3,5 %ige, ■ 7 %ige, ◆ 30 %ige Dispersion, ▲ Protein-Eudragit-Matrix. **Rechts:** Nachträglich über die Biodotproben gesprühte wässrige Eudragit NE Dispersion: ▲ 1x, ● 2x, ■ 3x gesprüht.

Scheinbar war es für G-CSF nur möglich durch sehr dünne Polymerschichten zu diffundieren. Außerdem wurde bei allen Produkten, unabhängig von der Überzugstechnik, mit zunehmenden Polymeranteil eine steigende Menge an Aggregaten im FreisetzungsmEDIUM festgestellt (Tab. 40), weshalb die Vermutung nahe lag, dass G-CSF während der Freisetzung, ebenso wie bei den Versuchen mit Eudragit RS, aggregiert wurde und damit – sowohl aufgrund seiner Größe, als auch aufgrund von Adsorptionsphänomenen - nicht mehr freigesetzt werden konnte.

Proteinmonomer (%)	1 %D	3,5 %D	7 %D	1 % Matrix	1x besprüht	3x besprüht
nach 20 Minuten	99,1	95,6	80,8	98,7	98,4	94,1

Tab. 40: Stabilität von G-CSF während der Freisetzung aus verschiedenen überzogenen Produkten. Der prozentuale Polymeranteil in der wässrigen Überzugsdispersion (% D), bzw. in der Matrixrezeptur (% Matrix) wird in der Tabelle wiedergegeben.

Für weitere Versuche wurde deshalb Erythropoietin verwendet, welches zwar eine größere Molmasse und damit einen größeren Durchmesser aufweist, welches jedoch aufgrund seiner Glykosylierung sehr viel hydrophiler und stabiler ist. Hierdurch sollte die Wasserlöslichkeit erhöht sein und es sollte in geringerem Maße zur Adsorption und Aggregation kommen. Tatsächlich konnten von diesem Protein zwischen 50 und 100 % der eingesetzten Menge wiedergefunden werden, das Freisetzungsverhalten der Proben änderte sich jedoch weder für mittels Mikrotropfenroboter überzogene Produkte (Abb. 160 Dreiecke), noch für mit wässriger Dispersion besprühte Träger (Abb. 160 Kreise). Immer noch setzten alle Produkte, entsprechend der zugegebenen

Polymermenge, nur einen Teil der Proteine innerhalb weniger Minuten frei. Dabei wurde eine höhere Gesamtfreisetzung erzielt, wenn Eudragit erst mit den vollständig getrockneten Proteinen in Kontakt kam (●) und nicht bereits vor Vakuumtrocknung aufgesprüht wurde (○). Dies lag vermutlich an dem für die Proteinwiederfindung ungünstigem Kontakt der Überzugsbestandteile mit der noch nicht getrockneten Proteinschicht. Auch durch Zusatz eines Porenbildners, PEG, zur Eudragit Dispersion konnte keine Verbesserung erzielt werden. Die Freisetzung erfolgte unvollständig, aber sofort (△).

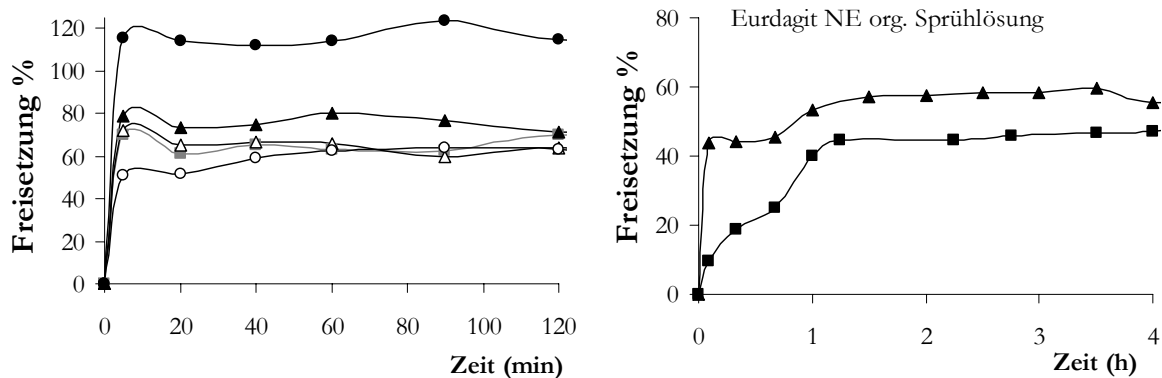


Abb. 160: Freisetzung von Epo+SPT Biodotproben, welche mit Eudragit NE Überzügen versehen wurden. **Links:** Mit dem Mikrotropfendispenser aufgebrauchte wässrige Dispersion: ▲ 5,5 %ige, △ 5,5 %ige Dispersion mit 20 % PEG, ■ Protein-Eudragit-Matrix. Nachträglich über die Biodotproben gesprühte wässrige Dispersion: ● nach Vakuum, ○ vor Vakuum. **Rechts:** Nachträglich über die Biodotproben gesprühte, organische Dispersion: ▲ 0,6 mg/cm<sup>2</sup>, ■ 2,7 mg/cm<sup>2</sup> Überzugsdicke.

Bei Betrachtung der Proben nach Freisetzung mittels Auflichtmikroskop fiel auf, dass diese zum Teil ein identisches Aussehen mit Proben vor der Freisetzung aufwiesen, dass sich zum Teil jedoch Löcher an Stellen gebildet hatten, an welchen vormals getrocknete Proteinzuckertropfen aufgebracht waren (Abb. 161). Optisch unveränderte Proben wiesen meist einen relativ dicken Überzug auf, durch welchen scheinbar nur sehr wenig Wasser diffundierte. Das in den Proteinpartikeln enthaltene schwerlösliche Phenylalanin konnte hierdurch nicht vollständig gelöst werden und die optische Integrität der Partikel blieb erhalten. Bei Proben, welche von einem sehr dünnen Überzug bedeckt wurden, könnte es dagegen bei Auflösung der Proteinpartikel zur Sprengung des Überzuges gekommen sein und damit zur sofortigen Freisetzung der gesamten Proteinpartikel. Dies würde die vollständige Freisetzung von mit einer dünnen Schicht übersprühten Proben erklären.

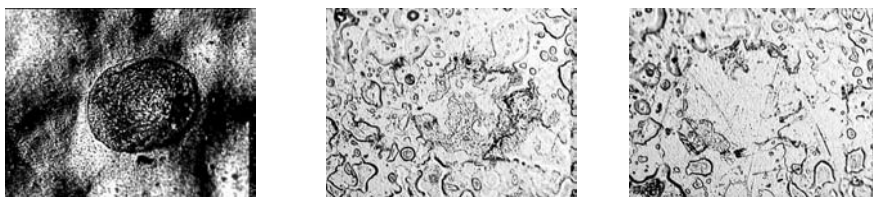


Abb. 161: Aussehen der Proben nach Freisetzung. Teilweise wiesen die Proben keine Veränderung zu ihrem Aussehen vor der Freisetzung auf (links), teilweise entstanden Löcher an Stellen, an welchen zuvor Proteinpartikel aufgebracht waren (Mitte und rechts).

Insgesamt wurde in keinem der Versuche ein haltbarer, und dennoch permeabler Überzug gebildet. Mit einer wässrigen Dispersion war es bei den verwendeten Temperaturen demnach nicht möglich, einen homogenen Film herzustellen. Deshalb wurde in einem weiteren Ansatz eine organische Eudragit NE Lösung mit 20 % Dibutylphthalat als Weichmacher mittels „Spray gun“ auf Epo-Proben aufgetragen. Das Produkt mit dem dickeren Überzug wies nun eine Retardierung von einer Stunde und eine fast lineare Freisetzungskinetik auf (Abb. 160 rechts, ■). Aufgrund der immer noch sehr geringen Gesamtfreisetzung – vermutlich hervorgerufen durch die Adsorption an das Eudragitgrundgerüst – wurde beschlossen ein anderes Filmbildnerpolymer einzusetzen.

### 7.3.3. Ethylcellulose

Organische Ethylcelluloselösung mit 20 % Dibutylphthalat als Weichmacher wurde mittels „Spray gun“ über vollständig getrocknete Biodotproben gesprüht, wodurch gleichmäßige, durchsichtige Filme entstanden, ohne dass es zur Auflösung der Proteinpartikel kam. Im Gegensatz zu Eudragit NE Filmen, welche bei Kontakt mit Wasser milchig trüb aufquollen, veränderten diese Filme ihr Aussehen während der Freisetzung nicht (abgesehen davon, dass sie aufquollen und elastisch wurden). Die enthaltenen Protein-Zucker-Phenylalanin-Partikel färbten sich bei Kontakt der überzogenen Proben mit Wasser zunächst weiß und verblassten mit der Zeit wieder, so dass eine erste optische Beobachtung der Freisetzung möglich wurde (Abb. 162). Mit zunehmender Dicke der Überzugsschicht verblassten die weißen Partikel langsamer. Es war also anzunehmen, dass auch die Auflösung und damit die Freisetzung der enthaltenen Proteine abhängig von der Überzugsdicke unterschiedlich schnell erfolgen sollte.

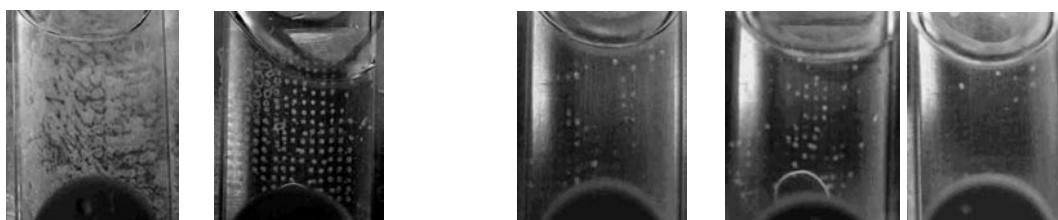


Abb. 162: Aussehen von verschieden überzogenen Proben während der Freisetzung. Die ersten zwei Bilder entstanden 20 Minuten nach Zugabe des Freisetzungsmittels zu Eudragit NE (links) und Ethylcellulose Proben (rechts). Das mittlere Bild (mit 0,6 mg/cm<sup>2</sup> EC-Überzug) entstand nach 2 Stunden, die Bilder rechts (mit 1,0 mg/cm<sup>2</sup> EC-Überzug) nach 2 und 5 Stunden Freisetzung.

In Abb. 163 sind die erzielten Freisetzungskurven für Erythropoietin wiedergegeben. Mit Ethylcellulose Überzügen war es möglich retardierte Freisetzungen über mehrere Stunden zu erhalten. Die Stärke der Retardierung ließ sich durch die Dicke des Überzugs steuern, wobei die in der Graphik dargestellten Daten zwar reproduzierbar waren, jedoch spezifisch nur für die verwendete Versuchsdurchführung galten.

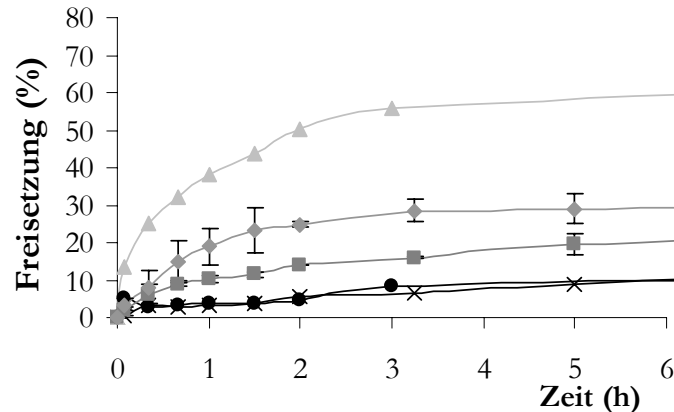


Abb. 163: Freisetzung von Epo+SPT Biodotproben, welche mit Ethylcellulose-Überzügen versehen wurden. Der Überzug wurde nachträglich mittels „Spray gun“ aufgebracht. Freisetzung in 2 ml Wasser. ▲ 0,3 ● 0,4 ■ 0,5 ● 0,6 ⊗ 0,7 mg/cm<sup>2</sup>.

Den Einfluss der Freisetzungsbedingungen verdeutlicht Abb. 164, durch Gegenüberstellung von Freisetzungskurven identisch überzogener Proben in unterschiedlichen Freisetzungsvolumina. Während durch einen 0,6 mg/cm<sup>2</sup> dicken Überzug bei Durchführung des Versuches in 2 ml Wasser (übliche Bedingungen) nach vier Stunden nur ca. 10 % Epo freigesetzt wurden (●), diffundierten aus einer identischen Probe bei Ausführung der Versuche in 3 ml Wasser in derselben Zeit 20 % Protein ins Freisetzungsmittel (○). Da diese Versuche jedoch nur der Orientierung, ob eine retardierte Freisetzung mittels Überzügen grundsätzlich machbar ist, dienen sollten, war die Verwendung nicht optimierter Versuchsbedingungen unerheblich. Unabhängig vom verwendeten Versuchsdesign kam es immer zur einer Verlangsamung der Freisetzung.

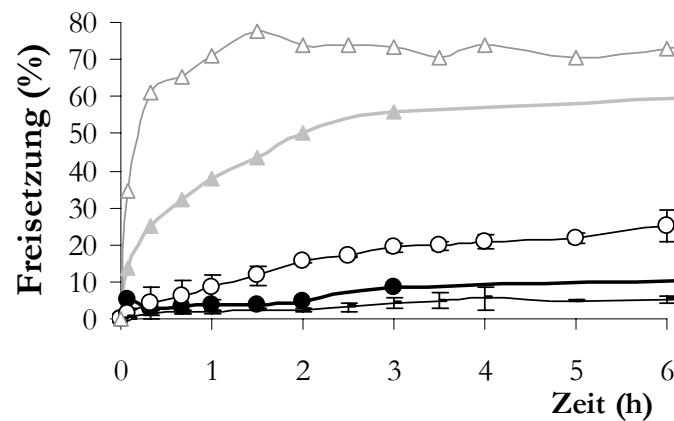


Abb. 164: Vergleich der Freisetzungen in 2 ml und 3 ml Wasser (Dicke der Überzüge wie in Abb. 163). Probe mit 0,3 mg/cm<sup>2</sup> Überzug ▲ in 2 ml und △ in 3 ml. Probe mit 0,6 mg/cm<sup>2</sup> Überzug ● in 2 ml und ○ in 3 ml. Probe mit 1,0 mg/cm<sup>2</sup> ⊕ in 3 ml.

