

STABILISIERUNG VON PHARMAZEUTISCHEN PROTEINLÖSUNGEN DURCH VAKUUMTROCKNUNG

**Verfahrenstechnische Optimierung verschiedener Vakuumtrocknungsverfahren,
Untersuchung von Aggregations-Phänomenen und Evaluierung von Hilfsstoffen**

DISSERTATION

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

vorgelegt von

Matthias Alexander Willmann
aus München

München 2003

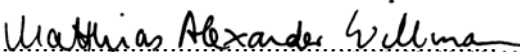
ERKLÄRUNG

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

EHRENWÖRTLICHE VERSICHERUNG

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, am 23.06.2003


.....
Matthias Alexander Willmann

Dissertation eingereicht am:	23.06.2003
1. Gutachter:	Prof. Dr. G. Winter
2. Gutachter:	Prof. Dr. W. Frieß

Tag der mündlichen Prüfung:	15.07.2003
-----------------------------	------------

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. G. Winter am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie des Departments Pharmazie – Zentrum für Pharmaforschung – der Ludwig-Maximilians-Universität München angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt:

- Herrn Prof. Dr. K. Thoma (†) für die Aufnahme in den Arbeitskreis und die übergangsweise Betreuung,
- Herrn Prof. Dr. G. Winter für die Auswahl des Themas, seine wissenschaftliche Anleitung sowie anregende fachliche Kritik und Unterstützung,
- Herrn Prof. Dr. W. Friß für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Weiterhin bedanke ich mich herzlich bei:

- Frau Maria Häringer für die hervorragende Betreuung bei der Literaturbeschaffung,
- Frau Ingrid Hiltmann für die unermüdliche und die gewissenhafte Durchführung von Karl-Fischer-Titrationen und Unterstützung bei der Betreuung im Studenten-Praktikum,
- Herrn Wolfgang Fraunhofer für die AF4-Analytik,
- Herrn Ingo Presser für den langjährigen computertechnischen Support,
- den Kollegen vom AK Winter und AK Friß für zahlreiche fachliche Diskussionen und Anregungen sowie die gute Zusammenarbeit und freundschaftliche Unterstützung,
- den Mitarbeitern von der Elektrowerkstatt und Feinmechanik für die technische Unterstützung (Bau und Reparatur diverser Geräte);

- Fa. Christ für die Leihgabe des RVC,
- Fa. Hettich-Zentrifugen für die Leihgabe des IR-Dancers,
- Fa. Vacuubrand für das Zurverfügungstellen der Vakuumbeschleunigungssoftware,
- Fa. Memmert für Gerätemodifizierung des Vakuumtrockenschrankes,
- Fa. Roche und Fa. Südzucker für Rohstoffspenden;

- Herrn Klaus Hellerbrand für Unterstützung bei der Entwicklung der SEC-Methode,
- dem AK Schnick für die Möglichkeit RD-Messungen durchzuführen,
- Herrn Dr. Norbert Stock (AK Bein) für die Anfertigung von REM-Aufnahmen;

- Frau Isabella Dietrich für die Mithilfe bei Laborversuchen,
- der Seminararbeitsgruppe im WS 02/03: Sabrina Berardi, Stefanie Müller, Susanne Münch, Olivia Wendrich, Alexander Buhl und Markus Elfinger,
- Herrn Dr. Markus Wiedmann und Herrn Fritz Gruber für die gewissenhafte Durchsicht der Arbeit.

Meinen Eltern danke ich besonders herzlich für ihre immerwährende Unterstützung.

**Meinen Eltern
in Liebe und Dankbarkeit
gewidmet**

1. EINLEITUNG.....	1
1.1. Zielsetzung der Arbeit.....	1
1.2. Struktur, Stabilität und Stabilisierung von Proteinen	4
1.2.1. Aminosäuren.....	4
1.2.2. Aufbau von Proteinen	6
1.2.3. Protein-Instabilität und auslösende Faktoren	9
1.2.3.1. Chemische Instabilität	9
1.2.3.2. Physikalische Instabilität	11
1.2.4. Stabilisierungsmöglichkeiten für Proteinarzneistoffe	12
1.2.4.1. Stabilisierung von Proteinen in flüssigen, wässrigen Zubereitungen.....	13
1.2.4.2. Stabilisierung von Proteinen in gefrorenen, wässrigen Zubereitungen.....	15
1.2.4.3. Stabilisierung mittels Trocknungsverfahren.....	15
1.2.4.3.1. Gefriertrocknung	16
1.2.4.3.2. Vakuumtrocknung	18
1.2.4.3.3. Stabilisierung von Proteinen in getrockneten Zubereitungen.....	21
1.2.4.3.4. Einsatz von trockenen Protein-Hilfsstoff-Matrices	23
2. MATERIALIEN UND METHODEN.....	24
2.1. Materialien	24
2.1.1. Proteine	24
2.1.1.1. Rekombinanter Granulocyten-Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF).....	24
2.1.1.2. Rekombinantes humanes Erythropoietin (EPO).....	24
2.1.2. Hilfsstoffe	24
2.1.3. Reagenzien.....	27
2.1.4. Weitere Materialien	28
2.2. Methoden.....	28
2.2.1. Geräte und Verfahren für die Vakuum- und Gefriertrocknung.....	28
2.2.1.1. Rotationsvakuumkonzentrator (RVC).....	28
2.2.1.2. Vakuumtrockenschrank (VTS-1)	29
2.2.1.3. IR-Dancer (IRD).....	30
2.2.1.4. Vakuumtrockenschrank (VTS-2)	31
2.2.1.5. Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4	34
2.2.1.6. Gefriertrocknungsanlage Epsilon 2-12 D Special	34
2.2.1.7. Verwendete Software zur Prozessdokumentation	37

2.2.2.	Allgemeine Verfahren	40
2.2.2.1.	Rezepturherstellung, pH-Wert-Bestimmung und Filtration	40
2.2.2.2.	Rekonstitution von getrockneten Proben.....	40
2.2.2.3.	Durchführung von Einfrier- / Auftau-Zyklen.....	41
2.2.2.4.	Bestimmung des Adsorptionsverhaltens von G-CSF an Glas	41
2.2.2.5.	Einlagerungen	41
2.2.2.6.	Versuche zur Optimierung der Rezeptur	42
2.2.3.	Charakterisierung der Zubereitungen	44
2.2.3.1.	Gravimetrischer Wasserverlust.....	44
2.2.3.2.	Wassergehalt nach Karl-Fischer-Titration.....	44
2.2.3.3.	Differentialscanningcalorimetrie (DSC).....	45
2.2.3.4.	Prüfung auf sichtbare Partikel	45
2.2.3.5.	Prüfung auf nicht sichtbare Partikel	45
2.2.3.6.	UV-Bestimmung des Proteingehaltes.....	46
2.2.3.7.	Weitwinkelröntgendiffraktometrie (RD).....	46
2.2.3.8.	SDS-Page-Gelelektrophorese	47
2.2.3.9.	Größenausschlusschromatographie (SEC)	47
2.2.3.10.	Asymmetrische Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung (AF4) + MALLS.....	52
2.2.3.11.	Rasterelektronenmikroskopie	53
3.	OPTIMIERUNG DER VAKUUMTROCKNUNG	54
3.1.	Ergebnisse mit dem Rotationsvakuumkonzentrator.....	54
3.2.	Ergebnisse mit dem Vakuumtrockenschrank VTS-1.....	58
3.3.	Ergebnisse mit dem IR-Dancer	61
3.4.	Ergebnisse im Vakuumtrockenschrank VTS-2	65
3.5.	Optimierung der Vakuumtrocknung im VTS-2	68
3.6.	Optimierung der Vakuumtrocknung im VTS-2 durch Spülzyklen.....	70
3.7.	Vakuumtrocknung im VTS-2 bei verschiedenen Trocknungstemperaturen	72
3.8.	Zusammenfassung der Optimierung der Vakuumtrocknung.....	75

4.	AGGREGATIONS-VERHALTEN VON G-CSF.....	77
4.1.	Auftreten von Aggregation bei der Trocknung von G-CSF-Rezepturen.....	77
4.2.	Einfrier- / Auftau-Versuche von G-CSF-Proben.....	81
4.3.	Auftreten von Aggregation bei verschiedenen Trocknungsverfahren	85
4.4.	Vergleichsuntersuchungen zur Aggregation mittels SEC und AF4	90
4.5.	Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der Aggregation von G-CSF	95
4.6.	Stabilitätsuntersuchung von getrockneten und flüssigen G-CSF-Proben.....	101
4.7.	Stabilitätsuntersuchung von wieder befeuchteten getrockneten G-CSF-Proben.....	110
4.8.	Zusammenfassung des Aggregations-Verhaltens von G-CSF	115
5.	STABILITÄTSUNTERSUCHUNGEN	118
5.1.	Ergebnisse der Placebo-Versuche	119
5.2.	Stabilität von G-CSF-Zubereitungen.....	121
5.2.1.	G-CSF-Rezepturen mit Agenamalt mit und ohne Phenylalanin-Zusatz	122
5.2.2.	G-CSF-Rezepturen mit Raftilose mit und ohne Phenylalanin-Zusatz.....	125
5.2.3.	G-CSF-Rezepturen mit Trehalose mit und ohne Phenylalanin-Zusatz	129
5.2.4.	G-CSF-Rezepturen mit Saccharose-Arginin-Phenylalanin	136
5.2.5.	G-CSF-Rezepturen mit HP- β -cyclodextrin mit und ohne Phenylalanin-Zusatz	138
5.3.	Stabilität von EPO-Zubereitungen	140
5.3.1.	EPO-Rezepturen mit Agenamalt mit und ohne Phenylalanin-Zusatz	140
5.3.2.	EPO-Rezepturen mit Raftilose mit und ohne Phenylalanin-Zusatz	142
5.3.3.	EPO-Rezepturen mit Trehalose mit und ohne Phenylalanin-Zusatz	145
5.3.4.	EPO-Rezepturen mit Saccharose-Arginin-Phenylalanin	147
5.3.5.	EPO-Rezepturen mit HP- β -CD mit und ohne Phenylalanin-Zusatz	149
5.4.	Röntgendiffraktometrie und Rasterelektronenmikroskopie getrockneter Proben...	151
5.5.	Zusammenfassung der Stabilitätsuntersuchungen.....	155
6.	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE.....	157
7.	LITERATURVERZEICHNIS	161
8.	ANLAGEN	172

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Symbole

A ₂₁₅ / A ₂₈₀	Absorption bei 215 bzw. 280 nm
AF4	Asymmetrische Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung
AM	Agenamalt (Maltodextrin)
Arg	Arginin
AS	Aminosäuren
Da	Dalton
DE	Dextrose-Äquivalent
DP	durchschnittlicher Polymerisationsgrad
DSC	Differentialscanningcalorimetrie
DTT	Dithiothreitol
EAZ	Einfrier-Auftau-Zyklen
EPO	Erythropoietin
G-CSF	Granulocyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GPM	α -D-Glucopyranosyl-1,6-mannitol
GPS	α -D-Glucopyranosyl-1,6-sorbitol
GT	Gefriertrocknung bzw. Gefriertrocknungsanlage
Gua	Guanidinhydrochlorid
HP- β -CD	Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (kurz als CD abgekürzt)
IRD	IR- Dancer
J	Joule
KF	Karl-Fischer-Titration
KS	Kühlschrank-Temperatur
MALLS	Multi angle laser light scattering (Mehrkanallichtstreuung)
Mark 12	Gelelektrophorese Marker mit 12 Eichproteinen
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure-Monohydrat
mM	millimolar
MV	Massenverlust
P, Phe	Phenylalanin
Ph. Eur.	Europäisches Arzneibuch
R	Raftilose P 95 (Oligofruktose)
RD	Röntgendiffraktometrie
REM	Rasterelektronenmikroskop
r.F.	relative Feuchte
RL	Rote Liste
RT	Raumtemperatur
RVC	Rotationsvakuumkonzentrator
RWG	Restwassergehalt
S	Saccharose
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEC	Größenausschlusschromatographie
T	Temperatur bzw. Trehalose
T _g / T _g '	Glasübergangstemperaturen
T _m	Schmelztemperatur
VT	Vakuumentrocknung
VTS	Vakuumentrockenschrank
VTS-1 / VTS-2	Vakuumentrockenschrank, Fa. Heraeus / Fa. Memmert
WV	Wasserverlust

1. EINLEITUNG

1.1. Zielsetzung der Arbeit

Am 25. April 2003 feierte die von Francis Crick und James Watson in der Zeitschrift Nature publizierte Beschreibung der DNA-Doppelstrang-Struktur ihr fünfzigjähriges Jubiläum. Mit ihrer Entdeckung schufen die beiden Forscher einen der bedeutendsten Meilensteine im Bereich der Biowissenschaften. Jeweils drei aufeinander folgende Basenpaare am DNA-Strang ergeben ein Basentriplett, das für eine Aminosäure codiert. Durch die Aneinanderreihung einzelner Aminosäuren entstehen Proteine, welche die Grundsubstanz allen Lebens darstellen. Ein Gen bezeichnet einzelne Abschnitte auf der DNA, in denen die Information für den Aufbau eines Proteins gespeichert ist. Die eigentliche Proteinbiosynthese erfolgt in den Ribosomen am Endoplasmatischen Retikulum.

Proteine erfüllen in einem Organismus eine Vielzahl von Aufgaben [1]:

- Strukturbildung/-erhaltung (z. B. Kollagen)
- Transport (z. B. Hämoglobin)
- Schutz/Abwehr (z. B. Immunglobuline)
- Steuerung und Regelung (z. B. Insulin)
- Katalyse/ Enzyme (z. B. LDH)
- Bewegung (z. B. Myosin)
- Speicherung (z. B. Muskelproteine)

Infolge des ubiquitären Vorkommens im Organismus stellen Proteine Schlüssel-Bausteine für lebenswichtige Prozesse dar, die im Falle eines Mangels nur noch eingeschränkt oder bei völligem Fehlen der Proteine nicht mehr ablaufen können. Als Folge daraus resultieren Krankheiten, die bis zu lebensbedrohlichem Ausmaß reichen [2].

Um all diesen verschiedenen Aufgaben gewachsen zu sein, müssen Proteine spezifisch aufgebaut und dem sie umgebenden Milieu angepasst sein. Damit ergibt sich für die Proteine ein Bereich mit optimaler Funktions- und Wirkungsweise. Die räumliche Anordnung des Proteins, in der es seine Funktion optimal ausübt, wird als native Struktur bezeichnet. Ändert sich die Struktur, droht eine Einschränkung der Funktion, Inaktivierung oder Zerstörung. Proteine reagieren aufgrund ihrer Struktur besonders empfindlich auf die sie umgebenden Faktoren wie Licht, Sauerstoff, Temperatur oder pH-Wert [3-5].

Die Gewinnung, Herstellung, Lagerung und therapeutische Anwendung verschiedenster Proteine wird seit langem erforscht. Erst die Fortschritte in der Biochemie und die Einführung der Biotechnologie und Gentechnik öffneten den Weg für eine breitere Nutzung proteinogener Arzneistoffe. Die ersten Schritte der Substitution fehlender Proteine wurden mit aus menschlichem Blut, Urin oder tierischen Organismen gewonnenen Proteinen gemacht. Sie waren allerdings nur sehr eingeschränkt erfolgreich, da bei körpereigenen Stoffen nur geringe Ausbeuten möglich waren und körperfremde Proteine vom Körper als Fremdproteine erkannt und eliminiert werden [2]. Die Gewinnung und Herstellung maßgeschneiderter, hochreiner Proteine ist inzwischen mit modernen Verfahren im industriellen Maßstab möglich. Bis Ende 2002 erreichten 88 Arzneimittel auf Basis rekombinanter Proteine und monoklonaler Antikörper die Marktreife [6]. Die Entwicklung, Nutzung und Instandhaltung solcher Herstellungsverfahren ist überaus kostenintensiv. Um eine kostendeckende Auslastung der Produktionseinheiten zu erreichen, muss in ausreichend großen Chargen produziert werden. Zwischen dem Zeitpunkt der Herstellung und der letztendlichen Applikation beim Patienten liegt stets eine erhebliche Zeitspanne. Deshalb muss das Protein während seiner Lagerung eine ausreichende Stabilität aufweisen.

Oberstes Ziel ist es, die Stabilisierung der Proteine in ihrer nativen Struktur zu erreichen. Ein Weg stellt die Verwendung verschiedener Hilfsstoffe wie Zucker, Aminosäuren, Proteine, Polyole zur Stabilisierung von Proteinen im flüssigen oder festen Zustand dar [7]. Durch Erniedrigung der Lagertemperatur, d.h. Lagerung im Kühlschrank oder Einfrieren, kann die Reaktionsgeschwindigkeit für Abbaureaktionen deutlich reduziert werden. Eine noch bessere Stabilisierung wird durch Entfernung des Lösungsmittels unter Zuhilfenahme verschiedener Trocknungsverfahren erzielt [7,8].

Als Standardverfahren findet die Gefriertrocknung von Proteinzubereitungen Anwendung. Trotz hoher Kapitalkosten, großem Energieeinsatz und einer langen Prozessdauer wird das technisch aufwendige Verfahren benützt. Die genannten Nachteile werden durch die Möglichkeit kompensiert, unter sterilen Bedingungen eine vollständige Herstellung zu gewährleisten. Die Gefriertrocknung liefert Produkte, die sich durch poröse Strukturen auszeichnen und sich dadurch schnell und vollständig rehydratisieren lassen [7,9].

Geeignete Hilfsstoffe sind für die Ausbildung einer großen Oberfläche während des Einfrier- und Trocknungsprozesses sehr wichtig. Der Einfriervorgang stellt bei der Gefriertrocknung trotz Zusatz von Stabilisatoren einen Stressfaktor für die Proteine dar. Sogenannte Cryoprotektanten sollen die Proteine vor Schädigungen beim Einfriervorgang, z. B. pH-shifts oder Aufkonzentrierung von Salzen, schützen. Die Aufgabe der Lyoprotektanten ist es, die Proteine im trockenen Zustand vor Instabilitätsreaktionen zu bewahren. Durch Zusatz von Gerüstbildnern können Proteinanzwemittel, die häufig in Dosierungen von wenigen $\mu\text{l/ml}$ bzw. $\mu\text{g/g}$ ihren therapeutischen Zweck erfüllen, als stabile, trockene Zubereitungen hergestellt werden. Die Gerüstbildner liefern die große Oberfläche und unterstützen dadurch die Trocknung der Proteine. Die zu trocknende Lösung setzt sich aus einer Mischung von Protein, Gerüstbildner und Puffern bzw. Salzen zur Einstellung eines optimalen Milieus zusammen.

Dieses Gemisch bestimmt in seiner Kombination die Parameter Trocknungszeit bzw. Trocknungsgeschwindigkeit und Trocknungsmasse. Andererseits kann durch Wahl der Prozessbedingungen der erreichbare physikalische Zustand der Produkte beeinflusst werden. Gegenüber dem kristallinen Zustand zeigt der amorphe Zustand einer getrockneten Hilfsstoffzubereitung für Proteine eine wesentlich größere Stabilität. Proteine kristallisieren bei der Trocknung nicht, sondern sie bilden amorphe Strukturen aus. Diese können durch eine amorph aufgebaute Umgebung besonders gut stabilisiert werden [10]. Im amorphen Zustand besteht die Möglichkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen der Proteinoberfläche und den Lyoprotektanten aufgrund räumlicher Nähe in größerem Umfang als bei kristallinen Strukturen mit festgefügttem Kristallgitter [11,12]. Durch das Erreichen des amorphen Zustandes kommt es durch starken Viskositätsanstieg zu einer Fixierung der Proteine. Daher sind zur Stabilisierung von Proteinen besonders amorphe Gerüste geeignet [8,13,14]. Die verwendeten Verfahrensparameter und die Auswahl der Hilfsstoffe beeinflussen die Produkteigenschaften der Trocknungsprodukte ganz wesentlich [7,14-16].

Wie Mattern zeigte, ist es auch mit Vakuumtrocknung möglich lagerstabile, trockene Proteinzubereitungen herzustellen [17-20]. Da bei der Vakuumtrocknung im Vergleich zur Gefriertrocknung nur der Einfrierschritt entfiel, waren auch hier eine sterile Herstellung, genaue, saubere Dosierung im Endbehälter und Verpackung in den bisher genutzten Anlagen möglich. Die Energie für den Einfriervorgang konnte eingespart werden, und der damit zusammenhängende Einfrierstress für das Protein entfiel. Ein anfänglicher Nachteil, dass die getrockneten Zubereitungen keine poröse, sondern eine kompakte Struktur aufwiesen, wurde durch den Zusatz von Aminosäuren bzw. dem Gemisch zweier Aminosäuren, insbesondere Phenylalanin und Arginin, ausgeglichen. Die Aminosäuren sind für das Erreichen eines teilamorphen/ teilkristallinen Zustandes verantwortlich. Sie bewirken durch die Vergrößerung

der Oberfläche und Reduzierung der kompakten Strukturanteile eine Absenkung der hohen Restfeuchten von ca. 5-10 % bei den Zuckern zu Restfeuchten von ca. 1-3 % bei den Zucker-Aminosäure-Mischungen [17].

Das **erste Ziel dieser Arbeit** war es, die Vakuumtrocknung auf ihre Leistungsfähigkeit zu untersuchen, sie verfahrenstechnisch zu optimieren und das Verfahren als Alternative zur Gefrier-trocknung weiterzuentwickeln.

Um diese Fragestellung zu beantworten, wurden u.a. zwei Geräte verwendet, deren eigentliches Einsatzgebiet die Aufkonzentrierung von Proben ist. Um möglichst schnell, aber gleichzeitig schonend Proben zu trocknen, wurde versucht, diese mit den Geräten nicht nur aufzukonzentrieren, sondern vollständig zu trocknen. Die beiden Geräte benutzen verschiedene Techniken, um das Ziel einer schnellen, sicheren und schonenden Aufkonzentrierung zu erreichen.

Beim Rotationsvakuumkonzentrator RVC wird die zu trocknende Lösung durch Verwendung einer Zentrifuge in das Trocknungsgefäß gepresst. Das Auftreten von Siedeverzug soll dadurch bei den Vakuumbedingungen vermindert werden. Die Zufuhr von Wärme erfolgt über IR-Wärmelampen.

Der IR-Dancer verwendet eine andere Methode zur Aufkonzentrierung. Die Flüssigkeit wird in Vibration versetzt, wodurch die Verdunstungsrate aufgrund der vergrößerten Oberfläche im Vakuum ansteigen soll. Die Zufuhr von Wärme erfolgt auch hier über IR-Wärmelampen bzw. wahlweise oder auch zusätzlich über einen beheizbaren Wärmemantel.

Neben diesen beiden speziellen Geräten wurden Vakuumtrockenschränke und Gefrier-trocknungsanlagen zur Vakuumtrocknung benutzt.

Im Verlauf der Trocknungsoptimierung wurden Aggregations-Phänomene während der Vakuumtrocknung von G-CSF-Rezepturen beobachtet.

Als **zweites Ziel dieser Arbeit** wurde versucht, das Verhalten von G-CSF im Verlauf der Trocknungsstadien durch verschiedene Versuchsansätze und mittels mehrerer analytischer Verfahren näher zu charakterisieren. Schließlich wurden flüssige, aufkonzentrierte, getrocknete und rückbefeuchtete Proben auf ihr Aggregations-Verhalten während der Lagerung bei verschiedenen Temperaturen bzw. verschiedenen relativen Feuchten untersucht.

Da Proteine nicht ohne Zusatz von Hilfsstoffen stabilisiert werden können, ist die Auswahl geeigneter Substanzen von entscheidender Rolle. Die in den Optimierungs-Versuchen der Vakuumtrocknung verwendeten Rezepturen knüpfen an bereits erprobte Hilfsstoffkombinationen an [17].

Als **drittes Ziel dieser Arbeit** wurden neue Hilfsstoffe und deren Kombinationen auf ihre Eignung zur Stabilisierung von Proteinen evaluiert.

Flüssige, gefrier- und vakuumgetrocknete Proben wurden einem 12-wöchigen Kurzbelastungs-stresstest unterzogen. Neben dem bisher benutzten Modellprotein G-CSF kam EPO hinzu. Zwei unterschiedliche pH-Werte bei den G-CSF-Rezepturen stellten eine weitere Variation der unter-suchten Rezepturen dar. Durch Rezepturen mit und ohne Phenylalanin-Zusatz konnte die von Mattern [17] entdeckte Trocknungsoptimierung der Vakuumtrocknung an neuen Hilfsstoffen/-Hilfsstoff-Kombinationen weiterentwickelt werden. Die Rezepturen wurden gefrier- und vakuumgetrocknet, und die Leistungsfähigkeit der Vakuumtrocknung gegenüber der Gefrier-trocknung wurde bestimmt.

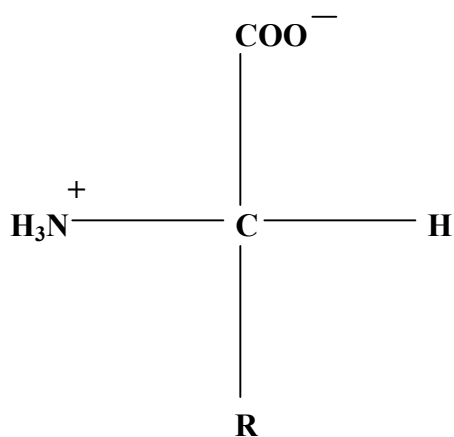
1.2. Struktur, Stabilität und Stabilisierung von Proteinen

1.2.1. Aminosäuren

Aminosäuren sind bifunktionelle Moleküle und gehören der chemischen Klasse der α -Aminocarbonsäuren an. Zum Grundgerüst jeder der 20 proteinogenen Aminosäuren gehört eine Carboxy- (-COOH) und eine Aminogruppe (-NH₂). Diese beiden Gruppen befinden sich neben einem Wasserstoffatom und einer Seitenkette an dem sogenannten α -C-Atom. Die einzelnen Aminosäuren unterscheiden sich nur in der Seitenkette am α -C-Atom (**Abb. 1-1**). Alle Aminosäuren sind mit Ausnahme von Glycin chiral und kommen in der Natur nur in der L-Konfiguration vor. Glycin trägt ein zweites Wasserstoffatom am α -C-Atom und ist deshalb nicht chiral.

Durch die saure und basische Gruppe zeigen Aminosäuren amphoterer Verhalten und liegen als zwitterionisches Ammoniumcarboxylat im flüssigen und festen Zustand vor. Die Aminosäuren lassen sich in Aminosäuren mit hydrophobem und hydrophilem Seitenrest und weiter in saure, basische und neutrale unterteilen [21].

Die Seitenketten der Aminosäuren beeinflussen entscheidend die chemische Stabilität von Proteinen. In **Abb. 1-2** sind die Seitenketten der proteinogenen Aminosäuren abgebildet und nach ihrer chemischen Stabilität eingeteilt [22].



(Rest R siehe **Abb. 1-2**)

Abb. 1-1: Aufbau der Aminosäuren

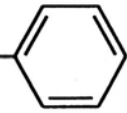
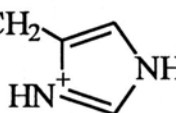
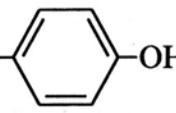
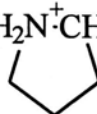
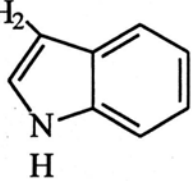
Chemisch stabile Aminosäuren		Chemisch instabile Aminosäuren	
Seitenkette	Aminosäure (Abkürzung)	Seitenkette	Aminosäure (Abkürzung)
-H	Glycin (Gly oder G)	$-\text{CH}_2\text{-COO}^-$	Asparaginsäure (Asp oder D)
$-\text{CH}_3$	Alanin (Ala oder A)	$-\text{CH}_2\text{-CONH}_2$	Asparagin (Asn oder N)
$-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	Valin (Val oder V)	$-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CONH}_2$	Glutamin (Gln oder E)
$-\text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$	Leucin (Leu oder L)	$-\text{CH}_2\text{-OH}$	Serin (Ser oder S)
$-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2\text{-CH}_3$	Isoleucin (Ile oder I)	$-\text{CH}(\text{OH})\text{-CH}_3$	Threonin (Thr oder T)
$-\text{CH}_2$ - 	Phenylalanin (Phe oder F)	$-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-CH}_3$	Methionin (Met oder M)
$-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}^-$	Glutaminsäure (Glu oder E)	$-\text{CH}_2\text{-SH}$	Cystein (Cys oder C)
$-\text{CH}_2\text{-(CH}_2)_3\text{-NH}_3^+$	Lysin (Lys oder K)		Histidin (His oder H)
$-\text{CH}_2\text{-(CH}_2)_2\text{-NH-CH=NH}_2^+$ NH_2	Arginin (Arg oder R)	$-\text{CH}_2$ - 	Tyrosin (Tyr oder Y)
$\text{H}_2\text{N}^+\text{CH-COO}^-$ 	Prolin (Pro oder P)	$-\text{CH}_2$ - 	Tryptophan (Trp oder W)

Abb. 1-2: Übersicht über die Seitenketten der 20 proteinogenen Aminosäuren [22]

1.2.2. Aufbau von Proteinen

Die Proteine gehören neben den Kohlenhydraten, Lipiden und Nukleinsäuren zu den Grundbausteinen einer jeden Zelle. Proteine stellen Polypeptide dar, deren Monomere die Aminosäuren sind.

Beschreiben lassen sich Proteine aufgrund ihrer Strukturen (Abb. 1-6). Durch die Reihenfolge der einzelnen Aminosäuren (Aminosäuresequenz) in einem Protein ist dessen **Primärstruktur** definiert. Zur Ausbildung dieser Aminosäurekette kommt es durch die Kondensationsreaktion zwischen einer α -Carbonylgruppe und der α -Aminogruppe der jeweils nächsten Aminosäure (Abb. 1-3). Die entstehenden Peptid-Bindungen zwischen den Aminosäuren sind durch Resonanzstrukturen stabilisiert und erlauben keine freie Rotation der Substituenten mehr (Abb. 1-4, Abb. 1-5) [1].

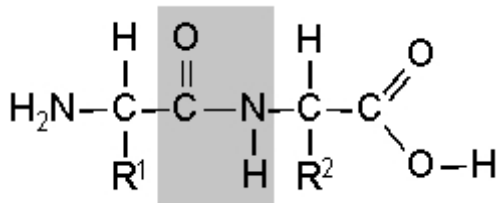


Abb. 1-3: Peptid-Bindung [23]

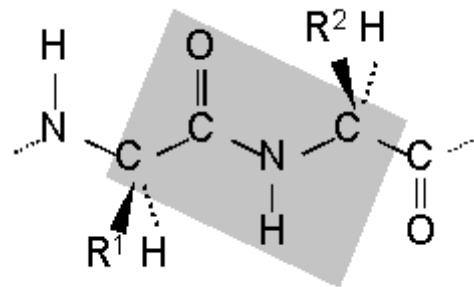


Abb. 1-4: Peptid-Bindung ohne freie Rotation [24]

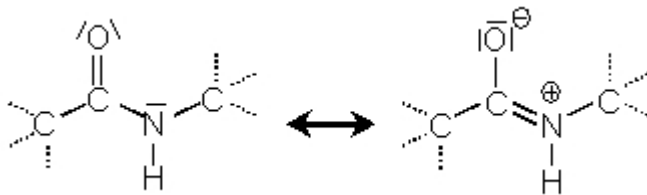


Abb. 1-5: Mesomerie der Peptid-Bindung [24]

Aufgrund dieser Einschränkung hinsichtlich der räumlichen Anordnung kommt es bei geeigneter Aminosäuresequenz zur Ausbildung größerer Strukturen in Form einer rechtswendigen Schraube (Helixstruktur) oder durch Zusammenlagerung mindestens zweier Ketten zu einem ebenen Gebilde (Faltblattstruktur). Neben diesen beiden bekanntesten Strukturen gibt es noch weitere Möglichkeiten zur Ausbildung der **Sekundärstruktur**. Allen gemeinsam ist die Stabilisierung der Strukturen durch Wasserstoffbrückenbindungen. Faserproteine zeigen dieses Bauprinzip aus Helices und Faltblattstrukturen. [1].

Globuläre Proteine weisen wegen ihrer kugelförmigen Gestalt auch **Tertiärstrukturen** auf. Diese werden durch die räumliche Anordnung von Schrauben und Faltblattstrukturen zueinander innerhalb einer Molekülkette definiert. Zur Stabilisierung der Tertiärstruktur treten neben Wasserstoffbrückenbindungen (hauptsächlich für die Sekundärstruktur) Ionenbindungen, charge-transfer-Komplexe oder kovalente Bindungen wie Disulfid-, Ester- oder Säureamidbindungen auf. Bei wasserlöslichen Proteinen sind die Aminosäuren mit geladenen oder polaren Gruppen nach außen gewandt, während die Aminosäuren mit apolaren Gruppen einen hydrophoben inneren Kern bilden [1].

Unter der **Quartärstruktur** versteht man schließlich die räumliche Anordnung mehrerer identischer oder verschiedener Peptidketten in einem globulären Protein zueinander. Die einzelnen Peptidketten bilden in dem Gesamtprotein sogenannte selbständige Untereinheiten [1].

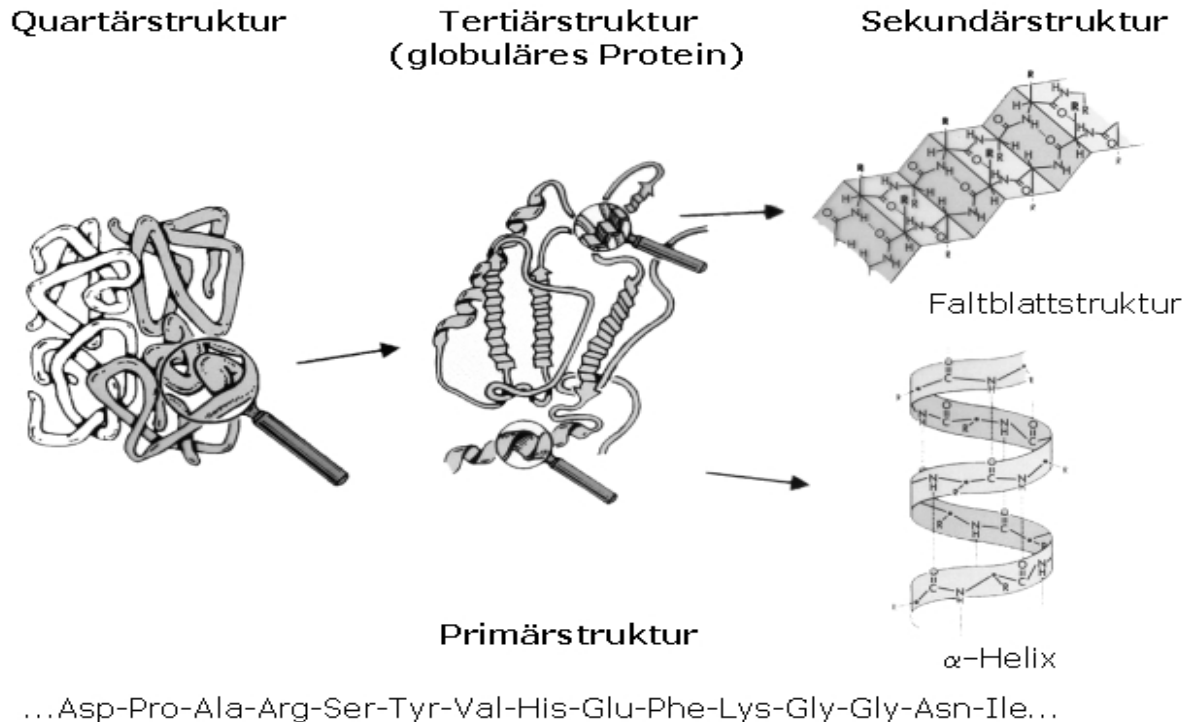


Abb. 1-6: Übersicht über die Proteinstruktur [25]

In dieser Arbeit kamen G-CSF und EPO als Modellproteine zum Einsatz.

Rekombinanter humaner Granulocyten-Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF)

In dieser Arbeit wurde die nicht-glycosilierte Variante des humanen Granulocyten-Kolonie-stimulierenden Faktors verwendet. G-CSF ist unter dem Wirkstoffnamen Filgrastim als Fertigarzneimittel Neupogen® der Fa. Amgen auf dem Markt.

Das Protein Filgrastim besitzt aus klonierungstechnischen Gründen 174 Aminosäuren und trägt zusätzlich Methionin an seinem N-Terminus (Abb. 1-7). In dieser Arbeit wurde G-CSF mit 174 AS ohne N-terminales Methionin eingesetzt. Dieses G-CSF ist 18,8 kDa schwer und wird mittels E. coli-Zellen gewonnen. Zwischen den Aminosäuren 36 und 42 sowie 64 und 74 stabilisieren zwei Disulfidbrücken die Sekundärstruktur. In Position 17 befindet sich ein ungepaartes Cystein. Die angegebenen Positionen beziehen sich auf die 174-Aminosäurenform.

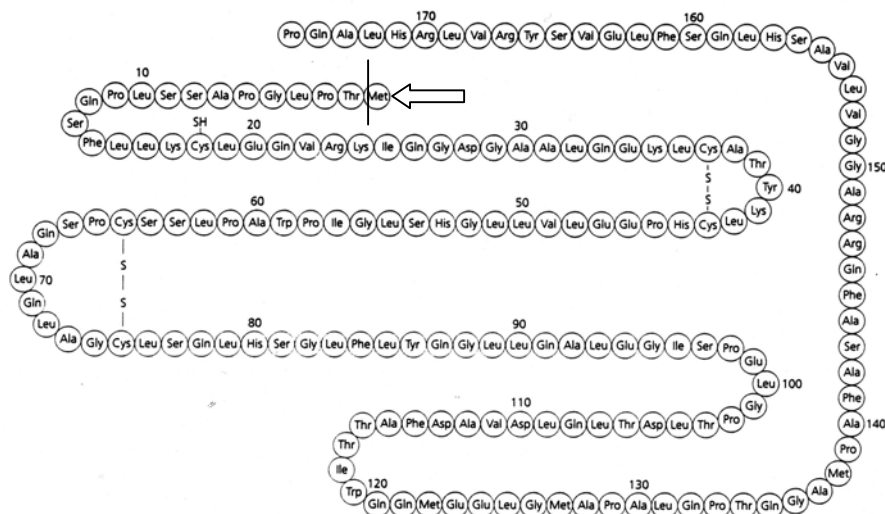


Abb. 1-7: Primärsequenz von G-CSF (Filgrastim) in der 175 AS-Form [26]

Neupogen® ist für die Therapie von Neutropenie, einem Mangel an neutrophilen Granulocyten, zugelassen. Diese tritt bei Chemotherapie oder Zytostatikagabe bei Tumorbehandlung oder nach Knochenmarkstransplantationen auf [27].

Neben Filgrastim befinden sich zwei weitere G-CSF-Fertigarzneimittel auf dem Markt:

- Lenograstim mit dem Handelsnamen Granocyte® von der Fa. Chugai Pharma ist die glykosilierte Form des humanen G-CSF und wird aus Ovarial-Zellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) gewonnen [28].
- Pegfilgrastim mit dem Handelsnamen Neulasta®, Fa. Amgen, stellt die Weiterentwicklung von Neupogen® durch Pegylierung von Filgrastim dar. Durch die Pegylierung kann die Halbwertszeit von 4 bis 6 Stunden auf 15 bis 80 Stunden verlängert werden [29].

Rekombinantes humanes Erythropoietin (EPO)

In dieser Arbeit wurde Erythropoietin in Form des Wirkstoffs Epoetin-beta benutzt. Dieses ist in dem Fertigarzneimittel NeoRecormon® der Fa. Roche enthalten.

Durch die Herstellung mittels CHO-Zellen wird ein 34 kDa schweres Glykoprotein aus 165 Aminosäuren und einem Kohlenhydratanteil von ca. 40 % gewonnen. An den Aminosäure-Positionen 51, 65 und 110 sind drei der vier Kohlenhydratketten N-glykosidisch und an Serin in Position 153 ist die vierte Kohlenhydratkette O-glykosidisch geknüpft.

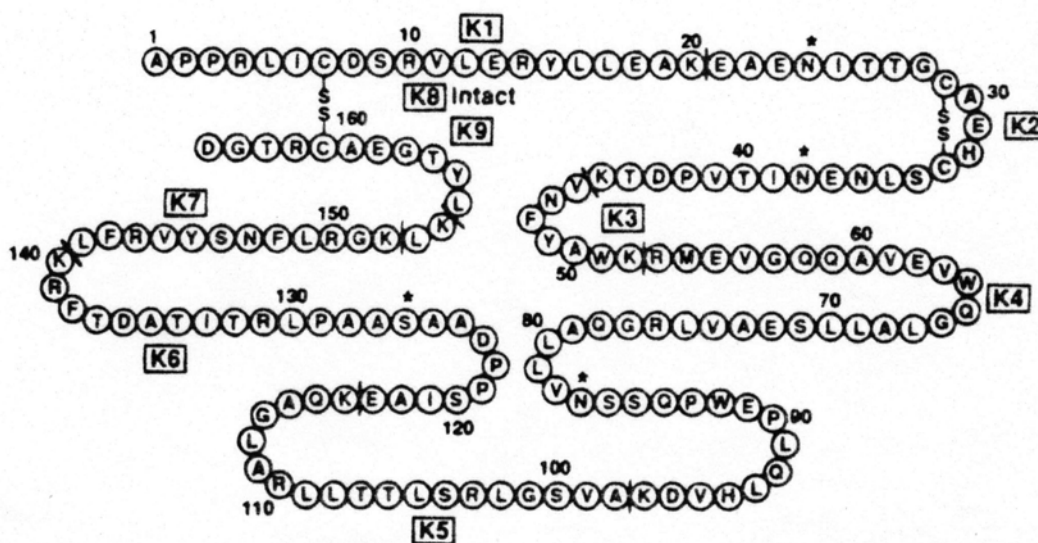


Abb. 1-8: Primärsequenz von EPO [30]

NeoRecormon® ist u.a. zur Therapie von Anämie zugelassen [27].

Neben Epoetin beta befinden sich drei weitere EPO Fertigarzneimittel auf dem Markt:

- Epoetin-alfa wird von Janssen Cilag aus CHO-Zellen gewonnen und heißt als Fertigarzneimittel Erypo® [27].
- Darbepoetin alfa wird von Amgen unter dem Handelsnamen Aranesp® vertrieben. Das Protein besitzt 5 Kohlenhydratketten [31].
- Epoetin-delta wird als Dynepo® von Aventis S.A. in den Handel gebracht [32].

1.2.3. Protein-Instabilität und auslösende Faktoren

Aufgrund ihres Aufbaus zeigen Proteine zahlreiche Instabilitäten, die in chemische und physikalische Instabilitäten differenziert werden können. Bei der chemischen Instabilität kommt es durch eine chemische Reaktion zur Veränderung der Primärstruktur. Dagegen wird bei der physikalischen Instabilität die räumliche Anordnung der Proteinketten zueinander verändert. Dies kann reversibel aber auch irreversibel sein. Eine kurze Übersicht stellt die verschiedenen Instabilitätsreaktionen gegenüber [33-35].

Chemische Instabilität:

- Hydrolyse
- Deamidierung
- Oxidation
- Inkorrekte Disulfidbrückenbildung
- Spaltung von Disulfidbrückenbindungen
- β -Eliminierung
- Racemisierung, Isomerisierung
- Maillard Reaktion

Physikalische Instabilität:

- Verlust der Sekundär- und/oder Tertiärstruktur (Denaturierung)

mögliche Folgereaktionen:

- Dimer-Bildung
- Aggregation
- Präzipitation
- Adsorption an Oberflächen

Als auslösende Faktoren für die genannten Instabilitätsreaktionen kommen unter anderem in Frage [34,35]:

Änderung des/r:

- pH-Wertes
- Lösungsmittels
- Ionenstärke

Zusatz von:

- Metallionen
- denaturierenden Reagenzien

Einfluss von:

- Temperatur
- Druck
- Scherkräften

1.2.3.1. Chemische Instabilität

• Hydrolyse

Die Säureamidstrukturen der Peptid-Bindungen in den Proteinen können sauer und basisch hydrolysiert werden, wobei ein direkter Zusammenhang zwischen der Hydrolysegeschwindigkeit und der Konzentration der Hydronium- bzw. Hydroxyl-Ionen besteht. Die meisten Peptid-Bindungen verhalten sich relativ stabil, außer bei Anwesenheit von Asparaginsäure. Diese wird bis zu 100 Mal schneller als alle anderen hydrolysiert. Über eine Succinimid-Zwischenstufe folgen der Hydrolyse zum einen Racemisierung oder zum anderen Isomerisierung der Asparaginsäure [22,34].

• Deamidierung

Die Deamidierung ist ein säure-/basen-katalysierter Prozess. Während der Deamidierung kommt es unter Abspaltung von Ammoniak zu einer Hydrolyse des Säureamids zur freien Carbonsäure. Die Seitenketten von Asparagin bzw. Glutamin sind am meisten von dieser Reaktion betroffen, wobei Asparagin empfindlicher als Glutamin reagiert. Obwohl Deamidierung eine Hydrolyse-Reaktion ist, soll es trotz Entfernung des Reaktionsmediums Wasser auch im trockenen Zustand zu Deamidierung kommen [34-37].

- Oxidation

Die Seitenketten der Aminosäuren Methionin, Cystein, Tryptophan, Tyrosin und Histidin sind bevorzugte Stellen in Proteinen für Oxidation im flüssigen wie im festen Zustand. An den schwefelhaltigen Aminosäuren können Oxidationen mit Luftsauerstoff ablaufen. Aus Methionin wird dadurch Methioninsulfoxid. Durch Oxidation können inter- und intramolekulare Disulfidbrücken geknüpft werden, die zur Bildung kovalenter Aggregate führen. Proteine, die ungepaartes Cystein enthalten, sind von der Oxidation stärker bedroht und sollten unter Stickstoffbegasung hergestellt und verpackt werden. Für die Oxidation spielt der Ort der oxidationsempfindlichen Aminosäuren eine große Rolle. Sofern sie sich im Inneren des Proteins befinden, können sie für Oxidation nur teilweise zugänglich sein. Autooxidation, reaktive Sauerstoffspezies und Spuren von Metallionen können weitere Faktoren für Oxidation sein [34-37].

- Veränderung an Disulfidbrücken

Disulfidbrücken tragen viel zur Stabilisierung der dreidimensionalen Struktur und somit zur biologischen Aktivität des Proteins bei. In neutraler und basischer Umgebung greifen freie Thiolgruppen in Form von Thiolationen nucleophil am Schwefelatom bestehender Disulfidbrücken an. Unter Abspaltung eines Thiols bildet sich eine neue Disulfidbrücke aus. Diese Reaktion setzt sich in einer Kettenreaktion fort. Im Säuren wird ein Schwefelatom der Disulfidbrücke von einem Proton elektrophil angegriffen. Durch Spaltung der Disulfidbrücke bilden sich eine neutrale SH-Gruppe und ein Sulfoniumkation, welches erneut eine Disulfidbrücke spalten kann [35].

- Racemisierung, Isomerisierung

Alle Aminosäuren mit Ausnahme des Glycin sind chiral und können durch basenkatalysierte Reaktion über ein nichtchirales Carbanion in ihr D-Enantiomer umgewandelt werden. Dies kann einerseits den Verlust biologischer Aktivität, andererseits eine erhöhte Stabilität des Proteins und eine größere Stabilität gegen proteolytische Enzyme zur Folge haben [35,36].

- β -Eliminierung

Bei hohen Temperaturen sowie bei niedrigen Temperaturen und gleichzeitig hohen pH-Werten erfolgt die Spaltung von Disulfidbrücken durch β -Eliminierung. Cystein, Serin, Threonin, Phenylalanin und Lysin können in basischer Umgebung einer β -Eliminierung unterliegen. Analog der Racemisierung entsteht im ersten Schritt durch Abspaltung des Protons am α -Kohlenstoff ein Carbanion. Dieses stabilisiert sich bei der β -Eliminierung durch Abspaltung der am α -Kohlenstoff sitzenden Abgangsgruppe. Diese Reaktion wird in vielen Fällen durch den pH-Wert, die Temperatur und Metallionen beeinflusst [35,36].

- Maillard Reaktion

Reduzierende Zucker wie z. B. Maltose, Lactose und Glucose können mit freien Aminogruppen unter Ausbildung einer Schiffschens Base reagieren. Die Produkte der sogenannten Maillard-Reaktion weisen eine Braunfärbung auf und sind besonders in der Lebensmittel- und Pharmaindustrie von Interesse. Während die Braunfärbung von Backwaren erwünscht ist, stellt diese bei einer Proteinformulierung eine ungewünschte Reaktion dar [38].

In dieser Arbeit kamen in Kapitel 5. ein Maltodextrin (Agenamalt) und eine Oligofruktose (Raftilose) zum Einsatz, die in geringen Mengen reduzierende Zucker wie Glucose und Fructose enthalten.

1.2.3.2. Physikalische Instabilität

- Denaturierung

Unter Denaturierung wird eine Veränderung der Tertiär- und/oder der Sekundärstruktur durch Auffaltung verstanden. Durch Temperatur, mechanischen Stress, extreme pH-Werte, denaturierende Agenzien oder hohe Salzkonzentrationen kann es zu reversibler oder irreversibler Denaturierung kommen. Die native Proteinstruktur entfaltet sich, wobei die normalerweise im Inneren des Protein liegenden hydrophoben Seitenketten der hydrophilen Umgebung ausgesetzt werden. Um diesen thermodynamisch ungünstigen Zustand zu verringern, lagern sich die Proteine zusammen und bilden Aggregate aus. Der native Zustand steht mit dem reversibel entfalteten Zustand im Gleichgewicht. Aus dem entfalteten Zustand kann schließlich die irreversible Aggregation erfolgen.

Der Phasenübergang von nativer zu entfalteter Struktur wird mit der Schmelztemperatur T_m charakterisiert. T_m bezeichnet den Mittelpunkt des Phasenübergangs, bei dem 50 % des Proteinmoleküls entfaltet vorliegt. Der T_m -Wert wird von den Umgebungsfaktoren wie dem pH-Wert stark beeinflusst [34-36].

- Aggregation

Aggregation ist ein zweistufiger Prozess, wie bei der Denaturierung beschrieben. Da der entfaltete Zustand thermodynamisch ungünstig ist, folgt die Bildung von Aggregaten, um die Anzahl der lösungsmittel-zugewandten hydrophoben Gruppen zu minimieren.

Aggregation kann sowohl im flüssigen wie im festen Zustand und während der Zwischenstadien auftreten. Im festen Zustand spielt dafür vor allem die Restfeuchte eine große Rolle.

Die Aggregate können löslicher und unlöslicher Natur sein und aus kovalenten und nicht kovalenten Bindungen aufgebaut sein [34-36].

- Adsorption

Aufgrund hydrophiler und hydrophober Bereiche reagieren Proteine oberflächenaktiv. Dadurch können sie sich an zahlreichen Oberflächen z. B. Primärpackmitteln oder flüssig/-gasförmigen oder flüssig/festen Grenzflächen anlagern, und zur Aggregation nach Entfaltung führen. Durch Zusatz von Tensiden wie Polysorbat 80 zur Formulierung wird versucht, die Adsorption zu vermindern [34-36,38].

1.2.4. Stabilisierungsmöglichkeiten für Proteinanzneistoffe

Basierend auf den oben beschriebenen Instabilitäten stehen verschiedene Wege zur Stabilisierung von Proteinen zur Verfügung [39]:

- Durch Selektion oder Ersatz labiler Aminosäuren kann die intrinsische Stabilität des Proteins vergrößert werden [40]. Durch Austausch der beiden Aminosäuren Methionin in Position 122 und 127 des G-CSF kann die Stabilität unter Erhalt der biologischen Aktivität verbessert werden [41].
- Durch chemische Modifizierung in Form von Glykosilierung oder Einführung von wasserlöslichen Polymeren wie Polyethylenglykol kann die Stabilität verbessert werden. So besitzen z. B. die glykosilierte und die pegylierte Form des G-CSF eine höhere Stabilität als die benutzte unglykosilierte Variante [42].
- Eine Stabilisierung kann über Modifizierung der Formulierung durch Zugabe stabilisierender Adjuvantien zur Lösung erfolgen. Der pH-Wert der Formulierung hat einen entscheidenden Einfluss auf die Stabilität der Proteine. G-CSF besitzt bei pH 4 eine hohe Stabilität. Bei pH 7-8 verhält es sich instabil [43,44]. Durch Zusatz von Saccharose kann die Stabilität bei G-CSF-Lösungen unter physiologischen Bedingungen verbessert werden [45]. Auf die Stabilisierung der Formulierung wird in Kapitel 5. besonders eingegangen.
- Aus reaktionskinetischen Untersuchungen mittels der Arrhenius-Gleichung ist bekannt, dass sich die Reaktionsgeschwindigkeit bei Erhöhung um 10 Kelvin verdoppelt bis vervierfacht. Durch Erniedrigung der Temperatur sollten die physikalischen, chemischen und mikrobiologischen Instabilitätsreaktionen verlangsamt werden können. Das Einfrieren der Lösung begrenzt die Stabilisierung des flüssigen Zustandes durch reine Temperaturerniedrigung. Bei gefrorenen Lösungen ist das Auftreten von Kältedenaturierung möglich [46,47]. Da es beim Einfrierprozess zur Bildung von „unfrozen water“ kommen kann, muss die Proteinlösung unter ihren eutektischen Punkt tief genug gefroren werden, bis der feste Zustand erreicht ist. „Unfrozen water“ ist problematisch, da nicht der feste Zustand vorliegt und es noch immer in geringem Umfang zu Instabilitätsreaktionen kommen kann. Durch den Einfrierprozess kann es zum pH-shift des Puffers und daraus resultierend zur Aggregation kommen [48,49]. Gefrorene Lösungen bringen Schwierigkeiten in ihrer Handhabung mit sich. Mehrfaches Auftauen und Einfrieren der Formulierung, beginnend von der Portionierung der Bulklösung in Einzeldosengebinde bis hin zur Anwendung beim Patienten, kann sich negativ auf die Stabilität der Proteine auswirken [50,51].
- Sofern durch Optimierung der flüssigen Zubereitung keine ausreichende Stabilität erzielt werden kann, ist die Überführung der flüssigen Rezeptur in den trockenen Zustand durch Trocknungsverfahren wie Gefrier-, Vakuum- oder Sprühtrocknung das Mittel der Wahl [17,52-55].

Nach dieser allgemeinen Übersicht der Stabilisierungswege für Proteine wird auf die Stabilisierungsmechanismen in wässrigen Zubereitungen eingegangen.

1.2.4.1. Stabilisierung von Proteinen in flüssigen, wässrigen Zubereitungen

Bei Proteinen besteht zwischen der nativen und der denaturierten Form eine Gleichgewichtsreaktion. Das Gleichgewicht kann durch den Zusatz von Hilfsstoffen zugunsten der nativen Struktur verschoben werden [56,57]. Dieses Phänomen der Stabilisierung von Proteinen in wässriger Lösung wurde von Timasheff [56] aufgeklärt. Er hatte festgestellt, dass die Proteindenaturierung beim Einwirken von Stressfaktoren durch den Zusatz von verschiedenen Hilfsstoffen, z. B. Sacchariden, Glycerol, Polyolen, Polyethylenglykol, Aminosäuren, Methylamine und anorganischen Salzen, verringert werden kann [56,57].

Durch Dialyse wurden die Verteilungsverhältnisse von Wasser und Hilfsstoffmolekülen an der Proteinoberfläche untersucht. Anstelle der zu erwartenden stabilisierenden Hilfsstoffmoleküle überwog in der Dialysetasche der Anteil an Wassermolekülen. Die Proteinoberfläche ist somit von einer großen Zahl von Wassermolekülen umgeben, während die Hilfsstoffmoleküle weitgehend ausgesperrt sind (preferential exclusion) [56]. Damit lassen sich die Bindungsverhältnisse bei der Gleichgewichtsdialyse v (Menge an Hilfsstoff, die pro Menge Protein gebunden werden) anhand der folgenden Formel angeben:

$$v = \frac{\text{Hilfsstoffkonzentration innerhalb der Dialysetasche} - \text{Hilfsstoffkonzentration außerhalb der Dialysetasche}}{\text{Proteinkonzentration}}$$

Zur Stabilisierung des Proteins und damit zur preferential exclusion des Hilfsstoffs kommt es, wenn v einen negativen Wert annimmt. Im umgekehrten Fall spricht man von preferential binding. Es kommt zur Destabilisierung des Proteins (Abb. 1-9) [56].

Das chemische Potential des Proteins und des Hilfsstoffs vergrößern sich durch preferential exclusion, und die Entropie nimmt zu [57]. Im Falle einer Denaturierung wächst die Kontaktfläche zwischen dem Protein und der Lösung an. Analog dazu würde sich auch die Fläche vergrößern, aus welcher der Hilfsstoff ausgeschlossen werden müsste (Abb. 1-10). Da aber stets die thermodynamisch günstigste Bedingung angestrebt wird, kommt es nach dem Prinzip von Le Chatelier zu einem Zurückdrängen der denaturierten Form zugunsten der nativen Struktur. Die Möglichkeit zum Ausschluss von Hilfsstoff wird dadurch kleiner und das Protein damit insgesamt stabilisiert [56,57]. Für diese Vorgänge ist einerseits eine Mindestkonzentration an Hilfsstoff notwendig, andererseits ist die Stabilisierung durch preferential exclusion durch die Zunahme an Wechselwirkungen zwischen dem Protein und dem Hilfsstoff begrenzt.

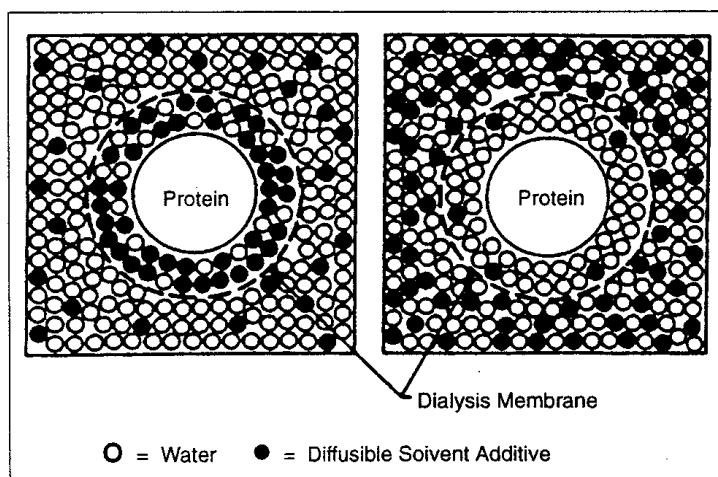


Abb. 1-9: preferential binding (links) und preferential exclusion (rechts) [56]

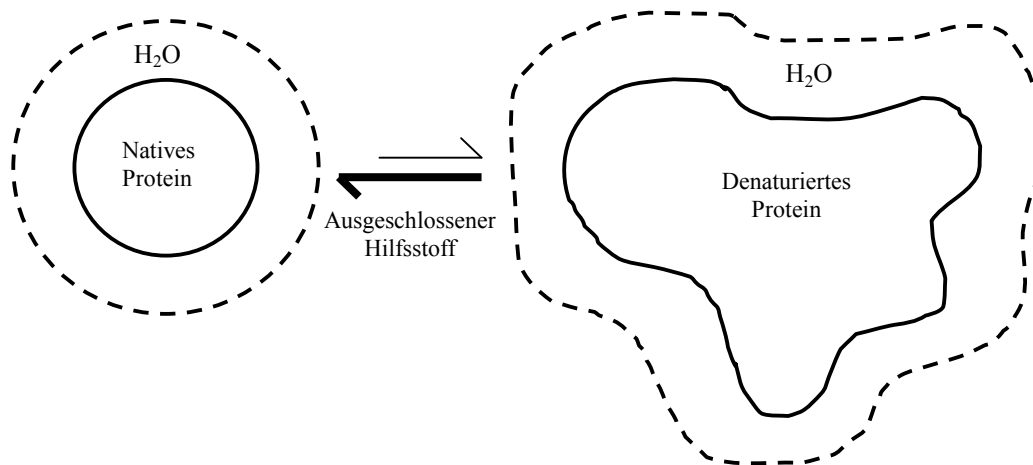


Abb. 1-10: Gleichgewicht zwischen nativer und entfalteter Form [56]

Folgende Mechanismen werden zur Erklärung der preferential exclusion herangezogen [56-59]:

1. Das Protein verhält sich inert. Die Interaktion zwischen Protein und Hilfsstoff werden einzig durch die Beschaffenheit der Hilfsstofflösung beeinflusst.
 - Infolge unterschiedlicher Größe von Hilfsstoffmolekül und Wasser können die kleinen Wassermoleküle eine dichtere Oberflächenbedeckung am Protein erreichen als die größeren Hilfsstoffmoleküle. Es liegt ein sterischer Ausschluss der Hilfsstoffmoleküle vor.
 - Durch den Hilfsstoffzusatz wird die Oberflächenspannung der Lösung verändert. An der Grenzfläche zum hydrierten Protein werden die Hilfsstoffmoleküle bevorzugt ausgeschlossen, und es kommt zu einer Ungleichverteilung in der Lösung. Die native Form des Proteins wird durch Hilfsstoffzusatz stabilisiert, welche die Grenzflächenspannung von Wasser erhöhen.

2. Die chemische Eigenschaft der Proteinoberfläche bestimmt die Anziehung oder Abstoßung zwischen Protein und Hilfsstofflösung.
 - Durch Abstoßung der Hilfsstoffmoleküle von der Proteinoberfläche aufgrund gleicher Ladungen steht an der Proteinoberfläche mehr Platz für Wassermoleküle zur Verfügung. Das Protein wird bevorzugt hydratisiert und die native Struktur durch preferential exclusion stabilisiert.
 - Hilfsstoffe wie Glycerol werden wegen eines solvophoben Effektes von der Proteinoberfläche ausgeschlossen. Der Kontakt zwischen den unpolaren Regionen des Proteins und der Glycerol-Wasser-Mischung ist entropisch noch ungünstiger als der Kontakt mit Wasser. Aus diesem Grund entfernen sich Glycerolmoleküle von der Proteinoberfläche und hinterlassen eine mit Wasser angereicherte Proteinoberfläche. Glycerol zeigt dieses Verhalten, obwohl es eine Affinität zu polaren Regionen der Proteine aufweist.

1.2.4.2. Stabilisierung von Proteinen in gefrorenen, wässrigen Zubereitungen

Carpenter et al. wiesen anhand von Lactatdehydrogenase und Phosphofruktokinase nach, dass Proteine im gefrorenen Zustand durch die gleichen Hilfsstoffe stabilisiert werden können, wie in flüssiger Formulierung [13,60]. Daraus wird geschlossen, dass der gleiche thermodynamische Mechanismus der preferential exclusion im gefrorenen Zustand analog dem flüssigen wirksam ist. Es kann aber nicht generell daraus abgeleitet werden, dass von der Proteinoberfläche ausgeschlossene Hilfsstoffe zu einer grundsätzlichen Stabilisierung der Proteine während des Einfrierens führen [61]. Zucker, Polyole, Aminosäuren, Salze und Polyethylenglykol sind Beispiele für Hilfsstoffe, die zur Cryoprotektion geeignet sind [12,61-63].

1.2.4.3. Stabilisierung mittels Trocknungsverfahren

Um Proteine für eine Langzeit-Lagerung zu stabilisieren, ist die Entfernung des Lösungsmittels das Mittel der Wahl. Allen Trocknungsverfahren ist die Umwandlung des Aggregatzustands des Wassers vom flüssigen oder festen Zustand in den gasförmigen gemeinsam (Abb. 1-11). Die Entfernung von Wasserdampf aus dem System führt zur Trocknung. An der Oberfläche von festen, d.h. gefrorenen und flüssigen Zubereitungen besteht zum gasförmigen Zustand ein Gleichgewicht. Pro Zeiteinheit gehen genau so viele Moleküle in die Gasphase wie zurück. Der Wasserdampfdruck ist damit gleich dem Sättigungsdampfdruck. Bei der Trocknung wird dieses Gleichgewicht durch Entfernen von Wasser gestört. Das System versucht, durch ständiges Sublimieren bzw. Verdunsten/Verdampfen wieder den Gleichgewichtszustand zu erreichen. Die treibende Kraft für die Trocknung ist die Dampfdruckdifferenz.

Die stetige Abnahme des Lösungsmittels während des Trocknungsvorganges kann durch Zufuhr von Energie und durch zusätzliches Anlegen eines Vakuums beschleunigt werden.

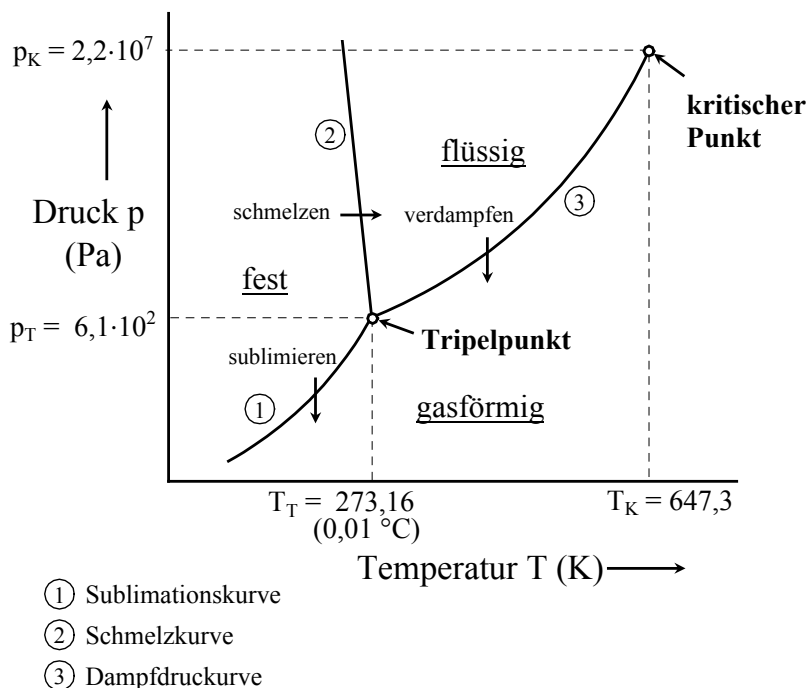


Abb. 1-11: Phasendiagramm des Wassers [64]

Einteilung von Trocknungsverfahren und Trocknertypen [65]Nach der Energiezufuhr

- Konvektionstrocknung (Gasstrom)
- Kontaktstrocknung (beheizte Fläche)
- Strahlungstrocknung (Infrarot, Mikrowellen)

Nach dem Phasenübergang des Wassers

- Verdampfung (Sieden von Wasser)
- Verdunstung (Verdunstung von Wasser)
- Sublimation (Verdunstung von Eis)

Nach dem Bewegungszustand des Produkts

- Ruhendes Bett (z. B. Trockenschrank)
- Bewegtes Bett (mechanisch: Nauta Mischer/Trockner)
(pneumatisch: Sprühtrockner, Wirbelschicht)

Nach dem Betriebsdruck (Normaldruck / Vakuum)Nach der Arbeitsweise (chargenweise / kontinuierlich)Nach konstruktiven Merkmalen (Walzen-, Trommel-, Schranktrockner usw.)

Das am häufigsten zur Stabilisierung von Proteinen verwendete Trocknungsverfahren ist die Gefriertrocknung [46,66,67]

Wie Mattern zeigen konnte, ist es aber auch mit der Vakuumtrocknung möglich, äquivalente Trocknungsergebnisse zu erzielen [17-20].

Die Sprühtrocknung erreichte in den letzten Jahren eine immer größere Anwendung zur Herstellung leichtlöslicher Protein-Hilfsstoffpulver [54,55,68-70]. Trotz Ausnutzung der Verdunstungskälte zum Schutz des Proteins kommt es dabei zu Instabilitäten in Form von Aggregation, Adsorption und Denaturierung.

1.2.4.3.1. Gefriertrocknung

Die herkömmliche Gefriertrocknung unterteilt sich in drei Teilschritte [46,66,67]:

1. Einfrieren: Die zu trocknende Lösung wird während des Einfrierens in den vollständig festen Zustand überführt, wobei auf die Abwesenheit verbliebener flüssiger Bereiche (Flüssigkeitsnester) zu achten ist.
2. Haupttrocknung: Durch Wärmezufuhr und Vakuum wird das zu Eis gefrorene Wasser durch Sublimation entfernt.
3. Nachtrocknung: Schließlich wird nicht als Eis auskristallisiertes, gebundenes Restwasser bei erhöhter Plattentemperatur aus dem vorgetrockneten Produkt abtransportiert.

Während des Einfrierschrittes kommt es durch Eisbildung zur Aufkonzentrierung der in der Lösung befindlichen Stoffe (freeze concentration) [14,71,72]. Ist die Löslichkeitsgrenze erreicht, erfolgt Auskristallisation des Hilfsstoffes neben Eis.

Aufgrund unterschiedlicher Löslichkeiten von Hilfsstoffen, vor allem Puffersalzen, kann es in der sich aufkonzentrierenden Lösung zu pH-Verschiebungen (pH-shift) kommen [49,73]. Diese Veränderungen des Milieus bedeuten Stress für das Protein. Es kann mit Denaturierung, Aggregatbildung und Ausfällung reagieren.

Bestimmte Hilfsstoffe kristallisieren während des Einfriervorgangs nicht aus, sondern neigen zur Übersättigung. So erstarren schließlich Hilfsstoff und Wasser im amorphen glasartigen Zustand. Sie unterliegen daher einem anderen Verhalten während der Aufkonzentrierung [49].

Die Lösung durchläuft während des Einfrierprozesses die Stadien vom flüssigen zum sirupartigen Aussehen bis hin zu einem viskosen, elastischen rubber. Im nächsten Schritt ergibt sich bei weiterer Abkühlung innerhalb eines engen Konzentrationsintervalls ein sprunghafter Anstieg der Viskosität (Abb. 1-12). Es entsteht ein sprödes, festes Glas. Der Temperaturbereich, in dem dies geschieht, wird als Glasübergangstemperatur T_g' bezeichnet und lässt sich mit Hilfe der Differentialthermoanalyse bestimmen. Bei T_g' liegt neben dem amorphen Hilfsstoff das Wasser in vollkommen ausgefrorenem Zustand vor.

Die Temperatur, bei der es zur Umwandlung einer glasig erstarrten trockenen Schmelze in einen zäh viskosen Zustand und umgekehrt kommt, wird im Unterschied zur Umwandlung einer Lösung in den amorphen Zustand als Glasübergangstemperatur T_g bezeichnet [49,73-75]. Je höher der Anteil an Hilfsstoff und damit je geringer der Anteil an Wasser in der Mischung ist, desto höher ist auch der T_g -Wert [17].

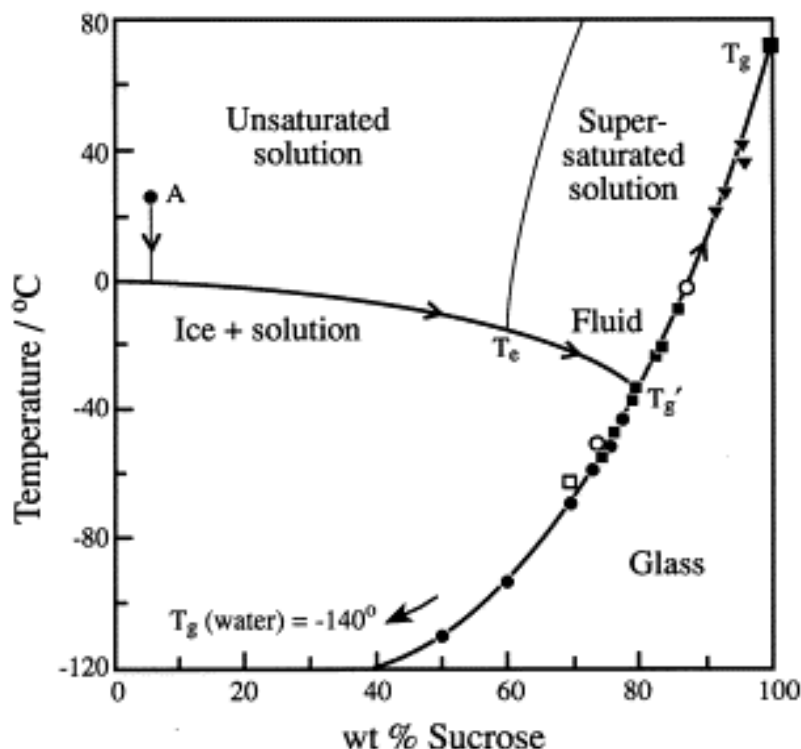


Abb. 1-12: Zustandsdiagramm für das System Wasser/Saccharose [76]

Der amorphe Zustand besitzt eine hohe Viskosität ($>10^{15}$ Pas), weshalb die Molekülbewegung auch als kinetisch eingefroren bezeichnet werden kann. Chemische Reaktionen und Wechselwirkungen zwischen dem Protein und Hilfsstoffen sind zwar noch möglich, sie kommen aber wegen der hohen Viskosität zum Erliegen.

Im kristallinen Zustand sind Wechselwirkungen nicht mehr möglich, da der Ordnungsgrad sehr hoch ist. Eine Molekülbewegung tritt in noch geringerem Umfang als bei amorphen Stoffen auf. Wegen der großen Oberfläche besitzen amorphe Zubereitungen eine hohe Löslichkeit und auch eine hohe Adsorptionsneigung für Wasser. Die Löslichkeit kristalliner Verbindungen ist durch die räumliche Anordnung dazu im Vergleich viel geringer. Bei der Wasseraufnahme besteht eine mäßige Tendenz zur Adsorption an der Oberfläche der Kristalle. Zur Stabilisierung von Proteinen sind besonders amorphe Gerüste geeignet [8,13,14]. Im Unterschied zu einem kristallinen Gerüst besitzt der ungeordnete amorphe Zustand eine stabilisierende Wirkung [15,77]. Bei kristallinen Hilfsstoffgerüsten liegen die einzelnen Phasen nebeneinander vor, und eine Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen den Hilfsstoff- und Protein-Molekülen ist unmöglich. Amorphe Zubereitungen liegen in einem metastabilen Zustand vor. Ihre Existenz ist stets durch die Umwandlungstendenz in den stabilen, kristallinen Zustand bedroht [49].

1.2.4.3.2. Vakuumtrocknung

Durch Verdunstung von Wasser aus einer Lösung entsteht bei der Vakuumtrocknung ein getrocknetes Produkt. Unter vermindertem Druck ist die Verdunstungsrate des Wassers erhöht, da durch das Senken des Gesamtdrucks der Übergang aus der flüssigen Phase erleichtert wird. Da die Verdunstung ein endothermer Vorgang ist, muss für einen kontinuierlichen Trocknungsvorgang streng darauf geachtet werden, dass die zugeführte Energie gleich der aufgenommenen Energie ist. Auch bei der Vakuumtrocknung liegt ein durch Wärmezufuhr und Wasserdampfentfernung gezielt gestörtes Ungleichgewicht vor, bis der Trocknungsvorgang beendet ist [72,74]. Wird mehr Energie zugeführt, kommt es zum Sieden der Lösungen, im umgekehrten Falle kühlen sich die Proben wegen der auftretenden Verdunstungskälte ab, bis sie schließlich gefrieren.

Bei der Vakuumtrocknung kommt es durch Entfernen des Wassers zur stetigen Aufkonzentrierung der Lösung bis die Löslichkeitsgrenze der Hilfsstoffe erreicht ist und sie auszukristallisieren beginnen. Der Hilfsstoff kristallisiert solange aus, bis kein Wasser zur Lösung des Hilfsstoffes mehr vorhanden ist. Setzt man auch hier nichtkristallisierende Hilfsstoffe wie Kohlenhydrate und Polyole ein, bildet sich ein „rubber“, wie es bei der Gefrier-trocknung beschrieben wurde [8]. Die Kohlenhydrate und Polyole konzentrieren sich während der Trocknung immer weiter auf, die flüssige Lösung wandelt sich über sirupartig in einen viskos elastischen rubber um, der schließlich zu einer amorphen, glasartigen Schmelze erstarrt. Der Konzentrationsanstieg geht mit einem Anstieg der Viskosität einher, die wiederum die Mobilität der Moleküle zunehmend einschränkt und die Bildung von Nuclei (Kristallisationskeime) und Kristallen unterdrückt [8,73].

Mattern konnte zeigen, dass zur Stabilisierung von Proteinen mit Hilfe der Vakuumtrocknung nicht nur Kohlenhydrate und Polyole geeignet sind, sondern dass auch mit kohlenhydratfreien Aminosäure-Mischungen eine Stabilisierung möglich ist [16,17,78].

Bei der Vakuumtrocknung muss der Zustand des rubber auf dem Weg zum glasig erstarrten amorphen Zustand durchquert werden. Die Temperatur für den Vakuumtrocknungsprozess liegt im Unterschied zur Gefrier-trocknung nicht unterhalb des T_g . Der rubber-Zustand ist in doppelter Hinsicht problematisch:

1. Der rubber-Zustand ist ungünstig, da er sich durch einen hohen Restwassergehalt im Produkt auszeichnet. Der erfolgte Viskositätsanstieg reicht noch nicht aus, die Mobilität der Moleküle so stark einzuschränken, dass Abbaureaktionen vermieden werden können. Die Annäherung der Moleküle durch die Aufkonzentrierung erhöht zugleich die Wahrscheinlichkeit der Reaktion zwischen den Molekülen [73].
2. Aufgrund des physikalischen Zustands dauert der Diffusionsprozess aus dem rubber relativ lange Zeit an. Das Restwasser wird im rubber förmlich festgehalten. Grund für die schlechte Entfernbarekeit des Wassers ist eine geringe Oberfläche, aus der das Wasser in die Gasphase übergehen kann. Für das nachdiffundierende Wasser bestehen lange Diffusionswege durch die hochviskose Masse.

Um zu Produkten mit geringem Restwassergehalt zu gelangen, ist es von größter Wichtigkeit, den Zustand des rubber möglichst schnell zum amorphen Zustand zu durchqueren [73]. Bei der Sprühtrocknung wird dies durch Oberflächenvergrößerung und Trocknung von Tröpfchen erzielt. Durch den Zusatz von kristallbildenden Hilfsstoffen kann die Ausbildung amorpher/teilmorpher Strukturen bei der Vakuumtrocknung beschleunigt und der rubber gestört werden. Während der Aufkonzentrierung erreichen kristallbildende Hilfsstoffe ihre Sättigungskonzentration und kristallisieren nachfolgend aus. Die verbleibende Lösung konzentriert sich weiter auf und kann sich schließlich amorph auf den Kristallen abscheiden. Die Diffusionsstrecke für das Wasser wird durch das Aufziehen der zu trocknenden Stoffe auf die große Oberfläche der gebildeten Kristalle der Hilfsstoffe verkürzt. Durch die geringere Diffusionsstrecke für das Wasser und die größere Oberfläche verkürzt sich die Trocknungszeit. Mattern stellte fest, dass besonders durch Verwendung von Phenylalanin als kristallbildendem Hilfsstoff es erst möglich war, trockene Produkte mit einer Restfeuchte kleiner 2 % zu erzielen.

Welche Problematik der rubber-Zustand bei der Vakuumtrocknung besitzt, wird anhand von Versuchen aus der Literatur deutlich. Bei diesen Versuchen wurden keine kristallisierenden Hilfsstoffe der Rezeptur zugesetzt. Miller et al. trockneten LDH in Trehalose/Borat-Rezepturen im Vakuum und erzielten Restwassergehalte von 3-7 %. Der korrespondierende T_g war mit 40-60 °C sehr viel niedriger als der T_g von ca. 110 °C der gefriergetrockneten Proben [18]. Uritani et al. bestätigen einen schützenden Effekt von Disacchariden während der Vakuumtrocknung von Restriktionsendonuklease. Auch nach 30 h Vakuumtrocknung konnten die Proben nicht aus dem hochviskosen, feuchten Zustand in trockene Produkte mit niedriger Restfeuchte überführt werden [19]. Rossi erhielt nach 24 h Vakuumtrocknung mit verschiedenen glasbildenden Hilfsstoffen nur hochviskose Massen mit hoher Restfeuchte [20].

Neben diesen Arbeiten gibt es weitere Literaturstellen zur Vakuumtrocknung von Proteinen. Ihnen allen ist gemeinsam, dass die Proben mittels Vakuumtrocknung getrocknet und auf Stabilität untersucht wurden. Eine Charakterisierung der Proben hinsichtlich Restfeuchte und/oder T_g fehlt vollständig.

Gibson nutzte Vakuumtrocknung zur Herstellung von analytischen Tests mit Enzymen. Die Enzyme, die zusammen mit verschiedenen Hilfsstoffen getrocknet wurden, zeigten eine größere Lagerstabilität als die ohne Hilfsstoffzusatz [79]. Conrad verwendete eine Trehalose/Borat-Rezeptur zur Stabilisierung von *Lactobacillus acidophilus* [80]. Der Erhalt an Aktivität war bei den vakuumgetrockneten Proben sehr viel niedriger als bei den gefrorenen bzw. gefriergetrockneten Proben. Dies ist vermutlich auf den hohen Restwassergehalt zurückzuführen, über den keine Angaben gemacht wurden. Bieganski trocknete einen rekombinanten Retrovirus mit Trehalose im Vakuum [81]. Cerrutti erforschte die Stabilität von Bäckerhefe in Abhängigkeit vom intra- und extrazellulären Gehalt an Trehalose bei der Vakuumtrocknung [82].

Sharma untersuchte flüssige, aufkonzentrierte und vakuumgetrocknete Proben von IFN, um mittels Fluoreszenzspektroskopie die Tertiärstruktur in den unterschiedlichen Zubereitungsformen zu charakterisieren [83]. Die Spektren von flüssigen und vakuumgetrockneten Zubereitungen wiesen keinen Unterschied auf. Daraus konnte abgeleitet werden, dass es zu keiner Veränderung der Tertiärstruktur gekommen ist. Bullifent trocknete Salmonellen Vaccinvektoren in Anwesenheit von Trehalose im Vakuum. Nach 6 Wochen Lagerung bei 37 °C konnte kein Verlust an Lebensfähigkeit beobachtet werden. Auch bei diesen Arbeiten wurde die Vakuumtrocknung nur als Herstellungsverfahren benutzt, und der Vergleich der Restfeuchten mit anderen Trocknungsverfahren fehlt [84].

Die Trocknungsgeschwindigkeit und damit auch die spezifische Oberfläche des zu trocknenden Produktes lassen sich durch die Wahl geeigneter Prozessparameter, z. B. Temperatur, Kammerdruck, Konzentration, bzw. Zusammensetzung und Menge der Hilfsstoffe wie bei der Gefriertrocknung beeinflussen.

Wie man aus der Clausius-Clapeyronschen Gleichung entnehmen kann, steigt der Dampfdruck exponentiell mit der Temperatur an, da die Moleküle mit steigender Temperatur immer mehr Freiheitsgrade für den Übergang in den gasförmigen Zustand erlangen [85]. Die Verdunstungsrate kann durch hohe Temperatur beschleunigt und die Trocknungszeit damit verkürzt werden. Diese Tatsache wird allerdings durch folgende Punkte begrenzt:

Die gezielte und kontrollierte Zufuhr großer Wärmemengen ist aufgrund der Gefahr von Siedeverzug schwierig steuerbar. Ein Sieden der Probenlösung ist zum einen wegen der Gefahr von Dosischwankungen durch Verspritzen der Lösung und zum anderen wegen der thermischen Belastung der Proteine zu vermeiden. Während der Trocknung kommt es am Ort der Verdunstung durch die Verdunstungskälte zum Schutz des zu trocknenden Produkts [17]. Allerdings erhöht sich durch Zunahme der Dicke der getrockneten Schicht der Strömungswiderstand des Produkts für das nachdiffundierende Wasser aus tieferen Schichten [86]. Die Verdunstungskälte muss daher so groß sein, dass sie sowohl für den Ort der Verdunstung, als auch für die bereits entstandene trockene Schicht ausreicht. Damit es zu keinen Abbaureaktionen an den zu trocknenden Proteinen kommt, ist es daher wichtig, anfangs mit viel Energie die Trocknung zu beginnen und dann die Wärmezufuhr zur Vermeidung von Instabilitätsreaktionen zu reduzieren. Bereits getrocknete Bereiche könnten sonst durch die hohe Zufuhr von Wärme Abbaureaktionen zeigen. Die Trocknung erfolgt auch bei der Vakuumtrocknung anfangs schnell und läuft dann sehr langsam in einem Plateau aus [87].

Bei der Gefriertrocknung werden für die Sublimation 2760 J/g Wasser benötigt, wohingegen bei der Vakuumtrocknung für die Verdunstung nur 2430 J/g Wasser aufgewendet werden müssen. Mit der gleichen Energiemenge kann also theoretisch mit der Vakuumtrocknung schneller auf niedrigere Restwassergehalte getrocknet werden [8,73].

Beim Einsatz gleicher Energiemengen kann bei der Vakuumtrocknung schneller der rubber erreicht und durchquert werden, da pro Zeiteinheit mehr Wasser entfernt wird [8,8,73]. Diese Tatsache wird durch die zumeist weniger porös entstehende Oberfläche und den damit längeren Diffusionsweg für das Wasser eingeschränkt [17].

Die Vakuumtrocknung besitzt gegenüber der Gefriertrocknung mehrere Vorteile. Durch Wegfall des Einfrierschrittes und durch eine verkürzte Trockenzeit zeichnet sich die Vakuumtrocknung durch einen geringeren Energieverbrauch aus [8,73]. Einfrierempfindliche Stoffe können ohne Einfrierstress getrocknet werden.

1.2.4.3.3. Stabilisierung von Proteinen in getrockneten Zubereitungen

In wässrigen Lösungen können Proteine durch Zusatz von Hilfsstoff über preferential exclusion stabilisiert werden. Eine Erklärung der Stabilisierung von Proteinen in getrockneten, nahezu wasserfreien Systemen ist mit preferential exclusion nicht möglich. Es wird versucht, die Stabilisierung im trockenen Zustand mit einer Reihe anderer Mechanismen zu beschreiben.

Bei der Stabilisierung von Proteinen in getrockneten Zubereitungen ist prinzipiell zwischen der Stabilisierung während des Trocknungsprozesses und während der Lagerung zu unterscheiden. Beide Bereiche lassen sich mit verschiedenen Mechanismen und Theorien erläutern, wobei aus einigen Vorgängen während der Trocknung weitere Ansatzpunkte für die Stabilisierung abgeleitet werden können. Dabei lässt sich diese nicht mit einem Mechanismus alleine erklären, sondern es kommt zu einer Überlagerung mehrerer stabilisierender Prozesse. Die drei wichtigsten Stabilisierungs-Mechanismen sind in der Übersicht hervorgehoben.

- Entzug von Wasser hat stabilisierenden Effekt; Wasser als Reaktionsmedium ist entfernt.
- „**glassy state**“: amorphe Umgebung mit sehr hoher Viskosität, günstig zur Stabilisierung von trockenen Protein-Zubereitungen. Es kommt zur Erhöhung des T_g der festen Formulierung.
- **water replacement theory**: Austausch von Wasser- gegen Hilfsstoffmolekülen an der Proteinoberfläche und **Ausbildung von Wasserstoffbrücken** zwischen Hilfsstoff und Protein
- physikalische Separierung von Proteinmolekülen

Der einfachste Ansatz zur Erklärung der höheren Stabilität des trockenen gegenüber dem flüssigen Zustand beruht auf der Tatsache, dass Wasser in den wässrigen, flüssigen Zubereitungen als Reaktionsmedium fungiert. Bei Anwesenheit von Wasser kann es leichter zu chemischen wie physikalischen Instabilitäten kommen. Allerdings ist es nicht so, dass der kleinste Restwassergehalt immer auch zur größten Stabilität führt [88-90]. Proteine benötigen ein Minimum an Wasser neben stabilisierenden Hilfsstoffen, die mittels Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Protein interagieren [91,92]. Durch Übertrocknung kann in bestimmten Fällen Aggregation induziert werden, ebenso wie durch zu geringe Trocknung.

