

**ENTWICKLUNG INHALIERBARER LYOPHILISierter  
PROTEINFORMULIERUNGEN UND GEEIGNETER  
INHALATIONSSYSTEME**



**DISSERTATION  
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES  
DER MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT  
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL**

**VORGELEGT VON**

**JAN FREDERIK PFEFFER**

**KIEL 2011**

Referent:

Prof. Dr. Hartwig Steckel

Koreferent:

Prof. Dr. Wolfgang Blaschek

Tag der mündlichen Prüfung:

09. Mai 2011

Zum Druck genehmigt:

09. Mai 2011

gez. Prof. Dr. Lutz Kipp, Dekan

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht:

Pfeffer, J. F. und Steckel, H., Pharmaceutical development of insulin containing lyophilisates for inhalation, 7<sup>th</sup> World Meeting of Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Valletta, Malta (2010)

Pfeffer, J.F. und Steckel, H., Systemic delivery of lyophilized proteins via inhalation, Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Braunschweig, Deutschland (2010)



*Meiner Freundin Melanie und meiner Familie gewidmet*

Das Fehlen einer besonderen Kennzeichnung oder eines entsprechenden Hinweises auf ein Warenzeichen, ein Gebrauchsmuster oder einen Patentschutz lässt nicht den Schluss zu, dass über die in dieser Arbeit angegebenen Dinge frei verfügt werden kann.

## INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
1.1	Einleitung	1
1.2	Zielsetzung	3
2	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	4
2.1	Proteine	4
2.1.1	Aufbau von Peptiden und Proteinen	5
2.1.2	Stabilität von Proteinen	7
2.1.3	Stabilisierung von Proteinen	10
2.1.3.1	Wässrige Proteinlösungen	10
2.1.3.2	Stabilisierung durch Trocknung	12
2.2	Lyophilisation	14
2.2.1	Einführung	14
2.2.2	Vor- und Nachteile der Lyophilisation	14
2.2.3	Grundlagen	15
2.2.4	Der Prozess	17
2.2.4.1	Das Einfrieren	18
2.2.4.1.1	Eigenschaften von gefrierenden Lösungen	18
2.2.4.1.2	Einfluss des Einfrierprozesses auf die Proteinstabilität	20
2.2.4.1.3	Annealing	22
2.2.4.2	Primärtrocknung	22
2.2.4.3	Sekundärtrocknung	25
2.3	Pulmonale Applikation von Proteinen	27
2.3.1	Pulverinhalatoren	31
3	MATERIALIEN UND METHODEN	32
3.1	Materialien	32
3.1.1	Insulin human	32
3.1.2	L-Glutaminsäure	33
3.1.3	Polysorbat 80	34
3.1.4	Myo-Inositol	35

3.1.5	L-Leucin	35
3.1.6	Aqua bidestillata	36
3.1.7	Vials	36
3.2	Methoden	37
3.2.1	Präparative Methoden	37
3.2.1.1	Herstellung der Lösungen	37
3.2.1.2	Lyophilisation	38
3.2.2	Analytische Methoden	39
3.2.2.1	Dynamische Differenzkalorimetrie	39
3.2.2.2	Gefriertrocknungsmikroskopie	41
3.2.2.3	Röntgendiffraktometrie	43
3.2.2.4	Dynamische Wasserdampfsorption	44
3.2.2.5	Karl Fischer-Titration	45
3.2.2.6	Rasterelektronenmikroskopie	45
3.2.2.7	Aktivitätsbestimmung des Insulins	46
3.2.2.8	Kaskadenimpaktion	47
3.2.2.9	Quantitative Wirkstoffbestimmung per HPLC	50
3.2.2.10	Klima-Prüfkammer	52
3.2.3	Statistische Methoden	52
4	FORMULIERUNGSENTWICKLUNG	53
4.1	Hilfsstoffe in der Gefriertrocknung und deren Funktion	53
4.2	Anforderungen an die Formulierung	55
4.3	Evaluierung der Ausgangsstoffe	58
4.3.1	Insulin human	59
4.3.2	L-Glutaminsäure	62
4.3.3	Myo-Inositol	65
4.3.4	L-Leucin	67
4.3.5	Polysorbat 80	69
4.3.6	Zusammenfassung	69
4.4	Rezepturfindung	70
4.4.1	Evaluierung der kritischen Formulierungsparameter	71

4.4.1.1	Glasübergangstemperatur $T_g'$ der Formulierungen	71
4.4.1.2	Kollapstemperatur $T_c$	73
4.5	Charakterisierung der Lyophilisate	76
4.5.1	Makro- und mikroskopische Charakterisierung	76
4.5.2	Morphologie	78
4.5.3	Sorptions- und Desorptionsverhalten	80
4.5.4	Proteinstabilität	81
4.5.5	Restwassergehalt nach Lyophilisation	84
4.5.6	Zusammenfassung und Schlussfolgerungen	85
5	AEROSOLISIERBARKEIT DER LYOPHILISATE	88
5.1	Einflüsse der Formulierung und der Einfriergeschwindigkeit	90
5.1.1	Versuchsplanung	90
5.1.2	Ergebnisse	93
5.1.2.1	Feinpartikeldosis	96
5.1.2.2	Absolute Feinpartikelfraktion	98
5.1.2.3	Relative Feinpartikelfraktion	99
5.1.2.4	Abgegebene Dosis	99
5.1.2.5	Rachendeposition	100
5.1.2.6	Rückstand im Inhalator	101
5.1.2.7	Rückstand im Vial	102
5.1.2.8	MMAD	103
5.1.2.9	Einfluss von Additiven auf die Aerosolisierbarkeit	104
5.1.2.10	Einfluss der Lagerung auf die Aerosolisierbarkeit	106
5.1.2.11	Charakterisierung des erzeugten Aerosols	108
5.2	Zusammenfassung und Schlussfolgerungen	109
6	ENTWICKLUNG EINES AKTIVEN INHALATORS	114
6.1	Einleitung	114
6.2	Aufbau und Funktionsprinzip des aktiven Inhalators	114
6.3	Anwendung	116
6.4	Evaluierung der Einflussparameter	117
6.4.1	Versuchsplanung	117

---

6.4.2	Ergebnisse	118
6.4.2.1	Feinpartikeldosis	120
6.4.2.2	Absolute und relative Feinpartikelfraktion	120
6.4.2.3	Abgegebene Dosis	121
6.4.2.4	Rachendeposition	122
6.4.2.5	Rückstand im Inhalator	122
6.4.2.6	Rückstand im Vial	122
6.4.2.7	MMAD	123
6.4.3	Zusammenfassung und abschließende Bewertung	123
7	ENTWICKLUNG EINES ATEMZUGGESTEUERTEN INHALATORS	125
7.1	Einleitung	125
7.2	Idee	125
7.3	Entwicklung	126
7.3.1	Erste Version mit 2R-Vials	126
7.3.2	Zweiter Prototyp mit breiterer Luft- und Aerosolführung	129
7.3.3	Evaluierung der geeignetsten Inhalatorkonfiguration	132
7.3.3.1	Ergebnisse	134
7.3.3.1.1	Feinpartikeldosis	137
7.3.3.1.2	Abgegebene Dosis	138
7.3.3.1.3	Rachendeposition	139
7.3.3.1.4	Rückstand im Inhalator	140
7.3.3.1.5	Rückstand im Vial	141
7.3.3.2	Zusammenfassung und Schlussfolgerungen	141
7.3.3.3	Gleichförmigkeit der abgegebenen Dosis	143
7.4	Optimierung der zweiten Version	145
7.4.1	Erweiterung des vorangegangenen Versuchsplans	145
7.4.1.1	Ergebnisse	146
7.4.1.1.1	Feinpartikeldosis	147
7.4.1.1.2	Rachendeposition	148
7.4.1.1.3	Rückstand im Vial	149
7.4.1.1.4	Rückstand im Inhalator	150
7.4.1.2	Zusammenfassung und Schlussfolgerungen	151

