

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

Herstellung partikulärer Formulierungen für
rekombinante Proteine mittels Wirbelschicht

Matthias Ganz
aus
Würzburg

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 selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 25. Oktober 2007



Matthias Ganz

Dissertation eingereicht am 05. November 2007

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Frieß
2. Gutachter: Prof. Dr. Gerhard Winter

Mündliche Prüfung am 06. Dezember 2007

Danksagung

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

Herrn Prof. Dr. W. Frieß danke ich für die Möglichkeit in einem innovativen Forschungsgebiet tätig sein zu dürfen, seine wissenschaftliche Anleitung sowie die anregende Kritik bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Gerhard Winter danke ich für die Möglichkeit die hervorragende apparative Ausstattung des Lehrstuhls nutzen zu können, für fachliche Anregungen und die Organisation zahlreicher Freizeitaktivitäten.

Der Firma Glatt, insbesondere Herrn Dr. J. Dressler, danke ich für die Kooperation bei der Erstellung der Arbeit, für die Bereitstellung der Mini-Glatt Anlage und der Möglichkeit Versuche im Technikum in Binzen durchführen zu können.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. S. Günther für seine Hilfe bei der Wiederinbetriebnahme der XPS Anlage und seine Einweisungen im Erstellen mathematischer Modelle danken.

Vielen Dank an die Kollegen des AK Prof. Frieß und AK Prof. Winter für die gemeinsame Zeit in München, für die freundschaftliche Unterstützung und die zahlreichen gemeinsamen Freizeitaktivitäten.

Meiner Freundin Virginie danke ich für Ihre Liebe und Unterstützung.

Ganz besonders danken möchte ich meinen Eltern und meinen Opa Richard Ganz† für die langjährige und uneingeschränkte Unterstützung.

Für meine Eltern

| | |
|---|-----------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1. Herstellung von Proteinpartikeln | 1 |
| 1.1.1. Wirbelschicht | 1 |
| 1.1.1.1. Geräteparameter | 2 |
| 1.1.1.2. Prozessparameter | 3 |
| 1.1.1.3. Steuerung der Trocknung | 4 |
| 1.1.1.4. Proteintrocknung in Wirbelschicht | 5 |
| 1.1.2. Alternative Verfahren zur Herstellung von Proteinpartikeln | 7 |
| 1.1.2.1. Sprühtrocknung | 7 |
| 1.1.2.2. Gefriertrocknung | 8 |
| 1.1.2.3. Sprühgefriertrocknung | 8 |
| 1.1.2.4. Präzipitation | 9 |
| 1.1.2.5. Superkritische Fluids | 9 |
| 1.2. Röntgenfotoelektronenspektroskopie in der Pharmazie | 11 |
| 1.2.1. Grundlagen | 11 |
| 1.2.2. Qualitative Spektrenauswertung | 14 |
| 1.2.3. Quantitative Spektrenauswertung | 15 |
| 1.2.4. XPS in der Proteintrocknung | 18 |
| 2. Zielsetzung der Arbeit | 21 |
| 3. Material und Methoden | 23 |
| 3.1. Material | 23 |
| 3.1.1. Rekombinantes humanes Interleukin-11 | 23 |
| 3.1.2. Substanzen für Wirbelschichtprozesse | 23 |
| 3.1.3. Weitere Substanzen | 24 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2. Prozessanlagen | 25 |
| 3.2.1. GPCG-1 Anlage | 25 |
| 3.2.2. Mini-Glatt Anlage | 26 |
| 3.3. Analytische Methoden | 27 |
| 3.3.1. Charakterisierung von rhIL-11 | 27 |
| 3.3.1.1. SE-HPLC zur Analyse von Aggregaten | 28 |
| 3.3.1.2. RP-HPLC zur Analyse der Related Species | 28 |
| 3.3.1.3. RP-HPLC zur Analyse von oxidierten Methionin 58 | 29 |
| 3.3.1.4. Gelelektrophorese (SDS-Page) | 29 |
| 3.3.2. Laserbeugung | 29 |
| 3.3.3. Karl-Fischer | 30 |
| 3.3.4. Polarimetrie | 30 |
| 3.3.5. DSC | 30 |
| 3.3.6. XPS | 31 |
| 3.3.7. UV-Spektroskopie | 31 |
| 3.3.8. BET-Oberflächenmessung | 31 |
| 4. Ergebnisse und Diskussion | 32 |
| 4.1. Vergleichende Versuche in verschiedenen Anlagen | 32 |
| 4.1.1. Versuche in der GPCG-1 Anlage | 32 |
| 4.1.2. Versuche in der Mini-Glatt Anlage | 40 |
| 4.1.3. Zusammenfassung | 46 |
| 4.2. Optimierung der Mini-Glatt Anlage | 48 |
| 4.2.1. Abgesenkte Düse | 49 |
| 4.2.2. Modifizierter Materialbehälter und Düsenaufnahme | 53 |

| | |
|---|------------|
| 4.2.3. Weiter optimierter Materialbehälter | 57 |
| 4.2.4. Mini-Glatt Anlage mit Mikro-Kit | 60 |
| 4.2.5. Zusammenfassung | 61 |
| 4.3. Stabilität von rhIL-11 Formulierungen | 63 |
| 4.3.1. Trägermaterialien und Sprühlösungen ohne stabilisierende Zusätze | 63 |
| 4.3.2. Trägermaterialien und Sprühlösungen mit Trehalosezusatz | 70 |
| 4.3.3. MCC-Spheres und Sprühlösungen mit PS80 Zusatz | 76 |
| 4.3.4. Einfluss von Zuckerzusätzen in Kombination mit 0,02% PS80 | 80 |
| 4.3.5. Zusammenfassung | 88 |
| 4.4. XPS von rhIL-11 Produkten | 90 |
| 4.4.1. Spektren der Trägermaterialien, Trehalose und rhIL-11 | 90 |
| 4.4.2. XPS-Analyse von rhIL-11 gecoateten Trägern | 96 |
| 4.4.3. Beladung | 104 |
| 4.4.4. Berechnung der Bedeckung auf Basis der XPS Analysen | 106 |
| 4.4.5. Auswertung der Modelle | 112 |
| 5. Zusammenfassung | 119 |
| 6. Literatur | 125 |

Abkürzungen

| | |
|---------|------------------------------------|
| BE | Bindungsenergie |
| BET | Brunnauer, Emmet und Teller |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DSC | Differential scanning calorimetry |
| FD | Fluidisierungsdruck |
| FD | Fluidisierungsdruck |
| GPCG-1 | Glatt Partikel Coater Granulator-1 |
| IR | Infrarot |
| KAD | Konfiguration mit abgesenkter Düse |
| LDH | Lactat Dehydrogenase |
| MCC | Mikrokristalline Cellulose |
| NaSal | Natriumsalicylat |
| NIR | Nahinfrarot |
| NIST | National Institut of Standards |
| PS80 | Polysorbat 80 |
| rhGH | Recombinant human growth hormone |
| rhIL-11 | Recombinant human interleukin-11 |
| RP-HPLC | Reversed phase HPLC |
| RS | Related species |
| SD | Sprühdruck |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SE-HPLC | Größenausschluß-Chromatografie |
| SK | Standardkonfiguration |
| WS | Wirbelschicht |
| XPS | Röntgenfotoelektronenspektroskopie |

1 EINLEITUNG

1.1 HERSTELLUNG VON PROTEINPARTIKELN

Herausforderungen bei der Entwicklung rekombinanter Proteinarzneistoffe liegen in der aufwendigen Herstellung und Aufreinigung und der begrenzten physikalischen und chemischen Stabilität. Die geringe Stabilität von Proteinen ist eine der Hauptursachen für deren parenterale Verabreichung (Wang; 1999). Zur Stabilisierung werden Proteine häufig in eine feste Formulierung überführt, in den meisten Fällen wird dabei das Verfahren der Gefriertrocknung angewandt. Im Fall von gefriergetrockneten Produkten erfolgt die Applikation nach Rekonstitution auf parenteralem Weg. In den letzten Jahren wurden verschiedene Anstrengungen unternommen, Proteinarzneistoffe auf alternativen Wegen wie beispielsweise über die Lunge (Adjei et al.; 1997; Mackay et al.; 1994; Patton; 2000; Almer et al.; 2002; Bindra et al.; 2002, Harsch et al.; 2001) oder die Haut (Chen et al.; 2000; Burkoth et al.; 1999) zu verabreichen. Proteinhaltige partikuläre Formulierungen mit definierten Eigenschaften spielen dabei eine besondere Rolle, weshalb ein verstärkter Bedarf nach Herstellungsverfahren für solche Partikel besteht.

1.1.1 WIRBELSCHICHT

Das Auftragen von Proteinlösungen auf Partikel in der Wirbelschicht ist ein Ansatz um partikuläre Proteinformulierungen zu erhalten (Maa et al.; 2004a), 2004). Wirbelschichtanlagen werden in der pharmazeutischen Industrie seit langer Zeit in der Herstellung fester Darreichungsformen zum Trocknen, Granulieren und Überziehen eingesetzt (Olsen; 1989). Vorteile der Wirbelschicht liegen im schnellen Wärme- und Stoffübergang und einer schonenden Trocknung (Kristensen et al.; 1987) unterscheiden bei Wirbelschichtprozessen zwischen Geräte-, Produkt- und Prozessparametern, wobei letztere zu den am häufigsten untersuchten Parametern gehören.

1.1.1.1 GERÄTEPARAMETER

Verschiedenartige Wirbelschichtverfahren wie das Gleichstrom-, Gegenstrom- oder Tangentialstromverfahren ermöglichen die Herstellung von Produkten mit unterschiedlichen Eigenschaften (Olsen; 2002). In allen Verfahren wird eine möglichst hohe Produktdichte im Bereich des Sprühkegels der Düse angestrebt (Jones; 94). Das Überziehen von Partikeln wird in der überwiegenden Zahl der Fälle im Gleichstromverfahren (Bottom-Spray Verfahren) nach Wurster durchgeführt. Erst mit Hilfe des Gleichstromverfahrens nach Wurster ist es möglich Partikel bis zu einer unteren Grenze von 50µm zu überziehen (Fukumori et al.; 1991; Iyer et al.; 1993). Beim Wurster-Verfahren ist ein Steigrohr in den Produktbehälter integriert und die Düse ist am Siebboden angebracht. Die Luftdurchlässigkeit des Siebbodens ist durch Einsatz einer perforierten Lochplatte nach innen hin, also Richtung Düse erhöht. Die Partikel werden durch den Fluidisierungsstrom in Sprührichtung der Düse nach oben durch das Steigrohr gefördert (Jones; 1994). Nach Verlassen des Steigrohrs werden die Partikel in der Entspannungszone abgebremst und fallen am Rand des Produktbehälters nach unten zurück. Der Prozess verläuft dann optimal, wenn die Partikel in einer schnellen Wirbelbewegung innerhalb des Steigrohres aufsteigen und außerhalb des Steigrohrs langsam in den Produktbehälter zurückfallen. Die Bewegung der Partikel erfolgt bei diesem Verfahren vergleichsweise kontrolliert, so dass man einen einheitlicheren Überzug als im Gegenstromverfahren (Top-Spray Verfahren) erhält. Im Gegenstromverfahren erfolgt die Fluidisierung nach dem Zufallsprinzip. Verfahrensbedingt ist beim Gleichstromverfahren nach Wurster die Düse von einer hohen Zahl an Partikeln umgeben und die Sprühtropfen treffen in sehr kurzer Entfernung zur Düse auf Partikel. Es kommt zu einer gleichmäßigen Verteilung des zu versprühenden Gutes auf den Partikeln (Koester; 2001). Im Gegenstromverfahren ist die Partikelzahl im Bereich des Sprühkegels der Düse weniger dicht und die Sprühtropfen haben bis zum Auftreffen auf Partikel deutlich unterschiedliche Flugzeiten. Man erhält so einen weniger homogenen Überzug als mit dem Gegenstromverfahren (Christensen et al.; 1997). Wenn eine kontrollierte Wirkstofffreigabe über längere Zeit angestrebt wird ist das Gleichstrom-

verfahren in der Wurster Anordnung dem Gegenstromverfahren Verfahren vorzuziehen. Das Gegenstromverfahren wird vorrangig zur Granulation eingesetzt. In einigen Fällen wird es mit dem Ziel der Maskierung von schlechtem Geschmack oder dem Auftragen von Schutzüberzügen allerdings auch zum Überziehen von Partikeln genutzt (Jones; 1994).

1.1.1.2 PROZESSPARAMETER

Neben dem eingesetzten Wirbelschichtverfahren, gibt es bis zu 20 Produkt- und Prozessparameter die den Ablauf und das Ergebnis beeinflussen (Parikh et al.; 2002). Am wichtigsten sind Temperatur und Volumenstrom der Fluidisierungsluft, der an der Düse anliegende Sprühdruk und die Speiserate der Sprühflüssigkeit (Jones; 1985). Der Volumenstrom der Fluidisierungsluft bestimmt die Bewegung und Geschwindigkeit der Partikel im Wirbelbett und sollte deshalb während des Prozesses nicht verändert werden. Die Trocknungskapazität wird vom Volumenstrom, der Temperatur und der absoluten Feuchte der Fluidisierungsluft bestimmt (Menon et al.; 1996). Mit Erhöhung der Eingangstemperatur der Fluidisierungsluft steigt die Trocknungskapazität der Fluidisierungsluft an. Ein Vorteil der Prozessführung mit hohen Eingangstemperaturen ist, dass Schwankungen der absoluten Feuchte der Luft, wie sie beispielsweise saisonabhängig vorkommen, den Prozess weniger stark beeinflussen als bei niedrigen Eingangstemperaturen (Jones; 1985). Das Wasseraufnahmevermögen der Luft hängt zumindest theoretisch vom Luftdruck der Fluidisierungsluft ab (Koester; 2001). Je niedriger der Luftdruck, desto höher ist die Wasseraufnahmekapazität der Luft. Der Luftdruck in der Anlage ist allerdings kein Parameter der vom Anwender eingestellt werden kann. In gängigen Wirbelschichtanlagen wird die Fluidisierungsluft durch einen Ventilator angesaugt, so dass in der Anlage ein Unterdruck im Vergleich zur Umgebung besteht. Wirbelschichtanlagen im Kleinmaßstab mit geringem Luftdurchsatz wie beispielsweise die Mini-Glatt Anlage werden üblicherweise mit Druckluft betrieben.

Beim Überziehen in der Wirbelschicht stellt die Agglomeration von Partikeln die größte Herausforderung dar. Wenn die Kohäsionskräfte zwischen Partikeln die

Trennungskräfte der Partikel übersteigen kommt es zur Agglomeration (Maa et al.; 2004a). Bei der Wahl der Speisezufuhr ist die Kohäsivität zu feuchter Partikel meist der limitierende Faktor. Mit abnehmender Größe der zu überziehenden Partikel muss die Sprütrate deshalb niedriger gewählt werden (Schaefer et al.; 1978). Eine weitere Möglichkeit die Agglomeration zu verhindern ist die Erhöhung des Sprühdruks. Mit höherem Sprühdruk sinkt die Tropfengröße der versprühten Flüssigkeit. Eine lokale Überfeuchtungen der Partikel und damit eine Agglomeration kann so verhindert werden (Maa et al.; 1996). Die Speisezufuhr wird auch in Abhängigkeit der Wasseraufnahmekapazität der Fluidisierungsluft gewählt (Schaefer et al.; 1977). In der Regel hat die zur Fluidisierung verwendete Luft allerdings eine sehr hohe Wasseraufnahmekapazität. Faktoren, welche neben dem gewählten Verfahren, Gleich- oder Gegenstromverfahren die Einheitlichkeit des Coatings (Jones; 1994) beeinflussen, sind insbesondere die Anzahl der Zyklen und die Geschwindigkeit, mit der die Partikel durch den Sprühkegel der Düse fliegen. Die Konzentration der Sprühlösung, die Sprütrate und der Sprühdruk sind weitere Faktoren, welche die Einheitlichkeit des Coatings bestimmen.

1.1.1.3 STEUERUNG DER TROCKNUNG

Die Restfeuchte im Produkt ist ein entscheidender Parameter für die Stabilität von Proteinprodukten. Da es kein einfaches etabliertes Verfahren gibt, um die Restfeuchte im Verlauf des Wirbelschichtprozesses mitzuverfolgen, muß nach Auftragen der Sprühlösung und Trocknung der Prozess nach vordefinierten Parametern beendet werden. In der Praxis wird dazu einer der folgenden Parameter herangezogen:

- Trocknungszeit
- Ablufttemperatur
- Produkttemperatur
- Abluftfeuchtigkeit

- Differenz zwischen Luftaustrittstemperatur und Kühlgrenztemperatur

Das von Ciba-Geigy entwickelte ECONDRY-Verfahren stellt eine Weiterentwicklung der über den Temperaturverlauf kontrollierten Trocknung dar (Koester; 2001). Die Zulufttemperatur wird während des Prozesses in Abhängigkeit der Temperaturempfindlichkeit des Produktes auf hohem Niveau gefahren. Steigt die Ablufttemperatur während der Trocknung des Produktes an, wird als neue Regelgröße eine konstante Produkttemperatur gewählt. Dem Produkt wird jetzt nur noch soviel Wärme zugeführt, wie zur Verdunstung des Wassers aus dem Inneren der Partikel erforderlich ist. Zur Trocknung wird konditionierte Luft verwendet, deren relative Feuchte der angestrebten Restfeuchte des Produktes entspricht. Haben Zu- und Abluft nahezu die gleiche Temperatur erreicht, ist die Trocknung beendet. Ein Vorteil des ECONDRY-Verfahrens ist, dass die Restfeuchte in den Partikeln am Ende der Trocknung gleichmäßig in den Partikeln verteilt ist. Allerdings hat sich das ECONDRY-Verfahren aus Kostengründen nicht durchsetzen können.

Prinzipiell besteht die Möglichkeit, die Produktfeuchte während eines WSG Prozesses mittels NIR-Spektroskopie zu überwachen und damit eine Steuerung des Prozesses zu entwickeln (Rantanen et al.; 1998; Rantanen et al.; 2000). Von Frake wurde die praktische Anwendung dieses Verfahrens publiziert (Frake et al.; 1997). Nachteil des Einsatzes der NIR-Spektroskopie ist die Notwendigkeit einer aufwendigen produktspezifischen Kalibrierung. Untersuchungen zur Erfassung der Feuchte während des Prozesses mittels IR Sensor finden sich bei Watano (Watano et al.; 1996).

1.1.1.4 PROTEINTROCKNUNG IN DER WIRBELSCHICHT

Zur Herstellung von Proteinpartikeln in der Wirbelschicht liegen bislang wenige Studien vor. In Untersuchungen von Maa wurde 14mg/ml rhDNase Lösung in der GPCG-1 Anlage der Firma Glatt (Wurster Anordnung) auf 500g Laktose-träger aufgesprüht (Maa et al.; 1996). Laktose wurde in den Größenklassen 53-125µm und 125-250µm eingesetzt. Der Prozess wurde anhand der Kriterien

geringe Agglomeration der Laktosepartikel, hohe Ausbeute und hohe Protein-stabilität bewertet. Bei Trägerpartikeln der Größenklasse 53-125µm wurde im Vergleich zum den Laktosematerial 125-250µm erwartungsgemäß eine verstärkte Agglomeration beobachtet. In allen Produkten kam es zu starker Aggregation des Proteins, die mittels SEC-HPLC nachgewiesen wurde. Als Ursache für die Aggregatbildung wurde die hohe thermische Belastung von rhDNase während des Prozesses angeführt. Die Prozesse wurden bei Einlass-temperaturen von 70 bis 85°C bzw. bei Produkttemperaturen von 35 bis 45°C gefahren. Durch Zusatz von Ca^{2+} , welches bei erhöhten Temperaturen einen stabilisierenden Effekt auf rhDNase aufweist konnte die Aggregation von rhDNase deutlich reduziert werden.

In weiteren Untersuchungen, ebenfalls mit rhDNase und Laktose setzte Maa neben der GPCG-1 Anlage in Wurster Anordnung eine Strea-1 Anlage der Firma Aeromatic in Top-Spray Anordnung ein (Maa et al.; 1996). Untersucht wurden der Einfluss von Geräte- und Prozessparametern und der Einfluss der Sprühlösungsformulierung auf das Produkt. In allen Prozessen kam es zur deutlichen Proteinaggregatbildung, die in der Strea-1 Anlage etwas geringer ausfiel. Als Ursache für die Aggregation wurde wie schon in den Untersuchungen zuvor der Temperaturstress während des Trocknungsprozesses verantwortlich gemacht. Die Prozesse wurden bei einer Einlasstemperatur von 75°C bzw. bei einer Auslasstemperatur von 35 bis 40°C gefahren. Der Scherstress während des Verdüsens hatte keinen Einfluss auf die Protein-stabilität. Produkte aus der GPCG-1 Anlage wiesen eine geringere Agglomeration und eine höhere Ausbeute auf. Maa folgerte, dass das Top-Spray Verfahren zwar möglich ist, um der Gefahr der Partikelagglomeration aber entgegenzutreten sollten die eingesetzten Partikel im Fall von Laktose größer 100µm sein.

Mit dem Ziel Vakzine zur epidermalen Pulverimmunisierung herzustellen, wurden diphtheria toxoid (dT) und aluminium gebundenes hepatitis-B Oberflächen Antigen (Alum-HBsAg) in einer Wirbelschichtanlage auf Laktosepartikel der Größe 40-60µm aufgesprüht (Maa et al.; 2004a). Der Wirbelschicht-

prozess wurde im Bottom-Spray Verfahren im 20g Maßstab durchgeführt. Nach dem Prozess wurden Partikelgröße, Partikeloberfläche und Grad der Partikelagglomeration untersucht. Die Stabilität der Proteine wurde mittels SDS-Page untersucht. Es wurde festgestellt, dass die Agglomeration der Partikel unter anderem von der Art des aufgesprühten Vakzins beeinflusst wird. Nach Applikation der Partikel konnte in Mäusen und Meerschweinchen vergleichbar mit subkutaner Injektion einer flüssigen Formulierung eine deutliche Bildung von Antikörpern nachgewiesen werden.

1.1.2 ALTERNATIVE VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON PROTEINPARTIKELN

Im folgendem sollen alternative Verfahren zur Herstellung von Proteinpartikel vorgestellt und verglichen werden.

1.1.2.1 SPRÜHTROCKNUNG

Die Sprühtrocknung ist ein gängiges Verfahren zur Herstellung von festen Partikeln. Dabei wird eine feststoffhaltige Flüssigkeit durch Verdüsen in ein heißes gasförmiges Medium in feste, trockene Partikel überführt (Masters; 1979). Durch Verdüsen entsteht eine enorme Oberfläche, so dass Wasser in Bruchteilen von Sekunden verdampfen kann. Stressfaktoren die bei der Sprühtrocknung auf das Protein wirken sind Temperatur, Scherkräfte, Oberflächenbildung und der Entzug von Wasser (Maa et al.; 2000). Aufgrund der geringen Abmessungen von im Labormassstab eingesetzten Sprühtrocknern lassen sich in der Regel nur Partikelgrößen kleiner 10µm herstellen (Ameri et al.; 2006). Die Größe der getrockneten Partikel hängt von der Größe der versprühten Tröpfchen und deren Feststoffgehalt ab (Elversson et al.; 2005). Die Verdampfungsrate ist ein kritischer Parameter in Bezug auf die Partikelqualität. Zu schnelles Trocknen kann zu unförmigen oder defekten, zu langsames Trocknen zu klebrigen und feuchten Partikeln führen. Die Art der gelösten Feststoffe in der Sprühlösung hat ebenfalls einen wichtigen Einfluss auf die endgültige Form der Partikel. Einige Materialien neigen dazu sphärische Partikel zu bilden, andere Materialien führen zur Bildung hohler oder

deformierter, geschrumpfter Partikel (Maa et al.; 1997). Für die Herstellung von sphärischer Partikel kleiner 5µm, wie sie beispielsweise auf dem Gebiet der pulmonalen Applikation eingesetzt werden, gehört die Sprühtrocknung zu den Methoden der Wahl.

1.1.2.2 GEFRIERTROCKNUNG

Die Geriertrocknung wird unterteilt in das Einfrieren der Lösung, die Primärtrocknung in der ungebundenes Wasser durch Sublimation entfernt wird und die Sekundärtrocknung in der fester gebundenes Wasser entfernt wird. Stressfaktoren die bei der Gefriertrocknung auf das Protein wirken sind das Einfrieren und die Trocknung (Wang; 2000; Abdul-Fattah et al.; 2007) Da es in keinem Stadium der Gefriertrocknung zur Bildung von Tropfen kommt, ist die Bildung von Partikeln nur durch das Einwirken mechanischer Kräfte auf den gefriergetrockneten Kuchen möglich. Zur Herstellung von Proteinpartikeln durch Mahlung finden sich nur wenige Informationen in der Literatur (Phillips et al.; 1998). In Abhängigkeit der eingetragenen Energie und der Eigenschaften des zu mahlenden Gutes wie Härte, Sprödhheit, Porosität und chemische Zusammensetzung lassen sich durch Luftstrahlmahlen Partikel kleiner 5µm herstellen. Die Steuerung der Partikeleigenschaften ist beim Mahlprozess nur bedingt möglich. Beim Mahlen von Proteinprodukten können durch den Bruch lokal hohe Temperaturen entstehen, die zur Denaturierung des Proteins führen. Maa konnte für verschiedene Proteine, u.a. rhGH zeigen, dass durch Mahlen der Lyophilisationsprodukte unregelmässig geformte Partikel mit einer breiten Partikelgrößenverteilung entstehen. Die Effektivität von Mahlverfahren für die Herstellung von Partikeln größer 5µm mit unterschiedlicher Oberflächenbeschaffenheiten ist eher fraglich (Maa et al.; 2000).

1.1.2.3 SPRÜHGEFRIERTROCKNUNG

Bei der Sprühgefriertrocknung wird die Proteinlösung in der Regel in flüssigen Stickstoff gesprüht, anschließend werden die erstarrten Tropfen gefriergetrocknet (Sonner et al.; 2002). Wie in der Sprühtrocknung hat die Formulierung einen starken Einfluß auf die Eigenschaften der Partikel (Costantino et al.; 2002). Stressfaktoren die bei der Sprühgefriertrocknung auf

das Protein wirken sind allem das extrem schnelle Einfrieren, Scherstress, Oberflächenstress und die im Zusammenhang mit der Lyophilisation beschriebenen Stressfaktoren (Costantino et al.; 2000). Im Unterschied zu sprühgetrockneten Produkten, entstehen bei der Sprühgefrieretrocknung in der Regel größere Partikel mit einer geringeren Dichte (Maa et al.; 1999). Prinzipiell ist es mit der Sprühgefrieretrocknung auch möglich Partikel mit hoher Dichte herzustellen, wie sie auf dem Gebiet der epidermalen Pulver Immunisierung eingesetzt werden (Rochelle et al.; 2007; Maa et al.; 2004b). Im Vergleich zur Sprühtrocknung ist die Sprühgefrieretrocknung zeitaufwendiger, komplexer und teurer (Maa et al.; 1999).

1.1.2.4 PRÄZIPITATION

Unter Präzipitation versteht man die Reduzierung der Löslichkeit einer gelösten Substanz durch Zusatz von Stoffen oder die Änderungen der Prozessbedingungen, so dass die meisten der gelösten Moleküle nicht mehr in Lösung bleiben (Maa et al.; 2000). Die Löslichkeit eines Proteins wird durch die Aminosäuren bestimmt, welche mit dem Lösungsmittel in Kontakt stehen. Die Löslichkeit des Proteins lässt sich durch Einflussfaktoren wie die Temperatur, den pH-Wert und die Ionenstärke beeinflussen (Fornasiero et al.; 1999). Nachteile dieser Methode sind die nur schwer steuerbare Partikelgröße/Partikelgrößenverteilung und die unregelmäßige Form der Partikel (Maa et al.; 2000).

1.1.2.5 SUPERKRITISCHE FLUIDS

Für die Herstellung von Proteinpartikeln mit superkritischen Fluids kann die Antisolvent oder Solvent Technologie angewandt werden. Der Antisolvent Technologie kommt dabei die größere Bedeutung zu (Jovanovic et al.; 2004). Bei der Antisolvent Präzipitation verringert sich die Löslichkeit des Proteins durch Zugabe eines superkritischen Fluids zur Proteinlösung und es kommt zur Präzipitation. Für Insulin, Lysozym und Myoglobin wurden u.a. mit DMSO Untersuchungen mittels Antisolvent Präzipitation durchgeführt (Thiering et al.; 2000b; Muhrer et al.; 2003). Für in DMSO gelöstes Lysozym wurden mit der Antisolvent Präzipitation Partikelgrößenverteilungen im Bereich von 20 bis

40nm erzielt (Thiering et al.; 2000a). Eine Weiterentwicklung der Präzipitation ist das Sprühen der Proteinlösung in ein Gefäß mit superkritischem Fluid, durch die beim Verdüsen entstehende Oberfläche entstehen innerhalb weniger Sekunden Proteinpartikel. Mit dieser Technologie lassen sich Partikel einheitlicher Form und enger Größenverteilung herstellen (Palakodaty et al.; 1999; Yeo et al.; 1993). Bei der superkritischen Fluid Technologie hängen Eigenschaften der Proteinpartikel wie Partikelgrößenverteilung und Morphologie u.a. von Temperatur und Druck des superkritischen Fluids ab (Jung et al.; 2001). Nachteile sind der komplexe Prozess und die hohe Kosten des Verfahrens.

1.2 RÖNTGENFOTOELEKTRONENSPEKTROSKOPIE IN DER PHARMAZIE

Die Kenntnis der Oberflächenbelegung eines Trägers mit Protein kann wichtige Hilfestellung zur Proteinstabilität geben, da es an Oberflächen zur Denaturierung von Proteinen kommen kann. Röntgenfotoelektronenspektroskopie (XPS), ist eine Methode, mit der die elementare Zusammensetzung der Oberfläche einer Probe ermittelt werden kann. Die im Spektrum enthaltenen Bindungsenergien sind allerdings nicht nur elementspezifisch, sondern enthalten auch chemische Informationen zum Oxidationszustand bzw. zur chemischen Umgebung der beobachteten Atome. Mit XPS ist es möglich sowohl qualitative als auch quantitative Aussagen zu treffen.

1.2.1 GRUNDLAGEN DER RÖNTGENFOTOELEKTRONENSPEKTROSKOPIE

Die Grundlagen für die Röntgenfotoelektronenspektroskopie beruhen auf dem Fotoeffekt (Grotz; 2001). Wird ein Festkörper mit monoenergetischer Röntgenstrahlung angeregt, kommt es zur Emission von Elektronen der K-Schale der enthaltenen Elemente (Abb. 1.1). Die maximale kinetische Energie der emittierten Elektronen ergibt sich zu:

$$E_{kin,max} = h \cdot \nu - E_B - \Phi$$

- Gl. 1-1: $E_{kin,max}$ = maximale kinetische Energie der emittierten Elektronen
 h = Heisenbergkonstante
 ν = Frequenz der Röntgenstrahlung
 E_B = Bindungsenergie des Fotoelektrons
 Φ = Austrittsarbeit der Elektronen aus dem Festkörper

Aus der kinetischen Energie der emittierten Elektronen bzw. deren Bindungsenergie können Informationen über die chemische Zusammensetzung einer Probe gewonnen werden. Infolge der Emission eines Elektrons durch die Bestrahlung kommt es zur Relaxation des angeregten Zustands, indem ein Übergang eines Elektrons der L- zur K-Schale stattfindet (Abb. 1.1). Die hierbei frei werdende Energie kann durch Röntgenfluoreszenz abgestrahlt werden. Alternativ kann es zur Ablösung eines zweiten Elektrons kommen, welches als

so genanntes Augerelektron im Spektrum sichtbar wird. Im einfachsten Fall, dem Koopmanschen Theorem, wird davon ausgegangen, dass die elektronische Struktur des neutralen Moleküls unverändert bleibt und deshalb Gl. 1-1 den Fotoionisationsprozess adäquat beschreibt (Henzler et al.; 1991).

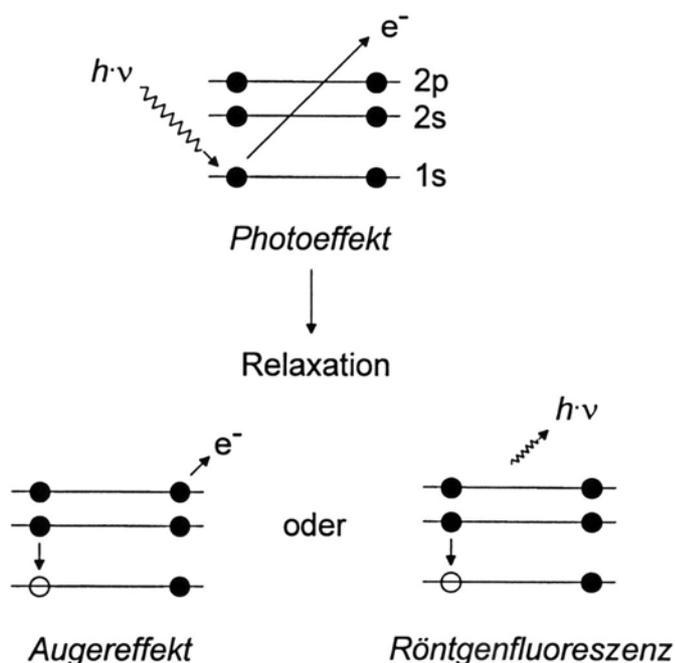


Abb. 1.1: Photoeffekt und Folgereaktionen (Levsen; 1985)

XPS Messungen werden im Ultrahochvakuum durchgeführt. Als Röntgenquelle dient meist eine Röhre mit Aluminium- oder Magnesiumanode die Röntgenstrahlung mit einer Energie von 1486,6eV bzw. 1253,7eV aussendet. Mit Hilfe eines Monochromators wird Strahlung der gewünschten Energie auf die Probe fokussiert. Die freigesetzten Elektronen werden durch eine elektrostatische Optik von der Probe in einen hemisphärischen Energieanalysator geleitet, wo die kinetische Energie der Elektronen detektiert wird. Am Ausgang des Energieanalysators befinden sich Channeltrons (Elektronenvervielfacher), welche die Intensität des Elektronenstroms aufzeichnen.

Die Oberflächenempfindlichkeit von XPS beruht auf der geringen Entkommenswahrscheinlichkeit der emittierten Photoelektronen aus tieferen Lagen. Eine wichtige Größe zur Berechnung der Informationstiefe ist dabei die inelastische mittlere freie Weglänge λ . In Abhängigkeit der kinetischen Energie der ange-

regten Elektronen und vom zu untersuchenden Material ergeben sich für λ unterschiedliche Werte. Die mittlere freie Weglänge lässt sich dabei als die Wegstrecke verstehen, die das Elektron zurücklegen muss, bevor es inelastisch gestreut wird (Polz; 1992) und dabei seine Energie dissipiert. Werte für λ können nach empirischen Formeln berechnet werden (Tanuma et al.; 1994) und sind in Datenbanken des „National Institute of Standards and Technology“ (NIST) aufgelistet (NIST; 2007).

Die Wahrscheinlichkeit p , dass ein Fotoelektron die Analyse verlässt, ohne einen Teil seiner Energie zu verlieren berechnet sich in Abhängigkeit von λ nach Gl. 1-2.

$$p(d) = e^{-\frac{d}{\lambda}}$$

Gl. 1-2: d = Tiefe aus der das Fotoelektron kommt
 λ = mittlere freie Weglänge der Elektronen in der Probe

Beträgt der Wert für λ beispielsweise 30\AA , wie beim C1s Fotoelektron in BSA (Tanuma et al.; 1994), kommen nach Integration der Gleichung über einen Bereich von $d=0$ bis $d=30\text{\AA}$ 63% der Intensität des XPS Signals aus den obersten 30\AA der Analyse. C1s bezieht sich dabei auf das detektierte Elektron aus dem 1s Orbital des Kohlenstoffs. 95% der Gesamtintensität kommen aus einem Bereich von 0 bis 3λ . Diese Dicke, die 95% der Intensität des Signals liefert, wird als Informationstiefe von ESCA betrachtet (Jablonski et al.; 2003). Die Informationstiefe beträgt bei Protein bzw. Kohlenhydrat haltigen Proben unter 100\AA (Millqvist-Fureby et al.; 1999). Gemäß Gl. 1-2 kommen 10% der Intensität aus der obersten Schicht von 0 bis 2\AA , dies entspricht in etwa einer Atomlage. XPS ist deshalb nicht nur für die oberste Atomlage einer Probe, sondern immer auch für tiefer liegende Atomlagen sensitiv. Treten die Elektronen nicht senkrecht zur Probenoberfläche aus, muss der Winkel zwischen der Austrittsrichtung und der Senkrechten θ mit $\lambda \cdot \cos \theta$ berücksichtigt werden (Polz; 1992).

1.2.2 QUALITATIVE SPEKTRENAUSWERTUNG

Bei in der Pharmazie zu vermessenden Proben handelt es sich in der Regel um Isolatoren. Diese laden sich während der Messung um einige Volt auf, so dass es zu einer Verschiebung des Spektrums kommt (Grotz; 2001). Um in der Auswertung alle Peaks eindeutig zuordnen zu können, muß eine Kalibrierung durchgeführt werden. Durch Messen des C1s Signals von graphitischem Kohlenstoff, welcher als Verunreinigung auf nahezu allen Proben vorkommt, lässt sich eine solche Kalibrierung vornehmen (Grotz; 2001). Bei ungeladenen Proben findet sich das entsprechende C1s Signal bei 284,8eV (Dengis et al.; 1995). Alternativ besteht die Möglichkeit die Probe mit Goldstaub als Referenz zur Ermittlung der Aufladung zu bestreuen (Grotz; 2001). Die Identifizierung der Atome und deren Spezies kann anhand der Literatur oder mit Hilfe der NIST Datenbank für XPS (Powell et al.; 2003) vorgenommen werden.

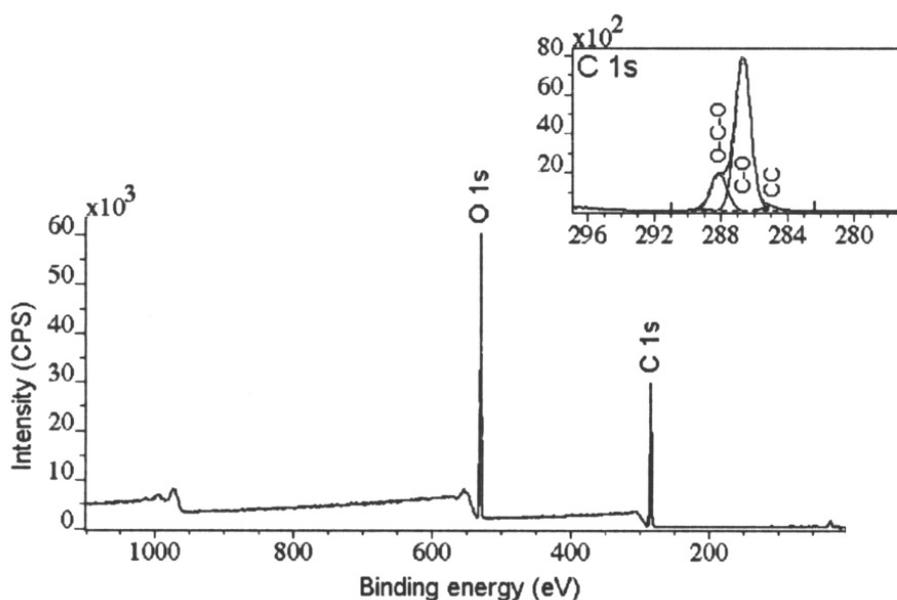


Abb. 1.2: Übersichtsspektrum von Cellulosepapier mit O1s und C1s Signal. Insert: C1s Spektrum mit starker Vergrößerung der x-Achse; einzelne Spezies lassen sich nach Dekonvolution quantifizieren (Johansson et al.; 2005)

Die Bindungsenergie der Elektronen eines Atoms wird von dessen Bindungspartnern beeinflusst. Die gemessene Gesamtintensität des C1s Signals einer Celluloseprobe setzt sich beispielsweise aus einer Komponente für Kohlenstoffatome, die an 2 Sauerstoffatome gebunden sind (Acetal), aus einer

Komponente für Kohlenstoffatome, die an ein Sauerstoffatom gebunden sind (Alkohol) und aus einer Komponente für Kohlenstoffatome, die ausschließlich an Kohlenstoff und/ oder Wasserstoffatome gebunden sind (Verunreinigung) zusammen (Johansson et al.; 2005) (Abb. 1.2).

1.2.3 QUANTITATIVE SPEKTRENAUSWERTUNG

Anhand der Signalintensitäten können Rückschlüsse auf die Oberflächenzusammensetzung einer Probe gezogen werden. Im einfachsten Fall integriert man die aufgezeichneten C1s, O1s bzw. N1s Spektren, ohne zwischen verschiedenen Spezies zu differenzieren. Will man, wie im oben angeführten Beispiel unterschiedliche Kohlenstoffqualitäten, wie Acetal und Alkohol gebundene Kohlenstoffatome quantifizieren, ist zu beachten, dass die Bindungsenergien für verschiedene Atomspezies sehr nahe zusammen liegen (Abb. 1.2), weshalb die Teilsignale nicht ausreichend aufgelöst sind. Zur Ermittlung der genauen Peakflächen (Intensitäten) muss deshalb eine Dekonvolution vorgenommen werden. Aus den ermittelten Intensitäten lässt sich dann das Atomzahlverhältnis N_a/N_b einer Substanz S nach Gleichung Gl. 1-3 berechnen.

$$\frac{N_a^S}{N_b^S} = \frac{I_a^S \cdot \sigma_a \cdot \lambda_a \cdot T_a}{I_b^S \cdot \sigma_b \cdot \lambda_b \cdot T_b}$$

| | | |
|----------|-------------|---|
| Gl. 1-3: | T = | Transmissionsfunktion des Spektrometers |
| | σ = | Wirkungsquerschnitt als Fläche |
| | λ = | mittlere freie Weglänge der Elektronen in der Probe |
| | N = | Anzahl der Atome pro Volumeneinheit |

Die Transmission T ist umgekehrt proportional zur kinetischen Energie der entsprechenden Fotoelektronen und hängt von der Art des eingesetzten Spektrometers ab.

Handelt es sich bei der Probe um eine Reinsubstanz, wie beispielsweise Cellulose oder Protein, spricht man von einer homogenen Zusammensetzung der Probe. Die Intensität eines Fotoelektronensignals aus einer Probe mit n-Schichten kann durch Gl. 1-4 beschrieben werden.

$$I^S(n) = T \cdot \sigma \cdot \lambda \cdot N \cdot \cos \theta \left(1 - e^{-\frac{n \cdot d}{\lambda \cdot \cos \theta}} \right) \cdot k$$

- Gl. 1-4 $I^S(n)$ = integrale Intensität
 θ = Abweichung im Detektionswinkel von der Senkrechten zur Oberfläche
 d = Schichtdicke
 n = Anzahl der Schichten
 k = Konstante

Für einen unendlich ausgedehnten Festkörper, also eine Probe bei der die Entkommwahrscheinlichkeit $p(d)$ für die Probendicke d gegen Null geht, strebt der Ausdruck in Klammern gegen 1.

$$I^S = T \cdot \sigma \cdot \lambda \cdot N \cdot \cos \theta \cdot k$$

- Gl. 1-5: I^S = integrale Intensität der Substanz S aus praktisch „unendlicher“ Tiefe

Bei Coating Prozessen wurde im Rahmen dieser Arbeit Proteinlösung bzw. proteinhaltige Lösung in der Wirbelschicht auf ein Trägermaterial aufgesprüht. Für diese heterogenen Proben gelten analoge Überlegungen, wie sie in der Literatur für Katalysatoren dargestellt werden (Cimino et al.; 1999). Bei Katalysatoren ist ähnlich wie im Fall der untersuchten Proben eine Oberflächenkomponente aufgebracht. Nachfolgend sollen das Turm- und das Schichtmodell vorgestellt werden, die prinzipiell auf proteinbeschichtete Träger anwendbar sein sollten. Beim Turmmodell ist die proteinhaltige Schicht auf dem Träger nicht kohärent, sondern liegt in Form von mehrschichtigen Türmen über die Trägeroberfläche verteilt vor (Abb. 1.3). Anhand des Modells können Aussagen über die vom Protein bedeckte Fläche gemacht werden. Da das Modell davon ausgeht, dass immer nur die oberste Lage gesehen werden kann, können keine Aussagen über die Höhe der Türme gemacht werden. Werte für die Bedeckung, die das Modell liefert, können als Untergrenze für die tatsächliche Bedeckung angesehen werden. Beim Schichtmodell wird davon ausgegangen, dass die Trägermaterialoberfläche zuerst vollständig von einer Schicht überzogen wird, bevor die nächste Schicht begonnen wird. Im Schichtmodell wird berücksichtigt, dass Intensitäten auch aus tieferen Lagen kommen. Liefert das Schichtmodell

Bedeckungen < 1 , sind diese als Obergrenze für die tatsächliche Bedeckung zu sehen.

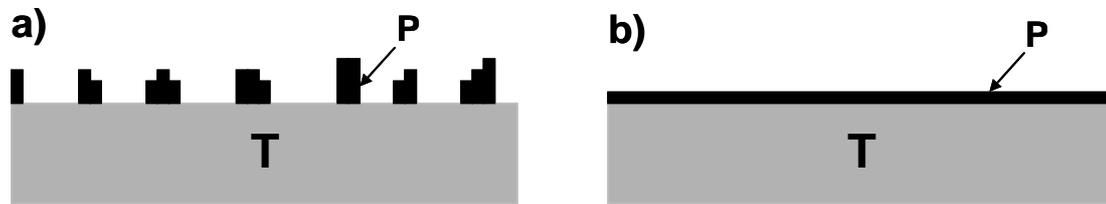


Abb. 1.3: a) Turmmodell; b) Schichtmodell; (P = Protein; T = Trägermaterial)

Beim Turmmodell ergibt sich das Intensitätsverhältnis zwischen dem Signal aus der proteinhaltigen Schicht P und dem des Trägermaterials T nach Gleichung 1.6. Die Gleichung berücksichtigt, dass alle Spezies, die im Trägermaterial T vorkommen auch im Protein P zu finden sind.

$$\frac{I_a}{I_b} = \frac{f \cdot I_a^P}{(1-f) \cdot I_b^P + f \cdot I_b^T}$$

- Gl. 1-6:
- f = Bedeckung des Trägermaterials (Werte zwischen 0 und 1)
 - I_a = Intensität der Spezies a der heterogenen Analyse (gemessen)
 - I_b = Intensität der Spezies b der heterogenen Analyse (gemessen)
 - I_a^P = Intensität der Spezies a des homogenen Proteins P (gemessen)
 - I_b^T = Intensität der Spezies b des homogenen Trägers T (gemessen)
 - I_b^P = Intensität der Spezies b des homogenen Proteins P (gemessen)

$$\frac{I_a}{I_b} = \frac{I_a^{S1} \cdot \left(1 - e^{-\frac{n \cdot d}{\lambda_{ainS1} \cdot \cos \theta}} \right) + f \cdot \left(e^{-\frac{n \cdot d}{\lambda_{ainS1} \cdot \cos \theta}} \right)}{I_b^{S2} \cdot e^{-\frac{n \cdot d}{\lambda_{binS1} \cdot \cos \theta}}}$$

- Gl. 1-7:
- f = Bedeckung des Trägermaterials (Werte zwischen 0 und 1)
 - n = Anzahl der S1-Schichten
 - I_a^{S1} = Intensität der Spezies a der reinen Substanz S1 (gemessen)
 - I_b^{S2} = Intensität der Spezies b der reinen Substanz S2 (gemessen)
 - λ_{ainS1} = mittlere freie Weglänge von a-Elektronen im Medium S1
 - λ_{binS1} = mittlere freie Weglänge von b-Elektronen im Medium S1
 - d = Schichtdicke der Spezies a

Zu beachten ist, dass die Gegebenheiten in der Realität oft nicht so extrem ausgeprägt sind, wie in den Modellen beschrieben. Beispielsweise kann es vorkommen, dass es zum Einhüllen der aktiven Phase durch den Träger kommt (Polz; 1992). Dies ist beispielsweise beim Besprühen von löslichem Trägermaterial mit Proteinlösung in der Wirbelschicht zu erwarten.

