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

Ölige Suspensionen als parenterale Depotsysteme für rekombinante Proteine

vorgelegt von Andreas Rutz
aus Gunzenhausen

2007

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. Wolfgang Frieß betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, am 26.07.2007

Andreas Rutz

(Andreas Rutz)

Dissertation eingereicht am 26.07.2007

1. Gutachter Prof. Dr. W. Frieß

2. Gutachter Prof. Dr. G. Winter

Mündlichen Prüfung am 25.09.2007

Danksagung

Für die sorgfältige Auswahl des Promotionsthemas, die umfassende wissenschaftliche Betreuung und die Beratung zu vielen Lebenslagen möchte ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. Frieß bedanken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Winter und den Mitarbeitern der beiden Arbeitskreise für die freundliche Aufnahme, den respektvollen Umgang und die jederzeitige gegenseitige Unterstützung bei vielen Fragen und Messungen.

Herrn Dr. Loch vom Zentralen Institut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr in Unterschleißheim danke ich für die Durchführung der GC Bestimmungen.

Herrn PD Dr. Hartmann, Praxis für pädiatrische Endokrinologie Frankfurt, und Herrn Dr. Gropp, Bernina Biosystems Martinsried, danke ich für die freundliche Überlassung des Modellproteins hGH und die Durchführung der hGH Bestimmungen der Proben der in vivo Studie

Herrn Prof. Dr. Uludag, University of Alberta Edmonton Canada, danke ich für die Unterstützung bei der Planung und für die Durchführung der in vivo Studie.

Frau Imke Leitner und Herrn Davide Vecchia danke ich für die große Hilfe bei den vielen rheometrischen Messungen und HPLC Bestimmungen.

Der Computergruppe der beiden Arbeitskreise, insbesondere Herrn Dr. Ingo Presser, Herrn Dr. Richard Fuhrherr und Herrn Thomas Willi, möchte ich dafür danken, dass ich von Ihnen so viel im Umgang mit Hard- und Software der Rechner lernen durfte.

Meinen beiden Kollegen in Labor B.003 Frau Dr. Iris Metzmacher und Herrn Dr. Daniel Schwartz danke ich für das fröhliche Miteinander und die vielfältigen wissenschaftlichen Diskussionen ganz besonders.

Ich danke meinen beiden Eltern Frau Luise Rutz und Herrn Rudolf Rutz für meine Erziehung, die Unterstützung auf allen Wegen und die behütete Kindheit.

Für Heike

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung 1
I.1. Proteine als neue Wirkstoffgruppe 1
I.1.1. Historische Entwicklung und aktuelle Marktbedeutung 1
I.1.2. Spezielle Anforderungen für die Formulierung von Proteinen 2
I.1.3. Parenterale Depotarzneiformen mit verlängerter Wirkstofffreigabe 5
I.1.4. Ausgewählte Beispiele für die Entwicklung von Formulierungen mit verlängerter Wirkungsdauer 6
I.2. Ölige Formulierungen für pharmazeutische Anwendungen 11
I.2.1. Eigenschaften und Anforderungen 11
I.2.2. Ölige Lösungen 20
I.2.3. Ölige Suspensionen 22
I.3. In vitro Freisetzungssysteme 26
I.4. Somatotropin (GH) 30
I.4.1. Substanzspezifische Eigenschaften und physiologische Wirkung 30
I.4.2. Posilac® ex Monsanto 33
I.5. Zielsetzung der Arbeit 39
II. Materialien und Methoden 40
II.1. Materialien 40
II.1.1. Pflanzliche und semisynthetische Öle 40
II.1.2. Formulierungsadditive 41
II.1.3. Modellproteine 41
II.2. Methoden 42
II.2.1. Fettsäure GC 42
II.2.2. DSC 43
II.2.3. Elementaranalyse 43
II.2.4. ICP-AES 43
II.2.5. Rheometrie 43
II.2.6. Röntgendiffraktometrie 44

II.2.7. Karl Fischer Bestimmungen 44
II.2.8. Laserlichtstreuung 44
II.2.9. Bestimmung der in vitro Freisetzung 45
II.2.10. BCA Assay 46
II.2.11. Bestimmung der in vivo Freisetzung 46
II.2.12. hGH Assay 47
II.2.13. Verfahren zur hGH Extraktion aus öligen Trägern 47
II.2.14. SEC HPLC 48
II.2.15. RP HPLC 49
III. Ergebnisse und Diskussion 50
III.1. Charakterisierung der verschiedenen Öle und ölhaltigen Handelsprodukte 50
III.1.1. Fettsäureverteilung der Öle 50
III.1.2. Rheometrische Untersuchungen 52
III.1.3. Wasseraufnahmefähigkeit verschiedener öliger Grundlagen 55
III.1.4. Fazit der Untersuchung öliger Grundlagen und Handelsprodukte 57
III.2. Charakterisierung der eingesetzten Suspensionsstabilisatoren 57
III.2.1. Bestimmung der Fettsäureverteilung der Suspensionsstabilisatoren 59
III.2.2. ICP-AES und Elementaranalyse der Aluminiumstearate 60
III.2.3. Berechnung des Komplexierungsgrades der Aluminiumstearate 62
III.2.4. DSC Untersuchungen der Suspensionsstabilisatoren 65
III.2.5. Röntgendiffraktometrie der Aluminiumstearate 69
III.2.6. Fazit der Untersuchung der Formulierungshilfsstoffe 70
III.3. Untersuchung der physikalischen Stabilität öliger Formulierungen mit ausgewählten Formulierungshilfsstoffen 71
III.3.1. Formulierungen mit Dynasan 114® und Dynasan 118® 71
III.3.2. Formulierungen mit Rheopearl KL® und Rheopearl TT® 72
III.3.3. Formulierungen mit den verschiedenen Aluminiumstearaten 73
III.3.4. Fazit der Untersuchung der Formulierungsstabilität 75
III.4. Methoden zur Herstellung von Pulvern zur Suspension 77

III.4.1. Untersuchung der Partikelgröße in Jenacillin O2 Mega® 77
III.4.2. Gefriertrocknung von BSA Lösungen und anschließende Zerkleinerung des Gefrierkuchens 78
III.4.2.1. Partikelzerkleinerung mittels Kreisschüttler 79
III.4.2.2. Partikelzerkleinerung mittels Hochleistungsdispergierer 80
III.4.2.3. Partikelzerkleinerung mittels Mörsermühle 82
III.4.3. Sprühtrocknung konzentrierter BSA Lösungen 84
III.4.4. Fazit der Partikelzerkleinerung 85
III.5. Rheologische Eigenschaften der Grundlagen 87
III.6. Untersuchung der Wasseraufnahme verdickter Grundlagen 92
III.7. In vitro und in vivo Freisetzungsversuche 94
III.7.1. In vitro Testsystem 94
III.7.2. In vitro BSA Freisetzungsversuche 95
III.7.3. Fazit der in vitro Freisetzungsversuche 105
III.7.4. In vivo hGH Freisetzungsversuche 106
III.7.5. Vergleich mit Freisetzungsdaten alternativer Somatotropin Formulierungen oder lipophiler Trägersystemen 111
III.7.6. Fazit der in vitro und in vivo Freisetzungsversuche 114
III.8. Untersuchungen zur Stabilität von hGH in ausgewählten öligen Matrices 115
III.8.1. Bestimmung der hGH Stabilität in öligen Suspensionen 115
III.8.2. Fazit der Untersuchungen zur Stabilität von hGH in öligen Trägern 121
III.9. Zusammenfassung der Ergebnisse 123
IV. Literaturverzeichnis 126

I. Einleitung

I.1. Proteine als neue Wirkstoffgruppe

I.1.1. Historische Entwicklung und aktuelle Marktbedeutung

Die Entwicklungen auf dem Gebiet der rekombinanten DNA Technologie der letzten 30 Jahre eröffneten vollkommen neue Möglichkeiten für die Gewinnung von Arzneistoffen aus der Gruppe der Peptide und Proteine. Bis dahin wurden diese hauptsächlich durch kosten- und zeitintensive Verfahren aus tierischen oder menschlichen Quellen dargestellt (vgl. Kapitel I.4). Die Aufreinigung der Extrakte zur Vermeidung der Übertragung von Krankheiten und die Begrenztheit des zur Verfügung stehenden Ausgangsmaterials stellten damals für die pharmazeutischen Hersteller große Herausforderungen dar. Heutzutage ermöglichen es die modernen Methoden der Biotechnologie große Mengen an Protein zu einem ökonomisch angemessenen Preis herzustellen (Frokjaer et al.; 2005).

Nach aktuellem Stand sind 2007 in Deutschland 122 Arzneimittel mit 92 rekombinant hergestellten Wirkstoffen zugelassen (VfA e.V.; 2007). In jedem Jahr kommen durchschnittlich fünf neue Arzneimittel gentechnologischen Ursprungs auf den Markt. Für die Zukunft wird erwartet, dass sich dieser Trend weiter verstärkt, da ein großer Anteil der sich in Entwicklung befindlichen Arzneistoffe biotechnologisch dargestellt wird (vgl. Abbildung 1).

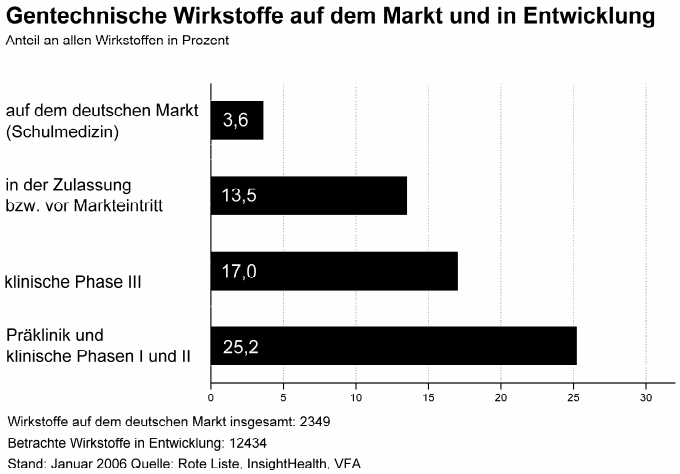


Abbildung 1: Biotechnologisch gewonnene Arzneistoffe nach Zulassung und Stand der klinischen Entwicklung (VfA e.V.; 2007)

Auch aus den Verkaufszahlen lässt sich die Bedeutung dieser Arzneimittelgruppe ablesen. Mit gentechnisch hergestellten Arzneimitteln wurden 2006 weltweit rund 32

Milliarden US-Dollar, entsprechend 7% des gesamten Arzneimittelmarktes, umgesetzt. Am deutschen Markt wurden 2006 etwa 2 Milliarden Euro Umsatz erzielt. Den größten Anteil daran haben mit jeweils einem Drittel Insulinpräparate und Immunmodulatoren wie Interferon oder Tumor Nekrose Faktor α (TNF-α). Es folgen mit 11% das Hormon Erythropoietin (EPO) und dessen Varianten. Die übrigen 30% verteilen sich auf Impfstoffe, Hormone wie Somatotropin und weitere Wirkstoffe (vgl. Abbildung 2).

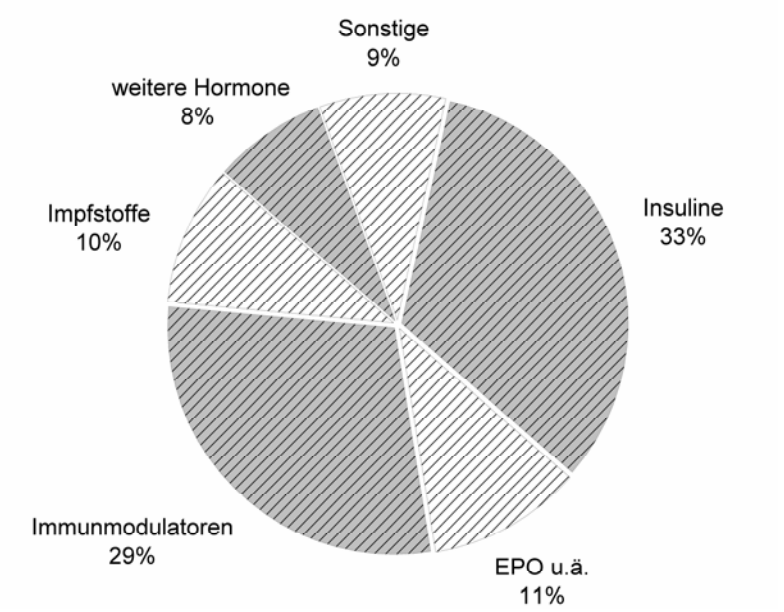


Abbildung 2: Umsatzverteilung rekombinant hergestellter Arzneimittel nach (VfA e.V.; 2006)

I.1.2. Spezielle Anforderungen für die Formulierung von Proteinen

Die Formulierung eines Proteins stellt für den pharmazeutischen Technologen eine große Herausforderung dar. Um erfolgreich eine Arzneiform entwickeln zu können, ist das vollständige Verstehen der Eigenschaften des Wirkstoffes hinsichtlich physikalisch-chemischer Stabilität, Immunogenität und Pharmakokinetik notwendig. Die therapeutische Aktivität des Proteins hängt in großem Maße von seiner räumlichen Struktur ab. Diese ist sehr flexibel und reagiert empfindlich auf äußere Einflüsse (Frokjaer et al.; 2005). Ziel jeder Formulierung für Biopharmazeutika ist deshalb, die Stabilität des Proteins zu jedem Zeitpunkt während Lagerung, Transport und Anwendung sicherzustellen (Lee; 2000) (Cady et al.; 1992) (Hageman et al.; 1992).

Hinsichtlich der Stabilität kann zwischen chemischen und physikalischen Abbaureaktionen unterschieden werden.

Je nach Verteilung der Aminosäuren im Proteingrundgerüst können folgende chemische Reaktionen auftreten:

- Deamidierung von Asparagin- und Glutaminseitenkettenresten
- Oxidation von Cystein-, Methionin-, Histidin-, Tryptophan- und Tyrosinseitenkettenresten
- Disulfidbrückenbruch oder -austausch zwischen Cysteinseitenkettenresten
- Isomerisierung an chiralen Aminosäuren
- Hydrolyse der Primärsequenz, vorwiegend nach Asparaginsäure
- Maillardreaktion mit reduzierenden Zuckern aus zugesetzten Hilfsstoffen

Folgende physikalische Instabilitäten können bei Proteinen auftreten:

- Adsorption an Ober- und Grenzflächen
- Denaturierung
- Aggregation
- Präzipitation

Die Abbaureaktionen können durch äußere Umgebungsfaktoren wie hohe Temperaturen, extreme pH-Werte, hohe Salzkonzentrationen, Scherung, organische Lösungsmittel, Feuchtigkeit und Licht verstärkt werden. Detaillierte Darstellungen der Abbaureaktionen von Proteinen und der Möglichkeiten zur Stabilisierung finden sich in einer Reihe von Übersichtsartikeln (Frokjaer et al.; 2005) (Wang; 2005) (Parkins et al.; 2000) (Wang et al.; 1988) (Manning et al.; 1989) (Cleland et al.; 1993) (Arakawa et al.; 1993) (Krishnamurthy et al.; 2002) (Wang; 1999).

Neben dem Verlust der biologischen Aktivität des Wirkstoffmoleküls, können physikalisch-chemische Instabilitäten auch zur Bildung von Reaktionsprodukten führen, die in vivo Immunantworten auslösen. Dadurch können Hypersensitivitäten entstehen oder es kommt zur Bildung von Antikörpern, die sowohl die exogen zugeführten als auch die körpereigenen Wirkstoffmoleküle inaktivieren (Hermeling et al.; 2004) (Cady et al.; 1992).

Peptid- und proteinhaltige Arzneimittel können nicht oral verabreicht werden, da diese den Magen-Darm-Trakt nicht unbeschadet überstehen. Die Standardapplikation ist deshalb die parenterale Gabe durch Injektion oder Infusion. Werden Proteine als wässrige Lösungen injiziert, können in vivo bei vielen Wirkstoffen ein schneller Abbau und kurze biologische Halbwertszeiten beobachtet werden. Zum Beispiel

beträgt die Plasmahalbwertszeit für infundiertes Interferon-α-2b nur 4h (Reddy et al.; 2002). Um therapeutische Wirkstoffspiegel aufrechterhalten zu können, müssen deshalb häufig kurze Dosierungsintervalle mit wiederholten Injektionen gewählt werden (Reichert et al.; 1995) (Sinha et al.; 2003) (Goldenberg et al.; 1999).

Die parenterale Gabe ist für den Patienten grundsätzlich unangenehm und belastet die Zustimmung zur Therapie. Enge Dosierungsschemata mit häufigen Injektionen werden von den Patienten selbst nur eingeschränkt eingehalten und können deshalb oft nur mit professioneller Unterstützung durchgeführt werden. Somit sind sie aus ökonomischer Sicht kosten- und zeitintensiv. Aktuell werden deshalb große Mittel investiert, um alternative Applikationswege für die Verabreichung von Makromolekülen zu erschließen. Diese sollen den Patienten weniger belasten und einfacher durchgeführt werden können.

Verglichen mit transdermalen und oralen Ansätzen ist die Entwicklung pulmonaler Applikationssysteme am weitesten fortgeschritten. Nektar Therapeutics kooperiert mit den Firmen Pfizer und Sanofi-Aventis bei der Entwicklung und Vermarktung von pulverförmigem Insulin unter dem Handelsnamen Exubera®. Insulinpartikel mit einer Teilchengröße von 1-3µm werden durch den Luftstrom des Inhalators aus Folienblistern aufgewirbelt und können anschließend aus einem Vorratsgefäß kontrolliert inhaliert werden. Nach umfangreichen Langzeitstudien zu Dosierung und Verträglichkeit wurde Exubera@ 2006 in Deutschland zugelassen und ist dort seit Mitte des Jahres am Markt verfügbar (Pfizer Deutschland GmbH; 2006). Novo Nordisk und Aradigm entwickeln das Produkt AERx/iDMS® zur Inhalation flüssigen Insulins. Für die Applikation wurde ein digitales Inhalationssystem hergestellt, das mit Insulineinzeldosen beladen werden kann. Analog zu den Insulin-Pens kann die gewünschte Insulindosis direkt am Gerät eingestellt werden. Für die Inhalation wird ein Sprühnebel aus 2-3µm großen Flüssigkeitströpfchen mit gelöstem Insulin produziert. Um Fehldosierungen auszuschließen, werden während der Inhalation Atemtiefe und Atemtempo überwacht und das Insulin nur bei korrekter Atemtechnik vernebelt. Nach den ersten klinischen Studien wurde im Mai 2006 eine Phase III Studie mit 3400 Patienten initiiert, die aktuell noch andauert (Novo Nordisk; 2006). Eli Lilly und Alkermes kooperieren in der Entwicklung des AIR® Pulverinhalators. Gegenüber dem Exubera® Inhalator werden für das AIR® System poröse Insulinpartikel mit geringerer Dichte und geometrischen Durchmessern von ca. 5µm verwendet. Nach der Inhalation sollen diese eine Insulinfreisetzung von bis zu 96h gewährleisten können. Im

Januar 2007 haben Alkermes und Eli Lilly den Aufbau weitere Fertigungskapazitäten vereinbart, um nach dem Abschluss einer laufenden Phase II Studie den Markteintritt vorbereiten zu können. Grundsätzlich haben alle vorgestellten inhalativen Anwendungen allerdings gemeinsam, dass ein Grossteil der applizierten Insulindosis in den oberen Atemwegen abgeschieden wird und gewöhnlich weniger als 20% tatsächlich resorbiert wird (Gomez-Perez et al.; 2005) (Mandal; 2005) (Trubo; 2005).

Trotz der jüngsten Entwicklungen und obwohl kleinere Moleküle wie Oxytocin oder Desmopressin auch transnasal verabreicht werden können, ist bis heute die parenterale Gabe die Standardapplikation für Proteine. Um dennoch die Belastung für den Patienten zu verringern und die Anzahl der Injektionen reduzieren zu können, erscheinen gerade für diese Wirkstoffgruppe parenterale Depotarzneiformen von besonderem Vorteil (Reichert et al.; 1995) (Hageman; 1993) (Reithmeier et al.; 2001b) (Sinha et al.; 2003).

I.1.3. Parenterale Depotarzneiformen mit verlängerter Wirkstofffreigabe

Der klinische Einsatz von Arzneiformen mit kontrollierter Wirkstofffreisetzung besitzt für den Patienten und den Therapeuten viele Vorteile. Im Vergleich zu schnell freisetzenden Arzneimitteln können Retardarzneiformen dazu beitragen, dass gleichmäßigere Blutspiegel erreicht und hohe systemische Blutspiegelspitzen vermieden werden. Durch die geringeren Schwankungen der Wirkstoffspiegel kann die Wirkstoffmenge reduziert und dosisabhängige Nebenwirkungen vermindert werden. Eine zielgerichtete und kontrollierte Wirkstofffreisetzung benötigt weniger Injektionen und ermöglicht es, das Dosierungsregime patientengerechter zu gestalten. Die Zustimmung des Patienten zu seiner Therapie kann auf diese Weise wesentlich erhöht werden (Goldenberg et al.; 1999) (Burgess et al.; 2004) (Benson et al.; 1998) (Larsen; 2001) (Larsen; 2003).

Neben diesen Vorteilen, die für die Anwendung von Retardarzneiformen sprechen, müssen dennoch auch einige grundsätzliche Nachteile bedacht werden. Parenteral zu verabreichende Retardarzneimittel sind in der Regel nur für intramuskuläre oder subkutane Anwendungen geeignet. Bei versehentlichen intravenösen Injektionen können durch verschlossene Blutgefässe Embolien in den Blutbahnen induziert werden. Unbedingt müssen intraarterielle Injektionen vermieden werden, da deren Blockade zur Ausbildung von Gangränen bis hin zum Absterben ganzer Gliedmaßen

führen kann (Benson et al.; 1998) (Larsen; 2001). Fehlgebrauch kann bei Arzneiformen mit Wirkstoffreservoir dazu führen, dass die für das gesamte Dosierungsintervall vorgesehene Wirkstoffmenge auf einmal freigesetzt wird und somit unbeabsichtigt sehr hohe systemische Blutspiegel erzeugt werden (Burgess et al.; 2004).

Da parenteral verabreichte Depotformulierungen nur schwierig entfernt werden können, sollte die Möglichkeit der Ausbildung einer Hypersensibilität des Patienten gegenüber dem Wirkstoff grundsätzlich beachtet werden. Zur Abklärung wird deshalb vor der erstmaligen Injektion eines Langzeitdepots mit großer Wirkstoffmenge häufig die Gabe einer geringen und nicht retardierten Dosis empfohlen (Benson et al.; 1998) (Burgess et al.; 2004) (Larsen; 2001) (Janssen-Cilag GmbH; 2005).

I.1.4. Ausgewählte Beispiele für die Entwicklung von Formulierungen mit verlängerter Wirkungsdauer

Die Verlängerung der Wirkungsdauer eines Arzneistoffs kann auf verschiedenen Wegen erreicht werden.

Gezielte Modifikationen des Wirkstoffmoleküls selbst können zu Veränderungen der Pharmakokinetik des Arzneistoffs führen. Für Proteine wurde Mitte der 70er Jahre von Davis et al. die Möglichkeit der Pegylierung zur Verlängerung der Wirkdauer entdeckt (Davis; 1976). Nach parenteraler Gabe der pegylierten Wirkstoffmoleküle sind renale Clearance und Wirkstoffabbau im Vergleich zu den nativen Molekülen deutlich verlangsamt. Therapeutische Blutspiegel können deshalb über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten werden. Auch wird die Immunogenität der applizierten Wirkstoffe stark vermindert (Roberts et al.; 2002) (Molineux; 2003). In Tabelle 1 sind die Halbwertszeiten für ausgewählte Wirkstoffe und deren pegylierten Varianten aufgeführt. Deutlich kann man den Anstieg der Halbwertszeit und die Verlängerung der Dosierungsintervalle erkennen.

Tabelle 1: Handelsprodukte mit nativen und pegylierten Wirkstoffen, Daten aus den jeweiligen Fachinformationen der Produkte

Produkt	Wirkstoff	Halbwertszeit	Dosierung
Roferon®	Interferon α-2a	3-4h	3x pro Woche s.c.
Pegasys®	Peginterferon α-2a	50-130h	1x pro Woche s.c.
Intron A®	Interferon α-2b	2-3h	3x pro Woche s.c.
PegIntron®	Peginterferon α-2b	~40h	1x pro Woche s.c.
Neupogen®	Filgastrim	3-4h	täglich s.c. nach Chemotherapiezyklus
Neulasta®	Pegfilgastrim	15-80h	1x s.c. nach Chemotherapiezyklus

Die nachträgliche chemische Pegylierung von Proteinen zur Modifikation der Moleküleigenschaften bildet allerdings einen zeit- und kostenintensiven Schritt der exakt gesteuert werden muss (Roberts et al.; 2002).

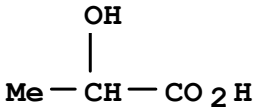
Eine andere Möglichkeit die Freigabe eines Arzneistoffs zu verlangsamen, ist die Bildung schwerlöslicher Verbindungen, die den Wirkstoff nach Applikation verzögert freisetzen. Hinsichtlich Herstellungsumfang und Marktbedeutung stellt für Proteine das Insulin ein bedeutendes Beispiel dar. Durch Komplexierung mit Zink Ionen, z.B. in Monotard®, Ultratard®, oder Bindung an Protaminsulfat, z.B. Huminsulin Basal®, Protaphane®, bilden sich amorphe und kristalline Niederschläge, die sich nach der Injektion verzögert auflösen. Die Insulinfreisetzung wird im Vergleich zu Normalinsulin, z.B. Actrapid®, deutlich verlangsamt (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Wirkprofile für Insulinformulierungen aus (Becker; 2001)

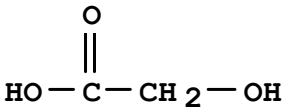
Wirkstoff	Wirkungsbeginn	Wirkungsmaximum	Wirkungsdauer
Normalinsulin	0,5-1h	2-3h	6-8h
Protaminsulfat-Verzögerungsinsulin	1-2h	5-8h	18-24h
Zink-Verzögerungsinsulin	3-4h	9-15h	22-26h

Technologisch gesehen ist die Herstellung der oben beschriebenen Komplexe ein vergleichsweise übersichtliches und etabliertes Verfahren. Die Wirkstofffreisetzung aus diesen Depotformulierungen erfolgt in vivo allerdings mit merklicher Variabilität. In systematischen Untersuchungen wurden Schwankungsbreiten von 30% bezogen auf c_{max} und t_{max} festgestellt (Heinemann; 2002) (Davies; 2004) (Gin et al.; 2005).

Neben der Modifizierung des Wirkstoffmoleküls oder der Bildung schwer löslicher Verbindungen kann die Freisetzungsgeschwindigkeit auch durch die Einbettung in bioabbaubarer Polymere gesteuert werden. Der Einsatz langkettiger Polymere aus Milchsäure (Lactic Acid, LA) und Glykolsäure (Glycolic Acid, GA) ist hier am weitesten verbreitet (Abbildung 3).



Milchsäure (LA)



Glykolsäure (GA)

Abbildung 3: Strukturformel Milchsäure und Glykolsäure

Zur Verzögerung der Freisetzung wird der Wirkstoff in ein Polymer, z.B. PLGA (Polylactic-glycolic-acid), eingebettet. Nach der Applikation erodiert dieses und setzt dabei den Wirkstoff frei. Insbesondere durch Veränderung der Dimensionen der Depotform, des Verhältnisses Wirkstoff zu Polymer oder des Verhältnisses LA zu GA innerhalb des Polymers kann die Freisetzungsgeschwindigkeit aus den Depotsystemen gezielt gesteuert werden (Cady et al.; 1992) (Burgess et al.; 2004) (Reddy; 2000) (Strickley; 1999).

In Tabelle 3 sind die in der Roten Liste 2006 aufgeführten PLGA Implantate und PLGA Mikrokapseln dargestellt.

Tabelle 3: Übersicht PLGA haltiger Depotformulierungen aus Rote Liste 2006

Produkt	Wirkstoff	Arzneiform	LA:GA	Dosierungsintervall
Zoladex® 3,6	Goserelinacetat	Implantat	50:50	4 Wochen
Zoladex® 10,8	Goserelinacetat	Implantat	95:5	12 Wochen
Profact Depot® 6,3/9,45	Buserelinacetat	Implantat	75:25	8/12 Wochen
Trenantone® 11,25	Leuprorelinacetat	Mikrokapseln	100:0	12 Wochen
Enantone® 3,75	Leuprorelinacetat	Mikrokapseln	75:25	4 Wochen
Risperdal Consta® 25	Risperidon	Mikrokapseln	75:25	2 Wochen
Sandostatin LAR® 10	Octreotidacetat	Mikrokapseln	55:45	4 Wochen
Decapeptyl N® 3,75	Triptorelinacetat	Mikrokapseln	50:50	4 Wochen
Pamorelin LA® 3,75/11,25	Triptorelinembonat	Mikrokapseln	50:50	4 Wochen
Nutropin Depot®	Somatotropin	Mikrokapseln	50:50	4 Wochen

Die Produktion der PLGA Retardmikrokapseln ist mit erheblichem technologischen Aufwand verbunden. Für die Herstellung der Nutropin Depot® Mikrokapseln wurde von Genentech und Alkermes das mehrstufige Verfahren Prolease® entwickelt (vgl. Abbildung 4). Im ersten Schritt wird zinkkomplexiertes humanes Wachstumshormon (hGH) gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wird anschließend in einer Lösung aus PLGA in Dichlormethan suspendiert. Die Suspension wird dann in ein Bad aus flüssigem Stickstoff und gefrorenem Ethanol gesprüht. Durch das Eintauchen in den flüssigen Stickstoff erstarren die zerstäubten PLGA-Dichlormethan-ZnhGH Tröpfchen. Sie sinken zu Boden und bilden auf dem gefrorenen Ethanol ein Sediment. Im nächsten Prozessschritt wird die Temperatur auf -70°C erhöht. Das Ethanol verflüssigt sich und entzieht den gefrorenen Partikeln das Dichlormethan. Es bilden sich feste PLGA-ZnhGH Teilchen. Die ethanolfeuchten Mikrokapseln werden anschließend abfiltriert und im Vakuum getrocknet (Johnson et al.; 1996b) (Strickley; 1999) (Cleland et al.; 1997b).

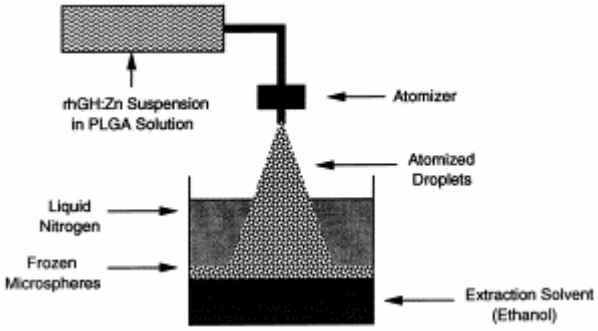


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Nutropin Depot® Herstellungsprozesses aus (Cleland et al.; 1997b)

Vier Jahre nach der Zulassung durch die FDA im Dezember 1999 wurde Nutropin Depot® 2004 von Genentech wieder vom Markt genommen. Als Begründung für die Rücknahme wurden die hohen Produktionskosten der Depotformulierung angeführt, die durch den Erlös am Markt dauerhaft nicht gedeckt werden konnten (Genentech Corp.; 2004).

Wie oben dargestellt, eröffnen PLGA Retardsysteme gute Möglichkeiten die Wirkstofffreisetzung aus der Depotformulierung zu verzögern. Da in vivo das Polymer aber wieder in die einzelnen kurzkettigen Säuren aufgespalten wird, sinkt der pH-Wert innerhalb der Formulierung deutlich ab. Dies kann die Stabilität des inkorporierten Proteins deutlich beeinträchtigen.

Alternativ zu den PLGA basierten Formulierungen, können auch Depotarzneiformen auf Basis fester Lipide, z.B. Stearinsäuretriglycerid, Palmitinsäuretriglycerid, herge-

stellt werden. Diese zeichnen sich durch eine hohe Biokompatibilität der Matrix und Inertheit gegenüber dem inkorporierten Wirkstoff aus. Je nach Partikelgröße werden Nanopartikel, Mikropartikel und Implantate unterschieden. In Abhängigkeit der gewählten Formulierungen können für Proteine Freisetzungszeiten von wenigen Tagen bis zu 4 Wochen erzielt werden (Reithmeier et al.; 2001a) (Mohl et al.; 2004) (Wissing et al.; 2004).

Neben der Herstellung fester Implantate oder Mikropartikel können bioabbaubare Polymere auch für die Herstellung flüssiger gelförmiger Depotformulierungen verwendet werden, die erst nach der Applikation feste Depots ausbilden.

Dunn et al. entwickelte unter dem Namen Atrigel® flüssige Depotformulierungen auf Basis von PLA als bioabbaubarem Polymer und N-Methyl-Pyrrolidon (NMP) als Lösungsmittel (Dunn; 1990). Als erstes Produkt dieser Entwicklungsreihe erhielt Atridox® 2001 die Zulassung. Im Bereich der Zahnmedizin wird Doxycyclinhyclat zur Behandlung der chronischen Parodontitis verwendet. Zur Herstellung der gebrauchsfertigen Doxycyclinhyclat Suspension wird unmittelbar vor der Anwendung der Inhalt zweier Spritzen vermischt, die Doxycyclinhyclat Pulver und PLA-NMP Lösung enthalten. Nach der Applikation in die entzündeten Zahnfleischtaschen diffundiert das NMP aus der flüssigen Formulierung. Es bildet sich ein festes PLA-Doxycyclinhyclat Depot, das den Wirkstoff kontrolliert über 7 Tage freisetzt (Strickley; 1999) (Strickley; 2004).

Das Atrigel® Prinzip wird mit Eligard® (Wirkstoff Leuprorelinacetat, 75:25 LA:GA Polymer) auch für die parenterale Anwendung eingesetzt. Analog zu Atridox® wird die gebrauchsfertige Suspension unmittelbar vor Verwendung hergestellt und anschließend s.c. injiziert. Nach der Diffusion des Lösungsmittels in das umliegende Gewebe formt sich ein festes Depot, das den Wirkstoff verzögert freigibt. Das Dosierungsintervall beträgt hier 3 Monate. Bei parenteraler Applikation kann NMP allerdings zu Gewebsreizungen führen (Hatefi et al.; 2002) (Packhaeuser et al.; 2004) (Strickley; 2004).

Aktuell befindet sich mit SABER® (Sucrose Acetate Isobutyrate Extended Release) ein zu Atrigel® alternatives System in den späten Phasen der klinischen Entwicklung (Durect Corporation; 2007). Saccharoseacetatisobutyrat (SAIB, vgl. Abbildung 5) wird seit langem im Bereich der Getränkeindustrie zur Stabilisierung von Emulsionen, insbesondere zur Stabilisierung von Zitrusaromen in Erfrischungsgetränken, eingesetzt.

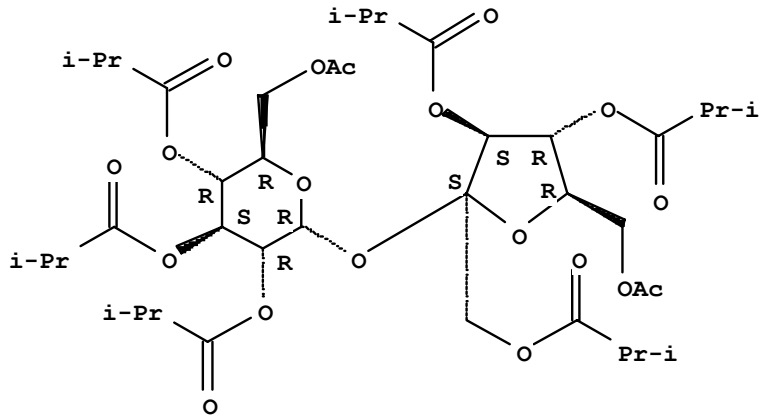


Abbildung 5: Molekülstruktur Saccharoseacetatisobutyrat

Chemisch gesehen ist SAIB im Gegensatz zu PLGA kein Polymer, sondern ein lipophiler Zucker. Alle freien Hydroxygruppen des Saccharosegrundgerüstes sind mit Acetat- oder Isobutyratresten verestert. SAIB löst sich in hydrophoben Medien wie Ethanol und Benzylbenzoat, während es in Wasser unlöslich ist. Die Anwendung von SAIB als Matrixbildner für parenterale Depotformulierungen untersuchten erstmals Tipton und Smith bei Southern BioSystems (Tipton; 1996) (Tipton; 2003). Zur Applikation wird SAIB zunächst in Ethanol/Benzylbenzoat/Miglyol Gemischen gelöst. Anschließend wird der Wirkstoff suspendiert. Nach der Injektion diffundieren die Kosolventien aus der Formulierung und hinterlassen ein festes Depot, das den Wirkstoff verzögert freisetzt. Im Vergleich zu den Atrigel® Formulierungen führen die SABER® Systeme zu einer niedrigeren Freisetzung in den ersten Phasen nach der Applikation (Burgess et al.; 2004) (Okumu et al.; 2002) (Okumu; 2001).

I.2. Ölige Formulierungen für pharmazeutische Anwendungen

I.2.1. Eigenschaften und Anforderungen

Im Bereich der pharmazeutischen Technologie haben Formulierungen mit pflanzlichen Ölen eine große Tradition. Wirkstoffe werden dann in einem lipophilen Medium formuliert, wenn sie im Wässrigen unlöslich oder instabil sind, wenn sie Irritationen hervorrufen, die durch das ölige Vehikel vermindert werden können, oder wenn für den Wirkstoff eine nachhaltige Freisetzung erzielt werden soll (Senior et al.; 2000) (Berry et al.; 2000).

Ein ideales Öl für die Anwendung in Injektabilia sollte folgende Eigenschaften haben (Larsen; 2001) (Senior et al.; 2000) (Schultz; 1997) (Gallardo et al.; 2000) (Floyd et al.; 1991) (Nema et al.; 1997):

- chemisch stabile Struktur mit niedrigen Anteilen an mehrfach ungesättigten Fettsäuren
- niedriger Gehalt an freien Fettsäuren und Hydroperoxiden
- rückstandsfreier Abbau zu toxikologisch unbedenklichen Spaltprodukten
- niedriger Wassergehalt
- keine pharmakologische Eigenwirkung
- nicht allergen
- einfache Sterilisierbarkeit

Fette Öle weisen per se chemisch stabile Strukturen auf, die gegenüber gelösten oder suspendierten Wirkstoffen inert reagieren. Eine Ausnahme bilden pflanzliche Öle, die einen hohen Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren z.B. Linol- oder Linolensäure besitzen. Diese können mittels radikalischer Oxidation durch Luftsauerstoff zu Hydroperoxiden umgesetzt werden, welche den Wirkstoff angreifen oder in vivo zu Gewebsreizungen führen (Floyd et al.; 1991) (Knepp et al.; 1998) (Berry et al.; 2000) (Goldenberg et al.; 1999). Aufgrund seines hohen Gehalts an natürlichen Antioxidantien ist die Verwendung von Sesamöl für pharmazeutische Zwecke unter diesem Aspekt von besonderem Vorteil (Senior et al.; 2000).

Nach der Applikation zeichnen sich pflanzliche Öle in vivo durch eine gute Verträglichkeit aus. Es werden kaum Reizungen oder Irritationen hervorgerufen (Larsen; 2001) (Traul et al.; 2000) (Radwan et al.; 1994) (Schultz; 1997). Mackey et al. hat eine systematische Untersuchung der Verträglichkeit von intramuskulär injizierten Testosteronethanoat Lösungen in Rizinusöl durchgeführt. Abgesehen von lokalen Nebenwirkungen, wie Schmerz an der Einstichstelle oder kleineren Blutungen, kam es bei den Injektionen zu keinen Problemen (Mackey et al.; 1995). Einen indirekten Hinweis für die gute Verträglichkeit pflanzlicher Öle liefern auch Berichte aus dem Bereich des Bodybuildings. Zur optischen Vergrößerung der Muskeln wurde missbräuchlich Sesamöl angewendet. Kleinere Injektionsvolumina wurden problemlos toleriert. Erst bei Anwendung sehr großer Mengen bis zu 1500ml traten am Injektionsort Gewebsveränderungen bis hin zu Nekrosen auf (Darsow et al.; 2000). Als Nebenerscheinungen wird bei wiederholten Injektionen größerer Volumina öliger Lösungen auch das Auftreten von Lymphadenopathien und Ölzysten beschrieben (Ahmed et al.; 1973). Bei bestimmten Patientengruppen liegen allergische Überempfindlichkeiten z.B. gegenüber Erdnussöl prävalent vor.

Um eine versehentliche Anwendung in diesen Populationen zu vermeiden, ist die Angabe des verwendeten Öles auf der Packungsbeilage zwingend vorgeschrieben (Senior et al.; 2000) (Floyd et al.; 1991). Durch Einsatz hochgereinigter Öle, die frei von Hydroperoxiden und sonstigen Verunreinigungen sind, konnte die Verträglichkeit weiter verbessert werden. Berichte aus älteren Quellen über Gewebsreizungen, sind deshalb sehr wahrscheinlich auf die Anwendung von Ölen mit einem höheren Gehalt an Verunreinigungen zurückzuführen (Larsen; 2003).

Die Applikation einer öligen Formulierung sollte tief intramuskulär, entfernt von größeren Nervenfasern oder Blutgefäßen, erfolgen. Am häufigsten werden Injektionen deshalb in den großen Gesäßmuskel, den äußeren Oberschenkelmuskel oder den oberen Armmuskel vorgenommen. Um lokale Schmerzen durch Gewebsausdehnungen oder -risse zu vermeiden, sollte das applizierte Injektionsvolumen möglichst klein sein (Strickley; 2004). Je nach Injektionsort und Applikationsart kann das Injektionsvolumen allerdings in gewissen Grenzen variiert werden (vgl. Tabelle 4). Als Injektionsvolumen für ölige Vehikel werden in Abhängigkeit von der Größe des Muskels 1 bis maximal 3ml empfohlen. Bei wiederholter Applikation ist ein Wechsel des Injektionsortes indiziert, um Reizungen zu vermeiden (Schultz; 1997) (Senior et al.; 2000) (Evans et al.; 1975).

Tabelle 4: Übersicht Injektionsvolumen in Abhängigkeit vom Injektionsort und –art (Larsen; 2003)

Injektionsart	Injektionsort	Lokalisation	Injektionsvolumen
i.m.	Gluteus medius	Äußere obere Hüfte	2–4ml, max. 6ml
	Ventrogluteal	Zentrale obere Hüfte	1-4ml, max. 6ml
	Quadriceps femoris	Zentraler mittlerer Schenkel	1-4ml, max. 6ml
	Vastus lateralis	Äußerer mittlerer Schenkel	1-4ml, max. 6ml
	Deltoideus	Oberarmmuskel am Schulteransatz	0,5ml, max. 2ml
s.c.	Panniculus adiposus	Unterhautfettgewebe, Abdomen auf Nabelhöhe, Gesäß, seitliche obere Hüfte, Schenkel, Rücken, mittlerer Oberarm	0,5ml, max. 2ml

Aus der Sicht der Applizierbarkeit bilden Viskosität der Formulierung, Kanülengröße und Injektionsdruck ein spannungsgeladenes Dreieck. Patient und Anwender bevorzugen möglichst rasche Injektionen durch dünne Kanülen. Dies impliziert niedrige Viskosität und hohe Injektionsgeschwindigkeit, bei bevorzugt geringem Injektions-

druck (Schultz; 1997) (Jeng et al.; 2001) (Heintz et al.; 2001). Da Öle und insbesondere Oleogele als Depotformulierungen eine höhere Viskosität besitzen, werden für deren Applikation im Vergleich zu wässrigen Injektionslösungen mit sofortiger Wirkstofffreisetzung systembedingt größere Kanülendurchmesser und höherer Kraftaufwand notwendig.

In Tabelle 5 sind exemplarisch vom Hersteller empfohlenen Kanülengrößen für die Applikation ausgewählter Fertigarzneimittel aufgeführt.

Tabelle 5: Übersicht empfohlener Kanülengrößen verschiedener Handelsprodukte Rote Liste 2006

Produkt	Arzneiform	Kanülenaußendurchmesser		Dosierungsintervall
Implanon®	Implantat	2,39mm	13G	156 Wochen
Zoladex® 10,8	Implantat	2,09mm	14G	12 Wochen
Zoladex® 3,6	Implantat	1,65mm	16G	4 Wochen
Profact Depot® 6,3	Implantat	1,65mm	16G	8 Wochen
Profact Depot® 9,45	Implantat	1,65mm	16G	12 Wochen
Sandostatin LAR® 10	Mikrokapseln	1,10mm	19G	4 Wochen
Risperdal Consta® 25	Mikrokapseln	0,90mm	20G	2 Wochen
Decapeptyl N® 3,75	Mikrokapseln	0,81mm	21G	4 Wochen
Pamorelin LA® 3,75/11,25	Mikrokapseln	0,81mm	21G	4 Wochen
Nutropin Depot®	Mikrokapseln	0,81mm	21G	4 Wochen
Trenantone® 11,25	Mikrokapseln	0,64mm	23G	12 Wochen
Enantone® 3,75	Mikrokapseln	0,51mm	25G	4 Wochen
Gynodian Depot®	Ölige Lösung	0,90mm	20G	4 Wochen
Noristerat®	Ölige Lösung	0,90mm	20G	12 Wochen
Jenacillin O2 Mega®	Ölige Suspension	0,90mm	20G	therapieindividuell
Genotropin®	Wässrige Lösung	0,25/0,33mm	31/29G	Täglich
Insuman®	Wässrige Lösung	0,25/0,33mm	31/29G	Täglich

Die Verabreichung fester Implantate erfordert große Kanülen und gleicht deshalb eher einem chirurgischen Eingriff als einer Injektion im herkömmlichen Sinn. Meist werden diese Implantate deshalb unter lokaler Betäubung verabreicht. Nicht bioabbaubare Depotformen, z.B. Implanon®, müssen nach Ablauf des Dosierungsintervalls

in einem zweiten chirurgischen Eingriff wieder entfernt werden. Große Kanülen können bei der Applikation zu deutlicher Traumatisierung der Injektionsstelle mit Hämatombildung und Blutungen führen. Für marcumarisierte Patienten ist deshalb die Applikation von Implantaten problematisch (Takeda GmbH; 2005). Mikrokapseln und ölige Lösungen können mit deutlich dünneren Kanülen, deren Durchmesser im Bereich von 19-25G liegt, appliziert werden. In Relation zu den Dosierungsintervallen von 4 bis 12 Wochen erscheinen diese Kanülen wesentlich patientenfreundlicher (Floyd et al.; 1991) (Akers et al.; 1987) (Defelippis et al.; 2000) (Dexter et al.; 1979). Formulierungen zur täglichen Injektion sollten den Patienten möglichst wenig belasten. Hier kommen sehr dünne Kanülen im Bereich von 30G zum Einsatz (Nash; 1991).

Wie oben dargestellt, erfolgt die Auswahl der Kanülengröße auch in Abhängigkeit der Viskosität der verwendeten Formulierung. Physikalisch wird die Injektion von Flüssigkeiten und Suspensionen mit geringen Feststoffanteilen durch das Hagen-Poiseuillesche Gesetz für laminare Strömungen in Rohren beschrieben (vgl. Formel 1), wobei die Druckdifferenz dem Quotient aus Injektionskraft F und der Fläche A des Spritzenquerschnitts entspricht (vgl. Formel 2) (Zingerman et al.; 1987) (Ritschel et al.; 1979) (Dexter et al.; 1979).