7.4.2	Optimiertes Modell	152
7.5	Zusammenfassung und abschließende Bewertung des atemzugesteuerten Inhalators	154
8	ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT	157
9	ABSTRACT	160
10	ANHANG	162
10.1	Symbole und Abkürzungen	162
10.2	Verwendete Substanzen	165
10.3	Rohdaten des Versuchsplanes aus Kapitel 5.1.1	167
10.4	Rohdaten des Versuchsplanes aus Kapitel 6.4.1	168
10.5	Rohdaten des Versuchsplanes aus Kapitel 7.3.3	169
10.6	Flussraten und Durchflusszeiten aus Kapitel 7.3.3	170
10.7	Rohdaten des Versuchsplanes aus 7.4.1	171
10.8	Flussraten und Durchflusszeiten aus Kapitel 7.4.1	172
11	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	173
12	TABELLENVERZEICHNIS	183
13	LITERATURVERZEICHNIS	186



## **1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG**

### **1.1 EINLEITUNG**

Seit etwa 25 Jahren steht eine Vielzahl an Methoden zur rekombinanten Synthese von Peptiden und Proteinen zur Verfügung, die es erlauben, diese Substanzen im industriellen Maßstab zu produzieren (Siekmeier und Scheuch, 2009). Derzeit sind in Deutschland mindestens 144 Arzneimittel mit 108 Wirkstoffen zugelassen, die gentechnisch hergestellt werden (Verband Forschender Arzneimittelhersteller e.V., 2010). Diese Medikamente machen mit rund 4,7 Mrd. Euro bereits 16 % des Arzneimittelumsatzes in Deutschland aus (2009; Apotheken und Krankenhäuser, gerechnet zu Herstellerabgabepreisen). Wichtige Anwendungsbereiche sind unter anderem Diabetes (Insuline), Multiple Sklerose und rheumatoide Arthritis (Immunmodulatoren), Krebserkrankungen (monoklonale Antikörper), angeborene Stoffwechsel- und Gerinnungsstörungen (Enzyme, Gerinnungsfaktoren) sowie Schutzimpfungen (Gebärmutterhalskrebs, Hepatitis B). Von allen zugelassenen Wirkstoffen sind derzeit 5 % gentechnischen Ursprungs; von den jährlich neu eingeführten Wirkstoffen sind es mittlerweile 15 bis 25 %. Das ist so auch für die kommenden Jahre abzusehen (Verband Forschender Arzneimittelhersteller e.V., 2010).

Ein großer Nachteil der Peptid- und Proteintherapeutika sind deren physiko-chemische Eigenschaften wie zum Beispiel das hohe Molekulargewicht und die hohe Sensitivität gegenüber physikalischen und chemischen Einflüssen. Die Applikation der therapeutischen Peptide und Proteine erfolgt daher in der Regel parenteral, da ihre perorale Bioverfügbarkeit aufgrund des Abbaus durch die im Gastrointestinaltrakt enthaltenen Proteasen niedrig ist. Sie liegt bei maximal 3% (Kayser, 2002). Dazu kommt, dass die che-

mische Stabilität in Lösung ebenfalls niedrig ist, da es in diesem Fall zu Denaturierungsreaktionen wie zum Beispiel Hydrolyse und Deamidierung kommen kann (Scotchler und Robinson, 1974). Als Verfahren der Wahl, aus Proteinlösungen haltbare und lagerstabile Arzneiformen zu generieren, hat sich im Laufe der Jahre die Gefriertrocknung etabliert. Trotz der technischen Komplexität und der hohen Produktions- und Zeitkosten im Vergleich zu anderen Trocknungsverfahren wie zum Beispiel der Sprühtrocknung (Franks, 1998) ist sie jenen Verfahren dennoch überlegen, da das entstehende Produkt nicht nur den Vorteil der höheren Stabilität, sondern auch ein besseres Handling liefert (Tang und Pikal, 2004). Das Lyophilisat wird im Produktionsgefäß gelagert und kann bei Bedarf in kurzer Zeit rekonstituiert werden, um es dann parenteral zur Anwendung zu bringen. Dabei lassen sich an jeder Stelle des Produktionsweges die hohen Ansprüche an Parenteralia erfüllen. Die Proteinlösung wird aseptisch hergestellt, in das entsprechende Lyophilisationsgefäß sterilfiltriert und nach der Gefriertrocknung automatisch verschlossen.

Die parenterale Applikation an sich und der damit verbundene Schmerz stellen jedoch ebenfalls ein Problem für viele Patienten dar, gerade für solche, die sehr oft therapiert werden müssen wie zum Beispiel Diabetiker und Patienten mit multipler Sklerose (Corkery, 2000). Diese Abneigung kann zu schlechter Compliance und inadäquater Krankenbetreuung führen (Costa *et al.*, 1995). Da, wie bereits erwähnt, orale Darreichungsformen wie Tabletten oder Kapseln aufgrund der schlechten Bioverfügbarkeit nicht in Frage kommen, muss die Pharmazeutische Technologie alternative Wege suchen, um den Wirkstoff an den Zielort zu bringen. Transdermale Therapeutische Systeme sind ebenso ungeeignet, da die Proteinmoleküle zu groß sind, um die Hautbarriere zu durchdringen. Die menschliche Lunge ist

aufgrund ihres Aufbaus und ihrer Struktur jedoch geeignet, als Ansatzpunkt für die systemische Pharmakotherapie zu fungieren (Agu *et al.*, 2001).

## **1.2 ZIELSETZUNG**

Ziel dieser Arbeit war es zunächst, mittels Lyophilisation eine inhalierbare, stabile Proteinformulierung mit Insulin als Modellprotein zu entwickeln. Diese Formulierung sollte lagerstabil sein, jedoch beim Inhalationsvorgang in lungengängige Partikel mit einem möglichst hohem Anteil an Partikeln mit einem aerodynamischen Durchmesser  $< 5 \mu\text{m}$  zerfallen. Die Rückstände im Vial und im Inhalator sollten so gering wie möglich sein, die abgegebene Dosis möglichst hoch. Des Weiteren sollte für die Aerosolisierung des Lyophilisates ein geeigneter Pulverinhalator (Dry Powder Inhaler, DPI) entwickelt werden, der es ermöglicht, die Formulierung in beliebiger Form im Produktionsgefäß selbst an den Inhalator zu koppeln, so dass kein Produktionsschritt außer der Gefriertrocknung zwischen Produktion des Lyophilisates und Anwendung durch den Patienten liegt. Als Grundlage für diese Idee diente ein von Yamashita, Ibaragi *et al.* im Jahre 2003 eingereichtes Patent (2003), welches die Entwicklung mehrerer Inhalationssysteme auf Basis von Lyophilisaten beschreibt.