1.2.4 XPS IN DER PROTEINTROCKNUNG

Die meisten Publikationen zur Anwendung von XPS im Zusammenhang mit der Trocknung therapeutischer Proteine, beschreiben die Untersuchungen sprühgetrockneter Produkte. Alle Autoren konnten an der Oberfläche sprühgetrockneter Produkte einen überproportional hohen Anteil an Protein nachweisen. Einige Autoren führten Untersuchungen zur Aktivität des Proteins in den sprühgetrockneten Produkten durch. Ein Verlust an Proteinaktivität wurde dabei mit der Oberflächendenaturierung an der Grenzfläche flüssig/gasförmig während des Verdüsens erklärt. Neben dem Protein wurden der Sprühlösung stabilisierende Kohlenhydrate, in einigen Fällen auch oberflächenaktive Substanzen, zugesetzt. Fäldt und Bergenstahl führten Sprühtrocknungsexperimente mit Natriumcaseinat und bovinem Serumalbumin (BSA) durch. Bereits bei Protein/Laktose Verhältnissen von 1/99 fanden Sie eine überwiegende Belegung der Oberfläche der sprühgetrockneten Pulver mit Protein. Nach Messung der Oberflächenspannung der Sprühlösung wurde ein

Zusammenhang zwischen der Oberflächenaktivität des Proteins in Lösung und der hohen Oberflächenkonzentration in den Pulvern abgeleitet (Faeldt et al.; 1994). Millqvist-Fureby et al. sprühtrockneten Trypsin (0,2 bis 5%) mit Zusätzen von Laktose, Saccharose, Mannitol, α -Cyclodextrin und Dextrin. Es konnte unter anderen gezeigt werden, dass die Oberflächenkonzentration von Trypsin mit steigenden Zusätzen von Polysorbat 80 (PS80) abnimmt (Millqvist-Fureby et al.; 1999a). Adler, Unger und Lee setzten in ihren Sprühtrocknungsexperimenten u.a. Trehalose/BSA im Verhältnis 95/5 und verschiedene Emulgatoren in unterschiedlichen Konzentrationen ein. BSA konnte durch PS80 vollständig von der Oberfläche verdrängt werden. Mit dem Austausch von PS80 gegen Natriumdodecylsulfat wurde eine Verringerung der Oberflächenkonzentration von BSA und ein Anstieg der Tensidkonzentration an der Oberfläche der sprühgetrockneten Partikel nachgewiesen. Natriumdodecylsulfat konnte aufgrund der im Molekül enthaltenen Schwefelatome selektiv durch XPS detektiert werden (Adler et al.; 2000). Millqvist-Fureby et al. führten mit den gleichen Formulierungen, die sie bereits in der Sprühtrocknung einsetzten auch Versuche zur Gefriertrocknung durch. Neben Trypsin wurde BSA als zweites Protein in die Untersuchungen einbezogen. Für gefriergetrocknete Pulver konnten wie in der Sprühtrocknung erhöhte Mengen Protein an der Oberfläche nachgewiesen werden. Der Grad der Oberflächenpräsenz des Proteins war von der Art des eingesetzten Zuckers abhängig. Durch Einfügen eines Tempereschrittes während der Lyophilisation wurde ein Anstieg der Oberflächenkonzentration des Proteins beobachtet (Millqvist-Fureby et al.; 1999b). In Untersuchungen von Webb et al. wurde rhIFN- γ mit 9,5% Trehalose in 10mM Kaliumphosphatpuffer bei pH 7,5 gefrier- bzw. sprühgefriergetrocknet. Die Oberflächenkonzentration des Proteins in sprühgefriergetrockneten Produkten war im Vergleich zu den gefriergetrockneten Produkten um den Faktor vier erhöht. Durch Zusatz von 0,12% PS20 zur Formulierung konnte die Oberflächenkonzentration von Protein in beiden Produkten deutlich abgesenkt werden (Webb et al.; 2002). Yu et al. untersuchten mit XPS den Lysozymgehalt an Oberflächen von konventionell sprühgefriergetrockneten Produkten im Vergleich zu sprühgefriergetrockneten Produkten die durch direktes Einsprühen

der Proteinlösung in flüssigen Stickstoff hergestellt wurden. Es wurde ein Zusammenhang zwischen der erhöhten Lysozym Oberflächenkonzentration in konventionell sprühgefriergetrockneten Produkten und der verminderten Lysozym Stabilität/ Aktivität in diesen Produkten gefunden. Die geringere Lysozym Stabilität/ Aktivität in Produkten die mittels konventioneller Sprühgefrieretrocknung hergestellt wurden, konnte mit der Oberflächendenaturierung von Lysozym an der Grenzfläche Luft/Wasser während des Verdüens erklärt werden (Yu et al.; 2006). Untersuchungen zur Oberflächenzusammensetzung von sprüh- und gefriergetrockneten Proteinformulierungen in Abhängigkeit der molaren Masse der eingesetzten Hilfsstoffe wurden auch von Abdul Fattah et al durchgeführt. Bei gleichen Formulierungen wurde bei der Sprühtrocknung eine stärkere Belegung der Oberfläche mit Protein als bei der Gefrieretrocknung nachgewiesen. Beim Einsatz von kohlenhydrathaltigen Hilfsstoffen, wurde unabhängig von der eingesetzten Trocknungsmethode ein Anstieg der Proteinkonzentration an den untersuchten Pulveroberflächen mit steigenden Polymerisationsgrad der eingesetzten Hilfsstoffe beobachtet (Abdul-Fattah et al.; 2005). Wie in der Literatur gezeigt wurde, findet in Abhängigkeit der eingesetzten Trocknungsmethode eine Anreicherung von Proteinen an der Oberfläche statt. Da das Ausmaß der Oberflächenanreicherung ein wichtiger Anhaltspunkt für Interpretation von Proteininstabilitäten ist, wurde die Oberflächenkonzentration bei der Wirbelschichttrocknung von Proteinen im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Für diese Untersuchungen wurde erstmals im Zusammenhang mit der Trocknung therapeutischer Proteine auf Intensitätsdaten verschiedener Spezies von Kohlenstoff- und Sauerstoffatomen zurückgegriffen. Vorteil davon ist, dass in Abhängigkeit der im Protein und Hilfsstoffen vorliegenden Spezies quantitative Auswertungen unabhängig vom im Protein vorliegenden Stickstoff vorgenommen werden können. Bei vorliegen stickstoffhaltiger Hilfsstoffe könnte so eine Ermittlung der Oberflächenbelegung mit Protein ermöglicht werden. In der Literatur beschriebene Untersuchungen basieren lediglich auf Intensitätsdaten verschiedener Atomarten, wie Kohlenstoff, Sauerstoff und Stickstoff.

2 ZIELSETZUNG

Im Kapitel 1.1.2 beschriebene Verfahren sind typischerweise dazu geeignet, Proteinpartikel im einstelligen Mikrometer Bereich herstellen (Kap. 1.1.2). Mit dem Aufsprühen von proteinhaltigen Lösungen auf Trägermaterialien in einer Wirbelschichtanlage soll ein Ansatz verfolgt werden größere, fließfähige Partikel herzustellen. Das Protein soll während des Prozesses in der Wirbelschicht und über die Lagerdauer möglichst gut stabilisiert werden. Aufgrund seiner hohen Empfindlichkeit, die in chemischen und physikalischen Abbauprozessen sichtbar wird, ist rhIL-11 besonders geeignet die Möglichkeiten der Protein-stabilisierung mittels Wirbelschichtprozess aufzuzeigen. Die Teilcheneigenschaften der eingesetzten Trägermaterialien sollen erhalten bleiben.

- 1) In orientierenden Versuchen gilt es den Einfluss von Anlagen- und Prozesssteuerungsparametern sowie des Trägermaterials auf Protein-stabilität, Ausbeute und Granulation/ Abrieb zu untersuchen. Verschiedene Prozessanlagen sollen auf ihre Eignung hin überprüft werden. Proteinarzneistoffe sind sehr teuer, weshalb hohe Ausbeuten neben der Protein-stabilität ein wichtiges Kriterium sind. Granulation und Abrieb führen zum Verlust der ursprünglichen Teilcheneigenschaften und sind deshalb unerwünscht. Durch Weglassen von stabilisierenden Zusätzen zur Sprühlösung soll der Einfluss von Anlage, Prozesssteuerungsparametern und Trägermaterialien auf die Protein-stabilität besser sichtbar werden.
- 2) Eine ausgewählte Anlage soll in Hinblick auf den Einsatz geringer Mengen an Trägermaterial bei gleichzeitig hoher Ausbeute optimiert werden, ggf. auch durch apparative Veränderungen. Ziel ist, dass in der optimierten Anlage Prozesse auch unter Zusätzen von Zuckern zur Sprühlösung stabil verlaufen. Als Basis für Versuche zur physikalischen und chemischen Stabilisierung von rhIL-11 mittels Sprühlösungsformulierung gilt es Standardprozessparameter und Standardträgermaterialmenge zu definieren.

- 3) Anschließend soll der Einfluss verschiedener Trägermaterialien und verschiedener Sprühlösungszusätze wie Zucker, Tenside oder Antioxidantien auf die physikalische und chemische Stabilität von rhIL-11 sowohl während des Prozesses als auch während der Lagerung untersucht werden. Mit unlöslichen MCC-Spheres soll der Einfluss von Sprühlösungszusätzen unabhängig von Löslichkeitseffekten des Trägermaterials untersucht werden.
- 4) Ein besseres Verständnis der Oberflächenbelegung des Trägers mit Protein bzw. Proteinmatrix könnte wichtige Erklärungen zu Proteininstabilitäten geben, da es an Oberflächen zur Denaturierung von Proteinen kommen kann. Mit Hilfe von XPS soll deshalb die Verteilung von rhIL-11 an der Oberfläche/ oberflächennahen Schichten der partikulären Proteinformulierungen untersucht werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 MATERIALIEN

3.1.1 REKOMBINANTES HUMANES INTERLEUKIN-11

Für alle Versuche wurde eine gefrorene wässrige Bulklösung mit ca. 15mg/ml rhIL-11, 6mM Natriummonophosphat, 4mM Natriumdiphosphat und 300mM Glycin, pH 7,0 verwendet (Wyeth BioPharma, Andover, USA). Für einige Versuche wurde das Glycin der Bulkformulierung durch Dialyse gegen Phosphat-Pufferlösung (10mM, pH=7) entfernt. Dabei wurde ein Dialyseschlauch des Typs Spectra/Por[®]7 mit einem MWCO von 3000 der Firma Spectrum Medical Industries Inc., USA eingesetzt.

3.1.2 HILFSSTOFFE FÜR WIRBELSCHICHT VERSUCHE

Tab. 3.1-1: Hilfsstoffe für Wirbelschicht Versuche

| Substanz | Beschreibung | Bezugsquelle |
|---------------------------------------|-------------------|-----------------------|
| MCC-Spheres (Cellets 100) | 98,2% = 100-200µm | Pharmatrans Sanaq AG |
| MCC-Spheres (Cellets 200) | 98% = 200-355µm | Pharmatrans Sanaq AG |
| Saccharose | RFF-Zucker | Südzucker |
| Trehalose dihydrat | | Georg Breuer GmbH |
| D-Mannitol (Pearlitol 200SD) | 98,0-102.0% EP | Roquette |
| D-Mannitol (Pearlitol 300DC) | 98,0-102.0% EP | Roquette |
| Glycin | 99,0-101% | Rexim (Degussa) |
| Dinatriumhydrogenphosphat Heptahydrat | | Merck, Darmstadt |
| Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat | | Merck, Darmstadt |
| Methionin | | Fluka, Buchs, Schweiz |

3.1.3 WEITERE SUBSTANZEN

Tab. 3.1-2: weitere Substanzen

| Substanz | Beschreibung | Bezugsquelle |
|-------------------------------------|--|--|
| Acetonitril | HPLC Qualität, >99,9% | Fisher Scientific, Leicestershire, UK |
| Ammoniumnitrat | >99% | Grüssing, Filsum |
| Colloidal Blue Staining Kit | Stainer A and B | Invitrogen, Karlsruhe |
| Lithium chlorid | | Riedel de Häen, Seelze |
| Mark12™ | Molekular Standard für Gelelektrophorese | Invitrogen, Karlsruhe |
| Methanol | HPLC Qualität, >99,8% | Merck, Darmstadt |
| Methionin | | Fluka, Buchs, Schweiz |
| Morpholinoethansulfonsäure (MES) | >99,5% | Sigma, Steinheim |
| Natriumchlorid | ACS, >99% | Sigma, Steinheim |
| Natriumdodecylsulfat | Elektrophorese Qualität, >99% | Roth, Karlsruhe |
| Natriumhydroxid Pellets | p.a. >99% | Merck, Darmstadt |
| NuPAGE® MOPS running buffer | Enthält MOPS, Tris Base, SLS, EDTA | Invitrogen, Karlsruhe |
| NuPAGE® LDS Sample Buffer | Enthält Glycerol, Tris Base, tris HCl, LDS;EDTA, Serva Blau 250, Phenol Rot, Wasser | Invitrogen, Karlsruhe |
| NuPAGE® reducing agent | 0,5M DTT | Invitrogen, Karlsruhe |
| PS80 | Crillet HP, high purity | Croda, Nettetal |
| Trifluoressigsäure | | Sigma, Steinheim |

3.2 PROZESSANLAGEN

3.2.1 GPCG-1 ANLAGE

Um den Prozess optisch besser verfolgen zu können, wurden die Versuche standardmäßig in der Top-Spray Anordnung durchgeführt, dabei wurde eine Zweistoffdüse mit 1mm Innendurchmesser eingesetzt. Das Abrütteln Stofffiltersäcke erfolgte nach dem Zweikammerverfahren. Die Standardparameter sind in Tab. 3.2-1 gelistet.

Tab. 3.2-1: Standardparameter GPCG-1 Versuche: Prozessparameter, Sprühlösung, Trägermaterial

| Prozesssteuerungsparameter | Wert (Einheit) |
|--------------------------------------|------------------------------|
| Geschwindigkeit Fluidisierungsluft | 1,5m/s |
| Sprühdruck Düse | 1,9 bar |
| Speiserate Sprühflüssigkeit | 2,8g/min |
| Einlasstemperatur | 30°C |
| Abrüttelintervall (Filter) | alle 10 Sekunden (asynchron) |
| Formulierung Sprühflüssigkeit | |
| rhIL-11 | 2,5 mg/ml |
| Phosphatpuffer | 10mM, pH = 7,0 |
| Glycin | 300mM |
| Menge Sprühflüssigkeit | 250g |
| Menge Trägermaterial | 300g |

3.2.2 MINI-GLATT ANLAGE

Zu Beginn der Entwicklung wurden Prozesse in der Bottom-Spray Konfiguration ohne Wursterinsatz durchgeführt. Zum Verdüsen wurde eine Zweistoffdüse mit 0,5mm Innendurchmesser eingesetzt. Die Fluidisierung von Trägermaterial und das Verdüsen der Sprühlösung erfolgten mit Druckluft aus der Hausleitung (6bar). Die Druckluft wurde mittels Druckminderer in der Anlage eingestellt. Durch eine Heizung in der Anlage konnte die Temperatur der Fluidisierungsluft eingestellt werden. Die Standardparameter sind in Tab. 3.2-2 gelistet.

Tab. 3.2-2: Standardwerte Mini-Glatt Versuche: Prozessparameter, Sprühlösung, Trägermaterial

| Prozessteuerungsparameter | Wert (Einheit) |
|--------------------------------------|-----------------------|
| Fluidisierungsdruck | 0,5bar |
| Sprühdruck | 0,5bar |
| Speiserate Sprühflüssigkeit | 0,36g/min |
| Produkttemperatur | 32°C |
| Abblasintervall (Filter) | 10s |
| Abblasdruck (Filter) | 1 bar |
| Formulierung Sprühflüssigkeit | |
| rhIL-11 | 4 mg/ml |
| Phosphatpuffer | 10mM, pH = 7,0 |
| Glycin | 300mM |
| Menge Sprühflüssigkeit | 15g |
| Menge Trägermaterial | 20g |

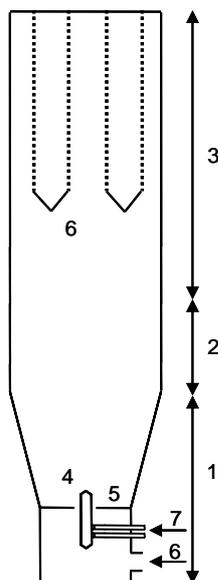


Abb. 3-1: (1) montierter Materialbehälter, (2) Entspannungsgehäuse mit Sichtfenster, (3) Filterturm, (4) Zweistoffdüse, (5) Siebboden, (6) temperierte Druckluft zur Fluidisierung, (7) Speisezufuhr und Druckluft für Zweistoffdüse

3.3 ANALYTISCHE METHODEN

3.3.1 CHARAKTERISIERUNG VON RHIL-11

Von der Sprühlösung wurde unmittelbar vor dem Prozess eine Probe entnommen und mit Formulierungspuffer auf 0,6mg/ml verdünnt. Untersuchungen zur Lagerstabilität wurden über eine Dauer von 2, 6 bzw. 12 Wochen durchgeführt. Nach dem Prozess wurden 220mg Produkt in 2R Vials der Glasart 1 eingewogen, mit Stickstoff begast und verbördelt (2-8, 25°C und 40°C). Zum Verschließen eingesetzte Gummistopfen wurden zuvor bei 100°C über 12 Stunden getrocknet. Eine Lagerung bei konstanter Luftfeuchte erfolgte in offenen Vials (25°C/ 60%r.F. und 40°C/75%r.F). Zur Einstellung konstanter Luftfeuchten wurden gesättigte Salzlösungen eingesetzt. Zur Analyse wurden 220mg Produkt in 1ml Formulierungspuffer gelöst (0,6mg/ml).

3.3.1.1 SE-HPLC

Die SE-HPLC wurde durchgeführt um die Konzentration von rhIL-11, nicht-kovalenten und kovalenten Aggregaten zu ermitteln. Die Analysen wurden auf einer Hewlett-Packard HP Series 1100 durchgeführt, welche mit einem Degasser, einer quaternären Pumpe, einen gekühlten Autosampler (2-8°C) und einen Dioden Array Detektor ausgestattet war. Als Trennsäule wurde eine TSK G2000 SW_{xl}, (7,8 mm ID x 30cm, 5µm) der Firma Toso Haas, Tokyo, Japan verwendet, welche bei einer Temperatur von 4±2°C betrieben wurde. Die Detektion der getrennten Moleküle erfolgte photometrisch durch UV-Detektion bei einer Wellenlänge von 225nm. Als Fließmittel wurde eine wässrige Lösung mit 0,1mM Glycin/ 500mM Natriumchlorid/ 50mM Morpholinoethansulfonsäure (MES) bei pH 6,0 eingesetzt. Die Flussrate betrug 0,75ml/min und das Injektionsvolumen 50µl. Bei jeder Probe wurden zwei Injektionen vorgenommen. In den Chromatogrammen erkennt man zwei oder mehrere Peaks, die von rhIL-11 Aggregaten stammen (Fitzner; 2003). Die Berechnung der Aggregatkonzentration erfolgt relativ zur Gesamtfläche der Aggregate und Monomere.

3.3.1.2 RP-HPLC ZUR ANALYSE DER RELATED SPECIES

Die RP-HPLC wurde durchgeführt um die Konzentration der related species (RS) zu ermitteln. Bei den RS handelt es sich u.a. um chemische Abbauprodukte von rhIL-11. Fitzner konnte zeigen, dass weiterhin entfaltetes rhIL-11 im Chrommatogramm sichtbar wird und somit zu einer Erhöhung des RS Gehaltes beiträgt (Fitzner, 2003). Die Analysen wurden auf einer Hewlett-Packard HP Series 1100 (siehe Kapitel 3.3.1.1) mit einer Säule Poros R1/H (4,6 mm ID x 10cm) der Firma PerSeptive Biosystems, Framingham, USA bei einer Temperatur von 20-25°C durchgeführt. Zwei mobile Phasen mit Fließmittel A (0,1% Trifluoressigsäure) und Fließmittel B (0,1% Trifluoressigsäure und 80% Acetonitril) wurden eingesetzt um einen Gradienten von 30% Fließmittel B bis 100% Fließmittel B zu fahren. Die Flussrate wurde hierbei ausgehend von 0,5 ml/min bis 2,0 ml/min gesteigert. Es wurden 100µl einer Probe mit etwa 0,6mg/ml rhIL-11 injiziert und bei einer Wellenlänge von 214nm detektiert. Die Gesamt Konzentration an RS wurde aus der Summe der Peakflächen der

detektierten related species im Verhältnis zur Summe aller Peakflächen berechnet.

3.3.1.3 RP-HPLC ZUR ANALYSE VON OXIDIERTEN METHIONIN 58

Unter den Bedingungen von (Kap. 3.3.1.2) lässt sich oxidiertes Methionin 58 (Met58ox) nicht von nativen rhIL-11 trennen, da beide Moleküle in etwa die gleiche Hydrophobizität aufweisen (Yokota et al.; 2000). Die Analyse von oxidierten Methionin 58 wurde im Unterschied zu der unter 3.3.1.2 beschriebenen Methode bei einer Säulentemperatur von 40°C durchgeführt. Weiterhin betrug die Konzentration des injizierten rhIL-11 lediglich 0,08mg/ml. Die Gesamt Konzentration an oxidierten Methionin 58 wurde aus dem Verhältnis zur Fläche an oxidierten Methionin 58 zur Gesamtfläche aller Peaks berechnet.

3.3.1.4 GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)

Zur qualitativen Bewertung und Quantifizierung von kovalenten Aggregaten wurden Proben mittels Gelelektrophorese unter Einsatz von NuPAGE® 10% und 12% Bis-Tris Gelen (1mm, 10 Taschen) anhand ihres Molekulargewichtes aufgetrennt und auftretende Banden durch Färbung mit Colloidal Blue Staining Kit kenntlich gemacht. Als Laufpuffer wurde NuPAGE® MOPS running buffer verwendet. Die zu untersuchenden Proben wurden mit NuPAGE® LDS Sample Buffer präpariert. Im Fall von reduzierenden Bedingungen wurde Sample Buffer mit einen Zusatz von 10% NuPAGE® reducing agent verwendet. Die Proben wurden vor dem Auftragen (20µl pro Tasche; rhIL-11 Konzentration 1-2µg pro Bande) bei etwa 100°C für 10 Minuten behandelt, die Gelelektrophorese wurde bei 30mA durchgeführt. Nach Trocknung der Gele wurden eine Transmissionsmessung der Gele durchgeführt (CS-9301 PC Densitometer (Shimadzu, Kyoto, Japan).

3.3.2 LASERBEUGUNG

Die Partikelgrößenverteilung der Sprühtropfen wurde mit dem Mastersizer X (Malvern, Herrenberg, Deutschland) vorgenommen. Die Düse vertikal über dem

Laser der Messzelle positioniert. Aufgrund der Positionierung der Düse konnte die Messzelle nicht wie sonst üblich verschlossen werden. Um eine Überlagerung der Lasersignale mit Tageslicht zu vermeiden wurden die Messungen bei Dunkelheit durchgeführt.

3.3.3 KARL-FISCHER

Die Bestimmung der Restfeuchte der partikulären Proteinformulierungen wurde mittels Coulometrischer Karl-Fischer Titration vorgenommen (KF 373, Metrohm GmbH & Co, Filderstadt, Deutschland). Die Proben wurden in einer mit Stickstoff gefluteten Glove Box in 1,0ml wasserfreien Methanol dispergiert und anschließend für 10 Minuten geschüttelt. Von jeder Probe wurden 500µl in die Coulometrische Zelle, in der sich Hydranal[®] (Coulamat AG) befand, injiziert. Im Verlauf der Arbeit wurde eine Coulometrische Karl Fischer Einheit mit einem Head-Space Ofen eingesetzt (Analytik Jena AG, Jena, Deutschland). Proben in verbördelten 2R Vials wurden auf dem Ofen auf 95°C erhitzt, das verdampfende Wasser wurde mit Hilfe eines Nadelsystems in die Karl-Fischer Zelle transportiert.

3.3.4 POLARIMERTIE

Die Polarimetrie (Perkin Elmer Polarimeter 241MC) wurde eingesetzt, um Saccharose, die sich im Verlauf des Prozesses an den Metallfilterpatronen der Mini-Glatt Anlage abscheidet zu quantifizieren. Die Filterpatronen wurden dazu mit einer definierten Menge Wasser gewaschen und die optische Drehung der Lösung ermittelt.

3.3.5 DSC

Die DSC wurde eingesetzt, um amorphe Anteile in den partikulären Proteinformulierungen nachzuweisen. Dazu wurden etwa 20mg der Analyse in einen Aluminiumtiegel eingewogen, der anschließend mit einem Aluminiumdeckel fest verschlossen wurde. Die Proben wurden von 20°C auf -70°C abgekühlt und anschließend mit 10°C/min in einer Netzsch DSC 204

Phoenix[®] (Selb, Deutschland), die mit Indium kalibriert wurde, auf 120°C aufgeheizt.

3.3.6 XPS

Für die Messungen stand ein Probesteller aus Edelstahl mit einer 1,5 cm² großen, runden Vertiefung (1,5 mm) zur Verfügung, in den die Proben mit Hilfe eines Stahlstempels eingepresst wurden. Die Spektren wurden an einem Röntgenfotoelektronenspektrometer von VSW (Vacuum Science Workshop) aufgezeichnet. Die Energieanalyse und Detektion der Photoelektronen erfolgte mit einem Halbkugelanalysator (VSW HA 100), der mit einem Channeltron ausgestattet war. Der Analysator wurde im FAT-Modus (Fixed Analyser Transmission) mit variabler Bremsspannung bei 22eV betrieben. Die erhaltenen Signale wurden mit Hilfe des Computerprogramms E-C13 aufgezeichnet. Mit dem Computerprogramm fixps2 wurde eine Dekonvolution der Spektren vorgenommen.

3.3.7 UV-SPEKTROSKOPIE

Für die Untersuchungen wurde das Thermo Spectronic UV1 (Thermo Electron Cooperation Dreieich, Deutschland) eingesetzt. Die Natriumsalicylat Konzentration bei den Untersuchungen zur Optimierung der Ausbeute wurde bei einer Wellenlänge von 296nm durchgeführt.

3.3.8 BET OBERFLÄCHENMESSUNG

Zur BET Analyse wurden die Proben jeweils 4 Stunden, bei 60°C, unter Vakuum vorbereitet. Die Messungen wurden am Quantachrom Sorptionsautomaten AUTOSORB-1 MP, als Mehrpunkt-BET, mit Krypton, bei 77 Kelvin durchgeführt (DIN ISO 9277).

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 VERGLEICHENDE VERSUCHE IN VERSCHIEDENEN ANLAGEN

Ein idealer Trocknungsprozess sollte neben einer entsprechenden Prozessstabilität des Proteins weder zum Abrieb noch zur Granulation des eingesetzten Trägermaterials führen. Daneben sollten die Ausbeuten möglichst hoch sein. Um die Übertragbarkeit vom Labormaßstab in den Produktionsmaßstab zu ermöglichen, ist eine scale-up Fähigkeit des Prozesses erwünscht. Neben der GPCG-1 Anlage wurde die Mini-Glatt Anlage in die Untersuchungen einbezogen.

4.1.1 VERSUCHE IN DER GPCG-1 ANLAGE

Die Vorteile der GPCG-1 gegenüber der Mini-Glatt Anlage liegen in der scale-up Fähigkeit und der besseren Instrumentierung. Die untere Grenze für den Einsatz von Trägermaterial ist durch die Abmessungen der GPCG-1 limitiert und beträgt 300g. Aufgrund der leichteren optischen Kontrolle des Prozesses, wurden die ersten Versuche in der Top-Spray Variante durchgeführt. Da die Stabilität von Proteinen nicht nur von der eingesetzten Trocknungsmethode, sondern auch von den Hilfsstoffen in der Umgebung des Proteins im trockenen Zustand abhängt (Foster; 2001), wurden geeignete Trägermaterialien ausgewählt. Maa et al. setzte in seinen Untersuchungen zur Proteintrocknung in der Wirbelschicht ausschließlich Laktose als Trägermaterial ein (Maa et al.; 1996b; Maa et al.; 1997 ; Maa et al.; 2004). Da Laktose ein reduzierender Zucker ist und mit Proteinen eine Maillard Reaktion eingehen kann (Colaco et al.; 1996), wurde Laktose nicht verwendet. Die eigene Auswahl der Trägermaterialien erfolgte anhand der proteinstabilisierenden Effekte welche aus der Gefrier- und Sprühtrocknung bekannt sind. Durch Einsatz von Gerüstbildnern in Gefriertrocknungs- (Chang et al.; 1995; Hawe; 2006; Dong et al.; 1995 ; Prestrelski et al.; 1993) bzw. Sprühtrocknungsprozessen (Tzannis et

al.; 1999; Fuhrherr; 2005), kann die Destabilisierung von Protein verringert oder verhindert werden. Disaccharide wie Saccharose und Trehalose stabilisieren Proteine während des Einfrierens, der Trocknung und im trockenen Zustand (Carpenter et al.; 2002). Glycin ist bereits im rhIL-11 Bulk enthalten und schützt das Protein während der Herstellung in wässriger Lösung vor Stress induzierter Denaturierung. Glycin in niedriger Konzentration unterdrückt eine pH-Wert Verschiebung in Gegenwart von 10 oder 100mM Natriumphosphatpuffer während der Gefriertrocknung (Pikal-Cleland et al.; 2002). Lückel konnte zeigen, dass rhIL-6 welches in eine amorphe Matrix aus Disaccharid und Glycin eingebettet ist, eine höhere Stabilität aufweist als Proteine in einer Formulierung aus reinem Zucker (Lückel; 1996). Vor dem Hintergrund einer möglichen späteren Sprühlösungsformulierung mit Disacchariden wurde Glycin als Trägermaterial mit berücksichtigt. Mannitol als Zuckeralkohol ist im Vergleich zu Einfachzuckern aufgrund der nicht vorhandenen Carbonylfunktion wenig reaktiv. In der Lyophilisation wird Mannitol, vor allem als Gerüstbildner, in Verbindung mit Disacchariden eingesetzt (Johnson et al.; 2002). Ein weiteres Kriterium für die Auswahl der Trägermaterialien war die Verfügbarkeit in Teilchengrößen größer 125µm. Als Ausgangsmaterial für die Versuche wurde die Siebfraktion von 125 bis 250µm verwendet. Der 2,5mg/ml rhIL-11 enthaltenden Sprühlösung wurden in den orientierenden Versuchen neben dem im Bulk enthaltenen 22,5mg/ml Glycin und 10mM Phosphatpuffer keine weiteren Substanzen zugesetzt. Durch Verzicht auf stabilisierende Zusätze, sollte der Einfluss von Prozess und Trägermaterial stärker hervortreten.

Die wichtigsten Prozessparameter sind in der Wirbelschichttechnologie das Volumen und die Temperatur der Fluidisierungsluft, der Sprühdruk an der Düse und die Flussrate der Sprühflüssigkeit (Kap 1.1)(Jones; 1985). Die Zuluftgeschwindigkeit wurde mit 1,5m/s so eingestellt, dass sich nach subjektivem Empfinden eine gute Fluidisierung von 300g Trehalose ergab. Diese Zuluftgeschwindigkeit wurde für alle anderen Experimente beibehalten. Proteine zeichnen sich u.a. durch ihre Thermolabilität aus (Brange; 2000). Für die Zulufttemperatur wurden deshalb standardmäßig 30°C gewählt und ein Versuch wurde bei 34°C durchgeführt. Als Sprühdruk für die Düse wurde neben dem

vom Hersteller angegebenen Standardsprühdruk von 1,9bar mit Drücken von 1 und 2,75bar gearbeitet. Für die erfolgreiche Durchführung eines Wirbelschichtprozesses ist es wichtig die Sprühgeschwindigkeit zu kennen, bei welcher die mit der Sprühlösung eingebrachte Menge an Wasser gerade noch verdampfen und mit der Abluft ausgetragen werden kann. Bei Überschreiten dieser so genannten kritischen Sprührate (Abberger; 1996) kommt es zur Granulation (Koester; 2001). In Placeboversuchen mit Formulierungspuffer als Sprühlösung, wurde die kritische Sprührate in Abhängigkeit des eingesetzten Trägermaterials bei einer Zulufttemperatur von 30°C und 1,9bar Sprühdruk untersucht (Tab. 4.1-1). Dazu wurde die Flussrate sukzessive gesteigert und der Punkt der einsetzenden Granulation visuell ermittelt. Es zeigte sich, dass die kritische Sprührate vom Material abhängt. Um einheitliche, stabile Bedingungen zu erzielen wurde die Standardflussrate mit 2,8g/min festgesetzt.

Tab. 4.1-1: Kritische Sprührate in der GPCG-1 Anlage (Trägermaterial: 300g, Fluidisierung: 1,5m/s bei T=30°C, Sprühdruk SD=1,9 bar)

| Trägermaterial | kritische Sprührate [g/min] |
|----------------|-----------------------------|
| Saccharose | 3,5 |
| Glycin | 5,9 |
| Trehalose | 4,5 |
| Mannitol | 5,7 |

Um die Phänomene Abrieb und Granulation des Trägermaterials zu quantifizieren, wurde mit der Siebanalyse eine Klassierung des Produktes in Teilchengrößenklassen von größer 250µm, 125 bis 250µm und kleiner 125µm vorgenommen. Der Massenanteil der Fraktion kleiner 125µm wird als Abrieb, der Massenanteil größer als 250µm als Granulat oder Granulation betrachtet. Mit Saccharose als Trägermaterial konnte weder Abrieb noch Granulation nachgewiesen werden. In Prozessen mit Glycin als Trägermaterial, beträgt der Abrieb lediglich 2,3% (Abb. 4.1-1). Unter denselben Bedingungen findet man für Trehalose einen deutlich erhöhten Abrieb von 10,2%. Das eingesetzte Mannitol hielt der mechanischen Beanspruchung in der WS nicht stand. Der Abrieb wurde zu 52% ermittelt. Mannitol wurde daher für Proteinversuche auf der

GPCG-1 Anlage nicht weiter berücksichtigt. Auf der Mini-Glatt Anlage wurde im Zusammenhang mit der Sprühlösungsformulierung eine andere Mannitolqualität eingesetzt (Kap 4.3). Mit Trehalose wurden zusätzlich Experimente mit verschiedenen Prozesssteuerungsparametern durchgeführt (Abb. 4.1-1). Eine Erhöhung der Zulufttemperatur von 30°C auf 34°C führte zu keiner Veränderung. Eine Steigerung des Sprühdruks auf 2,75bar führte zur deutlichen Zunahme des Abriebs auf 22%, was sich auf eine verstärkte mechanische Beanspruchung des Trägermaterials bei erhöhtem Sprühdruk zurückführen lässt (Koester; 2001). Bei Versuchen mit erniedrigtem Sprühdruk von 1bar kam es zur Granulation des Trägermaterials. Wie Kristensen zeigte, geht in Wirbelschichtprozessen im allgemeinen mit einer Erniedrigung des Sprühdruks eine Zunahme der Granulatgröße einher (Kristensen et al.; 1987). Somit erweisen sich Saccharose und Glycin als gut geeignet, die eingesetzte Mannitolqualität allerdings nicht. Im Falle von Trehalose hängt das Ergebnis stark von den Prozessparametern ab und könnte kritische sein.

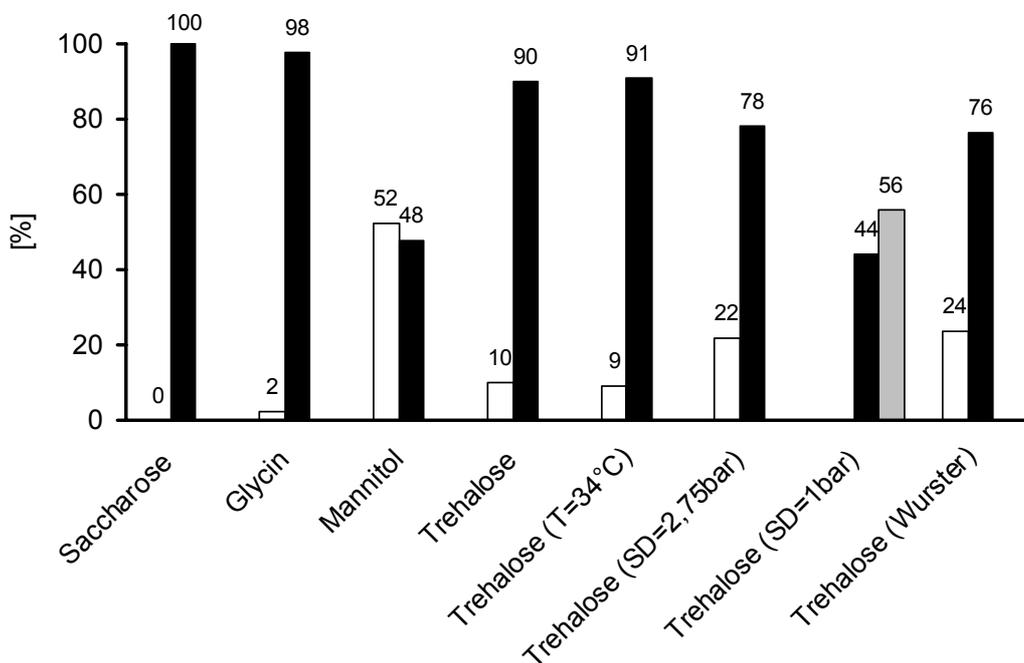


Abb. 4.1-1: Abrieb und Granulation von Produkten in der GPCG-1 Anlage □<math><125\mu\text{m}</math>, ■>math>125-250\mu\text{m}</math>, ■>math>>250\mu\text{m}</math> (Bedingungen abweichend von Standardbedingungen (Kap. 3) in Klammern angegeben)

Mittels Laserbeugung wurde die Tröpfchengröße beim Verdüsen in Abhängigkeit des Sprühdruks und der Flussrate der Sprühflüssigkeit bestimmt (Abb. 4.1-2) (Juslin et al.; 1995). Bei einem niedrigen Sprühdruks von 1bar und einer Flussrate der Sprühflüssigkeit von 2,8g/min, beträgt der d90-Wert für den Tröpfchendurchmesser 372 μ m und zeigt eine unzureichende Zerstäubung an. Die d90-Werte bei einem Sprühdruks von 1,9 bzw. 2,75bar fallen mit 30 bzw. 25 μ m deutlich geringer aus. Die Granulation bei 1bar Sprühdruks, lässt sich somit durch punktuelle Überfeuchtung infolge größerer Tröpfchen bei niedrigerem Sprühdruks erklären. Die Standardbedingung von 1,9bar führt zu einer ausreichenden Bestäubung.

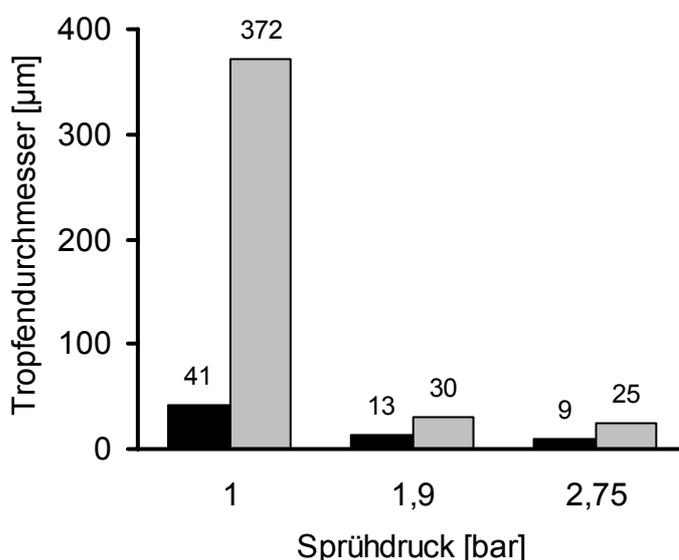


Abb. 4.1-2: Tropfendurchmesser beim Verdüsen mit der GPCG-1 Düse: ■d50, ■d90

Im Versuch in der Bottom-Spray Konfiguration mit Wurster Kolonne musste der Sprühkegel der Düse aufgrund der geänderten Geometrie der Anordnung verkleinert werden. Infolgedessen stieg der Abrieb im Vergleich zur Top-Spray Konfiguration mit 24% deutlich an (Abb. 4.1-1). Folgeversuche in der Wurster Konfiguration mit Saccharose als Trägermaterial bei ansonsten Standardbedingungen, führten unter zum Zusammenbruch der Fluidisierung nach Prozesszeiten von 10 bis 20 Minuten. Es konnte beobachtet werden, dass an der Innenseite der Wurster Kolonne abtropfende Sprühflüssigkeit auf dem

Siebboden liegendes Trägermaterial zum Verkleben brachte. Die Ursache hierfür liegt im Einsatz von geringen Mengen an Trägermaterial (300g). Der Sprühnebel der Düse trifft während des Prozesses aufgrund der geringen Trägermaterialdichte um die Düse zum Teil direkt auf die Wurster Kolonne.

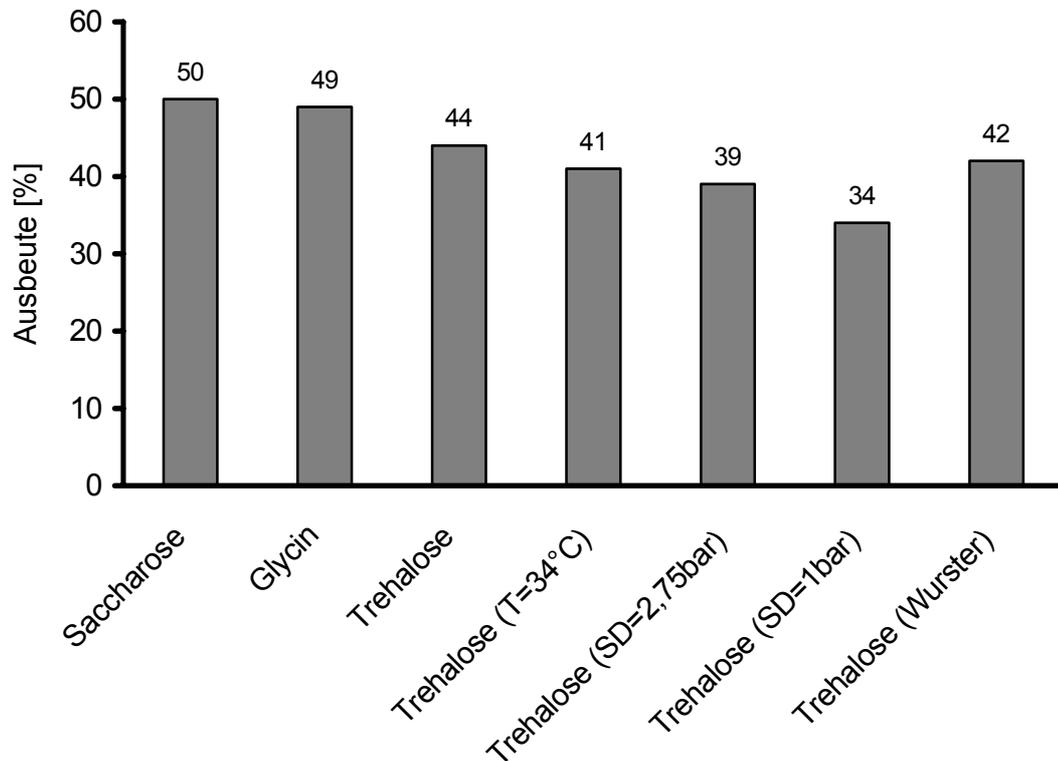


Abb. 4.1-3: Ausbeuten bei verschiedenen Versuchsbedingungen in der GPCG-1 Anlage (Bedingungen abweichend von Standardbedingungen (Kap. 3) in Klammern angegeben)

Neben Gesamtverhalten, Abrieb und Granulation wurde die Ausbeute der Wirbelschichtversuche in der GPCG-1 Anlage bestimmt (Abb. 4.1-3). Die Ausbeute ergibt sich als Verhältnis aus der Proteinmenge im Produkt zur tatsächlich eingesprützten Proteinmenge. Teile des Produktes wurden rekonstituiert und der rhIL-11 Gehalt der Lösung ermittelt (Kap. 3). Ausbeuten kleiner 100% können durch Ansprühen von Gerätebauteilen, durch Sprühtrocknung der Sprühlösung oder durch Abrieb von mit Protein gecoateten Partikeln erklärt werden. Um zu visualisieren in welchen Gerätebauteilen sich die Sprühlösung nach dem Prozess wieder findet, wurde neben den Proteinversuchen auch ein Versuch mit Farbstofflösung durchgeführt. Große

Teile der Sprühlösung fanden sich nach dem Prozess in den Filtern wieder. Bei verschiedenen Trägermaterialien ist zu erwarten, dass die Ausbeute von Teilcheneigenschaften wie Oberfläche, Dichte und Teilchengrößenverteilung abhängt. Unter Standardbedingungen sind die eingesetzten Trägermaterialien mit einer Ausbeute von 44 bis 50% vergleichbar (Abb. 4.1-3). Bei 2,75bar Sprühdruk beträgt die Ausbeute 39%. Eine mögliche Erklärung für die vergleichsweise geringe Ausbeute bei erhöhtem Sprühdruk bietet der verstärkte Abrieb (Abb. 4.1-1). Feines Material kann sich bevorzugt in den Filtern abscheiden. Eingehende Untersuchungen hierzu wurden im Rahmen der Optimierung der Mini-Glatt Anlage durchgeführt (Kap. 4.2). Die niedrigste Ausbeute wurde mit 34% im Trehaloseversuch mit 1 bar Sprühdruk beobachtet. Eine mögliche Erklärung hierfür bietet die starke Aufgranulierung (Abb. 4.1-1). Das Fluidisierungsbild des Materials ändert sich durch die geänderten Teilcheneigenschaften, die Gesamtoberfläche des zu überziehenden Materials nimmt mit zunehmender Aufgranulierung ab. Im Versuch mit erhöhter Zulufttemperatur von 34°C wurde wie schon in Bezug auf Granulation/ Abrieb kein auffälliger Einfluss in Bezug auf die Ausbeute festgestellt. Im Vergleich zu möglichen Ausbeuten die für die Sprühtrocknung beschrieben sind, ist die Ausbeuten die in den GPCG-1 Versuchen erzielt wurden zu niedrig.