Formel 1: Gesetz von Hagen-Poiseuille

$$\frac{dV}{dt} = \frac{\pi \cdot \Delta p \cdot r^4}{8 \cdot \eta \cdot l}$$

$\frac{dV}{dt}$	Volumenstrom (entspricht Injektionsgeschwindigkeit)
Δp	Druckdifferenz innerhalb des Rohres (entspricht Injektionsnadel)
r^4	Radius des Rohrs (entspricht Radius der Injektionsnadel)
η	Viskosität der Formulierung
l	Länge des Rohres (entspricht Länge der Injektionsnadel)

Formel 2: Druckdifferenz bezogen auf Spritzenquerschnitt

$$\Delta p = \frac{F}{A}$$

Δp	Druckdifferenz innerhalb des Rohres
F	Kraft auf Spritzkolben mit der Fläche A des Spritzenquerschnitts

Hinsichtlich der Bestimmung der Injizierbarkeit einer Formulierung werden in der Literatur verschiedene Ansätze beschrieben. Der wohl einfachste Weg die Spritzbarkeit einer Formulierung zu untersuchen, ist die direkte manuelle Injektion der Formulierung in ein Versuchstier. Wenn dem Anwender die Injektion problemlos erscheint, wird die Formulierung als injizierbar gewertet. Für Reihenuntersuchungen mit verschiedenen Nadelgrößen und Formulierungsvarianten ist diese Methode allerdings

weniger geeignet. Alternativ zum Versuchstier kann die Applikation auch in ein Stück Muskel, in einen Polyurethanschwamm oder in ein leeres Becherglas erfolgen. Anwenderabhängige Variationen im Injektionsdruck, die zur Beeinflussung des Versuchsergebnisses führen können, bleiben bei diesem Aufbau dennoch immer erhalten (Akers et al.; 1987) (Ritschel et al.; 1979). Ein übersichtlicher apparativer Ansatz besteht in der Bestimmung der Spritzbarkeit bei definierter Nadelgröße und vorgegebener Injektionskraft bzw. Injektionsdruck. Die Spritzbarkeit ist dann gegeben, wenn ein bestimmter Mindestvolumenstrom erreicht wird oder wenn eine definierte Kraft bzw. definierter Druck zur Injektion ausreicht. In Tabelle 6 sind Literaturquellen exemplarisch aufgeführt, die diesen Ansatz zur Bestimmung der Spritzbarkeit verfolgen.

Tabelle 6: Literaturübersicht Bestimmung der Spritzbarkeit

Quelle	Kanüle	Kraft	Druck	Spritzbarkeit	Bemerkungen
(Mitchell; 1992)	18G		1193kPa	mindestens 0,03ml/sec ideal >0,3ml/sec	große Kanüle und hohe Injektionsgeschwindigkeit, da Tierarzneimittel
(Zingerman et al.; 1987)	16G		730kPa einfach	>3ml/sec	mittlere Kanüle, sehr hohe Injektionsgeschwindigkeit, da Tierarzneimittel
(Zingerman et al.; 1987)	16G		310kPa mehrfach	>3ml/sec	Unterscheidung zwischen einfacher und mehrfacher Injektion
(Dupuis et al.; 2002)	21G	30N		30N ausreichend	3kg Gewicht auf Spritzenstempel
(Gao et al.; 1995)	20G, 22G, 26G	50N		50N ausreichend	benötigte Injektionskraft bei definiertem Vorschub mit Kraftaufnehmer bestimmt
(Schwach-Abdellaoui et al.; 2002)	19G, 20G	50N		50N ausreichend	benötigte Injektionskraft bei definiertem Vorschub mit Kraftaufnehmer bestimmt
(Ritschel et al.; 1979)	13G, 15G, 17G-27G	13N		13N ausreichend	13N als Äquivalent der Injektionskraft, die ein Erwachsener für 1min aufbringen kann

Bei dieser Art der Bestimmung der Spritzbarkeit können neben den Eigenschaften der Formulierungen auch äußere Faktoren, wie die Beschaffenheit der Spritzenwandung (Glas, Plastik) oder Interaktionen des Gummistopfens des Spritzenstempels mit der Formulierung, die zu Quellungen führen können, deutlichen Einfluss auf das Messergebnis haben (Dexter et al.; 1979).

Alternativ zu den dargestellten Versuchsansätzen können die physikalischen Eigenschaften der Formulierungen, die Einfluss auf die Applizierbarkeit haben, auch mittels rheometrischer Untersuchungen ermittelt werden. Hierzu untersuchen die Autoren die Fließkurve (Scherrate D versus Viskosität η) der Formulierung und entnehmen bei einer für die Injektion charakteristischen Scherrate den Viskositätswert als repräsentative Größe „apparent viscosity“ (vgl. Tabelle 7).

Tabelle 7: Übersicht Literaturquellen zu Fließkurvenbestimmungen

Quelle	Scherratenbereich	charakteristische Scherrate	Untersuchte Formulierungen
(Sims et al.; 1985)	2,15-157,90s^{-1}	157,90s^{-1}	Pflanzliche Öle, Miglyol 812, Aluminiumstearatgele
(al Hammami et al.; 1996) (al Hammami et al.; 1996)	0-436s^{-1}	100s^{-1}	Miglyol 812, Aluminiumstearat-, Aerosil-, Lecithingele
(Realdon et al.; 1996)	0-Maximum	96s^{-1}	Erdnussöl, Glycerolmonostearat-, Bienenwachsgele
(Heintz et al.; 2001) (Jeng et al.; 2001)	0-Maximum	141s^{-1}	Pflanzliche Öle, Aluminiumstearatgele

Die Viskosität einer Formulierung ist nach oben limitiert, da hochviskose Formulierungen nicht mehr durch dünne und patientenfreundliche Kanülen injiziert werden können. Als Viskositätsgrenze, bei der die Applizierbarkeit noch gewährleistet ist, werden in der Literatur für Newtonsche Formulierungen Werte bis 200mPas angegeben (Okumu; 2001) (Hatefi et al.; 2002) (Zingerman et al.; 1987).

Neben der Viskosität hat bei partikulären Formulierungen auch die Teilchengröße der suspendierten Partikel Einfluss auf die empfohlene Kanülengröße. Um ein Verstopfen der Kanüle während der Injektion zu vermeiden, sollte die Partikelgröße maximal 1/3 des verwendeten Kanüleninnendurchmessers betragen (Nash; 1991) (Floyd et al.; 1991) (Akers et al.; 1987). Die in der Literatur angestrebten Partikelgrößen für parenterale Formulierungen sind vielfältig. Sie reichen von kleiner 10µm (Floyd et al.; 1991) (Gallardo et al.; 2000) (Gonzalez-Caballero et al.; 2000), über mittlere Werte um 50µm (Mitchell; 1985) (Johnson et al.; 1996b) bis 150µm (Reithmeier et al.; 2001b). Am Markt erhältliche Insulinsuspensionen besitzen Partikelgrößen bis 40µm (Defelippis et al.; 2000). Für Nutropin Depot® beträgt die Teilchengröße der Mikropartikel etwa 50µm (Johnson et al.; 1996b). Im Allgemeinen werden Partikelgrößen bis

100µm für parenterale Injektionen als geeignet angesehen (Maniar et al.; 1992) (Reslow et al.; 2001) (Eliaz et al.; 2000).

Der Abbau öliger Formulierungen erfolgt in vivo mit mäßiger Geschwindigkeit. Verschiedene Autoren bestimmten, in welchem Zeitraum ölige Formulierungen in vivo abgebaut werden. Medlicott et al. untersuchte makroskopisch, wie sich wässrige und lipophile Formulierungen nach der Injektion in vivo verhalten (Medlicott et al.; 2004). Hierfür wurden die Vehikel mit einem blauen Farbstoff versetzt und subkutan injiziert. 48h nach der Applikation wurde der Injektionsort für die visuelle Inspektion präpariert (vgl. Abbildung 6).

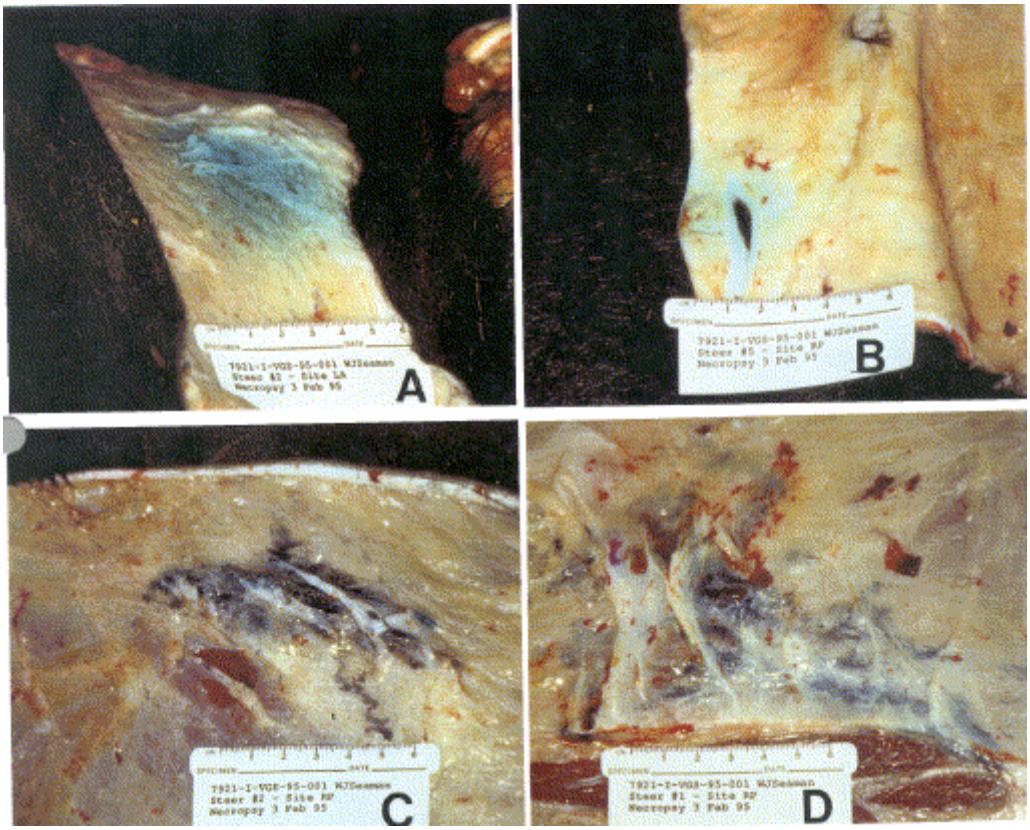


Abbildung 6: Aufnahme subkutaner Depots 48h nach der Injektion nach (Medlicott et al.; 2004)

In Abbildung 6A wurde eine blau gefärbte wässrige Lösung injiziert. Nach 2 Tagen ist der Farbstoff aus der Formulierung in das umgebende Gewebe diffundiert. Abbildung 6B zeigt die injizierte Partikelsuspension eines blauen Farbstoffs. Das Depot ist auch nach 48h noch scharf begrenzt. Das wässrige Suspensionsmedium wurde resorbiert, während die unlöslichen blauen Wirkstoffpartikel am Applikationsort verblieben sind. In Abbildung 6C wurde die Lösung eines Farbstoffs in Miglyol 812, in Abbildung 6D die Lösung eines Farbstoffs in einer hochviskosen Formulierung aus 7,5% Aluminiumstearat in Miglyol 812 injiziert. Die beiden letzten Formulierungen zeigen im Vergleich zur wässrigen Lösung aus Abbildung 6A deutlich begrenztere Ausdehnungen

und kein Abwandern des Farbstoffs in das umgebende Gewebe. Auch nach 48h ist der blaue Farbstoff noch in dem Depot verblieben (Medlicott et al.; 2004).

Um injizierte Depots wie bei Medlicott et al. beschrieben makroskopisch untersuchen zu können, müssen die Versuchstiere zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt getötet werden. Eine Reihenuntersuchung über einen längeren Versuchszeitraum würde deshalb eine sehr große Anzahl von Versuchstieren benötigen. Der Einsatz nichtinvasiver Techniken mit denen die einzelnen Tiere wiederholt untersucht werden können ist für Reihenuntersuchungen wesentlich besser geeignet. Für diesen Zweck wurden ölige Vehikel mit dem β-Stahler ^{14}C oder dem γ-Stahler ^{131}I markiert. Nach der Applikation wurde die Radioaktivität in definierten Zeitabständen bestimmt. Aus der Abnahme der Radioaktivität im Vergleich zum Wert unmittelbar nach der Injektion kann die Geschwindigkeit des Depotabbaus, angegeben als Halbwertszeit, berechnet werden (Schultz; 1997) (Larsen; 2003) (Svendsen et al.; 1980) (Howard et al.; 1983). In Tabelle 8 sind die nach der Radioaktivitätsmethode bestimmten Halbwertszeiten für verschiedene Tierarten aufgeführt.

Tabelle 8: Halbwertszeiten öliger Vehikel nach (Howard et al.; 1983; Larsen; 2003; Schultz; 1997; Svendsen et al.; 1980)

Öliges Vehikel	Schwein	Kaninchen	Hund	Ratte
Mittelkettige Triglyceride	14d	8d	2d	7d
Sesamöl	23d	27d	35d	63d
Ethyloleat		10d		
Erdnussöl		25d		
Rizinusöl	20d			10-30d

Aus den in vivo bestimmten Halbwertszeiten kann man erkennen, dass zwischen den einzelnen Tierarten deutliche Unterschiede in der Abbaugeschwindigkeit bestehen. Von den untersuchten Spezies kommt das Schwein den Bedingungen, die bei Injektionen in den menschlichen Organismus auftreten, am nächsten. Die Halbwertszeit beträgt dort für das kurzkettige Miglyol 812 zwei Wochen, für die längerkettigen Öle Sesam- und Rizinusöl ca. 3 Wochen.

Physiologisch erfolgt der Abbau in vivo durch ein Zusammenspiel verschiedener Mechanismen. Entweder werden die Öle direkt am Injektionsort metabolisch durch Lipasen, die aus Makrophagen oder Fettzellen freigesetzt werden, abgebaut oder es

erfolgt eine Aufnahme von Mikrotröpfchen durch Phagozytose und ein Abtransport über die Lymphe oder Blutgefäße (Senior et al.; 2000).

I.2.2. Ölige Lösungen

Unter pharmazeutischen Gesichtspunkten stellt die Formulierung des Wirkstoffs als Lösung in einem Öl einen einfach zu kontrollierenden und kostengünstigen Herstellungsprozess dar, der zu einem physikalisch stabilen Einphasensystem in einem seit langem angewendeten biokompatiblen Vehikel führt (Larsen; 2001).

Wirkstofflösungen in öligen Vehikeln sind in einer Vielzahl von Produkten am Markt erhältlich. Vorwiegend werden Öle für die Herstellung von Lösungen lipophiler Hormonderivate oder Antidepressiva verwendet (Davis et al.; 1994) (Marder et al.; 1989). Tabelle 9 stellt einen Auszug der in der Roten Liste 2006 aufgeführten Produkte mit lipophilen Grundlagen dar. Neben den reinen Ölen wie Erdnussöl, Sesamöl und mittelkettigen Triglyceriden werden auch Mischungen von Benzylbenzoat mit Rizinusöl oder Ethanol mit Erdnussöl verwendet. Die Additive werden eingesetzt, um die Viskosität der Formulierung zu verringern und die Applikation zu erleichtern.

Tabelle 9: Auswahl an Handelsprodukten Rote Liste 2006

Handelsname	Wirkstoff	Öliges Vehikel
Testosteron Depot Rotexmedica®	Testosteronenantat	Benzylbenzoat, Rizinusöl
Gynodian Depot®	Prasteronenantat Estradiolvalerat	Benzylbenzoat, Rizinusöl
Progynon Depot®	Estradiolvalerat	Benzylbenzoat, Rizinusöl
Sustanon® 250	Testosteronpropionat Testosteronphenylpropionat Testosteronisocaproat Testosterondecanoat	Erdnussöl
Deca-Durabolin® 25mg	Nandrolondecanoat	Erdnussöl
Jephagynon®	Estradiolbenzoat Progesteron	Ethanol, Erdnussöl
Testosteron Depot 250mg Eifelfango®	Testosteronenantat	Sesamöl
Lyorodin Depot®	Fluphenazindecanoat	Sesamöl
Haldol-Janssen Decanoat®	Haloperidoldecanoat	Sesamöl
Dapotum D® 2,5	Fluphenazindecanoat	mittelkettige Triglyceride

Die Freisetzung der Wirkstoffe aus öligen Lösungen ist diffusionskontrolliert und erfolgt nach einer Kinetik erster Ordnung (vgl. Formel 3).

Formel 3: Kinetik 1. Ordnung

$$\frac{dc}{dt} = -k_{el} \cdot c$$

k_{el} Eliminationskonstante

c Konzentration des gelösten Wirkstoffs

Für die Freisetzung müssen die gelösten Wirkstoffe innerhalb des Depots zur Grenzfläche diffundieren, diese überschreiten und dann in vivo zum Wirkort transportiert werden (Senior et al.; 2000).

Für die unmittelbare Freisetzung des Wirkstoffs ist der Verteilungskoeffizient zwischen der Öl- und Wasserphase von entscheidender Bedeutung. Je größer der Verteilungskoeffizient, desto langsamer erfolgt die Wirkstofffreisetzung aus dem Depot in das umgebende Medium. Durch gezielte Modifikation des Wirkstoffs oder Veränderung der Eigenschaften des Depots kann der Verteilungskoeffizient beeinflusst und somit nachfolgend die Freisetzung gesteuert werden (Hirano et al.; 1981) (Strickley; 1999) (Mitchell; 1992) (Larsen et al.; 2001) (Senior et al.; 2000) (Zuidema et al.; 1994) (Al Hindawi et al.; 1987).

Die Strategie der Veränderung des Wirkstoffmoleküls zur Steuerung der Freisetzung wird in vielen hormonhaltigen Formulierungen angewendet. Durch Veresterung des Arzneistoffs werden lipophile Prodrugs hergestellt, die nach Applikation in vivo langsam aus dem ölhaltigen Depot abgegeben werden. Nach der Wirkstofffreisetzung setzen lokale Esterasen den eigentlichen Wirkstoff frei (Al Hindawi et al.; 1987). Das Handelsprodukt Sustanon® 250 besteht aus einem Gemisch der Ester von Testosteron mit Propionsäure, Phenylpropionsäure, Isocapronsäure und Decansäure, die in Erdnussöl gelöst sind. Nach Applikation werden die einzelnen Komponenten entsprechend ihres Verteilungskoeffizienten mit unterschiedlicher Geschwindigkeit aus dem Depot freigesetzt. Somit können über 4 Wochen hinweg therapeutische Testosteronspiegel gewährleistet werden (Benson et al.; 1998).

Die parenterale Applikation von Hormonprodrugs oder Neuroleptika als Lösungen in Ölen hat neben der verzögerten Wirkstofffreisetzung und den im Vergleich zur peroralen Gabe wesentlich gleichmäßigeren Wirkstoffspiegeln auch den Vorteil, dass die therapeutisch notwendige Wirkstoffdosis insgesamt gesenkt werden kann. Dies kann zu einer deutlichen Verringerung der Nebenwirkungsrate und Steigerung der Patientenakzeptanz beitragen. Ein gutes Beispiel stellt der Wirkstoff Fluphenazin dar. Das

im Wässrigen leicht lösliche Fluphenazinhydrochlorid wird täglich 20mg p.o. oder 10mg i.m. gegeben. Durch die Formulierung als Ethanoat oder Decanoat Ester in Sesamöl genügt eine einmalige wöchentliche Gabe von 25mg. Die notwendige Dosis kann im Vergleich zur oralen Gabe somit um über 80% reduziert werden (Senior et al.; 2000) (Berry et al.; 2000).

I.2.3. Ölige Suspensionen

Im Gegensatz zu Wirkstofflösungen stellen Wirkstoffsuspensionen Mehrphasensysteme dar, die per se instabil sind und zu Sedimentation und Kuchenbildung neigen. Ein Wirkstoff wird dann als Suspension formuliert, wenn er in konventionellen Lösungsmitteln unlöslich bzw. instabil ist oder eine kontrollierte Wirkstofffreisetzung mit Depoteffekten erzielt werden soll (Akers et al.; 1987) (Gonzalez-Caballero et al.; 2000) (Rathbone et al.; 2000a) (Falkiewicz; 1991) (Defelippis et al.; 2000) (Floyd et al.; 1991). Ökonomisch betrachtet stellen Suspensionen im Vergleich zu Mikropartikeln oder Implantaten sehr kostengünstig herzustellende Arzneiformen dar, die zu einer Verlängerung der Arzneimittelwirkung und einer Verringerung der toxischen Nebenwirkungen durch hohe Plasmaspiegelspitzen führen können.

Obwohl viele parenterale Suspensionen auf dem Markt sind, ist die Herstellung stabiler Suspensionen dennoch nicht trivial (Burgess et al.; 2004) (Floyd et al.; 1991).

Eine ideale Wirkstoffsuspension für die parenterale Applikation sollte neben den in Kapitel I.2.1 beschriebenen allgemeinen Anforderungen für Injektabilia noch folgende zusätzliche Kriterien erfüllen (Akers et al.; 1987):

- keine Veränderung der Partikelgröße während der Lagerung
- langsame Sedimentation und leichte Resuspendierbarkeit
- leichte Entnahme und Applikation homogener Dosen
- möglichst wenig Irritationen nach Injektion

Aufgrund der verschiedenen Phasen weisen Suspensionen eine entsprechende Grenzflächenenergie auf. Jedes thermodynamische System versucht den Zustand des geringsten Energieinhalts zu erreichen. Wenn die suspendierten Partikel eine, wenn auch geringe, Restlöslichkeit in der umgebenden Phase besitzen, kann deshalb der Effekt der Ostwald-Freundlich-Reifung auftreten (vgl. Formel 4).

Formel 4: Ostwald-Freundlich Gleichung

$$\ln \frac{c_{s1}}{c_{s2}} = \frac{2M\gamma}{\rho RT}\left(\frac{1}{r_1} - \frac{1}{r_2}\right)$$

c_{s1}	Sättigungslöslichkeit des Partikels 1
c_{s2}	Sättigungslöslichkeit des Partikels 2
M	Molare Masse
γ	Grenzflächenenergie
ρ	Dichte
R	allgemeine Gaskonstante
T	absolute Temperatur
r_1	Radius des Partikels 1
r_2	Radius des Partikels 2

Nach der Ostwald-Freundlich Gleichung haben die Partikel mit dem kleineren Radius eine höhere Sättigungslöslichkeit. Um die gesamte Grenzfläche und damit die Grenzflächenenergie zu minimieren, gehen deshalb die kleineren Partikel während der Lagerung in Lösung, während der Anteil der größeren Partikel zunimmt. Dies führt zu einer Verschiebung der Partikelgrößenverteilung innerhalb der Suspension und kann Auswirkungen auf die Injizierbarkeit oder auf die Freisetzung haben. Um die Ostwald-Freundlich-Reifung zu vermeiden, sollten deshalb die suspendierten Partikel in dem Dispersionsmedium vollkommen unlöslich sein oder zumindest eine einheitliche Partikelgröße besitzen (Falkiewicz; 1991) (Akers et al.; 1987) (Swarbrick et al.; 2001) (Benson et al.; 1998).

Die Sedimentation der suspendierten Partikel und Bildung eines festen Kuchens ist ein häufig beobachtetes Phänomen bei Suspensionen. Nach dem Gesetz von Stokes (vgl. Formel 5) kann man die Sedimentationsgeschwindigkeit durch Erhöhung der Viskosität, Angleichung des Dichteunterschieds zwischen den suspendierten Partikeln und der äußeren Phase, sowie durch die Verkleinerung der Partikelgröße verringern.

Formel 5: Gesetz nach Stokes

$$v = \frac{2}{9}\left(\frac{\rho_p - \rho_f}{\eta}\right) g r^2$$

v	Sedimentationsgeschwindigkeit
ρ_p	Dichte der suspendierten Partikel
ρ_f	Dichte der Dispersionsphase
η	Viskosität
g	Erdbeschleunigung
r	Radius der suspendierten Partikel

Für Injektabilia kann die Viskosität aber nur in engen Grenzen erhöht werden (siehe Kapitel I.2.1). Um die Suspension zu stabilisieren, werden deshalb häufig die Partikelgrößen reduziert. Bei wässrigen Formulierungen besteht darüber hinaus die Möglichkeit, unter Beachtung der Isotonie, die Dichten anzugleichen.

Eine leichte Resuspendierbarkeit ist Voraussetzung für die Entnahme und die Applikation gleichförmiger Dosen. Für wässrige Suspensionen kann die Wiederaufschüttelbarkeit des Partikelkuchens durch Zusatz von Elektrolyten, wie Aluminiumchlorid, gezielt gesteuert werden. Diese führen zu einer Erhöhung der Ladungsdichte an der Partikeloberfläche und steigern die gegenseitige Abstoßung der suspendierten Teilchen. Es bildet sich ein lockeres Sediment, das durch geringen Scherstress wieder resuspendiert werden kann. Für ölige Suspensionen ist diese Möglichkeit der Suspensionstabilisierung allerdings aufgrund der Eigenschaften der äußeren Phase nicht gegeben (Floyd et al.; 1991) (Falkiewicz; 1991) (Defelippis et al.; 2000).

Aus Sicht der Verträglichkeit treten für partikuläre Wirkstoffsuspensionen lokale Reaktionen nach der Injektion im Vergleich zu homogenen Wirkstofflösungen häufiger auf, da der Organismus auf körperfremde Partikel intensiver reagiert. Auch die Partikelform der suspendierten Phase beeinflusst die Verträglichkeit einer Suspension deutlich. Partikel mit scharfen Ecken oder nadelförmige Wirkstoffkristalle können nach der Injektion lokalen Schmerz oder Schwellungen verursachen (Hardee et al.; 1998).

Nach der Applikation formen ölige Suspensionen ein Depot, das analog zu den in Kapitel I.2.1 für ölige Lösungen beschriebenen Mechanismen abgebaut wird (Cady et al.; 1997). Die Wirkstofffreisetzung aus öligen Suspensionen erfolgt durch die Wanderung der suspendierten Partikel zur Grenzfläche, den Übertritt in das Umgebungsmedium und der nachfolgenden Partikelauflösung. Für den Fall, dass semisolide Depots vorliegen, in denen keine Partikelsedimentation stattfindet, erfolgt die Wirkstofffreisetzung mit der Abbaugeschwindigkeit des Depots und der Partikelauflösung an der jeweiligen Grenzfläche (Chien; 1981) (Crommelin et al.; 1980 a) (Crommelin et al.; 1980 b) (Mendelow et al.; 1987).

Additive können die Freisetzungsgeschwindigkeit aus den öligen Suspensionen stark beeinflussen. Sie können die Viskosität des Depots erhöhen, das Eindringen von Umgebungsflüssigkeit in das Depot verringern oder den Depotabbau verlangsamen (Hageman et al.; 1992) (Wang et al.; 1988). Beispielsweise konnte durch den Einsatz von Aluminiumstearat eine deutliche Verlängerung der Wirkstofffreisetzung aus Peni-

cillin G Suspensionen in pflanzlichen Ölen erreicht werden (Chien; 1981). Neben dem Effekt der Viskositätserhöhung wird für Aluminiumstearat auch die Bildung eines lipophilen und wasserabweisenden Überzugs unmittelbar auf der Partikeloberfläche diskutiert, der zu einer langsameren Partikelauflösung und verzögerten Wirkstofffreisetzung führt (Lippold; 1980).

Die Formulierung eines Wirkstoffs in öligen Suspensionen ist in zahlreichen Veröffentlichungen beschrieben. Erstmals wurde Anfang der 50er Jahre beobachtet, dass die Verdickung eines pflanzlichen Öls mit Pektin zu einer verlängerten Wirkstofffreisetzung in vivo führt (Welch; 1949). Buckwalter untersuchte im selben Zeitraum den Einfluss von Aluminiumstearat auf die Procain Freisetzung in Ratten. Eine 5%ige Aluminiumstearat Sesamölsuspension führte zu einer Wirkstofffreisetzung über 11 Tage (Buckwalter; 1950). 1975 veröffentlichte Geller das erste Patent zur Formulierung eines Proteins in einem verdickten Öl. Er suspendierte Adrenocorticotropes Hormon (ACTH) in einem Oleogel aus Erdnussöl mit 2% Aluminiumstearat und konnte dadurch in vivo eine Wirkung über sieben Tage erzielen (Geller L.; 1975).

In einer Reihe von Humanarzneimitteln wurden ölige Suspensionen als Formulierungsprinzip angewendet. Bei dem Arzneimittel Solganal® von Schering für die Behandlung von rheumatischer Arthritis wurden Aurothioglucose Partikel in Sesamöl mit 2% Aluminiumstearat suspendiert. Nach intramuskulärer Anwendung wird eine Freisetzung und verlängerte Wirkung erreicht (Strickley; 1999). Depinar®, zugelassen durch Armour Pharma, besteht aus einer Suspension von Cyanocobalamin-Zinktannat Teilchen in Sesamöl mit 2% Aluminiumstearat (Floyd et al.; 1991) (Chien; 1981). Bis vor kurzem war mit Jenacillin® auch am deutschen Markt die Suspension eines Wirkstoffs in einem pflanzlichen Öl erhältlich. Für die Behandlung von Weichteilinfektionen wurden Benzylpenicillin Partikel in mit Aluminiumstearat verdicktem Sesamöl suspendiert. Das umsatzträchtigste Tierarzneimittel in den USA besteht aus einer Suspension von bovinem Wachstumshormon in geliertem Sesamöl und ist dort unter dem Handelsnamen Posilac® verfügbar (siehe auch Kapitel I.4.2).

I.3. In vitro Freisetzungssysteme

In den letzten 25 Jahren haben sich die Tests für die Bestimmung der Wirkstofffreisetzung aus Arzneiformen zu einem wichtigen Werkzeug für den pharmazeutischen Technologen entwickelt. Sie werden zur Untersuchung von Formulierungseigenschaften im Rahmen der Arzneiformenentwicklung und zur Bestimmung der Produktqualität und Produktstabilität während der Herstellung eingesetzt. Falls die Etablierung einer in vivo/in vitro Korrelation möglich ist, können teure und zeitintensive Tierversuche ersetzt werden. Im Idealfall besitzen die in vitro Freisetzungssysteme einen möglichst einfachen Aufbau, der eine rasche und ökonomische Datengewinnung ermöglicht (Schultz; 1997) (Rathbone et al.; 2000b) (Larsen; 2001).

Die Etablierung von in vitro Freisetzungsmethoden für parenterale Depotformulierungen ist kein leichtes Unterfangen. Selbst für die seit langem kommerziell erhältlichen Insulinsuspensionen wurden bisher noch keine verbindlichen in vitro Testmodelle in den Arzneibüchern vorgeschrieben (Gietz et al.; 1998) (Schultz; 1997).

Eine Reihe von Veranstaltungen, die von der Federation International Pharmaceutique (FIP) und der American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS) durchgeführt wurde, beschäftigte sich mit der Erstellung von Richtlinien für in vitro Freisetzungstestsysteme zur Untersuchung von neuen und speziellen Arzneiformen. In einem Positionspapier, das als Ergebnis dieser Workshops formuliert wurde, wurde dargestellt, dass aufgrund der Verschiedenheit der Depotarzneiformen keine einheitliche Methode vorgeschrieben werden kann und dass der jeweilige Anwender eine aus seiner Sicht angemessene (besser maßgeschneiderte) Methode anwenden sollte (Shah et al.; 2002) (Siewert et al.; 2003).

Für das Design eines Freisetzungssystem müssen dennoch einige grundsätzliche Anforderungen berücksichtig werden (Schultz; 1997) (Rathbone et al.; 2000b) (Larsen; 2001):

- Während des Untersuchungszeitraums sollte die Stabilität des Wirkstoffs gewährleistet sein.
- In vitro sollten Bedingungen gewählt werden, die auch in vivo zu erwarten sind, z.B. physiologischer pH 7.4, Körperkerntemperatur 37°C.
- Der Freisetzungsmechanismus in vitro sollte analog zu dem in vivo sein, um eine spätere in vivo/in vitro Korrelation zu erleichtern.

- Während der Freisetzung sollten grundsätzlich Sink-Bedingungen vorliegen. Nach USP darf die Konzentration des Wirkstoffs während der Freisetzung maximal 1/3 der Sättigungskonzentration betragen.
- Die Grenzfläche zwischen Donator und Rezeptor sollte konstant sein.
- Falls Membranen für die Trennung von Formulierung und Freisetzungsmedium eingesetzt werden, darf der Membranübertritt des Wirkstoffs nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Freisetzung sein.
- Die Adsorption des Wirkstoffs an die Membran und an das gesamte System ist zu vermeiden.
- Thixotrope Formulierungen sollten nicht gerührt werden, um Strukturzerstörungen zu vermeiden.

In der Literatur werden viele unterschiedliche Aufbauten von Freisetzungssystemen für Depotarzneiformen beschrieben. Eine gute Übersicht findet sich in (Schultz; 1997). Die einzelnen Testsysteme können grundsätzlich in membranhaltige und membranfreie Systeme unterteilt werden.

Chang et al. untersuchte die Wirkstofffreisetzung von sprühgetrockneten und in Sesamöl suspendierten Butorphanoltartrat Partikel. Hierzu gab er die Formulierungen in Dialyseschläuche, die in Phosphatpuffer pH 7,4 gelegt wurden. Während des Bestimmungszeitraums wurde das Medium gerührt und zum Probenzug der gesamte Puffer in regelmäßigen Abständen ausgetauscht (Chang et al.; 1999). Durch den vollständigen Austausch des Mediums zu den Probenzugszeitpunkten wurden Sink-Bedingungen gewährleistet. Eine Kontrolle der Grenzfläche zwischen Formulierung und Freisetzungspuffer konnte mit diesem Aufbau aber nicht sichergestellt werden.

Ein ähnlicher Versuchsaufbau wurde von Gao et al. gewählt. Levonorgestrel Lösungen in Mischungen aus derivatisiertem Pflanzenöl (Labrafil® 1994 CS) und Glycerylpalmitostearat wurden in Dialyseschläuche gegeben. Diese wurden anschließend in Flaschen mit Sorensen Phosphatpuffer pH 7,4 gelegt. Als Testapparat wurde der „Rotating bottle apparatus“ der Fa. Vankel mit temperierbarem Wasserbad verwendet. Während der Freisetzung drehte der Apparat die in das Wasserbad eintauchenden Flaschen fortlaufend Kopf über Kopf. Zum Probenzug wurde das Medium ausgetauscht (Gao et al.; 1995). Auch bei diesem System konnte keine konstante Grenzfläche zwischen Formulierung und Freisetzungsmedium gewährleistet werden. Zu-

sätzlich wurden durch das fortlaufende Wenden der Flaschen große Scherkräfte auf die Formulierung übertragen.

Für Flupentixol Lösungen in Gemischen aus verschiedenen pflanzlichen Ölen verwendete die Forschergruppe um Larsen die „Rotating dialysis cell“: Ein mit einer Dialysemembran bespannter Hohlzylinder wurde waagrecht in ein auf 37°C temperiertes Becherglas getaucht und während der Freisetzung fortwährend um die Längsachse gedreht. Zu definierten Zeitabständen wurden Proben gezogen und die Wirkstofffreisetzung bestimmt (Schultz et al.; 1997) (Larsen; 2003). Analog zu dem Modell nach Gao et al. wurden auch bei diesem System durch die Bewegung des Zylinders Scherkräfte auf die Formulierungen ausgeübt. Im Gegensatz zu den thixotropen Öl-Fett Systemen die Gao et al. einsetzte, wurden von Larsen et. al. jedoch nur reine Ölgrundlagen mit newtonschem Charakter untersucht. Veränderungen in den physikalischen Formulierungseigenschaften wurden deshalb durch die Scherung nicht hervorgerufen.

Realdon et al. untersuchte das Freisetzungsverhalten von Benzocainlösungen in verdickten pflanzlichen Ölen. Als Versuchsaufbau verwendete er Plexiglasscheiben, die in der Mitte eine zylindrische Vertiefung aufwiesen. In diese Vertiefungen wurden die zu untersuchenden Formulierungen gegeben. Die Scheiben wurden mit einer Dialysemembran bespannt, die durch einen Plexiglasring fixiert wurde. Für die Bestimmung der Freisetzung wurden die Scheiben in ein Becherglas mit temperiertem Puffer gegeben (Realdon et al.; 1996). Vorteilhaft an diesem Aufbau war, dass die Formulierungen physikalisch nicht belastet wurden und eine konstante Grenzfläche zwischen Formulierung und Freisetzungsmedium vorlag. Für Suspensionen scheint der Aufbau weniger geeignet, da sich nach Partikelsedimentation am Boden der Vertiefungen ein Wirkstoffsediment bilden kann, das aus der Formulierung nicht mehr freigesetzt wird.

Für die Bestimmung des Freisetzungsverhaltens wässriger Insulinsuspensionen verwendete Graham et al. Ultrafiltrationszellen durch die Puffer gepumpt wurde. Die Insulinpartikel legten sich auf die Membran und lösten sich entsprechend ihren Kristalleigenschaften (Graham et al.; 1984). Für wässrige Kristallsuspensionen war dieser Versuchsaufbau gut geeignet, da durch die Ultrafiltrationsmembran keine Partikel in den Analyt gelangen konnten. Für semisolide Formulierungen ist dieser Ansatz aber weniger geeignet, da sich durch das permanente Durchströmen der Formulierung diffuse Grenzschichten ausbilden würden.

Gietz et al. entwickelte für die Untersuchung von Zn-Hirudin Partikel ein Mehrschichtensystem als Freisetzungsmodell, um Formulierungen für subkutane Injektionen untersuchen zu können. In ein Glasgefäß wurde eine warme 2% Agaroselösung mit suspendierten Wirkstoffpartikeln gegeben. Nachdem die erste wirkstoffhaltige Schicht erstarrt war, wurde auf diese eine zweite wirkstofffreie Agarose Trennschicht aufgebracht und anschließend mit Freisetzungsmedium überschichtet. Das System wurde temperiert und mittels Rotationsshaker bewegt. Mit diesem Versuchsaufbau stellten die Autoren gezielt Non-Sink Bedingungen her, da der Wirkstoff nach Auflösung erst die zweite Trennschicht überwinden musste, um in den Puffer zu gelangen. Die Autoren begründeten ihren Versuchsaufbau damit, dass nach subkutanen Injektionen der Wirkstoff nach Auflösung erst das wenig durchblutete Unterhautfettgewebe durchdringen muss, bevor er in den Blutkreislauf gelangen kann. Würden Freisetzungssysteme mit Sink-Bedingungen angewendet werden, würden sich steile Konzentrationsgradienten zwischen Formulierung und Medium ausbilden, die in vitro zu einer sehr raschen aber in vivo nicht reproduzierbaren Wirkstofffreisetzung führen würden (Gietz et al.; 1998). Das System scheint für wässrige Suspensionen gut geeignet. Ein Einsatz für ölige Systeme erscheint schwierig, da die Formulierungen auf der ersten und auch zweiten Agarose Schicht aufschwimmen würden.

Im Rahmen seiner Dissertation beschäftigte sich Crommelin mit der Untersuchung von Freisetzungsmechanismen aus hydrophoben Trägern. In seinem Versuchsaufbau verwendete er ein Metallrohr, dessen Stirnseite in ein mit Freisetzungsmedium gefülltes und temperiertes Becherglas eingetaucht war. Die Wirkstofffreisetzung erfolgte nach Probenzug in definierten Zeitabständen (Crommelin et al.; 1980 a) (Crommelin et al.; 1980 b). In dem von Crommelin gewählten Versuchsaufbau konnte über den Querschnitt des Zylinders die Grenzfläche zwischen Formulierung und Medium exakt gesteuert werden.

Andere Autoren haben diesen Versuchsaufbau noch weiter vereinfachten. Uekama et al. suspendierte Buserelinacetat Partikel in Erdnussöl und gab dies zu vorgelegtem Puffer in ein Glassgefäß (Matsubara et al.; 1994; Uekama et al.; 1989). Das Erdnussöl spreitete auf der Oberfläche des Puffers in den Dimensionen des Gefäßes. Zur weiteren Miniaturisierung wurde von Okumu et al. für die Untersuchung von SAIB Formulierungen kleine Eppendorf Vials verwendet (Okumu; 2001). Hahn et al. setzte diesen Versuchsaufbau für die Bestimmung der Freisetzung von Wachstumshormon aus Hyaluronsäure Partikel ein, die in Miglyol 812 suspendiert waren (Hahn

et al.; 2004) (Kim et al.; 2005). Bei diesen Aufbauten können durch die Abmessung des Gefäßes, im Gegensatz zu den anfangs beschriebenen Ansätzen mit flexiblen Dialyseschläuchen, die Grenzflächen für den Wirkstoffübertritt genau definiert werden. Ebenso findet keine physikalische Belastung der Formulierung durch Scherkräfte oder Ähnlichem statt, die zu einer Verfälschung der Freisetzungsdaten bei thixotropen Formulierungen führen können. Dieser Versuchsaufbau wurde deshalb auch für die Ermittlung der in vitro Daten der vorliegenden Arbeit verwendet (vgl. Kapitel III.7.1).

I.4. Somatotropin (GH)

I.4.1. Substanzspezifische Eigenschaften und physiologische Wirkung

Die Achse Hypothalamus–Hypophyse ist für die Steuerung einer Vielzahl hormoneller Regelkreise innerhalb des Körpers verantwortlich. Biosynthese und Ausschüttung der Hypophysenhormone selbst werden durch Releasing- und Inhibiting-Faktoren des Hypothalamus gesteuert.

Der Aufbau der Hirnanhangdrüse (Hypophyse, Glandula pituitaria) ist zweigeteilt: Aus dem Hinterlappen (Neurohypophyse) werden Oxytocin und Antidiuretisches Hormon (ADH), aus dem Vorderlappen (Adenohypophyse) werden Adrenocorticotropes Hormon (ACTH), Thyreoideastimulierendes Hormon (TSH), Lutenisierendes Hormon (LH), Follikelstimulierendes Hormon (FSH), Prolactin (PRL) und Somatotropin (ST, Growth hormone, GH) ausgeschüttet (Silbernagl et al.; 1994). Das Wachstumshormon Somatotropin ist das am häufigsten vorkommende Hormon der Hirnanhangdrüse und wird in den somatotropen Zellen der Hypophyse synthetisiert. Zunächst wird ein inaktiver Vorläufer gebildet, der durch Abspaltung einer kürzeren Peptidkette vom N-Terminus bioaktiviert wird (Silbernagl et al.; 1994). Das menschliche Wachstumshormon (hGH) besitzt eine Molekülmasse von 22kDa und besteht aus einer Peptidkette mit 191 Aminosäuren (vgl. Abbildung 7). Zwei Disulfidbrücken formen zwischen Cystein 53 und Cystein 165 eine lange und zwischen Cystein 182 und Cystein 189 eine kurze Schleife (vgl. Abbildung 7).

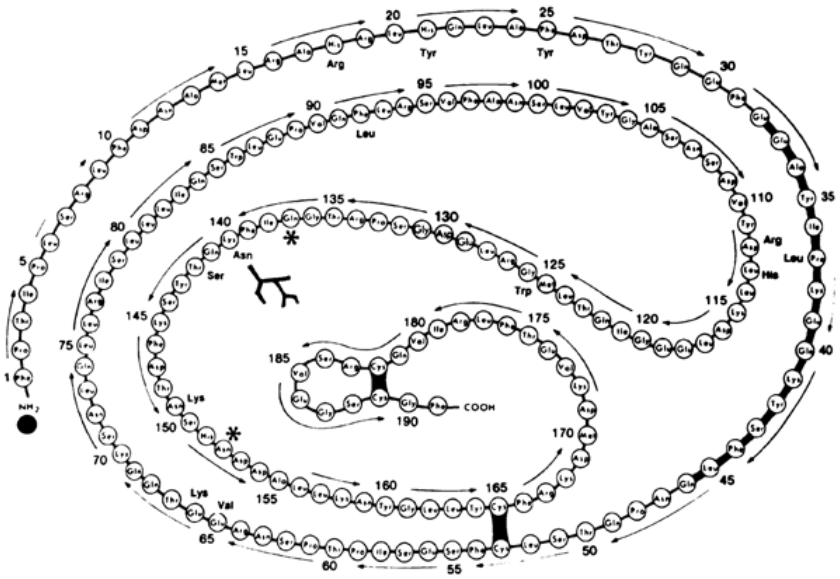


Abbildung 7: Primärstruktur hGH aus (Becker; 2001)

In der Tertiärstruktur (vgl. Abbildung 8) zeigt hGH einen vorwiegend helikalen Aufbau. Die vier α-Haupthelices formen eine eher ungewöhnliche auf-auf-ab-ab Topologie. Drei Minihelices werden in den Verbindungsschleifen der Haupthelices gebildet (Sukumar et al.; 2005).

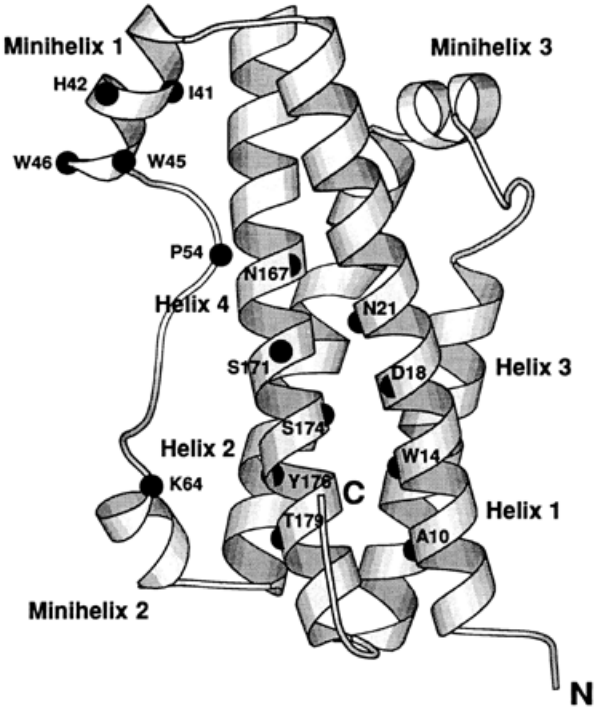


Abbildung 8: hGH Tertiärstruktur aus (Becker; 2001)

Das in der Hypophyse synthetisierte Wachstumshormon wird in den somatotropen Zellen in großen Granula als Zinkkomplex gespeichert und während der REM-Phasen des Schlafes in kurzen Schüben ausgeschieden (Johnson et al.;

1996b) (Cleland et al.; 1997b). Die Halbwertszeit von hGH im Plasma ist mit 20min relativ kurz. Etwa die Hälfte des zirkulierenden Somatotropins bildet zusammen mit einem Bindungsprotein im Plasma ein Hormon-Reservoir. Das Bindungsprotein stellt den löslichen extrazellulären Teil des Rezeptors dar. Die hGH Wirkung erfolgt in vivo entweder direkt an den Zielorten oder wird über Somatomedine z.B. dem Insulin-like-growth Faktor (IGF) vermittelt. Das Wachstumshormon zeigt vorwiegend anabole Wirkungen. Es steigert die Proteinbiosynthese in den Zellen, die Wachstumszonen der Knochen werden angeregt und Glykogenolyse und Lipolyse werden erhöht. Mit zunehmendem Alter sinkt die Bildung von Somatotropin im Vergleich zur Pubertät deutlich ab. Ab der Lebensmitte werden nur noch etwa 15% der pubertären Produktion erreicht. Altersbedingte Veränderungen des Fett/Muskelmasseverhältnisses können auch auf diese Verschiebung zurückgeführt werden (Kim et al.; 2005) (Silbernagl et al.; 1994) (Becker; 2001).

Bei Störungen der Somatotropinbiosynthese entsteht ein Mangel an Wachstumshormon. Dieser führt beim Menschen zu der Erscheinung des hypophysären Minderwuchses. Zur Behandlung dieses Krankheitsbildes wurde in den 50er Jahren die Wachstumshormonersatztherapie entwickelt. Da die Somatotropine aus tierischen Quellen zwar in sich zu 90% homolog sind, z.B. Schweine und Rinder Wachstumshormon, mit menschlichem GH aber nur zu 60% übereinstimmen, konnte im Gegensatz zu Insulin für die humane Therapie kein tierisches Somatotropin verwendet werden (Bauman; 2005) (Cady et al.; 1992) (Cady et al.; 1997). Deshalb waren damals die Hirnanhangdrüsen Verstorbener die einzige und nur sehr limitiert verfügbare Quelle für hGH. Mitte der 80er Jahre wurde auf diese Weise gewonnenes Wachstumshormon mit der Übertragung von Creutzfeld-Jacob-Erkrankungen in Zusammenhang gebracht und musste vom Markt genommen werden. Glücklicherweise waren bis dahin die Methoden der rekombinanten DNA Technologie soweit entwickelt, dass ausreichend Somatotropin als Ersatz zur Verfügung stand. Neben dem kindlichen Wachstumshormonmangel wurde die Indikation für die Gabe von Somatotropin im Verlauf der Zeit auch auf chronisch renale Insuffizienz, Turner Syndrom und sekundäre Kachexie in Zusammenhang mit HIV ausgeweitet (Cleland et al.; 1997b).

I.4.2. Posilac® ex Monsanto

Im Jahr 1936 wurde erstmals eine Steigerung der Milchleistung von Kühen nach der Gabe von Hypophysenextrakten geschlachteter Rindern entdeckt (Asimov et al.; 1937). In einer systematischen Untersuchung wurde festgestellt, dass bei Rindern durch den gezielten Einsatz dieser Hypophysenauszüge die Milchproduktion um 10-15% gesteigert und die Laktationsphase insgesamt verlängert werden kann. Aufgrund der hohen Kosten für die Aufreinigung des Extraktes und der Begrenztheit des zur Verfügung stehenden Ausgangsmaterials wurde damals von einem weiteren Einsatz für die tierische Produktion jedoch abgesehen (Cotes et al.; 1949) (Young; 1947).