## 2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

### 2.1 PROTEINE

Peptide und Proteine sind organische Makromoleküle, die ubiquitär in allen Organismen vorhanden sind. Die Definitionsgrenze zwischen Peptid und Protein ist unscharf. Ab ungefähr 50 Aminosäuren wird das Molekül als Protein bezeichnet. Ein kennzeichnendes Charakteristikum zwischen Peptiden und Proteinen ist weiterhin, dass sich das physiko-chemische Verhalten von Peptiden allein durch die Eigenschaften der enthaltenen Aminosäuren erklären lässt; die Eigenschaften von Proteinen hingegen werden stark von ihrer dreidimensionalen Konformation beeinflusst (Porter, 1997). Der Begriff „Protein“ stammt aus dem Griechischen und wurde von dem holländischen Chemiker Gerardus Mulder im Jahre 1839 geprägt (Mulder, 1839). Er bedeutet so viel wie „von zentraler Bedeutung“. In der Tat sind Proteine von zentraler Bedeutung für das Leben, denn:

- Sie katalysieren chemische Reaktionen im Organismus (Enzyme wie z.B. Lipase);
- sie sind verantwortlich für die Signalübertragung, wie z.B. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren;
- sie geben Zellen ihre Struktur (Kollagen);
- sie transportieren (Wirk)-Stoffe (Transportproteine);
- sie stellen selbst eine Vielzahl von Wirkstoffen (Antikörper, Peptide wie Oxytocin oder Insulin und viele weitere).

### 2.1.1 AUFBAU VON PEPTIDEN UND PROTEINEN

Bausteine der Peptide und Proteine sind die sogenannten proteinogenen Aminosäuren. Es gibt 22 proteinogene Aminosäuren, die über peptidische Bindungen zu einem Strang verknüpft werden. Mit Ausnahme von Glycin sind alle proteinogenen Aminosäuren chiral. Abbildung 2.1 zeigt die Strukturen der proteinogenen Aminosäuren in undissoziierter Form.

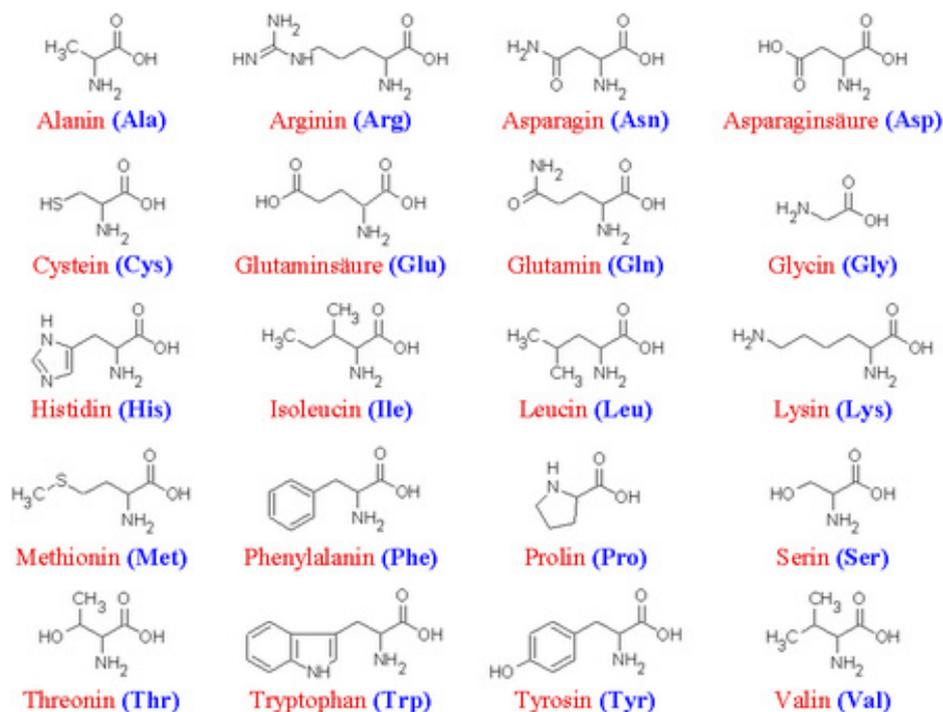


Abbildung 2.1: Proteinogene Aminosäuren

Die proteinogenen Aminosäuren Selenocystein und Pyrrolysin sind in dieser Abbildung nicht vorhanden. Ersteres ist ein reaktives Analogon des Cysteins und trägt anstelle des Schwefelatoms ein Selenatom (Papp *et al.*, 2010). Zweiteres ist ein natürliches Derivat des L-Lysins und wird von einigen Archaeen (z.B. *Methanosarcina barkeri*) und Bakterien als Teil von Enzymen des Methan-Stoffwechsels verwendet (Srinivasan *et al.*, 2002).

Bei der Verknüpfung von Aminosäuren zu einem Protein reagiert eine Carboxylgruppe einer Aminosäure mit der Aminogruppe einer zweiten Aminosäure. Es handelt sich dabei um eine Kondensationsreaktion, bei der

formal Wasser abgespalten wird. Die entstehende Bindung wird als Peptidbindung (-NH-CO-) bezeichnet. An dem entstandenen Dipeptid lassen sich an beiden Seiten des Moleküls theoretisch beliebig viele weitere Aminosäuren anknüpfen, da sich an dem jeweiligen Molekülende noch eine uncondensierte Amino- bzw. Carboxylgruppe befindet. Auf diese Weise können Proteine mit mehreren Tausend Kilodalton (kDa) Molekulargewicht entstehen. Der entstehende Aminosäurestrang wird auch als Aminosäuresequenz oder Primärstruktur eines Proteins bezeichnet. Aminosäuresequenzen falten sich lokal zu Sekundärstrukturen. Diese werden durch nicht-kovalente Wechselwirkungen zusammengehalten. Es wird dabei zwischen  $\alpha$ -Helices,  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen,  $\beta$ -Schleifen und ungeordneten „random-coil“-Strukturen differenziert. Diese Strukturen ergeben sich durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Peptidbindungen der Primärstruktur. Die Sekundärstrukturen wiederum falten sich zu einer definierten dreidimensionalen Gestalt, der sogenannten Tertiärstruktur. Dieser Strukturtyp wird von den Kräften und Bindungen zwischen den Seitenketten der Aminosäuren bestimmt. Als strukturstabilisierende Kräfte wirken hier Wasserstoffbrückenbindungen (analog zur Sekundärstruktur), ionische Wechselwirkungen, van-der-Waals-Kräfte und auch inter- und intramolekulare Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten, wie im Beispiel von Insulin (siehe Kapitel 3.1.1). Besteht ein Protein aus unterschiedlichen Polypeptidketten, werden diese als Untereinheiten bezeichnet. Zwei oder mehrere Untereinheiten lagern sich zur Quartärstruktur des Proteins zusammen. Dabei sind die einzelnen Proteine häufig durch Wasserstoffbrücken, aber auch durch kovalente Bindungen miteinander verknüpft. Abbildung 2.2 zeigt die verschiedenen Strukturen der Proteine.