Zur Einstellung der gewünschten Retardierung bot sich neben der Überzugsdicke der Zusatz von PEG an. Dieser sollte als Porenbildner wirken, und auf diese Weise die Freisetzungsgeschwindigkeit erhöhen. Bei unseren Experimenten konnte jedoch nur in einigen Fällen eine erhöhte Freisetzung beobachtet werden (Abb. 165 ▲-△), während in anderen Versuchen die Freisetzung gleich blieb (●-○). Vermutlich lag dies an einer

ungleichmäßigen Verteilung von PEG in der Rezeptur, oder einer zu geringen Konzentration. In Anlehnung an zahlreiche Vorschläge in der Literatur über Polymerimplantate oder Mikropartikel bieten sich zur Beeinflussung der Freisetzungskinetik von Polymerüberzügen mannigfaltige Variationsmöglichkeiten, welche jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht werden sollten. Grundsätzlich ist zu vermuten, dass sich die Diffusion von Proteinen durch einen Polymerüberzug ähnlich wie die Diffusion aus Polymerimplantaten verhält, mit dem Unterschied, dass überzogene Produkte keinen „burst-effekt“ aufweisen. Dieser durch nicht verkapselten oder nur in den äußersten Schichten eingeschlossenen Wirkstoff verursachte Effekt kann bei wirkstofffreien Überzügen nicht auftreten.

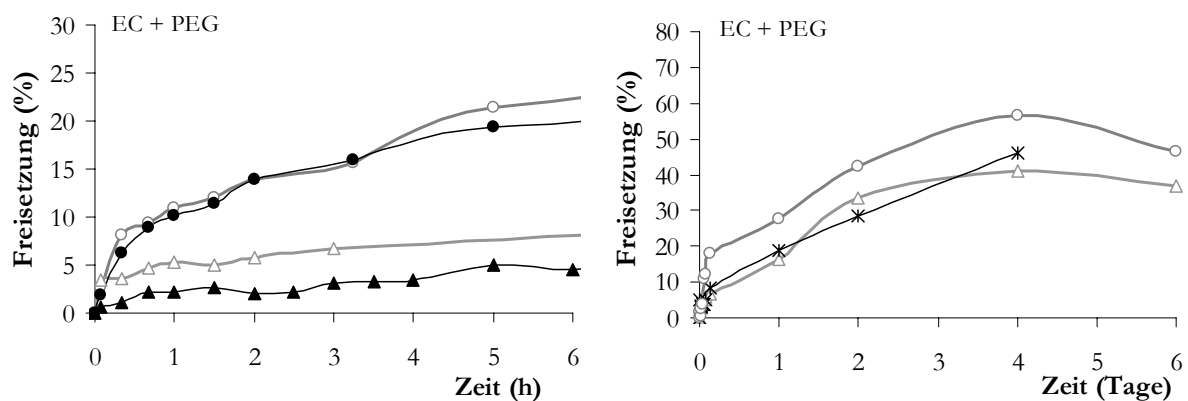


Abb. 165: Beeinflussung der Freisetzung (in Stunden links und in Tagen rechts) von Epo durch Zugabe von PEG zur EC-Überzugslösung. ● 0,5 mg/cm<sup>2</sup>, ○ 0,5 mg/cm<sup>2</sup>+ 20 % PEG, ▲ 1,0 mg/cm<sup>2</sup>, △ 1,0 mg/cm<sup>2</sup>+ 20 % PEG; ✕ 0,7 mg/cm<sup>2</sup>.

Insgesamt konnte mit Hilfe einfacher Ethylcelluloseüberzüge eine reproduzierbare Retardierung über 10 Stunden erzielt werden. Aus Abb. 166 und Abb. 165 (rechts) wird des weiteren deutlich, dass es auch möglich war, längere, bis ca. 4 Tage dauernde, Retardierungen zu erreichen. Aufgrund der geringen Volumina, der Störung durch eine Undichtigkeit der Freisetzungszellen, und den auftretenden Adsorptionsphänomenen ließen sich diese Ergebnisse nicht mit exakt gleichen Werten reproduzieren, der grundsätzliche Trend blieb jedoch erhalten.

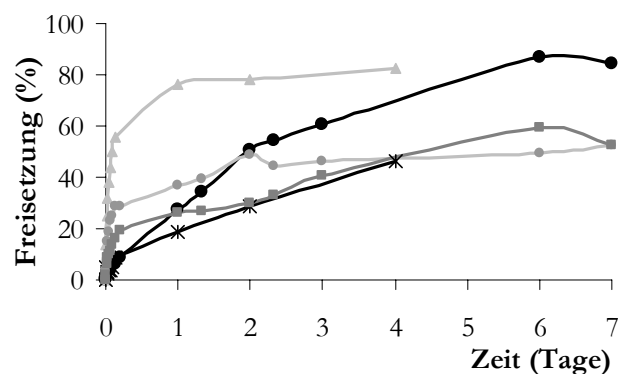


Abb. 166: Freisetzung von Epo + SPT Biotodproben, welche mit Ethylcelluloseüberzügen versehen wurden. Der Überzug wurde nachträglich mittels „Spray gun“ aufgebracht. ▲ 0,3 ● 0,4 ■ 0,5 ● 0,6 ✕ 0,7 mg/cm<sup>2</sup>.

Während zunächst eine lineare Freisetzung detektiert wurde, kam es nach ca. zwei Tagen bei manchen Versuchen zur Abflachung der Kurve. Da es aufgrund der geringen Proteinkonzentrationen nicht möglich war, das FreisetzungsmEDIUM zu wechseln, lag dies eventuell an einer zunehmenden Adsorption der Proteine an die Freisetzungszelle und das Überzugspolymer. Bereits freigesetztes Protein entzog sich hierdurch der Analytik, wodurch es teilweise sogar zur scheinbaren Abnahme der insgesamt freigesetzten Menge Protein kam. Auch durch Adsorption von freigesetztem Protein an den Überzug und durch die hierdurch verursachte Blockade der Poren, kann es zu einer Diffusionsverlangsamung kommen (257), diese sollte jedoch bereits zu Beginn der Freisetzung und nicht erst nach zwei Tagen auftreten.

Besonders häufig trat der Effekt „der abnehmenden Freisetzungskonzentration“ bei G-CSF-Proben auf (■), was in diesem Fall mit einer zunehmenden Aggregation des Proteins während der Freisetzung bei 25 °C einher ging (siehe C.II.7.3.4). Zwei dennoch geglückte Freisetzungen gibt Abb. 167 wieder (△●). Auch für G-CSF Produkte war es also grundsätzlich möglich, durch EC-Überzüge eine retardierte Freisetzung zu erhalten.

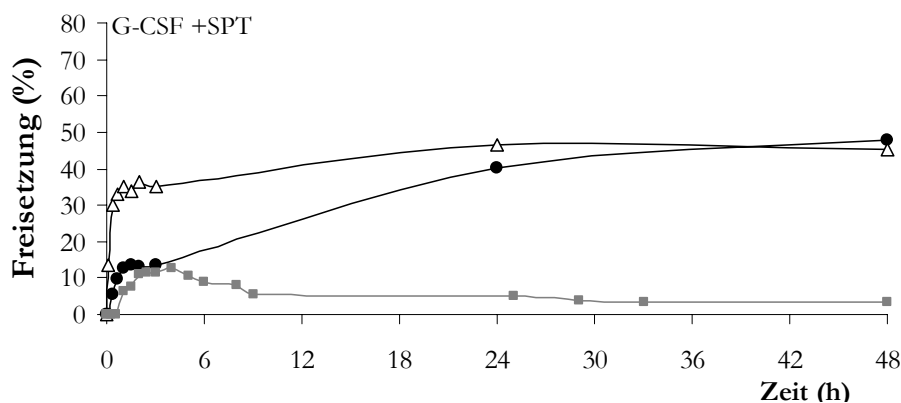


Abb. 167: Freisetzung von G-CSF aus mit EC überzogenen Proben. △ 0,8 mg/cm<sup>2</sup> + 10 % PEG, ● 0,7 mg/cm<sup>2</sup>, ■ 0,5 mg/cm<sup>2</sup>.

#### 7.3.4. Einfluss organischer Lösungsmittel und Proteinstabilität

Um sicherzustellen, dass die bisher beobachteten Retardierungen nicht durch die Besprühung mit organischen Lösungsmitteln, sondern durch den Polymerüberzug verursacht wurden, besprühten wir sowohl Epo, als auch G-CSF Biodotproben mit einer Isopropanol-Aceton-Mischung, und überprüften die Freisetzung der Produkte. Die erhaltenen Freisetzungskurven waren absolut identisch mit Kurven nicht überzogener Produkte. Innerhalb von fünf Minuten wurde das gesamte Protein freigesetzt. Allein das Besprühen mit organischen Lösungsmitteln verursachte demnach keine Retardierung. Allerdings kam es bei alleinigem Besprühen mit organischen Lösungsmitteln bei beiden verwendeten Proteinen zur Bildung von Aggregaten, wie aus den SE-HPLC-Chromatogrammen in Abb. 168 entnommen werden kann. Dagegen wurden mit organischer Polymerlösung besprühte Proben vor Aggregation geschützt, indem es zur

schnellen Ausbildung einer festen Schutzschicht kam. Darüber aufgesprühte organische Lösung kam nicht mehr in Kontakt mit den Proteinen und rief keine Schäden hervor.

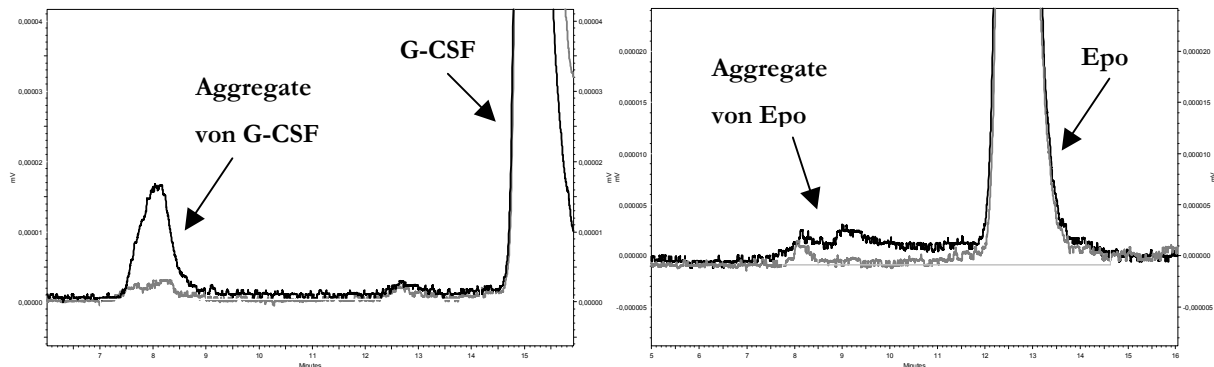


Abb. 168: SE-HPLC von Proben ohne Überzug (grau) und von Proben, welche mit organischen Lösungsmitteln besprüht wurden (schwarz), nach 30 minütiger Freisetzung. Dargestellt sind G-CSF (links) und Epo (rechts).

Mit organischem Lösungsmittel besprühte Proben wurden zusammen mit verschiedenen überzogenen Produkten mittels SDS-PAGE untersucht. Aus den Gelen in Abb. 169 geht hervor, dass G-CSF grundsätzlich stärker zur Aggregation neigt als Epo, und dass innerhalb eines Gels immer die mit organischem Lösungsmittel besprühte Probe die meisten Nebenbanden aufweist (Pfeil). Der HPC-Überzug verursachte bei einer G-CSF-Probe fast keine Aggregation (Spalte 6), wohingegen die mit EC-Überzug versehenen Proben nach zweistündiger Freisetzung deutliche Aggregate enthielten (Spalte 8). Von den zwei über Epo-Proben aufgetragenen Retardüberzügen rief nur Eudragit NE eine starke Aggregation hervor (Spalte 9), während mit Ethylcelluloseüberzug versehene Proben ihre volle Stabilität bewahrten (Spalte 8, die innerhalb von 20 Minuten freigesetzte Probe enthält noch fast kein Protein, siehe auch Abb. 170).

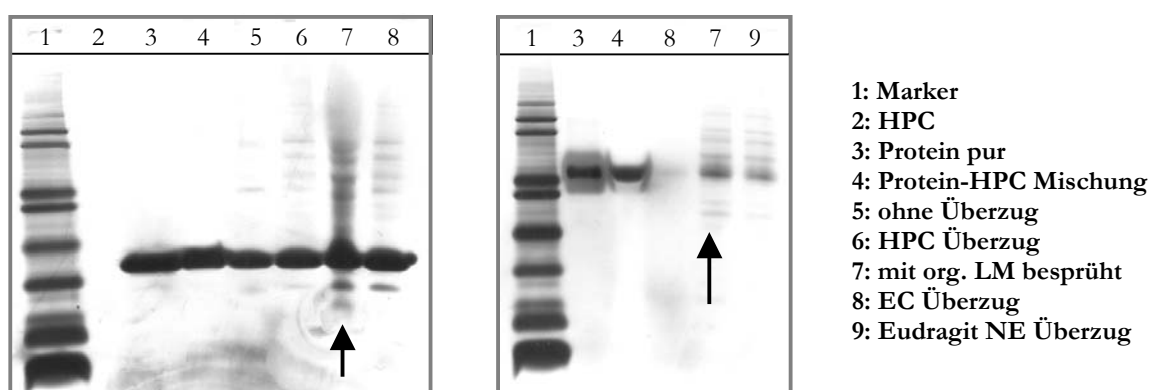


Abb. 169: Nicht reduzierende SDS-PAGE von G-CSF (links) und Epo (rechts) Proben, welche mit verschiedenen Filmbildnern überzogen wurden. Mit Pfeilen sind die mit organischem Lösungsmittel (Isopropanol/Aceton ohne Filmbildner) besprühten Proben gekennzeichnet.

Da sich, entsprechend den Freisetzungskurven, zur Retardierung besonders Überzüge aus Ethylcellulose anbieten, wurde in diesen Produkten die Proteinestabilität genauer untersucht. Mittels SE-HPLC wurden im Freisetzungsmedium nur geringe Mengen an

Erythropoietindimeren festgestellt. Innerhalb der ersten Stunden enthielt die freigesetzte Lösung 1,5 bis 2 % Dimere und auch nach drei Tagen Freisetzung bei Raumtemperatur kam es nur zur geringfügigen Zunahme des Aggregatanteils (6 %). Mittels SDS-PAGE konnte die gute Stabilität von freigesetztem Erythropoietin ebenfalls bestätigt werden (Abb. 170). Das Gel veranschaulicht die retardierte Freisetzung aus überzogenen Proben. In den Spalten zwei bis fünf des Gels sind mit zunehmender Freisetzungsdauer ansteigende Bandenintensitäten zu erkennen.