Bei der Verdüsung von Proteinlösungen kann es durch Scherstress an der Düse und die enorme Oberflächenzunahme zur Bildung von Aggregaten kommen (Maa et al.; 1996). Neben dem Einfluss des Gesamtprozesses auf die Proteinstabilität wurde deshalb der Einfluss der Düse isoliert untersucht. Mit zunehmendem Sprühdruk wird ein Anstieg der Aggregate beobachtet. Beim Standardsprühdruk von 1,9bar steigt der Gehalt an Aggregaten von 2,6% in der Sprühlösung nach dem Verdüsen auf 5,0% an. Bei 1 bar Sprühdruk finden sich nach dem Verdüsen 2,9% bei 2,75 bar 7,1% Aggregate. Adler zeigte, dass sich erst durch den Zusatz von PS80 der Aggregatgehalt nach dem Versprühen von LDH Lösungen deutlich reduzieren lässt (Adler et al.; 2000). Die Flussrate der Sprühflüssigkeit hat bei 1,9bar im untersuchten Bereich von 2g/min bis 5,7g/min keinen Einfluss auf die Aggregatbildung. Das auf Glycin als

Trägermaterial aufgezogener Proteine, weist mit 32% einen deutlich höheren Gehalt an Aggregaten auf, als auf Saccharose und Trehalose aufgezo- genes rhIL-11 (Abb. 4.1-4). Durch Wasserstoffbrückenbildung mit polaren Gruppen im Protein tragen Hilfsstoffe wie Disaccharide zum Erhalt der nativen Struktur des Proteins bei, indem sie in der getrockneten Formulierung an die Stelle des Wassers treten (Arakawa et al.; 2001). Für die Lyophilisation konnte gezeigt werden, dass Saccharose die Entfaltung von Proteinen aufgrund ihrer geringeren Neigung zur Phasentrennung vom Protein während des Einfrierens besser unterdrücken kann als Trehalose (Allison et al.; 2000; Carpenter et al.; 2002). Für Sprühtrocknungsprozesse wurde ebenfalls das Phänomen der Phasentrennung von Zucker und Protein beschrieben (Tzannis et al.; 1999a). Trehalose weist im Vergleich zu Saccharose einen höheren T_g auf. Amorphe Trehalose hat selbst in Gegenwart von 1 bis 2% Restfeuchte noch einen T_g von über 90°C und ist deshalb ein für die Lagerung bei Raumtemperatur zu bevorzugender Hilfsstoff (Hatley 1999). Für den Zuckereffekt, wird das Trägermaterial offensichtlich angelöst und interagiert mit dem Protein (Kap 4.4). Daher kommt der Auswahl des Trägers besondere Bedeutung zu. Das Trehaloseprodukt aus dem Prozess mit einem Sprühdruk von 2,75bar weist einen deutlich höheren Aggregatgehalt (20,2%) auf als das bei 1,9bar erzeugte Produkt, während mit 1 bar Sprühdruk der Aggregatgehalt leicht absinkt. Der höhere Aggregatgehalt bei 2,75 bar lässt sich durch die stärkere Aggregation von rhIL-11 beim Verdüsen erklären (Abb. 4.1-4). Diese Schädigung des Proteins durch das Verdüsen begünstigt eine weitere stärkere Schädigung während der Trocknung. Weder eine Erhöhung der Zulufttemperatur von 30 auf 34°C, noch der Einsatz der Wurster Konfiguration in der Top-Spray Anordnung führen zu einer Erhöhung des Aggregatgehalts. Der Vergleich dieser Wirbelschichtkenntnisse und der Literatur zur Sprühtrocknung (Maa et al.; 1996; Fuhrherr; 2005; Schuele; 2005; Adler; 2005) legt den Schluss nahe, dass Verdüsung und Trocknung die Hauptursachen für die Proteinschädigung sind.

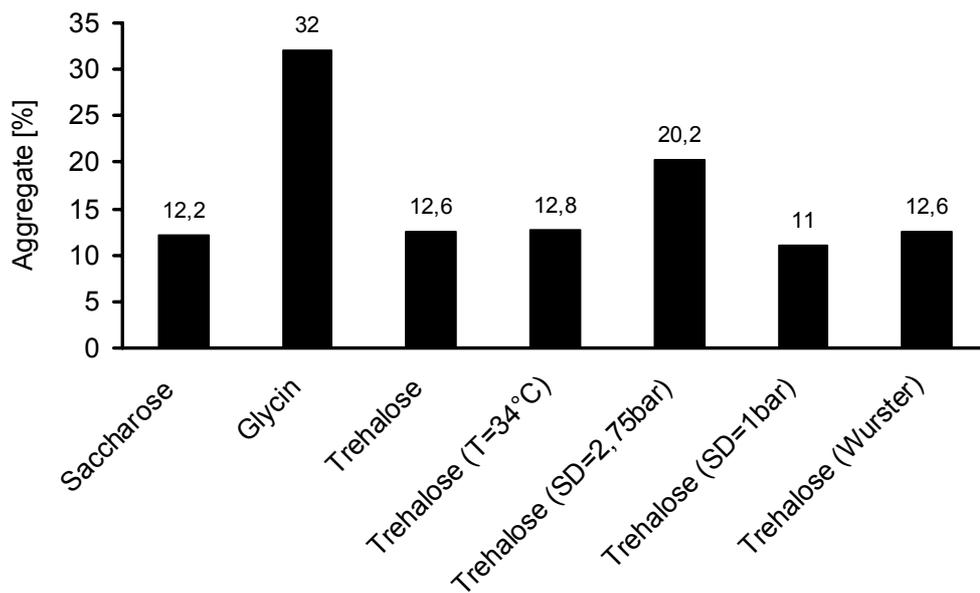


Abb. 4.1-4: GPCG-1 Anlage: ■ Prozessstabilitäten von rhIL-11 (Bedingungen abweichend von Standardbedingungen (Kap. 3) in Klammern angegeben)

Zusammenfassend lässt sich zur GPCG-1 Anlage sagen, dass die Produkteigenschaften von der Art des eingesetzten Trägermaterials und daneben maßgeblich vom Sprühdruk an der Düse beeinflusst werden. Bei Ansatzgrößen von 300g sind die Ausbeuten mit 34 bis 50% für Entwicklungsansätze nicht zufriedenstellend. Für die Verbesserung der Proteinstabilität der Produkte besteht durch die Auswahl geeigneter Trägermaterialien in Verbindung mit einer Sprühlösungsformulierung Optimierungspotential.

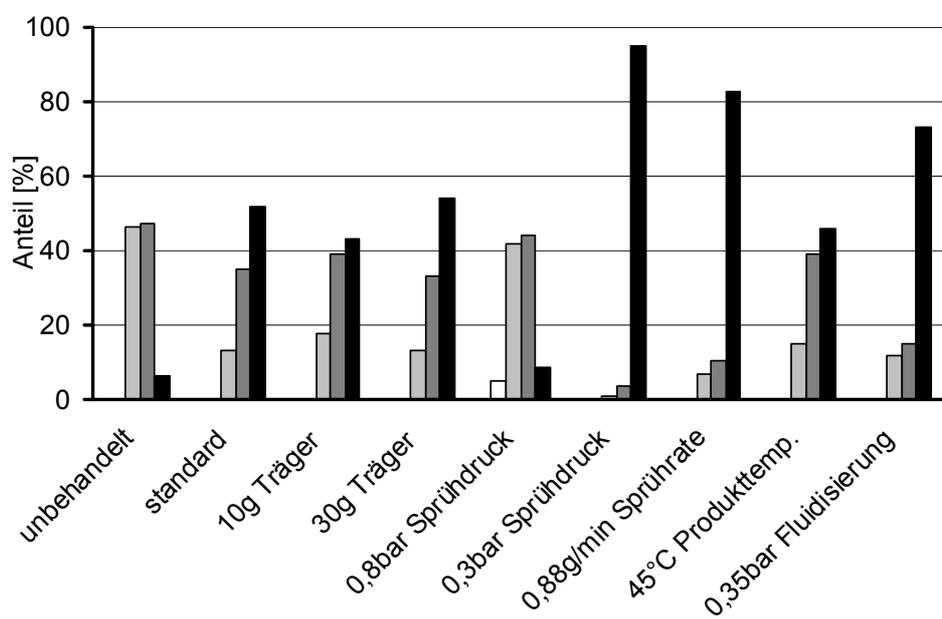
4.1.2 VERSUCHE IN DER MINI-GLATT ANLAGE

Der Vorteil der Mini-Glatt Anlage liegt in den kleineren Abmessungen, so dass grundsätzlich weniger Trägermaterial eingesetzt werden muss als in der größeren GPCG-1 Anlage. Da die Anlage nicht mit Luft aus der Umgebung, sondern mit Druckluft betrieben wird, ist kein Gerät zur Konditionierung der Luftfeuchte nötig. Nachteile der Mini-Glatt Anlage sind die eingeschränkte scale-up Fähigkeit und die wenig umfangreiche Instrumentierung. Die Anordnung der Komponenten in der Bottom-Spray Konfiguration sorgt dafür, dass die Düse in den Trägermaterialstrom eintaucht (Kap. 1.1). Sprühtropfen

fliegen deshalb nur eine kurze Strecke, bevor sie auf das Trägermaterial treffen, Reproduzierbarkeit und Einheitlichkeit des Coatings und Ausbeute sind deshalb besser als bei der Top-Spray Variante (Kap 1.1)(Jones; 1985). In Vorversuchen wurde beobachtet, dass es beim Einsatz geringer Trägermaterialmengen (10 bis 30g) zum Ansprühen des Wurstereinsatzes und der Metallfilter kommt. Alle Prozesse wurden deshalb ohne Wurstereinsatz durchgeführt. Die langen Standardmetallfilterpatronen wurden durch kürzere Filter ersetzt (Kap 3). Basierend auf den Erkenntnissen mit der GPCG-1 Anlage wurden zunächst Versuche mit Saccharose als Trägermaterial durchgeführt. In Vorversuchen wurde Formulierungspuffer mit Zusatz von 5mg/ml Saccharose bzw. Trehalose versprüht, wobei es zum Zusammenbruch der Prozesse nach ca. 4 Minuten kam. Alle Versuche wurden deshalb wie in der GPCG-1 Anlage vorerst ohne Zuckerzusätze durchgeführt. Ziel war es zunächst, die Aspekte Ausbeute, Abrieb und Granulation, sowie Proteinstabilität in Vorversuchen zu testen. Der Luftdruck zur Fluidisierung wurde mit 0,5 bar so eingestellt, dass die eingesetzten 10 bis 30g (Standard 20g) Trägermaterial nach subjektivem Empfinden gut fluidisiert wurden. Aufgrund der Thermolabilität von Proteinen wurde die Zulufttemperatur so gewählt, dass sich für die Produkttemperatur ein Wert von 32°C (Standard) bzw. 45°C einstellte. Neben einer geringen Standardsprührate von 0,36g/min, wurde ein Versuch mit einer Sprührate von 0,88g/min durchgeführt. Um stabile Prozesse fahren zu können, war es nötig an den Filtern einen hohen Abblasdruck von 3 bar anzulegen.

Zur Untersuchung von Abrieb und Granulation wurde mittels Siebanalyse eine Klassierung des Ausgangsmaterials und der Produkte vorgenommen (Abb. 4.1-5a). Bei Standardparametern kommt es im Vergleich zum Saccharose Prozess in der GPCG-1 zur verstärkten Granulation (Abb. 4.1-1). Die in der Mini-Glatt pro Gramm Trägermaterial eingesprühete Flüssigkeitsmenge ist mit 0,36g/min auf 20g Trägermaterial etwa doppelt so hoch wie in der GPCG-1 Anlage,

a)



b)

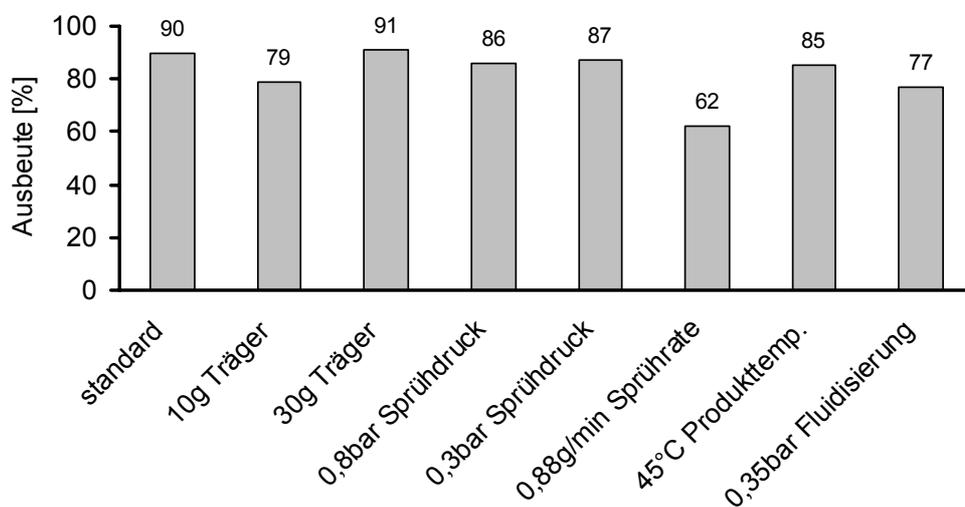


Abb. 4.1-5: Prozesse in der Mini-Glatt Standard Konfiguration mit Saccharose (Bedingungen abweichend von Standardparametern (Kap. 3) auf der x-Achse) a) Siebanalyse: □ <180µm, ■ 180-355µm, ■ 355-500µm ■ >500µm; b) Ausbeuten

in der mit 2,8g/min auf 300g Trägermaterial gesprüht wurde. Weiterhin hat die Abmessung der Anlage einen deutlichen Einfluss auf die Produkteigenschaften. Je größer die Anlage, desto geringer ist die Neigung der Partikel zu agglomerieren (Maa et al.; 1996). Bei Prozessen mit erniedrigtem Sprühdruk, erhöhter Speisezufuhr und schwächerer Fluidisierung, wurde eine verstärkte Granulation beobachtet. Diese genannten Einstellungen führen zu einer erhöhten Feuchte im Wirbelbett, wodurch sich die erhöhte Granulationsneigung erklärt. Der stärkste Granulationseffekt tritt bei einem erniedrigten Sprühdruk von 0,3bar auf. Eine Erhöhung der Trägermaterialmenge von 20 auf 30g führt zu keinen auffälligen Veränderungen. Bei Einsatz von 10g (Standard 20g) Trägermaterial sowie bei einer Produkttemperatur von 45°C (Standard 32°C) besteht kein deutlicher Unterschied zu den Standard Bedingungen. Bei einer Erhöhung des Sprühdruks auf 0,8bar wurde neben einer leichten Granulation deutlicher Abrieb beobachtet. Durch den höheren Sprühdruk ist die mechanische Belastung für das Trägermaterial höher.

Unter den Standardparametern wurde beim Aufsprühen von rhIL-11 Lösung eine erfreuliche Ausbeute von 90% erzielt (Abb. 4.1-5b). Bei einer höheren Sprühdrate von 0,88g/min, einer niedrigen Fluidisierungsströmung von 0,35bar oder einer auf 10g reduzierten Trägermaterialmenge, wurden geringere Ausbeuten von 62, 77 bzw. 79% erhalten. Die Ausbeuten, die bei Einsatz von 30g Trägermaterial, 0,3 bzw. 0,8 bar Sprühdruk oder 45°C Produkttemperatur erzielt wurden, bewegen sich mit 85 bis 91% in einem mit den Standardbedingungen vergleichbaren Bereich. Untersuchungen zum Verbleib von Wirkstoff in den Komponenten der Anlage die zu Ausbeuten von weniger als 100% führen, sind in Kapitel 4.2 beschrieben. Aufgrund der Erkenntnisse zu Abrieb/ Granulation und Ausbeute wurden Bedingungen für die Prozessstabilitätsversuche mit Protein festgelegt. Neben Versuchen bei unterschiedlichem Sprühdruk wurde ein Versuch bei einer Produkttemperatur von 45°C durchgeführt.

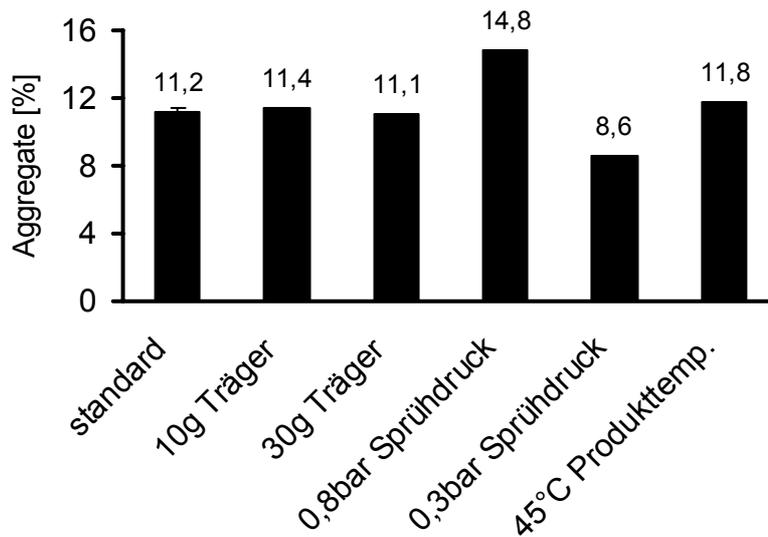


Abb. 4.1-6: Prozessstabilitäten: Mini-Glatt Standard Konfiguration mit Saccharose
(Grundparameter: Trägermaterial TM=20g, Sprühdruk SD=0,5bar, Sprütrate SR=0,36g/min, Fluidisierung: T=32°C mit FD=0,5bar)

Um zu untersuchen, welchen Einfluss das Verdüsen auf die Stabilität des Proteins hat, wurden wie mit der GPCG-1 Untersuchungen zur Sprühstabilität von rhIL-11 durchgeführt. Bei der Ausgangsbedingung von 0,5bar steigt der Gehalt an Aggregaten in der Sprühlösung von 2,6% nach dem Verdüsen auf 5,2% an. Bei 0,3 bar Sprühdruk finden sich nach dem Verdüsen 2,8% bei 0,8 bar 7,1% Aggregate. Durch die unterschiedlichen geometrischen Abmessungen von GPCG-1- und Mini-Glatt Düse unterscheiden sich die zum Verdüsen notwendigen Sprühdruicke. Bei Standard Sprühdruicken von 1,9bar (GPCG-1 Düse) und 0,5bar (Mini-Glatt Düse) ist der Aggregatgehalt mit 5,0% bzw. 5,2% nach dem Versprühen vergleichbar. Analog zu Ergebnissen zur Sprühstabilität nimmt, wie in GPCG-1 Prozessen, die Prozessstabilität der untersuchten Produkte mit steigendem Sprühdruk ab (Abb. 4.1-6). Der Effekt der Trocknung des Proteins im Fluidbett auf die Bildung von Aggregaten beträgt in der Standardkonfiguration zwischen 5,9 und 7,5%. Bei Produkten, in denen bereits aufgrund des Verdüsens eine erhöhte Aggregation des Proteins beobachtet wird findet zusätzlich eine verstärkte Aggregation durch die Trocknung im Wirbelbett statt. Eine Erhöhung der Produkttemperatur auf 45°C führt zu einem ganz leichten Anstieg der Aggregate. Bei Einsatz von 10 bzw. 30g

Trägermaterial konnte kein Unterschied zu den Versuchen mit 20g festgestellt werden.

Die Restfeuchte hat einen signifikanten Einfluss auf die chemische und physikalische Stabilität von getrockneten Proteinen (Maa et al.; 1998; Lückel; 1996). Wasser fungiert als Weichmacher und führt zu einer Absenkung der Glasübergangstemperatur von amorphen Materialien (Shamblin et al.; 1998), (Te Booy et al.; 1992). Im allgemeinen gilt die Proteinstabilität in Formulierungen als umso besser, je tiefer die Formulierung unterhalb ihrer Glasübergangstemperatur gelagert wird (Carpenter et al.; 2000). Die Restfeuchte eines getrockneten Pulvers hängt von Art des Materials und der Umgebung ab, in der das Pulver produziert, verarbeitet und gelagert wird (Maa et al.; 1998). Die Produkte unterscheiden sich nur geringfügig mit marginalem Restfeuchten zwischen 0,01 und 0,03%. Betrachtet man wirbelschichtgetrocknete Produkte so befindet sich das Protein in einer dünnen Schicht auf der Trägermaterialoberfläche (Abb. 4.1-7 a). Zum Vergleich ist in sprühgetrockneten Produkten das Protein in eine Matrix eingebettet (Abb. 4.1-7 b). Die Feuchtigkeit in der proteinhaltigen Schicht der wirbelschichtgetrockneten Produkte, welche maßgebend für die Proteinstabilität ist, kann nicht isoliert bestimmt werden. Aufgrund der verschiedenen Zusammensetzung von Trägermaterial und proteinhaltiger Schicht, muss von unterschiedlichen Restfeuchten ausgegangen werden. Die Restfeuchte unbehandelter Saccharose wurde zu 0,01% ermittelt.

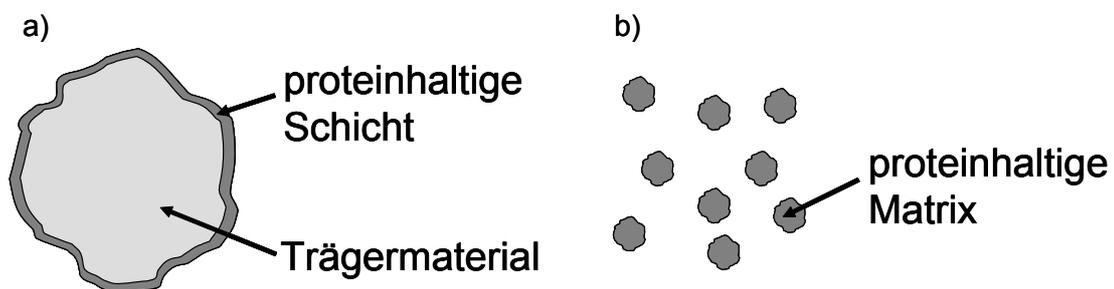


Abb. 4.1-7: Aufbau von wirbelschicht(a)- und sprüh(b)-getrockneten Produkten

Bei 20g Trägermaterial beträgt nach Auftragen von 15g Sprühlösung die Masse der proteinhaltigen Schicht 0,4g. Bei einer ermittelten Restfeuchte des Produktes von beispielsweise 0,02%, kann in Abhängigkeit der Verteilung des Wassers im Produkt die Restfeuchte in der proteinhaltigen Schicht theoretisch Werte zwischen 0 und 1% annehmen. Damit lässt sich eine geringe Restfeuchte in der proteinhaltigen Schicht, vergleichbar mit einem Lyophilisationsprodukt postulieren.

4.1.3 ZUSAMMENFASSUNG

In Abhängigkeit der Art des eingesetzten Trägermaterials sind bei Produkten aus der GPCG-1 Anlage die Eigenschaften, die Ausbeuten und die Prozessstabilität von rHL-11 unterschiedlich. Beim Einsatz geringer Sprühdreücke, die zur Granulation führen und hoher Sprühdreücke, die zum Abrieb führen, sind die Ausbeuten vergleichsweise gering. In der GPCG-1 Anlage wurden Ausbeuten zwischen 34 und 50%, in der Mini-Glatt Anlage zwischen 62 und 91% erzielt. Bei erhöhter Flussrate der Sprühflüssigkeit oder reduzierter Menge Trägermaterial war in der Mini-Glatt Anlage die Ausbeute etwas geringer. Produkte aus der GPCG-1 Anlage enthalten zwischen 11 und 32% Aggregate, wobei das Produkt auf Saccharose Basis 12,2% Aggregate enthält. Bei GPCG-1 Prozessen mit Trehalose als Trägermaterial kommt es außer bei niedrigem Sprühdreuck zum Abrieb. Mit Saccharose wurde weder Abrieb noch Granulation beobachtet, Glycin bietet keinen stabilisierenden Effekt. In Prozessen auf der Mini-Glatt Anlage wurde nur Saccharose eingesetzt. Die Produkte enthalten zwischen 8,7 und 14,6% Aggregate. Die Höhe des Sprühdreucks hat in beiden Anlagen einen deutlichen Einfluss auf die Bildung von Aggregaten. Der Effekt der eigentlichen Trocknung im Wirbelbett, der sich aus dem Aggregatgehalt im Produkt, abzüglich der Aggregatbildung durch das Verdüsen ergibt, beträgt in der GPCG-1 Anlage für Saccharose 7,2%, für Trehalose 7,6 und für Glycin 27%. In der Mini-Glatt Anlage entstehen durch die eigentliche Trocknung in Abhängigkeit der Prozessparameter mit Saccharose zwischen 5,9 und 7,5% Aggregate. In den Mini-Glatt Prozessen mit Saccharose wurde in Abhängigkeit der Prozessbedingungen partiellen Aufgranulierung bzw.

Abrieb beobachtet. Eine Steigerung der Ausbeute in der GPCG-1 Anlage ist nur durch Einsatz höherer Mengen an Trägermaterial zu erwarten. Da Ansätze von größer 300g für Entwicklungsarbeiten zu hoch sind, wird auf weitere Versuche mit der GPCG-1 verzichtet. Die Ausbeuten in der Mini-Glatt sind mit 85 bis 90% auch im Vergleich zur Sprühtrocknung sehr gut. Fitzner erzielte in Sprühtrocknungsversuchen mit 5mg/ml rhIL-11 bei variablen Trehalose/ Glycin Verhältnissen, unterschiedlich hohen PS80 Konzentrationen und verschiedenen T_{inlet}/ T_{outlet} Kombinationen Ausbeuten zwischen 57 und 80% (Fitzner; 2003). In Kooperation mit der Firma Glatt sollen an der Mini-Glatt Anlage apparative Veränderungen vorgenommen werden, so dass Prozesse in Kleinstmengen bei möglichst hoher Ausbeute auch unter Zusätzen von Zuckern zur Sprühlösung stabil laufen.

Die Trocknung von rhIL-11 mit Hilfe der Wirbelschicht ist somit erfolgversprechend. Vor dem Hintergrund einer guten Stabilisierung von rhIL-11, soll die Produkttemperatur niedrig gewählt werden. Aufgrund der vergleichsweise geringen Abmessungen der Mini-Glatt, besteht prinzipiell eine verstärkte Neigung zur Granulation. Beim Überziehen von Partikeln ist die Agglomeration eines der größten Probleme (Fukumori et al.; 1992). Mit Hilfe der Prozesssteuerungsparameter soll die Feuchte im Prozess deshalb gering gehalten werden um die Granulation zu unterbinden. Bei der Wahl der Prozesssteuerungsparameter, sollte die Sprühdrate so niedrig wie möglich gewählt werden. Mit Saccharose wurde so eine hohe Ausbeute bei vergleichsweise geringer Granulation erzielt. Der Sprühdruk sollte in Hinblick auf hohe Ausbeute und geringe(n) Abrieb/ Granulation nicht zu extrem gewählt werden.

Um die Prozessstabilität der Produkte zu verbessern, gilt es anschließend eine Optimierung der Sprühlösung durchzuführen. Durch Zusatz geeigneter Hilfsstoffe soll das Protein beim Verdüsen und während der Trocknung möglichst gut geschützt werden. Neben der Prozessstabilität soll die Lagerstabilität bei unterschiedlichen Bedingungen untersucht und optimiert werden.

4.2 OPTIMIERUNG DER MINI-GLATT ANLAGE

Die Optimierung der Mini-Glatt Anlage wurde in Kooperation mit der Firma Glatt durchgeführt. Ziel ist es, dass Prozesse mit Mengen Trägermaterial von 20g und weniger auch unter Zusätzen von Zuckern zur Sprühlösung stabil verlaufen. Die Ausbeute sollte 90% oder höher sein. Eine Aufgranulierung und auch verstärkter Abrieb des Trägermaterials ist dabei unerwünscht. Bei Einsatz von 10g und 20g wurden in den orientierenden Versuchen mit 79 und 90% bereits gute Ausbeuten erzielt (Kap 4.1). Diese Prozesse konnten allerdings nur durch einen hohen Ausblasdruck von 3bar an den Filtern stabil am Laufen gehalten werden. Weiterhin konnte in diesen Prozessen beobachtet werden, dass Teile des Trägermaterials beim Zurückfallen auf den Anströmboden nicht sofort wieder fluidisiert wurden, vielmehr blieb das Trägermaterial für unbestimmte Zeit am äußeren Rand des Anströmbodens liegen, was zu einer verminderten Ausbeute und auch zum Zusammenbruch des Prozesses führen kann. Beim Versprühen von Wasser mit Zusatz von 5mg/ml Saccharose bzw. Trehalose, konnten keine stabilen Prozesse gefahren werden (Kap 4.1). Ein Leitgedanke bei der Durchführung der Anlagenoptimierung ist, dass eine höhere Trägermaterialmenge im Bereich des Sprühnebels der Düse während des Prozesses zu höheren Ausbeuten führen kann. Vor Durchführung der orientierenden Versuche (Kap 4.1), wurde mit dem Austausch der regulären Filter durch kürzere Filter bereits eine Modifikation der Standardanlage vorgenommen. Ein Ansprühen der Filter und der damit verbundene Wirkstoffverlust konnten so verhindert werden. Da die Mini-Glatt Anlage nicht über ein Trägermaterialaufgabesystem verfügt, muss das Trägermaterial vor dem Zusammenbau der Anlage in den montierten Materialbehälter eingefüllt werden. Das Einstellen einer definierten Temperatur in der Anlage mit unmittelbar anschließendem Prozessbeginn durch Zugabe des Trägermaterials ist so nicht möglich. Beim Befüllen können außerdem Teile des Trägermaterials durch den Ringschlitz zwischen Düse und Anströmboden fallen. Zur reproduzierbaren Befüllung der Anlage wurde deshalb eine Düsenkappe eingesetzt. Um den Verlust von Sprühlösung durch Ansprühen der

Komponenten der Anlage oder die Anhaftung von wirkstoffhaltigen Trägermaterial während eines Prozesses zu quantifizieren, wurde mit Natriumsalicylat(NaSal)-haltiger Sprühlösung gearbeitet. Die Bauteile der Anlage wurden nach dem Prozess gewaschen und der NaSal-Gehalt der Waschlösung bestimmt. Untersucht wurden dabei Filter, Filterturm, Entspannungsgehäuse sowie der Materialbehälter. Um über Wirkstoff- und Saccharosegehalt in den Filtern zwischen direkten Ansprühen der Filter und Anhaften von besprühten Partikeln zu unterscheiden, wurde zusätzlich der Saccharosegehalt der Filterwaschlösungen polarimetrisch bestimmt.

4.2.1 ABGESENKTE DÜSE

Die erste Modifikation mit der Prozesse durchgeführt wurden, war eine auf das Niveau des Anströmbodens abgesenkte Düse (Abb. 4.2-1). Bei einer abgesenkten Düse, ist die Wegstrecke auf der Sprühtropfen und Trägermaterial aufeinander treffen können verlängert, was die Ausbeute von Prozessen erhöhen sollte. Durch die anströmende Luft aus der auf das Niveau des Anströmbodens abgesenkten Düse, entsteht durch den Venturi-Effekt (Jones; 1994) ein Sog in Richtung Düse. Am Rand des Materialbehälters zurückfallendes Trägermaterial kann durch den Sog schneller in Richtung Düse transportiert werden, was zu stabileren Prozessen führen kann.

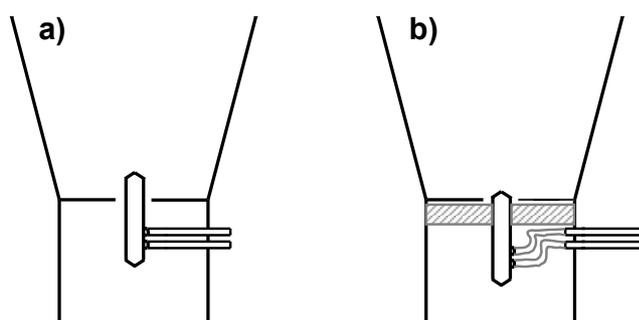


Abb. 4.2-1: Montierter Materialbehälter der Mini-Glatt Anlage (schematisch): Standardkonfiguration (a), Konfiguration mit absenkbarer Düse (b)

Letztlich wird die Trägermaterialmenge im Bereich des Sprühnebels der Düse erhöht, wodurch mit einer Erhöhung der Ausbeute gerechnet werden kann. Um die Position der Düse in der Höhe verändern zu können, wurden die Metallanschlußröhrchen für Druckluft und Sprühflüssigkeit verkürzt. Die jeweiligen Enden der Metallröhrchen wurden mit flexiblen Schläuchen verbunden. Zur Fixierung der Düse wurde ein Düsenhalter aus Plexiglas angefertigt (Abb. 4.2-2).

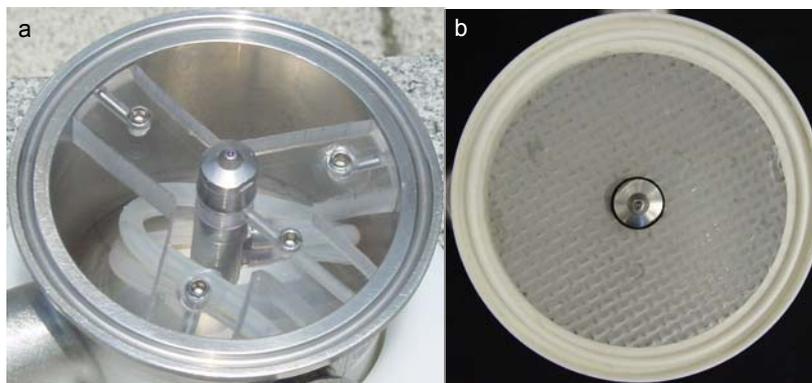


Abb. 4.2-2: Düsenhalter mit absenkbarer Düse (a) Aufsicht: abgesenkte Düse mit Siebplatte und Ringschlitz dazwischen (b)

Ausgewählte, im Rahmen der orientierenden Versuche durchgeführte Experimente, wurden in der Konfiguration mit abgesenkter Düse (KAD) wiederholt. Die Ausbeuten betragen dabei zwischen 84 und 96% (Tab 4.2-1). Im Vergleich zur Standardkonfiguration, wurde eine Steigerung der Ausbeuten um 5 bis 6% erzielt. In den Komponenten der Anlage wurden nach dem Prozess zwischen 5 und 14% des versprühten NaSal wieder gefunden. Die größten Verluste traten mit Werten zwischen 4,1 und 9,1% an den Filtern auf. Im Vergleich zu Prozessen bei 0,8bar und 0,3bar Sprühdruck, wurde bei 0,5bar Sprühdruck mit 96% die höchste Ausbeute erzielt. Bei einem Sprühdruck von 0,8bar wurde mit 3% ein relativ hoher Wirkstoffgehalt im Entspannungsgehäuse gefunden.

Tab. 4.2-1: Ausbeute/Verluste in der Konfiguration mit abgesenkter Düse (KAD). Ausbeute in der Standardkonfiguration zum Vergleich. Standardabweichungen für n=3 in Klammern

| | Anlage | Prozessbedingungen | | | | |
|------------------|---------------------|--------------------|----------|----------|----------|--------|
| | | standard | 0,3bar | 0,8bar | 45°C | 10g |
| Ausbeute [%] | Standard | 90 (4,1) | 87 | 86 | 85 | 79 |
| | KAD | 96 (3,5) | 93 (5,2) | 92 (4,2) | 91 (3,9) | 84 (7) |
| Verluste KAD [%] | Filter | 4,1 | 5,1 | 5,5 | 4,5 | 9,1 |
| | Filtergehäuse | 0,2 | 0,7 | 0,4 | 1,8 | 1,6 |
| | Sichtfenster | 0,6 | 1,2 | 3 | 2,4 | 2,7 |
| | Materialbehälter | 0,3 | 0,4 | 0,3 | 1,4 | 0,5 |
| Summe KAD [%] | Verluste + Ausbeute | 101 | 100,8 | 101,6 | 101,2 | 97,6 |

Dieser lässt sich auf die Anheftung von Produkt am Übergang von Fenster und Metall zurückführen. Sowohl der NaSal-Verlust (5,5%) als auch die Menge an Saccharose (0,23g) waren in den Filtern gegenüber den Versuchen bei 0,5bar und 0,3bar Sprühdruk leicht erhöht (Abb. 4.2-3). Durch den hohen Abrieb von Saccharose bei einem Sprühdruk von 0,8bar (Abb. 4.2-4) entsteht Feinanteil, der sich teilweise in den Filtern ablagert.

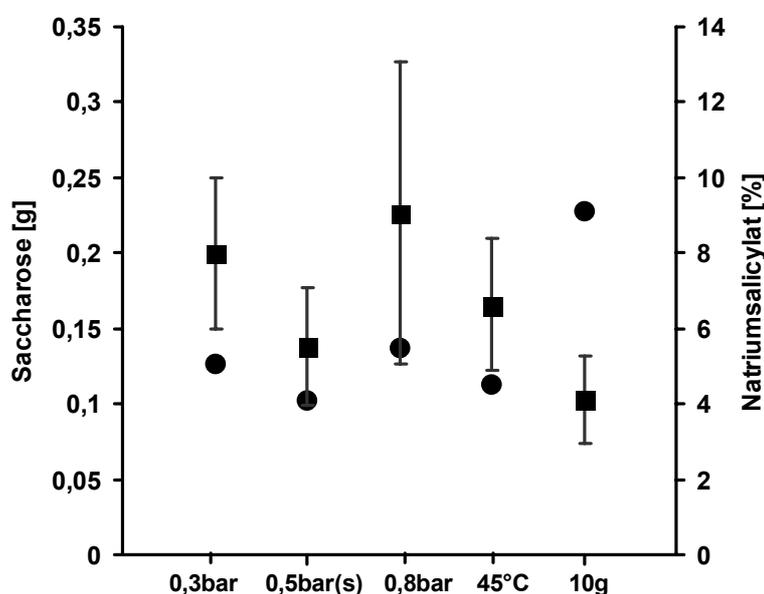


Abb. 4.2-3: Verluste in den Filtern in der Konfiguration mit abgesenkter Düse: ■ Saccharose und ● Natriumsalicylat

Der leicht höhere Verlust bzw. die geringere Ausbeute bei 0,3bar im Vergleich zu 0,5bar lässt sich durch die Granulation des Trägermaterials erklären. Infolge des Aufgranulierens des Trägermaterials nimmt die Teilchenzahl um die Düse im Verlauf des Prozesses ab, die Ausbeuten sind daher geringer. In Prozessen mit 10g Trägermaterial war die Ausbeute am geringsten und der Verlust an den Komponenten der Anlage am höchsten. Offensichtlich reicht die Menge von 10g nicht für eine ausreichende Partikeldichte in Düsenumgebung aus, so dass Entspannungsgehäuse und Filter vom Sprühnebel erreicht werden.

Zusätzlich wurde eine Klassierung der Produkte vorgenommen (Abb. 4.2-4). Beim Vergleich von Produkten, die in der Standardkonfiguration und in der Konfiguration mit abgesenkter Düse erzeugt wurden, besteht kein auffälliger Unterschied. In beiden Varianten kommt es bei 0,5 bar zu deutlicher Agglomeration, die bei 0,3bar in verstärkter Form auftritt. Lediglich bei 0,8bar kommt es zu keinem starken Anstieg von Partikeln größer 500 μm , allerdings entstehen 5% Abrieb.

Um zu untersuchen, ob Prozesse in der Konfiguration mit abgesenkter Düse stabil verlaufen, wurde wie schon in den orientierenden Versuchen mit der Standardkonfiguration, den Sprühlösungen Zucker zugesetzt. Zusätze von 5mg/ml Saccharose bzw. 5mg/ml Trehalose zur Sprühlösung führten nach drei bis fünf Minuten zum Zusammenbruch der Prozesse. Wie bereits bei Prozessen in der Standardkonfiguration wurden Teile des Trägermaterials beim Zurückfallen auf den Anströmboden nicht gleich wieder fluidisiert, sondern verweilten am Rand des Anströmbodens. Der Venturi-Effekt führte nur zu einer unzureichenden Unterstützung des Trägermaterialstroms in Richtung Düse.

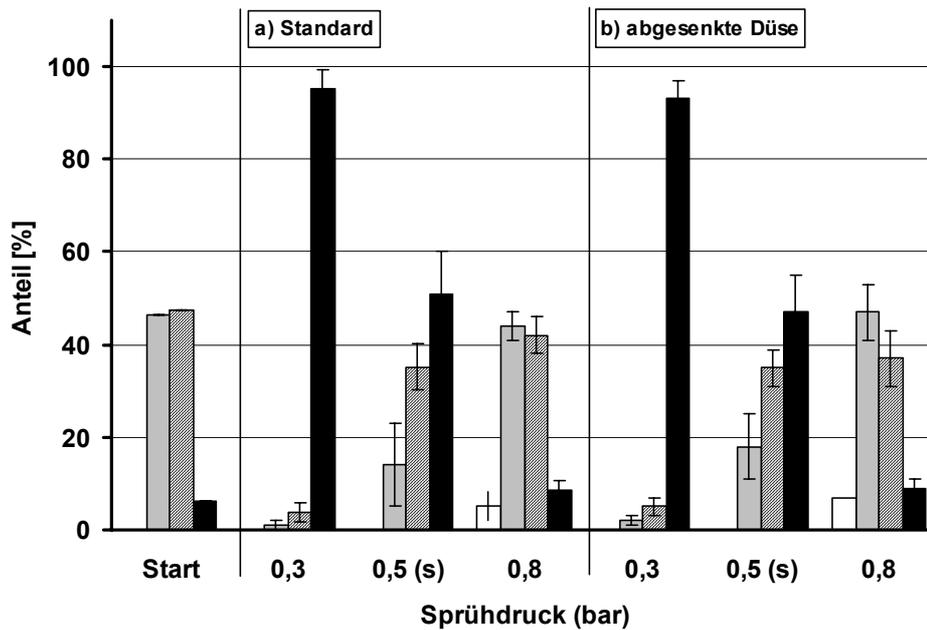


Abb. 4.2-4: Partikelgrößenverteilung: Produkte mit unterschiedlichen Sprühdrukken: a) Standard und b) Konfiguration mit abgesenkter Düse (KAD); ohne = unbehandeltes Ausgangsmaterial (0-180µm □, 180-355µm ■, 355-500µm ▨, >500µm ■)

Durch die Absenkung der Düse konnte die Ausbeute weiter gesteigert werden. Phänomene wie Abrieb/ Granulation und das Kollabieren von Prozessen beim Einsatz von Sprühlösungen mit Zuckerzusatz traten in der Konfiguration mit abgesenkter Düse ebenfalls auf. Daher galt es die Anlage durch weitere Modifizierungen für Prozesse im kleinen Maßstab bei geringen Temperaturen auf Basis der Konfiguration mit abgesenkter Düse weiter zu verbessern.

4.2.2 MODIFIZIERTER MATERIALBEHÄLTER UND DÜSENAUFNAHME

Mit einer Reduzierung der Grundfläche des Materialbehälters soll erreicht werden, dass Trägermaterial schneller wieder fluidisiert werden kann. Neben stabileren Prozessen bei Einsatz von zuckerhaltigen Sprühlösungen, wird mit einer höheren Ausbeute und einer verminderten Granulation gerechnet. Die Reduzierung der Grundfläche kann im einfachsten Fall mit Hilfe eines Ringeinsatzes aus Stahl erfolgen (Abb. 4.2-5).

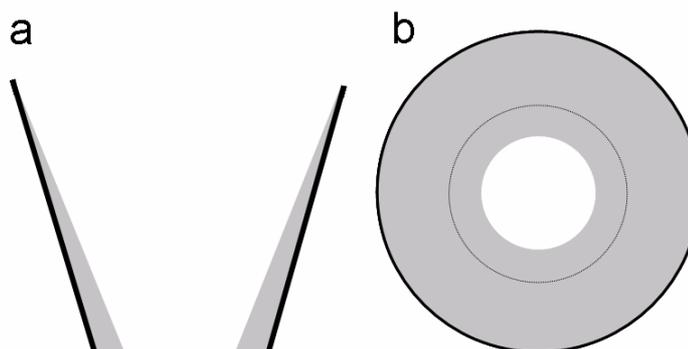


Abb. 4.2-5: Möglichkeit zur Reduzierung der Grundfläche schematisch: Ringeinsatz aus Metall zur Reduzierung der Grundfläche des Materialbehälters; Seitenansicht (a), Ansicht von oben (b): weißer Kreis: reduzierte Grundfläche, angedeuteter schwarzer Kreis: Begrenzung ursprüngliche Grundfläche ohne Ringeinsatz

Es wurde ein neuer Materialbehälter, der im Folgenden als Materialbehälter 1 bezeichnet wird, mit kleinerer Grundfläche und eine Düsenaufnahme konstruiert (Abb. 4.2-6b, Abb. 4.2-7b). Durch Einschrauben der Düse in die Düsenaufnahme entsteht ein 0,1mm breiter Ringspalt, welcher im Vergleich zum 0,6mm Ringspalt der Standardkonfiguration und der Konfiguration mit abgesenkter Düse deutlich schmaler ausfällt. Die Geschwindigkeit des Volumenstroms der Fluidisierungsluft um die Düse in der Anordnung mit Düsenaufnahme ist deshalb erhöht. Durch eine Aussparung von 0,1 mm zwischen dem Anströmboden und dem Materialbehälter, entsteht parallel zum Anströmboden ein Luftstrom in Richtung Düse (Abb. 4.2-6b). Zurückfallendes Trägermaterial soll durch die optimierte Geometrie des Materialbehälters und den Luftstrom parallel zum Anströmboden schneller in Richtung Düse befördert werden. Die Düsenaufnahme begünstigt dabei durch die vom Anströmboden in Richtung Düsen spitze ansteigende Form den Trägermaterialfluss. Durch den oben beschriebenen Volumenstrom hoher Geschwindigkeit um die Düse wird das Trägermaterial fluidisiert. Der Ansatz die Anlage höher zu Bauen um den Wirkstoffverlust in den Filtern zu reduzieren wurde aus technischen Gründen nicht weiterverfolgt.