Mit der Entwicklung der rekombinanten DNA Technologie rückte der wirtschaftlich vertretbare Einsatz von bovinem Somatotropin (bST) wieder in greifbare Nähe. Vier pharmazeutische Unternehmen standen für die Sicherung der kommerziellen Rechte an bST im Wettbewerb: Monsanto, American Cyanamid, Eli Lilly und Upjohn. 1979 gründete Monsanto mit dem damals noch jungen Unternehmen Genentech eine Kooperation zur Entwicklung und Produktion von humanem Insulin. Aus dieser Zusammenarbeit erhielt es die Rechte zur Entwicklung und Kommerzialisierung des bovinen Somatotropins. Nach der weiteren Entwicklung erfolgte 1993 die Zulassung von Posilac® durch die FDA zur Steigerung der Milchleistung laktierender Rinder. Seit der Markteinführung in den USA entwickelte sich Posilac® bis heute zum umsatzstärksten verschreibungsfrei erhältlichen Tierarzneimittel in Nordamerika. Für die Deckung der großen Nachfrage wurde im Jahr 2000 in Augusta/Georgia ein eigens erstelltes Werk in Betrieb genommen. Die Produktion des Wirkstoffes selbst erfolgt in Zusammenarbeit mit Sandoz in Kundl/Österreich (Monsanto Co.; 2002).

Aus pharmazeutisch-technologischer Sicht stellt Posilac® eine Partikelsuspension in einer viskosen lipophilen Matrix dar. Lyophilisiertes zinkkomplexiertes bST wird in einem Oleogel aus 5% Aluminiumstearat und Sesamöl homogen verteilt. Durch die Komplexierung mit Zink Ionen wird die Wasserlöslichkeit des bST stark herabgesetzt. Der Komplex bildet sich durch elektrostatische Wechselwirkungen der Zn^{2+} Ionen mit den negativ geladenen Seitenkettenresten der Asparagin- und Glutaminsäurebausteine des Somatotropins aus. Da das Wachstumshormon in der Hypophyse auch physiologisch bis zur Ausschüttung als Zinkkomplex vorliegt, ergeben sich keine

Unverträglichkeiten in vivo. Als ideal wird eine Menge von 0,5% Zink bezogen auf die Masse des Somatotropins angesehen (Jeng et al.; 2001).

Der Hilfsstoff Aluminiumstearat wird angewandt, um das Eindringen von Körperflüssigkeiten in das Depot zu verzögern. Durch dies und die zusätzliche Zinkkomplexierung soll eine verlangsamte Wirkstoffauflösung und nachhaltige Freisetzung in vivo gewährleistet werden. In den verschiedenen Posilac® Patenten wird beschrieben, dass der Einsatz einer Reihe von Fettsäuren mit polyvalenten Metallionen, z.B. Laurin-, Myristin-, Palmitin- und Stearinsäure mit Mg^{2+}, Ca^{2+}, Zn^{2+} und Al^{3+}, als Hilfsstoff möglich ist. Besonders hervorgehoben wird aber die Anwendung von Aluminiummono- oder -distearaten (Jeng et al.; 2001) (Mitchell; 1985) (Mitchell; 1992) (Mitchell; 1985) (Heintz et al.; 2001).

Bei der Entwicklung des Produkts wurde eine Reihe verschiedener pflanzlicher und synthetischer Öle untersucht. Als Grundlage für die Herstellung wurden bevorzugt hydrophobe pflanzliche Öle, insbesondere Sesamöl und Erdnussöl, verwendet. Hochgereinigtes pflanzliches Öl zeichnet sich durch eine niedrige Säure- und Oxidationszahl aus und hat keinen negativen Einfluss auf die Stabilität der suspendierten Wirkstoffe (Jeng et al.; 2001) (Mitchell; 1992).

Für die Herstellung der Basisgrundlage wird zuerst das Öl mit Aluminiumstearat versetzt und unter Vakuum und Rühren für 20min auf ca. 160°C bis zur klaren Schmelze erhitzt. Unter Beibehaltung des Vakuums, um einen Eintrag von Wasser zu vermeiden, wird die Formulierung auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wird die Formulierung mit Zn bST Lyophilisat versetzt. Für eine Reduktion der Partikelgröße wird die Formulierung entweder mittels Kugelmühlen oder hochtourigen Rührern weiterverarbeitet. Die fertige Matrix wird in Fertigspritzen in Einzeldosen zu 500mg bST abgefüllt und zusammen mit 18G Nadeln in einem gebrauchsfertigen Satz an die Anwender ausgeliefert. Aus Gründen der Erleichterung der Applikation wird eine Partikelgröße $d_{(v,50)}$ kleiner als 15µm und ein Mindestfluss von 0,3ml/s angestrebt (Methoden zur Bestimmung der Fließfähigkeit/Viskosität für Injektabilia vergleiche Kapitel I.2.1) (Mitchell; 1985) (Mitchell; 1992) (Jeng et al.; 2001).

In der Praxis wird Posilac® beginnend in der 9. Woche nach Laktationsbeginn in einem 14tägigen Rhythmus gegeben. Zu diesem Zeitpunkt ist der natürliche Gipfel in der Milchleistung nach dem Kalben erreicht und der physiologische Abstieg bis zum natürlichen Ende der Laktation beginnt. Durch gezielte Gabe von Wachstumshormon

wird dieser Abstieg verlangsamt und eine ausgeglichenere Leistung auf insgesamt höherem Niveau erreicht.

In Abbildung 9 wird die Wirkung der bST Gabe in einer retardierten Arzneiform auf die Milchleistung im Vergleich zur Placebo Gabe veranschaulicht.

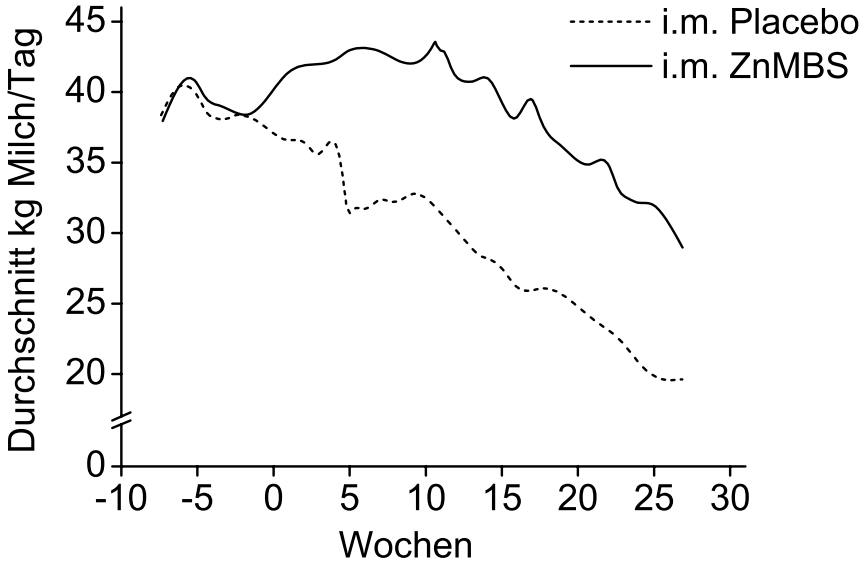


Abbildung 9: Laktationsverlauf in Abhängigkeit der bST Supplementierung (Bauman; 2005)

Es wurden täglich 27mg bST beginnend ab Woche 0 im Vergleich zu einer Placebo Kontrollgruppe gegeben. Der physiologische Abfall wird bei der Verum Gruppe verzögert und die gesamte Leistung ist deutlich erhöht (Bauman; 2005).

In einem Patent zu Posilac® wurden Daten zur Entwicklung der Blutspiegel nach der Gabe von zinkkomplexiertem und am N-Terminus methionyliertem bovinem Somatotropin (ZnMBS) veröffentlicht. 800mg ZnMBS in einem 5%igen Aluminiumstearat/Sesamöl Gel wurde einmalig Rindern intramuskulär und subkutan verabreicht und mit einer Placebo Kontrollgruppe verglichen (vgl. Abbildung 10) (Mitchell; 1985).

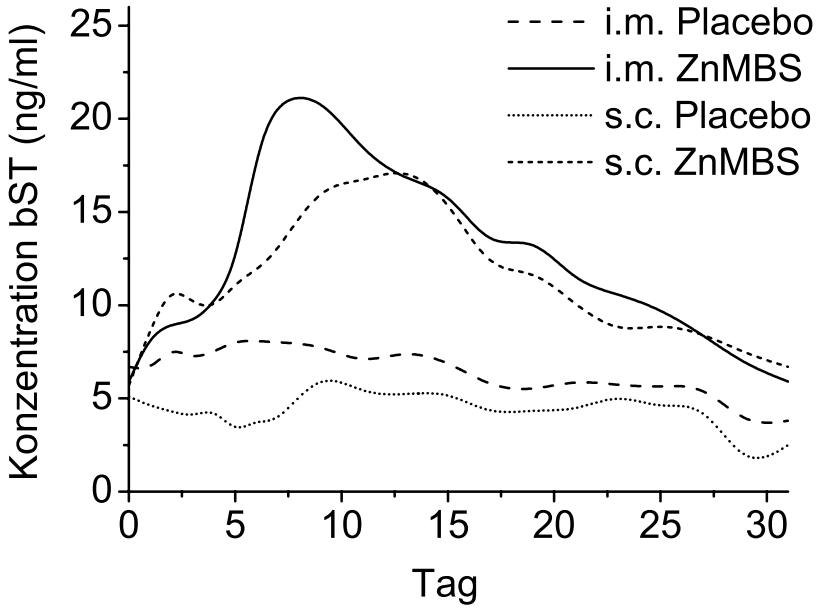


Abbildung 10: Blutspiegelkurven nach Somtatotropin Gabe aus (Mitchell; 1985)

Deutlich kann man den Anstieg der Blutspiegel der Verumgruppe im Vergleich zur Placebogruppe erkennen. Bei einmaliger Injektion erreichen die Werte erst nach 30 Tagen wieder den Placebo Bereich. Im Vergleich zur intramuskulären Injektion steigen die Spiegel bei subkutaner Applikation langsamer an. Dies ist auf die geringere Durchblutung des subkutanen im Vergleich zum intramuskulären Gewebe zurückzuführen. Parallel zu den Blutspiegeln wurde auch die Milchproduktion dieser Rinder gemessen und die Tagesleistung bezogen auf den Wochendurchschnitt ermittelt (vgl. Abbildung 11).

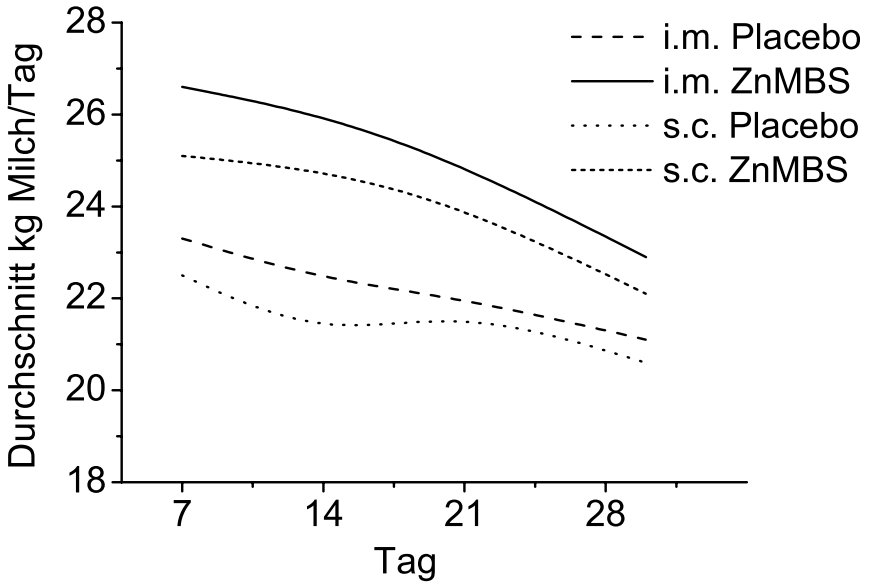


Abbildung 11: Entwicklung der durchschnittlichen Tagesleistung nach Somatotropin Gabe aus (Mitchell; 1985)

Eine einmalige subkutane oder intramuskuläre Injektion der retardiert freisetzenden Formulierung führte in den ersten beiden Wochen zu einer durchschnittlichen Steigerung um 14%, in den darauf folgenden beiden Wochen zu einer Steigerung um 10% bezogen auf die Placebogruppe. Da das empfohlene Dosierungsintervall bei 14 Tagen liegt, dürfte die zu erwartende langfristige Leistungssteigerung oberhalb von 10% liegen.

Posilac® war vor der Zulassung durch die FDA Gegenstand zahlreicher Kontroversen. Gegner der Zulassung befürchteten, dass durch den Einsatz von biotechnologisch gewonnenem bST in der Tierproduktion Einträge in den menschlichen Nahrungskreislauf entstehen könnten. In umfangreichen Studien versuchte Monsanto diese Vorwürfe zu entkräften.

Bovines Somatotropin oder das die bST Wirkung vermittelnde Somatomedin IGF sind native Bestandteile der Milch. Je nach Laktationsphase unterliegen sie einer deutlichen physiologischen Schwankungsbreite. Nach Ansicht der FDA kann die Anwendung von Posilac® zwar zu einem geringen Anstieg der beiden Proteine in der Milch führen, schädliche Wirkungen sind aber nicht zu befürchten. Langfristige Auswirkungen des Posilac® Gebrauchs auf die Tiergesundheit sind schwieriger zu beurteilen. Da nach der Anwendung das Leistungspotential der Tiere ansteigt, muss sichergestellt werden, dass durch eine Anpassung der Fütterungsstrategie Ernährungsdefizite vermieden werden (Monsanto Co.; 2002).

Posilac® wurde außerhalb der USA in keinem anderen bedeutenden westlichen Land zugelassen. In Europa wurde ein Moratorium für den Einsatz von Posilac® verhängt. Ein im Jahr 1999 beauftragtes Expertengremium der europäischen Gesundheits- und Verbraucherschutzbehörde kam zu dem Schluss, dass ein geringer Anstieg von bST in der Milch als unbedenklich erachtet werden kann, da bST durch Pasteurisieren der Milch inaktiviert und oral aufgenommenes Rinderwachstumshormon im Gastrointestinaltrakt abgebaut wird. Aufgrund der Homologieunterschiede der Somatotropine ist bST im Menschen ohnehin inaktiv. Im Gegensatz hierzu wird die Lage bei IGF wesentlich kritischer beurteilt. Die Insulin like Growth Faktoren zeigen über die Speziesgrenze hinweg hohe Homologie. Bovines und humanes IGF sind nahezu identisch. Da die IGF vermittelte Wirkung eine Vielzahl verschiedener Körpervorgänge reguliert und es Hinweise gibt, dass auch die Entwicklung von Säuglingen über IGF aus der Muttermilch gesteuert wird, wurde die Erhebung weiterer Forschungsdaten empfohlen (Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health; 1999).

Auch aus universitärer Sicht entwickelte sich die Vermarktung von Posilac® zu einer Erfolgsgeschichte. Nach langem Patentstreit um eines der ersten biotechnologischen Patente überhaupt kam es 2006 zu einer Einigung zwischen Monsanto und der University of California, in deren Labors die Grundlagen zur bST Produktion mittels rekombinanter DNA Technologie entwickelt wurden. Gegen die Zahlung von 100 Millionen Dollar und einer prozentualen Umsatzbeteiligung erhielt Monsanto das Exklusivrecht zur weltweiten kommerziellen Vermarktung, während alle nicht kommerziellen Rechte bei der Universität blieben (University of California; 2006).

I.5. Zielsetzung der Arbeit

In den vorhergehenden Kapiteln wurden zahlreiche Möglichkeiten für parenterale Depotformulierungen mit verzögerter Wirkstofffreisetzung beschrieben. Je nach gewählter Formulierungsstrategie können diese mit erheblichem technologischen Aufwand in Produktion und Applikation verbunden sein.

Die vorliegende Arbeit verfolgt im Gegensatz hierzu den Ansatz einer möglichst einfachen Herstellung und Anwendung. Es gilt zu untersuchen, wie aus wirkstoffhaltigen Lyophilisaten und ölhaltigen Grundlagen in übersichtlichen Verfahrensschritten gebrauchsfertige Formulierungen mit nachhaltiger Wirkstofffreisetzung dargestellt werden können.

Zu Beginn steht die Untersuchung wichtiger physikalisch-chemischer Eigenschaften der verschiedenen öligen Grundlagen und ausgewählten Hilfsstoffe. Anschließend gilt es zu bestimmen, wie die wirkstofffreien Basisformulierungen optimal hergestellt werden können und welche pharmazeutisch-technologischen Eigenschaften diese Formulierungen besitzen. Weiter muss untersucht werden, welche Verfahren zur Verarbeitung der beiden Modellwirkstoffe bovines Serumalbumin und rekombinantes humanes Somatotropin in den Basisformulierungen besonders geeignet sind.

Für die Bestimmung des Freisetzungsverhaltens gilt es zunächst zu ermitteln, welches in vitro Freisetzungsmodell für die spezifischen Eigenschaften der Formulierungen am besten geeignet ist. Anhand von in vitro Freisetzungsversuchen ist anschließend der Einfluss der ölhaltige Grundlagen und der zugesetzten Additive auf die Wirkstofffreisetzung zu untersuchen. Mit relevanten Formulierungen sind in vivo Versuche durchzuführen, um den Einfluss der Formulierungen und Additive auf die Entwicklung der Wirkstoffspiegel im Organismus zu bestimmen.

Für die Ermittlung der Wirkstoffstabilität sind Lagerungsversuche mit verschiedenen Formulierungen unter praxisrelevanten Bedingungen durchzuführen und geeignete Formulierungen und Lagerungsparameter abzuleiten, die hohe Wirkstoffstabilität gewährleisten.

II. Materialien und Methoden

II.1. Materialien

II.1.1. Pflanzliche und semisynthetische Öle

Für die Durchführung der verschiedenen Versuche wurden die in Tabelle 10 dargestellten semisynthetischen und pflanzlichen Öle verwendet.

Tabelle 10: Übersicht der eingesetzten semisynthetischen und pflanzlichen Öle

Produkt	Hersteller/Lieferant	Bezeichnung	Ch.B.
Miglyol 812	Sasol Germany GmbH Witten	mittelkettige Triglyceride	20528
Sesamöl	Croda GmbH Nettetal	hochgereinigtes Sesamöl	28484
Erdnussöl	Caesar & Loretz GmbH Hilden	Erdnussöl	32550513
Sojabohnenöl	Caesar & Loretz GmbH Hilden	Sojabohnenöl	12016481
Weizenkeimöl	Caesar & Loretz GmbH Hilden	Weizenkeimöl	24186312
Leinsamenöl	Caesar & Loretz GmbH Hilden	Leinsamenöl	30553483
Rizinusöl	Caesar & Loretz GmbH Hilden	Rizinusöl	22244162
Benzylbenzoat	Synopharm GmbH Barsbüttel	Benzylbenzoat	0206A066

II.1.2. Formulierungsadditive

Für die vorliegende Arbeit wurden die in Tabelle 11 dargestellten Hilfsstoffe verwendet.

Tabelle 11: Übersicht der eingesetzten Aluminiumstearate

Produkt	Hersteller/Lieferant	Bezeichnung	Ch.B.
Aluminiumstearat Fluka®	Fluka Sigma-Aldrich Chemie GmbH Buchs CH	Aluminiummonostearat	410989/1 22301
Aluminiumstearat ALG V®	Peter Greven GmbH Bad Münstereifel	Aluminiumdistearat	C064775-001
Aluminiumstearat Alugel 30 HEP®	Baerlocher GmbH Unterschleissheim	Aluminiumdi/tristearat	M27/0400
Aluminiumstearat NF®	Ferro GmbH Frankfurt am Main	Aluminiummonostearat	6004030429940
Aluminiumstearat Gellant®	Ferro GmbH Frankfurt am Main	Aluminiummonostearat	6004061139915
Rheopearl KL®	S. Black GmbH Duisburg	Dextrinpalmitat	20524
Rheopearl TT®	S. Black GmbH Duisburg	Dextrinpalmitat/ Dextrinethylhexanoat	30616
Dynasan 114®	Sasol Germany GmbH Witten	Myristinsäuretriglycerid	104576
Dynasan 118®	Sasol Germany GmbH Witten	Stearinsäuretriglycerid	105151

II.1.3. Modellproteine

Für die Durchführung der verschiedenen Versuche im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die in Tabelle 12 dargestellten Proteine verwendet.

Tabelle 12: Übersicht der eingesetzten Proteine

Produkt	Hersteller/Lieferant	Bezeichnung	Ch.B.
BSA	Sigma GmbH Taufkirchen	Bovines Serum Albumin	103H0308
Genotropin Multidose 16 I.E.	Pharmacia GmbH Karlsruhe	Rekombinantes humanes Wachstumshormon	334877

II.2. Methoden

II.2.1. Fettsäure GC

Die Bestimmung der relativen Fettsäureverteilung der Öle und Hilfsstoffe wurde in Zusammenarbeit mit dem Zentralen Institut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr Standort Unterschleissheim durchgeführt. Zur Herstellung der Analysenlösung wurden jeweils 50mg Probe mit 3ml 0,5n methanolischer Kalilauge in einem 50ml Messkolben 5min unter Rückflusskühlung zum Sieden erhitzt. Anschließend wurde mit 2ml BF_3-Methanollösung (ex Merck Art. Nr. 801663) versetzt und weitere 2min erhitzt. Nach Zugabe von 2ml n-Pentan und kurzem Aufkochen wurde die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt. Ein weiterer Milliliter n-Pentan wurde zugegeben und mit gesättigter Kochsalzlösung bis zum Eichstrich des Messkolbens aufgefüllt. Anschliessend wurde die Pentan Phase abgehoben und für die Gaschromatographie verwendet.

Zur Durchführung der Messung wurde ein HP 5890 Gaschromatograph (Agilent Technologies GmbH Waldbronn) mit den in Tabelle 13 dargestellten Parametern verwendet.

Tabelle 13: Parameter der gaschromatographischen Fettsäurebestimmung

Parameter	
Detektion	Flammenionisation
Kapillarsäule	CW 20 M (25m / 0,25 ID / 0,25µm FD)
Temperaturprogramm	5min 45°C, 15°C/min 220°C, 28min 220°C
Detektortemperatur	260°C
Injektortemperatur	200°C
Kopfdruck	50kPa
Splitflow	80ml/min
Probenvolumen	1µl

Zum Vergleich der Retentionszeiten wurden Lipidstandard 1 (Sigma Art. Nr. 189-9), Lipidstandard 2 (Sigma Art. Nr. 189-1), Lipidstandard 3 (Sigma Art. Nr. 189-7) jeweils aufgelöst in 10ml n-Pentan eingesetzt. Die Auswertung der Messungen und Bestimmung der relativen Fettsäureverteilung der Probesubstanzen wurde mit der gerätespezifischen Software durchgeführt.

II.2.2. DSC

Zur Bestimmung des Schmelzverhaltens der Hilfsstoffe wurden DSC Untersuchungen mit dem Messgerät DSC 204 Phoenix (Fa. Netzsch GmbH Selb) durchgeführt. Jeweils ca. 10mg Substanz wurden in Aluminiumtiegel eingewogen und versiegelt. Die Proben wurden zunächst auf -20°C gekühlt und anschliessend mit einer Rate 10K/min auf 200°C erhitzt. Dieser Vorgang wurde jeweils einmal wiederholt. Die Glasübergangspunkte, Schmelzpunkte bzw. Schmelzbereiche der Proben wurden mit der gerätespezifischen Software bestimmt und ausgewertet.

II.2.3. Elementaranalyse

Die Bestimmung der Elementverteilung der untersuchten Hilfsstoffe erfolgte mit dem C, H, N, S-Analysator Elementar Vario EL (Fa. Elementar Analysensysteme GmbH Hanau) der Zentralen Analytik des Departments für Chemie und Biochemie.

II.2.4. ICP-AES

Die Bestimmung der Aluminiumgehalte der Aluminiumstearate wurde am Department Chemie und Biochemie mit einem Vista RL (CCD-Simultan AES-ICP) der Firma Varian GmbH Darmstadt durchgeführt. Hierzu wurden 20-50 mg der zu untersuchenden Probe mit einer Mischung aus 1ml 65% HNO_3 und 0,5ml 40% HF 4 Stunden bei 180 °C in einer Druckbombe aufgeschlossen. Die quantitative Analyse erfolgte mit Hilfe von Mehrelementstandardlösungen der Firma Merck.

II.2.5. Rheometrie

Die Aufnahmen der Fliesskurven und die oszillatorischen Messungen wurden mit einem Rheometer MCR 100 der Fa. Paar-Physika GmbH Ostfildern und einem Kegel-Platte System CP 50-1 (50mm Durchmesser, 1° Kegelneigung) durchgeführt. Für die Bestimmung der Fliesskurve wurden jeweils ca. 1ml Probe auf die mit 25°C temperierte Platte gegeben und anschliessend die Viskositätswerte in Abhängigkeit des Scherratenverlaufs 0-500s^{-1} (180s), 500s^{-1} (180s), 500-0s^{-1} (180s) bestimmt. Als charakteristischer Viskositätswert wurde die Viskosität der Scherrate 100s^{-1} $\eta_{(100s^{-1})}$ herangezogen (vgl. Kapitel I.2.1).

Die oszillatorischen Messungen wurden mit dem Rheometer MCR 100 und dem Kegel-Platte System CP 75-1 bei konstanter Kreisfrequenz ω=10s^{-1} und Steigerung der Deformation γ von 0 auf 100% durchgeführt. Als Messwerte wurden das festkörpertypische Speichermodul G´ und das flüssigkeitstypische Verlustmodul G´´ be-

stimmt. Der Schnittpunkt der beiden Kurven G´=G´´ kennzeichnet die Mindestschubspannung $\tau_{(G´=G´´)}$ ab der ein Übergang von einem ursprünglich festköperbetonten Gel hin zu einer flüssigen Formulierung stattfindet. Für die Bestimmung der rheometrischen Eigenschaften der verschiedenen Formulierungen wurde deshalb die Mindestschubspannung $\tau_{(G´=G´´)}$ als charakteristische Größe herangezogen.

II.2.6. Röntgendiffraktometrie

Die Aluminiumstearate wurden am Department Chemie und Biochemie mit dem Röntgendiffraktometer XRD 3000 TT (Fa. Seifert GmbH Ahrensburg) mit einer Messrate von 0.05° (2°Theta) von 5 bis 40°C (Cu-Kα-Radiation λ = 0.15418mm, 40 kV, 30 mA) untersucht. Die Diffraktogramme wurden im ScanX-Rayflex Modus bestimmt. Die Auswertung der Röntgendiffraktogramme erfolgte anschliessend mit dem X'Pert High Score®.

II.2.7. Karl Fischer Bestimmungen

Die Bestimmung des Wassergehalts erfolgte mit dem Karl-Fischer Titrator Aqua 40 (Fa. Analytik Jena GmbH Jena) mit angeschlossenem Verdampfermodul. Jeweils 20mg Probe wurden in ein HPLC Vial eingewogen und versiegelt. Anschliessend wurde das Vial in den auf 80°C erhitzen Ofen des Messgeräts gegeben und der entstehende Wasserdampf zur Bestimmung des prozentualen Wassergehalts in die Karl-Fischer Messzelle überführt.

II.2.8. Laserlichtstreuung

Die Bestimmung der Partikelgröße wurde mit dem Mastersizer® X (Fa. Malvern Instruments GmbH Herrenberg) durchgeführt. Für die Messungen wurden Partikelsuspensionen in einem inerten Trägermedium aus 1% Span 80 und Miglyol 812 hergestellt. Während der Messungen wurden diese zur Vermeidung von Sedimentation fortwährend geräteseitig aufgerührt und durch die Messzellen gepumpt. Die Bestimmung der Laserlichtstreuung und Berechnung der Partikelgrößenverteilung wurde im Fraunhofer Modus der Gerätesoftware beruhend auf einer polydispersen Verteilung durchgeführt.

II.2.9. Bestimmung der in vitro Freisetzung

Für die Bestimmung der in vitro Freisetzung wurden die zu untersuchenden Formulierungen in Glasvials gegeben, die mit auf 37°C temperiertem Freisetzungspuffer gefüllt waren. Für die Versuche mit BSA wurde isotonischer Phosphatpuffer pH 7.4 (Na_2HPO_4 $2H_2O$ 1,44mg/ml, KH_2PO_4 0,2mg/ml, NaCl 8,0mg/ml, KCl 0,2mg/ml, konserviert mit 0.05% (w/v) Natriumazid) verwendet. Für die Versuche mit hGH wurde als Freisetzungsmedium ein pH 7.4 Puffer aus Glycin 2mg/ml, Mannitol 40,7mg/ml, NaH_2PO_4 wasserfrei 0,29mg/ml, Na_2HPO_4 wasserfrei 0,28mg/ml, konserviert mit 3mg/ml Cresol, entsprechend der Hilfsstoffzusammensetzung der fertigen Injektionslösung des hGH Handelsproduktes verwendet (Pharmacia GmbH; 2004). In regelmäßigen Zeitabständen wurden Proben gezogen und der Protein Gehalt untersucht. Um das Gesamtvolumen des Freisetzungsmediums während des Untersuchungszeitraums konstant zu halten, wurde das entnommene Probenvolumen nach Probenzug wieder ergänzt. Die Freisetzungsversuche wurden jeweils in drei Vials parallel durchgeführt. In Abbildung 12 und Abbildung 13 ist der oben beschriebene praktische Aufbau des eingesetzten Freisetzungssystems abgebildet. Die ersten in vitro Untersuchungen nach Kapitel III.7.2 wurden mit größeren 22R Vials durchgeführt. Die parallel zu den in vivo Versuchen nach Kapitel III.7.4 durchgeführten in vitro Versuchen wurden mit kleineren 2R Vials erstellt (vgl. auch Kapitel III.7.1).

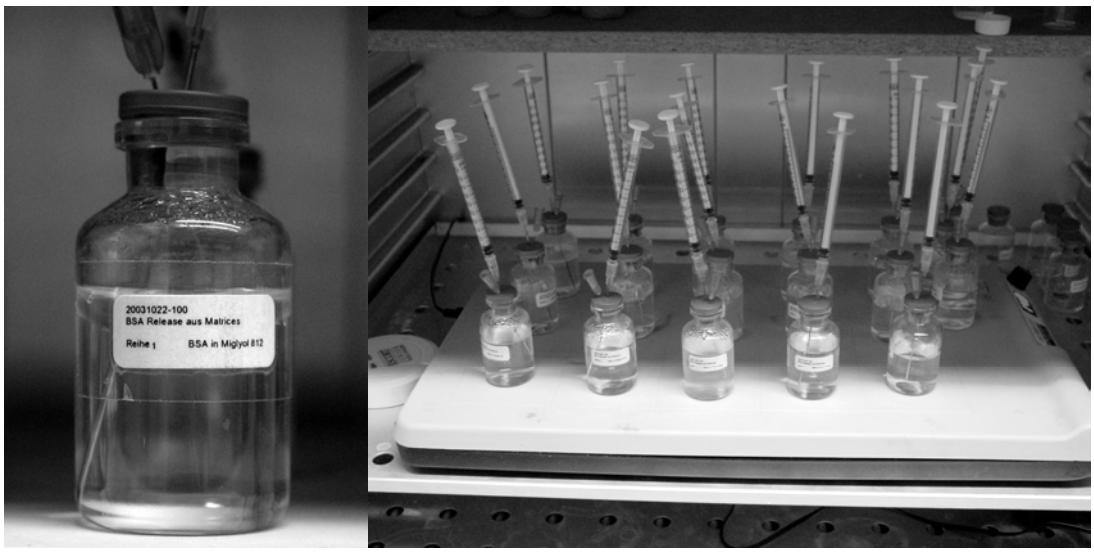


Abbildung 12: In Vitro Bestimmung der BSA Freisetzung Aufbau mit 22R Vials

Abbildung 13: In vitro Bestimmung der hGH Freisetzung, Aufbau mit 2R Vials

II.2.10. BCA Assay

Der BSA Gehalt der Proben der in vitro Studie nach Kapitel III.7.2 wurde mit dem BCA Proteinbestimmungskit der Fa. Uptima durchgeführt (Uptima GmbH; 2004) Die photometrische Bestimmung der zu untersuchenden Proben erfolgte bei 562nm mit einem Shimdazu CS 9301 PC Densitometer (Shimadzu GmbH, Duisburg) gegen selbst hergestellte BSA Kalibriergeraden.

II.2.11. Bestimmung der in vivo Freisetzung

Der praktische Teil der in vivo Versuche mit Applikation, Tierhaltung und Probenzug wurde am Department of Chemical and Materials Sciences der University of Alberta, Edmonton, Canada, in der Arbeitsgruppe von Prof. Hasan Uludag durchgeführt. Hierzu wurden 24 Ratten in 8 Gruppen á 3 Tiere entsprechend den 8 zu untersuchenden Formulierungen eingeteilt (vgl. Kapitel III.7.4). Für die Durchführung der Freisetzungsstudie wurden den Tieren 200µl der jeweiligen Formulierung injiziert. Am Tag 0 unmittelbar vor Applikation und zu den abgesprochenen Probezeitpunkten wurden jeweils 500µl Blut entnommen, zentrifugiert und bei -80°C bis zur hGH Bestimmung eingelagert. Das ursprünglich wesentlich engmaschiger geplante Probenzugsintervall wurde nach Rücksprache mit dem Versuchsleiter mit Ausnahme der ersten Probe auf einen Abstand von 7 Tage angehoben, um die Versuchstiere zu schonen. Die Bestimmung des hGH Gehalts der Blutproben erfolgte nach Abschluss der in vivo Versuche mit der in Kapitel II.2.12 beschriebenen immunochemischen Methode am Partnerlabor in Deutschland.

II.2.12. hGH Assay

Die Bestimmung des Gehalts an biologisch aktivem hGH der Proben der in vivo Studie wurde im Partnerlabor der Praxis für paediatrische Endokrinologie PD Dr. Hartmann, Frankfurt, mit einem Immulite 2000 Analyzer (Siemens Medical Solutions, München) durchgeführt.

II.2.13. Verfahren zur hGH Extraktion aus öligen Trägern

Für die Untersuchung der Proben der Stabilitätsstudie aus Kapitel III.8 musste zunächst ein Extraktionsverfahren entwickelt werden, um die anfallenden hGH Suspensionen mittels SEC HPLC und RP HPLC auf Wirkstoffstabilität untersuchen zu können. Aus den Produktinformationen der verschiedenen AlSt Handelsmuster war bekannt, dass die Aluminiumstearate in Toluol gut löslich sind (Baerlocher GmbH; 2003b) (Peter Greven GmbH; 2003). Da die beiden ausgewählten lipophilen Grundlagen Miglyol 812 und Sesamöl sowie der alternative Hilfsstoff Rheopearl KL® ebenfalls in Toluol löslich waren, erschien dieses Lösungsmittel für die Abtrennung der suspendierten hGH GFK Partikel von den öligen Formulierungen besonders gut geeignet.

Für die Extraktion des hGH GFK und anschließende Probenaufbereitung zur Bestimmung der Wiedergewinnung wurde schließlich das in Tabelle 14 dargestellte Verfahren angewendet.

Tabelle 14: Übersicht zur hGH Extraktion aus öligen Suspensionen

	100mg 1% hGH GFK ölige Suspension
+	0,5ml Toluol
+	2min Vortex Stufe 5
+	10min Zentrifugation bei 10 000rpm
+	Verwerfen des Überstands
+	0,5ml Toluol
+	2min Vortex Stufe 5
+	10min Zentrifugation bei 10 000rpm
+	Verwerfen des Überstands
+	0,5ml Genotropin® Rekonstitutionspuffer
+	Filtration durch 0,22µm Spritzenfilter in HPLC Vials
=>	analysenfertige hGH Probe

Nach der Extraktion wurde der hGH Gehalt der analysenfertigen Proben mit der in Kapitel II.2.14 beschriebenen SEC HPLC Methode bestimmt. Als Maß für die Güte des Aufbereitungsverfahrens wurde die Wiederfindungsrate verschiedener hGH GFK Testsuspensionen bestimmt. Die Ergebnisse der Analysen sind in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Wiederfindung suspendierter hGH GFK Partikel nach Toluolextraktion

	Wiederfindung [%] ± SD (n=3)
1% hGH GFK Miglyol 812	93,5 ± 5,0
1% hGH GFK Sesamöl	91,3 ± 4,0
1% hGH GFK 3% AlSt ALG V ® Miglyol 812	81,6 ± 6,3
1% hGH GFK 3% Rheopearl KL® Miglyol 812	84,9 ± 8,2
1% hGH GFK 3% AlSt ALG V ® Sesamöl	87,4 ± 9,7
1% hGH GFK 3% Rheopearl KL® Sesamöl	91,8 ± 6,7

Aus den Werten zur prozentualen Wiederfindung wird deutlich erkennbar, dass durch das gewählte Verfahren ein Anteil zwischen ca. 80 – 93% des suspendierten hGH GFKs aus den öligen Suspensionen rückgewonnen werden kann. Die gewählte Methode erscheint deshalb für die Probenaufbereitung der hGH GFK Suspensionen der Stabilitätsstudie gut geeignet.

II.2.14. SEC HPLC

Mittels SEC HPLC wurden die Proben der hGH Stabilitätsstudie auf den hGH Monomergehalt und das Ausmaß der Bildung löslicher Aggregate hin untersucht. Die Messungen wurden mit einem HP 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn) in Verbindung mit einer TSK 3000 SWXL Säule (300 x 7.8 mm, Tosoh Bioscience GmbH, Stuttgart) durchgeführt. Als mobile Phase wurde ein 50mM Natriumphosphatpuffer mit 150mM Natriumchlorid pH 7,25 bei einer Flussrate von 0,5ml/min und einem Injektionsvolumen von 25µl verwendet (Eckhardt et al.; 1991) (McNamara et al.; 1997). Die HPLC Läufe wurden mit einem Diodenarraydetektor bei 214nm detektiert. Für die Integration der erhaltenen Peaks wurde die HP Analysensoftware Chemstation Version 9 verwendet.

II.2.15. RP HPLC

Die Proben der Stabilitätsstudie nach Kapitel III.8 wurden mittels RP HPLC auf den Gehalt an nativen hGH und oxidierten Abbauprodukten untersucht. Zum Einsatz kam die HP 1100 Anlage nach Kapitel II.2.14 ausgestattet mit einer Vydac 218 TP C_{18} (5µm, 300 A°, 250mm x 4.6 mm I.D, Grace Davison Discovery Sciences) HPLC Säule. Als mobile Phase wurde eine Mischung aus 27% (V/V) 1-Propanol und 73% (V/V) Kaliumphosphatpuffer pH 6,5 verwendet. Analog zu den SEC HPLC Untersuchungen betrug das Probenvolumen 25µl. Die Säule wurde bei einer Flussrate von 1,0ml/min auf 55°C equilibriert. Die Detektion wurde bei 220nm durchgeführt (Karlsson et al.; 1999). Die Auswertung der erhaltenen Peaks erfolgte wieder mit der HP Analysensoftware Chemstation Version 9.

III. Ergebnisse und Diskussion

III.1. Charakterisierung der verschiedenen Öle und ölhaltigen Handelsprodukte

III.1.1. Fettsäureverteilung der Öle

Aus galenischer Sicht stellt die Oxidation durch Sauerstoff eine bedeutende Abbaureaktion der fetten Öle dar (vgl. auch Kapitel I.2.1). Die pflanzlichen Öle werden umso leichter oxidiert, je größer der Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren innerhalb des Fettsäurespektrums ist. Aus diesem Grund kann die Stabilität eines Öles im Vergleich zu anderen Ölen anhand der Fettsäureverteilung und insbesondere dem Anteil der dreifach ungesättigten Fettsäue Linolensäure (18:3) eingeschätzt werden.

Zu diesem Zweck wurde mit der in Kapitel II.2.1 beschriebenen gaschromatographischen Methode die Fettsäureverteilung verschiedener pflanzlicher Öle bestimmt. Als Proben wurden vegetabile und semisynthetische Öle verwendet, die vorwiegend in parenteralen Formulierungen eingesetzt werden (siehe auch Kapitel I.2.2 Tabelle 9). Sesamöl und Sojabohnenöl konnten durch den Hersteller in spezieller hochgereinigter Qualität zur Verfügung gestellt werden. Die übrigen Öle entsprechen der Standardqualität der pharmazeutischen Lieferanten und müssen vor dem Einsatz in Parenteralia durch den pharmazeutischen Hersteller entsprechend aufgereinigt werden. Leinsamenöl wird vorwiegend in Dermatika eingesetzt und wurde als Beispiel für ein trocknendes Öl in die Untersuchung aufgenommen.

In Tabelle 16 ist das Ergebnis der GC Analyse der untersuchten pflanzlichen und semisynthetischen Öle aufgeführt.

Tabelle 16: Darstellung der Fettsäureverteilung der untersuchten öligen Grundlagen

	Fettsäureverteilung in %										
	8:0	10:0	16:0	18:0	18:1OH	18:1	18:2	18:3	20:0	20:1	22:0
MCT	52,6	47,4									
Sesamöl			10,0	6,7		41,8	40,5		1,0		
Erdnussöl			10,4	2,8		46,4	34,3		1,3	1,6	3,2
Sojabohnenöl			10,6	3,6		20,4	49,0	4,9	11,6		
Weizenkeimöl			17,3	0,8		18,7	55,9	5,6		1,7	
Leinsamenöl			6,1	3,1		15,3	55,6	19,9			
Rizinusöl			5,0	5,7	57,4	12,2	19,7				

Aus dem Ergebnis der gaschromatographischen Untersuchung kann man erkennen, dass die teilsynthetisch hergestellten mittelkettigen Triglyceride (MCT) ausschließlich aus den gesättigten kurzkettigen Fettsäuren Caprylsäure (8:0) und Caprinsäure (10:0) bestehen. Die natürlichen pflanzlichen Öle setzen sich aus Gemischen längerkettiger Fettsäuren zusammen. Sesamöl und Erdnussöl bestehen überwiegend aus den ungesättigten Fettsäuren Ölsäure (18:1) und Linolsäure (18:2), sowie Anteilen von Palmitinsäure (16:0) und Stearinsäure (18:0). Analog bestehen Sojabohnenöl, Weizenkeimöl und Leinsamenöl vorwiegend aus höheren Fettsäuren. Im Unterschied zu Sesamöl und Erdnussöl weisen diese allerdings deutliche Anteile an der dreifach ungesättigten Fettsäure Linolensäure (18:3) auf, die bei Leinsamenöl bis ca. 20% betragen. Hauptbestandteil des Rizinusöls ist die einfach ungesättigte Hydroxyfettsäure Rizinolsäure (18:1 OH), weitere Anteile bilden Ölsäure und Linolsäure und in kleinerem Ausmaß Palmitinsäure und Stearinsäure.

Als Fazit der GC Analyse ergeben sich somit deutliche Unterschiede in der Fettsäurezusammensetzung der untersuchten Öle. Da mehrfach ungesättigte Fettsäuren im Vergleich zu gesättigten Fettsäuren oxidativ instabil sind und die Neigung zur Oxidation mit der Zahl der Doppelbindungen exponentiell ansteigt (Larsen; 2001) (Gunstone et al.; 1994), bildet der Anteil an Linolensäure ein wichtiges Auswahlkriterium (Przybylski et al.; 1993) (O'Keefe et al.; 1993). Innerhalb der Gruppe der pflanzlichen Öle erscheint deshalb der Einsatz von Sesam- und Erdnussöl vorteilhafter im Vergleich zur Anwendung von Sojabohnen-, Weizen- und insbesondere Leinsamenöl. Rizinusöl nimmt innerhalb der pflanzlichen Öle mit der Hydroxyfettsäure Rizinolsäure eine Sonderstellung ein, die auch Auswirkungen auf weitere Substanzeigen-

schaften (vergleiche Kapitel III.1.3) hat. Die mittelkettigen Triglyceride besitzen die höchste Stabilität gegenüber oxidativen Abbaureaktionen, da sie ausschließlich aus gesättigten Fettsäuren bestehen.

III.1.2. Rheometrische Untersuchungen

Die Viskosität der Formulierungen stellt für Injektabilia eine zentrale Formulierungseigenschaft dar. Wie in Kapitel I.2 dargestellt, bevorzugen anwendender Arzt und behandelter Patient niedrige Viskositäten, um eine rasche Injektion durch möglichst dünne Kanülen gewährleisten zu können. Mit dem Ziel der Verlängerung der Wirkstofffreisetzung und Reduktion der Injektionsfrequenz wird bei einer Reihe von Formulierungen allerdings der genau gegenteilige Weg beschritten. Hier werden neben der Grundlage weitere Hilfsstoffe verwendet, die die Viskosität deutlich anheben und zu festeren Depots führen. Das zielgerichtete Verändern der Viskosität unterliegt dennoch bestimmten oberen Grenzwerten, um weiterhin patientenfreundliche Nadelgrößen zur Applikation einsetzen zu können. Diese gegensätzlichen Zielsetzungen stellen bei der Entwicklung derartiger Formulierungen eine große Herausforderung dar.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Evaluation verschiedener Hilfsstoffe für den Einsatz in parenteralen öligen Formulierungen. Diese verändern die physikalischen Eigenschaften der Grundlage und führen zu viskoseren Formulierungen, die mit höherem Aufwand appliziert werden müssen. Sowohl in der Ph.Eur. als auch in der USP sind aktuell keine Viskositätsgrenzwerte parenteraler Formulierungen angeben. Um abschätzen zu können, bis zu welchem oberen Grenzwert die Viskosität angehoben werden kann, wurden zunächst am Markt verfügbare ölige Formulierungen und anschließend verschiedene ölige Grundlagen rheometrisch untersucht. Hierzu wurden nach dem in Kapitel II.2.5 beschriebenem Verfahren die Fließkurven bei verschiedenen Temperaturen bestimmt und die Viskosität bei einer Scherrate von $100s^{-1}$ ermittelt. Für im Kühlschrank gelagerte Parenteralia wird allgemein empfohlen, diese vor Injektion Raumtemperatur annehmen zu lassen. Als maßgeblicher Wert für die Applikation wird deshalb die Viskosität $\eta_{(100s^{-1})}$ bei 25°C angesehen. Der bei 37°C bestimmte Wert entspricht der Viskosität des Depots nach Applikation in vivo.

In Tabelle 17 sind die untersuchten Handelsprodukte mit den bestimmten Viskositätswerten aufgeführt.

Tabelle 17: Ergebnis der rheometrischen Untersuchung öliger Handelsprodukte

Produkt	Zusammensetzung	Darreichungs-form	Viskosität $\eta_{(100s^{-1})}$ [mPas]	
			25°C	37°C
Dapotum D 2,5®	MCT	Lösung	25,5	16,3
Androcur Depot-10®	Rizinusöl, Benzylbenzoat	Lösung	57,7	31,6
Dapotum D 25®	Sesamöl	Lösung	60,2	37,6
Lyorodin Depot®	Sesamöl	Lösung	63,5	39,6
Fluphenazin Neuraxpharm®	Sesamöl	Lösung	63,8	39,7
Haldol Jannsen®	Sesamöl	Lösung	65,3	40,2
Estradiol Depot Jenapharm®	Rizinusöl, Benzylbenzoat	Lösung	72,7	39,2
Testosteron Depot Eifelfango®	Sesamöl	Lösung	79,7	47,0
Progynon Depot-10®	Rizinusöl, Benzylbenzoat	Lösung	95,0	49,8
Proluton Depot®	Rizinusöl, Benzylbenzoat	Lösung	102,0	51,0
Progesteron Depot Jenapharm®	Rizinusöl, Benzylbenzoat	Lösung	111,0	55,0
Gynodian Depot®	Rizinusöl, Benzylbenzoat	Lösung	132,0	65,8
Testosteron Depot Rotexmedica®	Rizinusöl, Benzylbenzoat	Lösung	148,0	72,5
Noristerat®	Rizinusöl, Benzylbenzoat	Lösung	195,0	90,9
Jenacillin O 2 Mega®	Erdnussöl, Aluminiumstearat	Suspension	260,0	147,0

Hinsichtlich der gemessenen Viskosität ergibt sich eine große Spannbreite. Der höchste Wert bei Applikationstemperatur 25°C liegt mit 260mPas etwa 10x so hoch wie die Viskosität des Produkts mit dem niedrigsten Wert. Aus Tabelle 17 kann man erkennen, dass das Muster mit dem niedrigsten Viskositätswert aus einer Wirkstofflösung in den MCT besteht. Im Gegensatz dazu besteht das Handelsprodukt mit der höchsten Viskosität anlog zu Posilac® (vergleiche Kapitel I.4.2) aus einer Wirkstoffssuspension in einem mit Aluminiumstearat verdickten pflanzlichen Öl. In der zugehörigen Packungsbeilage wird für die Applikation die Verwendung einer relativ großen 20G Kanüle mit 0,9mm Durchmesser empfohlen (Jenapharm AG; 2004). Interessant sind auch die Wirkstofflösungen in Mischungen aus Benzylbenzoat und Rizinusöl. Diese decken je nach Zusammensetzung einen Viskositätsbereich von 60mPas bis

200mPas ab. In einer Reihe von Formulierungen wird reines Sesamöl als Grundlage mit Viskositäten der Formulierungen zwischen 60 und 80mPas verwendet. Deutlich ist auch die Abhängigkeit der Viskosität von der Temperatur erkennbar. Das Anheben der Messtemperatur auf 37°C führt zu einer ausgeprägten Verringerung der Viskosität um ca. 30-50% bezogen auf den Ausgangswert bei 25°C.