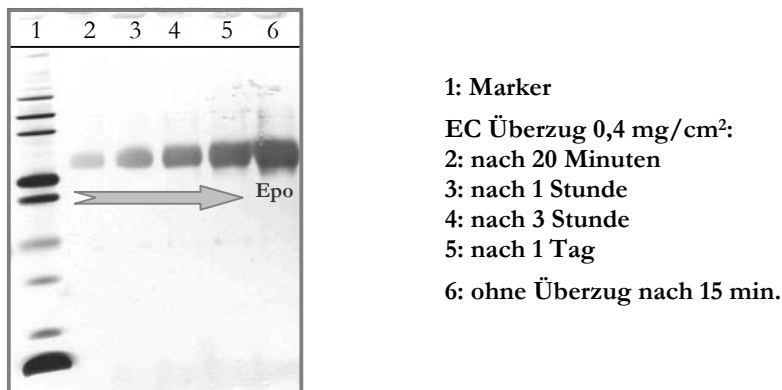


Abb. 170: SDS-PAGE von mit EC überzogenen Proben, welche nach unterschiedlich langer Freisetzung entnommen und aufgetragen wurden. Der Pfeil verdeutlicht die zunehmende Freisetzungsdauer.

Die Stabilität des eingeschlossenen und noch nicht freigesetzten Proteins konnte nicht direkt bestimmt werden. Aufgrund der Untersuchung von Proben mit fehlerhaften Überzügen, bei welchen sich der Überzug nach einiger Zeit spontan vom Träger ablöste, und das gesamte noch eingeschlossene Protein freigesetzt wurde, wurde auch für das eingeschlossene Epo die Erhaltung der Stabilität angenommen. Abb. 171 gibt die Freisetzung einer solchen Probe wieder.

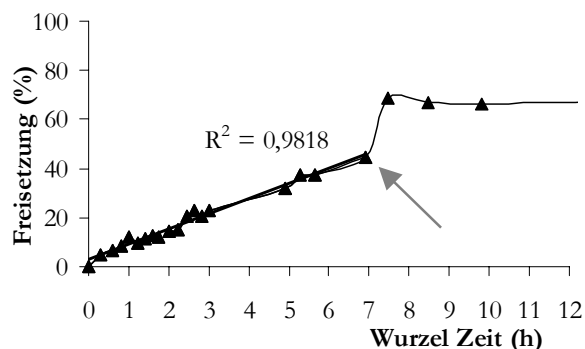


Abb. 171: Freisetzung von Epo+SPT Biodotproben, welche mit Ethylcellulose-Überzügen versehen wurden, im Higuchi-Blot. Freisetzung in 2 ml Wasser. ▲ 0,9 mg/cm<sup>2</sup>. Nach 7 Stunden kam es zur ungeplanten Ablösung des Überzuges und dadurch zur spontanen Freisetzung (Markierung durch den Pfeil).

Nach sieben Stunden kam es zur vollständigen Ablösung des Überzuges (Abb. 171 Pfeil). In der nach Ablösung des Überzuges erhaltenen Probe wurde im Vergleich zu Proben, welche vorher freigesetzt wurden, keine Veränderung im Aggregatgehalt detektiert. Sofern die Aggregate nicht so fest an das Polymer adsorbierten, dass sie auch bei Ablösung des



Überzuges nicht freigesetzt wurden, sollte es in der eingeschlossenen Probe zu keiner Aggregation gekommen sein. Durch Darstellung der Freisetzung im Higuchi-Blot wird deutlich, dass die Probe, bis zur Ablösung des Überzugs, diffusionskontrolliert freisetzte. Auch alle anderen funktionstüchtigen Überzüge wiesen eine diffusionsgesteuerte Freisetzung auf.

Im Gegensatz zu Erythropoietin kam es bei der Freisetzung von G-CSF mit zunehmender Freisetzungsdauer zur Entstehung von Aggregaten (Tab. 41), was aufgrund der ausgeprägten Neigung dieses Proteins zur Denaturierung nicht erstaunlich war. Bei einer Freisetzungsdauer über vier Stunden wurde häufig sogar eine Abnahme der freigesetzten Menge Protein detektiert, vermutlich durch Entzug des entfaltenen G-CSFs aus der Lösung aufgrund von Adsorption (Abb. 167 ■). Wegen der bei diesen Experimenten beobachteten geringen Gesamtfreisetzung ist davon auszugehen, dass G-CSF auch innerhalb der eingeschlossenen Partikel aggregierte.

Zeit (h)	2	2,5	3	4	5	6	8
Proteinmonomer (%)	95,0	93,8	91,6	88,3	85,0	81,0	82,9

Tab. 41: Stabilität von G-CSF während der Freisetzung aus mit EC überzogenen Proben.

Zusammenfassend konnte mit diesen Versuchen gezeigt werden, dass es möglich ist, überzogene Biodotproben herzustellen, welche eine über mehrere Stunden oder Tage retardierte Freisetzung aufweisen. Als am besten geeignet stellte sich die Besprühung mit organischer Ethylcellulose heraus. Erythropoietin bewahrte während der Freisetzung seine volle Stabilität und wurde vermutlich auch nicht innerhalb der eingeschlossenen Partikel aggregiert. Insgesamt scheint die Aufbringung von Überzügen über Biodotproben eine potente Möglichkeit zur Beeinflussung der Freisetzungskinetik zu sein. In Anlehnung an die Erfahrungen bei der Freisetzung aus Polymerimplantaten, bestehen auch hier noch vielseitige Variationsmöglichkeiten. Da mit dieser Arbeit nur ein grundlegender Eindruck von der Realisierbarkeit gewonnen wurde sollte, wurden weitere Optimierungen nicht durchgeführt.

## 8. Trennung inkompatibler Stoffe

Die gezielte Applikation von Proteinen mittels Biodotmethode eröffnet, im Gegensatz zur Tränkung oder Besprühung von Trägern, die Möglichkeit zur gleichzeitigen Aufbringung von miteinander unverträglichen Stoffen auf einem Träger. Die Unverträglichkeit kann an einer direkten Reaktion der Proteine miteinander liegen, oder an den für ein Protein ungünstigen Milieubedingungen des anderen Stoffes. Es ist bekannt, dass Proteine bei sehr unterschiedlichen pH-Werten ihre optimale Stabilität

aufweisen. Während z.B. Erythropoietin bei physiologischen pH-Werten stabil ist, neigt rh G-CSF im Neutralen zur Aggregation und kann bei einem pH-Wert von ca. 3,5 - 4 optimal stabilisiert werden. Eventuell kommt es auch zwischen den notwendigen Stabilisatoren der zwei Rezepturen zu Inkompatibilitäten. Dieses ebenfalls bei Produkten zur parenteralen Ernährung bekannte Problem wird üblicherweise durch Trennung der inkompatiblen Bestandteile (Aminosäure und reduzierender Zucker) geregelt. Auch bei mittels Biodotmethode hergestellten Produkten kann eine solche Trennung erfolgen, indem die unverträglichen Stoffe unabhängig voneinander auf verschiedene Teile eines Trägers, oder leicht versetzt voneinander aufgetropft werden (Abb. 172).

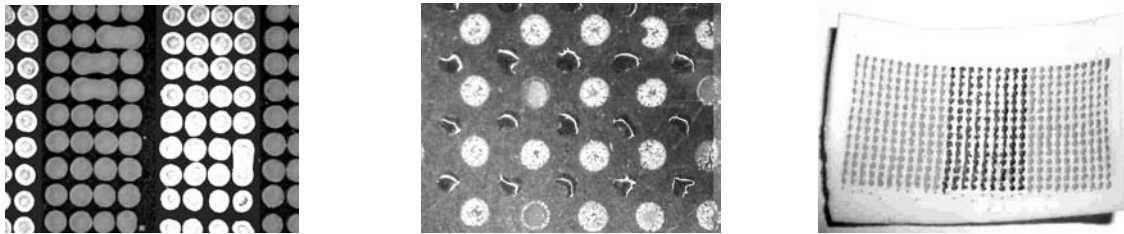


Abb. 172: Mikroskopische Aufnahmen von mit verschiedenen Stoffen (hell und dunkel) betropften Trägern, links in Reihen abwechselnd nebeneinander und rechts leicht versetzt zueinander auf derselben Fläche. Ganz rechts ist ein in der Mitte mit anderer Lösung betropfter Träger im Überblick dargestellt.

Zur Überprüfung der Effektivität dieser Trennung wurden G-CSF und Epo direkt neben einer Proteinase-Lösung (entsprechen dem Produkt in Abb. 172 links) auf einen PE-Träger aufgetropft und getrocknet. Bei Wahl geeigneter Tropfengrößen berührten sich die zwei Lösungen nicht, und hafteten absolut getrennt voneinander am Träger. Bei der verwendeten Proteinase handelte es sich um ein unspezifisch spaltendes Enzym, welches – wie in einem Vorversuch gezeigt werden konnte - sowohl Epo als auch G-CSF in der eingesetzten Konzentration völlig oder fast völlig spaltete (Abb. 173). Die SE-HPLC-Chromatogramme von Mischungen aus Enzym und therapeutischem Protein (schwarz) wiesen neben dem Monomerpeak einige definierte Peaks von Spaltprodukten auf. G-CSF wurde in dieser Mischung sogar völlig zersetzt, so dass keinerlei Monomer detektiert werden konnte.

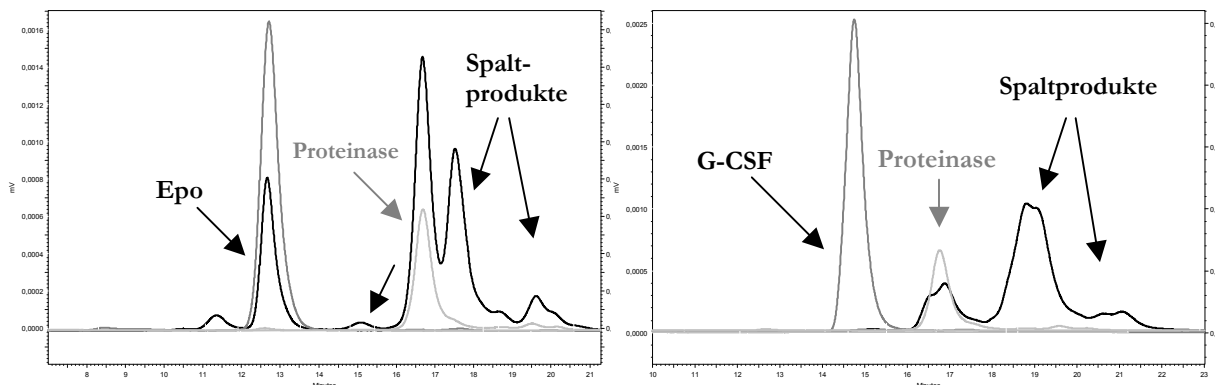


Abb. 173: SE-HPLC Chromatogramme von Epo (links) und G-CSF (rechts) Proben. Dargestellt sind pures Protein (dunkelgrau), Proteinase (hellgrau) und eine Mischung aus beiden (schwarz).

Die selbe Zersetzung trat auch auf, wenn das Enzym mittels Biodotmethode nachträglich über die zuvor dispensierten, angetrockneten, therapeutischen Proteine getropft wurde (Abb. 174 grau). Da beide Stoffe auf exakt dieselbe Stelle aufgebracht wurden, und die Aktivität des Enzyms durch die Biodottrocknung nicht beeinträchtigt wurde, kam es entweder bereits in den angetrockneten Proben, oder bei Rekonstitution der Proben zur Reaktion der Proteine miteinander. Wurde das Enzym jedoch nicht auf, sondern neben die zuvor dispensierten Proteine getropft (entsprechend Abb. 172 links), kam es zur vollständigen Trennung der zwei Stoffe und die Stabilität der therapeutischen Proteine konnte erhalten werden (Abb. 174 schwarz). Abgesehen von der normalen Basislinienschwankung aufgrund der Einspritzung und des an dieser Stelle ebenfalls detektierten Phenylalanins, wurden bei getrennt aufgetropften Proben keinerlei Peaks hinter dem Monomerpeak (Spaltprodukte) aufgezeichnet. Die Fläche des Monomerpeaks entsprach der Fläche einer alleine dispensierten Biodotprobe.

Die Applikation von Proteinen mittels Biodotmethode stellt demnach ein geeignetes Mittel zur Aufbringung von miteinander inkompatiblen Stoffen auf einen einzigen Träger unter Erhaltung der Stabilität beider Stoffe dar.

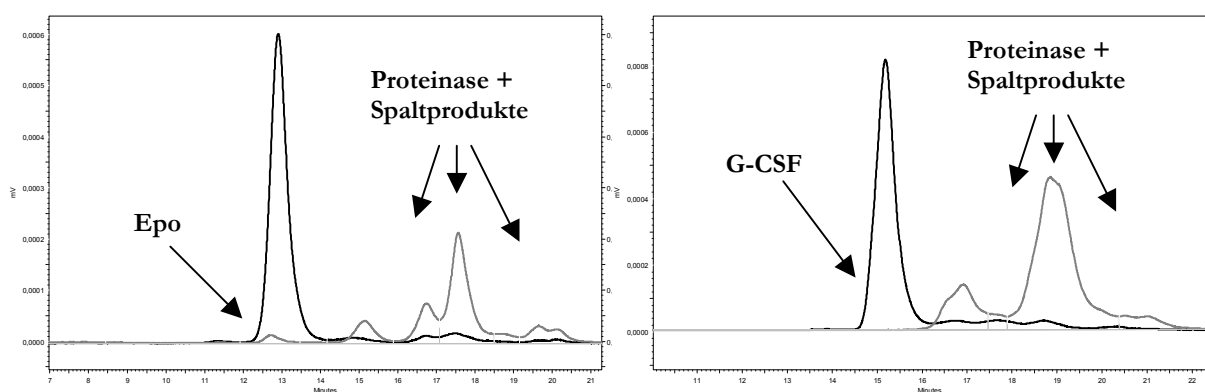


Abb. 174: SE-HPLC Chromatogramme von Epo (links) und G-CSF (rechts) Proben, nach Dispensierung und Trocknung entsprechend der Biodotmethode. Dargestellt sind getrennt vom Enzym in parallelen Reihen vertropftes Protein (schwarz) und übereinander getropftes Protein und Enzym (grau).

## 9. Zusammenfassung „Applikation und Trocknung mittels Mikrotropfen“

Ziel dieses Teils der Arbeit war es, eine Methode zu entwickeln, mit der konzentrierte Proteinlösungen auf Oberflächen platziert und getrocknet werden können. Basierend auf der Verwendung eines Mikrotropfenroboters war es möglich, eine Trocknungsmethode zu schaffen, bei der im Gegensatz zur Tränkung oder zum Besprühen von Trägermaterialien, eine exakte Aufbringung vorbestimmter Proteinmengen zu erreichen ist. Durch die genaue, vorprogrammierte Aufbringung der Proteinlösung eignet sich diese Technik hervorragend zur Applizierung von Proteinen auf Oberflächen, wie Implantaten oder Medical Devices. Insgesamt dürfte die Methode besonders für niedrig dosierte Proteinarzneiformen von Interesse sein.