Sowohl bei Gefrier- als auch Vakuumtrocknung wurde bereits auf die stabilisierende Wirkung des amorphen glasartigen Zustands und die Immobilisierung des Proteins in der Hilfsstoffmatrix aufgrund der extrem hohen Viskosität der trockenen Zubereitung hingewiesen. Die Proteine werden in dem amorphen Gerüst, das sich während der Trocknung ausbildet, kinetisch fixiert. Molekülbewegungen kommen völlig zum Erliegen [93,94]. Als Voraussetzung für die Protein-stabilisierung muss der Hilfsstoff neben der chemischen Inertheit und einer hohen Glasbildungseigenschaft die Fähigkeit zu molekularen Wechselwirkungen mit den zu stabilisierenden Proteinen besitzen. Je höher der T_g -Wert, desto höher ist die Viskosität der getrockneten Zubereitung. Ziel der Trocknung ist es, das Protein aus der in der flüssigen Phase durch preferential exclusion stabilisierten Form durch Anwesenheit eines geeigneten Hilfsstoffs (Disaccharide,..) in eine lagerfähige, stabile Trockenform zu bringen [8,14]. Proteine können durch den Zusatz von Hilfsstoffen stabilisiert werden, indem der T_g der trockenen Zubereitung im Vergleich zur hilfsstofffreien Rezeptur erhöht wird [95]. Besonders gilt dies bei der Verwendung von Polymeren, die wegen ihres Molekulargewichtes einen hohen T_g besitzen und deren T_g linear mit der Zunahme ihres Molekulargewichtes ansteigt. Roos beobachtete dieses Verhalten bei PVP und Maltodextrin; letzteres wurde in dieser Arbeit in Kapitel 5. benutzt [96]. Yoshioka zeigte an Dextran und Gammaglobulin einen direkten Zusammenhang zwischen der Stabilität und dem Molekulargewicht [7]. Der T_g der trockenen Formulierung soll mindestens 40 °C für die Lagerform betragen, um einen Sicherheitsabstand zwischen der Lagertemperatur und der Glasübergangstemperatur zu besitzen [73]. Hancock et al. stellten selbst 50 Kelvin unterhalb von T_g -Werten noch molekulare Mobilität in amorphen Zubereitungen fest, so dass aus

dieser Beobachtung ein größerer Sicherheitsabstand geeigneter zur Verhinderung von Instabilitäten wäre [97]. Ein weiterer Gesichtspunkt ist die Verhinderung der Auskristallisation des Hilfsstoffes während der Lagerung. Dies kann durch Aufnahme von Feuchtigkeit durch das trockene Produkt und der damit resultierenden Absenkung des T_g induziert werden. Wie oben dargestellt, besitzt die amorphe Umgebung durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen einen stabilisierenden Effekt auf das Protein. Geht diese durch Kristallisation verloren, erniedrigt sich automatisch die Stabilität. Durch Auswahl nichtkristallisierender Hilfsstoffe oder die Kristallisation inhibierende Zusätze kann dies verhindert werden. Eine reine Mannitol-Formulierung führte zu Aggregation von IL-6 durch Auskristallisation [11]. In Anwesenheit von 1 % PEG trat erst ab einer Konzentration von 10 mM Mannitol eine erniedrigte Aktivität bei den Enzymen LDH bzw. PFK auf [12].

Neben der Stabilisierung des Proteins durch den amorphen Zustand gibt es zwei weitere wichtige Ansätze zur Erklärung der Stabilisierung im trockenen Zustand. Die water replacement theory und die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen sind dabei eng miteinander verknüpft. Aufbauend auf die Beobachtung und Entdeckung, dass Organismen in der Lage sind, durch Erhöhung der intrazellulären Disaccharidkonzentration Trockenphasen zu überdauern [98], formulierten Carpenter und Crowe die water replacement theory [99]. Die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen den Zuckermolekülen und den polaren Gruppen des Proteins stabilisiert die Proteine in ihrer nativen Form [89,100]. Die Theorie konnte durch FTIR-Messungen an mit/ohne Hilfsstoff getrockneten Proteinen, bzw. reinen getrockneten Hilfsstoffproben bestätigt werden [101]. Der Hilfsstoff tritt während der Trocknung an die Stelle des Wassers und ersetzt die durch die Trocknung schwindende Hydrathülle des Proteins durch Wasserstoffbrücken. Das labile Protein kann so in seiner nativen Form stabilisiert werden. Ähnlich wie bei der preferential exclusion spielt auch bei der water replacement theory die Molekülgröße für das Maß der Stabilisierung eine wesentliche Rolle. Aus sterischen Gründen verringert sich mit steigendem Molekulargewicht der Kohlenhydrate die Möglichkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Daraus ergibt sich, dass Disaccharide ein hohes Stabilisierungspotenzial besitzen und Polysaccharide weniger zur Stabilisierung beitragen können [56]. Entscheidendes Kriterium für die Stabilisierung von Proteinen mit Kohlenhydraten ist das Erreichen des amorphen Zustands. Nur in diesem können sich die stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Proteinen und den Kohlenhydraten ausbilden, während es im kristallinen Zustand zum nebeneinander Auskristallisieren von Kohlenhydraten und Proteinen kommt [15,77].

Ein weiterer Stabilisierungsmechanismus wird mit den Begriffen physikalische Verdünnung und Separierung von Proteinmolekülen beschrieben. Liu stellte fest, dass die Aggregation von lyophilisiertem BSA im Vergleich zu hilfsstofffreien Rezepturen durch den Zusatz von Hilfsstoffen wie Kochsalz, Dextran und PEG reduziert werden konnte [102]. Chang beobachtete ähnliche Stabilisierungseffekte durch den Zusatz von Saccharose bei IL-1ra [103]. Durch den Hilfsstoffzusatz kommt es zu einer physikalischen Verdünnung der Rezeptur, woraus eine Trennung der Proteinmoleküle resultiert. Die Möglichkeiten zu Protein-Protein-Interaktionen wird durch den Hilfsstoffzusatz erniedrigt. Dadurch erhöht sich gleichzeitig die Stabilität.

Eine andere Stabilisierungshypothese basiert auf Hilfsstoff-Wasser-Interaktionen. Costantino stellte fest, dass die Verhinderung von Aggregation von lyophilisiertem rHA in direkter Beziehung zur aufgenommenen Wassermenge des Hilfsstoffes bei Lagerung bei 96 % r.F. lag [104]. Als Mechanismus wird aus diesen Ergebnissen geschlossen, dass die Stabilisierung umso effektiver verläuft, je größer die Affinität des Hilfsstoffes zum Wasser ist. Der Hilfsstoff nimmt das Wasser auf und verhindert den Zutritt des Wassers zum Protein. Diese Stabilisierungsmethode ist aber nur begrenzt anwendbar und setzt voraus, dass das Protein sich nicht sehr feuchtigkeitsempfindlich verhält. Da das aufgenommene Wasser als Weichmacher in amorphen Strukturen fungiert, ist diese Stabilisierungshypothese zusätzlich kritisch zu bewerten. Bei dieser vorgeschlagenen Stabilisierungsmethode kommt es zur Überlagerung mit der glassy-state-theory.

1.2.4.3.4. Einsatz von trockenen Protein-Hilfsstoff-Matrices

Neben verfahrenstechnischen Aspekten und der Stabilisierungsproblematik stellt sich immer die Frage nach der Einsatzmöglichkeit des hergestellten trockenen Produktes. Durch die Trocknungsverfahren kann die Struktur des trockenen Produktes nur teilweise beeinflusst werden. Verschiedene Einfriergeschwindigkeiten bei der Gefriertrocknung beeinflussen die Porengröße des entstehenden Kuchens. Im Vergleich zu vakuumgetrockneten Produkten zeichnen sich alle gefriergetrockneten Produkte unabhängig von der Porengröße durch eine geringe Dichte und hohe Porosität aus. Aufgrund derer besitzt der Kuchen eine große Oberfläche, die zu einer raschen Lösungsgeschwindigkeit führt. Durch den kontinuierlichen Wasserentzug bei der Vakuumtrocknung konzentrieren sich die Produkte immer weiter auf. Es resultieren Produkte mit hoher Dichte und geringer Oberfläche. Dies führt zu einer niedrigen Lösungsgeschwindigkeit.

Mehrere Anwendungswege stehen den getrockneten Produkten offen:

- Bisher ist die Standardanwendung die Rekonstitution von Lyophilisaten mit Reinstwasser kurz vor der Applikation. Trotz einiger Vorteile der Vakuumtrocknung wurde bisher keine pharmazeutische Zubereitung auf diese Weise hergestellt und zugelassen.
- Aus den trockenen Proteinformen können mit Zusatz von Hilfsstoffen Implantate als Retardformulierungen hergestellt werden.
- Lyo-Kuchen lassen sich zu kleinen Partikeln komprimieren. Aus den vakuumgetrockneten Produkten sind kleine Partikel über Vermahlung produzierbar. Die kleinen Teilchen wären für eine intradermale Applikation mittels nadelfreier Injektion geeignet [105]. Ebenso ist eine inhalative Applikation mittels Pulver-Inhalatoren denkbar, wobei hierfür weitgehend die Sprühtrocknung zur Herstellung angewandt wird [106]. Durch Komprimierung der trockenen Formen, Tablettierung zusammen mit Hilfsstoffen und anschließendes geeignetes Überziehen der Tabletten steht der Weg zu oralen Zubereitungen offen [107,108]. Die Herstellung trockener Produkte zu diesem Zweck wurde nicht verfolgt.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1. Materialien

2.1.1. Proteine

2.1.1.1. Rekombinanter Granulocyten-Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF)

Von Fa. Roche Diagnostics, Penzberg, wurde der Granulocyten-Kolonie-stimulierender Faktor G-CSF als Geschenk erhalten. Das Protein lag als gefrorene Bulklösung mit 4,2 mg/ml G-CSF in einem 20 mM Natriumphosphat-Puffer mit pH 4,2 vor und wurde bei – 80 °C gelagert. Die aufgetaute Bulklösung kam, wie unter Punkt 2.2.2.1. Rezepturherstellung beschrieben, zur Anwendung.

2.1.1.2. Rekombinantes humanes Erythropoietin (EPO)

Analog dem G-CSF wurde Erythropoietin (EPO) von Fa. Roche Diagnostics, Penzberg, als Geschenk bezogen. Das Glycoprotein lag als gefrorene Bulklösung mit 2,38 mg/ml EPO in einem 10 mM NaK₂PO₄ Puffer mit 100 mM NaCl Zusatz bei pH 7,5 vor und wurde bei – 80 °C gelagert. Die aufgetaute Bulklösung wurde, wie unter 2.2.2.1. beschrieben, verwendet.

2.1.2. Hilfsstoffe

Folgende Kohlenhydrate fanden Anwendung:

KOHLLENHYDRAT	HERSTELLER
Agenamalt	Südzucker, Mannheim/ Ochsenfurt
Hydroxypropyl-β-cyclodextrin	Janssen Biotech N.V., Drug Delivery Systems (B-Olen)
Isomalt GPM angereichert	Südzucker, Mannheim/ Ochsenfurt
Isomalt GPS angereichert	
Isomalt ST	
Raftiline ST	
Raftilose P 95	
Saccharose	
Trehalose	

Tab. 2-1: Übersicht über die Kohlenhydrate

Nachfolgend werden Aufbau, Eigenschaften und Gewinnung der Kohlenhydrate näher charakterisiert.

Agenamalt

Der Handelsname Agenamalt 20222 (AM) bezeichnet ein Maltodextrin mit einem DE von 18-20. Maltodextrine stellen ein Gemisch von Glucose, Di- und Polysacchariden dar, welches durch partielle Hydrolyse von Stärke gewonnen wird. Die Abkürzung DE steht für Dextrose-Äquivalent und gibt den Hydrolysegrad, ausgedrückt als Glucose-Äquivalent, an [109].

Agenamalt ist ein weißes, in Wasser leicht lösliches Pulver und verhält sich schwach hygroskopisch [109]. Aufgrund der Anwesenheit von Glucose besteht die Möglichkeit für Maillard-Reaktionen.

Hydroxypropyl- β -cyclodextrin

Cyclodextrine sind cyclische Oligosaccharide, die aus α -1,4 glykosidisch verknüpften D-Glucopyranosyl-Einheiten aufgebaut sind. Eine große Einteilung der Derivate erfolgt durch die am Ring beteiligten Glucose-Einheiten. Sechs Glucose-Einheiten ergeben die α -Cyclodextrine, sieben Einheiten die β -Cyclodextrine und acht Glucose-Moleküle bilden die γ -Cyclodextrine. Gewonnen werden Cyclodextrine durch Abbau von Stärke mit dem Enzym Glycosyltransferase. Durch Derivatisierung der freien Hydroxylgruppen können die Eigenschaften der Cyclodextrine stark modifiziert werden. In dieser Arbeit wurde Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (CD) benutzt [110-115].

Isomalt-Derivate

Isomalt ist die Handelsbezeichnung für einen auch als Palatinit bezeichneten Zuckeraustauschstoff, der aus Zuckerrüben gewonnen wird. Isomalt stellt ein äquimolares Gemisch aus α -D-Glucopyranosyl-1,6-sorbit (GPS) und α -D-Glucopyranosyl-1,6-mannit (GPM) dar. Isomalt wird durch mikrobielle Transglucosidation von Saccharose in Isomaltulose (Palatinose, α -D-Glucopyranosyl-1,6-fructose) umgewandelt. Diese wird dann chemisch zu dem Gemisch reduziert (Abb. 2-1). GPM kristallisiert als Dihydrat, während GPS in wasserfreier Form kristallisiert [116-118]. Isomalt ist eine weiße, in Wasser leicht lösliche und nichthygroskopische Substanz [119]. Bei den Isomalt Derivaten handelt es sich um nichtreduzierende Zuckeraustauschstoffe, bei denen keine Maillard-Reaktion auftritt.

Die äquimolare Mischung von GPM und GPS heißt Isomalt ST und besitzt 5 % Kristallwasser [117]. Daneben kam noch GPM bzw. GPS angereichertes Isomalt (GPM : GPS im Verhältnis 75:25 oder 25:75) zum Einsatz.

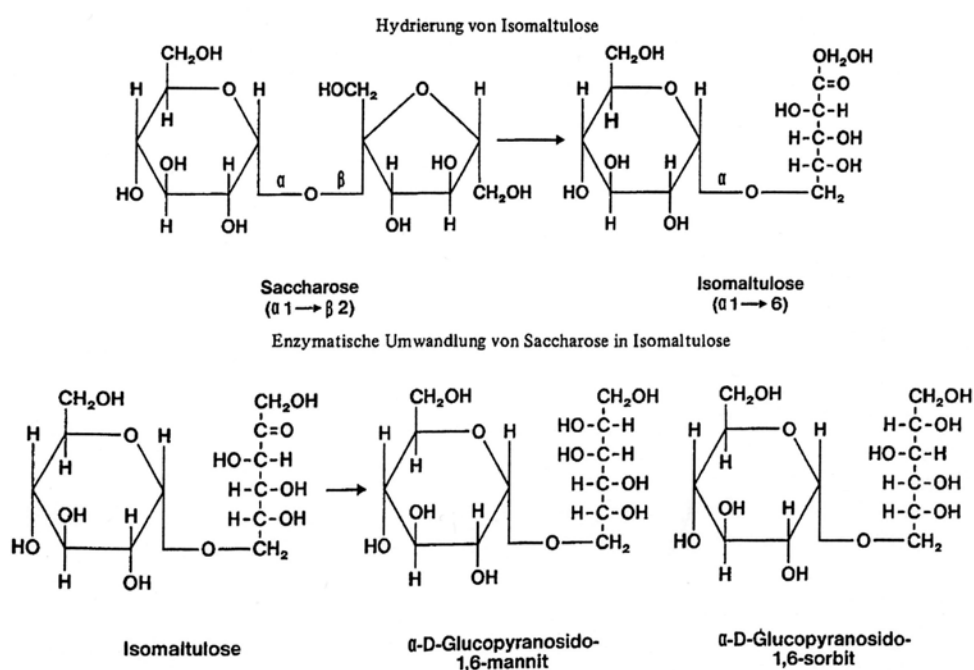


Abb. 2-1: Zweistufiger Herstellungsprozess für Isomalt [120]

Raftiline ST

Raftiline ST ist ein aus Zichorien-Wurzeln durch Extraktion gewonnenes Inulin (Abb. 2-2). Inulin ist ein hochmolekulares pflanzliches Kohlenhydrat, welches aus 20 bis 30 β -1,2-glykosidisch verknüpften Fructofuranose-Einheiten aufgebaut ist. Das reduzierende Ende der Kette schließt mit einem Glucosemolekül ab (Abb. 2-3). Das Produkt setzt sich aus 92 % Inulin mit einem DP von 10 und 8 % Glucose, Fructose und Saccharose zusammen [121,122].

Unter dem DP versteht man den durchschnittlichen Polymerisationsgrad eines Moleküls. Er gibt die Anzahl der Grundbausteine in einem Makromolekül an. Aufgrund des enthaltenen Mono- bzw. Disaccharid-Anteils ist das Auftreten von Maillard-Reaktionen möglich.

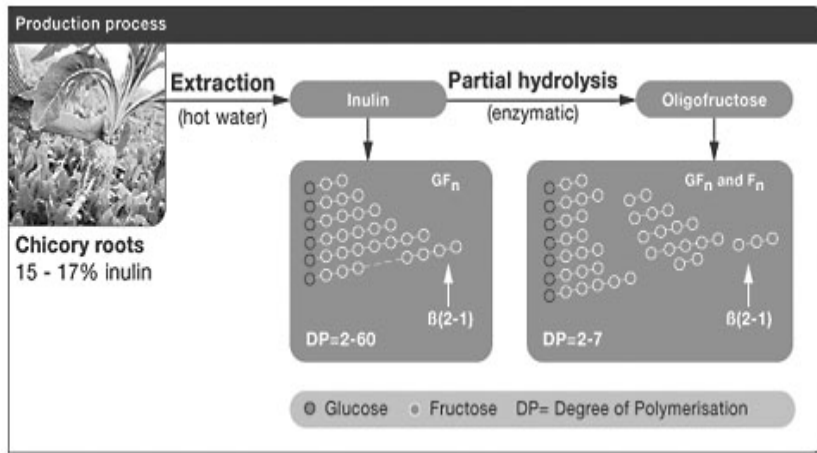


Abb. 2-2: Herstellung von Inulin und Oligofruktose [123]

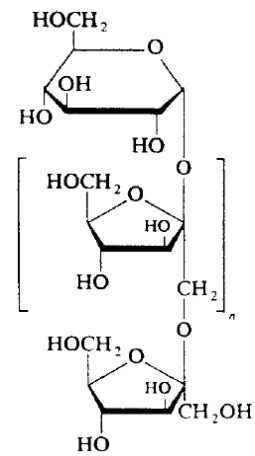


Abb. 2-3: Inulin/Oligofruktose [124]

Raftilose P 95

Durch enzymatische Partialhydrolyse kann aus Inulin die Oligofruktose Raftilose P 95 gewonnen werden (Abb. 2-2). Das Produkt setzt sich aus 95 % Oligofruktose und 5 % Glucose, Fructose und Saccharose zusammen und besitzt einen DP von 2-7. Auch hier sind Maillard-Reaktionen durch den Anteil an reduzierenden Zuckern möglich.

Saccharose

Saccharose (β -D-Fructofuranosyl- α -D-glucopyranosid) setzt sich aus Glucose und Fructose zusammen [109] und wird aus Zuckerrüben gewonnen. Durch die 1 \rightarrow 2 Verknüpfung ist Saccharose ein nichtreduzierendes Disaccharid, bei dem keine Maillard-Reaktion auftritt.

Trehalose

Trehalose (α -D-Glucopyranosyl- α -D-glucopyranosid) ist ein aus zwei Glucosemolekülen aufgebautes Disaccharid. Durch die 1 \rightarrow 1 Verknüpfung gehört Trehalose zu den nichtreduzierenden Zuckern (Abb. 2-4). Trehalose kristallisiert als Dihydrat aus wässriger Lösung aus und ist ein nicht hygroskopischer Zucker. Von Trehalose sind 3 Isomere möglich (Abb. 2-4). In dieser Arbeit wurde die α , α -Trehalose benutzt.

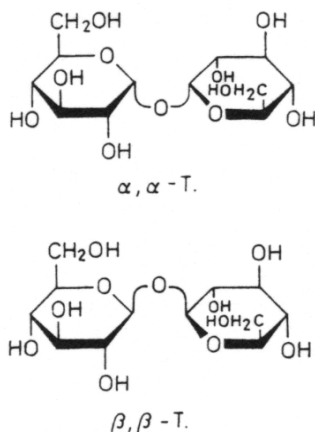


Abb. 2-4: Räumliche Darstellung von den drei möglichen Trehalose-Isomeren [125]

Neben den oben genannten Kohlenhydraten kamen weitere Hilfsstoffe zum Einsatz:

HILFSSTOFF	HERSTELLER
L-Arginin	VWR / Merck Eurolab, Ismaning
L-Phenylalanin	VWR / Merck Eurolab, Ismaning
Polysorbat 80	Serva, Heidelberg
o-H ₃ PO ₄ 85 %,	Grüssing, Filsum
Salzsäure 2N	VWR / Merck Eurolab, Ismaning
Natronlauge 2N	VWR / Merck Eurolab, Ismaning
NaOH-Plätzchen	VWR / Merck Eurolab, Ismaning
Blaugel	VWR / Merck Eurolab, Ismaning

Tab. 2-2: Übersicht über die verwendeten Hilfsstoffe (p.a. Qualität)

Zum Lösen der Substanzen wurde Reinstwasser aus der Reinstwasseranlage Pure Lab Plus, Fa. USF Elga, Ransbach-Baumbach, verwendet.

2.1.3. Reagenzien

Folgende Reagenzien wurden in p.a. Qualität bei den analytischen Verfahren eingesetzt und in Reinstwasser gelöst.

REAGENZIEN	HERSTELLER
<u>Karl-Fischer-Titration</u>	
Methanol 100 % (wasserfrei)	VWR / Merck Eurolab, Ismaning
Hydranal-Composite 2	VWR / Merck Eurolab, Ismaning
<u>SEC und AF4</u>	
Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O	VWR / Merck Eurolab, Ismaning
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	VWR / Merck Eurolab, Ismaning
NaOH-Plätzchen	VWR / Merck Eurolab, Ismaning
o-H ₃ PO ₄ 85 %,	Grüssing, Filsum
<u>Gel-Elektrophorese</u>	
1,4-Dithiothreit (DTT)	VWR / Merck Eurolab, Ismaning
Essigsäure (100 %)	VWR / Merck Eurolab, Ismaning
Methanol (100 %)	VWR / Merck Eurolab, Ismaning
Eichproteine Mark 12	Invitrogen, Karlsruhe
NuPage 10 % Bis Tris Gel	Invitrogen, Karlsruhe
Coomassie Färbungskit	Invitrogen, Karlsruhe
Silber Färbungskit	Invitrogen, Karlsruhe
<u>Wasser-Adsorptions-Isotherme</u>	
KNO ₃	VWR / Merck Eurolab, Ismaning
KCl	VWR / Merck Eurolab, Ismaning
NaCl	VWR / Merck Eurolab, Ismaning
NaNO ₂	VWR / Merck Eurolab, Ismaning
<u>Protein-Adsorption an Glas</u>	
Guanidinhydrochlorid	VWR / Merck Eurolab, Ismaning
Natriumdodecylsulfat	VWR / Merck Eurolab, Ismaning

Tab. 2-3: Tabelle der Reagenzien

2.1.4. Weitere Materialien

Als Trocknungsgefäße wurden unsilikonisierte, farblose 2R-Glasvials (Materialspende Fa. Roche Diagnostics) mit unsilikonisierten GT-Stopfen benutzt.

Für Einlagerungen wurden die Glasvials mit Reinstwasser gespült und im Trockenschrank bei 180 °C für 30 min hitzesterilisiert.

Für die SEC wurden braune Gewindeflaschen (32 x 11,5 mm) mit Teflonsepten, beide von Fa. VWR / Merck Eurolab, verwendet.

2.2. Methoden

2.2.1. Geräte und Verfahren für die Vakuum- und Gefriertrocknung

2.2.1.1. Rotationsvakuumkonzentrator (RVC)

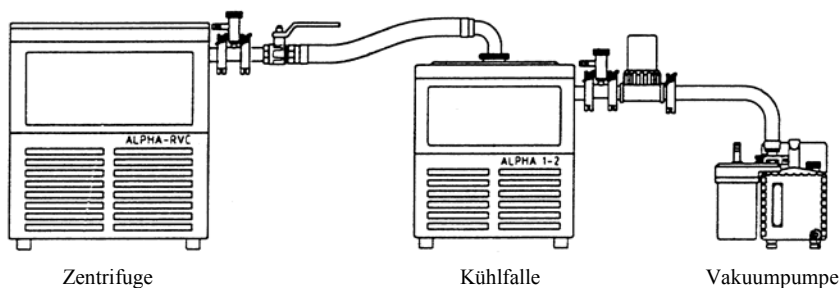


Abb. 2-5: Rotationsvakuumkonzentrator (RVC) [126]

Es wurde ein Rotationsvakuumkonzentrator (Alpha-RVC) der Fa. Martin Christ, Osterode, (Abb. 2-5) benutzt. Die Anlage besteht aus einer Zentrifuge (1300 U/min), einer Kühlfalle (minimale Temperatur des Kondensators ca. – 80 °C) und einer Drehschieberpumpe (Modell DUO 005M, Pfeiffer-Vakuum, Asslar). Der Zentrifugenraum kann durch zwei links und rechts montierte IR-Lampen bis 60 °C beheizt werden.

Vor Versuchsbeginn bzw. jedem Versuchsteilschritt wurde die Kühlfalle vorevakuiert, um bei der Evakuierung der Gesamtanlage schneller das erforderliche Vakuum zu erreichen.

Es wurde mit einem sehr umfangreichen Versuchsplan ein Temperatur-Druck-Programm entwickelt, mit dem 0,5 ml Rezeptur (siehe 2.2.2.1.) sowohl ohne Siedeverzug als auch ohne zwischenzeitliches Einfrieren getrocknet werden konnten (Tab. 2-4).

Abschnitt	Zeit Rotor/- Heizung [min]	Temperatur im RVC [°C]	Vakuum [mbar]	Gesamtlaufzeit [min]
1	20	60	20	20
2	60	60	225	80
3	30	60	200	110
4	15	60	150	125
5	15	60	125	140
6	15	60	100	155
7	15	60	50	170
8	15	60	10	185
9	60	60	0,5	245

Tab. 2-4: Trocknungsprogramm RVC

Während Abschnitt 1 der Trocknung befanden sich maximal 18 2R-Vials im schräggestellten Rotor des RVC. In den weiteren Schritten (2 bis 9 des Trocknungsprogramms) wurden alle Vials stehend in dem Zentrifugenraum positioniert (Abb. 2-6).

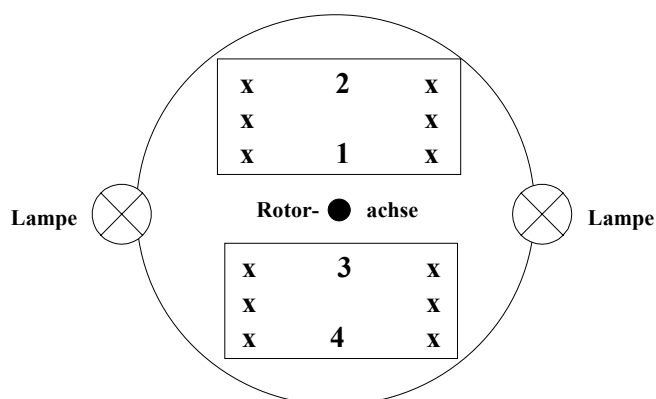


Abb. 2-6: Positionierung der Vials im RVC

(x = normale Probe, 1 – 4 = Probe zur Untersuchung der ortsabhängigen Trocknung)

Dieses Standard-Programm wurde bei weiteren Versuchen angepasst. Zum einen wurde die Temperatur von Abschnitt 3 (Tab. 2-4) an auf 45 °C gesenkt, zum anderen wurde das Vakuum schneller auf den Maximalwert von 10 bzw. 0,5 mbar abgesenkt.

2.2.1.2. Vakuumtrockenschrank (VTS-1)

Der Vakuumtrockenschrank (VTS-1), der Fa. Heraeus, Hanau, (Abb. 2-7) besitzt eine Mantelheizung und 2 Alu-Stellflächen, die durch den Kontakt mit dem Mantel beheizt werden. Die Proben wurden auf der unteren Stellfläche gleichmäßig für die Trocknung verteilt.

Vor Versuchsbeginn wurde der VTS-1 auf 40 °C temperiert. Dies erfolgte zur besseren Temperatureinstellung mit Hilfe eines Temperaturdatenloggers (Escort Datenlogger Junior und der dazugehörigen Software Escort, Kirsch Messtechnik, Ködnitz) und dem im Trockenschrank befindlichen Thermometer.

Der VTS-1 wurde mit einer Membranvakuumpumpe (Vario Pumpstand mit Membranvakuumpumpe PC 2002, mit Vakuumkontroller CVC 2000, Fa. Vaccubrand, Wertheim) evakuiert.

Der Druck wurde auf 75 mbar abgesenkt und dann auf die automatische Siedepunktnachführung umgeschaltet. Es wurde schließlich ein Druck von 13 mbar erreicht.

Kombination von RVC und VTS-1

Im Kombinationsversuch aus RVC und VTS-1 wurden die Proben im Rotor des RVC bei 22 °C bis 50 °C aufkonzentriert und dann zur Nachtrocknung bei 40 °C in den VTS-1 überführt (Tab. 2-5).

Trocknung	Probenzug nach min bzw. h:min	Vakuum [mbar]
RVC	7, 14, 23, 30, 38	20
VTS-1	88	250
	119	200
	20:43	50

Tab. 2-5: Kombination von RVC und VTS-1

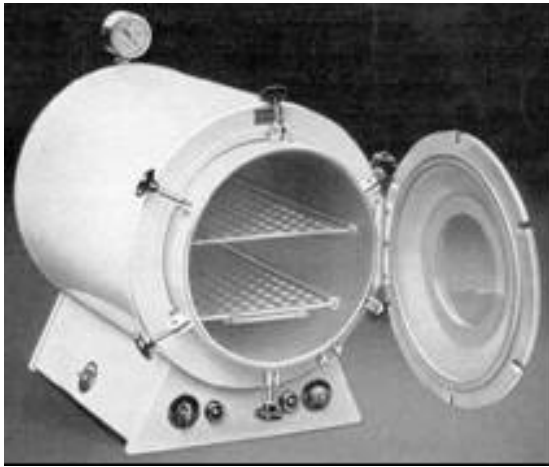


Abb. 2-7: Vakuumtrockenschrank VTS-1 [127]



Abb. 2-8: IR-Dancer [128]

2.2.1.3. IR-Dancer (IRD)

Der Geräteaufbau des IR-Dancers, Fa. Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen, gleicht dem des RVC, bestehend aus einer evakuierbaren Kammer, Kühlfalle und Vakuumpumpe (Abb. 2-8). Anstelle des Zentrifugenraumes besitzt der IR-Dancer eine Kammer, in der ein Probenrack magnetisch angetrieben in Vibration gesetzt werden kann. Die Vibration kann stufenlos zwischen 0 und 10 geregelt werden. Bei den Versuchen kamen fünf verschiedene Einstellungen zum Einsatz (Tab. 2-6). Beheizt werden kann die Kammer zum einen durch vier IR-Wärmelampen und/oder durch einen fest auf 60 °C eingestellten Heizmantel. Ein Teil der Versuche wurde ohne jegliche Beheizung durchgeführt. Bei den anderen Versuchen wurde das Probenrack von Raumtemperatur (RT) beginnend bis auf 40 °C aufgeheizt und konstant auf 40 °C gehalten (Tab. 2-6). Alle Probenials wurden ohne aufgesetzten Stopfen verwendet.

Vakuumpprofil

Der IR-Dancer wurde mit der Membranvakuumpumpe evakuiert. Solange die Proben noch flüssig waren, wurde auf ca. 220 mbar bis 120 mbar evakuiert. Dann wurde die Pumpe auf die automatische Siedepunktnachführung umgeschaltet, die selbstständig den Siedepunkt erkennt und das Vakuum unterhalb des Siedepunktes durch die Membranvakuumpumpe automatisch anpasst. Schrittweise erhöhte sich dann das Vakuum bis zum Maximalwert von ca. 10 mbar. Sobald die Proben sich in einem hochviskosen rubber-Zustand befanden, wurde der Schüttler ausgeschaltet und mit maximaler Pumpleistung evakuiert. In Tab. 2-6 sind die verwendeten Einstellungen angegeben.

Parameter	Mögliche Einstellungen	Verwendete Einstellungen
Heizmantel	60 °C oder „AUS“	„AUS“
Wärmelampen	Von RT in 1 °C Schritten bis mind. 60 °C	RT (= Heizung „Aus“) und 40 °C
Vibration	Stufe 0 bis 10 (= 0 – 800 U/ min)	Stufe: 0– 3,5 – 5,5 – 7,5 bei Raumtemp. Stufe: 0 – 3,5 – 5,5 – 7,5 – 10 bei 40 °C

Tab. 2-6: Übersicht über die möglichen und verwendeten Einstellungen

Thermofühler PT 100

Der IR-Dancer besitzt im Trocknungsraum einen flexibel positionierbaren Thermofühler (PT 100). Er liefert dem Gerät die Rückkopplung über das Erreichen bzw. Halten der voreingestellten Temperatur. Der Fühler wurde in einem Vial mittig auf dem Probenteller positioniert.

Anordnung der Vials und des Thermofühlers im Probenteller (gefäster Hartplastik-Probentänder)

	O	O				X	X
	O	O				X	X
	O	O				X	X
	O	O				X	X
				PT 100			
	O	O				X	X
	O	O				X	X
	O	O				X	X
	O	O				X	X

O = Rez. SP

X = Rez. SAP

Abb. 2-9: Anordnung der Vials im Probenteller

2.2.1.4. Vakuumtrockenschrank (VTS-2)

Der Vakuumtrockenschrank (VTS-2), Fa. Memmert, Schwabach, besitzt im Gegensatz zum VTS-1 eine reine Plattenheizung (**Abb. 2-10**). Der Mantel bzw. die Wände können nicht beheizt werden. Für die Versuche wurden Temperaturen von 23 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C und 60 °C eingestellt. Das benutzte Gerät kann maximal 3 Bleche aufnehmen. Im verwendeten VTS-2 konnten die Probenvials auf 2 Blechen in der oberen und unteren Schiene positioniert werden. Der VTS-2 wurde zur Aufkonzentrierung der Proben mit der gleichen Membranvakuumpumpe wie bei IRD und VTS-1 unter teilweiser Ausnutzung der automatischen Siedepunktnachführung mit minimal 13 mbar betrieben. Die Nachtrocknung erfolgte mit der Drehschieberpumpe (siehe RVC) mit einem maximalen Vakuum von 0,012 mbar. Je nach Versuchsaufbau und -ziel wurde zwischen die Vakuumpumpen und den VTS-2 zur Kondensation des Wassers die Kühlfalle des RVC geschaltet.

**Abb. 2-10: Vakuumtrockenschrank VTS-2 [129]**

Validierungs-Versuche der Temperaturverteilung auf beiden Blechen

Zur Untersuchung der Temperaturverteilung auf den Blechen des VTS-2 wurden in zwei Versuchen 2R-Vials auf 40 °C temperierten Blechen getrocknet (Abb. 2-11). Der VTS-2 wurde in Kombination mit Kühlfalle und Membranvakuumpumpe betrieben. Da es bei der Versuchsauswertung nur auf Relativwerte ankam, wurden die ermittelten Massenverlustwerte nicht in Wasserverlustwerte umgerechnet.

Um einer Kondenswasserbildung und Wasserabscheidung bei Versuch 2 entgegenzuwirken, wurde ein Trocknungsprogramm mit Spülzyklen verwendet. Alle 30 min wurde das Vakuum von 70 mbar für 5 min auf 700 mbar erniedrigt und danach das Vakuum wieder auf 70 mbar erhöht (Abb. 2-12). Die 70 mbar resultierten aus der Dampfdruckkurve von Wasser. Das Wasser wurde knapp unterhalb seines Siedepunktes verdunstet. Die 700 mbar als obere Grenze der Spülzyklen war frei gewählt. Um trockene Luft zur Belüftung verwenden zu können, erfolgte die Belüftung des VTS-2 durch eine mit Blaugel gefüllte Trockenpatrone.

Parameter	Validierung Versuch 1	Validierung Versuch 2
Anzahl der Vials pro Blech	4 Reihen mit je 20	4 Reihen mit je 10
Füllmenge der Vials	0,5 ml Reinstwasser	1,0 ml Reinstwasser
Trocknungsdauer	42 min	8:07 h:min
Spülzyklen	keine	alle 30 min

Abb. 2-11: Parameter der Validierungs-Versuche

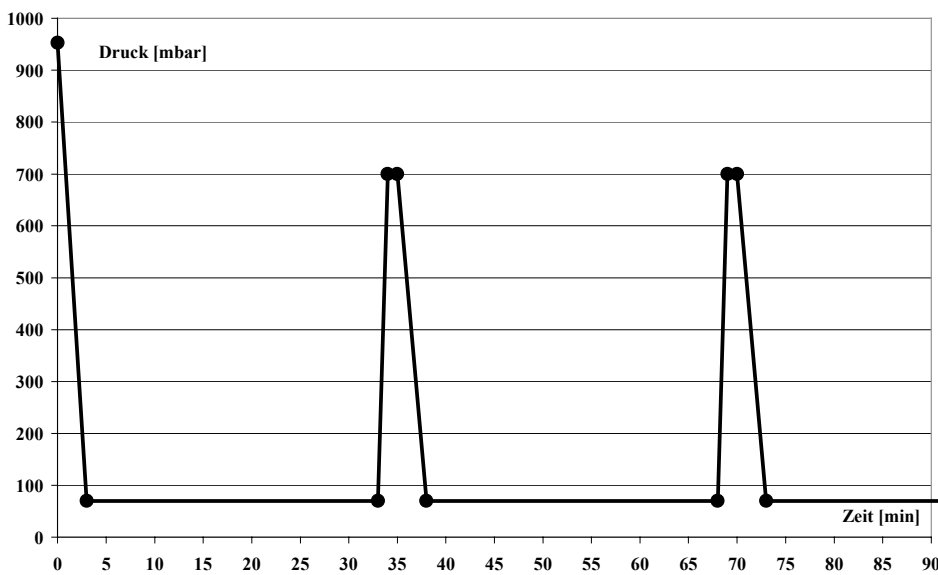


Abb. 2-12: Darstellung der Spülzyklen

Optimierung der Vakuumtrocknung im VTS-2

Der VTS-2 wurde in folgenden Kombinationen mit den Vakuumpumpen und der Kühlfalle betrieben:

- Versuch 1: Membranvakuumpumpe ohne Kühlung der Kondensatorgefäße (Abb. 2-13)
- Versuch 2: Membranvakuumpumpe mit Kühlung der Kondensatorgefäße mit einer Kühlmischung (ca. – 70 °C) aus Trockeneis und Ethanol (Abb. 2-13)
- Versuch 3: Membranvakuumpumpe ohne Kühlung der Kondensatorgefäße in Kombination mit der Kühlfalle (ca. – 80 °C) von der RVC-Anlage



Kondensatorgefäße der Membranvakuumpumpe

Abb. 2-13: Membranvakuumpumpe [130]

Zur Aufkonzentrierung der Proben wurde die Membranvakuumpumpe benutzt. Diese besitzt vor und hinter der Pumpenkammer jeweils ein Gefäß zum Auffangen von Kondensat (Abb. 2-13). In einem Versuch wurde das saugseitige Kondensatorgefäß in ein Kältebad getaucht und als Kühlfalle genutzt. Die Nachtrocknung der Proben erfolgte bei allen Versuchen mit der Drehschieberpumpe.

Trocknungsprofil

Start bis 8h: alle 30 min Belüften mit trockenem Stickstoff (Qualität 5.0) mit der Membranvakuumpumpe

8. - 11. h: max. Vakuum von ca. 15 mbar mit der Membranvakuumpumpe

11. - 22. h: max. Vakuum von ca. 0,5 mbar mit Pfeiffer Drehschieberpumpe

Um die Optimierung der Vakuumtrocknung zu beschleunigen, wurden Belüftungsschritte zwischen 70 mbar und 700 mbar während der Aufkonzentrierung ausgeführt. Die Grenzen waren analog den Belüftungsschritten, die bereits bei der Untersuchung der Temperaturverteilung auf den Blechen benutzt worden waren.

Der VTS-2 wurde jeweils konstant bei 40 °C temperiert. Pro Blech standen 40 2R-Vials, die mit 0,5 ml Placebo-Rezeptur SAP befüllt waren.

Tab. 2-7 zeigt, wie die Vials auf den beiden Blechen getrocknet wurden und welche Vials zu welchem Zeitpunkt als Probe gezogen wurden.

	Vial 1	Vial 2	Vial 3	Vial 4	Vial 5	Vial 6	Vial 7	Vial 8	Vial 9	Vial 10
1 – 10 bzw. 41 - 50										
11 – 20 bzw. 51 - 60										
21 – 30 bzw. 61 – 70										
31 – 40 bzw. 71 - 80										

Tab. 2-7: Positionierung der Vials und Probezugschema

Vials 1 - 40 auf Blech unten (Schiene unten); Vials 41 - 80 Blech oben (Schiene oben)

- hellgraue Fläche: Probezug nach 8 h => Mittelwerte von 12 Proben für den MV
- dunkelgraue Fläche: Probezug nach 11 h => Mittelwerte von 16 Proben für den MV
- weiße Fläche: Probezug nach 22 h => Mittelwerte von 12 Proben für den MV

Vakuumtrocknung für Vergleichsuntersuchungen zur Aggregation mittels SEC und AF4

Während der ersten drei Stunden waren die beiden Bleche auf 40 °C temperiert. Danach wurde die Heizung ausgeschaltet, und die Bleche kühlten auf RT bei ca. 23 °C ab. Die Aufkonzentrierung mit der Membranvakuumpumpe wurde nach 155 min abgeschlossen. Die Nachtrocknung mit der Drehschieberpumpe dauerte bis 20:30 h:min Gesamttrocknungszeit. Proben für die Analytik wurden von Trocknungsbeginn bis zur 140. min alle 10 min, sowie nach 155 min, 170 min, 7 h und 20,5 h gezogen.

2.2.1.5. Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4

Die Kühlfalle des RVC, Fa. Christ, bildet zusammen mit einer anschließbaren heiz- und kühlbaren Stellfläche eine Einkammer-Gefriertrocknungsanlage. Wie bereits bei RVC beschrieben, besaß der Kondensator eine Temperatur von ca. – 80 °C. Die Stellfläche wurde versuchsbedingt zwischen – 40 °C und + 40 °C temperiert. Die Kammer wurde mit der Membranvakuumpumpe zur Aufkonzentrierung der Proben und mit der Drehschieberpumpe zur Nachtrocknung evakuiert.

2.2.1.6. Gefriertrocknungsanlage Epsilon 2-12 D Special

Mit der Gefriertrocknungsanlage Epsilon 2-12 D Special, Fa. Christ, wurden die Vergleichsversuche zwischen Gefrier- und Vakuumtrocknung von Kapitel 5. durchgeführt (Abb. 2-14, Abb. 2-15).

Die Vials wurden dazu auf 2,0 mm dicken Edelstahlblechen in mehreren Reihen aufgestellt und auf den Blechen stehend auf der Stellfläche getrocknet.



Abb. 2-14: GT Epsilon 2-12 D Special [131]

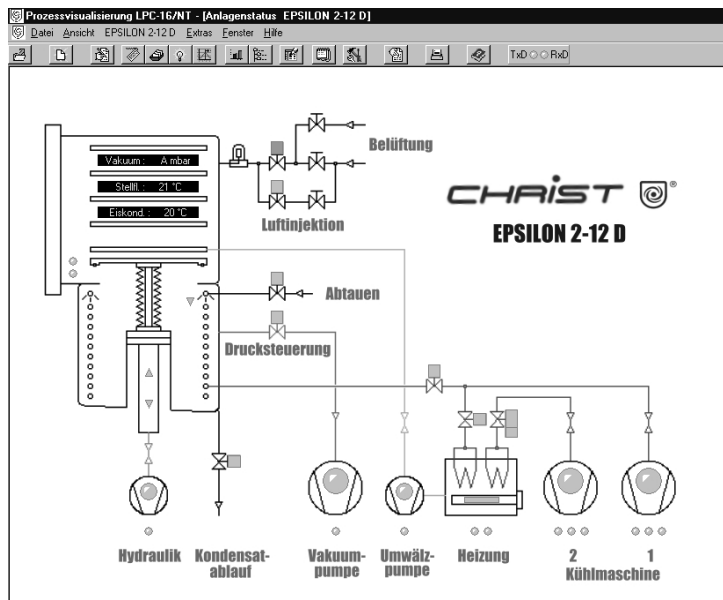


Abb. 2-15: Anlagenschema der GT

Die Abb. 2-16 und Abb. 2-17 zeigen das benutzte Programm der Gefriertrocknungsversuche.

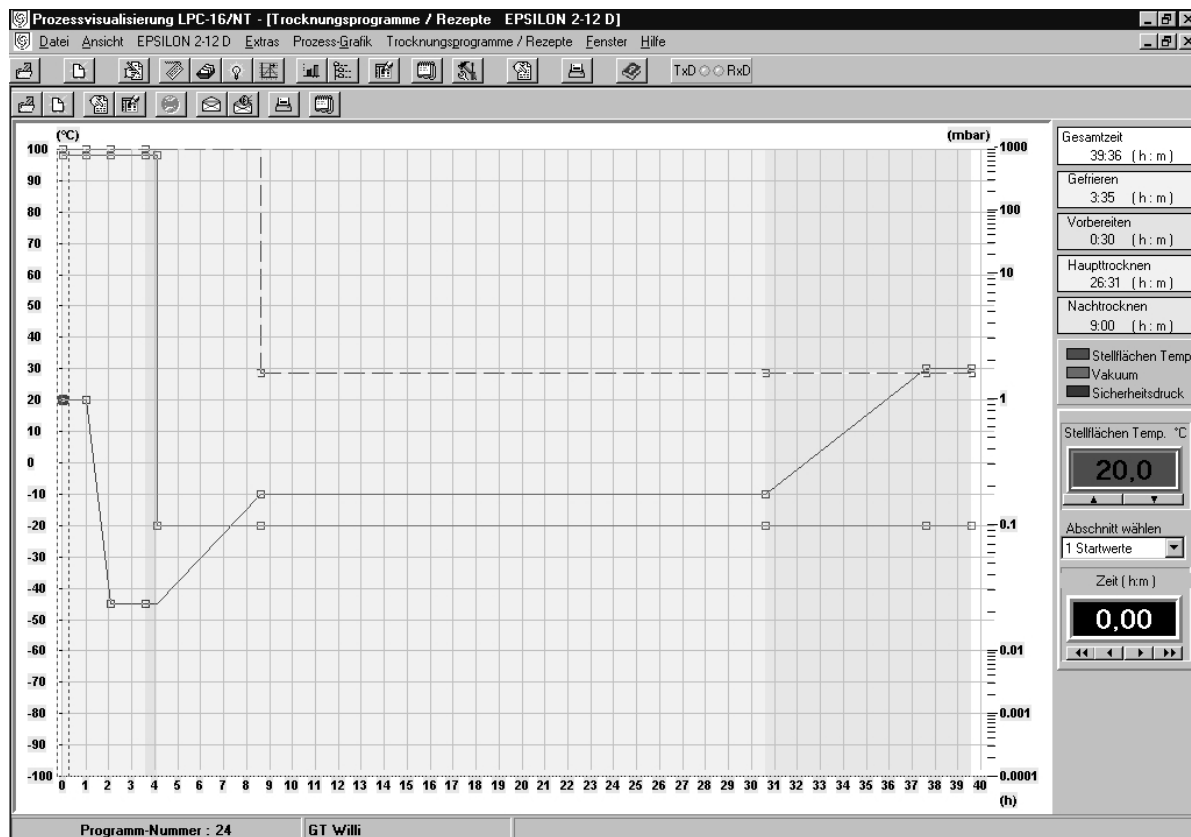


Abb. 2-16: Profil der Gefriertrocknung

The screenshot shows the 'Trocknungsprogramm- / Rezept-Tabelle' software interface. The main window displays a table with the following data:

Abs.	Prozess-Phase	Zeit (h:m)	Temp. (°C)	Vakuum (mbar)	Si.-Druck (mbar)
1	Startwerte	0:00	20	OFF	OFF
2	Gefrieren	1:00	20	OFF	OFF
3	Gefrieren	1:05	-45	OFF	OFF
4	Gefrieren	1:30	-45	OFF	OFF
5	Vorbereiten	0:30	-45	OFF	OFF
6	Haupttrocknen	0:01	-45	0,1	OFF
7	Haupttrocknen	4:30	-10	0,1	1,65
8	Haupttrocknen	22:00	-10	0,1	1,65
9	Nachtrocknen	7:00	30	0,1	1,65
10	Nachtrocknen	2:00	30	0,1	1,65

The interface also includes a menu bar (Trocknungsprogramm- / Rezept-Tabelle) and a toolbar with buttons for 'Werte ändern', 'Abschnitt Einfügen', and 'Abschnitt Löschen'. At the bottom, there are buttons for 'OK', 'Abbrechen', and 'Hilfe'. The program number is 24 and the program name is 'GT Willi'.

Abb. 2-17: Profil der Gefriertrocknung

Die Abb. 2-18 und Abb. 2-19 veranschaulichen das Temperatur-Druck-Profil der Vakuumtrocknungsversuche.

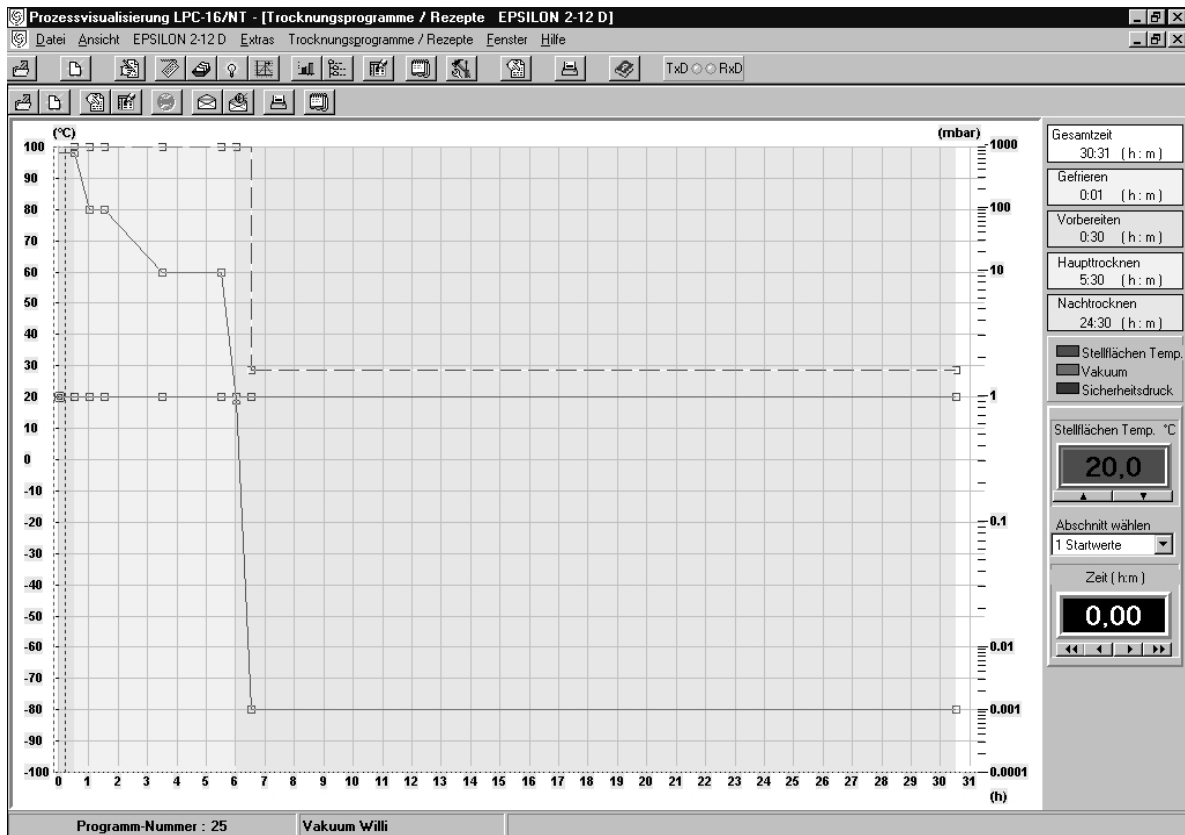


Abb. 2-18: Profil der Vakuumtrocknung

Trocknungsprogramm- / Rezept-Tabelle

Programmnummer : 25 Programmname : Vakuu Willi

Abs.	Prozess-Phase	Zeit (h:m)	Temp. (°C)	Vakuu (mbar)	Si.-Druck (mbar)
1	Startwerte	0:00	20	OFF	OFF
2	Gefrieren	0:01	20	OFF	OFF
3	Vorbereiten	0:30	20	OFF	OFF
4	Haupttrocknen	0:30	20	100	OFF
5	Haupttrocknen	0:30	20	100	OFF
6	Haupttrocknen	2:00	20	10	OFF
7	Haupttrocknen	2:00	20	10	OFF
8	Haupttrocknen	0:30	20	0,94	OFF
9	Nachtrocknen	0:30	20	0,001	1,65
10	Nachtrocknen	24:00	20	0,001	1,65

Werte ändern

Abschnitt Einfügen

Abschnitt Löschen

OK Abbrechen Hilfe

Abb. 2-19: Profil der Vakuumtrocknung

2.2.1.7. Verwendete Software zur Prozessdokumentation

Sowohl während der Entwicklung als auch bei der Anwendung der Trocknungsprofile wurde versucht, möglichst viele Ist-Werte zu den Soll-Daten von Druck- und Temperatur zu dokumentieren. Tab. 2-8 gibt eine Übersicht, auf welche Art und Weise die Trocknungsprozesse dokumentiert wurden.

Die einzelnen Softwareprogramme Celsius, Vacuu-Control und VacuGraph werden auf den nächsten beiden Seiten mit ihrer Benutzeroberfläche abgebildet (Abb. 2-20, Abb. 2-21, Abb. 2-22) und anschließend hinsichtlich ihrer Vor- und Nachteile tabellarisch verglichen (Tab. 2-9).

Die Programme wurden zur Dokumentation und Steuerung der verschiedenen Trocknungsgeräte (in Kapitel 3. und 4.) verwendet.

Die Software LPC 16 NT wurde zur Steuerung und gleichzeitigen Prozessdokumentation der in Kapitel 5. beschriebenen Versuche (Stabilitätsuntersuchungen an verschiedenen Rezepturen) benutzt.

GERÄT	DRUCK	TEMPERATUR
RVC	manuell	manuell
IRD	manuell	manuell
IRD + VTS-1	manuell	manuell
VTS-1	manuell	<ul style="list-style-type: none"> • Vacuu-Control (Vacuubrand)
VTS-2	<ul style="list-style-type: none"> • Celsius (Memmert) 	<ul style="list-style-type: none"> • Celsius (Memmert) • Vacuu-Control (Vacuubrand) • VacuGraph (Fa. Thyracont, Passau)
GT-Alpha	manuell	<ul style="list-style-type: none"> • Vacuu-Control (Vacuubrand) • VacuGraph (Thyracont)
GT-Epsilon	<ul style="list-style-type: none"> • LPC 16 NT (Christ) 	<ul style="list-style-type: none"> • LPC 16 NT (Christ)

Tab. 2-8: Übersicht der Dokumentation der Trocknungsprozesse

Kurzbeschreibung der Charakteristika der Programme

Während mit Celsius und Vacuu-Control manuell gesteuerte Prozesse protokolliert, aber auch automatisch gesteuert werden können, ist mit VacuGraph nur eine Dokumentation möglich.

Bei der LPC 16 NT steht die Steuerung mit gleichzeitiger Dokumentation von Prozessen im Vordergrund.

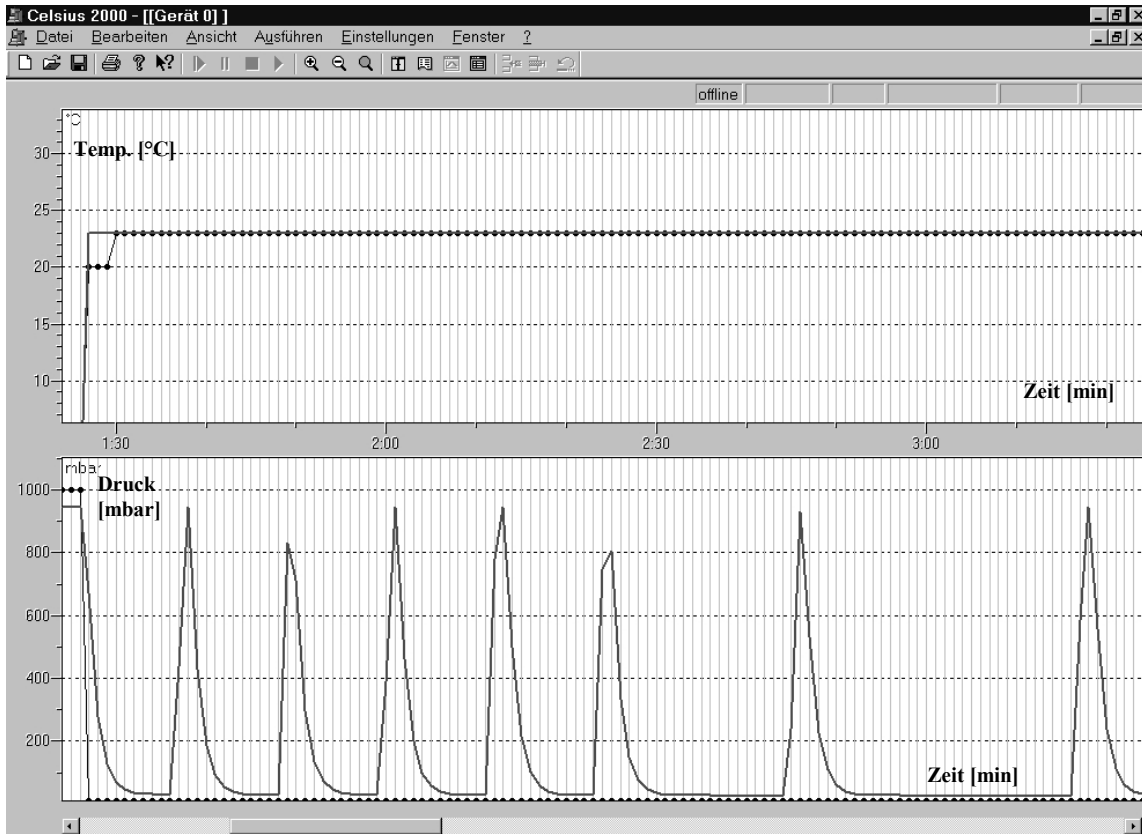


Abb. 2-20: Celsius-Software, Fa. Memmert

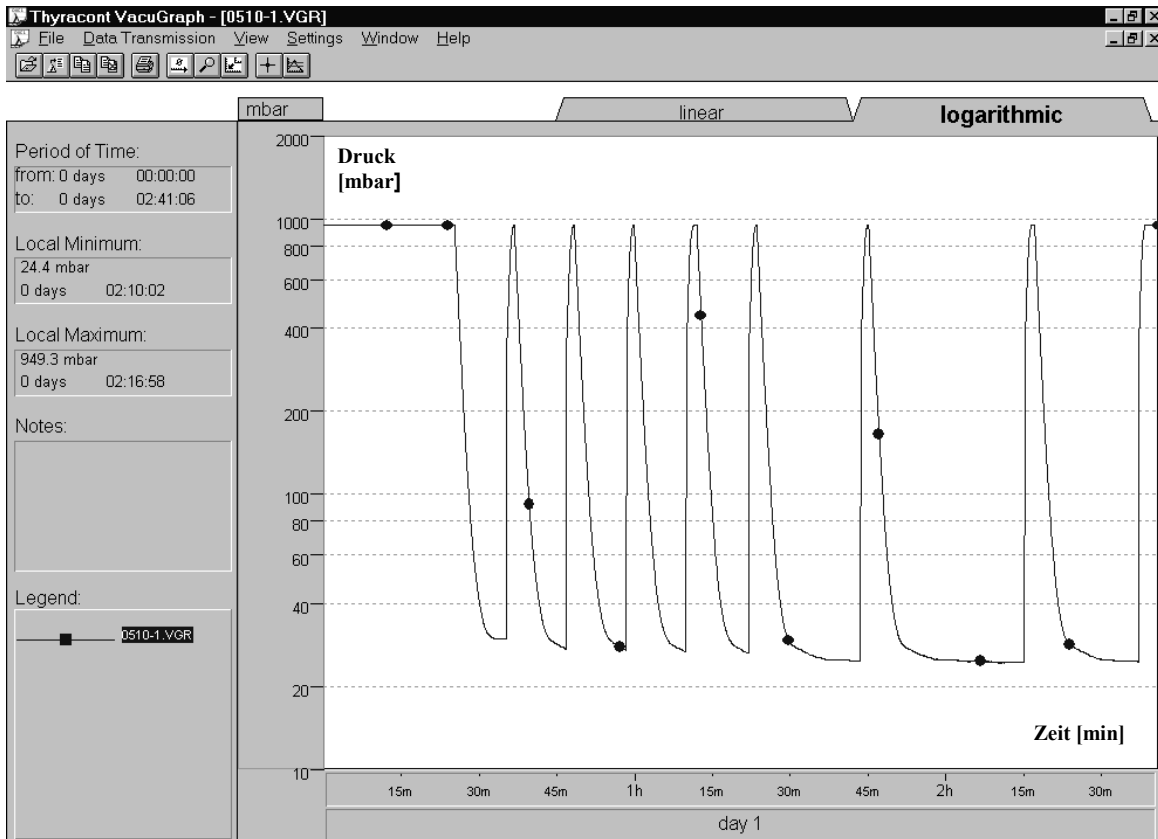


Abb. 2-21: VacuGraph-Software, Fa. Thyracont

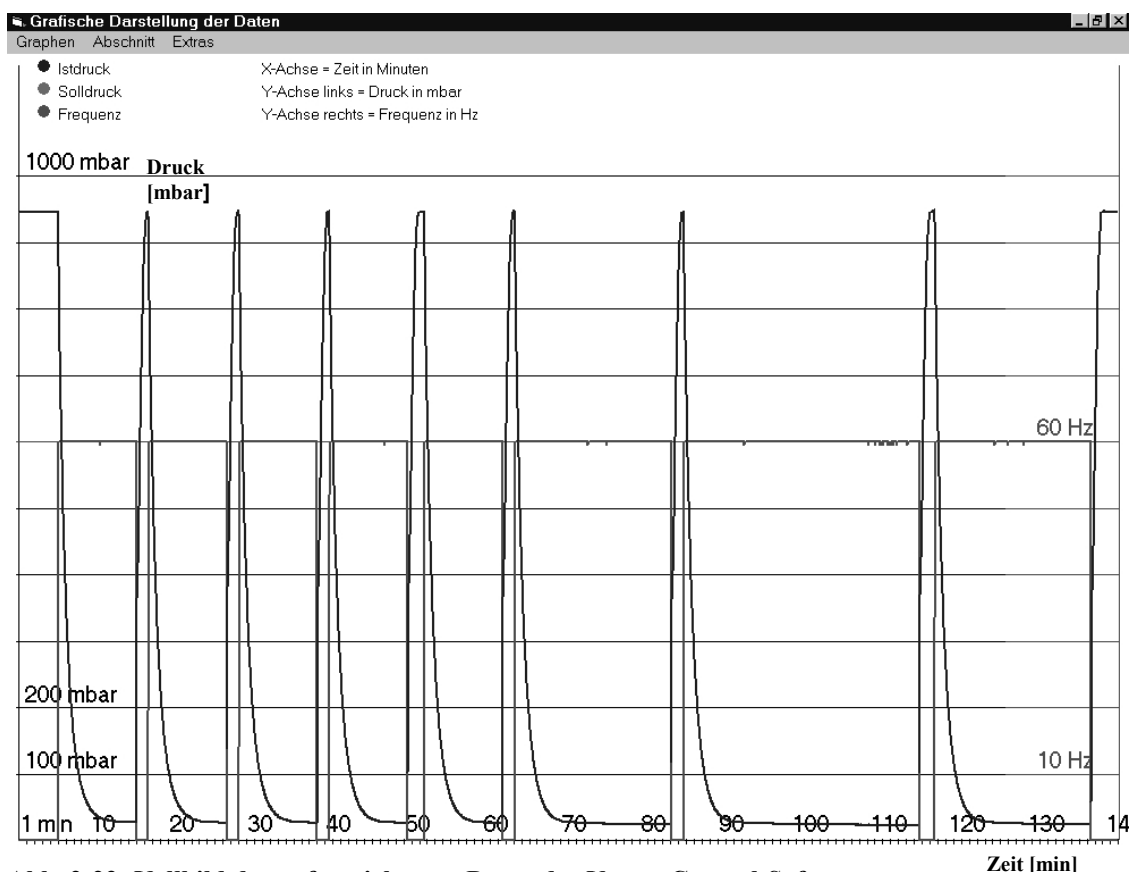


Abb. 2-22: Vollbild der aufgezeichneten Daten der Vacuu-Control-Software

Übersicht über die verschiedenen Softwareprogramme:

	Celsius (Memmert)	Vacuu-Control (Vacuubrand)	VacuGraph (Thyracont)	LPC 16 NT (Christ)
Speicherung der Datei	manuell am Ende des Prozesses	Automatische Abfrage nach Prozessende und Programm beenden	Autom. beim Datei beenden; Autom. speichern bei Erreichen der maximalen Messwertanzahl	Automatisch am Prozessende
Aufzeichnungsintervall	1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 12, 15, 20, 30, 40, 45, 60 min	1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30 s, 1, 2, 3, 4, 5 min	1, 2, 5, 10, 30 s, 1, 2 min, Trigger	alle 1 s
Max. Datenpunkte	nach 10000 h	Keine Begrenzung	8100	Keine Begrenzung
Automatische Achsen-skalierung für Gesamtansicht	nein	im Hauptfenster und im Extrafenster (Vollbild Graph) ja	ja	ja
Achsen Darstellung linear und logarithmisch (y-Achse)	nein	nein	ja	Druck: logarithmisch Temp.: linear
Zoomen der Achsen	<u>Temperatur:</u> Beide Achsen unabhängig <u>Druck:</u> Nur x-Achse	Im Vollbild jeweils getrennt über Eingabefenster Im Hauptfenster nicht	Zeit und Druck getrennt durch Eingabefenster bzw. Mausziehen Resetfkt. für Originalgröße	Getrennt möglich
Skalierung in mbar, Pa, Torr	nein	nein	ja	nein
Maxima und Minima Anzeige	nein	nein	ja	nein
Cursor	nein	nein	ja	nein

Tab. 2-9: Übersicht und Vergleich der verschiedenen Software-Programme

2.2.2. Allgemeine Verfahren

2.2.2.1. Rezepturherstellung, pH-Wert-Bestimmung und Filtration

Für die Versuche in den Kapiteln 3. und 4. (Ergebnisse und Diskussion Teil 1 und 2) wurden zwei verschiedene G-CSF Rezepturen verwendet (Tab. 2-10). Im weiteren Text werden sie als SP und SAP abgekürzt. Die Buchstaben stehen für die in der Rezeptur enthaltenen Hilfsstoffe. Die Rezeptur SAP ist die Saccharose-Variante der bei Mattern verwendeten G-CSF Maltose-Rezeptur [17]. Durch das Anhängen von 4 bzw. 7,4 an die Buchstaben-Kombination wird der pH-Wert der Rezeptur charakterisiert.

Komponente	Rezeptur SP [mg]	Rezeptur SAP [mg]
G-CSF	0,35	0,35
Saccharose (S)	50	50
Arginin (A)	-	15
Phenylalanin (P)	20	15
Polysorbat 80	0,1	0,1
Einstellung des pH mit NaOH bzw. HCl auf 7,4 bzw. 4,0	q.s.	q.s.
Reinstwasser	ad 1,0 ml	ad 1,0 ml

Tab. 2-10: Rezepturentabelle

Die Feststoffe wurden in einem Anteil Reinstwasser gelöst, Polysorbat 80 als Stammlösung zugesetzt und vor Zugabe der G-CSF-Bulklösung der pH-Wert voreingestellt. Dazu wurde ein pH-Meter Typ MP 220, mit einer Messelektrode Typ InLab 423 bzw. 413, Fa. Mettler, Giessen, benutzt. Dieses war vorher mit zertifizierten Kalibrierlösungen bei pH 7,0 und 2,0 (VWR / Merck Eurolab) kalibriert worden. Nach Einstellung des pH-Werts auf 7,4 bzw. 4,0 wurde der Messkolben mit Reinstwasser aufgefüllt.

Nach einer Sterilfiltration durch einen 0,22 µm Einmalfilter (Qualilab, Spritzenvorsatzfilter, VWR/ Merck Eurolab) unter einem Laminar-Air-Flow (Herasafe HS 18, Fa. Heraeus) wurden für jeden Trocknungsversuch jeweils 0,5 ml Lösung in die 2R-Vials pipettiert.

Um ein Vial nach der Trocknung wieder auf das Anfangsvolumen und damit zugleich auch das Anfangsgewicht rekonstituieren zu können, wurden die Vials zusammen mit einem Stopfen gewogen, die Rezeptur pipettiert und das gefüllte Vial + Stopfen erneut gewogen.

Für die Versuche im Kapitel 5. wurden die Rezepturen mit G-CSF und mit EPO und den jeweiligen Kohlenhydraten und Aminosäuren analog der gerade beschriebenen Herstellungsweise vorbereitet. Bei den EPO-Rezepturen wurde EPO in einer Konzentration von 0,1 mg/ml verwendet. Die Rezepturen wurden auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt.

2.2.2.2. Rekonstitution von getrockneten Proben

Die getrockneten Proben wurden auf einer Analysenwaage, Mettler Toledo B 204-S, jeweils einzeln anhand des vorher dokumentierten Vollgewichtes (Vial + Stopfen + Rezeptur) mit Reinstwasser rekonstituiert. Unter gelegentlichem langsamen Drehen und/oder leichten Schüttelbewegungen der Vials musste solange gewartet werden, bis sich alles gelöst hatte und keine Feststoffe mehr in der Lösung zu erkennen waren. Die Prüfung auf sichtbare (siehe 2.2.3.4.) bzw. nicht sichtbare Partikel (siehe 2.2.3.5.) erfolgte gemäß den Monographien des Ph. Eur. [109].

2.2.2.3. Durchführung von Einfrier- / Auftau-Zyklen

Für die Durchführung von Einfrier- / Auftau-Versuchen wurden flüssige und vakuumgetrocknete Proben in 2R-Vials verwendet. Nach dem Verschließen mit einem Stopfen und Verbördeln wurden die Vials für eine Minute in flüssigen Stickstoff getaucht. Um ein Verspröden des Stopfens zu vermeiden, wurden die Vials nur bis knapp unterhalb des Vialhalses eingetaucht. Nach dem Schockgefrieren folgte eine mehrstündige Lagerung bei -80 °C (GFL Tiefkühlschrank Typ 6483, GFL, Burgwedel). Der Auftauvorgang fand bei Raumtemperatur statt. 30 min nach der Entnahme aus dem Freezer erfolgte der nächste Einfrierschritt bzw. die Untersuchung der Proben mit SEC und Lichtblockade.

2.2.2.4. Bestimmung des Adsorptionsverhaltens von G-CSF an Glas

Zur Bestimmung der Adsorption des G-CSF an Glas wurden unsilikonisierte 2R-Vials mit verschiedener Vorbehandlung benutzt.

Neben neuen, unbenutzten Vials kamen welche zum Einsatz, in denen Placebo-Rez. SAP7,4 getrocknet worden war. Als drittes wurden Vials untersucht, in denen G-CSF-haltige Rez. SAP7,4 getrocknet worden war.

Alle Vials wurden mehrfach mit Reinstwasser gespült, bevor sie mit 0,5 ml 8 molarer Guanidinhydrochlorid- (Gua) bzw. 2 molarer SDS-Lösung über Nacht auf einem Vortexer inkubiert wurden. Sofern G-CSF an das Glas adsorbiert worden war, wird es durch die Gua- bzw. SDS-Lösung wieder desorbiert. Die Lösungen wurden mittels UV-Messung bei 280 nm analysiert. Die Gehalte des adsorbierten und wieder desorbierten G-CSF wurden über eine Eichgerade errechnet.

2.2.2.5. Einlagerungen

Stabilitätseinlagerung

Die getrockneten Proben wurden in verbördelten Vials für einen Kurzbelastungstest über 12 Wochen bei verschiedenen Temperaturen (Tab. 2-11) in temperierten Trockenschränken, Fa. Memmert bei normaler Raumfeuchte eingelagert. Von der Rezeptur SAP4 und SAP7,4 wurden zusätzlich nicht vollständig getrocknete Proben eingelagert, die während der Trocknung gezogen worden waren.

Rezepturen mit	Flüssig-Proben gelagert bei [°C]	Getrocknete Proben gelagert bei [°C]
<ul style="list-style-type: none"> • G-CSF-Rez. SAP4 • G-CSF-Rez. SAP7,4 	4, 23, 30, 40, 50	4, 23, 30, 40
<ul style="list-style-type: none"> • Kohlenhydrat-Rez. • Kohlenhydrat-Aminosäure-Rez. 	4, 20, 30, 40	4, 20, 40, 50
<ul style="list-style-type: none"> • Cyclodextrin-Rez. • Cyclodextrin-Phenylalanin-Rez. 	4, 20, 30, 40	4, 40, 50

Tab. 2-11: Einlagerungstemperaturen [°C] verschiedener Stabilitätseinlagerungen

Einlagerung von Proben zur Rückbefeuchtung

Zur Rückbefeuchtung von getrockneten Proben wurden die Vials in Exsiccatoren mit verschieden eingestellten, definierten relativen Feuchten bei 20 °C gelagert. Auf allen Vials steckten Stopfen in der GT-Position, um die Vials nach der Lagerung verschließen zu können. Mit Hilfe von gesättigten Salzlösungen wurden folgende relative Feuchten eingestellt: 96 % r.F. (KNO₃), 86 % r.F. (KCl), 76 % r.F. (NaCl) und 65 % r.F. (NaNO₂). Die tatsächliche relative Feuchte wurde anhand eines Handhygrometer H 1, Fa. Testo, Lenzkirch, überprüft. Sie stimmte jeweils mit einer Schwankungsbreite von ±1% mit den theoretischen Werten überein [65].

2.2.2.6. Versuche zur Optimierung der Rezeptur

Alle Rezepturen wurden aufgrund ihrer Chargengröße in der Gefriertrocknungsanlage Epsilon 2-12D Special, Fa. Christ, gemäß den Trocknungsprogrammen in 2.2.1.6., gefrier- bzw. vakuumgetrocknet.

Placeboversuche

Der Gefriertrocknungsprozess wurde nach 45 h und der Vakuumtrocknungsprozess bereits nach 25 h beendet. Die Vials wurden in der mit trockenem Stickstoff belüfteten GT-Anlage bei einem Vakuum von ca. 800 mbar verschlossen.

Pro Trocknung wurden 2R-Vials mit 0,5 ml Lösung getrocknet.

Jeweils 3 Proben wurden für Karl-Fischer-Titration bzw. DSC-Messung verwendet.

Placebo-Rezeptur	Abkürzung
Agenamalt	AM
Isomalt ST	IST
Isomalt GPS angereichert	GPS
Isomalt GPM angereichert	GPM
Raftiline ST	RST
Raftilose P95	R
Trehalose	T

Tab. 2-12: Tabelle der Hilfsstoffe und der verwendeten Abkürzungen der Placebo-Rezepturen

Von den angegebenen Hilfsstoffen (Tab. 2-12) wurde jeweils eine Rezeptur mit 50 mg/ml Hilfsstoff, sowie zusätzlich mit 10 mg/ml und alternativ zusätzlich mit 20 mg/ml Zusatz von Phenylalanin hergestellt.

Versuche mit G-CSF bzw. EPO – Teil 1: verschiedene Rezepturen

Um einen direkten Vergleich zwischen den beiden Trocknungsmethoden ziehen zu können, wurden für die Evaluierung der proteinhaltigen Rezepturen jeweils 48 h Prozessdauer für die Gefrier- und Vakuumtrocknung angewandt. Getrocknet wurden jeweils 0,5 ml Lösung in 2R-Vials. Die Lösung bestand aus 50 mg/ml Kohlenhydrat und 10 mg/ml Phenylalanin-Zusatz bei den phenylalanin-haltigen Lösungen.

Für G-CSF wurden Rezepturen mit pH 7,4 und pH 4,0 hergestellt. Die EPO-Rezepturen besaßen alle pH 7,2.

Zur Unterscheidung zwischen G-CSF- und EPO-haltigen Rezepturen, der beiden pH Werte bei G-CSF und den beiden Trocknungsverfahren wird daher die Nomenklatur der Rezepturen ausgedehnt und an 2 Beispielen erklärt:

- Die Buchstaben **F** (flüssig), **G** (gefriergetrocknet) und **V** (vakuumgetrocknet) geben die Zubereitungsform der Proben an.
- Der nächste Buchstabe bzw. die nächsten Buchstaben stehen für die Rezeptur.
- Der Buchstabe **P** steht für Phenylalanin in den phenylalanin-haltigen Rezepturen.
- Für G-CSF-Rezepturen werden die beiden pH-Werte zur Unterscheidung angefügt. Bei allen EPO-Rezepturen wird ein -EPO angehängt.

Beispiele:

- GAMP7,4 steht für eine **G**-efriergetrocknete Rezeptur aus **A**-gena-**M**-alt mit **Phe**-Zusatz von G-CSF mit pH 7,4
- FR-EPO steht für eine **F**-lüssige Rezeptur aus **R**aftilose P95 von **EPO**

Verwendete Rezepturen:

- AM und AMP
- R und RP
- T und TP
- SAP

Versuche mit G-CSF bzw. EPO - Teil 2: Rezepturen mit HP- β -cyclodextrin

Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurde jeweils eine Prozessdauer von 48 h für die Gefrier- und Vakuumtrocknung der HP- β -cyclodextrin-Rezepturen (CD) benutzt.

Von CD wurden ebenfalls 50 mg/ml und von Phe 10 mg/ml eingesetzt. Für G-CSF wurden Rezepturen mit pH 7,4 und 4,0 und für EPO mit pH 7,2 hergestellt.

Getrocknet wurden jeweils 0,5 ml Lösung in 2R-Vials.

Cyclodextrin-Rezepturen

- CD7,4 und CDP7,4
- CD4 und CDP4
- CD-EPO und CDP-EPO

Weitere Versuchsdurchführung

Die Vials wurden in der mit trockenem Stickstoff belüfteten GT-Anlage bei einem Vakuum von ca. 800 mbar verschlossen. Mit dieser Vorgehensweise sollten zum einen der Einschluss von Luftfeuchtigkeit und zum anderen die Oxidation durch Luftsauerstoff in den Vials minimiert bzw. ausgeschlossen werden.

Um für die Vials, die mit flüssiger Rezeptur eingelagert werden sollten, ähnliche Bedingungen zu schaffen, wurden die befüllten Vials einzeln für 10 Sekunden mit trockenem Stickstoff begast und verschlossen.

Rezeptur	Lagertemperaturen [°C]	Probezug [Wochen]
Teil 1, versch. Rezepturen flüssig	4, 20, 30, 40	1, 2, 4, 6, 12
Teil 1, versch. Rezepturen getrocknet	4, 20, 40, 50	2, 4, 8, 12
Teil 2, CD flüssig	4, 20, 30, 40	2, 3, 4, 6, 12
Teil 2, CD getrocknet	4, 40, 50	2, 6, 12

Tab. 2-13: Tabelle der Lagerbedingungen und der Probezug-Zeitpunkte

Analytik

Die Proben von den einzelnen Probezug-Punkten wurden mittels Karl-Fischer, Lichtblockade und SEC charakterisiert. Von den getrockneten Proben wurde vom Beginn und vom Ende der Einlagerung der T_g bestimmt.

Ausgewählte Proben wurden zusätzlich mit Röntgendiffraktometrie auf ihre Morphologie und mit dem Rasterelektronenmikroskop auf ihre Oberflächenmorphologie untersucht.

Als Nullwert für den Beginn der Einlagerung wurde jeweils von 3 Proben der Mittelwert gebildet.

Aufgrund des umfangreichen Versuchsplans konnte zu allen anderen Probezugpunkten nur eine Probe gezogen werden.

Für die KF- und DSC-Bestimmung vom Lagerungsende nach 12 Wochen wurde der Mittelwert aus 2 Proben gebildet.

2.2.3. Charakterisierung der Zubereitungen

2.2.3.1. Gravimetrischer Wasserverlust

Um Daten über die Trocknungsgeschwindigkeit und letztendlich über den Trocknungsgrad zu erhalten, wurden während der Versuche zu bestimmten Zeiten der Trocknungsprozess unterbrochen. Die entnommenen Proben wurden auf einer Analysenwaage, Mettler Toledo B 204-S, gewogen. Der Massenverlust (MV) der Proben gab Auskunft über den Verlust an Wasser und damit der Restfeuchte der Proben.

Der bestimmte Massenverlust (MV) wurde in den Wasserverlust (WV) umgerechnet, so dass 0 % Wasserverlust für die pipettierte Rezeptur und 100 % für eine vollständig getrocknete Probe stehen.

2.2.3.2. Wassergehalt nach Karl-Fischer-Titration

Der Restwassergehalt in den getrockneten Produkten wurde mittels coulometrischer Titration (Metrohm 737 KF Coulometer mit 703 Titrationsstand, Filderstadt, bestimmt.

Durch Wiegen von Stopfen und Vial ohne und mit Rezeptur vor und nach der Trocknung, sowie nach Methanolzugabe wurde der Restwassergehalt jeder einzelnen Probe berechnet.

Bei jeder Titration wurde der gesamte Inhalt eines Vials in ca. 2 ml wasserfreiem Methanol (Hydranal – Methanol dry, VWR / Merck Eurolab) aufgelöst bzw. dispergiert.

Um ein Einschleppen von Wasser aus der Raumluft beim Einspritzen des wasserfreien Methanols zu minimieren, wurden alle Vials zusammen mit dem wasserfreien Methanol in eine Glovebox gestellt und diese mit trockenem Stickstoff (Qualität 5.0) geflutet.

Nach mindestens 30 min Begasung wurde ein Becherglas mit etwas wasserfreiem Methanol befüllt, damit gespült und das Methanol verworfen. Das Becherglas wurde dann mit der Menge an Methanol, für alle Proben ausreichend, befüllt.

Mit einer Plastikspritze wurden ca. 2 ml wasserfreies Methanol durch den Stopfen in die Vials gespritzt. Um die Wasseraufnahme des Methanol während des Befüllens der Vials von den ermittelten Restwassergehalten abziehen zu können, wurden analog zu den Proben einer Messcharge 5–7 Vials als Methanol-Blindwerte mit ebenfalls 2 ml Methanol befüllt.

Außerhalb der Glovebox wurden die Vials gewogen, mit einem Vortexer behandelt und für 5–15 min mit Ultraschall behandelt und anschließend zentrifugiert, sofern keine klare Lösung vorlag.

Die Messlösung (Hydranal–Coulomat-Lösung, VWR / Merck Eurolab) des Metrohm Coulometers wurde zu Beginn der Messungen konditioniert, d.h. die Messlösung wurde auf einen Nullgehalt an Wasser austitriert. Zugleich bestimmt das Coulometer die Drift, die durch eindringende Feuchtigkeit aus der Luft verursacht wird.

Um ein Einschleppen von Wasser in das Vial zu minimieren, war es unabdingbar, zügig zu arbeiten sobald das Vial zur Probenentnahme geöffnet wurde.

Mit einer Hamilton Spritze (0,5 ml) wurde ein Aliquot aus dem Vial in das Coulometer überführt. Sobald die injizierte Probe austitriert war, konnten der Wassergehalt abgelesen und die nächste Probe eingespritzt werden.

Für die Angabe von Nullwerten direkt nach der Trocknung wurde der Mittelwert aus 3 Proben gebildet. Alle weiteren Messpunkte ergeben sich aus einer Einzelbestimmung.

2.2.3.3. Differentialscanningcalorimetrie (DSC)

Zur Bestimmung der Glasübergangstemperaturen der getrockneten Proben wurde die dynamische Differenzkalorimetrie benutzt. Bei dieser Methode wird die Temperaturdifferenz zwischen den Proben und einem Referenztiegel gemessen und daraus der Wärmestrom berechnet. Der Wärmestrom wird als Funktion gegen die Temperatur oder die Zeit aufgetragen. Das Probenmaterial wird dabei einem kontrollierten Temperaturprogramm unterworfen.

Die Messungen erfolgten mit der DSC 204 Phoenix ASC, Fa. Netzsch, Selb, bestehend aus einem Autosampler ASC 204, DSC-Ofen 204, TASC 414 / 3A Controller und CC 200L Controller. Zur Dokumentation und Auswertung der Thermogramme wurde die Software Proteus, Version 4.12, verwendet.

Nach dem Homogenisieren der Proben wurden ca. 5–10 mg Substanz in Alutiegeln, Netzsch, mit einem Volumen von 25 bzw. 40 μl auf einer Analysenwaage Mettler Toledo HB 104 eingewogen und die Tiegel mit der zugehörigen Universalverschlusspresse kaltverschweißt. Üblicherweise wurden verschlossene Tiegel vermessen. Kurz vor der Messung automatisch gelochte Tiegel wurden nur bei Rezepturen verwendet, deren Tiegel sich ansonsten durch Volumenexpansion verformt und damit ein verfälschtes Messsignal ergeben hätten. Zu einer Volumenexpansion kann es durch entstehende Zersetzungsprodukte oder durch Wasserdampf kommen.

Der Probenofen wurde mit trockenem Stickstoff (Qualität 5.0) mit 0,5 bar gespült, um entstandene Zersetzungsprodukte aus dem Ofen zu entfernen bzw. das Eindringen von Luftfeuchtigkeit zu verhindern. Zur Kühlung des Ofens wurde gasförmiger bzw. flüssiger Flüssigstickstoff benutzt.

Die Tiegel wurden stets bei Raumtemperatur in den Ofen eingesetzt. Die Heizrate der T_g -Messungen betrug 10 bis 20 K/min. Der T_g -Wert wird als Midpoint der sigmoidal verlaufenden Glasumwandlungskurve angegeben.

Für die Angabe von Nullwerten direkt nach der Trocknung von Proben wurde der Mittelwert aus 3 Einzelwerten gebildet. Alle weiteren Messpunkte ergeben sich aus einer Einzelbestimmung.

2.2.3.4. Prüfung auf sichtbare Partikel

Die Prüfung auf Partikelkontamination - sichtbare Partikel - erfolgte gemäss der Monographie 2.9.20. des Ph. Eur. [109]. Nach der vollständigen Rekonstitution der Proben wurden die Vials einzeln gegen den weißen und schwarzen Hintergrund des Gerätes zur Prüfung der sichtbaren Partikel betrachtet. Als Referenz diente jeweils ein mit gleichem Volumen an Reinstwasser befülltes 2R-Vial.

Unter Partikeln in den Proben werden in diesem Zusammenhang fremde, bewegliche, ungelöste Partikel verstanden, die unbeabsichtigt in den Lösungen vorhanden sind, mit Ausnahme von Gasbläschen. Zum einen stehen als Quelle für Partikel Verunreinigungen oder Absonderungen oder Absplitterungen von Primärpackmitteln im Vordergrund. Zum anderen können Partikel durch Instabilitäten oder Inkompatibilitäten gebildet werden. Ziel der Prüfung auf Partikel war in dieser Arbeit mehr das Erfassen von Tendenzen als eine strenge Quantifizierung der genauen Partikelzahl.

2.2.3.5. Prüfung auf nicht sichtbare Partikel

Die Prüfung auf Partikelkontamination - nicht sichtbare Partikel - erfolgte gemäss einer modifizierten Form der Monographie 2.9.19 des Ph. Eur. [109]. Die Messungen wurden mit einem Lichtblockade Gerät PAMAS – SVSS-C, Sensor HCB-LD-25/25 der Fa. Partikelmess- und Analysesysteme, Rutesheim, durchgeführt.

Alle Proben lagen bei Raumtemperatur vor. Gelagerte Proben wurden zur Homogenisierung der Partikelverteilung in der Lösung vorsichtig umgeschwenkt, wobei darauf geachtet wurde, dass sich keine Luftbläschen durch das Umschwenken bildeten.

Das Gerät wurde so lange mit partikelfreiem Wasser gespült, bis keine Partikel größer 10 µm mehr nachgewiesen wurden. Nach jeweils 10 Messproben wurde partikelfreies Wasser vermessen, um die Abwesenheit von Partikeln im Wasser und die einwandfreie Funktion des Lichtblockade-Gerätes zu überprüfen.

Mit folgenden Einstellungen wurden alle Messungen ausgeführt:

- | | | | |
|-------------------|--------|--------------|-----------|
| • Vorlaufvolumen: | 0,3 ml | • Füllrate: | 7 ml/min |
| • Messvolumen: | 0,4 ml | • Leerrate: | 10 ml/min |
| • Analysevolumen: | 0,4 ml | • Spülrate: | 7 ml/min |
| | | • Wartezeit: | 1 sec |

Die angegebenen Messergebnisse resultieren aus dem Mittelwert von je drei Einzelmessungen aus einer Messprobe. Eine Messprobe wurde aus 100 µl Aliquot der zu vermessenden Probe und 1400 µl partikelfreiem Wasser hergestellt. Der vorliegende Verdünnungsfaktor von 14 wird durch das Pamas-Gerät berücksichtigt. Die angegebenen Partikelwerte sind auf ein Volumen von 1,0 ml bezogen und werden in kumulativer Darstellung notiert. Vor dem Export des Messergebnisses (= Mittelwertes der drei Messungen) wurden die drei Einzelwerte auf eine maximale Abweichung von 10 % vom Mittelwert überprüft und gegebenenfalls abweichende Einzelwerte eliminiert. Zur Auswertung wurde die Software PMA – Partikel Mess- und Analyseprogramm, Version 1.28, Fa. Pamas, benutzt.