Analog zu den am Markt verfügbaren Produkten wurden auch reine ölige Grundlagen bei 25°C und 37°C rheometrisch untersucht (vgl. Tabelle 18).

Tabelle 18: Bestimmung der Viskosität öliger Grundlagen bei 25°C und 37°C

Öl	Viskosität η_{100s-1} [mPas]	
	25°C	37°C
MCT	26,5	16,9
Sesamöl	60,9	38,2
Erdnussöl	68,8	42,5
Sojabohnenöl	56,2	35,4
Weizenkeimöl	63,2	35,4
Leinsamenöl	48,5	31,5
Rizinusöl	736,0	315,0
Benzylbenzoat	9,1	6,3

Aus Tabelle 18 kann man erkennen, dass aus der Gruppe der Öle die mittelkettigen Triglyceride mit einem Wert um 25mPas bei 25°C die geringste Viskosität aufweisen. Die pflanzlichen Öle Sesamöl, Erdnussöl, Sojabohnenöl, Weizenkeimöl und Leinsamenöl zeigen vergleichbare Werte zwischen 50 und 70mPas, während sich Rizinusöl mit einer Viskosität von über 730mPas deutlich abhebt. Benzylbenzoat zeigt eine sehr niedrige Viskosität von 9mPas. Dies erklärt seine Verwendung als Mischungspartner in Formulierungen mit dem hochviskosen Rizinusöl.

In der Bestimmung der Viskositätswerte spiegelt sich das Ergebnis der Fettsäurezusammensetzung wider. MCT, das aus kurzkettigen gesättigten Fettsäuren besteht, besitzt die niedrigste Viskosität. Die längerkettigen Fettsäuren der pflanzlichen Öle führen zu höheren Viskositäten. Größere Anteile an mehrfach ungesättigten Fettsäuren führen wiederum zu einem Absinken der Viskosität. Dies tritt besonders deutlich bei Leinsamenöl hervor. Ein Sprung in der Viskosität tritt bei Rizinusöl auf. Bedingt durch die Hydroxyfettsäure können sich zwischen den Trigylceridmolekülen vermehrt

Wasserstoffbrückenbindungen bilden, die zu einer Erhöhung der Viskosität führen. Die Umgebungstemperatur übt einen großen Einfluss auf die Viskosität aus. Analog zu den Handelsprodukten ist auch bei den öligen Grundlagen eine deutliche Abnahme der Viskosität bei Anheben der Messtemperatur zu erkennen. Eine Erhöhung der Temperatur um 12°C von 25°C auf 37°C verringert die Viskosität im Schnitt um ca. 40%, bei Rizinusöl um ca. 60%.

Die Untersuchung der Handelspräparate zeigt, dass bei öligen Grundlagen für Injektabilia die Viskosität in einem weiten Viskositätsbereich variiert werden kann. Als obere Grenze bei akzeptablen Nadelgrößen bis 20G ergeben sich etwa 200-250mPas. Die meisten Fertigprodukte weisen Werte unter 100mPas auf. Mit Ausnahme von Rizinusöl zeigen reine Öle Viskositäten im Bereich von 50 bis 70mPas auf und können deshalb direkt als Grundlage verwendet werden. Rizinusöl kann aufgrund seiner sehr hohen Viskosität lediglich als Gemisch mit anderen weniger viskosen Substanzen eingesetzt werden.

III.1.3. Wasseraufnahmefähigkeit verschiedener öliger Grundlagen

Nach subkutaner oder intramuskulärer Applikation interagieren die Formulierungen mit dem physiologischen Umgebungsmedium und nehmen in begrenztem Umfang Wasser auf. Dieser Anstieg der Feuchte kann die Stabilität des noch nicht freigesetzten Wirkstoffs in der Depotformulierung negativ beeinflussen (Jeng et al.; 2001). Die Wasseraufnahmefähigkeit der Grundlage bildet deshalb ein wichtiges Kriterium für die Auswahl der öligen Grundlage.

Um die Veränderung des Wassergehalts nach der Applikation abschätzen zu können, wurden verschiedene Öle mit physiologischem Phosphatpuffer versetzt und 28 Tage bei 37°C gelagert. Der Wassergehalt vor und nach der Einlagerung wurde mit der in Kapitel II.2 beschriebenen Methode nach Karl Fischer bestimmt. Die Ergebnisse der Karl Fischer Analyse sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

Tabelle 19: Bestimmung des Wassergehalts öliger Grundlagen vor und nach Einlagerung mit PBS (Mittelwert ± Standardabweichung, n=3)

Öl	Wassergehalt [%]	
	Reinsubstanz	4 Wochen PBS 37°C
MCT	0,024 ± 0,001	0,120 ± 0,003
Sesamöl	0,026 ± 0,001	0,051 ± 0,009
Erdnussöl	0,019 ± 0,001	0,039 ± 0,002
Sojabohnenöl	0,015 ± 0,001	0,030 ± 0,019
Weizenkeimöl	0,028 ± 0,001	0,179 ± 0,028
Leinsamenöl	0,034 ± 0,001	0,067 ± 0,005
Rizinusöl	0,105 ± 0,001	0,880 ± 0,002
Benzylbenzoat	0,039 ± 0,006	0,268 ± 0,006

Die Bestimmung des Wassergehalts der Öle vor Einlagerung über PBS zeigt generell sehr niedrige Ausgangswerte. Diese liegen deutlich unter dem in den Formulierungspatenten zu Posilac® angestrebtem Soll von kleiner 2% (Mitchell; 1985) (Heintz et al.; 2001). Aus Sicht der Lagerstabilität der noch nicht applizierten Formulierungen sollten deshalb keine Probleme zu erwarten sein. Über den Einlagerungszeitraum hinweg zeigen die untersuchten öligen Grundlagen nur eine geringe Zunahme im Wassergehalt. Lediglich Rizinusöl weist einen deutlichen Anstieg auf 0,880% auf. Der hohe Gehalt an der hydrophileren Hydroxyfettsäure Rizinolsäure und die damit verbundene verbesserte Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen bedingen sehr wahrscheinlich diesen Anstieg im Vergleich zu den übrigen pflanzlichen Ölen. Um eine möglichst hohe in-use Stabilität für proteinogene Wirkstoffe gewährleisten zu können, erscheinen deshalb alle untersuchten Öle mit Ausnahme von Rizinusöl geeignet.

III.1.4. Fazit der Untersuchung öliger Grundlagen und Handelsprodukte

Ölige Grundlagen für Parenteralia wurden hinsichtlich wichtiger physikalisch-chemischer Eigenschaften charakterisiert. Anhand der Fettsäurezusammensetzung kann die oxidative Stabilität der Grundlage abgeschätzt werden. Der Anteil an dreifach ungesättigter Fettsäure Linolensäure ist hierfür ein wichtiger Parameter. Die Verwendung von Sojabohnenöl, Weizenkeimöl und Leinsamenöl ist aus dieser Sicht kritisch zu beurteilen. Die Viskosität der Parenteralia ist aus Anwender- und Patientensicht nach oben beschränkt. Die Analyse am Markt verfügbarer Produkte ergab ein oberes Viskositätslimit von etwa 250mPas. Dieses Kriterium erfüllen alle Parenteralia mit Ausnahme von Rizinusöl. Um die Wirkstoffstabilität nach Applikation in vivo gewährleisten zu können, sollten die Formulierungen möglichst wenig Wasser aufnehmen können. Die Anwendung von pflanzlichen Ölen mit Hydroxyfettsäuren wie Rizinusöl erscheint unter diesem Aspekt ungünstig.

Von den untersuchten pflanzlichen und semisynthetischen Ölen kommen somit MCT, Sesamöl und Erdnussöl den Anforderungen am Nächsten. Sesam- und Erdnussöl sind in ihren Eigenschaften relativ ähnlich. Da Erdnussöl aber ein, wenn auch geringes, allergenes Potential besitzt (Senior et al.; 2000) (Floyd et al.; 1991) und darüber hinaus von Sesamöl eine hochgereinigte und für die parenterale Anwendung zugelassene Qualität zur Verfügung stand, wurden für die weiteren Versuche MCT und Sesamöl als Formulierungsbasis verwendet.

III.2. Charakterisierung der eingesetzten Suspensions–stabilisatoren

Wie in Kapitel I.2.3 beschrieben, werden bei ölhaltigen Grundlagen oftmals Aluminiumstearate verwendet, um die Viskosität der Formulierungen zu verändern. Durch eine Erhöhung der Viskosität werden Wirkstoffsuspensionen stabilisiert, da die Sedimentation der Partikel verlangsamt wird. Häufig wird auch eine Verlängerung der Wirkstofffreisetzung erreicht. Eine Analyse ergab, dass Aluminiumstearate in verschiedenen Qualitäten und insbesondere unterschiedlichen Verhältnissen Aluminium zu Fettsäure am Markt erhältlich sind. Um entscheiden zu können, welches Aluminiumstearat für die weitere Entwicklung am besten geeignet ist, mussten deshalb die chemischen, physikalischen und die galenischen Eigenschaften der verschiedenen

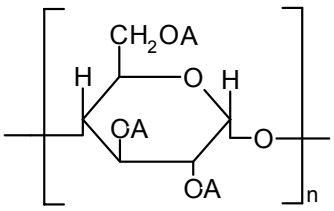
Muster bestimmt werden. In Tabelle 20 sind die untersuchten Proben mit den jeweiligen Lieferanten und den deklarierten Komplexierungsgraden aufgeführt

Tabelle 20: Übersicht der untersuchten Aluminiumstearat Handelsmuster

Produkt	Hersteller/Lieferant	deklariert als
Aluminiumstearat Fluka®	Fluka	Aluminiummonostearat
Aluminiumstearat ALG V®	Peter Greven	Aluminiumdistearat
Aluminiumstearat Alugel 30 HEP®	Baerlocher	Aluminiumdi/tristearat
Aluminiumstearat NF®	Ferro	Aluminiummonostearat
Aluminiumstearat Gellant®	Ferro	Aluminiummonostearat

Die Suche nach alternativen Formulierungshilfsstoffen für Oleogele führte zu den Produkten der Rheopearl® Serie des japanischen Herstellers Chiba Flour Milling. Dieser hat sich auf die Entwicklung polysaccharidhaltiger Hilfsstoffe spezialisiert. Aus Stärke werden durch Hydrolyse kürzerkettige Dextrinpolysaccharide gewonnen, deren freie Hydroxygruppen in einem zweiten Syntheseschritt verestert werden (vergleiche Tabelle 21).

Tabelle 21: Darstellung der Strukturformeln der Produkte der Rheopearl® Serie

Grundgerüst	Produkt	Seitenketten
	Rheopearl KL®	A: Palmitat, H n: Polymerisationsgrad
	Rheopearl TT®	A: Palmitat, H, 2-Ethyl-hexanoat n: Polymerisationsgrad

Rheopearl KL® und Rheopearl TT® wurden bisher vorwiegend im Bereich der kosmetischen Industrie eingesetzt, um die Struktur lipophiler Grundlagen wie wasserfreier Salbengrundlagen und Lippenstiftgrundmassen zu verändern. Nach Firmenangaben soll Rheopearl TT® im Vergleich zu Rheopearl KL® zu weicheren, thixotropen Gelen führen (Chiba Flour Milling Ltd.; 2004).

In einem weiteren Versuchsansatz wurde der Einsatz fester Lipide als viskositätserhöhendes Additiv öliger Grundlagen untersucht. Deshalb wurden die hochgereinigten synthetischen Fette Myristinsäuretriglycerid (Dynasan 114®) und Stearinsäuretriglycerid (Dynasan 118®), die auch für die Herstellung lipidhaltiger Implantate verwendet

werden (Mohl et al.; 2004) (Reithmeier et al.; 2001b) in die Untersuchung mit einbezogen.

III.2.1. Bestimmung der Fettsäureverteilung der Suspensionsstabilisatoren

Analog zu den flüssigen Ölen wurde auch bei den untersuchten Formulierungshilfsstoffen die Fettsäurezusammensetzung mit der in Kapitel II.2.1 beschriebenen gaschromatographischen Methode bestimmt. In Tabelle 22 findet sich die Übersicht der erhaltenen Verteilungen.

Tabelle 22: Darstellung der Fettsäureverteilung der untersuchten Formulierungshilfsstoffe

	Fettsäureverteilung in %							
	8:0	10:0	12:0	14:0	16:0	18:0	20:0	22:0
Aluminiumstearat Fluka®				1,09	30,10	67,86	0,95	
Aluminiumstearat ALG V®			0,07	0,36	46,56	52,40	0,62	
Aluminiumstearat Alugel 30 HEP®					60,12	39,40	0,48	
Aluminiumstearat NF®	0,17	0,25	1,53	3,27	28,82	64,99	0,98	
Aluminiumstearat Gellant®		0,03	0,07	1,82	15,14	38,70	20,63	23,60
Dextrinpalmitat Rheopearl KL®					100,0			
Dextrinpalmitatethylhexanoat Rheopearl TT®			0,08	1,49	98,4			
Stearinsäuretriglycerid Dynasan 118®					100,0			
Myristinsäuretriglycerid Dynasan 114®			100,0					

Die untersuchten Aluminiumstearate (AlSt) bestehen analog zu den pflanzlichen Ölen aus Fettsäuregemischen. Palmitin- (16:0) und Stearinsäure (18:0) bilden bei AlSt Fluka®, AlSt ALG V®, AlSt Alugel 30 HEP® und AlSt NF® die Hauptbestandteile. Das Verhältnis von Palmitat zu Stearat ist jedoch variabel und schwankt von (gerundeten) 1:2 bei AlSt Fluka® und AlSt NF® über ca. 1:1 bei AlSt ALG V® zu etwa 1,5:1 bei AlSt Alugel 30 HEP®. Im Unterschied zu den übrigen Stearaten treten bei AlSt Gellant®

bedeutende Anteile an weiteren höherkettigen Fettsäuren auf. Mit ca. 40% bildet Stearinsäure (18:0) auch hier den Hauptbestandteil. Die weiteren Fettsäuren Arachin- (20:0) und Behensäure (22:0) übertreffen aber mit jeweils mehr als 20% den Gehalt an Palmitinsäure (16:0) von 15% deutlich. Bei allen untersuchten Aluminiumstearaten treten keine ungesättigten Fettsäuren auf.

Die Ursache für die zum Teil deutlich unterschiedliche Fettsäurezusammensetzung der Aluminiumstearate lässt sich aus dem Herstellprozess ableiten. Für die Produktion des Hilfsstoffs werden pflanzliche Öle durch Zugabe von Wasser im Hochdruckreaktor bei erhöhter Temperatur in die einzelnen Fettsäuren und Glycerin gespaltet. Ungesättigte Fettsäuren werden in einem weiteren Verfahrensschritt katalytisch hydriert. Dies erklärt das vollständige Fehlen der ungesättigten Fettsäuren in der GC Analyse. Durch Versetzen mit Natronlauge im weiteren Verlauf bilden sich wasserlösliche Natriumcarboxylate. Dieser Lösung wird Aluminiumsulfat zugesetzt und wasserunlösliche Aluminiumcarboxylate entstehen, die einfach mittels Filtration abgetrennt werden. Anschließend erhält man durch Trocknung das fertige Endprodukt (Baerlocher GmbH; 2003b). Die Fettsäurezusammensetzung der eingesetzten pflanzlichen Öle bestimmt somit das Verhältnis der Fettsäuren im hergestellten Aluminiumcarboxylat.

Im Gegensatz zu den Aluminiumstearaten sind die übrigen Formulierungshilfsstoffe in ihrer Fettsäurezusammensetzung sehr homogen. Dynasan 114® und Dynasan 118®, sowie Rheopearl KL® enthalten ausschließlich die spezifizierten Fettsäuren. Allein Rheopearl TT® enthält neben der angegebenen Stearinsäure ca. 1,5% weitere Fettsäuren. Ursache für diese hohen Reinheitsgrade ist die Verwendung synthetisch hergestellter Fettsäuren, die im Gegensatz zu den bei den Aluminiumstearaten verwendeten pflanzlichen Ölen keine Gemische darstellen (Chiba Flour Milling Ltd.; 2004) (Sasol GmbH; 2004).

III.2.2. ICP-AES und Elementaranalyse der Aluminiumstearate

Neben der Verteilung der Fettsäuren haben bei den Aluminiumstearaten auch der Gehalt an Aluminium und insbesondere das Verhältnis Aluminium zu Fettsäure Einfluss auf das galenische Verhalten des Hilfsstoffs.

Zur Bestimmung des Aluminiumgehaltes und der Anteile an Kohlenstoff und Wasserstoff wurden die in Kapitel II.2.4 beschriebene Methode der induktiv gekoppelten Plasma-Atom-Emissions-Spektroskopie (ICP-AES) und der Elementaranalyse ange-

wendet. Da Natrium und Sulfat aufgrund des Herstellungsprozesses als Verunreinigungen in Aluminiumstearaten vorhanden sein können und deren Bestimmung mit den beiden Messmethoden ebenfalls zugänglich ist, wurden diese mit erfasst. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 23 aufgeführt.

Tabelle 23: Untersuchung der AlSt mittels ICP-AES und Elementaranalyse

	ICP-AES			Elementaranalyse		
	Al [%]	Na [%]	S [%]	C [%]	H [%]	S [%]
Aluminiumstearat Fluka®	4,72	7,11	0,54	66,71	11,09	0,76
Aluminiumstearat ALG V®	4,58	5,73	0,52	67,01	11,07	0,79
Aluminiumstearat Alugel 30 HEP®	4,48	8,34	0,60	68,00	11,14	0,98
Aluminiumstearat NF®	7,68	3,59	0,68	60,27	10,44	0,99
Aluminiumstearat Gellant®	7,53	3,64	0,67	60,72	10,54	0,76

Deutlich kann man erkennen, dass die Hilfsstoffe in zwei Gruppen eingeteilt werden können: Zur ersten Gruppe gehören AlSt Fluka®, AlSt ALG V® und AlSt Alugel 30 HEP®. Sie besitzen Aluminiumgehalte zwischen 4,5 und 4,7%, Kohlenstoffgehalte zwischen 66,7 und 68%, sowie Wasserstoffgehalte um 11,1%. AlSt NF® und AlSt Gellant® bilden die zweite Gruppe. Hier liegt der Aluminiumgehalt bei 7,5% bzw. 7,7%, der Kohlenstoffanteil bei 60,3% bzw. 60,7% und der Wasserstoffanteil um 10,5%. In den untersuchten Hilfsstoffen können z.T. Gehalte an Reststoffen aus der Herstellung bestimmt werden. Für Natrium liegen diese zwischen 3,6% und 8,3%, für Schwefel zwischen 0,5% und 1%.

Anhand der bestimmten Aluminiumgehalte kann das Verhältnis Aluminium zu Fettsäure abgeschätzt werden. Wie in Tabelle 20 dargestellt, werden die Komplexierungsgrade der Aluminiumstearate von den Herstellern in den Produktdatenblättern angegeben. AlSt NF® und AlSt Gellant® werden als Monostearate spezifiziert. Demzufolge muss der prozentuale Aluminiumanteil im Vergleich zu den Di- und Tristearaten höher sein. Dies wird auch durch die Messungen bestätigt. Bei AlSt Fluka® zeigt sich eine deutliche Abweichung zwischen Messergebnis und Schätzung. Der als Monostearat deklarierte Hilfsstoff liegt mit einem Aluminiumgehalt von 4,7% nahe an

den Messwerten von AlSt ALG V® und AlSt Alugel 30 HEP®, die von den Herstellern als Di- bzw. Di-/Tristearate deklariert werden.

Durch die Verknüpfung der Ergebnisse der Fettsäureanalyse mit den Messwerten der Bestimmungen des Aluminium-, Kohlenstoff- und Wasserstoffgehaltes kann eine im Vergleich zu den oben dargestellten Abschätzungen wesentlich genauere Berechnung des Verhältnis Aluminium zu Fettsäure und somit eine Bestimmung des Komplexierungsgrades durchführt werden. Dieses Vorgehen wird in dem folgenden Kapitel III.2.3 näher beschrieben.

III.2.3. Berechnung des Komplexierungsgrades der Aluminiumstearate

Anhand der Ergebnisse der GC Analyse aus Kapitel III.2.1 kann für jedes der untersuchten Aluminiumstearate die Molekülmasse M_r einer der jeweiligen Fettsäureverteilung entsprechenden durchschnittlichen Fettsäure berechnet werden. Für AlSt Fluka® ergibt sich somit eine repräsentative Fettsäure mit der Molekülmasse von 274,10 g/mol bezogen auf das Carboxylat (siehe Tabelle 24).

Tabelle 24: Berechnung der Molekülmasse der durchschnittlichen Fettsäure für AlSt Fluka®

Aluminiumstearat Fluka®		M_r (Carboxylat) [g/mol]	berechnete durchschnittliche M_r (Carboxylat) [g/mol]
Fettsäure	Anteil [%]		
14:0	1,09	227,37	
16:0	30,10	255,42	
18:0	67,86	283,48	274,69
20:0	0,95	311,53	

Mit Hilfe des durchschnittlichen M_r-Wertes kann im nächsten Schritt die prozentuale Elementverteilung für jedes Verhältnis Aluminium zu Fettsäure berechnet und mit den erhaltenen Werten aus den Ergebnissen der ICP-AES Analyse verglichen werden (siehe Tabelle 25).

Tabelle 25: Berechnung der Elementverteilung in Abhängigkeit des Komplexierungsgrades für AlSt Fluka® und Vergleich mit den Werten der ICP-AES und Elementaranalyse

Aluminiumstearat Fluka® Spezifikation:	M_r [g/mol]	berechnete Elementverteilung [%]			Ergebnis [%] ICP-AES und Elementaranalyse		
Aluminiummonostearat		Al	C	H	Al	C	H
Aluminiummonocarboxylat Al^{3+} $(OH^-)_2$ Carboxylat	335,69	8,04	62,14	10,73			
Aluminiumdicarboxylat Al^{3+} OH^- $(Carboxylat)_2$	593,37	4,55	70,31	11,61	4,72	66,71	11,09
Aluminiumtricarboxylat Al^{3+} $(Carboxylat)_3$	851,05	3,17	73,53	11,99			

Für den Hilfsstoff AlSt Fluka® ergeben sich deutliche Unterschiede zwischen der Spezifikation des Lieferanten und dem experimentell bestimmten Komplexierungsgrad des Rohstoffs. Die Deklaration des Lieferanten weist AlSt Fluka® als Monostearat aus. Wie der Vergleich zwischen der berechneten und der experimentell bestimmten Elementverteilungen zeigt, liegt AlSt Fluka® tatsächlich aber überwiegend als Distearat vor.

Analog zu dem oben beschriebenen Verfahren wird für die übrigen Aluminiumstearate vorgegangen. Aus den Ergebnissen der GC Analyse wird zunächst für jeden Hilfsstoff das Molekülgewicht der durchschnittlichen Fettsäure berechnet (vgl. Tabelle 26).

Tabelle 26: Übersicht der Molekülgewichte der repräsentativen Fettsäuren der verschiedenen Aluminiumstearat Handelsmuster

AlSt Probe	durchschnittliches Mr (Carboxylat) [g/mol]
Aluminiumstearat ALG V®	270,36
Aluminiumstearat Alugel 30 HEP®	266,74
Aluminiumstearat NF®	272,05
Aluminiumstearat Gellant®	297,12

Anschließend wird für jeden Hilfsstoff die theoretische Elementverteilung jedes Komplexierungsgrades berechnet und mit den mittels ICP-AES und Elementaranalyse bestimmten Werten verglichen (siehe Tabelle 27).

Tabelle 27: Vergleich der theoretisch berechneten und tatsächlich bestimmten Elementverteilungen der verschiedenen Aluminiumstearate

Hilfsstoff Spezifikation des Lieferanten	Al - Carboxylat Komplex	berechnete Elementverteilung [%]			experimentelles Ergebnis [%]		
		Al	C	H	Al	C	H
AlSt ALG V® Aluminiumdistearat	$Al(OH)_2$ Carboxylat	8,14	61,84	10,68			
	$Al\ OH\ (Carboxylat)_2$	4,61	70,09	11,59	4,58	67,01	11,07
	$Al\ (Carboxylat)_3$	3,22	73,35	11,95			
AlSt Alugel 30 HEP® Aluminiumdi/tristearat	$Al(OH)_2$ Carboxylat	8,23	61,57	10,64			
	$Al\ OH\ (Carboxylat)_2$	4,67	69,89	11,56	4,48	68,00	11,14
	$Al\ (Carboxylat)_3$	3,26	73,19	11,92			
AlSt NF® Aluminiummonostearat	$Al(OH)_2$ Carboxylat	8,10	61,93	10,70	7,68	60,27	10,44
	$Al\ OH\ (Carboxylat)_2$	4,59	70,15	11,60			
	$Al\ (Carboxylat)_3$	3,20	73,39	11,96			
AlSt Gellant® Aluminiummonostearat	$Al(OH)_2$ Carboxylat	7,53	63,55	10,94	7,53	60,72	10,54
	$Al\ OH\ (Carboxylat)_2$	4,23	71,32	11,81			
	$Al\ (Carboxylat)_3$	2,94	74,34	12,15			

Deutlich kann man erkennen, dass bei den in Tabelle 27 dargestellten Aluminiumstearaten AlSt ALG V®, AlSt Alugel 30 HEP®, AlSt NF® und AlSt Gellant® die Angaben der Hersteller hinsichtlich des Komplexierungsgrades mit den experimentell bestimmten Werten gut übereinstimmen.

AlSt ALG V® wird vom Hersteller Peter Greven als Distearat deklariert. Der Vergleich der theoretisch berechneten mit den praktisch bestimmten Werten bestätigt die Angaben des Lieferanten. AlSt Alugel 30 HEP® der Fa. Baerlocher wird im Analysenzertifikat als Gemisch aus Di- und Tristearaten angegeben. Der gemessene Aluminiumgehalt von 4,48% liegt deutlich über dem berechneten Wert des Tristearats von 3,26% und nahe bei dem Wert des reinen Distearats von 4,67%. AlSt Alugel 30 HEP® dürfte deshalb zum überwiegenden Teil als Distearat vorliegen, was auch durch den Vergleich der Kohlenstoff- und Wasserstoffgehalte bestätigt werden kann.

Die beiden Proben AlSt NF® und AlSt Gellant® werden vom Hersteller Ferro als Monostearate deklariert. Wie schon in Kapitel III.2.2 beschrieben, muss bei Aluminiummonostearaten der prozentualen Anteil an Aluminium im Vergleich zu den Aluminiumdi-/tristearaten deutlich höher sein. Dies bestätigen die Ergebnisse der ICP-AES

Analyse. Der Vergleich der vorab berechneten Werte mit den experimentell bestimmten Werten bestätigt die Angaben des Herstellers Ferro. AlSt NF® und AlSt Gellant® liegen als Monostearat vor und unterscheiden sich in diesem Punkt deutlich von den übrigen Aluminiumstearaten, die hauptsächlich als Distearate vorliegen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich einerseits deutliche chemische Unterschiede zwischen den kommerziell erhältlichen Aluminiumstearaten ergeben und andererseits die Angaben des Lieferanten zu den Hilfsstoffeigenschaften nicht zwingend richtig sein müssen. Inwiefern die unterschiedlichen Komplexierungsgrade Einfluss auf die Galenik der Formulierung besitzen, wurde im weiteren Verlauf des Projektes untersucht.

III.2.4. DSC Untersuchungen der Suspensionsstabilisatoren

Wie in Kapitel I.4.2 und den Formulierungspatenten zu Posilac® (Heintz et al.; 2001) (Jeng et al.; 2001) beschrieben, erfolgt die Herstellung aluminiumstearathaltiger Oleogele durch Aufschmelzen der Hilfsstoffe in der öligen Grundlage. Um zu untersuchen, welche Temperaturen hierfür erforderlich sind, wurde das Schmelzverhalten der verschiedenen Formulierungshilfsstoffe mittels der in Kapitel II.2.2 beschriebenen DSC Methode bestimmt. Für die Aluminiumstearate ergeben sich die in Abbildung 14 dargestellten Messkurven.

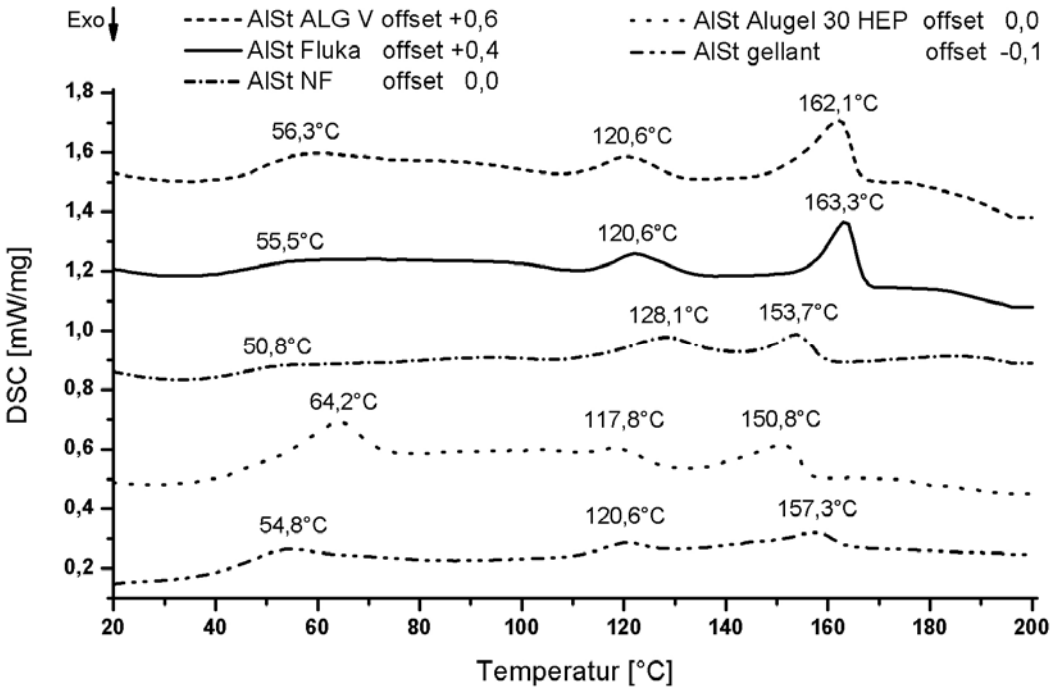


Abbildung 14: DSC Aufnahme der verschiedenen Aluminiumstearate

Anhand der Kurvenverläufe kann man erkennen, dass alle Substanzen oberhalb von ca. 165°C geschmolzen vorliegen und die Kurvenverläufe durch drei Peaks bzw. Schultern gekennzeichnet sind. Die Peaks im Bereich von 150-165°C entsprechen dem Schmelzpunkt der Aluminiumfettsäurekomplexe. Der aus den DSC Untersuchungen erhaltene Schmelzbereich stimmt mit den Angaben aus der Literatur und den Angaben der Hersteller überein (Loncar et al.; 2003) (Peter Greven GmbH; 2003) (Baerlocher GmbH; 2003a) (Ferro GmbH.; 2003b) (Ferro GmbH.; 2003a). Die Peaks im Bereich von 120°C deuten auf nicht mit Aluminiumsulfat umgesetzte Fettsäuren hin, die vermutlich noch als Natrium Fettsäuresalze vorliegen. Die DSC Analyse von reinem Natriumstearat zeigt Schmelzübergänge bei 100 und 135°C (vgl. Abbildung 15).

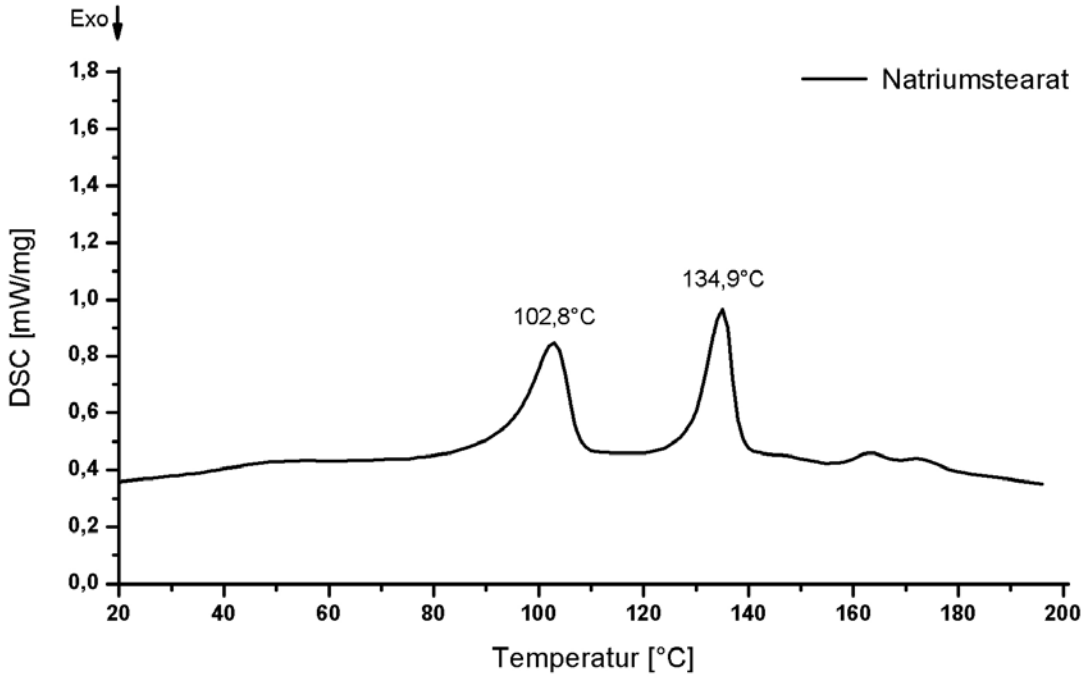


Abbildung 15: DSC Aufnahme von Natriumstearat

In der GC Analyse des Fettsäurespektrums der Natriumstearatprobe wurden Palmitinsäure mit 44,15% und Stearinsäure mit 53,02% als dominierende Fettsäuren bestimmt. Die beiden Schmelzpunkte der DSV Kurve können somit einerseits Natriumpalmitat (102,8°C) und andererseits Natriumstearat (134,9°C) zugeordnet werden. Die Verschiebung des Schmelzpunktes in den Aluminiumstearaten zu tieferen Temperaturen dürfte durch die Ausbildung eines Eutektikums mit den übrigen Bestandteilen hervorgerufen werden. Aufgrund der geringen Gehalte sind die Peaks im Vergleich zur Natriumstearatprobe wesentlich schwächer ausgeprägt.

Die Schultern bzw. kleineren Peaks in Abbildung 14 bei 55-65°C deuten auf Glasübergänge hin, da diese beim zweimaligen Aufheizen der Proben nicht mehr auftreten. Besonders ausgeprägt ist dieser Effekt bei AlSt Alugel 30 HEP® (vgl. Abbildung 16). Beim erstmaligen Durchfahren der Temperaturrampe kann bei 62°C ein deutlicher Relaxationspeak beobachtet werden, welcher in der zweiten Messung nicht mehr beobachtet wird.

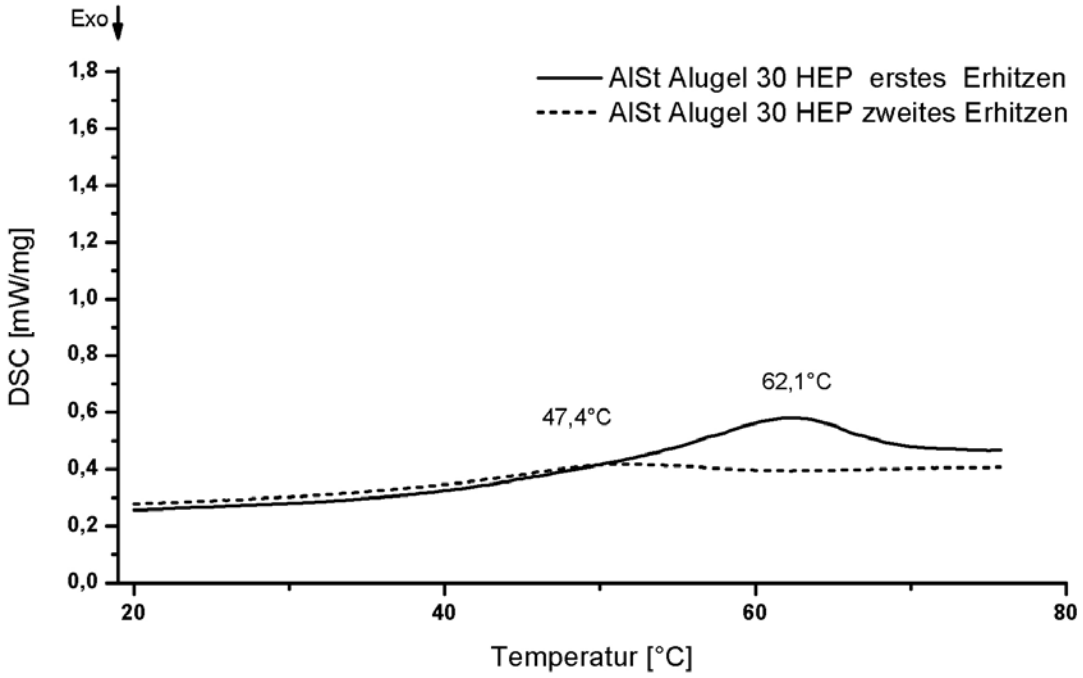


Abbildung 16: DSC Aufnahme von AlSt Alugel 30 HEP®

Die DSC Untersuchung der Rheopearl® Serie führte zu dem in Abbildung 17 dargestellten Ergebnis. Im Thermogramm von Rheopearl KL® (Dextrinpalmitat) sind deutlich zwei Peaks zu erkennen. Oberhalb von 80°C ist die Substanz vollständig geschmolzen. Die beiden Peaks bei Rheopearl KL® können durch Modifikationsumwandlungen oder unterschiedliche Veresterungsgrade der freien Hydroxygruppen des Dextringrundgerüsts mit Palmitinsäure hervorgerufen werden. Bei Rheopearl TT® (Dextrinpalmitat/-ethylhexanoat) konnte trotz mehrfacher Messung kein eindeutiger Schmelzpunkt ermittelt werden. Nach Angaben des Herstellers soll dieser bei etwa 100°C liegen. Um dies zu überprüfen, wurde die Substanz makroskopisch im Heizblock untersucht. Ab ca. 90°C kann eine optische Veränderung mit einem Übergang vom pulvrig-weißen in einen durchscheinend klaren Zustand beobachtet werden (Chiba Flour Milling Ltd.; 2004).

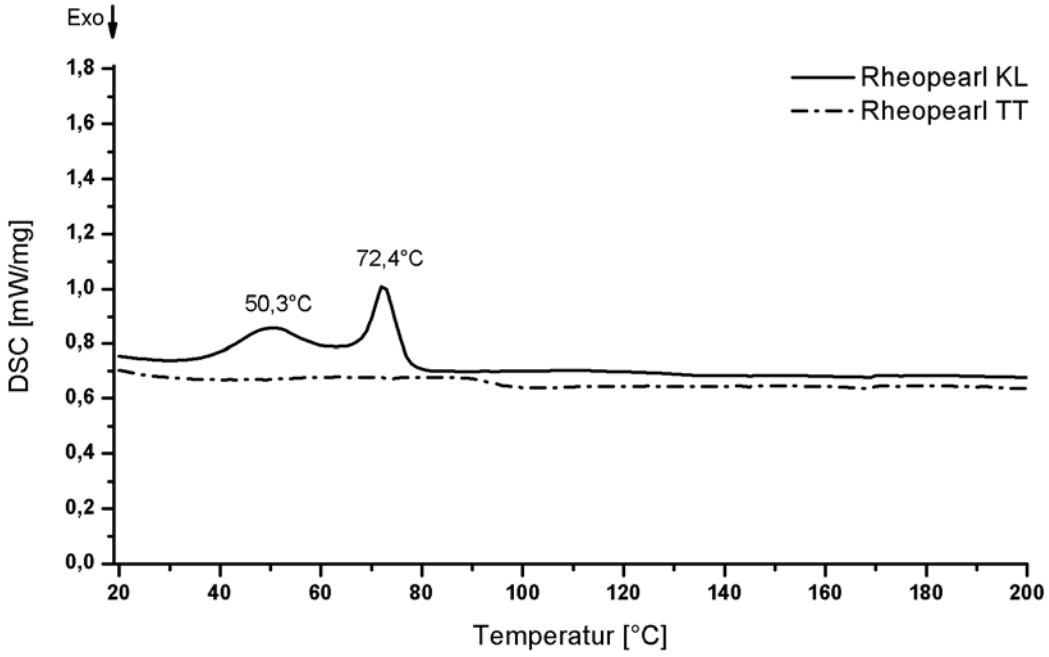


Abbildung 17: DSC Aufnahme von Rheopearl KL® und Rheopearl TT®

Für Dynasan 114® und Dynasan 118® ergaben sich in den DSC Untersuchungen jeweils eindeutige Schmelzpeaks (vgl. Abbildung 18) Die Abhängigkeit des Schmelzbereichs der beiden Lipide von der Kettenlänge der veresterten Fettsäuren geht aus den DSC Kurven deutlich hervor. Für Dynasan 114® mit der kürzerkettigen Fettsäure Myristinsäure (14:0) liegt dieser mit ca. 58°C um 14°C niedriger als der des Dynasan 118® mit der längerkettigen Stearinsäure (18:0).

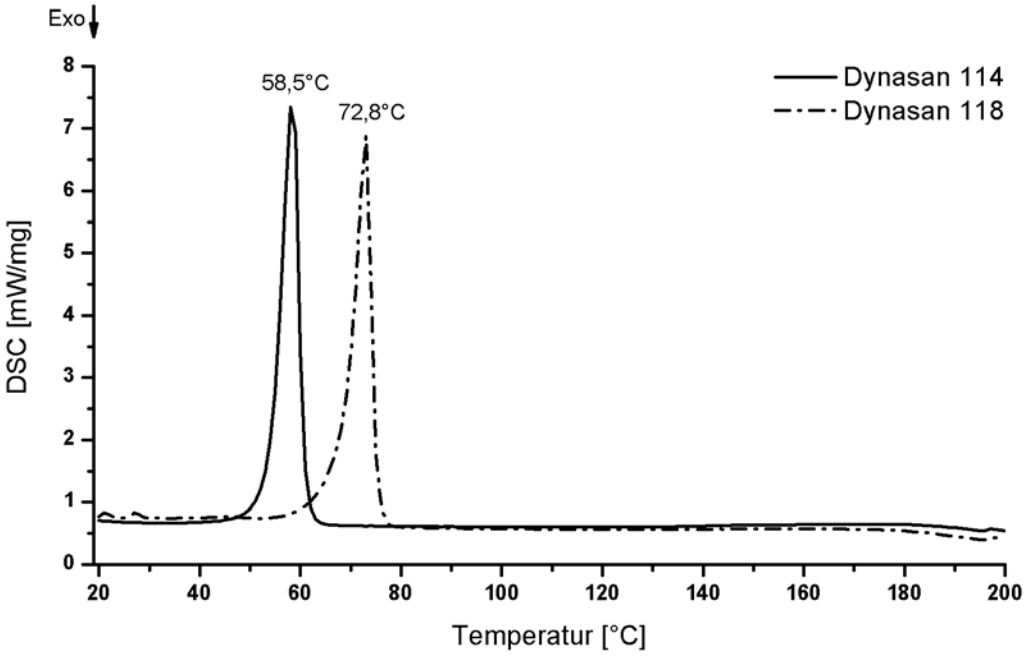


Abbildung 18: DSC Aufnahme von Dynasan 114® und Dynasan 118®

III.2.5. Röntgendiffraktometrie der Aluminiumstearate

Die vorgehenden Teilkapitel III.2.1 bis III.2.4 zeigten bei den verschiedenen Aluminiumstearaten deutliche Unterschiede in der Fettsäurezusammensetzung, dem Aluminium/Fettsäureverhältnis und dem Schmelzverhalten in der DSC. Um zu bestimmen, ob sich diese Eigenschaften auch in der Anordnung der Moleküle im festen Zustand niederschlagen, wurden die Aluminiumstearate mit dem in Kapitel II.2.6 beschriebenen Verfahren der Röntgendiffraktometrie untersucht (Abbildung 19).

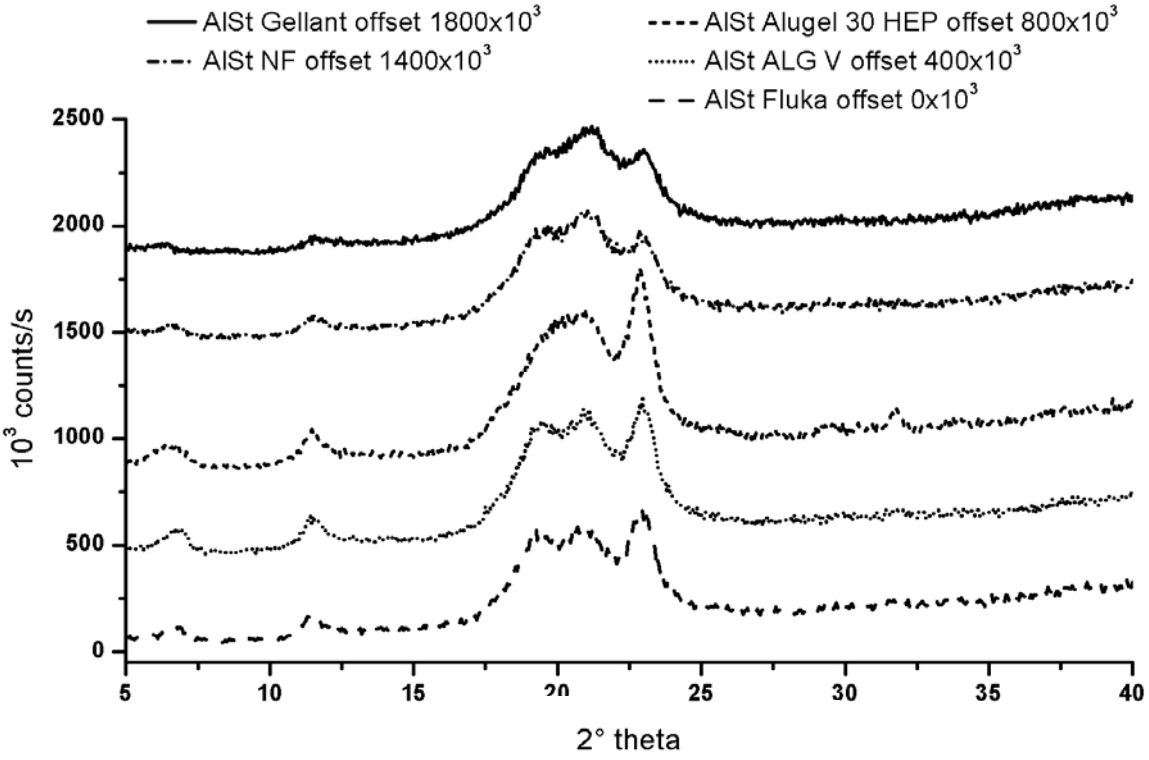


Abbildung 19: Röntgendiffraktometrie der Aluminiumstearate

Die verschiedenen Aluminiumstearate lieferten in der Untersuchung vergleichbare Röntgendiffraktogramme und weisen eine teilkristalline Struktur auf. Auffallend bei den Kurvenverläufen der untersuchten Proben ist jedoch, dass bei den in Kapitel III.2.3 jeweils als Monostearat bestimmten Proben AlSt Gellant® und AlSt NF® die Peaks bei 23° im Vergleich zu den als Aluminiumdistearaten ermittelten AlSt Alugel 30 HEP®, AlSt ALG V® und AlSt Fluka® deutlich weniger ausgeprägt sind. Potentiell liegen die Aluminiumdistearate im festen Zustand besser geordnet vor als die Aluminiummonostearate und zeigen deshalb deutlichere Reflexe. Mit der Methode der Röntgendiffraktometrie kann somit im Vergleich zur der Kombination aus GC Analyse und ICP-AES vergleichsweise schnell und einfach der Komplexierungsgrad einer Aluminiumstearatprobe ermittelt werden.