Im Rahmen der Arbeit wurde eine zwei Schritte umfassende Methode entwickelt, um trockene Proteindarreichungsformen unter Erhalt der Proteinstabilität herzustellen. Dazu werden im ersten Schritt geringe Volumina einer Proteinlösung, ca. 20 µl, mit Hilfe eines Mikrotropfenroboters in 20 nl große Tropfen dispensiert und in vorprogrammierten Mustern auf einer beliebigen Oberfläche platziert. Hierdurch entsteht ein auf den Trägern gut haftendes Muster aus winzigen Tröpfchen mit einer Restfeuchte von ca. 5 %, und einer vollständig erhaltenen Proteinstabilität. In einem zweiten Schritt werden diese Produkte mittels Vakuumtrocknung innerhalb von ca. sechs Stunden auf Restfeuchten unter 1 % getrocknet. Unabhängig von der Dauer der Vakuumtrocknung hat auch dieser Schritt keinen negativen Einfluss auf die Proteinstabilität. Die fertigen Produkte können je nach Form der Träger in verschiedenen Verpackungen, dicht verschlossen gelagert werden. Für auf PE-Folie applizierte Erythropoietin oder G-CSF Formulierungen konnte eine Lagerstabilität von mindestens neun Monaten bei 25 °C nachgewiesen werden. Innerhalb dieser Zeit stieg die Restfeuchte aller Produkte nicht über 2 % und es entstanden nicht mehr als 1,8 % Aggregate.

Die für die Einlagerung verwendeten Rezepturen wurden zuvor bezüglich Restfeuchte, Proteinstabilität und der Möglichkeit zur Ausbildung geordneter Muster optimiert. Ähnlich wie bei der Warmlufttrocknung konnten auch hier kristallisierende Zucker – aufgrund des zur Proteinstabilisierung fehlenden amorphen Anteils und aufgrund der schlechten Haftung der getrockneten Partikel - nicht verwendet werden. Zur Senkung der Restfeuchte von Produkten aus amorphen Zuckern, in unserem Fall Saccharose, mussten Tenside oder Phenylalanin zugesetzt werden. Bei Verwendung zu hoher Tensidkonzentrationen konnten allerdings keine kontrollierten Muster gebildet werden. Als am besten geeignet stellt sich eine Mischung aus 5 % Saccharose, 2 % Phenylalanin und 0,01 % Polysorbat 80 heraus. Hiermit konnten geordnete, fest haftende Muster aus stabilen Proteinen und eine Produktrestfeuchte unter 1 % gebildet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss verschiedener Trägermaterialien auf Restfeuchte, Proteinstabilität und Wiederfindung der applizierten Proteine, sowie Aussehen und Haftung der Partikel untersucht. Dazu wurden unterschiedliche

hydrophile, hydrophobe, glatte und porenhaltige Trägermaterialien analysiert. Hinsichtlich der Restfeuchte konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen verschiedenen Materialien festgestellt werden. Die verwendete Trocknungsmethode war so effizient, dass unabhängig von Struktur und Hydrophilie der Träger gleich niedrige Restfeuchten erzielt wurden. Allerdings kam es, während der Lagerung an Raumluft, bei auf porenhaltigen Materialien applizierten Proben, aufgrund der vergrößerten Oberfläche, zur deutlichen Wasseraufnahme. Dieser Restfeuchteanstieg kann durch Lagerung der Proben unter Inertgas (z.B. mit Stickstoff gefüllte Vials) vollständig vermieden werden.

Hinsichtlich des Aussehens und der Größe der applizierten Tropfen unterschieden sich die verschiedenen Produkte, entsprechend der Oberflächenspannung und der Porosität der verwendeten Trägermaterialien, stark. Auf hydrophilen, porenhaltigen Trägern wurde eine deutlich größere Fläche von Proteinlösung benetzt, als auf hydrophoben Materialien. Üblicherweise nahm die benetzte Fläche eines Tropfens je nach Material einen Durchmesser zwischen 0,3 mm und 1 mm ein. Auf Teflonfilter applizierte Partikel wiesen die geringste Größe auf, wobei bei Verwendung von 10 nl großen Tropfen auch Partikeldurchmesser von 80 µm erzielt werden konnten. Dies entspricht der bei ballistischer Injektion eingesetzten Partikelgröße. Es wäre demnach denkbar mittels Biodotmethode Proteinzuckerpartikel auf den Membranen eines Devices zur ballistischen intradermalen Injektion (z.B. Powderject oder Slingshot) zu applizieren. Aufgrund der hohen Dichte dieser Partikel ist eine große Eindringtiefe und hohe Bioverfügbarkeit zu erwarten. Mit Hilfe einiger Fallversuche konnte bestätigt werden, dass sich auf Teflonfilter aufgebrachte Placebopartikel bei Einwirkung eines Stossimpulses von den Trägern ablösen. Während der Lagerung haften die applizierten Partikel dagegen gut auf den Oberflächen (auch auf Teflon) und fallen bei normaler Behandlung kaum ab. Es wurde deutlich, dass das Ablöseverhalten der Partikel bei Rezepturveränderung wechseln kann. Daher ist zu empfehlen, diese Versuche für jede Formulierung und jedes geplante Trägermaterial gesondert durchzuführen.

Besonders wichtig für die spätere Verwendung der Produkte ist die Stabilität und Wiederfindung der applizierten Proteine. Die Stabilität der abgelösten Proteine kann für alle üblichen Trägermaterialien durchgehend als gut bezeichnet werden. Es wurden mehr als 98 %, meist mehr als 99,2 % Monomer im Freisetzungsmedium detektiert. Allerdings kam es abhängig von der applizierten Proteinkonzentration und der benetzten Oberfläche zu einer deutlichen Adsorption der Proteine an die Träger, und damit zu einer verringerten Wiederfindung. Während auf PE-Folie, Alu und Stahl nur eine geringfügige Adsorption beobachtet wurden, kam es auf hydrophilen Trägern mit vergrößerter Oberfläche (Filter oder Schwämme) zur stärksten Adsorption. Wichtig in diesem Zusammenhang ist die Stabilität und Aktivität der adsorbierten Proteine. Die Stabilität der adsorbierten Proteine wurde nach Ablösung mittels SDS untersucht. Von PE-Folien wurde nur G-CSF Monomer abgelöst, während auf Teflonfilter und Nylonfilter minimale Mengen, und auf PVDF-Filter größere Mengen an Aggregaten entstanden waren und

mittels SDS abgelöst wurden. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindungsstärke der adsorbierten Proteine an die verschiedenen Trägermaterialien in folgender Reihenfolge zunehmen: PE, Teflon, Nylon und PVDF.

Auch eine Dispensierung auf Träger wie Kollagenschwämme und Xerogele, wurde vorgenommen, wodurch ebenfalls trockene, stabile Produkte hergestellt werden konnten. Da es zur starken Adsorption der Proteine an Kollagen kam, eignen sich diese Produkte eventuell als Depotarzneiform (die Aktivität der adsorbierten Proteine konnte in dieser Arbeit jedoch nicht untersucht werden), welche aufgrund der geringen Restfeuchte eine hohe Lagerstabilität aufweisen sollten. Dotierte Xerogele könnten ihre Anwendung in der feuchten Wundbehandlung finden. Im Unterschied zu direkt in den Gelen eingebrachten Proteinen müssen Proteine auf nachträglich dotierten Xerogelen nicht den Gefriertrocknungs- und Sterilisationsschritt durchlaufen, so dass sich diese Variante besonders für extrem empfindliche Proteine anbietet. Mit Hilfe von Freisetzungsversuchen konnte eine sehr schnelle, reproduzierbare Diffusion aus betropften Gelen ins Freisetzungsmittel nachgewiesen werden. Die Freisetzung aus betropften Gelen war dabei schneller als aus Gelen, in welche die Proteine direkt eingebracht wurden. Vermutlich kam es nach Auflösung der Proteinpartikel nicht zur gleichmäßigen Diffusion der Proteinlösung, sondern zur gerichteten Diffusion weg vom Gel (aufgrund des hohen Gelwiderstandes) ins Freisetzungsmittel. Dieser Effekt wurde sowohl für G-CSF als auch für Epo beobachtet. Dementsprechend ließe sich durch die Dotierung eines wirkstoffhaltigen Xerogels eine Darreichungsform herstellen, welche sowohl aus Initialdosis (dotierte Proteine), als auch aus Erhaltungsdosis (Proteine im Xerogel) besteht. Des Weiteren wäre es möglich, zwei miteinander inkompatible Proteine in einer Darreichungsform zu kombinieren (in und auf dem Gel). Eine Trennung inkompatibler Stoffe ist, aufgrund der programmierbaren Aufbringung mittels Mikrotropfenroboter, auf jeder Oberfläche zu verwirklichen. Die inkompatiblen Lösungen müssen dazu nacheinander in getrennten Bahnen oder Punkten aufgetropft werden. In dieser Arbeit konnte eine solche Trennung anhand der Dispensierung von Proteinlösung neben Proteinlösung (Epo und G-CSF) verwirklicht werden. Trotz Applikation beider Lösungen auf einem Träger, in unmittelbarer Nähe zueinander, kam es nicht zur Spaltung der Proteine durch das Enzym.

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde das Freisetzungs- und Haftungsverhalten von Biodotproben durch Aufbringung von Überzügen beeinflusst. Durch Überziehen von auf PE-Folien aufgetragenen Proteinzuckerpartikeln mit einer Hydroxypropylcelluloseschicht konnten Produkte geschaffen werden, welche vor mechanischer Beanspruchung geschützt sind, sich jedoch weder optisch noch in ihrem Freisetzungsverhalten von nicht überzogenen Proben unterscheiden. Des Weiteren wurden Untersuchungen zur Erlangung einer retardierten Freisetzung der Proteine mittels Überzug durchgeführt. Mit wässrigen Filmdispersionen konnten mit verschiedenen Filmbildnern (Eudragit RS, Eudragit Ne) unter Verwendung unterschiedlicher Überzugstechniken keine

geschlossenen, retardierenden Filme ausgebildet werden. Es kam zur sofortigen Freisetzung, wobei mit zunehmender Polymermenge eine geringere Proteinwiederfindung im Freisetzungsmedium – aufgrund zunehmender Adsorption und Aggregation der Proteine - beobachtet wurde. Durch Aufsprühen von organischen Ethylcelluloselösungen über vollständig getrocknete Biodotproben war es dagegen möglich retardierte Freisetzungen über mehrere Stunden oder Tage zu erhalten. In Abhängigkeit von der Dicke der aufgesprühten Ethylcelluloseschicht wurde eine reproduzierbare Retardierung der Erythropoietinfreisetzung erzielt. Auch mit G-CSF betropfte Proben konnten durch Ethylcelluloseüberzüge grundsätzlich retardiert werden, wobei es jedoch während der Freisetzung zur Aggregation und Adsorption des Proteins kam. Für Erythropoietinproben konnte gezeigt werden, dass die erzielte Retardierung nicht durch das organische Lösungsmittel verursacht wurde, sondern auf einer diffusionskontrollierten Freisetzungsverzögerung durch den Überzug beruht.

Insgesamt wurde mit dieser Arbeit eine vielseitig anzuwendende Technik entwickelt, mit der gleichzeitig die programmierbare Applikation und Trocknung von Proteinen in Mustern auf beliebigen Oberflächen möglich ist.

## D. RESÜMEE UND AUSBLICK

Aufgrund der schnellen Weiterentwicklung der DNA-Technologie stehen immer mehr rekombinante Proteine zur therapeutischen Anwendung zur Verfügung. Allerdings stellt die Entwicklung geeigneter Formulierungen und Darreichungsformen wegen der geringen Stabilität dieser Proteine eine große Herausforderung dar. Zur Verbesserung der Lagerstabilität, sowie zur Beeinflussung der Freisetzungskinetik und zur Nutzung alternativer Applikationswege hat sich die Herstellung getrockneter Darreichungsformen bewährt. In diesem Zusammenhang werden vor allem Sprüh- und Gefriertrocknung genutzt. Diese Verfahren erfordern neben optimierten Formulierungen, zum Ausgleich der auf die Proteine wirkenden Trocknungsstressfaktoren, einen hohen apparatetechnischen Einsatz. Besonders die proteinschonende Lyophilisation zeichnet sich durch einen extrem hohen Energie und Zeitaufwand aus. Deshalb stellt die Entwicklung alternativer, kürzerer Trocknungsverfahren eine interessante und wichtige Aufgabe dar. Aufgrund der hohen Wirksamkeit von Proteinwirkstoffen bedarf es oft nur einer geringen Dosis, welche bei Einsatz konzentrierter Rezepturen bereits in 10 µl bis 500 µl enthalten ist. Für solche Volumina wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei alternative Trocknungsmethoden entwickelt, zum einen die Warmlufttrocknung und zum anderen die Applikation und Trocknung mittels Mikrotropfen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde gezeigt, dass es durch Einleiten von warmen Stickstoff in erwärmte Vials möglich ist, Proteinformulierungen auf Restfeuchten unter 2 % zu trocknen. Mit dieser Methode können innerhalb von nur zwei Stunden trockene, lagerstabile Darreichungsformen unter Erhalt der vollen Proteinstabilität hergestellt werden. Bei Einlagerung bei 25 °C (G-CSF) bzw. 30 °C (Epo) bewahrten die Produkte über sechs Monate ihre Stabilität. Durch Variation der Temperatur während der Trocknung bietet sich die Möglichkeit, die Methode gezielt an die Empfindlichkeit der zu trocknenden Proteine anzupassen und kurze Prozesszeiten zu erhalten. Innerhalb der ersten Minuten der Trocknung kommt es zur extrem schnellen Aufkonzentrierung der Proben, so dass diese nach nur fünf bis zehn Minuten als feste Zuckermatrix vorliegen, in welcher die Proteine eingeschlossen und vor Aggregation geschützt sind. Nach Erreichen dieses Zustandes (unter Einsatz von niedrigen Temperaturen) können zur weiteren Verdunstung von Wasser hohe Temperaturen verwendet werden, ohne dass es zur Verminderung der Stabilität der eingeschlossenen Proteine kommt. Hierdurch sind die im Vergleich zu klassischen Trocknungsverfahren kurzen Prozesszeiten möglich. Des weiteren zeichnet sich diese Trocknungsmethode durch einen geringen Energieverbrauch aus. Auch der eingesetzte Stickstoff könnte nach Regeneration erneut verwendet werden. Eine Erweiterung der Technik auf Produktionsmaßstab ist grundsätzlich möglich. Bemerkenswert ist die Variabilität des Gerätes, welche eine einfache Anpassung an



unterschiedliche Gefäßgrößen und Formen ermöglicht. Insgesamt erscheint diese variable, schnelle und dennoch schonende Methode eine interessante Alternative zu klassischen Trocknungsverfahren darzustellen. Bisher konnte ihr Einsatz für Dosierungen von 75 µl gezeigt werden, in ersten Vorversuchen deutete sich jedoch auch die Verwendung für größere Volumina (500 µl ergaben ähnlich gute Resultate) an.