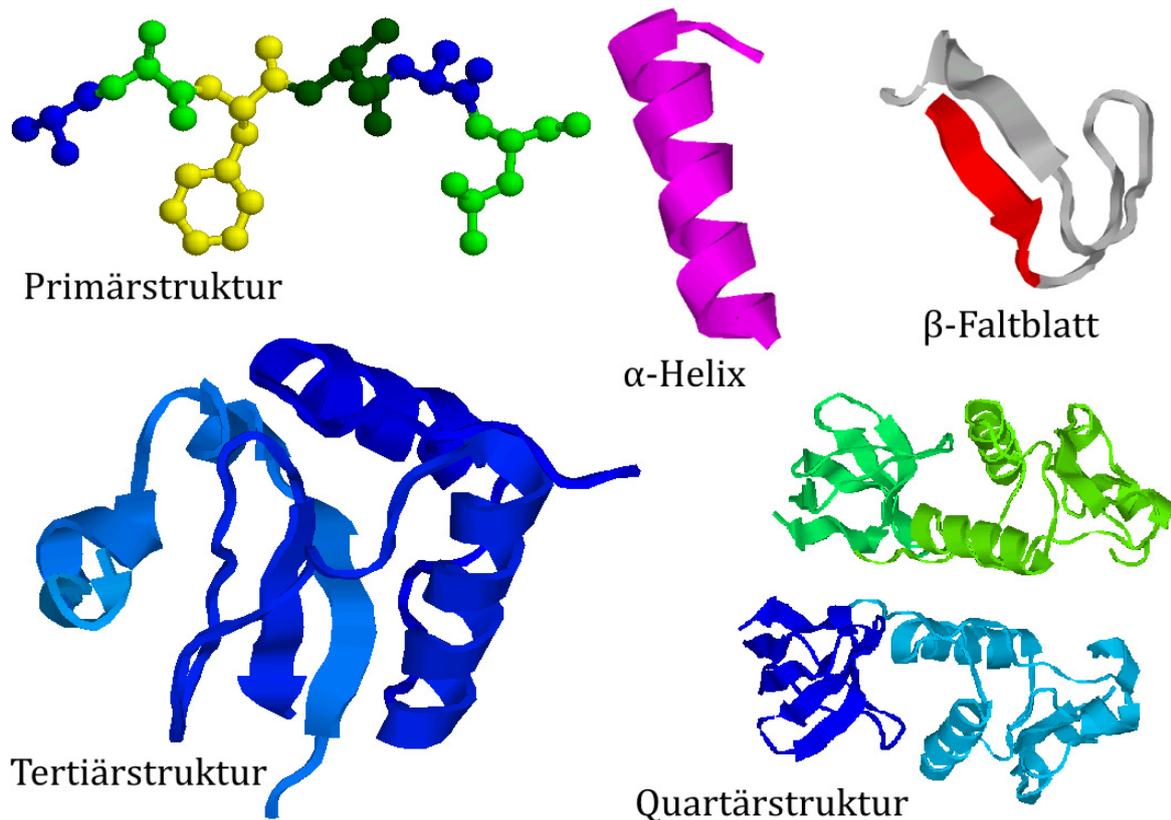


Abbildung 2.2: Übersicht über die Proteinstrukturen

### 2.1.2 STABILITÄT VON PROTEINEN

Die Wirksamkeit von Protein- und Peptidtherapeutika und der damit zusammenhängende Therapieerfolg sind eng an die höheren Strukturen des Proteins, also das intakte Vorliegen der Tertiär- und Quartärstruktur, gekoppelt (Andrade *et al.*, 2010). Proteine weisen jedoch eine begrenzte Stabilität auf (Franks, 1998); nicht zuletzt ist es auf die Instabilität der Proteine zurückzuführen, dass bis heute keine orale Darreichungsform zur Applikation proteinogener Arzneistoffe auf dem Markt erhältlich ist. Proteininstabilitäten können in zwei Klassen aufgeteilt werden: chemische und physikalische Instabilitäten. Chemische Instabilitäten beinhalten beispielsweise Reaktionen, die zum Bruch oder zur Neubildung von kovalenten Bindungen führen. Tabelle 2.1 zeigt die wesentlichen Reaktionen auf.

*Tabelle 2.1: Beobachtete chemische Instabilitäten von Proteinen (Auswahl)*

---

Deamidierung

Racemisierung

Proteolyse

$\beta$ -Eliminierung

Oxidationsreaktionen

Disulfidaustausch

Kondensationsreaktionen

---

Deamidierungsreaktionen, speziell die Deamidierung einer Asparagin- oder Glutaminseitenkette, sind die am häufigsten zu Instabilität des Proteins führenden Reaktionen. Sie spielen sich zumeist im sauren Milieu ab (Robinson und Rudd, 1974) und generieren unerwünschte Verunreinigungen durch Ablagern von Abbaustoffen im Produkt (Doyle *et al.*, 2007). Racemisierungsreaktionen und  $\beta$ -Eliminierungen stehen in Wechselbeziehung zueinander, da der erste Schritt der Reaktion, nämlich die Deprotonierung des  $\alpha$ -C-Atoms, der gleiche ist (Manning *et al.*, 1989). Racemisierung tritt oft an Asparaginsäureresten auf (Shapira *et al.*, 1988). Des Weiteren kann die Deprotonierung über die Bildung eines Carbanions zu  $\beta$ -Eliminierung führen. Diese spielt sich oft bei höheren Temperaturen ab, und zwar bevorzugt von Cysteinresten (Volkin und Klibanov, 1987). Oxidationen stellen die zweithäufigsten Degradationsreaktionen dar. Proteine, die Histidin, Methionin, Cystein, Tyrosin oder Tryptophan enthalten, können unter bestimmten Bedingungen durch reaktive Sauerstoffspezies oxidiert werden (Stadtman, 1993). Dies kann sowohl bei der Produktion, als auch bei der Lagerung des Produktes geschehen. Dabei beeinflussen intrinsische Faktoren wie beispielsweise die räumliche Proteinstruktur und extrinsische Faktoren wie der pH-Wert und Pufferzusammensetzung die Oxidationsrate (Chu *et al.*, 2004). Physikalische Instabilitäten sind charak-

---

terisiert durch Prozesse, die die räumliche Gestalt des Proteins beeinflussen, ohne dabei die chemische Struktur zu verändern. In den meisten Fällen kollabieren die Sekundär- und Tertiärstrukturen des betreffenden Proteins. Tabelle 2.2 zeigt die vier wichtigsten Prozesse.

*Tabelle 2.2: Physikalische Instabilitäten von Proteinen*

---

Denaturierung

Oberflächenadsorption

Aggregation

Präzipitation

---

Unter Denaturierung wird der Verlust der dreidimensionalen Proteinstruktur, welche auch als native Struktur bezeichnet wird, verstanden. Die auslösenden Faktoren sind unter anderem Temperatur (Hitze, aber auch Kälte), Einwirkung von bestimmten Salzen wie beispielsweise Guanidin oder Harnstoff (chemische Denaturierung), pH-Wert, organische Lösungsmittel und Druck. Hitzebedingte Denaturierung ist oft irreversibel, wohingegen die chemische Denaturierung beispielsweise durch Harnstoff reversibel sein kann (Canchi *et al.*, 2010).