2.2.3.6. UV-Bestimmung des Proteingehaltes

Der Proteingehalt der Bulklösung wurde durch Messung der Extinktion bei 280 nm bestimmt. Die Bulklösung wurde mit Reinstwasser verdünnt und gegen Reinstwasser gemessen. Die Durchführung der Gehaltsbestimmung erfolgte mit Quarzküvetten (Schichtdicke 1cm) in einem UV-Spektrometer Hitachi U 1100, Fa. Juan, Unterhaching, bzw. UV Thermo Spectronic UV 1, Egelsbach. Der Proteingehalt c der Verdünnung berechnet sich nach der Formel $c = A_{280} \times F / 0,86$ für G-CSF bzw. $c = A_{280} \times F / 1,24$ für EPO [132,133]. F steht für den Verdünnungsfaktor der Probe. Die beiden Zahlen sind jeweils der Extinktionskoeffizient der verwendeten Proteine.

2.2.3.7. Weitwinkelröntgendiffraktometrie (RD)

Um die Morphologie der getrockneten Proben zu bestimmen, wurden die Proben mit einem X-Ray Diffractometer XRD 3000 TT, Fa. Seifert, Ahrensburg, in einem auf 22 °C temperierten Raum untersucht. Die Röntgenröhre Cu-Anode, Cu-K_α-Strahlung mit $\lambda = 0,15418$ nm (Primärfilter Ni), wurde mit einer Anodenspannung von 40 kV und einer Stromstärke von 30 mA betrieben.

Aus den getrockneten Proben wurde jeweils Material entnommen, in einem Achatmörser verrieben und homogenisiert. Anschließend wurde das Pulver in die Vertiefung (1,2 * 1,2 * 0,02 cm) des Proben Tellers ohne Verdichtung des Materials eingebracht und mit einem Objektträger gleichmäßig darin verteilt.

Nach Positionieren des Proben Tellers im Gerät wurde die Probe im Bereich von 5° bis 40° mit einer Scanrate von $2\theta = 0,05^\circ$ mit 2 sec Messdauer bei jedem Winkel vermessen.

Die Pulverdiffraktogramme wurden mit der ScanX-Rayflex Applikation, Version 3.07 device XRD 3000 (Scan), bzw. der Rayflex Version 2.1, 1996 (Analyse) am Detektor SC 1000 V aufgenommen.

Um Pulverdiffraktogramme überlagern zu können, wurden die Daten in Excel importiert.

2.2.3.8. SDS-Page-Gelelektrophorese

Die SDS-Page-Gelelektrophorese wurde benutzt, um Proben auf ihre Zusammensetzung hinsichtlich Aggregate, Dimer, Monomer und Fragmente zu untersuchen. Alle Hilfsmittel wurden von Fa. Invitrogen, Karlsruhe, bezogen.

Die Proben wurden unter reduzierenden (DTT-Zusatz zum Probenpuffer) und nicht-reduzierenden Bedingungen bei 95 °C 30 min lang denaturiert. Der Probenpuffer setzte sich aus Natriumdodecylsulfat, Bromphenolblau und Glycerin zusammen.

Auf jeweils separaten Gelen (10 %-ige Novex Bis-Tris-Gele, 1,0 mm * 10 well) wurden 20 µl Probe pro Geltasche mit einem NuPage MES SDS Laufpuffer mit 35 mA pro Gel aufgetrennt. Die nach Molekulargewicht aufgetrennten Proben wurden durch Coomassie- und/oder Silberfärbung sichtbar gemacht.

5 µl und 10 µl Molekulargewichtsmarker Mark 12 pro Gel dienten zur Molekulargewichtsbestimmung. Auf jedem Gel wurde verdünnte Proteinlösung als Arbeitsstandard verwendet.

Nach der Entfärbung wurden die Gele und Cellophanpapiere in Gel-dry-Trocknungslösung getaucht und zum Trocknen in einem Rahmen aufgespannt. Die konservierten Gele wurden schließlich eingescannt und mittels der Scan Pack 3.0 Software, Fa. Biometra, Göttingen, dokumentiert und ausgewertet.

2.2.3.9. Größenausschlusschromatographie (SEC)

Der Monomergehalt der Proben wurde mittels Größenausschlusschromatographie bestimmt. Die technischen Bedingungen sind in Tab. 2-14 aufgelistet.

Geräte (Fa. Thermoquest)	Pumpe P 100, Autosampler AS 100, UV-Detektor UV 100
Elutionspuffer	100 mM bzw. 300 mM Natriumphosphat mit pH 7,0 zweifache Sterilfiltration durch doppelten 0,2 µm Membranfilter (Fa. Sartorius)
Temperaturen	Probenhalter gekühlt auf 10 °C; Säule temperiert auf 20 °C
Flussrate	0,7 ml/ min
Probenkonzentration	G-CSF 0,35 mg/ml; EPO 0,1 mg/ml
Einspritzvolumen	20 µl
Detektion	<ul style="list-style-type: none"> • 280 nm (TSK G 3000 SWXL, Tosoh Bioscience, Stuttgart) • 215 nm (Superdex 75 HR 10 / 30, Pharmacia, Freiburg)
Probenlaufzeit	<ul style="list-style-type: none"> • 30 min (TSK G 3000 SWXL) • 50 min (Superdex 75 HR 10 / 30), 70 min bei HP-β-CD-Rez.
Auswertesoftware	Chromquest Version 3.0, Thermoquest
Säulen	<ul style="list-style-type: none"> • TSK G 3000 SWXL, Tosoh Bioscience • TSK G 3000 PWXL, Tosoh Bioscience • Superdex 75 HR 10 / 30, Pharmacia

Tab. 2-14: Übersicht der SEC-Parameter

Bei der SEC-Analytik ist festgestellt worden, dass sich das Verhältnis der Fraktionen in Abhängigkeit von der Standzeit der Probe nach der Rekonstitution verändert. Daher wurden daraufhin alle G-CSF Proben einzeln rekonstituiert und mit dem Autosampler in Einzelinjektionen analysiert. Bei den EPO-Proben konnten die Proben im Sequenzmodus analysiert werden, da es hier zu keiner Veränderung der Fraktionen-Verhältnisse kam.

Die angegebenen Monomergehalte wurden über die jeweils ermittelten Gesamtflächen aller Fraktionen ohne die Hilfsstoff-Peaks der Injektionen berechnet. Von jeder Rezeptur wurde sofort nach der Herstellung ein Nullwert der ungestressten Rezeptur durch Mehrfachinjektion und Mittelwert-Bildung bestimmt.

$$\text{Monomergehalt [\%]} = \frac{\text{Gesamtfläche untersuchte Probe}}{\text{Gesamtfläche Nullwert}} \times 100 \times \text{prozentualer Anteil des Monomer- Peaks der untersuchten Probe}$$

Für die Vielzahl der Proben von Kapitel 5. wurden 2 UV-Detektorlampen benötigt. Da das UV-Signal der zweiten, neuen Lampe höher als das der älteren ersten war, wurden die Flächen über die beiden Kalibriergeraden (alte und neue Lampe) der externen Standardreihen umgerechnet.

Säulentyp 1: Tosoh Bioscience, TSK-GEL G 3000 SWXL

Zu Beginn der Arbeit wurden die Proben mit einer SEC-Säule von Tosoh Bioscience, TSK-GEL G 3000 SWXL, 30 cm x 7,8mm ID, mit einem 100 mM Na₃PO₄ Puffer in die Fraktionen aufgetrennt. Dieser Säulentyp ist mit Silicat gefüllt, das mit hydrophilen Gruppen derivatisiert ist.

Zur Bestätigung der Trennleistung der Säule wurden die Rezepturbestandteile jeweils alleine und als komplette Rezeptur injiziert. Abb. 2-23 zeigt ein überlagertes Chromatogramm der vier Injektionen. Anhand der dicken Linie (Rezeptur) ist deutlich erkennbar, dass die Hilfsstoffe Saccharose, Arginin, Phenylalanin und G-CSF Monomer getrennt detektiert werden.

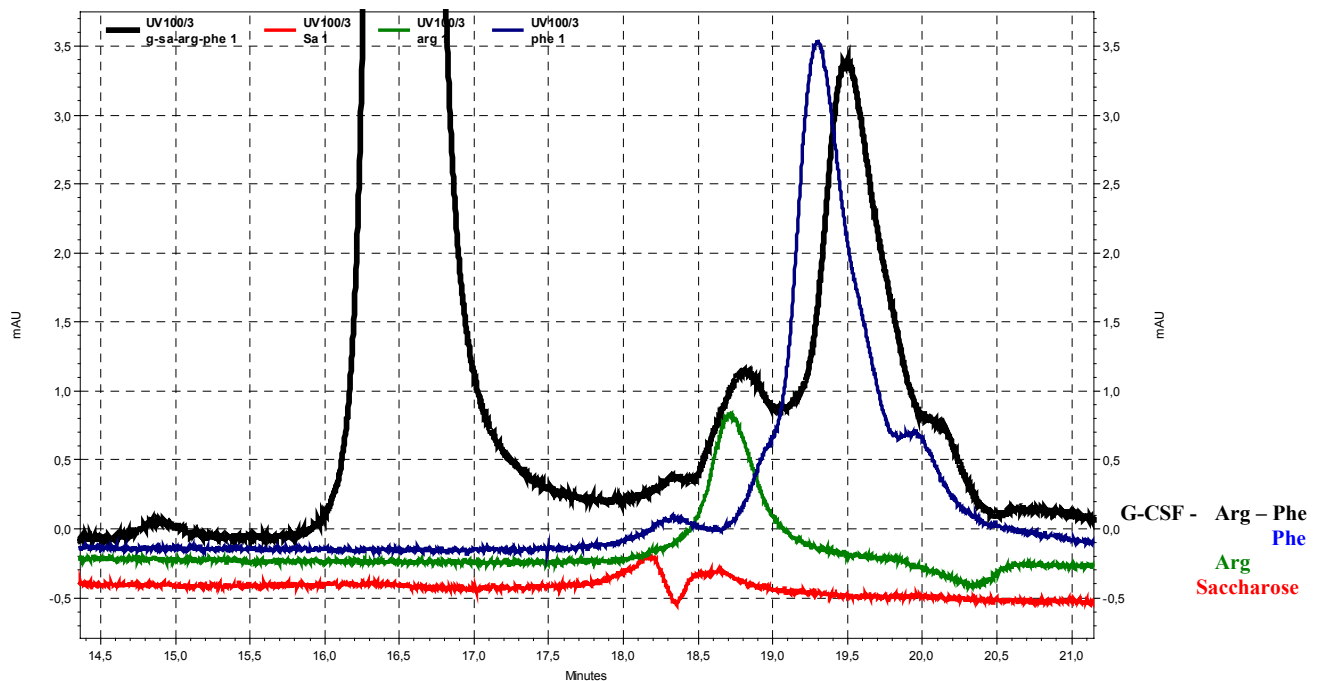


Abb. 2-23: Überlagerung verschiedener Injektionen

Bei mehreren Säulen des Typs TSK GEL G 3000 SWXL trat nach einer Injektionszahl von ca. 250 zum einen starkes Tailing des Monomer-Peaks (**Abb. 2-24**) bzw. zum anderen eine ungenügende Trennung in Form eines Doppel-Peaks des Monomers (**Abb. 2-25**) auf.

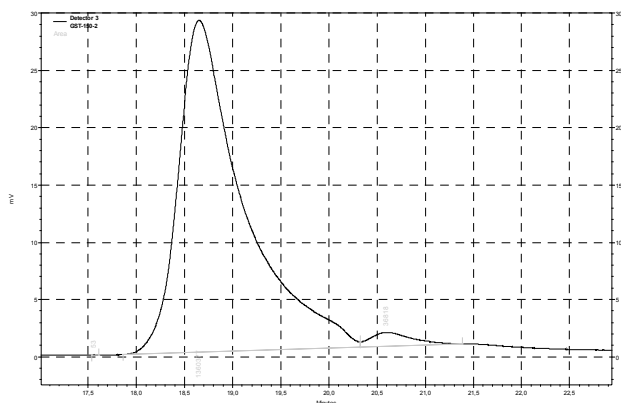


Abb. 2-24: Tailing des G-CSF Monomer-Peaks

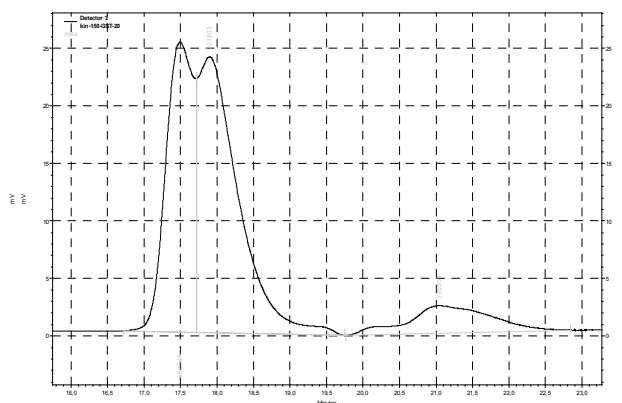


Abb. 2-25: Doppel-Peak des G-CSF Monomer-Peaks

Reinigungsprozeduren zeigten keine Verbesserung. Einzige Abhilfe brachte die Verwendung einer neuen Säule. Obwohl für die Trennung von G-CSF dieser Säulentyp bzw. dieses Säulenmaterial in diversen Literaturstellen zitiert wird, konnte kein Hinweis in der Literatur auf die beobachtete kurze Lebensdauer der Säule gefunden werden [42,134-137].

Säulentyp 2: Tosoh Bioscience, TSK-GEL G 3000 PWXL

Es wurde die Trennung der Proben mit einem anderen Säulentyp (TSK G 3000 PWXL) (Detektion bei 215 nm) versucht. Die Säule ist mit einem Methacrylat-Polymer befüllt. Drei Testbedingungen veranschaulichen die Probleme bei der Fraktionierung der Proben. Die überlagerten Kurven in den folgenden Abbildungen sind an der y-Achse verschoben, damit die einzelnen Kurvenverläufe besser erkannt werden können.

Testbedingung 1: Laufpuffer: 100 mM Natriumphosphat mit pH 7,0

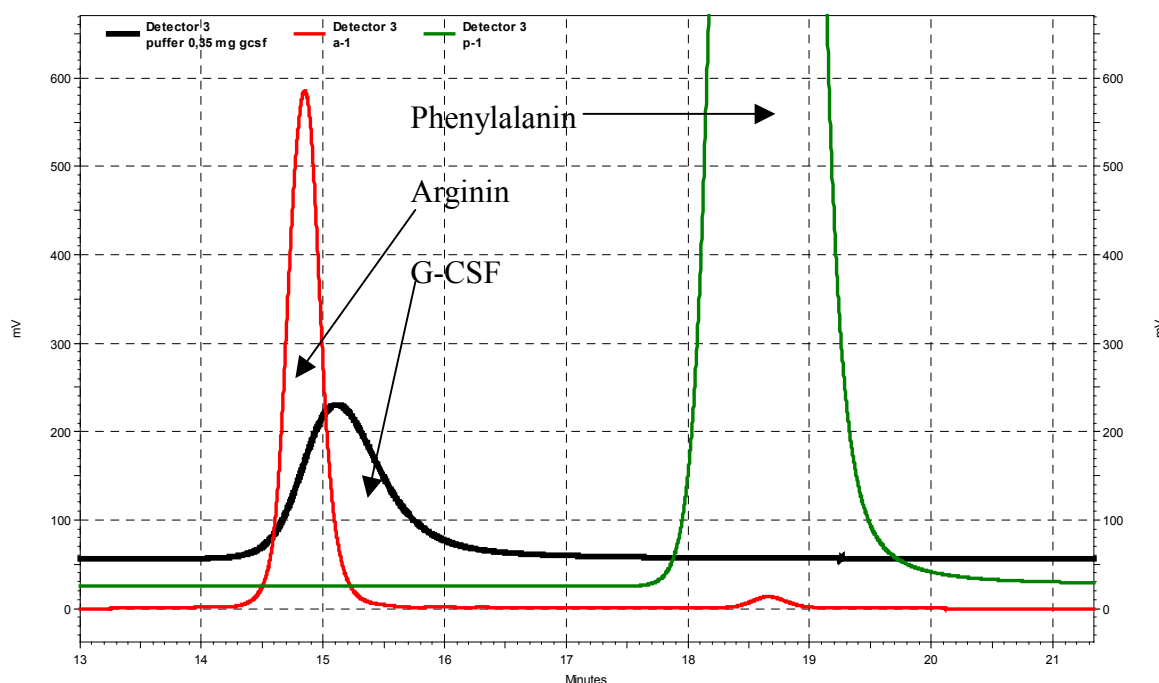


Abb. 2-26: überlagertes Chromatogramm mit Arginin, Phenylalanin und G-CSF

In Abb. 2-26 kommt es zu Überlagerung von Arginin und dem G-CSF Monomer bei nahezu gleicher Retentionszeit.

Testbedingung 2: Laufpuffer: **300 mM** Natriumphosphat mit pH 7,0 (höher molarer Puffer)

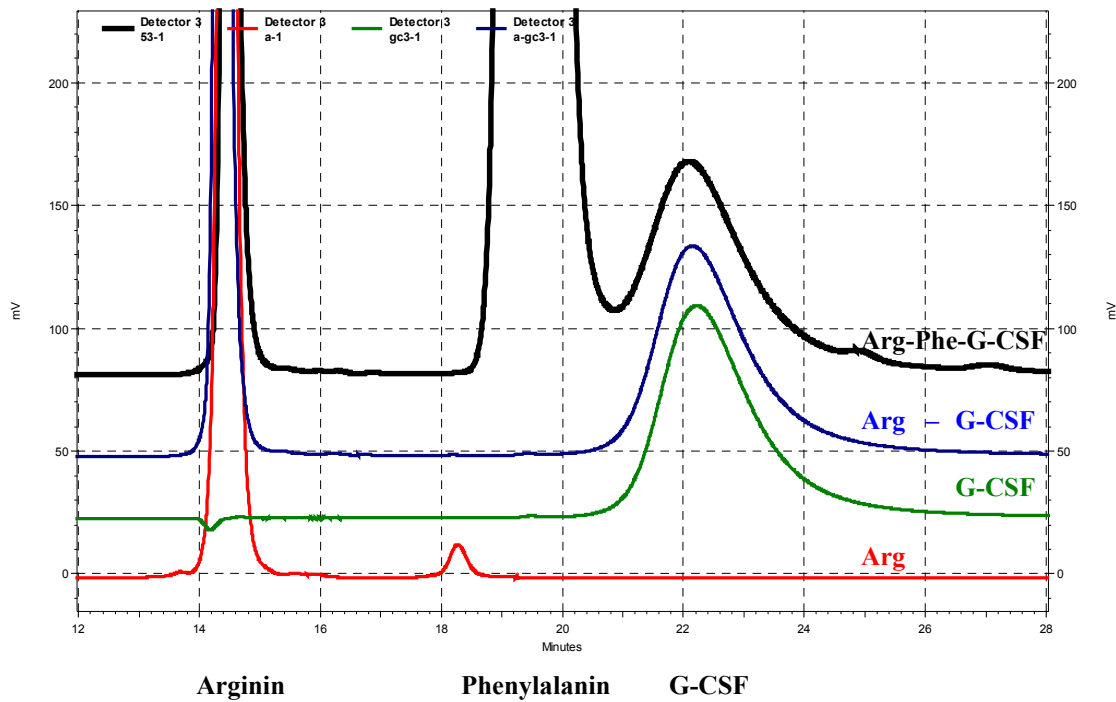


Abb. 2-27: überlagertes Chromatogramm bei höher molarem Laufpuffer

Durch Erhöhung der Molarität des Laufpuffers kommt es zu einer starken Verschiebung des G-CSF-Monomer-Peaks. Während ein 100 mM Puffer zu einer Überlagerung mit Arginin führt, erfolgten bei 300 mM eine Überlagerung des Phenylalanins mit möglichen Aggregat- und/ oder Dimer-Fractionen sowie eine unzureichende Abtrennung des Monomer-Peaks (Abb. 2-27).

Testbedingung 3: Laufpuffer: **300 mM** Natriumphosphat mit **pH 4,2** (höher molarer, saurer Puffer)

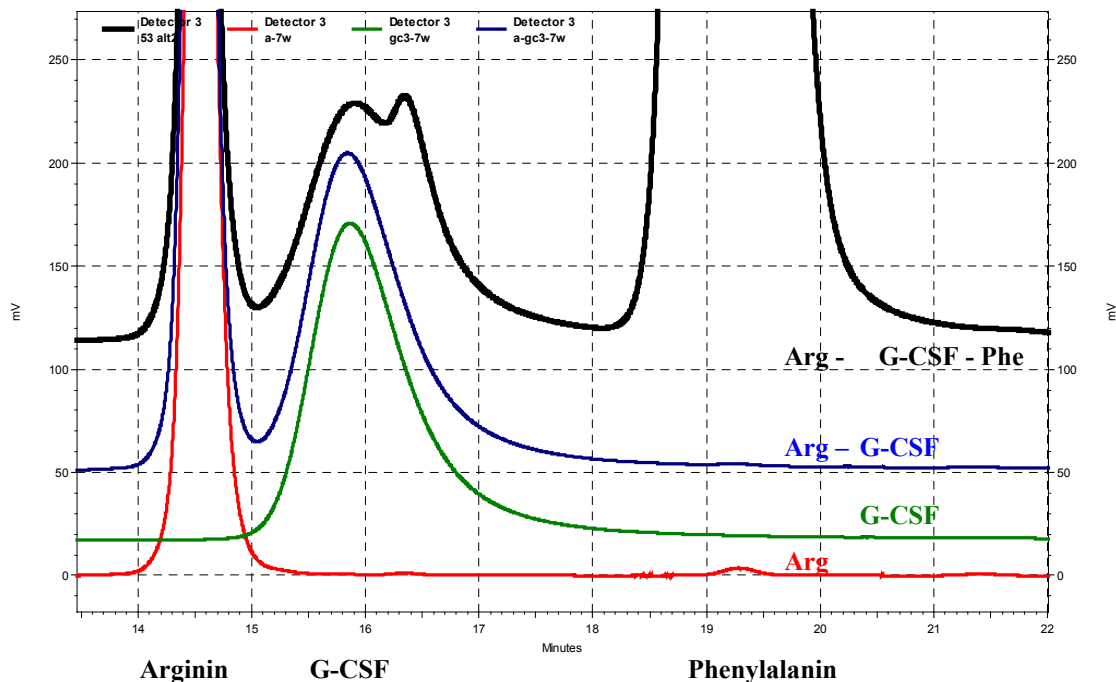


Abb. 2-28: überlagertes Chromatogramm bei höher molarem, saurem Laufpuffer

Durch Erniedrigung des pH-Wertes des Laufpuffers verschiebt sich der Monomer-Peak wieder zwischen den Arginin- und Phenylalanin-Peak. Auch hier erfolgt keine akzeptable Fraktionierung der Probe (Abb. 2-28).

Aufgrund dieser Trennergebnisse ist die TSK G 3000 PWXL Säule für die Anwendung ungeeignet.

Säulentyp 3: Pharmacia, Superdex 75 HR 10 / 30 (funktionierende Fraktionierung)

Die Säule Superdex 75 HR 10 / 30 ist mit einem quervernetzten Gemisch aus Agarose und Dextran befüllt.

Erst durch Verwendung dieser Säule in Verbindung mit einem 300 mM Natriumphosphat-Puffer mit pH 7,0 konnten die Proben in ihre Aggregat-, Dimer-, Monomer- und Fragment-Fractionen aufgetrennt und bei 215 nm detektiert werden. Die Hilfsstoffe störten dabei die Detektion der einzelnen Fraktionen nicht (Abb. 2-29, Abb. 2-30).

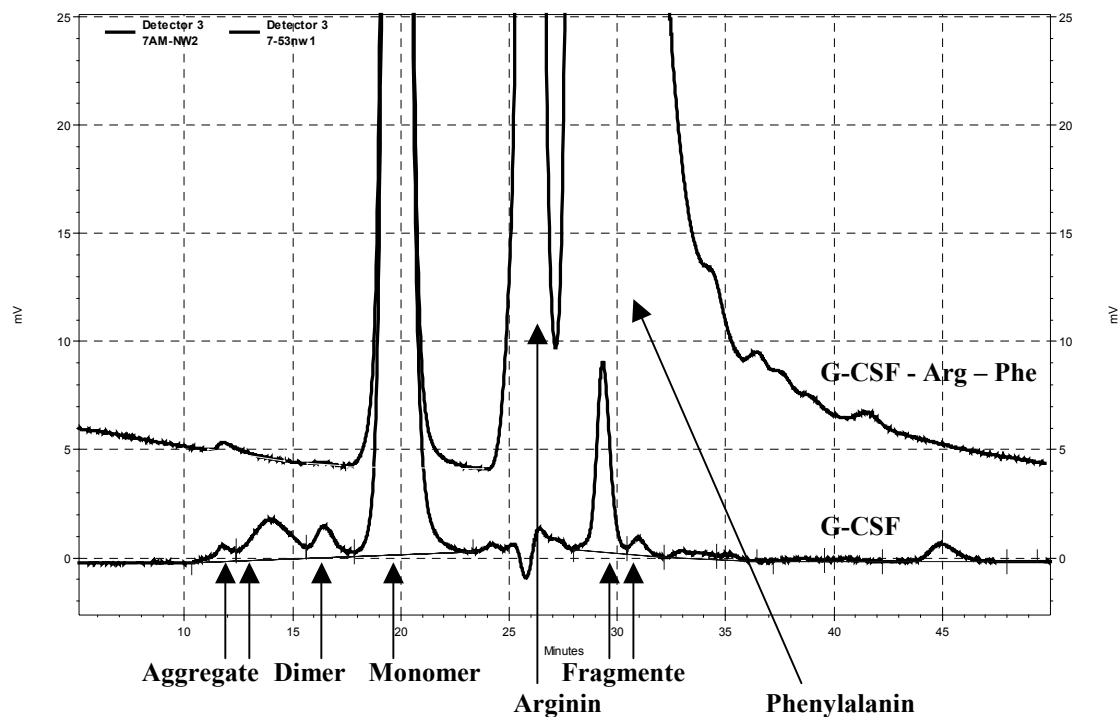


Abb. 2-29: G-CSF Chromatogramm einer Trennung mit der Superdex-Säule

Die Abb. 2-29 zeigt die in 2 Aggregat-, Dimer-, Monomer- und Fragment-Fractionen getrennte G-CSF-Probe (untere Linie) bzw. die Monomer-Fraktion neben den beiden Peaks von Arginin und Phenylalanin (obere Linie). Es ist klar erkennbar, dass die Fragment-Fractionen der aminosäure- freien Rezeptur durch die beiden großen Peaks der beiden Aminosäuren der aminosäure- haltigen Rezeptur überdeckt werden.

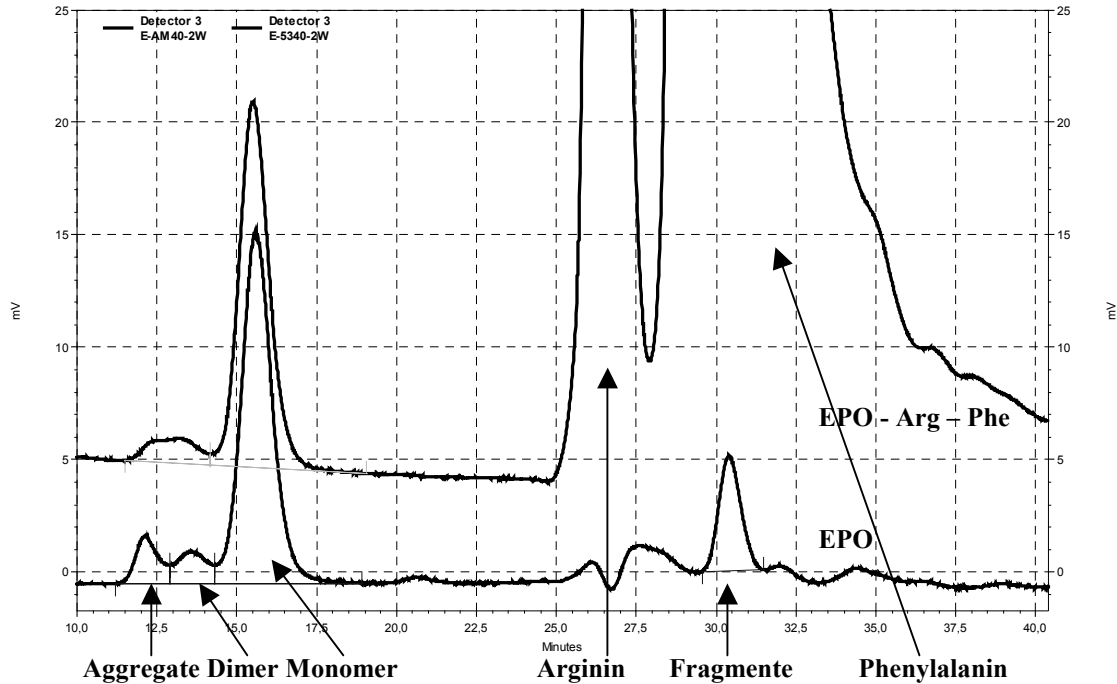


Abb. 2-30: EPO-Chromatogramm einer Trennung mit der Superdex-Säule

Abb. 2-30 zeigt die in 2 Aggregat-, Dimer-, Monomer- und Fragment-Fractionen (unten) bzw. in Aggregat-, Monomer- und Aminosäure-Fractionen (oben) getrennten EPO-Proben.

2.2.3.10. Asymmetrische Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung (AF4) + MALLS

Zum Abgleich und zur Überprüfung der SEC-Daten wurde eine Methode zur Trennung der SEC-Proben an der AF4, Fa. Postnova, Eresing, entwickelt. Die verwendete Anlage ist analog einer HPLC-Anlage mit Pumpe, Autosampler, Detektor und Auswerteeinheit aufgebaut.

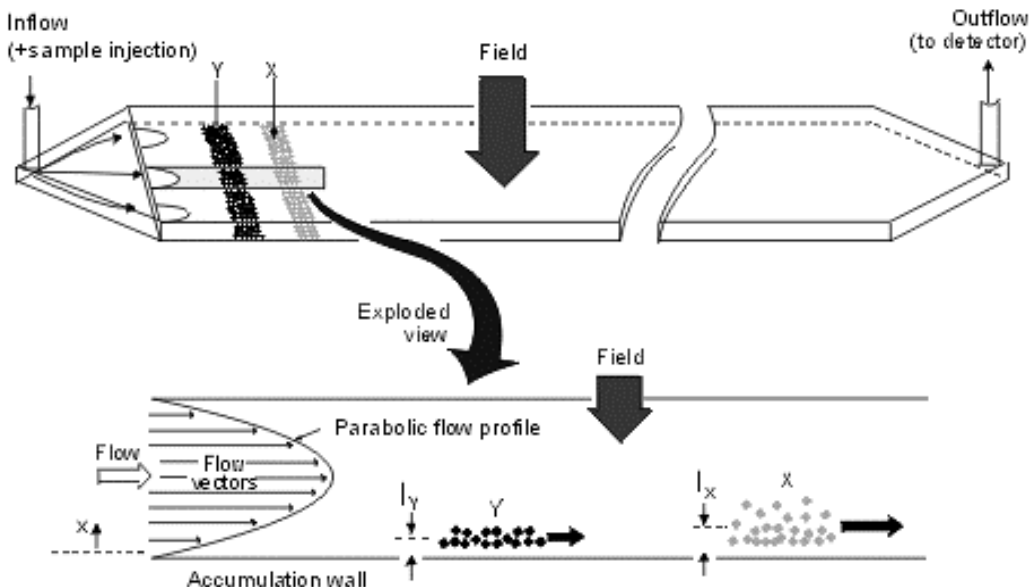


Abb. 2-31: Trennkanal einer AF4-Anlage

Bei der AF4 tritt an die Stelle der bei der SE-HPLC verwendeten Trennsäule ein Trennkanal (**Abb. 2-31**), der auf seiner Unterseite durch eine Membran mit einer definierten Ausschlussgrenze begrenzt wird. Der Kanal wird von links nach rechts laminar mit Puffer durchspült, wobei sich ein parabolisches Strömungsprofil ausbildet. Neben diesem horizontalen Pufferfluss besteht eine senkrecht zu diesem Fluss gerichtete Flussrichtung durch die Membran. Auf die Probenmoleküle wirkt durch den Querfluss eine Kraft, welche die Moleküle gegen die Membran drückt. Dieser Querfluss-Kraft wirkt aufgrund der Fick'schen Diffusionsgesetze eine Diffusionskraft in den Kanal hinein entgegen. Es bildet sich ein Gleichgewichtszustand aus. Kleine Moleküle besitzen eine höhere Diffusionskraft als große Moleküle.

Die Trennung der fokussierten Probe wird mit einer Mischung aus horizontalem und vertikalem Fluss durchgeführt. Durch die Fokussierung befinden sich die kleinen Moleküle in einem Bereich mit höherer Fließgeschwindigkeit des Puffers durch den Kanal. Daher werden die Moleküle von kleinerer zur größeren Größe der Reihe nach aus dem Kanal eluiert und vom Detektor erfasst. Das entstehende Fraktogramm (entspricht dem Chromatogramm bei einer SEC-Analytik) bildet von links nach rechts die Fraktionen Fragment, Monomer, Dimer und Aggregate ab.

Als Laufpuffer wurde für die Versuche der gleiche Puffer wie für die SEC verwendet. Der Autosampler war auf 6 °C gekühlt. Pro Injektion wurden 100 bzw. 200 µl Probe in den Kanal injiziert. Die Ausschlussgrenzen der Membranen lagen bei 5 kDa. Für die Untersuchung der Proben auf Fragment-Anteile wurden zusätzlich 1 und 10 kDa Membranen benutzt.

Zur Detektion wurde ein UV-Detektor, Spectra Physics UV 1000, Thermoquest, Egelsbach, bei verschiedenen Wellenlängen (215 nm und 280 nm) verwendet. Die Detektion bei 215 nm wurde aufgrund der größeren Spezifität standardmäßig angewandt. Nur zur Untersuchung der Proben auf Fragment-Anteile wurde die Detektion bei 280 nm ausgenutzt.

Mit Mehrwinkel-Lichtstreu-Detektor (MALLS), miniDAWN, Wyatt, Schweitenkirchen/Dürnzhausen, konnte eine Molmassen-Bestimmung der via AF4 fraktionierten Analyten realisiert werden. Die quantitative Auswertung erfolgte anhand eines externen G-CSF Standards mit den ermittelten AUC-Flächen des UV-Detektors.

2.2.3.11. Rasterelektronenmikroskopie

Zur Bestimmung der Oberflächenmorphologie der getrockneten Proben wurde ein Rasterelektronenmikroskop, Feld Emissions Scannendes Elektronen Mikroskop Typ JSM-6500F, Fa. Jeol, Eching, eingesetzt. Das Probenmaterial wurde nach dem Verreiben in einem Achatmörser auf einen Messingzylinder mit minimalen Mengen Klebstoff aus einer Heißklebepistole befestigt. Um die Leitfähigkeit der Proben zu erhöhen, wurden die Zylinder anschließend mit Gold besputtet.

3. OPTIMIERUNG DER VAKUUMTROCKNUNG

Das Kapitel Optimierung der Vakuumtrocknung behandelt die Evaluierung verschiedener Geräte hinsichtlich ihrer Eignung zur Vakuumtrocknung. Daneben werden Ergebnisse zur Optimierung der Vakuumtrocknungsverfahren vorgestellt.

3.1. Ergebnisse mit dem Rotationsvakuumpkonzentrator

Es waren viele Trocknungsversuche notwendig, um ein Programm für die Vakuumtrocknung zu entwickeln, bei dem es zu keinem Siedeverzug und keinem Einfrieren der Proben kam (vgl. 2.2.1.1.). In den Versuchen wurde jeweils 0,5 ml Placeborezeptur SAP7,4 in 2R-Vials getrocknet.

Vakuumtrocknung von Placeborezeptur SAP7,4 im RVC

Der zur Trocknung benutzte Zentrifugenrotor besaß eine definierte Schräglage für die Proben und konnte nicht ausschwenken. Während der Entwicklung des Trocknungsprogrammes fiel auf, dass die Proben keine großvolumigen Kuchen wie bei der Gefriertrocknung lieferten, sondern dass sich das trocknende Produkt am Boden des Vials aufkonzentrierte. Durch die Schräglage der Proben im Rotor war die Schichtdicke im Vial unterschiedlich stark. Es bestand die Gefahr, dass Wasser in Form von Feuchtigkeitsnestern eingeschlossen werden könnte. Um dies zu vermeiden, die Trocknung zu beschleunigen und den ungünstigen rubber-Zustand möglichst schnell zu durchqueren, wurden die Proben bis kurz vor den hochviskosen rubber-Zustand im Rotor aufkonzentriert. Anschließend wurden die Vials im Zentrifugenraum stehend weitergetrocknet. Auf diese Weise konnte eine gleichmäßige Schichtdicke erhalten werden.

Um zu verhindern, dass die Vials ungleichmäßig von den IR-Lampen mit Wärmestrahlung versorgt werden, wurden sie in einem Rechteck angeordnet (vgl. Abb. 2-6, Kapitel 2.).

Durch gravimetrische Bestimmung des Wasserverlustes wurde der Unterschied zwischen innen und außen stehenden Vials untersucht. Wie zu erwarten war, trockneten die beiden innen stehenden Proben wegen der kürzeren Distanz zu den Lampen und der fehlenden Abschirmung durch die nebenstehenden Vials schneller bzw. waren trockener als die beiden außen stehenden. In Abb. 3-1 sind die Mittelwerte (MW) des Wasserverlustes in Abhängigkeit von der Trocknung aufgetragen.

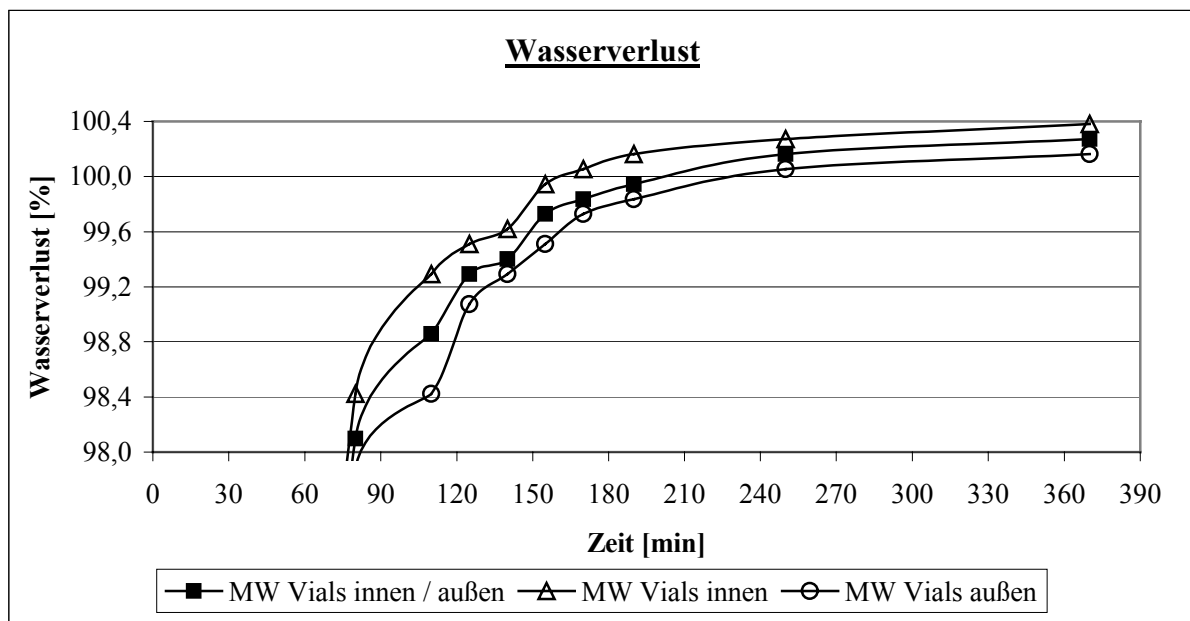


Abb. 3-1: Wasserverlust (Mittelwerte) in Abhängigkeit vom Standort

Fazit:

Durch das Entfernen der Proben aus dem Rotor nach der Aufkonzentrierung und dem Aufstellen der Vials im Zentrifugenraum zur Nachtrocknung konnte ein trockenes Produkt mit gleichmäßiger Schichtdicke erhalten werden. Allerdings wurden die Proben aufgrund ihrer räumlichen Anordnung im Zentrifugenraum unterschiedlich trocken. Je mehr Vials angeordnet werden, desto stärker wird die Abschirmung für die innen in einer Gruppe stehenden Vials und desto ausgeprägter sollte der Unterschied in der Trocknung werden.

Erste Vakuumtrocknung von G-CSF-haltiger Rezeptur SAP7,4 im RVC

Nach dem Aufheizen des RVC von Raumtemperatur auf 60 °C innerhalb von 20 min wurde für weitere 166 min bis Versuchende nach 186 min die Temperatur konstant gehalten.

Abb. 3-2 zeigt das SEC-Chromatogramm der getrockneten und wieder rekonstituierten Probe im Vergleich zu ungestresster Rezeptur und G-CSF-Bulklösung. Die beiden letzteren sind zur besseren Übersicht an der X-Achse verschoben.

Das G-CSF in der Rezeptur wurde während der Trocknung stark abgebaut. Das SEC-Chromatogramm (Abb. 3-2) unterscheidet sich stark von den Referenzkurven. Setzt man die erhaltene Fläche der Rezeptur ins Verhältnis zu den durchschnittlichen Flächen von G-CSF, so waren nur 18,2 % G-CSF als Monomer nach der Trocknung übrig.

Als Mittelwert der Wasserverluste ergab sich ein Wert von 99,6 %. Dies ließ auf trockene Proben mit einem Restwassergehalt < 2 % schließen.

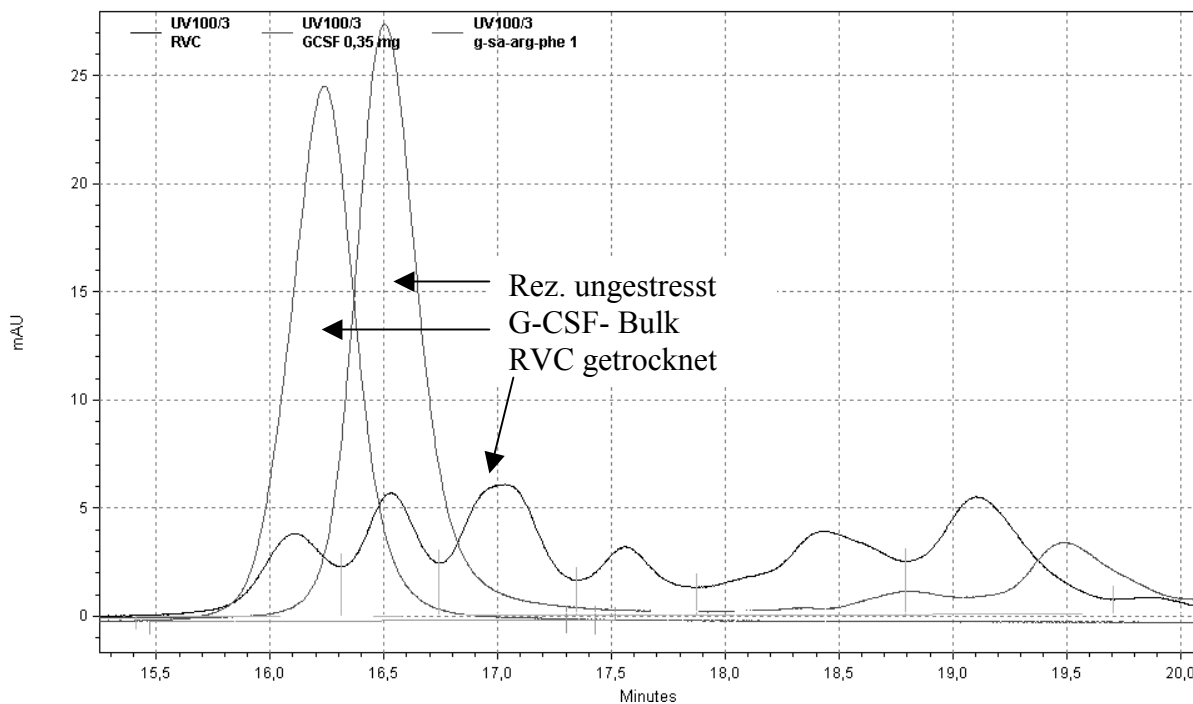


Abb. 3-2: SEC- Chromatogramm: „RVC 60 °C“ (Kurven an der x-Achse verschoben)

Fazit:

Obwohl durch die Vakuumtrocknung ein niedriger Restwassergehalt und damit günstige Bedingungen für das Protein geschaffen wurden [90,92,138], konnte nur ein niedriger Monomergehalt erzielt werden. Der Abbau des G-CSF musste durch die Wärmeeinwirkung (60 °C im RVC) während der Trocknung stattgefunden haben [139,140]. Viele Proteine besitzen im Bereich von 10 °C und 40 °C einen stabilen Zustand, während es unter- und oberhalb dieses Bereichs verstärkt zur Destabilisierung kommen kann [40].

Zweite Vakuumtrocknung von SAP7,4 im RVC und auf der Stellfläche der Kühlfalle des RVC

Die Proben wurden 23 min aufkonzentriert und eine Stunde bei 60 °C getrocknet. Zur Produktschonung wurde die Temperatur dann auf 45 °C abgesenkt und bis Versuchende nach insgesamt 153 min konstant gehalten.

Während der Aufkonzentrierungsphase im Rotor wurden Proben für die SEC gezogen. Die Nachtrocknung der Vials erfolgte zum einen stehend in der Zentrifuge und zum anderen auf der temperierten Stellfläche der Kühlfalle. Am Ende der Trocknung wurde jeweils eine Probe aus der Zentrifuge und von der Stellfläche auf ihren Monomer-Gehalt mit SEC untersucht.

Während der Aufheiz-/Aufkonzentrierungsphase bis zur 23. min nahm der Monomer-Gehalt an G-CSF nur wenig ab.

Bei der in der Zentrifuge fertig getrockneten Probe konnte außer den beiden Hilfsstoff-Peaks keine G-CSF-Fraktion mehr nachgewiesen werden (Abb. 3-3). Dies ist überraschend, da bei diesem Versuch die Trocknungsdauer im Vergleich zum vorherigen Versuch um 33 min kürzer war und weniger Energieeintrag durch Absenkung der Temperatur von 60 auf 45 °C im letzten Trocknungsschritt erfolgte. Der Wasserverlust von 99,7 % war vergleichbar zum vorherigen Versuch.

Die Probe, die für die Nachtrocknung auf der Stellfläche der Kühlfalle stand, enthielt 41 % G-CSF-Monomer.

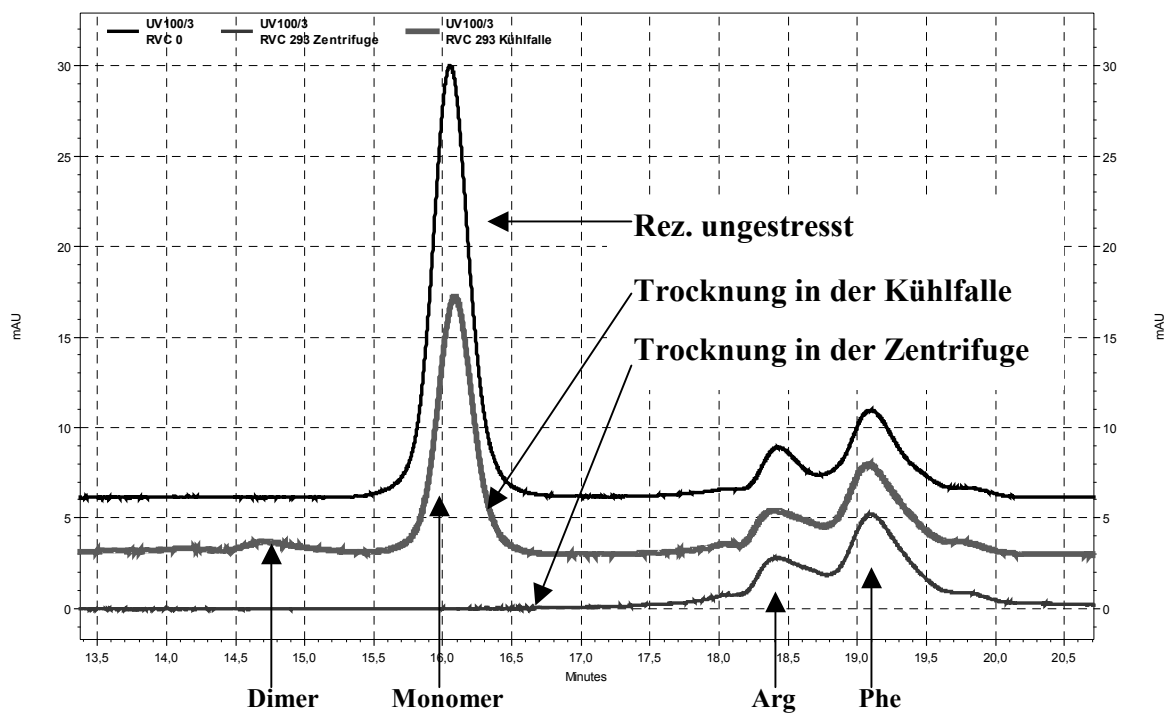


Abb. 3-3: SEC-Chromatogramm: „RVC 60/45 °C“ (Kurven an der Y-Achse verschoben)

Fazit:

Aufgrund des günstigen, niedrigen Restwassergehaltes wäre ein höherer Monomer-Gehalt zu erwarten gewesen. Der Trocknungsprozess führte trotz Erniedrigung der Trocknungstemperatur zu großem Monomer-Verlust. Das bislang erreichte Ergebnis war, wie beim Versuch vorher, nicht befriedigend.

Aufkonzentrierung im RVC und Nachtrocknung im Vakuumtrockenschrank (VTS-1)

Mit diesem Versuchsansatz wurde untersucht, ob der Monomer-Gehalt durch die Kombination von RVC und dem Vakuumtrockenschrank (VTS-1) erhöht werden kann (vgl. Kapitel 2.2.1.2.).

Der Wasserverlust im RVC verlief linear und schnell. Für die Nachtrocknung im VTS-1 verringerte sich die Trocknungsrate stark (Abb. 3-4). Während der Aufkonzentrierungsphase im RVC reduzierte sich der Gehalt an G-CSF um ca. 10 % bei einem gleichzeitigen Wasserverlust von 84,8 % (Abb. 3-4). In der daran anschließenden 20-stündigen Trocknung bei 40 °C im VTS-1 trat weiterer Monomerverlust von ca. 9 % zu einem Endgehalt von 81 % G-CSF auf.

Die G-CSF-Gehalte in Tab. 3-1 sind als Mittelwerte zweier Proben angegeben. Zum ersten Mal traten nach 23 min Neben-Peaks in Form von Aggregat bzw. Dimer auf. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Abnahme des Monomer-Gehaltes und des Auftretens der Neben-Peaks war nicht zu erkennen (Tab. 3-1). In Abhängigkeit von der Trocknungsdauer kam es zu einer Abnahme der mit SEC wiedergefundenen Proteinmenge. Diese Problematik wird in Kapitel 4.3. näher erläutert.

	Zeit [min]	Aggregat + Dimer [%]	Monomer [%]
RVC	0	0	100
	14	0	97,1
	23	1,5	95,4
	30	5,6	94,9
	38	4,9	94,1
	43	0	89,8
VTS-1	88	4,2	83,4
	119	2,8	82,3
	1243	5,3	81,4

Tab. 3-1: SEC-Daten der Kombination aus RVC und VTS-1

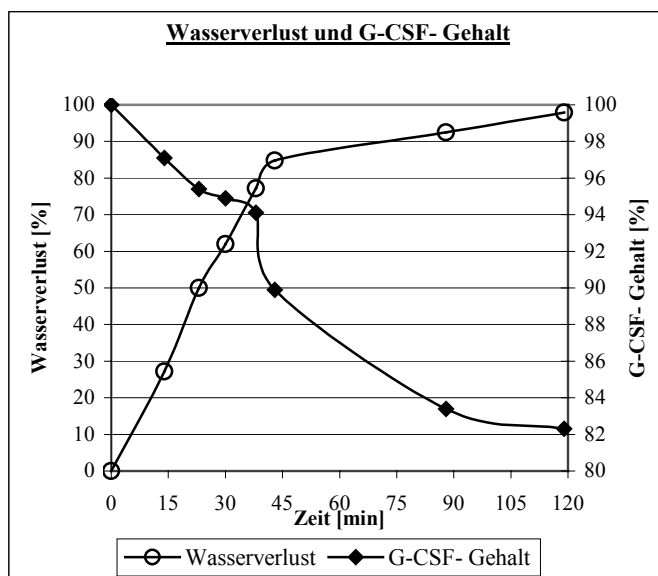


Abb. 3-4: WV und Gehalt bei RVC + VTS-1

Fazit:

Die Kombination beider Trocknungsverfahren deutet daraufhin, dass es möglich ist, G-CSF schonend zu trocknen. Allerdings ist der G-CSF-Verlust zu hoch und die Trocknungskapazität für eine großtechnische Anwendung durch den zweistufigen Prozess unpraktikabel.

3.2. Ergebnisse mit dem Vakuumtrockenschrank VTS-1

Erste Vakuumtrocknung im VTS-1

Der nächste Schritt bei der Optimierung der Vakuumtrocknung war eine komplette Trocknung im VTS-1. Ziel des Versuches war zu überprüfen, ob mit dem VTS-1 alleine schonender und schneller als mit dem RVC bzw. einer Kombination aus beiden Geräten getrocknet werden kann.

Die Proben wurden in einem konstant 40 °C temperierten VTS-1 getrocknet. Zur Vermeidung von Siedeverzug wurde mit der Membranvakuumpumpe der Druck kontinuierlich auf 75 mbar abgesenkt und dann auf automatische Siedepunktsnachführung (ASN) umgeschaltet. Der Druck wurde bis 13 mbar gesenkt und konstant gehalten.

Nach 1, 5 und 20 h Trocknung wurden Proben gezogen und auf ihren WV und je 2 auf den G-CSF-Gehalt untersucht. Tab. 3-2 listet die Ergebnisse der Trocknung auf.

Zeit [h]	0	1	5	20
G-CSF-Gehalt [%]	100	91,9	93,6	92,5
Wasserverlust [%]	0	100,2	100,7	101,0

Tab. 3-2: SEC-Daten zur Vakuumtrocknung im VTS-1

Die Auswertung der Daten ergab, dass bereits nach einer Stunde Trocknung der gravimetrisch bestimmbare maximale Wasserverlust erreicht wurde. Der G-CSF-Gehalt der drei Messungen bewegte sich um die 92,5 %.

In Abb. 3-5 und Abb. 3-6 werden die Ergebnisse dieses Versuchs mit denen des vorherigen verglichen.

Mit dem VTS-1 (⊖) war es möglich, innerhalb von 60 min einen maximalen Wasserverlust zu erreichen. Mit der Kombination von RVC und VTS-1 (●) wurden 90 % Wasserverlust erst nach 2 Stunden erzielt (Abb. 3-5).

Im Vergleich zur Kombination erniedrigte sich im VTS-1 (⊖) ebenso während der ersten 60 min der G-CSF-Gehalt um ca. 7-8 %. Da aber danach bereits der maximale Trocknungsgrad der Proben erreicht war, nahm dann der Abbau nicht weiter zu. Bei der Kombination RVC + VTS-1 (■) fand so lange G-CSF-Abbau statt, bis ein Wasserverlust von 97,8 % zum Zeitpunkt 119 min erreicht war (Abb. 3-6).

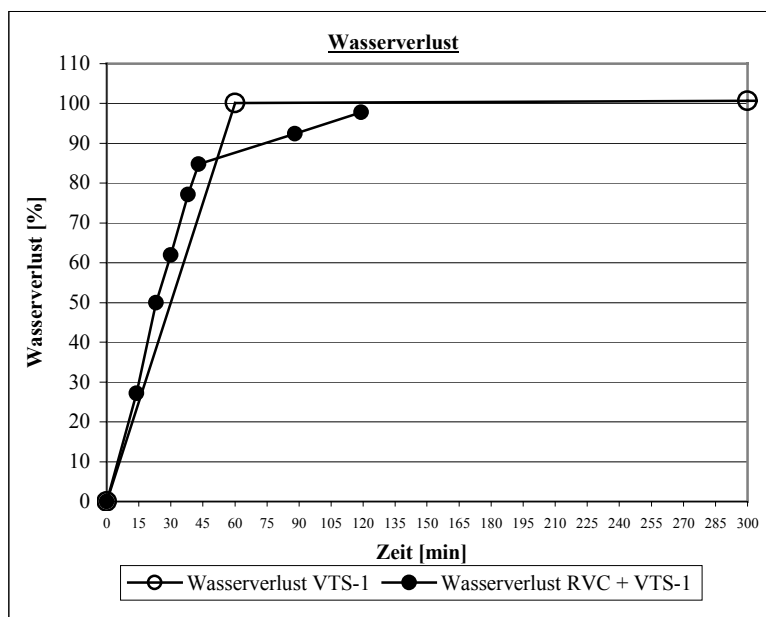


Abb. 3-5: WV von der Kombination von RVC + VTS-1 und VTS-1 alleine

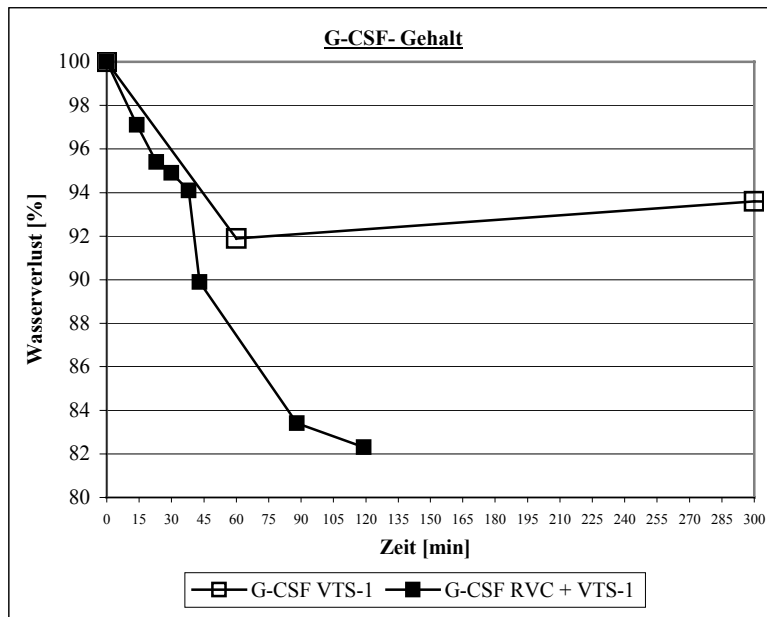


Abb. 3-6: G-CSF-Gehalt von der Kombination von RVC + VTS-1 und VTS-1 alleine

Fazit:

Mit diesem Versuch konnte die prinzipielle Eignung einer vollständigen Trocknung im VTS-1 gezeigt werden. Die Kontrolle von Siedeverzügen bzw. zwischenzeitlichem Einfrieren gestaltete sich im VTS-1 einfacher als im RVC.

Mit dem VTS-1 ließ sich Rez. SAP7,4 schneller und schonender als mit dem RVC trocknen. Für den Erhalt der Stabilität ist ein möglichst zügiges Durchqueren des rubber-Zustandes entscheidend [102,141-147]. Die Lagerung der flüssigen Rez. SAP7,4 bei 40 °C führt zum Vergleich innerhalb von 3 h zur Aggregation des G-CSF. Während der Trocknung schützt Verdunstungskälte das G-CSF. Je schneller der trockene Zustand erreicht wird, desto günstiger wirkt sich dies auf den Monomer-Gehalt aus.

Zweite Vakuumtrocknung im VTS-1

Da die Chargengröße in diesem ersten vollständigen Prozess im VTS-1 nur 6 Vials umfasste, wurde ein weiterer Versuch mit einer Charge von 154 Vials angeschlossen.

Für 7:20 h:min wurden Proben bei 40 °C im VTS-1 in Kombination mit Kühlfalle und Membranvakuumpumpe mit ASN getrocknet.

Aufgrund des großen Probenaufkommens und einer Laufzeit von 50 min pro Probe in der SEC konnten die Proben nicht sofort analysiert werden. Um alle Proben mit den gleichen Bedingungen untersuchen zu können, wurden sie nach dem Verbördeln der Vials in Flüssigstickstoff getaucht und schockgefroren. Bis zur SEC-Analyse lagerten die Proben bei – 20 °C.

Der Wasserverlust verlief bis zum Zeitpunkt 140 min mit einem Wert von 98,2 % linear und näherte sich dann mit 99,7 % am Prozessende nach 440 min dem maximal möglichen WV an.

Während im vorherigen Versuch mit einer Beladung von 6 Vials bereits nach einer Stunde der maximale WV erreicht wurde, verschob sich dieser Punkt nun um mehr als 6 Stunden nach hinten. Die insgesamt größere Wassermenge verursachte eine notwendige Verlängerung der Trocknungszeit.

Für die letzten beiden Probezug-Zeitpunkte (180 min und 440 min) wurde der Restwassergehalt (RWG) festgestellt. Als Mittelwert wurde für beide Probenzeitpunkte ein RWG von 0,3 % bzw. 0,2 % bestimmt.

Vom Trocknungs-Ende wurde von drei Proben die Glasübergangstemperatur (T_g) mit einem Mittelwert von 33,6 °C ermittelt. Mattern gab in seiner Arbeit für die gleiche Rezeptur einen T_g von ca. 55 °C bei einem RWG von ca. 1,5 % an [17].

Im Vergleich mit diesen Daten erscheint der kleine RWG und der gleichzeitig niedrige T_g unplausibel. Bei den Karl-Fischer-Messungen handelt es sich um die ersten Messungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt worden waren. Bei der Vorbereitung dieser Proben wurde noch kein Ultraschallbad verwendet. Es besteht die Möglichkeit, dass das in den Proben vorhandene Wasser nicht vollständig aus der getrockneten Matrix eluiert worden war und daraus der scheinbar niedrige RWG resultierte.

Am Ende der Trocknung lagen noch 84,8 % G-CSF als Monomer vor. Durch die Verlängerung der Prozessdauer erniedrigte sich gleichzeitig der Monomergehalt. Während bei der vorherigen Trocknung ein Gehalt von 92,5 % am Ende der Trocknung noch bestimmt werden konnte, verursachte die Verlängerung der Trocknung einen höheren Abbau des G-CSF. Das Protein befand sich länger in einem hochkonzentrierten Zustand und konnte erst später den stabilen trockenen Zustand erreichen.

Das Kapitel 4. wird näher auf das Aggregations-Verhalten und die Problematik des rubber-Zustandes eingehen.

Da es aus sicherheitstechnischen Gründen nicht möglich war den VTS-1 weiter als 10 mbar zu evakuieren, wurde für weitere Versuche ein anderer Vakuumtrockenschrank (VTS-2) der Fa. Memmert beschafft. Die weitere Optimierung der Vakuumtrocknung wird in Kapitel 3.4. fortgesetzt.

Fazit:

Der zweite Vakuumtrocknungsversuch im VTS-1 bestätigt den direkten Zusammenhang zwischen dem Erhalt der Stabilität und der Trocknungsdauer auf. Je länger das Protein sich im rubber-Zustand befindet, desto größer ist der Proteinverlust [102,141-147].

3.3. Ergebnisse mit dem IR-Dancer

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse vorgestellt, die bei der Evaluierung des IR-Dancers (IRD) zur Eignung auf Vakuumtrocknung erhalten wurden.

Es war die Hauptintention zu überprüfen, ob der IRD im Vergleich zum RVC bzw. VTS-1 Vorteile bei der Trocknung von flüssigen Proteinzubereitungen bietet.

Der IRD unterscheidet sich in der Art und Weise, wie die Proben aufkonzentriert werden sollen, grundlegend von der des RVC:

1. Durch die Vibration wird die Probe durchmischt und die Verteilung der zugeführten thermischen Energie unterstützt. Die daraus resultierende Homogenisierung vermindert die Tendenz zum Siedeverzug.
2. Die Probenoberfläche wird durch die Vibration vergrößert und der Übergang vom flüssigen in den gasförmigen Zustand durch Verdunsten bzw. Verdampfen wird beschleunigt.
3. Im Gegensatz zum RVC unterliegt beim IR-Dancer die Dampfphase keiner Zentrifugalkraft. Dadurch soll das Absaugen der Dampfphase begünstigt werden.

Die Verfahrensentwicklung eines optimierten Trocknungsprogrammes gestaltete sich allerdings schwierig. Trotz Verwendung der Membranvakuumpumpe mit automatischer Siedepunktsnachführung (ASN) waren nur 9 von 27 durchgeführten Versuchen verwertbar, da bei den restlichen Siedeverzug auftrat. Versuch V5 und V17 sind zwei der neun erfolgreichen Versuche.

Bei den Versuchen zu Beginn wurden die Proben bei konstant 40 °C getrocknet. Das Trocknen bei den unterschiedlichen Vibrationsraten verursachte einige Fehlversuche, da aufgrund der Schüttelbewegung das Einsetzen des Siedens visuell nicht rechtzeitig erkannt werden konnte. Der Versuch, die Trocknung ab 25 min durch weiter erhöhte Temperatur zu beschleunigen, führte immer zu Siedeverzügen.

Schließlich wurden noch 4 Versuche bei Raumtemperatur ohne Wärmezufuhr durchgeführt.

Die Ergebnisse der Versuche bei 40 °C sind als Mittelwerte von einer Doppelbestimmung angegeben, während die Ergebnisse der RT- Versuche auf einem Einzelwert basieren.

Die Reproduzierbarkeit der Versuche war ungenügend. Für jede Parameterkombination (Temperatur und Vibration) musste ein individuelles Trocknungsprogramm bestimmt werden. Beim erneuten Verwenden eines Trocknungsprogramms musste dieses beim Vakuum modifiziert werden, da Siedeverzug aufgetreten war.

Beim IRD wurden neben der bisher benutzten Rez. SAP7,4 auch die Rez. SP7,4 getrocknet. In Abb. 3-7 und Abb. 3-8 sind die Ergebnisse des Wasserverlustes (▲) (exemplarisch anhand SP7,4) und des G-CSF-Gehalts von Rez. SP7,4 (■) und SAP7,4 (⊖) von Versuch V5 und V17 aufgetragen.

Die beiden Versuche mit der Einstellung Schütteln Stufe 5,5 und Heizung 40 °C führten zu ähnlichen Endergebnissen, allerdings wiesen sie während des Laufs deutliche Unterschiede beim Wasserverlust und den G-CSF-Monomer-Gehalten auf. Bei Versuch V17 ist eine deutliche Lag-Phase zu Beginn der Trocknung zu erkennen. Diese wurde durch die geringeren Vakuumbedingungen verursacht. Bei V5 konnte bereits innerhalb der ersten 15 min das maximale Vakuum von 7 mbar erreicht werden, während bei V17 erst 20 min später diese Bedingungen herrschten (Abb. 3-7, Abb. 3-8).

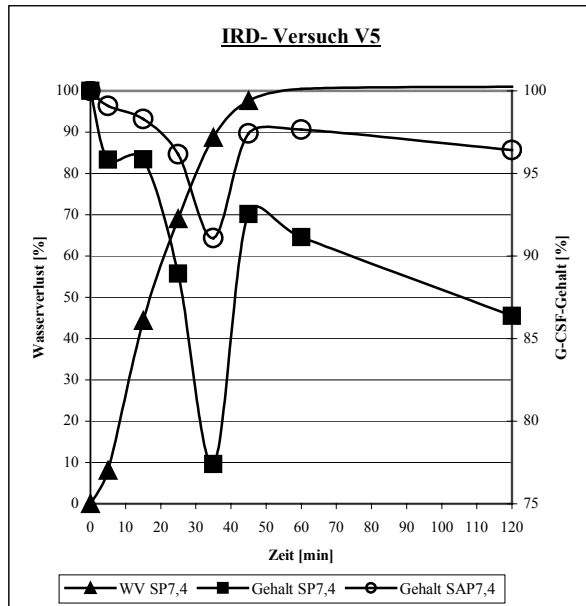


Abb. 3-7: IR-Dancer Versuch V5

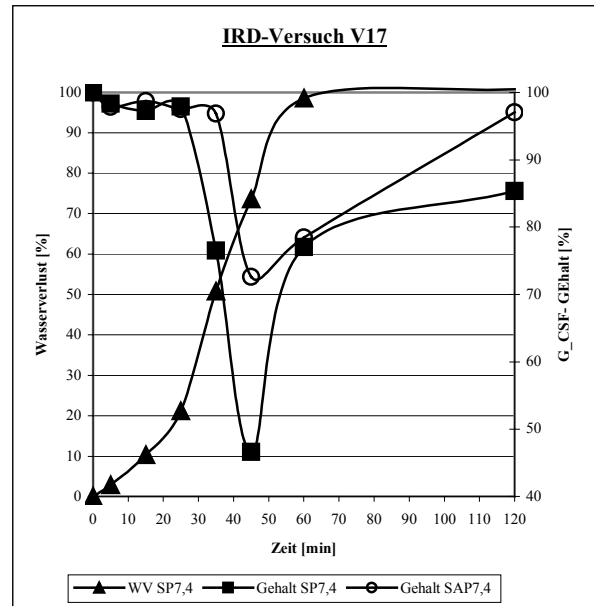


Abb. 3-8: IR-Dancer Versuch V17

Bei Versuch V5 wurde der Wasserverlust von mehr als 98 % bereits nach 45 min, bei Versuch V17 erst nach 60 min erreicht. Der G-CSF-Monomer-Endgehalt war bei Rez. SAP7,4 mit 96,4 % bzw. 97,1 % höher als bei Rez. SP7,4 mit 83,9 % bzw. 85,3 % (Tab. 3-3).

Versuch	Zeit [min] bis WV > 98%		G-CSF-Endgehalt [%]	
	SP7,4	SAP7,4	SP7,4	SAP7,4
V5	45	45	83,9	96,4
V17	60	60	85,3	97,1

Tab. 3-3: Vergleich der Ergebnisse aus den V5 und V17 (Vibration 5,5 und Temp. 40 °C)

Wie in Abb. 3-7 und Abb. 3-8 deutlich zu sehen ist, sank der Monomer-Gehalt während der Trocknung rapide ab und stieg kurz darauf wieder steil an. In Kapitel 4.1. wird dieses eingehend erläutert.

Abhängigkeit des Wasserverlustes von der Temperatur bzw. von der Vibrationsrate

Weder bei den beheizten (40 °C) (Tab. 3-4), noch bei den bei RT (Tab. 3-5) getrockneten Proben erzielte das Schütteln eine Beschleunigung der Trocknung. Die Zufuhr von Wärme ließ die 40 °C Proben im Vergleich zu den RT-Proben schneller trocknen.

Allerdings fiel hierbei der RT-Versuch mit Vibrationsstufe 5,5 aus dem Rahmen, da dort nach 60 min ein Wasserverlust von ca. 98 % gemessen werden konnte.

Vibration [0-10]	Zeit [min] bis WV > 98%	
	SP7,4	SAP7,4
0	60	60
3,5	45	60
5,5	45	45
7,5	60	60
10	45	60

Tab. 3-4: Zeit bis WV > 98 % bei 40 °C

Vibration [0-10]	Zeit [min] bis WV > 98%	
	SP7,4	SAP7,4
0	180	180
3,5	180	180
5,5	60	120
7,5	180	180
10	-	-

Tab. 3-5: Zeit bis WV > 98 % bei RT

Die fehlende Abhängigkeit zwischen Vibrationsrate und Wasserverlust resultiert aus der Erniedrigung der Probentemperatur durch die Verdunstungskälte. Je stärker die Vibration ist, desto größer wird die Oberflächenvergrößerung. Dadurch erhöht sich zunächst die Verdunstungsrate. Dies hat eine größere Verdunstungskälte zur Folge. Somit verkleinert sich die Verdunstungsmenge durch die sinkende Probentemperatur wieder. Es findet eine negative Rückkopplung statt (Abb. 3-9). Das System ist „selbstregulierend“.

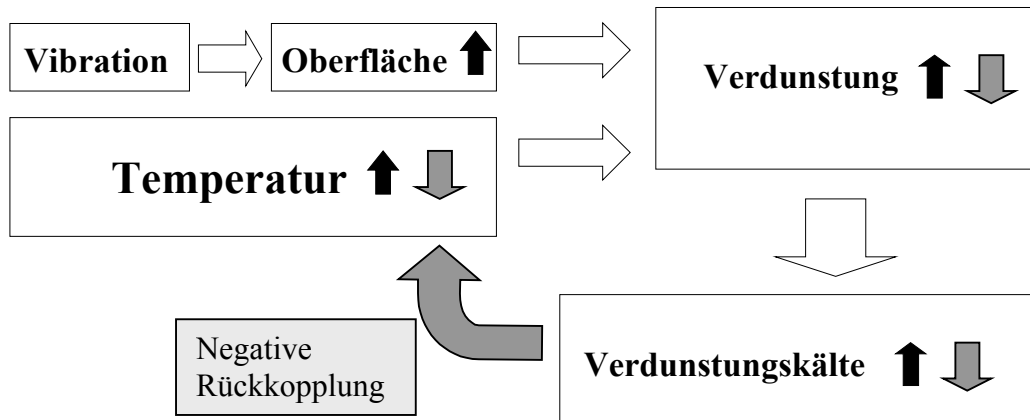


Abb. 3-9: Trocknungs- Mechanismus mit negativer Rückkopplung

Durch zu starke Erhöhung der Wärmezufuhr kann es jedoch leicht zum Siedeverzug kommen. Um eine Trocknung ohne Siedeverzug zu gewährleisten, müssen die Parameter Druck, Temperatur und Vibration für jede Rezeptur individuell für den Trocknungsprozess entwickelt werden.

- Stabilisierungsverhalten von Rez. SP7,4 und SAP7,4 bei 40 °C

Während der 40 °C Trocknung trat bei Rez. SAP7,4 starke Trübung auf (siehe grau unterlegte Felder in Tab. 3-6). Bei allen anderen Proben konnte keine Trübung beobachtet werden.

Ein direkter Zusammenhang bei 40 °C, Vibrationsstärke und G-CSF-Abbau konnte festgestellt werden. Je mehr Vibration, desto größer war der Monomerverlust. Für die SAP7,4 stellten die beiden Vibrationsstufen 10 und 7,5 bei 40 °C offensichtlich ungeeignete Trocknungsbedingungen mit hohem Stresspotential für das Protein dar (Tab. 3-6).

Bemerkenswert in diesem Zusammenhang war das Stabilisierungsverhalten von der SP7,4 bei den genannten Stress-Bedingungen. Bei beiden Temperaturen traten keine Trübungen auf. Die SEC-Daten belegten für Schütteln mit Stufe 10 immerhin noch 74,7 % und mit Stufe 7,5 sogar 85,4 % G-CSF-Monomer nach der Rekonstitution (Tab. 3-6). Der hohe Anteil an Phenylalanin stabilisierte offensichtlich besser bei diesen Trocknungsbedingungen. SAP7,4 mit weniger Phenylalanin und zusätzlich gleicher Menge Arginin war für diese Trocknungsbedingungen nicht geeignet.

Bei geringerer Vibration der beiden Rezepturen wurde dagegen festgestellt, dass die Mischung von SAP7,4 bessere SEC-Daten lieferte als SP7,4.

Vibration [0-10]	G-CSF-Gehalt [%]	
	SP7,4	SAP7,4
0	88,8	95,9
3,5	92,1	95,1
5,5	83,9	96,4
7,5	85,3	81,0
10	74,7	21,0

Tab. 3-6: G-CSF-Gehalte [%] bei 40 °C

( bedeutet getrübe Proben, alle anderen waren klar)

Vibration [0-10]	G-CSF-Gehalt [%]	
	SP7,4	SAP7,4
0	95,4	98,3
3,5	96,1	99,1
5,5	95,5	98,2
7,5	93,2	98,1
10	-	-

Tab. 3-7: G-CSF-Gehalte [%] bei RT

- Stabilisierungsverhalten von SP7,4 und SAP7,4 bei RT

Bei der Trocknung bei RT wurden Produkte mit 98,1 % – 99,1 % (SAP7,4) bzw. 93,2 % – 96,1 % (SP7,4) G-CSF-Gehalt erhalten. Der im Vergleich zu der Trocknung bei 40 °C geringere G-CSF-Verlust war mit einer längeren Trocknungsdauer von drei Stunden verbunden. Die Trocknung bei 40 °C lieferte bereits nach 60 min Produkte mit 95 % (SAP7,4) bzw. 83 % - 91 % (SP7,4) (Tab. 3-7).

Um das G-CSF in eine stabile, trockene Zubereitung zu überführen, sollte die Rezeptur SAP7,4 verwendet werden.

Bei RT konnte keine Abhängigkeit von der Vibrationsintensität festgestellt werden.

Fazit:

Es konnte gezeigt werden, dass mit dem IR-Dancer in Abhängigkeit von der Temperatur, der Vibrationsrate und der verwendeten Rezeptur G-CSF schneller als durch Gefriertrocknung, getrocknet werden konnte. Bei hoher Vibrationsrate und hoher Temperatur trat eine fast vollständige G-CSF-Aggregation auf, bei optimalen Bedingungen waren 99% monomeres G-CSF zu erhalten.

Beim IR-Dancer gestaltete sich die Entwicklung eines Trocknungsprogrammes durch die Vibration der Proben schwierig. Ein rechtzeitiges, visuelles Erkennen eines drohenden Siedeverzuges bzw. zwischenzeitliches Einfrierens war unmöglich. Rezepturen schonend und gleichzeitig schnell zu trocknen war mit dem IR-Dancer schwieriger als im VTS-1 mit einem Druck-Temperatur-Profil.

Der erwartete Effekt, die Trocknung durch die Oberflächenvergrößerung zu beschleunigen, wurde durch die damit verbundene größere Verdunstungsrate und den selbstregulierenden Rückkopplungsmechanismus überdeckt. Eine Beschleunigung der Trocknung in Abhängigkeit von der Vibration konnte nicht beobachtet werden.

Im direkten Vergleich der Verfahren (VTS-1 und IR-Dancer) war durch das Schütteln im IR-Dancer eine Beschleunigung der Trocknung um ca. 15 min von ca. 60 min auf ca.45 min möglich. Auch hier muss berücksichtigt werden, dass beim IR-Dancer die Trocknung bei Raumtemperatur begonnen wird, während der VTS-1 bereits auf 40 °C vortemperiert war. Die Vibration muss als Stressfaktor berücksichtigt werden.

Die resultierenden G-CSF-Gehalte lagen für die SAP7,4 Mischungen mit 95 – 99 % oberhalb den VTS-1-Ergebnissen mit 92 %. Mit dem IR-Dancer war es zudem im Unterschied zum VTS-1 möglich G-CSF fast ohne Abbauprodukte zu trocknen.

3.4. Ergebnisse im Vakuumtrockenschrank VTS-2

In diesem Kapitel wird an die Ergebnisse von 3.3. angeknüpft. Ziel war es mit einem optimierbaren Gerät die Vakuumtrocknung weiter zu verbessern.

Im Vakuumtrockenschrank VTS-2 wurden 36 Vials mit Rez. SAP7,4 und SAP4 zentral auf beiden Blechen getrocknet. Auf dem unteren Blech in der unteren Schiene standen die Vials der Rez. SAP7,4; auf dem oberen Blech in der mittleren Schiene standen die Vials SAP4. Der Probenzug erfolgte alle 10 min (0-140 min), sowie nach 160 und 900 min. In diesem Kapitel werden zunächst nur die Proben vom Trocknungsende besprochen. Anhand aller Proben wird in Kapitel 4.3. das beobachtete Aggregationsphänomen des G-CSF untersucht.

Die Proben wurden unter Ausnützung der ASN mit der Membranvakuumpumpe aufkonzentriert und mit der Drehschieberpumpe nachgetrocknet.

Nach der Trocknungsdauer von 15 h konnte ein WV von 99,2 % - 101,1 % bestimmt werden. Die Karl-Fischer-Titration lieferte einen RWG von kleiner 1 % für beide pH-Werte.

Bei der Rekonstitution der Proben fiel ab dem Probezeitpunkt 100 min auf, dass sich die Proben teilweise schlechter rekonstituieren ließen. Zum einen traten Opaleszenz und Trübung auf, zum anderen blieben Probenbestandteile ungelöst zurück.

Für Rez. SAP7,4 konnte ein G-CSF-Gehalt von 88,9 % und für SAP4 ein Gehalt von 77,1 % ermittelt werden. Der Wert für SAP7,4 ist vergleichbar mit dem Ergebnis der Trocknung der großen Charge im VTS-1, bei der 84,8 % Monomer nach der Trocknung wiedergefunden wurden. Die prinzipielle Eignung des VTS-2 zur Vakuumtrocknung war damit bestätigt. Um eine höhere Wiederfindungsrate beim Monomergehalt zu erhalten, mussten allerdings die Trocknungsbedingungen weiter optimiert werden.

Bei der Trocknung wurden zwei weitere Beobachtungen gemacht:

Die Wasserverlustkurven der beiden Rezepturen unterschieden sich im Bereich von 30 min bis 150 min. Rez. SAP7,4 trocknete schneller als SAP4. Die Ursache dafür lag in der Versuchsanordnung. Aufgrund der Anordnung der Bleche im VTS-2 trockneten die Proben auf dem unteren Blech etwas schneller, da sie neben der direkten Wärme vom eigenen Blech von der Wärmestrahlung vom Blech darüber profitierten.

Die zweite Beobachtung war, dass nach 120 min stetiger Trocknung die Wasserverlustkurve etwas absank und nach dem Minimum wieder bis zum Ende anstieg. Da dieses Phänomen bei beiden Blechen auftrat, lag der Verdacht nahe, dass die Vials ungleichmäßig beheizt worden waren. Die Bleche sind an ihrer Unterseite mit einem Heizgeflecht beklebt. In der Mitte des Bleches ist ein Thermofühler zwischen dem Blech und dem Heizgeflecht positioniert. Er gibt dem VTS-2 die Rückkopplung über die tatsächliche Temperatur des Bleches. Dieser Fühler stört durch seine Anwesenheit die Übertragung der Wärme auf das Blech und verursacht eine kältere Zone in der Mitte des Bleches.

Validierungsversuch 1 zur Temperaturverteilung auf beiden Blechen

Um die Temperaturverteilung der Bleche zu überprüfen, wurden zwei Validierungsversuche gemäß Kapitel 2.2.1.4. durchgeführt.

Der MV lag bei beiden Blechen zwischen 3 % bis 12 %. Die Abb. 3-10 und Abb. 3-11 illustrieren den Massenverlust auf den beiden Blechen. Die Abbildungen stellen eine Aufsicht auf die Bleche dar und sind um 90 ° gegen den Uhrzeigersinn gedreht abgebildet.

Auf beiden Blechen gab es ober- und unterhalb der Blechmitte, wie die Abb. es zeigt, Bereiche in denen ein größerer Massenverlust abgelesen werden konnte. Der Thermofühler auf der Unterseite der Bleche teilt den wärmsten Bereich in der Blechmitte in zwei Hälften. Zum Rand hin nahm der MV stufenweise immer weiter ab.

Anhand der beiden Abbildungen ließ sich der Einfluss der zusätzlichen Wärmeeinwirkung durch das obere Blech auf das untere ablesen. Der Massenverlust war auf dem unteren Blech deutlich größer als beim Oberen.

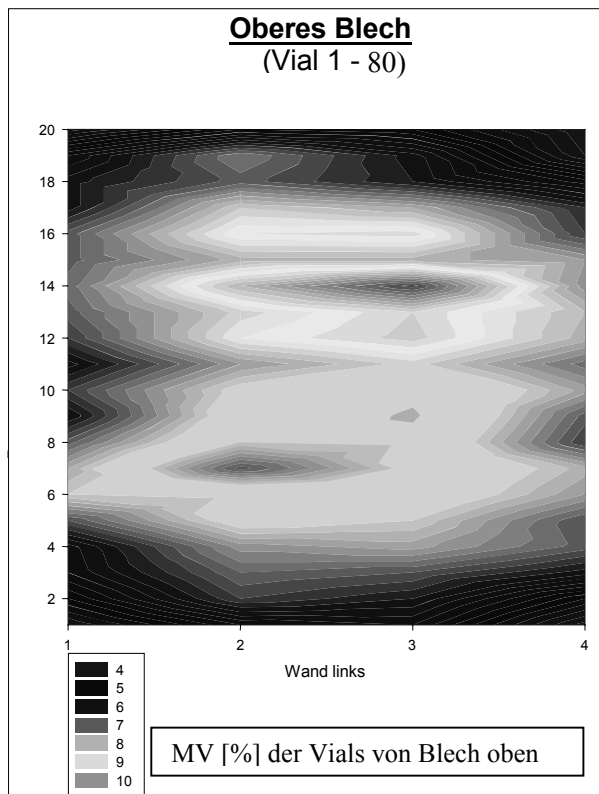


Abb. 3-10: Validierungsversuch 1: Blech oben

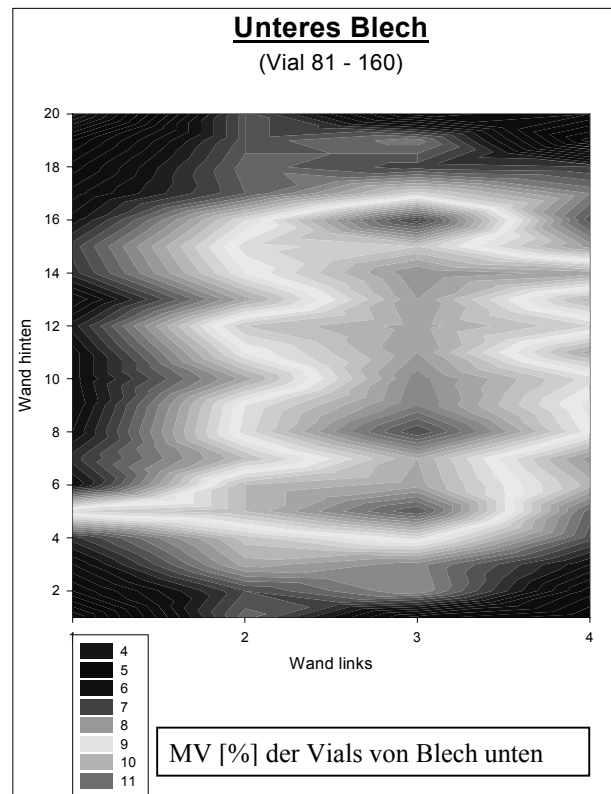


Abb. 3-11: Validierungsversuch 1: Blech unten

Validierungsversuch 2 zur Temperaturverteilung auf beiden Blechen

Da die Trocknungsdauer in Versuch 1 nur sehr kurz war und es zu starker Kondensatbildung von Wasser an der VTS-2-Scheibe kam, wurde mit geringerer Vialzahl über einen längeren Zeitraum getrocknet (siehe Kapitel 2.2.1.4.).

Abb. 3-12 und Abb. 3-13 zeigen ähnliche Ergebnisse wie der erste Validierungsversuch. Auch nach längerer Trocknung war das Massenverlustprofil nicht ausgeglichener. Der Unterschied zwischen zentralständigen und randständigen Vials trat noch sehr viel ausgeprägter auf. Beim oberen Blech konnte ein MV von 26,7 % bis 51,3 % und beim unteren Blech ein MV von 25,2 % bis 64,9 % bestimmt werden. Auf beiden Blechen sind deutlich die beiden Zonen mit verstärktem MV zu erkennen.

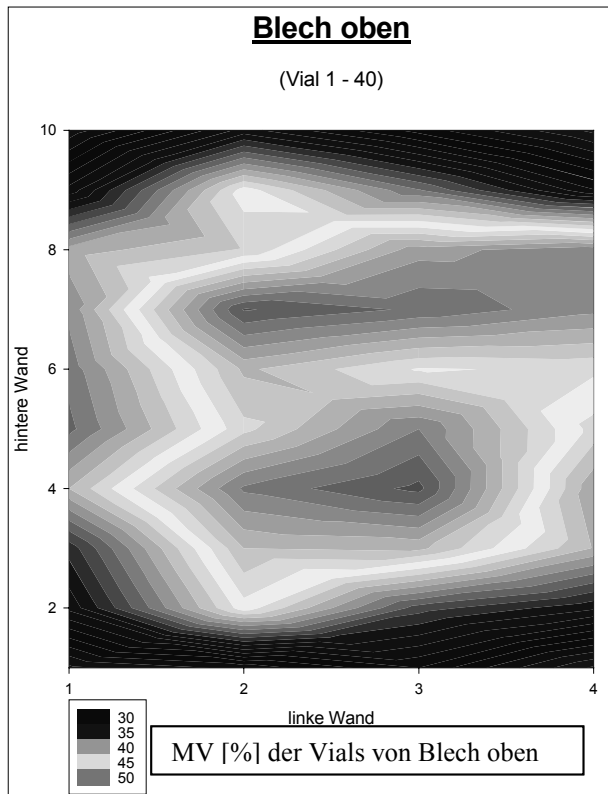


Abb. 3-12: Validierungsversuch 2: Blech oben

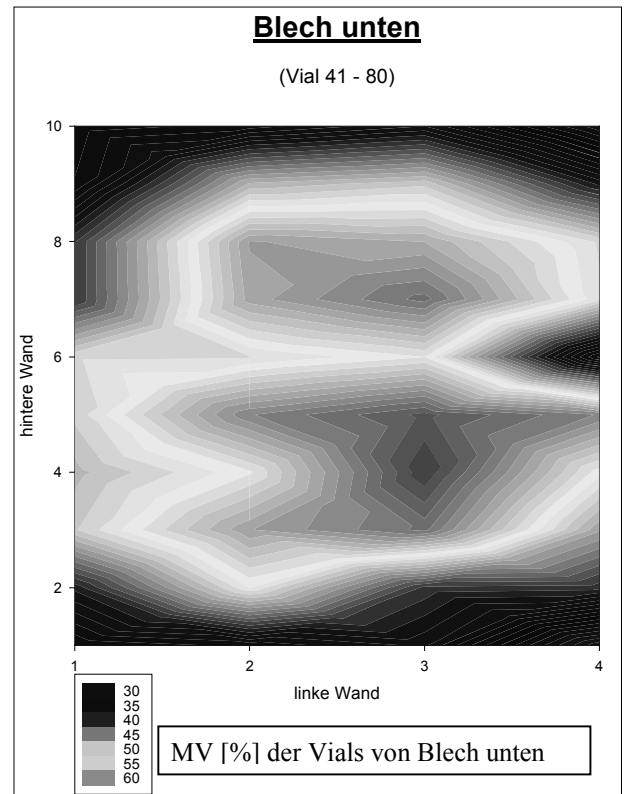


Abb. 3-13: Validierungsversuch 2: Blech unten

Die Ungleichverteilung der Temperatur und damit der ungleichmäßige Wasserverlust ist konstruktionsbedingt. Die Bleche werden beidseitig von einer Metallschiene gehalten. An der Blechrückseite befindet sich eine Steckverbindung, welche die Bleche mit Strom für die Heizung versorgt und den Kontakt des Thermofühlers mit dem VTS-2 herstellt.