Für noch geringere Volumina wurde eine zweite Trocknungsmethode entwickelt. Diese ermöglicht die gezielte Applikation auf beliebigen Oberflächen und nachfolgende Trocknung. Dazu wird eine Dosis (z.B. 20 µl) Proteinlösung mit Hilfe eines Robotersystems in vielen winzigen (z.B. 20 nl große) Tropfen, in vorprogrammierten Mustern auf einer Oberfläche platziert. Um lagerfähige Produkte zu erhalten, wird anschließend eine Vakuumtrocknung (mindestens 6 Stunden) durchgeführt. Die Produkte bestehen aus fest haftenden Mustern aus getrockneten Proteinzuckerpartikeln mit hoher Reinheit (> 99,2 % Monomer bei Epo und G-CSF) und guter Lagerstabilität. Auf PE-Folie getropfte Epo oder G-CSF Formulierungen bewahrten über mindestens neun Monate bei 25 °C ihre Qualität. Grundsätzlich eignet sich diese Methode zur Betropfung jeder beliebigen Oberfläche, und bietet sich unter anderem zur Dotierung von Implantaten oder Xerogelen an. Aufgrund der exakten Dosierung ist dieses neue Verfahren einer Tränkung oder dem Besprühen von porenhaltigen Trägermaterialien vorzuziehen. Es können gezielt bestimmte Stellen eines Trägers dotiert und andere freigelassen werden, was beim Tissue Engineering, oder bei Implantaten von Interesse sein kann. Weiterhin ist es möglich, unverträgliche Stoffe getrennt voneinander zu applizieren und damit lagerfähig zu machen. Da es zur starken Anlagerung der Proteine an hydrophile, porenhaltige Materialien (wie Kollagen oder Nylonfilter) kam, bieten sich diese Proben eventuell als retardiert freisetzende Darreichungsform an. Eine Retardierung kann auch durch Überziehen der betropften Träger erreicht werden. Mit Hilfe organischer Ethylcellulosepolymerlösung konnten Überzüge gebildet werden, welche je nach Schichtdicke über mehrere Stunden oder Tage retardiert freisetzten. Zum Schutz der Proben vor mechanischer Beanspruchung, Feuchte oder Oxidation eignen sich schnell lösliche Überzüge. Außerdem optimieren diese die Haftung der applizierten Partikel auf den Oberflächen. Auf Teflonfiltern aufgebrachte Partikel können bei Einwirken eines Impulses auf die Träger zur kontrollierten Ablösung gebracht werden, eine Eigenschaft, die für Devices zur ballistischen Injektion von Bedeutung ist.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit zwei Methoden entwickelt werden, welche alternativ zu den klassischen Trocknungstechniken stabile, getrocknete Produkte garantieren. Im Falle der Warmlufttrocknung ist dies innerhalb eines besonders kurzen Zeitintervalls möglich. Die Biodotmethode ermöglicht darüber hinaus die vielseitige Applizierung der Proteine auf beliebigen Trägermaterialien.

## E. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Informationen zur Geschichte von Enzymen. [http://www.mucos.de/homedeutsch/wissenschaft/-geschichte/body\\_geschichte.html#hintergrund](http://www.mucos.de/homedeutsch/wissenschaft/-geschichte/body_geschichte.html#hintergrund) . **2003**.
- [2] Proteine (Berzelius). <http://www.guidobauersachs.de/oc/protein.html> . **2003**.
- [3] Informationen zur Geschichte von Insulin. <http://www.lilly-pharma.de/gesundheit/diabetes-/insulin/geschichte.html> . **2003**.
- [4] Informationen zur Geschichte von Insulin2. [http://www.diabetiker-linz.at/geschichte\\_des\\_insulin.htm](http://www.diabetiker-linz.at/geschichte_des_insulin.htm) **2003**.
- [5] Walsh, G. Pharmaceutical biotechnology products approved within the European Union. *Eur. J. Pharm. Biopharm* **2003**, *55*, 3-10.
- [6] Tsuda, E.; Kawanishi, G.; Ueda, M.; Masuda, S.; Sasaki, R. The role of carbohydrate in recombinant human erythropoietin. *Eur. J. Biochem.* **1990**, *188*, 405-411.
- [7] Endo, Y.; Nagai, H.; Watanabe, Y.; Ochi, K.; Takagi, T. Heat-induced aggregation of recombinant erythropoietin in the intact and deglycosylated states as monitored by gel permeation chromatography combined with a low-angle laser light scattering technique. *Journal of Biochemistry (Tokyo, Japan)* **1992**, *112*, 700-706.
- [8] Narhi, L. O.; Arakawa, T.; Aoki, K. H.; Elmore, R.; Rohde, M. F.; Boone, T.; Strickland, T. W. The effect of carbohydrate on the structure and stability of erythropoietin. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 23022-23026.
- [9] Lipp H.P. Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktoren: Gemeinsamkeiten, Unterschiede und Indikationen. *Krankenhauspharmazie* 23[8], 375-381. 2002.
- [10] Jakubowski, A.; Gabilove, J. Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF): Biology and clinical status. *Cancer Biother. Radiopharm.* **1996**, *11*, 5-20.
- [11] Kuwabara, T.; Kobayashi, S.; Sugiyama, Y. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Drug Metab. Rev.* **1996**, *28*, 625-658.
- [12] CLeland, J. L.; Langer, R. Formulation and delivery of proteins and peptides: design and development strategies. *ACS Symp. Ser.* **1994**, *567*, 1-19.
- [13] Mozhaev, V. V.; Martinek, K. Structure-stability relationships in proteins: a guide to approaches to stabilizing enzymes. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1990**, *4*, 387-419.
- [14] Shortle, D. The denatured state (the other half of folding equation) and its role in protein stability. *FASEB J.* **1996**, *10*, 27-34.
- [15] Jaenicke, R. Protein structure and function at low temperatures. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences* **1990**, *326*, 535-553.
- [16] Patro, S. Y.; Przybycien, T. M. Simulations of reversible protein aggregate and crystal structure. *Biophysical Journal* **1996**, *70*, 2888-2902.
- [17] McNally, E. J. Protein Formulation and Delivery. [In: *Drugs Pharm. Sci.*, 2000; 99]. **2000**.

- [18] Wang, W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *Int. J. Pharm.* **1999**, *185*, 129-188.
- [19] Cappola, M. L. Freeze-drying concepts: The basics. *Drugs Pharm. Sci.* **2000**, *99*, 159-199.
- [20] Mathias, S. F., Franks, F., and Hatley, R. H. M. The stabilization of proteins by freeze-drying and by alternative methods. *Polypept. Protein Drugs* **1991**.
- [21] Wang, W. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *Int. J. Pharm.* **2000**, *203*, 1-60.
- [22] Rankell, Albert S. and Lieberman, Herbert A. Drying [of pharmaceuticals]. *Theory Pract. Ind. Pharm.* **1970**, 1nd Ed.
- [23] Koseki, T.; Kitabatake, N.; Doi, E. Freezing denaturation of ovalbumin at acid pH. *Journal of Biochemistry.* **1990**, *107*, 389-394.
- [24] Graziano, G.; Catanzano, F.; Riccio, A.; Barone, G. A reassessment of the molecular origin of cold denaturation. *Journal of Biochemistry.* **1997**, *122*, 395-401.
- [25] Hanson, M. A.; Rouan, S. K. E. Introduction to formulation of protein pharmaceuticals. *Pharm. Biotechnol.* **1992**, *3*, 209-233.
- [26] Gessner, A.; Lieske, A.; Paulke, B. R.; Muller, R. H. Influence of surface charge density on protein adsorption on polymeric nanoparticles: analysis by two-dimensional electrophoresis. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* **2002**, *54*, 165-170.
- [27] Wahlgren, M.; Welin-Klintstrom, S.; Karlsson, C. A. C. Interactions between proteins and surfactants at solid interfaces. *Surfactant Science Series* **1998**, *75*, 485-512.
- [28] Wertz, C. F.; Santore, M. M. Adsorption and Reorientation Kinetics of Lysozyme on Hydrophobic Surfaces. *Langmuir* **2002**, *18*, 1190-1199.
- [29] Tzannis, S. T.; Hrushesky, W. J.; Wood, P. A.; Przybycien, T. M. Irreversible inactivation of interleukin 2 in a pump-based delivery environment. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America.* **1996**, *93*, 5460-5465.
- [30] Katakam, M.; Bell, L. N.; Banga, A. K. Effect of Surfactants on the Physical Stability of Recombinant Human Growth Hormone. *J. Pharm. Sci.* **1995**, *84*, 713-716.
- [31] Knepp, V. M.; Whatley, J. L.; Muchnik, A.; Calderwood, T. S. Identification of antioxidants for prevention of peroxide-mediated oxidation of recombinant human ciliary neurotrophic factor and recombinant human nerve growth factor. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* **1996**, *50*, 163-171.
- [32] Dill, K. A. Dominant forces in protein folding. *Biochemistry.* **1990**, *29*, 7133-7155.
- [33] Ledger, R.; Tucker, I. G.; Walker, G. F. The metabolic barrier of the lower intestinal tract of salmon to the oral delivery of protein and peptide drugs. *Journal of Controlled Release* **2002**, *85*, 91-103.
- [34] Eiamtrakarn, S.; Itoh, Y.; Kishimoto, J.; Yoshikawa, Y.; Shibata, N.; Murakami, M.; Takada, K. Gastrointestinal mucoadhesive patch system (GI-MAPS) for oral administration of G-CSF, a model protein. *Biomaterials* **2001**, *23*, 145-152.
- [35] Woodley, J. F. Enzymic barriers to oral peptide and protein delivery. *Proceedings of the International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials* **1997**, *24th*, 99-100.

- [36] Shah, R. B.; Ahsan, F.; Khan, M. A. Oral delivery of proteins: progress and prognostication. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems* **2002**, *19*, 135-169.
- [37] Senel, S.; Kremer, M.; Nagy, K.; Squier, C. Delivery of bioactive peptides and proteins across oral (buccal) mucosa. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **2001**, *2*, 175-186.
- [38] Wratschko, S. C.; Muller-Bohn, T. Oral available peptides. *Deutsche Apotheker Zeitung* **2000**, *140*, 4474-4478.
- [39] Tirucherai, G. S.; Pezron, I.; Mitra, A. K. Novel approaches to nasal delivery of peptides and proteins. *S. T. P. Pharma Sciences* **2002**, *12*, 3-12.
- [40] Inderjit Jabbal-Gill Nasal vaccines. *ddsc&s* **2001**, *1*, 89-94.
- [41] Towns, J. K. Moisture content in proteins: its effects and measurement. *J. Chromatogr. , A* **1995**, *705*, 115-127.
- [42] Costantino, H. R.; Schwendeman, S. P.; Langer, R.; Klibanov, A. M. Deterioration of lyophilized pharmaceutical proteins. *Biochemistry (Moscow)* **1998**, *63*, 357-363.
- [43] Zaks, A. Protein-water interactions. Role in protein structure and stability. *Pharm. Biotechnol.* **1992**, *2*, 249-271.
- [44] Hageman, M. J. The role of moisture in protein stability. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1988**, *14*, 2047-2070.
- [45] Hancock, B. C.; Zografi, G. Characteristics and Significance of the Amorphous State in Pharmaceutical Systems. *J. Pharm. Sci.* **1997**, *86*, 1-12.
- [46] Slade L.; Levine H.; Finley J.W. Protein-water interactions: water as a plasticizer of gluten and other protein polymers. In *Protein Quality and the Effects of Processing*, Philips R.D., Finley J.W., Eds.; Marcel Dekker: New York, **1989**; pp. 9-124.
- [47] Hancock, B. C.; Shamblin, S. L.; Zografi, G. Molecular mobility of amorphous pharmaceutical solids below their glass transition temperatures. *Pharm. Res.* **1995**, *12*, 799-806.
- [48] Yoshioka, S.; Aso, Y.; Nakai, Y.; Kojima, S. Effect of High Molecular Mobility of Poly(vinyl alcohol) on Protein Stability of Lyophilized .gamma.-Globulin Formulations. *J. Pharm. Sci.* **1998**, *87*, 147-151.
- [49] Hatley, R. H. M. Glass fragility and the stability of pharmaceutical preparations-exciipient selection. *Pharm. Dev. Technol. .* **1997**, *2*, 257-264.
- [50] Franks, F. Long-term stabilization of biologicals. *Bio/Techenology.* **1994**, *12*, 253-256.
- [51] Christensen, H.; Pain, R. H. Molten globule intermediates and protein folding. *Eur. Biophys. J.* **1991**, *19*, 221-229.
- [52] Pikal, M. J.; Dellerman, K.; Roy, M. L. Formulation and stability of freeze-dried proteins: effects of moisture and oxygen on the stability of freeze-dried formulations of human growth hormone. *Dev. Biol. Stand.* **1992**, *74*, 21-38.
- [53] Hsu, C. C.; Ward, C. A.; Pearlman, R.; Nguyen, H. M.; Yeung, D. A.; Curley, J. G. Determining the optimum residual moisture in lyophilized protein pharmaceuticals. *Dev. Biol. Stand.* **1992**, *74*, 255-271.
- [54] Arakawa, T.; Prestrelski, S. J.; Kenney, W. C.; Carpenter, J. F. Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1993**, *10*, 1-28.