III.2.6. Fazit der Untersuchung der Formulierungshilfsstoffe

Aus der Charakterisierung der verschiedenen Formulierungszusätze in den vorgehenden Kapiteln kann folgendes Fazit gezogen werden: Die untersuchten Aluminiumstearate sind hinsichtlich ihrer Fettsäurezusammensetzung nicht einheitlich und bestehen aus Gemischen verschiedener Fettsäuren mit großen Anteilen an Palmitin- und Stearinsäure. Bei AlSt Gellant® treten darüber hinaus Arachin- und Behensäure in beachtlichen Anteilen auf. Die Untersuchung des Aluminiumgehaltes ermöglicht in Verbindung mit den GC Ergebnissen die Bestimmung des Komplexierungsgrades der Aluminiumstearate. AlSt Fluka®, AlSt ALG V® und AlSt Alugel 30 HEP® liegen vorwiegend als Aluminiumdistearate vor, AlSt NF® und AlSt Gellant® als Aluminiummonostearate. DSC Messungen zeigen für alle Aluminiumstearate vergleichbare Übergänge bei 50°C und 120°C und ein Schmelzen zwischen 150°C und 165°C. Mit Hilfe der Röntgendiffraktometrie werden für die Aluminiumstearate vergleichbare teilkristalline Strukturen bestimmt, die bei Aluminiummonostearaten im Vergleich zu Aluminiumdistearaten allerdings schwächer ausgeprägt sind. Umgekehrt kann dieses Merkmal für die Bestimmung des Komplexierungsgrades verwendet werden.

Die untersuchten Dynasan® und Rheopearl® Produkte besitzen hinsichtlich der Fettsäurezusammensetzung eine hohe Reinheit. Sie bestehen ausschließlich aus den jeweils deklarierten Fettsäuren. In DSC Untersuchungen zeigen Dynasan 114® und Dynasan 118® klare Schmelzpunkte bei ca. 58°C und 73°C. Das Verhalten der Rheopearl® Derivate hingegen ist uneinheitlich. Rheopearl KL® zeigt zwei Peaks bei 50°C und 72°C, während für Rheopearl TT® im Bereich von 0-200°C kein Schmelzpeak erkennbar ist. Im Schmelzblock hingegen kann man für Rheopearl TT® bei ca. 90°C den Übergang zu einer klaren Phase erkennen.

Abschließend können somit für die weiteren Formulierungsversuche bei Aluminiumstearaten Verarbeitungstemperaturen von ca. 170°C und bei den Rheopearl® und Dynasan® Derivaten Temperaturen von 80°C festgelegt werden.

III.3. Untersuchung der physikalischen Stabilität öliger Formulierungen mit ausgewählten Formulierungshilfsstoffen

Nach Abschluss der Charakterisierung der öligen Grundlagen und der Formulierungshilfsstoffe wurden verschiedene Ansätze mit Miglyol 812 bzw. Sesamöl und Dynasan 114/118®, Rheopearl KL/TT® sowie den verschiedenen Aluminiumstearaten hergestellt. Diese Formulierungsansätze wurden kurz nach der Herstellung und in einem Zeitraum bis 52 Wochen nach der Herstellung optisch hinsichtlich ihrer physikalischen Stabilität bei 25°C und 40°C Lagerung untersucht. Ergänzend durchgeführte DSC Untersuchungen der Formulierungen zeigten keine klaren Übergänge.

III.3.1. Formulierungen mit Dynasan 114® und Dynasan 118®

In der Einleitung der vorliegenden Arbeit wurde der Einsatz fester Lipide für die Herstellung parenteraler Depotarzneiformen mit verlängerter Wirkstofffreisetzung dargestellt (siehe Kapitel I.1.4). Feste Lipide werden vorwiegend in Form von Mikropartikeln (Reithmeier et al.; 2001b) oder Implantaten (Mohl et al.; 2004) angewendet. Nachteilig bei dieser Art der Formulierung ist allerdings die vergleichsweise kostenintensive Herstellung der Mikropartikel oder die für den Patienten unangenehme Applikation der Implantate durch großlumige Hohlnadeln. Anhand der Formulierungsansätze mit den Dynasan® Derivaten sollte untersucht werden, ob durch den Zusatz von Myristinsäuretriglycerid (= Dynasan 114®) und Stearinsäuretriglycerid (= Dynasan 118®) zu Miglyol 812 und Sesamöl stabile flüssige Formulierungen hergestellt werden können, die im Vergleich zu den nativen Ölen eine höhere Viskosität mit potentiell verlängerte Wirkstofffreisetzung besitzen und dennoch einfach mittels üblicher Nadeln injiziert werden können.

Für die Untersuchungen wurden die beiden Hilfsstoffe in 1% bis 5% Anteilen den Ölen zugesetzt und bei 80°C unter Rühren bis zur Klarschmelze erhitzt. Nach der Herstellung wurden die Formulierungen bei Raumtemperatur und bei 40°C gelagert und anschließend in regelmäßigen Zeitabständen visuell untersucht (Abbildung 20a-d und Abbildung 21a-d). Alle Formulierungen zeigten bereits nach kurzer Zeit sowohl bei 25°C als auch bei 40°C eine deutliche Auftrennung in flüssige ölige Phase und abgeschiedenes festes Lipid. Hinsichtlich der Abscheidung des Fetts ergab sich kein wesentlicher Unterschied zwischen den eingesetzten Fetten und den verwendeten Ölen. Ebenso führte eine Erhöhung des Anteils der zugesetzten Hilfsstoffe nicht zu

einer Verbesserung der Stabilität der Formulierungen. Aus den Ergebnissen dieses Versuchsarms kann deshalb geschlossen werden, dass Dynasan® Derivate zwar in Form fester Mikropartikel und in Form von Implantaten als Basis für Depotarzneiformen verwendet werden können, für die Herstellung physikalisch stabiler flüssiger Formulierungen durch Aufschmelzen in öligen Grundlagen aber weniger geeignet sind, da bereits nach kurzer Lagerzeit ein Abscheiden der Lipide zu beobachten ist.

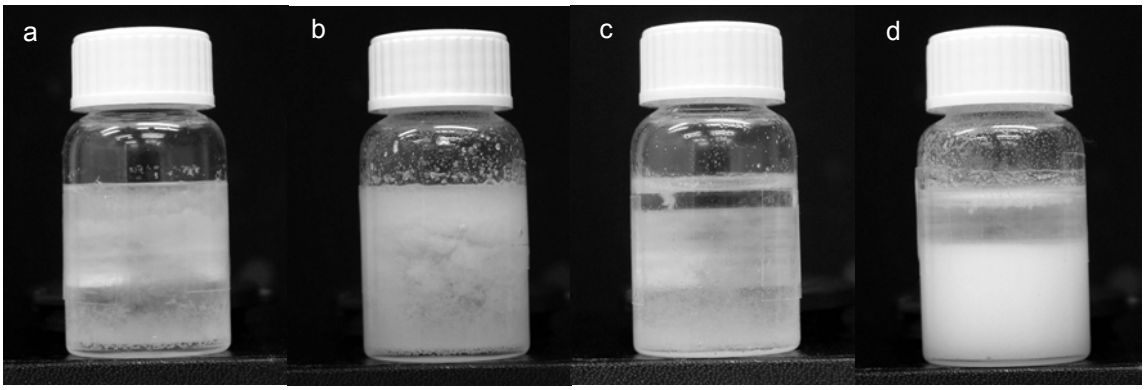


Abbildung 20: 1% und 5% Dynasan 114® in Miglyol 812 (Teilbild a/b) und 1% und 5% Dynasan 114® in Sesamöl (Teilbild c/d) 14d Lagerung bei Raumtemperatur

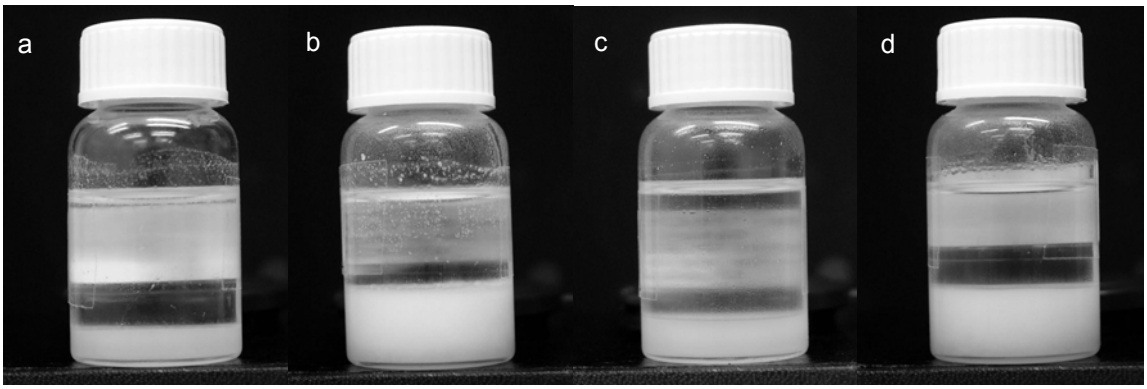


Abbildung 21: 1% und 5% Dynasan 118® in Miglyol 812 (Teilbild a/b) und 1% und 5% Dynasan 118® in Sesamöl (Teilbild c/d) 14d Lagerung bei Raumtemperatur

III.3.2. Formulierungen mit Rheopearl KL® und Rheopearl TT®

Analog zu der Stabilitätsstudie mit Dynasan® Proben wurden auch mit den Hilfsstoffen der Rheopearl® Serie Formulierungen in Miglyol 812 und Sesamöl als Grundlage hergestellt und sowohl bei Raumtemperatur und als auch bei 40°C eingelagert. Die Hilfsstoffe wurden den Ölen in Anteilen von 1-5% zugesetzt und bei 80°C unter Rühren bis zur Klarschmelze erhitzt. Auch die Formulierungen mit dem Hilfsstoff Rheopearl TT®, für den in der DSC Untersuchung kein klarer Schmelzpunkt zu ermitteln war (vgl. Kapitel III.2.4), erschienen bei 80°C klar und homogen. Während der Einlagerung wurden die Formulierungen in regelmäßigen Abständen makroskopisch auf Instabilitäten untersucht. Die Formulierungen mit Rheopearl KL® und Rheopearl TT®

waren während des Einlagerungszeitraums von einem Jahre bei Raumtemperatur und 40°C stabil und zeigten keine Phasenauftrennung oder sonstige Instabilitäten (Abbildung 22a-d und Abbildung 23a-d).

Als Ergebnis dieses Versuchszweigs ergibt sich somit, dass die Rheopearl® Derivate sowohl mit dem kurzkettigen Miglyol 812 als auch mit dem längerkettigen Sesamöl stabile höherviskose Formulierungen bilden und auch bei Einlagerung bei erhöhter Temperatur keine makroskopisch erkennbaren separierten Phasen ausbilden.

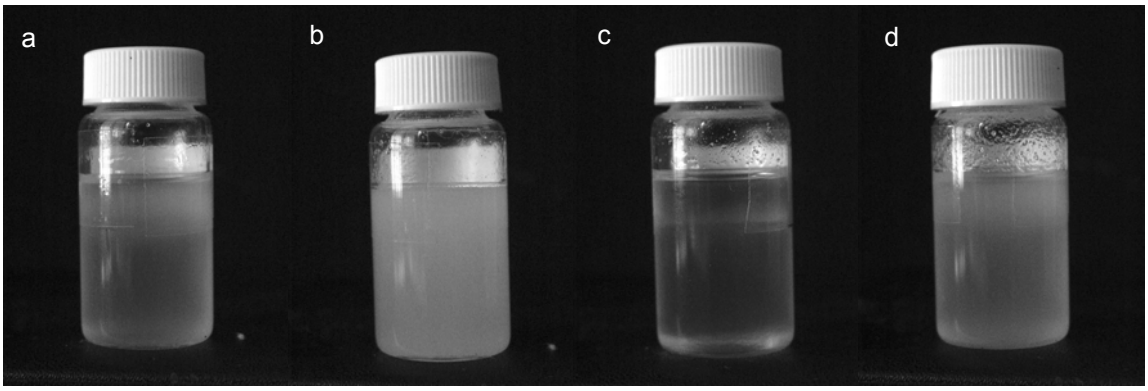


Abbildung 22: 1% und 5% Rheopearl KL® (Teilbild a/b) in Miglyol 812 und 1% und 5% Rheopearl KL® in Sesamöl (Teilbild c/d) ein Jahr Lagerung bei 40°C

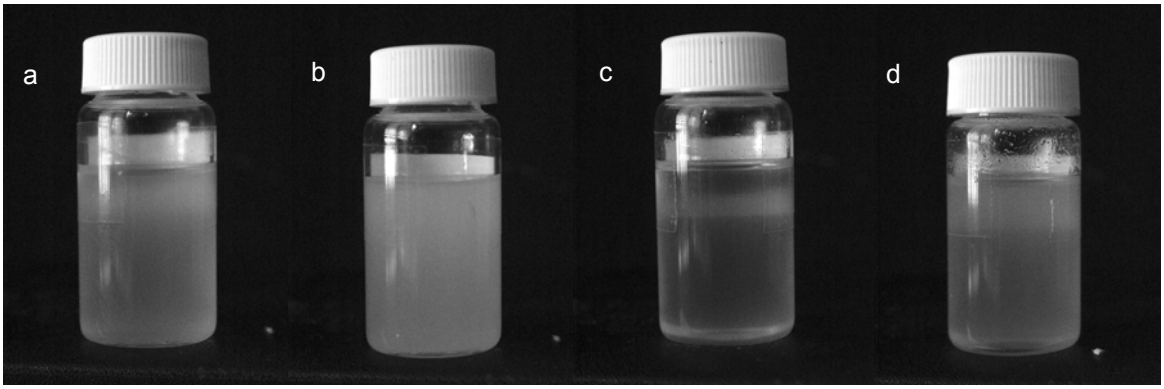


Abbildung 23: 1% und 5% Rheopearl TT® (Teilbild a/b) in Miglyol 812 und 1% und 5% Rheopearl TT® in Sesamöl (Teilbild c/d) ein Jahr Lagerung bei 40°C

III.3.3. Formulierungen mit den verschiedenen Aluminiumstearaten

Analog zu den vorherigen Formulierungen wurden mit Aluminiumstearaten verdickte Öle untersucht. Die Hilfsstoffe wurden den Grundlagen Miglyol 812 und Sesamöl in Anteilen von 1 bis 5% zugesetzt und bei 170°C unter Rühren bis zur Klarschmelze erhitzt. Anschließend wurden die Formulierungen bei 25°C und 40°C eingelagert und in festgelegten Zeitintervallen makroskopisch auf Phasentrennungen oder sonstige Instabilitäten untersucht.

Für die Aluminiumstearate ergab sich ein differenziertes Bild. Die Formulierungen mit AlSt Fluka®, AlSt ALG V® und AlSt Alugel® waren in beiden Ölen auch nach einem Jahr Einlagerung physikalisch stabil und zeigten keine Phasentrennungen (Abbildung 24 bis Abbildung 26). Feine Schlieren wie sie in Abbildung 24d und Abbildung 26d der 5% Formulierungen von AlSt Fluka® und AlSt Alugel 30 HEP® erkennbar sind, waren bereits zu Beginn der Einlagerung vorhanden und bildeten sich nicht während der Einlagerung. Die Formulierungen mit AlSt Gellant® und AlSt NF® hingegen wiesen ein deutlich unterschiedliches Verhalten auf (Abbildung 27 und Abbildung 28). Bei den 1% Formulierungen konnte eine Phasenauftrennung in einen klaren öligen Überstand und einen festen wachsartigen Bodensatz beobachtet werden. Ein ähnlicher Effekt konnte in abgeschwächter Form auch bei den 5% Formulierungen festgestellt werden. Aufgrund des höheren Gehalts an Aluminiumstearat waren die Überstände allerdings nicht klar, sondern milchig-trüb. Die Abscheidung des Bodensatzes war hierbei bei Betrachtung mit bloßem Auge deutlicher erkennbar, als in den Aufnahmen dargestellt, bei denen der wachsartige Niederschlag nur in Umrissen deutlich wird.

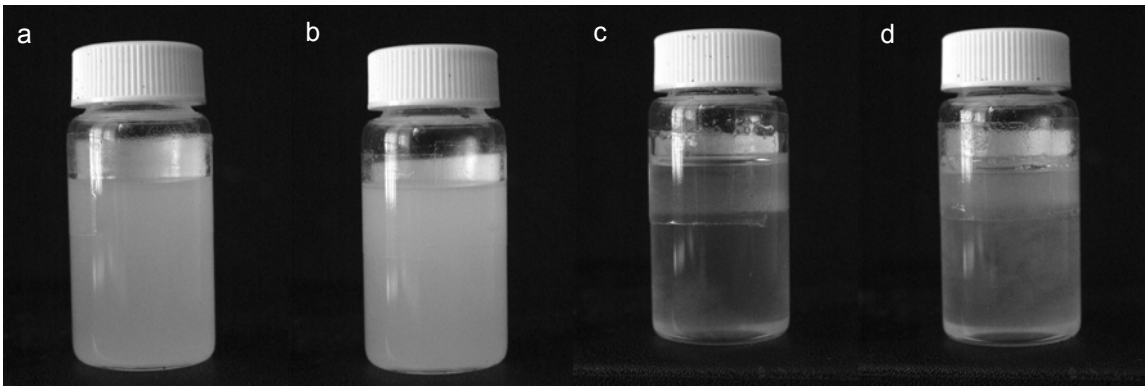


Abbildung 24: 1% und 5% AlSt Fluka® in Miglyol 812 (Teilbild a/b) und 1% und 5% AlSt Fluka® in Sesamöl (Teilbild c/d), ein Jahr Lagerung bei 40°C

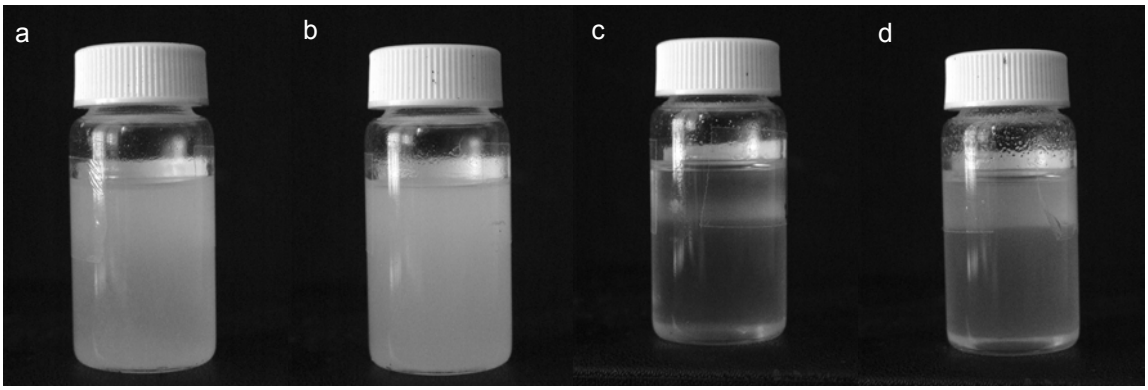


Abbildung 25: 1% und 5% AlSt ALG V® in Miglyol 812 (Teilbild a/b) und 1% und 5% AlSt ALG V® in Sesamöl (Teilbild c/d), ein Jahr Lagerung bei 40°C

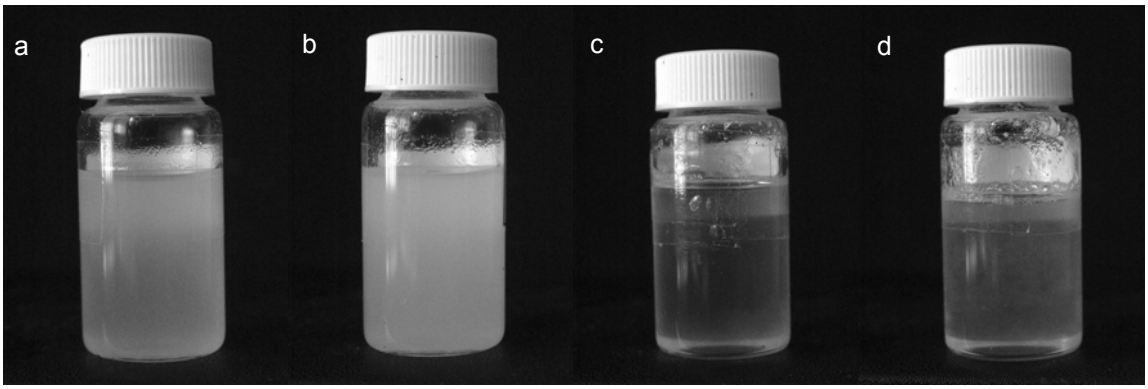


Abbildung 26: 1% und 5% AlSt Alugel 30 HEP® in Miglyol 812 (Teilbild a/b) und 1% und 5% AlSt Alugel 30 HEP® in Sesamöl (Teilbild c/d), ein Jahr Lagerung bei 40°C

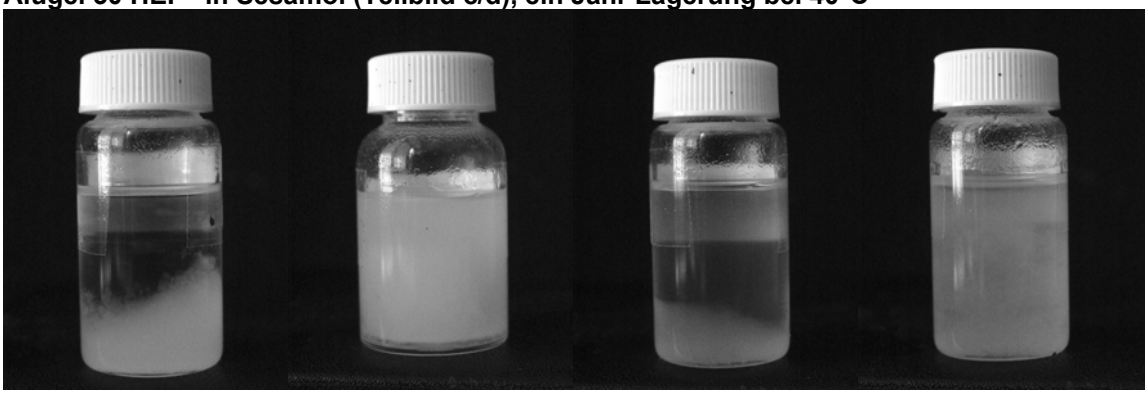


Abbildung 27: 1% und 5% AlSt Gellant® in Miglyol 812 (Teilbild a/b) und 1% und 5% AlSt Gellant® in Sesamöl (Teilbild c/d), ein Jahr Lagerung bei 40°C

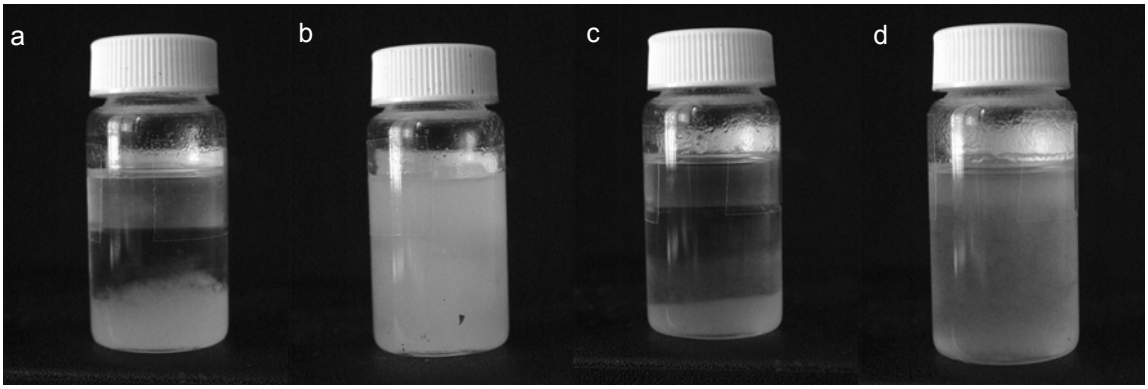


Abbildung 28: 1% und 5% AlSt NF® in Miglyol 812 (Teilbild a/b) und 1% und 5% AlSt NF® in Sesamöl (Teilbild c/d), ein Jahr Lagerung bei 40°C

III.3.4. Fazit der Untersuchung der Formulierungsstabilität

Aus den Ergebnissen der oben beschriebenen Versuchsansätze können folgende Schlüsse gezogen werden: Für die Herstellung stabiler viskoser Formulierungen sind feste Lipide in Kombination mit öligen Grundlagen nicht geeignet. Bereits nach kurzer Zeit erfolgt eine Trennung der unmittelbar nach der Herstellung klaren Formulierungen in flüssige ölige Grundlage und festes Lipid.

Die Hilfsstoffe Rheopearl KL® und Rheopearl TT® sind für die Herstellung viskoser Oleogele gut geeignet. Unabhängig von der zugesetzten Menge Hilfsstoff bilden sich

stabile Formulierungen, die auch nach einem Jahr Lagerung bei erhöhter Temperatur keine Instabilitäten zeigen.

Die Verwendung der Aluminiumstearate für die Herstellung lipophiler Gele muss differenziert betrachtet werden. Mit den Produkten AlSt Fluka®, AlSt ALG V® und AlSt Alugel 30 HEP® können lagerstabile Formulierungen auf Grundlage von Miglyol 812 und Sesamöl hergestellt werden. Höherprozentige Formulierungen mit AlSt Fluka® und AlSt Alugel 30 HEP® im Bereich bis 5% zeigen von Beginn der Beobachtung an feine Schlieren, die während der Einlagerung konstant bleiben. Die Ansätze mit AlSt ALG V® erscheinen makroskopisch am besten geeignet. Sie sind nach der Herstellung vollkommen homogen und bleiben über den gesamten Beobachtungszeitraum auch bei 40°C stabil. Formulierungen mit AlSt Gellant® und AlSt NF® zeigen demgegenüber deutliche Instabilitäten bis hin zu Phasentrennungen in klare Überstände und feste Bodensätze. Besonders ausgeprägt ist dieser Effekt bei niedrigem Hilfsstofffanteil. Auffallend ist, dass die Stabilität der Aluminiumstearat Formulierungen abhängig vom Komplexierungsgrad des Hilfsstoffes ist. Die in Kapitel III.2.3 als Di- und Tristearate charakterisierten Aluminiumstearate AlSt Fluka®, AlSt ALG V® und AlSt Alugel 30 HEP® bilden stabile Gele, während die als Monostearat charakterisierten Aluminiumstearate AlSt Gellant® und AlSt NF® zu instabilen Formulierungen führen.

Aufgrund der Ergebnisse des vorliegenden Kapitels ist die Verwendung von Rheopearl KL®, Rheopearl TT® sowie die der Aluminiumstearate AlSt Fluka®, AlSt ALG V® und AlSt Alugel 30 HEP® für die Herstellung physikalisch stabiler öliger Formulierungen mit erhöhter Viskosität möglich. Um allerdings die Anzahl der möglichen Versuchsansätze im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit dem versuchstechnisch machbaren Maßstab anzupassen, musste eine weitere Hilfsstoffauswahl getroffen werden. Aus der Gruppe der Aluminiumstearate wurde deshalb AlSt ALG V® ausgewählt, da diese Substanz die makroskopisch besten Formulierungen sowohl für Sesamöl als auch für Miglyol 812 lieferte. Aus der Gruppe der Rheopearl® Derivate wurde Rheopearl KL® (=Dextrinpalmitat) ausgewählt, da dieser Hilfsstoff bei vergleichbarer Stabilität der Formulierungen aufgrund seines chemischen Aufbaus ausschließlich aus Zucker und Fettsäure aus toxikologischer Sicht für die Anwendung in Parenteralia besser geeignet erscheint, als der Hilfsstoff Rheopearl TT® (=Dextrinpalmitatethylhexanoat), der die verzweigte 2-Ethylhexansäure als Seitenkettenrest enthält.

III.4. Methoden zur Herstellung von Pulvern zur Suspension

Für parenteral applizierbare Suspensionen stellt neben der Viskosität der Grundlage auch die Größe der suspendierten Wirkstoffteilchen ein wichtiges Kriterium für die Auswahl der empfohlenen Injektionskanüle dar. Für den Fall, dass das zu suspendiere Gut anfangs unzerkleinert vorliegt oder die Partikelgrößenverteilung den Zielbereich überschreitet, müssen Verfahren zu Reduktion der Partikelgröße angewendet werden. In der Literatur wird u.a. der Einsatz von Labor-Luftstrahlmühlen (Brooks et al.; 1992), Miniaturkugelmühlen (Foster et al.; 1997) oder hochtourigen Rührgeräten (Mitchell; 1985) beschrieben.

Im folgenden Kapitel wird, um erste Anhaltspunkte zu gewinnen, zunächst die Partikelgrößenverteilung eines am Markt erhältlichen Produktes bestimmt. Anschließend werden verschiedene Methoden zur Herstellung von Pulvern zur Suspensionen in öligen Trägern erprobt.

III.4.1. Untersuchung der Partikelgröße in Jenacillin O2 Mega®

Jenacillin O2 Mega® stellt ein gutes Beispiel für die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Formulierungsstrategie dar. Für die Herstellung dieses Fertigarzneimittels mit verzögerter Wirkstofffreisetzung werden Benzylpenicillin Partikel in einer verdickten Grundlage aus pflanzlichem Öl und Formulierungshilfsstoff Aluminiumstearat suspendiert. Um die Partikelgröße der in der öligen Grundlage suspendierten Teilchen zu bestimmen, wurde die Kapitel II.2.8 beschriebene Methode der Laserlichtstreuung angewendet. Typische Kenngrößen für Partikelgrößenverteilungen stellen der $d_{(v,0.5)}$ (=Grenzdurchmesser von 50% der Partikel bezogen auf die Volumenverteilung) und der $d_{(v,0.9)}$ (=Grenzdurchmesser von 90% der Partikel bezogen auf die Volumenverteilung) dar. Das Ergebnis der Untersuchung ist in Tabelle 28 zusammengefasst.

Tabelle 28: Partikelgrößenverteilung von Jenacillin O2 Mega® (Mittelwert ± Standardabweichung, n=3)

Partikeldurchmesser [µm]	Volumenverteilung [%]	Kenngröße
2,35 ± 0,01	10	
3,27 ± 0,01	20	
6,53 ± 0,01	50	$d_{(v,0.5)}$
12,25 ± 0,13	80	
16,81 ± 0,33	90	$d_{(v,0.9)}$

Anhand der bestimmten Verteilung wird deutlich, dass die suspendierten Partikel vergleichsweise geringe Durchmesser besitzen. 90% der Partikel sind kleiner als 16,8µm und 50% der Teilchen kleiner als 6,5µm. Für die Applikation von Jenacillin O2 Mega® wird in der Packungsbeilage eine relativ große 20G Nadel mit einem Kanülendurchmesser von 0,9mm empfohlen (Jenapharm AG; 2004). Diese Empfehlung beruht somit auf der im Vergleich zu anderen Formulierungen relativ hohen Viskosität $\eta_{(100s^{-1})}$ von 260mPas (siehe Kapitel III.1.2 Tabelle 17) und nicht auf der Partikelgröße, da diese bei Wirkstoffsuspensionen bis zu 1/3 des Kanüleninnendurchmessers betragen kann, ohne einen Verschluss der Kanüle während der Applikation befürchten zu müssen (Nash; 1991) (Floyd et al.; 1991) (Akers et al.; 1987).

III.4.2. Gefriertrocknung von BSA Lösungen und anschließende Zerkleinerung des Gefrierkuchens

Nach Stand der Technik werden rekombinante Proteine typischerweise durch Lyophilisation getrocknet. Als Ausgangmaterial für die Versuche zur Partikelgrößenreduktion wurden deshalb BSA Gefrierkuchen (GFK) gewählt und deren Verhalten bei verschiedenen Zerkleinerungsmethoden untersucht. Zum Einsatz kamen hochtouriges Rühren mittels Vortex® Kreisschüttler, Zerkleinerung durch den Hochleistungsdispergierer Ultra-Turrax® und Vermahlung mittels Mörsermühle. Als Zerkleinerungsgut wurde ein selbst hergestelltes BSA Lyophilisat verwendet, das eine identische Hilfsstoffzusammensetzung zu dem hGH Fertigprodukt Genotropin® 16 I.E. der Fa. Pharmacia besaß, welches später als Modellprotein bei in vitro und in vivo Freisetzungsversuchen verwendet wurde (vgl. Tabelle 29).

Tabelle 29: Zusammensetzung des Gefrierkuchens von Genotropin® 16 I.E.

Substanz	[mg]
hGH	5,30
Glycin	2,00
Mannitol	1,60
NaH_2PO_4 wasserfrei	0,29
Na_2HPO_4 wasserfrei	0,28

III.4.2.1. Partikelzerkleinerung mittels Kreisschüttler

Für die Erprobung der Partikelzerkleinerung mittels Kreisschüttler wurden in 10ml Injektionsflaschen jeweils 2g Ansätze mit Sesamöl und 100-400mg BSA Gefrierkuchen eingewogen. Die Formulierungen wurden auf maximaler Stufe bei 2500s^{-1} 5min bis 30min geschüttelt. Anschließend wurde die Partikelgrößenverteilung bestimmt. Das Ergebnis der Partikelgrößenbestimmungen ist in Tabelle 30 aufgeführt.

Tabelle 30: Partikelgrößenverteilung von 5%, 10% und 20% BSA Lyophilisat Ansätzen in Sesamöl nach Zerkleinerung mittels Kreisschüttler (Mittelwert ± Standardabweichung, n=3)

BSA Lyokuchen [%]	Zeit [min]	$d_{(v,0.5)}$ [µm]	$d_{(v,0.9)}$ [µm]
5	5	124,50 ± 5,82	310,57 ± 8,42
	10	110,88 ± 2,43	298,47 ± 5,37
	20	114,59 ± 2,95	295,73 ± 6,38
	30	90,80 ± 2,17	253,94 ± 7,23
10	5	104,04 ± 4,51	287,23 ± 10,36
	10	103,86 ± 2,83	302,05 ± 7,23
	20	103,49 ± 1,80	298,17 ± 6,01
	30	85,42 ± 1,26	253,72 ± 5,28
20	5	82,69 ± 2,93	258,51 ± 7,16
	10	75,40 ± 1,36	241,37 ± 5,44
	20	74,53 ± 2,42	240,70 ± 6,98
	30	71,21 ± 1,53	239,62 ± 10,08

Die Ergebnisse zeigen, dass durch den Einsatz des Kreisschüttlers die BSA Gefrierkuchen in überschaubarer Prozesszeit zerkleinert werden können. Mit zunehmender Einwirkdauer von 5min auf 30min kann für alle drei BSA Gehalte eine deutliche Abnahme der Partikelgrößen beobachtet werden. Es werden Partikelgrößen von kleiner 100µm bezogen auf den $d_{(v,0.5)}$ und Partikelgrößen um 250µm bezogen auf den $d_{(v,0.9)}$ erreicht. Die Erhöhung des BSA Anteils in der Formulierung führt im Vergleich zu den geringer konzentrierten Formulierungen zu kleineren Partikeln. Dieser Effekt wird vermutlich durch höhere Scherkräfte in der deutlich viskoseren 20% Formulierung hervorgerufen. Die mittels Kreisschüttler erzielbaren Partikelgrößenverteilungen liegen allerdings deutlich über den 16,77µm bezogen auf den $d_{(v,0.9)}$ des Handelsprodukts Jenacillin O2 Mega®. Dennoch können die mit dem Kreisschüttler hergestellten

Formulierungen aufgrund der erzielbaren Partikelgrößen grundsätzlich mit der für das Handelsprodukt empfohlenen 20G Kanülen appliziert werden, da sie den Richtwert von 1/3 des Kanülendurchmessers (0,9mm) unterschreiten und ein Verstopfen der Kanüle deshalb nicht zu erwarten ist. Bedingt durch die erhöhte Viskosität erscheinen die 20% BSA Formulierungen für die Applikation mit üblichen Nadeln aus der Sicht des Anwenders allerdings eher ungünstig.

III.4.2.2. Partikelzerkleinerung mittels Hochleistungsdispergierer

Als weitere Methode für die Zerkleinerung der BSA Gefrierkuchen wurde ein Ultra-Turrax® Hochleistungsdispergierer in Verbindung mit einem Dispergierwerkzeug der Spaltbreite 0,2mm eingesetzt. Analog zu Kapitel III.4.2.1 wurden 2g Ansätze aus Sesamöl und BSA Gefrierkuchen in variablen Anteilen eingewogen. Auf einen Zusatz von 20% BSA wurde aufgrund der hohen Viskosität der daraus resultierenden Formulierungen verzichtet. Um den Einfluss der Bearbeitungsintensität zu untersuchen, wurde die Drehzahl des Hochleistungsdispergierers in drei Stufen von $4000s^{-1}$ (Stufe 1) über $12000s^{-1}$ (Stufe 3) auf $20000s^{-1}$ (Stufe 5) verändert. Anschließend wurde die Partikelgrößenverteilung der verschiedenen Proben bestimmt (vgl. Tabelle 31).

Tabelle 31: Partikelgrößenverteilung von 5% und 10% BSA Lyophilisat Ansätzen in Sesamöl nach Zerkleinerung mittels Hochleistungsdispergierer (Mittelwert ± Standardabweichung, n=3)

BSA Lyokuchen [%]	Stufe	Zeit [min]	$d_{(v,0.5)}$ [µm]	$d_{(v,0.9)}$ [µm]
5	1	5	61,11 ± 1,85	163,71 ± 3,67
		10	51,05 ± 0,33	150,40 ± 3,13
		30	49,97 ± 0,36	142,38 ± 2,98
5	3	5	52,12 ± 0,99	155,20 ± 3,29
		10	50,75 ± 0,38	145,49 ± 2,75
		30	43,93 ± 0,40	127,87 ± 3,65
5	5	5	49,73 ± 0,44	151,68 ± 2,42
		10	39,94 ± 0,68	117,83 ± 4,07
		30	34,07 ± 0,48	90,19 ± 3,81
10	1	5	54,70 ± 0,46	145,20 ± 4,05
		10	44,28 ± 0,47	138,83 ± 3,33
		30	40,68 ± 0,30	124,46 ± 3,10
10	3	5	47,83 ± 0,58	146,84 ± 3,48
		10	42,30 ± 0,83	132,94 ± 3,74
		30	35,43 ± 0,24	101,34 ± 2,97
10	5	5	45,92 ± 0,86	139,49 ± 3,56
		10	41,50 ± 0,26	118,60 ± 2,70
		30	31,66 ± 0,15	79,38 ± 1,21

Anhand der Messerergebnisse der Tabelle 31 wird deutlich, dass durch den Einsatz des Hochleistungsdispergierers im Vergleich zum Kreisschüttler wesentlich kleinere Partikelgrößenverteilungen erreicht werden können. Nach 30min auf Stufe 5 werden für die 10% Lyophilisat Formulierung $d_{(v,0.9)}$ Werte von ca. 80µm, für die 5% Formulierung um 90µm erzielt. Analog können deutlich geringere $d_{(v,0.5)}$ Werte beobachtet werden. Der Effekt der Zerkleinerungsintensität und der Prozesszeit auf die erzielbaren Partikelgrößen wird aus den Messwerten ebenfalls gut erkennbar. Bei einer Steigerung der Zerkleinerungsintensität sinken die $d_{(v,0.5)}$/$d_{(v,0.9)}$ Werte bei jeweils 30 Minuten Bearbeitung von 49,97/142,38µm (Stufe 1) über 43,93/127,87µm (Stufe 3) auf 34,07/90,19µm (Stufe 5) bezogen auf die 5% BSA Formulierung. Deutlich ist auch die Abnahme der Partikelgröße bei Verlängerung der Zerkleinerungszeit zu beobach-

ten. Für die 5% BSA GFK Formulierung sinken die $d_{(v,0.5)}/d_{(v,0.9)}$ Werte von 49,73/151,68µm auf 34,07/90,19µm bei Steigerung der Prozesszeit von 5min auf 30min bei Stufe 5. Vergleichbare Tendenzen sind auch bei der 10% BSA GFK Formulierung zu beobachten. Insgesamt werden hier analog zu den Ergebnissen des Kreisschüttlers etwas niedrigere Partikelquerschnitte erzielt. Bei Stufe 5 und 30min Zerkleinerungszeit erreicht die 10% BSA Gefrierkuchen Formulierung $d_{(v,0.5)}/d_{(v,0.9)}$ Werte von 31,66/79,38µm im Vergleich zu 34,07/90,19µm der 5% BSA Lyophilisat Formulierung. Obwohl die Kennzahlen der erzielbaren Partikelgrössenverteilungen noch deutlich über den $d_{(v,0.5)}/d_{(v,0.9)}$ Vergleichswerten 6,52/16,77µm des Jenacillin O2 Mega® liegen, sollte dennoch eine Applikation mit üblichen Kanülengrößen ohne Probleme möglich sein.

III.4.2.3. Partikelzerkleinerung mittels Mörsermühle

Eine weitere Möglichkeit zur Partikelgrößenreduktion stellt die Behandlung des Lyophilisats mit der Mörsermühle dar. Maniar et al. konnten mit dieser Methode, basierend auf einem hGH Gefrierkuchen, Partikelgrößen um 100µm erzielen (Maniar et al.; 1992). Analog zu den vorherigen Versuchszweigen wurden jeweils 2g Ansätze aus Sesamöl und BSA Gefrierkuchen hergestellt und mittels Mörsermühle zerkleinert. Aufgrund der Ergebnisse der Partikelgrößenbestimmungen der übrigen Zerkleinerungsmethoden wurden in diesem Versuchszweig nur Ansätze mit 10% BSA Anteil erprobt. Die gesamte Prozessdauer wurde auf 120min ausgedehnt.

Anhand der Ergebnisse der Laserbeugungsuntersuchungen (Tabelle 32) kann man erkennen, dass die Zerkleinerung mittels Mörsermühle eine effektivere Methode darstellt, um in kurzer Zeit eine deutliche Partikelgrößenreduktion zu erreichen. Bereits nach 10min Prozesszeit werden $d_{(v,0.5)}/d_{(v,0.9)}$ Werte von 35,13/124,14µm erreicht. Eine Verlängerung der Prozesszeit führt zu einer weiteren Abnahme der Partikelgrößenverteilungen. Nach 30min werden mit der Mörsermühle $d_{(v,0.5)}/d_{(v,0.9)}$ Werte von 23,01/69,37µm, nach 60min Werte von 17,94/53,17µm erreicht. Eine weitere Verdoppelung der Bearbeitungszeit auf 120 Minuten führt dann allerdings zu keiner wesentlichen Verkleinerung mehr.

Tabelle 32: Partikelgrößenverteilungen von 10% BSA Lyophilisat Formulierungen in Sesamöl nach Zerkleinerung mittels Mörsermühle (Mittelwert ± Standardabweichung, n=3)

BSA Lyokuchen [%]	Zeit [min]	$d_{(v,0.5)}$ [µm]	$d_{(v,0.9)}$ [µm]
10	10	35,13 ± 0,18	124,14 ± 1,85
	30	23,01 ± 0,24	69,37 ± 1,49
	60	17,94 ± 0,20	53,17 ± 1,08
	120	16,90 ± 0,32	48,57 ± 1,10

Um zu bestimmen, ob der Zusatz viskositätserhöhender Hilfsstoffe einen Einfluss auf die erzielbaren Partikelgrößen besitzt, wurden verschiedene Matrices mit AlSt ALG V® und Rheopearl KL® untersucht. Nach jeweils 30min Zerkleinerungszeit wurde die Partikelgröße bestimmt.

Tabelle 33: Partikelgrößenverteilungen von 10% BSA Lyophilisat Formulierungen in verdicktem Sesamöl nach Zerkleinerung mittels Mörsermühle (Mittelwert ± Standardabweichung, n=3)

BSA Lyokuchen [%]	Zeit [min]	Matrix	$d_{(v,0.5)}$ [µm]	$d_{(v,0.9)}$ [µm]
10	30	1% AlSt ALG V® SO	39,55 ± 0,94	108,04 ± 3,44
		3% AlSt ALG V® SO	35,72 ± 0,35	105,11 ± 3,24
		5% AlSt ALG V® SO	35,16 ± 0,18	102,44 ± 1,52
10	30	1% Rheopearl KL® SO	33,36 ± 0,95	102,00 ± 3,42
		3% Rheopearl KL® SO	30,22 ± 0,79	86,38 ± 1,62
		5% Rheopearl KL® SO	33,25 ± 0,47	93,73 ± 1,99

Aus den Messergebnissen der Tabelle 33 wird deutlich, dass der Zusatz viskositätserhöhender Hilfsstoffe zu einem Anstieg der Partikelgröße gegenüber den $d_{(v,0.5)}$/$d_{(v,0.9)}$ Werten von 23,01/69,37µm der reinen SO Formulierung (Tabelle 32, 30min 10% BSA Lyophilisat in SO) führt. Der für die Applikation durch dünne Injektionskanülen wichtige $d_{(v,0.9)}$ liegt mit Werten im Bereich von 85-100µm im unkritischen Bereich. Ein Verschluss der Kanüle bei Applikation von Formulierungen mit Partikeln im Bereich von 100µm ist für 20G Injektionskanülen mit 0,9mm Durchmesser nicht zu erwarten. Die Zerkleinerungsmethode mittels Mörsermühle ist somit auch für die Partikelgrößenreduktion in den viskoseren Grundlagen der verdickten Öle gut geeignet.

III.4.3. Sprühtrocknung konzentrierter BSA Lösungen

Eine Alternative zur Herstellung feiner Proteinpulver durch Lyophilisation und nachgeschalteter Mahlung stellt die Methode der Sprühtrocknung dar. Hierbei werden in einem einzigen Prozess direkt die fertigen Haufwerke erhalten. Bei der Sprühtrocknung werden Wirkstofflösungen unter Druck fein zerstäubt und im warmen Luftstrom unmittelbar zu Pulvern getrocknet. In Abhängigkeit der Zusammensetzung der Wirkstofflösung, der Düsenkonfiguration, des Zerstäubungsdruck und der Speiserate können Pulver verschiedener Partikelgrößenverteilungen hergestellt werden. Erfahrungsgemäß liegen die Partikelgrößenverteilungen der mittels Sprühtrocknung erhaltener Pulver im unteren µm Bereich (Lee; 2002) (Maa et al.; 2000) (Broadhead et al.; 1992).

Um zu ermitteln, ob das Verfahren der Sprühtrocknung für die Herstellung von Pulvern zur Suspension in öligen Trägern geeignet ist, wurde eine Reihe von Versuchen mit einem Büchi Mini Sprühtrockner B290 durchgeführt. Zielsetzung dieser Versuche war es zu ermitteln, ob durch Variation der BSA Konzentration bei konstantem Zerstäuberluftstrom (670 l/min) und bei konstanter Lösungszufuhr (6ml/min) neben sehr kleinen Partikelgrößen auch Pulverteilchen mit Querschnitten im mittleren µm Bereich erhalten werden können. Da durch letztere eine verlangsamte Wirkstofffreisetzung im Vergleich zu Partikeln mit kleineren Querschnitten erzielt werden könnte.

In Tabelle 34 ist das Ergebnis der Untersuchung der Partikelgröße der verschiedenen sprühgetrockneten BSA Lösungen aufgeführt.