Durch den Kontakt der beheizten Bleche mit der Schiene und damit der unbeheizten VTS-2-Wand kommt es zu einem kontinuierlichen Wärmeverlust. Dieser könnte durch Isolierung der Auflagefläche bzw. -punkte optimiert werden.

Sofern es die Probenzahl des Versuches zulässt, empfiehlt sich die zentrale Positionierung der Proben auf den Blechen.

Fazit:

Mit dem VTS-2 konnten zum VTS-1 vergleichbare Ergebnisse beim Restwasser- und Monomergelhalt erzielt werden. Die Vakuumtrocknung war in drei Schritten weiter zu optimieren:

1. Das Auftreten von Kondenswasser im VTS-2 ist durch Einsatz einer Kühlfalle zu vermindern.
2. Ein anderer Ansatz das Ausmaß des Kondenswassers zu reduzieren und die Trocknung zu beschleunigen, ist die Verwendung von Spülzyklen mit einem trockenem Spülgas.
3. Der erzielte G-CSF Gehalt ist bislang nicht mit literaturbekannten Ergebnissen, die mittels Gefrier- und Vakuumtrocknung gewonnen wurden, konkurrenzfähig [17]. Bisher erfolgte die Vakuumtrocknung bei 40 °C. Durch Trocknung bei verschiedenen, niedrigeren Temperaturen ist der G-CSF Gehalt zu erhöhen.

3.5. Optimierung der Vakuumtrocknung im VTS-2

Mittels dreier Versuche (siehe Kapitel 2.2.1.4.) wurde untersucht, ob die Kondensation von Wasser im VTS-2 durch die Verwendung einer geeigneten Kühlfalle vermindert und die Vakuumtrocknung gleichzeitig beschleunigt werden kann.

Vergleich der Verfahren anhand der Massenverluste

Massenverlust [%]	8h	11h	22h
Blech oben			
ohne Kühlung	88,6	90,7	91,4
Trockeneis-Kühlung	85,2	91,0	91,4
Kühlfalle	86,1	90,9	91,3

Tab. 3-8: Massenverlust Blech oben

Massenverlust [%]	8h	11h	22h
Blech unten			
ohne Kühlung	89,9	91,0	91,5
Trockeneis-Kühlung	87,4	91,1	91,5
Kühlfalle	90,4	90,9	91,4

Tab. 3-9: Massenverlust Blech unten

Nach acht Stunden konnte ein höherer Trocknungsgrad auf dem unteren Blech erzielt werden. Dies wurde offensichtlich durch Wärmestrahlung des oberen Bleches begünstigt. Zu den beiden folgenden Zeitpunkten 11 und 22 h hatte sich dies bereits ausgeglichen (Tab. 3-8, Tab. 3-9).

Vergleich der Verfahren anhand der Restwassergehalte

RWG [%]	8h	11h	22h
Blech oben			
ohne Kühlung	19,3	12,7	8,6
Trockeneis-Kühlung	16,9	11,8	12,2
Kühlfalle	17,0	10,9	8,8

Tab. 3-10: RWG Blech oben

RWG [%]	8h	11h	22h
Blech unten			
ohne Kühlung	15,8	12,2	7,8
Trockeneis-Kühlung	11,6	11,2	10,8
Kühlfalle	15,5	11,7	7,9

Tab. 3-11: RWG Blech unten

Nach 11 h Trocknung waren die RWG bei allen Verfahren bei beiden Blechen praktisch gleich. Nach 8 h und 22 h konnte für die Vials des unteren Blechs ein niedrigerer RWG festgestellt werden. Die Trockeneis-Kühlung war bei beiden Blechen nach 22 h Trocknung am schlechtesten. Überraschend konnte ohne Kühlung ein gleichwertiger RWG zur Kühlfalle erzielt werden (Tab. 3-10, Tab. 3-11).

Vergleich der Verfahren anhand der T_g-Werte

T _g [°C]	8h	11h	22h
Blech oben			
ohne Kühlung	-34,3	-12,1	3,3
Trockeneis- Kühlung	-33,8	-10,4	2,2
Kühlfalle	-38,0	-8,8	4,0

Tab. 3-12: T_g-Werte Blech oben

T _g [°C]	8h	11h	22h
Blech unten			
ohne Kühlung	-31,1	-6,3	7,2
Trockeneis- Kühlung	-26,4	-9,1	2,2
Kühlfalle	-21,4	-8,6	5,0

Tab. 3-13: T_g-Werte Blech unten

Wie bereits beim Vergleich der MV-Daten fällt auch bei den DSC Daten auf, dass sich für das untere Blech höhere und damit bessere T_g'- bzw. T_g-Werte ergeben haben. Insgesamt lässt sich auch hier aufgrund der Datenlage keine eindeutige Entscheidung für ein Verfahren treffen (Tab. 3-12, Tab. 3-13).

Fazit:

Anhand der Daten ist es nicht möglich eine eindeutige, allgemeingültige Aussage zu treffen, ob die Verwendung einer Kühlfalle bzw. die Trockeneis-Kühlung die Trocknungsgeschwindigkeit beschleunigen können. Wodurch es bei den Trocknungen ohne und mit Trockeneis-Kühlung zu so deutlichen Unterschieden gekommen war, blieb unklar.

Am Trocknungsende nach 22 h bestanden nur geringe Unterschiede zwischen der Verwendung der Trocknung ohne Kühlung und der Kühlfalle. Bei den anderen beiden Zeitpunkten ließ sich aus den Ergebnissen des MV, dem RWG und den T_g -Werten kein Trocknungsverfahren als Favorit ableiten.

Aus energetischer Sicht kann eine klare und eindeutige Aussage getroffen werden. Wenn die Trocknung mit der Kühlfalle und die Trocknung ohne Kühlung gleichwertige Ergebnisse liefert, so ist das Verfahren mit dem geringeren Energieverbrauch zu bevorzugen. Da mit der Kühlfalle in der gleichen Zeit keine trockeneren Produkte erhalten wurden, kann die Energie für die Kühlfalle eingespart werden. Zur Trocknung reicht die alleinige Verwendung der Vakuumpumpe ohne Kühlung aus.

Allerdings kann daraus keine allgemeingültige Aussage abgeleitet werden, da die Ergebnisse bisher nur für diese Beladung des VTS-2 untersucht wurden. Von einer Übertragbarkeit der Daten, vor allem beim Scale-up der Chargengröße, kann nicht ohne Überprüfung ausgegangen werden, da die Saugleistung der Vakuumpumpe einen gravierenden trockenheitsbestimmenden Schritt darstellt.

Die Ursache dafür, dass die Trocknung im VTS-2 nicht durch eine Kühlfalle beschleunigt werden kann, liegt vermutlich in der Konstruktion des benutzten VTS-2.

Die Trocknungskammer und die Kühlfalle sind über einen ca. 0,8 m langen Schlauch mit einem Innenquerschnitt von ca. 2,5 cm verbunden. Das Verbindungsstück zwischen Trocknungskammer und Anschlussstück für den Schlauch ist ca. 40 cm lang und besitzt nur einen Durchmesser von ca. 0,7 cm. Der Wasserdampf muss diese lange Strecke von der Trocknungszur Kondensatorkammer der Kühlfalle durch das enge Verbindungsstück zurücklegen.

3.6. Optimierung der Vakuumtrocknung im VTS-2 durch Spülzyklen

Im vorherigen Kapitel wurde festgestellt, dass der Einsatz einer Kühlfalle nicht zur Reduzierung von Kondenswasser und nicht zur Beschleunigung der Vakuumtrocknung mit dem VTS-2 beitragen kann. Im nächsten Schritt wurde versucht, den Trocknungsprozess durch Spülzyklen mit trockenem Spülgas zu optimieren.

Während des Trocknungsprozesses verdunstet das Wasser in den Vials und sättigt die Luft bzw. das Spülgas im VTS-2 mit Wasserdampf. Ab dem Erreichen der maximalen Sättigung (= Taupunkt) kommt es zur Kondensation von Wasserdampf aus der Dampfphase. Wird der VTS-2 vor der maximalen Wasserdampf-Sättigung mit einem Gas gespült, so kann das Gas noch weiteren Wasserdampf aufnehmen und ist nicht gesättigt. Erfolgt der Spülschritt erst nach dem Taupunkt, ist bereits Wasser im VTS-2 wieder kondensiert.

Die nächsten Versuche verfolgten das Ziel den Zeitpunkt zu finden an dem der Taupunkt in dem VTS-2 erreicht wird.

80 2R-Vials, gefüllt mit 0,5 ml Placeborezeptur SAP7,4, wurden im VTS-2 zentral auf einem Blech in der unteren Schiene bei konstant 40 °C getrocknet. 20 von den 80 Vials wurden für die MV-, KF- und DSC-Analytik benutzt

Nach 9 h Trocknung mit der Membranvakuumpumpe wurde der MV der 20 Vials bestimmt. Anschließend wurde weitere 14 h bei max. Vakuum von ca. 0,36 mbar mit der Drehschieberpumpe getrocknet.

Mit vier verschiedenen Spülzykleneinstellungen wurde versucht den Taupunkt im VTS-2 zu bestimmen. Während der ersten 9 h Trocknung wurde neben einem Versuch ohne Spülen alle 10, 20 bzw. 30 min der VTS-2 mit trockenem Stickstoff gespült (siehe Abb. 2-12 in Kapitel 2.2.1.4.).

Vergleich der Spülzyklen im VTS-2

Nach 23 h Trocknung konnte für alle vier Trocknungsvarianten mit ca. 91,4 % Massenverlust der selbe Trocknungsgrad bestimmt werden (Tab. 3-14). Die Restwassergehalte und die T_g -Werte unterschieden sich nur geringfügig. Im VTS-2 alleine kam es bei allen Versuchsvarianten trotz Spülzyklen zu starker Kondensatbildung.

VTS-2				
Zyklus	MV 9 h [%]	MV 23 h [%]	RWG [%]	T_g [°C]
10 min	86,4	91,4	8,6	5,8
20 min	89,7	91,3	8,5	3,2
30 min	85,6	91,4	8,8	2,7
ohne	84,1	91,3	9,2	3,8

Tab. 3-14: Ergebnisse der Spülzyklen von VTS-2

In der nächsten Versuchsreihe wurde versucht die Mantel- und Plattenheizung des VTS-1 für die Aufkonzentrierungsphase auszunutzen, da in ihr die meiste Wassermenge entfernt wird. Die Nachtrocknung erfolgte im VTS-2. Durch diesen zweistufigen Prozess sollte die Kondensatbildung minimiert und die Trocknungsgeschwindigkeit beschleunigt werden.

Vergleich der Spülzyklen bei der Kombination von VTS-1 und VTS-2

Bei den Massenverlusten zeigte sich nach 9 h und 23 h Trocknung kein nennenswerter Unterschied. Analog verhielt es sich bei den Restwassergehalten und T_g -Werten (Tab. 3-15).

Kombination von VTS-1 + VTS-2				
Zyklus	MV 9 h [%]	MV 23 h [%]	RWG [%]	T_g [°C]
10 min	90,6	91,5	7,9	8,3
20 min	90,9	91,5	8,0	9,6
ohne	90,0	91,5	8,7	6,2

Tab. 3-15: Ergebnisse der Spülzyklen von der Kombination aus VTS-1 und VTS-2

Fazit:

Vakuumtrockenschränke ohne Mantelheizung und klein dimensionierter Gasableitung sind zur Trocknung großer Wassermengen ungeeignet, weil es zu Kondenswasserbildung in der Trocknungskammer kommt.

Erst durch Aufkonzentrierung und Entfernung der größten Wassermenge in einem mantelbeheizten Vakuumtrockenschrank (VTS-1) und Nachrocknung der Restwassermengen im VTS-2 konnte die Kondenswasserbildung deutlich minimiert werden. Die Trocknung konnte durch Kombination der beiden Trockenschränke und die geeignete Spülzykluszeit von 20 min optimiert werden. In dieser Zeit wurde die Trocknungskammer bei den gewählten Bedingungen am besten mit Wasserdampf gefüllt und durch den Spülschritt davon wieder befreit.

Da es selbst im mantelbeheizten VTS-1 zu Kondensation kommt, kann als logische Konsequenz nur die Verwendung eines Gerätes angesehen werden, welches folgende Konstruktionsmerkmale in sich vereinigt. Die Verdampfungs- und Kondensationsorte des Wassers sollten sich in möglichst großer Nähe zueinander befinden. Ein ungehinderter Gasaustausch zwischen den vorgenannten Orten sollte möglich sein.

3.7. Vakuumtrocknung im VTS-2 bei verschiedenen Trocknungstemperaturen

Aus den Erfahrungen der beiden vorherigen Kapitel heraus, wurde für die weiteren Versuche die Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4 in Form einer Kühlfalle mit beheizbarer Stellfläche zur Vakuumtrocknung benutzt. Dort befinden sich der Verdampfungsort und der Kondensator in unmittelbarer Nähe. Durch den Aufbau einer Einkammeranlage wird der Gasaustausch nicht behindert.

Bisher wurden bei den vorgestellten Vakuumtrocknungs-Versuchen nur G-CSF-Gehalte von 77 % bis 93 % in den Vakuumtrockenschränken erzielt. Diese Gehalte waren zu literaturbekannten Ergebnissen von Mattern, die mittels Gefrier- aber auch Vakuumtrocknung erreicht wurden, nicht konkurrenzfähig [17].

Da mit ähnlichen Rezepturen trockene, stabile Proben durch Vakuumtrocknung hergestellt werden konnten, wurde die Rezeptur unverändert gelassen und der Parameter Trocknungstemperatur variiert.

Proben der Rez. SAP4 und SAP7,4 wurden in der Kühlfalle mit beheizter Stellfläche bei 20 °C, 30 °C und 40 °C mit Hilfe der Membranvakuumpumpe und ASN ab 70 mbar aufkonzentriert. Sobald alle Vials in den rubber-Zustand übergegangen waren, wurde im VTS-2 bei RT nachgetrocknet.

Stellfläche [°C]	Dauer [h:min]		
	Aufkonzentrierung	Nachtrocknung	Gesamttrocknungszeit
20	3:15	11:50	15:05
30	1:00	9:20	10:20
40	0:45	10:40	11:25

Tab. 3-16: Übersicht über die Dauer der Aufkonzentrierung und der Nachtrocknung

Beobachtungen während der Trocknung

Das verdunstende Wasser schied sich sofort am Kondensator ab. Mit der Membranvakuumpumpe konnte ohne Siedeverzüge das Vakuum unterhalb des Siedepunktes nachgeführt werden. Es kam in einzelnen Vials zu einer Bildung von Siedebälchen. Da die Rezeptur zu diesem Zeitpunkt noch eine Flüssigkeit mit sehr niedriger Viskosität darstellte, lief die Rezeptur schließlich wieder im Vial zusammen und wurde weiter aufkonzentriert. Durch manuelles Unterbrechen der Siedepunktsnachführung konnten Siedeverzüge vermieden werden. Die Ursache für das Auftreten der Siedebälchen kann durch die geringe Probenzahl begründet werden. Um bevorstehendes Sieden erkennen zu können, muss eine Mindestbeladung der Kammer erfolgen. In einem ergänzenden Versuch wurde gezeigt, dass sich Siedeverzug durch größere Beladung der Stellfläche vermeiden lässt.

Wasserverlust in der Kühlfalle

Sobald alle Vials in den rubber-Zustand übergegangen waren, wurde die Aufkonzentrierung in der Kühlfalle beendet, der Massenverlust bestimmt und der Wasserverlust errechnet.

Bei der 40 °C Trocknung konnte nach 45 min ein WV von ca. 97 % und bei der 30 °C Trocknung nach 60 min WV von 90 % - 94 % erzielt werden. Bei der Aufkonzentrierung mit 20 °C waren 3:15 h:min notwendig um einen WV von 90 % bzw. 97 % zu erreichen (Tab. 3-17). Am individuellen Trocknungs-Ende lagen die WV-Werte alle sehr eng zusammen.

Temp. [°C]	Dauer [h:min]	WV [%]		RWG [%]	
		pH 4,0	pH 7,4	pH 4,0	pH 7,4
20	03:15	90,3	97,4	0,6	0,3
	15:05	98,4	99,2		
30	01:00	89,6	94,1	0,5	0,4
	10:20	98,5	99,1		
40	0:45	96,6	97,8	0,4	0,1
	11:25	98,6	99,5		

Tab. 3-17: Wasserverlust und Restwassergehalt

Restwassergehalte

Die Restwassergehalte für alle Proben bewegten sich unter 1 %. Die Werte für SAP7,4 waren stets kleiner als die Werte von SAP4 (Tab. 3-17).

T_g-Werte

Bereits vom Aussehen der Proben und ihrer Konsistenz beim Abwiegen für die DSC-Messung konnte eine ungefähre Vorhersage über das spätere Messergebnis getroffen werden. Während die Proben mit SAP7,4 meist in Form fester Stücke vorlagen, waren die Proben von SAP4 überwiegend eine Mischung hochviskoser und fester Anteile. Da bei der DSC nur ein Teil der getrockneten Probe für die Messung verwendet wurde und es schwierig war derartige Mischungen zu einer Probe mit homogenen Wassergehalt zu vermischen, kam es bei der DSC Messung zu größeren Abweichungen zwischen den Messergebnissen.

Die DSC-Ergebnisse unterschieden sich für die beiden pH-Werte sehr deutlich voneinander. Die Werte für SAP7,4 lagen stets weit über denen von SAP4 (Tab. 3-18).

Von jedem Versuch wurde jeweils von 3 Vials der T_g bestimmt. Die erhaltenen Daten differierten besonders stark bei den 20 °C Proben.

Bei SAP4 stieg der gemittelte T_g-Wert mit der Trocknungstemperatur für die drei Einzelmessungen von 0,5 °C über 13,7 °C auf 19 °C.

Bei SAP7,4 konnte ein Ansteigen der T_g-Werte parallel zu den Stellflächentemperaturen nicht festgestellt werden.

T _g [°C]	pH 4,0			pH 7,4		
	20 °C	30 °C	40 °C	20 °C	30 °C	40 °C
Vial 1	-5,2	20,1	14,6	54,8	39,7	60,6
Vial 2	7,5	11,6	22,2	44,7	39,1	57,6
Vial 3	-0,8	9,5	20,3	45,6	41,2	54,3
MW [°C]	0,5	13,7	19,0	48,4	40,0	57,5

Tab. 3-18: DSC in der Kühlfalle

SEC-Ergebnisse

Die Monomer-Gehalte waren für Rez. SAP4 größer als für SAP7,4 (Tab. 3-19). Bei Rez. SAP4 ergaben sich für die drei Trocknungstemperaturen sehr ähnliche Ergebnisse. Bei SAP7,4 stieg dagegen der Monomer-Gehalt parallel mit der Trocknungstemperatur leicht an. Dieser Verlauf scheint zunächst überraschend. Trotz höherer Temperatur und damit höherem Temperaturstress wurde weniger G-CSF zerstört. Die Ursache dafür ist in der Aufkonzentrierung zu suchen. Während bei der Trocknung bei 20 °C 3:15 h:min zur Aufkonzentrierung benötigt wurden, waren bei 40 °C Trocknungstemperatur 45 min dafür ausreichend. Die sich aufkonzentrierende Lösung befand sich bei 40 °C kürzer im ungünstigen rubber-Zustand und es konnte somit ein höherer G-CSF-Gehalt erzielt werden [102,141-147].

Stellfläche [°C]	G-CSF-Gehalt [%]	
	pH 4,0	pH 7,4
20	96,8	91,4
30	97,8	92,3
40	97,5	93,1

Tab. 3-19: SEC in der Kühlfalle

Fazit:

Die Trocknung von Proben in der Kombination aus Aufkonzentrierung in der Gefriertrocknungsanlage und Nachtrocknung im VTS-2 lieferten Proben mit einem RWG von < 1 % und einem G-CSF-Gehalt von ca. 97 % für Rez. SAP4 und von ca. 92 % bei Rez. SAP7,4. Damit konnten mit Rez. SAP4 Ergebnisse erhalten werden, die mit Literaturdaten vergleichbar waren. Auch für Rez. SAP7,4 waren diese Daten im Vergleich aller bisher angewandter Trocknungsprogramme die besten. Obwohl die Restwassergehalte für beide Rezepturen bei < 1 % lagen, konnten nur für Rez. SAP7,4 T_g-Werte von 40 % – 57,5 °C gemessen werden. Bei Rez. SAP4 streuten die T_g-Werte trotz des niedrigen Restwassergehaltes stark über einen Bereich von 0,5 bis 19,0 °C.

Neben der schonenden Trocknung ist besonders interessant, dass bereits nach 45 min bei der Trocknung mit 40 °C ein Wasserverlust von ca. 97 % erhalten werden konnte. Die gesamte Prozessdauer war mit den verwendeten 11:25 h:min deutlich kürzer als übliche Gefriertrocknungsprozesse.

3.8. Zusammenfassung der Optimierung der Vakuumtrocknung

Es konnte gezeigt werden, dass bei den verwendeten Trocknungsverfahren die Parameter Druck, Temperatur, Vibrationsrate und die Zusammensetzung der Rezeptur einen entscheidenden Einfluss auf die Trocknungsgeschwindigkeit und Stabilität von G-CSF in den Zubereitungen haben.

Das rechtzeitige, visuelle Erkennen bzw. die Kontrolle von Siedeverzug und/oder dem zwischenzeitlichen Einfrieren der Lösungen gestaltete sich durch die Parameter Vibration bzw. Rotation beim IR-Dancer bzw. RVC schwieriger als bei den beiden Vakuumtrockenschränken. Die Entwicklung eines Trocknungsprogramms unter Berücksichtigung der Parameter Temperatur, Druck und Vibration/Rotation war komplex und musste für jede Rezeptur neu bestimmt werden.

Durch die Einbauten in die Geräte RVC und IR-Dancer ist der Probandurchsatz stark limitiert und die Handhabbarkeit kompliziert. Dies entfällt bei der Benutzung von Vakuumtrockenschränken bzw. Kammern von Gefriertrocknungsanlagen.

Die Trocknungsrate war beim IR-Dancer und dem VTS-1 vergleichbar hoch. Beim RVC war sie dagegen deutlich niedriger. Der erwartete Effekt, die Trocknung durch die Oberflächenvergrößerung beim IR-Dancer stark zu beschleunigen, wurde durch die negative Rückkopplung des Systems überdeckt.

Die Ausbildung von Aggregaten und/oder Dimeren von G-CSF war beim RVC sehr viel stärker als bei den anderen Verfahren ausgeprägt. Eine entscheidende Rolle spielte aber der längere Trocknungsprozess. Außerdem wirkte sich die Trocknung bei höheren Temperaturen (60 / 45 °C) im Gegensatz zu 40 °C bei beiden Vakuumtrockenschränken und IR-Dancer negativ auf den G-CSF-Gehalt aus.

Als Konsequenz und Zusammenfassung der ermittelten Ergebnisse bietet der RVC keine Vorteile für eine schnellere und schonendere Trocknung und der IR-Dancer nur eine teilweise Annäherung an das gesteckte Ziel.

Tab. 3-20 fasst die Vor- und Nachteile der einzelnen Verfahren zusammen:

Parameter	RVC	IR-Dancer	VTS-1 / VTS-2	VT in GT-Anlage
Optische Kontrolle von Siedeverzug	schwierig	schwierig	einfach	einfach
Chargengröße	gering	gering	hoch	hoch
Handhabbarkeit	schwierig	schwierig	einfach	einfach
Trocknungsrate	gering	hoch	gering	hoch
G-CSF-Aggregation	hoch	niedrig	niedrig	niedrig

Tab. 3-20: Vergleich der verwendeten Trocknungsverfahren und -geräte

Bei den beiden Vakuumtrockenschränken konnte Siedeverzug durch den Einsatz der Membranvakuumpumpe mit automatischer Siedepunktnachführung verhindert werden.

Konstruktionsbedingt schränkte sich aber beim VTS-2 der Beladungsgrad der Bleche ein, da die Temperaturverteilung auf den Blechen inhomogen ist. Ausgehend von zwei warmen Bereichen auf den Blechen nimmt die Temperatur zum Rand hin durch den Kontakt der Bleche mit der unbeheizten Wand ab.

Trotz zahlreicher Optimierungsversuche mit einer Kühlfalle und Spülzyklen mit trockenem Spülgas konnte nicht verhindert werden, dass es zur Kondensation von Wasserdampf in beiden Vakuumtrockenschränken kam. Aufgrund dieser Tatsache verlängerten sich die Trocknungszeiten in den beiden Vakuumtrockenschränken und damit einhergehend erhöhte sich das Ausmaß der Aggregation, da die Proben sich länger im hochkonzentrierten Zustand befanden. Verursacht wird die schlechte Entfernung des Wassers aus den Vakuumtrocken-

schränken durch die räumliche Trennung der Verdampfungs- und Kondensationskammer. Beide Kammern waren über zum Teil enge Verbindungsschläuche miteinander verbunden. Erst die Vakuumtrocknung in der Einkammer-Gefriertrocknungsanlage mit temperierter Stellfläche lieferte gute Voraussetzungen für eine schnelle und gleichzeitig schonende Vakuumtrocknung. Mittels einer Membranvakuumpumpe mit automatischer Siedepunktnachführung konnte Siedeverzug aber auch zwischenzeitliches Einfrieren verhindert werden. Da nur eine temperierbare Stellfläche vorhanden war, konnten pro Prozess nur 80 2R-Vials getrocknet werden. Mehrere Stellflächen oder größere Anlagen besitzen diesen Nachteil nicht. Durch die räumliche Nähe des Verdampfungs- und Kondensationsortes und einen unbehinderten Weg für den Wasserdampf zwischen den beiden Orten wurde eine schnelle Trocknung erzielt. Der Faktor Temperatur hat nur bedingt einen direkten Einfluss auf den G-CSF-Gehalt. Ausschlaggebend ist, bei welcher Temperatur das Protein den hochkonzentrierten Zustand verlassen und zum trockenen Zustand gelangt. Auch hier liegt wieder ein Rückkopplungsmechanismus vor. Zwar ist bei niedrigen Temperaturen der denaturierend wirkende Temperatureinfluss primär gering, durch die verlangsamte Trocknung kann es dennoch zu Aggregation kommen. Bei höherer Temperatur verkürzt sich die Trocknungsdauer und damit die Zeit bis der trockene Zustand erzielt wird. Andererseits wirken sich höhere Temperaturen negativ auf die Proteinstabilität aus [102,141-147]. Neben der Evaluierung der geeigneten Prozessparameter kann die Proteinstabilität durch die Rezepturkomponenten optimiert werden [20,35,67,148,149].

4. AGGREGATIONS-VERHALTEN VON G-CSF

Das Kapitel Aggregations-Verhalten von G-CSF beschäftigt sich mit dem Verhalten von G-CSF während des Trocknungsprozesses. Bereits im Kapitel 3.3. wurde bei den IR-Dancer-Versuchen darauf hingewiesen, dass der mittels SEC bestimmbare Monomeranteil während der Trocknung absinkt und anschließend wieder ansteigt.

In zahlreichen Versuchen wurde dieses Verhalten von G-CSF mit verschiedenen Trocknungsgeräten näher untersucht. Dazu wurden während der Aufkonzentrierung und Nachtrocknung in zeitlichen Abständen Proben gezogen.

Pro Versuch war durch diese Vorgehensweise eine Vielzahl an Proben mittels SEC zu analysieren. Eine Probe benötigte in der SEC 50 min für die Fraktionierung und Detektion der Probenbestandteile. Aus der Literatur ist bekannt, dass der hochkonzentrierte rubber-Zustand für die Proteinstabilität sehr ungünstig ist und zur Aggregation des Proteins führen kann [73,141-145]. Eine Lagerung der Proben, in dem Zustand wie sie während der Trocknung gewonnen wurden, schied aus diesem Grund aus. Für das Problem der langen Analysezeit und der Problematik des rubber-Zustandes musste ein geeigneter Ausweg gefunden werden. In Versuchsreihen wurde geprüft, ob Schockgefrieren der Proben mit Flüssigstickstoff ohne Veränderung der Proben möglich ist.

Zur Überprüfung und Bestätigung der mittels SEC erhaltenen Daten wurden die Proben parallel zusätzlich mit AF4 analysiert.

Mit mehreren Versuchen wurde die Abhängigkeit des G-CSF-Aggregations-Verhaltens von der Trocknungstemperatur untersucht.

Schließlich wurden flüssige und getrocknete Proben einer Stabilitätseinlagerung unterworfen. Außerdem wurden aufkonzentrierte Proben eingelagert und getrocknete Proben einer Rückbefeuchtung bei verschiedenen Luftfeuchten im Exsiccator ausgesetzt. Anhand der flüssigen, aufkonzentrierten, getrockneten und wieder befeuchteten Proben konnte die Stabilität des G-CSF bei verschiedenen Restfeuchten von ca. 155 % – 0,5 % untersucht werden. Diese hergestellten Proben entsprechen von ihrer Zusammensetzung gleichzeitig den Feuchtigkeitsstadien, die während der Trocknung durchlaufen werden.

4.1. Auftreten von Aggregation bei der Trocknung von G-CSF-Rezepturen

Um den Trocknungsprozess hinsichtlich des Wasserverlustes und der Proteinstabilität besser charakterisieren zu können, wurden während der Trocknung in bestimmten Abschnitten Proben von den Rez. SP7,4 und SAP7,4 gezogen. Sie wurden gravimetrisch und mit SEC analysiert.

Bei der Auswertung der IR-Dancer-Versuche fiel zum ersten Mal auf, dass es in der Mitte des Trocknungsprozesses bei ca. 13 % – 69 % Feststoffanteil zu einem teilweise rapiden Absinken des G-CSF-Monomer-Gehalts kam. Während des weiteren Trocknungsfortschritts stieg der Monomer-Gehalt wieder an und verfehlte mit dem Erreichen der maximalen Trockene teilweise nur knapp den Anfangsgehalt einer frisch hergestellten Rezeptur.

Exemplarisch ist dies anhand Abb. 4-1 zu erkennen. Zum Zeitpunkt 45 min war sowohl bei Rez. SP7,4 als auch bei SAP7,4 das Minimum des G-CSF-Gehalts erreicht.

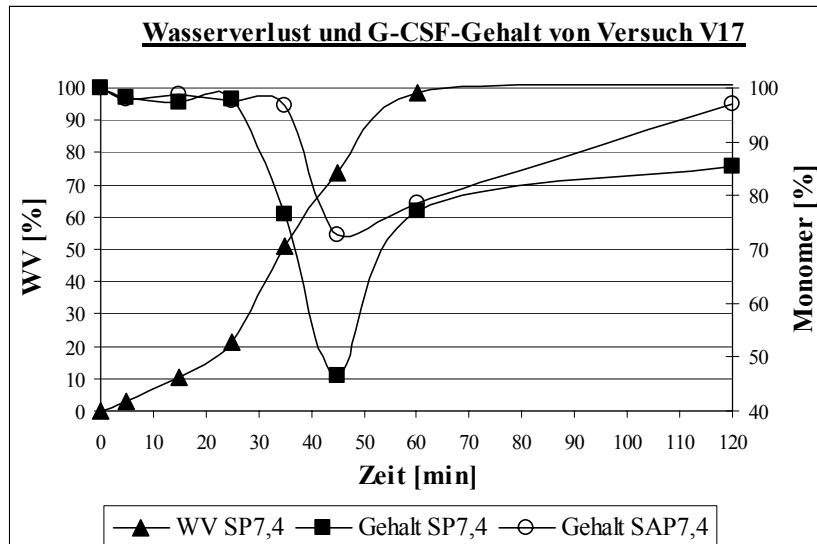


Abb. 4-1: IR-Dancer Versuch V17 (Temperatur 40 °C und Vibrationsstufe 5,5)

Charakteristika des minimalen G-CSF-Gehalts während der Trocknung

Die folgenden Tabellen (Tab. 4-1 bis Tab. 4-4) zeigen, dass es sich bei der Beobachtung des Monomer-Minimums nicht um einen Einzelfall handelte. In Abhängigkeit von der Trocknungstemperatur und der Vibrationsstufe werden der G-CSF-Gehalt zum Zeitpunkt des Monomer-Minimums dargestellt. Dieser Zeitpunkt wird zusätzlich durch Angaben zum Wasserverlust und daraus errechnet der Feststoffanteil der Probe charakterisiert.

Der kritische Bereich der Aggregation befand sich für beide Rezepturen bei einem Feststoffanteil von 13 % – 69 % (40 °C) bzw. 24 % – 34 % (RT).

Als minimaler Monomer-Gehalt ergaben sich für beide Rezepturen 17 % – 85 % (40 °C) bzw. 66 % – 94 % (RT) (Tab. 4-1 bis Tab. 4-4).

Die Ergebnisse der Trocknung bei RT fielen alle in einen engen Bereich während die bei 40 °C getrockneten Proben über einen großen Bereich streuten.

Vibration [0-10]	Zeitpunkt [min]	G-CSF-Gehalt [%]	WV [%]	Feststoffanteil [%]
0	45	82,3	92,4	45,7
3,5	35	57,1	82,0	27,4
5,5	45	46,6	74,4	21,4
7,5	25	70,9	51,6	12,9
10	45	64,3	98,2	68,5

Tab. 4-1: Zeitpunkt der minimalen Gehalte, der Wasserverluste und Feststoffanteile von SP7,4 bei 40 °C

Vibration [0-10]	Zeitpunkt [min]	G-CSF-Gehalt [%]	WV [%]	Feststoffanteil [%]
0	120	88,0	77,5	23,6
3,5	120	88,4	77,7	23,6
5,5	45	65,5	87,6	34,3
7,5	120	87,5	78,7	24,5

Tab. 4-2: Zeitpunkt der minimalen Gehalte, der Wasserverluste und Feststoffanteile von SP7,4 bei RT

Vibration [0-10]	Zeitpunkt [min]	G-CSF-Gehalt [%]	WV [%]	Feststoffanteil [%]
0	45	85,4	91,5	48,9
3,5	45	66,8	92,9	52,2
5,5	45	72,6	75,3	25,2
7,5	35	70,9	74,9	25,2
10	35	16,7	80,7	30,1

Tab. 4-3 : Zeitpunkt der minimalen Gehalte, der Wasserverluste und Feststoffanteile von SAP7,4 bei 40 °C

Vibration [0-10]	Zeitpunkt [min]	G-CSF-Gehalt [%]	WV [%]	Feststoffanteil [%]
0	120	91,6	80,2	29,0
3,5	120	93,5	77,4	27,0
5,5	45	91,6	83,5	34,0
7,5	120	83,7	82,8	30,1

Tab. 4-4: Zeitpunkt der minimalen Gehalte, der Wasserverluste und Feststoffanteile von SAP7,4 bei RT

Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Aggregaten, Dimeren und dem Monomer-Gehalt

Die Daten in Tab. 4-5 verdeutlichen ein intermediäres Auftreten von Dimer bzw. Aggregaten und ein massives Absinken des G-CSF-Monomers. Bis auf zwei Ausnahmen konnte aus den jeweiligen SEC-Daten der 9 IR-Dancer Versuche ein direkter Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Aggregat- und Dimer-Gehalt und dem Absinken des G-CSF-Monomers hergestellt werden. Es fand offensichtlich eine durch Feuchtigkeit und Aufkonzentrierung der Proben induzierte Aggregation statt. Diese verlief scheinbar reversibel.

Trocknungszeit [min]	Gehalt [%] SP7,4 (Probe 1)			Gehalt [%] SP7,4 (Probe 2)			Gehalt [%] SAP7,4 (Probe 1)			Gehalt [%] SAP7,4 (Probe 2)		
	Aggregat	Dimer	Monomer	Aggregat	Dimer	Monomer	Aggregat	Dimer	Monomer	Aggregat	Dimer	Monomer
0	0	0	100,0	0	0	100,0	0	0	100,0	0	0	100,0
5	0	0	98,2	0	0	98,6	0	0	98,8	0	0	96,9
15	0	0	96,8	0	0	97,7	0	0	98,7	0	0	98,7
25	0	0	97,5	0	0	98,4	0	0	97,6	0	0	97,4
35	0	0	78,4	0	1,3	74,6	0	0	96,5	0	0	97,2
45	1,6	1,2	44,1	2,2	1,5	42,6	0	0,5	75,9	0,2	0,9	67,7
60	0	3,3	63,7	0,6	3,6	90,3	0	0	97,2	0	1,5	59,7
120	2,3	8,3	89,8	0	3,5	80,9	0	0	97,6	0	0	96,5

Tab. 4-5: Zusammenhang zwischen Auftreten von Aggregaten, Dimeren und Monomeren

An den Daten von Tab. 4-5 kann abgelesen werden, dass Rez. SAP7,4 eine besser stabilisierende Wirkung als Rez. SP7,4 besitzt. Bei Rez. SAP7,4 konnte im Gegensatz zu Rez. SP7,4 am Ende kein Aggregat- und Dimer-Gehalt detektiert werden. Außerdem lag nach der Trocknung fast das gesamte G-CSF noch oder wieder als Monomer vor. Bei Rez. SP7,4 ist der Anteil des G-CSF-Monomers deutlich vermindert.

Die Erklärung für das unterschiedliche Stabilisierungsverhalten der beiden Rezepturen kann aus Placebo-Ergebnissen von Mattern abgeleitet werden [17]. Placebo-Rez. SAP7,4 lieferte bei der Vakuumtrocknung bei Mattern ein teilamorphes Produkt. Für Rez. SP7,4 ist ebenfalls ein teilamorphes Produkt zu erwarten. Aufgrund der guten Wasserlöslichkeit des Arginins, verbleibt es neben der Saccharose in der sich immer weiter aufkonzentrierenden rubber-Masse, während Phenylalanin auskristallisiert. Saccharose, Arginin und G-CSF scheiden sich schließlich im amorphen Zustand auf den Phenylalanin-Kristallen ab.

Bei den durchgeführten Versuchen befanden sich die beiden Rez. SP7,4 und SAP7,4 im teilamorphen Zustand. Durch den Arginin-Zusatz war der amorphe Anteil im teilamorphen System bei SAP7,4 im Vergleich zu SP7,4 höher. Aus der Literatur ist bekannt, dass amorphe Gerüste zur Stabilisierung von Proteinen besonders geeignet sind [8,13,150]. Da Rez. SAP7,4 diejenige Formulierung mit dem größeren amorphen Anteil ist, besitzt sie das größere Stabilisierungsvermögen.

Aus diesem Grunde wurde in allen weiteren Versuchen nur noch Rez. SAP verwendet. Neben der Rez. SAP7,4 kam bei weiteren Versuchen auch die saure Rez. SAP4 zum Einsatz.

Fazit:

Bei allen 9 IR-Dancer-Versuchen konnte bei der Auswertung der SEC-Daten ein intermediäres Monomer-Minimum ermittelt werden. Parallel zum Monomer-Minimum kam es zu einem zwischenzeitlich verstärktem Auftreten von Aggregat und Dimer.

Je nach Formulierung war das Ausmaß des Monomer-Minimums unterschiedlich stark ausgeprägt. Die Rez. SAP7,4 stabilisierte das G-CSF besser als Rez. SP7,4. Beide getrockneten Produkte lagen in einem teilamorphen System vor. Da bei SAP7,4 der amorphe Anteil höher ist als bei SP7,4, kam es deshalb zu einer besseren Stabilisierung.

4.2. Einfrier- / Auftau-Versuche von G-CSF-Proben

In der Einleitung dieses Kapitels wurde bereits auf die Problematik der großen Probenzahl der Versuche und der Destabilisierung des G-CSF im rubber-Zustand eingegangen.

Mittels Einfrier-Auftauzyklen (EA-Zyklen) wurde untersucht, ob sich Proben durch das Schockgefrieren mit Flüssigstickstoff in ihrer Zusammensetzung verändern. Durch diese Versuche sollte ausgeschlossen werden, dass Aggregation von G-CSF durch Schockgefrieren induziert wird.

Untersuchung von Flüssigproben

Wie unter 2.2.2.3. beschrieben, wurden von Rez. SAP4 und SAP7,4 und von Reinstwasser gefüllten Vials sechs Einfrier-/Auftau-Zyklen durchgeführt.

Die Proben wurden mittels Lichtblockade, SEC und Gelelektrophorese untersucht. Die Daten der Partikelmessung werden als Mittelwert von drei Messungen dargestellt. Die Daten sind als Relativwerte angegeben und nicht gegen Blindwerte von Reinstwasser korrigiert.

- Lichtblockade-Ergebnisse der Flüssigproben

Anhand der Reinstwasser befüllten Vials konnte ausgeschlossen werden, dass es durch Verspröden des Stopfens mit der Anzahl der Zyklen zu einem Anstieg der Partikelzahlen kommt. Bei beiden Rezepturen konnte keine Tendenz zur Zunahme der Partikelzahl durch Aggregation in Abhängigkeit von der EA-Zyklenzahl festgestellt werden. Alle erhaltenen Werte entsprachen der Prüfung auf nichtsichtbare Partikel gemäß Ph. Eur. [109].

- SEC-Ergebnisse beider flüssiger Rezepturen

Bei beiden Rezepturen blieb der Monomer-Gehalt von den EA-Zyklen unbeeinflusst. Das Schockgefrieren induzierte keine mit der SEC messbare irreversible Aggregation.

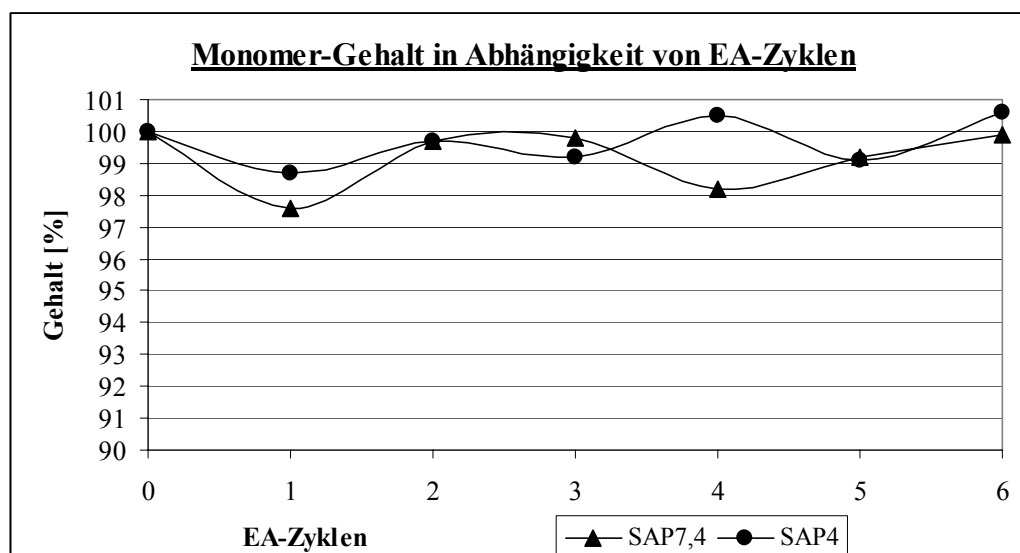
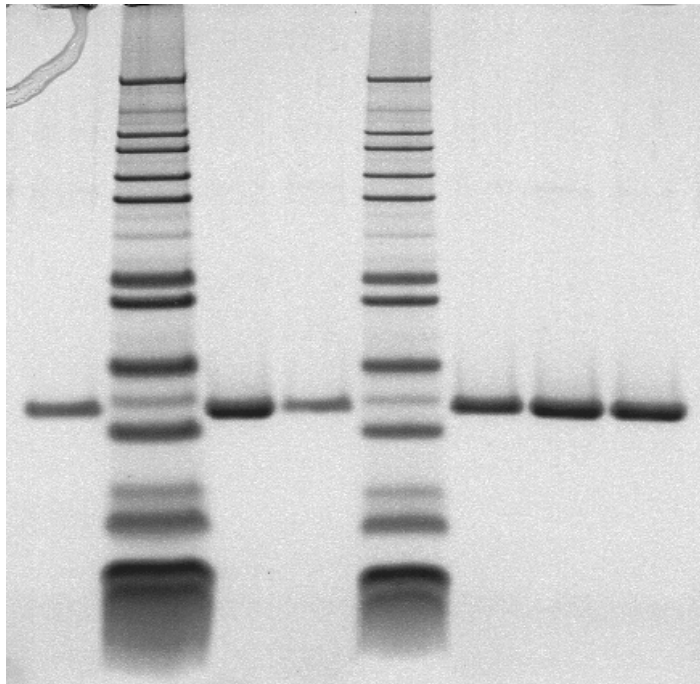


Abb. 4-2: Monomer-Gehalt [%] in Abhängigkeit von EA-Zyklen

- Gelelektrophorese beider flüssiger Rezepturen

Die Gele zeigten bei reduzierenden und nicht-reduzierenden Laufbedingungen für beide Rezepturen unabhängig von den EA-Zyklen eine starke Monomer-Bande. Die beiden Gele von SAP4 und SAP7,4 mit den nicht-reduzierenden Bedingungen wiesen zusätzlich eine fast nicht detektierbare Dimer-Bande auf. Aggregat-Banden konnten nicht detektiert werden. Auf Abb. 4-3 ist zu erkennen, dass die Intensität durch die EA-Zyklen nicht beeinflusst wurde. Einzige Ausnahme mit einer etwas geringeren Intensität war auf diesem Gel die Bande 4 mit einem EA-Zyklus.



Banden:

- 1: G-CSF-Bulk
- 2: Marker 20 µl
- 3: ungestresste Rez.
- 4: ein EA-Zyklus
- 5: Marker 10 µl
- 6: zwei EA-Zyklen
- 7: vier EA-Zyklen
- 8: sechs EA-Zyklen

Abb. 4-3: Banden von Rez. SAP4 bei reduzierenden Bedingungen

Mit den Messverfahren Lichtblockade, SEC und Gelelektrophorese konnten keine Unterschiede zwischen den unterschiedlich oft eingefrorenen und aufgetauten Proben bestimmt werden. Es lässt sich daraus folgern, dass Schockgefrieren mit Flüssigstickstoff von Rezepturen keine Aggregation induziert.

Untersuchung von Proben in unterschiedlichem Trocknungszustand nach EA-Zyklen

Jeweils 0,5 ml von Rez. SAP4 und SAP 7,4 wurden auf der 40 °C temperierten Stellfläche der Gefriertrocknungsanlage Alpha vakuumgetrocknet. Nach der Probenaufkonzentrierung mit der Membranpumpe erfolgte der Probezug. Die Formulierung der gezogenen Proben befand sich zu diesem Zeitpunkt im rubber-Zustand mit ca. 71 % (SAP4) bzw. 85 % (SAP7,4) Wasserverlust. Nach 10 h Gesamttrocknungszeit erfolgte der Probezug vom Trocknungs-Ende.

- Lichtblockade-Ergebnisse

Die ermittelten Partikelzahlen für die Proben aus dem rubber-Zustand und vom Trocknungs-Ende wiesen hinsichtlich der Partikelzahl und Partikelgröße keine Unterschiede zwischen sofort untersuchten und einmal bzw. zweimal schockgefrorenen Proben auf.

Das Einfrieren mit Flüssigstickstoff hat folglich keinen Einfluss auf das Ergebnis der Partikelmessung. Alle Proben entsprachen dem Ph. Eur. [109].

- SEC-Ergebnisse

Abb. 4-4 und Tab. 4-6 zeigen die G-CSF-Gehalte der unterschiedlich behandelten Proben.

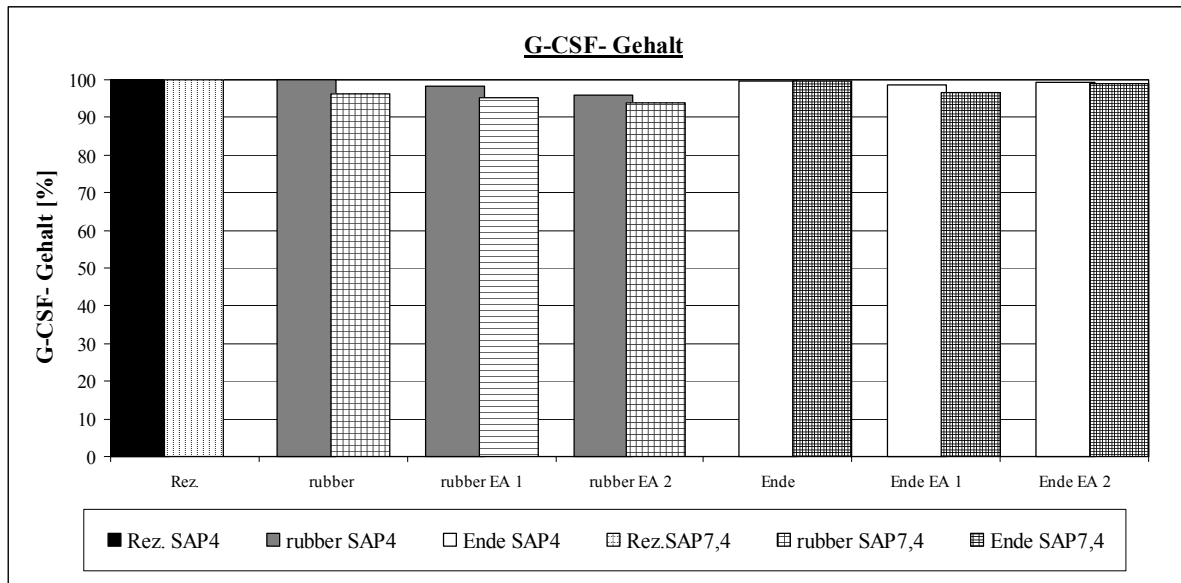


Abb. 4-4: G-CSF-Gehalt

Die Balken sind in drei Gruppen eingeteilt (Darstellung der Rez. SAP4 von dunkel nach hell und bei SAP7,4 von hell-kariert nach dunkel-kariert):

1. Von links beginnend steht das erste Balkenpaar für frisch hergestellte Formulierungen (Rezepturen nicht getrocknet).
2. Die nächsten drei Balkenpaare zeigen Proben, die während des rubber-Zustandes gezogen wurden.
3. Die rechten drei Balkenpaare zeigen die dritte Gruppe der Proben, die am Ende der Trocknung gezogen wurden.

Innerhalb einer Gruppe (Rubber, Ende) stellt das linke Balkenpaar die nicht eingefrorenen Proben, das mittlere die einmal eingefrorenen Proben und das rechte die zweimal eingefrorenen Proben dar.

G-CSF-Gehalte [%]	SAP4	SAP7,4
Rez. ungestresst	100,0	100,0
rubber	100,0	96,4
rubber (1 EA-Zyklus)	98,3	95,4
rubber (2 EA-Zyklen)	95,9	93,9
Ende	99,6	99,7
Ende (1 EA-Zyklus)	98,8	96,6
Ende (2 EA-Zyklen)	99,4	98,9

Tab. 4-6: G-CSF-Gehalte

○ SEC-Ergebnisse der Proben aus dem rubber-Zustand

Innerhalb der 3 Balkenpaare ist bei beiden Rezepturen eine geringfügige Abnahme des G-CSF-Gehalts zu erkennen. Die Abnahme wurde durch die Einfrier-/Auftau-Schritte ausgelöst und verlief direkt proportional zur Anzahl der EA-Zyklen (**Abb. 4-4, Tab. 4-6**).

Bei Rez. SAP4 war durch einen EA-Zyklus ein Verlust von 1,7 %, bei SAP7,4 von 1 % zu verzeichnen. Durch einen zweimaligen Zyklus nahm der Gehalt bei beiden Rezepturen weiter ab. Für Rez. SAP4 konnten 4,1 % und für SAP7,4 2,5 % Monomer-Abnahme bestimmt werden.

○ SEC-Ergebnisse der Proben vom Ende der Trocknung

Bei beiden Rezepturen konnten für die verschieden behandelten Proben keine auffällige Abnahme des G-CSF-Gehalts beobachtet werden (**Abb. 4-4, Tab. 4-6**). Nur der Gehalt von 96,6 % von Rez. SAP7,4 lag nach einmaligem EA-Zyklus außerhalb der wiedergefundenen Gehalte von 98,8 % bis 99,7 % Monomer. Es ließ sich kein Zusammenhang zwischen den Schwankungen der Gehaltswerte und der Anzahl der EA-Zyklen herstellen.

Fazit:

Von den SEC-Ergebnissen kann, analog zu den Ergebnissen der Lichtblockade-Messungen, abgeleitet werden, dass die EA-Zyklen keine Aggregation bei getrockneten G-CSF Proben induzieren. Diese Ergebnisse bestätigen die Untersuchungen von Izutsu et al. über das Einfrier- und Auftau-Verhalten von Lactatdehydrogenase [51]. Kerwin et al. schützten mittels Saccharose- und Tensid-Zusatz rekombinantes Hämoglobin vor Aggregation [50].

Für Proben im rubber-Zustand wurde mittels SEC lediglich eine geringe Tendenz zur Induzierung von Aggregation in Größenordnung von 2,5 – 4 % festgestellt werden.

Unter Berücksichtigung dieser Tatsache, kann die beobachtete reversible Aggregation des G-CSF nicht durch die Probenbehandlung mit Flüssigstickstoff verursacht worden sein. Die intermediären Monomer-Minima betragen ein Vielfaches des bei den EA-Zyklen ermittelten Wertes.

4.3. Auftreten von Aggregation bei verschiedenen Trocknungsverfahren

Aufgrund der Beobachtung eines intermediären Monomer-Minimums bei den IR-Dancer-Versuchen wurde überprüft, ob reversible Aggregation auch bei der Trocknung mit anderen Trocknungsgeräten auftritt.

Auftreten von Aggregation während der Trocknung im VTS-1

In Kapitel 3.2. wurden die Daten vom Trocknungs-Ende der kompletten Trocknung von der Rez. SAP7,4 im VTS-1 vorgestellt. An dieser Stelle wird nun auf den Mittelteil der 40 °C Trocknung eingegangen. In bestimmten Zeitabständen waren Proben gezogen und schockgefroren bis zur SEC-Analyse gelagert worden.

Abb. 4-5 zeigt den linear verlaufenden Wasserverlust und den Verlauf des G-CSF-Gehalts. Es kam auch bei dieser Trocknung zu einem Absinken und Ansteigen des Monomer-Gehalts. Die Aggregat- und Dimer-Kurven verhielten sich gegenläufig zur Monomer-Kurve und zeigten ihr Maximum im Monomer-Minimum. Ab dem Zeitpunkt 95 min konnten Dimer-Peaks und nach 110 und 125 min zusätzlich Aggregat-Peaks detektiert werden. Genau ab dem Auftreten der Neben-Peaks kam es zu einem Absinken des Monomer-Gehalts.

Diese Daten bestätigen die Ergebnisse, die bei der SEC-Analyse der IR-Dancer-Daten erhalten wurden.

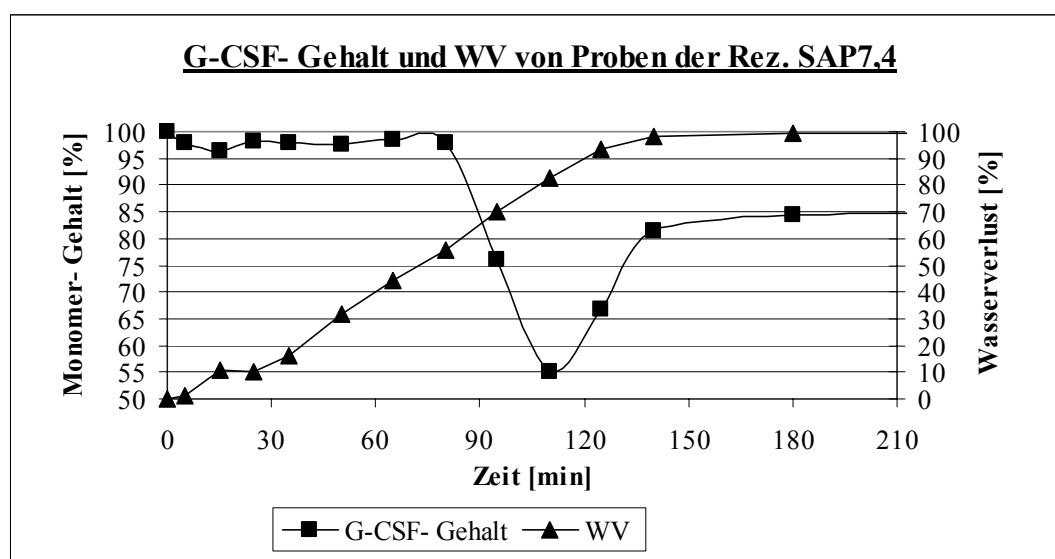


Abb. 4-5: G-CSF-Gehalt und Wasserverlust der Rez. SAP7,4 im VTS-1

Um das scheinbar reversible Absinken des Monomer-Gehalts näher zu betrachten, wurden Proben vom Monomer-Minimum und dem Trocknungs-Ende mittels Lichtblockade auf ihre Partikelzahl und Partikelgröße, sowie mittels Gelelektrophorese auf ihre Zusammensetzung untersucht.

- Lichtblockade-Ergebnisse

Alle Proben entsprachen dem Ph. Eur. [109]. Aufgrund von großen Schwankungen zwischen den Mittelwerten der Proben konnte keine klare Aussage abgeleitet werden. Es fiel auf, dass bei den rubber-Proben tendenziell mehr kleine Partikel und bei den Proben vom Trocknungs-Ende mehr größere Partikel gemessen wurden (Tab. 4-7).

	Partikelzahl		
	> 1 μm	> 4,1 μm	> 10 μm
rubber	93000	5107	140
Ende	72948	9877	734

Tab. 4-7: Lichtblockade-Daten von Proben vom Monomer-Minimum und Trocknungs-Ende

- Gelelektrophorese

Da mit der SEC nur gelöste Fraktionen aufgetrennt und detektiert werden können, wurden von beiden Zeitpunkten Proben mit Gelelektrophorese untersucht.

Unter reduzierenden Bedingungen konnten neben der Monomer-Bande für das Minimum zusätzlich eine Dimer- und zwei schwache Aggregat-Banden detektiert werden. Bei der Probe vom Ende zeigte sich nur eine Monomer-Bande (**Abb. 4-6**).

Unter nicht-reduzierenden Bedingungen zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den beiden Proben (**Abb. 4-7**). Es konnten neben der Monomer- und Dimer-Bande mehrere Aggregat-Banden angefärbt werden. Die Monomer-Bande der Probe vom Trocknungs-Ende besaß eine größere Intensität und ergab eine größere Fläche als bei der Probe vom Minimum. Dafür war die Anzahl und die Intensität der Aggregat-Banden bei der Probe aus dem Monomer-Minimum ausgeprägter (**Abb. 4-7**).

Aus dem Vergleich der beiden Gele konnte abgeleitet werden, dass es im Bereich um das Monomer-Minimum verstärkt zu Aggregaten mit Beteiligung von Disulfidbrücken gekommen sein musste. Da im Gel mit den nicht-reduzierenden Bedingungen ebenfalls Aggregat-Banden auftraten, mussten die Aggregate teilweise auch anders aufgebaut sein. Denaturierende Zusätze wie das SDS im Probenpuffer lassen eine Unterscheidung in kovalent und nicht-kovalent gebundene Aggregate zu [38]. Sofern sich Aggregate durch die denaturierenden Zusatz wieder auflösen lassen, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um nicht-kovalente Aggregate handelt [151,152]. Allerdings sind diese Aussagen nicht generell anwendbar. Katakam et al. und Brange et al. erhielten Ergebnisse, die von der Unterscheidbarkeit abweichen [153,154].

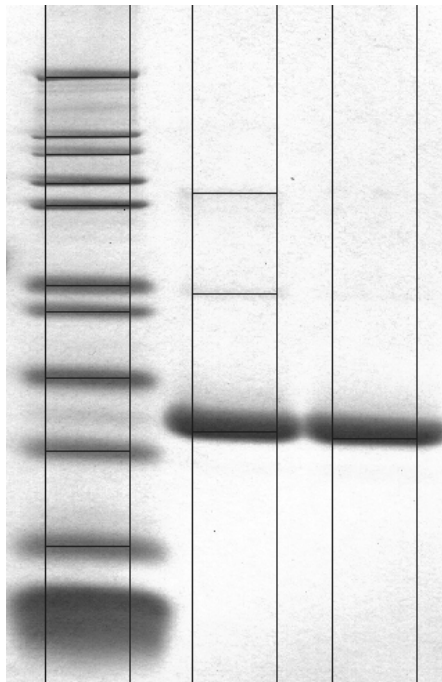


Abb. 4-6: Gel mit reduzierenden Bedingungen

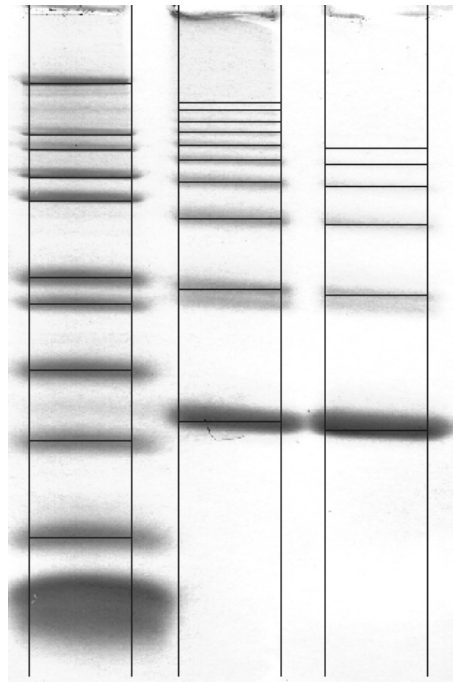


Abb. 4-7: Gel mit nichtreduzierenden Bedingungen

Legende der Gele (jew. v. li. n. re.): Marker, Probe Monomer-Minimum, Probe Trocknungs-Ende

Fazit zur Aggregation während der Trocknung im VTS-1

Während mittels der Lichtblockade-Messung keine klaren Unterschiede zwischen den Proben vom Monomer-Minimum und vom Trocknungs-Ende festgestellt werden konnten, lieferte die Gelelektrophorese deutliche und eindeutige Ergebnisse. Die Anzahl der Aggregat-Banden war bei der Probe aus dem Monomer-Minimum sehr viel ausgeprägter, wohingegen die Monomer-Bande bei der Probe vom Trocknungs-Ende wieder an Intensität zugenommen hat. Die eventuell nicht in der SEC detektierbaren unlöslichen Aggregate konnten nicht die Ursache für etwaige Artefakte sein, sondern die reversible Aggregation war real.

Auftreten von Aggregation während der Trocknung im VTS-2

Mit der Trocknung im VTS-1 konnte das Absinken und Wiederansteigen des Monomer-Gehalts bestätigt werden. Zur Untermauerung der Ergebnisse wurden im VTS-2 neben der Rez. SAP7,4 auch die Rez. SAP4 getrocknet, um zu überprüfen, ob eine Abhängigkeit des Phänomens vom pH-Wert der Rezeptur besteht. Die Versuchsbeschreibung und die Ergebnisse vom Trocknungs-Ende wurden bereits in Kapitel 3.4. erläutert.

• SEC-Ergebnisse

Abb. 4-8 zeigt die Kurven des Monomer-Gehalts der beiden Rezepturen. Sowohl bei Rez. SAP7,4, als auch bei Rez. SAP4 kam es zu einem Absinken und Wiederansteigen des Monomer-Gehalts. Das Monomer-Minimum lag bei beiden Formulierungen nach 120 min Trocknung vor. Allerdings unterschieden sie sich im Ausmaß des Minimums sehr stark. Bei Rez. SAP7,4 sank der Monomer-Gehalt auf 47,6 % ab.

Das Minimum lag bei Rez. SAP4 ebenfalls nach 120 min bei 85,4 % Monomer. Der zeitliche Bereich in dem es zum Absinken und Wiederansteigen kommt, war bei der Rez. SAP4 auf den Messpunkt bei 120 min beschränkt. Wie aus der Literatur bekannt, stabilisierte die saure Rezeptur im Vergleich mit Rez. SAP7,4 besser [45,132,155]. Wie bereits bei der Trocknung im VTS-1 lag im Minimum von Rez. SAP7,4 ein Feststoffanteil von 32,7 % vor. Für Rez. SAP4 konnte ein Feststoffanteil von 25,7 % bestimmt werden, d.h. es handelt sich um weiche Massen von ca. 3-4 Teilen Wasser und 1 Teil Hilfsstoff/Protein.

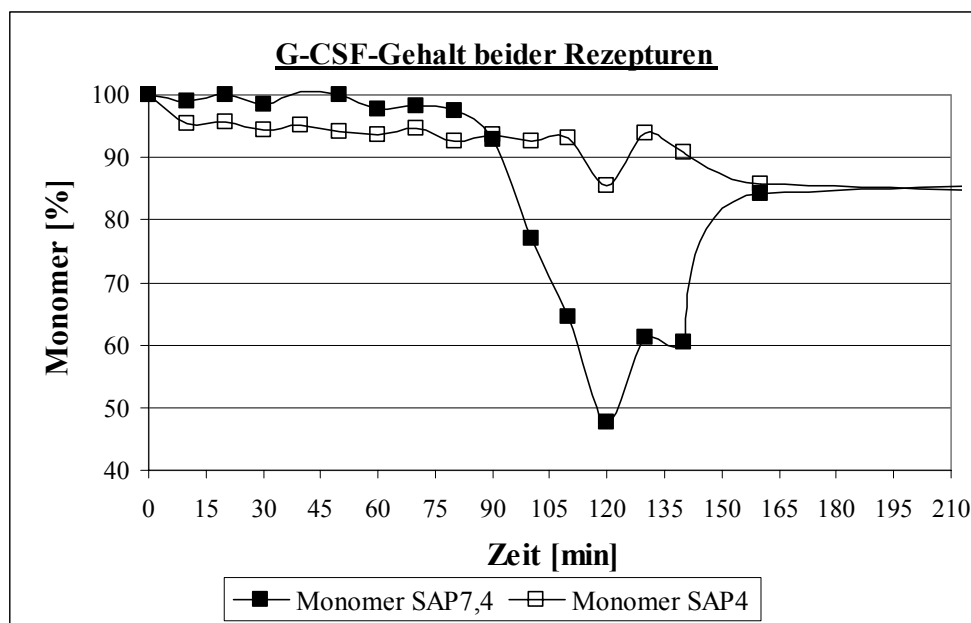


Abb. 4-8: G-CSF-Gehalt von Rez. SAP4 und SAP7,4

Bei Rez. SAP7,4 kam es zum Ansteigen des Aggregat- und Dimer-Gehalts während der Monomer-Gehalt absank und zum umgekehrtem Verlauf der Kurven nach dem Minimum (Abb. 4-9).

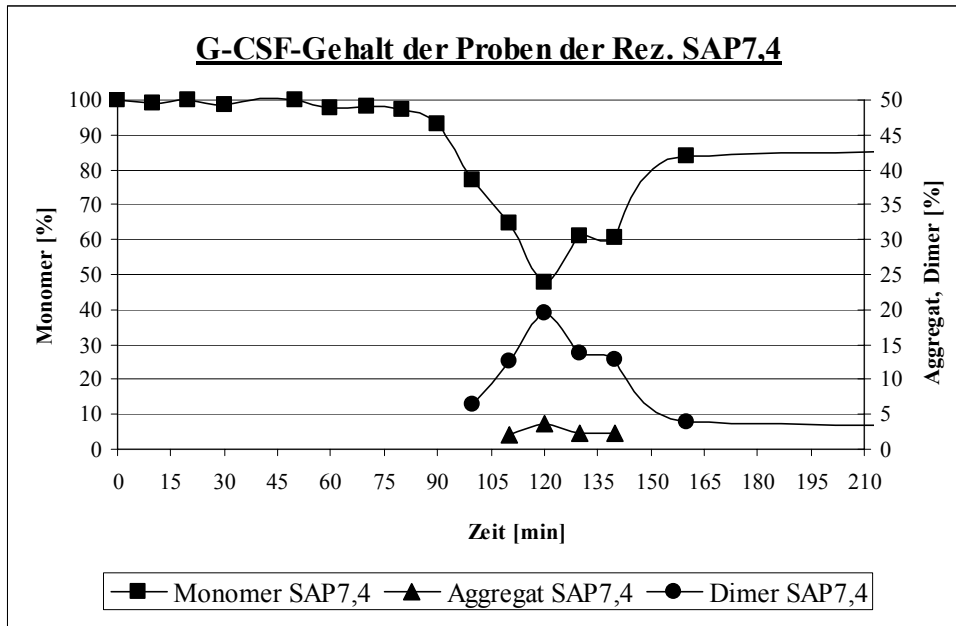


Abb. 4-9: G-CSF-Gehalte der Proben der Rez. SAP7,4

Eine interessante Beobachtung wurde bei der Auswertung der SEC-Daten gemacht. Im Verlauf der Trocknung kam es aufgrund der Abnahme der Gesamtpeakfläche resultierend zu einem Absinken des mittels SEC wiedergefundenen G-CSF-Gesamt-Gehalts (Tab. 4-8).

Die Gesamtpeakfläche setzt sich aus Aggregat-, Dimer- und Monomer-Fläche zusammen.

Zeit [min]	Aggregat [%]	Dimer [%]	Monomer [%]	Gesamt [%]
0	0	0	100	100
10	0	0	99,1	99,1
20	0	0	99,9	99,9
30	0	0	98,5	98,5
40	0	0	100,4	100,4
50	0	0	100,1	100,1
60	0	0	97,8	97,8
70	0	0	98,2	98,2
80	0	0	97,4	97,4
90	0	0	92,9	92,9
100	0	6,5	77	83,5
110	2,0	12,5	64,6	79,1
120	3,7	19,5	47,6	70,8
130	2,2	13,7	61,1	77
140	2,3	12,9	60,5	75,7
160	0	4,0	84,1	88,1
180	0	3,2	85,7	88,9

Tab. 4-8: G-CSF-Fractionen in % von Proben der Rez. SAP7,4

Während der Trocknung kam es zu einem Verlust an Protein. Die Summe der Aggregat-, Dimer- und Monomer-Gehalte ergeben zusammen keine 100 Prozent mehr. Die Gesamtgehaltskurve zeigte den gleichen Verlauf wie die Monomerkurve. Zum Zeitpunkt des Monomer-Minimums lag auch beim Gesamtgehalt ein Minimum vor.

Da das Protein nicht „verlorengehen“ kann, musste es sich der Detektion durch die SEC-Analytik entzogen haben. Es wurde vermutet, dass es sich bei den nicht detektierten Proteinbestandteilen um unlösliche Aggregate handeln könnte, da diese durch SEC nicht detektiert werden können.

Da die Gelelektrophorese zur quantitativen Untersuchung derartiger Proben nicht geeignet ist, musste ein anderer Weg zur Analyse gesucht werden. Abhilfe aus diesem analytischen Problem sollte die Asymmetrische Fluss-Feldfluss Fraktionierung (AF4) liefern. Diese Ergebnisse werden im nächsten Kapitel vorgestellt.

Fazit:

Mit den beiden Vakuumtrockenschränken konnte das intermediäre Absinken des Monomer-Gehalts bestätigt werden. Dazu gegenläufig kam es zum zwischenzeitlichen Anstieg des Aggregat- und Dimer-Gehalts. Die SEC-Daten konnten durch Gelelektrophorese gestützt werden. Die Partikelmessung war für weitere Erkenntnisse wenig hilfreich. Besonders interessant war die Tatsache, dass nicht nur der Monomer-Gehalt, sondern auch der Gesamtgehalt ein zwischenzeitliches Minimum besitzt und es zu einem Proteinmindergehalt durch die Trocknung gekommen ist.

4.4. Vergleichsuntersuchungen zur Aggregation mittels SEC und AF4

Im Gegensatz zur SEC findet bei der AF4-Technik die Fraktionierung der Analyten ohne stationäre Phase statt. Somit können Proben mit ihren unlöslichen und löslichen Bestandteilen in einem Lauf aufgetrennt und quantifiziert werden. Die Gefahr von Adsorption an das Trägermaterial einer SEC-Säule oder die Abtrennung durch die Säule entfallen bei der AF4. Mit Hilfe der AF4 sollten die SEC-Ergebnisse zum intermediären Monomer-Minimum überprüft und der Proteinmindergehalt untersucht werden.

In zahlreichen Versuchen wurden geeignete Trennbedingungen für die AF4 etabliert, so dass eine Fraktionierung der Proben in die einzelnen Spezies möglich war. Aggregate, Dimer, Monomer und Fragmente konnten getrennt mit dem UV- und dem Lichtstreu-Detektor detektiert werden [156,157].

Für die SEC-AF4-Vergleichsuntersuchungen wurden von Rez. SAP4 und SAP7,4 Proben im VTS-2 getrocknet (siehe 2.2.1.5.). Diese Trocknung wird im nächsten Kapitel eingehend hinsichtlich RWG und T_g diskutiert und mit anderen Trocknungen bei verschiedenen Trocknungstemperaturen verglichen.

Die Proben wurden nach ihrer Rekonstitution parallel in die SEC und in die AF4 injiziert. Als Elutionsmedium wurde bei beiden Anlagen der Standard-SEC-Puffer, bestehend aus 300 mM Natriumphosphat mit pH 7,4, verwendet. Um Unterschiede bei der Fraktionierung möglichst ausschließen zu können, wurden die Trennbedingungen so identisch wie möglich gewählt.

Fraktionierung der Rez. SAP4 mittels SEC und AF4

In Abb. 4-10 sind die mittels SEC- und AF4-Fraktionierung erhaltenen Monomergehalte der Rez. SAP4 über die Zeit abgebildet. Beide Kurven verlaufen parallel. Es fällt auf, dass es zu keinem intermediären Monomer-Minimum bei der Rez. SAP4 gekommen ist. Bis zum Trocknungs-Ende nach 20,5 h erfolgte ab 110 min ein kontinuierliches Absinken des Gehalts. Davor lag der Gehalt zwischen 97 % und 101 % für die SEC und zwischen 86 % und 94 % für die AF4.

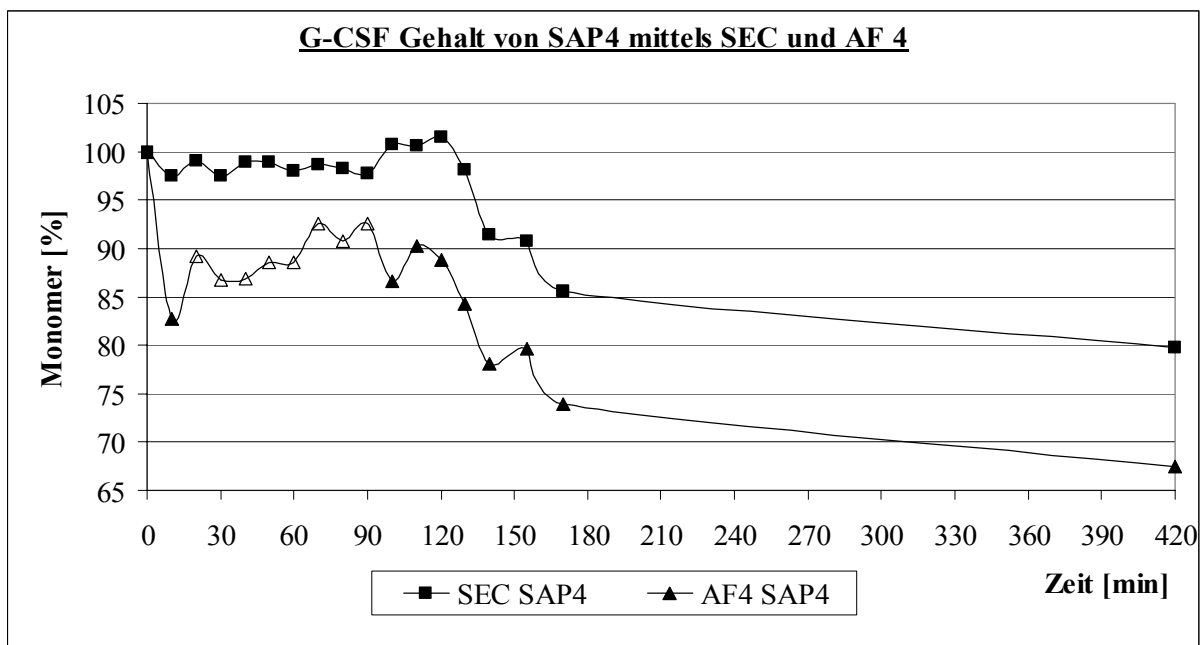


Abb. 4-10: G-CSF-Gehalt der Rez. SAP4 mittels SEC und AF4 bestimmt

Hinweis: Die AF4- Analysen der Proben von der 20. bis einschließlich 90. min wurden aus technischen Gründen zu einem anderen Zeitpunkt durchgeführt (\triangle). Aufgrund anderer Trennbedingungen ergaben sich niedrigere Gesamtflächen. Die Daten wurden angepasst und in gekennzeichnete Form ins Diagramm eingefügt (\triangle).

Fraktionierung der Rez. SAP7,4 mittels SEC und AF4

Der Verlauf der beiden Kurven der SEC- und der AF4- Fraktionierung der Rez. SAP7,4 war prinzipiell der selbe (Abb. 4-11). Zum Zeitpunkt 140 min konnte das Monomer-Minimum bestimmt werden. Danach kam es im Unterschied zu der Rez. SAP4 wieder zu einem Ansteigen des Gehalts und nicht zu einem weiteren Absinken des Gehalts. Nach 20,5 h resultierte für die SEC-Bestimmung ein Endgehalt von 70 % bzw. von 66 % für die AF4- Analytik.

Bei beiden Rezepturen ergab sich bei der Fraktionierung mittels AF4 ein niedrigerer Monomer-Gehalt als bei der SEC. Mit der AF4 konnten neben den löslichen zusätzlich die unlöslichen Aggregate erfasst werden. Diese Tatsache führte zu einer Erniedrigung des Monomeranteils der prozentualen Flächenanteile der einzelnen Fraktionen.

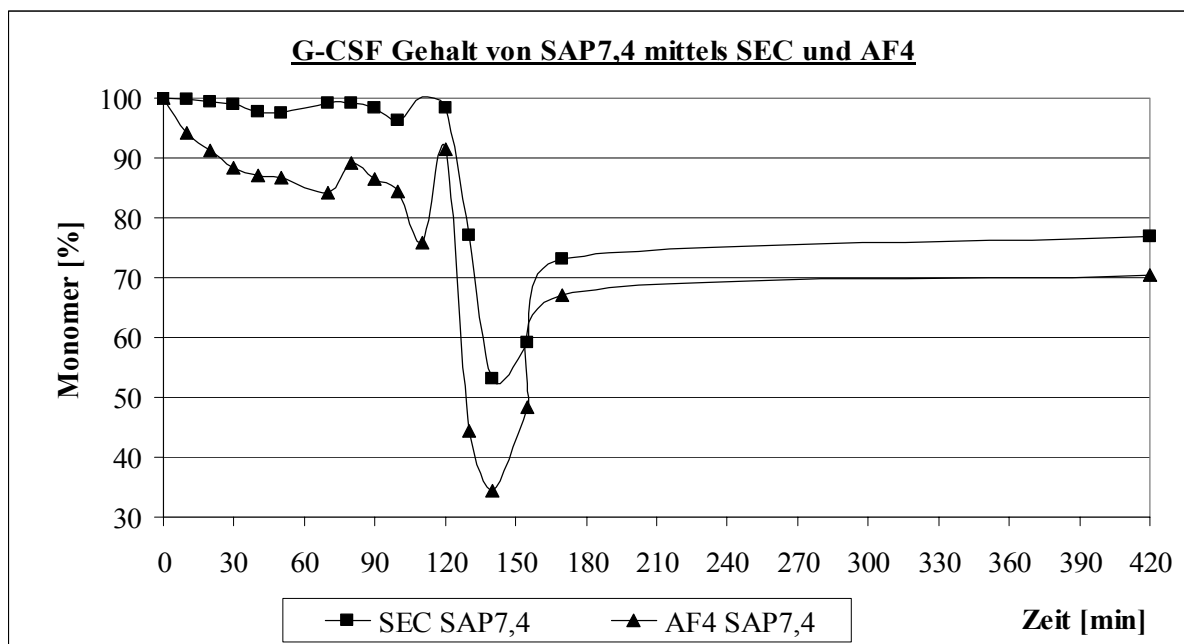


Abb. 4-11: G-CSF-Gehalt der Rez. mit pH7, 4 mittels SEC und AF4 bestimmt

Allerdings kam es bei der AF4-Analyse wie bei der SEC-Bestimmung zu einer Abnahme der Gesamtfläche bestehend aus den Flächen der Aggregat-, Dimer- und Monomer-Peaks. Der bei der SEC-Bestimmung fehlende Flächenanteil konnte nur teilweise durch die Erfassung unlöslicher Aggregate mit der AF4 erklärt werden.

Zwei Möglichkeiten, die diesen fehlenden Flächenanteil verursachen, sind denkbar.

- Zum einen besteht bei Proteinen neben der Neigung zu Aggregation immer auch die Möglichkeit zur Bildung von Fragmenten, die mit Gelelektrophorese erfasst werden können.
- Zum anderen muss trotz Tensid-Zusatz zur Rezeptur mit der Adsorption von Protein an Oberflächen gerechnet werden.

Beide Möglichkeiten können nicht nur einzeln, sondern auch kombiniert auftreten.

Der Verdacht auf Fragmente konnte mittels Gelelektrophorese bestätigt werden.

Theoretisch sollte die Erfassung des Fragmentanteils mit der SEC und AF4 möglich sein. Sofern der Fragment-Anteil gemäß der Theorie der Größenausschlusschromatographie folgt, ist mit einer Detektion zwischen Monomer-Peak und dem Ende des Laufs zu rechnen. Die verwendete Rezeptur enthielt die beiden Aminosäuren Arginin und Phenylalanin, welche bei der Detektion bei 215 bzw. 280 nm als zwei große Peaks erfasst wurden. Es bestand die Gefahr, dass es zu einer Überlagerung von Fragment- und Hilfsstoff-Peaks kommt und keine klare Aussage über den Fragmentanteil getroffen werden kann.

Bei aminosäurefreien Rezepturen wurden mit SEC-Fragment-Fractionen detektiert, die im Bereich des Arginins und Phenylalanins liegen (siehe **Abb. 2-29** und **Abb. 2-30** in 2.2.3.8.).

Lichtblockade-Ergebnisse

Von den Proben um das zu erwartende Monomer-Minimum wurde der Partikelanteil untersucht. Aus den erhaltenen Daten konnte kein Trend hinsichtlich der Partikelzahlen und der Größe abgeleitet werden. Alle Proben entsprachen der Prüfung gemäß Ph. Eur. [109].

Weitergehende Untersuchungen mit der AF4

Um Fragmentfraktionen quantitativ erfassen zu können, wurden die Trennbedingungen der AF4-Analytik an diese Fragestellung adaptiert.

- Charakterisierung der einzelnen Fraktionen

Mit der AF4 wurde versucht den Fragment-Anteil von Proben zu bestimmen.

Zur Methodenentwicklung wurde G-CSF-Bulklösung mit 0,84 mg/ml in SEC-Puffer bei 60 °C gestresst, im Abstand von 10 min Proben gezogen und das Verhältnis der Fraktionen untersucht. Die Messungen wurden je einmal mit einer 5 kDa und einer 10 kDa Membran im Trennkanal durchgeführt.

Beide Versuche lieferten das gleiche Ergebnis. In den Fraktogrammen der AF4 wurden ab einer gewissen Stressbelastung Fragmente detektiert, die bisher in der SEC nicht beobachtet werden konnten. Mit zunehmender Stressdauer stieg ihr Gehalt an.

Aufgrund der gewählten Messbedingungen konnte ab einer bestimmten Menge an Fragmenten nicht mehr eindeutig gesagt werden, ob es sich tatsächlich um die reine Fragmentfraktion handelte, oder ob eine Kombination von detektierten Fragmenten und Aggregaten vorliegt. Die Ursache dafür ist eine gerätespezifische Trennbedingung, die als „hyperlayer mode“ bezeichnet wird [158-161]. Das bedeutet, die Aggregate befinden sich allein aufgrund ihrer Größe im Bereich schneller Strömungslinien des parabolischen Eluatflusses und werden demzufolge schnellstmöglich eluiert. In diesem Zustand sind Aggregate und Fragmente via AF4 mit den benutzten Trennbedingungen kaum zu trennen. Aufgrund des geringen Molekulargewichtes und der gleichzeitig niedrigen Konzentration der Fragment-Fraktion konnten mit MALLS hinsichtlich Molekulargewichtsbestimmung keine Ergebnisse erhalten werden.

Da alle Fragmente kleiner 5 kDa durch die Membran den Trennkanal verlassen, wurden in einer weiteren Versuchsreihe die gleichen Proben mit einer 1 kDa neben einer 10 kDa Membran im Trennkanal aufgetrennt. Durch Subtraktion der mit den beiden Membranen erhaltenen detektierbaren Proteinmengen konnten 10 % – 14 % Differenz ermittelt werden. Dieser Anteil entspricht der Menge an Protein-Fragment mit einer Molekulargröße zwischen 1 kDa und 10 kDa.

Um etwaig vorhandene Fragmente, Monomer und Aggregate mit AF4 zu trennen, ist bei Protein-Analyten mit relativ geringer Molmasse (< 50 kDa) ein hoher Querfluss nötig. Der Durchflusswiderstand von Membranen steigt mit sinkender Ausschlussgrenze. Folglich weisen Membranen mit 1 kDa-Ausschlussgrenze einen höheren Durchflusswiderstand auf als Membranen mit 5 kDa- resp. 10 kDa-Ausschlussgrenzen. Durch den hohen Querfluss werden Aggregate auf die Membran gedrückt und es besteht die Tendenz zur Adsorption bzw. einer Beeinflussung der Trennbedingungen. Letztlich resultierte die gleichzeitige Fraktionierung in Aggregate und Fragmente in schlechter Reproduzierbarkeit der Messungen und wurde nicht weiter verfolgt.

- Konformationsänderung des G-CSF-Monomers in Abhängigkeit von der Stressdauer

Mit Hilfe der AF4 konnten Unterschiede im Aussehen des Monomer-Peaks in Abhängigkeit der Stressdauer detektiert werden. Die Monomer-Peaks der Proben, die länger als 60 min bei 60 °C gestresst wurden, wiesen eine an das Tailing erinnernde Form auf. Dieses Signal ist durch eine Konformationsänderung von den G-CSF-Monomeren ausgelöst worden, da sich das Signal der UV-Messung und das Lichtstreusignal zur Deckung bringen ließen. Aufgrund dieser Tatsache konnte es sich bei dem Monomer-Peak mit Tailing nicht um Dimer handeln, da Dimere aufgrund ihrer größeren Form ein intensiveres MALLS-Signal geben müssten.

Trotz aller analytischer Bemühungen und der interessanten Erkenntnisse aus den AF4 Versuchen konnte die Abnahme der Gesamtfläche in Abhängigkeit von der Trocknungs- oder Stressdauer von Proben mit der AF4 nicht vollständig aufgeklärt werden. Offensichtlich kommt es zwischenzeitlich zu geringfügigen Konformationsänderungen des G-CSF, welche sich aber im weiteren Verlauf wieder zurückbilden.

Bestimmung von adsorbiertem G-CSF an die Glaswand

Es wurden Vials, in denen G-CSF getrocknet worden war, bezüglich Adsorption von Protein an die Glaswand, wie in Kapitel 2.2.2.4. beschrieben, analysiert. Als Blindwerte wurden ebenfalls unbenutzte Vials und solche in denen Placebo-Rezeptur getrocknet worden war mit Guanidinhydrochlorid- bzw. SDS-Lösung behandelt.

Bei beiden Lösungen konnte kein Unterschied zwischen unbenutzten Vials und solchen, in denen bereits Placeborezeptur getrocknet worden war, ermittelt werden.