- [55] Roser, B. Trehalose drying: a novel replacement for freeze-drying. *BioPharm (Duluth, MN, United States)* **1991**, *4*, 47-53.
- [56] Katakam, M.; Banga, A. K. Aggregation of proteins and its prevention by carbohydrate excipients: albumins and  $\gamma$ -globulin. *J. Pharm. Pharmacol.* **1995**, *47*, 103-107.
- [57] Wu, S., Leung, D., Vemuri, S., Shah, D., Yang, B., and Wang, J. Degradation mechanism of lyophilized basic fibroblast growth factor (BFGF) in protein in sugar formulation. *Pharm.Sci.Suppl.* *1*, S-539. 1998.
- [58] Yoshioka, S.; Aso, Y.; Kojima, S. Dependence of the molecular mobility and protein stability of freeze-dried  $\gamma$ -globulin formulations on the molecular weight dextran. *Pharm.Res.* **1997**, *14*, 736-741.
- [59] Chang, B. S.; Reeder, G.; Carpenter, J. F. Development of a stable freeze-dried formulation of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *Pharm. Res.* **1996**, *13*, 243-249.
- [60] Bessmertnaya, L. Y.; Goncharova, A. I.; Rumsh, L. D.; Grokhovskaya, T. E.; Feldstein, M. M. Thermostability and phase behavior of enzymes in solid state and within polymer matrixes. *Proc. Int. Symp. Controlled Release Bioact. Mater.* **1999**, *26th*, 1084-1085.
- [61] Costantino, H. R.; Langer, R.; Klibanov, A. M. Moisture-induced aggregation of lyophilized insulin. *Pharm. Res.* **1994**, *11*, 21-29.
- [62] Sinn, A. Technology and application of thin film dryer equipment. *Tech. Film Appl. Oper. Genie Chim., Colloq. Int.* **1983**. Chapter XV, 441-464
- [63] MacDonald, J. O. S. Progress in drying. *Process Technology International* **1973**, *18*, 127-9, 131, 133.
- [64] Bonafonte, A. B.; Iglesias, O.; Bueno, J. L. Combined convective-microwave drying of agar gels: Influence of microwave power on drying kinetics. *Drying Technology* **2002**, *20*, 93-108.
- [65] Merk, D.; Puschner, P. A. Microwave vacuum drying in advanced process technology. *Vakuum in Forschung und Praxis* **1999**, *11*, 252-256.
- [66] Wang, Z. H.; Chen, G. Theoretical Study of Fluidized-Bed Drying with Microwave Heating. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2000**, *39*, 775-782.
- [67] Hsu, Chung C., Wu, Sylvia S., and Walsh, Andrew J. The preparation of recombinant human deoxyribonuclease powder : comparative studies of spray drying versus lyophilization and application of microwave drying. B. *Drying '96* **1996**, [Proceedings of the International Drying Symposium], 10th, Krakow, July 30-Aug. 2, 1996.
- [68] Hernandez-Infante, M.; Sousa, V.; Montalvo, I.; Tena, E. Impact of microwave heating on hemagglutinins, trypsin inhibitors and protein quality of selected legume seeds. *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)* **1998**, *52*, 199-208.
- [69] Dernelj, M.; Bogenrieder, C.; Hidvegi, M.; Laszity, R. Effect of microwave vacuum drying on protein and chlorophyll contents of blind nettle (*Urtica urens* L.). *Periodica Polytechnica, Chemical Engineering* **1995**, *39*, 77-84.
- [70] Gall, R.; Krueger, G.; Ruempler, K. Estimation of technological variants for fluidized-bed drying and granulation drying. *Chemische Technik (Leipzig, Germany)* **1988**, *40*, 344-348.
- [71] McCormick, P. Y. Drying. *Industrial and Engineering Chemistry* **1968**, *60*, 52-56.

- [72] Maskan, M.; Ibanoglu, S. Hot air drying of cooked and uncooked tarhana dough, a wheat flour-yoghurt mixture. *European Food Research and Technology* **2002**, *215*, 413-418.
- [73] Broadhead, J.; Rouan, S. K. E.; Rhodes, C. T. The spray drying of pharmaceuticals. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **1992**, *18*, 1169-1206.
- [74] Masters, K. Spray drying. The unit operation today. *Industrial and Engineering Chemistry* **1968**, *60*, 53-63.
- [75] Shah, D. S. Spray dryers. Applications. *Chemical Industry Developments* **1973**, *7*, 39-45.
- [76] Bodmeier, R.; Chen, H. Preparation of biodegradable poly(+)-lactide microparticles using a spray-drying technique. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **1988**, *40*, 754-757.
- [77] Pavanetto, F.; Conti, B.; Genta, I.; Giunchedi, P. Solvent evaporation, solvent extraction and spray drying for polylactide microsphere preparation. *International Journal of Pharmaceutics* **1992**, *84*, 151-159.
- [78] Daesy, P. B. Microencapsulatin and Related Drug Processes. **1984**Dekker New York, 181-193.
- [79] Bhat, S. G. Spray drying and its applications. *Chem. Age India* **1979**, *30*, 1009-1014.
- [80] Lyne, C. W. Review of spray drying. *Brit. Chem. Eng.* **1971**, *16*, 370-373.
- [81] Cleland, J. L.; Powell, M. F.; Shire, S. J. The development of stable protein formulations: a close look at protein aggregation, deamidation, and oxidation. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*. **1993**, *10*, 307-377.
- [82] Fox, K. C. Biopreservation. Putting proteins under glass. *Science*. **1995**, *267*, 1922-1923.
- [83] Suzuki, Y.; Sumi, Y.; Mizuta, T. Studies on development of manufacturing processes for pharmaceutical freeze-dried products. *Drugs Pharm. Sci.* **1999**, *96*, 433-463.
- [84] Rey, L. R. Basic aspects and future trends in the freeze-drying of pharmaceuticals. *Dev. Biol. Stand.* **1992**, *74*, 3-8.
- [85] Franks, F. Improved freeze-drying: from empiricism to predictability. *Cryo Letters* **1990**, *11*, 93-110.
- [86] Pere, C.; Rodier, E. Microwave vacuum drying of porous media: experimental study and qualitative considerations of internal transfers. *Chemical Engineering and Processing* **2002**, *41*, 427-436.
- [87] Prash, A. Vacuum fluidized bed with integrated microwave for combined drying of thermally labile products: development and modeling. *Fortschritt-Berichte VDI, Reihe 3: Verfahrenstechnik* **1997**, *513*, 1-173.
- [88] Flora, K. P.; Rahman, A.; Craddock, J. C. Low temperature vacuum drying: evaluation of excipients in injectable dosage forms. *Journal of the Parenteral Drug Association* **1980**, *34*, 192-199.
- [89] Altmeyer, A. Vacuum microwave drying in pharmaceutical industry. *Vakuum in der Praxis* **1994**, *6*, 117-121.
- [90] Miller, D. P.; Anderson, R. E.; De Pablo, J. J. Stabilization of lactate dehydrogenase following freeze-thawing and vacuum-drying in the presence of trehalose and borate. *Pharmaceutical Research*. **1998**, *Pharmaceutical-Research*. **1998**; *15*, 1215-1221.
- [91] Rossi, S.; Buera, M. P.; Moreno, S.; Chirife, J. Stabilization of the Restriction Enzyme EcoRI Dried with Trehalose and Other Selected Glass-Forming Solutes. *Biotechnology Progress* **1997**, *13*, 609-616.

- [92] Uritani, M.; Takai, M.; Yoshinaga, K. Protective effect of disaccharides on restriction endonucleases during drying under vacuum. *Journal of Biochemistry*. **1995**, *117*, 774-779.
- [93] Uritani, M.; Takai, M.; Yoshinaga, K. Protective effect of disaccharides on restriction endonucleases during drying under vacuum. *Journal of Biochemistry (Tokyo)* **1995**, *117*, 774-779.
- [94] Schnell, W. Driers and technical drying processes. *Fortschritte der Verfahrenstechnik* **1968**, *8*, 484-518.
- [95] Mattern, M.; Winter, G.; Kohnert, U.; Lee, G. Formulation of proteins in vacuum-dried glasses. II. Process and storage stability in sugar-free amino acid systems. *Pharm. Dev. Technol.* **1999**, *4*, 199-208.
- [96] Mattern, Markus. Stabilisierung von therapeutischen Proteinen mittels Gefrier- und Vakuumtrocknung. 1997. Ref Type: Thesis/Dissertation
- [97] Miao, Xiubin. Process for preparing beverages from animal/vegetable protein solids. Xixia Vegetable Fat and Oil General Mill, Peop. Rep. China. 92-106442[1076345]. **17-3-1992**. CN. Ref Type: Patent
- [98] Chin, K. B.; Keeton, J. T.; Lacey, R. E. Reduction of drying time for pepperoni by vacuum-drying. *Journal of Food Science* **1996**, *61*, 142-4, 148.
- [99] Bullifent, H. L.; Dhaliwal, K.; Howells, A. M.; Goan, K.; Griffin, K.; Lindsay, C. D.; Tunnacliffe, A.; Titball, R. W. Stabilization of Salmonella vaccine vectors by the induction of trehalose biosynthesis. *Vaccine* **2000**, *19*, 1239-1245.
- [100] Miller, D. P.; Anderson, R. E.; de Pablo, J. J. Stabilization of lactate dehydrogenase following freeze thawing and vacuum-drying in the presence of trehalose and borate. *Pharm. Research* **1998**, *15*, 1215-1221.
- [101] Crowe, L. M.; Reid, D. S.; Crowe, J. H. Is trehalose special for preserving dry biomaterials? *Biophys. J.* **1996**, *71*, 2087-2093.
- [102] Laurent, S.; Couture, F.; Roques, M. Vacuum drying of a multicomponent pharmaceutical product having different pseudo-polymorphic forms. *Chemical Engineering and Processing* **1999**, *38*, 157-165.
- [103] Bullifent, H. L.; Dhaliwal, K.; Howells, A. M.; Goan, K.; Griffin, K.; Lindsay, C. D.; Tunnacliffe, A.; Titball, R. W. Stabilization of Salmonella vaccine vectors by the induction of trehalose biosynthesis. *Vaccine* **2000**, *19*, 1239-1245.
- [104] Conrad, P. B.; Miller, D. P.; Cielenski, P. R.; De Pablo, J. J. Stabilization and Preservation of Lactobacillus acidophilus in Saccharide Matrices. *Cryobiology*. **2000**, *41*, 17-24.
- [105] Winters, M. A.; Knutson, B. L.; Debenedetti, P. G.; Sparks, H. G.; Przybycien, T. M.; Stevenson, C. L.; Prestrelski, S. J. Precipitation of proteins in supercritical carbon dioxide. *Journal of Pharmaceutical Science*. **1996**, *85*, 586-594.
- [106] Dr.Bechthold-Peters. Crystallization and precipitation as tools to stabilize therapeutic proteins and peptides. *CRS Local Chapter, Annual Meeting 2003 Munich*. **2003**.
- [107] Maa, Y. F.; Nguyen, P. A.; Sweeney, T.; Shire, S. J.; Hsu, C. C. Protein inhalation powders: spray drying vs spray freeze drying. *Pharmaceutical Research*. **1999**, *16*, 249-254.
- [109] Mumenthaler, M.; Leuenberger, H. Atmospheric spray-freeze drying: a suitable alternative in freeze-drying technology. *Int. J. Pharm.* **1991**, *72*, 97-110.
- [110] Strambini, G. B.; Gabellieri, E. Proteins in frozen solutions: evidence of ice-induced partial unfolding. *Biophysical Journal* *70*, 971-976.

- [111] Franks, F. Solid aqueous solutions. *Pure Appl. Chem.* **2003**, *65*, 2527-2537.
- [112] Strickley, R. G.; Anderson, B. D. Solid-state stability of human insulin. II. Effect of water on reactive intermediate partitioning in lyophiles from pH 2-5 solutions: stabilization against covalent dimer formation. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* **1996**, *86*, 645-653.
- [113] Chang, B. S.; Beauvais, R. M.; Dong, A.; Carpenter, J. F. Physical factors affecting the storage stability of freeze-dried interleukin-1 receptor antagonist: glass transition and protein conformation. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **1996**, *331*, 249-258.
- [114] Roos, Y. Melting and glass transition of low molecular weight carbohydrates. *Carbohydr. Res.* 238[39], 48. **1993**.
- [115] Pikal, M. J. Mechanisms of protein stabilization during freeze-drying and storage: the relative importance of thermodynamic stabilization and glassy state relaxation dynamics. In *Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceuticals and Biopharmaceutical Products*; Rey, L., May, J. C., Eds.; Marcel Dekker: New York, **1999**; pp. 161-198.
- [116] Carpenter, J. F.; Martin, B.; Crowe, L. M.; Crowe, J. H. Stabilization of phosphofructokinase during air-drying with sugars and sugar/transition metal mixtures. *Cryobiology.* **1987**, *24*, 455-464.
- [117] Carpenter, J. F.; Prestrelski, S. J.; Arakawa, T. Separation of freezing- and drying-induced denaturation of lyophilized proteins using stress-specific stabilization. I. Enzyme activity and calorimetric studies. *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *303*, 456-464.
- [118] Carpenter, J. F.; Crowe, J. H. An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. *Biochemistry* **1989**, *28*, 3916-3922.
- [119] Arakawa, T.; Kita, Y.; Carpenter, J. F. Protein-solvent interactions in pharmaceutical formulations. *Pharm. Res.* **1991**, *8*, 285-291.
- [120] Chang, B. S.; Beauvais, R. M.; Dong, A.; Carpenter, J. F. Physical factors affecting the storage stability of freeze-dried interleukin-1 receptor antagonist: glass transition and protein conformation. *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, *331*, 249-258.
- [121] Izutsu, K. i.; Yoshioka, S.; Terao, T. Stabilizing effect of amphiphilic excipients on the freeze-thawing and freeze-drying of lactate dehydrogenase. *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, *43*, 1102-1107.
- [122] Carpenter, J. F.; Crowe, J. H. The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes. *Cryobiology.* **1988**, *25*, 244-255.
- [123] Carpenter, J. F.; Crowe, J. H.; Arakawa, T. Comparison of solute-induced protein stabilization in aqueous solution and in the frozen and dried states. *J. Dairy Sci.* **1990**, *73*, 3627-3636.
- [124] Sarciaux, J. M.; Hageman, a. M. Effects of Bovine Somatotropin (rbSt) Concentration at Different Moisture Levels on the Physical Stability of Sucrose in Freeze-Dried rbSt/Sucrose Mixtures. *J. Pharm. Sci.* **1997**, *86*, 365-371.
- [125] Carpenter, J. F.; Crowe, J. H. Modes of stabilization of a protein by organic solutes during desiccation. *Cryobiology* **1988**, *25*, 459-470.
- [126] Allison, S. D.; Dong, A.; Carpenter, J. F. Counteracting effects of thiocyanate and sucrose on chymotrypsinogen secondary structure and aggregation during freezing, drying, and rehydration. *Biophys. J.* **1996**, *71*, 2022-2032.