Oberflächenadsorption kann an verschiedensten Oberflächen auftreten. So ist Adsorption unter anderem an Glasoberflächen, an der Luft-Wasser-Grenzfläche und an der Eis-Wasser-Grenzfläche beobachtet worden. Der Grad der Adsorption wird vornehmlich durch die Oberflächenspannung und die Oberflächeneigenschaften des jeweiligen Proteins beeinflusst (Randolph *et al.*, 1994). Es ist heute etabliert, nichtionische Tenside wie zum Beispiel Polysorbat 80 bei der Formulierungsentwicklung von Lyophilisaten einzusetzen, da diese die Adsorption zu verhindern oder zumindest zu reduzieren vermögen (Chang *et al.*, 1996). Proteinaggregation ist ein Überbegriff für eine Vielzahl von molekularen Anordnungen und wird unter

---

anderem ausgelöst durch Störeinflüsse während der Gefriertrocknung, der Ultrafiltration und auch bei der Lagerung (Cromwell *et al.*, 2006; Wang, 2000). Dabei assoziieren native Proteinmonomere zu Oligomeren, bleiben aber in Lösung. Wird die Sättigungslöslichkeit durch weiteres Anwachsen des Aggregates überschritten, präzipitiert das Protein. Nicht allen Proteinpräzipitaten geht Proteinaggregation voraus. Ausgesalzte Proteine präzipitieren auch, bleiben oft aber biologisch aktiv, und die Präzipitation ist nach Verdünnung des Systems reversibel (Matheus *et al.*, 2009).

### **2.1.3 STABILISIERUNG VON PROTEINEN**

#### **2.1.3.1 WÄSSRIGE PROTEINLÖSUNGEN**

Wässrige Proteinlösungen können durch Zusatz bestimmter Hilfsstoffe derart stabilisiert werden, dass die biologische Aktivität trotz der oben genannten Instabilität vieler Proteine gewährleistet ist. So ist es zum Beispiel möglich, Insulin in wässriger Lösung gekühlt stabil zu halten. Die Haltbarkeit ist auf ein Jahr begrenzt, nach Anbruch jedoch nur noch bis zu vier Wochen, was aber auf mikrobiologische Bedenken zurückzuführen ist (Beispiel Insuman rapid, Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland). Es wird von zwei bedeutenden Stabilisierungsmechanismen in Lösung ausgegangen:

1. bevorzugte Bindung (preferential binding) des Hilfsstoffs an die Proteinoberfläche
2. bevorzugter Ausschluss (preferential exclusion) des Hilfsstoffs von der Proteinoberfläche

In Proteinlösungen tritt der Schutz der nativen Proteinstruktur überwiegend durch bevorzugten Ausschluss der Hilfsstoffe von der Proteinoberfläche auf, wodurch das Protein selbst stärker hydratisiert wird. Viele

Polyole, darunter Zucker und Zuckeralkohole wie beispielsweise Trehalose (Zhang *et al.*, 2007) oder myo-Inositol (Terakita *et al.*, 2009), aber auch Aminosäuren (L-Leucin, L-Alanin), Polymere (Gelatine) und Salze entfalten eine protektive Wirkung auf die native Proteinstruktur. Die Theorie der bevorzugten Bindung von Stabilisatoren an die Proteinoberfläche war zur Zeit des Aufkommens dieser Hypothese unter Wissenschaftlern nicht hoch angesehen (Manning *et al.*, 2010). Mit der Zeit wurden aber auch Hilfsstoffe, darunter Polymere, oberflächenaktive Stoffe und Metallionen erforscht, die sich eben genau dieses Schutzmechanismus bedienen. Abbildung 2.3 veranschaulicht das Prinzip und den Unterschied der Mechanismen.

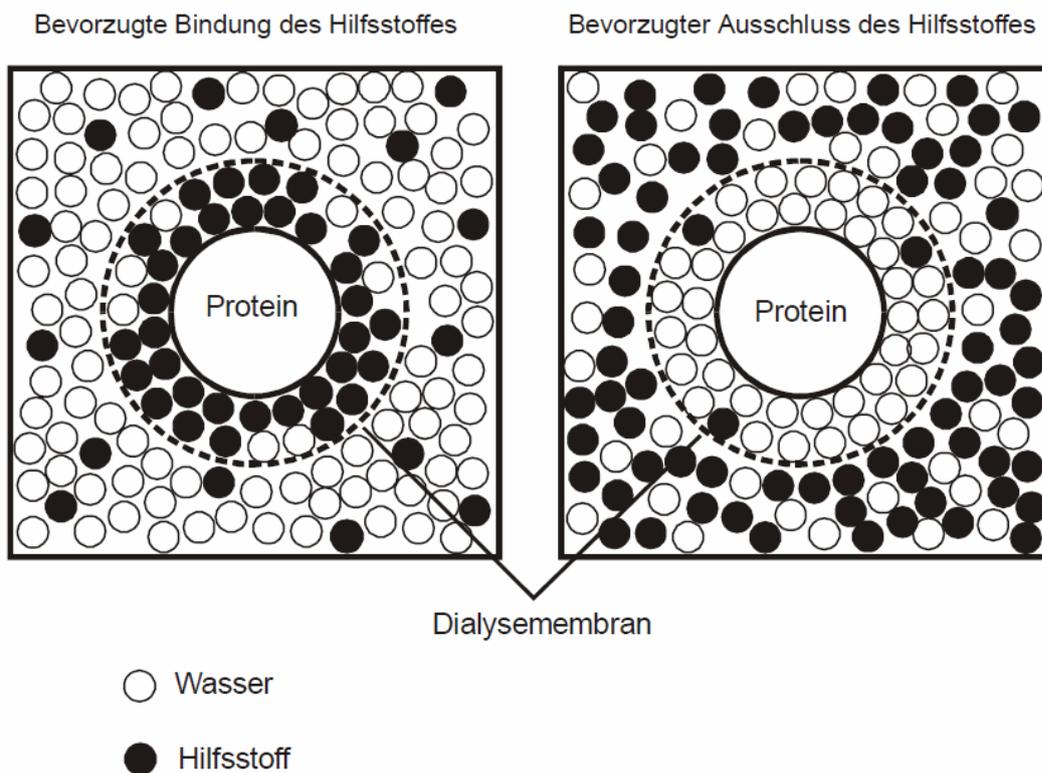


Abbildung 2.3: *Dialysegleichgewicht eines Proteins in verschiedenen Hilfsstofflösungen: Im linken Bild wird der Hilfsstoff bevorzugt an der Proteinoberfläche gebunden. Im rechten Bild wird er bevorzugt von der Proteinoberfläche ausgeschlossen (Gloger, 2002)*

Die stabilisierende Wirkung des Hilfsstoffs korreliert mit seiner Affinität zur Proteinoberfläche des nativen und des denaturierten Proteins. Beim denaturierten Protein liegen die sonst im Inneren liegenden hydrophoben

Seitenketten der einzelnen Aminosäuren außen, so dass diese nicht mit den hydrophilen Hilfsstoffen interagieren würden. Dadurch verschiebt sich das Gleichgewicht zugunsten der nativen Form, wie Abbildung 2.4 veranschaulicht (Carpenter *et al.*, 1992).