In der Standardkonfiguration und der Konfiguration mit abgesenkter Düse kollabierten Prozesse mit Zusätzen von 5mg/ml Saccharose bzw. Trehalose zur Sprühlösung. Da eine Formulierungsentwicklung der Sprühlösung nur unter

Einsatz von Zuckern möglich ist, wurden mit den neuen Komponenten zuerst Untersuchungen zur Prozessstabilität in Verbindung mit zuckerhaltigen Sprühlösungen durchgeführt. Diese Prozesse wurden unter Standardbedingungen durchgeführt. Dabei wurden die Gehälter an Saccharose bzw. Trehalose und Glycin in der Sprühlösung variiert. Neben Saccharose als Trägermaterial wurden Glycin, Trehalose und Mannitol in die Untersuchungen einbezogen. Da die im Rahmen der GPCG-1 Untersuchungen eingesetzte Mannitolqualität eine geringe mechanische Stabilität aufwies (Kap. 4.1), wurde eine andere Qualität eingesetzt (Kap. 3).

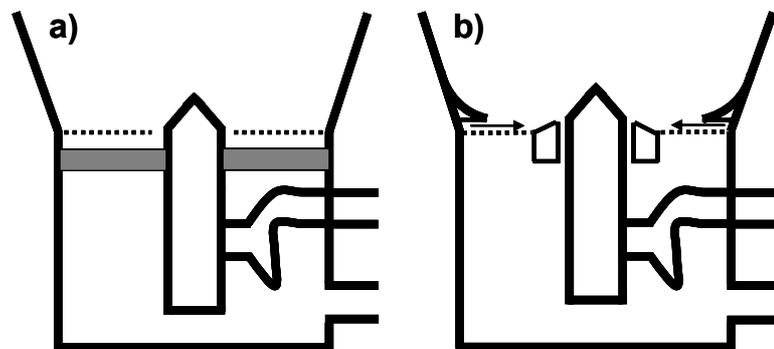


Abb. 4.2-6: Querschnitt (schematisch): montierter Materialbehälter: Konfiguration mit abgesenkter Düse (a) und Materialbehälter^o1 mit kleinerer Grundfläche und Düsenaufnahme (b)

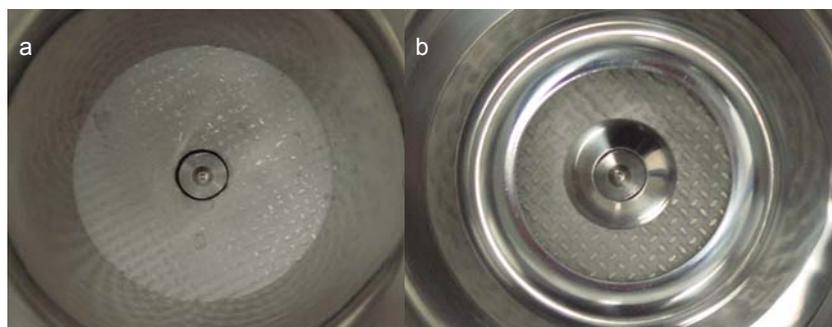


Abb. 4.2-7: Aufsicht der montierten Materialbehälter: Konfiguration mit abgesenkter Düse (a) und Materialbehälter mit kleinerer Grundfläche und Düsenaufnahme von Glatt (b)

Prozesse mit Saccharose als Trägermaterial und 5mg/ml Saccharose bzw. Trehalose in der Sprühlösung verliefen über die gesamte Zeit stabil (Tab. 4.2-2). Mit Zusatz von 11,25mg/ml Trehalose bzw. Saccharose kommt es während des Prozesses am Rand des Materialbehälters zur Ansammlung von Saccharoseträgermaterial. Bei Zusätzen von 22,5mg/ml Trehalose bzw. Saccharose und mehr kollabieren die Prozesse mit Saccharose als Trägermaterial innerhalb von 3 Minuten. Das eingesetzte Trägermaterial sammelt sich im Verlauf des Prozesses am unteren Rand des Materialbehälters und klebt dort zusammen. Um zu untersuchen, ob Prozesse bei reduzierter Feuchte stabiler verlaufen, wurden die Versuche mit Sprühlösungszusätzen von 11,25mg/ml Trehalose bzw. Saccharose bei einer Produkttemperatur von 45°C wiederholt. Die für 32°C beschriebenen Phänomene, wie Ansammlung von Trägermaterial am Rand, wurden bei 45°C ebenfalls beobachtet.

Tab. 4.2-2: Stabilität von Prozessen bei Standardbedingungen mit Materialbehälter 1: „+“ stabiler Prozess; „o“ Ansammlung von Trägermaterial am Rand des Materialbehälters während des Prozesses; „-“ Prozess kollabiert

| Sprühlösungszusätze [mg/ml] | | | Prozessstabilität: Trägermaterialien [20g] | | | |
|-----------------------------|-----------|------------|--|--------|-----------|----------|
| Glycin | Trehalose | Saccharose | Saccharose | Glycin | Trehalose | Mannitol |
| 11,25 | 11,25 | | o | + | + | |
| 22,5 | 22,5 | | - | + | o | |
| 9 | 36 | | - | o | - | |
| 11,25 | | 11,25 | o | + | + | |
| 22,5 | | 22,5 | - | + | o | |
| 9 | | 36 | - | | - | + |
| 5 | | 5 | + | | | |
| 5 | 5 | | + | | | |

Wie in den orientierenden Versuchen gezeigt wurde, kann es bei 45°C zu einer verstärkten Bildung von Proteinaggregaten kommen, weshalb auf Prozesse mit höherer Produkttemperatur verzichtet wurde. Die Flussrate ließ sich nicht mehr weiter reduzieren, da die mit der zur Verfügung stehenden apparativen Anordnung, erreichbare Mindestsprührate von 0,36g/min bereits erreicht war. Mit Glycin als Trägermaterial und Sprühlösungszusätzen von 22,5mg/ml Saccharose bzw. Trehalose verlaufen alle Prozesse stabil. Bei Zusätzen von 36mg/ml Saccharose bzw. Trehalose wurden allerdings auch bei Glycin als

Trägermaterialablagerung am Rande des Materialbehälters beobachtet. Im Unterschied zu Saccharose treten mit Trehalose als Trägermaterial erst nach Zusatz von 22,5mg/ml Trehalose bzw. Saccharose Instabilitäten in der Prozessführung auf. Bei Saccharose war dies bereits nach Zusätzen von 11,25g Trehalose bzw. Saccharose der Fall. Mit Mannitol als Trägermaterial konnten Prozesse auch nach Zusatz von 36mg/ml Saccharose bzw. Trehalose problemlos durchgeführt werden. Somit nimmt die Stabilität der Prozesse bei Zusatz von Zuckern zur Sprühlösung in der Reihenfolge der Trägermaterialien Saccharose, Trehalose, Glycin und Mannitol zu.

Mit Saccharose als Trägermaterial wurde in den orientierenden Versuchen die beste Stabilisierung von rhIL-11 erzielt (Kap 4.1). Daher war es interessant Formulierungen mit Zusätzen von Saccharose bzw. Trehalose zur Sprühlösung zu untersuchen. Mit dem neuen Materialbehälter wurde die Durchführbarkeit von Prozessen nach Zusätzen von 5mg/ml Trehalose bzw. Saccharose ermöglicht. Allerdings wäre es wünschenswert auch Prozesse mit höheren Zuckerzusätzen zur Sprühlösung durchführen zu können.

4.2.3 WEITER OPTIMIERTER MATERIALBEHÄLTER

Es wurde ein weiterentwickelter Materialbehälter gefertigt (Abb. 4.2-8), der im Folgenden als Materialbehälter 2 bezeichnet wird. Der Unterschied zum bereits getesteten Materialbehälter besteht in der steiler abfallenden Wandung im unteren Teil. Um zu untersuchen, mit welchen Sprühlösungszusätzen sich stabile Prozesse realisieren lassen, wurden ausgewählte Versuche mit dem neu konstruierten Materialbehälter wiederholt.

Prozesse mit Zusätzen von bis zu 22,5mg/ml Trehalose bzw. Saccharose zur Sprühlösung lassen sich mit dem Materialbehälter 2 problemlos durchführen (Tab. 4.2-3). In Versuchen mit Zusätzen von 33,75 mg/ml Saccharose/Trehalose zur Sprühlösung blieben Teile des Trägermaterials während des Prozesses für unbestimmte Zeit auf dem Anströmboden liegen, bevor sie wieder fluidisiert wurden.

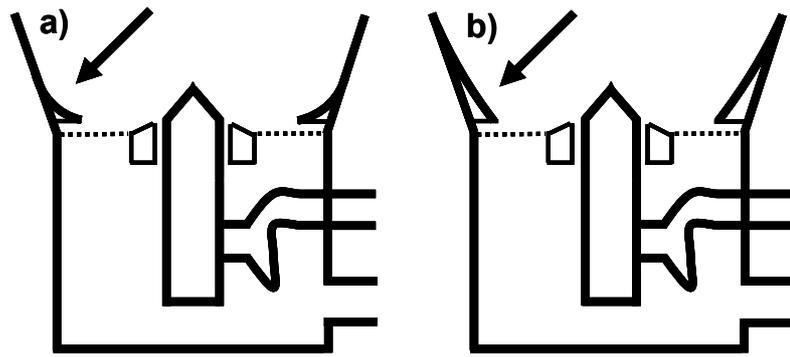


Abb. 4.2-8: Materialbehälter mit reduzierter Grundfläche: Materialbehälter 1 (a), weiterentwickelter Materialbehälter 2 (b)

Tab. 4.2-3: Stabilität von Prozessen bei Standard Bedingungen mit Materialbehälter 2, zum Vergleich Materialbehälter 1: „+“ stabiler Prozess; „o“ Ansammlung von Trägermaterial am Rand des Materialbehälters während des Prozesses; „-“ Prozess kollabiert

| Sprühlösungszusätze [mg/ml] | | | Prozessstabilität: Saccharose [20g] | |
|-----------------------------|-----------|------------|-------------------------------------|-----|
| Glycin | Trehalose | Saccharose | MB1 | MB2 |
| 11,25 | 11,25 | | O | + |
| 22,5 | 22,5 | | - | + |
| 11,25 | 33,75 | | - | O |
| 9 | 36 | | - | - |
| 11,25 | | 11,25 | O | + |
| 22,5 | | 22,5 | - | + |
| 11,25 | | 33,75 | - | O |
| 9 | | 36 | - | - |

Zum Kollabieren der Prozesse kam es allerdings erst mit Sprühlösungszusätzen von 36mg/ml Trehalose bzw. Saccharose. Da Prozesse unter Einsatz des Materialbehälters 2 mit bis zu 22,5 mg/ml Trehalose bzw. Saccharose zur Sprühlösung selbst ohne Einsatz der Filterausblasung stabil liefen, war die Basis für eine Formulierungsentwicklung mit Zuckerzusätzen zur Sprühlösung gelegt. Zur Ermittlung der Ausbeuten, die sich mit dem weiterentwickelten Materialbehälter 2 erzielen lassen, wurden ausgewählte Versuche unter gleichen Bedingungen wie bereits in der Standardkonfiguration und der Konfiguration mit abgesenkter Düse durchgeführt.

Mit dem Materialbehälter 2 bewegen sich die Ausbeuten bei 0,3bar Sprühdruck mit 93%, bei 0,5bar Sprühdruck (Standard) mit 95% und bei 0,3bar Sprühdruck mit 93% Sprühdruck in der gleichen Größenordnung wie in der Konfiguration mit abgesenkter Düse (Tab. 4.2-1). Die erhöhten Ausbeuten im Vergleich zur Standardkonfiguration lassen sich somit auf die abgesenkte Düse zurückführen, wohingegen sich die stabile Prozessführung nach Zusätzen von 22,5mg/ml Zuckern zur Sprühlösung auf die Kombination aus Materialbehälter 2 und Düsenaufnahme zurückführen lässt. Die in der Standardkonfiguration und der Materialbehälter 2 Kombination hergestellten Produkte unterscheiden sich bezüglich Granulation und Abrieb nicht von der Standardkonfiguration und der Konfiguration mit abgesenkter Düse. Zusätzlich zu den bisherigen Entwicklungsversuchen wurde die Prozessstabilität von rhIL-11 in der Konfiguration mit Materialbehälter 2 im Vergleich zur Standardkonfiguration untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich die Prozessstabilität von rhIL-11 in Bezug auf die Bildung von Aggregaten nicht unterscheidet (Abb. 4.2-9).

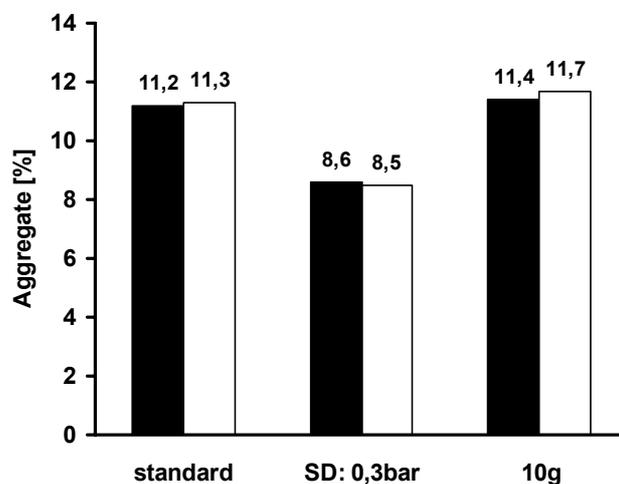


Abb. 4.2-9: Prozessstabilitäten rhIL-11 in der Mini-Glatt Anlage ■ und in der optimierten Anlage mit Materialbehälter 2 und Düsenaufnahme □

4.2.4 MINI-GLATT ANLAGE MIT MICRO-KIT

Die von Glatt an der Anlage vorgenommenen Änderungen sind in Form des Micro-Kits auf dem Markt erhältlich. Das Micro-Kit ist so konzipiert, dass sich die Standard Mini-Glatt Anlage durch Austausch von Komponenten mit den Micro-Kit Komponenten aufrüsten lässt. Der Standard Materialbehälter wird durch den neuen Materialbehälter (Materialbehälter 2) ersetzt. Damit die mit der Düsenaufnahme fixierte Düse mit Druckluft und Sprühflüssigkeit versorgt werden kann, enthält das Micro-Kit flexible Schläuche, diese wurden erstmals in der Konfiguration mit abgesenkter Düse zur Versorgung der Düse eingesetzt. Das Trägermaterialaufgabesystem, befindet sich ebenso wie die Halterung für den pneumatischen Klopfer in einem zum Lieferumfang des Micro-Kits gehörenden neuen Filterturm. Durch das Trägermaterialaufgabesystem (Abb. 4.2-10) entfällt das umständliche Zerlegen der Anlage zum Befüllen mit Trägermaterial. Da die Zudosierung des Trägermaterials bei laufender Fluidisierung vorgenommen wird, kann Trägermaterial nicht mehr durch den Ringschlitz zwischen Düse und Düsenaufnahme fallen. Die Düsenkappe zum Befüllen ist somit überflüssig. Der pneumatische Klopfer (Abb. 4.2-10a) wird über eine Ansteuerungseinheit mit Kugelhahn und T-Abgangsstück versorgt. Trägermaterial, das sich während des Prozesses an Bauteilen der Anlage festsetzt, kann durch die Klopfbewegungen wieder dem Prozess zugeführt werden. Durch die Rückführung von Trägermaterial in den Prozess kann der Klopfer zu einer Erhöhung der Ausbeute beitragen. Im Umfang des Micro-Kits sind auch die weiter oben beschriebenen kürzeren Filter enthalten (Kap 4.1).

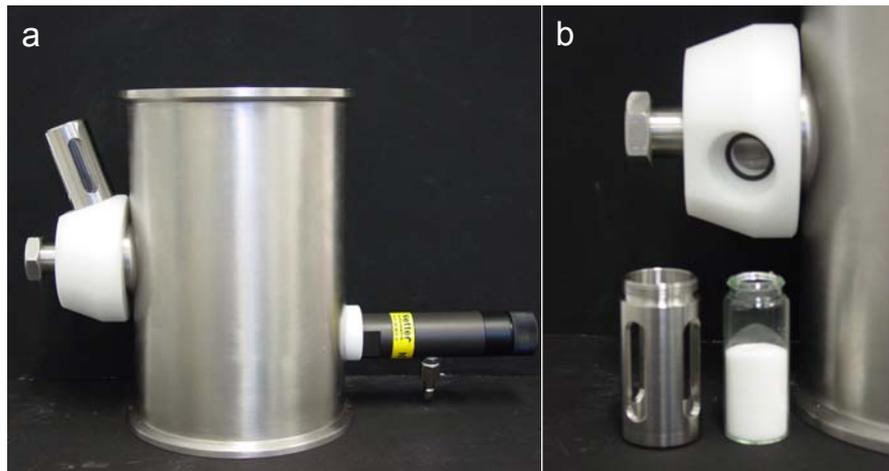


Abb. 4.2-10: Mikro-Kit: (a) Filtergehäuse mit Trägermaterialaufgabesystem und Klopfer (b) demontiertes Trägermaterialaufgabesystem mit Trägermaterial

4.2.5 ZUSAMMENFASSUNG

Bereits vor Durchführung der orientierenden Versuche erfolgte ein Austausch der langen durch kürzere Filter. Ein Verlust von Sprühlösung durch ein direktes Ansprühen der Filter konnte so vermieden werden. In der Konfiguration mit abgesenkter Düse konnten die guten Ausbeuten die in den orientierenden Versuchen mit der Mini-Glatt Anlage erzielt wurden um durchschnittlich 5% gesteigert werden. In Bezug auf die Stabilität des Prozessablaufs nach Zuckerzusätzen zur Sprühlösung und die Reduzierung von Granulation oder Abrieb, konnten in der Konfiguration mit abgesenkter Düse Standardkonfiguration keine Fortschritte erzielt werden. Mit dem neu konstruierten Materialbehälter 1, der zusammen mit der neu konstruierten Düsenaufnahme eingesetzt wurde, konnten Prozesse mit dem Trägermaterial Saccharose nach Zusätzen von 5mg/ml Trehalose bzw. Saccharose zur Sprühlösung stabil durchgeführt werden. Nach Austausch des Materialbehälters 1 durch einen Materialbehälter 2 mit weiter optimierter Geometrie, waren stabile Prozesse mit Sprühlösungszusätzen von 22,5mg/ml Trehalose bzw. Saccharose möglich. Sowohl bei Einsatz der Konfiguration mit abgesenkter Düse als auch bei Einsatz des Materialbehälters 2 in Kombination mit der Düsenaufnahme, sind die Ausbeuten gegenüber der Standardkonfiguration um 5% erhöht. Die erhöhten Ausbeuten lassen sich somit auf die abgesenkte Düse zurückführen,

wohingegen sich die stabile Prozessführung nach Zusätzen von 22,5mg/ml Zuckern zur Sprühlösung auf die Kombination aus Materialbehälter 2 und Düsenaufnahme zurückführen lässt. In einem Filterturm der die gleichen Abmessungen wie der Filterturm der Standardkonfiguration aufweist, wurden von Glatt zusätzlich ein pneumatischer Klopfer und ein Trägermaterialaufgabesystem integriert. Die kürzeren Filter, der Materialbehälter 2, die Düsenaufnahme und der Filterturm mit Klopfer und Trägermaterialaufgabesystem, sind auf dem Markt als Micro-Kit zur Aufrüstung der Standard Mini-Glatt Anlage erhältlich. Granulation und Abrieb der Produkte waren in allen untersuchten Anlagenmodifikationen gleich. Die Stabilitäten von rhIL-11 in der Materialbehälter²-Düsenaufnahme Kombination unterscheidet sich nicht von der in der Standardkonfiguration. Mit der weiterentwickelten Mini-Glatt Anlage ist somit die Basis gelegt für eine Entwicklung stabiler rhIL-11 Produkte unter Einsatz der Formulierungsentwicklung der Sprühlösung mit Zuckern.

4.3 STABILITÄT WIRBELSCHICHTGETROCKNETER rhIL-11 FORMULIERUNGEN

In den Kapitel 4.1 und 4.2 wurde der Einfluss von Prozessparametern, Trägermaterialien und der Anlagenkonfiguration auf Proteinstabilität, Produkteigenschaften und Ausbeute beschrieben. Untersuchungen zur Optimierung der Mini-Glatt Anlage in Hinblick auf den Einsatz geringer Mengen Trägermaterial unter Zusätzen von Zuckern zur Sprühlösung finden sich in Kapitel 4.2. Im folgendem galt es ein Produkt mit möglichst guter rhIL-11 Stabilität durch Einsatz eines Trägermaterials in Verbindung mit einer optimal formulierten Sprühlösung zu entwickeln. Für die Untersuchungen wurde die Mini-Glatt Anlage mit Mikro-Kit verwendet. Um die Stabilität der Produkte nach dem Prozess und während der Lagerung zu bewerten, wurden neben der bereits in den orientierenden Versuchen verwendeten SE-HPLC zwei RP-HPLC Methoden eingesetzt (Kap. 3). Der Sprühlösung wurden in allen folgenden Versuchen standardmäßig 10 mM Methionin zugesetzt um das Protein während der Trocknung in der Wirbelschicht und der Lagerung vor Oxidation zu schützen. Die Stabilität der Produkte in verschlossenen Vials bei 2-8°C, 25°C und 40°C und in offenen Vials bei 25°C/ 60%r.F und 40°C/ 75%r.F. wurde über eine Lagerdauer von 2, 6 und 12 Wochen untersucht (Kap. 3). Verschlossen gelagerte Vials wurden vor dem Verbördeln zum Schutz des Produktes vor Oxidation mit Stickstoff begast.

4.3.1 TRÄGERMATERIALIEN UND SPRÜHLÖSUNGEN OHNE STABILISIERENDE ZUSÄTZE

Um die stabilisierenden Eigenschaften von Trägermaterialien in Bezug auf Aggregate, „related species“ (RS) und Oxidation nach dem Prozess und über die Lagerdauer bewerten zu können, wurden zunächst Versuche bei Standardbedingungen mit Sprühlösungen ohne Zuckerzusatz (4mg/ml rhIL-11, 22,5mg/ml Glycin, 10mM Phosphatpuffer pH=7) durchgeführt.

Als Trägermaterialien wurden Glycin, Mannitol und Saccharose eingesetzt (Kap 4.1). Zusätzlich sollen Nonpareilles aus mikrokristalliner Cellulose/ MCC Spheres als Modell für die Formulierungsoptimierung der Sprühhlösung dienen. Da MCC Spheres praktisch wasserunlöslich sind, kann der stabilisierende Effekt aufgesprühter Formulierungen unabhängig von Löslichkeitseffekten des Trägermaterials untersucht werden. Mannitol der Qualität Parteck M200[®] war unter den Bedingungen der GPCG-1 mechanisch nicht stabil (Kap 4.1), weshalb Mannitol der Qualität Pearlitol 300DC[®] eingesetzt wurde. In einem Versuch mit Placebo Sprühhlösung trat unter Standardbedingungen mit Pearlitol 300DC praktisch kein Abrieb auf.

Während des Aufsprühens werden mit allen eingesetzten Trägern größere Mengen an Aggregaten gebildet (Abb. 4.3-1a). Dabei erhält man mit Saccharose als Träger mit 11,3% Aggregaten ein stabileres Produkt als mit Mannitol (12,5%) und MCC Spheres mit 12,8% Aggregaten. Glycinpartikel tragen nach dem Prozess mit 14,6% die meisten Aggregate. Bei 2-8°C und 25°C in verschlossenen Vials zeigt sich ein leichter Trend zum Anstieg in den Aggregaten (Abb. 4.3-1b,c). Nach 12 Wochen Lagerdauer bei 25°C enthalten Saccharoseprodukte 15,4% und Glycinprodukte 17,7% Aggregate. Bei 40°C in verschlossenen Vials wird dieser Trend zum Anstieg in den Aggregaten über die Lagerdauer verstärkt sichtbar (Abb. 4.3-1e). Glycinprodukte weisen nach 12 Wochen bei 40°C in verschlossenen Vials mit 19,9% den höchsten Aggregatgehalt auf. Die offene Lagerung bei 25°C/ 60%r.F. führt im Vergleich zu verschlossener Lagerung v.a. in MCC-Produkten aber auch in Mannitolprodukten zum weiteren Ansteigen der Aggregate (Abb. 4.3-1d). Deutlich wird die Instabilität bei allen Trägern bei 40°C/ 75%r.F. offener Lagerung (Abb. 4.3-1f). Im Vergleich zu 40°C geschlossener Lagerung ist, wie schon bei 25°C/ 60%r.F. beobachtet, der Anstieg v.a. in MCC Spheres Produkten, aber auch in Mannitolprodukten besonders ausgeprägt.

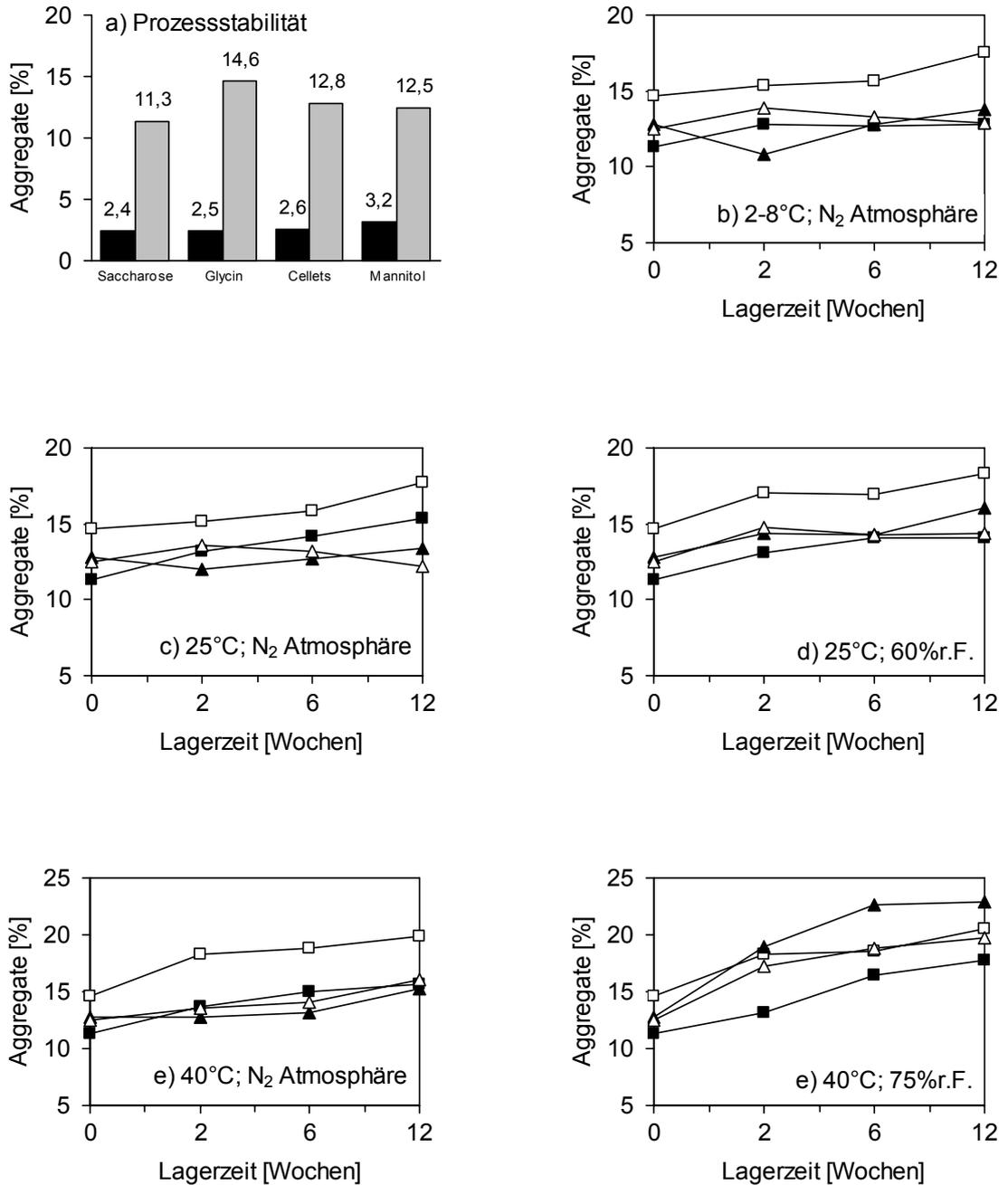


Abb. 4.3-1: Einfluss von Trägermaterialien bei Einsatz der Standardsprühlösung (4mg/ml rhIL-11, 22,5mg/ml Glycin, 10mM Methionin, 10mM Phosphatpuffer pH=7) auf die rhIL-11 Stabilität
 a) Prozessstabilität: schwarz: Sprühlösung; grau: Produkt nach dem Prozess
 b) bis f) Lagerstabilität: —■— Saccharose, —□— Glycin, —▲— MCC Spheres, —△— Mannitol

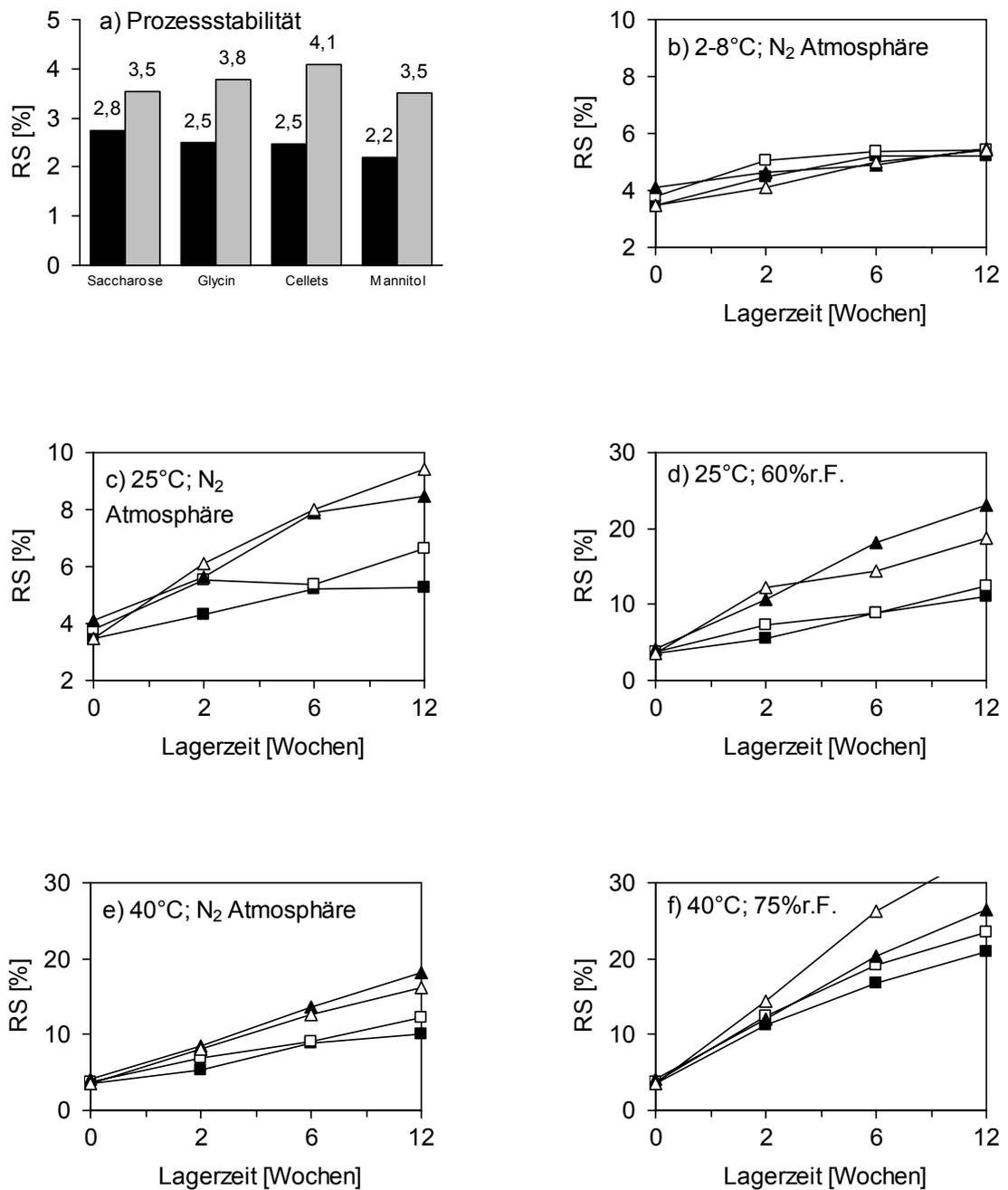


Abb. 4.3-2: Einfluss von Trägermaterialien bei Einsatz der Standardsprühlösung (4mg/ml rhIL-11, 22,5mg/ml Glycin, 10mM Methionin, 10mM Phosphatpuffer pH=7) auf die rhIL-11 Stabilität

a) Prozessstabilität: schwarz: Sprühlösung; grau: Produkt nach dem Prozess
 b) bis f) Lagerstabilität: —■— Saccharose, —□— Glycin, —▲— MCC Spheres, —△— Mannitol

Ferner wurden die RS als Stabilitätskriterium untersucht. Mit Mannitol und Saccharose entstanden während des Prozesses etwas weniger RS als bei Einsatz von MCC Spheres (4,1%) (Abb. 4.3-2a). Im Zuge der Lagerung wurde bei 2-8°C ein geringer Anstieg der RS über die Lagerdauer auf ca. 5% nach 12 Wochen für alle Trägermaterialien beobachtet (Abb. 4.3-2b). Bei höheren Lagertemperaturen ist der Anstieg der RS insbesondere bei Mannitol und MCC deutlich ausgeprägt. Über 12 Wochen bei 25°C wird bei Saccharoseträgern mit 1,8% ein vergleichsweise schwacher, bei MCC Spheres und Mannitolprodukten mit 4,5 bzw. 6% ein ausgeprägter Anstieg der RS beobachtet (Abb. 4.3-2c). Bei 25°C/60%r.F. beschleunigt sich dieser Anstieg der RS über die Lagerdauer enorm. Saccharoseprodukte enthalten 5,7%, MCC Spheres-Produkte 13,8% und Mannitolprodukte 9,4% mehr RS als in verschlossen gelagerten Produkten (Abb. 4.3-2d). Im Vergleich zu 40°C geschlossener Lagerung ist der Anstieg bei 40°C/75%r.F. noch stärker ausgeprägt als bei 25°C/60%r.F. (Abb. 4.3-2e,f). Glycin schneidet in Bezug auf Lagerstabilität etwas schlechter ab als Saccharose, aber besser als MCC Spheres und Mannitol.

Der Vergleich von SE- und RP-Chromatogrammen zeigt, dass es bei allen Produkten im Verlauf der Lagerung zu einem verstärkten Anstieg von entfaltetem und aggregiertem rhIL-11 kommt. In RP-Chromatogrammen besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Fläche von Peak 9 und der Summe aus entfaltetem Protein und kovalenten Aggregaten (Kap 3.3). Da die Fläche von Peak 9 in der RP-HPLC (Kap 3.3) bei allen Produkten über die Lagerdauer stärker ansteigt, als die Peakflächen der Aggregatepeaks in der SE-HPLC kann auf die Entstehung größerer Mengen entfaltetem rhIL-11 geschlossen werden. Die native dreidimensionale Struktur von Proteinen ist in der Regel thermodynamisch am stabilsten und Voraussetzung für die physiologische und pharmakologische Aktivität (Brange; 2000). Durch die Entfaltung des Proteins kommen hydrophobe Reste mit Wasser in Kontakt (Banga; 1995). Um diesen thermodynamisch ungünstigen Zustand zu überwinden, kann es durch hydrophobe Wechselwirkungen zur Bildung von Aggregaten kommen. Bei hoher Luftfeuchte ist der Anstieg an entfaltetem rhIL-11 im Vergleich zu geringer

Luftfeuchte verstärkt. Bei hoher Luftfeuchte kommt es weiterhin zur Zunahmen der Fläche von Peak 6 und 7, welche sich auf Oxidationsprodukte von rhIL-11 zurückführen lassen. Da in der RP Methode zur Analyse der RS oxidiertes rhIL-11 mit nativen rhIL-11 im Chromatogramm erscheint, lässt sich der endgültige Gehalt an oxidierten Spezies nur mit einer anderen RP-Methode analysieren, die im Verlauf der weiteren Formulierungsoptimierung eingesetzt wird.

Damit sich stabilisierende Wasserstoffbrücken ausbilden können, muss sich das Protein-Hilfsstoff-System im amorphen Zustand befinden (Souillac et al.; 2002). Dieser Zustand weist die strukturellen Eigenschaften einer Flüssigkeit auf, hat allerdings eine deutlich höhere Viskosität (Hancock et al.; 1997). Kristalline Strukturen bieten mit Ihrer ausgedehnten dreidimensionalen Anordnung keinen stabilisierenden Effekt für Proteine da keine Wasserstoffbrücken gebildet werden (Izutsu et al.; 1993). Darüber hinaus beeinflusst die Restfeuchte getrockneter Proteinprodukte maßgeblich die Lagerstabilität. Die Aufnahme von Wasser durch eine amorphe Substanz kann zum Absinken der Glasübergangstemperatur unter die Lagertemperatur führen, in dessen Folge es zur Kristallisation amorpher Hilfsstoffe kommen kann (Sarciaux et al.; 1997). Untersuchungen der wirbelschichtgetrockneten Produkte nach dem Prozess mit DSC und RD ergeben keine Hinweise auf amorphe Strukturen. Detektierte amorphe Anteile in MCC-Produkten wurden auf die nativ vorhandenen amorphen Anteile des Ausgangsmaterials zurückgeführt. In Kapitel 4.1 wurde gezeigt, dass aus Restfeuchtebestimmungen an überzogenen Trägermaterialien nicht auf die Restfeuchte in der proteinhaltigen Schicht geschlossen werden kann.

Fitzner beobachtete, dass es in sprühgetrockneten rhIL-11 Produkten, mit Glycin-Trehalosematrix, die sich mit 1,3, 1,8 und 3% lediglich in den Restfeuchten unterschieden, bei erhöhter Produktfeuchte während der Lagerung zu einem stärkeren Anstieg des kristallinen Anteils kam (Fitzner; 2003). Unter dem Einfluss erhöhter Produktfeuchten, stieg auch der Gehalt an entfaltetem rhIL-11 stärker an als der Gehalt an Aggregaten. Der starke Anstieg

von entfaltetem Protein bei gleichzeitig geringerem Anstieg in den Aggregaten in wirbelschichtgetrockneten Produkten verläuft bei erhöhten Luftfeuchten (25°C/ 60%r.F. und 40°C/ 75%r.F.) vergleichbar. Unter dem Einfluss von erhöhter Luftfeuchtigkeit könnte es in wirbelschichtgetrockneten Produkten deshalb ebenfalls zu einem Anwachsen kristalliner Anteile in der proteinhaltigen Schicht während der Lagerung kommen.

Schüle konnten zeigen, dass eine dem Prozess nachgeschaltete Vakuumtrocknung des Produktes zu einer Erhöhung der Lagerstabilität von sprühgetrockneten Produkten führt (Schuele; 2005). Nach dem Wirbelschichtprozess wurde deshalb ebenfalls der Effekt einer Vakuumtrocknung getestet (Kap 3.3). Die Restfeuchten nach der Vakuumtrocknung und unmittelbar nach dem Wirbelschichtprozess unterscheiden sich praktisch nicht (Tab. 4.3-1).

Tab. 4.3-1: Restfeuchte von Produkten unmittelbar nach dem Wirbelschichttrocknungsprozess, nach Vakuumtrocknung und nach 12 Wochen Lagerung bei 25°C/60%r.F. bzw. 40°C/75%r.F. Sprühlösung: 4mg/ml rhIL-11, 22,5mg/ml Glycin, 10mM Methionin, 10mM Phosphatpuffer pH=7

| Trägermaterial | nach Prozess [%] | nach Vakuumtrocknung [%] | 25°C/ 60%r.F. [%] | 40°C/ 75%r.F. [%] |
|----------------|------------------|--------------------------|-------------------|-------------------|
| Saccharose | 0,01 | 0,02 | 0,05 | 0,34 |
| Glycin | 0 | 0,01 | 0 | 0,03 |
| Mannitol | 0,05 | 0,04 | 0,12 | 0,27 |
| MCC Spheres | 3,5 | | 5 | 5,9 |

In der Mini-Glatt Anlage wird das Trägermaterial mit Druckluft fluidisiert, welche bei 25°C eine relative Feuchte von weniger 5% aufweist. Während der Nach-trocknung können dem Produkt so bereits große Mengen an Wasser entzogen werden. In den Stabilitäten konnte ebenfalls kein Trend zugunsten der Vakuum- oder der nicht Vakuumgetrockneten Produkte über die Lagerdauer festgestellt werden.

Formulierungen die bereits nach dem Trocknungsprozess einen höheren Gehalt an RS und Aggregaten enthalten sind zur Langzeitstabilisierung von rhIL-11 nicht geeignet. Die vergleichsweise gute Stabilisierung durch Saccharose nach dem Prozess und der langsamere Anstieg der RS über die Lagerdauer kann mit der Einbettung des Proteins in eine Saccharosematrix erklärt werden. In den XPS Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich in Saccharose Produkten weniger Protein an der Oberfläche befindet als in Mannitolprodukten (Kap 4.3), was sich mit der besseren Löslichkeit der Saccharose erklären lässt. In MCC Spheres Produkten in denen der Anstieg der RS über die Lagerdauer am stärksten ausgeprägt ist, kann sich keine Matrix wie im Fall der Saccharose ausbilden.

Bei offener Lagerung nimmt die Stabilität von rhIL-11 weiter ab. Insbesondere in Bezug auf RS konnte über die Lagerdauer keine Stabilisierung der Produkte erreicht werden. Mit Saccharose wurde noch der geringste Anstieg der RS über die Lagerdauer beobachtet. Der Grad des Anstiegs von entfaltetem rhIL-11 über die Lagerdauer hängt vom Wassergehalt in der proteinhaltigen Schicht ab. Eine dem Prozess nach geschaltete Vakuumtrocknung hatte keinen Einfluss auf die Proteinstabilität während der Lagerung. Somit wird die Notwendigkeit der Sprühlösungsformulierung sichtbar.

4.3.2 TRÄGERMATERIALIEN UND SPRÜHLÖSUNGEN MIT TREHALOSE ZUSATZ

Durch Zuckerzusätze zur Sprühlösung soll die Entstehung amorpher und damit proteinstabilisierender Strukturen unterstützt werden. Disaccharide, Glycerol, Polyole, Polyethylenglykol und Aminosäuren können der Stress induzierten Denaturierung durch den „preferential exclusion“ Mechanismus entgegenwirken (Timasheff; 1992). Um die Stabilität der Produkte zu verbessern wurden der Sprühlösung, im Unterschied zu den Versuchen zuvor, neben rhIL-11 Phosphatpuffer, Glycin und Methionin zusätzlich 22,5mg/ml Trehalose zugesetzt. Für die Sprühtrocknung konnte Fitzner zeigen dass der Austausch von Trehalose gegen Saccharose zu vergleichbaren Stabilitäten der Formulierungen bei 25°C und 40°C führt. Proteine die in amorphe Disaccharid/

Glycin Mischungen eingebettet sind, zeigen eine höhere Stabilität im Vergleich zu Formulierungen, die reinen Zucker enthalten (Lueckel et al.; 1998). Nach Lyophilisation von Disaccharid/ Glycin haltigen Formulierungen erhält man bei Raumtemperatur und bei 40°C stabile Produkte (Warne; 2001).

Mit MCC Spheres konnte durch Trehalosezusatz zur Sprühlösung die Bildung von Aggregaten während des Prozesses von 12,8% (Abb. 4.3-1a) auf 8,9% (Abb. 4.3-3a) und die Bildung der RS von 4,1% (Abb. 4.3-2a) auf 2,5% (Abb. 4.3-4a) verringert werden. Im Fall der unlöslichen MCC Spheres, lassen sich die Unterschiede in der Stabilisierung auf die Zusammensetzung der proteinhaltigen Schichten der Produkte (Glycin versus Glycin/ Trehalose 1:1) zurückführen. Mit Glycin als Trägermaterial fällt der Unterschied in den Aggregatgehalten mit 12,2% in Produkten mit Trehalosezusatz zu 14,6% in Produkten ohne Trehalose Zusatz weniger deutlich aus. Eine mögliche Erklärung ist ein Auflösen des Trägermaterials und somit ein im Vergleich zu wasserunlöslichen Trägern reduzierter Trehaloseanteil in der proteinhaltigen Schicht. Bei den RS besteht zwischen Glycinprodukten mit und ohne Trehalose in der Sprühlösung mit 2,4 bzw. 2,5% praktisch kein Unterschied. Mannitol als Träger verhält sich ähnlich wie Glycin. Die Prozessstabilität erhöht sich in Bezug auf Aggregate durch den Zusatz von Trehalose von 12,5% auf 9,8%, die RS bleiben mit 3,5% nach dem Prozess unverändert. Mit Saccharose als Träger wurde unter den Produkten ohne Trehalosezusatz zur Sprühlösung mit 11,3% die beste Stabilisierung erzielt (Abb. 4.3-1a). Mit Zusatz von Trehalose wurden nach dem Prozess mit 12,5% mehr Aggregate beobachtet (Abb. 4.3-3a). Wie im Fall des Glycinträgers muss die Erklärung in der Löslichkeit des Trägermaterials liegen. Leider bieten die RD- und DSC Untersuchungen keine Erklärungsmöglichkeit über die physikalisch chemischen Eigenschaften, auch ein möglicherweise reduzierter Glasübergang der amorphen Mischung wäre eine mögliche Erklärung. In sprühgetrockneten rhIL-11 Produkten, in denen Trehalose durch Saccharose ersetzt wurde, konnte kein Unterschied in Stabilität festgestellt werden (Fitzner; 2003).