- [127] Wolkers, W. F.; Van Kilsdonk, M. G.; Hoekstra, F. A. Dehydration-induced conformational changes of poly-L-lysine as influenced by drying rate and carbohydrates. *Biochimica et Biophysica Acta* **1998**, *1425*, 127-136.
- [128] Rupley, J. A.; Careri, G. Protein hydration and function. *Adv. Protein Chem.* **1991**, *41*, 37-172.
- [129] Nagendra, H. G.; Sukumar, N.; Vijayan, M. Role of water in plasticity, stability, and action of proteins: the crystal structures of lysozyme at very low levels of hydration. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* **1998**, *32*, 229-240.
- [130] Arakawa, T.; Kita, Y.; Carpenter, J. F. Protein-solvent interactions in pharmaceutical formulations. *Pharm. Research* **1991**, *8*, 285-291.
- [131] Arakawa, T.; Prestrelski, S. L.; Kenney, W. C.; Carpenter, C. J. Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1993**, *10*, 1-28.
- [132] Timasheff, S. N. The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes? *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure.* **1993**, *22*, 67-97.
- [133] Timasheff, S. N. Control of protein stability and reactions by weakly interacting cosolvents: the simplicity of the complicated. *Advances in Protein Chemistry.* **1998**, *51*, 355-432.
- [134] Lin, T. Y.; Timasheff, S. N. On the role of surface tension in the stabilization of globular proteins. *Protein Science.* **1996**, *5*, 372-381.
- [135] Arakawa, T.; Timasheff, S. N. Stabilization of protein structure by sugars. *Biochemistry* **1982**, *21*, 6536-6544.
- [136] Lee, J. C.; Timasheff, S. N. The stabilization of proteins by sucrose. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 7193-7201.
- [137] Vrkljan, M.; Foster, T. M.; Powers, M. E.; Henkin, J.; Porter, W. R.; Staack, H.; Carpenter, J. F.; Manning, M. C. Thermal stability of low molecular weight urokinase during heat treatment. II. Effect of polymeric additives. *Pharm. Res.* **1994**, *11*, 1004-1008.
- [138] Uedaira, H.; Uedaira, H. The effect of sugars on the thermal denaturation of lysozyme. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1980**, *53*, 2451-2455.
- [139] Back, J. F.; Oakenfull, D.; Smith, M. B. Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols. *Biochemistry* **1979**, *18*, 5191-5196.
- [140] Carpenter, J. F.; Arakawa, T.; Crowe, J. H. Interactions of stabilizing additives with proteins during freeze-thawing and freeze-drying. *Dev. Biol. Stand.* **1992**, *74*, 225-239.
- [141] Costantino, H. R.; Carrasquillo, K. G.; Cordero, R. A.; Mumenthaler, M.; Hsu, C. C.; Griebenow, K. Effect of Excipients on the Stability and Structure of Lyophilized Recombinant Human Growth Hormone. *J. Pharm. Sci.* **1998**, *87*, 1412-1420.
- [142] Prestrelski, S. J.; Arakawa, T.; Carpenter, J. F. Separation of freezing- and drying-induced denaturation of lyophilized proteins using stress-specific stabilization. II. Structural studies using infrared spectroscopy. *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *303*, 465-473.
- [143] Prestrelski, S.; Tedeschi, N.; Arakawa, T.; Carpenter, J. F. Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers. *Biophysical Journal* **1993**, *65*, 661-671.

- [144] Carpenter, J. F.; Crowe, J. H. An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. *Biochemistry*. **1989**, *28*, 3916-3922.
- [145] Crowe, J. H.; Crowe, L. M.; Carpenter, J. F. Preserving dry biomaterials: the water replacement hypothesis. *Biopharm*. **1993**, *6*, 28-37.
- [146] Allison, S. D.; Chang, B.; Randolph, T. W.; Carpenter, J. F. Hydrogen bonding between sugar and protein is responsible for inhibition of dehydration-induced protein unfolding. *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, *365*, 289-298.
- [147] Allison, S. D.; Randolph, T. W.; Manning, M. C.; Middleton, K.; Davis, A.; Carpenter, J. F. Effects of drying methods and additives on structure and function of actin: mechanisms of dehydration-induced damage and its inhibition. *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, *358*, 171-181.
- [148] Allison, S. D.; Chang, B.; Randolph, T. W.; Carpenter, J. F. Hydrogen Bonding between Sugar and Protein Is Responsible for Inhibition of Dehydration-Induced Protein Unfolding. *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, *365*, 289-298.
- [149] Imamura, K.; Iwai, M.; Ogawa, T.; Sakiyama, T.; Nakanishi, K. Evaluation of hydration states of protein in freeze-dried amorphous sugar matrix. *J. Pharm. Sci.* **2001**, *90*, 1955-1963.
- [150] Colaco C.; Smith C.; Roser D.; Sen S.; Newman Y.; Ring S.; Roser B.J. Chemistry of protein stabilization by trehalose. In *Formulation and Delivery of Proteins and Peptides*; Cleland J.L., Langer R., Eds.; **1994**; pp. 222-240.
- [151] Andya, J. D.; Maa, Y. F.; Costantino, H. R.; Nguyen, P. A.; Dasovich, N.; Sweeney, T. D.; Hsu, C. C.; Shire, S. J. The effect of formulation excipients on protein stability and aerosol performance of spray-dried powders of a recombinant humanized anti-IgE monoclonal antibody. *Pharm. Res.* **1999**, *16*, 350-358.
- [152] Gibson, T. D. Protein stabilisation using additives based on multiple electrostatic interactions. *Dev. Biol. Stand.* **1996**, *87*, 207-217.
- [153] Zeng, X. M.; Martin, G. P.; Marriott, C. Effects of molecular weight of polyvinylpyrrolidone on the glass transition and crystallization of co-lyophilized sucrose. *Int. J. Pharm.* **2001**, *218*, 63-73.
- [154] Gombotz, W. R.; Pankey, S. C.; Phan, D.; Drager, R.; Donaldson, K.; Antonsen, K. P.; Hoffman, A. S.; Raff, H. V. The stabilization of a human IgM monoclonal antibody with poly(vinylpyrrolidone). *Pharm. Res.* **1994**, *11*, 624-632.
- [155] Izutsu, K. i.; Yoshioka, S.; Kojima, S. Increased stabilizing effects of amphiphilic excipients on freeze-drying of lactate dehydrogenase (LDH) by dispersion into sugar matrixes. *Pharm. Res.* **1995**, *12*, 838-843.
- [156] Brauns, Ulrich and Mueller, Bernhard Willi Werner. .beta.-Cyclodextrin inclusion compounds for pharmaceuticals. Janssen, Pharmaceutica N., V. 83-3346123[3346123]. **21-12-1983**. DE. Ref Type: Patent
- [157] Hora, Maninder Singh, Rubinfeld, Joseph, Stern, Warren, and Wong, Gregory J. Method and compositions for solubilization and stabilization of polypeptides, especially proteins. Chiron Corporation. 89-373928[5997856]. **29-6-1989**. US. Ref Type: Patent
- [158] Horsky, J.; Pitha, J. Inclusion complexes of proteins: interaction of cyclodextrins with peptides containing aromatic amino acids studied by competitive spectrophotometry. *Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry* **1994**, *18*, 291-300.

- [159] Yoshii, H., Shiga, H., Ishikawa, M., Furuta, T., and Linko, P. Effect of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin on protein stability in enzyme encapsulation with crystal transformation of anhydrous trehalose. Cyclodextrin: From *Basic Research to Market, International Cyclodextrin Symposium*, 10th, Ann Arbor, MI, United States, **May 21-24, 2000**.
- [160] Siems, W. G.; Kraemer, K.; Grune, T. Chemistry and biology of the glutathione system. A review. *Pharm. Ztg.* **1996**, *141*, 4239-4242,4244.
- [161] Chen, B.; Costantino, H. R.; Liu, J.; Hsu, C. C.; Shire, S. J. Influence of calcium ions on the structure and stability of recombinant human deoxyribonuclease I in the aqueous and lyophilized states. *J. Pharm. Sci.* **1999**, *88*, 477-482.
- [162] Adler, M.; Lee, G. Stability and Surface Activity of Lactate Dehydrogenase in Spray-Dried Trehalose. *J. Pharm. Sci.* **1999**, *88*, 199-208.
- [163] Seitakari, R. L.; Tanninen, V. P.; Yliruusi, J. Effect of different surface active agents on the crystallinity of lyophilized diltiazem hydrochloride. *S. T. P. Pharma Sciences* **1999**, *9*, 365-369.
- [164] Pikal, M. J.; Roy, M. L.; Shah, S. Mass and heat transfer in vial freeze-drying of pharmaceuticals: role of the vial. *J Pharm Sci* **1984**, *73*, 1224-1237.
- [165] Le Meste, M.; Simatos, D.; Preaud, J. M.; Precausta, P. M. Factors influencing changes in moisture content during storage of freeze-dried vaccines in vials. *Journal of Biological Standardization*. **1985**, *13*, 177-184.
- [166] Pikal, M. J.; Shah, S. Moisture transfer from stopper to product and resulting stability implications. *Dev. Biol. Stand.* **1992**, *74*, 165-179.
- [167] Earle, J. P.; Bennett, P. S.; Larson, K. A.; Shaw, R. The effects of stopper drying on moisture levels of Haemophilus influenzae conjugate vaccine. *Dev. Biol. Stand.* **1992**, *74*, 203-210.
- [168] Jaffe, D. R.; Samyn, J. C.; Sheehan, G. Techniques used to freeze-dry "small doses" of thrombin. *Dev. Biol. Stand.* **1992**, *74*, 211-214.
- [169] H.Färber; D.Skutlarek Proben schneller und simultan aufkonzentrieren. *LaborPraxis* **2002**, *April 2002*, 92-93.
- [170] Lee, Soo Hyeok. Method for preparing instant dried rice cake. Korea, S. 99-13015[2000066135], **13-4-1999**. KR. Ref Type: Patent
- [171] Nicoletti, J. F.; Telis-Romero, J.; Telis, V. R. N. Air-drying of fresh and osmotically pre-treated pineapple slices: Fixed air temperature versus fixed slice temperature drying kinetics. *Drying Technology* **2001**, *19*, 2175-2191.
- [172] Murray, B. S.; Liang, H. J. Enhancement of the Foaming Properties of Protein Dried in the Presence of Trehalose. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4984-4991.
- [173] Kuhn C., Dobler H., Klumpp B., and Lindner H. Trends and solutions in microarray production. *Bioforum International 1* **2000**, 30-31.
- [174] Wöfl S. Biochip-Technologien. *transkript Laborwelt 3* **2000**, 12-20.
- [175] Vollert h., Jordan B., and Winkler I. Wandel in der Wirkstoffsuche - Ultra-High-Throughput-Screening-Systeme in der Pharmaindustrie. *transkript Laborwelt 1*, **2000**, 5-10.

- [176] Microarray-Scanner. *Laborjournal* 3, **2000**, 47-48.
- [177] Fiehn H., Kleineidam R.G., and Hauch S. Technische Anforderungen an Geräte für die Herstellung und Auswertung von Microarrays. *Bioforum* 4, **2000**, 200-202.
- [178] Evers, Paul. Biochip Microarray. *PJB Publications Ltd.* **20-11-2000**.
- [179] Asang-Soergel, R. Biochips - Miniaturization Gains Ground, New Drugs, *Vogel Life Science Media* [3], 26-29. **2003**.
- [180] K.Resch, T.Pingel, and H.Spiecker. Biochips - Proteinnachweis mit Fluoresznz und Chemiluminsenz. *Bioforum* 12/2001, **2001**, 906-907.
- [181] Frederickson, C. J., Wallace, D., Cox, R., and Hayes, D. J. Biomedical applications of piezoelectronic fluid dispensing jets. *Tenth Annual conference on biomedical Engineering Research in Houston.* **19-5-1992**.
- [182] Haar, H. P. and Meacham, G. Elecromagnetic transdermal injection device and methods related thereto. [WO 99/04838]. **4-2-1999**. Ref Type: Patent
- [183] Diestelhorst, M.; Grunthal, S.; Suverkrup, R. Dry Drops: a new preservative-free drug delivery system. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology.* **1999**, 237, 394-398.
- [184] Süverkrüp, R., Grunthal, S., and Diestelhorst, M. Darreichungsform zur äußeren Applikation und Verfahren zur Herstellung derselben. [DE 19549506C2]. **12-9-1996**. Ref Type: Patent
- [185] Mertsching, M.; Martin, U. Zelltransplantation und Tissue Engineering: Aktuelle Entwicklungen und klinische Perspektiven. *transkript Laborwelt I* **2001**, 4-13.
- [186] Sittinger, M. Tissue Engineering - Hoffnungsträger der regenerativen Medizin. *transkript Laborwelt I* **2002**, 12-16.
- [187] Zhang, S.; Yan, L.; Altman, M.; Lassle, M.; Nugent, H.; Frankel, F.; Lauffenburger, D. A.; Whitesides, G. M.; Rich, A. Biological surface engineering: a simple system for cell pattern formation. *Biomaterials* **1999**, 20, 1213-1220.
- [188] Delamarche, E.; Bernard, A.; Schmid, H.; Michael, B.; Biebuyck, H. Patterned delivery of immunoglobulins to surfaces using microfluidic networks. *Science (Washington, D. C.)* **1997**, 276, 779-781.
- [189] Six, N.; Decup, F.; Lasfargues, J. J.; Salih, E.; Goldberg, M. Osteogenic proteins (bone sialoprotein and bone morphogenetic protein-7) and dental pulp mineralization. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2002**, 13, 225-232.
- [190] Lichtinger, T. K.; Muller, R. T.; Schurmann, N.; Oldenburg, M.; Wiemann, M.; Chatzinikolaidou, M.; Rumpf, H. M.; Jennissen, H. P. Osseointegration of titanium implants by addition of recombinant bone morphogenetic protein 2 (rhBMP-2). *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* **2001**, 32, 937-941.
- [191] Voggenreiter, G.; Hartl, K.; Assenmacher, S.; Chatzinikolaidou, M.; Rumpf, H. M.; Jennissen, H. P. Assessment of the biological activity of chemically immobilized rhBMP-2 on titanium surfaces in vivo. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* **2001**, 32, 942-948.
- [192] Jennissen, H. P. Accelerated and improved osteointegration of implants biocoated with bone morphogenetic protein 2 (BMP-2). *Annales of the New York Academy of Sciences.* **2002**, 961, 139-142.
- [193] Scil Biomedicals GmbH. Growth Factors in bone Regeneration: Proteins, Carriers, Coating Technology and Characterizatin. *CRS Local Chapter, Annual Meeting 2003 Munich.* **2003**.