Mit der Guanidin-Lösung konnten 38,1 µg/ml G-CSF für die gefriergetrockneten- und 43,9 µg/ml für die vakuumgetrockneten Rezepturen bestimmt werden. Mit der SDS-Lösung konnten nur 3,8 µg/ml G-CSF aus den Gefriertrocknungs- und 16,2 µg/ml aus den Vakuumtrocknungs-Vials wieder von der Glaswand eluiert werden. Der größte Wert mit 43,9 µg/ml entspricht 12,5 % und der niedrigste Wert mit 3,8 µg/ml entspricht 1,1 % der eingesetzten Rezeptur. Diese Werte reichen allerdings nicht aus, um die beobachteten Defizite bei der Gesamtfläche zu erklären.

Die Menge an adsorbiertem G-CSF war bei beiden Lösungen für die vakuumgetrockneten Vials höher. Dies wird prozessbedingt verursacht. Bei der Gefriertrocknung steht nur die Zeit vom Einfüllen bis zum Durchfrieren der Rezeptur für Adsorptionsprozesse zur Verfügung. Bei der Vakuumtrocknung findet Adsorption solange statt, bis der trockene Zustand erreicht ist. Dieses benötigt ein Vielfaches mehr an Zeit als bei der Gefriertrocknung. Neben diesem Unterschied bei der Zeit, die für die Adsorption zur Verfügung steht, kommt bei der Vakuumtrocknung ein weiterer wichtiger Faktor zum Tragen. Das Protein liegt in einer sich immer weiteraufkonzentrierenden Matrix vor. Der Konzentrationsunterschied zwischen der Glaswand und der Matrix nimmt kontinuierlich zu und verstärkt die Adsorption ans Glas.

Es ist lange bekannt, dass Proteine an Oberflächen adsorbieren [162]. Während Calhoun et al. berichten, dass G-CSF keine, dafür aber EPO, Adsorption an PVC zeigt, bestätigen die Ergebnisse von Johnston die gefundene Adsorption von G-CSF an Glas [163,164]. In den Untersuchungen von Johnston besaß Polysorbat 20 das größte Potential die Adsorption von G-CSF zu verhindern. Warum die verwendete Menge an Polysorbat 80 nicht ausreichend wirksam die Aggregation unterdrückt, wurde nicht weiter untersucht. Die Aggregation hätte mit verschiedenen Tensiden und unterschiedlichen Tensidkonzentrationen optimiert werden können.

Fazit:

Mit Hilfe der AF4 konnten die Ergebnisse der SEC hinsichtlich des intermediären Monomer-Minimums bestätigt werden. Da bei der AF4 unlösliche Aggregate im Gegensatz zur SEC miterfasst werden können, ergab sich bei der AF4 stets ein niedrigerer prozentualer Monomer-Gehalt.

Bei der AF4 kam es, wie bei der SEC, zu einem Absinken der Gesamtflächen im Verlauf des Trocknungsprozesses.

Durch Variation der Trennbedingungen bei der AF4 konnten Fragmente in den Proben in Abhängigkeit von der Stressdauer nachgewiesen werden. Diese Tatsache bestätigte die Ergebnisse der Gelelektrophorese und ermöglichte eine Quantifizierung.

Da bei der Summe aus Aggregat, Dimer, Monomer und Fragment immer ein Absinken der Gesamtfläche errechnet werden konnte, musste ein weiterer Faktor dafür verantwortlich sein. Durch UV-Messungen konnte die Adsorption von G-CSF an die Glaswände bestätigt werden.

4.5. Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der Aggregation von G-CSF

In diesem Kapitel wird untersucht, ob ein direkter Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der reversiblen Aggregation und der Trocknungstemperatur besteht.

Dazu wurden bei 23, 30, 40 und 50 °C die Rez. SAP4 und SAP7,4 getrocknet (Tab. 4-9). Nach bestimmten Zeitabschnitten erfolgte der Probenzug für KF, DSC, SEC, Lichtblockade und Gelelektrophorese.

Trocknung bei [°C]	Dauer der Heizung, dann RT bis Ende	Gesamttrocknungsdauer [h:min]
23	23:15 bei 23 °C	23:15
30	8:15 bei 30 °C	22:00
40	3:00 bei 40 °C	20:30
50	1:52 bei 50 °C	20:30

Tab. 4-9: Übersicht über Dauer der Heizung und Gesamttrocknungsdauer

Je nach Trocknungstemperatur musste mit einer anderen Konfiguration bestehend aus dem VTS-2, der Kühlfalle und den beiden Vakuumpumpen getrocknet werden, um Siedeverzug zu vermeiden.

Die Daten zum intermediären Monomer-Minimum von der Trocknung bei 40 °C wurden im Kapitel vorher bereits dargestellt. Diese werden nun in den Kontext zu den anderen 3 Trocknungstemperaturen gestellt.

Restwassergehalte und T_g -Werte

Der RWG am Ende der Trocknung lag zwischen 1,8 und 4,6 %. Die T_g -Werte betragen zwischen 27 °C und 49 °C. Eine Korrelation zwischen den RWG- und T_g -Werten konnten nicht abgeleitet werden (Tab. 4-10).

Trocknung bei [°C]	RWG [%]		T_g [°C]	
	SAP4	SAP7,4	SAP4	SAP7,4
23	3,0	3,3	45,0	48,1
30	2,3	1,8	46,0	48,5
40	4,6	4,2	41,3	43,7
50	2,9	4,6	41,8	27,3

Tab. 4-10: RWG- und T_g -Werte

SEC-Ergebnisse

Tab. 4-11 listet den Umfang des auftretenden intermediären Monomer-Minimums bei verschiedenen Trocknungstemperaturen auf.

Trocknung bei [°C]	Ausmaß der reversiblen Aggregation	
	SAP4	SAP7,4
23	gering	gering
30	gering	vorhanden
40	gering	sehr ausgeprägt
50	irrev. >> rev. Aggregation	

Tab. 4-11: Ausmaß der reversiblen Monomer-Minima bei verschiedenen Trocknungstemperaturen

- Bei der Trocknung mit 23 °C kam es bei beiden Rezepturen nur zu einer schwachen Ausprägung eines Monomer-Minimums.
- Während bei Rez. SAP7,4 bei 30 °C Trocknung ein eindeutiges Minimum auftrat, war es bei Rez. SAP4 nur schwach erkennbar.
- Bei 40 °C Trocknung konnte für Rez. SAP4 nur ein geringes Ausmaß und bei Rez. SAP7,4 ein sehr ausgeprägtes Absinken des Monomer-Gehalts bestimmt werden.
- Die Auswertung der Proben der 50 °C Trocknung gestaltete sich schwierig. Bis auf die erste Probe bei Rez. SAP7,4 konnten alle anderen nur noch zu getrübbten Lösungen rekonstituiert werden. Ab dem Probezug von 70 min zeigten die Proben der Rez. SAP4 das gleiche Verhalten. Bei beiden Rezepturen überlagerte die auftretende, irreversible Aggregation ein mögliches Monomer-Minimum.

Auf der nächsten Seite sind die Diagramme mit den prozentualen Aggregat-, Dimer- und Monomer-Gehalten von beiden Rezepturen abgebildet (**Abb. 4-12** bis **Abb. 4-17**). Eine Ellipse in den Abbildungen markiert den Bereich in dem reversible Aggregation auftrat.

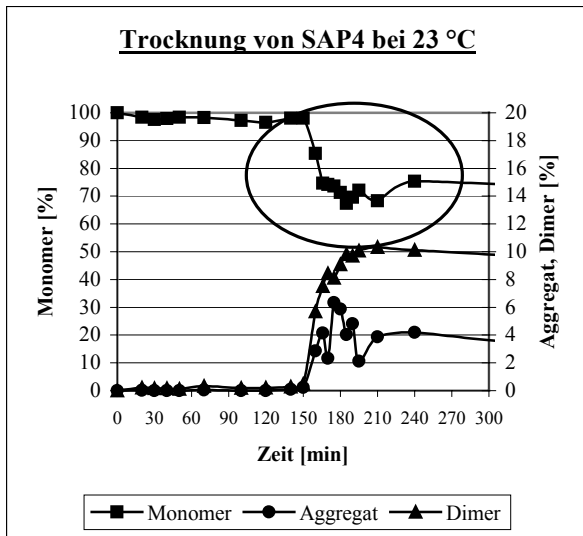


Abb. 4-12: Trocknung von Rez. SAP4 bei 23 °C

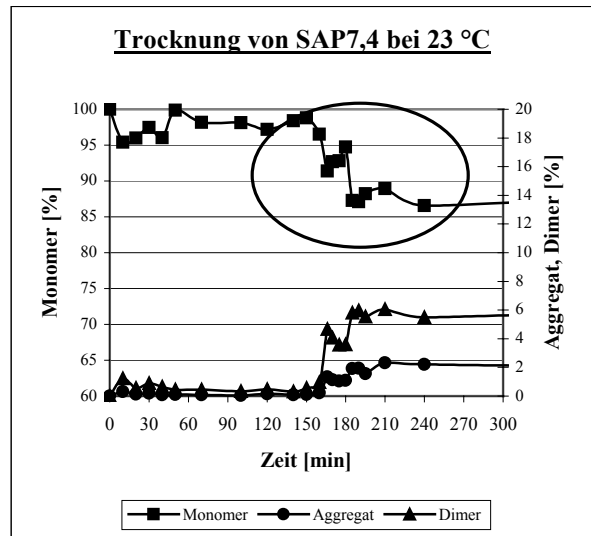


Abb. 4-13: Trocknung von Rez. SAP7,4 bei 23 °C

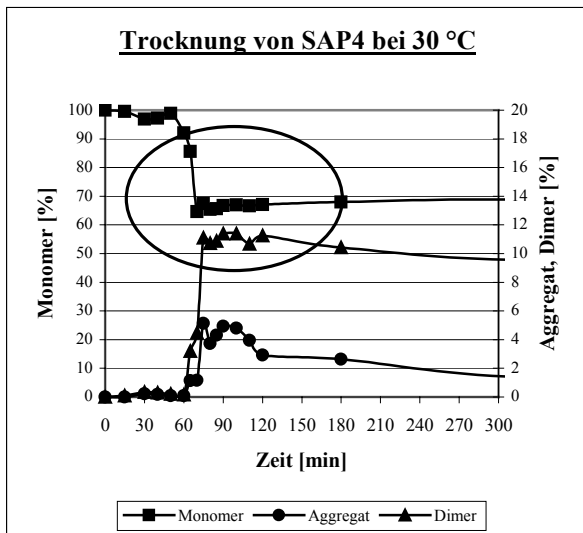


Abb. 4-14: Trocknung von Rez. SAP4 bei 30 °C

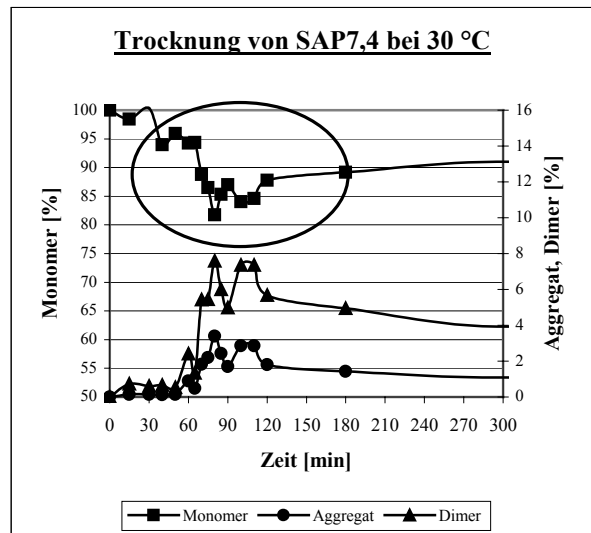


Abb. 4-15: Trocknung von Rez. SAP7,4 bei 30 °C

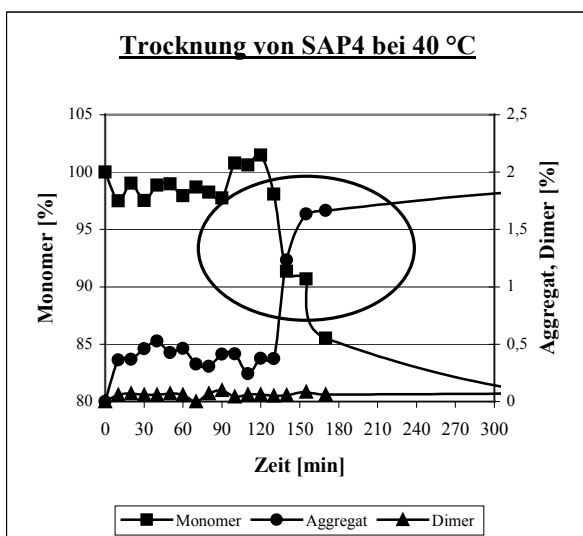


Abb. 4-16: Trocknung von Rez. SAP4 bei 40 °C

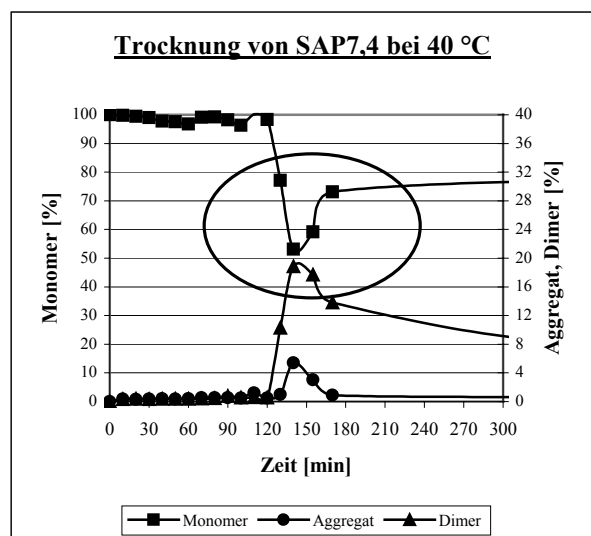


Abb. 4-17: Trocknung von Rez. SAP7,4 bei 40 °C

Anhand der SEC-Daten konnte bei Rez. SAP7,4 eine Abhängigkeit der reversiblen Aggregation von der Trocknungstemperatur belegt werden (Tab. 4-11). Bei Rez. SAP4 wurde kein ausgeprägtes Monomer-Minimum beobachtet, oder es kam zu einer Überlagerung der reversiblen Aggregation durch die irreversible Aggregation. Zur Stützung dieser Aussage wurden von ausgewählten Proben die Partikelgehalte bestimmt.

Lichtblockade-Ergebnisse

Bei der 50 °C Trocknung zeigten alle Proben nach spätestens 20 min SAP7,4 bzw. 70 min SAP4 eine starke Trübung oder wiesen ausgeflocktes Protein auf. Alle Proben der anderen Trocknungstemperaturen entsprachen den Anforderungen des Ph. Eur [109].

Bei keiner der Messreihen konnte eine direkte Abhängigkeit zwischen der Partikelzahl und dem Monomer-Gehalt festgestellt werden. Die Lichtblockade-Messungen leisteten keine Hilfeleistung bei der Aufklärung der reversiblen Aggregation.

Fazit:

Die SEC-Ergebnisse ließen eine Aussage über eine Abhängigkeit von der Temperatur zu. Bei Rez. SAP4 konnte nur eine geringe Abhängigkeit festgestellt werden, während bei Rez. SAP7,4 eine Beziehung zwischen dem Ausmaß der reversiblen Aggregation und der Trocknungstemperatur bestand. Allerdings erstreckte sich diese Abhängigkeit nur über einen Temperaturbereich von 23 °C bis 40 °C. Bei höheren Temperaturen kam es zu einer Überlagerung der reversiblen Aggregation durch die thermisch kontrollierte irreversible Aggregation.

Zusammenfassung der Ergebnisse des reversiblen Aggregations-Verhaltens von G-CSF

Es lässt sich zusammenfassen, dass die reversible Aggregation durch SEC, AF4 und Gelelektrophorese bestätigt werden konnte.

Pestrelski und Mitarbeiter wiesen an G-CSF dehydratations-induzierte Veränderungen der Konformation nach und folgerten aus ihren Daten, dass es sich dabei aber um reversible Veränderungen handelte [165]. Weitere Arbeitsgruppen konnten auf andere Art nachweisen, dass es zu keiner bzw. nur teilweise lokaler Konformationsänderung beim G-CSF kommt [43,166,167]. Ein Hinweis für derartige geringfügige Konformationsänderungen konnten zum Teil bei Fraktogrammen der AF4 beobachtet werden. Sie wurden in Kapitel 4.4. beschrieben.

Die Lyophilisation von G-CSF ohne Stabilisator- oder Hilfsstoff-Zusätze führte bei Bae zu einem Monomer-Verlust von 80 %, wohingegen durch den Zusatz von Mannit und Polysorbat 80 keine Abnahme des Gehalts zu messen war [168]. G-CSF-Lösung des unglykosilierten G-CSF ist bei pH 4 stabil, während erhöhte Temperaturen und pH-Werte von 7-8 sehr schnell zur Aggregation führen [42,45,132].

Die Aminosäure Cystein in Position 17 ist bei unglykosiliertem und glykosyliertem G-CSF teilweise dem umgebenden Lösungsmedium ausgesetzt. Im Säuren liegt das Cystein protoniert vor und beide G-CSF-Varianten besitzen im sauren Milieu eine hohe Stabilität. Im Gegensatz dazu weisen beide G-CSF-Formen im neutralen Milieu eine hohe Instabilität auf. Durch den Austausch des Cysteins durch die Aminosäure Serin konnte belegt werden, dass das Cystein eine große Rolle bei der Instabilität im Neutralen spielt. Die Serin-Variante des G-CSF ist auch im Neutralen sehr stabil [43].

Hasegawa beschreibt ein thermodynamisches Modell über die unterschiedliche Instabilität von unglykosiliertem und glykosiliertem G-CSF. Es wird angenommen, dass die Denaturierung über eine ionische Zwischenstufe verläuft. Die Zuckerkette des glykosilierten G-CSF kann zwar die Ausbildung der ionischen Zwischenstufe genauso wenig wie die zuckerfreie G-CSF-Form verhindern, aber die nachfolgende Denaturierung verläuft beim glykosilierten G-CSF 10-fach langsamer. Die ionische Thiol-Gruppe ist sehr reaktiv für Oxidationen. Es wird vermutet, dass durch sterische Hinderung der Zuckerkette des glykosilierten G-CSF der Angriff von freien Radikalen an der deprotonierten Thiol-Gruppe behindert werden kann. Es wird weiterhin angenommen, dass dies den Unterschied in der Reaktionsgeschwindigkeit der G-CSF-Formen verursacht [169].

Die Verwendung eines HEPES-Puffers (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure) ermöglichte Kasraian die in vivo Aktivität von bovinem G-CSF bei neutralem pH bei 40 °C zu verlängern. Als Stabilisierungsmechanismus werden elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem zwitterionischen Puffer und geladenen Regionen der Proteinoberfläche angenommen [170].

Bartkowski et al. untersuchten bei 50 °C die Aggregation von G-CSF in Abhängigkeit vom pH der Lösung. Bei pH 2,9 bildeten sich nicht-kovalente lösliche Aggregate. Ab einem pH von 4 bis 6,2 entstand eine Mischung aus nicht-kovalenten und kovalenten Aggregaten, wobei der Anteil der kovalenten Aggregate parallel zum Ansteigen des pH-Wertes zunahm. Durch Gelelektrophorese konnte aufgeklärt werden, dass die kovalenten Aggregate durch intermolekulare Disulfidbrücken gebildet wurden [155].

Entfaltete Monomere können sich irreversibel zu Dimeren zusammenlagern oder sich an bestehende Aggregate anlagern. Diese Aggregation ist ein kinetisch kontrollierter Prozess. Saccharose inhibiert die Aggregation von G-CSF durch den Mechanismus der preferential exclusion. Durch Saccharose wird der Anteil an aufgefalteter oder teilweise entfalteter Monomerspezies zurückgedrängt, da aufgrund der Theorie der preferential exclusion der native, kompakte Zustand thermodynamisch begünstigt wird. Unter physiologischen Bedingungen bildet natives, monomeres G-CSF reversibel Dimere aus, die nicht an dem Prozess der irreversiblen Reaktion beteiligt sind [45][171]. Neben der thermodynamischen Triebkraft, die auf einem Gleichgewichtsprozess beruht, gibt es den alternativen Weg, der einen kinetisch kontrollierten Prozess darstellt.

Das in den Versuchen der Kapitel 4.1. bis 4.5. beobachtete Absinken des Monomer-Gehalts ging stets mit dem steilen Anstieg des Dimer-Gehalts einher. Durch die weitere Trocknung der Probe nahm der Anteil des nativen Monomers wieder zu und der Anteil des reversibel entstandenen Dimers wieder ab. Besonders klar ist dieser Vorgang in Abb. 4-9 und Abb. 4-17 zu erkennen. Die Ergebnisse der SEC, AF4 und Gelelektrophorese sind damit mittels der Stabilisierung durch preferential exclusion von Saccharose schlüssig erklärbar und stimmen mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein. Da es im Bereich des Monomer-Minimums zur verstärkten Ausbildung von Dimeren kam, wird nun klar, dass die Lichtblockade mit einem Messbereich von größer 1 µm bis 200 µm für Partikel kein geeignetes Verfahren zur Untersuchung der reversiblen Aggregation darstellte. Erst durch irreversible Prozesse gebildete Partikel konnten erfasst werden.

Das trotz der reversiblen Bildung von Dimer-Spezies nicht der eingesetzte Monomer-Gehalt wieder erreicht werden konnte, lässt sich durch die parallel auftretende irreversible Aggregation erklären. Wie bereits früher dargestellt, tritt irreversible Aggregation in Abhängigkeit von der Trocknungstemperatur und der Dauer des Aufenthalts im rubber-Zustand auf.

Bei den beiden 40 °C Trocknungs-Versuchen in Kapitel 4.3. und 4.4. war die reversible Aggregation des Monomers bei Rez. SAP7,4 sehr viel stärker als bei SAP4 ausgeprägt (**Abb. 4-8**, **Abb. 4-10** und **Abb. 4-11**). Eine These für dieses Verhalten kann sein, dass bei der sauren Formulierung die Aminosäure Cystein in Position 17 protoniert vorliegt und offensichtlich dadurch die Bildung des Dimers inhibiert wird.

Bei der neutralen Rezeptur kam es zu einem starken Absinken des Monomer-Gehalts und einer starke Zunahme von Dimeren, wie in Abb. 4-9 erkennbar.

In Kapitel 4.5. wurde die Abhängigkeit des Aggregations-Verhaltens von der Temperatur mit diesen beiden Rezepturen untersucht. Nur die 40 °C Trocknung folgt der gerade aufgestellten These. Bei der 23 °C und 30 °C Trocknung sank der Monomergehalt der Rez. SAP4 stets weiter ab als bei SAP7,4. Das Ausmaß des gebildeten Dimers und Aggregats war bei Rez. SAP4 ebenfalls größer als bei SAP7,4. Damit besitzt die aufgestellte These nur eine eingeschränkte Gültigkeit. Offensichtlich beeinflussen weitere Faktoren das Aggregations-Verhalten bei 23 °C und 30 °C Trocknungstemperatur.

4.6. Stabilitätsuntersuchung von getrockneten und flüssigen G-CSF-Proben

Um weitere Erkenntnisse über das Aggregations-Verhalten von G-CSF zu erhalten, wurden Proben, die während der Aufkonzentrierungsphase und am Trocknungs-Ende gezogen wurden, bei verschiedenen Temperaturen eingelagert. Diese Daten wurden mit Ergebnissen von flüssig gelagerten Rezepturen in Beziehung gesetzt. Die Untersuchung der flüssigen, aufkonzentrierten und getrockneten Proben erfolgte mittels Lichtblockade und SEC.

Durch diese Versuche sollte die Stabilität des G-CSF in den unterschiedlichen Zubereitungsformen bzw. Trocknungsstadien untersucht werden. Die aufkonzentrierten Proben sollten Proben aus dem Bereich des Monomer-Minimums simulieren.

In zwei getrennten Prozessen wurden mit 0,5 ml Rez. SAP4 und SAP7,4 befüllte 2R-Vials bei 40 °C mit der GT-Anlage Alpha vakuumgetrocknet. Nach 26 min Aufkonzentrierung mit der Membranvakuumpumpe erfolgte der Probezug der aufkonzentrierten Proben. Nach einer Gesamttrocknungsdauer von 40,25 h (SAP4) bzw. 45,5 h (SAP7,4) wurden die Proben vom Trocknungs-Ende gezogen. Die Proben von beiden Probezügen lagerten bei 4, 22, 30 und 40 °C.

Wasserverluste, Restwassergehalte und T_g -Werte

Die Wasserverlust-Daten wurden benutzt, um eine Aussage über den RWG und den Feststoffanteil der aufkonzentrierten Proben zu treffen. Bei beiden Rezepturen kam es zu einem durchschnittlichen WV von ca. 74 % – 76 %, was umgerechnet einem Feststoffanteil von ca. 27 % entspricht. Alle RWG der getrockneten Proben lagen kleiner 1 %. Bei Rez. SAP4 konnte ein mittlerer T_g von ca. 56 °C und für Rez. SAP7,4 ein T_g von 64 °C ermittelt werden.

SEC-Ergebnisse der Rez. SAP4 aufkonzentriert- bzw. getrocknet

Bei den Proben im rubber-Zustand trat in Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur innerhalb von 2 Wochen starke irreversible Aggregation auf (Abb. 4-18). Hingegen verzeichneten die getrockneten Proben innerhalb von 7 Wochen maximal 5 % Monomer-Verlust (Abb. 4-19).

Nach 17,5 h 40 °C Lagerung konnten für aufkonzentrierte Proben nur 18 % Monomer nachgewiesen werden. Bei 30 °C Lagerung wurden nach 40,5 h nur noch 33 % und bei 22 °C nach 13 Tagen 48 % Monomer detektiert. Die Lagerung im Kühlschrank reduzierte den Protein-Verlust und ergab nach 13 Tagen einen Monomer-Gehalt von 93 % (Abb. 4-18).

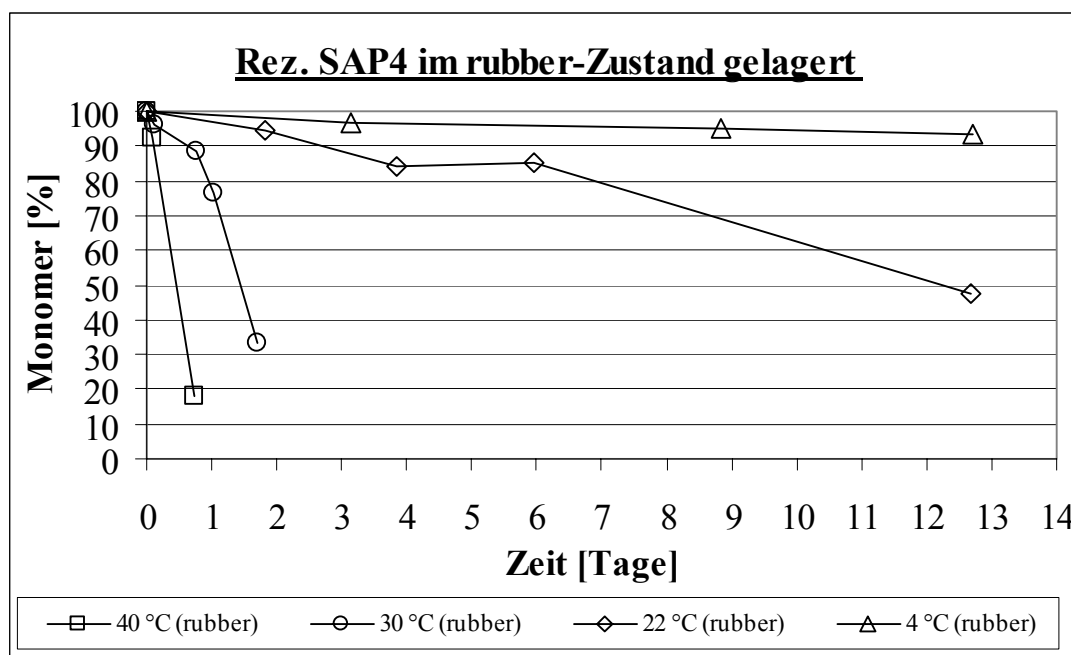


Abb. 4-18: Proben vom rubber-Zustand der Rez. SAP4

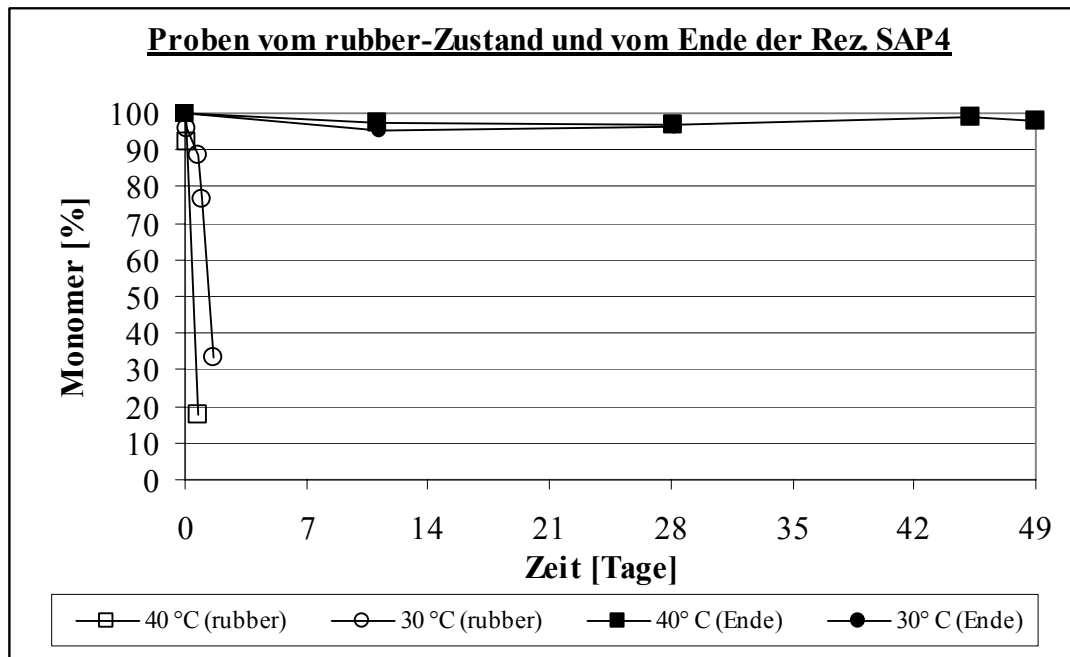


Abb. 4-19: Proben vom rubber-Zustand und vom Trocknungs-Ende der Rez. SAP4

In Abb. 4-19 wird der große Stabilitäts-Unterschied zwischen den aufkonzentrierten und getrockneten Proben während der 40 bzw. 30 °C Lagerung deutlich. Innerhalb von 2 Tagen aggregierten die aufkonzentrierten Proben, wohingegen die getrockneten Proben bei gleichen Lagertemperaturen stabil blieben und nur einen geringen Monomer-Verlust aufwiesen.

Ausführliche Erklärung der Vorgänge während der Vakuumtrocknung

Zu Beginn der Vakuumtrocknung liegt das G-CSF vollkommen hydratisiert in der wässrigen Lösung vor. Die Proteinmoleküle sind an ihrer Oberfläche von Wasser in Form einer Hydratations-Hülle umgeben. Für diese Hülle werden ca. 0,3 bis 0,35 g Wasser pro g Protein benötigt [172]. Während der Trocknung wird diese Schutzhülle um das Protein bis zu einem Restwassergehalt von ca. 3 % bis 5 % der trockenen Probe entfernt [73,138]. Durch diese grundlegende Veränderung der Umgebung des Proteins kann es zu Störung des nativen Zustands und darausfolgend zu Denaturierung kommen.

Der native Zustand, in dem globuläre Proteine einen gefalteten Aufbau besitzen, befindet sich im reversiblen Gleichgewicht mit dem denaturierten Zustand, in dem sie im entfalteten Zustand vorliegen. Durch irreversible Reaktion bilden sich aus dem entfalteten Zustand Aggregate. Die Gibbs-Helmholtz-Gleichung beschreibt den energetischen Zusammenhang zwischen den gefalteten und entfalteten Zuständen des Proteins. Die gefaltete Form ist nur um 5 bis 20 kcal/mol stabiler, als der entfaltete Zustand [173].

Aufgrund der allgemein niedrigen Stabilität in wässriger Umgebung wird versucht Proteine durch Zusatz von Hilfsstoffen gegen Abbaureaktionen zu stabilisieren. Angewandt werden zu diesem Zweck Zucker und Zuckeralkohole, Aminosäuren, Polymere u.v.m.. Die stabilisierende Wirkung der genannten Hilfsstoffe kommt durch den Mechanismus der Preferential Interaction zustande. Dabei wird die Destabilisierung des denaturierenden Zustands ausgenutzt. Wie in der Einleitung dargestellt, wird der Hilfsstoff aus energetischen Gründen von der Proteinoberfläche bevorzugt ausgeschlossen (preferential exclusion) und das Protein dadurch auf thermodynamische Weise stabilisiert. Ein weiterer Gesichtspunkt ist die Beeinflussung der Oberflächenspannung durch den Hilfsstoff [89,174,175].

Zu Beginn der Trocknung wird das Protein durch preferential exclusion stabilisiert. Durch die Trocknung konnte die G-CSF-Konzentration von anfänglich eingesetzten 0,35 mg/ml auf 1,1 mg/ml in den aufkonzentrierten Proben erhöht werden. Diese Konzentration liegt weit oberhalb der von Ruddon beschriebenen Konzentration von 0,02 mg/ml, unterhalb deren es nicht zu Aggregation kommen soll [176]. Die von Fields aufgestellte Theorie besagt, dass ab einer ausreichend hohen Protein-Konzentration Aggregation auftreten wird [177]. In der Literatur wird an vielen Stellen von konzentrationsbedingter Aggregation berichtet [176,178]. Die von Ruddon angegebene Proteinkonzentration kann nur als Richtgröße verstanden werden und muss für jedes Protein individuell in Abhängigkeit des stabilisierenden Mediums untersucht werden. Der eingesetzte G-CSF-Bulk besaß eine Konzentration von 4,2 mg/ml und zeigte eine geeignete Stabilität.

Je weiter die Trocknung fortschreitet, desto wahrscheinlicher wird das Auftreten von Aggregaten bei erhöhter Trocknungstemperatur durch die Dehydratisierung der Umgebung des Proteins.

Spätestens ab einem Verhältnis von 1:1 zwischen Wasser und Feststoff lässt sich eine bevorzugte Hydratisierung des Proteins durch preferential exclusion nicht mehr erklären.

Im hochkonzentrierten Zustand verliert die Stabilisierung durch preferential exclusion ihre Wirkung und andere Stabilisierungsmechanismen kommen zum Tragen. Dies ist zum einen die Immobilisierung im amorphen glasartigen Zustand und zum anderen die von Crowe und Carpenter beschriebene „water replacement theory“ [99,152,179].

Aufgrund der Aufkonzentrierung der Lösung kommt es zur Übersättigung des Hilfsstoffes durch die angestiegene Viskosität. In einem so hochkonzentrierten Zustand besitzen die Proben eine weiche Konsistenz. Durch den Aufkonzentrierungsprozess wurde noch nicht genügend Wasser entfernt, um den stabilen glasartigen Zustand zu erreichen. Bei der vorliegenden Viskosität liegen die G-CSF-Monomere nicht immobilisiert vor. Es besteht aufgrund ihrer Beweglichkeit in der Matrix die Möglichkeit zu physikalischen und/oder chemischen Abbaureaktionen [180]. Wie in Abb. 4-18 und Abb. 4-19 gezeigt, verursacht der rubber-Zustand die große Instabilität der aufkonzentrierten Proben.

Nach weiterer Wasserentfernung kommt es zu einem starken Anstieg der Viskosität und die Probe erstarrt im amorphen, glasartigen Zustand [73]. Im Unterschied zu einem geordneten kristallinen Gerüst besitzt der ungeordnete amorphe Zustand eine stabilisierende Wirkung [15,77]. Bei kristallinen Hilfsstoffgerüsten liegen die einzelnen Phasen nebeneinander vor und eine Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen den Hilfsstoff- und Protein-Molekülen ist unmöglich. Dieser Stabilisierungsansatz leitet über zur Theorie des water replacements durch die Hilfsstoffe [99,152,179]. Am Ende der Trocknung werden die Wassermoleküle an der Proteinoberfläche gegen Hilfsstoffe ausgetauscht. Die Hilfsstoffe übernehmen die Aufgabe des Wassers, erhalten den nativen Zustand und bewahren das Protein vor Abbaureaktionen [13,174]. Auf diese Weise werden intra- oder intermolekulare Verbindungen zwischen den Proteinmolekülen verhindert [181], die zu Denaturierung führen können. Durch IR-Spektroskopie-Studien kann belegt werden, dass es zu Wasserstoffbrückenbindungen kommt [182,183].

Durch Bestimmung der Glasübergangstemperatur T_g mittels DSC-Messung kann der amorphe Zustand der Proben charakterisiert werden. Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen dem Wassergehalt und dem T_g . Wasser fungiert als Weichmacher der glasartigen Formulierungen [73,184]. Als generelle Regel kann angesehen werden, dass die Stabilität einer Formulierung um so größer ist, je höher der T_g -Wert ist. Franks empfiehlt einen T_g von mindestens 40 °C für lagerstabile Formulierungen [73]. Die zur Stabilisierung eingesetzten Hilfsstoffe besitzen neben der Ausbildung einer amorphen Matrix den Nebeneffekt, dass es gleichzeitig zur Erhöhung des T_g -Wertes im Vergleich zur hilfsstofffreien Formulierung kommt. Dies führt zudem zu einer Erhöhung der Stabilität der getrockneten Proben [95].

Mit dem Ende des Trocknungsprozesses ist jedoch keine vollständige Stabilisierung der getrockneten Proben erreicht. Auch im trockenen Zustand können Abbaureaktionen stattfinden. Mit dem Verschließen der Vials beginnt sich ein Feuchtigkeits-Gleichgewicht zwischen der getrockneten Probe und dem darüber liegenden Gasraum einzustellen. In Abhängigkeit von der erzielten Restfeuchte und der Beschaffenheit der Stopfen kann es zu einer Wiederaufnahme von geringen Mengen an Wasser durch Adsorption kommen. Aufgrund der Eigenschaft des Wassers als Weichmacher fungieren zu können, sinkt der T_g um 10 °C oder mehr pro Prozent aufgenommenes Wasser [20]. Ausgehend vom trockenen stabilen Zustand reichen wenige Prozent wieder aufgenommenes Wasser aus, um die Probe wieder in einen rubber-ähnlichen Zustand zu versetzen. Dort kommt es zu größerer Mobilität der Wasser- und Proteinmoleküle und ermöglicht ungewollte chemische und physikalische Abbaureaktionen [92].

Das zuletzt beschriebene Phänomen der unfreiwilligen Rückbefeuchtung kann experimentell bewusst ausgenutzt werden, um die Stabilität einer Rezeptur auf diesen unausweichlichen Faktor während der Lagerung zu überprüfen. Die sogenannte „moisture induced aggregation“ wird im nächsten Kapitel anhand von Lagerung getrockneter Proben bei hohen relativen Feuchten untersucht [104,147].

SEC-Ergebnisse der Rez. SAP7,4 aufkonzentriert- bzw. getrocknet

Die Proben im rubber-Zustand zeigten eine sehr geringe Stabilität. Innerhalb von 2,5 h sank der Monomer-Gehalt der 40 °C Proben auf 73 % ab. Für die bei 30 °C und 20 °C gelagerten Proben resultierte nach 55 Stunden jeweils ein Monomer-Gehalt von 13 %. Nach 6 Tagen Kühlschrank-Lagerung konnten noch 47 % Monomer detektiert werden (Abb. 4-20).

Die SAP7,4-Proben zeigten im rubber-Zustand im Vergleich mit denen der Rez. SAP4 eine sehr viel geringere Stabilität (Abb. 4-19, Abb. 4-20).

Bei den getrockneten Proben der Rez. SAP7,4 konnten während des Zeitraums von 12 Wochen stets Monomer-Gehalte größer 90 % ermittelt werden (Abb. 4-21). Aufgrund der großen Instabilität der aufkonzentrierten Proben, mussten die 20 °C bzw. 4 °C gelagerten Proben zum Vergleich zwischen aufkonzentrierten und getrockneten Proben ausgewählt werden, um den Verlauf der Kurven erkennen zu können (Abb. 4-21).

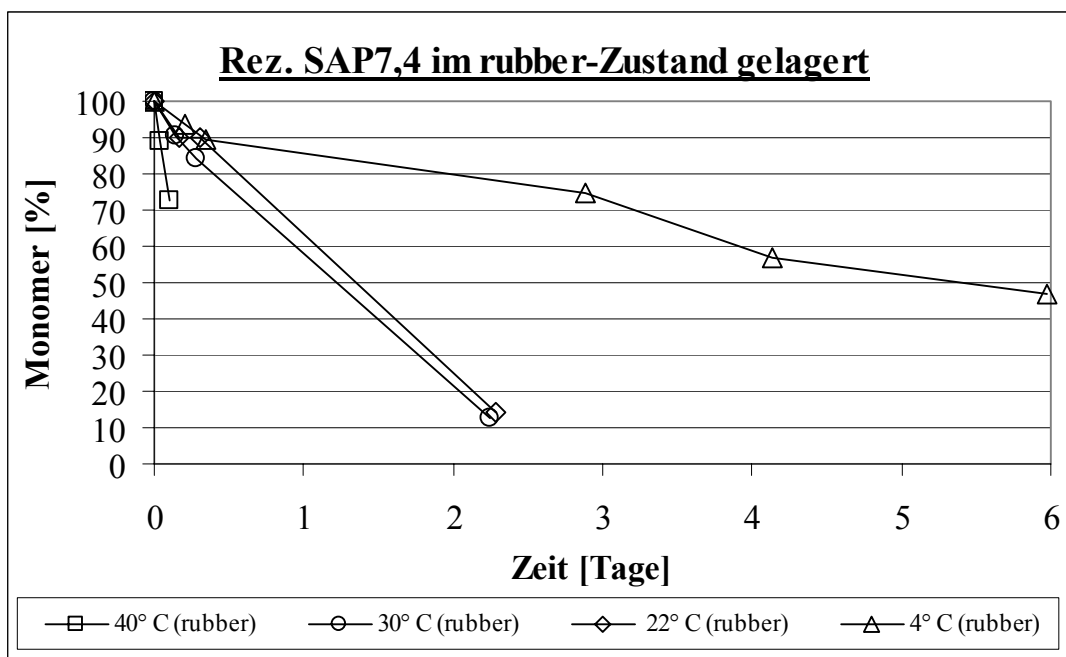


Abb. 4-20: Proben vom rubber-Zustand der Rez. SAP7,4

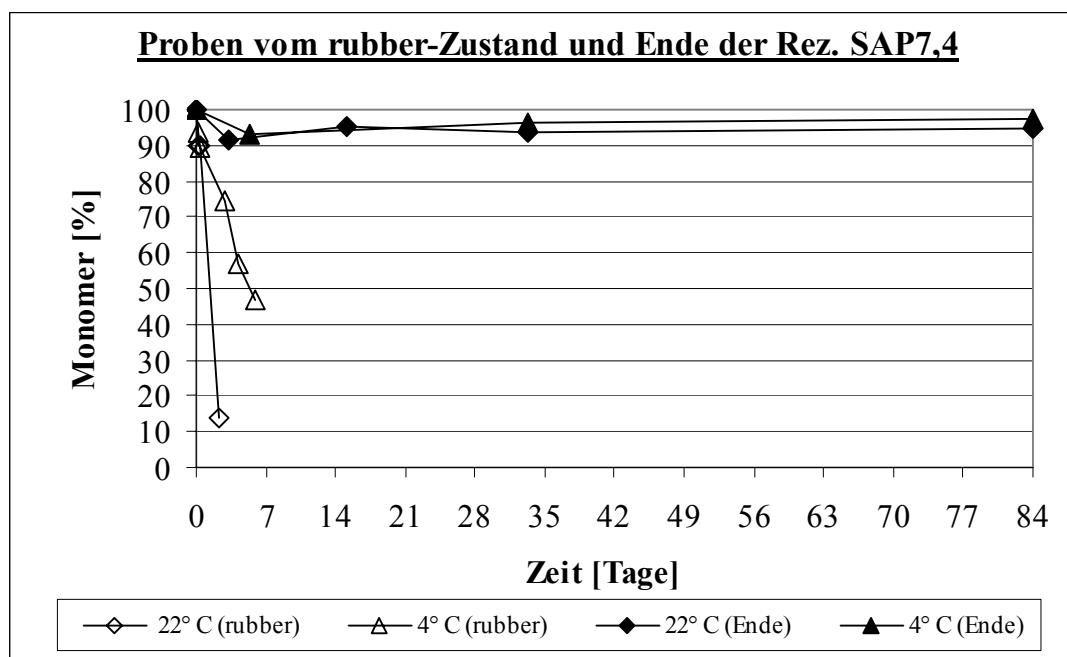


Abb. 4-21: Vergleich der Proben vom rubber-Zustand und vom Trocknungs-Ende der Rez. SAP7,4

Lichtblockade-Ergebnisse der aufkonzentrierten-/getrockneten Proben der beiden Rezepturen

Alle Ergebnisse entsprachen den Anforderungen des Ph. Eur. [109]. Aus den Partikelzahlen der Rez. SAP4 ließ sich keine Tendenz ableiten.

Bei den Proben aus dem rubber-Zustand der Rez. SAP7,4 konnte ein Anstieg der Partikelzahlen für kleine Partikel im Bereich von 1 bis 2,9 μm in Abhängigkeit von der Lagerdauer beobachtet werden. Dies wies auf einen direkten Zusammenhang zwischen Lagerung und Aggregation hin.

Lagerung von Flüssig-Proben

Aufgrund der Tatsache, dass Proteine in flüssigen Zubereitungen nur eine geringe Stabilität aufweisen, werden die Formulierungen üblicherweise einer Gefrier-, Vakuum- oder Sprühtrocknung unterworfen, um stabile Lagerformen zu gewinnen [35,38,185,186].

Anhand der gelagerten Proben konnte gezeigt werden, dass besonders hohe Instabilität bei den aufkonzentrierten, feuchten Proben besteht.

Wie stabil oder instabil sich G-CSF in flüssigen Zubereitungen verhält, wurde nachfolgend durch die Lagerung von flüssigen Proben untersucht. Mit dieser Vorgehensweise sollte der Unterschied zwischen flüssig und aufkonzentriert gelagerten Proben überprüft werden. Da das verwendete G-CSF als optimierte flüssige Zubereitung als zugelassenes Handelsprodukt existiert und aus der Literatur die hohe Stabilität bei pH 4 bekannt ist [27,43,132,187], war zu erwarten, dass die rubber-Proben eine geringere Stabilität als die flüssigen Proben aufweisen sollten.

Frisch hergestellte Rezeptur wurde in Vials eingefüllt, diese bei 4 °C, 22 °C, 40 °C, und 50 °C gelagert und als Analytik Lichtblockade und SEC benutzt.

• Lichtblockade-Ergebnisse der beiden flüssigen Rezepturen

Mit Ausnahme der 50 °C gelagerten Proben entsprachen alle anderen der Prüfung auf nicht sichtbare Partikel des Ph. Eur. [109]. Ab einer Lagerdauer von 12 h konnte in 50 °C gelagerten Proben der Rez. SAP4 Trübung und später auch ausgeflocktes Protein beobachtet werden. Die anderen SAP4-Proben zeigten keine visuell bestimmbare Trübung.

Nur bei den 50 °C gelagerten Proben war eine stetige Zunahme der Partikelzahlen in allen Größenbereichen zu verzeichnen.

Bereits nach einer Lagerdauer von 30 min bei 50 °C konnte in den Proben der Rez. SAP7,4 eine Trübung erkannt werden. Ab 12 h Lagerung zeigten auch die 40 °C gelagerten Proben eine Trübung. Die anderen Proben wiesen keine visuell erkennbare Trübung auf. Alle Proben entsprachen der Prüfung auf nichtsichtbare Partikel des Ph. Eur. [109]. Eine stetige Zunahme der Partikelzahlen konnte bei den bei 40 °C und 50 °C gelagerten Proben festgestellt werden.

- SEC-Ergebnisse der Rez. SAP4 flüssig

Es konnte bei 4 °C und 22 °C Lagerung kein Monomer-Verlust bestimmt werden, d.h. bei pH 4 war die SAP-Lösung stabil (**Abb. 4-22**). Nach 4 Tagen 50 °C Lagerung blieb ein Monomer-Gehalt von 22 % übrig. Bei 40 °C Lagerung kam es innerhalb von 28 Tage zu einem Absinken des Monomer-Gehalts um 20 %.

G-CSF liegt im Handelsprodukt Neupogen in einer 5 % igen Mannitol-Lösung mit pH 4 vor und ist mehr als 2 Jahre bei Kühlschrank-Lagerung stabil [132].

Die Rez. SAP4 ist ebenfalls fähig bei geeigneten Temperaturen das Protein im flüssigen Zustand zu stabilisieren.

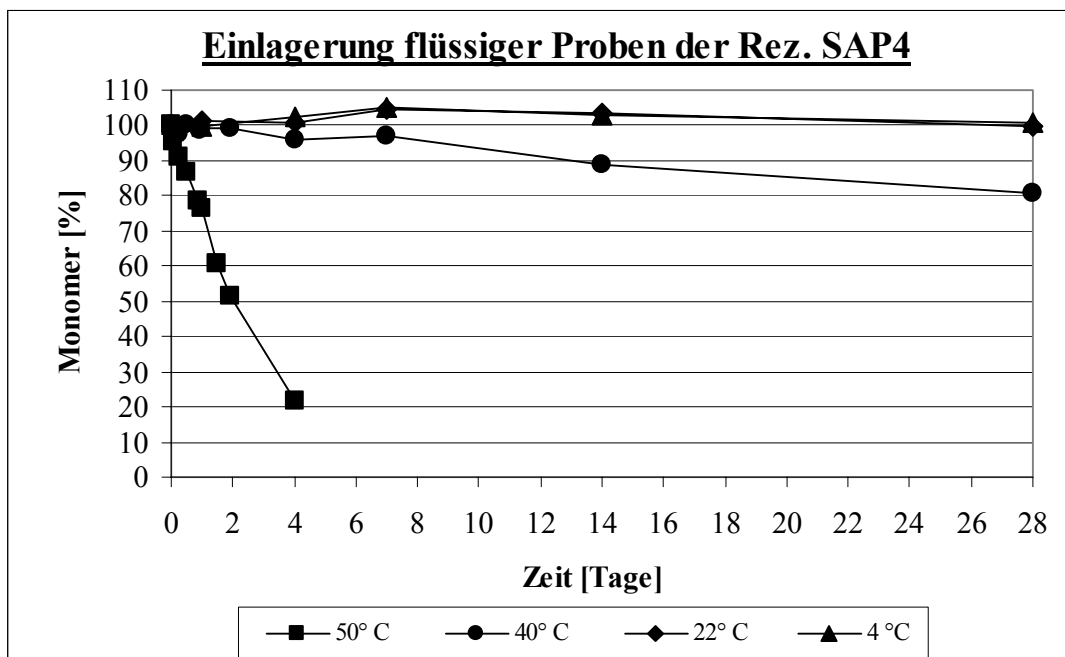


Abb. 4-22: SEC-Ergebnisse der Einlagerung von flüssigen Proben der Rez. SAP4

- SEC-Ergebnisse der Rez. SAP7,4 flüssig

Innerhalb von einer halben Stunde konnte bei 50 °C Lagerung bei Trübung bzw. ausgeflocktes Protein beobachtet werden (**Abb. 4-23**). Nach 28 Tagen 30 °C Lagerung waren mit 56 % über die Hälfte des Proteins abgebaut worden. Bei der 22 °C gelagerten Probe waren noch 88 % Monomer vorhanden.

Nur die im Kühlschrank gelagerte Probe der Rez. SAP7,4 konnte äquivalente Stabilitätsergebnisse liefern, wie die bei 22 °C und 4 °C gelagerten Proben der Rez. SAP4.

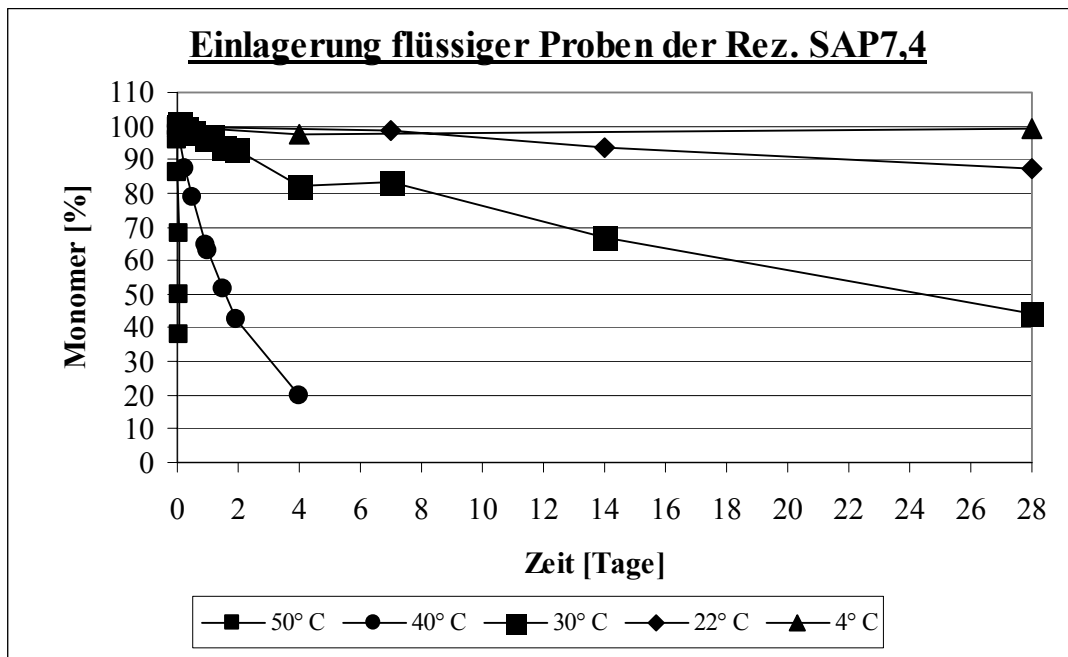


Abb. 4-23: SEC-Ergebnisse der Einlagerung von flüssigen Proben der Rez. SAP7,4

Vergleich gelagerter Proben mit schneller Aggregation

In Abb. 4-24 sind verschiedene Proben mit schnellem Aggregations-Verhalten überlagert dargestellt. Aus dieser Abbildung kann die unterschiedliche Kinetik abgelesen werden, wie schnell es zur Aggregation kam.

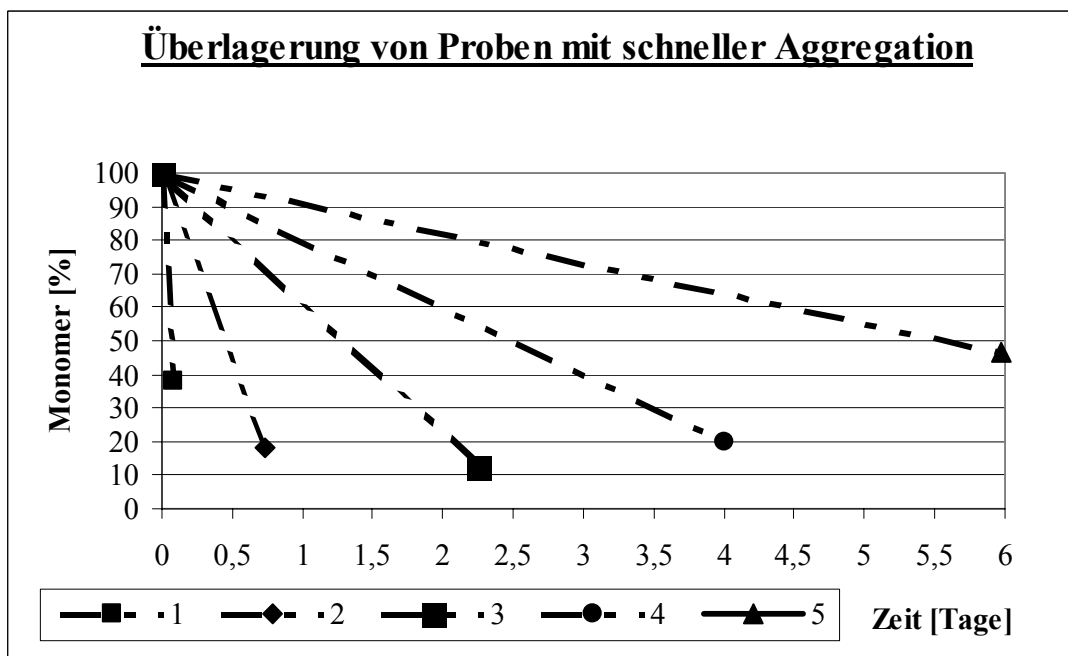


Abb. 4-24: Überlagerung der Proben, die schnelle Aggregation zeigen

- 1 50 °C flüssig SAP7,4 und 40 °C rubber SAP7,4
- ◆— 2 40 °C rubber SAP4
- 3 30 °C rubber SAP7,4 und 22 °C rubber SAP7,4 und 30 °C rubber SAP4
- 4 50 °C flüssig SAP4 und 40 °C flüssig SAP7,4
- ▲— 5 4 °C rubber SAP7,4

Die zuvor aufgestellte Hypothese, dass das G-CSF im aufkonzentrierten Zustand eine größere Instabilität als im flüssigen Zustand besitzt, kann mit der Abb. 4-24 eindeutig bewiesen werden:

- Bei 40 °C Lagerung waren aufkonzentrierte SAP7,4-Proben innerhalb von wenigen Stunden aggregiert, während die gleiche Rez. in flüssiger Form erst nach 4 Tagen so stark abgebaut wurde (Abb. 4-25).

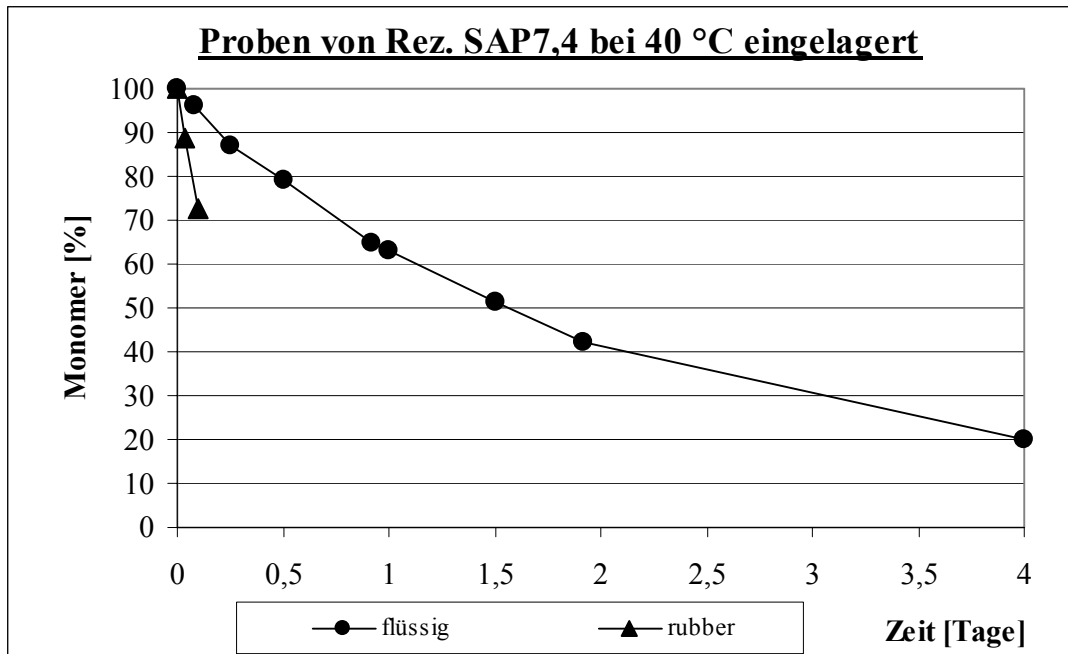


Abb. 4-25: Proben der Rez. SAP7,4 bei 40 °C eingelagert

- Bei 30 °C Lagerung konnten nach 54 h bei den aufkonzentrierten SAP7,4-Proben nur 13 % Monomer detektiert werden. Nach 28 Tagen lagen bei der flüssigen Form noch 44 % Monomer vor (Abb. 4-26).

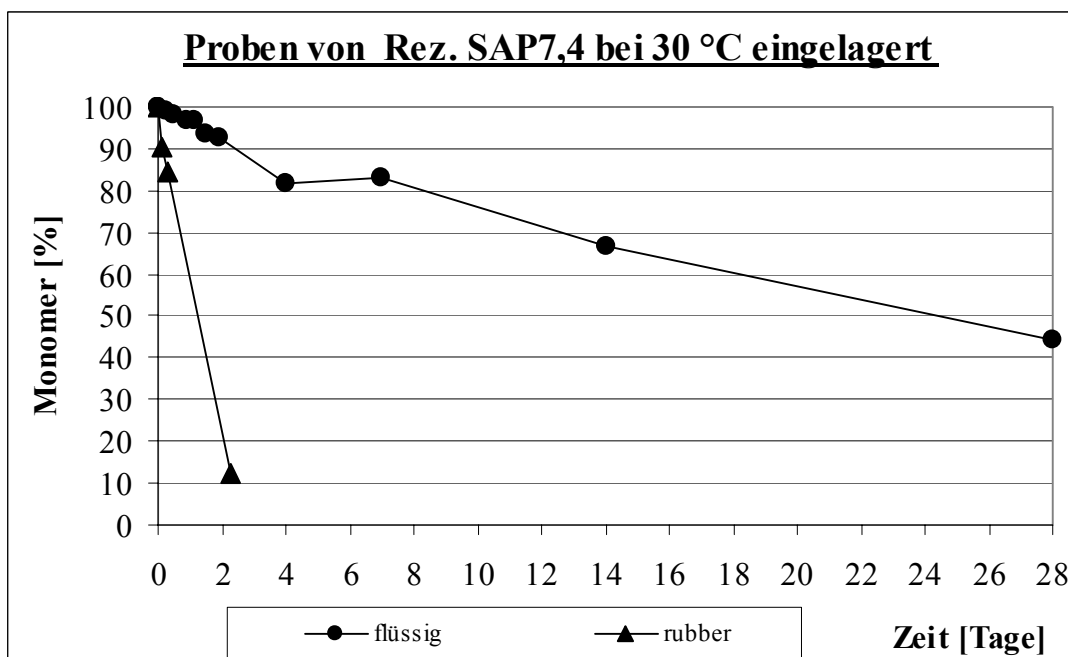


Abb. 4-26: Proben der Rez. SAP7,4 bei 30 °C eingelagert

Bei den Proben der Rez. SAP4 war der Unterschied zwischen den flüssig und aufkonzentriert gelagerten Proben größer als bei SAP7,4.

- Nach 17,5 h war der Monomer-Gehalt der 40 °C gelagerten rubber SAP4-Proben auf 18 % Monomer gesunken. Bei der flüssigen Form konnten nach 12 Wochen unter gleichen Lagerbedingungen 60 % G-CSF bestimmt werden.
- Die 30 °C gelagerte SAP4-rubber-Proben wiesen nach 54 h eine Gehalt von 13 % auf. Nach 12 Wochen der flüssigen Proben erniedrigte sich der Gehalt nur auf 90 %.

Aus Abb. 4-24 kann außerdem abgeleitet werden, dass G-CSF im aufkonzentrierten Zustand bei Rez. SAP7,4 eine geringere Stabilität als bei Rez. SAP4 aufwies.

Bei 40 °C Lagerung betrug der Unterschied nur wenige Stunden. Die bei 22 °C gelagerten SAP7,4-rubber-Proben waren schon nach 54 h mit 18 % Monomer aggregiert, wohingegen SAP4-rubber-Proben nach 13 Tagen noch 48 % Monomer enthielten. Die im Kühlschrank-gelagerten SAP7,4-rubber-Proben zeigten nach 6 Tagen nur noch einen Monomer-Gehalt von 47 %. Die saure Rez. besaß nach doppelter Lagerdauer (13 Tage) den doppelten Gehalt (93 %).

Fazit:

Es konnte gezeigt werden, dass eine starke Abhängigkeit des Monomer-Gehalts der gelagerten Proben von der Lagertemperatur, der Art der Zubereitung (flüssig, aufkonzentriert oder getrocknet) und des Formulierungs-pH-Wertes besteht.

Proteine besitzen in flüssigen Zubereitungen aufgrund zahlreicher Abbaureaktionen nur begrenzte Stabilität. Wasser fungiert in der flüssigen Zubereitung als Reaktionsmedium. Daher werden Proteine durch Gefriertrocknung oder andere Trocknungsverfahren in trockene, stabile Lagerformen überführt [53]. Der Stabilitäts-Unterschied zwischen flüssigen und getrockneten Proben konnte mit den Einlagerungen bestätigt werden.

Die größte Instabilität besaß G-CSF im aufkonzentrierten rubber-Zustand, der während der Vakuumtrocknung durchlaufen wird. Bei gleicher Temperatur stabilisierte stets der flüssige oder der trockene Zustand das G-CSF besser als der hochkonzentrierte rubber-Zustand. In diesem Zustand kam es zu Aggregation, die durch die Aufkonzentrierung und den noch verbliebenen Wasseranteil induziert wurde [144,145].

Der rubber-Zustand bildet die Schlüsselstelle in der Umwandlung der Umgebung des Proteins vom flüssigen in den trockenen Zustand. Die Literatur bekannten Theorien zur Stabilisierung im flüssigen und trockenen Zustand, wie preferential exclusion, water replacement theory und der glasartige amorphe Zustand, überlagern sich im rubber-Zustand [10,56,58,99,152,188,189]. Je nach Feuchtigkeits-Feststoff-Verhältnis können die Vorgänge am Protein mit der einen oder der anderen Theorie besser erklärt werden.

4.7. Stabilitätsuntersuchung von wieder befeuchteten getrockneten G-CSF-Proben

Im Kapitel 4.6. wurde der rubber-Zustand durch Aufkonzentrierung von flüssigen Proben hergestellt. Nun wurden getrocknete Proben durch gezielte Rückbefeuchtung wieder in einen hochkonzentrierten, angefeuchteten Zustand überführt. Diese Vorgehensweise entspricht den aus der Literatur bekannten Untersuchungen zu „moisture induced aggregation“ von Costantino, Langer und Klibanov [102,146,147], aber auch anderen Arbeitsgruppen [190,191].

Es wurden jeweils mit 0,5 ml Rez. SAP4 bzw. SAP7,4 befüllte 2R-Vials in der GT-Anlage Alpha bei 40 °C vakuumgetrocknet. Nach der Aufkonzentrierung mit der Membranvakuum-pumpe wurde die Nachdrying der Proben mit der Drehschieberpumpe bis zu einer Gesamtdryingdauer von 54 h fortgesetzt.

Der RWG der Proben von SAP4 lag bei 1,0 % und bei 0,4 % bei den SAP7,4-Proben. Diese Daten korrespondieren mit den T_g -Werten. Bei den Proben der Rez. SAP4 konnte ein T_g von 57,9 °C und bei Rez. SAP7,4 ein T_g von 64,0 °C bestimmt werden.

Die getrockneten- Proben wurden, wie unter 2.2.2.5. beschrieben, in offenen Vials in Exsiccatoren bei 93 % r.F., 86 % r.F., 76% r.F. und 65 % r.F. bei 20 °C eingelagert. Die rückbefeuchteten Proben wurden mittels Lichtblockade und SEC analysiert.

SEC-Ergebnisse der rückbefeuchteten Proben

In Abhängigkeit von der relativen Feuchte in den Exsiccatoren kam es zu Aggregation der gelagerten Proben. Nach 3 Wochen Lagerung wurden bei 93 % r.F. nur noch 43,8 %, bei 86 % r.F. noch 73,3 % und bei 76 % r.F. noch 81,6 % Monomer gemessen (Abb. 4-27).

Ein ähnliches Verhalten zeigten die Proben der Rez. SAP7,4. Nach 3 Wochen konnten bei 86 % r.F. noch 35,8 % und bei 76 % r.F. noch 62,0 % Monomer detektiert werden. Die Veränderung schritt bei 93 % r.F. so rasch voran, dass schon nach zwei Wochen untersucht wurde. Hier lagen nur noch 19,9 % in monomerer Form vor.

In Abb. 4-27 sind die Kurven der beiden Rezepturen dargestellt. Es wird deutlich, dass die Proben der Rez. SAP7,4 eine geringere Stabilität besitzen, als die von Rez. SAP4.

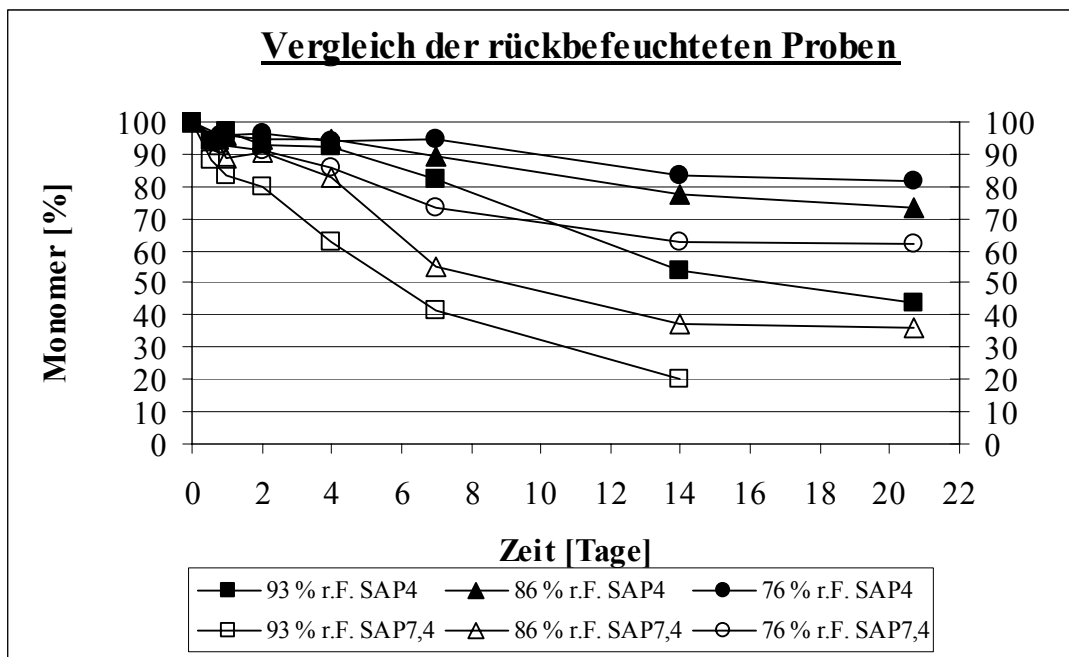


Abb. 4-27: Gehalte der im Exsiccator befeuchteten Proben der Rez. SAP4 und SAP7,4

Lichtblockade-Ergebnisse der rückbefeuchteten Proben

Alle Proben entsprachen den Anforderungen des Ph. Eur. [109].

Ab dem Probezug mit eintägiger Probenlagerung konnten alle Proben von allen Lagerfeuchten der Rez. SAP4 nur noch zu getrübbten Lösungen rekonstituiert werden.

Bei SAP7,4 kam es ab dem vierten bzw. fünften Probezug bei der Lagerung mit 93 % r.F. bzw. 86 % r.F. zu Trübungen.

Bei den Proben der Rez. SAP4 konnte eine sehr starke Abhängigkeit zwischen der Lagerung bei verschiedenen relativen Feuchten und der Lagerdauer beobachtet werden (Abb. 4-28).

Aus den bisherigen Versuchen und der Literatur ist bekannt, dass Rez. SAP7,4 sich instabiler als Rez. SAP4 verhält [132]. Wodurch es bei diesen Versuchen zur Umkehrung der bekannten Verhältnisse kam, blieb unbekannt. Die Rückbefeuchtung getrockneter SAP4-Proben führte offensichtlich zu instabileren Produkten. Der pH-Wert der rekonstituierten Lösung hatte sich durch die Lagerung und Rückbefeuchtung nicht verändert und lag bei 4,0.

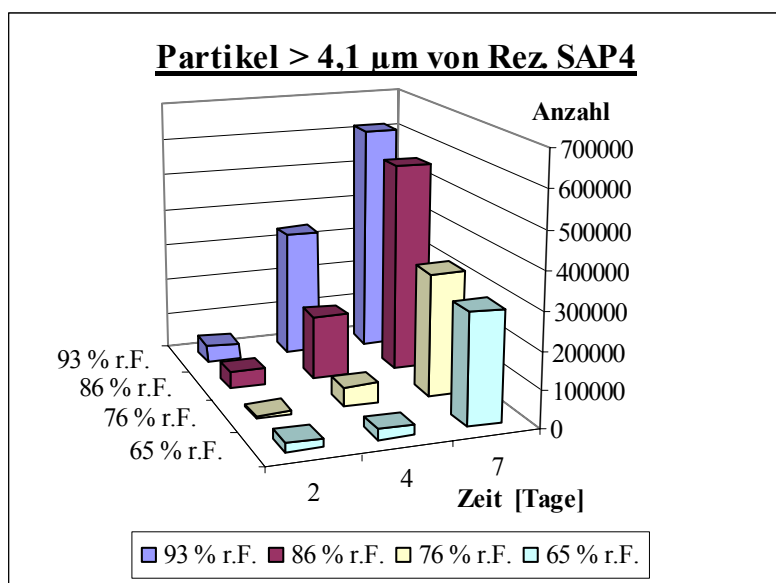


Abb. 4-28: Lichtblockade- Daten der Proben Rez. SAP4

Wasseraufnahme der Proben während der Befeuchtung im Exsiccator

Die Wasseraufnahme der Proben während der Rückbefeuchtung wurden gravimetrisch ermittelt. Zwischen der Wasseraufnahmekapazität der beiden Rezepturen bestand kein Unterschied. Abb. 4-29 zeigt exemplarisch die Wasseraufnahme bei den Proben der Rez. SAP4.

Nach 14 Tagen waren bei der Lagerung mit 93 % r.F. 100 % Massenzunahme zu verzeichnen. Es lag daher ein Feststoff- zu Wasser- Anteil von ca. 50 : 50 vor.

Der Feststoffanteil der Probenreihen von Rez. SAP4 und SAP7,4 nahm von anfangs ca. 83 % – 80 % beim ersten Probezug zu einem Feststoffanteil von ca. 75 – 50 % ab.

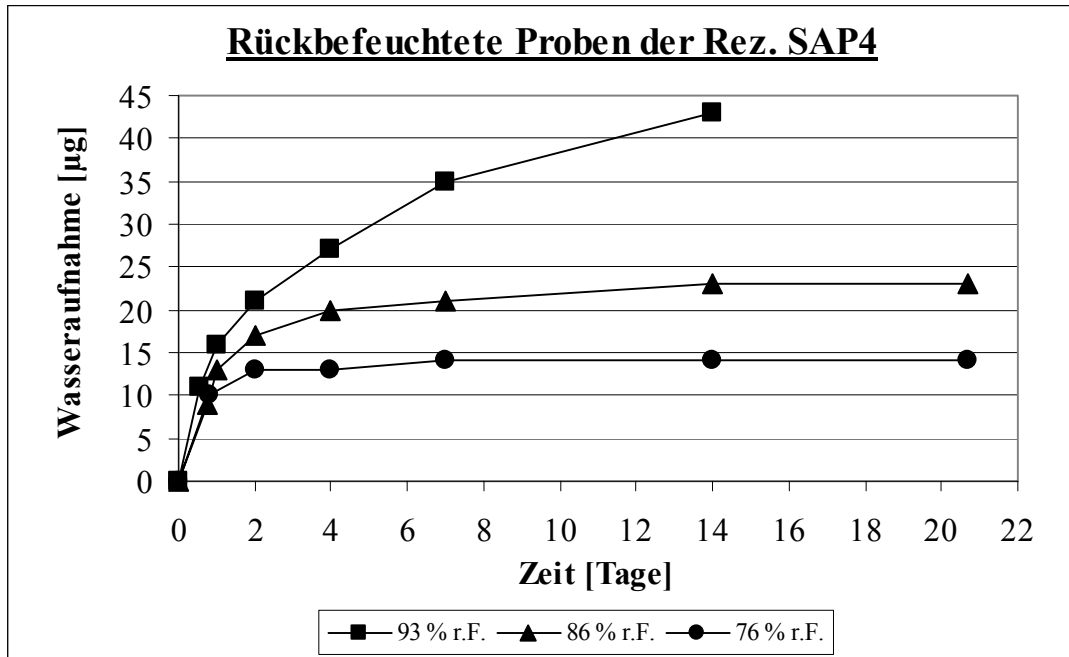


Abb. 4-29: Wasseraufnahme während der Rückbefeuchtung der Proben Rez. SAP4

In Abb. 4-30 sind der Monomer-Gehalt und die Wasseraufnahme der Proben von der Rez. SAP4 gegenübergestellt. Mit Anstieg des Wassergehaltes kam es parallel zu einem Absinken des Monomer-Anteils. Zwischen der Feuchtigkeit der Lagerung und der Abnahme des Gehaltes konnte ein direkter Zusammenhang bestätigt werden. Gleiches galt für die SAP7,4-Proben.

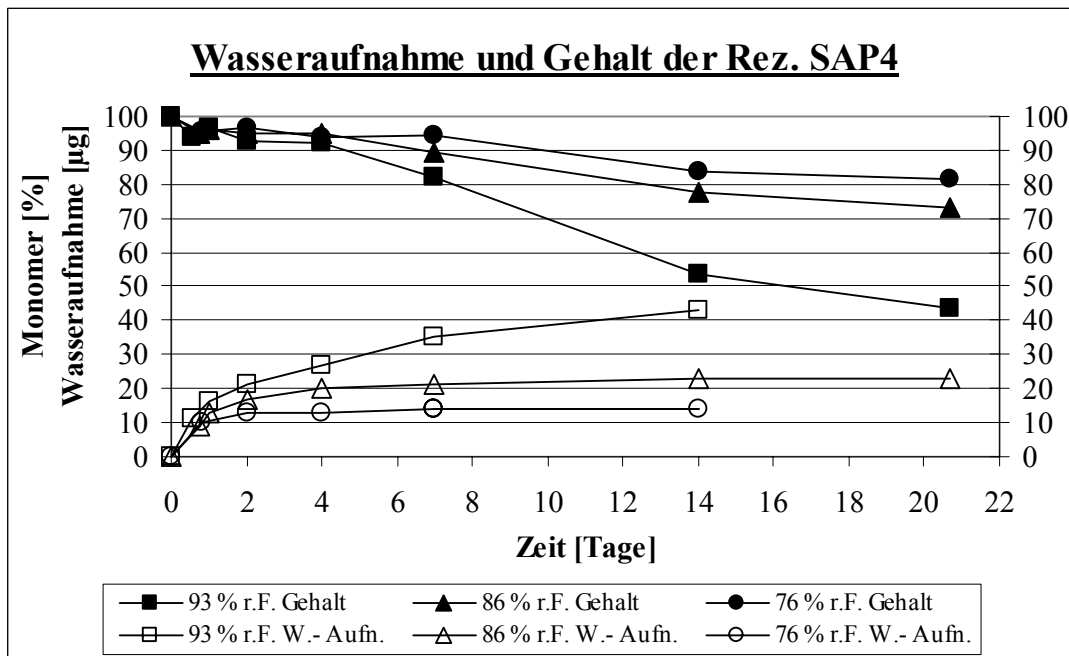


Abb. 4-30: Wasseraufnahme und Monomer-Gehalt der rückbefeuchteten Proben Rez. SAP4

Vergleich flüssiger, aufkonzentrierter und rückbefeuchteter Proben

Die beiden folgenden Abbildungen stellen den Zusammenhang zwischen rückbefeuchteten und den anderen gelagerten Proben her. Die Monomer-Gehalte der rückbefeuchteten Proben werden mit den Ergebnissen der bei 22 °C gelagerten Proben verglichen. Die im aufkonzentrierten rubber-Zustand bei 22 °C gelagerten SAP4-Proben zeigten eine stärkere Aggregation als die bei 93 % r.F. rückbefeuchteten Proben (Abb. 4-31).

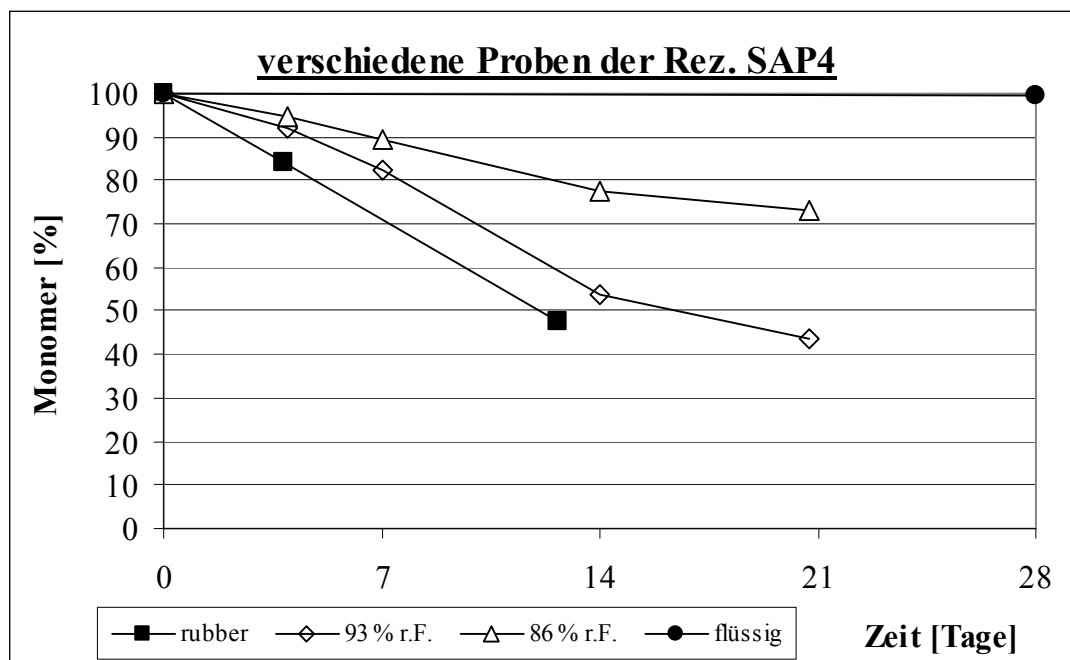


Abb. 4-31: Monomer-Gehalte rückbefeuchteter und anderer Proben von Rez. SAP4 (22 °C)

Die rückbefeuchteten, flüssigen und getrockneten SAP7,4-Proben zeigten eine viel ausgeprägtere Stabilität, als die bei 22 °C gelagerten Proben aus dem rubber-Bereich (Abb. 4-32).

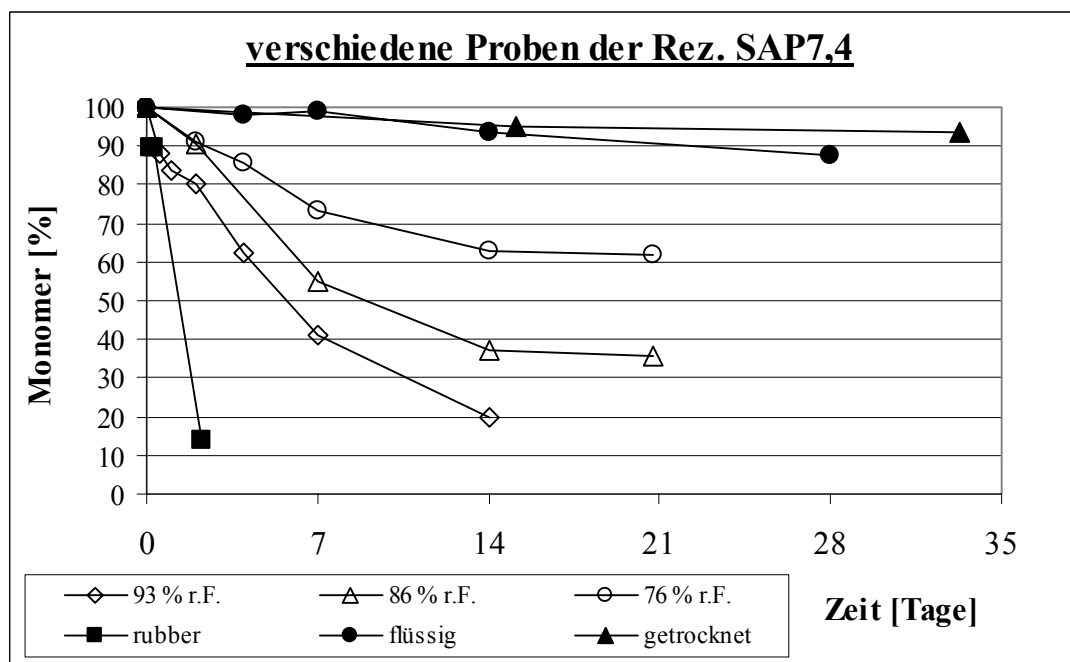


Abb. 4-32: Monomer-Gehalte rückbefeuchteter und anderer Proben von Rez. SAP7,4 (22 °C)

Fazit:

Zwischen dem Ausmaß der Aggregation, der relativen Feuchte der Lagerung und der aufgenommenen Wassermenge konnte ein direkter Zusammenhang nachgewiesen werden. Bei der Rez. SAP7,4 wurde durch die Rückbefeuchtung eine stärkere Aggregation als bei der Rez. SAP4 ausgelöst.

Allerdings konnte dies mit der Lichtblockade nicht bestätigt werden. Im Gegensatz zu dieser Erwartung waren die Proben der Rez. SAP4 stark getrübt und zeigten eine kontinuierliche Zunahme der Partikelzahlen. Die Proben der Rez. SAP7,4 zeigten keine auffälligen Veränderungen über die Lagerdauer.

Auf molekularer Ebene laufen die unter 4.6 bereits beschriebenen Stabilisierungsvorgänge in umgekehrter Reihenfolge ab, d.h. vom trockenen zum rubber-Zustand. Durch Anlagerung von Wasser gehen die trockenen glasartigen Proben in einen hochviskosen Zustand über. Die Proben von Rez. SAP4 und SAP7,4 besaßen mit einem Feststoffanteil von 50 bis 80 % eine größere Viskosität, als die aufkonzentrierten Proben aus dem vorherigen Kapitel. Trotz der Rückbefeuchtung in den rubber-Zustand verhinderte die höhere Viskosität der Proben die Aggregation des G-CSF. Das G-CSF lag noch ausreichend immobilisiert in der weichen Proben-Matrix vor. Bei den aufkonzentrierten Proben in Kapitel 4.6. war der Wasseranteil höher und führte demzufolge aufgrund niedrigerer Viskosität der Proben zu stärkerer Aggregation.

4.8. Zusammenfassung des Aggregations-Verhaltens von G-CSF

Bei Trocknungsversuchen mit dem IR-Dancer war beobachtet worden, dass der G-CSF-Monomer-Gehalt zu einem Minimum absinkt und anschließend wieder ansteigt. Dazu gegenläufig erfolgte der Anstieg und das Absinken des Dimer- und Aggregat-Anteils. Während der Trocknung kam es zur reversiblen Aggregation des G-CSF.

Bevor die reversible Aggregation mit anderen Trocknungsgeräten untersucht werden konnte, mussten die Voraussetzungen geschaffen werden, die Analytik so zu organisieren, dass eine Induzierung von Aggregation durch die Probenbehandlung ausgeschlossen war. Anhand von Einfrier-/Auftau-Zyklen mit flüssigen, aufkonzentrierten und getrockneten Proben konnte gezeigt werden, dass Schockgefrieren der Proben keine Veränderung an den Proben hervorruft. Die gefrorenen Proben konnten mit dieser Vorgehensweise schließlich einzeln aufgetaut und analysiert werden.

Die Beobachtung der reversiblen Aggregation der IR-Dancer-Versuche konnte in zahlreichen Versuchen in verschiedenen Vakuumtrockenschränken bestätigt werden.

Um Artefakte durch die SEC ausschließen zu können, wurden Proben parallel mit der SEC und der AF4 untersucht. Mit beide Verfahren ließ sich feststellen, dass bei der Trocknung ein Monomer-Minimum auftritt.

Mit der AF4 konnten Fragmente detektiert werden. Diese wurden durch Gelelektrophorese bestätigt. Bei der Trennung mit der SEC besitzen die Fragmentfraktionen die gleiche Retentionszeit wie die Hilfsstoffzusätze Arginin und Phenylalanin. Die Peaks der Hilfsstoffe überlagern die möglichen Fragment- Peaks.

In Abhängigkeit von der Trocknungszeit kam es zur Abnahme der mittels SEC und AF4 bestimmten Gesamtfläche. Die Fragment-Anteile alleine konnten den Gehalts-Verlust nicht ausreichend erklären. Es musste noch einen weiteren Grund für diese Verluste geben. Als Ursache für die Abnahme der Gesamtfläche konnte schließlich die Adsorption von Protein an die Glaswand der Vials ermittelt werden. Die Adsorption konnte trotz Tensidzusatz zur Formulierung nicht verhindert werden. Johnston untersuchte den Einfluss von Tensidzusätzen auf die Adsorption von G-CSF an verschiedene Packmittel. Polysorbate zeigten dabei einen positiven Effekt die Adsorption zu vermindern [164]. Calhoun konnte im Gegensatz zu Johnston bei G-CSF keine Adsorption beobachten [163]. Eine Optimierung der Adsorption durch Variation der Art und Menge des Tensidzusatzes wurde nicht durchgeführt, da sie nicht im Focus dieser Arbeit stand.