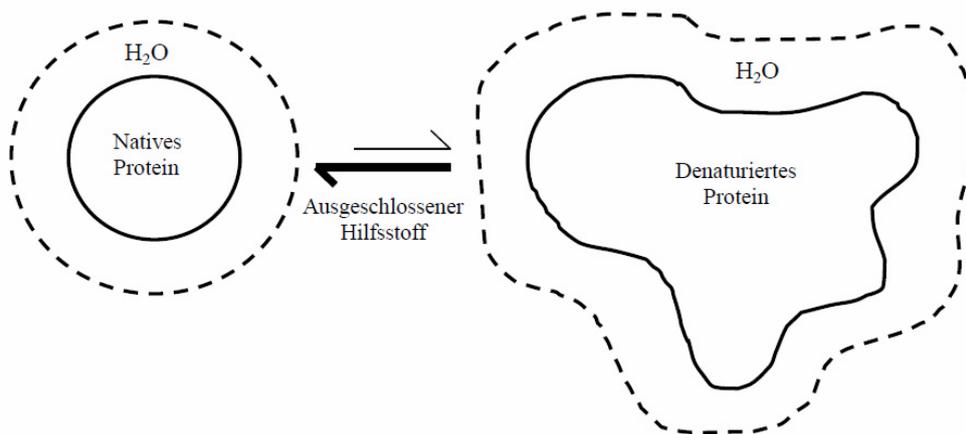


Abbildung 2.4: Gleichgewicht zwischen nativer und denaturierter Form

### 2.1.3.2 STABILISIERUNG DURCH TROCKNUNG

Um Proteine für eine Langzeitlagerung zu stabilisieren, ist die Entfernung des Lösungsmittels durch Trocknung das Mittel der Wahl. Allen Trocknungsverfahren ist die Umwandlung des Aggregatzustands des Wassers vom flüssigen oder festen Zustand in den gasförmigen gemein (Willmann, 2003). Trotz der hohen Kosten des Verfahrens hat sich die Lyophilisation gegenüber anderen Trocknungsverfahren wie beispielsweise der Vakuumtrocknung oder Sprühtrocknung behauptet. Sie bringt verfahrensbedingt einige Vorteile hinsichtlich Transport, Lagerung und Stabilität des Produktes mit (Manning *et al.*, 2010). Die Gefriertrocknung selbst beeinflusst die Stabilität des Proteins jedoch auch. Bei jedem Prozessschritt, sei es Einfrieren, Primärtrocknung oder Sekundärtrocknung, kann das Protein inaktiviert werden, so dass der Prozess sehr gut überwacht werden muss (Carpenter *et al.*, 1997). Während des Einfrierens kommt es zu Gefrierkonzentration der gelösten Substanzen. Eventuell vorhandene Puffersalze

können daraufhin aufgrund des Erreichens der Sättigungslöslichkeit auskristallisieren, so dass es zu einer pH-Wert-Verschiebung kommen kann, die in der Folge das Protein schädigt (siehe Seite 7). Des Weiteren kann es durch die Aufkonzentrierung zu vermehrten Protein-Protein-Interaktionen kommen, die möglicherweise zu Aggregation des Proteins führen. Eine sorgfältige Auswahl an Kryoprotektoren, die bevorzugt von der Proteinoberfläche ausgeschlossen werden (vergleiche Abbildung 2.3), kann dies verhindern. Ein weiteres Problem ist die große Eis-Wasser-Grenzfläche, die beim Einfrieren entsteht. Dies ist, wie in Abschnitt 2.1.2 beschrieben, durch den Einsatz nichtionischer Tensiden in den Griff zu bekommen. Bei der anschließenden Trocknung durch Sublimation des Eises kann es durch Dehydrierung der Proteinoberfläche ebenfalls zu Denaturierung und damit verbunden zu Wirksamkeitsverlust kommen. Auch hier kann durch die Selektion geeigneter Hilfsstoffe Abhilfe geschaffen werden. Mittel der Wahl sind Disaccharide. Hintergrund ist die „water replacement theory“. Das Hilfsstoffmolekül ersetzt dabei das Wassermolekül, indem es sich an der Proteinoberfläche orientiert und Wasserstoffbrückenbindungen zum Protein aufbaut. So wird die Sekundärstruktur durch das Wasserstoffbrückennetzwerk geschützt. Voraussetzung ist, dass Protein und Hilfsstoff amorph vorliegen. Eine weitere Theorie ist die Glasbildungstheorie („vitrification theory“). Sie besagt, dass der schützende Effekt der Kryoprotektion durch Glasbildung des entsprechenden Hilfsstoffes oder der Hilfsstoffkombinationen zustande kommt. Es wird angenommen, dass im glasartig-erstarrten Zustand die molekulare Mobilität derart reduziert ist, dass Degradationsreaktionen sehr stark verlangsamt ablaufen (Craig *et al.*, 1999). Proteine sind auch in der Lage, sich während der Gefriertrocknung selbst zu stabilisieren. Jiang und Nail (1998) beschreiben, dass die Restaktivität von gefriergetrocknetem Protein ohne Verwendung von Stabilisatoren höher ist, je höher die eingesetzte Konzentration an Protein in Lösung war.

## 2.2 LYOPHILISATION

### 2.2.1 EINFÜHRUNG

Die Lyophilisation, auch Sublimationstrocknung oder Gefriertrocknung genannt, ist ein Dehydrierungsprozess, bei dem eine Lösung oder Suspension eingefroren und anschließend getrocknet wird. Lyophilisation bedeutet im eigentlichen Wortsinn, das entstehende, stark poröse Produkt „lösungsmittelfreundlich“ zu machen. Das Lösungsmittel wird dabei durch Sublimation aus dem evakuierten System entfernt. Das Verfahren bietet ein weites Feld von Anwendungsmöglichkeiten (Tabelle 2.3):

*Tabelle 2.3: Anwendungsmöglichkeiten der Gefriertrocknung (nach Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH (2009))*

---

Beibehalten von Produktcharakteristika der Ausgangssubstanzen (Milch)

Bewahren der Ausgangsform (Tierpräparation, Blumen, Restauration von Büchern)

Konditionierung des Materials (gefriergetrocknete Früchte im Joghurt)

In der Lebensmittelindustrie (Instantprodukte, zum Beispiel Kaffee, Tee, Säfte, Fertigsuppen)

In der Biotechnologie zur Herstellung von z. B. in vitro- und in vivo Diagnostika

In der Pharmazeutischen Industrie zur Produktion von Parenteralia und zur Formulierung sensibler Substanzen