- [194] Chatzinikolaidou, M.; Laub, M.; Rumpf, H.; Jennissen, H. P. Biocoating of electropolished and ultra-hydrophilic titanium and cobalt chromium molybdenum alloy surfaces with proteins. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* **2002**, *33*, 720-727.
- [195] Lloyd J.S. and Aguado M.T. Pre-filled monodose injection devices: a safety standard for new vaccines, or a revolution in the delivery of immunizations? *Global Programme on Vaccines and Immunization, World Health Organisation Mai 1998*, **1998**, 1-22.
- [196] Collins, C.; Kennedy, D. Needlestick injuries and infections: an overview. *European Journal of Parenteral Sciences* **2002**, *7*, 45-48.
- [197] Weintraub, A. M.; Ponce de Leon, M. P. Potential for cross-contamination from use of a needleless injector. *American Journal of Infection Control*. **1998**, *26*, 442-445.
- [198] Winter, G. Development of Needle-Free Injectors. *APV Course no.397 [Innovative Parenteral Application Systems]*. **5-9-1999**. Nürnberg.
- [199] Quinlan, N. J. Application of doppler global velocimetry to supersonic gasparticle flows in drug delivery. *Laser Anemometry: Adv. and Applications Proc. of the 7th Int. Conference Karlsruhe*, **1997**, 85; 102; 629-636.
- [200] Burkoth, T. L.; Bellhouse, B. J.; Hewson, G.; Longridge, D. J.; Muddle, A. G.; Sarphie, D. F. Transdermal and transmucosal powdered drug delivery. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* **1999**, *16*, 331-384.
- [201] Tomioka, Y.; Sato, H.; Katayama, J.; Mizugaki, M. Adsorption of continuous infused G-CSF to infusion sets. *Byoin Yakugaku* **1996**, *22*, 230-234.
- [202] Sarphie, D. F.; Johnson, B.; Cormier, M.; Burkoth, T. L.; Bellhouse, B. J. Bioavailability following transdermal powdered delivery (TPD) of radiolabeled inulin to hairless guinea pigs. *J. Controlled Release* **1997**, *47*, 61-69.
- [203] Kendall, M. A. F.; Mitchell, T. J.; Hardy, M. P.; Bellhouse, B. J. The ballistic delivery of high density, high-velocity microparticles into excised human skin. *BED (American Society of Mechanical Engineers)* **2001**, *50*, 587-588.
- [204] van de Wijdeven, G. G. P. Development and assessment of mini projectiles as drug carriers. *Journal of controlled release* **2002**, *85*, 145-162.
- [205] Höhne G.; Hemminger W.; Flammersheim H.-J. Differential Scanning Calorimetry: an Introduction For Practitioners. Springer Verlag: Berlin Heidelberg, **1996**.
- [206] Ahlin, P.; Kristl, J.; Sentjurc, M. EPR study of loading capacity and location of spin-labeled lipophilic substance in different SLN. *Proc. Int. Symp. Controlled Release Bioact. Mater.* **1998**, *25th*, 334-335.
- [207] Ramaswamy, S.; Ryan, M.; Huang, S. Through Air Drying Under Commercial Conditions. *Drying Technol.* **2001**, *19*, 2577-2592.
- [208] Zografi, G. and Hancock, B. Water-solid state interactions in pharmaceutical systems. *Top. Pharm. Sci. 1993, Proc. Int. Congr. Pharm. Sci. F.I.P., 53rd*, **1994**.
- [209] Green, J. L.; Angell, C. A. Phase relations and vitrification in saccharide-water solutions and the trehalose anomaly. *J. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 2880-2882.
- [210] Roser, B. Trehalose drying: a novel replacement for freeze-drying. *BioPharm (Eugene, Oreg.)* **1991**, *4*, 47-53.

- [211] Gribbon, E. M.; Hatley, R. H. M.; Gard, T.; Blair, J.; Kampinga, J.; Roser, B. J. Trehalose and novel hydrophobic sugar glasses in drug stabilization and delivery. *Spec. Publ. - R. Soc. Chem.* **1996**, *178*, 138-145.
- [212] Mattern, M.; Winter, G.; Rudolph, R.; Lee, G. Formulation of proteins in vacuum-dried glasses. Part 1. Improved vacuum-drying of sugars using crystallizing amino acids. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1997**, *44*, 177-185.
- [213] Gomez-Orellana, I.; Variano, B.; Miura-Fraboni, J.; Milstein, S.; Paton, D. R. Thermodynamic characterization of an intermediate state of human growth hormone. *Protein Sci.* **1998**, *7*, 1352-1358.
- [214] Narhi, L. O.; Kenney, W. C.; Arakawa, T. Conformational changes of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor induced by pH and guanidine hydrochloride. *J. Protein Chem.* **1991**, *10*, 359-367.
- [215] Kolvenbach, C. G.; Narhi, L. O.; Philo, J. S.; Li, T.; Zhang, M.; Arakawa, T. Granulocyte-colony stimulating factor maintains a thermally stable, compact, partially folded structure at pH 2. *J. Pept. Res.* **1997**, *50*, 310-318.
- [216] Michaelis, Uwe, Rudolph, Rainer, Winter, Gerhard, and Woog, Heinrich. Buffers for stabilization of aqueous pharmaceutical preparations of G-CSF. Boehringer, Mannheim G. 92-4242919[4242919 ], 12. **18-12-1992**. DE. Ref Type: Patent
- [217] Lu, H. S.; Fausset, P. R.; Narhi, L. O.; Horan, T.; Shinagawa, K.; Shimamoto, G.; Boone, T. C. Chemical modification and site-directed mutagenesis of methionine residues in recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effect on stability and biological activity. *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, *362*, 1-11.
- [218] Fakes, M. G.; Dali, M. V.; Haby, T. A.; Morris, K. R.; Varia, S. A.; Serajuddin, A. T. M. Moisture sorption behavior of selected bulking agents used in lyophilized products. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* **2000**, *54*, 144-149.
- [219] Costantino, H. R.; Langer, R.; Klivanov, A. M. Solid-Phase Aggregation of Proteins under Pharmaceutically Relevant Conditions. *J. Pharm. Sci.* **1994**, *83*, 1662-1669.
- [220] Nguyen, T. H. Oxidation degradation of protein pharmaceuticals. *ACS Symp. Ser.* **1994**, *567*, 59-71.
- [221] Bonilla Vidales, C. M.; Plett, E. A.; Loncin, M. Observations on aroma retention during airdrying of sugar solutions. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* **1981**, *14*, 153-159.
- [222] Vermeer, A. W. P.; Giacomelli, C. E.; Norde, W. Adsorption of IgG onto hydrophobic teflon. Differences between the Fab and Fc domains. *Biochimica et Biophysica Acta* **2001**, *1526*, 61-69.
- [223] Norde, W.; Zoungrana, T. Activity and structural stability of adsorbed enzymes. *Progress in Biotechnology* **1998**, *15*, 495-504.
- [224] Norde, W. The behavior of proteins at interfaces, with special attention to the role of the structure stability of the protein molecule. *Clinical Materials* **1992**, *11*, 85-91.
- [225] Norde, W. Proteins at solid surfaces. *Physical Chemistry of Biological Interfaces.* **2000**.
- [226] Al Malah, K.; Abdellatif Hasan Mousa, H. Protein adsorption kinetics. *Surfactant Science Series* **2002**, *107*, 847-870.
- [227] Elwing, H.; Goelander, C. G. Protein and detergent interaction phenomena on solid surfaces with gradients in chemical composition. *Advances in Colloid and Interface Science* **1990**, *32*, 317-339.

- [228] Rapoza, R. J.; Horbett, T. A. Changes in the SDS elutability of fibrinogen adsorbed from plasma to polymers. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **1989**, *1*, 99-110.
- [229] Wannerberger, K.; Welin-Klintstroem, S.; Arnebrant, T. Activity and Adsorption of Lipase from *Humicola lanuginosa* on Surfaces with Different Wettabilities. *Langmuir* **1997**, *13*, 784-790.
- [230] Elam, J. H.; Nygren, H. Adsorption of coagulation proteins from whole blood on to polymer materials: relation to platelet activation. *Biomaterials* **1992**, *13*, 3-8.
- [231] Read, M. J.; Burkett, S. L.; Mayes, A. M. Control and characterization of protein adsorption on ceramic surfaces. *Materials Research Society Symposium Proceedings* **2000**, *599*, 337-342.
- [232] Herman, A. C.; Boone, T. C.; Lu, H. S. Characterization, formulation, and stability of Neupogen (Filgrastim), a recombinant human granulocyte colony stimulating factor. *Pharmaceutical Biotechnology* **1996**, *9*, 303-328.
- [233] Lu, H. S.; Boone, T. C.; Souza, L. M.; Lai, P. H. Disulfide and secondary structures of recombinant human granulocyte colony stimulating factor. *Arch. Biochem. Biophys.* **1989**, *268*, 81-92.
- [234] Wannerberger, K.; Arnebrant, T. Lipases from *Humicola lanuginosa* adsorbed to hydrophobic surfaces - desorption and activity after addition of surfactants. *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces* **1996**, *7*, 153-164.
- [235] Wannerberger, K.; Arnebrant, T. Comparison of the adsorption and activity of lipases from *Humicola lanuginosa* and *Candida antarctica* on solid surfaces. *Langmuir* **1997**, *13*, 3488-3493.
- [236] Mori, H.; Hiraoka, K.; Yorifuji, R.; Iwasaki, T.; Gomikawa, S.; Inagaki, O. ; Inoue, S.; Takamitsu, Y.; Fujita, Y. Adsorption of human recombinant erythropoietin on dialysis membranes in vitro. *Artificial Organs* **1994**, *18*, 725-728.
- [237] Klinkmann, H.; Vienken, J. Membranes for dialysis. *Nephrology, Dialysis, Transplantation.* **1995**, *10 Suppl 3*, 39-45.
- [238] Yago, K.; Matsubara, H.; Sakuma, M.; Otori, K.; Shimada, S. Adsorption of rhG-CSF to various intravenous filters. *Byoin Yakugaku* **1996**, *22*, 359-363.
- [239] Przybycien, Todd M. and Vedantham, Ganesh. Pharmaceutical protein-catheter surface interactions in continuous infusion therapy. *Book of Abstracts, 218th ACS National Meeting*, New Orleans, **Aug. 22-26 1999**.
- [240] Schroder, C. H.; Swinkels, L. M.; Reddingius, R. E.; Sweep, F. G.; Willems, H. L.; Monnens, L. A. Adsorption of erythropoietin and growth hormone to peritoneal dialysis bags and tubing. *Peritoneal Dialysis International.* **2001**, *21*, 90-92.
- [241] Johnston, T. P. Adsorption of recombinant human granulocyte colony stimulating factor (rhG-CSF) to polyvinyl chloride, polypropylene, and glass: Effect of solvent additives. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* **1996**, *50*, 238-245.
- [242] Deepa Sarkar and D.K.Chattoraj. Kinetics of desorption of proteins from the surface of protein-coated alumina by various desorbing reagents. *Journal of Colloid and Interface Science* *178*, **1996**, 606-613.
- [243] Wang, P. L.; Udeani, G. O.; Johnston, T. P. Inhibition of granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) adsorption to polyvinyl chloride using a nonionic surfactant. *Int. J. of Pharmaceutics* **1995**, *114*, 177-184.
- [244] Taylor, G. T.; Troy, P. J.; Sharma, S. K. Protein adsorption from seawater onto solid substrata. I. Influences of substratum surface properties and proteins concentration. *Marine Chemistry* **1994**, *45*, 15-30.

- [245] Turner, S. R.; Litt, M.; Lynn, W. S. Protein adsorption to Teflon. Effect on apparent molecular area of dipalmitoyl lecithin. *Journal of Colloid and Interface Science* **1974**, *48*, 100-104.
- [246] Matsui, T.; Tanaka, S.; Akaike, T.; Sakuraj, Y.; Nitadori, Y.; Kataoka, K. ; Tsuruta, T. Study of plasma proteins adsorbed on polymer surfaces by Fourier transform infrared spectrometry. *Journal of Bioengineering* **1979**, *2*, 539-541.
- [247] Hajra, S.; Chatteraj, D. K. Protein adsorption at solid-liquid interfaces: part II - adsorption from binary protein mixture. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* **1991**, *28*, 124-132.
- [248] Rapoza, R. J.; Horbett, T. A. The effects of concentration and adsorption time on the elutability of adsorbed proteins in surfactant solutions of varying structures and concentrations. *Journal of Colloid and Interface Science* **1990**, *136*, 480-493.
- [249] Wahlgren, M.; Arnebrant, T. Removal of T4 Lysozyme from Silicon Oxide Surfaces by Sodium Dodecyl Sulfate: A Comparison between Wild Type Protein and a Mutant with Lower Thermal Stability. *Langmuir* **1997**, *13*, 8-13.
- [250] Becker, G. W.; Bowsher, R. R.; Mackellar, W. C.; Poor, M. L.; Tackitt, P. M.; Riggan, R. M. Chemical, physical, and biological characterization of a dimeric form of biosynthetic human growth hormone. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **1987**, *9*, 478-487.
- [251] Schmidt, R., Gossler, U., and Winter, G. Xerogels - a topical protein delivery system for moist wound healing. *30th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society Glasgow, Scotland*, **19-23 July 2003**.
- [252] Amsden, B. Solute diffusion in hydrogels. An examination of the retardation effect. *Polymer Gels and Networks* **1998**, *6*, 13-43.
- [253] Kumar, A.; Agarwal, R.; Batra, R.; Gupta, M. N. Effect of polymer concentration on recovery of the target proteins in precipitation methods. *Biotechnology Techniques* **1994**, *8*, 651-654.
- [254] Kumar, A.; Gupta, M. N. An assessment of nonspecific adsorption to Eudragit S-100 during affinity precipitation. *Molecular Biotechnology* **1996**, *6*, 1-6.
- [255] Sardar, M.; Agarwal, R.; Kumar, A.; Gupta, M. N. Noncovalent immobilization of enzymes on an enteric polymer Eudragit S-100. *Enzyme and Microbial Technology* **1997**, *20*, 361-367.
- [256] Amorim, M. J. L. G.; Ferreira, J. P. M. Microparticles for delivering therapeutic peptides and proteins to the lumen of the small intestine. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. **2001**, *52*, 39-44.
- [257] Abu-Izza, K. A.; Lu, D. R. Effect of gastrointestinal protein adsorption on the in vitro release of AZT from ethylcellulose microspheres. *Pharmaceutical Development and Technology*. **1998**, *3*, 495-501.
- [258] Dielektrizitätskonstante. [www.igb.fraunhofer.de/ www/GF/GrenzflMem/ Grenzflächen/Gfphysik/Gfphys-PolmOberfl.html](http://www.igb.fraunhofer.de/www/GF/GrenzflMem/Grenzflächen/Gfphysik/Gfphys-PolmOberfl.html) . **2003**.



# LEBENS LAUF

## Persönliche Daten

Anke Stabenau  
Geboren am 31.5.1973 in München  
ledig  
deutsch

## Schul Ausbildung

1979 – 1983                    Grundschule Kleinfeldschule in Germering  
1983 – 1992                    Carl-Spitzweg-Gymnasium in Germering  
1992                              Abschluss mit Abitur (Note 1,1)

## Hochschulausbildung

1992 – 1997                    Studium der Pharmazie an der Ludwig-Maximilians-  
Universität München

## Praktika

1992                              Stern Apotheke in Germering (Famulatur)  
1993                              Krankenhausapotheke Großhadern in München (Famulatur)  
11/1997 – 5/1998              Winthir Apotheke in München  
5/1998 – 11/1998              Goedecke in Freiburg, Abteilung Galenische Entwicklung  
12/1998                            Approbation als Apotheker

## Wissenschaftliche Tätigkeit

3/1999 - 7/2003              Dissertation am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie  
und Biopharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität  
München unter der Leitung von Prof. Dr. G. Winter.

## Berufliche Tätigkeit

3/1999 - 7/2003              Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für  
Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Ludwig-  
Maximilians-Universität München.