Um die reversible Aggregation näher zu charakterisieren, wurde die Abhängigkeit des Phänomens von der Temperatur untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Rezeptur SAP4 eine größere stabilisierende Wirkung auf G-CSF ausübt und es nicht zu einem klar erkennbaren Monomer-Minimum kam. Im Gegensatz dazu war bei der Rezeptur SAP7,4 eine Abhängigkeit von der Temperatur zu erkennen. Bei beiden Rezepturen wurden bei zu hoher Trocknungstemperatur die reversible Denaturierung des G-CSF durch die irreversible Aggregation überdeckt.

Die Ergebnisse zum reversiblen Aggregations-Verhalten des G-CSF stimmen mit Angaben in der Literatur überein, in denen von einem reversibel gebildeten Dimer berichtet wird. Die Bildung dieser Dimer-Spezies wird thermodynamisch durch preferential exclusion von Saccharose begünstigt. Diese Dimere entstehen aus zwei nativen, gefalteten Monomeren und greifen nicht in die Aggregation des G-CSF ein. Das als intermediäres Monomer-Minimum beobachtete Aggregations-Verhalten des G-CSF ist somit aufgeklärt.

Mit Hilfe von Einlagerungen wurde das Verhalten von G-CSF im flüssigen, aufkonzentrierten und getrockneten Formulierungs-Zustand auf Stabilität untersucht. Die aufkonzentrierten Proben, die sich im rubber-Zustand befanden, wiesen die größte Instabilität auf [144,145]. Mit großem Abstand folgten die flüssigen Proben. Am stabilsten verhielten sich die getrockneten Proben [53,192,193].

Ein weiterer Ansatz bei der Untersuchung der Aggregations-Phänomene bestand aus der gezielten Rückbefeuchtung von getrockneten Proben analog der Vorgehensweise von Costantino bei der Untersuchung der „moisture induced aggregation“ [146,147].

Hierbei wurde eine direkte Abhängigkeit der Aggregation vom Feuchtigkeitsgehalt der Proben festgestellt.

In Abb. 4-33 sind die Ergebnisse zur Untersuchung der Aggregation anhand der Einlagerungen von flüssigen, aufkonzentrierten, rückbefeuchteten und getrockneten Proben zusammengefasst:

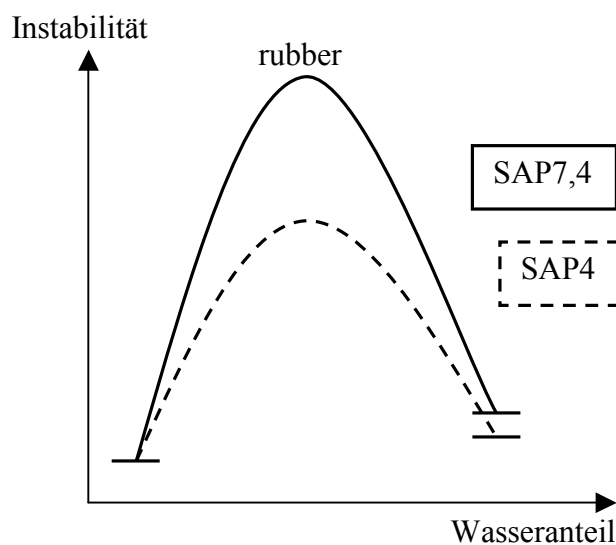


Abb. 4-33: Zusammenhang zwischen Zustand und Stabilität der Probe

- Die flüssige Rez. SAP4 besaß eine höhere Stabilität als SAP7,4.
- Das Ausmaß der reversiblen Aggregation war bei Rez. SAP4 geringer als bei SAP7,4.
- Die getrockneten Proben beider Rezepturen zeigten vergleichbare Stabilität.

Bei der Trocknung von Proteinlösungen bildet der rubber-Zustand die Schlüsselstelle in der Umwandlung der Umgebung des Proteins vom flüssigen in den trockenen Zustand. Je nach Wasser-Feststoff-Verhältnis können die Vorgänge am Protein mit der einen oder der anderen Theorie zur Stabilisierung im flüssigen und trockenen Zustand besser erklärt werden [10,56,58,99,152,188,189].

Im aufkonzentrierten Zustand besitzt das Protein die größte Instabilität. Am einfachsten lassen sich die Aggregations-Vorgänge anhand der unterschiedlichen Viskosität der Trocknungsstadien erklären. Die einzelnen Moleküle sind nicht mehr frei beweglich wie im flüssigen Zustand. Andererseits ist die Viskosität der hochkonzentrierten Formulierung noch nicht hoch genug, um die Moleküle in der Matrix vollständig zu immobilisieren. Aufgrund der großen räumlichen Nähe und der noch vorhandenen Beweglichkeit kann es zur Annäherung und Anlagerung der einzelnen Moleküle kommen. Dies ermöglicht die Zusammenlagerung zu größeren Einheiten. Je nach Art und Dauer der Zusammenlagerung kann von reversibler oder irreversibler Aggregation gesprochen werden. Andererseits konnte bei Allison die These gefunden werden, dass es zu einer gegenseitigen sterischen Hinderung der Proteine im hochkonzentrierten Zustand kommt. Aufgrund der großen Nähe zwischen den Protein-Molekülen sollen sie sich bei der Auffaltungsreaktion gegenseitig beeinflussen [152]. Dies konnte bei den Versuchen aufgrund des Ausmaßes der reversiblen Aggregation nicht bestätigt werden.

Da bei der Vakuumtrocknung auf dem Weg von der flüssigen zur getrockneten Zubereitung immer der aufkonzentrierte rubber-Zustand durchquert werden muss, sind folgende Faktoren wichtig, um eine stabile getrocknete Zubereitung zu erhalten.

- Die Trocknungstemperatur spielt eine entscheidende Rolle. Sie bestimmt die Dauer des Verweilens im hochkonzentrierten Zustand [194]. Wie bereits an anderer Stelle ausgeführt, erfolgt bei niedriger Temperatur die Proteinschädigung mehr durch die verlängerte Trocknungsdauer als durch den Temperaturstress. Dies führt zu einem längeren Verweilen im rubber-Zustand. Bei höherer Trocknungstemperatur kann der hochkonzentrierte Zustand schneller durchquert werden, andererseits sind die Proben einer höheren thermischen Belastung ausgesetzt. Für die praktische Anwendung muss ein Kompromiss bei der Trocknungstemperatur eingegangen werden. Für jede Rezeptur kann eine andere Temperatur optimale Bedingungen darstellen.
- Da dieser aufkonzentrierte Zustand unumgänglich ist, kann das Ausmaß der Aggregation durch die Optimierung der Rezeptur sehr stark beeinflusst werden [191,195]. Wie in diesem Kapitel gezeigt werden konnte, sind die Trocknungsergebnisse bei einer Rezeptur durch die Wahl des geeigneten pH- Wertes bereits steuerbar [196]. Die Rezeptur mit pH 4 wies deutlich weniger Aggregation auf als die Rezeptur mit pH 7,4. Neben dem pH-Wert der Formulierung spielen die eingesetzten Hilfsstoffe eine entscheidende Rolle für die Stabilisierung des Proteins. Eine Trocknung bei pH 4 macht aus praktischen Gründen wenig Sinn, da die Lösung schon ausreichend stabil ist.

Eine optimierte Formulierung ist besonders für den Verbleib im trockenen Zustand notwendig. Amorphe Strukturen liegen in einem thermodynamisch metastabilen Zustand vor. Je nach Lagertemperatur und Glasübergangstemperatur der Zubereitung kann es zum Verlust des amorphen Zustands kommen. Dies führt meist zu einer Destabilisierung des Proteins, da das Protein die stabilisierende Umgebung verliert. Auslöser für solche Vorgänge sind die Aufnahme von Feuchtigkeit durch die getrockneten Matrices.

In den Vials können bei der Herstellung Restmengen an Feuchtigkeit eingeschlossen werden. Trotz Vortrocknung können Vial-Stopfen Feuchtigkeit abgeben bis sich ein Gleichgewicht im Vial eingestellt hat. Durch Begasung mit trockenem Schutzgas wie Stickstoff oder Edelgasen und geeigneten, vorbehandelte Packmitteln kann dies günstig beeinflusst werden. Durch Schutzbegasung kann gleichzeitig Oxidation reduziert werden.

Im nächsten Kapitel wird daher dieser Bereich der Optimierung der Vakuumtrocknung mit verschiedenen Formulierungen eingehender untersucht.

5. STABILITÄTSUNTERSUCHUNGEN

Nach der Optimierung der Vakuumtrocknung in Kapitel 3. und der Untersuchung der Aggregations-Phänomene von G-CSF in Kapitel 4. werden in diesem Kapitel die Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen verschiedener Rezepturen vorgestellt.

Wie in Kapitel 3. und 4. gezeigt werden konnte, ist die Beachtung mehrerer Faktoren notwendig, um mit der Vakuumtrocknung zu einem trockenem, stabilen Produkt zu gelangen.

Neben dem verwendeten Trocknungsgerät übt die Trocknungstemperatur einen großen Einfluss auf die Stabilisierung des Proteins aus. Verursacht werden die Stabilitäts-Unterschiede aber vor allem durch die Rezeptur, in der das Protein getrocknet wird.

Bereits bei den Versuchen mit dem IR-Dancer in Kapitel 3.3 wurde beobachtet, dass Rezeptur SAP7,4 ein größeres Stabilisierungsvermögen besitzt, als Rez. SP7,4.

Zur Evaluierung verschiedener Kohlenhydrate bzw. Kohlenhydrat-Aminosäure-Kombinationen auf ihre Stabilisierungseigenschaften wurden Verum-Proben im flüssigen und getrockneten Zustand einem Kurzzeitbelastungs-Stresstest von 12 Wochen ausgesetzt.

Vorab erfolgte mittels Placeboversuchen die Auswahl geeigneter Kohlenhydrate bzw. Kohlenhydrat-Aminosäure-Kombinationen.

Alle Verum-Proben wurden mit KF, DSC, Lichtblockade und SEC untersucht. Ausgewählte Proben wurden zusätzlich mit Röntgendiffraktometrie und Rasterelektronenmikroskopie näher charakterisiert.

Neben dem bisher als Modellprotein genutztem G-CSF wurde für zusätzlich Versuche Erythropoietin (EPO) eingesetzt.

Aus der Literatur [17] war bekannt, dass erst durch den Zusatz von Phenylalanin zu einer Rezeptur trockene Produkte mittels Vakuumtrocknung erhalten werden können. Deshalb wurden neben den reinen Kohlenhydrat-Rezepturen (KH) auch Kohlenhydrat-Aminosäure-Kombinationen (KH-AS) mit Phenylalanin gefrier- und vakuumgetrocknet.

Die Gefriertrocknung stellt als etabliertes Verfahren den Standard bei der kommerziellen Herstellung getrockneter Proteinzubereitungen dar. Das Ziel dieser Arbeit war es, die Vakuumtrocknung von Proteinarzneistoffen zu optimieren. Aus diesem Grund wurden zu Vergleichszwecken Rezepturen mittels Gefrier- und Vakuumtrocknung getrocknet. Anhand der vorgestellten Ergebnisse kann die Leistungsfähigkeit der Vakuumtrocknung bewertet und die Daten der Vakuumtrocknung von denen der Gefriertrocknung abgegrenzt werden.

Für die Evaluierung der Stabilität standen mehrere Parameter zur Auswahl, die gegeneinander verglichen wurden:

- Parameter Wirkstoff: G-CSF versus EPO
- Parameter pH-Wert bei G-CSF: pH 4 versus pH 7,4
- Parameter Aminosäure-Zusatz: Aminosäure-freie versus Aminosäure-haltige Rezeptur
- Parameter Verfahren: flüssig, gefrier- oder vakuumgetrocknet

5.1. Ergebnisse der Placebo-Versuche

In diesem Unterkapitel werden die Ergebnisse der Gefrier- und Vakuumtrocknung der Placebo-Rezepturen diskutiert, die gemäß den Angaben in Kapitel 2.2.2.6. hergestellt wurden.

- Gefriertrocknung der Placebo-Rezepturen

Bei der Bestimmung des RWG konnten für alle Proben Gehalte mit weniger als 1 % ermittelt werden (Tab. 5-1), wobei der Phenylalanin-Zusatz zu den gefriergetrockneten Rezepturen keinen Einfluss hatte.

Bei der Bestimmung der T_g-Werte wurden teilweise Einflüsse des Phe-Zusatzes offensichtlich. Während bei Raftilose mit steigender Phe-Menge der T_g kontinuierlich anstieg, blieb er bei Agenamalt unbeeinflusst. Aus den T_g-Werten der anderen Derivate konnte keine allgemeine Aussage abgeleitet werden.

Ein Ansteigen der T_g-Werte für die Zucker mit niedrigen T_g-Werten (Isomalt-Derivate) konnte nicht beobachtet werden.

Placebo- GT	RWG [%]			T _g [°C]		
	ohne Phe	10 mg Phe	20 mg Phe	ohne Phe	10 mg Phe	20 mg Phe
Raftilose P95	0,2	0,3	0,2	59,0	73,7	80,5
Raftiline ST	0,2	0,2	0,2	101,0	99,0	91,8
Agenamalt	0,1	0,2	0,2	100,0	100,1	105,4
Trehalose	0,3	0,2	0,0	70,4	61,2	92,6
Isomalt ST	0,4	0,2	0,1	40,9	38,7	28,2
GPS angereichert	0,4	0,2	0,1	34,2	36,9	28,4
GPM angereichert	0,7	0,2	0,1	41,3	33,1	28,2

Tab. 5-1: RWG und T_g-Werte der gefriergetrockneten Placebo-Rezepturen

- Vakuumtrocknung der Placebo-Rezepturen

Restwassergehalte der vakuumgetrockneten Placebo-Rezepturen

Bei der Vakuumtrocknung übte der Phe-Zusatz einen sehr großen Einfluss auf den Restwassergehalt aus (Tab. 5-2).

Eine wichtige Ausnahme bildete Agenamalt. Unabhängig vom Phe-Gehalt lag bei Agenamalt ein RWG kleiner 1 % vor. Das heißt, dass Agenamalt als einzige bislang untersuchte Zuckermatrix ohne weitere Zusätze praktisch vollständig getrocknet werden konnte.

Bei allen anderen Proben konnte ein RWG zwischen 7 und 11 % für die Phe-freien Zubereitungen ermittelt werden. Während der Phe-Zusatz bei Raftilose, Trehalose und GPM angereichertem Isomalt zu einem RWG kleiner 1 % führte, konnte für Raftiline, Isomalt ST und das GPS angereicherte Isomalt der RWG von ca. 11 % nur auf ca. 3-5 % erniedrigt werden.

Placebo- VT	RWG [%]			T _g [°C]		
	ohne Phe	10 mg Phe	20 mg Phe	ohne Phe	10 mg Phe	20 mg Phe
Raftilose P95	9,2	0,5	0,2	n.b.	95,9	92,1
Raftiline ST	11,3	3,2	4,0	42,9	30,3	20,8
Agenamalt	0,3	0,2	0,5	110	109,3	104
Trehalose	7,4	0,1	0,1	46,8	96,6	97,6
Isomalt ST	10,6	3,9	5,3	17,1	39,4	44,7
GPS angereichert	10,5	3,3	2,5	13,2	22,8	22,2
GPM angereichert	6,9	0,3	0,8	n.b.	50,2	51,7

Tab. 5-2: RWG und T_g-Werte der vakuumgetrockneten Placebo-Rezepturen

T_g-Werte der vakuumgetrockneten Placebo-Rezepturen

Bei der Bestimmung des T_g-Wertes wurden teilweise Einflüsse des Phe-Zusatzes deutlich.

Durch den Phe-Zusatz konnte die Trocknung der Raftilose-, Trehalose-, Isomalt ST und GPM angereicherten Isomalt-Rezepturen sehr viel verbessert werden (Tab. 5-2). Die Werte lagen alle über den T_g-Werten der GT.

Umgekehrt verhielt es sich bei Raftiline. Mit steigendem Phe-Zusatz kam es trotz Abnahme des RWG zu einem kontinuierlichen Absinken der T_g. Hier lag das Ergebnis der VT sehr weit unterhalb des der GT.

Agenamalt schien wie bereits bei der GT vom Phe-Zusatz in seinem Trocknungsverhalten nicht beeinflusst zu werden. Alle drei Werte waren ähnlich den T_g-Werten der GT.

Fazit:

Der Restwassergehalt bei der Gefriertrocknung ergab stets Werte kleiner 1 %. Bei der Vakuumtrocknung konnte der Restwassergehalt durch den Phe-Zusatz stark gesenkt und gleichzeitig der T_g-Wert erhöht werden.

Die Ergebnisse bei Agenamalt unterscheiden sich nur minimal bei beiden Trocknungsverfahren. Agenamalt lieferte auch ohne Phe-Zusatz mit Vakuumtrocknung trockene Produkte mit niedriger Restfeuchte und hohem T_g. Verschiedene Phe-Konzentrationen hatten auf die Ergebnisse bei beiden Trocknungsmethoden keinen Einfluss.

Für Verum-Versuche wurden Agenamalt, Raftilose und Trehalose ausgewählt.

Die Isomalt-Derivate und Raftiline fanden bei den Verum-Versuchen keine Anwendung. Aus der Literatur ist bekannt, dass es vorteilhaft für die Lagerstabilität ist, wenn der T_g-Wert deutlich oberhalb der Lagertemperatur liegt [8,88,92].

Da die T_g-Werte der verschiedenen Isomalt-Derivate nur maximal 52 °C erreichten, wurde auf weitere Versuche mit Isomalt-Derivaten verzichtet.

Raftiline lieferte bei der Gefriertrocknung niedrige Restwassergehalte und sehr hohe T_g-Werte. Bei der Vakuumtrocknung konnte der Phe-Zusatz den Restwassergehalt zwar von 11 % auf 4 % senken, aber die zugehörigen T_g-Werte lagen nur zwischen 21 °C und 43 °C. Diese niedrigen Werte waren für weitere Versuche nicht vielversprechend. Warum es bei den vakuumgetrockneten Raftiline-Proben zu einer Abnahme des T_g-Wertes in Abhängigkeit vom Phe-Zusatz kam, konnte nicht aufgeklärt werden. Da gleichzeitig zum Phe-Zusatz eine Erniedrigung des Restwassergehaltes erfolgte, sind die Daten unplausibel.

5.2. Stabilität von G-CSF-Zubereitungen

Nachfolgend werden die Ergebnisse der bei verschiedenen Temperaturen eingelagerten Proben vorgestellt. Die Rezepturen wurden in flüssiger Form und als gefrier- bzw. vakuumgetrockneten Proben eingelagert. Genaue Angaben zur Nomenklatur der Proben und Herstellung und Lagerung sind in Kapitel 2.2.2.5. und 2.2.2.6. zu finden.

Alle Proben wurden auf die Restfeuchte, den T_g -Wert und auf Partikel untersucht. Mittels SEC wurde eine Aussage über die Stabilität der Zubereitung getroffen.

Ausgewählte Proben wurden noch mit Röntgendiffraktometrie und Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Diese Daten werden separat in Kapitel 5.4. vorgestellt.

Vorgehensweise bei der Auswertung der eingelagerten Proben

Aus den Ergebnissen der visuellen Überprüfung und der Lichtblockade-Messung der Proben konnten bereits erste Schlüsse auf das Stabilisierungsvermögen der verschiedenen Rezepturen gezogen werden.

Bei einigen Rezepturen kam es zu einer Gelb-Verfärbung der Proben während der Lagerung. Bei der Rekonstitution resultierten schließlich gelbe Lösungen, deren Intensität direkt proportional der Lagerungstemperatur war. Ein direkter Zusammenhang zwischen dieser Beobachtung und den Partikelzahlen und den SEC-Ergebnisse konnte nicht hergestellt werden. Besonders stark zeigte sich die Verfärbung bei den flüssigen Cyclodextrin-Rezepturen. Der Verdacht auf Maillard-Reaktionen bei der Gelbfärbung liegt nahe. Eine weitere Untersuchung stand nicht im Focus dieser Arbeit.

Die Restwassergehalte nach der Trocknung werden mit den nach 12 Wochen bei verschiedenen Temperaturen gelagerten Proben verglichen.

Zur übersichtlichen Gestaltung werden in den folgenden Kapiteln nur die SEC-Ergebnisse der 4 °C und 20 °C Einlagerung nach 12 Wochen graphisch dargestellt. Alle Werte beruhen aus Gründen des Probenumfangs auf Einzelpunkt-Bestimmungen. Zur weiteren Diskussion werden Daten aus der Anlage hinzugezogen.

In den folgenden fünf Kapiteln wird die Stabilität von G-CSF in Phe-freien und Phe-haltigen Rezepturen mit pH 4 und pH 7,4 besprochen. Anschließend folgen fünf Kapitel zur Stabilität von EPO.

Alle angegebenen SEC-Ergebnisse sind auf den Monomergehalt der frisch hergestellten Rezeptur bezogen. Bei den getrockneten Proben wird jeweils zwischen dem Monomerverlust durch den Trocknungsprozess und die Lagerung unterschieden.

5.2.1. G-CSF-Rezepturen mit Agenamalt mit und ohne Phenylalanin-Zusatz

Bei allen Agenamalt-Rezepturen wurde eine Trübung beobachtet, die während der Lagerdauer nicht zunahm. Es konnten keine partikulären Verunreinigungen in Form von aggregiertem und ausgeflocktem Protein visuell oder mittels Lichtblockade erfasst werden. Ein Einfluss der Trübung auf die SEC-Ergebnisse ließ sich nicht feststellen. Die Trübung wurde vermutlich durch Agenamalt verursacht, dessen höhermolekulare Bestandteile wegen ungenügender Löslichkeit teilweise wieder ausgefallen waren. Die Proben wurden trotz der Trübung aufgrund niedriger RWG und hoher T_g -Werte über die gesamte Zeit gelagert und G-CSF auf die Stabilität untersucht.

Mit beiden Trocknungsmethoden konnten gleichermaßen niedrige RWG bei gleichzeitig hohen T_g -Werten zu Beginn und am Ende der Lagerung ermittelt werden. Dabei ist besonders bemerkenswert, dass dies auch für die Phe-freien vakuumgetrockneten Proben gilt. Analog den Placebo-Agenamalt-Rezepturen erfolgte mit reinen G-CSF-Agenamalt-Rezepturen eine schnelle Durchquerung des rubber-Zustandes zu trockenen Produkten (Tab. 5-3). Die angegebenen Restwassergehalte stellen den höchsten Wert der jeweiligen Rezeptur nach 12 Wochen Lagerung dar.

	GAM4	GAMP4	GAM7,4	GAMP7,4	VAM4	VAMP4	VAM7,4	VAMP7,4
RWG [%]	3,1	3,4	2,9	2,6	2,1	5,3	2,9	3,6
T_g [°C]	≥ 80	≥ 77	≥ 80	≥ 85	≥ 82	≥ 83	≥ 81	≥ 91

Tab. 5-3: RWG und T_g der G-CSF-Agenamalt-Rezepturen

Bei einem RWG von ca. 2,5 % ergaben sich bei Dekeyser bei gleicher Hilfsstoffkonzentration im Vergleich zu Saccharose (T_g 38 °C) für die Maltodextrine höhere T_g -Werte (57-75 °C) [197]. Die Literatur-Daten korrelieren mit den ermittelten Daten.

Roos stellte eine direkte Abhängigkeit zwischen T_g und Molekulargewicht verschiedener Maltodextrine fest, d.h. je höher das Molekulargewicht, desto größer der T_g [96]. Allgemein bilden Kohlenhydrate mit größerem Molekulargewicht schneller eine glasartige amorphe Struktur mit hohem T_g aus [99].

Bei dem verwendeten Agenamalt handelt es sich um ein Kohlenhydrat mit höherem Molekulargewicht. Dies erklärt die schnelle Trocknung zum niedrigen RWG und hohen T_g . Aus der Tab. 5-3 lässt sich ablesen, dass der Phe-Zusatz keinen positiven Einfluss auf die RWG-Ergebnisse der Gefriertrocknung und einen schwach negativen Effekt auf die vakuumgetrockneten Proben ausübte.

Der Monomerverlust der getrockneten Proben kann in den Verlust durch Trocknung und durch Lagerung unterteilt werden.

Monomer-Verlust [%]	AM4	AMP4	AM7,4	AMP7,4
GT-Prozess	13,1	7,6	19,5	10,0
Lagerung GT-Proben	ca. 14	ca. 12	ca. 8	ca. 8
VT-Prozess	13,8	10,0	21,3	12,4
Lagerung VT-Proben	ca. 7	ca. 7	ca. 2	ca. 8

Tab. 5-4: Monomer-Verlust durch Trocknungsprozess und Lagerung

Die Phe-freien Rezepturen wiesen stets einen höheren Monomer-Verlust durch die Trocknung auf. Die Vakuumtrocknung löste jeweils einen um bis zu 2,4 % größeren Monomerverlust aus.

Es ließ sich daraus folgern, dass die Gefriertrocknung die Proben schonender trocknete und der Phe-Zusatz bei beiden Trocknungsprozessen stabilisierend wirkt.

Bei Cerrutti schlug dagegen der Versuch Bäckerhefe mit Maltodextrin alleine durch 40 °C Vakuumtrocknung zu stabilisieren trotz niedrigem RWG und hohem T_g fehl [82]. Mit Maltodextrin vakuumgetrocknete *Eco* RI Enzyme wiesen bei Rossi eine geringere Stabilität als Trehalose-Rez auf, obwohl auch hier der RWG niedriger und der T_g höher war [20].

Der Monomer-Verlust im trockenen Zustand war in unseren Versuchen bei den vakuumgetrockneten Proben fast um die Hälfte kleiner als bei den gefriergetrockneten Proben. Bei Rez. AMP7,4 war der Verlust bei beiden Verfahren gleich (Tab. 5-4).

Aus diesen Daten kann abgeleitet werden, dass die kompakte Struktur der vakuumgetrockneten Proben zu einem geringeren Monomer-Verlust während der Lagerung führte, als der poröse Aufbau der Lyophilisate. Mit den Restwassergehalten und T_g -Werten kann diese These nicht gestützt werden, da die Ergebnisse sich damit nicht in Einklang bringen lassen.

In Abb. 5-1 werden die Monomer-Gehalte der bei 4 °C und 20 °C über 12 Wochen gelagerten flüssigen, gefrier- und vakuumgetrockneten G-CSF-Agenamalt-Rezepturen verglichen. Die Rezepturen bestehen aus Phe-freiem und Phe-haltigem G-CSF-Agenamalt bei jeweils pH 4 und pH 7,4.

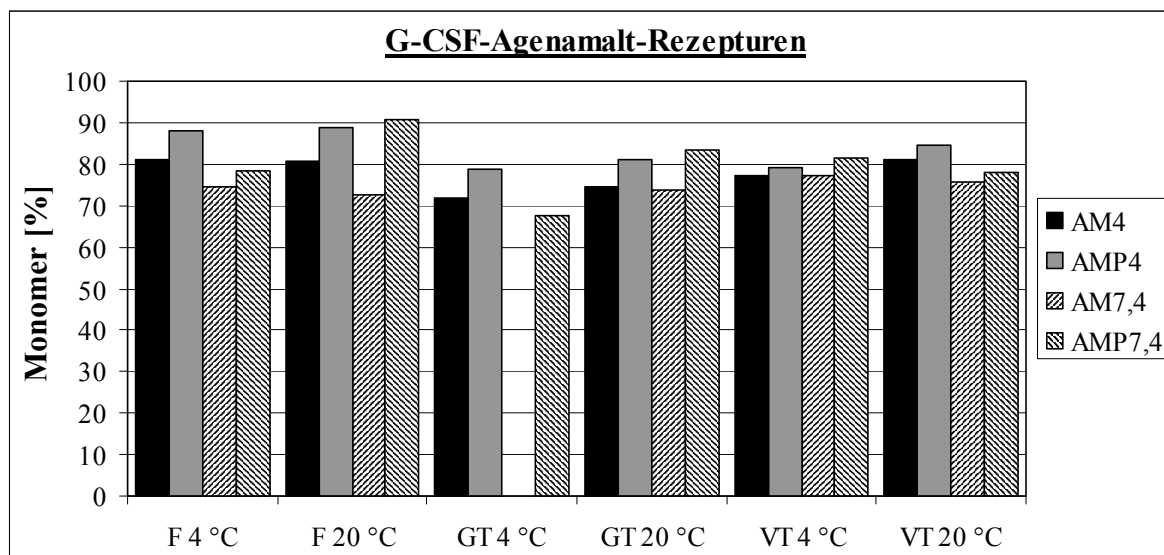


Abb. 5-1: G-CSF-Gehalte in Agenamalt/ Agenamalt-Phenylalanin-Rezepturen (GAM7,4 bei 4 °C fehlt)

Die Phe-haltigen Agenamalt-Proben ergaben unabhängig von der Zubereitungsform (flüssig, GT, VT) und unabhängig vom pH-Wert stets höhere Monomer-Gehalte. Alle Gehalte lagen in einem Bereich von 67-90 %.

Bei der 40 °C Lagerung der flüssigen Proben fiel besonders stark der Unterschied der Stabilität bei beiden pH-Werten der Phe-freien und Phe-haltigen Rezepturen auf (Abb. 5-2). Die saure Rezeptur verhielt sich jeweils, wie aus der Literatur bekannt, viel stabiler als die neutrale [42-44,132].

Durch den Phe-Zusatz in beiden Rezepturen kam es zu einer deutlichen Erhöhung der Stabilität. Das Ausmaß der von Agenamalt bewirkten preferential exclusion konnte durch den Phe-Zusatz offensichtlich erhöht und gleichzeitig G-CSF in der nativen Form stabilisiert werden. Das Stabilisierungsvermögen des Phe-Zusatzes bei der neutralen Rezeptur genügt nicht, um auch nur annähernd die Stabilität der sauren Rezeptur zu erreichen (Abb. 5-2).

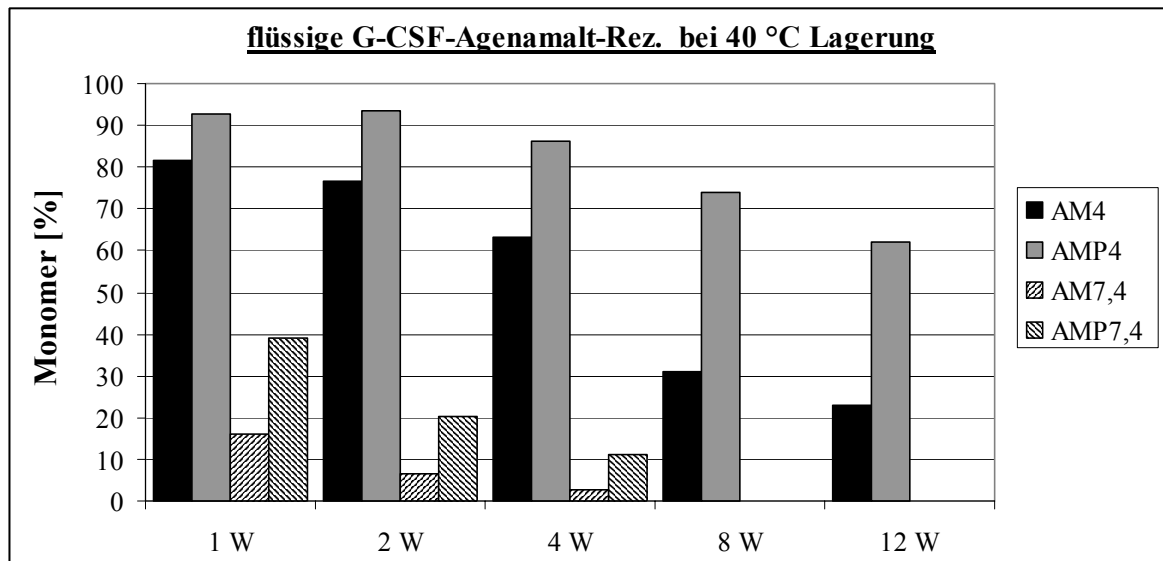


Abb. 5-2: G-CSF-Gehalte flüssiger Agenamalt/ Agenamalt-Phenylalanin-Rezepturen bei 40 °C Lagerung

Corveleyn et al. schreiben Maltodextrinen zu Saccharose gleichwertige bis leicht erhöhte lyoprotektive Eigenschaften in Abhängigkeit vom benutzten Molekulargewicht und der Konzentration zu [198]. Dekeyser kam zu gleichen Ergebnissen bei der Lyophilisation von Chymopain mit Maltodextrinen bzw. Saccharose [197].

Größere Kohlenhydrate besitzen eine stärkere sterische Hinderung zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken mit dem Protein im trockenen Zustand [99]. Carvajal et al. folgerten aus ihren Untersuchungen zur Cryostabilisierung von Fischmuskelproteinen, dass bei niedrigem Molekulargewicht für die Stabilisierung die geringere sterische Hinderung und bei höheren Molekulargewichten der Einfluss der Immobilisierung und Ausbildung des glasartigen Zustandes eine größere Rolle spielten [199].

Für die Stabilität einer Zubereitung ist ein hoher T_g hilfreich, wobei er mindestens 40 °C betragen sollte [53]. Dies war bei den untersuchten Rezepturen mit T_g über 77 °C der Fall. Trotzdem enttäuschen die Ergebnisse der gelagerten Proben beim Monomer-Gehalt. Es wird aus den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen gefolgert, dass es aufgrund sterischer Hinderung der Maltodextrin-Moleküle nicht zu einer besseren Stabilisierung des trockenen Zustandes durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen kommen konnte.

Fazit:

Unabhängig vom Trocknungsverfahren und von der Rezepturzusammensetzung konnten niedrige RWG und hohe T_g -Werte erzielt werden. Trotz guter Voraussetzungen für eine hohe Stabilität blieb diese, vermutlich aufgrund sterischer Hinderung zur Ausbildung von stabilisierend wirkenden Wasserstoffbrücken hinter den Erwartungen zurück. Der Phe-Zusatz beeinflusste die Stabilität des G-CSF günstig. Der Monomer-Verlust allein durch die Trocknung lag zwischen 13-21 % (Phe-frei) bzw. 8-12 % (Phe-haltig). Aufgrund des unterschiedlichen Aufbaus des trockenen Produktes betrug der Monomer-Verlust 8-14 % (GT) bzw. 2-8 % (VT).

5.2.2. G-CSF-Rezepturen mit Raftilose mit und ohne Phenylalanin-Zusatz

Alle getrockneten Proben mit pH 4 lieferten trübe Lösungen bei der Rekonstitution. Die bei 40 °C gelagerten flüssigen Proben zeigten nach einer Woche Trübung, sowie nach 4 Wochen bei 30 °C. Die beiden neutralen Proben waren nach 8 Wochen 40 °C ebenfalls getrübt.

An VR7,4 und VRP7,4, sowie GRP7,4 konnte eine Gelbfärbung an den trockenen Proben bzw. den rekonstituierten Lösungen in Abhängigkeit von der Lagertemperatur beobachtet werden. Die Ursache für die Gelbfärbung waren vermutlich Maillard-Reaktionen. Im Sauren sind Aminogruppen protoniert, während im Neutralen Aminogruppen unprotoniert vorliegen und nur in dieser Form für Maillard-Reaktionen zur Verfügung stehen.

Abb. 5-3 und Abb. 5-4 vergleichen die Restwassergehalte der vier Raftilose-Rezepturen der gefrier- und vakuumgetrockneten Proben. Neben dem Anfangswert ($t=0$) sind die Ergebnisse nach 12 Wochen Lagerung bei vier Temperaturen abgebildet.

Bei den gefriergetrockneten Proben bestand kaum Unterschied zwischen den Ergebnissen der vier Rezepturen. In Abhängigkeit von der Lagertemperatur kam es zu einem Anstieg des RWG von anfangs kleiner 1 % auf maximal 3,8 % (Abb. 5-3).

Bei den vakuumgetrockneten Rezepturen zeigten die Phe-haltigen Proben zu den beiden gefriergetrockneten Proben vergleichbare Werte. Die Phe-freien Proben lieferten RWG zwischen 7-10 % (Abb. 5-4). Ohne Phe-Zusatz blieb die Trocknung auf einem Level mit hohem RWG stehen, während der Phe-Zusatz wie bei Mattern zu Produkten mit niedrigem RWG führten [17].

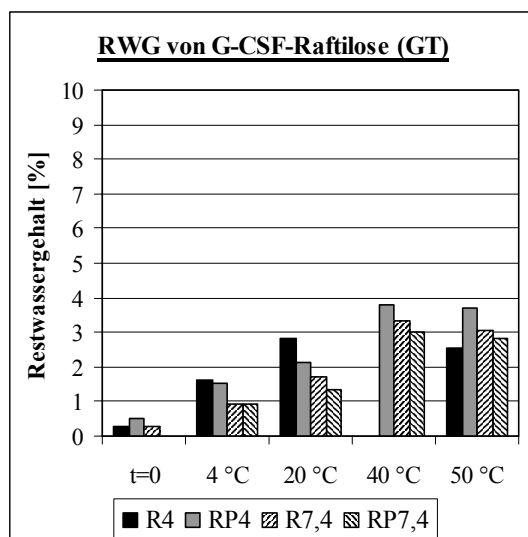


Abb. 5-3: RWG von G-CSF-Raftilose (GT)

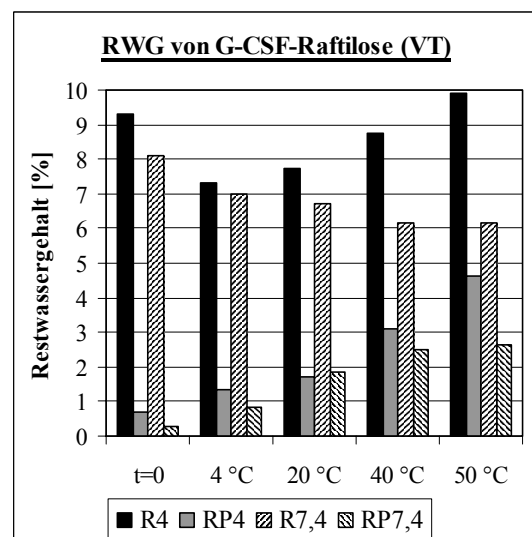


Abb. 5-4: RWG von G-CSF-Raftilose (VT)

Die Ergebnisse der Karl-Fischer-Titration korrelierten mit den T_g -Werten der gefriergetrockneten Proben. An den T_g -Werten der vakuumgetrockneten Proben zeigte sich der große Einfluss des Phe-Zusatzes. Durch Zusatz von Phenylalanin erhöhte sich der T_g auf das Doppelte (Tab. 5-5).

T _g [°C]	R4	RP4	R7,4	RP7,4
GT	≥ 60	≥ 47	≥ 62	≥ 58
VT	32-42	65-88	43-48	72-96

Tab. 5-5: T_g-Werte von G-CSF-Raftilose

Der Monomer-Verlust durch die Trocknung betrug zwischen 13-21 % (pH 4) bzw. 6-8 % (pH 7,4). Während der Lagerung nahm der Gehalt um 10-17 % (pH 4) bzw. 6-12 % (pH 7,4) ab. Der Zusatz oder das Fehlen von Phenylalanin wirkte sich nicht auf die Stabilität aus. Die kompakten vakuumgetrockneten Proben erfuhren während der Lagerung einen nur halb so großen Monomer-Verlust wie die gefriergetrockneten.

Monomer-Verlust [%]	R4	RP4	R7,4	RP7,4
GT-Prozess	12,5	13,4	5,5	5,5
Lagerung GT-Proben	ca. 16	ca. 17	ca. 12	ca. 11
VT-Prozess	21,2	13,9	8,3	7,6
Lagerung VT-Proben	ca. 10	ca. 16	ca. 6	ca. 7

Tab. 5-6: Monomer-Verlust durch Trocknungsprozess und Lagerung

Besonders interessant war das SEC-Ergebnis der vakuumgetrockneten Raftilose-Rez. ohne Phe-Zusatz mit pH 7,4. Obwohl diese Rez. kein Phe enthielt und deshalb ein hoher RWG und ein niedriger T_g resultierte, waren die Monomer-Verluste während der Vakuumtrocknung und der Lagerung denen der Phe-haltigen Rezeptur äquivalent.

Es konnte daraus abgeleitet werden, dass sich die Stabilisierung aufgrund des hohen RWG nicht über den glasartigen amorphen Zustand erklären ließ. Als Ursache für die Stabilitätsunterschiede wurde die unterschiedliche Möglichkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen verantwortlich gemacht.

Dazu wurde das Ergebnis von VR7,4 (Tab. 5-6) mit der Rezeptur VAM7,4 (Tab. 5-4) verglichen. Bei Raftilose handelt es sich um ein lineares Polymer aus Fructosebausteinen. Agenamalt setzt sich als Maltodextrin aus 5-7 α -glykosidisch verknüpften Glucose-Molekülen zusammen. Die Glucoseketten beginnen wie Stärke eine helicale Molekül-Gestalt auszubilden und benötigen mehr Raum als die Raftilose für eine dichte Anordnung. Aufgrund gegenseitiger sterischer Hinderung der Moleküle in der Umgebung der Proteinoberfläche ist eine größere Stabilisierung durch die lineare Raftilose als durch das helicale Maltodextrin zu erwarten.

Im Vergleich mit den Ergebnissen der Rez. VAM7,4 wurde klar, dass es bei VR7,4 trotz höheren RWG zu einem weitaus geringeren Monomer-Verlust während der Trocknung kam (VR7,4 mit 8,3 % versus 21,3 % bei VAM7,4). Der G-CSF-Abbau während der Lagerung war bei VR7,4 im Vergleich zu VAM7,4 nur leicht erhöht. Mit diesen Ergebnissen konnte die These bestätigt werden, dass bei VR7,4 für die gute Stabilisierung das Ausmaß an Wasserstoffbrückenbindungen verantwortlich ist.

In Tab. 5-6 und Abb. 5-5 fiel besonders auf, dass die sauren Rezepturen stets kleinere Monomer-Gehalte aufwiesen als die neutralen. Dies ist insofern bemerkenswert, da die saure Formulierung den besser stabilisierend wirkenden pH besitzt [43,44,132]. Die SEC-Ergebnisse korrelierten mit der visuellen Beobachtung der Trübungen bei den sauren Proben. Wodurch eine Umkehrung der Stabilitätsverhältnisse erfolgte, konnte nicht aufgeklärt werden.

Aus diesem Grunde blieb unklar, warum die Stabilisierung durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken bei VR7,4 erfolgreich war und bei der sauren vakuumgetrockneten Raftilose-Rez. nicht. Möglicherweise spielt eine andere Ladung der Oberfläche durch den sauren pH eine Rolle.

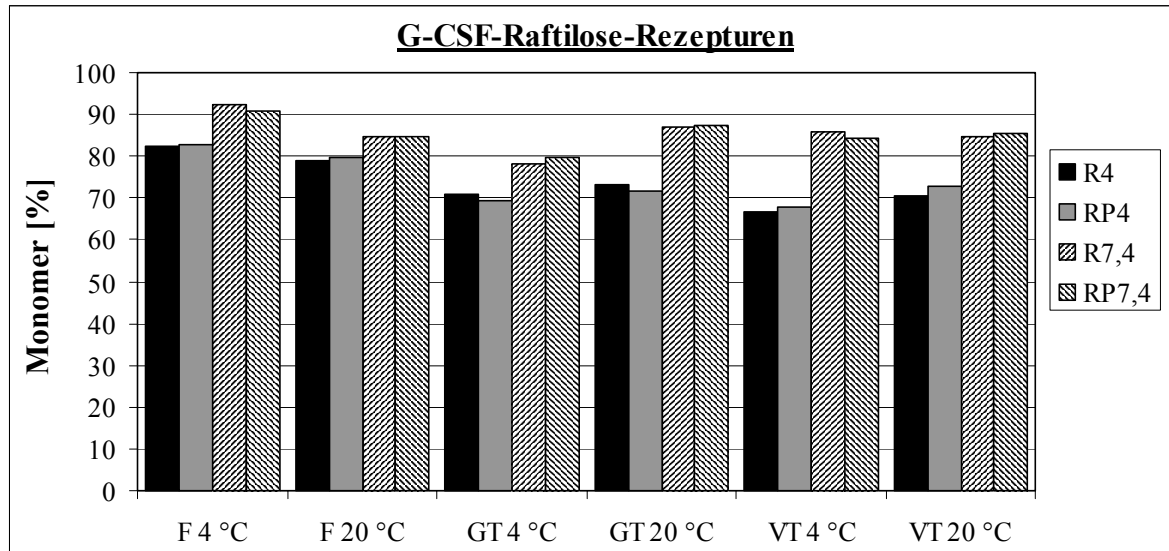


Abb. 5-5: G-CSF-Gehalte in Raftilose/Raftilose -Phenylalanin-Rezepturen

An den flüssigen sauren Rezepturen ließ sich eine sehr große Instabilität bei 40 °C Lagerung beobachten. Nach 4 Wochen waren die sauren und nach 8 Wochen die neutralen Proben vollkommen aggregiert (Abb. 5-6).

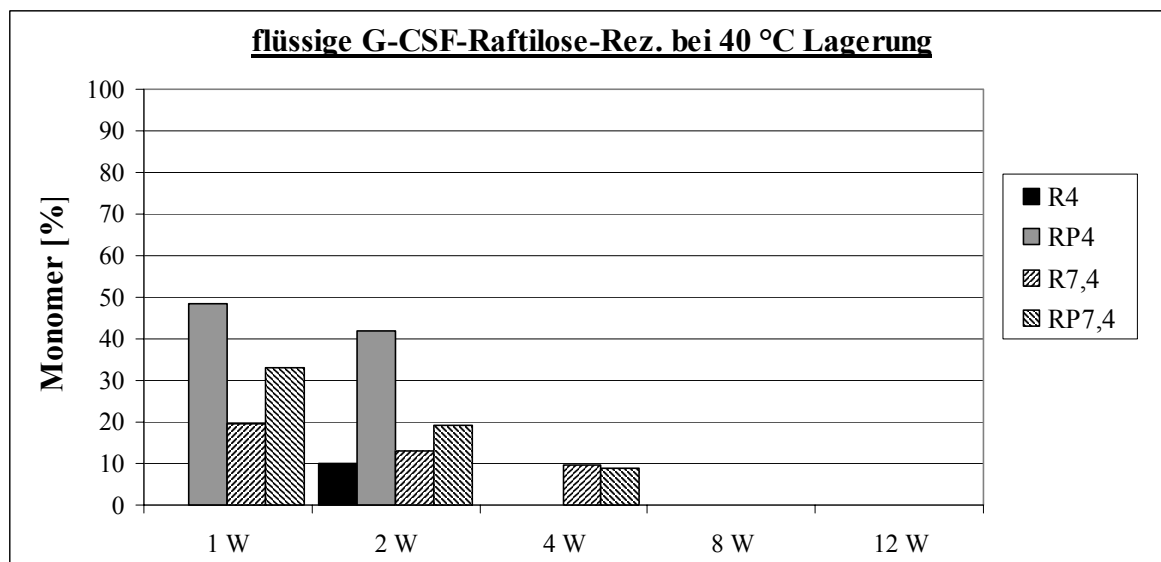


Abb. 5-6: G-CSF-Gehalte flüssiger Raftilose/ Raftilose-Phenylalanin-Rezepturen bei 40 °C Lagerung (FR4 1W fehlt)

Bei 4 °C und 20 °C Lagerung der flüssigen Proben fanden sich dagegen höhere Monomer-Gehalte bei den neutralen Rezepturen. Bei GT und VT waren, wie oben dargestellt, ebenfalls die Proben mit pH 7,4 stabiler als die mit pH 4. Diese Tatsache stellte wieder den umgekehrten Fall zur üblichen größeren Stabilität der sauren Formulierung dar (Abb. 5-7).

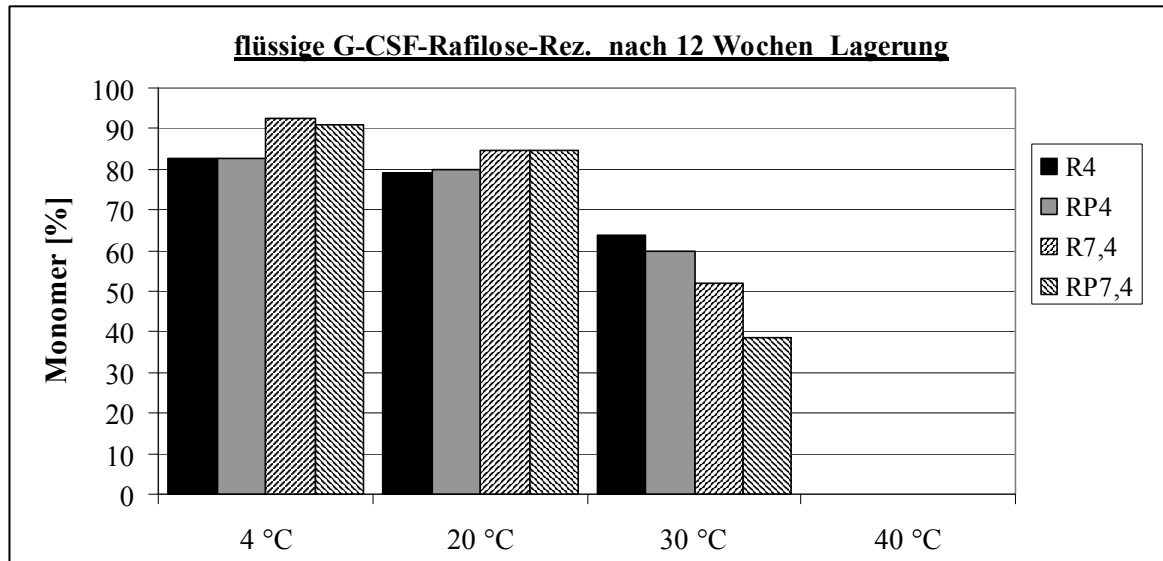


Abb. 5-7: G-CSF-Gehalte flüssiger Raftilose-Rezepturen nach 12 Wochen Lagerung

Bei 4 °C bzw. 20 °C Lagerung wies die flüssige Form größere Monomer-Gehalte als die beiden getrockneten Rezepturen auf, zwischen denen kein Gehalts-Unterschied bestand (Abb. 5-5). Phenylalanin nahm keinen Einfluss auf die Stabilität der Rezepturen.

Hinrichs untersuchte die Stabilisierung von alkalischer Phosphatase mit verschiedenen Inulinen, d.h. höhermolekularen Oligofruktosen. Er stellte fest, dass Inulin mit einem größeren DP (mittleren Polymerisationsgrad) von 5,5/6,0 geeignet waren, um das Enzym zu stabilisieren [122]. Hinchabe beobachtete einen positiven Schutz-Effekt von Oligofruktosen bei der Luft-trocknung [200].

Für das benutzte Oligofruktose-Derivat Raftilose P95 wird ein DP von 2-7 angegeben [123]. Es befindet sich an der unteren Grenze bzw. unterhalb des von Hinrichs ermittelten DP-Wertes. Die Stabilisierung mit Raftilose muss analog dem bei Agenamalt ausgeführten Gesichtspunkten kritisch betrachtet werden. Zwar konnte mit Raftilose eine etwas höhere Stabilisierung für die flüssigen Rezepturen erzielt werden, andererseits steht vermutlich die sterische Hinderung bei den getrockneten Proben höheren Monomer-Gehalten entgegen.

Fazit:

Raftilose-Rezepturen zeigten im Unterschied zu den anderen Kohlenhydrat- oder Kohlenhydrat-Aminosäuren-Mischungen bei allen flüssigen Formulierungen bei hohen Lagertemperaturen große Instabilität.

Erst der Phe-Zusatz führte bei der Vakuumtrocknung zu niedrigen Restwassergehalten und hohen T_g -Werten und konnte die Trocknung positiv beeinflussen. Ohne Phe-Zusatz ergaben sich nur hohe Restwassergehalte und niedrige T_g -Werte. Auf die Ergebnisse der Gefriertrocknung hatte der Phe-Zusatz keinen Einfluss.

Eine nennenswerte Verbesserung der Proteinstabilität blieb auch mit Raftilose-Rezepturen aus. Die neutralen Rezepturen besaßen eine höhere Stabilität als die sauren Varianten. Bei allen Rezepturen kam es zu beträchtlichem Monomer-Verlust durch Trocknung und durch Lagerung. Die Phe-freie vakuumgetrocknete Rez. mit pH 7,4 erzielte die gleiche Stabilität wie die Phe-haltige, obwohl der Restwassergehalt bei ihr doppelt so hoch war. Als Mechanismus für diesen Fall konnte auf eine Stabilisierung über Wasserstoffbrückenbindungen geschlossen werden.

5.2.3. G-CSF-Rezepturen mit Trehalose mit und ohne Phenylalanin-Zusatz

Alle gefriergetrockneten Proben ließen sich zu einer klaren Lösung rekonstituieren. Alle vakuumgetrockneten Proben bei pH 4, sowie die 50 °C und 40 °C gelagerten VT7,4 Proben zeigten Trübung. Nur bei den bei 40 °C gelagerten flüssigen Proben trat bei FT4 ab einer Woche, bei FT7,4 und FTP7,4 ab acht Wochen und bei FTP4 nach 12 Wochen Trübung auf.

Durch Gefrier Trocknung ließen sich trockene Produkte unabhängig von Phenylalanin mit allen Rezepturen erzielen (Abb. 5-8). Bei der Vakuumtrocknung wiesen die Phe-freien Produkte einen Restwassergehalt von 7-11 % im Gegensatz zu 1-5 % bei den Phe-haltigen Proben auf (Abb. 5-9). Erst der Phe-Zusatz ermöglichte trockene Produkte mit niedriger Restfeuchte herzustellen.

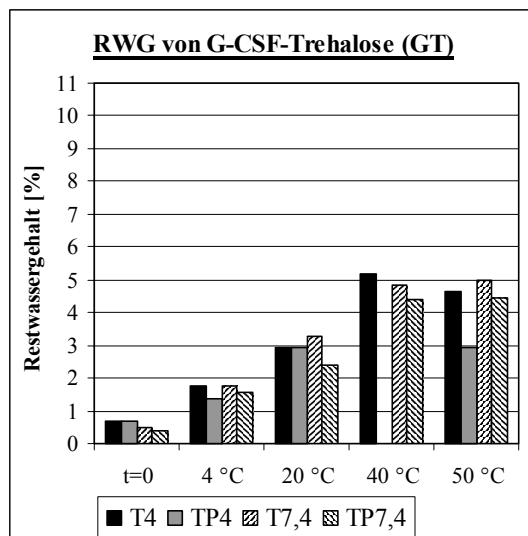


Abb. 5-8: RWG von G-CSF-Trehalose (GT) (TP4 40 °C fehlt)

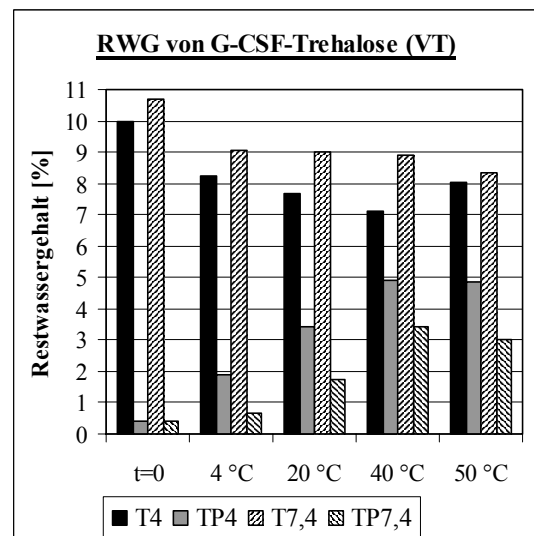


Abb. 5-9: RWG von G-CSF-Trehalose (VT)

Die T_g -Werte der gefriergetrockneten Proben stimmten mit den Restfeuchten überein. Anhand der T_g -Werte der vakuumgetrockneten Proben ließ sich eindrucksvoll der trocknungsverbessernde Effekt des Phe-Zusatzes beobachten.

T_g [°C]	T4	TP4	T7,4	TP7,4
GT	≥ 57	≥ 47	≥ 61	≥ 57
VT	33-47	65-95	28-53	71-99

Tab. 5-7: T_g -Werte von G-CSF-Trehalose

Nur bei Trehalose-Rez. mit pH 4 trat ein hoher Monomer-Verlust mit ca. 14-17 % durch die Trocknung auf, wohingegen er bei den anderen drei Rezepturen zwischen 3-7 % lag. Die Lagerung löste bei beiden neutralen vakuumgetrockneten Rezepturen nur einen Monomer-Verlust von 5-8 % aus. Die anderen Formulierungen verzeichneten einen Abbau von 10-16 % (Tab. 5-8).

Monomer-Verlust [%]	T4	TP4	T7,4	TP7,4
GT-Prozess	14,0	5,9	3,2	3,8
Lagerung GT-Proben	ca. 16	ca. 15	ca. 11	ca. 10
VT-Prozess	17,0	5,8	6,9	6,3
Lagerung VT-Proben	ca. 15	ca. 15	ca. 5	ca. 8

Tab. 5-8: Monomer-Verlust durch Trocknungsprozess und Lagerung

Obwohl der saure pH-Wert die stabilere Umgebung für G-CSF darstellt [43,132], besaßen die sauren Trehalose-Rez. einen kleineren Monomer-Gehalt (Abb. 5-10). Dieses Verhalten der sauren Trehalose-Rez. ist mit den sauren Raftilose-Rez. vergleichbar. Wodurch die erniedrigte Stabilität ausgelöst wurde, konnte nicht aufgeklärt werden.

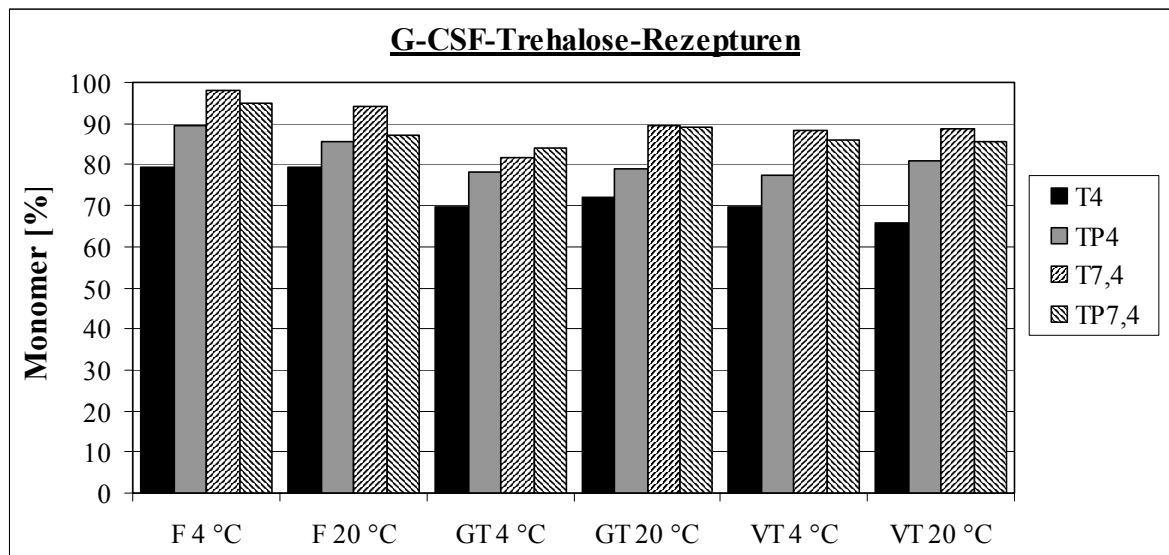


Abb. 5-10: G-CSF-Gehalte in Trehalose/Trehalose-Phenylalanin-Rezepturen

Bei 30 °C und 40 °C Lagerung der flüssigen Trehalose-Rez. trat große Instabilität bei den neutralen Rez. auf. Bei diesen führte der Phe-Zusatz zu einer offensichtlichen Destabilisierung. Im Gegensatz dazu konnte der Proteinabbau bei den sauren Proben durch den Phe-Zusatz stark positiv beeinflusst werden. Nach 12 Wochen 40 °C Lagerung lagen bei FTP4 noch 40 % Monomer entgegen 5 % bei FT4 vor (Abb. 5-11, Abb. 5-12).

Bei 4 °C und 20 °C Lagerung der flüssigen Proben fanden sich dagegen höhere Monomer-Gehalte bei den neutralen Rezepturen. Bei GT und VT waren, wie oben dargestellt, ebenfalls die Proben mit pH 7,4 stabiler als die mit pH 4. Diese Tatsache stellte wieder den umgekehrten Fall zur üblichen größeren Stabilität der sauren Formulierung dar (Abb. 5-12).

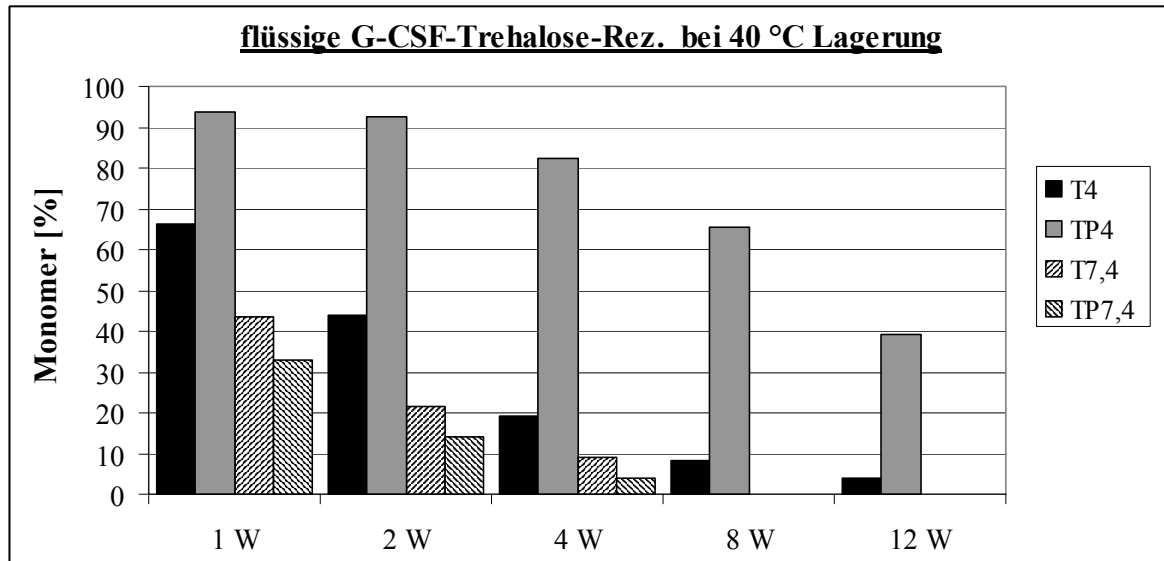


Abb. 5-11: G-CSF-Gehalte flüssiger Trehalose/ Trehalose-Phenylalanin-Rezepturen bei 40 °C Lagerung

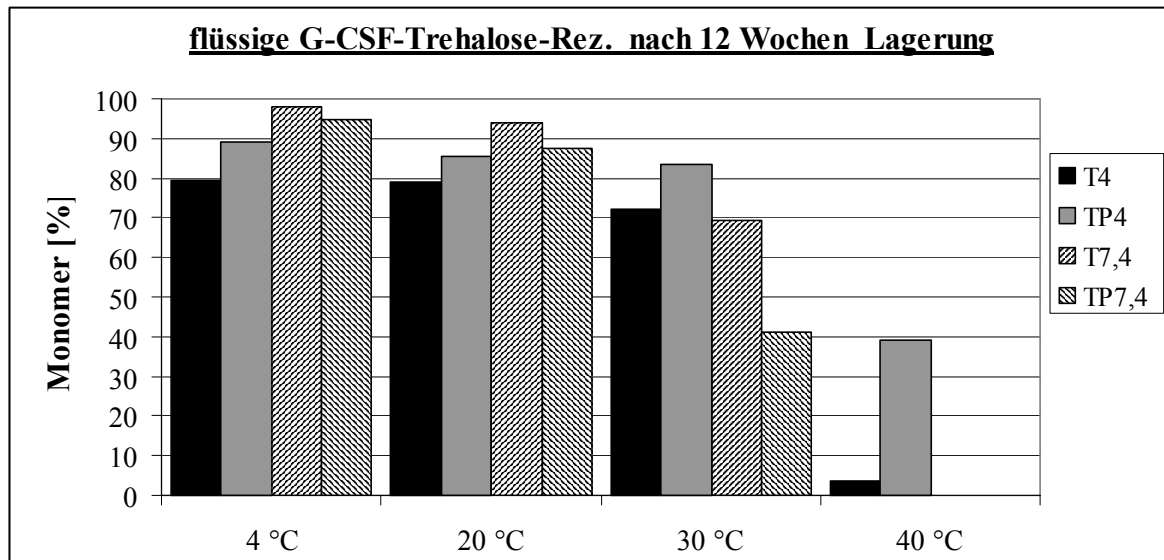


Abb. 5-12: G-CSF-Gehalte flüssiger Trehalose-Rezepturen nach 12 Wochen Lagerung

Die vakuumgetrocknete Rezeptur VT7,4 zeigte bei der Stabilität ähnliches Verhalten wie die Raftilose-Rez. VR7,4. Trotz hohem Restwassergehalt und niedrigem T_g wies VT7,4 eine vergleichbare Stabilität zur Phe-haltigen Rez. VTP7,4 auf (Tab. 5-8). Analog zur Raftilose-Rez. VR7,4 konnte in diesem Fall nicht mit einer Stabilisierung über den glasartigen amorphen Zustand, sondern vermutlich über eine Stabilisierung durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken argumentiert werden. Eine sterische Hinderung durch die Molekülgröße wie bei Agenamalt kam bei dem Disaccharid Trehalose nicht in Betracht.

Es stellte sich heraus, dass der Phe-Zusatz bei den sauren Rez. eine stabilisierende Wirkung und bei den neutralen Rez. eine destabilisierende Wirkung ausübte (Abb. 5-10, Abb. 5-12).

Weitere Erkenntnisse folgten aus den Ergebnissen der Röntgendiffraktometrie (RD):

Die Röntgendiffraktogramme, der bei 50 °C für 12 Wochen gelagerten gefriergetrockneten Proben, zeigten alle einen vollamorphen Zustand an (Aussehen des Diffraktogrammes entspricht **Abb. 5-14**). Der amorphe Zustand fand sich in niedrigen Restwassergehalten und hohen T_g -Werten wieder (**Abb. 5-8, Tab. 5-7**). Trotz dieser mit RD bestätigten günstigen Voraussetzungen für hohe Stabilität, trat bei den gefriergetrockneten Proben ein Monomer-Verlust von 14-30 % durch Trocknung und Lagerung auf.

Nach 12 Wochen 4 °C bis 50 °C Lagerung besaßen die beiden Phe-haltigen vakuumgetrockneten Rezepturen amorphen Aufbau mit Tendenz zu teilamorphen Strukturen. Im Röntgendiffraktogramm sind durch den Phe-Zusatz kleine Peaks in der Kurve zu erkennen (**Abb. 5-13**).

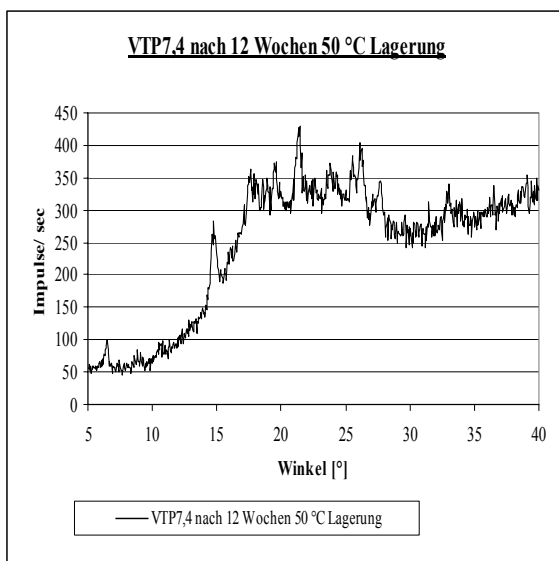


Abb. 5-13: VTP7,4 nach 12 Wochen 50 °C Lagerung

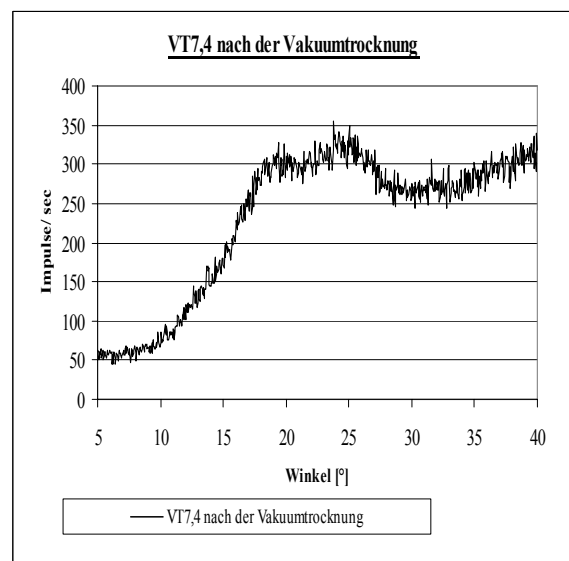


Abb. 5-14: VT7,4 nach der Vakuumtrocknung

Proben von VT4 und VT7,4 lagen direkt nach der Vakuumtrocknung im vollamorphen Zustand vor (**Abb. 5-14; VT4 entspricht VT7,4**).

Nach 12 Wochen 4 °C bzw. 50 °C Lagerung zeigte VT7,4 einen erhöhten Anteil kristalliner Strukturen (**Abb. 5-15 und Abb. 5-16**). Aus dieser Tatsache, konnte abgeleitet werden, dass sich auch in den Proben bei 20 °C und 40 °C Lagerung teilweise Kristalle gebildet haben müssen.

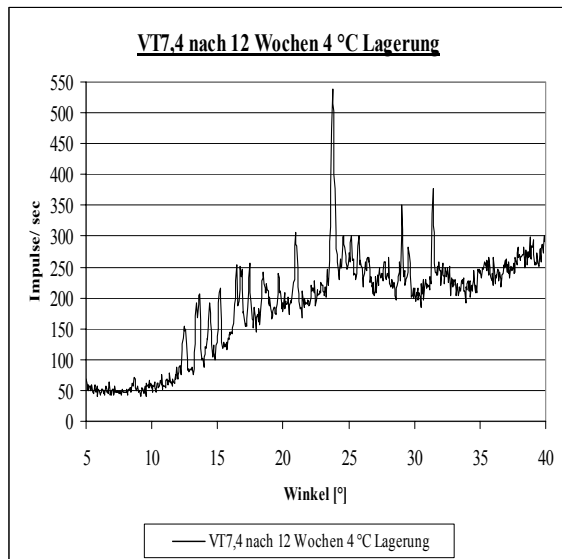


Abb. 5-15: VT7,4 nach 12 Wochen 4 °C Lagerung

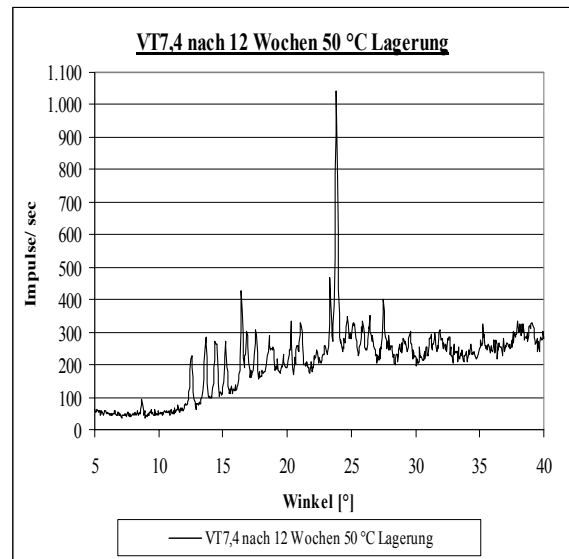


Abb. 5-16: VT7,4 nach 12 Wochen 50 °C Lagerung

Zum Vergleich der Ergebnisse mit teilamorph/teilkristallinem Aussehen ist ein Diffraktogramm von unbehandelter Trehalose abgebildet. Sie lag in vollkristallinem Zustand vor (Abb. 5-17).

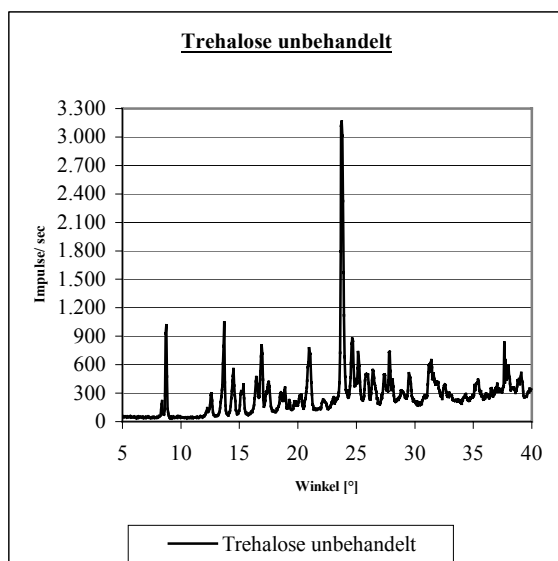


Abb. 5-17: Trehalose unbehandelt

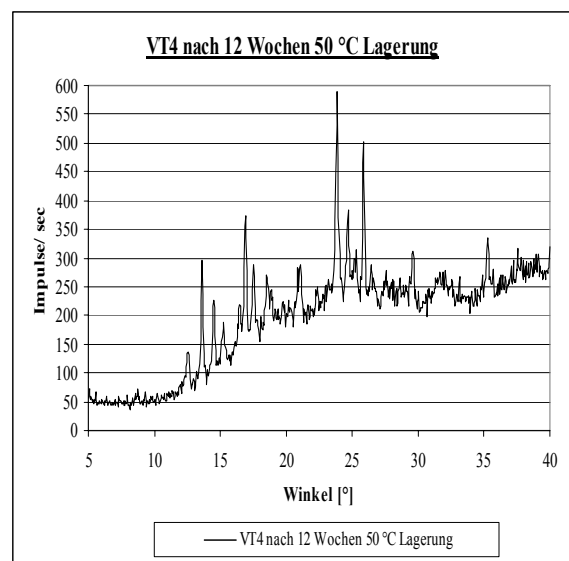


Abb. 5-18: VT4 nach 12 Wochen 50 °C Lagerung

Ein besonderer Effekt war bei VT4 zu beobachten. Die Proben, die bei 40 °C und 50 °C für 12 Wochen gelagert worden waren, besaßen teilkristalline Gestalt (Abb. 5-18).

Dagegen zeigten die bei 4 °C und 20 °C gelagerten Proben noch immer vollamorphe Strukturen ohne die Anzeichen einer Umwandlung zu teilamorphen Anteilen (entspricht Abb. 5-14).

Erklärung zur Stabilität der vakuumgetrockneten Trehalose-Rezepturen

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der SEC, Karl-Fischer-Titration, DSC, und RD ließ sich ableiten, dass die Trehalose-Rez. ohne Phe-Zusatz die höchste Stabilität der vier vakuumgetrockneten Rezepturen aufwies. Dies überrascht zunächst in Anbetracht der Tatsache, dass diese Rezeptur aufgrund fehlenden Phe-Zusatzes einen RWG von ca. 8-11 % und einen T_g von 39-53 °C besaß. Die RD-Messung bestätigte diese beiden Ergebnisse durch das Anzeigen von teilamorphen/teilkristallinen Strukturen in gelagerten Proben.

Die Stabilisierungsvorgänge im trockenen Zustand durch Hilfsstoffe werden in der Literatur hauptsächlich mittels Mechanismen/ Theorien des glasartigen/amorphen Zustandes und der water replacement theory durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Hilfsstoff und Protein versucht zu erklären. In der Literatur werden anhand zahlreicher Beispiele diese Theorien als Schlüssel zur Erklärung der Stabilisierung vorgestellt. Allerdings lassen sich genauso Veröffentlichungen finden, die zu anderen oder gegensätzlichen Ergebnissen kommen.

Wie bei den eigenen Versuchen festgestellt, zeigen Maltodextrine vergleichsweise hohe T_g -Werte, bei gleichzeitig geringen stabilisierenden Effekten für das Protein. Rossi et al. beobachteten trotz niedrigerem T_g eine bessere Stabilisierung des vakuumgetrocknet gelagerten Enzyms *Eco* RI mit Trehalose und Saccharose, als mit Maltodextrin und PVP mit höheren T_g [20]. Der glasartige amorphe Zustand reicht zur Erklärung daher nicht aus.

Anhand der oben zusammengefassten Ergebnisse der Rez. VT7,4 lässt sich die Komplexität der Stabilisierungsvorgänge durch Überlagerung mehrerer Effekte beispielhaft studieren.

Trehalose haftet seit längerer Zeit ein Mythos an, über besondere Stabilisierungseigenschaften zu verfügen. Crowe et al. relativierten inzwischen einige Annahmen. Bei der Stabilisierung biologischer Membranen wurde festgestellt, dass Trehalose anderen Zuckern überlegen war. Das bedeutete aber nicht, dass mit anderen Zuckern keine Stabilisierung möglich war, sondern, dass z. B. Saccharose genauso stabilisierend wirkte, jedoch höhere Konzentrationen für den gleichen Stabilisierungseffekt notwendig waren. Unter idealen Bedingungen für Trocknung und Lagerung ist Trehalose kein speziell zu bevorzugender Hilfsstoff. Aber unter suboptimalen Bedingungen erlaubt Trehalose eine sehr viel bessere Stabilisierung im Unterschied zu anderen Hilfsstoffen [201].

Eine besonders wichtige Eigenschaft von Trehalose ist der von Green und Angell berichtete sehr viel höher liegende T_g als bei allen anderen Disacchariden [202]. Für wasserfreie Trehalose wird ein T_g von 120 °C und für Saccharose ein T_g von 77 °C angegeben [203]. Bei einer angenommenen Lagertemperatur von 20 °C ist die Differenz zum T_g bei Trehalose ca. 100 °C und bei Saccharose nur ca. 47 °C. Da von Hancock bekannt ist, dass es auch unterhalb des T_g zu Instabilitäten kommen kann, so wird die Saccharose-Rezeptur schneller abgebaut werden als die Trehalose-haltige [97]. Durch Aufnahme von Wasser durch Adsorption von Luftfeuchtigkeit erniedrigt sich bei Saccharose sehr schnell der T_g auf einen Wert unterhalb der Lagertemperatur, während er bei Trehalose durch Aufnahme der gleichen Menge an Wasser oberhalb der Lagertemperatur bliebe.

An dieser Stelle kommt eine weitere wichtige Eigenschaft von Trehalose zum Tragen. Es ist bekannt, dass Trehalose unter Einschluss von Kristallwasser, wohingegen Saccharose in wasserfreier Form kristallisiert. Die Ausbildung von wasserfreien Kristallen setzt Wasser frei (Saccharose), während durch Bildung von Kristallwasser Wasser adsorbiert wird [20].

Gibbon et al beschreiben, dass Trehalose nur an der glasartigen Oberfläche Wasser adsorbiert, es daraufhin dort zum Auskristallisieren kommt und der innere Teil vor weiterer Wasseraufnahme geschützt wird [204]. Crowe et al. bestätigten diesen Prozess experimentell. Sie konnten nach Zugabe kleiner Mengen Wasser zu amorpher Trehalose sofort gebildete kristalline Trehalose bestimmen, wobei trotzdem der T_g unerwartet hoch blieb [205]. Yoshii et al zeigten, dass zwischen wasserfreier und -haltiger Form der Trehalose unter bestimmten Bedingungen ein reversibles Gleichgewicht bestehen könnte, da sich beide Formen leicht ineinander umwandeln ließen [206].

Mit Kenntnis dieser Zusammenhänge lassen sich die eigenen Daten erklären. Nach der Vakuumtrocknung von VT7,4 konnte ein T_g von 39 °C bei einem Restwassergehalt von 10,7 % bestimmt werden. Durch Gleichgewichtseinstellung in den gelagerten Vials zwischen der feuchten Probenmatrix und den getrockneten Stopfen erniedrigte sich der RWG um ca. 1,7-2,4 %. Mittels Röntgendiffraktometrie ließ sich ein vollamorpher Zustand direkt nach der Trocknung nachweisen (Abb. 5-14). Im Verlauf der Lagerung kam es bei allen vier Lagerungstemperaturen zur Bildung kristalliner Strukturen in der amorphen Matrix, die mit RD bestimmt werden konnten (Abb. 5-15, Abb. 5-16). Bei den 50 °C gelagerten Proben war der kristalline Anteil so groß, dass mit der DSC kein T_g mehr ermittelt werden konnte. Da diese Lagertemperatur oberhalb des T_g lag, wurde die Kristallisation besonders begünstigt. Bei den 20 °C gelagerten Proben stieg der T_g von 39 °C von Beginn der Einlagerung auf 53 °C nach 12 Wochen an. Ursache dafür könnte zum einen die Erniedrigung des RWG durch Gleichgewichtseinstellung im Vial sein. Zum anderen wurde Wasser der feuchten rubber-Matrix durch Bildung von Kristallwasser entzogen und damit der amorphe Anteil erhöht. Dies könnte zur Erhöhung des T_g geführt haben. Der große Vorteil von Trehalose gegenüber Saccharose scheint zu sein, dass Trehalose einen so hohen T_g besitzt und dieser selbst bei der Aufnahme von Wasser und Bildung von Kristallwasser hoch bleibt [205].

Wie oben beschrieben, konnten Rossi et al das Enzym *Eco* RI zusammen mit Trehalose vakuumtrocknen und trotz hoher Restfeuchte der Produkte eine hohe Aktivität nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen bestimmen [20]. Sie kamen bei der DSC-Untersuchung dieser Proben zum Schluss, dass der glasartige Zustand für die Stabilisierung in ihrem Falle nicht verantwortlich sein konnte [207]. Analog zu den Ergebnissen von Rossi verhielt sich die Rez. VT7,4. Trehalose bewies seine herausragenden Stabilisierungseigenschaften unter derartig ungünstigen Bedingungen. Trotz des hohen RWG ließ sich noch ein T_g von 39 °C und mit RD ein teilamorph/teilkristallines System bestätigen. G-CSF wurde durch eine amorphe Matrix stabilisiert, die durch den hohen Wasseranteil jedoch honigartig und nicht glasartig erstarrt war. Bei der Diskussion der beiden neutralen vakuumgetrockneten Rez. wäre aufgrund des großen Unterschiedes beim RWG und T_g zu erwarten gewesen, dass die amorphe Rez. VTP7,4 sich deutlich stabiler verhält als VT7,4. Bei der 4 °C und 20 °C Lagerung war die Phe-freie Rez. tendenziell stabiler. Damit konnte der amorphe glasartige Zustand nicht für die Stabilität ausschlaggebend sein. Es wird vermutet, dass die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen für die Stabilisierung verantwortlich war. Da es mit einer Ausnahme bei allen anderen neutralen Probenzubereitungen bei den Phe-freien Rez. zu einem höheren Monomergehalt kam, besteht die Möglichkeit, dass der Phe-Zusatz die Ausbildung von Wasserstoffbrücken behinderte. Die Zunahme an Monomer-Verlust bei erhöhter Lagertemperatur bei VT7,4 im Vergleich zu VTP7,4 lässt sich mit gesteigerter Aggregation durch die erhöhte Mobilität in der Nähe bzw. knapp unterhalb des T_g erklären. Im Vergleich dazu war das G-CSF bei VTP7,4 im amorphen Glas mit niedrigem RWG und hohem T_g fixiert.

Fazit:

Der Phe-Zusatz führte bei vakuumgetrockneten Trehalose-Rezepturen zu niedrigen Restwassergehalten und hohen T_g -Werten. Er konnte die Stabilität der sauren Proben positiv beeinflussen, während er leicht destabilisierend bei den neutralen wirkte. Allerdings zeigten die neutralen Rezepturen entgegen der bekannten Tatsache eine höhere Stabilität als die sauren. Besonders eindrucksvoll bewies Trehalose ihr Stabilisierungsvermögen bei der Phe-freien vakuumgetrockneten Rezeptur mit pH7,4. Diese Proben wiesen trotz hoher Restfeuchte und niedrigem T_g einen vergleichbaren Monomer-Gehalt zur Phe-haltigen Rez. auf. Trehalose besitzt in der Tat unter derartigen suboptimalen Bedingungen herausragende Stabilisierungseigenschaften.

5.2.4. G-CSF-Rezepturen mit Saccharose-Arginin-Phenylalanin

Alle GT- und VT-Proben ließen sich zu klaren Lösungen rekonstituieren. Bei der flüssigen sauren SAP-Rez. war nur die Probe nach 12 Wochen 40 °C Lagerung trüb und alle anderen klar. Die Instabilität der flüssigen neutralen SAP-Rez. war bereits von den Versuchen vorher bekannt. Alle bei 30 °C und 40 °C gelagerten Proben zeigten Trübung, der Rest war klar. Bei GSAP7,4 konnte eine Gelbfärbung der rekonstituierten Proben in Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur und Lagerdauer beobachtet werden.

Beide Rezepturen hätten aufgrund des Phe-Zusatzes niedrige Restfeuchten und hohe T_g -Werte erzielen sollen. Die hohen RWG und niedrigen T_g -Werte von VSAP4 waren sehr auffällig für eine Phe-haltige Rezeptur (Abb. 5-19). Diese wurden durch das in der Rezeptur enthaltene Arginin verursacht. Arginin ist eine basische Aminosäure. Bei der Rezepturherstellung wird zur Einstellung auf pH 4 eine größere Menge an Salzsäure benötigt als für pH 7,4. Ausgehend vom basischen pH-Wert des Arginin muss für pH 4 über den Wendepunkt des entstehenden Arginin-Hydrochlorid-Puffers bei ungefähr pH 5,7 angesäuert werden. Durch dieses notwendige starke Ansäuern wird der Salzgehalt der Rezeptur erhöht, wodurch die Trockenbarkeit der Rezeptur negativ beeinflusst wird. Bei der Gefriertrocknung wirkte sich der erhöhte Salzgehalt offensichtlich nicht negativ aus. Die korrespondierenden T_g -Werte ergaben für VSAP7,4 niedrigere Werte als für die anderen Proben (Tab. 5-9).

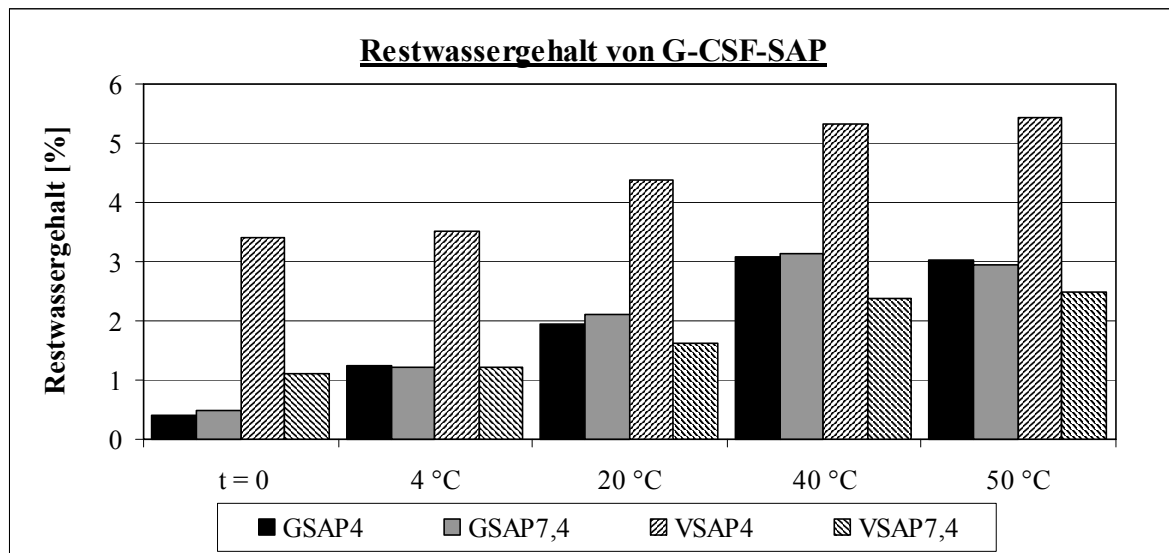


Abb. 5-19: Restwassergehalte von G-CSF-SAP

T_g [°C]	SAP4	SAP7,4
GT	≥ 47	≥ 45
VT	47-64	25-44

Tab. 5-9: T_g -Werte von G-CSF-SAP

Der Monomer-Verlust durch die Trocknung war bei beiden Rezepturen und beiden Trocknungsverfahren mit 6-8 % vergleichbar groß. Während der Lagerung nahm der Monomer-Gehalt um weiter 6-8 % ab.

Monomer-Verlust [%]	SAP4	SAP7,4
GT-Prozess	5,9	6,5
Lagerung GT-Proben	ca. 7	ca. 8
VT-Prozess	6,4	7,8
Lagerung VT-Proben	ca. 6	ca. 7

Tab. 5-10: Monomer-Verlust durch Trocknungsprozess und Lagerung

Bei den flüssigen Rezepturen war, wie aus der Literatur bekannt, pH 4 stabiler als pH 7,4. Bei den getrockneten Rez. waren die Unterschiede zwischen den beiden pH-Werten minimal.