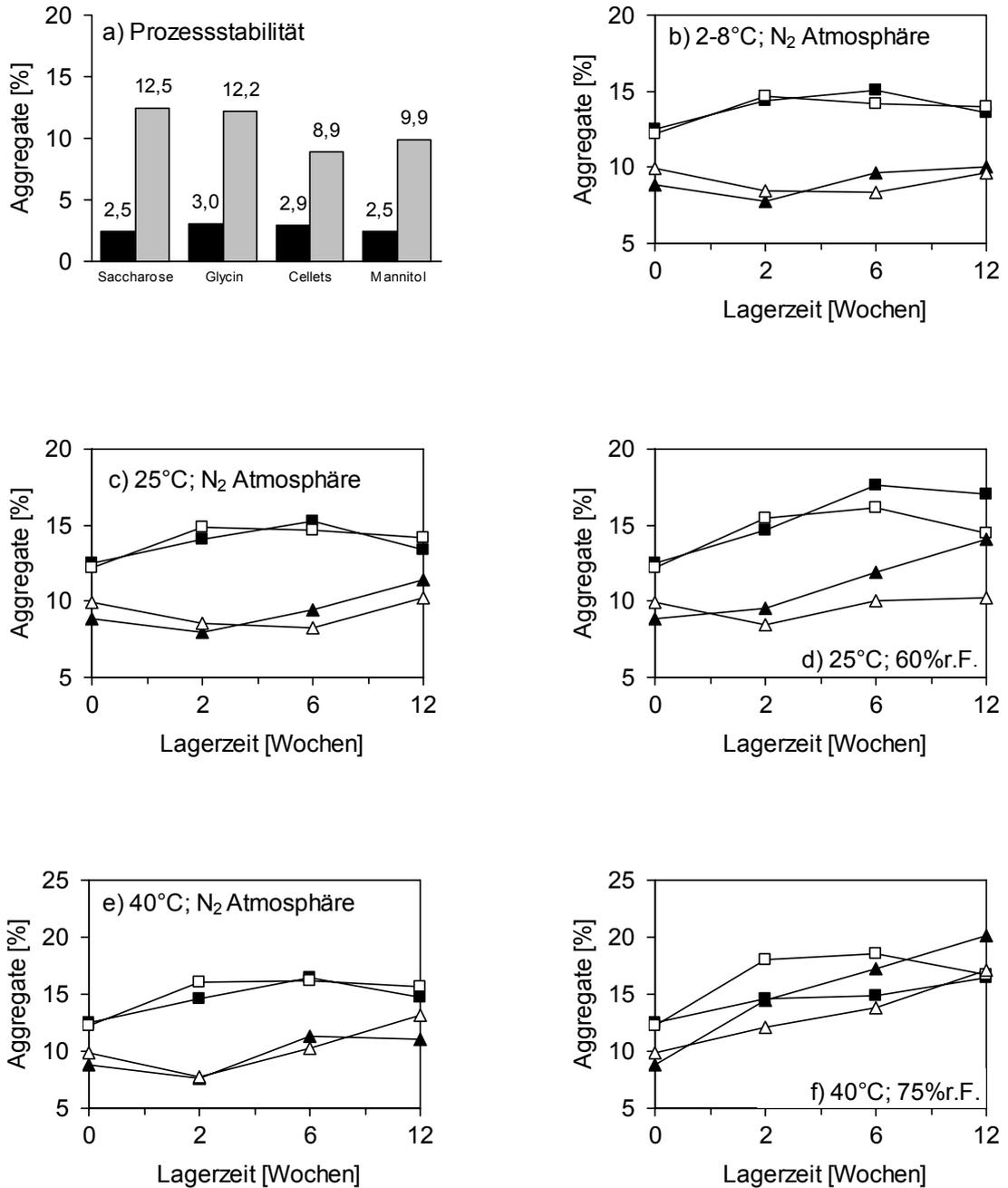


Abb. 4.3-3: Einfluss von Trägermaterialien bei Zusatz von 22,5mg/ml Trehalose zur Standard-sprühlösung (4mg/ml rhIL-11, 22,5mg/ml Glycin, 10mM Methionin, 10mM Phosphatpuffer, pH=7) auf die rhIL-11 Stabilität
 a) Prozessstabilität: schwarz: Sprühdösung; grau: Produkt nach dem Prozess
 b) bis f) Lagerstabilität: —■— Saccharose, —□— Glycin, —▲— MCC Spheres, —△— Mannitol

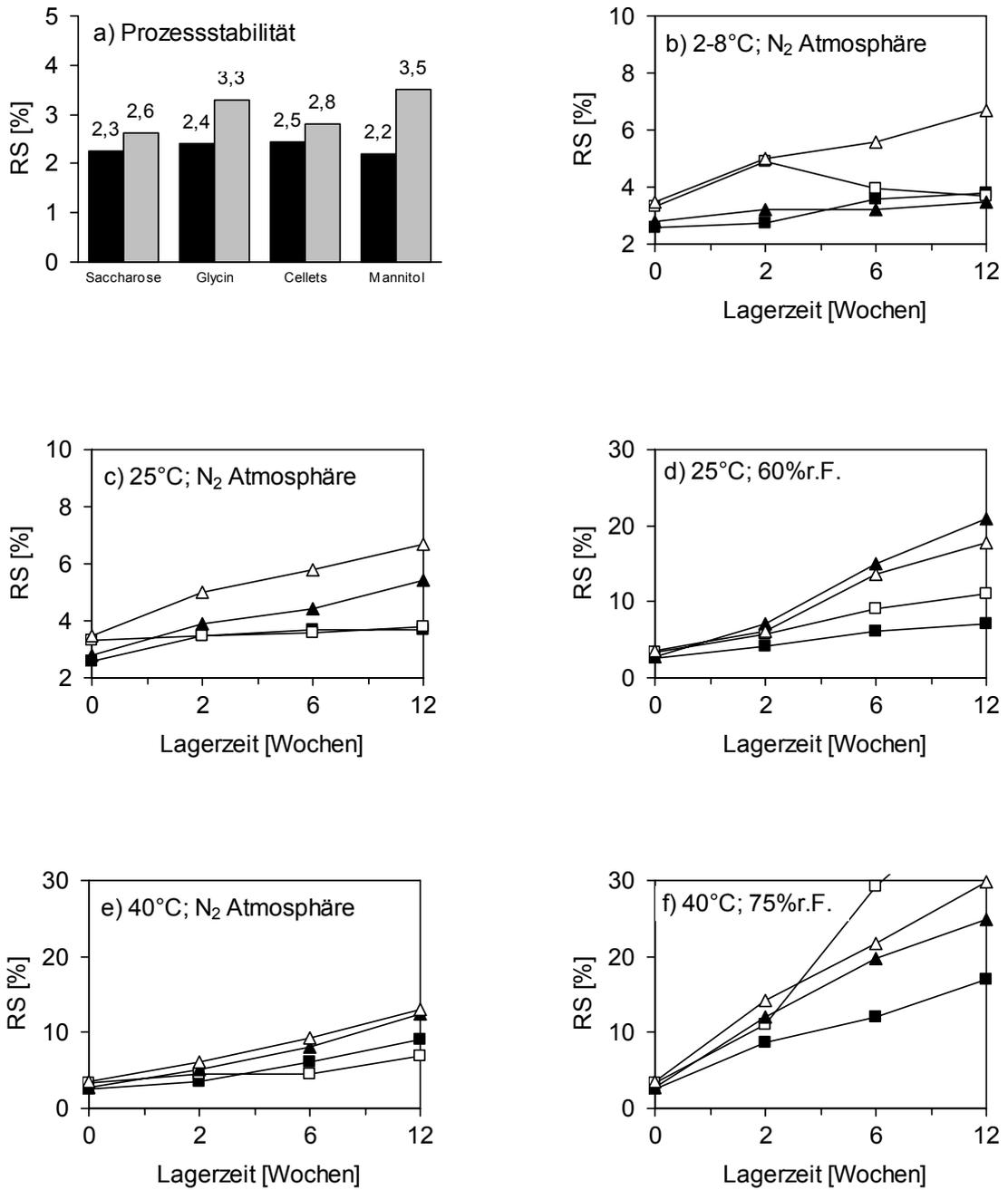


Abb. 4.3-4: Einfluss von Trägermaterialien und Zusätzen von 22,5mg/ml Trehalose zur Standardsprühlösung (4mg/ml rhIL-11, 22,5mg/ml Glycin, 10mM Methionin, 10mM Phosphatpuffer pH=7) auf rhIL-11
 a) Prozessstabilität: schwarz: Sprühlösung; grau: Produkt nach dem Prozess
 b) bis f) Lagerstabilität: —■— Saccharose, —□— Glycin, —▲— MCC Spheres, —△— Mannitol

In den Untersuchungen mit XPS konnte gezeigt werden, dass sich in Saccharoseprodukten mit Trehalosezusätzen zur Sprühlösung mehr Protein an der Oberfläche befindet als in Saccharose Produkten ohne Trehalose Zusätze (Kap 4.4). An Grenzflächen besteht eine verstärkte Tendenz zur Entfaltung bzw. Denaturierung des Proteins, in Folge dessen kann es zur Aggregation kommen. rhIL-11 enthält keine Disulfidbrücken und da die Neigung eines Proteins sich zu entfalten mit sinkender Anzahl stabilisierender Disulfidbrücken im Inneren des Moleküls steigt (Porter; 1997), neigt rhIL-11 zur Entfaltung und Aggregation.

Der Aggregatgehalt der Produkte ist bei 2-8, 25 und 40°C geschlossener Lagerung (Abb. 4.3-3) im Vergleich zu Produkten ohne Trehalosezusatz (Abb. 4.3-1) nach 12 Wochen mit Werten von 1 bis 4% leicht erniedrigt. Gehälter in den Aggregaten zwischen 10,2 und 15,2% nach 12 Wochen bei 25°C sind allerdings immer noch zu hoch. In Bezug auf RS finden sich nach 12 Wochen bei 2-8, 25 und 40°C geschlossener Lagerung (Abb. 4.3-4) zwischen 1 und 6% weniger RS als in Produkten ohne Trehalosezusatz (Abb. 4.3-2). Nach 12 Wochen Lagerung bei 25°C enthalten Produkte zwischen 3,7 und 6,7% RS. Ursache für die bessere Stabilisierung über die Lagerdauer in Bezug auf Aggregate und RS scheint die bessere Prozessstabilität von Produkten mit Trehalosezusatz zu sein. Bei offener Lagerung (25°C/60%r.F. und 40°C/75%) ist die Lagerstabilität nach 12 Wochen trotz der besseren Prozessstabilität kaum besser als in Produkten ohne Trehalosezusatz zur Sprühlösung. Ursache hierfür könnte das Auskristallisieren der Hilfsstoffe in der proteinhaltigen Schicht bzw. die stark reduzierte Glasübergangstemperatur und der direkte Einfluss des Wassers auf das Protein sein (Schuele; 2005). Bei Produkten die bei erhöhten Luftfeuchten mehr Wasser aufnehmen, nimmt die Stabilität stärker ab (Tab. 4.3-2).

Tab. 4.3-2: Restfeuchte von Produkten nach Prozess, Vakuumtrocknung und 12 Wochen Lagerung. Sprühlösung: 4mg/ml rhIL-11, 22,5mg/ml Glycin, 22,5mg/ml Trehalose, 10mM Methionin, 10mM Phosphatpuffer pH=7

| Trägermaterial | nach Prozess [%] | nach Vakuumtrocknung [%] | 25°C/ 60%r.F. [%] | 40°C/ 75%r.F. [%] |
|----------------|------------------|--------------------------|-------------------|-------------------|
| Saccharose | 0 | 0 | 0,07 | 0,36 |
| Glycin | 0 | 0,01 | 0 | 0,02 |
| Mannitol | 0,02 | 0,01 | 0,14 | 0,31 |
| MCC Spheres | 3,6 | | 5,2 | 6 |

Wie bei Produkten ohne Trehalose in der Sprühlösung, wurde mit KF die Restfeuchte nach dem Prozess bestimmt. Zwischen Produkten mit und ohne Trehalose in der Sprühlösung waren keine Unterschiede festzustellen. Eine dem Prozess nach geschaltete Vakuumtrocknung über 24 Stunden führte wie schon bei den Produkten ohne Trehalose Zusätze in der Sprühlösung weder zu einer Reduzierung der Restfeuchte, noch zu einer Reduzierung von Aggregaten und RS über die Lagerdauer.

Der Zusatz von 22,5mg/ml Trehalose zur Sprühlösung führt somit zu einer leicht verminderten Bildung von RS und Aggregaten während des Prozesses und der Lagerung. Eine Erklärung für die verbesserte Stabilisierung bietet der Trehaloseanteil in der proteinhaltigen Schicht. Das Saccharoseprodukt bildet eine Ausnahme und nach Zusatz von Trehalose zur Sprühlösung entstehen während des Prozesses mehr Aggregate. In XPS Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich in Saccharoseprodukten mit Trehalosezusätzen zur Sprühlösung mehr Protein an der Oberfläche anreichert als in Saccharoseprodukten ohne Trehalosezusätze (Kap. 4.4). Die Stabilisierung von rhIL-11 gerade während des Prozesses ist nicht zufrieden stellend. Disaccharide wie Trehalose und Saccharose stabilisieren das Protein vorwiegend während der Trocknung. Eine Verbesserung der Prozessstabilität soll durch eine Stabilisierung des Proteins während des Versprühens erreicht werden.

4.3.3 MCC SPHERES UND PS80

Durch das Verdüsen kommt es zu einer enormen Oberflächenzunahme der Sprühlösung. Tensidmoleküle können rasch an die Grenzfläche des Sprühnebels adsorbieren und verringern so eine Adsorption der Proteine mit nachfolgender Entfaltung (Maa et al.; 1998; Adler; 2005). Fitzner konnte für rhIL-11 eine besondere Tendenz des Proteins zur Anlagerung an die Grenzfläche nachweisen (Fitzner; 2003). Typischerweise werden bei Proteinen zur Stabilisierung nichtionische Zusätze wie Polysorbate (PS) oder Poloxamere eingesetzt (Kerwin et al.; 1998; McGregor; 1996), da ionische Tenside wie SDS zur Denaturierung des Proteins führen können (Hillgren et al.; 2002). Um eine maximale Stabilisierung zu erreichen, wird empfohlen oberflächenaktive Substanzen in Konzentrationen zuzusetzen, die sich leicht oberhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration bewegen (Randolph et al.; 2002), daher wurden Versuche mit PS80 Konzentrationen von 0,02% bis 0,25% durchgeführt. Um den Einfluss von PS80 in der Sprühlösung auf die Stabilität von rhIL-11 unabhängig von Löslichkeitseffekten des Trägermaterials untersuchen zu können, wurden MCC Spheres als Träger eingesetzt.

Sprühlösungen ohne PS80 Zusätze führten zu Produkten mit 12,8% Aggregaten. Mit steigendem Zusatz von PS80 in der Sprühlösung konnte die Entstehung von Aggregaten während des Prozesses deutlich reduziert werden (Abb. 4.3-5a). Bei einer PS80 Konzentration von 0,25% beträgt der Gehalt an Aggregaten nur noch 2,3%. Um den Einfluss des Verdüsen der Sprühlösung selbst auf die Aggregatbildung zu untersuchen, wurden Sprühlösungen unmittelbar nach dem Verdüsen aufgefangen und untersucht. Mit steigender PS80 Konzentration wurden dabei weniger Aggregate gefunden was auf die verminderte Denaturierung an der Tropfenoberfläche während des Verdüsen zurückgeführt werden kann, weiterhin macht sich auch hier der Aggregat lösende Effekt von hohen PS80 Konzentrationen bemerkbar. Allerdings wird deutlich, dass die Aggregation zu einem hohen Maß Folge der eigentlichen Trocknung ist.

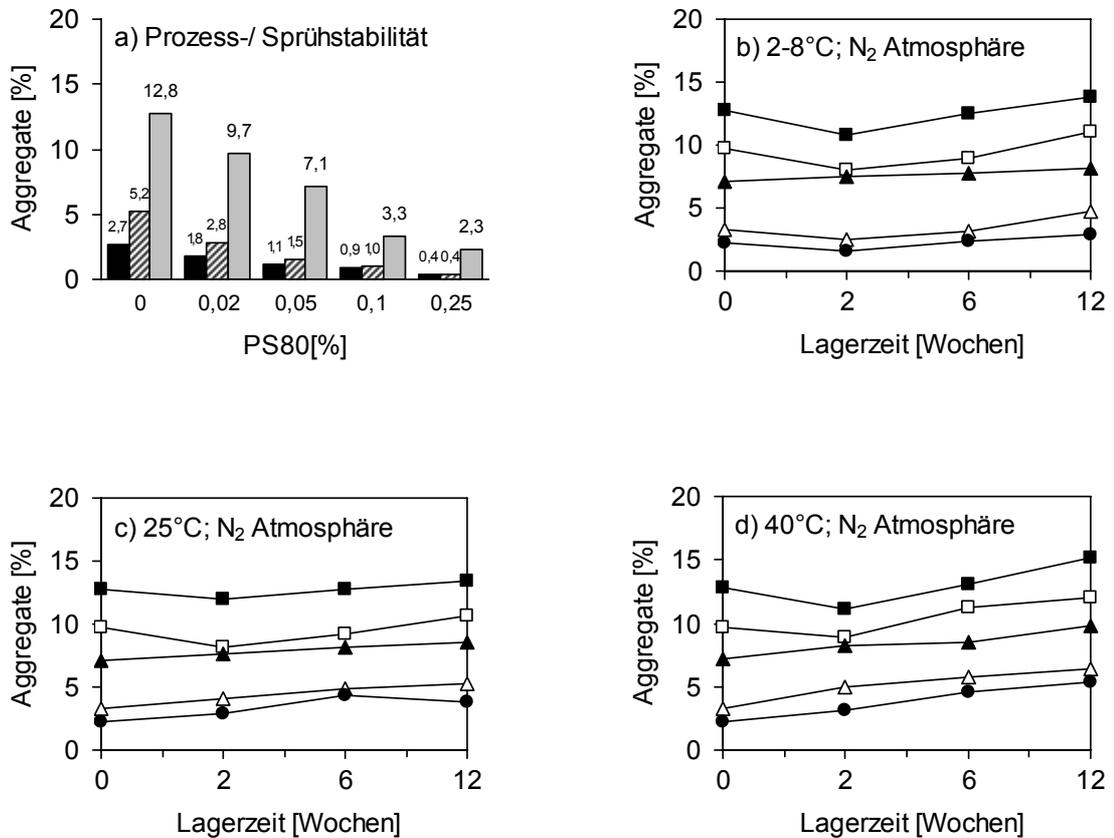


Abb. 4.3-5: Einfluss von PS80 zur Standardsprühlösung (4mg/ml rhIL-11, 22,5mg/ml Glycin, 10mM Methionin, 10mM Phosphatpuffer pH=7) auf die Stabilität von rhil-11
a) Prozessstabilität: schwarz: Sprühlösung; grau: Produkt nach dem Prozess
b) bis d) Lagerstabilität —■—0% PS80, —□—0,02% PS80, —▲—0,05%PS80, —△—0,1%PS80,—●—0,25%PS80)

Während der Lagerung über 12 Wochen bei 2-8°C und 25°C sind die Produkte unabhängig von der PS80 Konzentration mit einem Anstieg in den Aggregaten von 0 bis 2% stabil (Abb. 4.3-5b,c). Bei 40°C Lagertemperatur ist der Anstieg mit 2,7% Aggregaten erhöht (Abb. 4.3-5d). In Sprühlösungen mit erhöhten PS80 Zusätzen wurden vor dem Versprühen weniger Aggregate gefunden. Sprühlösungen ohne PS80 Zusatz enthalten 2,6% Aggregate, während in der Sprühlösung mit 0,25% PS80 nur 0,4% Aggregate enthalten sind. Durch Interaktion von hydrophoben Domänen des Proteins mit hydrophoben Bereichen des Tensids kann ein Protein Tensid Komplex entstehen, der das Protein vor Interaktionen mit anderen Proteinen schützt.

Durch Tensidzusätze wird so die Neigung zur Aggregatbildung herabgesetzt (Randolph et al.; 2002). Die Aggregation ist dabei im Fall von rhIL-11 offensichtlich zum Teil reversibel.

Die Produkte enthielten nach dem Prozess zwischen 4 und 4,4% RS (Abb. 4.3-6a). Zwischen der PS80 Konzentration in der Sprühlösung und den Gehalt an RS konnte kein Zusammenhang abgeleitet werden. In sprühgetrockneten rhIL-11 Produkten mit höheren PS80 Konzentrationen wurden nach dem Prozess sogar leicht erhöhte RS Gehälter gefunden (Fitzner; 2003). Bei 2-8°C stiegen die RS unabhängig von der PS80 Konzentration über 12 Wochen von ursprünglich ca. 4,2% auf ca. 5,6% leicht an (Abb. 4.3-6b). Höhere Lager-temperaturen führten zu einem deutlich stärkeren Anstieg der RS. Dieser Anstieg war mit höheren PS80 Konzentrationen deutlich ausgeprägter. Ohne PS80 und mit 0,02% PS80 in der Sprühlösung wurden bei 25°C nach 12 Wochen 9,3 bzw. 9,7% RS gefunden (Abb. 4.3-6c), bei 40°C 18,1% bzw. 17,6% RS (Abb. 4.3-6d). PS80 Konzentrationen von 0,05% und 0,1% in der Sprühlösung führten bei 25°C zu 11,4 bzw. 12,1% RS, bei 40°C zu 20,4% bzw. 20,7% RS. Mittels SDS Page wurde der Einfluss von PS80 auf die Bildung von kovalenten Aggregaten untersucht. Durch Reaktion von Aldehyd-Gruppen in oxidierten PS80 Molekülen und Lysin Resten im rhIL-11 Molekül kann es zur kovalenten Verknüpfung von rhIL-11 Molekülen durch Polysorbat-Brücken kommen (Friedland et al.; 1999). Sprühlösungen mit 0,05%, 0,1% und 0,25% PS80 führten nach dem Prozess zu Produkten mit 0,2%, 0,3% und 0,5% kovalenten Aggregaten. Nach Lagerung über 12 Wochen bei 40°C stiegen diese auf 2,2%, 2,7% und 2,8% an. Der mittels SDS Page ermittelte Anstieg in kovalenten Aggregaten macht sich im RP Chromatogramm in einem zusätzlichen Anstieg von Peak 9 bemerkbar. Die Fläche von Peak 9 resultiert aus entfalteten Protein und kovalenten Aggregaten (Kap 3.3). Bereits in Produkten ohne PS80 Zusatz ist der Anteil von entfaltetem Protein gegenüber den mittels SE-HPLC ermittelten Aggregaten deutlich erhöht (Kap 4.3.3). Der stärkere Anstieg der RS bei gleichen Lagerbedingungen lässt sich somit durch eine leicht verstärkte Bildung von kovalenten Aggregaten bei höheren PS80 Konzentrationen erklären.

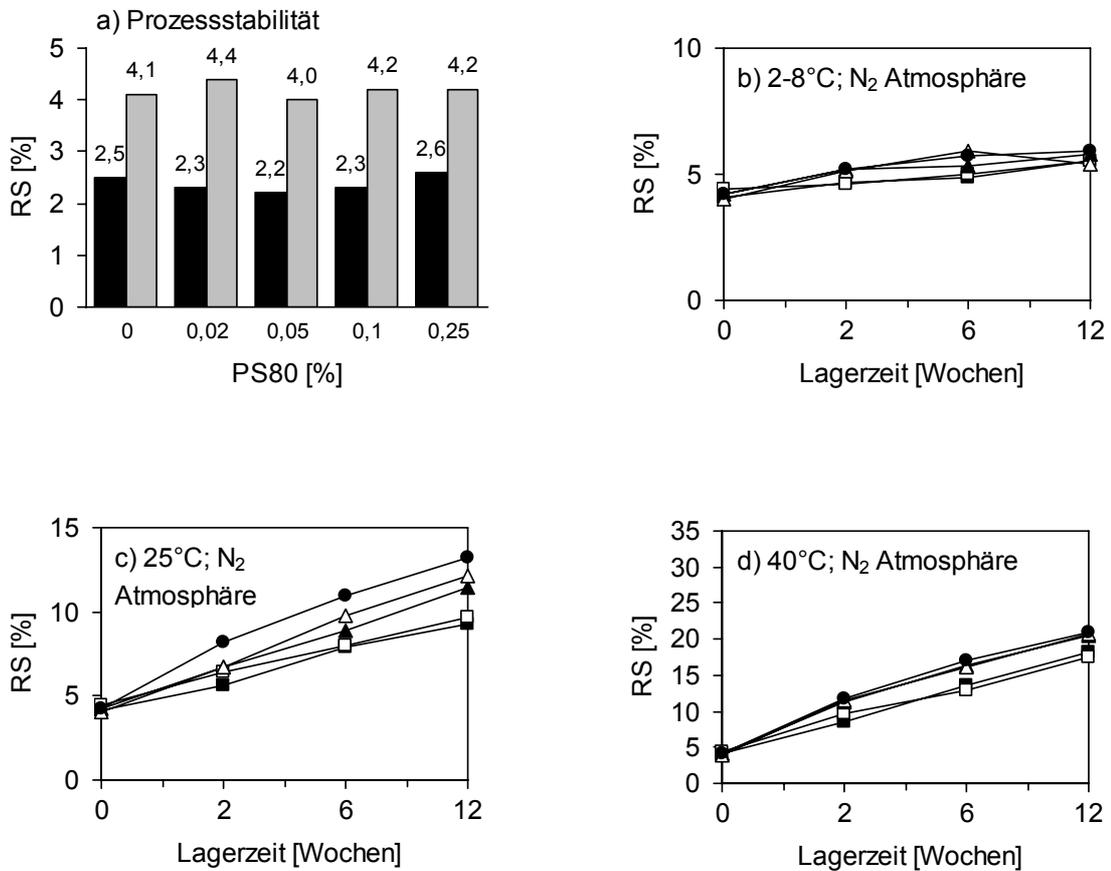


Abb. 4.3-6: Einfluss von PS80 zur Standardsprühlösung (4mg/ml rhIL-11, 22,5mg/ml Glycin, 10mM Methionin, 10mM Phosphatpuffer pH=7) auf die Stabilität von rhIL-11
a) Prozessstabilität: schwarz: Sprühhösung; grau: Produkt nach dem Prozess
b) bis d) Lagerstabilität —■—0% PS80, —□—0,02% PS80, —▲—0,05%PS80, —△—0,1%PS80, —●—0,25%PS80

Fitzner konnte diese von der PS80 Konzentration abhängige Bildung von kovalenten Aggregaten mit rhIL-11 für die Sprühtrocknung nachweisen (Fitzner; 2003). Zwischen der Menge des eingesetzten PS80 und der Entstehung von entfaltetem Protein scheint kein direkter Zusammenhang zu bestehen. Das Entstehen von Oxidationsprodukten in Gegenwart von 0,02% PS80 wird in Kap 4.3.4 näher untersucht.

Zusammenfassend wurden mit höherem PS80 Zusatz während des Prozesses deutlich weniger Aggregate gebildet und somit auch die Lagerstabilität in Bezug

auf die Bildung von Aggregaten verbessert. Die Entstehung von RS während des Prozesses wird durch PS80 nicht beeinflusst, im Verlauf der Lagerung werden allerdings beim Einsatz von Sprühhösungen mit 0,02% PS80 oder mehr erhöhte Mengen an RS gebildet, die sich auf die Entstehung von kovalenten Aggregaten zurückführen lassen. Bei einer Lagertemperatur von 2-8°C sind für die Stabilisierung hohe PS80 Konzentrationen zu bevorzugen. Geht man von 0,02% PS80 Zusätzen zur Sprühh Lösung aus, lässt sich mit 0,1% PS80 eine deutlich bessere Stabilisierung in Bezug auf Aggregate erzielen als mit 0,05% PS80. Bei Lagertemperaturen von 25°C und höher, ist die Bildung von kovalenten Aggregaten bei 0,05% allerdings fast so stark ausgeprägt wie bei 0,1%. Durch den Einsatz unlöslicher Träger ohne Disaccharidzusatz zur Sprühh Lösung konnten die beschriebenen Effekte leichter erkannt werden.

4.3.4 EINFLUSS VON ZUCKERZUSÄTZEN IN KOMBINATION MIT 0,02% PS80

In den vorangehenden Kapiteln wurden die stabilisierenden Einflüsse von Trehalose und PS80 auf rhIL-11 getrennt untersucht. Zusätze von 22,5mg/ml Trehalose zur Sprühh Lösung schützen das Protein teilweise während des Prozesses und der Lagerung (Kap 4.3.2). Mit Einsatz steigender PS80 Konzentration in der Sprühh Lösung entstehen während des Prozesses deutlich weniger Aggregate, die Bildung von RS wird allerdings nicht verhindert (Kap 4.3.3). PS80 Zusätze bis zu einer Konzentration von 0,02% sind in Bezug auf die Bildung von kovalenten Aggregaten während der Lagerung gegenüber höheren PS80 Konzentrationen zu bevorzugen (Kap 4.3.3). Nachfolgend soll unter Einsatz der Trägermaterialien Saccharose, Glycin, MCC Spheres und Mannitol der gemeinsame Einfluss, sowohl von 22,5mg/ml Trehalose als auch von 0,02% PS80 in der Sprühh Lösung auf die Stabilität untersucht werden. Neben den Prozess- wurden die Lagerstabilitäten bei 25°C ermittelt. Nach dem Prozess wurden für Saccharose 6,1%, für MCC Spheres 4,3% Aggregate erhalten (Abb. 4.3-7). Die weniger gute Stabilisierung von 8% für Glycinprodukte und von 9,9% für Mannitolprodukte in Bezug auf Aggregate lässt sich wie bei Produkten ohne PS80 Zusatz durch Verdünnungseffekte der

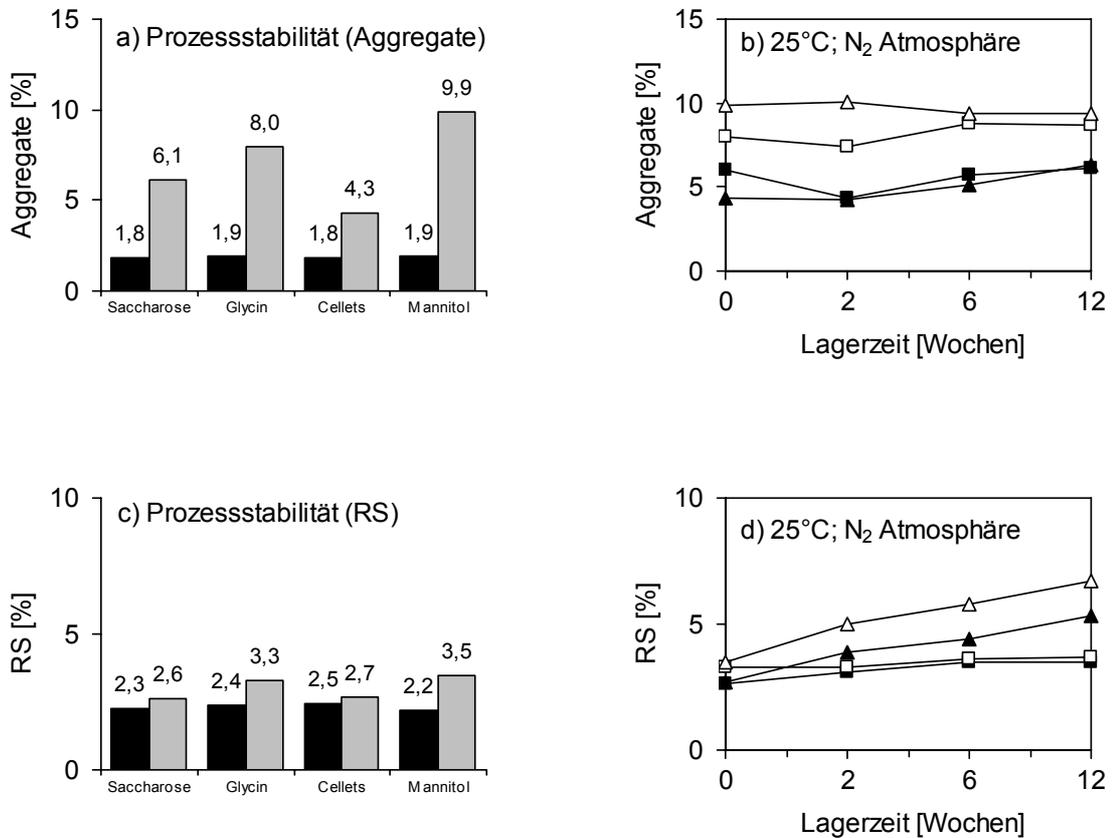


Abb. 4.3-7: Einfluss des Zusatzes von 22,5mg/ml Trehalose und 0,02% PS80 zur Standard-sprühlösung auf die Bildung von Aggregaten und RS
a) und b) Prozessstabilität: schwarz Sprühhösung; grau: Produkt nach dem Prozess
b) und d) Lagerstabilität : —■— Saccharose, —□—Glycin, —▲— MCC Spheres, —△— Mannitol

proteinhaltigen Schicht mit gelöstem Trägermaterial erklären (Kap. 4.3.2). Saccharose ist auch löslich, ist allerdings auch ein guter Stabilisator für rhIL-11 (Garzon-Rodriguez; 2003). Im Vergleich zu Produkten, die lediglich Trehalose (Kap 4.3.2) oder dem MCC Produkt, welches lediglich 0,02% PS80 Zusatz zur Sprühhösung enthalten (Kap. 4.3.3), tragen beide Stabilisierungsprinzipien Additiv zur Stabilität bei. Die RS Gehälter sind vergleichbar mit Produkten, mit 22,5mg/ml Trehalosezusatz zur Sprühhösung, 0,02% Zusätze von PS80 haben keinen negativen Einfluss auf die Bildung von RS. Mit dem Ziel die Sprühhösung weiter zu optimieren, wurde parallel zu den oben durchgeführten Untersuchungen mit MCC Spheres als Trägermaterial der Einfluss unter-

schiedlicher Zucker Glycin Verhältnisse unter Zusatz von 0,02% PS80 zur Sprühlösung auf die rHL-11 Stabilität untersucht. Zusätze von Glycin führen in Systemen mit rein amorphen Zuckern zu einer Herabsetzung der Glasübergangstemperatur und damit zu einer verringerten Stabilität va. über die Lagerdauer (Te Booy et al.; 1992), weshalb auch Formulierungen mit reduzierten Glycingehalt bzw. ohne Glycin untersucht wurden. Neben Trehalose wird mit Saccharose ein alternatives Disaccharid eingesetzt. Durch Phasentrennung von Protein und Zucker kann es zu unzureichender Stabilisierung und Entfaltung des Proteins kommen. Phasentrennungsphänomene von Zuckern und Proteinen wurden für die Sprüh- (Tzannis et al.; 1999) und Gefrier-trocknung beschrieben (Allison et al.; 2000 ; Carpenter et al.; 2000). Die Fähigkeit von Saccharose und Trehalose die Entfaltung zu unterdrücken lässt sich nicht vorhersagen und muss deshalb für jedes Protein gesondert ermittelt werden (Carpenter et al.; 2002). In der Formulierung mit 22,5mg/ml Trehalose, ohne Glycin und 0,02%PS80 wurde der Einfluss des als Antioxidationsmittel eingesetzten Methionins und der Stickstoffbegasung des Gasraums der Vials näher untersucht.

Mit einer Erniedrigung des Glycingehaltes in der Sprühlösung, entstehen während des Prozesses weniger Aggregate (Abb. 4.3-8a). Produkte mit 22,5mg/ml Saccharose/ Trehalose und mit 22,5mg/ml Glycin enthalten jeweils 4,3% Aggregate, wohingegen die entsprechenden Produkte ohne Glycin nur 3,7 bzw. 3,3% Aggregate enthalten. Über die Lagerdauer von 12 Wochen weisen Produkte ohne Glycin die beste Stabilität auf. Bei 25°C enthalten das Saccharose und Trehalose Produkte ohne Glycinzusatz 4,1 bzw. 4,0% Aggregate, wohingegen die entsprechenden Produkte mit 22,5mg/ml Glycin in der Sprühlösung 6,5 bzw. 5,3% Aggregate enthalten (Abb. 4.3-8c).

In Bezug auf RS weisen alle Produkte nach dem Prozess mit 2,8 bis 3% gleiche Qualität auf (Abb. 4.3-9a). Nach Lagerung sind Produkte, die kein Glycin enthalten stabiler. Bei 2-8°C findet man beim Saccharose/ Glycin Produkt mit 3,5% nach 12 Wochen die meisten RS (Abb. 4.3-9a). Die RS Gehälter der anderen Produkte sind mit Werten um 3,1% vergleichbar. Bei höheren

Temperaturen ist der Anstieg über die Lagerdauer verstärkt. Die höhere Stabilität von Produkten ohne Glycin zeigt sich v.a. bei 25°C und 40°C (Abb. 4.3-9c,d). Nach 12-wöchiger Lagerung bei 40°C enthalten Produkte ohne Glycin mit 6,5 bis 7,9% nur halb so viel RS wie Produkte mit Glycin.

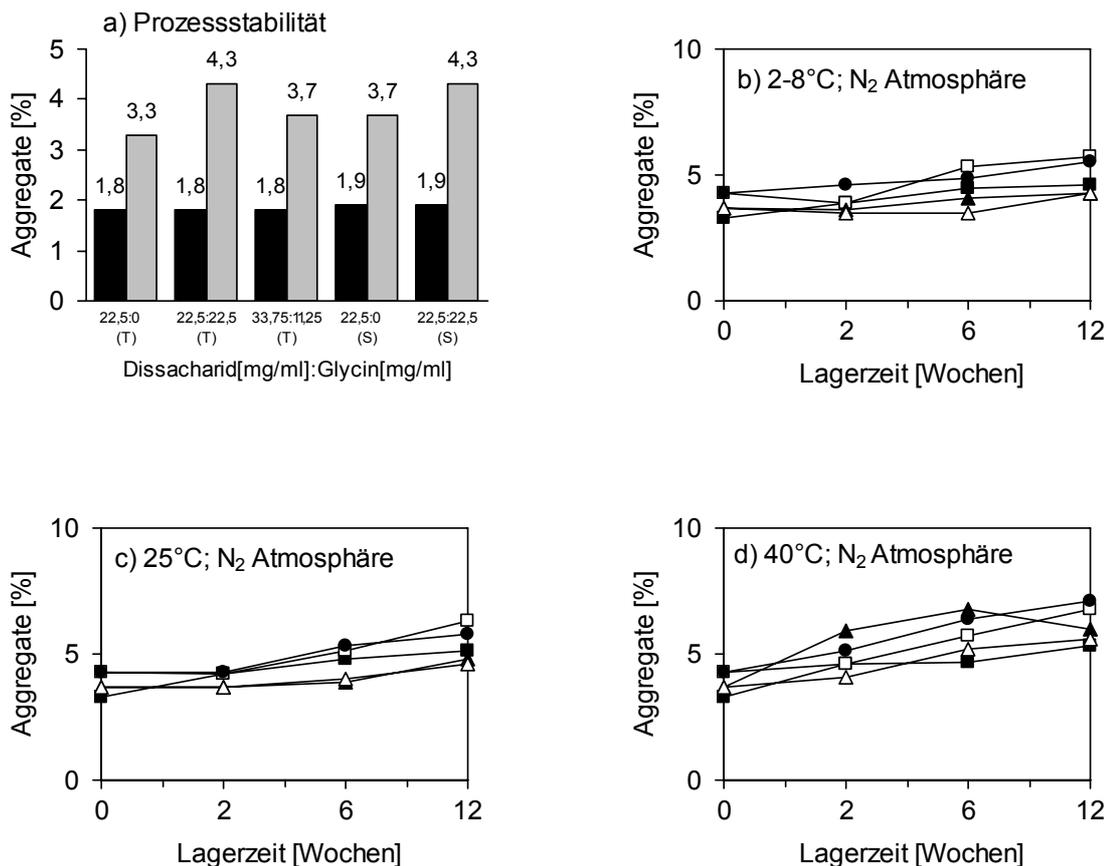


Abb. 4.3-8: Einfluss des Zucker:Glycin Verhältnisses in der Sprühhlösung auf die Bildung von Aggregaten; Trägermaterial: MCC Spheres;
 a) Prozessstabilität: schwarz: Sprühhlösung; grau: Produkt nach dem Prozess
 b) bis d) Lagerstabilität —■—22,5:0(T), —□—22,5:22,5(T), —▲—33,75:11,25(T), —△—22,5:0(S), —●—22,5:22,5(S); S = Saccharose; T= Trehalose

Ein Vergleich der Stabilitätsdaten mit Literaturdaten legen den Schluss nahe, dass die proteinhaltige Schicht in Abhängigkeit der Formulierung amorph oder teilamorph vorliegt (Kap 4.3.2). In diesem kinetisch eingefrorenen Zustand sind diffusionskontrollierte Reaktionen wie die Entfaltung und chemische Reaktionen von Proteinen gegenüber Temperaturen oberhalb von T_g stark vermindert

(Carpenter et al.; 2002). In Bezug auf die stabilisierenden Eigenschaften besteht zwischen Saccharose und Trehalose kein Unterschied.

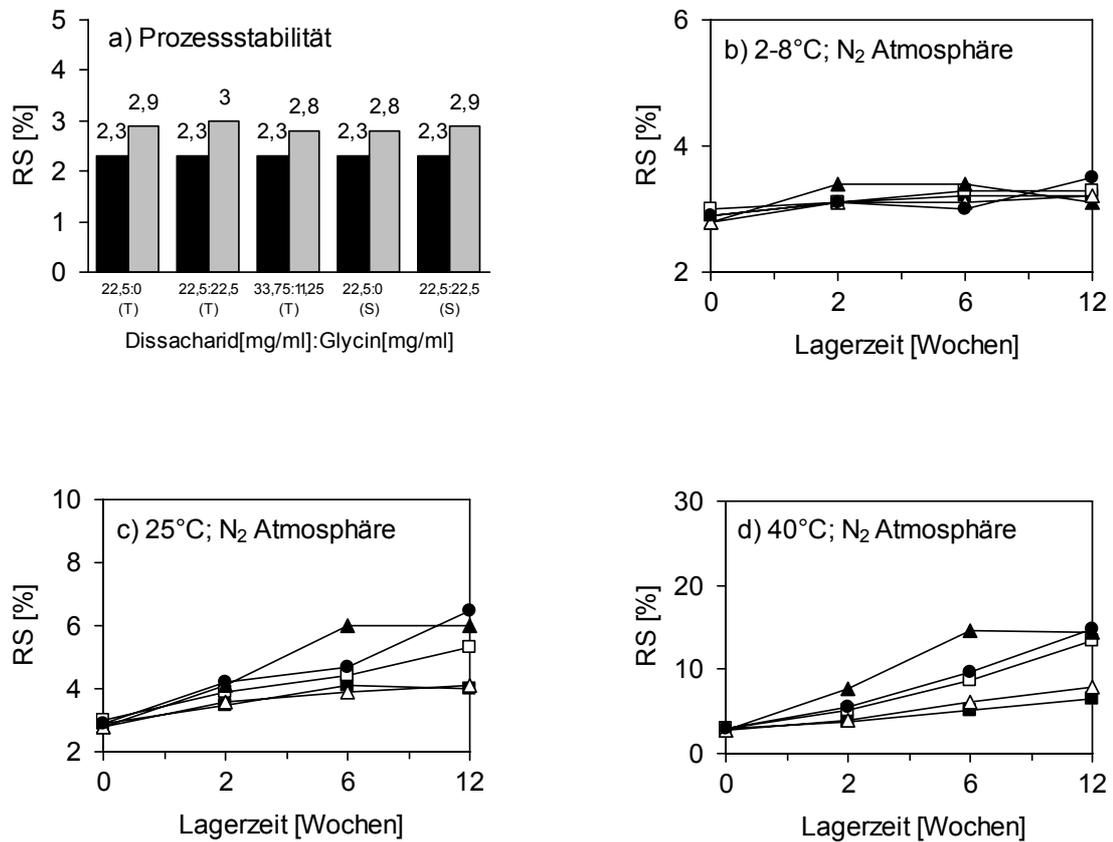


Abb. 4.3-9: Einfluss des Zucker:Glycin Verhältnisses in der Sprühhösung auf die Bildung von Aggregaten; Trägermaterial: MCC Spheres;
 a) Prozessstabilität: schwarz: Sprühhösung; grau: Produkt nach dem Prozess
 b) bis d) Lagerstabilität —■—22,5:0(T), —□—22,5:22,5(T), —▲—33,75:11,25(T), —△—22,5:0(S), —●—22,5:22,5(S); S = Saccharose; T= Trehalose

Der hohe Anteil Trägermaterial im Vergleich zu aufgesprühtem Feststoffanteil im Produkt verhindert den Nachweis eventuell vorhandener amorpher Strukturen (Kap. 4.3.2). Das Einsprühen einer Standardsprühhösung mit 22,5mg/ml Trehalose und 22,5mg/ml Glycin in die Anlage bei Standardprozessparametern ohne Einsatz von Trägermaterial war ein Ansatz um dieses Problem zu umgehen. Die von den Filtern mechanisch entfernte getrocknete Sprühhösung hatte eine gummiartige, glasige Konsistenz.