Tabelle 34: Partikelgrößenverteilung sprühgetrockneter BSA Pulver (Mittelwert ± Standardabweichung, n=3)

BSA [% (w/w)]	$d_{(v,0.5)}$ [µm]	$d_{(v,0.9)}$ [µm]
5	5,05 ± 1,25	7,95 ± 1,20
7,5	5,73 ± 1,87	9,40 ± 1,43
10	7,91 ± 1,46	15,61 ± 1,51
15	10,12 ± 1,27	21,39 ± 1,49
20	12,37 ± 1,53	27,15 ± 1,55
30	15,97 ± 1,46	28,98 ± 1,31

Anhand der Ergebnisse der Partikelgrößenbestimmungen wird deutlich, dass sowohl $d_{(v,0.5)}$ als auch $d_{(v,0.9)}$ mit steigender Proteinkonzentration deutlich zunehmen. Lösungen mit mehr als 30% BSA konnten aufgrund zu hoher Viskosität nicht mehr kontrolliert zerstäubt werden und waren deshalb für die Sprühtrocknung grundsätzlich nicht geeignet. Im Vergleich zu den oben beschriebenen Verfahren zur Zerkleinerung von Lyophilisaten können durch Einsatz des Sprühtrockners leicht Partikelgrößen im Bereich der Vergleichswerte von Jenacillin O2 Mega® hergestellt werden. Die Untersuchung der Morphologie der sprühgetrockneten BSA Partikel im Lichtmikroskop (siehe Abbildung 29) zeigt, dass die sprühgetrockneten Partikel nicht aus festen soliden Partikeln, sondern aus Gemischen kleinerer und größer vorwiegend hohler Pulverteilchen bestehen, die im Gegenlicht des Mikroskops transparent erscheinen.

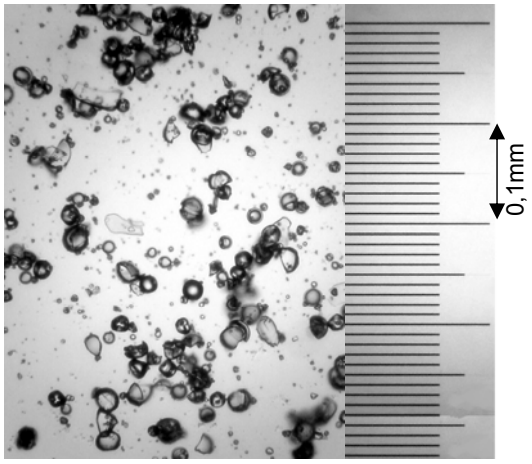


Abbildung 29: Mikroskopische Aufnahme sprühgetrockneter BSA Partikel

III.4.4. Fazit der Partikelzerkleinerung

In den vorangegangenen Teilkapiteln wurden verschiedene Methoden zur Herstellung von Proteinpulvern mit definierten Partikelgrößenverteilungen untersucht. Als Richtgröße der anzustrebenden Partikelgrößenverteilung diente die Untersuchung eines kommerziell erhältlichen Fertigarzneimittels und dessen für die Applikation empfohlene Kanülengröße, welche einen Rückschluss auf die maximal applizierbare Partikelgrößen ermöglicht.

Von den drei untersuchten Methoden zur Partikelzerkleinerung Vortex® Kreisschüttler, Ultra-Turrax® Hochleistungsdispergierer und Mörsermühle stellen die beiden letztgenannten effektive Methoden zur Reduktion der Partikelgröße dar. Bei der Methode mit der Mörsermühle wird der Gefrierkuchen durch Druck und Reibung zwischen den Werkzeugen fein vermahlen. In vergleichsweise kurzer Prozesszeit werden Partikelgrößen deutlich unter 100µm erreicht (vgl. Tabelle 32; 30min Zerkleine-

rung, 10% BSA GFK: $d_{(v,0.5)}/d_{(v,0.9)}$ ca. 23/70µm, 60min Zerkleinerung: $d_{(v,0.5)}/d_{(v,0.9)}$ ca. 18/53µm). Formulierungen höherer Viskosität führen zu einem leichten Anstieg der erzielbaren Partikelquerschnitte (vgl. Tabelle 33: 30min Zerkleinerung, 10% BSA GFK: $d_{(v,0.5)}/d_{(v,0.9)}$ ca. 30-40µm/86-108µm). Wirkstoffsuspensionen mit Partikeln dieser Größenordnung sind durch übliche Kanülengrößen problemlos applizierbar. Weitere Vorteile dieser Methode stellen die einfache Anpassung an unterschiedliche Ansatzgrößen und der methodenbedingt nur geringe Verlust an Wirkstoff und Formulierung dar.

Auch mit dem Hochleistungsdispergierer können die Gefrierkuchen in kurzer Prozesszeit durch Schlag und Prall effektiv zerkleinert werden (vgl. Tabelle 31: 10min Zerkleinerung, Stufe 5, 10% BSA GFK: $d_{(v,0.5)}/d_{(v,0.9)}$ ca. 42/119µm, 30min Zerkleinerung: $d_{(v,0.5)}$ / $d_{(v,0.9)}$ ca. 32/80µm). Die erzielbaren Partikelverteilungen liegen im Vergleich zur Mörsermühle etwas höher. Der Verlust an Wirkstoff und Formulierung ist im Vergleich zur Mörsermühle durch Anhaften von Resten innerhalb des Dispergierwerkzeugs deutlich größer. Insbesondere bei kleineren Ansatzgrößen mit Verum Probe ist dies von essentieller Bedeutung.

Der Einsatz des Kreisschüttlers führt zu Partikelgrößenverteilungen, die im Vergleich zu den beiden anderen Methoden wesentlich größer sind (vgl. Tabelle 30: 10min Zerkleinerung, 10% BSA GFK: $d_{(v,0.5)}/d_{(v,0.9)}$ ca. 103/302µm, 30min Zerkleinerung: $d_{(v,0.5)}/d_{(v,0.9)}$ ca. 85/253µm). Insbesondere der $d_{(v,0.9)}$ nimmt im Vergleich zu den anderen Zerkleinerungsmethoden deutlich zu und könnte zu Kanülenverschlüssen während der Applikation führen.

Aus produktionstechnischer Sicht besitzen alle drei beschriebenen Methoden zur Zerkleinerung des Gefrierkuchens den Vorteil der direkten Aufbereitung in der Endmatrix, die unmittelbar zu der gebrauchsfertigen Formulierung führt.

Alternativ können feine Pulverpartikel durch Sprühtrocknung von Proteinlösungen erzielt werden. Die Größenbestimmungen zeigen, dass durch Variation der Proteinkonzentration der Sprühlösung die Partikelgrößenverteilung in den resultierenden Pulvern einfach in den Bereichen von 5-16µm bezogen auf den $d_{(v,0.5)}$ bzw. von 8-29µm bezogen auf den $d_{(v,0.9)}$ gesteuert werden kann. Ein Nachteil an dem Verfahren der Sprühtrocknung stellt der im Vergleich zur Gefriertrocknung höhere Wirkstoffverlust dar, da ein Teil der versprühten Proteinlösung systembedingt im Trocknungsluftstrom verloren geht. Nach der Herstellung der Proteinpulver durch Sprühtrock-

nung wäre analog zur Zerkleinerung der Gefrierkuchen ein nachgeschalteter Dispergierungsschritt notwendig, um die fertige Formulierung zu gewinnen.

Aufgrund der beschriebenen Vorteile erscheint deshalb die Abfolge Gefriertrocknung mit anschließender Zerkleinerung des Lyophilisats durch die Mörsermühle in der Endmatrix am besten geeignet, um applikationsfertige Formulierungen mit angemessener Partikelgröße bei geringem verfahrensbedingtem Substanzverlust zu erhalten.

III.5. Rheologische Eigenschaften der Grundlagen

In Kapitel III.3 wurde die physikalische Beständigkeit verschiedener hilfsstoffhaltiger Formulierungen untersucht und stabile Kombinationen für die weiteren Versuche ausgewählt. In dem folgenden Kapitel sollen Zubereitungen mit den ausgewählten Verdickungsmitteln rheologisch charakterisiert werden. Weiter soll ermittelt werden, welchen Einfluss die in Kapitel III.4 empfohlene Methode zur Zerkleinerung und Einarbeitung des Wirkstoffs auf die viskosimetrischen Eigenschaften der Formulierungen besitzt und ob die gescherten Formulierungen ihre Eigenschaften während einer Einlagerung bei Raumtemperatur verändern.

Um den Einfluss der ausgewählten Methode zur Zerkleinerung des Gefrierkuchens auf die Formulierungen bestimmen zu können, wurden Miglyol 812 und Sesamöl mit 1 bis 5% AlSt ALG V® und Rheopearl KL® als Grundlagen hergestellt. Von den nicht gescherten Zubereitungen wurde für die Bestimmung der Ausgangseigenschaften jeweils eine Nullprobe vermessen. Die Zubereitungen wurden dann 30min mit der Mörsermühle bearbeitet und anschließend bei 25°C eingelagert. In regelmäßigen Abständen wurden diese mit dem Rheometer weiter untersucht. Als rheologische Messmethoden wurden zum einen die Fliesskurve bestimmt und die Viskosität der Scherrate $100s^{-1}$ $\eta_{(100s^{-1})}$ als charakteristische Kenngröße herangezogen (Tabelle 35 und Tabelle 36). Zum anderen wurde in oszillatorischen Untersuchungen anhand des Schnittpunkts der Kurven des Speichermoduls G´ und Verlustmoduls G´´ die Mindestschubspannung $\tau_{(G´=G´´)}$ als zweite charakteristische Kenngröße ermittelt. Oberhalb dieser Schubspannung besitzen die Formulierungen Flüssigkeitscharakter, beginnen zu fließen und können injiziert werden (Tabelle 37 und Tabelle 38).

Tabelle 35: Viskosität $\eta_{(100s^{-1})}$ von Miglyol 812 und Sesamöl verdickt mit 1-5% AlSt ALG V® ungeschert, sowie nach Scherung mit der Mörsermühle und Lagerung bei RT nach 1, 5, 12 und 18 Wochen (Mittelwert ± Standardabweichung, n=3)

Formulierung	Viskosität $\eta_{(100s^{-1})}$ [mPas]				
	ungeschert w0 25°C	geschert w1 25°C	geschert w5 25°C	geschert w12 25°C	geschert w18 25°C
AlSt ALG V® 1% Miglyol 812	56,3 ± 0,5	46,8 ± 1,0	44,1 ± 2,2	44,8 ± 0,8	47,7 ± 1,2
AlSt ALG V® 2% Miglyol 812	113,5 ± 0,5	80,7 ± 1,2	80,8 ± 1,3	86,3 ± 1,7	81,3 ± 1,3
AlSt ALG V® 3% Miglyol 812	219,5 ± 3,3	143,5 ± 2,5	142,5 ± 1,6	154,1 ± 1,9	150,7 ± 2,4
AlSt ALG V® 4% Miglyol 812	336,5 ± 4,5	246,0 ± 1,0	247,5 ± 3,5	248,6 ± 2,6	281,0 ± 2,6
AlSt ALG V® 5% Miglyol 812	653,0 ± 4,3	304,5 ± 3,9	344,0 ± 2,8	519,0 ± 3,7	521,5 ± 4,1
AlSt ALG V ®1% Sesamöl	116,5 ± 0,5	96,2 ± 2,1	98,7 ± 2,6	112,2 ± 1,3	111,3 ± 1,5
AlSt ALG V® 2% Sesamöl	303,1 ± 2,9	200,0 ± 1,3	204 ± 2,8	191,1 ± 1,4	190,3 ± 1,9
AlSt ALG V® 3% Sesamöl	411,5 ± 4,1	274,0 ± 3,2	283,0 ± 3,6	281,1 ± 2,7	296,6 ± 3,2
AlSt ALG V® 4% Sesamöl	524,2 ± 5,3	290,0 ± 3,5	300,7 ± 2,6	311,2 ± 3,3	321,1 ± 4,1
AlSt ALG V® 5% Sesamöl	772,7 ± 8,5	498,1 ± 2,9	482,1 ± 3,1	521,2 ± 4,5	543,1 ± 4,9

Anhand der Messergebnisse aus Tabelle 35 kann man erkennen, dass 30min Scherung mit der Mörsermühle zu einer deutlichen Reduktion der Viskosität im Vergleich zu den ungescherten Formulierungen führt. Bei höheren Hilfsstoffanteilen ist dieser Effekt stärker ausgeprägt. Die Erklärung dieser deutlichen Abnahme der Viskosität ist im Herstellungsverfahren zu suchen: Bei der Zubereitung der Oleogele werden die Verdickungsmittel direkt in den erhitzen Ölen aufgeschmolzen und können dann beim Erkalten in den ungerührten Formulierungen ideale Gele ausbilden. Durch die Scherung mit der Mörsermühle werden diese Strukturen stark beeinträchtigt. Im Verlauf der Beobachtungszeit bleibt die $\eta_{(100s^{-1})}$ bei den Miglyol 812 und Sesamöl Formulierungen mit 1 und 2% AlSt sowie Miglyol 812 mit 3% AlSt relativ konstant. Diese Ansätze mit den vergleichsweise niedrigen Verdickungsmittelanteilen werden durch die Scherung mittels Mörsermühle irreversibel verändert. Hingegen steigt bei

den Miglyol 812 und Sesamöl Formulierungen mit 4 und 5% AlSt ALG V® und der Zubereitung aus Sesamöl mit 3% AlSt die Viskosität während der Einlagerung im zeitlichen Ablauf wieder verhalten an.

Die Viskosität von ca. 260mPas des Handelsprodukts Jenacillin O2 Mega® (vgl. Kapitel III.1.2) wird bei den gescherten Formulierungen von AlSt ALG V® in Miglyol 812 bei einem Anteil von ca. 4% erreicht, bei den Formulierungen mit Sesamöl bei ca. 3%.

Tabelle 36: Viskosität $\eta_{(100s^{-1})}$ von Miglyol 812 und Sesamöl verdickt mit 1-5% Rheopearl KL® ungeschert, sowie nach Scherung mit der Mörsermühle und Lagerung bei RT nach 1, 5, 12 und 18 Wochen (Mittelwert ± Standardabweichung, n=3)

Formulierung	Viskosität $\eta_{(100s^{-1})}$ [mPas]				
	ungeschert w0 25°C	geschert w1 25°C	geschert w5 25°C	geschert w12 25°C	geschert w18 25°C
Rheopearl KL® 1% Miglyol 812	62,5 ± 0,9	38,0 ± 0,7	40,7 ± 0,8	43,8 ± 0,8	42,2 ± 1,0
Rheopearl KL® 2% Miglyol 812	108,0 ± 2,0	57,9 ± 1,0	56,0 ± 1,3	61,7 ± 0,7	60,1 ± 1,9
Rheopearl KL® 3% Miglyol 812	344,0 ± 1,0	136,5 ± 1,5	136,5 ± 0,7	135,3 ± 1,3	142,5 ± 1,8
Rheopearl KL® 4% Miglyol 812	527,5 ± 3,6	224,3 ± 3,9	216,5 ± 3,5	239,1 ± 3,1	212,2 ± 2,1
Rheopearl KL® 5% Miglyol 812	1002,0 ± 19,2	440,5 ± 10,5	442,5 ± 17,5	447,0 ± 11,2	474,0 ± 9,8
Rheopearl KL® 1% Sesamöl	116,3 ± 3,4	89,0 ± 0,6	90,6 ± 0,5	97,2 ± 0,8	95,6 ± 0,7
Rheopearl KL® 2% Sesamöl	191,7 ± 1,6	119,0 ± 1,0	121,0 ± 0,3	125,3 ± 1,6	127,2 ± 1,8
Rheopearl KL® 3% Sesamöl	524,2 ± 4,1	229,1 ± 2,3	231,1 ± 3,6	233,3 ± 3,2	239,1 ± 2,8
Rheopearl KL® 4% Sesamöl	846,2 ± 9,8	370,1 ± 8,2	328,5 ± 6,3	325,3 ± 5,1	349,8 ± 6,2
Rheopearl KL® 5% Sesamöl	1235,1 ± 20,7	581,2 ± 6,1	565,2 ± 5,1	521,2 ± 4,1	589,2 ± 6,3

Analog zu den Formulierungen mit AlSt ALG V® kann auch bei den Formulierungen mit Rheopearl KL® eine deutliche Abnahme der Viskosität nach der Behandlung mit der Mörsermühle beobachtet werden. Ein signifikanter Wiederanstieg der Viskosität im Verlauf der Lagerung ist bei Rheopearl KL® haltigen Grundlagen im Vergleich zu

AlSt ALG V® nicht zu erkennen. Die Vergleichsviskosität des Fertigarzneimittels wird oberhalb von 4% für die gescherten Miglyol 812 Formulierungen und zwischen 3 und 4% für die Sesamölansätzen erreicht.

Um Veränderungen während der Lagerung der gescherten Systeme besser abbilden zu können, wurden zusätzlich oszillatorische Messungen durchgeführt und die Mindestschubspannung $\tau_{(G'=G'')}$ der Formulierungen bestimmt. Die Mindestschubspannung ist eine Kenngröße für Formulierungen die in ungeschertem Zustand Feststoffcharakter besitzen (Speichermodul G´ > Verlustmodul G´´), diesen aber unter Scherung verlieren und Flüssigkeitseigenschaften annehmen (Verlustmodul G´´> Speichermodul G´) (vgl. Tabelle 37 und Tabelle 38).

Tabelle 37: Schubspannung $\tau_{(G'=G'')}$ von Miglyol 812 und Sesamöl verdickt mit 1-5% AlSt ALG V® ungeschert, sowie nach Scherung mit der Mörsermühle und Lagerung bei RT nach 1, 5, 12 und 18 Wochen (Mittelwert ± Standardabweichung, n=3)

Formulierung	Mindestschubspannung $\tau_{(G'=G'')}$ [Pa]				
	ungeschert w0 25°C	geschert w1 25°C	Geschert w5 25°C	Geschert w12 25°C	geschert w18 25°C
AlSt ALG V® 1% Miglyol 812	G´´>G´	G´´>G´	G´´>G´	G´´>G´	G´´>G´
AlSt ALG V® 2% Miglyol 812	1,9 ± 0,1	0,6 ± 0,01	1,2 ± 0,03	1,3 ± 0,07	1,0 ± 0,09
AlSt ALG V® 3% Miglyol 812	12,9 ± 0,5	2,1 ± 0,2	2,7 ± 0,17	2,6 ± 0,08	2,8 ± 0,12
AlSt ALG V® 4% Miglyol 812	28,1 ± 1,1	4,7 ± 0,1	4,6 ± 0,2	5,6 ± 0,04	5,4 ± 0,1
AlSt ALG V® 5% Miglyol 812	69,6 ± 2,1	6,5 ± 0,3	9,0 ± 0,2	9,1 ± 0,5	9,0 ± 0,3
AlSt ALG V ®1% Sesamöl	0,2 ± 0,02	G´´>G´	G´´>G´	G´´>G´	G´´>G´
AlSt ALG V® 2% Sesamöl	7,5 ± 0,2	2,5 ± 0,07	3,0 ± 0,1	2,9 ± 0,05	3,0 ± 0,1
AlSt ALG V® 3% Sesamöl	30,3 ± 1,3	3,3 ± 0,1	6,5 ± 0,2	4,8 ± 0,1	3,3 ± 0,1
AlSt ALG V® 4% Sesamöl	40,0 ± 1,3	4,8 ± 0,1	5,5 ± 0,2	5,0 ± 0,1	5,0 ± 0,2
AlSt ALG V® 5% Sesamöl	74,9 ± 2,1	12,8 ± 0,7	14,6 ± 0,4	12,3 ± 0,2	11,4 ± 0,4

Analog zu den Ergebnissen der Bestimmung der Fliesskurve ist zu erkennen, dass durch die Scherung die Gelstruktur der Formulierungen stark verändert wird. Im Vergleich zu den ungescherten Formulierungen nimmt die Mindestschubspannung $\tau_{(G'=G'')}$ deutlich ab und bleibt auch während der Einlagerung bei 25°C über den Beobachtungszeitraum konstant auf niedrigem Niveau. Im Vergleich zu den ungescherten Formulierungen muss auf die Formulierungen wesentlich weniger Scherstress ausgeübt werden, bis diese zu fließen beginnen. Ein deutlicher Wiederanstieg der Mindestschubspannung während der Einlagerung ist für keine Formulierung zu erkennen. Dies deutet darauf hin, dass eine irreversible und dauerhafte Zerstörung des Anteils der festen Gelstrukturen stattgefunden hat.

Tabelle 38: Schubspannung $\tau_{(G'=G'')}$ von Miglyol 812 und Sesamöl verdickt mit 1-5% Rheopearl KL® ungeschert, sowie nach Scherung mit der Mörsermühle und Lagerung bei RT nach 1, 5, 12 und 18 Wochen (Mittelwert ± Standardabweichung, n=3)

Formulierung	Mindestschubspannung $\tau_{(G'=G'')}$ [Pa]				
	ungeschert w0 25°C	geschert w1 25°C	geschert w5 25°C	geschert w12 25°C	geschert w18 25°C
Rheopearl KL® 1% Miglyol 812	0,3 ± 0,005	G´´>G´	G´´>G´	G´´>G´	G´´>G´
Rheopearl KL® 2% Miglyol 812	0,7 ± 0,05	0,2 ± 0,04	0,1 ± 0,02	0,1 ± 0,01	0,2 ± 0,03
Rheopearl KL® 3% Miglyol 812	19,2 ± 0,2	2,8 ± 0,10	1,9 ± 0,07	1,9 ± 0,04	1,4 ± 0,02
Rheopearl KL® 4% Miglyol 812	41,5 ± 0,9	4,2 ± 0,2	3,7 ± 0,2	4,2 ± 0,04	4,3 ± 0,1
Rheopearl KL® 5% Miglyol 812	110,8 ± 2,1	12,5 ± 0,3	14,7 ± 0,6	15,1 ± 0,3	14,4 ± 0,3
Rheopearl KL® 1% Sesamöl	3,0 ± 0,1	0,1 ± 0,02	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,03	0,3 ± 0,05
Rheopearl KL® 2% Sesamöl	2,5 ± 0,2	0,8 ± 0,07	0,7 ± 0,07	0,4 ± 0,01	0,4 ± 0,02
Rheopearl KL® 3% Sesamöl	28,6 ± 1,8	4,7 ± 0,3	4,3 ± 0,2	4,1 ± 0,1	3,4 ± 0,09
Rheopearl KL® 4% Sesamöl	57,4 ± 1,2	8,4 ± 0,3	7,2 ± 0,8	7,9 ± 0,5	7,1 ± 0,4
Rheopearl KL® 5% Sesamöl	113,9 ± 1,9	17,1 ± 0,6	17,9 ± 1,0	19,5 ± 0,8	17,4 ± 0,6

Auch bei den Ansätzen mit Rheopearl KL® kann ein starkes Absinken der $\tau_{(G'=G'')}$ Werte in Folge der Scherung mittels Mörsermühle beobachtet werden. Während des Beobachtungszeitraums bleiben auch die $\tau_{(G'=G'')}$ Werte nach Scherung relativ konstant. Eine Wiederherstellung der festen Gelkomponenten kann ebenfalls nicht beobachtet werden.

Zusammenfassend kann aus den rheologischen Untersuchungen der gescherten Formulierungen geschlossen werden, dass die Behandlung mit der Mörsermühle zu einer deutlichen Veränderung der Viskosität $\eta_{(100s^{-1})}$ und der Mindestschubspannung $\tau_{(G'=G'')}$ im Vergleich zu den ungescherten Formulierungen führt. Da die Mindestschubspannung $\tau_{(G'=G'')}$ während des Beobachtungszeitraums relativ gleichmäßig auf dem jeweils neu gewonnenen Niveau verharrt, kann auf eine dauerhafte Beeinträchtigung der festen Gelanteile geschlossen werden. Im zeitlichen Verlauf der $\eta_{(100s^{-1})}$ Werte kann bei den Formulierungen mit höheren Anteilen an AlSt ALG V® eine gewisse Restrukturierung des flüssigen Gelanteils beobachtet werden. Für die Applikation durch dünne Kanülen könnte dieser Anstieg von Nachteil sein. Somit erscheinen die Formulierungen mit AlSt ALG V® und Rheopearl KL® in Anteilen von 1-4% in Miglyol 812 und 1-3% in Sesamöl für die weitere Untersuchung der in vitro Wirkstofffreisetzung besonders geeignet.

III.6. Untersuchung der Wasseraufnahme verdickter Grundlagen

In Kapitel III.1.3 wurde die Wasseraufnahme der reinen Öle während der Einlagerung über physiologischem Phosphatpuffer (PBS) untersucht. Mit dem vorliegenden Versuchszweig sollte untersucht werden, ob sich die Wasseraufnahme der Grundlagen bedingt durch den Zusatz von Verdickungsmitteln verändert. Idealerweise sollte diese möglichst niedrig liegen, um eine vorzeitige Degradation des suspendierten Proteins nach der Applikation in vivo durch in das Depot aufgenommene Gewebsflüssigkeit zu verhindern (Heintz et al.; 2001).

Für die Bestimmung der Wasseraufnahme wurden Ansätze von Miglyol 812 und Sesamöl mit den Verdickungsmitteln in 1-5% Anteilen hergestellt. Anschließend wurden jeweils 1g Formulierung in ein 20ml Injektionsglas mit 10ml PBS gegeben und bei 37°C über 4 Wochen eingelagert. Nach Ende der Einlagerung wurden die auf der Oberfläche schwimmenden Formulierungen mit einem Spatel entnommen und oberflächlich mitgeschlepptes Restwasser durch Zentrifugation abgetrennt. Der Wassergehalt der Proben wurde analog zu Kapitel III.1.3 mittels Karl-Fischer Titration

bestimmt (Tabelle 39). Da bei einer Reihe von Formulierungen der bei Probenzug mitgeführte Restpuffer nicht vollständig durch Zentrifugation separiert werden konnte, waren für diese keine reproduzierbaren Werte bestimmbar.

Tabelle 39: Wassergehalt verschiedener Formulierungen nach 4 Wochen Einlagerung bei 37°C über physiologischem Phosphatpuffer (Mittelwert ± Standardabweichung, n=3) (n.d. = nicht bestimmbar)

Formulierung	Wassergehalt [%] w4, PBS, 37°C	Formulierung	Wassergehalt [%] w4, PBS, 37°C
Miglyol 812	0,120 ± 0,003	Sesamöl	0,051 ± 0,009
AlSt ALG V® 1% Miglyol 812	n.d.	AlSt ALG V ®1% Sesamöl	0,077 ± 0,016
AlSt ALG V® 2% Miglyol 812	0,900 ± 0,160	AlSt ALG V® 2% Sesamöl	0,198 ± 0,068
AlSt ALG V® 3% Miglyol 812	0,852 ± 0,136	AlSt ALG V® 3% Sesamöl	0,351 ± 0,013
AlSt ALG V® 4% Miglyol 812	1,710 ± 0,348	AlSt ALG V® 4% Sesamöl	1,438 ± 0,087
AlSt ALG V® 5% Miglyol 812	1,620 ± 0,105	AlSt ALG V® 5% Sesamöl	1,530 ± 0,148
Rheopearl KL® 1% Miglyol 812	n.d.	Rheopearl KL® 1% Sesamöl	0,089 ± 0,001
Rheopearl KL® 2% Miglyol 812	n.d.	Rheopearl KL® 2% Sesamöl	0,154 ± 0,026
Rheopearl KL® 3% Miglyol 812	0,347 ± 0,008	Rheopearl KL® 3% Sesamöl	0,086 ± 0,027
Rheopearl KL® 4% Miglyol 812	n.d.	Rheopearl KL® 4% Sesamöl	n.d.
Rheopearl KL® 5% Miglyol 812	n.d.	Rheopearl KL® 5% Sesamöl	n.d.

Die Ergebnisse zeigen, dass nach dem Zusatz von AlSt ALG V® und Rheopearl KL® die Wasseraufnahme im Vergleich zu den nativen Ölen (vgl. auch Kapitel III.1.3 Tabelle 19) ansteigt. Mit höheren Anteilen an AlSt nimmt ebenfalls die Wasseraufnahme zu. Für Rheopearl KL® konnten aufgrund der oben beschriebenen Problemstellung nur relativ wenige Ansätze vermessen werden. Die erhaltenen Messwerte deuten nur auf eine geringe Zunahme des Wassergehalts hin. Mit Maximalwerten bis ca. 2% bei AlSt ALG V® liegen die Werte in einem Bereich, der von verschiedenen

Autoren als für die Gewährleistung der Lagerstabilität von Proteinen als tolerabel angesehen wird, z.B. hGH (Berry et al.; 2000), bST (Jeng et al.; 2001) (Mitchell; 1992). Auch unter diesem Gesichtspunkt können deshalb die Formulierungen mit AlSt ALG V® und Rheopearl KL® für die weiteren Versuche der vorliegenden Arbeit empfohlen werden.

III.7. In vitro und in vivo Freisetzungsversuche

III.7.1. In vitro Testsystem

In Kapitel I.3 der vorliegenden Arbeit wurde der Aufbau verschiedener in vitro Testsysteme für parenterale Arzneiformen vorgestellt. Von vielen Autoren wurde einerseits das Fehlen eines offiziell anerkannten und allgemein verbindlichen Testsystems bemängelt, da die Vielzahl der angewendeten Testsysteme einen Vergleich der Freisetzungsdaten untereinander deutlich erschwert. Andererseits wurde aufgrund der stark variierenden physikalischen und chemischen Eigenschaften der unterschiedlichen Depotsysteme grundsätzlich hinterfragt, ob jemals ein allgemein verbindlicher Testaufbau möglich sein wird (Burgess et al.; 2004) (Siewert et al.; 2003).

Im Rahmen der Überlegungen für den Entwurf des in vitro Freisetzungssystems dieser Arbeit entstand eine Reihe von Kontakten zu anerkannten Autoren auf dem Gebiet der Depotformulierungen. Diese bemängelten ebenso die Problematik des nichtexistenten verbindlichen in vitro Testsystems: „There is no current right or wrong way (…). Everybody in this area is debating the best way to perform such tests on protein containing injections and no one has the ultimate answer." (Rathbone; 2002). Andererseits ergaben sich auch interessante Gesichtspunkte, welche Einfluss auf die weiteren Planungen nahmen: „The surface area of the depot formulation exposed to the dissolution medium is very critical for the evaluation of such type drug delivery systems. (…) The surface area of the depot formulation exposed to body fluid (…) can be estimated by assuming that the depot will stay in a spherical shape after administered (…)" (Sun; 2002).

Um einerseits eine realitätsnahe Dimensionierung des in vitro Testsystems gewährleisten zu können und andererseits einen späteren Vergleich der in vitro erzielten Freisetzungsdaten mit den Ergebnissen der in vivo Versuche möglich zu machen, wurde der oben beschriebene Ansatz von Y. Sun zur Abschätzung der Grenzfläche zwischen Depotformulierung und Freisetzungsmedium auf das Design des in vitro Testsystems angewendet. Für die praktische Durchführung wurden Injektionsfläsch-

chen mit unterschiedlichen Innendurchmessern verwendet. In diesen wurde wässriges Freisetzungsmedium mit ölhaltigen Formulierungen überschichtet. Aufgrund der niedrigeren Dichte bildeten die öligen Formulierungen auf der Oberfläche des Freisetzungsmediums eine gleichmäßige Schicht, die durch den Innendurchmesser des Vials exakt begrenzt wurde. Durch die Auswahl verschiedener Injektionsfläschchen konnte die Grenzfläche zwischen Formulierung und Freisetzungsmedium gezielt so gesteuert werden, dass diese unter der Annahme einer sphärischen Ausbildung des injizierten Depots mit dessen Oberfläche korrelierte.

Für die ersten in vitro Versuche wurden 22R Injektionsvials mit einem Innenradius von 1,45cm verwendet. Anhand der Formel

$$\textit{Querschnittsfläche Vial} = (\textit{Innenradius Vial})^2\,\pi$$

kann aus dem Innenradius des Vials die Grenzfläche zwischen Formulierung und Freisetzungsmedium berechnet werden.

Über die Formel

$$\textit{Kugelvolumen} = \frac{1}{6}\,\pi\,(\textit{Innenradius Vial})^3$$

kann nun das Volumen eines oberflächengleichen sphärischen Depots entsprechend dem jeweiligen Injektionsvolumen berechnet werden.

Die Querschnittsfläche eines 22R Vials mit 1,45cm Innenradius ist somit oberflächengleich zu einem Kugelvolumen von 1,6ml, welches gut im Idealbereich von kleiner 2ml für s.c. und i.m. Injektionen zur Anwendung am Menschen liegt (vgl. Kapitel I.2.1 Tabelle 4).

In den späteren in vitro Versuchen, die parallel zu den in vivo Untersuchungen durchgeführt wurden, wurden kleinere 2R Fläschchen verwendet, da diese mit einem Innenradius von 0,7cm und einer Querschnittsfläche von 1,54cm^2 der 1,65cm^2 großen Oberfläche eines sphärischen Depots mit einem Volumen von 0,2ml, entsprechend dem Injektionsvolumen der in vivo Versuche, am nächsten kamen.

III.7.2. In vitro BSA Freisetzungsversuche

Für die ersten orientierenden in vitro Freisetzungsversuche wurde als Modellprotein bovines Serum Albumin der Partikelgrößenklasse 45-63µm nach Siebung verwendet. Die Bestimmung der Partikelgrößenverteilung mit der Laserlichtstreuung ergab für die verwendete BSA Siebfraktion einen $d_{(v,0.5)}$ Wert von 42,27µm und einen $d_{(v,0.9)}$ Wert von 85,45µm. Das in vitro Freisetzungsverhalten der untersuchten BSA Sus-

pensionen wurde nach dem in Kapitel II.2.9 dargestellten Vorgehen bestimmt. Der BSA Gehalt der erhaltenen Proben wurde anschließend mit der in Kapitel II.2.10 dargestellten BCA Methode untersucht.

In einer ersten Versuchsreihe wurde für die Untersuchung der Proteinstabilität im Freisetzungsmedium eine BSA Lösung in isotonischem Phosphatpuffer (PBS) untersucht. Zugleich wurde auch die BSA Freisetzung aus den nicht verdickten Grundlagen Miglyol 812 und Sesamöl bestimmt (siehe Tabelle 40).

Die BCA Bestimmungen der BSA in PBS Proben ergaben bis zu einem Einlagerungszeitraum von einer Woche relativ konstante und in sich konsistente Messergebnisse. Bei längerer Einlagerung stiegen diese aber sprunghaft an und führten zu Messergebnissen deutlich oberhalb der eingesetzten BSA Einwaage. Offensichtlich wurden hierbei durch das BCA Assay Abbauprodukte miterfasst, dies sich erst bei längerer Einlagerung bildeten. Aus diesem Grund werden in den nachfolgenden Abbildungen für die BSA in vitro Freisetzungsversuche nur Messergebnisse bis Probenzug an Tag 7 dargestellt.

Tabelle 40: Bestimmung des BSA Gehaltes in PBS mit BCA Assay und Bestimmung der BSA Freisetzung aus Miglyol 812 und Sesamöl, Mittelwert ± Standardabweichung, n=3, Angabe in Prozent der BSA Einwaage

	Formulierung		
	BSA in PBS	BSA in Miglyol 812	BSA in Sesamöl
Probenzug	BSA Gehalt [%]	Freisetzung [%]	Freisetzung [%]
2h	102,1 ± 2,8	97,3 ± 3,1	85,9 ± 1,2
7h	101,8 ± 2,5	103,1 ± 3,3	87,6 ± 1,3
24h	103,6 ± 4,0	102,3 ± 2,6	84,8 ± 3,4
2d	102,9 ± 3,9	102,9 ± 3,5	85,7 ± 2,5
3d	105,2 ± 4,7	104,6 ± 0,5	88,2 ± 1,4
4d	104,3 ± 4,8	103,0 ± 2,5	87,7 ± 2,5
7d	104,6 ± 2,6	102,7 ± 3,1	89,8 ± 2,8

Aus den Ergebnissen der Versuchsreihen BSA in Miglyol 812 und BSA in Sesamöl kann man deutlich erkennen, dass die nicht verdickten Grundlagen zu einer sehr raschen Wirkstofffreisetzung führen, die bereits nach 2h fast den Maximalwert erreichen. Aus Miglyol 812 ist die Freigabe vollständig, während bei Sesamöl nur ca. 90% im Akzeptormedium gefunden werden. Offensichtlich führt hierbei die höhere Viskosität des Sesamöls (vgl. Kapitel III.1.2 Tabelle 18 $\eta_{100s\text{-}1;\ 37°C}$ = 38,2mPas) zu einer im

Vergleich zu dem weniger viskosen Miglyol 812 (vgl. Kapitel III.1.2 Tabelle 18 $\eta_{100s\text{-}1;\ 37°C}$ = 16,9mPas) verringerten Gesamtfreisetzung.

In den weiteren Versuchszweigen wurde der Einfluss der Verdickung auf die BSA Freisetzung bestimmt. Zunächst wurden Formulierungen mit 1,0%, 1,5% und 2,0% AlSt ALGV® in Miglyol 812 und Sesamöl untersucht (vgl. Tabelle 41 und Tabelle 42).

Tabelle 41: Bestimmung der BSA Freisetzung aus Miglyol 812 mit 1,0%, 1,5% und 2,0% AlSt ALG V®, Mittelwert ± Standardabweichung, n=3, Angabe in Prozent der BSA Einwaage

	Formulierung		
	BSA in Miglyol 812 1,0% AlSt ALG V®	BSA in Miglyol 812 1,5% AlSt ALG V®	BSA in Miglyol 812 2,0% AlSt ALG V®
Probenzug	Freisetzung [%]	Freisetzung [%]	Freisetzung [%]
2h	19,6 ± 7,8	keine Freisetzung	keine Freisetzung
7h	27,7 ± 4,1	keine Freisetzung	keine Freisetzung
24h	30,4 ± 4,1	0,7 ± 0,5	keine Freisetzung
2d	30,7 ± 3,4	4,0 ± 2,8	keine Freisetzung
5d	37,5 ± 4,8	5,4 ± 1,0	keine Freisetzung
7d	36,2 ± 6,9	8,0 ± 0,5	keine Freisetzung

Die Miglyol 812 Formulierung mit 1,5% AlSt ALG V® gibt während des Beobachtungszeitraums mit 8% BSA an Tag 7 insgesamt genommen nur sehr wenig Protein frei. Eine weitere Erhöhung des AlSt ALG V® Anteils auf 2% führt zu einer vollständigen Unterdrückung der BSA Freisetzung während des gesamten Beobachtungszeitraums. Im Gegensatz hierzu werden aus der 1% AlSt ALG V® Formulierung mit ca. 20% nach 2h, ca. 30% nach 24h und ca. 36% nach 7 Tagen größere Anteile BSA freigesetzt.

Der Vergleich der hilfsstofffreien Miglyol 812 Formulierung (vgl. Tabelle 40) mit der 1% AlSt ALG V® Miglyol 812 Formulierung zeigt deutlich, dass bereits durch einen relativ geringen Hilfsstoffzusatz sowohl Gesamtfreisetzung (z.B. Tabelle 40 7d: 104,6% versus Tabelle 41 d7: 36,2%) als auch die Freisetzung kurz nach Applikation (vgl. Tabelle 40: 2h: 97,3%, 24h: 102,3% versus Tabelle 41: 2h: 19,6%, 24h: 30,4%) deutlich beeinflusst werden können.

In Kapitel III.5 wurden die rheologischen Eigenschaften der verdickten Grundlagen vor und nach Scherung bestimmt (vgl. Tabelle 37 und Tabelle 38). Die Messungen ergaben, dass die Formulierung AlSt ALG V® 1% in Miglyol 812 permanenten Flüs-

sigkeitscharakter besitzt, da bei allen Messpunkten das flüssigkeitstypische viskose Modul G´´ gegenüber dem festkörpertypischen Speichermodul G´ überwiegt. Formulierungen mit höheren Anteilen an AlSt ALG V® in Miglyol 812 hingegen besitzen nach Scherung grundsätzlich Feststoffcharakter und nehmen erst nach Überwinden der Mindestschubspannung $\tau_{(G´=G´´)}$ Flüssigkeitseigenschaften an. Dies kann die BSA Freisetzung aus der 1% AlSt ALG V® Formulierung in Miglyol 812 und die geringe bis keine Freisetzung aus den 1,5% und 2% Formulierungen erklären. In der 1% AlSt Formulierung können die BSA Partikel aufgrund des Flüssigkeitscharakters stetig zur Phasengrenze wandern und in das Freisetzungsmedium übertreten, während bei der 2% Formulierung die Gewichtskraft der BSA Partikel nicht mehr ausreicht, um die Mindestschubspannung zu überwinden. Eine Sedimentation innerhalb der Formulierung und nachfolgende Freisetzung findet deshalb nicht mehr statt. Die 1,5% Formulierung mit geringer Freisetzung nimmt hier offensichtlich eine Mittelstellung ein. Potentiell können hier oberflächennahe BSA Partikel noch aus dem Depot gelöst werden.

Analog zu den Versuchen auf Grundlage Miglyol 812 wurden auch Formulierungen mit 1,0%, 1,5% und 2,0% AlSt ALG V® in Sesamöl untersucht (vgl. Tabelle 42).

Tabelle 42: Bestimmung der BSA Freisetzung aus Sesamöl mit 1,0%, 1,5% und 2,0% AlSt ALG V®, Mittelwert ± Standardabweichung, n=3, Angabe in Prozent der BSA Einwaage

	Formulierung		
	BSA in Sesamöl 1,0% AlSt ALG V®	BSA in Sesamöl 1,5% AlSt ALG V®	BSA in Sesamöl 2,0% AlSt ALG V®
Probenzug	Freisetzung [%]	Freisetzung [%]	Freisetzung [%]
2h	28,1 ± 5,1	keine Freisetzung	keine Freisetzung
7h	30,5 ± 2,6	keine Freisetzung	keine Freisetzung
24h	37,9 ± 1,2	keine Freisetzung	keine Freisetzung
2d	37,5 ± 3,0	keine Freisetzung	keine Freisetzung
5d	36,1 ± 6,7	keine Freisetzung	keine Freisetzung
7d	38,4 ± 0,3	keine Freisetzung	keine Freisetzung

Ähnlich zu den Ergebnissen der Tabelle 41 ist auch bei den Formulierungen auf Basis von Sesamöl deutlich der Effekt des Hilfsstoffzusatzes auf die Freisetzung erkennbar. Bei einem Anteil von 1,5% und 2% AlSt ALG V® wird kein BSA mehr freigegeben, während bei einem Anteil von 1% AlSt ALG V nach 2h fast 30% und nach 7d fast 40% BSA freigegeben wird. Auch hier können die Freisetzungsdaten

anhand der oszillatorischen Untersuchungen aus Kapitel III.5 Tabelle 37 und Tabelle 38 interpretiert werden. Da die Formulierung mit 1% Hilfsstoff nach Scherung fortwährenden Flüssigkeitscharakter (G´´>G´) besitzt, können die BSA Partikel unabhängig von dem Überwinden einer Mindestschubspannung durch Sedimentation freigesetzt werden. Die Formulierung mit 2% Hilfsstoff in Sesamöl besitzt vergleichbar zur Formulierung in Miglyol 812 nach Scherung eine Mindestschubspannung $\tau_{(G´=G´´)}$ die von den BSA Partikeln nicht überwunden werden kann und zu einem Ausbleiben der Freisetzung führt. Konnte bei der Formulierung mit 1,5% AlSt ALG V® in Miglyol 812 noch eine geringe Freisetzung beobachtet werden, so bleibt diese bei der Formulierung auf Basis Sesamöl vollständig aus. Offensichtlich ist hier der Feststoffcharakter im Vergleich zur Miglyol 812 Formulierung stärker ausgeprägt. Diese Beobachtung wird auch durch die höhere Mindestschubspannung der 2,0% AlSt ALG V® Sesamöl Formulierung (ca. 3Pa) gegenüber der Formulierung 2,0% AlSt ALG V® Miglyol 812 (ca. 1,2Pa) unterstützt (vgl. Kapitel III.5).

Da die Formulierungen mit einem Aluminiumstearatanteil über 1% in den in vitro Untersuchungen nur geringe bis keine Freisetzung zeigten, wurden in den anschließenden Versuchsreihen AlSt Formulierungen mit geringeren Hilfsstoffanteilen untersucht (vgl. Tabelle 43 und Tabelle 44).

Tabelle 43: Bestimmung der BSA Freisetzung aus Miglyol 812 mit 0,2%, 0,4%, 0,6% und 0,8% AlSt ALG V®, Mittelwert ± Standardabweichung, n=3, Angabe in Prozent der BSA Einwaage

	Formulierung			
	BSA in Miglyol 812 0,2% AlSt ALG V®	BSA in Miglyol 812 0,4% AlSt ALG V®	BSA in Miglyol 812 0,6% AlSt ALG V®	BSA in Miglyol 812 0,8% AlSt ALG V®
Probenzug	Freisetzung [%]	Freisetzung [%]	Freisetzung [%]	Freisetzung [%]
2h	64,5 ± 8,9	63,4 ± 6,9	50,9 ± 3,6	30,5 ± 3,6
6h	70,6 ± 3,1	62,3 ± 6,4	62,2 ± 6,2	31,6 ± 1,9
24h	77,3 ± 5,3	62,8 ± 4,2	71,7 ± 4,5	32,7 ± 4,4
2d	74,6 ± 6,0	69,8 ± 5,1	71,9 ± 2,2	32,5 ± 3,0
5d	80,6 ± 8,3	70,2 ± 9,5	71,4 ± 2,7	33,8 ± 2,7
7d	81,0 ± 4,6	75,4 ± 3,5	71,9 ± 5,2	33,7 ± 1,7

Aus den Daten der in vitro Untersuchungen auf Basis von Miglyol 812 und AlSt ALG V® Anteilen kleiner 1% wird der Einfluss des steigenden Hilfsstoffanteils auf die BSA Freisetzung deutlich erkennbar. Verhalten sich die Formulierungen mit 0,2% bis 0,6% AlSt ALG V® relativ ähnlich und zeigen bereits nach 2h rasche und hohe

Freisetzung und einen nur moderaten weiteren Anstieg bis Tag 7 (z.B. Tabelle 43: 0,2%/0,4%/0,6% AlSt ALG V® 2h: 64,5%/63,4%/50,9% BSA Freisetzung, 7d: 81,0%/75,4%/71,9% BSA Freisetzung), so tritt bei einer weiteren Erhöhung auf 0,8% AlSt ALG V® ein deutlicher Abfall der Gesamtfreisetzung und eine nur geringfügige weitere Steigerung des bei 2h erreichten Niveaus im weiteren zeitlichen Verlauf auf (z.B. Tabelle 43: 0,8% AlSt ALG V® 2h 30,5%, 7d: 33,7%). In ihrem Freisetzungsverhalten ähnelt die Formulierung mit 0,8% AlSt ALG V® der Formulierung mit 1,0% Hilfsstoff in Miglyol 812 (vgl. Tabelle 42). Offensichtlich ist der Einfluss des Additivs auf die Eigenschaften der Formulierung bei niedrigen Anteilen von 0,2 bis 0,6% AlSt ALG V® noch relativ gering, so dass diese die suspendierten BSA Partikel rasch freigeben und ein Freisetzungsverhalten ähnlich der nicht verdickten Grundlage zeigen (vgl. Tabelle 40).

Analog zu den Formulierungen mit Miglyol 812 wurden auch die Formulierungen auf Basis von Sesamöl mit AlSt ALG V® Gehalten von weniger als 1% untersucht (vgl. Tabelle 44).

Tabelle 44: Bestimmung der BSA Freisetzung aus Sesamöl mit 0,2%, 0,4%, 0,6% und 0,8% AlSt ALG V®, Mittelwert ± Standardabweichung, n=3, Angabe in Prozent der BSA Einwaage

	Formulierung [%]			
	BSA in Sesamöl 0,2% AlSt ALG V®	BSA in Sesamöl 0,4% AlSt ALG V®	BSA in Sesamöl 0,6% AlSt ALG V®	BSA in Sesamöl 0,8% AlSt ALG V®
Probenzug	Freisetzung [%]	Freisetzung [%]	Freisetzung [%]	Freisetzung [%]
2h	69,8 ± 2,6	61,0 ± 4,6	51,4 ± 1,4	19,5 ± 2,3
7h	71,5 ± 1,1	69,4 ± 2,9	62,6 ± 7,4	23,9 ± 1,6
24h	85,6 ± 3,0	72,9 ± 3,6	63,8 ± 4,1	26,1 ± 2,0
2d	80,1 ± 2,2	75,2 ± 3,2	65,6 ± 2,7	34,7 ± 1,8
5d	81,9 ± 5,2	72,5 ± 2,3	65,4 ± 2,6	57,5 ± 5,5
7d	84,9 ± 5,5	77,6 ± 6,2	66,4 ± 4,6	62,5 ± 7,0

Wie bei den Ergebnissen der Freisetzungsuntersuchungen auf Basis von Miglyol 812, kann auch bei den Formulierungen von AlSt ALG V® in Sesamöl mit zunehmendem Hilfsstoffanteil ein Absinken der prozentualen Freisetzung nach 24h und eine Verringerung der kumulierten Freisetzung nach 7 Tagen beobachtet werden (vgl. Tabelle 44).