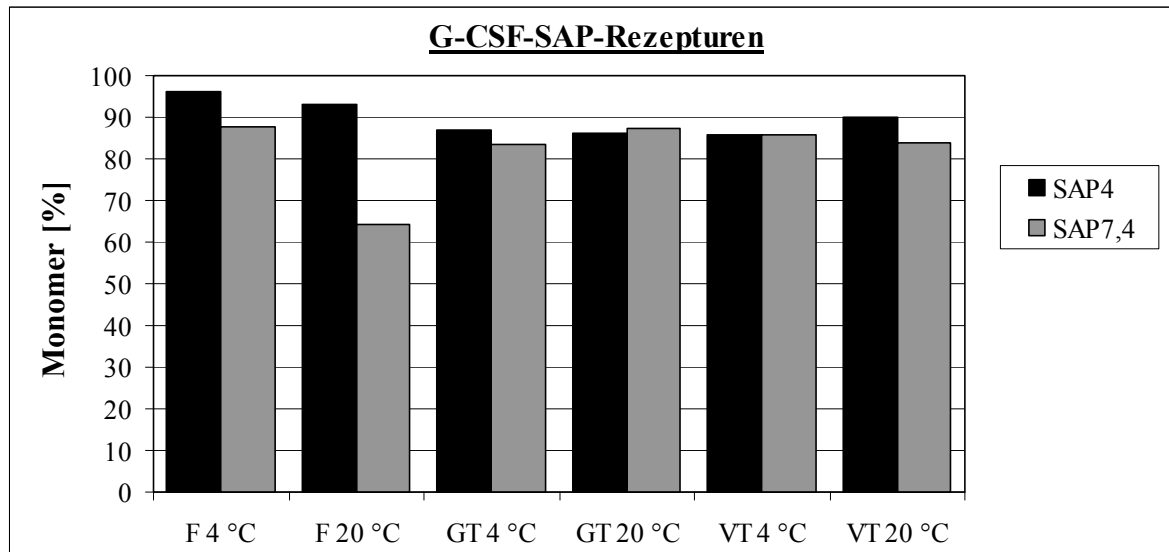


Abb. 5-20: G-CSF-Gehalte in SAP-Rezepturen

Abb. 5-21 zeigt den Verlauf der Aggregation der beiden flüssig gelagerten Rezepturen. Rez. SAP 7,4 bei 40 °C Lagerung war bereits nach vier Tagen aggregiert. Bei der sauren Rez. sank der Gehalt nach 12 Wochen 40 °C Lagerung auf 60 % bzw. für 30 °C auf 90 % Monomer ab.

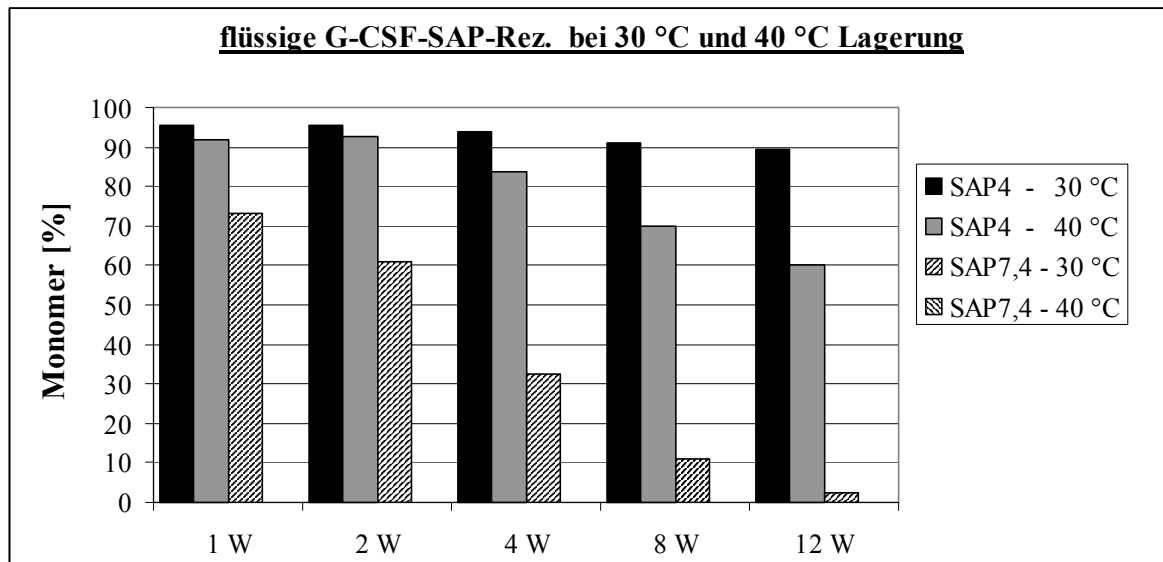


Abb. 5-21: G-CSF-Gehalte flüssiger SAP-Rezepturen bei 30 °C und 40 °C Lagerung (Rez. SAP7,4 bereits ab 1 Woche Lagerung vollkommen aggregiert)

Fazit:

Alle vier getrockneten Rezepturen zeigten eine vergleichbar gute Stabilität mit hohen Monomer-Gehalten. Bei den flüssigen Zubereitungen verhielt sich die neutrale Rezeptur sehr viel instabiler. Bei niedrigen Lagertemperaturen war die flüssige Rez. SAP4 allen getrockneten Rez. überlegen.

5.2.5. G-CSF-Rezepturen mit HP- β -cyclodextrin mit und ohne Phenylalanin-Zusatz

Alle Phe-freien flüssigen und alle getrockneten Cyclodextrin-Proben ließen sich klar rekonstituieren. Die flüssigen Phe-haltigen Cyclodextrin-Rezepturen zeigten nach 6 bzw. 12 Wochen Opaleszenz. Bei FCDP7,4 und FCDP-EPO konnte zusätzlich ab dem Lagerungszeitpunkt 6 Wochen eine Gelbfärbung der Proben in Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur beobachtet werden.

Die Restwassergehalte der vier G-CSF-Cyclodextrin-Rez. lagen nach der Trocknung bei ca. 0,1 % und erhöhten sich infolge der Lagerung auf Werte kleiner 1,5 %. Die zugehörigen T_g -Werte befanden sich alle größer 74 °C (Tab. 5-11). Durch Vakuumtrocknung konnten höhere T_g -Werte erhalten werden. Der Zusatz von Phenylalanin erniedrigte teilweise den T_g . Der Phe-Zusatz somit zu keiner weiteren Steigerung des T_g , sondern wirkte sich negativ aus.

T_g [°C]	CD4	CDP4	CD7,4	CDP7,4
GT	≥ 85	≥ 78	≥ 81	≥ 74
VT	≥ 99	≥ 81	≥ 89	≥ 90

Tab. 5-11: T_g -Werte von G-CSF-HP- β -CD

Durch die Trocknung sank der Monomer-Gehalt um ca. 4-9 %. Während der Lagerung trat bei VCDP7,4 nur ein Gehalts-Verlust von 4 % auf. Bei GCD4, GCDP,4 und VCDP4 reduzierte sich der Gehalt um 13-14 %, bei allen anderen Rez. um 6-9 % (Tab. 5-12). In Summe ergaben sich 18 % bei allen sauren Rez., wohingegen bei den neutralen Rez. nur 9-13 % Abnahme aufgetreten war.

Monomer-Verlust [%]	CD4	CDP4	CD7,4	CDP7,4
GT-Prozess	4,3	3,8	4,3	4,8
Lagerung GT-Proben	ca. 14	ca. 13	ca. 8	ca. 6
VT-Prozess	9,2	5,4	6,6	5,4
Lagerung VT-Proben	ca. 9	ca. 13	ca. 6	ca. 4

Tab. 5-12: Monomer-Verlust durch Trocknungsprozess und Lagerung

Bei beiden flüssigen neutralen CD-Rez. kam es zu einem rapiden Monomer-Verlust. Nach 4 Wochen 40 °C Lagerung konnten nur noch 10 % Monomer detektiert werden. Aus diesem Grund ergibt sich auch in der Abb. 5-22 die Lücke bei F 40 °C. Dieses Aggregations-Verhalten wurde wieder durch den ungünstigen neutralen pH-Wert der flüssigen Rez. verursacht. Die Proben zeigten trotzdem keine Trübung oder erhöhte Partikelzahlen. Offensichtlich wurden die gebildeten Aggregate durch das Cyclodextrin solubilisiert und maskiert.

Bemerkenswert war das Stabilisierungs-Verhalten von FCDP4. Nach 12 Wochen 40 °C Lagerung konnten noch 78 % Monomer detektiert werden. Dieser Wert war zugleich der höchste Wert für flüssige Rez. mit Phe-Zusatz.

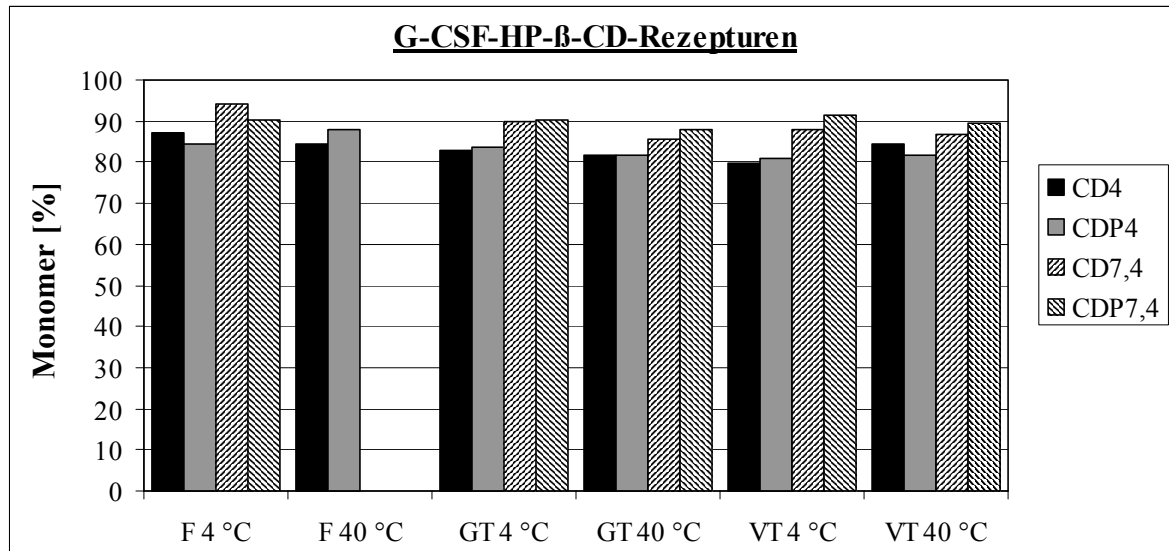


Abb. 5-22: G-CSF-Gehalte in HP-β-CD/HP-β-CD-Phenylalanin-Rezepturen
(Werte von CD7,4 und CDP7,4 bei F 40 °C waren 0 %)

Bei beiden pH-Werten waren die flüssigen Phe-freien Rez. stabiler als die Phe-haltigen. Durch den Phe-Zusatz konnte dagegen bei beiden Trocknungsverfahren bei pH 7,4 die Stabilität erhöht werden. Im Unterschied dazu konnte bei beiden Trocknungsverfahren bei pH 4 kein Unterschied zwischen den Phe-freien und Phe-haltigen Rez. festgestellt werden.

Die guten Ergebnisse der Stabilisierung mit dem Cyclodextrin-Derivat stehen im Einklang mit zahlreichen Veröffentlichungen. Andere Arbeitsgruppen gelang es erfolgreich die Denaturierung von pGH und die Inaktivierung von β-Galctosidase zu verhindern oder IL-2 zu stabilisieren [54,115,208].

Zwei wichtige Eigenschaften der Cyclodextrine werden für den Mechanismus der Stabilisierung verantwortlich gemacht. Einerseits erhöhen sie die Oberflächenspannung der Lösung, andererseits sind sie geeignet, um Wechselwirkungen mit Teilstrukturen von Proteinen einzugehen und auf diese Weise hydrophobe Bereiche zu maskieren. Durch diese Eigenschaften erniedrigt sich der Anteil an hydrophober Bereiche an der Proteinoberfläche. Die Neigung zu Protein-Aggregation, die ebenfalls zum Ziel hat den Anteil lipophiler Bereiche zu erniedrigen, wird dadurch gehemmt. Außerdem erschweren Cyclodextrine die Ausbildung von Protein-Protein-Bindungen [114,209,210].

Die Komplexeigenschaften der Cyclodextrine besitzen aber auch einen Nachteil. Sie stabilisieren die infolge von Denaturierung neu geschaffenen hydrophoben Bereiche genauso wie den nativen gefalteten Zustand [209,211,212].

Fazit:

Während bei den flüssigen Proben pH 4 die stabilere Rez. war, lieferten bei den getrockneten pH 7,4 höhere Monomer-Gehalte. Vergleichbar mit Agenamalt konnten durch Cyclodextrin auch ohne Phe-Zusatz niedrige RWG bei gleichzeitig hohen T_g -Werten erhalten werden. Im Unterschied zu Agenamalt mit 68-81 % Monomer konnten mit Cyclodextrin 79-94 % Monomer-Gehalt erzielt werden.

Am auffälligsten war die hohe Stabilität von FCD4 und FCDP4. Bei keiner der anderen flüssigen Rezepturen konnten selbst nach 12 Wochen 40 °C Lagerung Monomer-Gehalte von 85 % bzw. 78 % erzielt werden. Die getrockneten Produkte zeigten alle hohe Monomer-Gehalte, die größer waren als bei den meisten der anderen Rezepturen.

5.3. Stabilität von EPO-Zubereitungen

In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen der EPO-Zubereitungen diskutiert.

5.3.1. EPO-Rezepturen mit Agenamalt mit und ohne Phenylalanin-Zusatz

Bei allen Agenamalt-EPO-Rezepturen konnte zu allen Probezeitpunkten eine Trübung der Proben beobachtet werden, die durch das Agenamalt ausgelöst wurde.

Zwischen den Restwassergehalten der Phe-freien und Phe-haltigen bestand kein großer Unterschied. Bei den 20 °C, 40 °C und 50 °C gelagerten Proben zeigten jeweils die Phe-haltigen einen minimal höheren RWG (Abb. 5-23). Die T_g -Werte stimmten mit den RWG überein (Tab. 5-13). Der Phe-Zusatz führte bei der Vakuumtrocknung zu keinem trockenungsverbessernden Effekt.

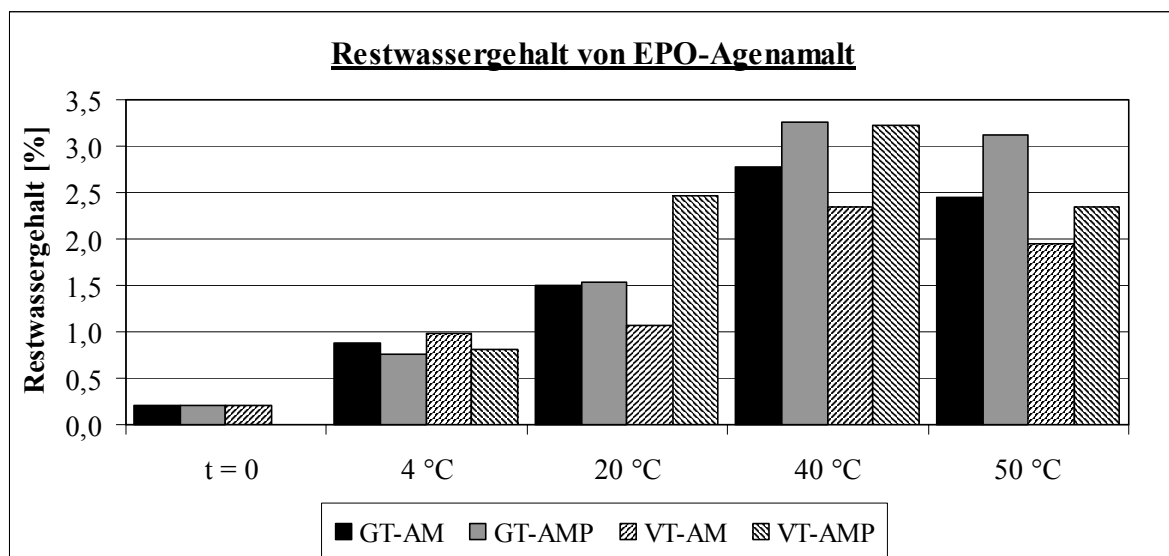


Abb. 5-23: Restwassergehalte von EPO-Agenamalt (Wert von VT-AMP bei t = 0 war 0 %)

T_g [°C]	AM-EPO	AMP-EPO
GT	≥ 76	≥ 78
VT	90-110	57-150

Tab. 5-13: T_g -Werte von EPO-Agenamalt

Der Monomer-Verlust durch Trocknung fiel mit 12 % bei Phe-freien Rez. gegenüber 9-10 % bei Phe-haltigen Rez. minimal höher aus. Während der Lagerung war der Monomer-Verlust bei allen vier Rezepturen mit 11-13 % gleich hoch. Der Phe-Zusatz wirkte sich nur geringfügig positiv auf die Stabilität bei der Trocknung aus (Tab. 5-14).

Monomer-Verlust [%]	AM-EPO	AMP-EPO
GT-Prozess	11,7	9,8
Lagerung GT-Proben	ca. 12	ca. 13
VT-Prozess	11,9	9,3
Lagerung VT-Proben	ca. 12	ca. 11

Tab. 5-14: Monomer-Verlust durch Trocknungsprozess und Lagerung

Nach 12 Wochen 4 °C bzw. 20 °C Lagerung zeigten sich nur geringe Monomer-Verlust-Unterschiede zwischen den flüssigen, gefrier- und vakuumgetrockneten Proben (Abb. 5-24). Von den Handelsprodukten ist bekannt, dass EPO sowohl als flüssige, als auch gefriergetrocknete Form auf dem Markt ist (siehe Einleitung).

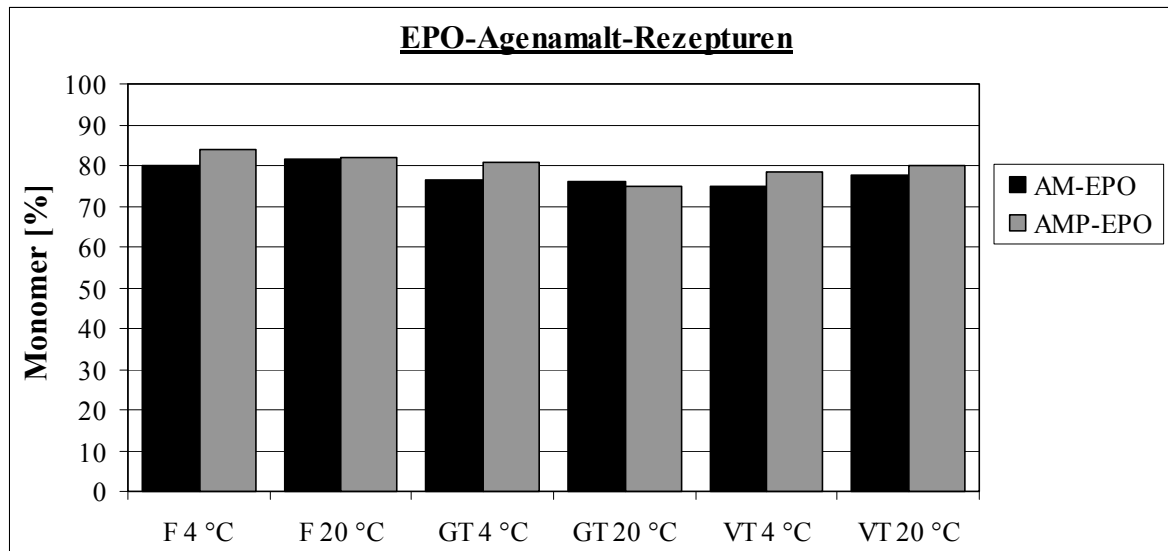


Abb. 5-24: EPO-Gehalte in Agenamalt/Agenamalt-Phenylalanin-Rezepturen

Bei 40 °C Lagerung erniedrigte sich innerhalb von 12 Wochen bei der flüssigen Phe-haltigen Rez. der Monomer-Gehalt auf 37 % im Unterschied zu 57 % der Phe-freien Rez..

Der hohe Monomer-Verlust bei den getrockneten EPO-Rezepturen wurde vermutlich wie bei G-CSF durch sterische Hinderung bei der Ausbildung von Wasserstoffbrücken verursacht. Da es sich bei EPO um ein Glycoprotein mit 4 Glycosidketten handelt, konnte Agenamalt wegen sterischer Hinderung durch die Zuckerreste weniger Wasserstoffbrücken mit EPO ausbilden. Es fand sicher auch eine Wechselwirkung der Hydroxylgruppen der Zuckerreste mit Agenamalts statt. In wieweit diese Wasserstoffbrückenbindungen zur Stabilisierung des EPO beitragen konnten blieb unklar.

Die untersuchten EPO-Agenamalt-Rezepturen unterstreichen mit ihren Ergebnissen erneut, dass die Anwesenheit von amorphen glasartigen Strukturen nicht zur Stabilisierung ausreichen.

Fazit:

Zwischen den drei Zubereitungsformen bestanden nur geringe Unterschiede in der Stabilität. Im Vergleich zu der G-CSF-Formulierung fiel auf, dass bei EPO auch die flüssige Form eine fast vergleichbare Stabilität zu den getrockneten Proben besaß. Insgesamt hatte der Phe-Zusatz genau wie die beiden Trocknungsverfahren keinen nennenswerten Einfluss auf die Stabilität und die Trocknung.

5.3.2. EPO-Rezepturen mit Raftilose mit und ohne Phenylalanin-Zusatz

Alle Raftilose-Proben konnten klar rekonstituiert werden.

Der Phe-Zusatz hatte nur bei der Vakuumtrocknung einen positiven Einfluss auf den RWG und den T_g -Wert und keinen bei den gefriergetrockneten Proben (Abb. 5-25, Tab. 5-15).

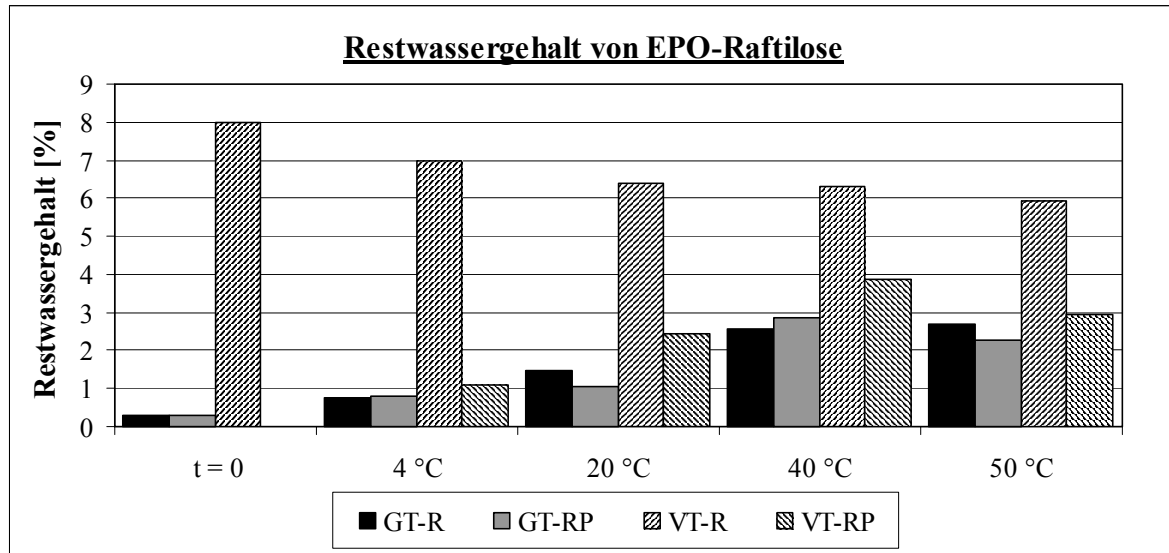


Abb. 5-25: Restwassergehalte von EPO-Raftilose (Wert von VT-RP bei t = 0 war 0 %)

T_g [°C]	R-EPO	RP-EPO
GT	≥ 55	≥ 57
VT	32-46	66-92

Tab. 5-15: T_g -Werte von EPO-Raftilose

Durch die Trocknung reduzierte sich der Monomer-Gehalt bei der vakuumgetrockneten Phe-haltigen Raftilose-Rez. nur um 13 %, während er sich um 17 % bei den anderen drei Rezepturen verringerte (Tab. 5-16). Der Gehalt-Verlust durch die Lagerung lag bei beiden Phe-freien Rez. bei 6 % und bei 11 % für die vakuumgetrocknete Phe-haltige Rez. Die gefriergetrocknete Variante zeigte dagegen eine Monomer-Verlust von 12-32 % (Tab. 5-16).

Monomer-Verlust [%]	R-EPO	RP-EPO
GT-Prozess	17,4	17,3
Lagerung GT-Proben	ca. 6	ca. 12-32
VT-Prozess	17,1	12,8
Lagerung VT-Proben	ca. 5	ca. 11

Tab. 5-16: Monomer-Verlust durch Trocknungsprozess und Lagerung

Der Phe-Zusatz führte bei den getrockneten Proben beide Male zu einer stärkeren Aggregation (Tab. 5-16, Abb. 5-26). Die 4 °C gelagerten Proben der Vakuumtrocknung bildeten in diesem Fall eine Ausnahme.

Der Phe-Zusatz übte bei den flüssigen Formulierungen eine stabilisierende Wirkung bei allen Lagertemperaturen aus. Nach 12 Wochen 40 °C Lagerung lagen noch mehr als 59 % Monomer vor (siehe Anlagen).

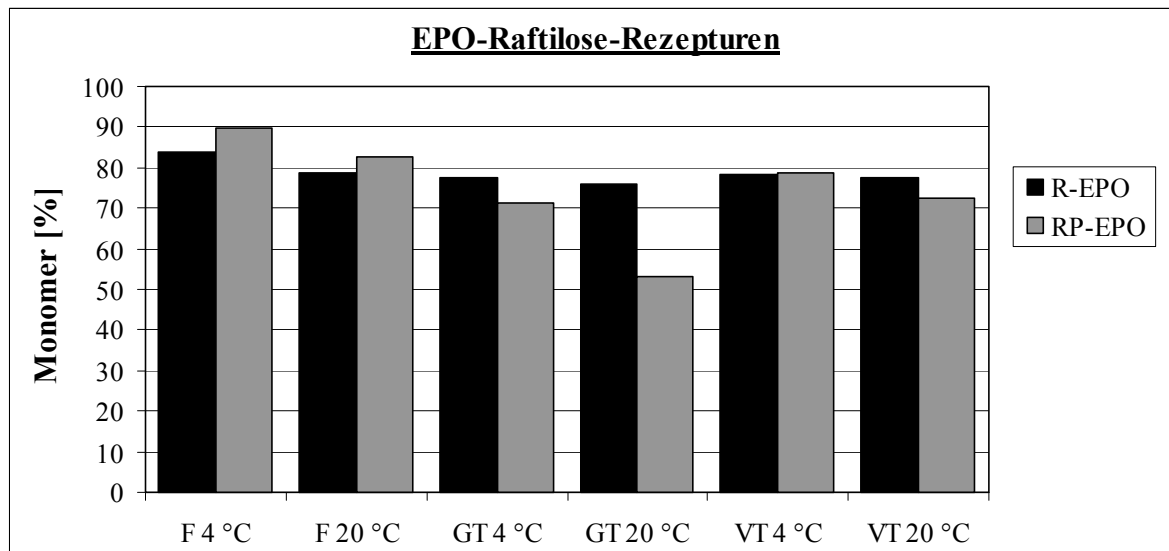


Abb. 5-26: EPO-Gehalte in Raftilose/Raftilose-Phenylalanin-Rezepturen

Während die trockenen Proben bei hohen Temperaturen hinsichtlich der Stabilität den flüssigen überlegen waren, drehte sich dies bei niedrigen Temperaturen zugunsten der flüssigen Rez. um. Eine große Ausnahme war in diesem Zusammenhang die Rez. GRP-EPO. Bei 40 °C und 50 °C Lagerung kam es zu sehr starkem Monomer-Verlust (Abb. 5-27). Eine Ursache für dieses Verhalten konnte nicht gefunden werden.

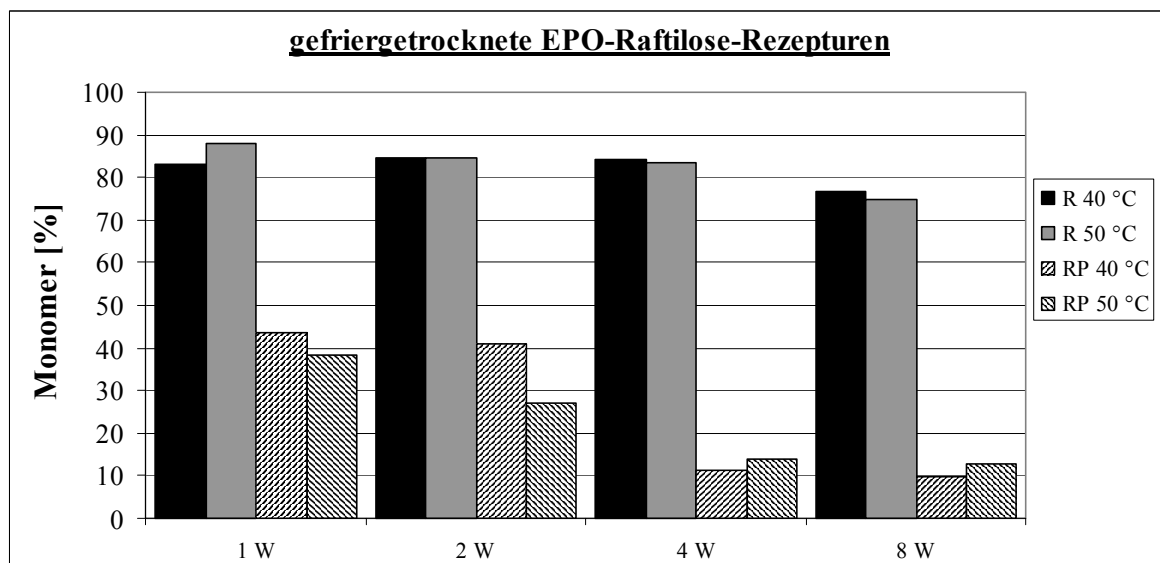


Abb. 5-27: EPO-Gehalte gefriergetrockneter Raftilose-Rezepturen nach 12 Wochen Lagerung

Die Instabilität bei den getrockneten Raftilose-Rez. war vergleichbar hoch zu den getrockneten Agenamalt-EPO-Rez.. Dies lässt sich damit erklären, dass es durch die Glycosidketten des EPOs zur sterischer Hinderung der Raftilose bei der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen gekommen sein musste. Bei G-CSF zeigte der lineare Aufbau der Raftilose im Vergleich zum helical aufgebauten Agenamalt eine höhere Stabilisierung. Diese wird hier durch Wechselwirkungen zwischen der Raftilose und den Zuckerketten von EPO geschmälert.

Fazit:

Die Verbesserung des Restwassergehaltes und des T_g -Wertes durch den Phe-Zusatz war für die vakuumgetrockneten Proben erwartet worden und konnte bestätigt werden.

Der Phe-Zusatz führte bei den flüssigen Zubereitungen zu einer Verbesserung der Stabilität, wohingegen bei den vakuumgetrockneten kein Einfluss beobachtet werden konnte. Sehr überraschend war die große Destabilisierung der gefriergetrockneten Phe-haltigen EPO-Rezepturen bei erhöhten Lagertemperaturen.

5.3.3. EPO-Rezepturen mit Trehalose mit und ohne Phenylalanin-Zusatz

Alle Trehalose-Proben konnten klar rekonstituiert werden.

Erst durch den Einsatz von Phenylalanin ließen sich mit Vakuumtrocknung Produkte mit niedriger Restfeuchte erzielen, die gleichwertig zu gefriergetrockneten Proben waren. Ohne Phenylalanin blieb der RWG bei 11 % stehen und variierte durch die Gleichgewichtseinstellung in den Vials nach 12 Wochen Lagerung zwischen 8-11 % (Abb. 5-28).

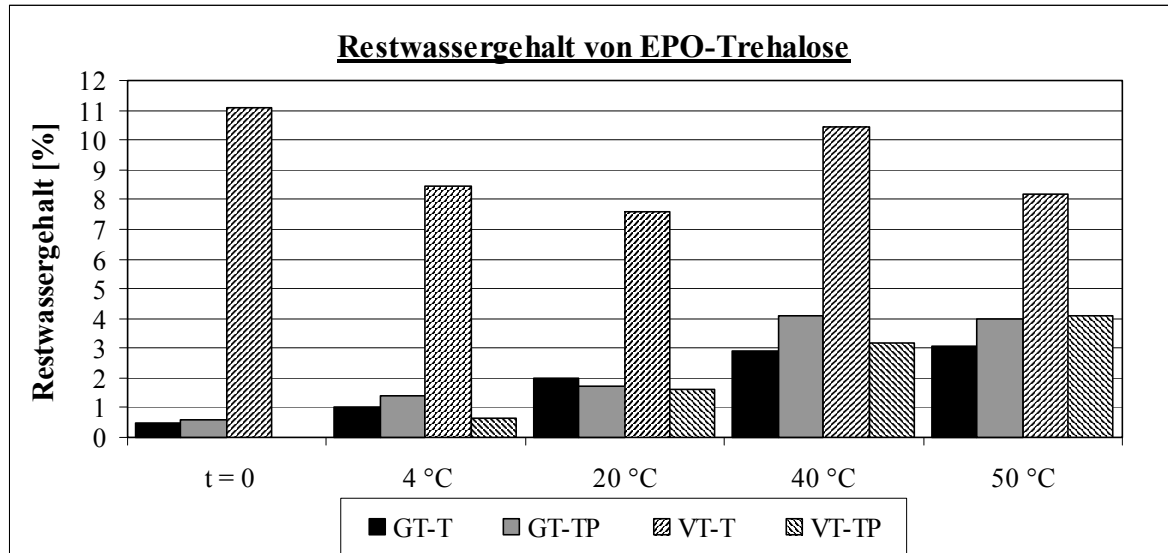


Abb. 5-28: Restwassergehalte von EPO-Trehalose (Wert von VT-TP bei t = 0 war 0 %)

Durch Gefriertrocknung resultierten T_g -Werte größer 66 °C (Phe-freie Rez.) bzw. größer 46 °C (Phe-haltige Rez.). Bei vakuumgetrockneten Proben konnte nach der Trocknung bei den Phe-freien ein T_g von 65 °C ermittelt werden. Während der Lagerung kristallisierte Trehalose teilweise aus, so dass nur noch bei der 4 °C gelagerten Probe ein T_g von 36 °C messbar war. Durch den Phe-Zusatz erhöhte sich der T_g der vakuumgetrockneten Proben auf 94 °C. Nach der Lagerung lagen die Werte zwischen 69 °C und 94 °C (Tab. 5-17).

T_g [°C]	T-EPO	TP-EPO
GT	≥ 66	≥ 46
VT	36-65	69-94

Tab. 5-17: T_g -Werte von EPO-Trehalose

Diese Ergebnisse konnten durch Röntgenstrukturanalyse bestätigt werden. Bei den vakuumgetrockneten Phe-freien Proben waren die RD-Ergebnisse denen der neutralen Trehalose-Rez. des G-CSF analog. Während die Proben direkt nach der Vakuumtrocknung noch amorph vorlagen, wandelten sie sich im Laufe der Lagerung teilweise in die kristalline Modifikation um. Obwohl auch bei der 4 °C gelagerten Probe ein teilkristallines RD-Signal erhalten wurde, konnte mit der DSC noch ein T_g gemessen werden.

Durch die Trocknung wurde bei VTP-EPO nur ein Monomer-Verlust von 7 % ausgelöst. Bei den drei anderen Proben lag er bei 11-12 %. Die geringste Gehaltsabnahme zeigte sich mit 6 % bei gefriergetrockneter Phe-freien Proben nach der Lagerung. Beide vakuumgetrockneten Rezepturen verloren 11 % Monomer während der Lagerung. Eine Abnahme von 16-41 % zeigte sich bei GTP-EPO (Tab. 5-18).

Monomer-Verlust [%]	T-EPO	TP-EPO
GT-Prozess	11,9	11,9
Lagerung GT-Proben	ca. 6	ca. 16-41
VT-Prozess	10,8	7,4
Lagerung VT-Proben	ca. 11	ca. 11

Tab. 5-18: Monomer-Verlust durch Trocknungsprozess und Lagerung

Nach 12 Wochen Lagerung bei 4 °C und 20 °C wiesen die beiden flüssigen Rezepturen die höchsten Monomer-Gehalte auf. Bei 40 °C und 50 °C Lagerung zeigten GT-EPO und VTP-EPO die besten Ergebnisse (Abb. 5-29).

Bei den flüssigen und vakuumgetrockneten Proben führte der Phe-Zusatz zu einer Verbesserung der Stabilität, wohingegen bei den gefriergetrockneten Rezepturen eine starke Destabilisierung folgte. Dieses Verhalten war bereits bei den gefriergetrockneten Phe-haltigen Raftilose-EPO-Rez. festgestellt worden.

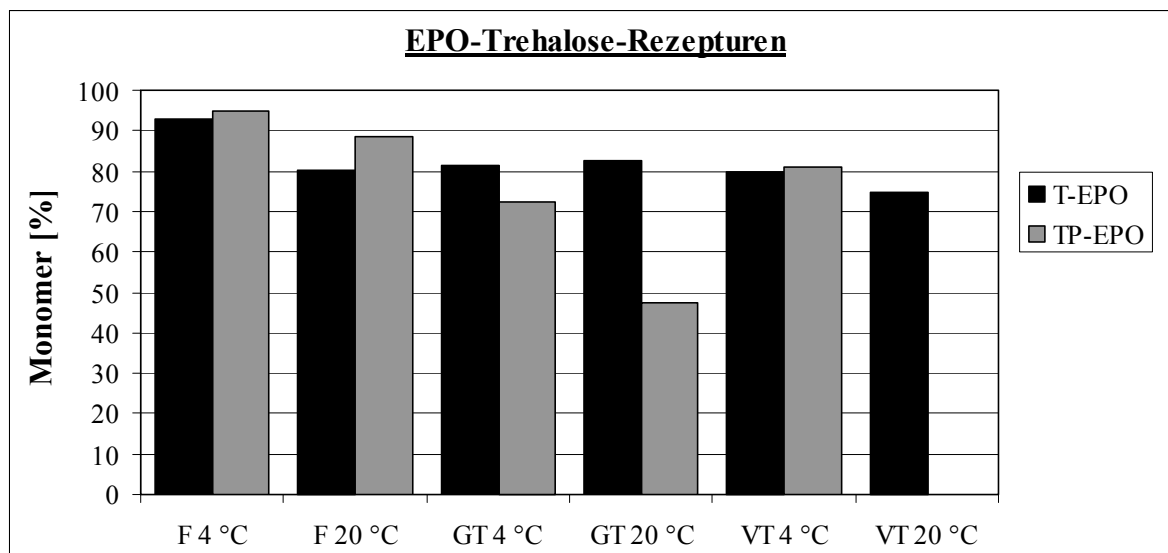


Abb. 5-29: EPO-Gehalte in Trehalose/Trehalose-Phenylalanin-Rezepturen (VT-TP bei 20 °C fehlt)

Wie schon bei G-CSF überrascht auch bei EPO die vergleichbare Stabilität der vakuumgetrockneten Phe-freien Rez. gegenüber der Phe-haltigen. Auch in diesem Beispiel wird für diese Beobachtung die gleiche Erklärung herangezogen. Trehalose stabilisierte unter diesen suboptimalen Bedingungen mit hohem RWG und niedrigem T_g EPO in überraschender Weise.

Fazit:

Bei der Vakuumtrocknung konnte durch den Phe-Zusatz der Restwassergehalt sehr stark gesenkt werden und das Auskristallisieren der Trehalose im Vergleich zur Phe-freien Rez. verhindert werden. Während der Phe-Zusatz bei den GT-Proben zu einer starken Destabilisierung führte, konnte bei den flüssigen und vakuumgetrockneten Proben eine Verbesserung der Stabilität erzielt werden. In Anbetracht der Tatsache, dass VT-EPO während der Lagerung aufgrund des hohen Restwassergehalten teilweise auskristallisierte, waren die hohen Monomer-Gehalte im Vergleich zu denen der amorph gebliebenen GT-EPO-Proben überraschend. Sie zeigten jedoch das große Stabilisierungspotential der Trehalose unter derartig suboptimalen Bedingungen auf.

5.3.4. EPO-Rezepturen mit Saccharose-Arginin-Phenylalanin

Alle SAP-Proben konnten zu einer klaren Lösung rekonstituiert werden.

Bei der gefriergetrockneten Rezeptur stieg der Restwassergehalt von 0,8 % auf 3,6 % und bei der vakuumgetrockneten von 2,3 % auf 4,6 % an (Abb. 5-30). Die zugehörigen T_g -Werte lagen bei ≥ 46 °C (GSAP-EPO) und zwischen 32 °C und 46 °C (VSAP-EPO) (Tab. 5-19).

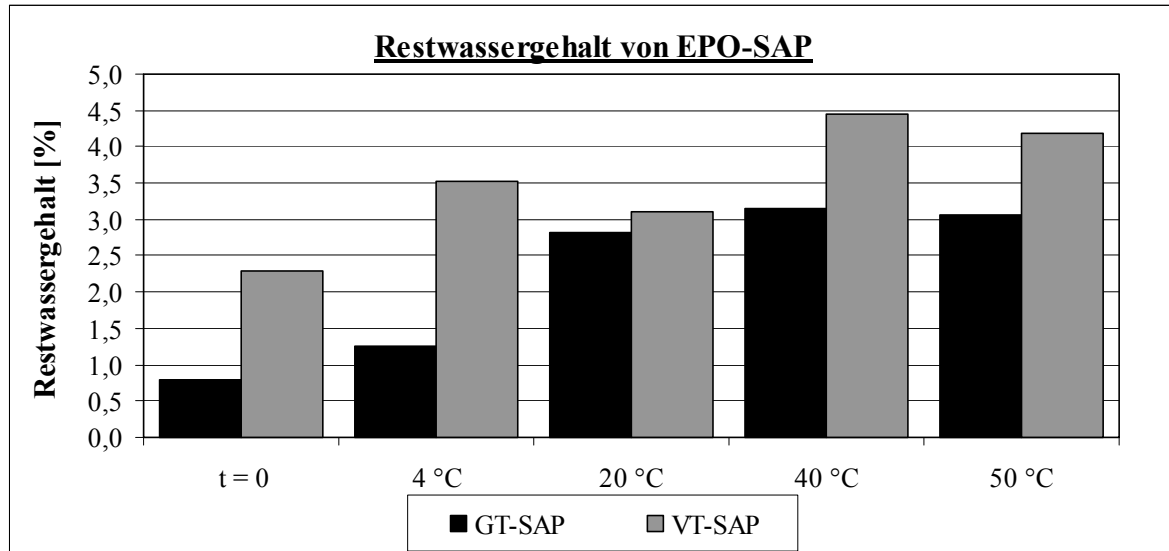


Abb. 5-30: Restwassergehalte von EPO-SAP

T_g [°C]	SAP-EPO
GT	≥ 46
VT	32-46

Tab. 5-19: T_g -Werte von EPO-SAP

Der Monomer-Verlust durch Trocknung war bei beiden Rez. mit 8 % gleich groß. Während die vakuumgetrockneten Proben bei 4 °C und 20 °C Lagerung nur ca. 10 % Gehalt einbüßten, waren es bei den gefriergetrockneten 11-31 % (Tab. 5-20).

Monomer-Verlust [%]	SAP-EPO
GT-Prozess	8,3
Lagerung GT-Proben	ca. 11-31
VT-Prozess	7,6
Lagerung VT-Proben	ca. 10

Tab. 5-20: Monomer-Verlust durch Trocknungsprozess und Lagerung

In Abb. 5-31 fällt auf, dass sich die flüssige Zubereitung bei 4 °C und 20 °C Lagerung stabiler als die beiden getrockneten verhielt, wobei dies bei 40 °C Lagerung dann wieder umgekehrt war.

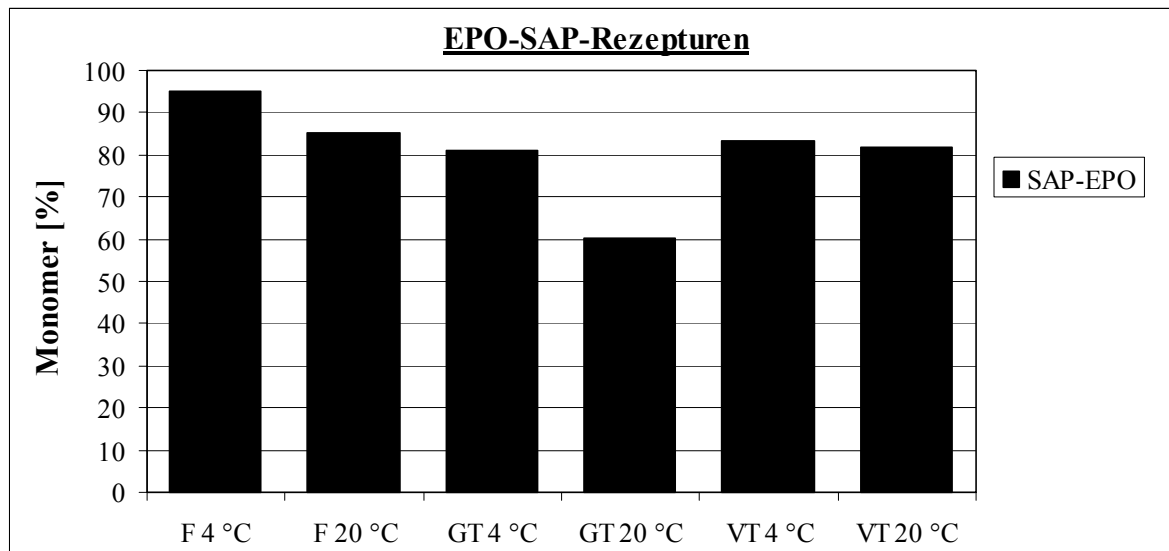


Abb. 5-31: EPO-Gehalte in SAP-Rezepturen

Mattern erhielt mit einer Saccharose:Arginin:Phenylalanin = 50:10:10 mg/ml EPO-Formulierung durch Vakuumtrocknung stabile Produkte ohne Gehalts-Verlust durch den Trocknungsprozess, die selbst nach 60 Wochen Lagerung nur einen Monomer-Verlust kleiner 1,5 % aufwiesen [17]. Die in dieser Arbeit verwendete Rezeptur unterscheidet sich nur durch einen um jeweils 5 mg/ml höheren Aminosäureanteil. Dieser Unterschied kann nicht ursächlich für die verschiedenen ausgeprägte Stabilität verantwortlich gemacht werden. Vielmehr können Parameter wie der Trocknungsprozess und die unterschiedliche pH-Einstellung Auslöser gewesen sein. Mattern benutzte Phosphorsäure, während in dieser Arbeit Salzsäure zur pH-Einstellung angewendet wurde. Dass die Art der Säure einen sehr großen Einfluss auf den T_g ausüben kann, ist von Placebo-Versuchen von Mattern bekannt. Arginin:Phenylalannin 20,9 :19,8 auf pH 7,4 eingestellt ergaben mit Salzsäure einen T_g von 71 °C und mit Phosphorsäure 113 °C. So ist es nicht verwunderlich, dass bei Mattern ein T_g von 87 °C resultierte, wohingegen hier nur Werte größer 46 °C erzielt wurden.

Fazit:

Trotz Verwendung der optimierten SAP-Rez. ließ sich mit Vakuumtrocknung nur ein Restwassergehalt von 2 % erzielen, der infolge der Lagerung auf 4,5 % zunahm. Aber auch bei den gefriergetrockneten Proben kam es während der Lagerung zu einem Anstieg der Restfeuchte und Erniedrigung des T_g . Bei beiden trockenen Produkten lag der Monomer-Gehalt bei 4 °C und 20 °C Lagerung unterhalb der flüssigen Proben. Auslöser für die niedrigen Monomer-Gehalte dürfte die Verwendung von Salzsäure anstelle von Phosphorsäure zur Einstellung der Rezeptur gewesen sein. Bei Mattern ließ sich die Phosphorsäure-haltige Rezeptur ohne Monomer-Verlust vakuumtrocknen und unter gleichen Bedingungen lagern [17].

5.3.5. EPO-Rezepturen mit HP- β -CD mit und ohne Phenylalanin-Zusatz

Alle Cyclodextrin-Proben konnten zu einer klaren Lösung rekonstituiert werden. Nach 12 Wochen Lagerung wurde bei den flüssigen Phe-haltigen CD-Rez. Opaleszenz und Gelbfärbung in Abhängigkeit von der Lagertemperatur festgestellt.

Die Restwassergehalte der beiden Rezepturen ergaben bei beiden Trocknungsmethoden Werte kleiner 1 % nach Trocknung und Lagerung. Mit der Vakuumtrocknung, sowie mit den Phe-freien Rez. konnten jeweils höhere T_g -Werte als mit der Gefriertrocknung bzw. der Phe-haltigen Rez. erzielt werden (Tab. 5-21).

T_g [°C]	CD-EPO	CDP-EPO
GT	≥ 93	≥ 76
VT	≥ 106	≥ 98

Tab. 5-21: T_g -Werte von EPO-HP- β -CD

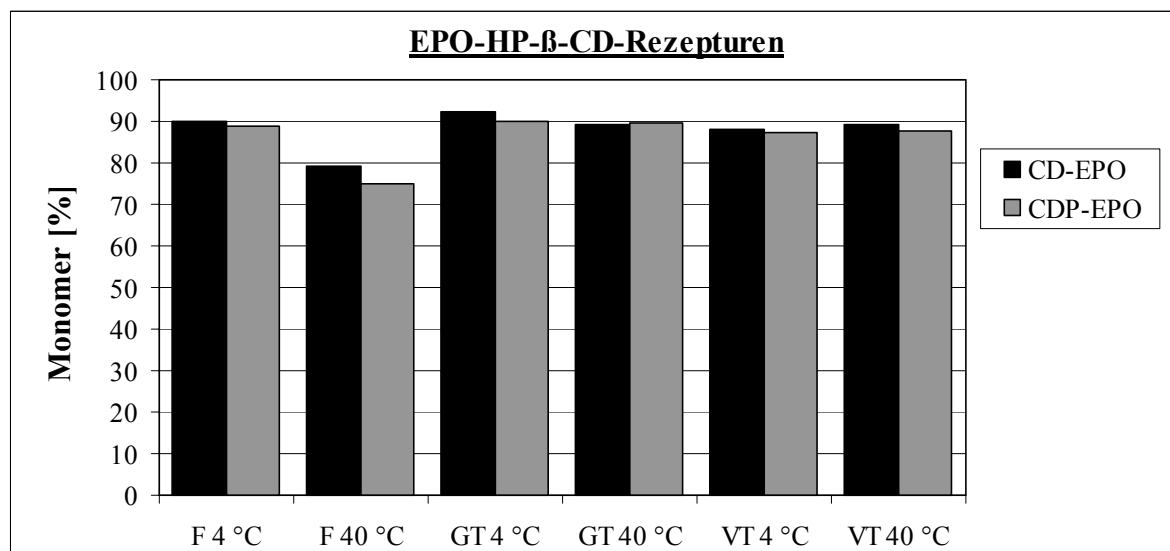
Die Monomer-Verluste durch die Trocknung lagen bei 2-3 % und für die Lagerung bei 8-10 % (Tab. 5-22).

Monomer-Verlust [%]	CD-EPO	CDP-EPO
GT-Prozess	1,6	2,0
Lagerung GT-Proben	ca. 8	ca. 8
VT-Prozess	1,9	3,0
Lagerung VT-Proben	ca. 9	ca. 10

Tab. 5-22: Monomer-Verlust durch Trocknungsprozess und Lagerung

Die gefriergetrockneten Rezepturen waren minimal stabiler als die vakuumgetrockneten. Bei den flüssigen Rez. konnte nach 12 Wochen 40 °C Lagerung immerhin 79 % bzw. 75 % Monomer nachgewiesen werden.

Bei allen drei Zubereitungsformen nahm die Stabilität durch den Phe-Zusatz in minimalem Umfang ab.

Abb. 5-32: EPO-Gehalte in HP- β -CD/HP- β -CD-Phenylalanin-Rezepturen

Fazit:

Wie bereits bei den G-CSF-Rezepturen konnten durch das Cyclodextrin-Derivat hohe Monomer-Gehalte und hohe T_g -Werte bei gleichzeitig niedrigen RWG erzielt werden. Der Phe-Zusatz hatte einen leicht destabilisierenden Effekt auf die Cyclodextrin-Rezepturen. Besonders bemerkenswert war der hohe Monomer-Gehalt, der bei den beiden flüssigen Zubereitungen erzielt werden konnte.

5.4. Röntgendiffraktometrie und Rasterelektronenmikroskopie getrockneter Proben

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse zur Morphologie ausgewählter Proben vorgestellt. Mittels Röntgendiffraktometrie (RD) und Rasterelektronenmikroskopie (REM) wurden die getrockneten Proben charakterisiert.

Ergebnisse der Röntgendiffraktometrie

Reine Hilfsstoffe (ungetrocknet und unbehandelt)

- Agenamalt, Raftilose und Cyclodextrin lagen vollamorph vor (entspricht **Abb. 5-14**).
- Saccharose, Arginin, Phenylalanin und Trehalose besaßen eine vollkristalline Gestalt (entspricht **Abb. 5-17**)

getrocknete Rezepturen

Gefriergetrocknete Proben

Alle Proben, die für 12 Wochen 50 °C eingelagert waren, zeigten vollamorphe Ergebnisse. Da alle 50 °C gelagerten Proben vollamorphe Gestalt besaßen, konnte daraus abgeleitet werden, dass auch die 40, 20 und 4 °C gelagerten Proben vollamorphe Struktur besessen haben. Sie wurden deshalb nicht untersucht.

Vakuumgetrocknete Proben:

- Alle Agenamalt- und Raftilose-Proben, die für 12 Wochen bei 50 °C gelagert worden waren, zeigten vollamorphes Aussehen.
- Alle AMP-, RP-, TP-, SAP-Proben waren amorph mit Anzeichen von teilamorphen Bereichen. Bei allen Diffraktogrammen zeigte sich kein Unterschied im Kurvenverlauf zwischen den 50 und 4 °C gelagerten Proben.
- Die Ergebnisse zur Trehalose wurden bereits in Unterkapitel 5.2.3. diskutiert. Nach der Vakuumtrocknung lagen beide Rez. amorph vor. Durch die Lagerung wandelten sich alle neutralen Proben in teilamorph/teilkristalline Systeme um. Bei den sauren Proben geschah diese Umwandlung nur bei den 40 °C und 50 °C gelagerten Proben. Die 4 °C und 20 °C gelagerten Proben behielten ihre amorphe Gestalt.

Ergebnisse der Rasterelektronenmikroskopie

Die Oberflächenstrukturen der getrockneten Produkte wurden mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie (REM) untersucht. Ausgewählt wurden vakuumgetrocknete Proben von G-CSF mit pH 4, die für 12 Wochen bei 4 °C gelagert worden waren.

Auf **Abb. 5-33** und **Abb. 5-34** sind die Oberflächenstrukturen von VAM4 und VAMP4 abgebildet. VAM4 zeigt große kantige Stücke, die eine sehr glatte Oberfläche aufweisen (**Abb. 5-33**). Bei VAMP4 sieht man an der geschwungenen Oberfläche kleine unregelmäßige Stücke auf der insgesamt unregelmäßigen Oberfläche. Allerdings konnte diese Oberflächenstruktur nicht bei allen untersuchten Probenstücken beobachtet werden.

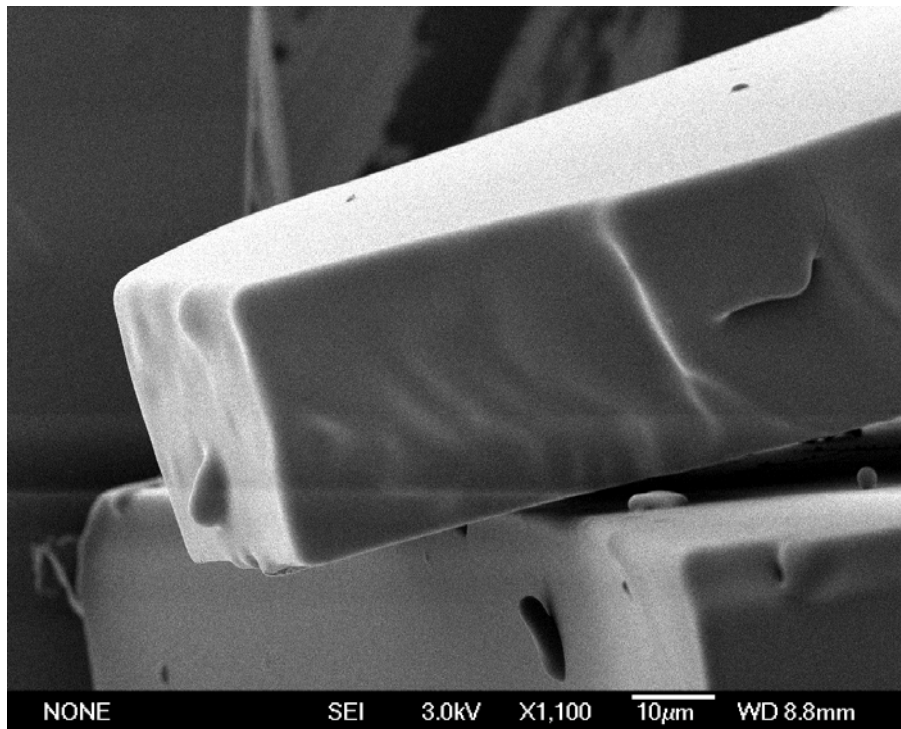


Abb. 5-33: REM-Aufnahme von VAM4

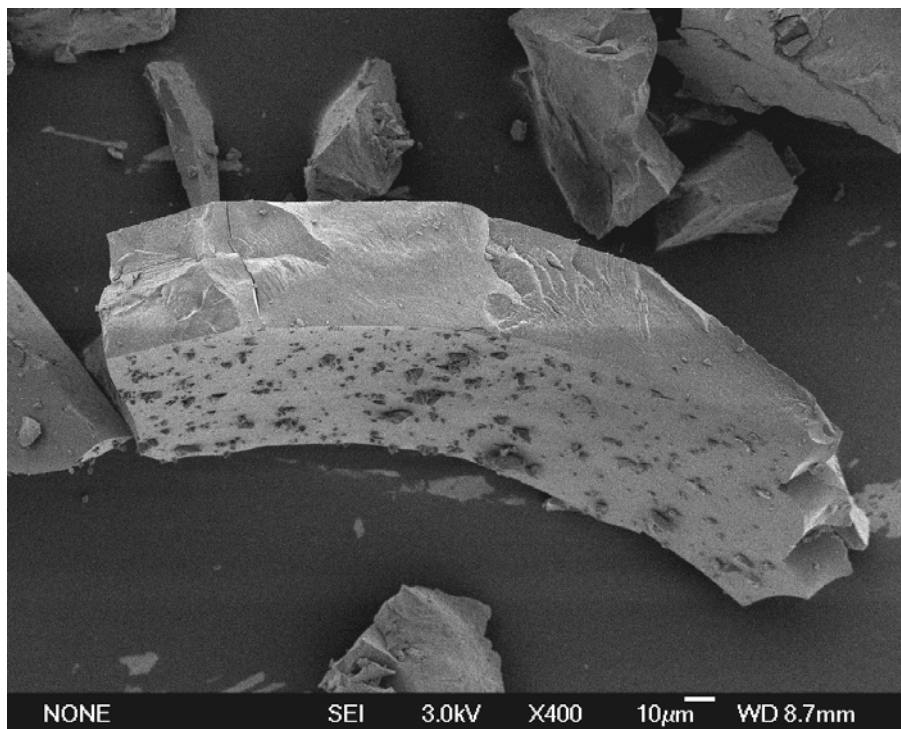


Abb. 5-34: REM-Aufnahme von VAMP4

Große Unterschiede waren zwischen VR4 und VRP4 nicht zu erkennen (Abb. 5-35 und Abb. 5-36). Die Oberfläche der Phe-freien Probe zeigte eine vergleichsweise glattere Oberfläche.

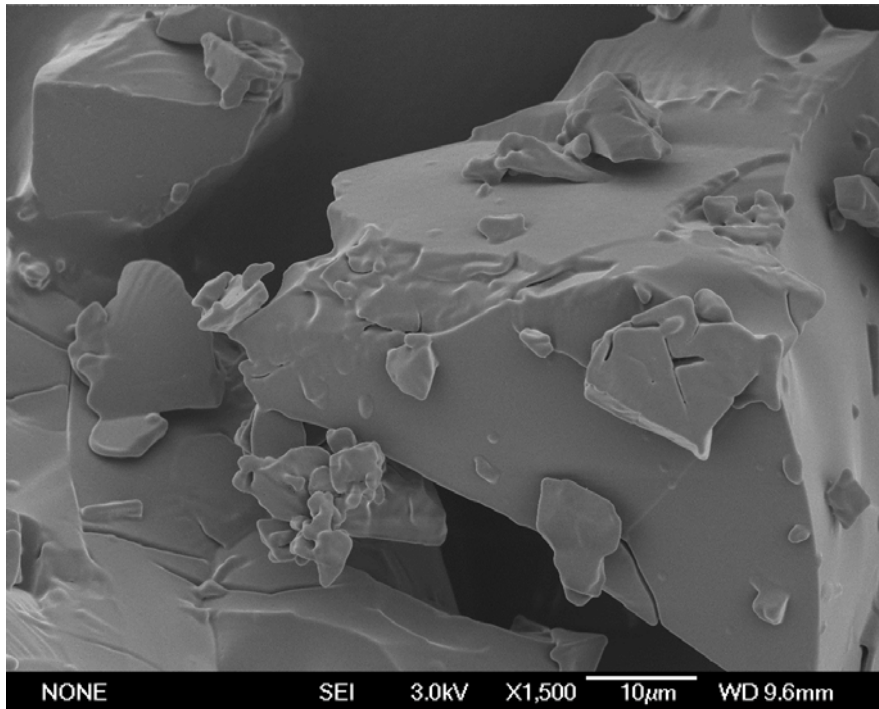


Abb. 5-35: REM-Aufnahme von VR4

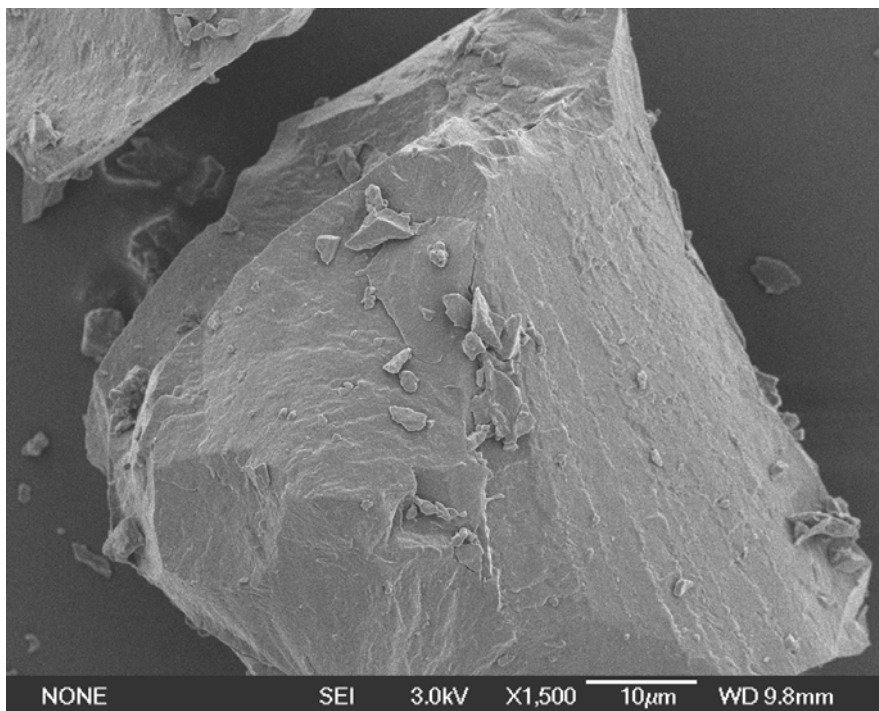


Abb. 5-36: REM-Aufnahme von VRP4

Abb. 5-37 zeigt die Oberflächenstruktur der vakuumgetrockneten SAP4-Probe. Auch hier konnten keine Phenylalanin-Kristalle beobachtet werden

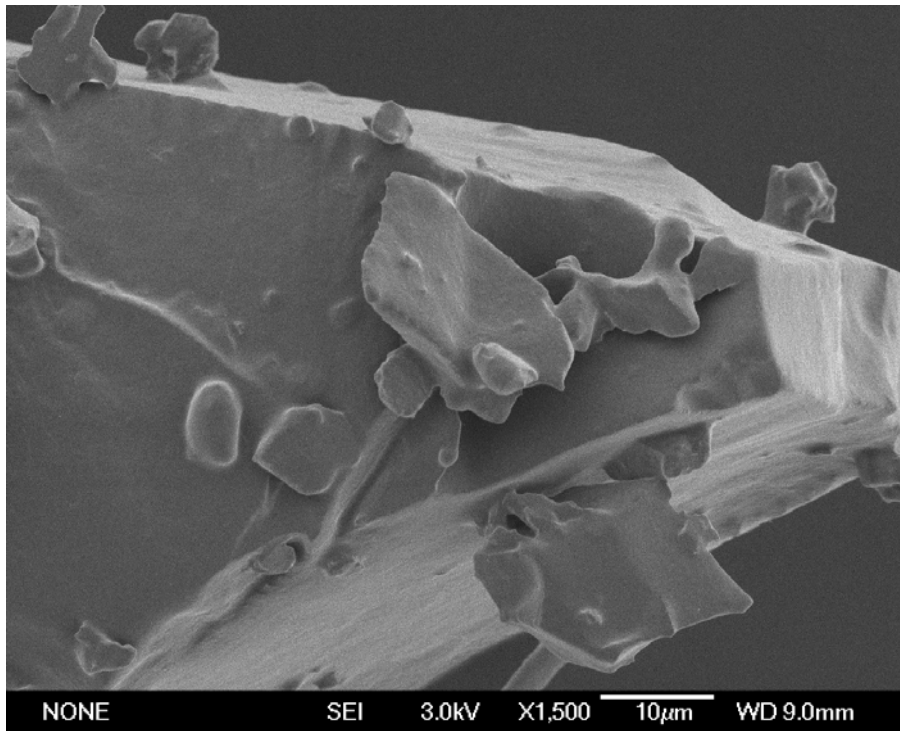


Abb. 5-37: REM-Aufnahme von VSAP4

Fazit:

Es konnten keine nennenswerten Unterschiede zwischen den Phe-freien und Phe-haltigen Proben beobachtet werden. Alle vakuumgetrockneten Proben zeigten Oberflächenstrukturen, wie sie in amorphen Systemen vorliegen. Die REM-Aufnahmen bestätigen die Ergebnisse der RD-Messungen, bei denen amorphe bis teilmorphe Systeme ermittelt werden konnten.

Die REM-Beobachtungen unterscheiden sich damit grundlegend von den Ergebnissen von Mattern [17]. Dort zeigten Maltose-Aminosäure-Mischungen kristalline Strukturen auf denen sich die Maltose-Protein-Matrix abgeschieden hatte.

5.5. Zusammenfassung der Stabilitätsuntersuchungen

Anhand der Ergebnisse von Placebo-Rezepturen wurden Agenamalt (Maltodextrin), Raftilose (Oligofruktose), Trehalose und eine Rezeptur mit Saccharose-Arginin-Phenylalanin (SAP) für vergleichende Untersuchungen von Vakuum- und Gefriertrocknung sowie für flüssige Einlagerungen ausgewählt. Mit den Modellarzneistoffen G-CSF und EPO wurde untersucht, ob diese Hilfsstoffe prinzipiell zur Stabilisierung geeignet sind und welches Trocknungsverfahren dabei vorteilhaft ist.

Bei allen **flüssigen G-CSF** Rezepturen mit pH 7,4 konnte eine starke Instabilität bei 40 °C Lagerung beobachtet werden. Je nach Rezeptur kam es innerhalb von wenigen Stunden bis hin zu 2 Wochen zum völligen Monomer-Verlust. Diese Instabilität wird in der Literatur mehrfach beschrieben [43,44,132].

Bei allen flüssigen Rezepturen mit pH 4 war die Stabilität deutlich höher, ausgenommen bei G-CSF-Raftilose-Rezepturen mit und ohne Phenylalanin-Zusatz, sowie bei G-CSF-Trehalose ohne Phenylalanin-Zusatz konnte derselbe rapide Abbau verfolgt werden.

Bei den **flüssig** gelagerten **EPO**-Proben traten diese Stabilitätsprobleme nicht auf.

Alle **gefriergetrockneten** Rezepturen lagen vor und nach der Lagerung im vollamorphen Zustand vor. Die **vakuumgetrockneten** Rezepturen bildeten amorphe bis teilamorphe Systeme aus. Bei allen vakuumgetrockneten Trehalose-Rezepturen kam es zu teilweise Auskristallisieren der Trehalose während der Lagerung.

Bei allen **Agenamalt**-Rezepturen konnten unabhängig von der Trocknungsmethode niedrige Restwassergehalte und hohe T_g erzielt werden. Der Phenylalanin-Zusatz war bei der Vakuumtrocknung nicht notwendig, um trockene Produkte zu erhalten. Der Zusatz wirkte sich jedoch stabilisierend während der Vakuumtrocknung und der Lagerung der G-CSF- und EPO-Produkte aus. Bei Agenamalt-G-CSF waren bei beiden pH-Werten alle Phenylalanin-haltigen Zubereitungen stabiler.

Trotz allem blieb bei beiden Proteinen die Stabilität der getrockneten Produkte hinter der flüssigen Form zurück oder lag auf gleichem Niveau. Aus diesem Grund bietet die Trocknung gegenüber der flüssigen Zubereitung keinen Vorteil, sondern verursacht nur große Kosten und nimmt viel Zeit für die Trocknung in Anspruch. Die guten Trocknungseigenschaften des Agenamalts zu niedrigen Restwassergehalten lassen sich eventuell durch Kombination mit besser stabilisierenden anderen Hilfsstoffen optimieren und sind ein Ansatzpunkt für eine Verwendung in getrockneten Formen.

Raftilose- und **Trehalose-**Rezepturen konnten erst durch Phenylalanin-Zusatz zu trockenen Produkten vakuumgetrocknet werden. Bei der Gefriertrocknung dieser Rezepturen hatte das Phenylalanin keinen Einfluss auf den Restwassergehalt und den T_g .

Bei höheren Lagertemperaturen zeigten nur die Phenylalanin-haltigen Raftilose- und Trehalose-Rezepturen von EPO im Unterschied zu den anderen EPO-Rezepturen eine ausgeprägte Instabilität, die nur bei den gefriergetrockneten aber nicht bei den vakuumgetrockneten auftrat. Dieses Phänomen war bei den gleichen Trocknungsbedingungen und denselben Rezepturen mit G-CSF nicht beobachtet worden.

Mit **Raftilose** ließen sich G-CSF und EPO trotz geeigneter Vorraussetzungen bezüglich geringer Restfeuchte und hohem T_g nur unzureichend stabilisieren. Da Raftilose ohne Phenylalanin-Zusatz nicht zu trockenen Produkten vakuumgetrocknet werden kann, ist es Agenamalt unterlegen. Wie bei Agenamalt wiesen die flüssigen Proben eine vergleichbare Stabilität auf und stellen eine kostenintensive langwierige Trocknung in Frage.

Trehalose zeigte in dieser Arbeit besondere Stabilisierungseigenschaften. Trotz hohem Restwassergehalt stabilisierte Trehalose in einem vakuumgetrockneten Phenylalanin-freien Produkt G-CSF so gut wie in Phenylalanin-haltigen Proben mit niedriger Restfeuchte. Aufgrund der hohen T_g -Werte bietet Trehalose eine amorphe stabilisierende Umgebung für das inkorporierte Protein und bildet Wasserstoffbrücken mit ihm aus.

Die Rezeptur mit **Saccharose-Arginin-Phenylalanin** (SAP) besitzt ein gutes Stabilisierungspotential. Aufgrund des im Vergleich zu Trehalose niedrigeren T_g -Wertes ist bei der Vakuumtrocknung nur eine Kombination aus Saccharose-Arginin-Phenylalanin erfolgreich. Mit Saccharose alleine bliebe das Produkt auf der Stufe des rubber-Zustandes stehen. Mit SAP können nur unter optimalen Bedingungen gleichwertige Ergebnisse zu Trehalose erzielt werden.

Die Rezepturen mit **Hydroxypropyl- β -cyclodextrin** zeigten sowohl bei den G-CSF- als auch den EPO-Rezepturen die größte Stabilität. Die gute stabilisierende Wirkung der Cyclodextrine ist literaturbekannt, wurde aber bisher nur für gefriergetrocknete und nicht für vakuumgetrocknete Proteinzubereitungen beschrieben [54,115,150,212]. Aufgrund ihrer hervorragenden Stabilisierungs-Eigenschaften können Cyclodextrine nicht nur den nativen Zustand der Proteine, sondern auch Aggregate stabilisieren [209]. Dies relativiert aber nicht die erhaltenen guten Daten. Aufgrund der teilweise eingeschränkten Löslichkeit der Cyclodextrine ist ihre parenterale Applizierbarkeit eingeschränkt. Vom verwendeten Hydroxypropyl- β -cyclodextrin ist aus der Literatur bekannt, dass diese Nebenwirkungen vernachlässigbar sind und durch die Derivatisierung das Löslichkeitsproblem behoben werden konnte [213].

Neben den Hilfsstoffen spielte das Trocknungsverfahren eine große Rolle. In dem vorausgegangenen Kapitel wurden die Hilfsstoffe hinsichtlich ihres Stabilisierungsvermögens während der Trocknung und der anschließenden Lagerung beurteilt.

Beim direkten Vergleich der beiden Trocknungsverfahren konnte abgeleitet werden, dass Vakuumtrocknung neben der Gefriertrocknung ein großes Potential zur Stabilisierung von Protein-Zubereitungen besaß. Neben gleichwertigen Produkten wurden mehrfach bessere Ergebnisse mit der Vakuumtrocknung erhalten. Als Beispiele sind die beiden neutralen Raftilose-Rez. und die neutrale Phe-freie Agenamalt-Rez. bei G-CSF und Phe-haltige Trehalose-Rez. bei EPO zu nennen. Die vakuumgetrockneten Proben wiesen teilweise einen größeren Monomer-Gehalt als die gefriergetrockneten Proben auf. Interessanterweise zeigten bei der Lagerung die nach beiden Verfahren getrockneten Proben nur bei höheren Lagertemperaturen eine größere Stabilität als flüssige Proben. Bei niedrigen Lagertemperaturen waren die flüssigen Zubereitungen gleichwertig oder überlegen.

Aus den gefundenen Daten kann gefolgert werden, dass die getrockneten Rezepturen hinsichtlich Stabilität weiter optimierungsbedürftig sind.

Durch weitere, neue Hilfsstoffe und/oder neue Hilfsstoffkombinationen sind die Rezepturen zu optimieren. Die guten Trocknungs-, aber begrenzten Stabilisierungseigenschaften von Agenamalt stellen in Kombination mit Trehalose oder Saccharose einen Ansatzpunkt dar.

6. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, verschiedene Vakuumtrocknungs-Verfahren für die Trocknung von Proteinen verfahrenstechnisch zu optimieren. Dies geschah zum einen durch die Verwendung unterschiedlicher Geräte und zum anderen durch den Einsatz spezieller Rezepturmodifizierungen. Dabei war es notwendig, das Verhalten der Proteine während des Trocknungsprozesses durch zahlreiche Versuchsansätze und mit mehreren analytischen Methoden zu charakterisieren. Das bei der Trocknung auftretende Aggregations-Phänomen des verwendeten Modellproteins Granulocyten-Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF) wurde im Detail untersucht, und Erklärungshypothesen wurden entwickelt.

Sehr häufig werden in Labors Geräte zur Einengung von wirkstoffhaltigen Lösungen verwendet, die durch Rotation oder Agitation der Proben in beheizbaren und evakuierbaren Kammern eine schnelle und schonende Aufkonzentrierung durch Vakuumtrocknung erreichen. Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigte sich damit, die Eignung derartiger Aufkonzentrierungsgeräte zu einer vollständigen und schonenden Trocknung zu überprüfen. Darüber hinaus wurden Trocknungsversuche in Vakuumtrockenschränken und Gefriertrockenanlagen durchgeführt.

Durch die Bewegung der Proteinlösungen im IR-Dancer bzw. im Rotationsvakuumkonzentrator gestaltete sich das rechtzeitige Erkennen von Siedeverzug sehr viel schwieriger als bei Versuchen in Trocknungskammern. Wenn sich die Proben in Bewegung befanden, war eine sichere optische Kontrolle nicht möglich. Negative Rückkopplung des Systems überdeckte beim IR-Dancer den erwarteten Effekt, die Trocknung durch Oberflächenvergrößerung stark zu beschleunigen, d.h. die Anlagen sind letztlich nicht wesentlich effektiver als Vakuumtrockenschränke.

Problematische Handhabung wie unzureichende Kontrolle von Siedeverzug, geringe Chargengröße, ungenügende Trocknungsrate und das Ausmaß der Aggregation führten zum Ausschluss des Rotationsvakuumkonzentrators und des IR-Dancers für weitere Versuche. Das Auftreten von Siedeverzug in den Vakuumtrockenschränken wurde durch den Einsatz einer Membranvakuumpumpe mit automatischer Siedepunktnachführung vermieden.

Trotz zahlreicher Versuche mit einem Kondensator und Spülzyklen mit trockenem Spülgas konnte die Kondensation von Wasserdampf in den Vakuumtrockenschränken nicht verhindert oder optimiert werden. Die Kondensation von Wasserdampf verlängerte die Trocknungszeiten erheblich. Das Ausmaß der Aggregation erhöhte sich, da die Proben länger im hochkonzentrierten Zustand verweilten. Erst die Vakuumtrocknung in der Gefriertrocknungsanlage mit temperierter Stellfläche wurde allen Anforderungen für eine schnelle und gleichzeitig schonende Vakuumtrocknung gerecht.

Vakuumtrocknungsversuche bei unterschiedlichen Temperaturen zeigten eine Wechselwirkung zwischen Temperatur und Zeit. Im Falle von G-CSF stellten Vakuumtrocknungen bei 30 °C bis 40 °C ein Optimum dar. Niedrigere und höhere Trocknungstemperaturen wirkten sich jeweils negativ auf die Stabilität aus. Für eine schnelle und gleichzeitig schonende Vakuumtrocknung ist die experimentelle Evaluierung der geeigneten Prozessparameter Druck, Temperatur und Trocknungsdauer von sehr großer Bedeutung.

Eine interessante Beobachtung wurde bei der Auswertung der SEC-Daten der Trocknungsversuche mit dem IR-Dancer gemacht. Der G-CSF-Monomer-Gehalt sank auf ein Minimum und stieg anschließend wieder steil an. Dazu gegenläufig erfolgten der Anstieg und das Absinken des Dimer- und Aggregat-Anteils. Es handelte sich um eine reversibel verlaufende Aggregation. In zahlreichen Versuchen mit Vakuumtrockenschränken konnte die Beobachtung des intermediären Monomer-Minimums bestätigt werden. Durch parallele Analysen von Proben mit der SEC und der AF4 ließ sich die beobachtete reversible Aggregation verifizieren.

Bei der Charakterisierung der reversiblen Aggregation des G-CSF konnte eine Abhängigkeit des Phänomens von der Temperatur und von der Rezepturzusammensetzung ermittelt werden. Bei der neutralen Rezeptur ließ sich ein direkter Zusammenhang zwischen der reversiblen Aggregation und der Temperatur feststellen. Bei zu hoher Trocknungstemperatur wurde die reversible Denaturierung des G-CSF durch die irreversible Aggregation überdeckt.

Die Ergebnisse zum reversiblen Aggregations-Verhalten des G-CSF stimmen mit Angaben in der Literatur überein, in denen von einem reversibel gebildeten Dimer berichtet wird [171,214]. Saccharose begünstigt die Bildung dieser Dimer-Spezies thermodynamisch durch preferential exclusion. Diese Dimere entstehen aus zwei nativen gefalteten Monomeren und greifen nicht in die irreversible Aggregation des G-CSF ein. Das als intermediäres Monomer-Minimum beobachtete Aggregations-Verhalten des G-CSF ist somit aufgeklärt.

Mit Hilfe von Einlagerungen von flüssigen, aufkonzentrierten, getrockneten und nach der Trocknung wieder befeuchteten Proben wurde das Verhalten von G-CSF in diesen Zuständen auf Stabilität untersucht. Die größte Instabilität resultierte für die aufkonzentrierten und die wieder befeuchteten Proben, d.h. viskose Zubereitungen mit relativ hoher Protein- und Hilfsstoffkonzentration führen gegenüber den verdünnten wässrigen Proteinlösungen zu deutlich reduzierten Stabilitäten. Durch gezielte Rückbefeuchtung der vakuumgetrockneten Proben wurde die sogenannte „moisture induced aggregation“ simuliert, die während der Lagerung auftritt. Die getrockneten Proben nahmen bis zur Gleichgewichtseinstellung Wasser in Abhängigkeit von der relativen Feuchte auf. Danach blieb das Probengewicht konstant, während die Aggregation in der feuchten Matrix sich kontinuierlich fortsetzte. Selbst durch Vorsichtsmaßnahmen wie wasserdampfdichte Packmittel, vorgetrocknete Stopfen und Verschluss der Vials unter trockenen Schutzgasbedingungen kann die langsame Rückbefeuchtung der getrockneten Produkte nicht vollständig verhindert werden.

Am stabilsten waren die vakuumgetrockneten Proben. Der rubber-Zustand bildet bei der Trocknung von Proteinlösungen die Schlüsselstelle in der Umwandlung der Umgebung des Proteins vom flüssigen in den trockenen Zustand. Die Vorgänge am Protein können je nach Wasser-Feststoff-Verhältnis mit verschiedenen Theorien zur Stabilisierung im flüssigen und trockenen Zustand besser erklärt werden [10,56,58,99,152,188,189]. Durch preferential exclusion von Hilfsstoff werden flüssige Zubereitungen stabilisiert. Für die Stabilisierung in trockenen Produkten werden der amorphe glasartige Zustand und der Austausch von Wasser gegen Hilfsstoffmoleküle an der Proteinoberfläche unter Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen verantwortlich gemacht.

Im letzten Teil der Arbeit wurde die Stabilisierung von Proteinanzustoff in verschiedenen Formulierungen untersucht. Um die Leistungsfähigkeit der Vakuumtrocknung gegenüber der Gefriertrocknung zu beweisen, wurden die Rezepturen zusätzlich zu Vergleichszwecken gefriergetrocknet. Flüssige Zubereitungen wurden neben getrockneten Proben eingelagert, um das Stabilisierungspotential der Hilfsstoffe auch an flüssigen Proben untersuchen zu können. Mit den Modellanzustoffen G-CSF und EPO wurde untersucht, ob diese Hilfsstoffe prinzipiell zur Stabilisierung geeignet sind und wenn ja, in welcher Zubereitungsform am besten.

Bei der Vakuumtrocknung von Raftilose (Oligofruktose) und Trehalose blieben beide Hilfsstoffe ohne weitere Zusätze auf der Stufe des rubber-Zustandes mit hoher Restfeuchte und niedrigem T_g stehen. Erst durch Phenylalanin-Zusatz war es bei Raftilose und Trehalose möglich, trockene Produkte mittels Vakuumtrocknung zu erhalten [17]. Beide Hilfsstoff-Kombinationen nutzten das Verhalten von Phenylalanin aus, in Nadeln auszukristallisieren. Dies erlaubte der sich während der Vakuumtrocknung weiter aufkonzentrierenden Hilfsstoffmasse, sich auf einer großen Oberfläche abzuscheiden. Aufgrund der vergrößerten Oberfläche reduzierte sich die Schichtdicke, aus der das verbliebene Wasser entfernt werden muss. Es kommt so zu einer Beschleunigung und starken Verbesserung der Trockenbarkeit der Lösung. Die auf diese Weise vakuumgetrockneten Rezepturen bildeten amorphe bis teilamorphe Systeme aus. Interessanterweise konnten keine Phenylalanin-Nadeln mit der Rasterelektronenmikroskopie mehr beobachtet werden. Es wird vermutet, dass die Kristalle vollständig von der amorphen Matrix eingehüllt wurden. Bei allen vakuumgetrockneten Trehalose-Rezepturen kam es zu teilweisem Auskristallisieren der Trehalose während der Lagerung. Dies wirkte sich überraschenderweise nicht negativ auf die Stabilität aus.

Nur Agenamalt-Rezepturen (Maltodextrin) und Cyclodextrin-Rezepturen ließen sich ohne Phenylalanin genauso gut vakuum- wie gefrier-trocknen. Ursache dafür ist, dass zwischen Molekulargewicht und T_g eine direkte Abhängigkeit besteht. Kohlenhydrate mit größerem Molekulargewicht bilden schneller eine glasartige amorphe Struktur mit hohem T_g aus [96,99].

Die beste Stabilisierung für beide Proteine ließ sich mit getrockneten Cyclodextrin-, Trehalose- und Saccharose-Arginin-Phenylalanin-Rezepturen erzielen.

Die Rezepturen mit Hydroxypropyl- β -cyclodextrin zeigten für beide Proteine die größte Stabilität. Aus der Literatur waren bisher nur für gefriergetrocknete Proteinzubereitungen die hervorragenden Stabilisierungs-Eigenschaften der Cyclodextrine bekannt [212]. Die guten Ergebnisse belegen auch für die Vakuumtrocknung die stabilisierende Wirkung. Einige Nachteile sind für eine breite Anwendung hinderlich. Im Vergleich zu anderen Kohlenhydraten sind Cyclodextrine teure Hilfsstoffe. Aufgrund der teilweise schlechten Löslichkeit der Cyclodextrine ist ihre parenterale Applizierbarkeit eingeschränkt. Durch Derivatisierung konnte für Hydroxypropyl- β -cyclodextrin das Löslichkeitsproblem behoben werden [213].

Trehalose zeigte besondere Stabilisierungseigenschaften. Der Zusatz von Phenylalanin zu Trehalose führte zwar erwartungsgemäß zu deutlich reduzierten Restwassergehalten und hohen T_g -Werten, die Stabilisierung war jedoch der ohne Phenylalanin-Zusatz gleich. Trehalose ist also geeignet, um Proteine unter besonders ungünstigen Bedingungen, z. B. beim Durchschreiten des rubber-Zustandes, hinreichend zu stabilisieren. Die in der Natur ablaufenden Vorgänge beim Überdauern von Pflanzen in der Trockenphase sind den hier modellhaft untersuchten Verfahren sehr ähnlich und nicht z. B. mit Gefriertrocknung zu vergleichen. Die festgestellten Aussagen zu Trehalose sind deshalb konsistent mit dessen Vorkommen und Funktion in der Natur.

Agenamalt-Rezepturen wiesen zwar aufgrund niedriger Restfeuchte und hohen T_g -Werten theoretisch gut geeignete Bedingungen auf, zeigten aber beim Stabilisierungsvermögen deutliche Schwächen. Wegen der Molekülgestalt und Molekülgröße kommt es beim Austausch von Wasser- gegen Agenamalt-Molekülen an der Proteinoberfläche zu sterischer Hinderung der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Dies reduziert die stabilisierende Wirkung im trockenen Zustand.

Raftilose-Rezepturen besaßen im Vergleich zu Agenamalt den Nachteil, nur durch Phenylalanin-Zusatz bei der Vakuumtrocknung vergleichbare Restfeuchten und Stabilitäten zu erreichen. Insgesamt war die Stabilität den Agenamalt-Produkten gleich, da es auch bei Raftilose zu einer sterischen Hinderung bei der Ausbildung von stabilisierend wirkenden Wasserstoffbrückenbindungen kommt.