---

### 2.2.2 VOR- UND NACHTEILE DER LYOPHILISATION

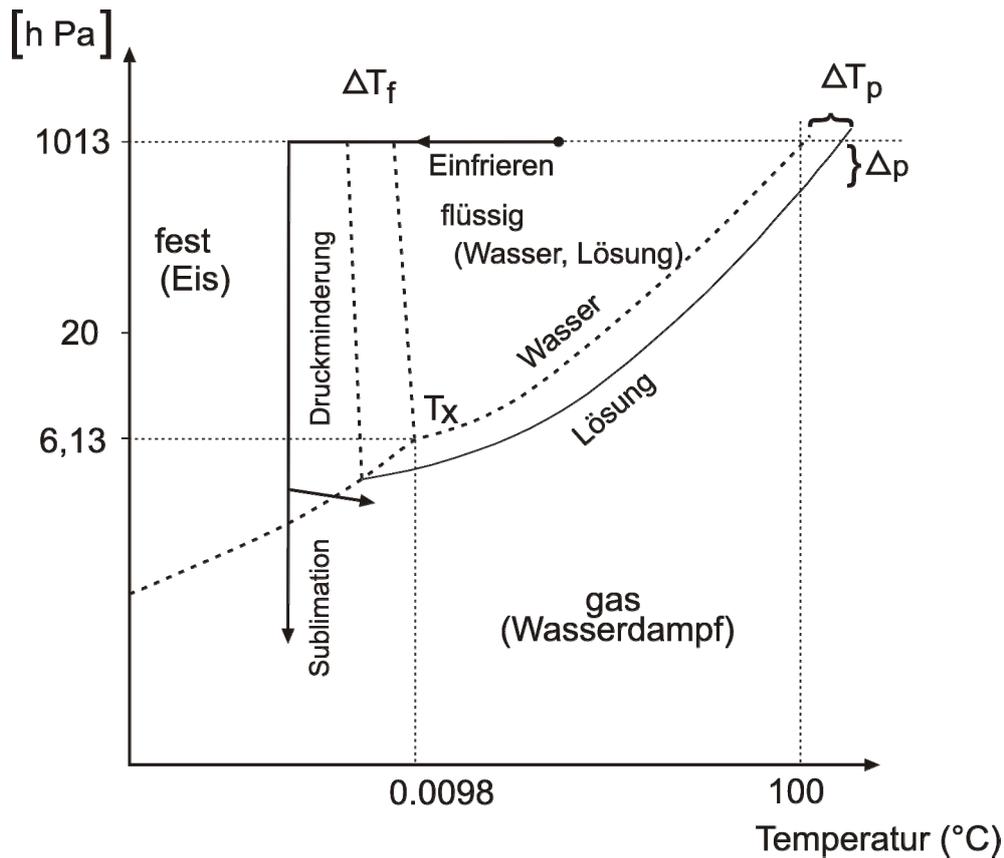
Ein großer Vorteil und sicherlich auch der Grund für die vielfältige und häufige Verwendung dieses Trocknungsverfahrens ist die Tatsache, dass es

sich um ein sehr schonendes Verfahren handelt. Selbst thermolabile Stoffe können erfolgreich und nahezu ohne Wirkverlust formuliert werden. Das entstehende Produkt weist eine sehr poröse Struktur auf, welche zu exzellenten Rehydratationseigenschaften führt. Wie bereits in Kapitel 1.1 erläutert, ist der Lyophilisationsprozess zur Herstellung steriler Produkte geeignet. Er ermöglicht eine aseptische Herstellung im Endbehältnis.

Der entscheidende Nachteil der Gefriertrocknung ist der hohe Kostenaufwand. Eine moderne Anlage ist sehr teuer. Des Weiteren sind bedingt durch die langen Prozesszeiten, die sich bei einigen Produkten auf mehrere Tage belaufen können, die Prozesskosten (Strom, Öl etc.) sehr hoch, was die Gefriertrocknung zu einem unökonomischen Verfahren macht. Die lange Prozesszeit an sich ist ebenso ein Problem, da die Herstellung einer Charge im Vergleich zu anderen Verfahren sehr lange dauern kann. Das entstehende Produkt ist feuchtigkeitsempfindlich, so dass sehr auf die Auswahl des Primärpackmittels geachtet werden muss. Sind, wie im vorliegenden Fall, Peptide formuliert, kann bei der Lagerung eintretende Feuchtigkeit die Wirksamkeit des Arzneimittels negativ beeinflussen.

### **2.2.3 GRUNDLAGEN**

Das Prinzip der Sublimation soll im Folgenden anhand des Zustandsdiagramms von Wasser erläutert werden, da es sich in der Praxis zumeist um wässrige Systeme handelt. Yong *et al.* (2008) beschreiben den erfolgreichen Einsatz von tertiärem Butanol (2-Methyl-2-Propanol) im Gemisch mit Wasser; die Verwendung von Lösungsmitteln ist sonst aber eher die Ausnahme.



$\Delta T_f$  = Gefrierpunktserniedrigung     $\Delta p$  = Dampfdruckerniedrigung

$\Delta T_p$  = Siedepunktserhöhung     $T_r$  = Tripelpunkt

Abbildung 2.5: Zustandsdiagramm von Wasser und einer wässrigen Lösung (nicht maßstabsgetreu)

Die Dampfdruckkurve beschreibt den Phasenübergang des Wassers in Abhängigkeit von Druck und Temperatur. Gleichermäßen interessant und essentiell für die Lyophilisation ist der Bereich der Dampfdruckkurve auf der linken Seite des Tripelpunktes, der auch als Sublimationskurve bezeichnet wird. Wird die Temperatur unter  $0,0098^\circ\text{C}$  gesenkt und das System evakuiert ( $p < 6,13$  mbar), geht das Wasser direkt vom festen in den gasförmigen Zustand über, ohne vorübergehend den flüssigen Zustand anzunehmen (Sublimation).

### 2.2.4 DER PROZESS

Da im Rahmen dieser Arbeit mit einem Modellpeptid gearbeitet wurde, ist dieses Kapitel nicht an allen Stellen allgemein gehalten, sondern auf die Besonderheiten der Trocknung von Peptiden und Proteinen bezogen. Ein konventioneller Gefriertrocknungsprozess besteht aus drei Phasen:

1. Einfrieren unterhalb der Kollapstemperatur (siehe Kapitel 3.2.2.2)
2. Primärtrocknung
3. Sekundärtrocknung

Für andere, moderne Gefriertrocknungszyklen, die mit nur einem Trocknungsschritt auskommen, sei auf Schersch *et al.* (2010) verwiesen. Im Folgenden sollen die jeweiligen Prozessschritte näher erläutert werden.