Die Formulierung mit 0,2% Additivanteil zeigt noch im Wesentlichen die Eigenschaften des nativen Sesamöls. Die Freisetzung erfolgt sehr rasch und ist nach 24h mit

ca. 86% nahezu abgeschlossen (vgl. Tabelle 40 und Tabelle 44). Der Anteil von 0,2% AlSt ALG V® ist offensichtlich noch zu gering, um die Eigenschaften der Formulierung und deren Freisetzungsverhalten im Vergleich zu reinem Sesamöl deutlich zu verändern. Eine Anhebung des AlSt ALG V® Anteils führt zu dem Absinken der Freisetzungswerte nach 24h und 7d (z.B. Tabelle 44: 0,4%/0,6%/0,8% AlSt ALG V® 24h: 72,9%/63,8%/26,1% BSA Freisetzung, 7d: 77,6%/66,4%/62,5% BSA Freisetzung). Während die 0,4% und 0,6% AlSt ALG V® Formulierung zu einer eher gleichmäßigen Reduktion der 24h/7d Messwerte neigen, zeigt die 0,8% Formulierung ein interessantes Verhalten: Die Freisetzung in den ersten 24h beträgt nur ca. 26% und steigt während des Beobachtungszeitraums auf 63% nach 7 Tagen an. Hier ist der gewünschte Effekt der Retardierung der BSA Freisetzung durch den Einsatz eines Gelbildners deutlich erkennbar. Eine Erhöhung der AlSt ALG V® Konzentration auf 1,0% führt dann allerdings wiederum zu einem deutlichen und gleichmäßigen Absinken der 24h und 7d Werte (vgl. Tabelle 42 1,0% AlSt ALG V® 24h/7d: 37,9%/38,4% BSA Freisetzung).

Wie bei den Formulierungen mit AlSt ALG V® wurde auch die BSA Freisetzung aus Rheopearl KL® haltigen Formulierungen bestimmt (vgl. Tabelle 46 und Tabelle 47).

Die Versuche mit AlSt ALG V® hatten ergeben, dass aus Formulierungen mit höherem Anteil Hilfsstoff aufgrund des Feststoffcharakters der verdickten Grundlagen kein BSA freigegeben wurde. In dem vorliegenden Versuchszweig wurden deshalb für die ersten Bestimmungen Formulierungen mit etwas niedrigeren Gehalten an viskositätserhöhendem Additiv untersucht. Um den Umfang der zu untersuchenden Proben anzupassen, wurden für diesen ersten Schritt nur Formulierungen auf Basis Sesamöl erprobt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 45 dargestellt.

Tabelle 45: Bestimmung der BSA Freisetzung aus Sesamöl mit 0,5%, 1,0% und 1,5% Rheopearl KL®, Mittelwert ± Standardabweichung, n=3, Angabe in Prozent der BSA Einwaage

	Formulierung		
	BSA in Sesamöl 0,5% Rheopearl KL®	BSA in Sesamöl 1,0% Rheopearl KL®	BSA in Sesamöl 1,5% Rheopearl KL®
Probenzug	Freisetzung [%]	Freisetzung [%]	Freisetzung [%]
2h	keine Freisetzung	keine Freisetzung	keine Freisetzung
7h	keine Freisetzung	keine Freisetzung	keine Freisetzung
24h	keine Freisetzung	keine Freisetzung	keine Freisetzung
2d	keine Freisetzung	keine Freisetzung	keine Freisetzung
5d	keine Freisetzung	keine Freisetzung	keine Freisetzung
7d	keine Freisetzung	keine Freisetzung	keine Freisetzung

Die rheologischen Untersuchungen der viskosen Grundlagen in Kapitel III.5 hatten ergeben, dass mit 1% Rheopearl KL® verdicktes Sesamöl noch in geringem Ausmaß Feststoffcharakter besitzt und eine Mindestschubspannung von 0,1Pa aufweist. Hierdurch lässt sich erklären, dass die Formulierungen mit 1,0 und 1,5% Rheopearl KL® zu keiner BSA Freisetzung führen. Auffallend ist, dass auch bei der Formulierung mit 0,5% Hilfsstoff keinerlei BSA aus der Matrix freigegeben wird. Offensichtlich ist bereits ein sehr geringer Hilfsstoffanteil ausreichend, um die BSA Freisetzung unter den Bedingungen des in vitro Tests zu unterbinden.

Aufgrund der Ergebnisse der oben beschriebenen Versuche wurden im nächsten Schritt Grundlagen mit sehr kleinen Anteilen von 0,1-0,3% Hilfsstoff untersucht (vgl. Tabelle 46 und Tabelle 47).

Tabelle 46: Bestimmung der BSA Freisetzung aus Sesamöl mit 0,1%, 0,2% und 0,3% Rheopearl KL®, Mittelwert ± Standardabweichung, n=3, Angabe in Prozent der BSA Einwaage

	Formulierung		
	BSA in Sesamöl 0,1% Rheopearl KL®	BSA in Sesamöl 0,2% Rheopearl KL®	BSA in Sesamöl 0,3% Rheopearl KL®
Probenzug	Freisetzung [%]	Freisetzung [%]	Freisetzung [%]
2h	33,0 ± 6,9	2,0 ± 2,3	Keine Freisetzung
7h	44,5 ± 5,0	4,7 ± 2,3	Keine Freisetzung
24h	53,0 ± 2,3	8,3 ± 4,4	0,2 ± 1,8
2d	54,5 ± 4,8	8,0 ± 1,8	1,6 ± 2,4
5d	53,7 ± 1,9	8,6 ± 2,7	1,5 ± 1,7
7d	53,7 ± 3,7	8,2 ± 2,6	1,5 ± 1,8

Anhand der Daten der Tabelle 47 kann man erkennen, dass auch bei den sehr geringen Anteilen von nur 0,2% und 0,3% Rheopearl KL® in Sesamöl die BSA Abgabe aus den Formulierungen sehr stark eingeschränkt wird. Die Wirkstofffreisetzung erreicht bei 0,3% Additiv nur ca. 1,5%, bei 0,2% Hilfsstoff ca. 8% der suspendierten BSA Menge. Bei einem Anteil von 0,1% Rheopearl KL® steigt die kumulierte Freisetzung mit ca. 53% nach 24h deutlich gegenüber den anderen untersuchten Formulierungen an. Allerdings erhöht sich der in den ersten 24 Stunden erreichte Wert mit fortschreitender Beobachtungszeit nicht mehr weiter.

Nach den Untersuchungen mit niedrigen Anteilen von Rheopearl KL® in Sesamöl wurden gleichgestaltete in vitro Versuche auf Basis von Miglyol 812 durchgeführt. Deren Ergebnis ist in Tabelle 47 dargestellt.

Tabelle 47: Bestimmung der BSA Freisetzung aus Miglyol 812 mit 0,1%, 0,2% und 0,3% Rheopearl KL®, Mittelwert ± Standardabweichung, n=3, Angabe in Prozent der BSA Einwaage

	Formulierung		
	BSA in Miglyol 812 0,1% Rheopearl KL®	BSA in Miglyol 812 0,2% Rheopearl KL®	BSA in Miglyol 812 0,3% Rheopearl KL®
Probenzug	Freisetzung [%]	Freisetzung [%]	Freisetzung [%]
2h	78,9 ± 4,6	76,4 ± 3,1	44,8 ± 4,7
7h	81,1 ± 3,6	83,8 ± 3,5	46,7 ± 1,9
24h	85,5 ± 5,3	85,5 ± 3,2	46,8 ± 1,9
2d	86,7 ± 4,8	86,0 ± 2,7	50,4 ± 1,2
5d	85,2 ± 5,6	85,4 ± 3,1	51,5 ± 2,5
7d	86,4 ± 2,1	86,1 ± 7,8	50,2 ± 0,6

Im Unterschied zu den Sesamölformulierungen kann auch mit 0,3% Additiv eine rasche und vergleichsweise hohe Freisetzung beobachtet werden. Binnen der ersten 24h tritt ein Anteil von ca. 46% des suspendierten BSA in das Freisetzungsmedium über. Im weiteren Verlauf der Untersuchung kann allerdings nur noch ein moderater weiterer Anstieg auf ca. 50% erreicht werden. Die Formulierungen mit 0,1% und 0,2% Rheopearl KL® zeigen eine deutliche Zunahme der Freisetzungsgeschwindigkeit mit 2h/24h Werten von ca. 75% und 85% (vgl. Tabelle 47). Allerdings ist die BSA Freisetzung der Formulierungen nach dem ersten Tag nahezu abgeschlossen, da mit Werten von ca. 86% nach Tag 7 nur noch ein sehr geringer Anstieg im weiteren Verlauf des Untersuchungszeitraums beobachtet werden kann.

III.7.3. Fazit der in vitro Freisetzungsversuche

Aus den Ergebnissen der in vitro Freisetzungsuntersuchungen können zusammenfassend folgende Schlussfolgerungen gezogen werden: Anhand der Freisetzungsdaten lassen sich die Formulierungen im Wesentlichen in drei Gruppen einteilen. Zum einen die nicht retardierenden Formulierungen mit sehr rascher Freisetzungsgeschwindigkeit und hoher Gesamtfreisetzung. Hierzu zählen die nicht verdickten nativen öligen Grundlagen Miglyol 812 und Sesamöl (vgl. Tabelle 40) und die Formulierungen mit geringen Anteilen an Aluminiumstearat ALG V® und Rheopearl KL® (vgl. Tabelle 43: 0,2% AlSt ALG V® in Miglyol 812, Tabelle 44: 0,2% und 0,4% AlSt ALG V® in Sesamöl, Tabelle 47: 0,1% und 0,2% Rheopearl KL® in Miglyol 812). Diese Formulierungen mit einer sehr raschen in vitro Freisetzung erreichen nicht die Zielsetzung der Arbeit, die auf eine prolongierte Wirkstofffreisetzung über einen längeren Zeitraum abzielt.

Demgegenüber stehen die verdickten Formulierungen, die keine oder allenfalls geringe Gesamtfreisetzung zeigen (vgl. Tabelle 41: 1,5% und 2,0% AlSt ALG V® in Miglyol 812, Tabelle 42: 1,5% und 2,0% AlSt ALG V® in Sesamöl, Tabelle 45: 0,5% bis 1,5% Rheopearl KL® in Sesamöl, Tabelle 46: 0,2% und 0,3% Rheopearl KL® in Sesamöl). Das in vitro Freisetzungsverhalten dieser Formulierungen trifft das Entwicklungsziel zunächst nicht, da das Modellprotein aus den Formulierungen kaum freigegeben wird. Da sich die Umgebungsvariablen in vivo deutlich von denen in vitro unterscheiden, könnte bei diesen nach Injektion in den Körper ein anderes Freisetzungsverhalten beobachtet werden.

In die dritte Gruppe fallen die Formulierungen, die in vitro eine mittlere Gesamtfreisetzung zeigen (vgl. Tabelle 41: 1,0% AlSt ALG V® in Miglyol 812, Tabelle 42: 1,5% AlSt ALG V® in Sesamöl, Tabelle 43: 0,4% bis 0,8% AlSt ALG V® in Miglyol 812, Tabelle 44: 0,6% AlSt ALG V® in Sesamöl, Tabelle 46: 0,1% Rheopearl KL® in Sesamöl), oder deren Freisetzung prolongiert erfolgt (besonders deutlich bei Tabelle 44: 0,8% AlSt ALG V® in Sesamöl). Gerade die Ergebnisse der letztgenannten Formulierung mit 26% Freisetzung nach 24h und ca. 63% Freisetzung nach 7 Tagen kommen dem Projektziel der verlangsamten Freisetzung über einen Zeitraum von mehreren Tagen relativ nahe.

III.7.4. In vivo hGH Freisetzungsversuche

Da die komplexen in vivo Umgebungsbedingungen bei in vitro Versuchen meist nur unvollständig nachgeahmt werden können, ist eine direkte Vergleichbarkeit der Aussagen der beiden unterschiedlichen Testsysteme und eine Vorhersage des in vivo Verhaltens aus den in vitro Daten gewöhnlich deutlich erschwert (Zuidema et al.; 1994) (Senior et al.; 2000). Aus diesem Grund wurden für eine Reihe ausgewählter Formulierungen separate in vivo Daten erhoben (vgl. Kapitel II.2.11).

In Tabelle 48 sind die Formulierungen dargestellt, die für die Bestimmung der in vivo Daten ausgewählt wurden.

Tabelle 48: Übersicht der Formulierungen für die Bestimmung von in vivo Daten

Formulierung	Grundlage	Additiv	Anteil Modellprotein	Applikationsvolumen
1	Sesamöl	0% Additiv	5% hGH GFK	200µl
2	Sesamöl	3% AlSt ALG V®	5% hGH GFK	200µl
3	Sesamöl	5% AlSt ALG V®	5% hGH GFK	200µl
4	Sesamöl	3% Rheopearl KL®	5% hGH GFK	200µl
5	Sesamöl	5% Rheopearl KL®	5% hGH GFK	200µl
6	Sesamöl	5% Rheopearl KL®	1% hGH GFK	200µl
7	Miglyol 812	5% AlSt ALG V®	5% hGH GFK	200µl
8	Miglyol 812	5% Rheopearl KL®	5% hGH GFK	200µl

Für die in vivo Versuche wurde als Modellprotein gefriergetrocknetes humanes Wachstumshormon (hGH GFK) verwendet, welches Genotropin® 16 I.E. Fertigspritzen entnommen wurde. Für die Formulierungen wurde als Wirkstoffbeladung ein Feststoffanteil von 5% hGH GFK gewählt. Bei Formulierung 6 wurde dieser auf 1% verringert, um einen Einfluss der Beladung auf die Wirkstofffreisetzung untersuchen zu können. Formulierung 1 ohne Additivzusatz wurde in den Versuchszweig aufgenommen, um den Effekt der öligen Grundlage auf die Wirkstofffreisetzung bestimmen zu können. Als verdickte Oleogele wurden die Formulierungen 2 bis 6 ausgewählt, die jeweils einen Hilfsstoffanteil von 3 bzw. 5% AlSt ALG V® oder Rheopearl KL® in Miglyol 812 oder Sesamöl enthielten. Da eine im Vergleich zu den in vitro Ergebnissen schnellere Wirkstofffreigabe in der in vivo Umgebung erwartet wurde, wurden vergleichsweise hohe Additivanteile gewählt, die auch hinsichtlich der Injizierbarkeit im Grenzbereich lagen (vgl. Kapitel III.5). Für die Herstellung der Formulierungen

wurden die verdickten Grundlagen mit dem unzerkleinerten hGH GFK der Fertigspritzen versetzt und mittels Mörsermühle 30min homogenisiert. Die Größe der zerkleinerten Partikel wurde mittels Laserlichtstreuung bestimmt (vgl. Tabelle 49).

Tabelle 49: Bestimmung der Partikelgrößenverteilung der hGH GFK Formulierungen der in vitro und in vivo Versuche, Mittelwert ± Standardabweichung, n=3

Nr.	Formulierung			Partikelgrößenverteilung $d_{(v,0.5)}$ [µm]	Partikelgrößenverteilung $d_{(v,0.9)}$ [µm]
1	5% hGH GFK	0% Additiv	Sesamöl	17,05 ± 0,07	53,91 ± 0,32
2	5% hGH GFK	3% AlSt ALG V®	Sesamöl	17,65 ± 0,13	65,78 ± 2,13
3	5% hGH GFK	5% AlSt ALG V®	Sesamöl	19,65 ± 0,13	68,32 ± 1,72
4	5% hGH GFK	3% Rheopearl KL®	Sesamöl	18,81 ± 0,12	58,92 ± 1,05
5	5% hGH GFK	5% Rheopearl KL®	Sesamöl	17,80 ± 0,25	60,17 ± 0,83
6	1% hGH GFK	5% Rheopearl KL®	Sesamöl	19,24 ± 0,07	67,70 ± 1,07
7	5% hGH GFK	5% AlSt ALG V®	Miglyol 812	21,26 ± 0,07	68,29 ± 0,72
8	5% hGH GFK	5% Rheopearl KL®	Miglyol 812	15,74 ± 0,08	49,20 ± 0,41

Aus den Ergebnissen der Vorversuche zur Partikelzerkleinerung (vgl. Kapitel III.4) war zu erwarten, dass durch die Behandlung des hGH GFKs mittels Mörsermühle ausreichend kleine Partikeldurchmesser erreichbar sein sollten. Die Ergebnisse der Partikelgrößenbestimmungen ergaben, dass im Vergleich zu dem BSA GFK mit $d_{(v,0.5)}/d_{(v,0.9)}$ Werten von ca. 30µm/90µm (vgl. Kapitel III.4.2.3 Tabelle 33) für den hGH GFK eine weitere Reduktion der Partikelgröße in den Bereich von ca. 20µm/70µm $d_{(v,0.5)}/d_{(v,0.9)}$ erzielt wurde, sodass die hGH GFK Formulierungen ohne Gefahr eines Nadelverschlusses injiziert werden konnten.

Parallel zu den geplanten in vivo Versuchen wurden in vitro Versuche nach dem in Kapitel II.2.9 beschriebenen Verfahren und den 2R Vials mit kleinerem Innendurchmesser durchgeführt. Die Bestimmung der hGH Freisetzung aus den Formulierungen wurde mit der in Kapitel II.2.14 beschriebenen SEC HPLC Methode durchgeführt. Die Ergebnisse der in vitro Freisetzung sind in Tabelle 50 dargestellt.

Tabelle 50: Ergebnisse der in vitro Freisetzung mit hGH GFK suspendiert in ölhaltigen Formulierungen, Mittelwert ± Standardabweichung, n=2, Angabe in Prozent der hGH Einwaage

Nr.	Formulierung	Freisetzung hGH Mononmer [%]				
		2h	10h	1d	2d	3d
1	5% hGH GFK 0% Additiv Sesamöl	67,4 ± 1,5	96,0 ± 0,7	104,0 ± 2,4	105,4 ± 1,4	104,1 ± 1,1
		6d	10d	14d	21d	28d
1	5% hGH GFK 0% Additiv Sesamöl	103,4± 0,4	102,1 ± 1,3	100,7 ± 1,4	98,0 ± 0,1	96,9 ± 0,1

Analog zu den Vorversuchen mit BSA (vgl. Kapitel III.7.2) wurde auch mit hGH in unverdicktem Sesamöl eine rasche Wirkstofffreigabe erzielt, die nach 10h Versuchszeit nahezu abgeschlossen war. Für die mit Rheopearl KL® und AlSt ALG V® in Anteilen von 3 und 5% hergestellten viskosen Oleogele der Formulierungen 2 bis 6 (vgl. Tabelle 48) konnte auch bei hGH GFK über den gesamten Versuchszeitraum hinweg keine Proteinfreisetzung beobachtet werden. Dies stimmt mit den Ergebnissen der BSA in vitro Vorversuche überein (vgl. Kapitel III.7.2) bei denen aufgrund des Feststoffcharakters der verdickten Öle keine BSA Freisetzung bestimmt werden konnte.

Die in vivo Freisetzungsversuche wurden nach dem in Kapitel II.2.11 beschriebenen Verfahren durchgeführt und der hGH Gehalt der erhaltenen Proben nach der in Kapitel II.2.13 dargestellten Methode bestimmt. Die Ergebnisse der Bestimmung der in vivo Freisetzung sind in Tabelle 51 dargestellt.

Tabelle 51: Ergebnisse der in vivo Freisetzung mit hGH GFK suspendiert in ölhaltigen Formulierungen, Mittelwert ± Standardabweichung, n=3

	Formulierung	Konzentration hGH [ng/ml Plasma]				
		0d	1d	7d	14d	21d / 28d
1	5% hGH GFK 0% Additiv Sesamöl	0,33 ± 0,02	1,96 ± 0,20	<0,20	<0,20	<0,20
2	5% hGH GFK 3% AlSt ALG V® Sesamöl	0,33 ± 0,02	420,80 ± 126,65	3,09 ± 1,37	<0,20	<0,20
3	5% hGH GFK 5% AlSt ALG V® Sesamöl	0,36 ± 0,03	164,11 ± 95,16	4,10 ± 0,34	0,45 ± 0,30	<0,20
4	5% hGH GFK 3% Rheopearl KL® Sesamöl	0,31 ± 0,02	61,87 ± 17,07	0,32 ± 0,12	<0,20	<0,20
5	5% hGH GFK 5% Rheopearl KL® Sesamöl	0,37 ± 0,02	237,60 ± 150,0	<0,20	<0,20	<0,20
6	1% hGH GFK 5% Rheopearl KL® Sesamöl	0,36 ± 0,03	101,88 ± 65,22	<0,20	<0,20	<0,20
7	5% hGH GFK 5% AlSt ALG V® Miglyol 812	0,33 ± 0,02	257,20 ± 127,52	5,28 ± 1,37	<0,20	<0,20
8	5% hGH GFK 5% Rheopearl KL® Miglyol 812	0,35 ± 0,02	235,07 ± 146,18	0,21 ± 0,02	<0,20	<0,20

Anhand der in vivo ermittelten Daten zur hGH Freisetzung aus den öligen Grundlagen kann man erkennen, dass nach einer Woche Beobachtungszeit bei den Formulierungen 2, 3 und 7 der Tabelle 51 die Wirkstoffspiegel noch deutlich erhöht sind. Mit Werten im Bereich von 3 bis 5ng/ml liegen die Spiegel um den Faktor 10-15 über dem zu Versuchsbeginn bestimmten Nullwert. Für Formulierung 3 mit 5% AlSt ALG V® in Sesamöl wird auch an Tag 14 mit 0,45ng/ml ein erhöhter hGH Spiegel knapp oberhalb des Ausgangsniveaus bestimmt. Vergleicht man die hGH Spiegel mit den Werten der Formulierung auf Basis des nativen Sesamöls (Tabelle 51 Formulierung 1), bei der bereits an Tag 1 nur noch hGH Spiegel um 2ng/ml erreicht werden, kann deutlich der prolongierende Effekt des Additivs AlSt ALG V® auf die Wirkstofffreisetzung abgelesen werden. Ein Formulierungsanteil von 5% AlSt führt an Tag 7

tendenziell zu höheren hGH Werten im Vergleich zu 3% Hilfsstoffanteil (vgl.Tabelle 51 Formulierung 3 und Formulierung 7 versus Formulierung 2).

Demgegenüber können bei den Formulierungen mit dem Hilfsstoff Rheopearl KL® (vgl. Tabelle 51 Formulierung 4, Formulierung 5, Formulierung 6 und Formulierung 8) nach einer Woche keine erhöhten hGH Werte mehr bestimmt werden. Offensichtlich wurde der Wirkstoff relativ schnell und vollständig freigesetzt, so dass sich die hGH Gehalte bis Tag 7 wieder nivelliert haben.

Aus den hGH Spiegeln an Tag 1 des in vivo Versuchs können folgende Schlüsse gezogen werden: Bei Formulierung 1 auf Basis des reinen Pflanzenöls wird mit ca. 2ng/ml im Vergleich zu den Werten der übrigen Formulierungen ein nur noch sehr niedriger hGH Wert bestimmt. Dies deutet auf schnelle Freisetzung unmittelbar nach Applikation und einen bereits weitgehenden Abbau des Wirkstoffs bis zur Probennahme an Tag 1 hin. Offensichtlich hat die unverdickte ölige Trägermatrix ohne Additiv nur geringen Einfluss auf die Wirkstofffreisetzung. Das reine Sesamöl kann nach Applikationen aufgrund des fehlenden viskositätserhöhenden Zusatzes im Gewebe sehr breit spreiten und eine große Grenzfläche ausbilden, die zu einer raschen Freisetzung führt. Formulierung 4 mit 3% Rheopearl KL® zeigt mit ca. 62ng/ml ebenfalls gegenüber den anderen hilfsstoffhaltigen Formulierungen einen eher niedrigen Wert. Es ist zu vermuten, dass die Hauptfreisetzung bis Tag 1 stattgefunden hat und der Probenzug bereits in der abfallenden Flanke der Blutspiegelkurve durchgeführt wurde. Formulierung 5 und Formulierung 8 mit 5% Rheopearl KL® zeigen mit ca. 230ng/ml an Tag 1 vergleichsweise hohe hGH Werte. Ob der Maximalwert der Blutspiegelkurve bereits erreicht wurde oder sich im zeitlichen Verlauf noch anschließt und inwiefern eine verlangsamte Freisetzung im Bereich von 3 bis 5 Tagen erzielt werden kann, kann aufgrund der großen zeitlichen Abständen zwischen den einzelnen Probenzugszeitpunkte nicht abgeschätzt werden. Der niedrigere Konzentrationswert von ca. 100ng/ml der Formulierung 6, die ebenfalls 5% Rheopearl KL® enthält, kann direkt dosisabhängig mit dem geringeren hGH GFK Anteil von 1% im Vergleich zu dem 5%igen Anteilen der Formulierungen 5 und 8 korreliert werden. Bei den aluminiumstearathaltigen Formulierungen 2, Formulierung 3 und Formulierung 7 ist davon aufgrund der erhöhten hGH Spiegel an Tag 7 davon auszugehen, dass die Wirkstofffreisetzung verlangsamt über den Zeitraum der ersten Woche hinweg erfolgt. Wiederum ist aufgrund des weiten Probenintervalls die Freisetzungskinetik im Zeitraum von Tag 1 bis Tag 7 nur eingeschränkt abschätzbar.

III.7.5. Vergleich mit Freisetzungsdaten alternativer Somatotropin Formulierungen oder lipophiler Trägersystemen

In den Patenten zu Posilac® (Mitchell; 1985) (Mitchell; 1992) (Jeng et al.; 2001) (Heintz et al.; 2001) wurden eine Reihe von in vivo Untersuchungen offengelegt. Neben der Untersuchung der Blutspiegelkurven und der Steigerung der Milchleistung nach Gabe von zinkkomplexiertem und am N-Terminus methionyliertem bovinen Somatotropin (ZnMBS) in Rindern (vgl.Kapitel I.4.2) wurden in vivo Daten in Form von Blutspiegelbestimmungen auch an Ratten erhoben (vgl. Tabelle 52). Im Vergleich zu der in vivo Studie der vorliegenden Arbeit mit Beladungen von 1% bzw. 5% hGH GFK (vgl. Tabelle 48) wurden mit 20% bis 40% wesentlich höhere Anteile an wirkstoffhaltigem Gefrierkuchen zugesetzt. Durch Variation des Applikationsvolumens wurde gewährleistet, dass unabhängig von dem ZnMBS GFK Anteil jeweils identische Wirkstoffdosen appliziert wurden.

Tabelle 52: Freisetzungsdaten der in vivo Studie nach (Mitchell; 1985)

Formulierung	appliziertes Volumen	Konzentration ZnMBS [ng/ml Plasma]								
		0d	1d	3d	7d	11d	14d	21d	28d	35d
20% ZnMBS GFK 3% AlSt Sesamöl	200µl	9	765	440	304	138	83	21	18	22
30% ZnMBS GFK 3% AlSt Sesamöl	130µl	10	494	309	237	141	113	60	31	15
40% ZnMBS GFK 3% AlSt Sesamöl	100µl	6	381	245	239	169	136	49	35	62
20% ZnMBS GFK 5% AlSt Sesamöl	200µl	11	255	91	146	119	86	49	40	48
30% ZnMBS GFK 5% AlSt Sesamöl	130µl	6	338	194	181	203	141	83	44	53
40% ZnMBS GFK 5% AlSt Sesamöl	100µl	6	468	258	151	134	149	103	48	35

Aus den gemessenen Blutspiegelwerten kann man deutlich erkennen, dass die ZnMBS Konzentrationen während des gesamten Beobachtungszeitraums von 35 Tagen deutlich über den Basisspiegeln an Tag 0 vor Applikation lagen. Analog zur eigenen Studie wurden die jeweiligen Spitzenspiegel an Tag 1 nach Gabe beobach-

tet. Im weiteren Verlauf des Beobachtungszeitraums sanken die ZnMBS Werte allerdings wesentlich langsamer ab und lagen selbst 5 Wochen nach Applikation noch deutlich über den Nullwerten. In der eigenen Studie hingegen konnten erhöhte Werte nur bis maximal 14 Tage beobachtet werden (vgl. Tabelle 51). Neben der deutlich höheren Beladung des Depots, aus dem wesentlich länger Protein freigegeben werden kann, hat auch die Zinkkomplexierung des Proteins deutlichen Einfluss auf die Wirkstofffreigabe (vgl. auch Kapitel I.1.4). Tendenziell neigen die Formulierungen mit 5% Aluminiumstearat aus Tabelle 52 zu etwas höheren Spiegeln im Bereich ab 14 Tagen Versuchsdauer, was auf eine verlängerte Freisetzung aus dem Depot im Vergleich zu den 3% AlSt Formulierungen hindeutet. Bisher wurden in keiner Veröffentlichung zu Posilac® der Aufbau eines in vitro Testsystems oder in vitro Daten publiziert. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf die Komplexität des Designs eines in vitro Testsystems.

Zu Nutropin Depot®, das 15% ZnrhGH in PLGA Retardmikrokapseln enthält (vgl. Kapitel I.1.4), wurden eine Reihe von in vitro und in vivo Untersuchungen offengelegt (Johnson et al.; 1997) (Johnson et al.; 1996a) (Cleland et al.; 1997a) (Kemp et al.; 2004). In vitro Versuche zeigten eine initiale Freisetzung an Tag 1 von ca. 15% und eine kontinuierliche Freisetzung von 2-3%/d über einen Zeitraum von 4 Wochen. In vivo Versuche mit Rhesus Affen zeigten einen Freisetzung von ca. 30% in den ersten beiden Tagen nach Applikation und eine kontinuierliche Freisetzung von ca. 1,7%/d in den folgenden 21 Tagen. Bis Tag 60 nach Injektion wurde hier eine kumulative Freisetzung von ca. 80% erreicht (Johnson et al.; 1996a). Ein Vergleich mit den Daten der eigenen Studie (siehe Tabelle 51) zeigt, dass hier durch die Verwendung von zinkkomplexiertem rhGH eingeschlossen in PLGA Mikropartikel wesentlich geringere Initialfreisetzungen und kontinuierliche Abgabe über mehrere Wochen erreicht werden können, die mit der langsamen Erosion der PLGA Partikel einhergehen.

Für lipophile Trägersysteme auf Basis fester Lipide wurden von verschiedenen Autoren Freisetzungsuntersuchungen publiziert. In vitro Untersuchungen zur Freisetzung von Thymocartin-4 aus Palmitinsäuretriglycerid-Lipidmikropartikeln wurden von Reithmeier et al durchgeführt (Reithmeier et al.; 2001b). Aus Partikeln mit einem Durchmesser von 20-150mm und einer Beladung von 16% wurde der Wirkstoff über einen Zeitraum von 5 Tagen nahezu vollständig freigesetzt. An Tag 1 des Beobachtungszeitraums waren ca. 30% des Proteins freigegeben worden. Vergleichbare Untersuchungen mit Somatostatin und geringeren Beladungen von 2% bis 9% zeig-

ten initiale Freisetzungen von 15-25% und in den anschließenden 10-15 Tagen eine kontinuierliche Freigabe (Reithmeier et al.; 2001a). Ähnlich wie die PLGA Mikropartikel zeigen auch die Lipid Mikropartikel im Vergleich zu den eigenen Formulierungen (vgl. Kapitel III.7.2 und Kapitel III.7.4) moderate Freisetzungen unmittelbar nach Applikation und eine verlängerte Wirkstofffreisetzung.

Untersuchungen an festen Lipidimplantaten mit mehreren Millimetern Durchmesser wurden von Mohl und Herrmann et al durchgeführt (Herrmann et al.; 2007b; Herrmann et al.; 2007a; Mohl et al.; 2004; Mohl et al.; 2006). Durch den Einschluss von 10% IFN-α GFK in zylindrische Implantate aus Tristearin Grundmatrix konnten kontinuierliche Wirkstofffreigaben von bis zu 4 Wochen in vitro beobachtet werden. Durch die Zugabe hydrophiler Porenbildner, z.B. PEG 6000, die nach Applikation aus dem Implantat herausgelöst werden und so zu einem tieferen Eindringen des Akzeptormediums in das lipophile Depot führen, konnte die Freisetzungskinetik nachhaltig verändert werden. Formulierungen ohne den hydrophilen Porenbildner zeigten eine Gesamtfreisetzung von 84%, wobei eine initiale Freisetzung von ca. 45% beobachtet wurde und ca. 70% nach 4d freigegeben waren. Formulierungen mit 5% und 10% PEG 6000 führten zu einer gleichmäßigeren Freigabe über den Beobachtungszeitraum bei ähnlichen Gesamtfreisetzungen. Formulierungen mit höheren PEG 6000 Anteilen von 16% und 20% zeigten höhere Gesamtfreisetzungen von bis zu 95% bei höheren Freisetzungsgeschwindigkeiten, sodass nach 14d bereits die Maximalwerte erreicht waren (Mohl et al.; 2004).

III.7.6. Fazit der in vitro und in vivo Freisetzungsversuche

Wie in Kapitel I.3 der Einleitung der vorliegenden Arbeit dargelegt, besteht bislang keine verbindliche Übereinkunft hinsichtlich des Designs eines in vitro Testsystem für parenterale Depotsysteme und ist zukünftig wohl auch nicht zu erwarten. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit der Ansatz der Korrelation zwischen Oberfläche des angenommenen kugelförmigen Depots und der Querschnittsfläche des Freisetzungsvials verwendet. Die Ergebnisse der in vitro Versuche zeigen bei einer Reihe von Formulierungen einerseits eine sehr rasche und unmittelbare Wirkstofffreisetzung, die nicht auf eine angestrebte nachhaltige Kinetik hindeuten. Andererseits wird in vitro bei einer Reihe weiterer Formulierungen ein nahezu vollständiges Ausbleiben jeglicher Wirkstofffreisetzung beobachtet.

Aus diesem Grund sind die Ergebnisse in simulierter Umgebung vorsichtig zu interpretieren. Zumindest bei den Formulierungen, die in vitro eine sehr rasche Freigabe zeigen, ist auch in vivo ein vergleichbares Ergebnis zu erwarten. Bei den Formulierungen mit sehr langsamer bis keiner Wirkstoffabgabe in vitro kann diese allerdings in vivo aufgrund der veränderten Umgebungsbedingungen, die zu einem aktiven Abbau des Depots durch Gewebsenzyme oder durch eine deutlich größere Ausbildung der Grenzfläche zwischen dem applizierten Depot führen, eine vollkommen andere Ausprägung annehmen. Für die Entwicklung parenteraler Depotarzneiformen erscheinen deshalb in vivo Versuche unbedingt notwendig.

Die Interpretation der Daten der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierstudie ist nur eingeschränkt möglich, da das Probenzugsintervall systembedingt sehr weit gewählt war. Es konnte gezeigt werden, dass aluminiumstearathaltige Oleogele über einen Zeitraum von bis zu 14 Tagen zu einem deutlichen Anstieg der Wirkstoffspiegel im Tiermodell führen und im Vergleich zu Formulierungen mit Rheopearl KL® für eine verlängerte Wirkstofffreigabe im Wochenbereich besser geeignet erscheinen. Besonders hervorzuheben ist, dass aufgrund der eingesetzten ELISA Bestimmungsmethode (vgl. Kapitel II.2.12) der Proben der in vivo Studie nur biologisch aktives hGH detektiert wird. Dies bedeutet, dass die eingesetzten Hilfsstoffe und Grundlagen den suspendierten hGH GFK nicht in seiner biologischen Aktivität negativ beeinflussen und über einen Zeitraum von 2 Wochen nach Applikation unversehrtes hGH aus den Depotformulierungen freigesetzt wird. Inwiefern Rheopearl KL® für die Modulation der Freigabe im Zeitraum von mehreren Tagen geeignet ist, kann anhand der vorliegen-

den Daten nicht abschließend abgeschätzt werden. Für zukünftige in vivo Versuche ist deshalb ein kürzeres Probenzugsintervall mit mehr Messpunkten bis Tag 7 empfehlenswert.

Der Vergleich mit publizierten Daten anderer somatotropinhaltiger Formulierungen bzw. lipophiler Trägersysteme (vgl. III.7.5) zeigte deren Vorteile in Hinsicht auf verlängerte Freisetzungen auf. Grundsätzlich sind diese auf die Verwendung schwerlöslicher Zn^{2+} - Protein Komplexe, die per se zu einer verzögerter Wirkstoffauflösung führen, oder der Verwendung partikulärer wirkstoffhaltiger Depots, die das Protein in Zusammenhang mit der Erosion der Matrix (z.B. PLGA Mikropartikel) bzw. dem Durchdringen durch das Freisetzungsmedium (z.B. Lipidimplantate) abgeben, zurückzuführen. Diese Depotformen weichen allerdings sehr stark von der Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ab, die auf eine in wenigen Schritten kostengünstig herzustellende und mittels üblicher Kanülengrößen leicht applizierbaren Formulierung abzielte.

III.8. Untersuchungen zur Stabilität von hGH in ausgewählten öligen Matrices

Untersuchungen zur Wirkstoffstabilität stellen für Entwicklungsprojekte wichtige Versuchszweige dar, um später potentielle Produktlaufzeiten abschätzen zu können. Echtzeitdaten, die unter idealen Umgebungsbedingungen wie abgesenkte Lagertemperatur oder Schutzbegasung gewonnen werden, besitzen hierfür die höchste Aussagekraft. In akzelerierten Stabilitätsstudien, bei denen die Umgebungsparameter deutlich von den Idealbedingungen abweichen können, laufen potentielle Abbauprozesse mit höherer Geschwindigkeit ab, so dass die Gewinnung erster Stabilitätsdaten wesentlich schneller möglich ist. Ausgehend von diesen Daten können frühe Abschätzungen der Laufzeit unter idealen Lagerbedingungen durchgeführt werden (Franks; 2000).

III.8.1. Bestimmung der hGH Stabilität in öligen Suspensionen

Für die Durchführung der hGH Stabilitätsstudie wurden jeweils 6 Vials einer 1% hGH GFK Suspension in den ausgewählten hilfsstofffreien und hilfsstoffhaltigen Matrices Miglyol 812, Sesamöl, 3% AlSt ALG V® Miglyol 812, 3% AlSt ALG V® Sesamöl, 3% Rheopearl KL® Miglyol 812, 3% Rheopearl KL® Sesamöl hergestellt und diese bei 2-8°C, 25°C und 40°C unter Normalatmosphäre eingelagert. In regelmäßigen Ab-

ständen wurde eine Probe der jeweiligen Gruppe entnommen und bis zur Analyse bei -20°C zwischengelagert. Die Probenaufbereitung erfolgte nach dem in Kapitel II.2.13 beschriebenen Verfahren. Die Wirkstoffstabilität wurde mit den in Kapitel II.2.14 und II.2.15 beschriebenen Methoden zur SEC HPLC und RP HPLC untersucht. Als Vergleich diente nicht suspendierter matrixfreier hGH GFK, der unter gleichen Umgebungsbedingungen wie die öligen Suspensionen gelagert wurde. Die Ergebnisse der hGH Stabilitätsstudie sind in Tabelle 53 bis Tabelle 59 geordnet nach den öligen Grundlagen dargestellt.

Tabelle 53: Stabilitätsuntersuchung hGH GFK, Einlagerung bei 2-8°C, 25°C und 40°C, Angabe SEC HPLC Ergebnisse in % hGH Monomer, Angabe der RP HPLC Ergebnisse in % hGH nativ

	hGH GFK					
	2-8°C		25°C		40°C	
	SEC	RP	SEC	RP	SEC	RP
0w	100,0	95,6	100,0	94,1	100,0	95,1
1w	100,0	94,9	99,1	93,7	98,6	93,7
2w	100,0	94,9	99,1	92,3	98,6	93,5
4w	100,0	94,8	98,8	92,0	98,3	92,0
8w	100,0	94,8	98,5	90,7	97,6	89,8
12w	100,0	94,6	98,4	89,2	97,2	87,2
Δ 0w – 12w	±0,0	1,0	1,6	4,9	2,8	7,9

Aus den Werten der Tabelle 53 wird deutlich, dass der nicht suspendierte hGH GFK während der Lagerung bei 2-8°C gegenüber der Bildung von Aggregaten hohe Stabilität besitzt und keinerlei Veränderungen zeigt. Der Anteil der oxidierten Bestandteile nimmt nur wenig um 1,0% zu. Bei den höheren Lagertemperaturen hingegen sind die Abbaueffekte deutlicher ausgeprägt. Der Monomergehalt nimmt bei 25°C bzw. 40°C um 1,6% bzw. 2,8% ab. Im Vergleich hierzu nehmen die oxidierten Bestandteile substantiell um 4,9% bzw. 7,9% zu. Die Lagerung des nicht suspendierten hGH GFK unter Normalatmosphäre mit hohem Sauerstoffgehalt erscheint deshalb insbesondere bei höheren Temperaturen weniger empfehlenswert.

Die Ergebnisse der Lagerversuche mit hGH GFK suspendiert in den beiden hilfsstofffreien öligen Grundlagen Miglyol 812 und Sesamöl sind in Tabelle 54 und Tabelle 55 aufgeführt.

Tabelle 54: Stabilitätsuntersuchung hGH GFK in Miglyol 812, Einlagerung bei 2-8°C, 25°C und 40°C, Angabe SEC HPLC Ergebnisse in % hGH Monomer, Angabe der RP HPLC Ergebnisse in % hGH nativ

	hGH GFK in Miglyol 812					
	2-8°C		25°C		40°C	
	SEC	RP	SEC	RP	SEC	RP
0w	100,0	94,8	100,0	93,5	100,0	92,8
1w	100,0	94,3	100,0	93,9	98,4	91,5
2w	100,0	95,0	99,3	92,6	98,6	90,9
4w	100,0	94,2	99,4	90,9	98,0	89,1
8w	100,0	94,0	98,4	87,5	96,3	85,6
12w	100,0	93,1	98,6	87,6	96,0	82,5
Δ 0w – 12w	±0,0	1,7	1,4	5,9	4,0	10,3

Tabelle 55: Stabilitätsuntersuchung hGH GFK in Sesamöl, Einlagerung bei 2-8°C, 25°C und 40°C, Angabe SEC HPLC Ergebnisse in % hGH Monomer, Angabe der RP HPLC Ergebnisse in % hGH nativ

	hGH GFK in Sesamöl					
	2-8°C		25°C		40°C	
	SEC	RP	SEC	RP	SEC	RP
0w	100,0	95,2	100,0	95,6	100,0	93,1
1w	100,0	94,8	100,0	94,7	99,0	92,8
2w	100,0	95,2	100,0	93,9	98,6	91,8
4w	100,0	95,1	99,8	92,1	98,0	88,8
8w	100,0	95,0	98,8	88,6	96,7	83,9
12w	100,0	94,8	97,8	85,6	96,1	78,6
Δ 0w – 12w	±0,0	0,4	2,2	10,0	3,9	14,5

Bei beiden öligen Grundlagen bleibt das suspendierte hGH während der 2-8°C Einlagerungen über 12 Wochen unverändert zu 100% als Monomer erhalten. Auch die oxidierten Bestandteile nehmen nur wenig um 1,7% bzw. 0,4% bei Miglyol 812 bzw. Sesamöl zu. Der geringere Anstieg der oxidierten Bestandteile von 0,4% bei Sesamöl im Vergleich zu 1,7% bei Miglyol 812 könnte durch den protektiven Effekt von nativ im Sesamöl enthaltenen Antioxidantien hervorgerufen werden.

Bei 25°C Einlagerung fällt der Monomergehalt moderat um 1,4% bzw. 2,2% für Miglyol 812 bzw. Sesamöl ab, ähnlich dem nicht suspendierten hGH GFK. Eine deutliche Abnahme um 5,9% bzw. 10,0% hingegen wird in der RP Analyse der Miglyol 812 bzw. Sesamöl Proben ermittelt. Die Tendenz zum Wirkstoffabbau wird aus den Ergebnissen der 40°C Proben noch deutlicher erkennbar: Der Monomergehalt nimmt nach 12 Wochen Einlagerung jeweils um ca. 4% ab und es werden 10,3% bzw. 14,5% an oxidierten Bestandteilen werden gebildet.

Aus den Ergebnissen der Stabilitätsstudie der hGH GFK Suspensionen in den nativen öligen Grundlagen können folgende Schlüsse gezogen werden: Die Einlagerung bei 2-8°C liefert ähnlich gute Stabilitätsdaten wie bei nicht suspendiertem hGH GFK. Das hGH bleibt jeweils zu 100% als Monomer erhalten und wird insgesamt nur wenig oxidiert. Bei den Einlagerungen der höheren Temperaturen wird die Neigung zum Wirkstoffabbau, die schon bei nicht suspendiertem hGH GFK erkennbar war, weiter verstärkt. Insbesondere bei Sesamöl, das ungesättigte Fettsäuren enthält, die zur Bildung reaktiver Spaltprodukte führen können, ist die Abnahme um beinahe 15% binnen 12 Wochen augenscheinlich.

Die Stabilitätsdaten der hGH GFK Suspensionen in den mit AlSt ALG V® verdickten öligen Grundlagen sind in Tabelle 56 und Tabelle 57 zusammengefasst.

Tabelle 56: Stabilitätsuntersuchung hGH GFK in 3% AlSt ALG V® Miglyol 812, Einlagerung bei 2-8°C, 25°C und 40°C, Angabe SEC HPLC Ergebnisse in % hGH Monomer, Angabe der RP HPLC Ergebnisse in % hGH nativ

	hGH GFK in 3% AlSt ALG V® Miglyol 812					
	2-8°C		25°C		40°C	
	SEC	RP	SEC	RP	SEC	RP
0w	100,0	96,2	100,0	94,8	100,0	96,1
1w	100,0	95,8	100,0	92,3	98,7	92,0
2w	100,0	95,7	99,5	91,4	98,6	91,0
4w	100,0	95,6	99,0	89,5	97,9	88,5
8w	100,0	94,8	99,0	85,2	96,2	83,0
12w	100,0	94,3	98,5	78,5	95,8	79,2
Δ 0w – 12w	±0,0	1,9	1,5	16,3	4,2	16,9

Tabelle 57: Stabilitätsuntersuchung hGH GFK in 3% AlSt ALG V® Sesamöl, Einlagerung bei 2-8°C, 25°C und 40°C, Angabe SEC HPLC Ergebnisse in % hGH Monomer, Angabe der RP HPLC Ergebnisse in % hGH nativ

	hGH GFK in 3% AlSt ALG V® Sesamöl					
	2-8°C		25°C		40°C	
	SEC	RP	SEC	RP	SEC	RP
0w	100,0	94,6	100,0	94,4	100,0	94,4
1w	100,0	94,3	99,3	89,3	99,0	88,7
2w	100,0	94,0	99,0	88,2	98,6	86,1
4w	100,0	93,9	98,7	84,9	97,9	93,8
8w	100,0	93,0	98,7	79,4	97,4	74,4
12w	100,0	92,5	97,8	75,1	96,6	66,7
Δ 0w – 12w	±0,0	2,1	2,2	19,3	3,4	27,7

Auch bei den Grundlagen, die Aluminiumstearat als Hilfsstoff enthalten, bleibt bei 2-8°C Lagerung der Gehalt an Monomeren für beide Öle unverändert bei 100%. Die oxidierten Bestandteile nehmen während des Beobachtungszeitraums um 1,9% bzw. 2,1% in 3% AlSt ALG V® Miglyol 812 bzw. 3% AlSt ALG V® Sesamöl zu und übertreffen somit leicht die korrespondierenden Werte von 1,0%/1,7%/0,4% des hGH GFK bzw. der hGH Suspensionen (vgl. Tabelle 53 bis Tabelle 55).

Bei 25°C Lagerungstemperatur steigt der Anteil der Di- und Oligomeren über 12 Wochen Beobachtungsdauer um 1,5% bzw. 2,2% bei 3% AlSt ALG V® Miglyol 812 bzw. 3% AlSt ALG V® Sesamöl. Dies liegt im Bereich der Werte von hGH GFK, bzw. der hGH GFK Suspensionen der reinen Öle. Ein deutlicher Anstieg kann bei den Ergebnissen der RP HPLC Analysen beobachtet werden. Die Werte von 16,3% bzw. 19,3% übertreffen wesentlich die Referenzwerte von 4,9%, 5,9% und 10,0% des hGH GFK bzw. der hGH GFK Suspensionen in den reinen Ölen der 25°C Einlagerungen. Ähnliche Effekte können auch bei den 40°C Temperaturreihen beobachtet werden: Während die Abnahme des Monomergehalts mit 4,2% bzw. 3,4% der AlSt haltigen Matrices im Bereich der Referenzwerte liegt, nehmen die oxidierten Anteile der hGH Suspensionen in 3% AlSt ALG V® Miglyol 812 bzw. 3% AlSt ALG V® Sesamöl mit 16,9% bzw. 27,7% wiederum deutlich stärker als die Vergleichsdaten des hGH GFK bzw. der hGH Suspensionen in den Ölen zu.