Es konnte gezeigt werden, dass Vakuumtrocknung neben Gefriertrocknung ein beachtliches Potential zur Stabilisierung von getrockneten Protein-Zubereitungen besitzt. In vielen Fällen konnten mit der Vakuumtrocknung bessere Ergebnisse oder auch gleichwertige Produkte zur Gefriertrocknung erhalten werden.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. J.Koolman, K.H.Roehm, Taschenatlas der Biochemie, Thieme, Stuttgart, New York, 1994.
2. R.Rudolph, Therapeutische Proteine und Peptide, Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e. V., Fachgruppe Flüssige Arzneiformen, Kurs 564, 1991, Entwicklung von Arzneiformen mit Peptiden und Proteinen, R.Oschmann, H.Steffen, 1991.
3. Y.-C.J.Wang, M.A.Hanson, Parenteral Formulations of Proteins and Peptides: Stability and Stabilizers, J.Par.Sci.Technol., Vol.42, Supplement, 1988, p.S4-S26.
4. J.L.Cleland, R.Langer, Formulation and delivery of proteins and peptides: design and development strategies, ACS Symp.Ser., Vol.567, Formulation and Delivery of Proteins and Peptides, 1994, p.1-19.
5. L.A.Gatlin, S.L.Nail, Protein purification process engineering. Freeze drying: A practical overview, Bioprocess Technology, Vol.18, 1994, p.317-367.
6. G.Walsh, Pharmaceutical biotechnology products approved within the European Union, Eur.J.Pharm.Biopharm, Vol.55, No.1, 2003, p.3-10.
7. M.A.Hanson, S.K.E.Rouan, Introduction to formulation of protein pharmaceuticals, Pharm.Biotechnol., Vol.3, Stability of Protein Pharmaceuticals, Part. B, 1992, p.209-233.
8. F.Franks, R.H.M.Hatley, S.F.Mathias, Materials science and the production of shelf-stable biologicals, BioPharm, Vol.4, No.9, 1991, p.38, 40-42, 55.
9. S.Yoshioka, Y.Aso, S.Kojima, The effect of excipients on the molecular mobility of lyophilized formulations, as measured by glass transition temperature and NMR relaxation-based critical mobility temperature, Pharm.Res., Vol.16, No.1, 1999, p.135-140.
10. L.S.Taylor, G.Zografi, Sugar-polymer hydrogen bond interactions in lyophilized amorphous mixtures, J.Pharm.Sci., Vol.87, No.12, 1998, p.1615-1621.
11. B.Lueckel, D.Bodmer, B.Helk, H.Leuenberger, 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., Vol.3, No.3, 1998, p.325-336.
12. J.F.Carpenter, S.J.Prestrelski, T.Arakawa, Separation of freezing- and drying-induced denaturation of lyophilized proteins using stress-specific stabilization. I. Enzyme activity and calorimetric studies, Arch.Biochem.Biophys., Vol.303, No.2, 1993, p.456-464.
13. J.F.Carpenter, J.H.Crowe, T.Arakawa, Comparison of solute-induced protein stabilization in aqueous solution and in the frozen and dried states, J.Dairy Sci., Vol.73, No.12, 1990, p.3627-3636.
14. M.J.Pikal, Freeze-Drying of Proteins Part II: Formulation Selection, Pharm.Technol.Int., Vol.February, 1991, p.40-43.
15. K.Izutsu, S.Yoshioka, S.Kojima, Physical stability and protein stability of freeze-dried cakes during storage at elevated temperatures, Pharm.Res., Vol.11, No.7, 1994, p.995-999.
16. J.F.Carpenter, B.Martin, L.M.Crowe, J.H.Crowe, Stabilization of phosphofructokinase during air-drying with sugars and sugar/transition metal mixtures, Cryobiology., Vol.24, No.5, 1987, p.455-464.
17. M.Mattern, Stabilisierung von therapeutischen Proteinen mittels Gefrier- und Vakuumtrocknung, Dissertation, Erlangen, 1997.
18. D.P.Miller, R.E.Anderson, J.J.De Pablo, Stabilization of lactate dehydrogenase following freeze-thawing and vacuum-drying in the presence of trehalose and borate, Pharm.Res., Vol.15, No.8, 1998, p.1215-1221.

19. M.Uritani, M.Takai, K.Yoshinaga, Protective effect of disaccharides on restriction endonucleases during drying under vacuum, *J.Biochem.*, Vol.117, No.4, 1995, p.774-779.
20. S.Rossi, M.P.Buera, S.Moreno, J.Chirife, Stabilization of the restriction enzyme EcoRI dried with trehalose and other selected glass-forming solutes, *Biotechnol.Prog.*, Vol.13, No.5, 1997, p.609-616.
21. K.P.C.Volhardt, *Organische Chemie*, VCH, Weinheim, Basel, 1990.
22. S.Li, C.Schoeneich, R.T.Borchardt, Chemical instability of proteins, *Pharm.News*, Vol.2, No.5, 1995, p.12-16.
23. <http://www2.chemie.uni-erlangen.de/education/medprak/vorlesung/Folien/aminosaeuren/sld013.htm>.
24. <http://www2.chemie.uni-erlangen.de/education/medprak/vorlesung/Folien/aminosaeuren/sld022.htm>.
25. <http://www.vetmed.uni-giessen.de/biochem/Folien/Folie3-2.png>.
26. H.-P.Lipp, Granulozyten-kolonie-stimulierende Faktoren (Gemeinsamkeiten, Unterschiede und Indikationen), *Krankenhauspharmazie*, Vol.23, No.8, 2002, p.375-383.
27. T.Dingermann, *Gentechnik-Biotechnik: Prinzipien und Anwendungen in Pharmazie und Medizin*, Wiss.Verl.-Ges., Stuttgart, 1999.
28. <http://www.chugaipharma.de/FuerAertzeApotheker/Granocyte/granocyte.htm>.
29. Pegfilgrastim, *Neue Arzneimittel (Beilage der Deutsch.Apot.Ztg.)*, 50. Jahrgang, Mai 2003.
30. A.M.DePaolis, J.V.Advani, B.G.Sharma, Characterization of erythropoietin dimerization, *J.Pharm.Sci.*, Vol.84, No.11, 1995, p.1280-1284.
31. http://www.nesp.de/fach/index_fach.html.
32. http://www.i-s-b.org/business/rec_drugs.htm.
33. J.L.Reubsat, J.H.Beijnen, A.Bult, R.J.Van Maanen, J.A.D.Marchal, W.J.M.Underberg, Analytical techniques used to study the degradation of proteins and peptides: physical instability, *J.Pharm.Bio.Anal.*, Vol.17, No.6,7, 1998, p.979-984.
34. C.Schoneich, M.J.Hageman, R.T.Borchardt, Stability of Peptides and Proteins, in : K.Park, ed., *Controlled Drug Delivery - Challenges and Strategies*, ACS Washington, 1997, p.205-228.
35. M.C.Manning, K.Patel, R.T.Borchardt, Stability of protein pharmaceuticals, *Pharm.Res.*, Vol.6, No.11, 1989, p.903-918.
36. A.K.Banga, Stability of Therapeutic Peptides and Proteins, *Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems*, 1995, p.3-28.
37. J.L.Reubsat, J.H.Beijnen, A.Bult, R.J.Van Maanen, J.A.D.Marchal, W.J.M.Underberg, Analytical techniques used to study the degradation of proteins and peptides: chemical instability, *J.Pharm.Bio.Anal.*, Vol.17, No.6,7, 1998, p.955-978.
38. W.Wang, Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals, *Int.J.Pharm.*, Vol.185, No.2, 1999, p.129-188.
39. G.Gross, Stabilisierungsmöglichkeiten für flüssige Formulierungen, *Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e. V. Fachgruppe Flüssige Arzneiformen, Kurs 564, Entwicklung von Arzneiformen mit Peptiden und Proteinen*, R.Oschmann, H.Steffen, 1991.
40. R.Jaenicke, Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions, *Eur.J.Biochem.*, Vol.202, No.3, 1991, p.715-728.

41. H.S.Lu, P.R.Fausset, L.O.Narhi, T.Horan, K.Shinagawa, G.Shimamoto, T.C.Boone, Chemical modification and site-directed mutagenesis of methionine residues in recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effect on stability and biological activity, *Arch.Biochem.Biophys.*, Vol.362, No.1, 1999, p.1-11.
42. M.Oheda, M.Hasegawa, K.Hattori, H.Kuboniwa, T.Kojima, T.Orita, K.Tomonou, T.Yamazaki, N.Ochi, O-linked sugar chain of human granulocyte colony-stimulating factor protects it against polymerization and denaturation allowing it to retain its biological activity, *J.Biol.Chem.*, Vol.265, No.20, 1990, p.11432-11435.
43. T.Arakawa, S.J.Prestrelski, L.O.Narhi, T.C.Boone, W.C.Kenney, Cysteine 17 of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor is partially solvent-exposed, *J.Protein Chem.*, Vol.12, No.5, 1993, p.525-531.
44. M.Ono, Physicochemical and biochemical characteristics of glycosylated recombinant human granulocyte colony stimulating factor (lenograstim), *Eur.J.Cancer, Part A*, Vol.30A, Suppl. 3, 1994, p.S7-S11.
45. S.Krishnan, E.Y.Chi, J.N.Webb, B.S.Chang, D.Shan, M.Goldenberg, M.C.Manning, T.W.Randolph, J.F.Carpenter, Aggregation of granulocyte colony stimulating factor under physiological conditions: characterization and thermodynamic inhibition, *Biochem.*, Vol.41, No.20, 2002, p.6422-6431.
46. S.L.Nail, S.Jiang, S.Chongprasert, S.A.Knopp, Fundamentals of freeze-drying, *Pharm.Biotechnol.*, Vol.14, Development and Manufacture of Protein Pharmaceuticals, 2002, p.281-360.
47. R.Pearlman, T.Nguyen, Pharmaceutics of protein drugs, *J.Pharm.Pharmacol.*, Vol.44, Suppl. 1, 1992, p.178-185.
48. F.Franks, Solid aqueous solutions, *Pure Appl.Chem.*, Vol.65, No.12, 1993, p.2527-2537.
49. F.Franks, Freeze-drying: from empiricism to predictability. The significance of glass transitions, *Dev.Biol.Stand.*, Vol.74, Biol. Prod. Freeze-Drying Formulation, 1992, p.9-19.
50. B.A.Kerwin, M.C.Heller, S.H.Levin, T.W.Randolph, Effects of tween 80 and sucrose on acute short-term stability and long-term storage at -20 Deg C of a recombinant hemoglobin, *J.Pharm.Sci.*, Vol.87, No.9, 1998, p.1062-1068.
51. K.Izutsu, S.Yoshioka, T.Terao, Stabilizing effect of amphiphilic excipients on the freeze-thawing and freeze-drying of lactate dehydrogenase, *Biotechnol.Bioeng.*, Vol.43, No.11, 1994, p.1102-1107.
52. J.L.Cleland, M.F.Powell, S.J.Shire, The development of stable protein formulations: A close look at protein aggregation, deamidation, and oxidation, *Crit.Rev.Ther Drug Carrier Syst.*, Vol.10, No.4, 1993, p.307-377.
53. J.F.Carpenter, M.J.Pikal, B.S.Chang, T.W.Randolph, Rational design of stable lyophilized protein formulations: some practical advice, *Pharm.Res.*, Vol.14, No.8, 1997, p.969-975.
54. S.Branchu, R.T.Forbes, P.York, S.Petren, H.Nyqvist, O.Camber, Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inhibits spray-drying-induced inactivation of beta-galactosidase, *J.Pharm.Sci.*, Vol.88, No.9, 1999, p.905-911.
55. M.Mumenthaler, C.C.Hsu, R.Pearlman, Feasibility study on spray-drying protein pharmaceuticals: recombinant human growth hormone and tissue-type plasminogen activator, *Pharm.Res.*, Vol.11, No.1, 1994, p.12-20.
56. S.N.Timasheff, Stabilization of protein structure by solvent additives, *Pharm.Biotechnol.*, Vol.3, Stab. Prot. Pharm., Part B, 1992, p.265-285.
57. S.N.Timasheff, T.Arakawa, Stabilization of protein structure by solvents, in: T.E.Creighton, ed., *Protein Structure: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, 2001, p.331-345.
58. T.Arakawa, S.N.Timasheff, Preferential interactions of proteins with salts in concentrated solutions, *Biochemistry*, Vol.21, No.25, 1982, p.6545-6552.
59. T.Arakawa, S.N.Timasheff, Stabilization of protein structure by sugars, *Biochemistry*, Vol.21, No.25, 1982, p.6536-6544.

60. J.F.Carpenter, T.Arakawa, J.H.Crowe, Interactions of stabilizing additives with proteins during freeze-thawing and freeze-drying, *Dev.Biol.Stand.*, Vol.74, Biol. Prod. Freeze-Drying Formulation, 1992, p.225-239.
61. J.F.Carpenter, J.H.Crowe, The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes, *Cryobiology.*, Vol.25, No.3, 1988, p.244-255.
62. K.Tanaka, T.Takeda, K.Miyajima, Cryoprotective effect of saccharides on denaturation of catalase by freeze-drying, *Chem.Pharm.Bull.*, Vol.39, No.5, 1991, p.1091-1094.
63. J.F.Carpenter, S.J.Prestrelski, T.J.Anchoroguy, T.Arakawa, Interactions of stabilizers with proteins during freezing and drying, *ACS Symp.Ser.*, Vol.567, Formulation and Delivery of Proteins and Peptides, 1994, p.134-147.
64. www.med.uni-magdeburg.de/fme/khno/audio/studium/medizin/WAERMEL2002.doc.
65. P.H.Stahl, *Relative Feuchten, Feuchtigkeit und Trocknen in der pharmazeutischen Technologie*, Steinkopf Verlag, Darmstadt, 1980.
66. M.L.Cappola, Freeze-drying concepts: The basics, *Drugs Pharm.Sci.*, Vol.99, Protein Formulation and Delivery, 2000, p.159-199.
67. S.L.Nail, Formulation of proteins and peptides, in: K.Park, ed., *Controlled Drug Delivery - Challenges and Strategies*, ACS Washington, 1997, p.205-228.
68. J.Broadhead, S.K.E.Rouan, C.T.Rhodes, The spray drying of pharmaceuticals, *Drug Dev.Ind.Pharm.*, Vol.18, No.11-12, 1992, p.1169-1206.
69. K.Masters, Spray drying. The unit operation today, *Ind.Eng.Chem.*, Vol.60, No.10, 1968, p.53-63.
70. C.W.Lyne, Review of spray drying, *Brit.Chem.Eng.*, Vol.16, No.4-5, 1971, p.370-373.
71. M.J.Pikal, Freeze-drying of proteins. Part I: process design, *BioPharm*, Vol.3, No.8, 1990, p.18-20, 22.
72. M.J.Pikal, Freeze-drying of proteins: process, formulation, and stability, *ACS Symp.Ser.*, Vol.567, Formulation and Delivery of Proteins and Peptides, 1994, p.120-133.
73. F.Franks, R.H.M.Hatley, Stable enzymes by water removal, in: W.J.J.van den Tweel, A.B.R.M.Harder, eds., *Stability and Stabilization of Enzymes*, 1993, p.45-54.
74. M.Karel, Heat and mass transfer in freeze-drying, in: S.A.Goldblith, L.Rey, W.W.Rothmayr, eds., *Freeze drying and advanced food technology*, Academic Press, London, 1975, p.177-202.
75. F.Franks, Freeze-drying: a combination of physics, chemistry, engineering and economics, *Japanese Journal of Freezing and Drying*, Vol.38, 1992, p.5-16.
76. F.Franks, Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice, *Eur.J.Pharm.Biopharm*, Vol.45, No.3, 1998, p.221-229.
77. K.Izutsu, S.Yoshioka, T.Terao, Decreased protein-stabilizing effects of cryoprotectants due to crystallization, *Pharm.Res.*, Vol.10, No.8, 1993, p.1232-1237.
78. T.W.G.Rowe, Energy, mass transfer and economy in large scale freeze-drying, in: L.Rey, ed., *Researches and development in freeze-drying*, Herman, Paris, 1964, p.141-170.
79. T.D.Gibson, Protein stabilisation using additives based on multiple electrostatic interactions, *Dev.Biol.Stand.*, Vol.87, 1996, p.207-217.
80. P.B.Conrad, D.P.Miller, P.R.Cielenski, J.J.De Pablo, Stabilization and preservation of *Lactobacillus acidophilus* in saccharide matrices, *Cryobiology*, Vol.41, No.1, 2000, p.17-24.

81. R.M.Bieganski, A.Fowler, J.R.Morgan, M.Toner, Stabilization of active recombinant retroviruses in an amorphous dry state with trehalose, *Biotechnol.Prog.*, Vol.14, No.4, 1998, p.615-620.
82. P.Cerrutti, M.S.De Huergo, M.Galvagno, C.Schebor, M.Pilar Buera, Commercial baker's yeast stability as affected by intracellular content of trehalose, dehydration procedure and the physical properties of external matrices, *Applied Microbiol.Biotechnol.*, Vol.54, No.4, 2000, p.575-580.
83. V.K.Sharma, D.S.Kalonia, Steady-state tryptophan fluorescence spectroscopy study to probe tertiary structure of proteins in solid powders, *J.Pharm.Sci.*, Vol.92, No.4, 2003, p.890-899.
84. H.L.Bullifent, K.Dhaliwal, A.M.Howells, K.Goan, K.Griffin, C.D.Lindsay, A.Tunnacliffe, R.W.Titball, Stabilisation of Salmonella vaccine vectors by the induction of trehalose biosynthesis, *Vaccine*, Vol.19, No.9-10, 2000, p.1239-1245.
85. H.Leuenberger, *Physikalische Pharmazie*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2002.
86. M.J.Pikal, M.L.Roy, S.Shah, Mass and heat transfer in vial freeze-drying of pharmaceuticals: role of the vial, *J.Pharm.Sci.*, Vol.73, No.9, 1984, p.1224-1237.
87. M.J.Pikal, S.Shah, M.L.Roy, R.Putman, The secondary drying stage of freeze drying: drying kinetics as a function of temperature and chamber pressure, *Int.J.Pharm.*, Vol.60, No.3, 1990, p.203-217.
88. A.Zaks, Protein-water interactions. Role in protein structure and stability, *Pharm.Biotechnol.*, Vol.2, Stability of Protein Pharmaceuticals, Part A, 1992, p.249-271.
89. T.Arakawa, S.J.Prestrelski, W.C.Kenney, J.F.Carpenter, Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins, *Adv Drug Delivery Rev.*, Vol.46, No.1-3, 2001, p.307-326.
90. C.C.Hsu, C.A.Ward, R.Pearlman, H.M.Nguyen, D.A.Yeung, J.G.Curley, Determining the optimum residual moisture in lyophilized protein pharmaceuticals, *Dev.Biol.Stand.*, Vol.74, Biol. Prod. Freeze-Drying Formulation, 1992, p.255-271.
91. M.Katakam, A.K.Banga, Aggregation of proteins and its prevention by carbohydrate excipients: albumins and gamma-globulin, *J.Pharm.Pharmacol.*, Vol.47, No.2, 1995, p.103-107.
92. M.J.Hageman, The role of moisture in protein stability, *Drug Dev.Ind.Pharm.*, Vol.14, No.14, 1988, p.2047-2070.
93. Y.Roos, M.Karel, Water and molecular weight effects on glass transitions in amorphous carbohydrates and carbohydrate solutions, *J.Food Sci.*, Vol.56, No.6, 1991, p.1676-1681.
94. Y.Roos, M.Karel, Phase transitions of amorphous sucrose and frozen sucrose solutions, *J.Food Sci.*, Vol.56, No.1, 1991, p.266-267.
95. H.R.Costantino, K.G.Carrasquillo, R.A.Cordero, M.Mumenthaler, C.C.Hsu, K.Griebenow, Effect of excipients on the stability and structure of lyophilized recombinant human growth hormone, *J.Pharm.Sci.*, Vol.87, No.11, 1998, p.1412-1420.
96. Y.Roos, M.Karel, Phase transitions of mixtures of amorphous polysaccharides and sugars, *Biotechnol.Prog.*, Vol.7, No.1, 1991, p.49-53.
97. B.C.Hancock, S.L.Shamblin, G.Zografí, Molecular mobility of amorphous pharmaceutical solids below their glass transition temperatures, *Pharm.Res.*, Vol.12, No.6, 1995, p.799-806.
98. J.H.Crowe, F.A.Hoekstra, L.M.Crowe, Anhydrobiosis, *Annu.Rev.Physiol.*, Vol.54, 1992, p.579-599.
99. J.H.Crowe, L.M.Crowe, J.F.Carpenter, Preserving dry biomaterials: The water replacement hypothesis. Part 2, *BioPharm*, Vol.6, No.4, 1993, p.40-43.
100. J.F.Carpenter, J.H.Crowe, Modes of stabilization of a protein by organic solutes during desiccation, *Cryobiology*, Vol.25, No.5, 1988, p.459-470.

101. R.L.Remmele, C.Stushnoff, J.F.Carpenter, Real-time infrared spectroscopic analysis of lysozyme during lyophilization: structure-hydration behavior and influence of sucrose, ACS Symp.Ser., Vol.567, Formulation and Delivery of Proteins and Peptides, 1994, p.170-192.
102. W.R.Liu, R.Langer, A.M.Klibanov, Moisture-induced aggregation of lyophilized proteins in the solid state, Biotechnol.Bioeng., Vol.37, No.2, 1991, p.177-184.
103. B.S.Chang, G.Reeder, J.F.Carpenter, Development of a stable freeze-dried formulation of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, Pharm.Res., Vol.13, No.2, 1996, p.243-249.
104. H.R.Costantino, R.Langer, A.M.Klibanov, Aggregation of a lyophilized pharmaceutical protein, recombinant human albumin: effect of moisture and stabilization by excipients, Bio/Technology, Vol.13, No.5, 1995, p.493-496.
105. T.L.Burkoth, B.J.Bellhouse, G.Hewson, D.J.Longridge, A.G.Muddle, D.F.Sarphie, Transdermal and transmucosal powdered drug delivery, Crit.Rev.Ther.Drug Carrier Syst., Vol.16, No.4, 1999, p.331-384.
106. G.Lee, Spray-drying of proteins, Pharm.Biotechnol., Vol.13, Rational Design of Stable Protein Formulations, 2002, p.135-158.
107. H.J.C.Eriksson, W.L.J.Hinrichs, B.van Veen, G.W.Somsen, G.J.de Jong, H.W.Frijlink, Investigations into the stabilisation of drugs by sugar glasses: I. Tablets prepared from stabilised alkaline phosphatase, Int.J.Pharm., Vol.249, No.1-2, 2002, p.59-70.
108. H.J.C.Eriksson, W.R.Verweij, K.Poelstra, W.L.J.Hinrichs, G.J.de Jong, G.W.Somsen, H.W.Frijlink, Investigations into the stabilisation of drugs by sugar glasses: II Delivery of an inulin-stabilised alkaline phosphatase in the intestinal lumen via the oral route, Int.J.Pharm., Vol.257, No.1-2, 2003, p.273-281.
109. Europäisches Arzneibuch, 4. Ausgabe, Grundwerk 2002 (in 2 Bänden), Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, 2002.
110. T.Loftsson, M.E.Brewster, H.Derendorf, N.Bodor, 2-Hydroxypropyl b-cyclodextrin: properties and usage in pharmaceutical formulations, PZ Wissenschaft, Vol.4, No.1, 1991, p.5-10.
111. M.Gröger, E.K.Kretzer, S.Würthner, Cyclodextrine, <http://www.science-forum.de/download/Cyclo-praktikum.pdf>, p.1-48.
112. General Cylcodextrin Info, CTD, Inc.Cyclodextrin Resource, http://www.cyclodex.com/routeof_administration.htm.
113. B.O.Janssen Biotech, A real solution for real drug delivery problems, Encapsin HPB, 1992, p.1-8.
114. K.Uekama, F.Hirayama, Improvement of drug properties by cyclodextrins, 1996, Practice of Medicinal Chemistry.
115. M.E.Brewster, M.S.Hora, J.W.Simpkins, N.Bodor, Use of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin as a solubilizing and stabilizing excipient for protein drugs, Pharm.Res., Vol.8, No.6, 1991, p.792-795.
116. B.Borde, A.Cesaro, A DSC study of hydrated sugar alcohols: isomalt, J.Therm.Anal.Cal., Vol.66, No.1, 2001, p.179-195.
117. H.Bollinger, W.Seibel, H.Steinlage, Preparation of cereal extrudates with the sugar substitute Palatinit (isomalt), Getreide, Mehl, Brot, Vol.44, No.1, 1990, p.24-28.
118. P.J.Straeter, W.E.Irwin, Isomalt, Food Sci.Technol., Vol.48, Altern. Sweeteners (2nd Ed.), 1991, p.309-332.
119. D.B.Volkin, P.K.Tsai, J.M.Dabora, J.O.Gress, C.J.Burke, R.J.Linhardt, C.R.Middaugh, Physical stabilization of acidic fibroblast growth factor by polyanions, Arch .Biochem.Biophys., Vol.300, No.1, 1993, p.30-41.
120. H.Schiweck, Palatinit - preparation, technological properties and analysis of palatinit containing foods, Alimenta, Vol.19, No.1, 1980, p.5-16.

121. S.De Gennaro, G.G.Birch, S.A.Parke, B.Stancher, Studies on the physicochemical properties of inulin and inulin oligomers, *Food Chem.*, Vol.68, No.2, 1999, p.179-183.
122. W.L.J.Hinrichs, M.G.Prinsen, H.W.Frijlink, Inulin glasses for the stabilization of therapeutic proteins, *Int.J.Pharm.*, Vol.215, No.1-2, 2001, p.163-174.
123. Herstellung von Inulin und Oligofructose, www.orafti.com/orafti/oraftiafi.nsf/docs/OurProducts?opendocument&maincat=OurProducts&cat=OurProducts.
124. Oligofructose, www.wiley-vch.de/books/biopoly/pdf_v06/bpol6014_439_448.pdf.
125. Trehalose, in: J.Falbe, M.Regnitz, eds., *Römpp Chemie Lexikon*, Thieme Verlag, Stuttgart, 1992.
126. RVC-Verfahrenschema ALPHA-RVC, Fa. Martin Christ, Osterode, Zeichnung Nr. 166595-D, in der Anlage der Bedienungsanleitung zum Rotations-Vakuum-Konzentrator ALPHA-RVC Version 604, 1996, p.19-2-0096.
127. Bedienungsanleitung Runder Vakuum-Trockenschrank RVT 360 Fa. Heraeus.
128. IR-Dancer, Fa. Hettich-Zentrifugen, www.hettichlab.com/deutsch/deutsch.htm.
129. Vakuumtrockenschrank, Fa. Memmert, www.memmert.com/frame/fr_prd_d.htm.
130. Vacuubrand- Vario 2002 Membranvakuumpumpe, http://www.vacuubrand.de/produkte/prod_fm_03.htm.
131. GT-Anlage Epsilon 2-12 D Special, Fa. Martin Christ, www.martinchrist.de/homemd.htm.
132. A.C.Herman, T.C.Boone, H.S.Lu, Characterization, formulation, and stability of Neupogen (Filgrastim), a recombinant human granulocyte colony stimulating factor, *Pharm.Biotechnol.*, Vol.9, Formulation, Characterization, and Stability of Protein Drugs, 1996, p.303-328.
133. L.O.Narhi, T.Arakawa, K.H.Aoki, R.Elmore, M.F.Rohde, T.Boone, T.W.Strickland, The effect of carbohydrate on the structure and stability of erythropoietin, *J.Biol.Chem.*, Vol.266, No.34, 1991, p.23022-23026.
134. B.Anspach, H.U.Gierlich, K.K.Unger, Comparative study of Zorbax Bio Series GF 250 and GF 450 and TSK-gel 3000 SW and SWXL columns in size-exclusion chromatography of proteins, *J.Chromatogr.*, Vol.443, 1988, p.45-54.
135. O.Hiraoka, H.Anaguchi, Y.Ota, Evidence for the ligand-induced conversion from a dimer to a tetramer of the granulocyte colony-stimulating factor receptor, *FEBS Lett.*, Vol.356, No.2,3, 1994, p.255-260.
136. M.E.Himmel, P.G.Squire, High-pressure gel permeation chromatography of native proteins on TSK-SW columns, *Int.J.Pept.Protein Res.*, Vol.17, No.3, 1981, p.365-373.
137. O.Hiraoka, H.Anaguchi, A.Asakura, Y.Ota, Requirement for the immunoglobulin-like domain of granulocyte colony-stimulating factor receptor in formation of a 2:1 receptor-ligand complex, *J.Biol.Chem.*, Vol.270, No.43, 1995, p.25928-25934.
138. J.K.Towns, Moisture content in proteins: its effects and measurement, *J.Chromatogr., A*, Vol.705, No.1, 1995, p.115-127.
139. B.L.Chen, T.Arakawa, E.Hsu, L.O.Narhi, T.J.Tressel, S.L.Chien, Strategies to suppress aggregation of recombinant keratinocyte growth factor during liquid formulation development, *J.Pharm.Sci.*, Vol.83, No.12, 1994, p.1657-1661.
140. B.L.Chen, T.Arakawa, C.F.Morris, W.C.Kenney, C.M.Wells, C.G.Pitt, Aggregation pathway of recombinant human keratinocyte growth factor and its stabilization, *Pharm.Res.*, Vol.11, No.11, 1994, p.1581-1587.

141. M.Mattern, G.Winter, R.Rudolph, G.Lee, Formulation of proteins in vacuum-dried glasses. Part 1. Improved vacuum-drying of sugars using crystallizing amino acids, *Eur.J.Pharm.Biopharm.*, Vol.44, No.2, 1997, p.177-185.
142. M.Mattern, G.Winter, U.Kohnert, G.Lee, Formulation of proteins in vacuum-dried glasses. II. Process and storage stability in sugar-free amino acid systems, *Pharm.Dev.Technol.*, Vol.4, No.2, 1999, p.199-208.
143. E.D.Breen, J.G.Curley, D.E.Overcashier, C.C.Hsu, S.J.Shire, Effect of moisture on the stability of a lyophilized humanized monoclonal antibody formulation, *Pharm.Res.*, Vol.18, No.9, 2001, p.1345-1353.
144. M.C.Lai, M.J.Hageman, R.L.Schowen, R.T.Borchardt, E.M.Topp, Chemical stability of peptides in polymers. 1. effect of water on peptide deamidation in poly(vinyl alcohol) and poly(vinyl pyrrolidone) matrixes, *J.Pharm.Sci.*, Vol.88, No.10, 1999, p.1073-1080.
145. M.C.Lai, M.J.Hageman, R.L.Schowen, R.T.Borchardt, B.B.Laird, E.M.Topp, Chemical stability of peptides in polymers. 2. discriminating between solvent and plasticizing effects of water on peptide deamidation in polyvinylpyrrolidone, *J.Pharm.Sci.*, Vol.88, No.10, 1999, p.1081-1089.
146. H.R.Costantino, R.Langer, A.M.Klibanov, Solid-phase aggregation of proteins under pharmaceutically relevant conditions, *J.Pharm.Sci.*, Vol.83, No.12, 1994, p.1662-1669.
147. H.R.Costantino, R.Langer, A.M.Klibanov, Moisture-induced aggregation of lyophilized insulin, *Pharm.Res.*, Vol.11, No.1, 1994, p.21-29.
148. M.C.Lai, E.M.Topp, Solid-state chemical stability of proteins and peptides, *J.Pharm.Sci.*, Vol.88, No.5, 1999, p.489-500.
149. J.Brånge, L.Langkjær, Chemical stability of insulin. 3. Influence of excipients, formulation, and pH, *Acta Pharm.Nord.*, Vol.4, No.3, 1992, p.149-158.
150. K.Izutsu, S.Yoshioka, T.Terao, Stability of beta-galactosidase by amphiphilic additives during freeze-drying, *Int.J.Pharm.*, Vol.90, No.3, 1993, p.187-194.
151. V.Sluzky, J.A.Tamada, A.M.Klibanov, R.Langer, Kinetics of insulin aggregation in aqueous solutions upon agitation in the presence of hydrophobic surfaces, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, Vol.88, No.21, 1991, p.9377-9381.
152. S.D.Allison, A.Dong, J.F.Carpenter, Counteracting effects of thiocyanate and sucrose on chymotrypsinogen secondary structure and aggregation during freezing, drying, and rehydration, *Biophys.J.*, Vol.71, No.4, 1996, p.2022-2032.
153. M.Katakam, L.N.Bell, A.K.Banga, Effect of surfactants on the physical stability of recombinant human growth hormone, *J.Pharm.Sci.*, Vol.84, No.6, 1995, p.713-716.
154. J.Brånge, L.Andersen, E.D.Laursen, G.Meyn, E.Rasmussen, Toward understanding insulin fibrillation, *J.Pharm.Sci.*, Vol.86, No.5, 1997, p.517-525.
155. R.Bartkowski, R.Kitchel, N.Peckham, L.Margulis, Aggregation of recombinant bovine granulocyte colony stimulating factor in solution, *J.Prot.Chem.*, Vol.21, No.3, 2002, p.137-143.
156. M.Willmann, W.Fraunhofer, G.Winter, Reversible aggregation of G-CSF during vacuum drying from aqueous solutions, Poster for Colorado Protein Stability Conference, Breckenridge, 2002.
157. M.Willmann, W.Fraunhofer, G.Winter, Vacuum drying of protein solutions - New results in evaluation of vacuum concentration processes, Poster for AAPS Annual Meeting and Exposition, Toronto, 2002.
158. H.Colfen, M.Antonietti, Field-flow fractionation techniques for polymer and colloid analysis, *Adv.Poly.Sci.*, Vol.150, New Developments in Polymer Analytics I, 2000, p.67-187.
159. K.D.Caldwell, Steric Field-Flow Fractionation and the Steric Transition, in: M.E.Schimpf, K.D.Caldwell, J.C.Giddings, eds., *Field-Flow Fractionation Handbook*, Wiley Interscience, 2003, p.79-94.

160. K.D.Jensen, S.K.Williams, J.C.Giddings, High-speed particle separation and steric inversion in thin flow field-flow fractionation channels, *J.Chrom., A*, Vol.746, No.1, 1996, p.137-145.
161. B.R.Min, S.J.Kim, K.H.Ahn, M.H.Moon, Hyperlayer separation in hollow fiber flow field-flow fractionation: effect of membrane materials on resolution and selectivity, *J.Chrom., A*, Vol.950, No.1-2, 2002, p.175-182.
162. T.A.Horbett, Adsorption of proteins and peptides at interfaces, *Pharm.Biotechnol., Vol.2, Stability of Protein Pharmaceuticals, Part A*, 1992, p.195-214.
163. D.A.Calhoun, S.E.Juul, E.V.McBryde, M.W.Veerman, R.D.Christensen, Stability of filgrastim and epoetin alfa in a system designed for enteral administration in neonates, *Ann.Pharmacother., Vol.34, No.11*, 2000, p.1257-1261.
164. T.P.Johnston, Adsorption of recombinant human granulocyte colony stimulating factor (rhG-CSF) to polyvinyl chloride, polypropylene, and glass: Effect of solvent additives, *PDA J.Pharm.Sci.Technol., Vol.50, No.4*, 1996, p.238-245.
165. S.Prestrelski, N.Tedeschi, T.Arakawa, J.F.Carpenter, Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers, *Biophys.J., Vol.65, No.2*, 1993, p.661-671.
166. M.Ono, M.Oh-eda, S.Kamachi, M.Kato, Y.Endo, N.Ochi, Structure of G-CSF: significance of the sugar chain, *J.Nutr.Sci.Vitam., Spec No*, 1992, p.337-340.
167. L.O.Narhi, W.C.Kenney, T.Arakawa, Conformational changes of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor induced by pH and guanidine hydrochloride, *J.Protein Chem., Vol.10, No.4*, 1991, p.359-367.
168. C.S.Bae, D.S.Yang, J.Lee, Y.H.Park, Improved process for production of recombinant yeast-derived monomeric human G-CSF, *Appl.Microbiol.Biotechnol., Vol.52, No.3*, 1999, p.338-344.
169. M.Hasegawa, A thermodynamic model for denaturation of granulocyte colony-stimulating factor: O-linked sugar chain suppresses not the triggering deprotonation but the succeeding denaturation, *Biochim.Biophys.Acta, Vol.1203, No.2*, 1993, p.295-297.
170. K.Kasraian, A.Kuzniar, D.Earley, B.J.Kamicker, G.Wilson, T.Manion, J.Hong, C.Reiber, P.Canning, Sustained in vivo activity of recombinant bovine granulocyte colony stimulating factor (rbG-CSF) using HEPES buffer, *Pharm.Dev.Technol., Vol.6, No.3*, 2001, p.441-447.
171. E.Y.Chi, Roles of conformational stability and colloidal stability in the aggregation of rhG-CSF, Poster Breckenridge "Protein Stability Convergence", 17-20.7.02.
172. J.A.Rupley, G.Careri, Protein hydration and function, *Adv.Protein Chem., Vol.41*, 1991, p.37-172.
173. D.B.Volkin, A.M.Klibanov, Minimizing protein inactivation, in: T.E.Creighton, ed., *Protein Function: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, 1989, p.1-23.
174. T.Arakawa, Y.Kita, J.F.Carpenter, Protein-solvent interactions in pharmaceutical formulations, *Pharm.Res., Vol.8, No.3*, 1991, p.285-291.
175. S.N.Timasheff, Control of protein stability and reactions by weakly interacting cosolvents: the simplicity of the complicated, *Adv.Prot.Chem., Vol.51, Linkage Thermodynamics of Macromolecular Interactions*, 1998, p.355-432.
176. R.W.Ruddon, E.Bedows, Assisted protein folding, *J.Biol.Chem., Vol.272, No.6*, 1997, p.3125-3128.
177. G.B.Fields, D.O.V.Alonso, D.Stigter, K.A.Dill, Theory for the aggregation of proteins and copolymers, *J.Phys.Chem., Vol.96, No.10*, 1992, p.3974-3981.
178. L.C.Gu, E.A.Erdos, H.S.Chiang, T.Calderwood, K.Tsai, G.C.Visor, J.Duffy, W.C.Hsu, L.C.Foster, Stability of interleukin 1 beta (IL-1 beta) in aqueous solution: analytical methods, kinetics, products, and solution formulation implications, *Pharm.Res., Vol.8, No.4*, 1991, p.485-490.

179. B.Roser, Trehalose drying: a novel replacement for freeze-drying, *BioPharm*, Vol.4, No.8, 1991, p.47-53.
180. M.J.Pikal, Mechanisms of protein stabilization during freeze-drying and storage: the relative importance of thermodynamic stabilization and glassy state relaxation dynamics, *Drugs Pharm.Sci.*, Vol.96, Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products, 1999, p.161-198.
181. S.Cardona, C.Schebor, M.P.Buera, M.Karel, C.Jorge, Thermal stability of invertase in reduced-moisture amorphous matrixes in relation to glassy state and trehalose crystallization, *J.Food Sci.*, Vol.62, No.1, 1997, p.105-112.
182. S.D.Allison, B.Chang, T.W.Randolph, J.F.Carpenter, Hydrogen bonding between sugar and protein is responsible for inhibition of dehydration-induced protein unfolding, *Arch.Biochem.Biophys.*, Vol.365, No.2, 1999, p.289-298.
183. W.F.Wolkers, M.G.Van Kilsdonk, F.A.Hoekstra, Dehydration-induced conformational changes of poly-L-lysine as influenced by drying rate and carbohydrates, *Biochim.Biophys.Acta*, Vol.1425, No.1, 1998, p.127-136.
184. D.Q.M.Craig, P.G.Royall, V.L.Kett, M.L.Hopton, The relevance of the amorphous state to pharmaceutical dosage forms: glassy drugs and freeze dried systems, *Int.J.Pharm.*, Vol.179, No.2, 1999, p.179-207.
185. W.Wang, Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals, *Int.J.Pharm.*, Vol.203, No.1-2, 2000, p.1-60.
186. R.Jaenicke, Stability and stabilization of globular proteins in solution, *J.Biotechnol.*, Vol.79, No.3, 2000, p.193-203.
187. U.Michaelis, R.Rudolph, G.Winter, H.Woog, Buffers for stabilization of aqueous pharmaceutical preparations of G-CSF, Patent 4242919.
188. B.S.Kendrick, B.S.Chang, T.Arakawa, B.Peterson, T.W.Randolph, M.C.Manning, J.F.Carpenter, Preferential exclusion of sucrose from recombinant interleukin-1 receptor antagonist: role in restricted conformational mobility and compaction of native state, *Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A.*, Vol.94, 1997, p.11917-11922.
189. T.Arakawa, R.Bhat, S.N.Timasheff, Why preferential hydration does not always stabilize the native structure of globular proteins, *Biochemistry*, Vol.29, No.7, 1990, p.1924-1931.
190. F.Separovic, Y.H.Lam, X.Ke, H.K.Chan, A solid-state NMR study of protein hydration and stability, *Pharm.Res.*, Vol. 15, No.12, 1998, p.1816-1821.
191. M.Katakam, A.K.Banga, Aggregation of insulin and its prevention by carbohydrate excipients, *PDA J.Pharm.Sci.Technol.*, Vol.49, No.4, 1995, p.160-165.
192. M.J.Pikal, K.M.Dellerman, M.I.Roy, R.M.Riggin, The effects of formulation variables on the stability of freeze-dried human growth hormone, *Pharm.Res.*, Vol.8, No.4, 1991, p.427-436.
193. S.Yoshioka, Y.Aso, K.Izutsu, T.Terao, Aggregates formed during storage of beta-galactosidase in solution and in the freeze-dried state, *Pharm.Res.*, Vol.10, No.5, 1993, p.687-691.
194. D.B.Volkin, C.R.Middaugh, The effect of temperature on protein structure, *Pharm.Biotechnol.*, Vol.2, Stability of Protein Pharmaceuticals, Part A, 1992, p.215-247.
195. M.G.Fakes, M.V.Dali, T.A.Haby, K.R.Morris, S.A.Varia, A.T.M.Serajuddin, Moisture sorption behavior of selected bulking agents used in lyophilized products, *PDA J.Pharm.Sci.Technol.*, Vol.54, No.2, 2000, p.144-149.
196. M.J.Pikal, K.Dellerman, M.L.Roy, Formulation and stability of freeze-dried proteins: effects of moisture and oxygen on the stability of freeze-dried formulations of human growth hormone, *Dev.Biol.Stand.*, Vol.74, Biol. Prod. Freeze-Drying Formulation, 1992, p.21-38.

197. P.M.Dekeyser, S.Corveleyn, J.Demeester, J.P.Remon, Stabilization of fully active chymopapain by lyophilization, *Int.J.Pharm.*, Vol.159, No.1, 1997, p.19-25.
198. S.Corveleyn, J.P.Remon, Maltodextrins as lyoprotectants in the lyophilization of a model protein, LDH, *Pharm.Res.*, Vol. 13, No.1, 1996, p.146-150.
199. P.A.Carvajal, G.A.MacDonald, T.C.Lanier, Cryostabilization mechanism of fish muscle proteins by maltodextrins, *Cryobiology*, Vol.38, No.1, 1999, p.16-26.
200. D.K.Hincha, E.Zuther, E.M.Hellwege, A.G.Heyer, Specific effects of fructo- and gluco-oligosaccharides in the preservation of liposomes during drying, *Glycobiology*, Vol.12, No.2, 2002, p.103-110.
201. J.H.Crowe, L.M.Crowe, A.E.Oliver, N.Tsvetkova, W.Wolkers, F.Tablin, The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state, *Cryobiology*, Vol.43, No.2, 2001, p.89-105.
202. J.L.Green, C.A.Angell, Phase relations and vitrification in saccharide-water solutions and the trehalose anomaly, *J.Phys.Chem.*, Vol.93, No.8, 1989, p.2880-2882.
203. R.H.M.Hatley, J.A.Blair, Stabilization and delivery of labile materials by amorphous carbohydrates and their derivatives, *J.Mol.Cat.B: Enzymatic*, Vol.7, No.1-4, 1999, p.11-19.
204. E.M.Gribbon, R.H.M.Hatley, T.Gard, J.Blair, J.Kampinga, B.J.Roser, Trehalose and novel hydrophobic sugar glasses in drug stabilization and delivery, *Spec.Publ.- R.Soc.Chem.*, Vol.178, *Chemical Aspects of Drug Delivery Systems*, 1996, p.138-145.
205. L.M.Crowe, D.S.Reid, J.H.Crowe, Is trehalose special for preserving dry biomaterials?, *Biophys.J.*, Vol.71, No.4, 1996, p.2087-2093.
206. H.Yoshii, T.Furuta, J.Kudo, P.Linko, Crystal transformation from anhydrous α -maltose to hydrous β -maltose and from anhydrous trehalose to hydrous trehalose, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Vol.64, No.6, 2000, p.1147-1152.
207. M.P.Buera, S.Rossi, S.Moreno, J.Chirife, DSC Confirmation that vitrification is not necessary for stabilization of the restriction enzyme EcoRI dried with saccharides, *Biotechnol.Prog.*, Vol.15, No.3, 1999, p.577-579.
208. S.A.Charman, K.L.Mason, W.N.Charman, Techniques for assessing the effects of pharmaceutical excipients on the aggregation of porcine growth hormone, *Pharm.Res.*, Vol.10, No.7, 1993, p.954-962.
209. J.Horsky, J.Pitha, Inclusion complexes of proteins: interaction of cyclodextrins with peptides containing aromatic amino acids studied by competitive spectrophotometry, *J.Incl.Phén.Mol.Rec.Chem.*, Vol.18, No.3, 1994, p.291-300.
210. M.E.Brewster, J.W.Simpkins, M.S.Hora, N.Bodor, Application of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin to protein stabilization and solubilization, 1990, *Minutes Int. Symp. Cyclodextrins*, 5th.
211. A.Cooper, Effect of cyclodextrins on the thermal stability of globular proteins, *J.Am.Chem.Soc.*, Vol.114, No.23, 1992, p.9208-9209.
212. I.Tetsumi, K.Uekama, Cyclodextrins in peptide and protein delivery, *Adv.Drug Delivery Rev.*, Vol.36, No.1, 1999, p.101-123.
213. E.Y.Chi, S.Krishnan, B.S.Kendrick, B.S.Chang, J.F.Carpenter, T.W.Randolph, Roles of conformational stability and colloidal stability in the aggregation of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor, *Protein Science*, Vol.12, No.5, 2003, p.903-913.
214. M.E.Brewster, J.W.Simpkins, M.S.Hora, W.C.Stern, N.Bodor, The potential use of cyclodextrins in parenteral formulations, *J.Parenter.Sci.Technol.*, Vol.43, No.5, 1989, p.231-240.

8. ANLAGEN

Übersicht über die Restwassergehalte (RWG)

RWG [%] n.GT	GCSF pH 7,4				GCSF pH 4				EPO			
	50 °C	40 °C	20 °C	4 °C	50 °C	40 °C	20 °C	4 °C	50 °C	40 °C	20 °C	4 °C
AM	2,6	2,9	1,7	0,8	3,1	3,0	1,9	0,9	2,4	2,8	1,5	0,9
AMP	2,6	2,4	1,8	0,7	3,4	1,2	1,2	0,9	3,1	3,3	1,5	0,8
R	3,1	3,4	1,7	0,9	2,5	n.b.	2,8	1,6	2,7	2,6	1,5	0,7
RP	2,8	3,0	1,3	0,9	3,7	3,8	2,1	1,5	2,3	2,9	1,0	0,8
T	5,0	4,8	3,3	1,8	4,6	5,2	2,9	1,8	3,1	2,9	2,0	1,0
TP	4,5	4,4	2,4	1,6	2,9	n.b.	2,9	1,4	4,0	4,1	1,7	1,4
SAP	2,9	3,1	2,1	1,2	3,0	3,1	1,9	1,2	3,1	3,1	2,8	1,3

Tab. 8-1: RWG der verschiedenen gefriergetrockneten Rezepturen nach 12 Wochen Lagerung

RWG [%] n.VT	GCSF pH 7,4				GCSF pH 4				EPO			
	50 °C	40 °C	20 °C	4 °C	50 °C	40 °C	20 °C	4 °C	50 °C	40 °C	20 °C	4 °C
AM	2,5	2,9	1,4	1,0	2,1	1,4	0,9	0,7	1,9	2,3	1,1	1,0
AMP	3,2	3,6	1,9	0,9	5,3	4,9	2,7	1,4	2,3	3,2	2,5	0,8
R	6,2	6,2	6,7	7,0	9,9	8,7	7,7	7,3	5,9	6,3	6,4	7,0
RP	2,6	2,5	1,9	0,9	4,6	3,1	1,7	1,4	3,0	3,9	2,4	1,1
T	8,3	8,9	9,0	9,0	8,0	7,1	7,7	8,2	8,2	10,4	7,6	8,4
TP	3,0	3,4	1,7	0,7	4,9	4,9	3,4	1,9	4,1	3,2	1,6	0,6
SAP	2,5	2,4	1,6	1,2	5,4	5,3	4,4	3,5	4,2	4,4	3,1	3,5

Tab. 8-2: RWG der verschiedenen vakuumgetrockneten Rezepturen nach 12 Wochen Lagerung

G-CSF pH 7,4	GT						VT					
	ohne Phe			mit Phe			ohne Phe			mit Phe		
	50 °C	40 °C	4 °C	50 °C	40 °C	4 °C	50 °C	40 °C	4 °C	50 °C	40 °C	4 °C
NW	0,1			0,0			0,1			0,1		
2 W	0,7	0,5	0,1	0,6	0,4	0,1	0,7	0,4	0,1	0,6	0,4	0,0
6 W	1,3	0,6	0,1	0,9	0,6	0,1	1,0	0,8	0,1	0,9	0,7	0,1
12 W	1,2	1,1	1,2	1,1	1,0	1,0	1,2	1,1	1,2	1,1	1,3	1,1

Tab. 8-3: RWG der verschiedenen HP-β-cyclodextrin-Proben mit pH 7,4

G-CSF pH 4	GT						VT					
	ohne Phe			mit Phe			ohne Phe			mit Phe		
	50 °C	40 °C	4 °C	50 °C	40 °C	4 °C	50 °C	40 °C	4 °C	50 °C	40 °C	4 °C
NW	0,1			0			0,1			0,1		
2 W	0,7	0,4	0,0	0,6	0,3	0,0	0,7	0,6	0,1	0,8	0,4	0,1
6 W	1,3	1,0	0,1	0,8	0,6	0,1	1,0	0,9	0,1	1,0	0,7	0,1
12 W	0,9	1,3	0,8	0,9	0,9	0,9	1,3	0,9	0,9	0,9	0,6	1,1

Tab. 8-4: RWG der verschiedenen HP-β-cyclodextrin-Proben mit pH 4

EPO	GT						VT					
	ohne Phe			mit Phe			ohne Phe			mit Phe		
	50 °C	40 °C	4 °C	50 °C	40 °C	4 °C	50 °C	40 °C	4 °C	50 °C	40 °C	4 °C
NW	0,1			0			0,1			0		
2 W	0,6	0,6	0,1	0,6	0,4	0,1	0,7	0,5	0,1	0,7	0,4	0,1
6 W	0,9	0,7	0,0	0,8	0,6	0,0	1,0	0,8	0,1	0,8	0,6	0,1
12 W	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1

Tab. 8-5: RWG der verschiedenen HP-β-cyclodextrin-Proben mit EPO

RWG	50 °C										40 °C										20 °C										4 °C									
	AM		R		RP		T		TP		SAP		AM		R		RP		T		TP		SAP		AM		R		RP		T		TP		SAP					
	AMP	AMP	R	R	RP	RP	T	T	TP	TP	SAP	SAP	AM	AMP	R	R	RP	RP	T	T	TP	TP	SAP	SAP	AM	AMP	R	R	RP	RP	T	T	TP	TP	SAP					
NW	0	0,2	0,3	2,4	0	0,5	0,4	0,5	0,4	0,5	0,4	0	0,2	0,3	0	0,5	0,4	0,5	0,4	0,5	0,4	0,5	0	0,2	0,3	0	0,5	0,4	0,5	0,4	0,5	0,4	0,5	0,4	0,5					
2w	2,2	2,3	2,4	2,1	4,3	3,4	3,4	2,7	1,9	1,5	1,2	3,3	2,7	2,1	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.					
4w	2,1	2,6	1,8	2,6	4,7	3,5	3,2	3,2	2,0	2,4	1,8	4,7	2,0	2,6	0,8	0,7	0,9	0,6	1,9	0,8	1,4	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6	0,4	1,2	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7						
8w	nb	nb.	nb.	nb.	nb.	4,4	3,9	nb.	nb.	nb.	nb.	5,0	4,1	3,2	nb.	nb.	nb.	nb.	2,7	2,0	1,9	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	0,7	1,6	1,3	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1						
12w	2,6	2,6	3,1	2,8	5,0	4,5	2,9	2,9	2,4	3,4	3,0	4,8	4,4	3,1	1,7	1,8	1,7	1,3	3,3	2,4	2,1	0,8	0,7	0,9	0,9	0,9	1,8	1,6	1,8	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6						

Tab. 8-6: Gesamtübersicht der KF-Daten der verschiedenen gefriergetrockneten G-CSF-Rezepturen mit pH 7,4

RWG	50 °C										40 °C										20 °C										4 °C									
	AM		R		RP		T		TP		SAP		AM		R		RP		T		TP		SAP		AM		R		RP		T		TP		SAP					
	AMP	AMP	R	R	RP	RP	T	T	TP	TP	SAP	SAP	AM	AMP	R	R	RP	RP	T	T	TP	TP	SAP	SAP	AM	AMP	R	R	RP	RP	T	T	TP	TP	SAP					
NW	0,7	0,3	0,3	0,5	0,7	0,7	0,4	0,7	0,3	0,3	0,5	0,7	0,7	0,4	0,7	0,3	0,3	0,5	0,7	0,7	0,7	0,4	0,7	0,3	0,3	0,3	0,5	0,7	0,7	0,7	0,4	0,7	0,3	0,3	0,5	0,7				
2w	2,6	2,5	1,8	3,1	4,2	3,3	1,9	1,8	1,5	1,2	2,7	3,3	1,9	1,9	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.					
4w	2,7	2,9	2,8	3,4	4,3	4,3	1,5	1,9	2,2	2,0	3,7	4,7	2,3	2,6	0,7	0,4	0,9	0,7	1,2	0,8	0,6	0,6	1,0	0,8	1,9	1,7	2,0	1,6	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3					
8w	3,6	3,2	3,1	3,8	5,6	4,0	3,0	3,3	3,0	4,7	4,1	4,9	4,3	3,0	1,6	1,4	2,5	2,3	2,9	1,3	1,8	1,8	0,9	0,9	1,6	1,3	1,8	1,5	1,3	1,5	1,3	1,5	1,3	1,3						
12w	3,1	3,4	2,5	3,7	4,6	2,9	3,0	3,0	1,2	9,8	3,8	5,2	4,2	3,1	1,9	1,2	2,8	2,1	2,9	2,9	1,9	1,9	0,9	0,9	1,6	1,5	1,8	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4						

Tab. 8-7: Gesamtübersicht der KF-Daten der verschiedenen gefriergetrockneten G-CSF-Rezepturen mit pH 4

RWG	50 °C										40 °C										20 °C										4 °C									
	AM		R		RP		T		TP		SAP		AM		R		RP		T		TP		SAP		AM		R		RP		T		TP		SAP					
	AMP	AMP	R	R	RP	RP	T	T	TP	TP	SAP	SAP	AM	AMP	R	R	RP	RP	T	T	TP	TP	SAP	SAP	AM	AMP	R	R	RP	RP	T	T	TP	TP	SAP					
NW	0,2	0,2	0,3	0,3	0,5	0,6	0,8	0,8	0,2	0,2	0,3	0,5	0,6	0,8	0,2	0,2	0,3	0,3	0,5	0,6	0,8	0,8	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,5	0,6	0,8	0,8	0,8	0,8							
2w	1,7	2,6	2,1	1,8	4,4	3,4	2,8	2,0	1,4	1,4	1,5	1,6	2,8	2,0	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.						
4w	2,0	2,1	2,4	1,9	2,7	4,3	3,6	1,5	2,4	2,3	1,8	2,9	3,7	2,6	0,5	0,9	0,8	0,7	1,2	1,6	1,6	1,6	0,4	0,5	0,4	0,4	0,4	0,7	0,8	0,8	0,7	0,8	0,7							
8w	2,2	3,2	2,5	1,7	3,2	4,7	3,1	2,1	2,6	2,7	2,5	2,4	4,1	3,1	0,9	1,2	1,4	0,9	1,5	2,0	1,9	1,9	0,7	0,6	0,8	0,7	1,3	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0							
12w	2,4	3,1	2,7	2,3	3,1	4,0	3,1	2,8	3,3	2,6	2,9	2,9	4,1	3,1	1,5	1,5	1,5	1,0	2,0	1,7	2,8	2,8	0,9	0,8	0,7	0,8	1,0	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4							

Tab. 8-8: Gesamtübersicht der KF-Daten der verschiedenen gefriergetrockneten EPO-Rezepturen

RWG	50 °C								40 °C								20 °C								4 °C							
	AM	AMP	R	RP	T	TP	SAP	AM	AMP	R	RP	T	TP	SAP	AM	AMP	R	RP	T	TP	SAP	AM	AMP	R	RP	T	TP	SAP				
	[%]																															
NW	0,6	0,5	8,1	0,3	10,7	0,4	1,1	0,6	0,5	8,1	0,3	10,7	0,4	1,1	0,6	0,5	8,1	0,3	10,7	0,4	1,1	0,6	0,5	8,1	0,3	10,7	0,4	1,1				
2w	1,3	2,4	7,2	2,4	8,7	2,0	1,2	1,3	1,9	6,2	1,6	8,5	1,9	1,7	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.				
4w	1,6	2,6	5,8	2,2	8,8	3,1	2,6	1,8	2,6	5,6	2,0	8,2	2,7	1,8	0,6	1,2	6,6	1,1	8,2	1,0	1,0	0,8	0,6	6,7	0,4	8,5	0,4	0,8				
8w	2,3	3,3	6,5	2,5	8,7	2,7	2,5	1,7	3,6	6,4	2,9	9,0	2,7	2,2	0,9	1,6	6,8	1,5	8,9	1,5	1,5	0,9	0,7	7,0	0,8	8,7	0,7	0,9				
12w	2,5	3,2	6,2	2,6	8,3	3,0	2,5	2,9	3,6	6,2	2,5	8,9	3,4	2,4	1,4	1,9	6,7	1,9	9,0	1,7	1,6	1,0	0,9	7,0	0,9	9,0	0,7	1,2				

Tab. 8-9: Gesamtübersicht der KF-Daten der verschiedenen vakuumgetrockneten G-CSF-Rezepturen mit pH 7,4

RWG	50 °C								40 °C								20 °C								4 °C							
	AM	AMP	R	RP	T	TP	SAP	AM	AMP	R	RP	T	TP	SAP	AM	AMP	R	RP	T	TP	SAP	AM	AMP	R	RP	T	TP	SAP				
	[%]																															
NW	2,1	0,8	9,3	0,7	10,0	0,4	3,4	2,1	0,8	9,3	0,7	10,0	0,4	3,4	2,1	0,8	9,3	0,7	10,0	0,4	3,4	2,1	0,8	9,3	0,7	10,0	0,4	3,4				
2w	1,3	4,4	9,4	2,0	7,5	4,2	5,2	0,9	3,2	8,1	3,0	8,0	3,4	4,0	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.				
4w	2,0	5,0	9,1	4,6	7,5	2,7	5,0	0,9	4,7	8,7	3,6	7,3	4,2	4,9	0,5	1,9	7,1	1,8	7,9	1,8	3,8	0,6	0,8	6,5	0,4	7,8	1,0	2,7				
8w	1,2	4,8	9,2	4,9	7,8	5,7	5,2	1,5	4,4	8,8	4,4	7,5	4,4	5,7	1,0	nb.	7,4	1,9	7,7	2,6	3,8	0,7	1,2	6,7	0,6	8,0	1,2	3,1				
12w	2,1	5,3	9,9	4,6	8,0	4,9	5,4	1,4	4,9	8,7	3,1	7,1	4,9	5,3	0,9	2,7	7,7	1,7	7,7	3,4	4,4	0,7	1,4	7,3	1,4	8,2	1,9	3,5				

Tab. 8-10: Gesamtübersicht der KF-Daten der verschiedenen vakuumgetrockneten G-CSF-Rezepturen mit pH 4

RWG	50 °C								40 °C								20 °C								4 °C							
	AM	AMP	R	RP	T	TP	SAP	AM	AMP	R	RP	T	TP	SAP	AM	AMP	R	RP	T	TP	SAP	AM	AMP	R	RP	T	TP	SAP				
	[%]																															
NW	0,2	0	8,0	0	11,1	0	2,3	0,2	0	8,0	0	11,1	0	2,3	0,2	0	8,0	0	11,1	0	2,3	0,2	0	8,0	0	11,1	0	2,3				
2w	2,3	2,1	7,7	3,0	9,8	3,3	3,6	1,6	1,6	7,8	1,6	9,8	2,9	3,3	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.				
4w	2,0	3,2	nb.	9,4	10,7	3,8	4,5	1,7	2,2	7,5	3,5	10,8	1,9	4,0	0,9	1,5	8,6	2,5	nb.	0,9	2,3	0,7	0,6	6,6	0,5	9,1	0,6	2,7				
8w	2,0	3,4	5,7	3,6	10,4	3,9	4,6	1,6	2,8	7,8	4,0	9,9	3,3	4,0	1,1	2,0	6,6	2,0	9,4	1,3	3,1	0,6	1,0	6,9	1,0	9,3	0,6	3,1				
12w	1,9	2,3	5,9	3,0	8,2	4,1	4,2	2,3	3,2	6,3	3,9	10,4	3,2	4,4	1,1	2,5	6,4	2,4	7,6	1,6	3,1	1,0	0,8	7,0	1,1	8,4	0,6	3,5				

Tab. 8-11: Gesamtübersicht der KF-Daten der verschiedenen vakuumgetrockneten EPO-Rezepturen

Übersicht über die DSC-Daten

T _g [°C] n. GT	G-CSF pH 7,4		G-CSF pH 4,0		EPO	
	NW	nach Lagerung	NW	nach Lagerung	NW	nach Lagerung
AM	≥ 89	≥ 80	≥ 84	≥ 80	≥ 76	≥ 77
AMP	≥ 85	≥ 94	≥ 77	≥ 84	≥ 78	≥ 86
R	≥ 62	≥ 69	≥ 60	≥ 67	≥ 55	≥ 58
RP	≥ 58	≥ 69	≥ 47	≥ 66	≥ 66	≥ 57
T	≥ 61	≥ 67	≥ 57	≥ 68	≥ 66	≥ 67
TP	≥ 57	≥ 60	≥ 47	≥ 64	≥ 46	≥ 57
SAP	≥ 56	≥ 47	≥ 59	≥ 45	≥ 52	≥ 46

Tab. 8-12: DSC-Daten der verschiedenen gefriergetrockneten Rezepturen nach 12 Wochen Lagerung

T _g [°C] n.VT	G-CSF pH 7,4					G-CSF pH 4					EPO				
	t=0	4 °C	20 °C	40 °C	50 °C	t=0	4 °C	20 °C	40 °C	50 °C	t=0	4 °C	20 °C	40 °C	50 °C
AM7,4	114,9	106,7	102,9	81,4	92,6	118,0	102,7	97,5	81,5	91,0	110,2	107,4	91,1	80,1	89,7
AMP7,4	120,7	94,0	n.b.	104,0	90,5	147,3	89,0	87,5	82,6	91,2	149,3	58,2	57,2	78,3	78,8
R7,4	45,2	42,6	47,8	45,6	47,6	40,5	42,0	41,8	33,4	31,7	40,8	38,0	45,3	31,6	46,4
RP7,4	95,8	95,5	78,0	71,5	74,1	88,3	87,2	73,8	65,4	68,6	91,0	91,7	75,8	66,5	75,2
T7,4	39,1	40,8	53,2	44,0	krist.	33,1	40,2	38,6	46,8	47,1	64,7	36,0	krist.		
TP7,4	99,4	95,3	87,4	71,4	71,9	95,3	87,8	79,5	76,2	64,6	94,1	93,8	86,7	71,2	69,0
SAP7,4	63,9	59,9	56,2	52,0	46,9	44,1	42,4	40,8	25,5	25,1	46,2	40,2	46,0	31,5	31,5

Tab. 8-13: DSC-Daten der verschiedenen vakuumgetrockneten Rezepturen nach 12 Wochen Lagerung

T _g [°C] nach GT		mit Phe			ohne Phe		
		50 °C	40 °C	4 °C	50 °C	40 °C	4 °C
G-CSF pH 7,4	NW	81,4			92,3		
	12 W	74,3	82,8	82,5	81,1	98	93,8
G-CSF pH 4	NW	77,7			85,0		
	12 W	80,8	95,8	83,1	101,9	100,0	93,3
EPO	NW	88,5			93,6		
	12 W	76,1	91,2	91,7	94,7	103,0	93,1

Tab. 8-14: DSC-Daten der gefriergetrockneten HP-β-cyclodextrin-Rezepturen nach 12 Wochen Lagerung

T _g [°C] nach VT		mit Phe			ohne Phe		
		50 °C	40 °C	4 °C	50 °C	40 °C	4 °C
G-CSF pH 7,4	NW	98,9			106,0		
	12 W	98,2	97,7	90,2	108,6	91,6	89,1
G-CSF pH 4	NW	105,6			98,8		
	12 W	99,9	81,4	91,2	117,2	114,4	97,5
EPO	NW	98			n.b.		
	12 W	104,1	103,4	102,8	105,8	109,4	107,7

Tab. 8-15: DSC-Daten der vakuumgetrockneten HP-β-cyclodextrin-Rezepturen nach 12 Wochen Lagerung

Übersicht über die SEC-Daten [Monomer-Gehalte in %]

Zeit [W]	°C	FAM7,4	FAMP7,4	FR7,4	FRP7,4	FT7,4	FTP7,4	FSAP7,4
1	40	16,2	39,0	19,4	33,2	43,4	32,9	0,0
	30	76,7	89,6	81,2	88,8	92,3	90,1	73,1
	20	86,7	99,3	93,7	96,6	99,5	97,9	94,4
	4	85,8	95,1	90,6	96,1	98,5	96,9	94,9
2	40	6,7	20,3	13,2	19,2	21,5	13,9	0,0
	30	75,6	88,3	73,3	81,3	91,6	84,7	61,0
	20	86,9	98,0	94,5	95,9	100,6	97,5	92,5
	4	86,2	97,2	91,9	96,0	100,3	97,8	92,4
4	40	2,6	11,2	9,5	8,8	9,0	4,1	0,0
	30	65,2	80,8	66,5	67,1	89,3	73,4	32,7
	20	88,0	95,5	88,8	91,3	98,1	93,6	82,7
	4	86,9	96,8	96,8	97,8	100,4	98,1	92,2
8	40	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	30	53,5	63,3	56,7	52,7	80,9	53,9	10,8
	20	80,5	96,2	91,3	91,4	99,9	96,6	77,3
	4	82,0	94,1	94,3	95,4	102,5	99,7	94,9
12	40		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	30	33,6	46,0	51,8	38,7	69,4	41,2	2,4
	20	72,6	90,8	84,8	84,6	94,0	87,3	64,4
	4	74,6	78,5	92,4	90,8	98,1	94,9	87,7

Tab. 8-16: SEC-Daten zu den einzelnen Probezug-Zeitpunkten bei verschiedenen Lagertemperaturen der verschiedenen, flüssig eingelagerten Rezepturen von G-CSF mit pH 7,4

Zeit [W]	°C	GAM7,4	GAMP7,4	GR7,4	GRP7,4	GT7,4	GTP7,4	GSAP7,4
n. GT 1		79,2	91,5	93,0	94,4	98,6	96,8	93,0
n. GT 2		81,7	88,4	95,9	94,6	95,0	95,6	93,9
2	50	77,7	87,2	92,1	91,4	96,1	93,6	92,5
	40	81,1	88,4	92,4	93,0	95,7	93,6	91,9
4	50	76,4	83,5	90,8	90,8	95,8	94,0	91,3
	40	77,5	85,2	92,9	93,5	95,2	95,2	89,3
	20	81,8	86,5	91,5	94,4	98,0	97,9	93,4
	4	75,9	88,0	93,0	94,1	97,0	97,2	95,4
8	50	74,2	77,6	91,2	89,1	93,2	91,6	90,1
	40	74,3	84,2	92,8	89,4	98,5	93,6	91,5
	20	82,2	89,4	95,0	97,3	98,1	98,3	97,1
	4	82,4	88,8	93,7	96,1	98,6	98,2	94,4
12	50	68,0	69,5	81,8	78,7	87,1	84,7	79,4
	40	69,4	78,9	83,9	84,0	87,8	83,2	83,0
	20	73,8	83,2	87,1	87,5	89,4	89,3	87,5
	4	n.b.	67,5	78,3	79,6	81,8	84,0	83,5

Tab. 8-17: SEC-Daten zu den einzelnen Probezug-Zeitpunkten bei verschiedenen Lagertemperaturen der verschiedenen, gefriergetrockneten eingelagerten Rezepturen von G-CSF mit pH 7,4

Zeit [W]	°C	VAM7,4	VAMP7,4	VR7,4	VRP7,4	VT7,4	VTP7,4	VSAP7,4
n. VT 1		75,0	87,3	92,0	92,1	93,9	94,0	92,3
n. VT 2		82,4	87,9	91,4	92,6	92,2	93,3	92,1
2	50	77,0	79,7	78,7	90,2	55,8	90,7	88,7
	40	81,7	82,3	88,1	90,7	74,2	92,0	91,4
4	50	72,7	78,8	76,1	90,1	50,5	90,6	90,4
	40	77,6	82,8	87,5	91,5	66,5	92,7	89,8
	20	81,3	90,9	96,8	96,3	101,1	95,2	94,5
	4	78,4	93,0	96,9	97,7	101,3	95,0	92,2
8	50	73,9	78,5	65,7	89,5	44,9	89,3	90,4
	40	79,2	85,3	89,9	91,8	59,3	92,2	91,4
	20	82,7	89,4	93,4	95,4	91,7	94,9	93,3
	4	80,0	88,1	92,0	93,0	91,6	96,5	91,6
12	50	69,7	68,9	58,8	79,0	42,2	83,2	82,2
	40	76,0	72,9	79,4	82,2	54,0	85,7	82,5
	20	75,6	78,1	84,7	85,3	88,8	85,5	83,9
	4	77,0	81,4	85,9	84,2	88,3	86,0	85,7

Tab. 8-18: SEC-Daten zu den einzelnen Probezug-Zeitpunkten bei verschiedenen Lagertemperaturen der verschiedenen, vakuumgetrockneten eingelagerten Rezepturen von G-CSF mit pH 7,4

Zeit [W]	°C	FAM4	FAMP4	FR4	FRP4	FT4	FTP4	FSAP4
1	40	81,6	92,8		48,4	66,4	93,5	91,8
	30		93,7	93,6	86,8	86,6	94,8	95,5
	20	94,5	99,4	95,5	95,2	93,6	99,3	96,7
	4	92,9	95,9	92,4	93,6	92,9	95,3	95,3
2	40	76,4	93,5	9,8	42,0	43,7	92,7	92,7
	30	92,1	96,1	87,6	87,0	86,5	94,2	95,7
	20	93,7	97,0	92,3	90,8	89,3	97,0	97,5
	4	94,7	97,2	91,4	90,6	87,2	95,9	98,8
4	40	63,1	86,1	0,0	0,0	19,4	82,4	83,6
	30	86,9	91,6	78,5	79,2	80,9	92,2	93,9
	20	92,2	95,8	86,7	87,2	86,3	95,0	99,1
	4	92,0	94,9	88,1	87,1	84,1	94,9	98,2
8	40	31,1	73,8	0,0	0,0	8,1	65,6	69,9
	30	82,4	88,3	73,3	70,8	78,3	87,3	91,2
	20	81,5	88,2	80,7	83,2	80,5	89,8	96,4
	4	83,9	91,3	87,2	85,2	83,1	91,9	96,4
12	40	23,2	61,9	0,0	0,0	3,8	39,2	60,3
	30	72,8	81,4	63,7	60,0	72,2	83,3	89,3
	20	80,5	88,6	79,1	79,8	79,2	85,5	92,9
	4	81,2	88,0	82,5	82,8	79,5	89,3	96,2

Tab. 8-19: SEC-Daten zu den einzelnen Probezug-Zeitpunkten bei verschiedenen Lagertemperaturen der verschiedenen, flüssig eingelagerten Rezepturen von G-CSF mit pH 4

Zeit [W]	°C	GAM4	GAMP4	GR4	GRP4	GT4	GTP4	GSAP4
n. GT 1		87,5	92,9	88,6	85,5	84,7	92,2	92,4
n. GT 2		86,2	91,9	86,3	87,6	87,3	96,0	95,7
2	50	85,2	91,2	85,0	85,9	86,4	93,7	95,8
	40	87,2	90,9	87,9	85,7	85,9	91,9	94,9
4	50	80,1	85,4	76,6	79,7	79,4	89,2	94,1
	40	83,3	88,5	78,2	79,4	78,0	87,7	94,0
	20	84,1	91,1	80,8	79,6	82,1	89,8	94,8
	4	83,2	91,0	79,0	74,1	78,4	90,4	94,7
8	50	78,5	81,5	75,7	72,4	75,5	85,1	87,8
	40	77,2	84,4	75,7	75,6	75,9	82,2	96,2
	20	79,3	87,7	76,8	77,3	75,9	85,7	92,6
	4	81,9	87,9	77,1	73,8	74,2	84,7	92,9
12	50	68,9	68,0	71,1	66,0	70,8	77,9	77,7
	40	73,8	78,6	71,1	69,9	70,2	79,4	85,4
	20	74,5	81,2	73,4	71,7	72,1	79,1	86,3
	4	71,8	78,9	70,9	69,3	69,8	78,3	87,0

Tab. 8-20: SEC-Daten zu den einzelnen Probezug-Zeitpunkten bei verschiedenen Lagertemperaturen der verschiedenen, gefriergetrocknet eingelagerten Rezepturen von G-CSF mit pH 4

Zeit [W]	°C	VAM4	VAMP4	VR4	VRP4	VT4	VTP4	VSAP4
n. VT 1		85,5	89,2	79,5	86,2	86,0	93,8	94,1
n. VT 2		86,8	90,8	78,0	85,9	80,0	94,5	93,1
2	50	87,0	83,2	66,0	76,6	52,4	89,2	91,4
	40	85,5	85,1	73,6	76,0	65,5	86,5	90,8
4	50	82,5	79,3	54,5	71,6	77,7	80,7	85,6
	40	84,6	86,7	69,1	79,1	75,6	87,6	92,8
	20	87,0	89,9	74,2	81,3	83,6	89,5	96,4
	4	88,8	92,9	79,7	84,5	80,8	91,3	96,8
8	50	77,5	79,2	47,3	69,9	63,1	81,9	82,7
	40	83,3	85,3	61,3	74,6	52,6	83,0	91,8
	20	84,7	89,1	72,0	77,7	70,0	85,8	96,1
	4	n.b.	85,0	71,3	75,0	79,2	79,4	95,8
12	50	73,0	70,4	41,3	56,5	63,0	74,5	68,5
	40	75,5	75,6	52,4	68,1	56,6	75,9	82,5
	20	81,1	84,6	70,6	72,9	65,9	81,0	89,9
	4	77,2	79,3	66,5	68,0	69,8	77,5	85,6

Tab. 8-21: SEC-Daten zu den einzelnen Probezug-Zeitpunkten bei verschiedenen Lagertemperaturen der verschiedenen, vakuumgetrocknet eingelagerten Rezepturen von G-CSF mit pH 4

Zeit [W]	°C	FAM-EPO	FAMP-EPO	FR-EPO	FRP-EPO	FT-EPO	FTP-EPO	FSAP-EPO
1	40	77,6	84,6	73,7	84,1	74,1	91,7	91,1
	30	84,6	89,3	80,3	86,5	82,2	92,4	93,7
	20	85,6	89,2	83,0	86,9	87,9	93,9	93,9
	4	86,8	90,1	83,8	89,7	89,6	95,3	91,8
2	40	78,4	77,0	72,5	81,3	68,6	90,8	86,3
	30	87,4	91,7	79,4	86,3	82,5	94,0	94,3
	20	86,7	90,1	83,2	87,6	88,8	93,8	94,8
	4	88,8	93,3	88,1	90,8	90,9	95,3	96,9
4	40	68,5	58,7	66,1	71,9	55,8	79,2	78,6
	30	86,0	88,2	78,9	88,2	80,3	97,2	92,5
	20	89,2	94,2	85,2	89,8	88,7	97,8	94,7
	4	93,0	97,1	91,0	94,8	94,4	99,0	97,5
8	40	70,1	45,9	67,1	74,5	44,1	69,0	54,3
	30	86,2	86,4	78,6	83,6	75,4	88,8	83,7
	20	87,5	89,8	5,9	87,9	6,3	93,0	91,5
	4	92,4	95,1	87,8	94,8	91,1	100,9	99,1
12	40	57,1	37,3	64,2	59,3	37,0	34,0	33,0
	30	78,1	77,2	73,2	76,1	66,9	78,9	71,1
	20	81,5	81,9	78,9	82,7	80,1	88,7	85,4
	4	79,8	84,0	83,8	89,6	92,8	94,9	95,1

Tab. 8-22: SEC-Daten zu den einzelnen Probezug-Zeitpunkten bei verschiedenen Lagertemperaturen der verschiedenen, flüssig eingelagerten Rezepturen von EPO

Zeit [W]	°C	GAM-EPO	GAMP-EPO	GR-EPO	GRP-EPO	GT-EPO	GTP-EPO	GSAP-EPO
n. GT 1		89,1	90,8	82,1	82,1	87,3	87,7	91,5
n. GT 2		87,5	89,5	83,1	82,2	88,8	88,5	91,8
2	50	83,5	76,6	87,9	38,2	89,2	40,6	62,5
	40	84,2	77,1	83,0	43,6	87,0	42,7	51,4
4	50	83,7	76,9	84,6	27,2	88,4	22,3	80,0
	40	83,0	68,7	84,6	41,1	90,5	41,8	61,6
	20	84,0	86,7	84,4	67,7	91,3	74,5	89,2
	4	84,9	88,3	85,2	77,8	90,2	86,3	93,4
8	50	83,9	79,5	83,5	14,0	85,8	23,5	77,5
	40	85,7	70,7	84,3	11,4	89,2	23,9	38,4
	20	82,8	83,8	83,6	66,6	88,5	68,3	79,0
	4	83,7	87,1	84,5	78,5	88,1	86,1	88,7
12	50	76,4	74,6	75,0	12,8	80,2	27,8	72,8
	40	76,5	66,4	76,7	9,7	83,4	21,4	34,9
	20	76,2	74,8	76,0	53,0	82,6	47,3	60,4
	4	76,5	80,9	77,7	71,5	81,4	72,3	81,0

Tab. 8-23 SEC-Daten zu den einzelnen Probezug-Zeitpunkten bei verschiedenen Lagertemperaturen der verschiedenen, gefriergetrocknet eingelagerten Rezepturen von EPO

Zeit [W]	°C	VAM-EPO	VAMP-EPO	VR-EPO	VRP-EPO	VT-EPO	VTP-EPO	VSAP-EPO
n. VT 1		87,1	90,5	82,2	86,7	90,1	91,4	91,6
n. VT 2		89,1	90,8	83,5	87,6	88,3	93,7	93,1
2	50	85,0	87,5	76,5	0,0	70,4	87,7	89,2
	40	84,0	88,0	83,7	83,6	69,6	89,8	90,5
4	50	87,0	87,0	80,1	99,3	72,4	91,2	91,0
	40	85,6	87,5	81,6	87,0	74,8	92,4	93,1
	20	88,0	88,8	89,5	83,6	85,4	91,3	93,2
	4	86,5	90,2	89,5	88,8	92,0	95,1	96,1
8	50	85,8	87,8	n.b.	0,0	68,5	93,2	82,9
	40	86,5	88,8	79,7	85,7	71,3	0,0	91,7
	20	85,9	86,8	85,1	83,6	83,8	89,0	91,9
	4	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	92,0
12	50	78,1	77,9	80,4	80,5	60,2	82,4	70,2
	40	78,2	80,0	74,3	79,1	62,6	82,3	81,2
	20	77,6	80,0	77,7	72,4	74,8	n.b.	81,7
	4	74,9	78,3	78,5	78,7	79,9	81,2	83,5

Tab. 8-24: SEC-Daten zu den einzelnen Probezug-Zeitpunkten bei verschiedenen Lagertemperaturen der verschiedenen, vakuumgetrocknet eingelagerten Rezepturen von EPO

Zeit [W]	°C	FCD4	FCDP4	FCD7,4	FCDP7,4	FCD-EPO	FCDP-EPO
2	40	99,4	98,6	26,5	27,0	96,6	92,9
	30	99,3	98,4	93,5	89,8	96,2	95,2
	20	100,0	98,2	104,1	99,3	97,2	95,3
	4	101,0	98,1	101,9	99,8	97,3	96,4
3	40	100,9	97,3	15,8	15,1	94,1	94,2
	30	99,4	97,2	90,9	86,2	95,9	96,1
	20	100,3	100,2	101,1	99,5	97,2	95,9
	4	104,7	99,3	102,3	100,7	97,7	95,0
4	40	101,1	99,9	9,8	8,4	95,9	95,0
	30	101,0	96,7	90,0	80,4	98,6	97,6
	20	101,9	100,8	103,7	101,3	100,9	101,7
	4	102,7	100,8	104,1	101,6	101,5	100,1
6	40	101,0	96,0	5,3	4,6	92,4	88,0
	30	98,8	100,4	80,2	73,7	98,2	96,6
	20	102,2	101,1	97,8	97,1	98,5	97,3
	4	101,9	100,0	100,2	100,2	97,3	96,5
12	40	84,5	78,2	0,0	0,0	79,2	75,1
	30	90,6	83,9	66,2	47,5	86,6	86,3
	20	93,8	87,9	89,2	86,7	90,9	88,9
	4	87,0	84,3	94,0	90,2	90,1	89,0

Tab. 8-25: SEC-Daten zu den einzelnen Probezug-Zeitpunkten bei verschiedenen Lagertemperaturen der verschiedenen, flüssig eingelagerten HP- β -cyclodextrin-Rezepturen

Zeit [W]	°C	GCD4	GCDP4	GCD7,4	GCDP7,4	GCD-EPO	GCDP-EPO
n. GT 1		96,1	97,0	95,6	95,3	98,0	97,9
n. GT 2		95,3	95,3	95,9	95,0	98,8	98,1
2	50	97,7	93,8	94,8	97,1	95,1	93,1
	40	96,1	96,8	96,4	97,4	94,3	92,5
	4	96,5	96,2	99,0	99,2	94,7	95,0
6	50	94,6	93,5	91,2	93,2	94,7	93,8
	40	95,6	95,3	94,7	94,2	93,9	94,6
	4	93,6	96,1	96,0	97,0	97,0	93,5
12	50	79,0	80,7	84,4	89,1	88,1	86,2
	40	81,8	81,7	85,7	87,9	89,2	89,7
	4	82,7	83,8	89,9	90,1	92,3	90,0

Tab. 8-26: SEC-Daten zu den einzelnen Probezug-Zeitpunkten bei verschiedenen Lagertemperaturen der verschiedenen, gefriergetrocknet eingelagerten HP- β -cyclodextrin-Rezepturen

Zeit [W]	°C	VCD4	VCDP4	VCD7,4	VCDP7,4	VCD-EPO	VCDP-EPO
n. VT 1		86,8	94,1	92,2	94,6	97,9	98,3
n. VT 2		94,7	95,1	94,5	94,5	98,3	95,6
2	50	97,0	95,3	94,3	98,4	98,3	91,3
	40	96,6	96,2	97,0	100,3	94,2	93,5
	4	95,2	96,4	96,5	95,7	95,1	90,0
6	50	96,8	90,6	96,2	95,9	94,7	94,7
	40	97,7	94,4	95,8	97,3	94,9	95,9
	4	97,5	95,2	98,3	96,7	98,9	94,2
12	50	83,2	81,6	82,3	90,0	88,1	87,6
	40	84,6	81,6	86,8	89,6	89,4	87,8
	4	79,6	81,1	87,9	91,6	88,1	87,4

Tab. 8-27: SEC-Daten zu den einzelnen Probezug-Zeitpunkten bei verschiedenen Lagertemperaturen der verschiedenen, vakuumgetrocknet eingelagerten HP- β -cyclodextrin-Rezepturen

Übersicht über die visuellen Beobachtungen bei der Prüfung auf sichtbare Partikel

		1 W	2 W	4 W	8 W	12 W
FAM7,4	40 °C	trüb				
	30 °C					
	20 °C					
	4 °C					
FAMP7,4	40 °C	trüb				
	30 °C					
	20 °C					
	4 °C					
FR7,4	40 °C	klar			trüb	trüb
	30 °C				klar	
	20 °C					
	4 °C					
FRP7,4	40 °C	klar			trüb	trüb
	30 °C				klar	
	20 °C					
	4 °C					
FT7,4	40 °C	klar			trüb	trüb
	30 °C				klar	
	20 °C					
	4 °C					
FTP7,4	40 °C	klar			trüb	trüb
	30 °C				klar	
	20 °C					
	4 °C					
FSAP7,4	40 °C	trüb	trüb	trüb	trüb	trüb
	30 °C	klar		trüb	trüb	trüb
	20 °C			klar		
	4 °C					

Tab. 8-28: Beobachtungen bei den flüssig gelagerten G-CSF-Rezepturen mit pH 7,4

		1 W	2 W	4 W	8 W	12 W
FAM4	40 °C	trüb				
	30 °C					
	20 °C					
	4 °C					
FAMP4	40 °C	trüb				
	30 °C					
	20 °C					
	4 °C					
FR4	40 °C	trüb	trüb	trüb	trüb	trüb
	30 °C	klar				
	20 °C					
	4 °C					
FRP4	40 °C	trüb	trüb	trüb	trüb	trüb
	30 °C	klar		trüb	trüb	trüb
	20 °C			klar		
	4 °C					
FT4	40 °C	trüb	trüb	trüb	trüb	trüb
	30 °C					
	20 °C					
	4 °C					
FTP4	40 °C	klar				trüb
	30 °C					
	20 °C					klar
	4 °C					
FSAP4	40 °C	klar				trüb
	30 °C					
	20 °C					klar
	4 °C					

Tab. 8-29: Beobachtungen bei den flüssig gelagerten G-CSF-Rezepturen mit pH 4

		1 W	2 W	4 W	8 W	12 W
FAM-EPO	40 °C 30 °C 20 °C 4 °C	trüb				
FAMP-EPO						
FR-EPO		klar				
FRP-EPO						
FT-EPO						
FTP-EPO						
FSAP-EPO						

Tab. 8-30: Beobachtungen bei den flüssig gelagerten EPO-Rezepturen

	GT			VT		
	G-CSF pH 7,4	G-CSF pH 4	EPO	G-CSF pH 7,4	G-CSF pH 4	EPO
AM	trüb	trüb	trüb	trüb	trüb	trüb
AMP	trüb ↓ gelb	trüb	trüb ↓ gelb	trüb ↓ gelb	trüb	trüb
R	klar	trüb	klar	klar ↓ gelb	trüb	klar
RP	klar ↓ gelb	trüb	klar ↓ gelb	klar ↓ gelb	trüb	klar
T	klar	klar	klar	50 + 40 °C trüb 20 + 4 °C	trüb	klar
TP	klar ↓ gelb	klar	klar ↓ gelb	klar	klar	klar
SAP	klar ↓ gelb	klar	klar ↓ gelb	klar	klar ↓ gelb	klar

Tab. 8-31: Beobachtungen bei den getrocknet gelagerten Proben von G-CSF mit pH 7,4 und pH 4 und von EPO

	°C	2 W	3 W	4 W	6 W	12 W
FCDP7,4	40	klar			gelb opaleszent	gelb opaleszent
	30				gelb opaleszent	gelb opaleszent
	20				klar	gelb opaleszent
	4				klar	gelb opaleszent
FCDP4	40	klar			opaleszent	
	30				opaleszent	
	20				opaleszent	
	4				opaleszent	
FCDP-EPO	40	klar			gelb opaleszent	gelb opaleszent
	30				klar	gelb opaleszent
	20				klar	gelb opaleszent
	4				klar	gelb opaleszent
FCD7,4	40 30 20 4	klar				
FCD4						
FCD-EPO						
alle gefrier- und vakuum- getrockneten	40 30 20 4	klar				

Tab. 8-32: Beobachtungen bei den gelagerten HP- β -cyclodextrin-Rezepturen von G-CSF mit pH 7,4 und pH 4 und von EPO

CURRICULUM VITAE

PERSÖNLICHE DATEN

Matthias Alexander Willmann
geboren am 19.02.1973
in München
ledig
deutsch

SCHULBILDUNG

1979 – 1983
1983 – 1992
1992

Grundschule Taufkirchen bei München
Gymnasium Unterhaching
Allgemeine Hochschulreife

ZIVILDIENST

09/92 – 11/93

Altenwohnheim St. Alfons, München

HOCHSCHULAUSBILDUNG

11/93 – 11/97

Studium der Pharmazie an der
Ludwig-Maximilians-Universität München

09/95
11/97
12/98

Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

01/99

Approbation als Apotheker

PRAKTISCHES JAHR

11/97 – 05/98
05/98 – 11/98

Klinge Pharma GmbH, München
SaniPlus Apotheke im PEP, München

CHEM. PRAKT. TÄTIGKEIT

03/96 – 04/96
09/96 – 10/96

Studentische Hilfskraft am Institut für Pharmazie und
Lebensmittelchemie der LMU München im Arbeitskreis
von Prof. Dr. H.-D. Stachel

BERUFLICHE TÄTIGKEIT

11/98 – 06/99

Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Pharma-
zeutische Technologie und Biopharmazie der LMU
München unter der Leitung von Prof. Dr. K. Thoma

07/99 – 07/03

Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Pharma-
zeutische Technologie und Biopharmazie der LMU
München unter der Leitung von Prof. Dr. G. Winter

WISSENSCHAFTL. TÄTIGKEIT

04/99 – 07/03

Dissertation unter der Anleitung von Prof. Dr. G. Winter
am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie und
Biopharmazie der LMU München