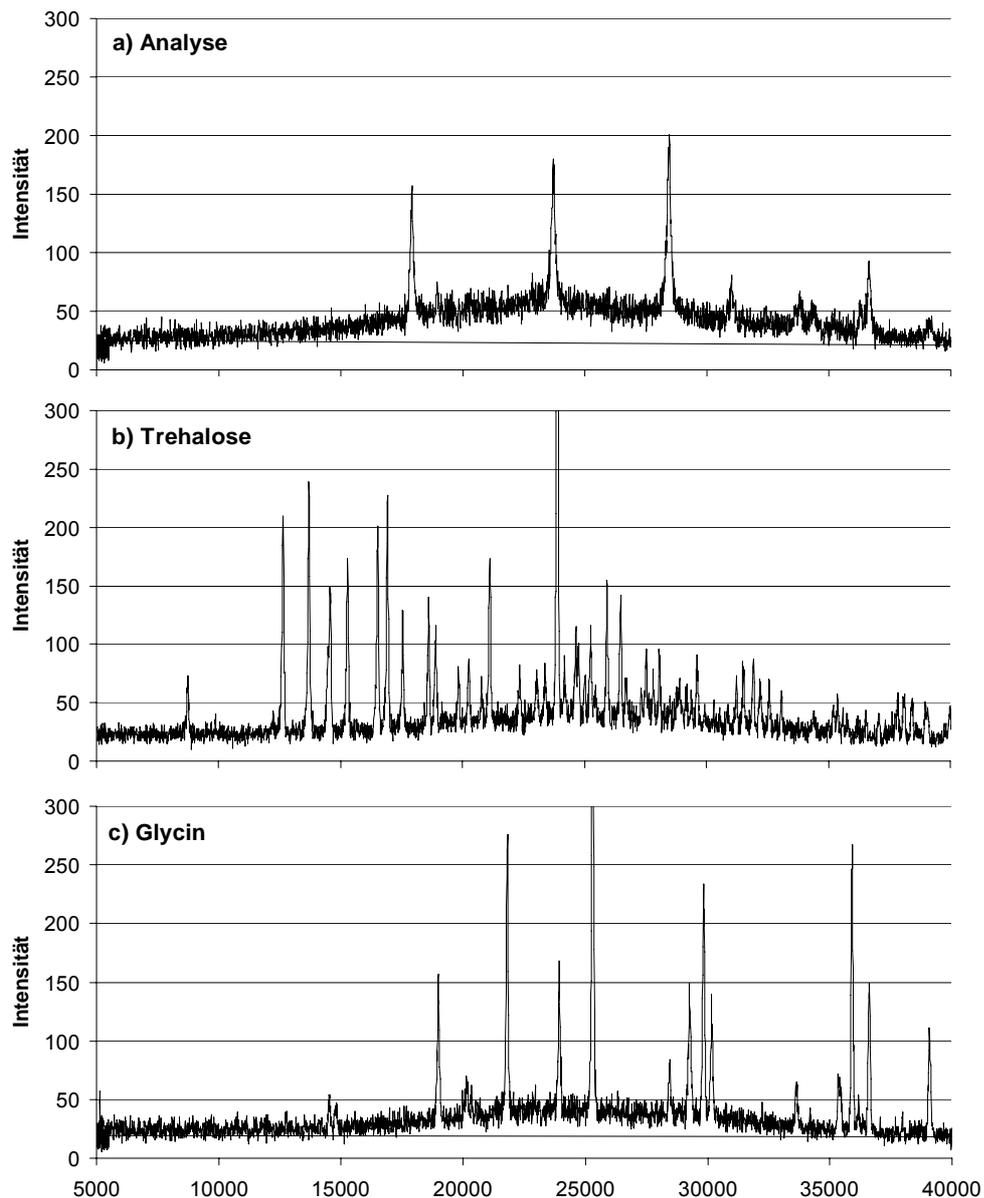


Abb. 4.3-10: Röntgendiffraktogramm von in der Wirbelschicht getrockneter Sprühdösung
Sprühdösung: 22,5mg/ml Trehalose, 22,5mg/ml Glycin, 300mM Phosphatpuffer
pH=7

In der Analyse erkennt man einen leichten Halo, der auf amorphe Strukturen hindeutet (Abb. 4.3-10a). Die drei ausgeprägten Reflexe korrespondieren mit kristallinem Glycin in der β -Modifikation (Abb. 4.3-10c). Ein weiterer Ansatz zum Nachweis amorpher Strukturen ist das Aufsprühen größerer Mengen Sprühdösung auf 10 anstatt 20g Trägermaterial. Durch den Einsatz der kleinsten kommerziell erhältlichen MCC Spheres (Durchmesser: 100 μ m) ist das

Verhältnis von Masse an aufgesprühtem Feststoffanteil zu Masse des Trägermaterials erhöht. Das Röntgendiffraktogramm der unbehandelten MCC Spheres lässt auf amorphe Anteile und kristalline Anteile im Ausgangsmaterial schließen. Der Vergleich der Röntgendiffraktogramme von Ausgangsmaterial und Produkt zeigt keine Hinweise auf kristalline Zustände von Trehalose und Glycin (Abb. 4.3-11)

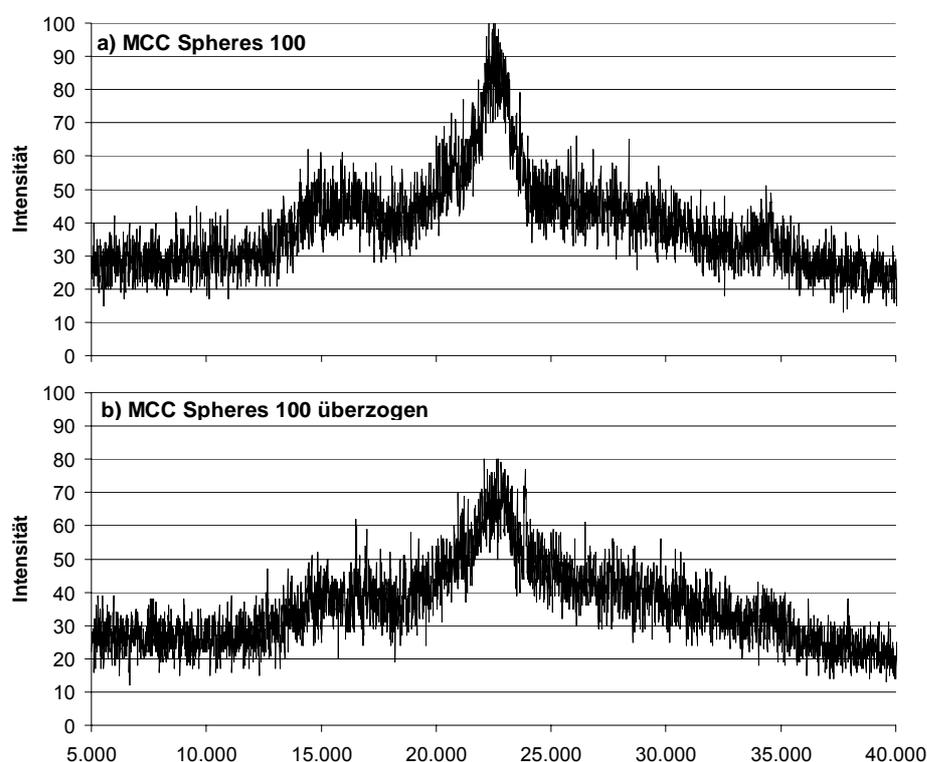


Abb. 4.3-11: Röntgendiffraktogramme: a) MCC Spheres 100- Startmaterial
b) Produkt: MCC Spheres 100 - überzogen (Sprütrate: 0,4mg/min, Sprühdauer: 6,5 Stunden, Sprühlösung: 22,5mg/ml Glycin + 22,5mg/ ml Trehalose)

Methioninreste in Proteinen können leicht durch atmosphärischen Sauerstoff oxidiert werden (Wang; 2000). Um die Oxidation von Proteinen möglichst zu unterbinden, kann man den Gasraum von Vials mit Stickstoff begasen, Antioxidantien verwenden oder das Protein als trockene Formulierung lagern (Waterman et al.; 2002). Ohne die Faltung von rhIL-11 zu beeinflussen, führt die Oxidation von Methionin 58 zu einem erheblichen Verlust der Bioaktivität um

90% (Czupryn et al.; 1995; Wright; 1999). In Kapitel 4.3.3 wurde die Notwendigkeit von PS80 Zusätzen zur Verringerung der rhIL-11 Aggregation während des Prozesses aufgezeigt. Tenside wie Polysorbate enthalten oft Spuren von Peroxiden, welche als Verunreinigung aus der Herstellung kommen oder als Abbauprodukt während der Lagerung entstehen (Nguyen 1994). Peroxide können des Weiteren durch Verpackungsmaterial wie Silikon Gummistopfen in das Produkt gelangen (Banga; 1995). In genügend hoher Konzentration führen diese Peroxide dann besonders bei erhöhter Temperatur zur Oxidation. Für rhIL-11 konnte der schützende Effekt von Methionin in flüssigen und lyophilisierten Formulierungen bereits nachgewiesen werden (Warne; 2001). Fitzner konnte durch Zusätze von 10 mM Methionin zur Sprühlösung die Oxidation von Methionin 58 in sprühgetrockneten rhIL-11 Formulierungen ebenfalls deutlich reduzieren (Fitzner; 2003). Zur Untersuchung der Met58-Oxidation in wirbelschichtgetrockneten Produkten, wurden Standard Sprühlösungen (22,5mg Glycin + 22,5mg Trehalose + 0,02% PS) mit 10 und 50mM Methionin eingesetzt. Die Produkte wurden in Vials mit und ohne Stickstoffbegasung des Gasraums eingelagert.

In Produkten mit Sprühlösungszusätzen von 0, 10 und 50mM Methionin und 0,02% PS80 wurden nach dem Prozess 3,6%, 2,8% und 2,7% Met58Ox gefunden. Die eingesetzten Sprühlösungen enthielten 2,7, 2,5 und 2,5% Met58Ox. Ohne Zusatz von Methionin zur Sprühlösung und ohne Stickstoff im Gasraum, steigt der Gehalt an Met58Ox in Abhängigkeit der Lagerbedingungen über 12 Wochen deutlich an. Bei 2-8°C findet man nach 12 Wochen einen um 0,8% erhöhten Met58Ox Gehalt. Zusätze von 10mM bzw. 50mM Methionin zur Sprühlösung und die anschließende Einlagerung ohne Stickstoffbegasung der Vials führen dazu, dass bei 2-8°C über 12 Wochen kein Met58Ox entsteht. Bei 25°C Lagertemperatur und 12 Wochen Lagerdauer steigt Met58Ox mit 3,3 bzw. 3% leicht an, bei 40°C finden sich nach 12 Wochen bereits 4,8 bzw. 5,1%. Durch Einsatz von 10mM Methionin in der Sprühlösung und von Vials mit Stickstoff im Gasraum, konnte das Fortschreiten der Oxidation während der Lagerung bei 25 und 40°C völlig unterbunden werden.

Anhand der Trägermaterialien Saccharose, Glycin, MCC Spheres und Mannitol konnte gezeigt werden, dass sich der stabilisierende Einfluss von 22,5mg/ml Trehalose und 0,02% PS80 in der Sprühlösung additiv verhält. In weiteren Untersuchungen zur Sprühlösungsoptimierung mittels MCC Spheres konnte gezeigt werden, dass in Sprühlösungen ohne Glycinzusatz eine weitere Verbesserung der Produktstabilität erreicht wird. Trehalose und Saccharose stabilisieren rhIL-11 unter den Bedingungen in der Wirbelschicht ähnlich gut. Über die Lagerdauer gesehen, sind Produkte ohne Glycinzusatz allerdings deutlich stabiler, als Produkte die Glycin enthalten. Die bessere Stabilisierung bei Abwesenheit von Glycin wird auf einen höheren amorphen Anteil in der proteinhaltigen Schicht zurückgeführt. Durch Zusatz von 10mM Methionin und Stickstoffbegasung des Gasraums der Vials kann eine Oxidation von rhIL-11 während der Lagerung bei 25°C und 40°C wirkungsvoll unterbunden werden.

4.3.5 ZUSAMMENFASSUNG

Mit Saccharose, Glycin, Mannitol und MCC-Spheres als Trägermaterial und ohne stabilisierende Zusätze in der Sprühlösung enthalten Produkte bereits nach dem Wirbelschichtprozess große Mengen an Aggregaten und RS, die über die Lagerdauer weiter ansteigen. Durch Zusatz von 22,5mg/ml Trehalose zur Sprühlösung konnte während des Prozesses und der Lagerung eine leichte Stabilisierung in Bezug auf Aggregate und RS erreicht werden. Eine Ausnahme war hierbei das Produkt mit Saccharose als Trägermaterial. Durch Verdünnung der Trehalose der Sprühlösung mit angelösten Saccharoseträger kam es hier zu einer leichten Abnahme der Stabilität während des Prozesses. In XPS Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich in Saccharoseprodukten mit Trehalosezusätzen zur Sprühlösung mehr Protein an der Oberfläche anreichert als in Saccharose Produkten ohne Trehalosezusätze (Kap. 4.4). Akzeptable Stabilitäten in Bezug auf die Bildung von Aggregaten va. während des Prozesses und auch während der Lagerung wurden erst durch Zusatz von PS80 zur Sprühlösung erzielt. PS80 hatte dabei keinen Einfluss auf die Bildung von RS während des Prozesses. In Konzentrationen größer 0,02% führte PS80 allerdings während der Lagerung zu einer verstärkten Bildung von RS. Die

beste Stabilisierung wurde durch die Kombination von Disacchariden und PS80 erzielt. Durch den Einsatz von Sprühlösungen ohne Glycin konnte die Stabilität der Produkte weiter verbessert werden. Der Austausch von Trehalose gegen Saccharose in der Sprühlösung hatte keinen Einfluss auf die Stabilität der Produkte. Mit Zusätzen von 10mM Methionin zur Sprühlösung konnte ein ausreichender Schutz von rhIL-11 vor Oxidation erzielt werden. Durch eine Begasung von Vials mit Stickstoff vor dem Verschließen, konnte der Anstieg von Met58Ox während der Lagerung verhindert werden. Somit ist es gelungen eine Sprühlösung zu entwickeln, die eine gute Stabilisierung von rhIL-11 während Prozess und Lagerung ermöglicht.

4.4 XPS VON RHIL-11 PRODUKTEN

Um Vorgänge während des Auftragens und der Trocknung in der Wirbelschicht besser verstehen zu können, wurden quantitative Untersuchungen zur Belegung der Produktoberfläche mit Protein durchgeführt. In einer Versuchsreihe wurden in aufeinander folgenden Prozessen 1,5mg-, 6mg-, 12mg- und 60mg rhIL-11 auf 20g Trägermaterial aufgetragen. Neben MCC Spheres als unlöslichen Träger, wurden in den Versuchsreihen Mannitol und Saccharose als Trägermaterialien eingesetzt. Für jedes der eingesetzten Trägermaterialien wurde jeweils eine Versuchsreihe ohne und eine mit Zusatz von 22,5mg/ml Trehalose hergestellt. Die Kenntnis der Oberflächenbelegung des Trägers mit Protein bzw. Matrixbildner kann wichtige Hilfestellung zur Erklärung der Proteininstabilität geben, da es an Oberflächen zur Denaturierung von Proteinen kommen kann.

4.4.1 SPEKTREN DER TRÄGERMATERIALIEN, TREHALOSE UND RHIL-11

Die C1s und O1s Spektren aller vermessenen Proben setzen sich aus verschiedenen Komponenten zusammen, die für eine bestimmte Kohlenstoff- bzw. Sauerstoffqualität charakteristisch sind. Da die jeweiligen Komponenten im Spektrum nicht vollständig voneinander separiert sind, musste für die quantitative Auswertung eine Dekonvolution durchgeführt werden. Das erhaltene C1s Spektrum von Cellulose setzt sich aus vier Komponenten C1 bis C4 zusammen (Abb. 4.4-1a). Die Komponenten C1 und C2 sind charakteristisch für Kohlenstoff, der nur an Kohlenstoff und/ oder Wasserstoff gebunden ist (\underline{C} -(C,H)). Diese Kohlenstoffqualität kommt nicht in der Cellulose selbst vor, sondern stammt aus Kohlenstoffverunreinigungen, die sich prinzipiell auf allen Probenoberflächen ablagern, welche der Atmosphäre ausgesetzt sind (Johansson et al.; 1999). Gleiche Spezies erscheinen grundsätzlich als eine Komponente im Spektrum. Die Verschiebung zwischen den Komponenten C1 und C2 lässt sich durch Aufladungseffekte der Probe während der Messung erklären. Der metallische, geerdete Probenträger, von dem das C1 Signal stammt, bleibt im Gegensatz zur Probe auf Erdpotential und zeigt demnach die für graphitischen

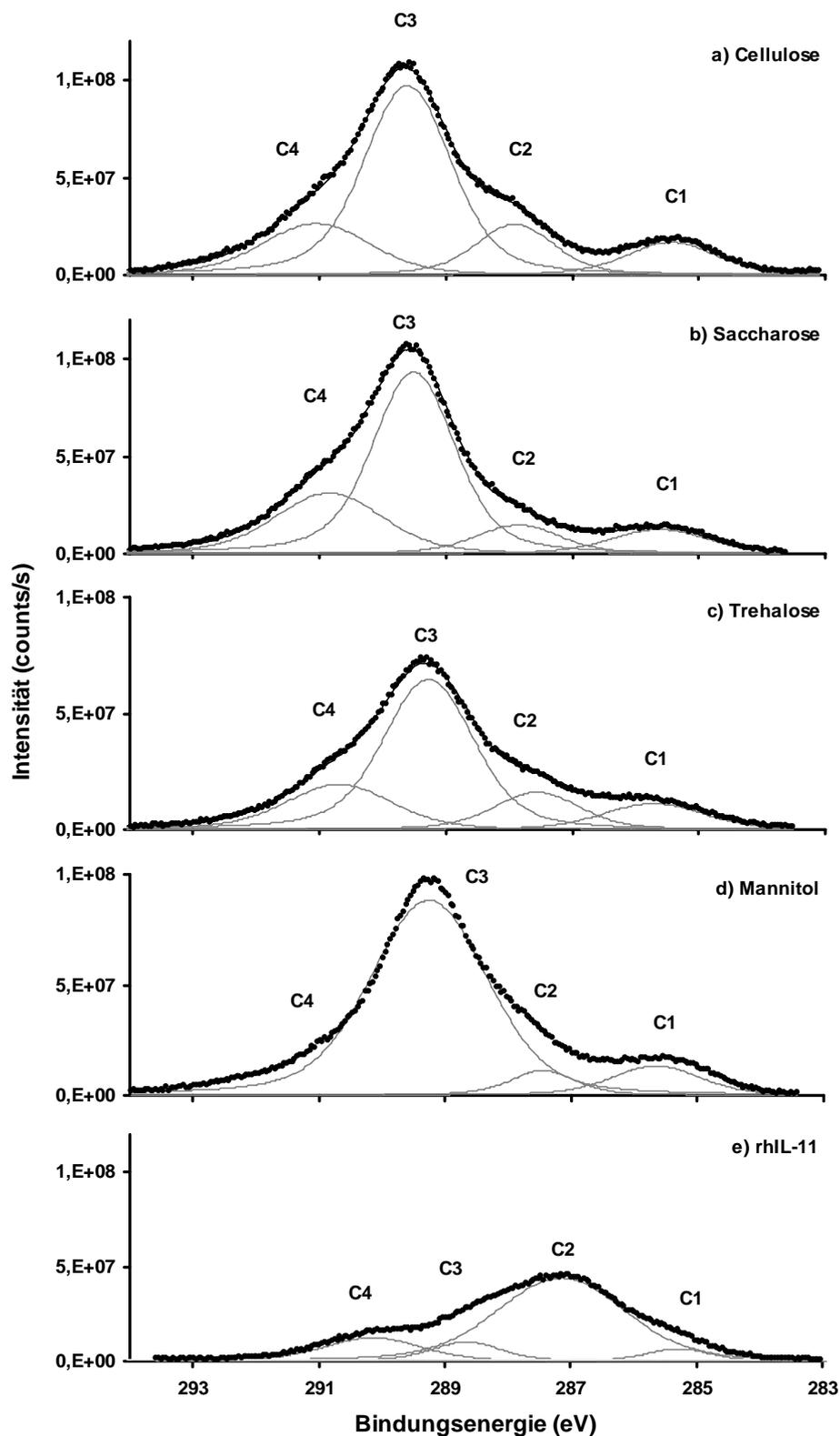


Abb. 4.4-1: C1s Spektren der Trägermaterialien und von rHL-11. Die Komponenten C2 bis C4 sind um den Betrag der Aufladung der Probe (Tab. 4.4-2) zu höheren Bindungsenergien hin verschoben.

Kohlenstoff (C-(C,H)) zu erwartende Bindungsenergie von 284,8 eV (Tab. 4.4-1). Alle anderen C1s Komponenten stammen von der nicht leitenden Probe und sind demnach um die Aufladung der Probe entsprechend zu größeren BE im Spektrum verschoben (Tab. 4.4-2/ Tab. 4.4-3). Gleiches gilt für alle anderen O1s und N1s Spezies, so dass aus der Abweichung der gemessenen Werte von den Literaturwerten auf die Aufladung der Probe geschlossen werden kann. Proben mit vergleichsweise hoher Leitfähigkeit, wie rhIL-11, laden sich weniger stark auf. Proben mit vergleichsweise geringer Leitfähigkeit wie Cellulose, laden sich stärker auf.

Tab. 4.4-1: Komponenten und Bindungsenergien in den Produkten (Literaturquellen: 1: (Dengis et al.; 1995)/ 2: (Auditore et al.; 2002)/ 3: (Dupont-Gillain et al.; 1999)/ 4: (NIST ; 2006); 2006/ 5: (Johansson et al.; 2005))

| Komponente | Spezies | BE [eV] (ermittelt) | BE [eV] (Literatur) |
|------------|--------------|---------------------|---------------------|
| C1, C2 | C-(C,H) | 284,8 ± 0,2 | 284,8 (1-5) |
| C3 | C-O | 286,2 ± 0,1 | 286,3 (1,4) |
| C4 | CII O, O-C-C | 287,6 ± 0,2 | 287,8 (1,3) |
| O3 | C-O-(C,H) | 532,9 ± 0,3 | 532,6 (1,4) |
| O4 | OII | 530,9 ± 0,4 | 531,3 (1) |
| N | N | 399,8 ± 0,3 | 399,9 (1-5) |

Tab. 4.4-2: Ermittelte Aufladung von Proben (Produkte ohne Trehalose)

| rhIL-11 aufgetragen [mg] | Aufladung [eV] | | |
|--------------------------|----------------|------------|----------|
| | MCC Spheres | Saccharose | Mannitol |
| rhIL-11 | 2,3 | | |
| 60 | 2,4 | 3,2 | 2,9 |
| 12 | 2,6 | 3,1 | 2,9 |
| 6 | 2,7 | 3,1 | 2,9 |
| 1,5 | 2,9 | 3 | 2,7 |
| 0 (Trägermaterial) | 3,3 | 3,2 | 3 |

Tab. 4.4-3: Ermittelte Aufladung von Proben (Produkte mit Trehalose)

| rhIL-11/ Trehalose aufgetragen [mg] | Aufladung [eV] | | |
|-------------------------------------|----------------|------------|----------|
| | MCC Spheres | Saccharose | Mannitol |
| rhIL-11 unverdünnt | 2,3 | | |
| 60/ 337,5 | 2,9 | 3 | 2,8 |
| 12/ 67,5 | 2,7 | 2,8 | 2,8 |
| 6/ 33,75 | 2,7 | 2,7 | 2,9 |
| 1,5/ 8,4375 | 3 | 2,9 | 3 |
| 0/ 0 (Trägermaterial) | 3,3 | 3,2 | 3 |

Ursache für die Aufladung ist die Emission von Fotoelektronen aus der Probe. Die Komponente C3 wurde bei einer BE von 286,2eV (Tab. 4.4-1) beobachtet und kann Kohlenstoffatomen zugeordnet werden, die über eine Einfachbindung an ein Sauerstoffatom gebunden sind (C-O) (Johansson et al.; 1999). Intensitäten von Kohlenstoffatomen, welche über Einfachbindungen an zwei Sauerstoffatome gebunden sind (O-C-O), findet man als Komponente C4 bei einer BE von 287,6eV im Spektrum. Aus der Strukturformel von Cellulose ergibt sich, ebenso wie bei Saccharose und Trehalose, das Verhältnis von O-C-O (Acetal) zu C-O (Alkohol/ Ether) mit eins zu fünf. Die C1s Spektren der Disaccharide Saccharose und Trehalose sind vom Cellulose Spektrum folglich praktisch nicht zu unterscheiden (Abb. 4.4-1). Mannitol als Zuckeralkohol enthält sechs C-O Strukturelemente, aber keine O-C-O Strukturelemente. Die Dekonvolution wurde deshalb mit einer Komponente weniger durchgeführt (Abb. 4.4-1d). Betrachtet man das Spektrum von rhIL-11 (Abb. 4.4-1e), treten wie bei den oben angeführten Proben ebenfalls vier Komponenten auf. Wie schon für Kohlenhydrate/ Mannitol erklärt, handelt es sich bei den Komponenten C1 und C2 um Verunreinigungen aus der Atmosphäre. Diese findet man folglich auch im C1s Spektrum des Proteins wieder. Die Zuordnung aller C-Atome in rhIL-11 zu verschiedenen Spezies ergibt 44% für \underline{C} -(C,H). Diese Spezies trägt neben den atmosphärische \underline{C} -(C,H) Verunreinigungen zur hohen Intensität der C2 Komponente im Protein bei. Die gleiche Lage der Komponenten C3 bzw. C4 im Vergleich zu C2 in rhIL-11 und den Kohlenhydraten/ Mannitol deutet auf gleiche bzw. ähnliche funktionelle

kohlenstoffhaltige Gruppen hin. \underline{C} -O Strukturelemente kommen in rhIL-11 mit 3,5% seltener vor als in Zuckern, weshalb die Intensität der C3 Komponente im Protein geringer ist. Die Intensität der C4 Komponente von rhIL-11 ist auf den Kohlenstoff der Peptidbindung ($\underline{C}=\text{O}$) zurückzuführen. Dieser findet sich in XPS Spektren bei gleichen Bindungsenergien wie die O- \underline{C} -O Strukturelemente bei Kohlenhydraten/ Mannitol (Tab. 4.4-1). Insgesamt erkennt man im Spektrum von rhIL-11 deutliche Unterschiede in der Gewichtung der Intensitäten der einzelnen Komponenten im Vergleich zu Kohlenhydraten/ Mannitol, was für eine Quantifizierung von Protein auf Trägermaterialoberflächen anhand von C1s Spektren wichtig ist. Zur Charakterisierung der Produkte wurden neben den C1s Spektren auch O1s Spektren aufgezeichnet (Abb. 4.4-2). Kohlenhydrate/ Mannitol enthalten nur eine Spezies von Sauerstoffatomen. Diese sind über zwei Einfachbindungen an Kohlenstoff bzw. Wasserstoff ($\text{C}-\underline{O}-(\text{C},\text{H})$) gebunden (Dengis et al.; 1995). Die Intensität dieser Spezies wird im Spektrum als Komponente O4 bei einer BE von 530,9eV sichtbar. In rhIL-11 sind 10% aller Sauerstoffatome $\text{C}-\underline{O}-(\text{C},\text{H})$, weshalb bei der Komponente O4 ebenfalls Intensitäten messbar sind. Die Komponente O3 resultiert aus der Peptidbindung ($\underline{O}=\text{C}$) und ist bei gleichzeitiger Anwesenheit von Kohlenhydraten/Zuckern für das Protein charakteristisch. Die Bindungsenergie wurde zu 532,9eV ermittelt. Die Komponenten O1 und O2 konnten nicht eindeutig identifiziert werden. Da diese aber sowohl in rhIL-11, als auch in Kohlenhydrate/ Mannitol Spektren vergleichbare schwache Intensitäten aufweisen, waren diese für die Quantifizierung des Proteins ohne praktische Bedeutung. In rhIL-11 finden sich verschiedene Stickstoffspezies, die bei einer BE von 399,9eV im Spektrum erscheinen. Bei den Kohlenhydraten/ Mannitol findet man keine N1s Intensitäten. Zur Quantifizierung von rhIL-11 auf Kohlenhydrat/ Mannitol Trägern wurden deshalb N1s Spektren aufgezeichnet. Weiterhin charakteristisch für das Protein ist der Schwefel aus der Aminosäure Methionin. Cystein ist in rhIL-11 nicht enthalten. Da der Schwefelanteil in rhIL-11 allerdings weniger als 0,1 Atomprozent beträgt, ist er für Quantifizierungen nicht geeignet.

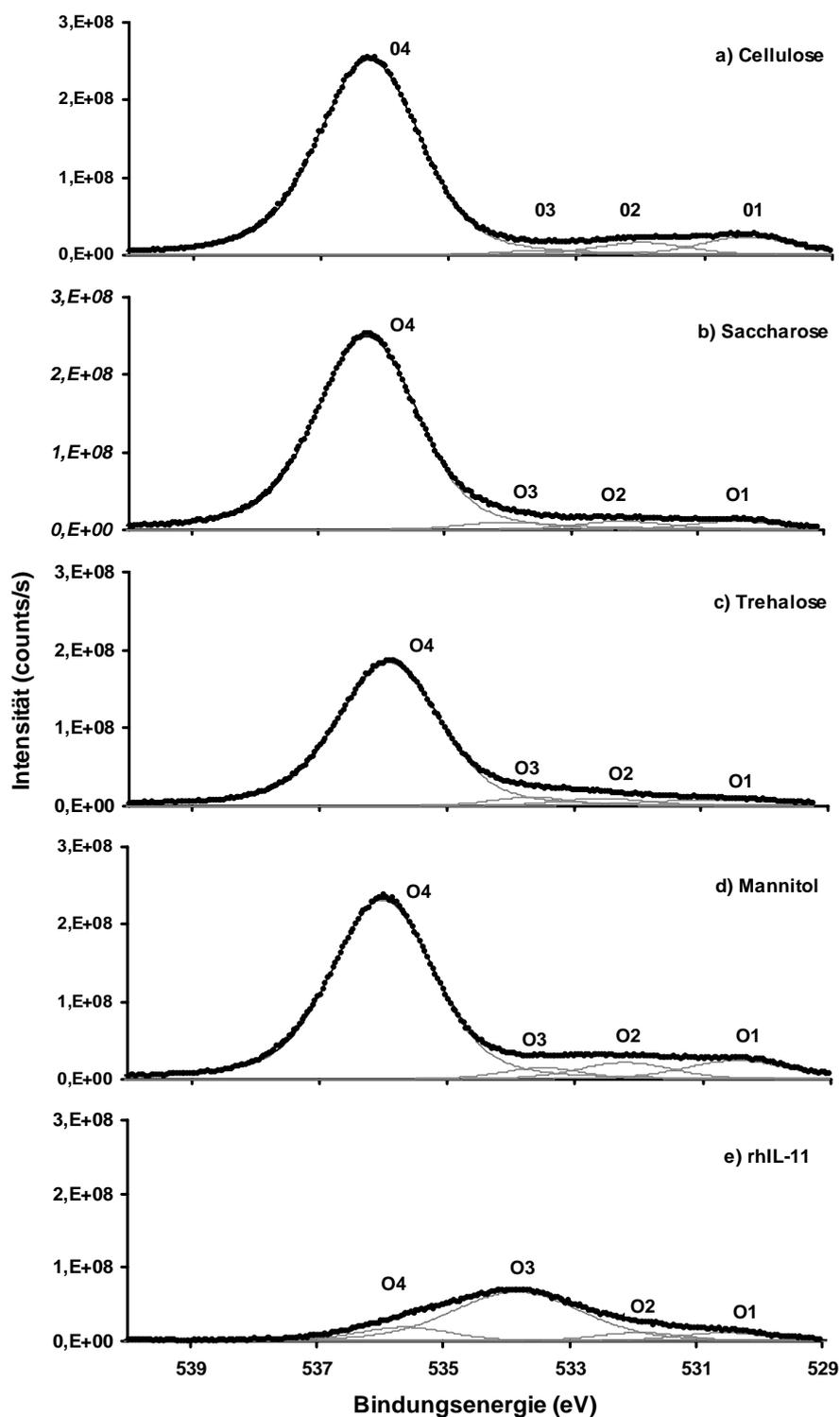


Abb. 4.4-2: O1s Spektren der Trägermaterialien und von rhIL-11. Die Komponenten sind um den Betrag der Aufladung der Probe (Tab. 4.4-2) zu höheren Bindungsenergien verschoben.

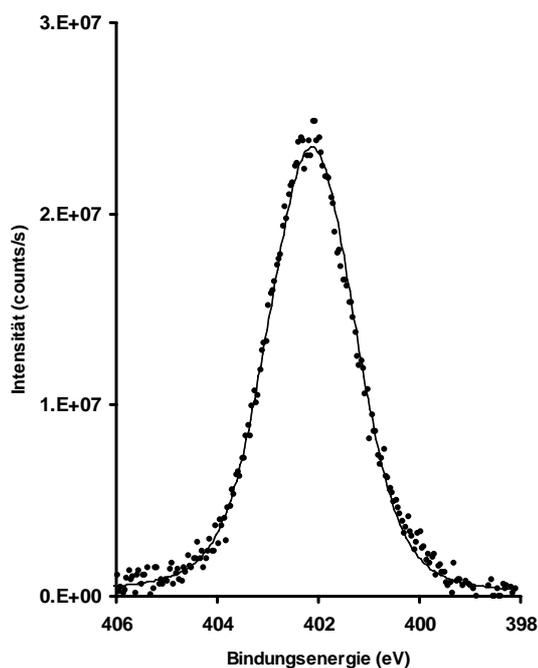


Abb. 4.4-3: N1s Spektrum von rhIL-11. Das Spektrum ist um den Betrag der Aufladung der Probe (Tab. 4.4-2) zu höheren Bindungsenergien verschoben.

4.4.2 XPS-ANALYSE VON RHIL-11 GECOATETEN TRÄGERN

Trägt man Sprühlösung in der Wirbelschicht auf einen Träger auf, so entstehen Produkte mit einer heterogenen Zusammensetzung (Kap 1.2). Beim Aufsprühen von 4mg/ml Proteinlösung auf einen unlöslichen Träger wie MCC Spheres, findet sich Protein in Abhängigkeit von der aufgetragenen Menge auf der Trägermaterialoberfläche wieder. In den XPS-Spektren hat die Komponente C3 (\underline{C} -0) der unbehandelten Cellulose maximale Intensität im Vergleich zur Kohlenstoffgesamtintensität (Abb. 4.4-4). Durch sukzessives Aufsprühen von Protein auf den Träger wird die Intensität der Komponente C3 schwächer und die der Komponente C2 stärker. Bei 60mg aufgetragenen Protein kommen die Intensitäten aller Kohlenstoffkomponenten ausschließlich vom Protein (Abb. 4.4-1e). Eine Korrelation zwischen der Intensität der Komponente C4 mit der Menge an aufgetragenen Protein ist in der Praxis nicht möglich, da dessen Intensität mit fortschreitenden Mengen an aufgetragenen Protein nicht systematisch zu- oder

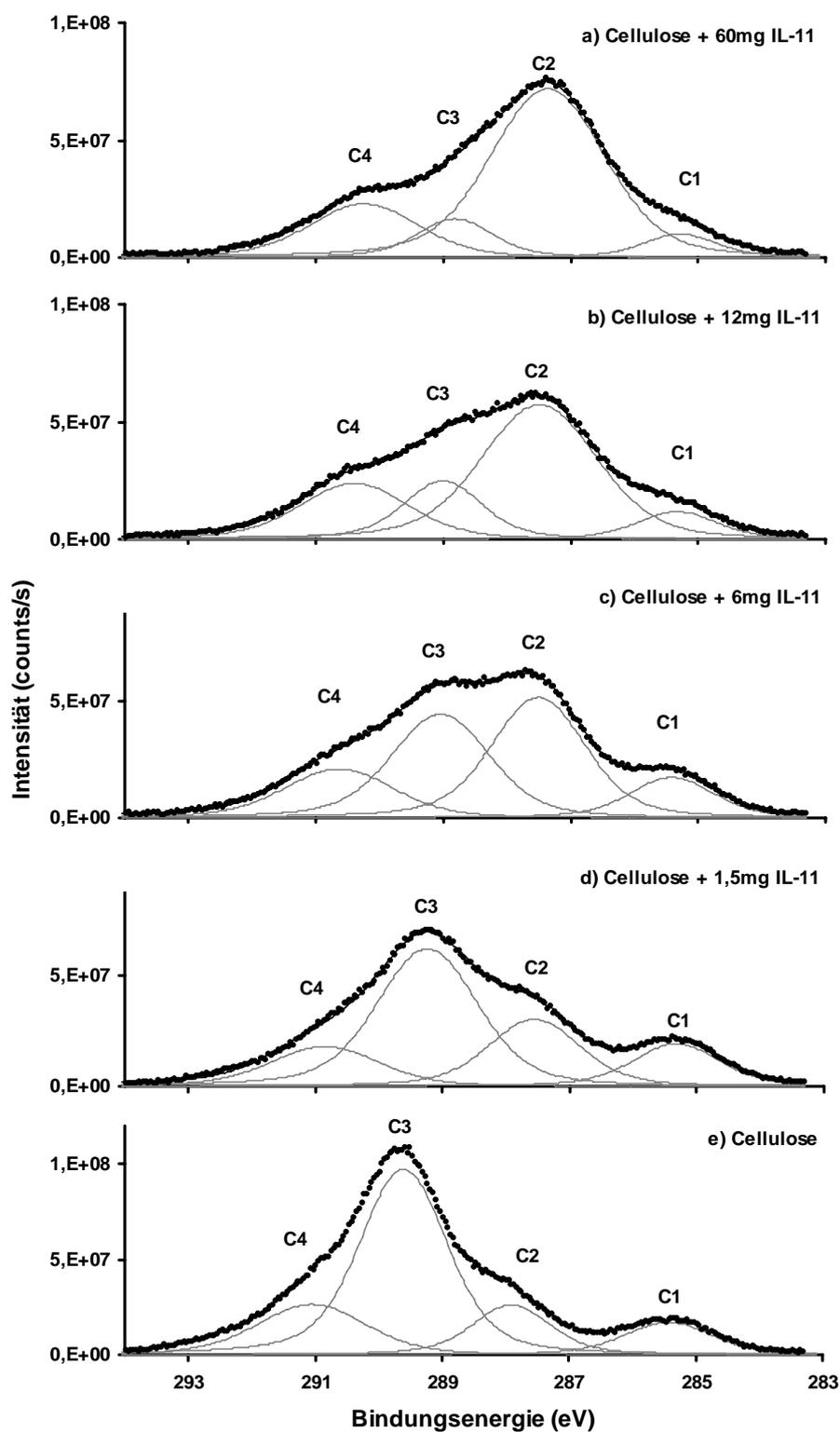


Abb. 4.4-4: C1s Spektren von Cellulose + rhIL-11. Die Komponenten C2 bis C4 sind um den Betrag der Aufladung der Probe (Tab. 4.4-2) zu höheren Bindungsenergien hin verschoben.

abnimmt. Betrachtet man die O1s Spektren (Abb. 4.4-5), nimmt die Intensität der O4 Komponente ausgehend von reiner Cellulose ab, während die Intensität der für die Peptidbindung des Proteins charakteristischen O3 Komponente ansteigt. Die Intensitäten des N1s Peak (Abb. 4.4-6) nehmen mit steigender Bedeckung zu. Die C1s, O1s und N1s Spektren des Proteins und des Produktes unterscheiden sich nach Auftragen von 60mg Protein praktisch nicht.

In Sprühlösungen mit 22,5mg/ml Trehalose zusätzlich zu 4mg/ml rhIL-11, ist der Feststoffanteil im Vergleich zu Sprühlösungen mit 4mg/ml rhIL-11 um den Faktor 6,625 erhöht. Durch den Zusatz von Trehalose stellt sich der endgültige Zustand der Oberflächenbelegung von MCC Spheres als Trägermaterial bereits beim Auftragen von vergleichsweise geringen Mengen an Sprühlösung ein. Das Protein liegt in solchen Produkten aufgrund des Zusatzes der Trehalose verdünnt vor. Da sich die Spektren von Cellulose und Trehalose praktisch nicht unterscheiden, sind die Spektren der Produkte mit Protein-Trehalose Sprühlösung mit denen von teilweise mit Protein bedeckten MCC-Produkten vergleichbar. Mit einer Auftragsmenge von 6mg/ 33,75mg Protein/ Trehalose sind die MCC Spheres bereits abgedeckt und es kommt mit weiterem Auftragen zu keiner weiteren Spektrenänderung (Abb. 4.4-7). Beim Aufsprühen von Proteinlösungen mit und ohne Trehalose auf lösliche Trägermaterialien wie Saccharose oder Mannitol, gehen Teile des Trägermaterials in Lösung. Durch Trocknung des gelösten Trägermaterials und gegebenenfalls der Trehalosezusätze aus der Sprühlösung, kommt es zu einer weiteren Verdünnung des Proteins. Die Spektren dieser Produkte sind von den Cellulosespektren mit Protein und Trehalose Zusätzen zur Sprühlösung praktisch nicht zu unterscheiden und werden deshalb nicht gezeigt. Bei Produkten in denen Zucker/ Mannitol als Sprühlösungszusatz und/ oder Trägermaterial zum Einsatz kommen findet man bei 397,6eV eine zweite Stickstoffkomponente (Abb. 4.4-9). In Spektren von reinem rhIL-11 kommt diese Komponente nicht vor (Abb. 4.4-3) und bei Celluloseprodukten deutet sie sich an (Abb. 4.4-6).

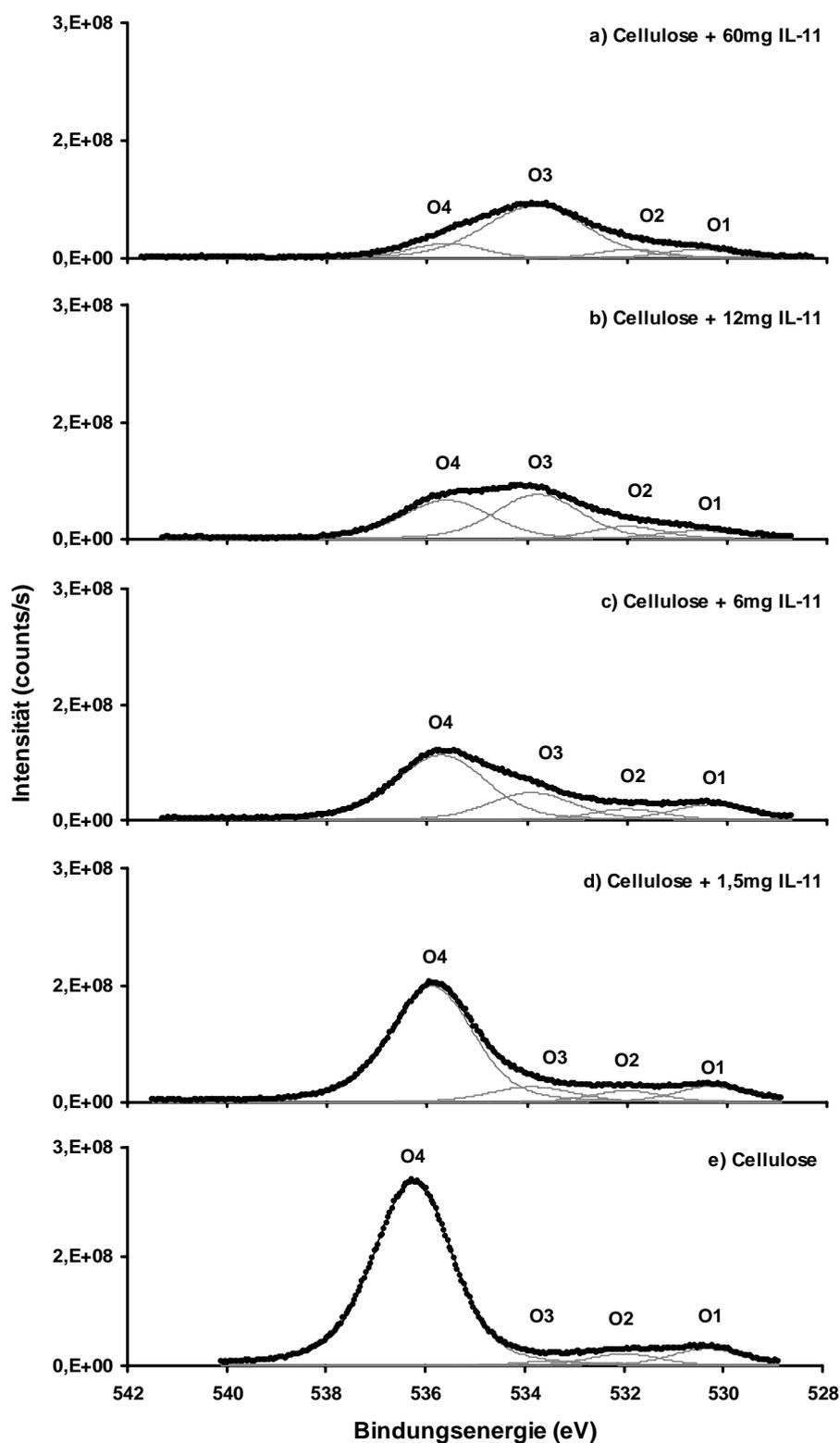


Abb. 4.4-5: O1s Spektren von Cellulose + rhIL-11. Die Komponenten sind um den Betrag der Aufladung der Probe (Tab. 4.4-2) zu höheren Bindungsenergien hin verschoben.

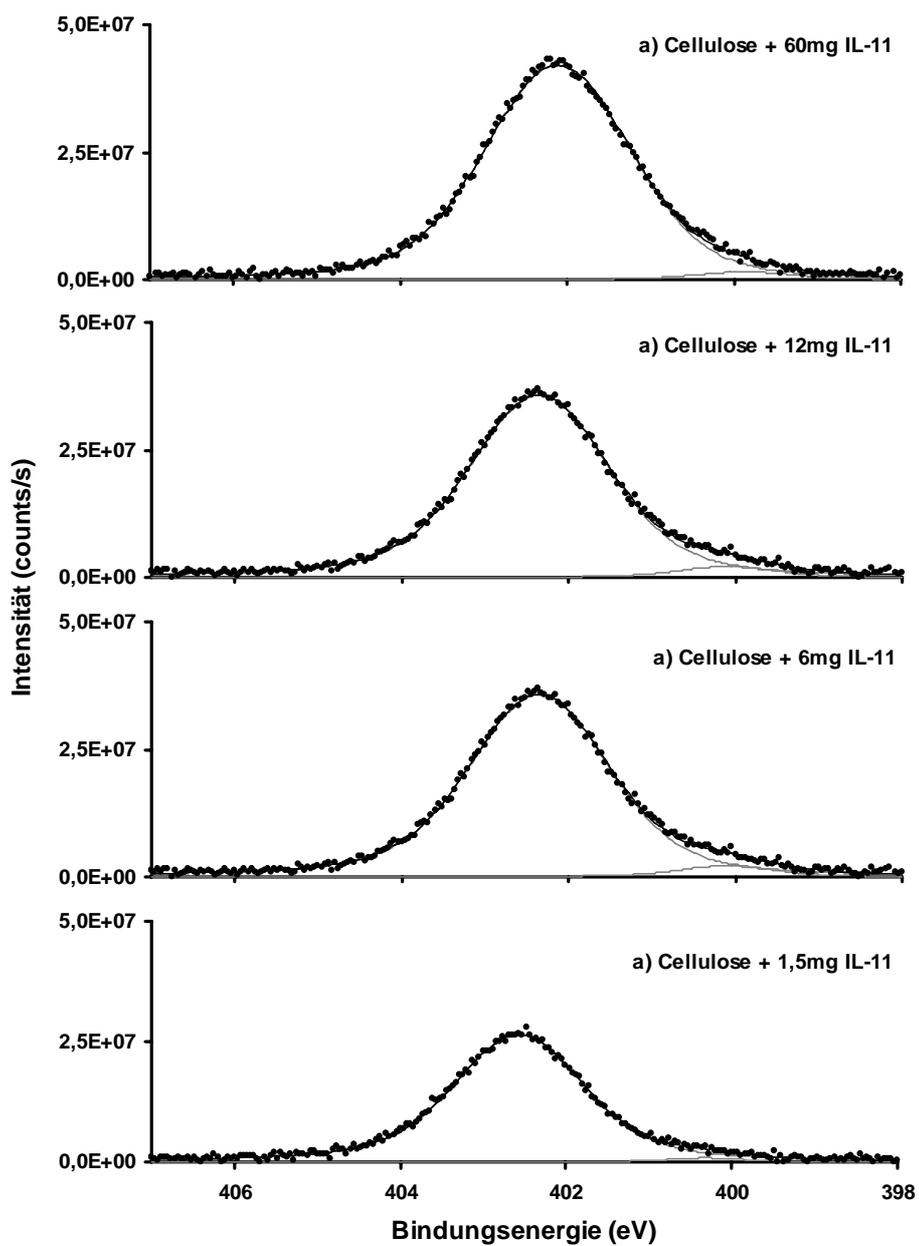


Abb. 4.4-6: N1s Spektren von Cellulose + rhIL-11. Komponente ist um den Betrag der Aufladung der Probe (Tab. 4.4-2) zu höheren Bindungsenergien hin verschoben.