Offensichtlich führt die Herstellung der verdickten AlSt Grundmatrices durch Aufschmelzen bei 170°C zu ersten Abbaureaktionen, die insbesondere bei höheren

Lagertemperaturen das hGH zunehmend oxidativ beeinträchtigen. Analog zu den Stabilitätsdaten der übrigen Versuchsteile erscheint deshalb die Lagerung bei 2-8°C aus Sicht der hGH Stabilität am vorteilhaftesten.

In Tabelle 58 und Tabelle 59 sind die Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen dargestellt, bei denen hGH GFK in 3% Rheopearl KL® Miglyol 812 und 3% Rheopearl KL® Sesamöl suspendiert wurde.

Tabelle 58: Stabilitätsuntersuchung hGH GFK in 3% Rheopearl KL® Miglyol 812, Einlagerung bei 2-8°C, 25°C und 40°C, Angabe SEC HPLC Ergebnisse in % hGH Monomer, Angabe der RP HPLC Ergebnisse in % hGH nativ

	hGH GFK in 3% Rheopearl KL® Miglyol 812					
	2-8°C		25°C		40°C	
	SEC	RP	SEC	RP	SEC	RP
0w	100,0	94,9	100,0	93,1	100,0	96,0
1w	100,0	94,1	100,0	91,1	99,1	92,5
2w	100,0	93,6	99,7	91,0	98,8	91,4
4w	100,0	93,6	99,4	81,2	98,2	89,0
8w	100,0	93,5	99,1	80,4	96,6	84,3
12w	100,0	93,6	98,0	78,8	96,2	81,0
Δ 0w – 12w	±0,0	1,3	2,0	14,3	3,8	15,0

Tabelle 59: Stabilitätsuntersuchung hGH GFK in 3% Rheopearl KL® Sesamöl, Einlagerung bei 2-8°C, 25°C und 40°C, Angabe SEC HPLC Ergebnisse in % hgH Monomer, Angabe der RP HPLC Ergebnisse in % hGH nativ

	hGH GFK in 3% Rheopearl KL® Sesamöl					
	2-8°C		25°C		40°C	
	SEC	RP	SEC	RP	SEC	RP
0w	100,0	94,2	100,0	92,3	100,0	91,3
1w	100,0	92,6	100,0	86,5	99,4	86,6
2w	100,0	93,2	99,7	82,5	99,6	81,1
4w	100,0	92,4	99,4	81,5	99,0	72,4
8w	100,0	91,6	99,2	79,4	98,6	65,2
12w	100,0	91,3	99,0	68,2	97,9	63,2
Δ 0w – 12w	±0,0	2,9	1,0	24,1	2,1	28,1

Auch bei den Suspensionen in den Rheopearl KL® haltigen Grundlagen wird, wie bei den übrigen Versuchsreihen in der 2-8°C Serie, keine Abnahme des hGH Monomergehalts und nur eine geringe Zunahme der oxidierten Bestandteile von 1,3%/2,9% für 3% Rheopearl KL® Miglyol 812 bzw. 3% Rheopearl KL® Sesamöl beobachtet. Diese ist mit den Ergebnissen von hGH GFK unter Normalatmosphäre vergleichbar.

Die Versuche mit höheren Lagertemperaturen ergeben moderate Abnahmen der Monomeranteile um 2,0% bzw. 1,0% bei 25°C und 3,8% bzw. 2,1% bei 40°C für 3% Rheopearl KL® Miglyol 812 bzw. 3% Rheopearl KL® Sesamöl. Die beobachteten Instabilitäten liegen im Bereich der Ergebnisse der übrigen Suspensionen und des nicht suspendierten hGH GFK. Bei dem mittels RP HPLC bestimmten oxidierten hGH werden wieder sehr starke Zunahmen von 14,3% bzw. 15,0% für 3% Rheopearl KL® Miglyol 812 bei 25°C bzw. 40°C und 24,1% bzw. 28,1% für 3% Rheopearl KL® Sesamöl bei 25°C bzw. 40°C beobachtet. Diese Daten liegen deutlich über den Werten des hGH GFK und der hGH GFK Suspensionen in den nativen Ölen, aber im Vergleichsbereich der entsprechenden AlSt haltigen Grundlagen.

Die Herstellung der Rheopearl KL® Oleogele erfolgt analog zu den AlSt haltigen Formulierungen durch Aufschmelzen bei erhöhten Temperaturen. Obwohl die Verarbeitungstemperatur der Rheopearl KL® Gele mit 80°C im Vergleich zur Prozesstemperatur von 170°C der AlSt Gele wesentlich niedriger liegt, werden dennoch in den Stabilitätsversuchen ähnlich hohe Abbauraten des suspendierten Proteins beobachtet. Dies legt den Schluss nahe, dass der für die Herstellung der Rheopearl KL® Formulierungen notwendige Temperaturbereich von ca. 80°C genügt, um in den öligen Matrices Abbaureaktionen zu induzieren, die zu ausgedehnter Oxidation des suspendierten hGH GFK, insbesondere während der Lagerung bei 25°C und 40°C, führen können.

III.8.2. Fazit der Untersuchungen zur Stabilität von hGH in öligen Trägern

Aus den Daten der Stabilitätsuntersuchungen können folgende Schlüsse gezogen werden: Im Vergleich zur Bildung von Dimeren und Oligomeren reagiert hGH gegenüber der Bildung oxidativer Abbauprodukte wesentlich sensibler. Dies wird insbesondere aus den Lagerversuchen bei erhöhten Temperaturen deutlich. Während der Monomergehalt nach 12 Wochen Beobachtungsdauer bei 25°C und 40°C unabhängig von der Suspensionsmatrix nur um wenige Prozentpunkte abnimmt, liegt die

Zunahme des oxidierten hGH in der Spitze bei knapp 30% (vgl. Tabelle 58 und Tabelle 59, Einlagerung bei 40°C). Insbesondere bei den verdickten öligen Grundlagen, für deren Herstellung höhere Prozesstemperaturen notwendig sind und die zu einer Vorschädigung der Matrix führen können, werden große Teile des suspendierten hGH oxidiert.

Die Einlagerungen bei 2-8°C hingegen zeigen gute Stabilität. Unabhängig von der Suspensionsgrundlage bleibt der Monomergehalt zu 100% erhalten. Die Zunahme der oxidierten Anteile liegt bei den hGH Suspensionen in den unverarbeiteten Ölen bei 0,4% bzw. 1,7% und selbst bei den verdickten öligen Grundlagen nur bei 1,3% bzw. 2,9%. Zwar kann auch bei der 2-8°C Einlagerung der aufbereiteten viskosen Grundlagen ein erhöhtes Ausmaß an Oxidation im Vergleich zu den nativen Ölen beobachtet werden, insgesamt gesehen liegt es aber auf vergleichbarem Niveau wie das nicht suspendierte lyophilisierte Handelsprodukt.

Hinsichtlich der Auswahl des Ausgangsöls zeigen sich bei den 2-8°C Einlagerungen keine bedeutsamen Unterschiede zwischen Miglyol 812 und Sesamöl, während bei den höheren Lagertemperaturen deutliche Zunahmen der oxidierten Anteile der Formulierungen auf Basis von Sesamöl gegenüber den Miglyol 812 Formulierungen beobachtet werden können. Hier haben sicher die zur Oxidation neigenden ungesättigten Fettsäuren des pflanzlichen Sesamöls großen Einfluss.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine Lagerung der hGH Suspensionen in den nativen Ölen und verdickten Grundlagen bei einer Temperatur von 2-8°C, welche auch der empfohlenen Lagertemperatur des hGH Handelsproduktes Genotropin® 16 I.E. entspricht, ohne erhöhten Wirkstoffverlust gut möglich ist. Eine weitere Verbesserung der Stabilitätsdaten können durch den Zusatz von Antioxidantien unmittelbar in den Gefrierkuchen oder in die Suspensionsgrundlagen, der Herstellung der hilfsstoffhaltigen Matrices unter Sauerstoffausschluss und Lagerung unter Schutzgasatmosphäre oder Vakuum erzielt werden.

III.9. Zusammenfassung der Ergebnisse

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einfach herzustellender, parenteral applizierbarer Depotformulierungen für rekombinante Proteine. Als Ausgangspunkt diente ein in Nordamerika am Markt erhältliches Tierarzneimittel, zu dessen Herstellung lyophilisiertes Protein in einem aus Aluminiumstearat und Sesamöl bestehenden wasserfreien Oleogel eingearbeitet wird. Nach in vivo Applikation können hierbei verlängerte Wirkstofffreisetzung und physiologische Leistungssteigerung beobachtet werden.

Für die Charakterisierung des bestehenden Formulierungsansatzes und die Entwicklung alternativer Formulierungen wurden in der vorliegenden Arbeit zahlreiche Versuche unternommen.

In einem ersten Schritt wurden natürliche und synthetische lipophile Trägersysteme hinsichtlich ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften, wie Fettsäurezusammensetzung, Viskosität und Wasseraufnahme, analysiert und Kriterien zur Charakterisierung und Reihung der Grundlagen aufgestellt. Ein niedriger Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, geringe Wasseraufnahme und Viskositäten unterhalb des Vergleichswertes eines am deutschen Markt erhältlichen Humanarzneimittels stellen wichtige Auswahlkriterien dar. Das pflanzliche Öl Sesamöl und das synthetisch gewonnene Miglyol 812 wurden vor diesem Hintergrund für die weiteren Versuche ausgewählt.

Anschließend wurde eine Reihe von Suspensionsstabilisatoren mittels Fettsäure GC, Elementaranalyse, DSC und Röntgendiffraktometrie untersucht. Die Ergebnisse der GC Analysen zeigten, dass die Aluminiumstearate aus Gemischen verschiedener, vorwiegend längerkettiger Fettsäuren bestehen, während die alternativen Formulierungshilfsstoffe Dextrinpalmitat (Rheopearl KL®), Dextrinpalmitatethylhexanoat (Rheopearl TT®), Myristinsäuretriglycerid (Dynasan 114®) und Stearinsäuretriglycerid (Dynasan 118®) bezüglich der Fettsäurezusammensetzung hohe Reinheiten aufweisen. Durch Kombination der GC Daten und Elementzusammensetzung konnte der Komplexierungsgrad unterschiedlicher AlSt Handelsmuster abgeschätzt werden. Diese liegen in Abhängigkeit des Herstellers als Aluminiummono- oder Aluminiumdifettsäurekomplexe vor. Die DSC Untersuchungen ergaben für die Aluminiumstearate obere Schmelzpunkte um 150-160°C, für Dynasan 118® und Rheopearl KL® um

70°C und für Dynasan 114® um 50°C. Die Röntgendiffraktogramme bestätigten die Unterschiede im Komplexierungsgrad der Aluminiumstearate.

In den folgenden Untersuchungen wurde die physikalische Stabilität verschiedener verdickter Grundlagen untersucht und aussichtsreiche Kombinationen für die weiteren Versuche ausgewählt. Stabile Formulierungen konnten mit Rheopearl KL®, Rheopearl TT® und den als Difettsäurekomplexen vorliegenden Aluminiumstearaten AlSt Fluka®, AlSt ALG V® und AlSt Alugel 30 HEP® erzielt werden, während die Ansätze mit den festen Lipiden Dynasan 114® und Dynasan 118® und den als Monofettsäurekomplexen vorliegenden AlSt Gellant® und AlSt NF® deutliche Instabilitäten bis hin zur Phasentrennung zeigten. Für die weiteren Versuche wurden AlSt ALG V® und Rheopearl KL® als Additive zur Herstellung der Oleogele ausgewählt.

Im nächsten Schritt wurden verschiedene Methoden zur Herstellung wirkstoffhaltiger öliger Suspensionen mit definierten Partikelgrößenverteilungen erprobt. Als effektive Methoden erwiesen sich der Einsatz des Ultra-Turrax® Hochleistungsdispergierers und die Einarbeitung mittels Mörsermühle. Durch diese können ausreichend kleine Partikelgrößenverteilungen erreicht werden, die ohne Gefahr des Verschlusses durch dünne Kanülen injiziert werden können. Aufgrund der geringeren Verluste wurde für das weitere Vorgehen das Verfahren mittels Mörsermühle ausgewählt.

In den folgenden Versuchen wurden die rheometrischen Eigenschaften ausgewählter Formulierungen in Abhängigkeit von zugesetztem Gelbildner und Scherung mittels Mörsermühle bestimmt. Der Vergleich der Viskositätswerte $\eta_{(100s^{-1})}$ und der Mindestschubspannungen $\tau_{(G'=G'')}$ der einzelnen Formulierungen veranschaulichte deutlich den großen Einfluss der gewählten Zerkleinerungsmethode, welche die Gelstruktur der Formulierungen nachhaltig in Richtung Flüssigkeitscharakter veränderte. Durch den Vergleich der rheometrischen Eigenschaften der selbst hergestellten Formulierungen mit den Werten am Markt verfügbarer Fertigarzneimittel konnten für die untersuchten Gelbildner jeweils obere Konzentrationsgrenzen ermittelt werden, bei denen eine einfache Applikation durch dünne Kanülen gewährleistet ist. Für die Formulierungen mit Miglyol 812 liegen diese im Konzentrationsbereich bis 4% Rheopearl KL® und AlSt ALG V®, für die Formulierungen auf Basis von Sesamöl im Bereich bis 3% der beiden Hilfsstoffe.

Die Untersuchung der in vitro und in vivo Wirkstofffreisetzung erfolgte in den weiteren Versuchen. Die in vitro Untersuchungen der Formulierungen mit geringen Hilfsstoffanteilen und überwiegendem Flüssigkeitscharakter belegten eine sehr rasche und unmittelbare Wirkstoffabgabe. Hingegen konnte bei den Formulierungen mit höheren Anteilen an Gelbildner und rheologischem Feststoffcharakter nur geringe bis keine Wirkstofffreisetzung beobachtet werden. In den in vivo Untersuchungen konnten für die Formulierungen mit 3% und 5% AlSt ALG V® in Miglyol 812 und Sesamöl deutlich erhöhte hGH Spiegel bis Tag 7, in der Kombination 5% AlSt ALG V® Sesamöl bis Tag 14 bestimmt werden. Der in der Zielsetzung der Arbeit gewünschte Effekt einer verzögerten Wirkstofffreigabe bei nachhaltiger Anhebung der Wirkstoffspiegel konnte durch die Formulierung in einem Aluminiumstearat Oleogel eindeutig erzielt werden. Die Freisetzungscharakteristik der Rheopearl KL® haltigen Formulierungen kann anhand der Ergebnisse der ersten in vivo Studie nicht abschließend beurteilt werden. Für diese Formulierungen war das gewählte Probenzugsintervall in Woche 1 mit Messpunkten an Tag 1 und Tag 7 zu groß, sodass die hGH Spiegel am zweiten Probenzug bereits wieder auf Ausgangsniveau lagen. Alternative in vivo Studien mit engerem Probenzugsintervall können diese Formulierungen besser abbilden.

Die Untersuchungen zur chemischen Stabilität der hergestellten hGH Suspensionen zeigten bei 2-8°C Einlagerung eine vergleichbare Stabilität wie das nicht suspendierte lyophilisierte Handelsprodukt mit vollständigem Erhalt als hGH Monomer und nur geringer Oxidationsneigung. Bei 25°C und 40°C konnte insbesondere bei den hilfsstoffhaltigen Oleogelen, zu deren Herstellung höhere Temperaturen notwendig sind, leicht erhöhte Aggregatbildung und z.T. starke Oxidation beobachtet werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass durch die untersuchten Methoden auf einfache Weise applikationsfertige Formulierungen hergestellt werden können, die bei angemessener Lagerung bei 2-8°C stabile Eigenschaften aufweisen und in Abhängigkeit des gewählten Additivs eine nachhaltige Wirkstofffreisetzung bis zu 14 Tagen besitzen.

IV. Literaturverzeichnis

1. Ahmed,A. and Greenwood,N.; Lymphadenopathy Following Repeated Oil-Based Injections; J.Pathol.; 111 (1973) 207 - 208.

2. Akers,M.J., Fites,A.L. and Robison,R.L.; Formulation Design and Development of Parenteral Suspensions; J.Parenter.Sci.Technol.; 41 (1987) 88 - 96.

3. al Hammami,O.M. and Richards,J.H.; Effects of Excipients on the Bioavailability of Sodium Salicylate From Orally Administered, Oily Suspensions; Pharmaceutica Acta Helvetiae; 71 (1996) 297 - 303.

4. Al Hindawi,M.K., James,K.C. and Nicholls,P.J.; Influence of Solvent on the Availability of Testosterone Propionate From Oily, Intramuscular Injections in the Rat; J.Pharm.Pharmacol.; 39 (1987) 90 - 95.

5. Arakawa,T., Prestrelski,S.J., Kenney,W.C. and Carpenter,J.F.; Factors Affecting Short-Term and Long-Term Stabilities of Proteins; Adv.Drug Deliv.Rev.; 10 (1993) 1 - 28.

6. Asimov,G.J. and Krouze,N.K.; The Lactogenic Preparations From the Anterior Pituitary and the Increase in Milk Yield Form Cows; Journal of Dairy Science; 20 (1937) 289 - 306.

7. Baerlocher GmbH; Analysenzertifikat Aluminiumstearat Alugel 30 HEP; (2003a) .

8. Baerlocher GmbH; Herstellungsprozess Aluminiumstearat Alugel 30 HEP; (2003b) .

9. Bauman,D.; Somatotropin; Encyclopedia of Animal Science; 2004 (2005) 806 - 809.

10. Becker,K.L.; Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism; 3. ed.; Lippincott Williams & Wilkins (2001).

11. Benson,H.A.E. and Prankerd,R.J.; Optimization of Drug Delivery. 6. Modified-Release Parenterals; Australian Journal of Hospital Pharmacy; 28 (1998) 99 - 104.

12. Berry,S.A., Fereira,P.J., Dehnad,H. and Muchnik,A.; Stable Non-Aqueous Single Phase Viscous Vehicles and Formulations Utilizing Such Vehicles;WO0045790 (2000) .

13. Broadhead,J., Rouan,S.K.E. and Rhodes,C.T.; The Spray Drying of Pharmaceuticals; Drug Development and Industrial Pharmacy; 18 (1992) 1169 - 1206.

14. Brooks,N.D. and Needham,G.F.; Injectable Extended-Release Formulations and Methods;US5352662 (1992) .

15. Buckwalter,F.H.; Repository Penicillin Compositions;US2507193 (1950) .

16. Burgess,D.J., Crommelin,D.J.A., Hussain,A.S. and Chen,M.L.; Assuring Quality and Performance of Sustained and Controlled Release Parenterals; European Journal of Pharmaceutical Sciences; 21 (2004) 679 - 690.

17. Cady,S.M. and Langer,R.; Overview of Protein Formulations for Animal Health Applications; J.Agric.Food Chem.; 40 (1992) 332 - 336.

18. Cady,S.M. and Steber,W.D.; Controlled Delivery of Somatotropins; Pharm.Biotechnol.; 10 (1997) 289 - 317.

19. Chang,H.C., Li,L.C., Marsh,K.C., Tian,Y. and Grischeau,D.; Parenteral Sustained-Release Dosage Forms of Butorphanol for Dogs; Int.J.Pharm.; 176 (1999) 147 - 156.

20. Chiba Flour Milling Ltd.; Rheopearl Series; (2004) .

21. Chien,Y.W.; Long-Acting Parenteral Drug Formulations; J.Parenter.Sci.Technol.; 35 (1981) 106 - 139.

22. Cleland,J.L., Powell,M.F. and Shire,S.J.; The Development of Stable Protein Formulations: a Close Look at Protein Aggregation, Deamidation, and Oxidation; Crit Rev.Ther.Drug Carrier Syst.; 10 (1993) 307 - 377.

23. Cleland,J.L., Duenas,E., Daugherty,A., Marian,M., Yang,J., Wilson,M., Celniker,A.C., Shahzamani,A., Quarmby,V., Chu,H., Mukku,V., Mac,A., Roussakis,M., Gillette,N., Boyd,B., Yeung,D., Brooks,D., Maa,Y.F., Hsu,C. and Jones,A.J.S.; Recombinant Human Growth Hormone Poly(Lactic-Glycolic Acid) (PLGA) Microspheres Provide a Long Lasting Effect; JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE; 49 (1997a) 193 - 205.

24. Cleland,J.L., Johnson,O.L., Putney,S. and Jones,A.J.S.; Recombinant Human Growth Hormone Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Microsphere Formulation Development; Advanced Drug Delivery Reviews; 28 (1997b) 71 - 84.

25. Cotes,P.M. and CRICHTON,J.A.; Galactopoietic Activity of Purified Anterior Pituitary Growth Hormone; Nature; 164 (1949) 992 - 998.

26. Crommelin,D.J.A. and De Blaey,C.J.; In Vitro Release Studies on Drugs Suspended in Non-Polar Media. II. The Release of Paracetamol and Chloramphenicol From Suspensions in Liquid Paraffin; Int.J.Pharm.; 6 (1980) b 29 - 42.

27. Crommelin,D.J.A. and De Blaey,C.J.; In Vitro Release Studies on Drugs Suspended in Nonpolar Media. I. Release of Sodium Chloride From Suspensions in Liquid Paraffin; Int.J.Pharm.; 5 (1980) a 305 - 316.

28. Darsow,U., Bruckbauer,H., Worret,W.I., Hofmann,H. and Ring,J.; Subcutaneous Oleomas Induced by Self-Injection of Sesame Seed Oil for Muscle Augmentation; J.Am.Acad.Dermatol.; 42 (2000) 292 - 294.

29. Davies,M.; The Reality of Glycemic Control in Insulin Treated Diabetes: Defining the Clinical Challenges; International Journal of Obesity; 28 (2004) S14 - S22.

30. Davis,F.F.; Protected Polypeptide, Essentially Nonimmunogenic, Enzymically Active Substance, and Method for the Extensive Suppression of the Immunogenicity of a Polypeptide;DE2433883 (1976) .

31. Davis,J.M., Matalon,L., Watanabe,M.D., Blake,L. and Metalon,L.; Depot Antipsychotic Drugs. Place in Therapy; Drugs; 47 (1994) 741 - 773.

32. Defelippis,M.R. and Akers,M.J.; Peptides and Proteins As Parenteral Suspensions: an Overview of Design, Development, and Manufacturing Considerations; (2000) .

33. Dexter,M.B. and Shott,M.J.; The Evaluation of the Force to Expel Oily Injection Vehicles From Syringes; JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACOLOGY; 31 (1979) 497 - 500.

34. Dunn,R.L.; Biodegradable in-Situ Forming Implants and Methods of Producing the Same;US4938763 (1990) 13 -.

35. Dupuis,L., Aucoutturier,J. and Roso,A.; Injectable Water in Oil Emulsions: Syringeability and Rheological Properties; (2002) .

36. Durect Corporation; Durect Development Pipline; DURECT Corporation, Corporate Headquarters, 2 Results Way, Cupertino, CA 95014; (2007) .

37. Eckhardt,B.M., Oeswein,J.Q. and Bewley,T.A.; Effect of Freezing on Aggregation of Human Growth Hormone; Pharmaceutical Research; 8 (1991) 1360 - 1364.

38. Eliaz,R.E. and Kost,J.; Characterization of a Polymeric PLGA-Injectable Implant Delivery System for the Controlled Release of Proteins; J.Biomed.Mater.Res.; 50 (2000) 388 - 396.

39. Evans,E.F., Proctor,J.D., Fratkin,M.J., Velandia,J. and Wasserman,A.J.; Blood Flow in Muscle Groups and Drug Absorption; Clinical Pharmacology & Therapeutics (St.Louis, MO, United States); 17 (1975) 44 - 47.

40. Falkiewicz,M.J.; Theory of Suspensions in: Pharmaceutical Dosage Forms 2; Dekker (1991); 17 - 51.

41. Ferro GmbH.; Analysenzertifikat Aluminiumstearat Gellant; (2003a) .

42. Ferro GmbH.; Analysenzertifikat Aluminiumstearat NF; (2003b) .

43. Floyd,A.G. and Jain,S.; Injectable Emulsions and Suspensions in: Pharmaceutical Dosage Forms ; Dekker (1991); 261 - 318.

44. Foster,T.P., Moseley,W.M., Caputo,J.F., Alaniz,G.R., Leatherman,M.W., Yu,X., Claflin,W.H., Reeves,D.R., Cleary,D.L., Zantello,M.R., Krabill,L.F. and Wiest,J.R.; Sustained Elevated Serum Somatotropin

Concentrations in Holstein Steers Following Subcutaneous Delivery of a Growth Hormone Releasing Factor Analog Dispersed in Water, Oil or Microspheres; J.Controlled Release; 47 (1997) 91 - 99.

45. Franks,F.; Accelerated Stability Testing of Bioproducts: Attractions and Pitfalls; TRENDS IN BIOTECHNOLOGY; 12 (2000) 114 - 117.

46. Frokjaer,S. and Otzen,D.E.; Protein Drug Stability: A Formulation Challenge; Nature Reviews Drug Discovery; 4 (2005) 298 - 306.

47. Gallardo,V., Ruiz,M.A. and Delgado,A.V.; Pharmaceutical Suspensions and Their Applications; Drugs Pharm.Sci.; 105 (2000) 409 - 464.

48. Gao,Z.h., Crowley,W.R., Shukla,A.J., Johnson,J.R. and Reger,J.F.; Controlled Release of Contraceptive Steroids From Biodegradable and Injectable Gel Formulations: in Vivo Evaluation; Pharmaceutical Research; 12 (1995) 864 - 868.

49. Geller L.; Oily ACTH-Peptide Preparatoins for Injections;US3869549 (1975) .

50. Genentech Corp.; Genentech and Alkermes Announce Decision to Discontinue Commercialization of Nutropin Depot; Genentech Inc.,1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; (2004) .

51. Gietz,U., Arvinte,T., Mader,E., Oroszlan,P. and Merkle,H.P.; Sustained Release of Injectable Zinc-Recombinant Hirudin Suspensions. Development and Validation of in Vitro Release Model; Eur.J.Pharm.Biopharm.; 45 (1998) 259 - 264.

52. Gin,H. and Hanaire-Broutin,H.; Reproducibility and Variability in the Action of Injected Insulin; Diabetes & Metabolism; 31 (2005) 7 - 13.

53. Goldenberg,M.S., Shan,D. and Beekman,A.C.; Polyol/Oil Suspensions for the Sustained Release of Proteins;WO0038652 (1999) .

54. Gomez-Perez,F.J. and Rull,J.A.; Insulin Therapy: Current Alternatives; Archives of Medical Research; 36 (2005) 258 - 272.

55. Gonzalez-Caballero,F. and de Dios Garcia Lopez-Duran,J.; Suspension Formulation; Drugs Pharm.Sci.; 105 (2000) 127 - 190.

56. Graham,D.T. and Pomeroy,A.R.; An in-Vitro Test for the Duration of Action of Insulin Suspensions; J.Pharm.Pharmacol.; 36 (1984) 427 - 430.

57. Gunstone,F.D. and Harwood,J.L.; The Lipid Handbook; 2; Chapman and Hall (1994).

58. Hageman,M.J.; Sustained-Release Protein Formulations With PEG and Triacetin;WO9406452 (1993) .

59. Hageman,M.J., Bauer,J.M., Possert,P.L. and Darrington,R.T.; Preformulation Studies Oriented Toward Sustained Delivery of Recombinant Somatotropins; J.Agric.Food Chem.; 40 (1992) 348 - 355.

60. Hahn,S.K., Kim,S.J., Kim,M.J. and Kim,D.H.; Characterization and in Vivo Study of Sustained-Release Formulation of Human Growth Hormone Using Sodium Hyaluronate; Pharm Res.; 21 (2004) 1374 - 1381.

61. Hardee,G.E., Baggot,J.D. and Editors.; Development and Formulation of Veterinary Dosage Forms, Second Edition, Revised and Expanded. [In: Drugs Pharm. Sci., 1998; 88]; (1998).

62. Hatefi,A. and Amsden,B.; Biodegradable Injectable in Situ Forming Drug Delivery Systems; JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE; 80 (2002) 9 - 28.

63. Heinemann,L.; Variability of Insulin Absorption and Insulin Action; Diabetes Technology & Therapeutics; 4 (2002) 673 - 682.

64. Heintz,D.N. and Jeng,Y.N.; Non-Aqueous Injectable Formulation Preparation With PH Adjusted for Extended Release of Somatotropin;US6664234 (2001) .

65. Hermeling,S., Crommelin,D.J., Schellekens,H. and Jiskoot,W.; Structure-Immunogenicity Relationships of Therapeutic Proteins; Pharm Res.; 21 (2004) 897 - 903.

66. Herrmann,S., Mohl,S., Siepmann,F., Siepmann,J. and Winter,G.; New Insight into the Role of Polyethylene Glycol Acting As Protein Release Modifier in Lipidic Implants; Pharm.Res.; (2007a) .

67. Herrmann,S., Winter,G., Mohl,S., Siepmann,F. and Siepmann,J.; Mechanisms Controlling Protein Release From Lipidic Implants: Effects of PEG Addition; J.Control Release; 118 (2007b) 161 - 168.

68. Hirano,K., Ichihashi,T. and Yamada,H.; Studies on the Absorption of Practically Water-Insoluble Drugs Following Injection. I. Intramuscular Absorption From Water-Immiscible Oil Solutions in Rats; Chem Pharm.Bull.(Tokyo); 29 (1981) 519 - 531.

69. Howard,J.R. and Hadgraft,J.; The Clearance of Oily Vehicles Following Intramuscular and Subcutaneous Injections in Rabbits; International Journal of Pharmaceutics; 16 (1983) 31 - 39.

70. Janssen-Cilag GmbH; Fachinformaton Risperal Consta; (2005) .

71. Jenapharm AG; Fachinformation Jenacillin O2 Mega; (2004) .

72. Jeng,Y.N. and Patel,K.R.; Non-Aqueous Injectable Formulations for Extended Release of Somatotropin;WO0162296 (2001) .

73. Johnson,O.L., Cleland,J.L., Lee,H.J., Charnis,M., Duenas,E., Jaworowicz,W., Shepard,D., Shahzamani,A., Jones,A.J. and Putney,S.D.; A Month-Long Effect From a Single Injection of Microencapsulated Human Growth Hormone; Nat.Med.; 2 (1996a) 795 - 799.

74. Johnson,O.L., Cleland,J.L., Lee,H.J., Charnis,M., Duenas,E., Jaworowicz,W., Shepard,D., Shahzamani,A., Jones,A.J. and Putney,S.D.; A Month-Long Effect From a Single Injection of Microencapsulated Human Growth Hormone; Nat.Med.; 2 (1996b) 795 - 799.

75. Johnson,O.L., Jaworowicz,W., Cleland,J.L., Bailey,L., Charnis,M., Duenas,E., Wu,C., Shepard,D., Magil,S., Last,T., Jones,A.J.S. and Putney,S.D.; The Stabilization and Encapsulation of Human Growth Hormone into Biodegradable Microspheres; Pharmaceutical Research; 14 (1997) 730 - 735.

76. Karlsson,G., Gellerfors,P., Persson,A., Noren,B., Edlund,P.O., Sandberg,C. and Birnbaum,S.; Separation of Oxidized and Deamidated Human Growth Hormone Variants by Isocratic Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography; Journal of Chromatography, A; 855 (1999) 147 - 155.

77. Kemp,S.F., Fielder,P.J., Attie,K.M., Blethen,S.L., Reiter,E.O., Ford,K.M., Marian,M., Dao,L.N., Lee,H.J. and Saenger,P.; Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Characteristics of a Long-Acting Growth Hormone (GH) Preparation (Nutropin Depot) in GH-Deficient Children; J.Clin.Endocrinol.Metab; 89 (2004) 3234 - 3240.

78. Kim,S.J., Hahn,S.K., Kim,M.J., Kim,D.H. and Lee,Y.P.; Development of a Novel Sustained Release Formulation of Recombinant Human Growth Hormone Using Sodium Hyaluronate Microparticles; J.Control.Release; 104 (2005) 323 - 335.

79. Knepp,V.M., Muchnik,A., Oldmark,S. and Kalashnikova,L.; Stability of Nonaqueous Suspension Formulations of Plasma Derived Factor IX and Recombinant Human Alpha Interferon at Elevated Temperatures; Pharm.Res.; 15 (1998) 1090 - 1095.

80. Krishnamurthy,R. and Manning,M.C.; The Stability Factor: Importance in Formulation Development; Curr.Pharm Biotechnol.; 3 (2002) 361 - 371.

81. Larsen,D.B., Fredholt,K. and Larsen,C.; Addition of Hydrogen Bond Donating Excipients to Oil Solution: Effect on in Vitro Drug Release Rate and Viscosity; European Journal of Pharmaceutical Sciences; 13 (2001) 403 - 410.

82. Larsen,D.B.; Parenteral Depot Formulatios - Pharmaceutical Chemical Characterization of Oil Solutions; (2001).

83. Larsen,S.W.; Parenteral Oil Depots - Applicability of the Prodrug Approach to Modify Lipophilicity and Release Rate; (2003).

84. Lee,G.; Spray-Drying of Proteins; Pharmaceutical Biotechnology; 13 (2002) 135 - 158.

85. Lee,J.C.; Biopharmaceutical Formulation; Curr.Opin.Biotechnol.; 11 (2000) 81 - 84.

86. Lippold,B.C.; Depot Preparations; Pharmacy International; 1 (1980) 60 - 63.

87. Loncar,E., Lomic,G., Radomir,V. and Ljiljana,K.; Preparation and Charakterization of Aluminium Stearate; Acta Periodica Technologica; 34 (2003) 55 - 60.

88. Maa,Y.F. and Prestrelski,S.J.; Biopharmaceutical Powders: Particle Formation and Formulation Considerations; Current Pharmaceutical Biotechnology; 1 (2000) 283 - 302.

89. Mackey,M.A., Conway,A.J. and Handelsman,D.J.; Tolerability of Intramuscular Injections of Testosterone Ester in Oil Vehicle; Hum.Reprod.; 10 (1995) 862 - 865.

90. Mandal,T.K.; Inhaled Insulin for Diabetes Mellitus; American Journal of Health-System Pharmacy; 62 (2005) 1359 - 1364.

91. Maniar,M. and Domb,A.J.; Controlled-Release Microparticulate Delivery System for Proteins;WO9214449 (1992) .

92. Manning,M.C., Patel,K. and Borchardt,R.T.; Stability of Protein Pharmaceuticals; Pharm.Res.; 6 (1989) 903 - 918.

93. Marder,S.R., Hubbard,J.W., Van,P.T. and Midha,K.K.; Pharmacokinetics of Long-Acting Injectable Neuroleptic Drugs: Clinical Implications; Psychopharmacology.(Berl.); 98 (1989) 433 - 439.

94. Matsubara,K., Irie,T. and Uekama,K.; Controlled Release of the LHRH Agonist Buserelin Acetate From Injectable Suspensions Containing Triacetylated Cyclodextrins in an Oil Vehicle; JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE; 31 (1994) 173 - 180.

95. McNamara,M.K., Charman,W.N. and Charman,S.A.; Stabilized Growth Hormone Pharmaceutical Formulation;WO9729767 (1997) .

96. Medlicott,N.J., Waldron,N.A. and Foster,T.P.; Sustained Release Veterinary Parenteral Products; Advanced Drug Delivery Reviews; 56 (2004) 1345 - 1365.

97. Mendelow,A.Y., Forsyth,A., Baillie,A.J. and Florence,A.T.; In Vitro Release of Nickel Sulfate of Varying Particle Size From Paraffin Bases; International Journal of Pharmaceutics; 49 (1987) 29 - 37.

98. Mitchell,J.W.; Prolonged Release of Biologically Active Somatotropin;EP 5411951 (1992) .

99. Mitchell,J.W.; Prolonged Release of Biologically Active Polypeptides;EP 177478 (1985) .

100. Mohl,S. and Winter,G.; Continuous Release of Rh-Interferon (Alpha-2a From Triglyceride Implants: Storage Stability of the Dosage Forms; Pharm.Dev.Technol.; 11 (2006) 103 - 110.

101. Mohl,S. and Winter,G.; Continuous Release of Rh-Interferon Alpha-2a From Triglyceride Matrices; J.Control Release; 97 (2004) 67 - 78.

102. Molineux,G.; Pegylation: Engineering Improved Biopharmaceuticals for Oncology; Pharmacotherapy; 23 (2003) 3S - 8S.

103. Monsanto Co.,U.; Monsanto Posilac Homepage; (2002) .

104. Nash,R.A.; Pharmaceutical Suspensions in: Pharmaceutical Dosage Forms 2; Dekker (1991); 1 - 46.

105. Nema,S., Washkuhn,R.J. and Brendel,R.J.; Excipients and Their Use in Injectable Products; PDA J.Pharm.Sci.Technol.; 51 (1997) 166 - 171.

106. Novo Nordisk; AERx® IDMS: Type 1 and 2 Diabetes: Phase 3 Study Initiated; Novo Nordisk A/S, Novo Allé, 2880 Bagsværd, DENMARK; (2006) .

107. O'Keefe,S.F., Wiley,V.A. and Knauft,D.A.; Comparison of Oxidative Stability of High- and Normal-Oleic Peanut Oils; Journal of the American Oil Chemists' Society; 70 (1993) 489 - 492.

108. Okumu,F.W., Dao,I.N., Fielder,P.J., Dybdal,N., Brooks,D., Sane,S. and Cleland,J.L.; Sustained Delivery of Human Growth Hormone From a Novel Gel System: SABER; Biomaterials; 23 (2002) 4353 - 4358.

109. Okumu,F.;
Sustained Release Formulations of Growth Hormone;WO0178683 (2001) .

110. Packhaeuser,C.B., Schnieders,J., Oster,C.G. and Kissel,T.; In Situ Forming Parenteral Drug Delivery Systems: an Overview; European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics; 58 (2004) 445 - 455.

111. Parkins,D.A. and Lashmar,U.T.; The Formulation of Biopharmaceutical Products; Pharm.Sci.Technol.Today; 3 (2000) 129 - 137.

112. Peter Greven GmbH; Analysenzertifikat Aluminiumstearat ALG-V; (2003) .

113. Pfizer Deutschland GmbH; Inhalatives Insulin – Neue Perspektiven in Der Insulintherapie, Pressemitteilung Pfizer Deutschland; (2006) .

114. Pharmacia GmbH; Fachinformation Genotropin 16 I.E Multidose; (2004) .

115. Przybylski,R., Malcolmson,L.J., Eskin,N.A.M., Durance-Tod,S., Mickle,J. and Carr,R.; Stability of Low-Linolenic Acid Canola Oil to Accelerated Storage at 60 DegC; Lebensmittel-Wissenschaft Und -Technologie; 26 (1993) 205 - 209.

116. Radwan,H.H., Plattner,H.J., Menge,U. and Diekmann,H.; The 92-KDa Chitinase From Streptomyces Olivaceoviridis Contains a Lysine-C Endoproteinase at Its N-Terminus; FEMS.Microbiol.Lett.; 120 (1994) 31 - 35.

117. Rathbone,M.J.; Discussion on the in Vitro Test System Design; (2002) .

118. Rathbone,M.J., Shen,J., Fawcett,J.P., Ogle,C.R., Burggraaf,S. and Bunt,C.R.; Stability Testing of Veterinary Drug Products; (2000a) 333 - 353.

119. Rathbone,M.J., Shen,J., Ogle,C.R., Burggraaf,S. and Bunt,C.R.; In Vitro Drug Release Testing of Controlled Release Veterinary Drug Products; (2000b) 311 - 331.

120. Realdon,N., Dal Zotto,M., Ragazzi,E. and Dalla Fini,G.; Drug Release From Lipogels According to Gelling Conditions and Mechanical Treatment; Drug Development and Industrial Pharmacy; 22 (1996) 125 - 134.

121. Reddy,K.R., Modi,M.W. and Pedder,S.; Use of Peginterferon A1fa-2a (40 KD) (Pegasys (R)) for the Treatment of Hepatitis C; Advanced Drug Delivery Reviews; 54 (2002) 571 - 586.

122. Reddy,K.R.; Controlled-Release, Pegylation, Liposomal Formulations: New Mechanisms in the Delivery of Injectable Drugs; Ann.Pharmacother.; 34 (2000) 915 - 923.

123. Reichert,P., Hruza,A.W., Nagabhushan,N. and Nagabhushan,T.; Crystalline Protein Controlled-Release Compositions;WO9618417 (1995) 40 - 46.

124. Reithmeier,H., Herrmann,J. and Gopferich,A.; Development and Characterization of Lipid Microparticles As a Drug Carrier for Somatostatin; Int.J.Pharm.; 218 (2001a) 133 - 143.

125. Reithmeier,H., Herrmann,J. and Gopferich,A.; Lipid Microparticles As Parenteral Controlled Release Device for Peptides; JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE; 73 (2001b) 339 - 350.

126. Reslow,M., Bjoern,S., Drustrup,J., Gustafsson,N.O., Joensson,M. and Laakso,T.; A Controlled-Release Starch Microparticle for Parenteral Administration;WO02028375 (2001) .

127. Ritschel,W.A. and Suzuki,K.; In Vitro Testing of Injectability; Pharm.Ind.; 41 (1979) 468 - 475.

128. Roberts,M.J., Bentley,M.D. and Harris,J.M.; Chemistry for Peptide and Protein PEGylation; Advanced Drug Delivery Reviews; 54 (2002) 459 - 476.

129. Sasol GmbH; Dynasan Product Information; (2004) .

130. Schultz,K., Moellgaard,B., Frokjaer,S. and Larsen,C.; Rotating Dialysis Cell As in Vitro Release Method for Oily Parenteral Depot Solutions; International Journal of Pharmaceutics; 157 (1997) 163 - 169.

131. Schultz,K.; Parenteral Oily Depot Formulations - In Vitro and in Vivo Characterisation; (1997).

132. Schwach-Abdellaoui,K., Moreau,M., Schneider,M., Boisramc,B. and Gurny,R.; Controlled Delivery of Metoclopramide Using an Injectable Semi-Solid Poly(Ortho Ester) for Veterinary Application; International Journal of Pharmaceutics; 248 (2002) 31 - 37.

133. Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health; Report on Public Health Aspects of the Use of Bovine Somatotropin - 15-16 March 1999; (1999) .

134. Senior,J.H. and Radomsky,M.; Sustained-Release Injectable Products; (2000).

135. Shah,V.P., Siewert,M., Dressman,J., Moeller,H. and Brown,C.K.; Dissolution/in Vitro Release Testing of Special Dosage Forms; Dissolution Technologies; 9 (2002) 6 - 10.

136. Siewert,M., Dressman,J. and Brown,C.K.; FIP/AAPS Guidelines to Dissolution/in Vitro Release Testing of Novel/Special Dosage Forms; AAPS PharmSciTech; 4 (2003) 43 - 52.

137. Silbernagl,S. and Klinke,R.; Lehrbuch Der Physiologie; 1; Thieme (1994).

138. Sims,E.E. and Worthington,H.E.C.; Formulation Studies on Certain Oily Injection Products; Int.J.Pharm.; 24 (1985) 287 - 296.

139. Sinha,V.R. and Trehan,A.; Biodegradable Microspheres for Protein Delivery; JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE; 90 (2003) 261 - 280.

140. Strickley,R.G.; Solubilizing Excipients in Oral and Injectable Formulations; Pharm Res.; 21 (2004) 201 - 230.

141. Strickley,R.G.; Parenteral Formulations of Small Molecules Therapeutics Marketed in the United States (1999). Part III; PDA JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCE AND TECHNOLOGY; 54 (1999) 152 - 169.

142. Sukumar,M., Storms,S.M. and De Felippis,M.R.; Non-Native Intermediate Conformational States of Human Growth Hormone in the Presence of Organic Solvents; Pharm Res.; 22 (2005) 789 - 796.

143. Sun,Y.; Discussion on the in Vitro Test System Design; (2002) .

144. Svendsen,O., Dencker,S.J., Fog,R., Gravem,A.O. and Kristjansen,P.; Microscopic Evidence of Lymphogenic Absorption of Oil in Humans Receiving Neuroleptic Oily Depot Preparations Intramuscularly; Acta Pharmacol.Toxicol.(Copenh.); 47 (1980) 157 - 158.

145. Swarbrick,J. and Boylan,J.C.; Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Second Edition; (2001).

146. Takeda GmbH; Fachinformationen Enantone / Trenantone; (2005) .

147. Tipton,A.J.; High Viscosity Liquids for Controlled Delivery of Biologically Active Substances;WO9639995 (1996) .

148. Tipton,A.J.; Sucrose Acetate Isobutyrate (SAIB) for Parenteral Delivery; Drugs and the Pharmaceutical Sciences; 126 (2003) 679 - 687.

149. Traul,K.A., Driedger,A., Ingle,D.L. and Nakhasi,D.; Review of the Toxicologic Properties of Medium-Chain Triglycerides; Food Chem.Toxicol.; 38 (2000) 79 - 98.

150. Trubo,R.; Interest in Inhaled Insulin Grows; Jama-Journal of the American Medical Association; 294 (2005) 1195 - 1196.

151. Uekama,K., Arima,H., Irie,T., Matsubara,K. and Kuriki,T.; Sustained Release of Buserelin Acetate, a Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Agonist, From an Injectable Oily Preparation Utilizing Ethylated .Beta.-Cyclodextrin; J.Pharm.Pharmacol.; 41 (1989) 874 - 876.

152. University of California,T.O.o.t.P.; UC Monsanto Reach 100 Million Dollar Settlement in Growth Hormone Patent Case; University of Callifornia, Office of the President, 1111 Franklin St., 12th FloorOakland, CA 94607-5200; (2006) .

153. Uptima GmbH; BCA Assay Protein Quantitation Kit; (2004) .

154. VfA e.V.; Forschung Und Entwicklung Konkret: Gentechnische Arzneimittel Hightech Im Dienst Der Patienten; (2006) .

155. VfA e.V.; Zulassungen Für Gentechnisch Hergestellte Arzneimittel; (2007) .

156. Wang,W.; Protein Aggregation and Its Inhibition in Biopharmaceutics; Int.J.Pharm; 289 (2005) 1 - 30.

157. Wang,W.; Instability, Stabilization, and Formulation of Liquid Protein Pharmaceuticals; Int.J.Pharm.; 185 (1999) 129 - 188.

158. Wang,Y.C. and Hanson,M.A.; Technical Report Nr.10 Parenteral Formulations of Proteins and Peptides: Stability and Stabilizers; PDA J.Pharm.Sci.Technol.; 42 (1988) S3 - S25.

159. Welch,H.; Liquid Injectable Oil-Pectin-Drug Therapeutic Compositions;US2491537 (1949) .

160. Wissing,S.A., Kayser,O. and Muller,R.H.; Solid Lipid Nanoparticles for Parenteral Drug Delivery; Advanced Drug Delivery Reviews; 56 (2004) 1257 - 1272.

161. Young,F.G.; Experimental Stimulation (Galactopoiesis) of Lactation; British Medical Bulletin; 5 (1947) 155 - 160.

162. Zingerman,J.R., Pope,D.G., Wilkinson,P.K. and Perfetto,L.; Automatic Injector Apparatus for Studying the Injectability of Parenteral Formulations for Animal Health; International Journal of Pharmaceutics; 36 (1987) 141 - 145.

163. Zuidema,J., Kadir,F., Titulaer,H.A.C. and Oussoren,C.; Release and Absorption Rates of Intramuscularly and Subcutaneously Injected Pharmaceuticals. II; Int.J.Pharm.; 105 (1994) 189 - 207.

Lebenslauf:

Name	Andreas Rutz
Geburtsdatum	28.02.1974
Anschrift	Sonnenstr.11, 91741 Dornhausen
Berufliche Tätigkeiten	ab 01.02.2006
	Leitung der Abteilung zentrale Arzneimittelherstellung
	Apotheke Klinikum Nürnberg
	01.11.2001 – 31.12.2005
	Doktorand am Department Chemie und Pharmazie
	Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie
	AK Prof. Dr. W. Frieß
	Ludwig-Maximilians Universität München
	01.01.2001 – 31.10.2001
	IDEA AG München
	01.01.2000 – 31.12.2000
	Apotheke des Klinikums Rechts der Isar TU München
Approbation	Dezember 1999
	Approbation zum Apotheker
	Regierung von Unterfranken Würzburg
	1999 3. Staatsexamen
Praktikum	01.08.1999 – 31.10.1999
	Apotheke des Klinikums Rechts der Isar TU München
	01.11.1998 – 31.07.1999
	Antonius–Apotheke Aschaffenburg
Studium	01.11.1994 – 30.10.1998
	Julius–Maximilians–Universität Würzburg
	1998 2. Staatsexamen, Preis der Fakultät
	1996 1. Staatsexamen
Zivildienst	01.08.1993 – 31.10.1994
	Krankenhaus Treuchtlingen
Schulausbildung	1984 – 1993
	Simon–Marius–Gymnasium Gunzenhausen