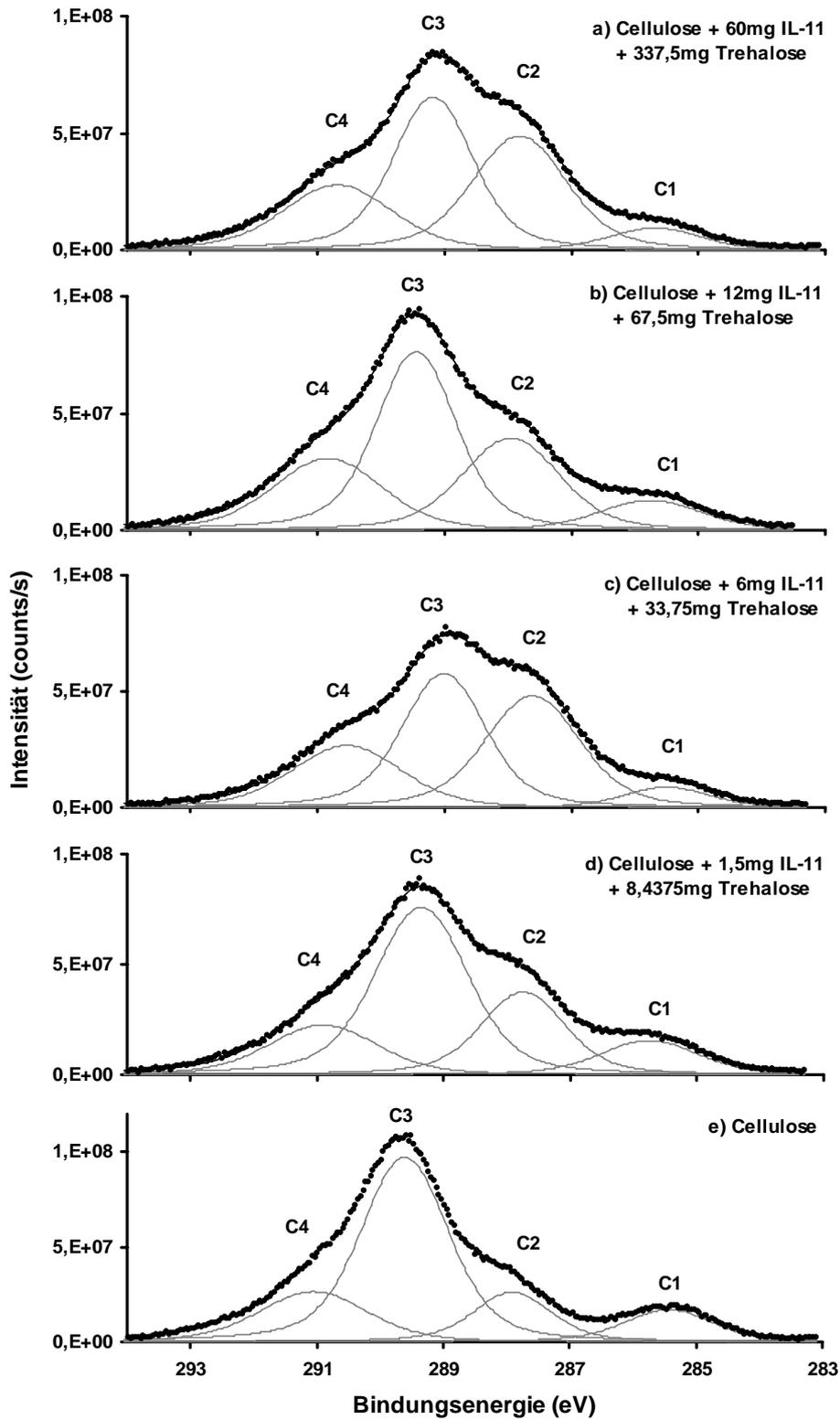


Abb. 4.4-7: C1s Spektren von Cellulose + rhIL-11 + Trehalose. Die Komponenten C2 bis C4 sind um den Betrag der Aufladung der Probe (Tab. 4.4-3) zu höheren Bindungsenergien hin verschoben.

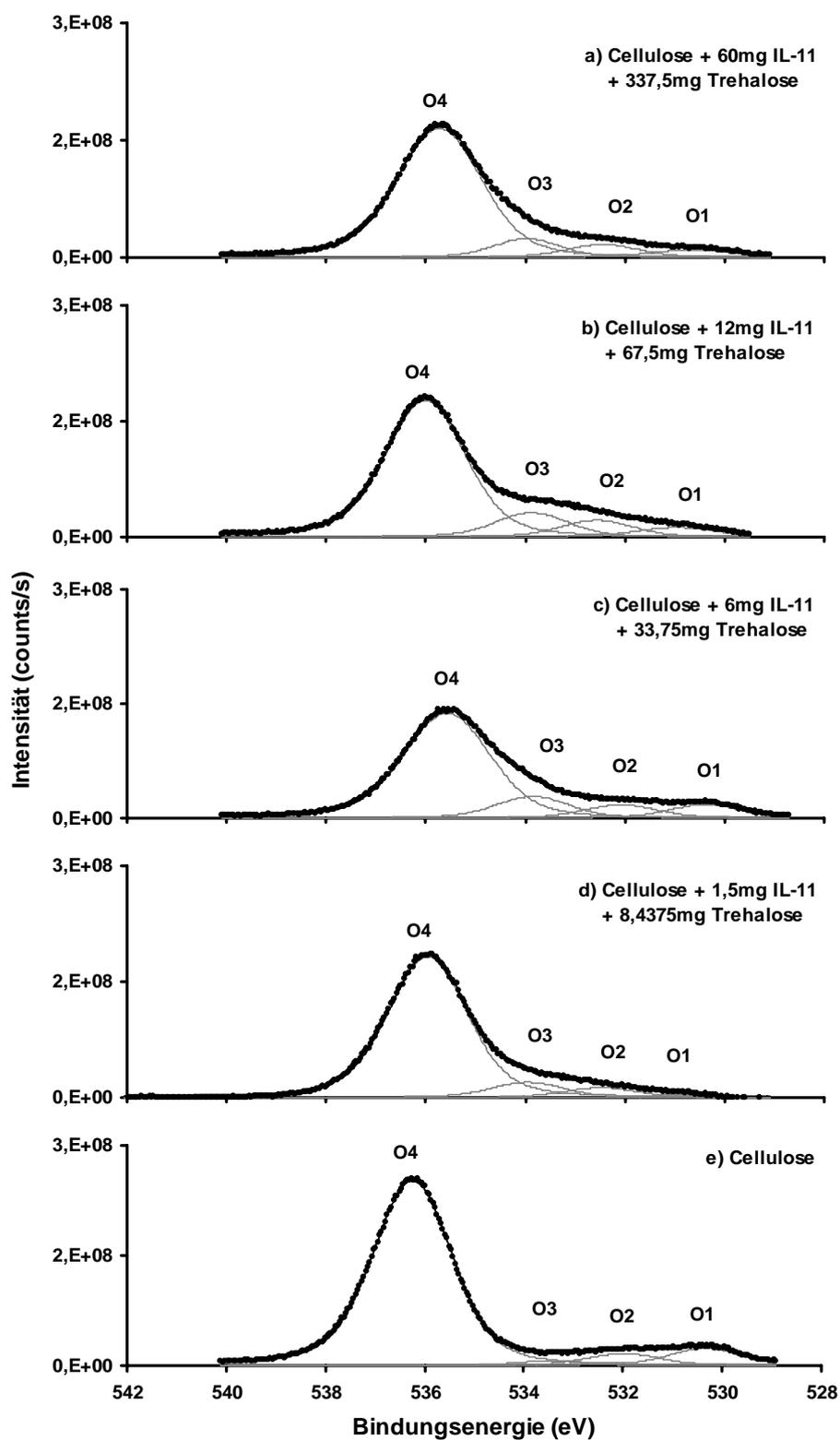


Abb. 4.4-8: O1s Spektren von Cellulose + rhIL-11 + Trehalose. Die Komponenten sind um den Betrag der Aufladung der Probe (Tab. 4.4-3) zu höheren Bindungsenergien hin verschoben.

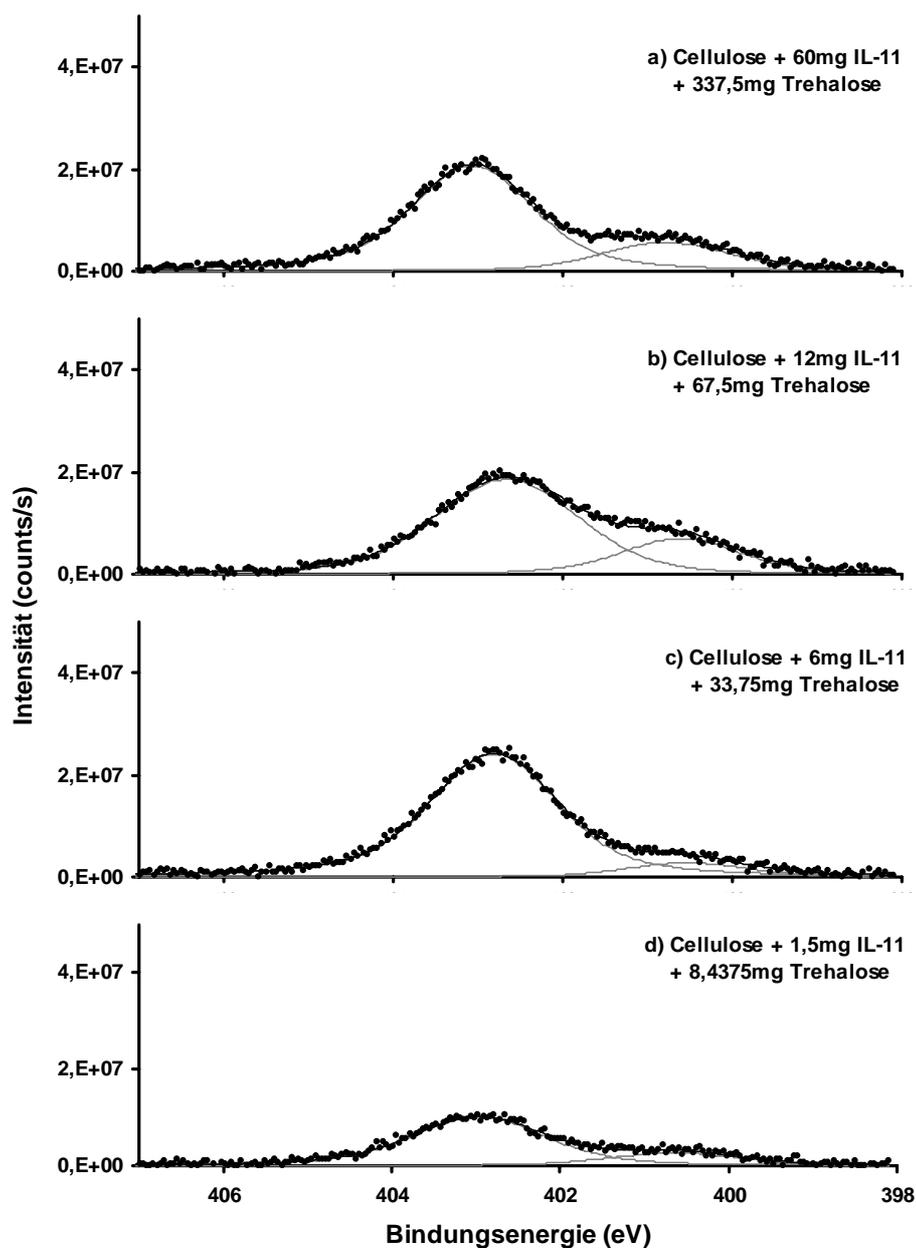


Abb. 4.4-9: N1s Spektren von Cellulose + rhIL-11 + Trehalose. Die Komponenten sind um den Betrag der Aufladung der Probe (Tab. 4.4-3) zu höheren Bindungsenergien hin verschoben. Die rechte Komponente im Spektrum resultiert wahrscheinlich aus einem Strahlenschaden.

Am stärksten ausgeprägt ist die Komponente in Mannitolprodukten und Mannitolprodukten mit Trehalose. In der NIST Datenbank findet man bei einer BE von 397,6eV die Carbamoyl-Funktionen (NIST; 2006). Die zweite Stickstoff Komponente lässt sich wahrscheinlich auf einen Strahlenschaden zurückführen (Tian et al.; 1982; Tanuma et al.; 2002). Durch den Beschuss der Probe mit Röntgenstrahlung und der daraus folgenden Emission von Elektronen kommt es zur Aufladung. Durch Reaktion zwischen einer Alkohol Funktion im Kohlenhydrat/ Mannitol und einer Amidfunktionen im Protein könnte es prinzipiell zur Umsetzung unter Urethanbildung kommen.

4.4.3 BELADUNG

Zur Ermittlung der Oberflächenbelegung mit Protein wurde für alle sechs Versuchsreihen die Beladung berechnet. Die Beladung ergibt sich aus dem geschätzten Oberflächenbedarf von rhIL-11 bzw. der rhIL-11 Matrix und wird in Schichten angegeben. Die räumliche Ausdehnung von rhIL-11 wurde mit Pymol Viewer 0.97 zu $45\text{\AA} \times 35\text{\AA} \times 35\text{\AA}$ bestimmt, was einem Volumen von 55130\AA^3 entspricht. Für die Belegung der Trägermaterialoberflächen wurde angenommen, dass sich rhIL-11 mit einem Flächenbedarf von $45\text{\AA} \times 35\text{\AA}$ anordnet und die Höhe einer aufgetragenen Schicht demnach 35\AA beträgt. Zwischen den einzelnen rhIL-11 Molekülen wurde der Platz näherungsweise als Null angenommen. Für Trehalose wurde der Raumbedarf in ISIS Draw 2.5 zu 350\AA^3 ermittelt. Der Gehalt an Natriumphosphatpuffer, welcher 3,6% der Masse von rhIL-11 beträgt, wurde für die Berechnung der Beladung vernachlässigt.

Tab. 4.4-4: Mittels BET ermittelte spezifische Oberflächen von Trägermaterialien

| Trägermaterial | BET-Oberfläche [m^2/g] |
|----------------|--|
| MCC-Spheres | 0,039 |
| Saccharose | 0,0175 |
| Mannitol | 0,65 |

Um die Gesamtoberfläche des Trägermaterials zu ermitteln, wurden BET-Messungen durchgeführt (Tab. 4.4-4). Aufgrund der geringen spezifischen Oberfläche der Trägermaterialien wurde Krypton als Messgas eingesetzt. Für MCC Spheres wurde die BET-Oberfläche zu $0,039 \text{ m}^2/\text{g}$ und die geometrische Oberfläche zu $0,0182 \text{ m}^2/\text{g}$ ermittelt. Der Unterschied um den Faktor zwei lässt sich durch die Oberflächenstruktur der MCC Spheres erklären, welche durch BET, nicht aber durch Berechnungen anhand geometrischer Kenndaten erfasst wird. Nach Auftragen von 1,5mg rhIL-11 auf MCC Spheres, sollte die mittels BET ermittelte Oberfläche des eingesetzten Trägermaterials mit 96% fast umhüllt sein (Tab. 4.4-5).

Tab. 4.4-5: Beladung von Trägermaterialien mit rhIL-11 auf Basis der mittels BET ermittelten Oberflächen (Beladungen der löslichen Trägermaterialien Saccharose und Mannitol in Klammern)

| Masse rhIL-11 aufgesprüht [mg] | Oberflächenbedarf aufgesprühte Masse rhIL-11 [m^2] | Beladung auf 20g Träger [Schichten] | | |
|--------------------------------|---|-------------------------------------|------------|----------|
| | | Cellulose | Saccharose | Mannitol |
| 1,5 | 0,745 | 0,96 | (2,13) | (0,06) |
| 6 | 2,98 | 3,82 | (8,5) | (0,23) |
| 12 | 5,96 | 7,64 | (17) | (0,46) |
| 60 | 28,8 | 36,9 | (82,3) | (2,22) |

Bei Einsatz von Sprühlösungen mit 1,5mg rhIL-11 und 8,4735mg Trehalose, beträgt die Beladung 2,87 (Tab. 4.4-6). Die vollständige Bedeckung mit einer Lage ist hier aufgrund des höheren Feststoffanteils der Sprühlösung schneller erreicht. Für Saccharose wurde ein BET-Wert von $0,0175 \text{ m}^2/\text{g}$ ermittelt. Der hohe BET-Oberflächen Wert für Mannitol von $0,65 \text{ m}^2/\text{g}$ im Vergleich zu MCC Spheres und Saccharose bei vergleichbarer Teilchengrößenverteilung lässt sich durch eine sehr große innere Oberfläche mit sehr kleinen Poren erklären. Das eingesetzte Mannitol, welches durch Schmelzextrusion hergestellt wird, weist viele Poren auf. Bei Poren die kleiner als das Protein, aber größer als ein Krypton Atom sind, kann die BET-Oberfläche nicht als die für das Protein

wirksame Oberfläche betrachtet werden. Durch das Aufsprühen der Proteinlösung auf die wasserlöslichen Träger Mannitol und Saccharose kommt es weiterhin zum Anlösen oberflächennaher Schichten, die für das Protein wirksame Oberfläche ändert sich somit im Verlauf des Prozesses. Die Berechnungen zur Beladung der löslichen Trägermaterialien mit Protein sind deshalb nur von theoretischer Bedeutung. Im Folgenden sollen die für die Beladung ermittelten Werte zusammen mit den auf XPS Untersuchungen basierenden Werten für die Bedeckung herangezogen werden, um ein tieferes Verständnis für die Oberflächenbelegung der Produkte zu erlangen.

Tab. 4.4-6: Beladung von Trägermaterialien mit rhIL-11/Trehalose. (Beladungen der löslichen Trägermaterialien Saccharose und Mannitol in Klammern)

| Masse rhIL-11/ Trehalose aufgesprüht [mg] | Oberflächenbedarf aufgesprühte Masse rhIL-11/ Trehalose [m ²] | Beladung auf 20g Träger [Schichten] | | |
|---|---|-------------------------------------|------------|----------|
| | | Cellulose | Saccharose | Mannitol |
| 1,5/ 8,4375 | 2,235 | 2,87 | (6,39) | (0,17) |
| 6/ 33,75 | 8,94 | 12 | (33) | (2,5) |
| 12/ 67,5 | 17,88 | 23 | (66) | (5) |
| 60/ 337,5 | 86,4 | 111 | (316) | (24) |

4.4.4 BERECHNUNG DER BEDECKUNG AUF BASIS DER XPS ANALYSEN

Anhand des Intensitätsverhältnis einer Spezies X1, die nur im Protein vorkommt, zu einer Spezies X2, die sowohl im Protein als auch im Träger vorkommt, kann mit dem Turmmodell (Gl. 4.4-1) die Bedeckung f (Gl. 4.4-2) des Trägermaterials ermittelt werden. Die Beladung wurde im Unterschied zur Bedeckung f unabhängig von den mittels XPS ermittelten Intensitäten bestimmt (Kap. 4.4.3). Beim Turmmodell wird davon ausgegangen, dass die proteinhaltige Schicht auf dem Träger nicht kohärent ist, sondern in Form von mehrschichtigen Türmen über die Trägeroberfläche verteilt vorliegt (Kap. 1.2). Da das Modell keine Tiefenauflösung berücksichtigt, erhält man unabhängig von der Höhe der Türme bei einer vollständigen Bedeckung des Trägermaterials

den Wert 1. In Verbindung mit der Beladung (Tab. 4.4-5/ Tab. 4.4-6), kann eine mittlere Turmhöhe berechnet werden (Tab. 4.4-7), die sich als Quotient aus Beladung, geteilt durch die Bedeckung ergibt. Bei Experimenten mit Zuckermatrix oder löslichen Trägermaterialien ist die Angabe einer Turmhöhe von rhIL-11 nicht sinnvoll, da das Protein von einer Zucker/ Mannitol Matrix umgeben ist.

$$\frac{I_{X_1}}{I_{X_2}} = \frac{f * I_{X_1}^P}{f * I_{X_2}^P + (1-f)I_{X_2}^T}$$

Gl. 4.4-1: Turmmodell
f = Bedeckung ($0 \leq f \leq 1$)

$$f = \frac{1}{1 + \frac{I_{X_2}^P}{I_{X_2}^T} \left(\frac{I_{X_1}^P}{I_{X_2}^P} * \frac{I_{X_2}^T}{I_{X_1}^T} - 1 \right)}$$

Gl. 4.4-2: Turmmodell nach der Bedeckung f aufgelöst

Tab. 4.4-7: MCC Spheres + rhIL-11: Bedeckung, Beladung und mittlere Turmhöhe in Abhängigkeit der aufgetragenen rhIL-11 Menge

| rhIL-11 aufgetragen [mg] | Bedeckung [Schichten] | Beladung [Schichten] | mittlere Turmhöhe [Schichten] | mittlere Turmhöhe [Å] |
|--------------------------|-----------------------|----------------------|-------------------------------|-----------------------|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1,5 | 0,27 | 0,96 | 3,6 | 126 |
| 6 | 0,61 | 3,82 | 6,2 | 217 |
| 12 | 0,89 | 7,64 | 8,5 | 298 |
| 60 | 1 | 36,9 | 36,9 | 1292 |

Mit dem Lagenmodell lässt sich die Beladung mit Proteinlagen abschätzen, wobei die Tiefenauflösung der XPS Technik berücksichtigt wird. Um die Auswertung nicht zu kompliziert zu gestalten, werden die Annahmen gemacht, dass q (Gl. 4.4-3) für Fotoelektronen aus Kohlenstoff-, Sauerstoff- und Stickstoff-

atomen (Tanuma et al.; 1994) gleich ist und dass sich das Protein beim Auftragen in der Wirbelschicht lagenweise anordnet. Erst wenn eine Lage aufgefüllt ist, wird die Nächste begonnen. Das Intensitätsverhältnis einer Spezies X_1 , die nur im Protein vorkommt, zu einer Spezies X_2 , die sowohl im Protein als auch im Träger vorkommt, kann unter diesen Annahmen benutzt werden, um die Anzahl der Proteinlagen auf dem Träger zu berechnen. Liegt ein Proteinüberzug der Dicke n, a vor, d.h. n geschlossene Lagen und eine begonnene Lage der

Größe a ergibt sich ein Intensitätsverhältnis $\frac{I_{X_1}}{I_{X_2}}$ gemäß Gl. 4.4-4.

$$q = e^{-\frac{d}{\lambda \cdot \cos \theta}}$$

- Gl. 4.4-3: d = Dicke einer Schicht (hier 35Å)
 λ = inelastische mittlere freie Weglänge (Mittelwert aus λ für Kohlenstoff, Sauerstoff und Stickstoff; hier 26,8Å)
 θ = Abweichung der Detektion von der senkrechten zur Oberfläche (hier 20°)

$$\frac{I_{X_1}}{I_{X_2}} = \frac{I_{X_1}^P}{I_{X_2}^P} \cdot \frac{1 - q^n + a(1 - q)q^n}{1 - q^n + a(1 - q)q^n + \frac{I_{X_2}^T}{I_{X_2}^P}(1 - a)q^n + a \cdot q^{n+1}}$$

- Gl. 4.4-4: Lagenmodell:
 n = Bedeckung (Schichten)
 a = Grad der Bedeckung durch angefangene Lage (($0 \leq a \leq 1$))
 $I_{X_1}^P$ = Intensität Atom/ Spezies X_1 von reinen rhIL-11
 $I_{X_2}^T$ = Intensität Atom/ Spezies X_2 des reinen Trägermaterials
 $I_{X_2}^P$ = Intensität Atom/ Spezies X_2 von reinen rhIL-11
 I_{X_1} = Intensität Atom /Spezies X_1 des Protein-/Matrix bedeckten Trägers
 I_{X_2} = Intensität Atom /Spezies X_2 des Protein-/Matrix bedeckten Trägers

Anhand von Gleichung Gl. 4.4-5 kann berechnet werden, wieviele ganzzahlige Lagen n vorliegen. Die Nachkommastelle a erhält man durch Einsetzen des berechneten Wertes für n in Gl. 4.4-4. Da mit dem Lagenmodell nur abgeklärt

werden soll, wie genau eine Behandlung der Daten unter Vernachlässigung der Tiefenauflösung der XPS Experimente ist, wird nur der Fall für Bedeckungen kleiner eine Lage betrachtet (Gl. 4.4-6). Bedeckungen a (Gl. 4.4-5), die mit dem Lagenmodell und Bedeckungen f , die mit dem Turmmodell (Gl. 4.4-1) erhalten werden, stehen über die Größe q (Gl. 4.4-1) in Beziehung (Gl. 4.4-7). Für den vorliegenden Fall von q gleich 0,25, erhält man bei Turmhöhen von 1 mit dem Lagenmodell um den Faktor 1,33 höhere Bedeckungen. Bei Turmhöhen von 2 Lagen, geht die Größe q zum Quadrat in Gl. 4.4-7 ein. Ergebnisse für die Bedeckung sind dann bei Nichtberücksichtigung der Tiefenauflösung nur noch um den Faktor 1,07 höher. Da auf Grundlage der Beladung berechnete Turmhöhen 3,6 Lagen oder mehr Lagen groß sind (Tab. 4.4-7), kann das Turmmodell in allen Versuchen zur Auswertung herangezogen werden.

$$n = \frac{\ln \frac{\frac{I_{X_1}^P}{I_{X_2}^P} - \frac{I_{X_1}}{I_{X_2}}}{\frac{I_{X_1}^P}{I_{X_2}^P} + \left(\frac{I_{X_2}^T}{I_{X_2}^P} - 1 \right) \cdot \frac{I_{X_1}}{I_{X_2}}}}{\ln q}$$

Gl. 4.4-5: Lagenmodell: Berechnung der Lagen n

$$a = \frac{1}{(1-q) * \left[1 + \frac{I_{X_2}^P}{I_{X_2}^T} \left(\frac{I_{X_1}^P}{I_{X_2}^P} * \frac{I_{X_2}}{I_{X_1}} - 1 \right) \right]}$$

Gl. 4.4-6: Berechnung von f für $n=0$

$$a = \frac{1}{1-q} * f$$

Gl. 4.4-7: Zusammenhang Bedeckungen mit und ohne Berücksichtigung der Tiefenauflösung

In unabhängig voneinander durchgeführten Messungen können durch Positionierfehler der Probe oder durch Schwankungen der Intensität der Röntgenquelle Spektren mit unterschiedlicher Gesamtintensität erhalten werden. Mit Hilfe von absoluten Intensitäten lassen sich Bedeckungen berechnen, Positionierfehler und Schwankungen der Intensität machen sich im Ergebnis allerdings bemerkbar. Beim Vergleich von relativen Intensitäten, heben sich Positionierfehler bzw. Intensitätsschwankungen gegeneinander auf, weshalb die Auswertung anhand von relativen Intensitäten erfolgen sollte. Ein geeigneter Ansatz zur Berechnung der Bedeckung gewährleistet, dass sich Schwankungen des absoluten Messwertes nicht in einer zu starken Schwankung in der berechneten Bedeckung niederschlagen. Zur Berechnung der Bedeckung wurde in den Modellen neben dem Intensitätsverhältnis, für das in der Wirbelschicht gecoatete Produkt I_{X_1} und I_{X_2} , das Intensitätsverhältnis des reinen Proteins $I_{X_2}^P$ und $I_{X_1}^P$ und die absolute Intensität des unbehandelten Trägermaterials $I_{X_2}^T$ herangezogen. Für Abweichungen des Messwertes des Trägermaterials X_2 um $\pm 10\%$, erhält man nach Einsetzen in die Modelle Abweichungen in der berechneten Bedeckung von maximal $\pm 6,7\%$ für ermittelte Werte der Bedeckung von 0,27 bzw. 0,35. Bei höheren Werten für die Bedeckung, fällt die Abweichung deutlich geringer aus. Die verwendeten Modelle zur Berechnung der Bedeckung können somit als robust gegenüber Schwankungen von X_2 angesehen werden. Die Intensitätsverhältnisse IV1 bis IV5 liefern, wie am Beispiel des Turmmodells aufgezeigt annähernd gleiche Ergebnisse für die bedeckte Fläche (Abb. 4.4-10). Mit Hilfe von IV4 wird die bedeckte Fläche nur aufgrund von O1s Intensitäten berechnet. Dies ist möglich, da die Komponente O3 für das Protein charakteristisch ist. Das C1s Spektrum enthält keine für das Protein charakteristische Spezies, weshalb eine Berechnung nur aufgrund von C1s Spezies unmöglich ist. Eine prinzipielle Ungenauigkeit einer Berechnung auf Basis von IV1 besteht darin, dass ein unbestimmter Teil der Intensität der C2 Komponente aus atmosphärischen Kohlenstoffverunreinigungen stammt. In Modellen, in denen Intensitäten von Sauerstoff zur Berechnung herangezogen werden, werden Bedeckungen auf Basis vergleichsweise kleiner Änderungen in den Intensitäten be-

rechnet. Zufällige Fehler machen sich hier stärker bemerkbar. Dieses Problem tritt verstärkt beim Einsatz von löslichen Zuckern auf, da hier vergleichsweise geringere Proteinkonzentrationen an der Oberfläche erwartet werden.

Tab. 4.4-8: Intensitätsverhältnisse (IV) zur Berechnung der bedeckten Fläche/ Bedeckung

| IV (I_{X1}/I_{X2}) | X ₁ (Fläche) | X ₂ (Fläche) |
|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| IV 1 | N(N1s) | C(C2+C3+C4) |
| IV 2 | N(N1s) | O(O3+O4) |
| IV 3 | N(N1s) | OH(O4) |
| IV 4 | OII(O3) | OH(O4) |
| IV 5 | N(N1s) | <u>C</u> -OH(C3) |

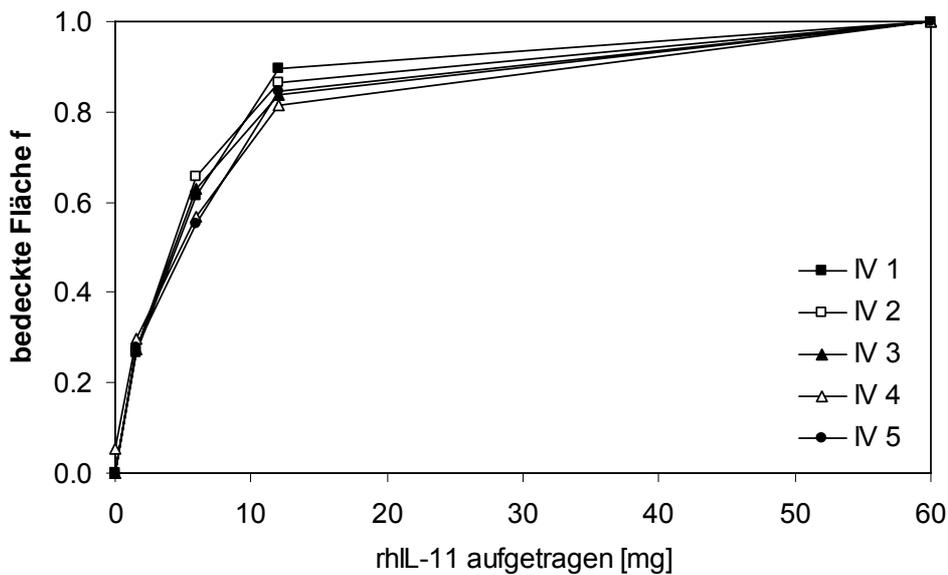


Abb. 4.4-10: Bedeckte Fläche f von MCC Spheres in Abhängigkeit der aufgetragenen rhIL-11 Menge (ohne Trehalose). Berechnungen der bedeckten Fläche f mit dem Turmmodell auf Basis verschiedener Intensitätsverhältnisse IV (Tab. 4.4-7)

4.4.5 AUSWERTUNG DER MODELLE

Turm- und Lagenmodell gehen von verschiedenen Annahmen über die Art der Belegung des Trägermaterials aus. Die tatsächliche Bedeckung ist zwischen den Werten zu erwarten, die beide Modelle liefern. Dem Lagenmodell liegt die Annahme zugrunde, dass erst eine weitere Lage begonnen wird, wenn die vorherige Lage abgeschlossen ist. Abweichungen zwischen Lagenmodell und der Beladung, können durch teilweise Anordnung der Proteine in Türmen und durch Proteinverluste während des Prozesses erklärt werden. Abweichungen aufgrund der Beladung können durch die tatsächlich für das Protein wirksamen Oberfläche im Vergleich zu der mit BET gemessenen Oberfläche erklärt werden (Kap 4.4.3). Mit dem Auftragen steigender Mengen rHL-11, weicht beim Lagenmodell die Bedeckung immer weiter von der Beladung ab. Je mehr Schichten aufgetragen sind, desto geringer sind die Intensitätszunahmen, die aus dem Auftragen einer weiteren Schicht resultieren. Intensitäten aus den Schichten erhöhen sich zwischen 1 und 2 aufgetragenen Lagen um 20%, zwischen 3 und 4 Lagen um 1% und zwischen 5 und 6 Lagen um 0,1%. Theoretisch vorhandene, sehr kleine Intensitätszunahmen, werden durch zufällige Schwankungen in der Intensität eines Messwertes überdeckt. Das Modell ist deshalb prinzipiell nicht geeignet, bei Auftragen größerer Mengen Protein, die Anzahl der Schichten korrekt wiederzugeben. Das Lagenmodell ergibt selbst bei theoretisch sehr hohen Bedeckungen von 37 (Gl. 4.4-5) nur Schichtdicken von kleiner 2 oder gar kein Ergebnis. Kein Ergebnis wird erhalten, wenn der Ausdruck in der Klammer des Zählers von Gl. 4.4-5 bedingt durch die Schwankungen des Messwertes Null oder negative Wert annimmt. Das Lagenmodell ist deshalb nur beim Auftragen geringer Proteinmengen sinnvoll anwendbar. Bei MCC Spheres Produkten lässt es sich bis zu Auftragen von 6mg rHL-11 anwenden. In Versuchen mit 22,5mg/ml Trehalosezusätzen zur Sprühlösung und bei Einsatz löslicher Trägermaterialien ist das Protein in eine Matrix eingebettet. Zur Auswertung wurde in diesen Fällen ausschließlich das Turmmodell herangezogen. Da das Protein nicht in Form von Türmen, sondern eingebettet in eine Zuckermatrix vorliegt,

erhält man als Lösung nicht die Bedeckung, sondern den Proteinanteil der Matrix in der obersten Lage.

Tab. 4.4-9: rhIL-11 auf MCC Spheres aufgetragen (ohne Trehalose): Beladung und Bedeckung anhand der Modelle

| rhIL-11 aufgetragen [mg] | Beladung | Turmmodell (bedeckte Fläche f) | Lagenmodell (Bedeckung n,a) |
|--------------------------|----------|--------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 1,5 | 0,96 | 0,27 | 0,35 |
| 6 | 3,82 | 0,61 | 0,82 |
| 12 | 7,64 | 0,89 | 1,48 |
| 60 | 36,90 | 1,00 | |

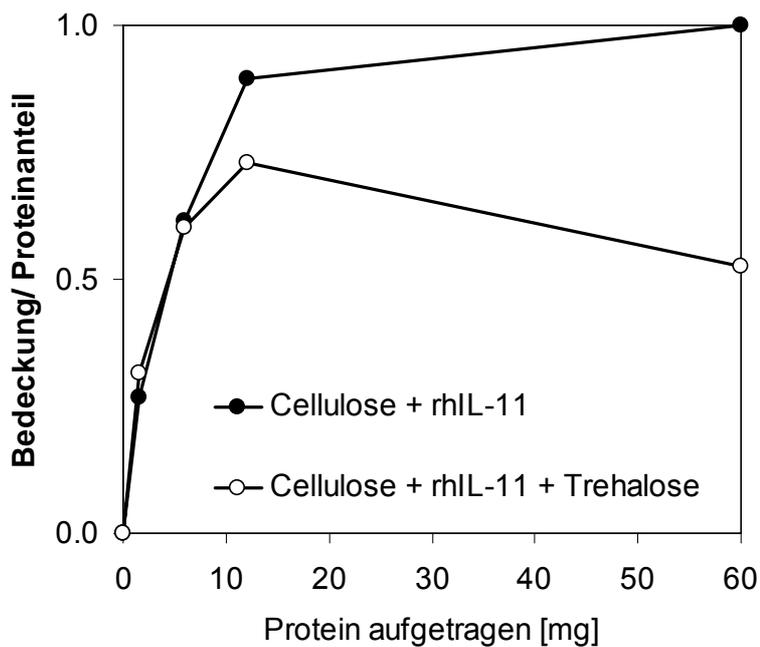


Abb. 4.4-11: Turmmodell: Bedeckung/ Proteinanteil MCC Spheres rhIL-11 (mit und ohne Trehalose)

Vergleicht man MCC Spheres Produkte mit MCC Spheres Produkten mit Trehalose (Abb. 4.4-11), ist die Bedeckung bzw. der Proteinanteil an der Oberfläche bis zum Auftragen von 6mg rhIL-11 vergleichbar. In MCC Spheres Produkten (ohne Trehalose) steigt die Bedeckung mit Auftragen von 12mg und 60mg bis

auf den Wert der vollen Bedeckung mit Protein an. In MCC Spheres Produkten mit Trehalose ist der Anstieg des Proteinanteils an der Oberfläche nach Auftragen von 12mg rhIL-11 geringer als in MCC Spheres Produkten. Die Schwankung in MCC Spheres Produkten mit Trehalose zwischen 6 und 60mg aufgetragenen rhIL-11 werden als zufällig betrachtet. Geht man davon aus, dass sich rhIL-11 wie in einer physikalischen Mischung statistisch verteilt, beträgt der Proteinanteil in MCC Spheres Produkten mit Trehalose 0,33. Im Vergleich dazu liegt der gemessene Wert bei 0,53. Es kommt somit in den MCC Spheres Produkten mit Trehalose zur bevorzugten Anreicherung des Proteins an der Oberfläche.

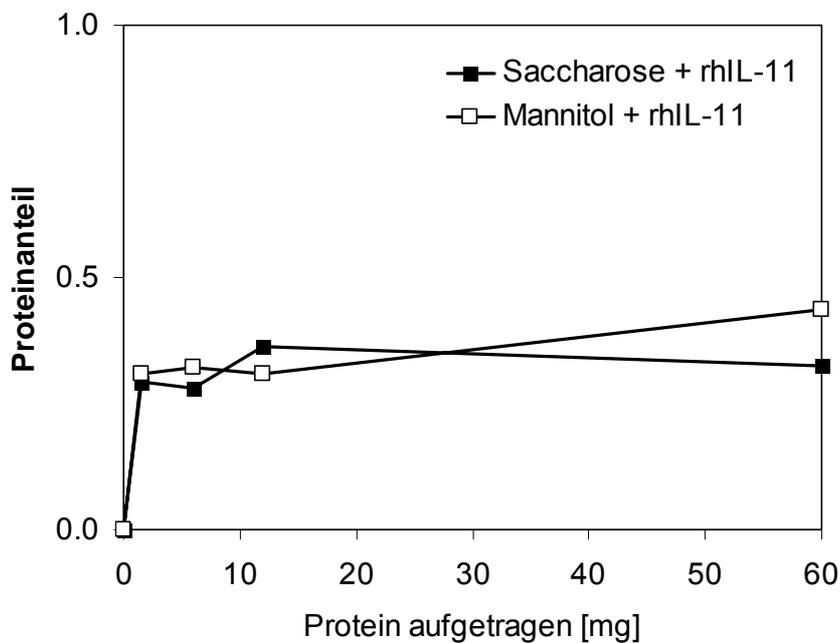


Abb. 4.4-12: Turmmodell: Proteinanteil Saccharose und Mannitol

Beim Einsatz der löslichen Trägermaterialien Saccharose und Mannitol ohne Zusatz von Trehalose zur Sprühlösung findet man nach Auftragen von 1,5mg Protein gleiche Proteinanteile wie in MCC Spheres Produkten und in MCC Spheres Produkten mit Trehalose an der Oberfläche (Abb. 4.4-12).

Beim Auftragen weiterer Sprühlösung bleibt der Proteinanteil an der Oberfläche nahezu konstant. Während des Auftragens werden immer wieder partielle Mengen Zucker gelöst, die dann in einer Zucker/ Proteinmatrix mit vergleichbarer Bedeckung der Oberfläche mit Protein erstarren.

Beim Einsatz der löslichen Trägermaterialien Saccharose und Mannitol in Verbindung mit 22,5mg/ml Trehalose Zusätzen zur Sprühlösung wird eine mit dem Auftragen von 60mg rhIL-11/ 337,5mg Trehalose auf MCC Spheres, vergleichbare Bedeckung der Oberfläche erhalten (Abb. 4.4-13).

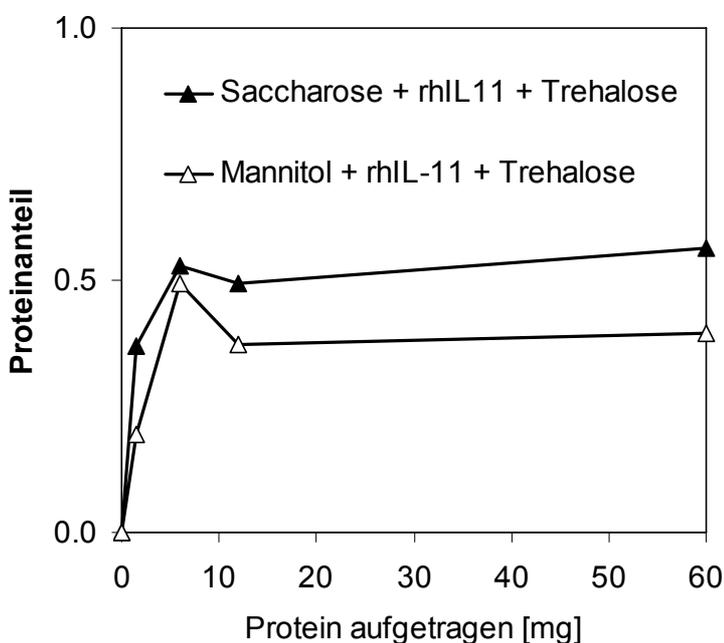


Abb. 4.4-13: Turmmodell: Proteinanteil Saccharose und Mannitol (mit Trehalose)

Produkte mit Trehalosezusatz zur Sprühlösung laufen unabhängig von den untersuchten Trägermaterialien mit dem Auftragen steigender Mengen rhIL-11/ Trehalose auf vergleichbare Werte für die Bedeckung zu. Beim Auftreffen von Protein-/ Trehalosehaltigen Tropfen kommt es zum Anlösen des Trägermaterials, das Protein wird beim Trocknen in eine Matrix aus Saccharose/ Trehalose bzw. Mannitol/ Trehalose eingebettet. Mit dem Auftragen steigender Mengen Sprühlösung kann davon ausgegangen werden, dass der Anteil des löslichen Trägermaterials an der Oberflächenzusammensetzung in Produkten mit Trehalose

losezusatz immer weiter abnimmt. Der geringere Proteinanteil an der Oberfläche von Saccharoseprodukten im Vergleich zu Saccharoseprodukten mit Trehalose bietet eine mögliche Erklärung für die bessere Stabilisierung von rhIL-11 in Saccharoseprodukten ohne Trehalosezusatz (Kap 4.3).

Eine Berechnung der mittleren Turmhöhe von rhIL-11 wurde mit dem Turmmodell für MCC Spheres durchgeführt (Tab. 4.4-7). Da dem Turmmodell die Annahme zugrunde liegt, dass sich das Protein vorzugsweise in Türmen und nicht in Lagen anordnet, sind Werte für die berechnete mittlere Turmhöhe als Obergrenze der tatsächlichen Turmhöhe zu sehen. Verluste der Sprühlösung während des Prozesses führen zu einer weiteren Reduzierung der tatsächlichen Turmhöhe bzw. Schichtdicke des Überzugs. Nach Auftragen von 60mg rhIL-11, beträgt die Höhe der aufgetragenen Schicht gemäß Turmmodell rund 1300Å. Dies ist in etwa 100mal kleiner als der Durchmesser eines Sprühtropfens bei einem Standard Sprühdruk von 0,5bar und einer Standard Sprührate von 0,36g/min. Bei MCC Spheres Produkten mit Trehalose ergeben sich anhand der Beladung nach Auftragen von 60mg rhIL-11/ 337,5mg Trehalose 111 Schichten, was einer Schichtdicke von rund 3900Å entspricht. In MCC Produkten die im Rahmen der Stabilitätsuntersuchungen (Kap. 4.3) hergestellt wurden ergeben sich vergleichbare Schichtdicken. Es kann davon ausgegangen werden, dass bei der Herstellung dieser Produkte Sprühtropfen welche auf die Oberfläche treffen in jedem Stadium des Prozesses alles in ihrer Umgebung aufgetragene und getrocknete Protein wieder auf- bzw. anlösen können.

4.4.6 ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden XPS Spektren von rhIL-11, Trehalose, den Trägermaterialien und den Produkten aufgezeichnet. Nach Identifizierung der Komponenten von C1s und O1s Spektren wurde nach Dekonvolution eine quantitative Auswertung der Komponenten/ Spektren vorgenommen. Es konnte gezeigt werden, dass die Komponente O3 im O1s Spektrum neben dem N1s Spektrum, welches ebenfalls aufgezeichnet wurde, für das Protein spezifisch ist. Zur Ermittlung der Oberflächenbelegung mit Protein wurde die Beladung berechnet. Dazu wurde der

Oberflächenbedarf/ räumliche Ausdehnung von rhIL-11 mittels 3D-Darstellung am Computer und die Oberfläche der Trägermaterialien mittels BET Messung bestimmt. Unter Einbeziehung der Ergebnisse der Beladung konnte anhand des Lagenmodells gezeigt werden, dass es möglich ist, die Tiefenauflösung der XPS Technik im vorliegenden Fall zu vernachlässigen und Werte für die Bedeckung ausschließlich anhand des Turmmodells zu ermitteln. Anhand der Spektren von Ausgangsmaterialien und Produkten wurden unter Anwendung der Standardmodelle für Turm- und Lagenmodell geeignete Berechnungsmodelle für die Bedeckung der Produkte mit Protein entwickelt. Um bei der Berechnung der Bedeckung unabhängig von Schwankungen in der absoluten Intensität der Spektren zu sein, wurden zur Auswertung bevorzugt relative Intensitäten herangezogen. Es konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, neben dem für das Protein spezifischen N1s Spektrum, eine Berechnung der Bedeckung ausschließlich anhand der O1s Spektren vorzunehmen. Für die Anwendung des Lagenmodells wurde gezeigt, dass es im vorliegenden Fall lediglich dazu geeignet ist Bedeckungen von kleiner als 2 Lagen korrekt wiederzugeben. Das Lagenmodell wurde deshalb neben dem Turmmodell nur für MCC Spheres Produkte ohne Trehalose mit bis zu 6mg aufgetragenem rhIL-11 angewendet. Für MCC Spheres Produkte ohne Trehalose wurde mit dem Auftragen von bis zu 60mg rhIL-11 auf 20g Trägermaterial ein Ansteigen bis zur vollständigen Bedeckung der Oberfläche nachgewiesen. In MCC Spheres Produkten mit Trehalose wurde der Proteinanteil an der Oberfläche zu 0,53 ermittelt. Im Vergleich zur physikalischen Mischung mit einem Proteinanteil von 0,33 konnte die bevorzugte Anreicherung des Proteins an der Trägermaterialoberfläche nachgewiesen werden. In Produkten mit den löslichen Trägermaterialien Saccharose und Mannitol wurden nach Auftragen von 1,5mg rhIL-11 ohne Zusatz von Trehalose vergleichbare Proteinanteile an der Oberfläche wie in MCC Spheres Produkten nachgewiesen. Ein Auftragen größerer Mengen Protein führte zu keinem weiteren Anstieg in der Bedeckung der Oberflächen mit Protein. In Produkten mit den löslichen Trägermaterialien Saccharose und Mannitol mit Trehalose wurde nach Auftragen von 6mg Protein eine Bedeckung wie in MCC Spheres Produkten mit Trehalose nach Auftragen von 60mg Protein beobachtet.

Produkte mit Trehalosezusatz zur Sprühlösung laufen unabhängig von den untersuchten Trägermaterialien mit dem Auftragen steigender Mengen rhIL-11/Trehalose auf einen vergleichbaren Wert für die Bedeckung zu. Der geringere Proteinanteil an der Oberfläche von Saccharoseprodukten im Vergleich zu Saccharoseprodukten mit Trehalose bietet eine mögliche Erklärung für die bessere Stabilisierung von rhIL-11 in Saccharoseprodukten ohne Trehalosezusatz. Anhand von Berechnungen konnte gezeigt werden, dass während der Herstellung der Produkte Sprühtropfen welche auf die Oberfläche treffen in jedem Stadium des Prozesses alles in ihrer Umgebung aufgetragene und getrocknete Protein wieder auf- bzw. anlösen können.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird die Herstellung partikulärer Proteinformulierungen durch Aufsprühen von rhIL-11 haltigen Lösungen auf Trägermaterialien in der Wirbelschicht untersucht. Vorteile der Wirbelschicht liegen im schnellen Wärme- und Stoffübergang und einer schonenden Trocknung. Neben der Proteinstabilität wurden Granulation und Abrieb des eingesetzten Trägermaterials und die Ausbeute der Prozesse untersucht. Um das Protein während des Prozesses und der Lagerung zu stabilisieren sollten sowohl geeignete Trägermaterialien als auch geeignete Sprühlösungszusätze getestet werden. Mit dem für die Sprühlösungsformulierung verwendeten Hilfsstoffen Saccharose, Trehalose, PS80 und Methionin wurden bereits in der Gefrier- und Sprühtrocknung gute rhIL-11 Stabilitäten erzielt. Auswahlkriterien für Trägermaterialien waren neben proteinstabilisierenden Eigenschaften geringe Tendenz zu Abrieb und Granulation während des Prozesses. Aufgrund seiner hohen Empfindlichkeit, die sich in chemischen und physikalischen Abbauprozessen bemerkbar macht, ist rhIL-11 besonders geeignet die Möglichkeiten der Proteinstabilisierung mittels Wirbelschichtprozess aufzuzeigen. Die Stabilität von rhIL-11 wurde mit Hilfe von SE-HPLC, RP-HPLC und Gelelektrophorese beurteilt. Da die Kenntnis der Oberflächenbelegung des Trägers mit Protein bzw. Proteinmatrix wichtige Hilfestellung zur Proteinstabilität geben kann, wurde die Verteilung von rhIL-11 an der Oberfläche der Produkte mit XPS untersucht.

Zunächst wurde im Rahmen von orientierenden Versuchen die Durchführbarkeit der Herstellung partikulärer Proteinformulierungen auf der GPCG-1 Anlage und der Mini-Glatt Anlage untersucht. Proteinstabilität, Granulation/ Abrieb und Ausbeute der Prozesse wurde in Abhängigkeit der Prozesssteuerungsparameter und der eingesetzten Trägermaterialien bewertet. In Prozessen auf der GPCG-1 Anlage konnte gezeigt werden, dass die rhIL-11 Stabilität während des Prozesses, Granulation und Abrieb des eingesetzten Trägermaterials und

die Ausbeuten der Prozesse von der Art des eingesetzten Trägermaterials abhängen. In den GPCG-1 Untersuchungen wurden Trehalose, Saccharose, Glycin und Mannitol als Trägermaterialien verwendet. Beim Einsatz geringer Sprühdruöcke, die zu Granulation führten und hoher Sprühdruöcke die zum Abrieb führten, wurden in beiden Anlagen vergleichsweise geringe Ausbeuten erzielt. In der GPCG-1 Anlage wurden in Abhängigkeit der eingesetzten Trägermaterialien und der Prozessbedingungen Ausbeuten zwischen 34 und 50%, in der Mini-Glatt Anlage zwischen 62 und 91% erzielt. In der Mini-Glatt Anlage wurde mit Saccharose der Einfluss der Prozessparameter eingehend untersucht. Die Flussrate der Sprühflüssigkeit und die Menge des eingesetzten Trägermaterials waren hier die wichtigsten Parameter um die Ausbeute zu beeinflussen.

Produkte, die auf der GPCG-1 Anlage hergestellt wurden enthielten zwischen 11 und 32% Aggregaten, das Produkt auf Saccharosebasis enthielt 12,2% Aggregate. In der Mini-Glatt Anlage enthielten Saccharoseprodukte, die bei unterschiedlichen Prozessparametern hergestellt wurden, zwischen 8,7 und 14,6% Aggregate. Die Höhe des Sprühdruöcks hatte in beiden Anlagen einen deutlichen Einfluss auf die Bildung von Aggregaten. Der Effekt der eigentlichen Trocknung im Wirbelbett, der aus dem Aggregatgehalt im Produkt abzüglich der Aggregatbildung durch das Verdüsen berechnet wurde, betrug in der GPCG-1 Anlage für das Produkt auf Saccharose Basis 7,2%, in der Mini-Glatt Anlage in Abhängigkeit der Prozessparameter zwischen 5,9 und 7,5%.

Bei Prozessen auf der GPCG-1 Anlage mit Trehalose als Trägermaterial kam es außer bei niedrigem Sprühdruöck zum Abrieb der Trehalose. Mit Saccharose wurde weder Abrieb noch Granulation beobachtet. In den Mini-Glatt Prozessen mit Saccharose wurde in Abhängigkeit der Prozessbedingungen partielle Aufgranulierung beobachtet. Da in der GPCG-1 Anlage eine Steigerung der Ausbeute nur durch Einsatz höherer Mengen an Trägermaterial zu erwarten war und Ansätze von 300g für Entwicklungsarbeiten bereits sehr hoch sind, sollte im weiteren Verlauf der Arbeit auf weitere GPCG-1 Versuche verzichtet werden. Die Ausbeuten, die in der Mini-Glatt Anlage erzielt wurden, waren mit

85 bis 90% auch im Vergleich zur Sprühtrocknung sehr gut. Vor dem Hintergrund einer guten Stabilisierung von rHL-11, sollten die Produkttemperatur niedrig gewählt werden. Aufgrund der vergleichsweise geringen Abmessungen der Mini-Glatt Anlage bestand eine verstärkte Neigung zur Granulation. Mit Hilfe der Prozesssteuerungsparameter sollte die Feuchte im Prozess deshalb gering gehalten werden, was mit einer möglichst niedrigen Sprühdrate erreicht werden sollte. Mit Saccharose wurde so eine hohe Ausbeute bei vergleichsweise geringer Granulation erzielt. Der Sprühdruk sollte in Hinblick auf hohe Ausbeute und geringe(n) Abrieb/ Granulation austariert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Mini-Glatt Anlage im Hinblick auf den Einsatz geringer Mengen an Trägermaterial (20g) durch apparative Veränderungen optimiert werden. Es wurden bei stabilem Verlauf der Prozesse, auch mit Zusatz von Zuckern zur Sprühdösung, Ausbeuten von größer als 90% angestrebt. Bereits vor Durchführung der orientierenden Versuche erfolgte ein Austausch der langen durch kürzere Filter. Ein Verlust von Sprühdösung durch ein direktes Ansprühen der Filter konnte so vermieden werden. Durch eine apparative Veränderung, die als Konfiguration mit abgesenkter Düse bezeichnet wurde, konnten die ansprechenden Ausbeuten, die in den orientierenden Versuchen mit der Mini-Glatt Anlage erzielt wurden, um durchschnittlich 5% gesteigert werden. In Bezug auf die Stabilität des Prozessablaufs nach Zuckerzusätzen zur Sprühdösung und die Reduzierung von Granulation oder Abrieb konnten in der Konfiguration mit abgesenkter Düse gegenüber der Standardkonfiguration der Mini-Glatt Anlage keine Fortschritte erzielt werden. Mit einem neu konstruierten Materialbehälter, der zusammen mit einer neu konstruierten Düsenaufnahme eingesetzt wurde, konnten Prozesse mit dem Trägermaterial Saccharose nach Zusätzen von 5mg/ml Trehalose bzw. Saccharose zur Sprühdösung stabil durchgeführt werden. Durch Einsatz eines weiteren in der Geometrie optimierten Materialbehälters waren stabile Prozesse mit Sprühdösungszusätzen von 22,5mg/ml Trehalose bzw. Saccharose möglich. Sowohl bei Einsatz der Konfiguration mit abgesenkter Düse als auch bei Einsatz dieses letzteren Materialbehälters in Kombination mit der Düsenaufnahme, waren die Ausbeuten gegenüber der Standardkonfiguration um 5%

erhöht. Die erhöhten Ausbeuten ließen sich somit auf die abgesenkte Düse zurückführen, wohingegen die stabile Prozessführung nach Zusätzen von 22,5mg/ml Zuckern zur Sprühlösung auf die Kombination aus optimiertem Materialbehälter und Düsenaufnahme zurückgeführt wurde. Granulation und Abrieb der Produkte waren in allen untersuchten Anlagenmodifikationen gleich. Die Stabilität von rhIL-11 in der Materialbehälteroptimierten Anlage unterscheidet sich praktisch nicht von der in der Standardkonfiguration erhaltenen. Mit der weiterentwickelten Mini-Glatt Anlage wurde somit die Basis für eine Entwicklung stabiler rhIL-11 Produkte durch Formulierungsentwicklung der Sprühlösung gelegt.

Im dritten Teil der Arbeit sollten der Einfluss von Trägermaterial und Sprühlösung auf die rhIL-11 Stabilität während Prozess und Lagerung in der weiterentwickelten Mini-Glatt Anlage untersucht werden. Mit Saccharose, Glycin, Mannitol und MCC-Spheres als Trägermaterial und ohne stabilisierende Zusätze in der Sprühlösung enthielten Produkte nach dem Wirbelschichtprozess hohe Mengen an Aggregaten und RS, die über die Lagerdauer weiter anstiegen. Durch Zusatz von 22,5mg/ml Trehalose zur Sprühlösung konnte während des Prozesses und während der Lagerung eine leichte Stabilisierung in Bezug auf Aggregate und RS erreicht werden. Eine Ausnahme war hierbei das Produkt mit Saccharose als Trägermaterial. Durch Verdünnung der Trehalose der Sprühlösung mit angelösten Saccharoseträger kam es hier zu einer leichten Abnahme der Stabilität während des Prozesses und infolge dessen auch während der Lagerung. Akzeptable Stabilitäten in Bezug auf die Bildung von Aggregaten während des Prozesses und der Lagerung wurden erst durch Zusatz von Polysorbat 80 zur Sprühlösung erzielt. Polysorbat 80 hatte dabei keinen Einfluss auf die Bildung von RS während des Prozesses. In Konzentrationen größer 0,02% führte PS80 allerdings während der Lagerung zu einer verstärkten Bildung von RS. Die beste Stabilisierung wurde durch die Kombination von Disacchariden und PS80 erzielt. Durch den Einsatz von Sprühlösungen ohne Glycin konnte die Stabilität der Produkte weiter verbessert werden. Der Austausch von Trehalose gegen Saccharose in der Sprühlösung hatte keinen Einfluss auf die Stabilität der Produkte. Mit Zusätzen von 10mM

Methionin zur Sprühlösung konnte ein ausreichender Schutz von rhIL-11 vor Oxidation während des Prozesses erzielt werden. Durch eine Begasung von Vials mit Stickstoff vor dem Verschließen, konnte der Anstieg von Met58Ox während der Lagerung verhindert werden.

Im letzten Teil der Arbeit sollten quantitative Untersuchungen zur Belegung der Oberfläche von MCC Spheres-, Saccharose- und Mannitolprodukten mit rhIL-11 durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wurden XPS Spektren von rhIL-11, Trehalose, den Trägermaterialien und den Produkten aufgezeichnet. Nach Identifizierung der Komponenten von C1s und O1s Spektren wurde nach Dekonvolution eine quantitative Auswertung der Komponenten/ Spektren vorgenommen. Es konnte gezeigt werden, dass die Komponente O3 im O1s Spektrum neben dem N1s Spektrum, welches ebenfalls aufgezeichnet wurde, für das Protein spezifisch ist. Zur Ermittlung der Oberflächenbelegung mit Protein wurde die Beladung berechnet. Dazu wurde der Oberflächenbedarf/ räumliche Ausdehnung von rhIL-11 mittels 3D-Darstellung am Computer und die Oberfläche der Trägermaterialien mittels BET Messung bestimmt. Unter Einbeziehung der Ergebnisse der Beladung konnte anhand des Lagenmodells gezeigt werden, dass es möglich ist, die Tiefenauflösung der XPS Technik im vorliegenden Fall zu vernachlässigen und Werte für die Bedeckung ausschließlich anhand des Turmmodells zu ermitteln. Anhand der Spektren von Ausgangsmaterialien und Produkten wurden unter Anwendung der Standardmodelle für Turm- und Lagenmodell geeignete Berechnungsmodelle für die Bedeckung der Produkte mit Protein entwickelt. Um bei der Berechnung der Bedeckung unabhängig von Schwankungen in der absoluten Intensität der Spektren zu sein, wurden zur Auswertung bevorzugt relative Intensitäten herangezogen. Es konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, neben dem für das Protein spezifischen N1s Spektrum, eine Berechnung der Bedeckung ausschließlich anhand der O1s Spektren vorzunehmen. Für die Anwendung des Lagenmodells wurde gezeigt, dass es im vorliegenden Fall lediglich dazu geeignet ist Bedeckungen von kleiner als 2 Lagen korrekt wiederzugeben. Das Lagenmodell wurde deshalb neben dem Turmmodell nur für MCC Spheres Produkte ohne Trehalose mit bis zu 6mg aufgetragenem rhIL-11 angewendet.

Für MCC Spheres Produkte ohne Trehalose wurde mit dem Auftragen von bis zu 60mg rhIL-11 auf 20g Trägermaterial ein Ansteigen bis zur vollständigen Bedeckung der Oberfläche nachgewiesen. In MCC Spheres Produkten mit Trehalose wurde der Proteinanteil an der Oberfläche zu 0,53 ermittelt. Im Vergleich zur physikalischen Mischung mit einem Proteinanteil von 0,33 konnte die bevorzugte Anreicherung des Proteins an der Trägermaterialoberfläche nachgewiesen werden. In Produkten mit den löslichen Trägermaterialien Saccharose und Mannitol wurden nach Auftragen von 1,5mg rhIL-11 ohne Zusatz von Trehalose vergleichbare Proteinanteile an der Oberfläche wie in MCC Spheres Produkten nachgewiesen. Ein Auftragen größerer Mengen Protein führte zu keinem weiteren Anstieg in der Bedeckung der Oberflächen mit Protein. In Produkten mit den löslichen Trägermaterialien Saccharose und Mannitol mit Trehalose wurde nach Auftragen von 6mg Protein eine Bedeckung wie in MCC Spheres Produkten mit Trehalose nach Auftragen von 60mg Protein beobachtet. Produkte mit Trehalosezusatz zur Sprühlösung laufen unabhängig von den untersuchten Trägermaterialien mit dem Auftragen steigender Mengen rhIL-11/ Trehalose auf einen vergleichbaren Wert für die Bedeckung zu. Der geringere Proteinanteil an der Oberfläche von Saccharoseprodukten im Vergleich zu Saccharoseprodukten mit Trehalose bietet eine mögliche Erklärung für die bessere Stabilisierung von rhIL-11 in Saccharoseprodukten ohne Trehalosezusatz. Anhand von Berechnungen konnte gezeigt werden, dass während der Herstellung der Produkte Sprühtropfen welche auf die Oberfläche treffen in jedem Stadium des Prozesses alles in ihrer Umgebung aufgetragene und getrocknete Protein wieder auf- bzw. auflösen können.

Zusammenfassend stellt die Wirbelschichttrocknung von Proteinen eine viel versprechende Möglichkeit dar partikuläre Proteinformulierungen herzustellen. Die erhaltenen Ergebnisse sollten auf andere Proteine übertragbar sein, da rhIL-11 als globuläres Protein mit einem Molekulargewicht von 19kDa eine größere Gruppe von therapeutischen Proteinen repräsentiert.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Abberger,T.; Definition Und Bedeutung Der Freien Feuchte Bei Der Wirbelschichtgranulierung, Ph.D. Thesis, University of Innsbruck; Dissertation; (1996) .

Abdul-Fattah,A., Kalonia D., Pikal,M. and Lechuga-Ballesteros; The Surface Composition of Spray Dried and Freeze Dried Protein Formulations With Varying Molecular Weight Stabilizers; (2005) .

Abdul-Fattah,A.M., Kalonia,D.S. and Pikal,M.J.; The Challenge of Drying Method Selection for Protein Pharmaceuticals: Product Quality Implications; Journal of Pharmaceutical Sciences; 96 (2007) 1886 - 1916.

Adjei,A.L., Gupta,P.K. and Editors.; Inhalation Delivery of Therapeutic Peptides and Proteins. [In: Lung. Biol. Health Dis., 1997; 107]; (1997) 913 -.

Adler,M.; Sprüheinbettung Von Proteinen in Gerüstbildner: Stabilität Und Oberflächenanalyse, Ph.D. Thesis, University of Erlangen-Nürnberg; (2005).

Adler,M., Unger,M. and Lee,G.; Surface Composition of Spray-Dried Particles of Bovine Serum Albumin/Trehalose/Surfactant; Pharmaceutical Research; 17 (2000) 863 - 870.

Allison,S.D., Manning,M.C., Randolph,T.W., Middleton,K., Davis,A. and Carpenter,J.F.; Optimization of Storage Stability of Lyophilized Actin Using Combinations of Disaccharides and Dextran; Journal of Pharmaceutical Sciences; 89 (2000) 199 - 214.

- Ameri, M. and Maa, Y.F.; Spray Drying of Biopharmaceuticals: Stability and Process Considerations; *Drying Technology*; 24 (2006) 763 - 768.
- Arakawa, T., Prestrelski, S.J., Kenney, W.C. and Carpenter, J.F.; Factors Affecting Short-Term and Long-Term Stabilities of Proteins; *Advanced Drug Delivery Reviews*; 46 (2001) 307 - 326.
- Auditore, A., Satriano, C., Coscia, U., Ambrosone, G., Parisi, V. and Marletta, G.; Human Serum Albumin Adsorption Onto a-SiC:H and a-C:H Thin Films Deposited by Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition; *Biomolecular Engineering*; 19 (2002) 85 - 90.
- Banga, A.K.; *Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems*; (1995) 324 - .
- Brange, J.; Physical Stability of Proteins; *Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins*; (2000) 89 - 112.
- Burkoth, T.L., Bellhouse, B.J., Hewson, G., Longridge, D.J., Muddle, A.G. and Sarphe, D.F.; Transdermal and Transmucosal Powdered Drug Delivery; *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*; 16 (1999) 331 - 384.
- Carpenter, J.F., Kreilgaard, L., Allison, S.D. and Randolph, T.W.; Roles of Protein Conformation and Glassy State in the Storage Stability of Dried Protein Formulations; *Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins*; (2000) 178 - 188.
- Carpenter, J.F., Chang, B.S., Garzon-Rodriguez, W. and Randolph, T.W.; Rational Design of Stable Lyophilized Protein Formulations: Theory and Practice; *Pharmaceutical Biotechnology*; 13 (2002) 109 - 133.

- Chang,B.S. and Fischer,N.L.; Development of An Efficient Single-Step Freeze-Drying Cycle for Protein Formulations; *Pharmaceutical Research*; 12 (1995) 831 - 837.
- Chen,D.X., Endres,R.L., Erickson,C.A., Weis,K.F., McGregor,M.W., Kawaoka,Y. and Payne,L.G.; Epidermal Immunization by a Needle-Free Powder Delivery Technology: Immunogenicity of Influenza Vaccine and Protection in Mice; *Nature Medicine*; 6 (2000) 1187 - 1190.
- Christensen,F.N. and Bertelsen,P.; Qualitative Description of the Wurster-Based Fluid-Bed Coating Process; *Drug Development and Industrial Pharmacy*; 23 (1997) 451 - 463.
- Cimino,A., Gazzoli,D. and Valigi,M.; XPS Quantitative Analysis and Models of Supported Oxide Catalysts; *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*; 104 (1999) 1 - 29.
- Colaco,C.A.L.S., Collett,M. and Roser,B.J.; Pharmaceutical Formulation Instability and the Maillard Reaction; *Chimica Oggi-Chemistry Today*; 14 (1996) 32 - 37.
- Costantino,H.R., Firouzabadian,L., Hogeland,K., Wu,C., Beganski,C., Carrasquillo,K.G., Cordova,M., Griebenow,K., Zale,S.E. and Tracy,M.A.; Protein Spray-Freeze Drying. Effect of Atomization Conditions on Particle Size and Stability; *Pharm Res*; 17 (2000) 1374 - 1383.
- Costantino,H.R., Firouzabadian,L., Wu,C.C., Carrasquillo,K.G., Griebenow,K., Zale,S.E. and Tracy,M.A.; Protein Spray Freeze Drying. 2. Effect of Formulation Variables on Particle Size and Stability; *Journal of Pharmaceutical Sciences*; 91 (2002) 388 - 395.

- Czupryn, M.J., McCoy, J.M. and Scoble, H.A.; Structure-Function Relationships in Human Interleukin-11. Identification of Regions Involved in Activity by Chemical Modification and Site-Directed Mutagenesis; *Journal of Biological Chemistry*; 270 (1995) 978 - 985.
- Davies, W.L. and Gloor, W.T., Jr.; Batch Production of Pharmaceutical Granulations in a Fluidized Bed. I. Effects of Process Variables on Physical Properties of Final Granulation; *J.Pharm.Sci.*; 60 (1971) 1869 - 1874.
- Davies, W.L. and Gloor, W.T., Jr.; Batch Production of Pharmaceutical Granulations in a Fluidized Bed. II. Effects of Various Binders and Their Concentrations on Granulations and Compressed Tablets; *J.Pharm.Sci.*; 61 (1972) 618 - 622.
- Dengis, P.B., Gerin, P.A. and Rouxhet, P.G.; X-Ray Photoelectron-Spectroscopy Analysis of Biosurfaces - Examination of Performances With Yeast-Cells and Related Model Compounds; *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*; 4 (1995) 199 - 211.
- Dong, A.C., Prestrelski, S.J., Allison, S.D. and Carpenter, J.F.; Infrared Spectroscopic Studies of Lyophilization-Induced and Temperature-Induced Protein Aggregation; *Journal of Pharmaceutical Sciences*; 84 (1995) 415 - 424.
- Dupont-Gillain, C.C., Nysten, B., Hlady, V. and Rouxhet, P.G.; Atomic Force Microscopy and Wettability Study of Oxidized Patterns at the Surface of Polystyrene; *Journal of Colloid and Interface Science*; 220 (1999) 163 - 169.
- Elversson, J. and Millqvist-Fureby, A.; Aqueous Two-Phase Systems As a Formulation Concept for Spray-Dried Protein; *International Journal of Pharmaceutics*; 294 (2005) 73 - 87.

- Faeldt,P. and Bergenstahl,B.; The Surface Composition of Spray-Dried Protein-Lactose Powders; Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects; 90 (1994) 183 - 190.
- Fitzner,M.; Chemical and Physicochemical Stability of Spray-Dried RhIL-11 Formulations, Ph.D. Thesis, University of Erlangen-Nürnberg; (2003).
- Fornasiero,F., Ulrich,J. and Prausnitz,J.M.; Molecular Thermodynamics of Precipitation; Chemical Engineering and Processing; 38 (1999) 463 - 475.
- Foster,L.C.; Stable Glassy State Powder Formulations; United States Patent; (2001) .
- Frake,P., Greenhalgh,D., Grierson,S.M., Hempenstall,J.M. and Rudd,D.R.; Process Control and End-Point Determination of a Fluid Bed Granulation by Application of Near Infrared Spectroscopy; International Journal of Pharmaceutics; 151 (1997) 75 - 80.
- Friedland,H.D. and Krieger,T.; Indolicidin and Cationic Peptides Conjugated With Polymers;99-CA143 (1999) 50 - .
- Fuhrherr,R.; Spray-Dried Antibody Powders for Pulmonary Application, Ph.D. Thesis, University of Munich; (2005).
- Fukumori,Y., Ichikawa,H., Yamaoka,Y., Akaho,E., Takeuchi,Y., Fukuda,T., Kanamori,R. and Osako,Y.; Microgranulation and Encapsulation of Pulverized Pharmaceutical Powders With Ethyl Cellulose by the Wurster Process; Chemical & Pharmaceutical Bulletin; 39 (1991) 1806 - 1812.
- Fukumori,Y., Ichikawa,H., Jono,K., Takeuchi,Y. and Fukuda,T.; Computer Simulation of Agglomeration in the Wurster Process; Chemical & Pharmaceutical Bulletin; 40 (1992) 2159 - 2163.

- Garzon-Rodriguez,W., Koval,R.L., Chongprasert,S., Krishnan,S., Randolph,T.W., Warne,N.W. and Carpenter,J.F.; Optimizing Storage Stability of Lyophilized Recombinant Human Interleukin-11 With Disaccharide/Hydroxyethyl Starch Mixtures; Journal of Pharmaceutical Sciences; 93 (2003) 684 - 696.
- Grotz,P.; Photoelektronenspektroskopische Untersuchungen an Mischoxidkatalysatoren; (2001).
- Hancock,B.C. and Zograf,G.; Characteristics and Significance of the Amorphous State in Pharmaceutical Systems; Journal of Pharmaceutical Sciences; 86 (1997) 1 - 12.
- Harsch,I.A., Hahn,E.G. and Konturek,P.C.; Syringe, Pen, Inhaler - the Evolution of Insulin Therapy; Med.Sci Monit.; 7 (2001) 833 - 836.
- Hawe,A.; Studies on Stable Formulations for a Hydrophobic Cytokine, Ph.D. Thesis, University of Munich; (2006).
- Henzler,M. and Göpel,W.; Oberflächenphysik Des Festkörpers; (1991).
- Hillgren,A., Evertsson,H. and Alden,M.; Interaction Between Lactate Dehydrogenase and Tween 80 in Aqueous Solution; Pharmaceutical Research; 19 (2002) 504 - 510.
- Iyer,R.M., Augsburger,L.L. and Parikh,D.M.; Evaluation of Drug Layering and Coating: Effect of Process Mode and Binder Level; Drug Development and Industrial Pharmacy; 19 (1993) 981 - 998.
- Izutsu,K., Yoshioka,S. and Terao,T.; Decreased Protein-Stabilizing Effects of Cryoprotectants Due to Crystallization; Pharmaceutical Research; 10 (1993) 1232 - 1237.

- Jablonski,A. and Powell,C.J.; Information Depth and the Mean Escape Depth in Auger Electron Spectroscopy and X-Ray Photoelectron Spectroscopy; Journal of Vacuum Science & Technology A; 21 (2003) 274 - 283.
- Johansson,L.S., Campbell,J.M., Fardim,P., Hulten,A.H., Boisvert,J.P. and Ernstsson,M.; An XPS Round Robin Investigation on Analysis of Wood Pulp Fibres and Filter Paper; Surface Science; 584 (2005) 126 - 132.
- Johansson,L.S., Campbell,J.M., Koljonen,K. and Stenius,P.; Evaluation of Surface Lignin on Cellulose Fibers With XPS; Applied Surface Science; 144-145 (1999) 92 - 95.
- Johnson,R.E., Kirchhoff,C.F. and Gaud,H.T.; Mannitol-Sucrose Mixtures- Versatile Formulations for Protein Lyophilization; Journal of Pharmaceutical Sciences; 91 (2002) 914 - 922.
- Jones,D.; Air Suspension Coating for Multiparticulates; Drug Development and Industrial Pharmacy; 20 (1994) 3175 - 3206.
- Jones,D.M.; Factors to Consider in Fluid-Bed Processing; Pharmaceutical Technology; 9 (1985) 50, 55 - 6, 58, 60, 62.
- Jovanovic,N., Bouchard,A., Hofland,G.W., Witkamp,G.J., Crommelin,D.J.A. and Jiskoot,W.; Stabilization of Proteins in Dry Powder Formulations Using Supercritical Fluid Technology; Pharmaceutical Research; 21 (2004) 1955 - 1969.
- Jung,J. and Perrut,M.; Particle Design Using Supercritical Fluids: Literature and Patent Survey; Journal of Supercritical Fluids; 20 (2001) 179 - 219.
- Juslin,L., Antikainen,O., Merkkü,P. and Yliruusi,J.; Droplet Size Measurement: I. Effect of Three Independent Variables on Droplet Size Distribution and

- Spray Angle From a Pneumatic Nozzle; International Journal of Pharmaceutics; 123 (1995) 247 - 256.
- Kerwin,B.A., Heller,M.C., Levin,S.H. and Randolph,T.W.; Effects of Tween 80 and Sucrose on Acute Short-Term Stability and Long-Term Storage at - 20 Degrees C of a Recombinant Hemoglobin; Journal of Pharmaceutical Sciences; 87 (1998) 1062 - 1068.
- Koester,U.; Massenbilanzierung Einer Wirbelschichtgranulierung, Ph.D. Thesis, University of Würzburg; (2001).
- Kristensen,H.G. and Schaefer,T.; Granulation. A Review on Pharmaceutical Wet-Granulation; Drug Development and Industrial Pharmacy; 13 (1987) 803 - 872.
- Levsen,K.; Physikalische Methoden in Der Chemie; (1985).
- List,k. and Steffens,K.J.; Überwachung Und Steuerung Von Granulationsprozessen Mit Hilfe Der Nah-Infrarot-Spektroskopie; Pharm.Ind; (1996) .
- Lueckel,B., Bodmer,D., Helk,B. and Leuenberger,H.; Formulations of Sugars With Amino Acids or Mannitol--Influence of Concentration Ratio on the Properties of the Freeze-Concentrate and the Lyophilizate; Pharm Dev Technol; 3 (1998) 325 - 336.
- Lueckel,B., Helk,B., Bodmer,D. and Leuenberger,H.; Effects of Formulation and Process Variables on the Aggregation of Freeze-Dried Interleukin-6 (IL-6) After Lyophilization and on Storage; Pharm Dev Technol; 3 (1998) 337 - 346.
- Maa,Y.F., Nguyen,P.A., Andya,J.D., Dasovich,N., Sweeney,T.D., Shire,S.J. and Hsu,C.C.; Effect of Spray Drying and Subsequent Processing Conditions

- on Residual Moisture Content and Physical/Biochemical Stability of Protein Inhalation Powders; *Pharmaceutical Research*; 15 (1998) 768 - 775.
- Maa,Y.F., Ameri,M., Rigney,R., Payne,L.G. and Chen,D.X.; Spray-Coating for Biopharmaceutical Powder Formulations: Beyond the Conventional Scale and Its Application; *Pharmaceutical Research*; 21 (2004) 515 - 523.
- Maa,Y.F. and Hsu,C.C.; Effect of High Shear on Proteins; *Biotechnology and Bioengineering*; 51 (1996) 458 - 465.
- Maa,Y.F., Nguyen,P.A. and Hsu,C.C.; Spray-Coating of RhDNase on Lactose: Effect of System Design, Operational Parameters and Protein Formulation; *International Journal of Pharmaceutics*; 144 (1996) 47 - 59.
- Maa,Y.F. and Hsu,C.C.; Feasibility of Protein Spray Coating Using a Fluid-Bed Wurster Processor; *Biotechnology and Bioengineering*; 53 (1997) 560 - 566.
- Maa,Y.F., Nguyen,P.A., Sweeney,T., Shire,S.J. and Hsu,C.C.; Protein Inhalation Powders: Spray Drying Vs Spray Freeze Drying; *Pharmaceutical Research*; 16 (1999) 249 - 254.
- Maa,Y.F. and Prestrelski,S.J.; Biopharmaceutical Powders: Particle Formation and Formulation Considerations; *Current Pharmaceutical Biotechnology*; 1 (2000) 283 - 302.
- Maa,Y.F., Ameri,M., Shu,C., Payne,L.G. and Chen,D.; Influenza Vaccine Powder Formulation Development: Spray-Freeze-Drying and Stability Evaluation; *Journal of Pharmaceutical Sciences*; 93 (2004) 1912 - 1923.

- Mackay,M., Phillips,J., Steward,A. and Hastewell,J.; Pulmonary Absorption of Therapeutic Peptides and Proteins in: Respiratory drug delivery IV ; Interpharm Press (1994); 31 - 37.
- Masters,K.; Spray Drying Handbook. 3rd Ed; (1979) 687 -.
- McGregor,W.C.; Pharmaceutical Composition Comprising BPI Proteins;94-190869 (1996) 19 -.
- Millqvist-Fureby,A., Malmsten,M. and Bergenstahl,B.; Surface Characterization and Activity Preservation in Spray-Drying of Trypsin; International Journal of Pharmaceutics; 188 (1999) 243 - 253.
- Millqvist-Fureby,A., Malmsten,M. and Bergenstahl,B.; Surface Characterization of Freeze-Dried Protein/Carbohydrate Mixtures; International Journal of Pharmaceutics; 191 (1999) 103 - 114.
- Muhrer,G. and Mazzotti,M.; Precipitation of Lysozyme Nanoparticles From Dimethyl Sulfoxide Using Carbon Dioxide As Antisolvent; Biotechnology Progress; 19 (2003) 549 - 556.
- Nguyen,T.H.; Oxidation Degradation of Protein Pharmaceuticals; Formulation and Delivery of Proteins and Peptides; 567 (1994) 59 - 71.
- NIST; National Institute of Standards and Technology; (2007) .
- Olsen; Batch Fluid-Bed Processing Equipment - A Design Overview:Part 1; Pharmaceutical Technology; (1989) 34 - 48.
- Olsen; Batch Fluid Bed Processing Equipment - a Design Overview Part 2; Pharmaceutical Technology; (2002) .

- Palakodaty,S. and York,P.; Phase Behavioral Effects on Particle Formation Processes Using Supercritical Fluids; *Pharmaceutical Research*; 16 (1999) 976 - 985.
- Parikh, Bonck and Mogavero; *Batch Fluid Bed Granulation (Handook of Pharmaceutical Granulation Technology)*; (2002) .
- Patton,J.S.; Inhalation: The Other \"Oral\" Route for Delivery of Molecules With Low Gastrointestinal Bioavailability; *Book of Abstracts, 219th ACS National Meeting, San Francisco, CA, March 26-30, 2000*; (2000) MEDI - 175.
- Phillips,E., Allsopp,E., Christensen,T., Fitzgerald,M. and Zhao,L.; Size Reduction of Peptides and Proteins by Jet-Milling; *Respiratory Drug Delivery VI: Biological, Pharmaceutical, Clinical and Regulatory Issues Relating to Optimized Drug Delivery by Aerosol, the International Symposium, 6th, Hilton Head, S.C., May 3-7, 1998*; (1998) 161 - 168.
- Pikal-Cleland,K.A., Cleland,J.L., Anchordoquy,T.J. and Carpenter,J.F.; Effect of Glycine on PH Changes and Protein Stability During Freeze-Thawing in Phosphate Buffer Systems; *Journal of Pharmaceutical Sciences*; 91 (2002) 1969 - 1979.
- Pikal,M.J.; *Freeze-Drying of Proteins: Process, Formulation, and Stability*; ACS Symposium Series; 567 (1994) 120 - 133.
- Polz,J.; *Oberflächenphysikalische Untersuchungen Zur Spreitung Von Oxiden Auf Oxidträgern*; (1992).
- Porter,W.R.; *Chemical and Physical Properties of Peptide and Protein Drugs; Lung Biology in Health and Disease*; 107 (1997) 59 - 88.

- Powell,C.J. and Jablonski,A.; NIST Databases for Surface Analysis by Auger-Electron Spectroscopy and X-Ray Photoelectron Spectroscopy; Journal of Surface Analysis; 10 (2003) 158 - 162.
- Prestrelski,S.J., Tedeschi,N., Arakawa,T. and Carpenter,J.F.; Dehydration-Induced Conformational Transitions in Proteins and Their Inhibition by Stabilizers; Biophysical Journal; 65 (1993) 661 - 671.
- Raesaenen,E., Rantanen,J., Mannermaa,J.P., Yliruusi,J. and Vuorela,H.; Dehydration Studies Using a Novel Multichamber Microscale Fluid Bed Dryer With in-Line Near-Infrared Measurement; Journal of Pharmaceutical Sciences; 92 (2003) 2074 - 2081.
- Randolph,T.W. and Jones,L.S.; Surfactant-Protein Interactions; Pharmaceutical Biotechnology; 13 (2002) 159 - 175.
- Rantanen,J., Lehtola,S., Ramet,P., Mannermaa,J.P. and Yliruusi,J.; Online Monitoring of Moisture Content in an Instrumented Fluidized Bed Granulator With a Multi-Channel NIR Moisture Sensor; Powder Technology; 99 (1998) 163 - 170.
- Rantanen,J., Antikainen,O., Mannermaa,J.P. and Yliruusi,J.; Use of the Near-Infrared Reflectance Method for Measurement of Moisture Content During Granulation; Pharmaceutical Development and Technology; 5 (2000) 209 - 217.
- Rochelle,C. and Lee,G.; Dextran or Hydroxyethyl Starch in Spray-Freeze-Dried Trehalose/Mannitol Microparticles Intended As Ballistic Particulate Carriers for Proteins; J Pharm.Sci.; 96 (2007) 2296 - 2309.
- Sarciaux,J.M. and Hageman,M.J.; Effects of Bovine Somatotropin (RbSt) Concentration at Different Moisture Levels on the Physical Stability of

- Sucrose in Freeze-Dried RbSt/Sucrose Mixtures; Journal of Pharmaceutical Sciences; 86 (1997) 365 - 371.
- Schaefer,T. and Woerts,O.; Control of Fluidized Bed Granulation. II. Estimation of Droplet Size of Atomized Binder Solutions; Arch.Pharm.Chemi, Sci.Ed.; 5 (1977) 178 - 193.
- Schaefer,T. and Woerts,O.; Control of Fluidized Bed Granulation. V. Factors Affecting Granule Growth; Arch.Pharm.Chemi, Sci.Ed.; 6 (1978) 409 - 422.
- Schuele,S.; Stabilization of Antibodies in Spray-Dried Powders for Inhalation, Ph.D. Thesis, University of Munich; (2005).
- Shamblin,S.L., Hancock,B.C. and Zografi,G.; Water Vapor Sorption by Peptides, Proteins and Their Formulations; European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics; 45 (1998) 239 - 247.
- Sonner,C., Maa,Y. and Lee,G.; Spray-Freeze-Drying for Protein Powder Preparation: Particle Characterization and a Case Study With Trypsinogen Stability; Journal of Pharmaceutical Sciences; 91 (2002) 2122 - 2139.
- Souillac,P.O., Costantino,H.R., Middaugh,C.R. and Rytting,J.H.; Investigation of Protein/Carbohydrate Interactions in the Dried State. 1. Calorimetric Studies; Journal of Pharmaceutical Sciences; 91 (2002) 206 - 216.
- Tanuma,S., Powell,C.J. and Penn,D.R.; Calculations of Electron Inelastic Mean Free Paths. V. Data for 14 Organic Compounds Over the 50-2000 EV Range; Surface and Interface Analysis; 21 (1994) 165 - 176.

- Tanuma,S., Aso,A., Koizumi,A., Suzuki,M., Tohma,H., Hashimoto,S. and Miura,K.; Development of Evaluation Method of Sample Damage of Organic Material Caused by X-Rays Irradiation During XPS. Results of Round Robin Test; *Journal of Surface Analysis*; 9 (2002) 501 - 509.
- Te Booy,M.P.W.M., De Ruiter,R.A. and De Meere,A.L.J.; Evaluation of the Physical Stability of Freeze-Dried Sucrose-Containing Formulations by Differential Scanning Calorimetry; *Pharmaceutical Research*; 9 (1992) 109 - 114.
- Thiering,R., Dehghani,F., Dillow,A. and Foster,N.R.; Solvent Effects on the Controlled Dense Gas Precipitation of Model Proteins; *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*; 75 (2000) 42 - 53.
- Thiering,R., Dehghani,F., Dillow,A. and Foster,N.R.; The Influence of Operating Conditions on the Dense Gas Precipitation of Model Proteins; *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*; 75 (2000) 29 - 41.
- Tian,P. and Yu,X.; Mechanism of Soft X-Ray Radiation Damage on Glycine by XPS; *Scientia Sinica (English Edition)*; 25 (1982) 176 - 182.
- Timasheff,S.N.; Stabilization of Protein Structure by Solvent Additives; *Pharmaceutical Biotechnology*; 3 (1992) 265 - 285.
- Tzannis,S.T. and Prestrelski,S.J.; Moisture Effects on Protein-Excipient Interactions in Spray-Dried Powders. Nature of Destabilizing Effects of Sucrose; *J Pharm Sci*; 88 (1999) 360 - 370.
- Tzannis,S.T. and Prestrelski,S.J.; Activity-Stability Considerations of Trypsinogen During Spray Drying: Effects of Sucrose; *J Pharm Sci*; 88 (1999) 351 - 359.

- Wang; Instability, Stabilization, and Formulation of Liquid Protein Pharmaceuticals; International Journal of Pharmaceutics; 185 (1999) 129 - 188.
- Wang,W.; Lyophilization and Development of Solid Protein Pharmaceuticals; International Journal of Pharmaceutics; 203 (2000) 1 - 60.
- Wang,W.; Protein Aggregation and Its Inhibition in Biopharmaceutics; International Journal of Pharmaceutics; 289 (2005) 1 - 30.
- Warne,N.W.; Formulations for IL-11;2000-US19347 (2001) 28 - .
- Watano,S., Takashima,H., Sato,Y., Yasutomo,T. and Miyanami,K.; Measurement of Moisture Content by IR Sensor in Fluidized Bed Granulation. Effects of Operating Variables on the Relationship Between Granule Moisture Content and Absorbance of IR Spectra; Chemical & Pharmaceutical Bulletin; 44 (1996) 1267 - 1269.
- Waterman,K.C., Adami,R.C., Alsante,K.M., Hong,J., Landis,M.S., Lombardo,F. and Roberts,C.J.; Stabilization of Pharmaceuticals to Oxidative Degradation; Pharm Dev Technol; 7 (2002) 1 - 32.
- Webb,S.D., Golledge,S.L., Cleland,J.L., Carpenter,J.F. and Randolph,T.W.; Surface Adsorption of Recombinant Human Interferon-Gamma in Lyophilized and Spray-Lyophilized Formulations; Journal of Pharmaceutical Sciences; 91 (2002) 1474 - 1487.
- Werther,J.; Measurement Techniques in Fluidized Beds; Powder Technology; 102 (1999) 15 - 36.
- Wright,J.F.; Bioassays and Biological Stability; Developments in Biological Standardization; 97 (1999) 73 - 80.

- Yeo,S.D., Lim,G.B., Debenedetti,P.G. and Bernstein,H.; Formation of Microparticulate Protein Powders Using a Supercritical Fluid Antisolvent; *Biotechnology and Bioengineering*; 41 (1993) 341 - 346.
- Yokota,H., Saito,H., Masuoka,K., Kaniwa,H. and Shibanuma,T.; Reversed Phase HPLC of Met58 Oxidized RhIL-11: Oxidation Enhanced by Plastic Tubes; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*; 24 (2000) 317 - 324.
- Yu,Z., Johnston,K.P. and Williams,R.O.; Spray Freezing into Liquid Versus Spray-Freeze Drying: Influence of Atomization on Protein Aggregation and Biological Activity; *European Journal of Pharmaceutical Sciences*; 27 (2006) 9 - 18.

Lebenslauf

Persönliches

Matthias Ganz
Geburtstag: 20.07.1975
Geburtsort: Würzburg
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Berufspraxis

Seit 04/2006 Laborleiter in der Abteilung Pharmazeutische Entwicklung bei Sanofi-Aventis in Frankfurt
03/2002-03/2006 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München
05/2001-10/2001 Pharmazie Praktikant in der Abteilung Pharmazeutische Entwicklung bei Bayer in Leverkusen
11/2000-04/2001 Pharmazie Praktikant in der Westend Apotheke Schweinfurt
08/1999-10/1999 Praktikant in der Abteilung Pharmazeutische Entwicklung bei Boehringer Ingelheim in Ingelheim

Wissenschaftliche Tätigkeit

03/2002- Dissertation am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie der Ludwig-Maximilians-Universität München bei Herrn Prof. Dr. W. Frieß

Studium

11/1996-10/2000 Pharmazie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
12/2001 Approbation zum Apotheker

Wehrdienst

1995-96 Jägerlehrbataillon in Hammelburg

Schulbildung

1982-86 Grundschule in Arnstein
1986-95 Johann-Schöner-Gymnasium in Karlstadt
06/1995 Abitur