## 2.2.4.1 DAS EINFRIEREN

## 2.2.4.1.1 EIGENSCHAFTEN VON GEFRIERENDEN LÖSUNGEN

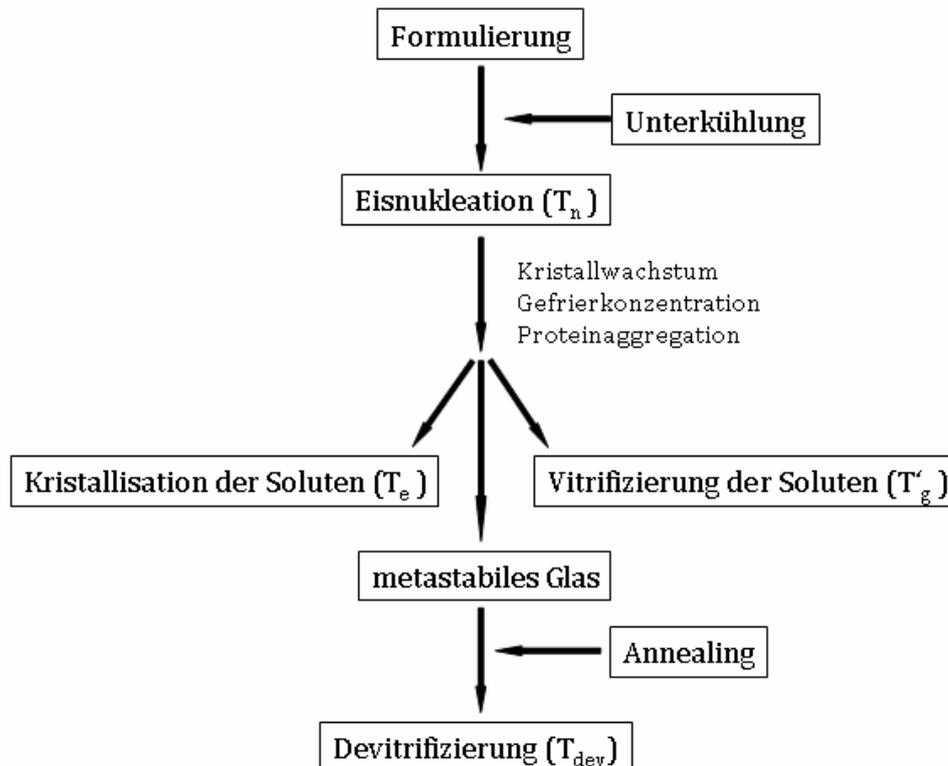


Abbildung 2.6: Physikalische Vorgänge beim Einfrieren einer Lösung (Nail, 2005)

Das Einfrierverhalten von Lösungen ist abhängig von den thermodynamischen Eigenschaften der enthaltenen Soluten (Franks, 1998). Wird eine wässrige Lösung abgekühlt, erfolgt die Kristallisation des Eises bei Erreichen der Nukleationstemperatur ( $T_n$ ). Die Differenz zwischen dem eigentlichen Gefrierpunkt und  $T_n$  wird als Unterkühlung (engl. „supercooling“) bezeichnet. Der Grad der Unterkühlung ist abhängig von dem Vorhandensein von Kristallisationskeimen, beispielsweise Verunreinigungen wie Staub (Cochran und Nail, 2009). Sind Kristallisationskeime vorhanden, ist die Unterkühlung nicht sehr stark ausgeprägt. Ist die (wässrige) Lösung jedoch sehr gut von Fremdpartikeln gereinigt, kann die Unterkühlung bis zu  $-40^\circ\text{C}$  betragen (Oetjen, 1997). Die Abkühlrate beeinflusst das Ausmaß der

Unterkühlung und damit die Kristallgröße und Kristallform des Eises. Schnelles Abkühlen führt zu starker Unterkühlung und der spontanen Bildung von vielen kleinen Eiskristallen bei Erreichen der  $T_n$ . Langsames Abkühlen führt zu verminderter Unterkühlung und Generierung von großen Kristallen. In sterilen, partikelfreien pharmazeutischen Produkten beträgt die Unterkühlung circa 10 bis 15°C (Liu, 2006). Bei weiterem Abkühlen der Lösung kommt es aufgrund der erfolgten Eiskristallisation zu einer Aufkonzentrierung der gelösten Bestandteile, bis die Sättigungslöslichkeit der jeweiligen Substanzen erreicht wird. Liegt ein eutektisches System vor, kristallisiert der Solut bei Erreichen der eutektischen Temperatur ( $T_e$ ) aus. Unterhalb der  $T_e$  trennt sich das System, Eis und Solut bilden ein Kristallgemisch. Ein Beispiel für ein solches System in der Gefriertrocknung ist Mannitol, welches in großem Maße Anwendung als Gerüstbildner („bulking agent“, siehe Kapitel 4.1) findet.

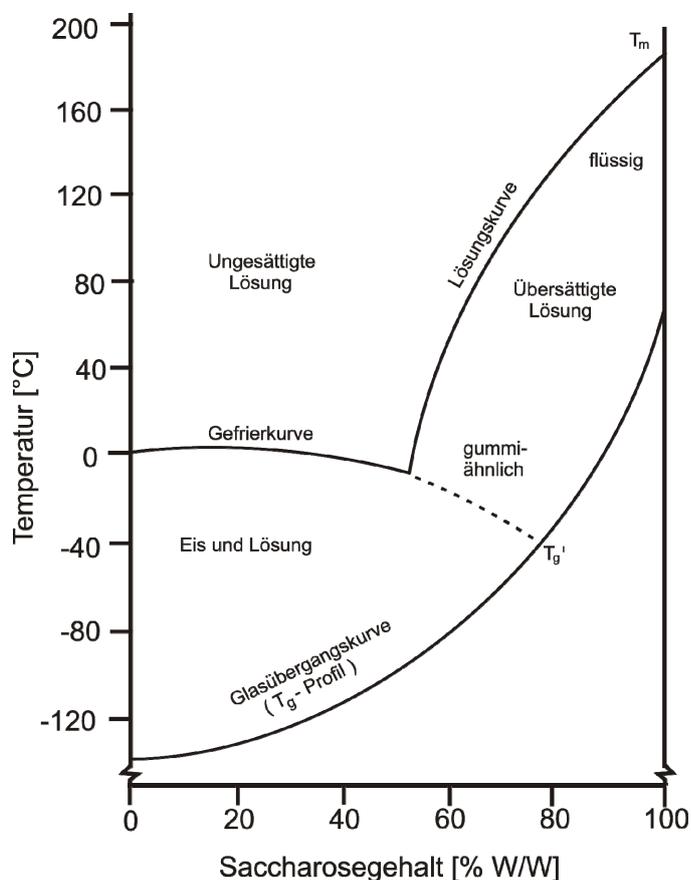


Abbildung 2.7: Zustandsdiagramm einer wässrigen Saccharoselösung (Franks, 1992)

Eine Glasbildung erfolgt immer dann, wenn zur Übersättigung neigende Hilfsstoffe verwendet werden. Diese fallen bei Erreichen der Sättigungslöslichkeit nicht aus, sondern gehen in einen gummiartigen Zustand von hoher Viskosität über (Franks, 1992). In diesem Temperaturbereich sind Diffusionsvorgänge aufgrund der hohen Viskosität der Lösung stark verlangsamt, so dass eine Kristallisation der Substanzen verhindert wird. Bei Erreichen der Glasübergangstemperatur der maximal gefrierkonzentrierten Lösung ( $T_g'$ ) vollzieht sich eine Umwandlung vom gummiartigen, elastischen in einen amorphen, spröden Zustand (siehe Abbildung 2.7). Dieser amorphe Zustand ist in der Lyophilisation gewünscht, da so die meisten Kryoprotektoren ihre stabilisierende Wirkung entfalten (vergleiche Kapitel 2.1.3.2). Zu dieser Kategorie an Hilfsstoffen, die glasartig erstarren, gehören beispielsweise Disaccharide (Saccharose, Trehalose) und Polymere.

### **2.2.4.1.2 EINFLUSS DES EINFRIERPROZESSES AUF DIE PROTEINSTABILITÄT**

Der Einfrierprozess ist mindestens als genau so wichtig anzusehen wie der anschließende Trocknungsschritt, da hier proteinschädigende Effekte auftreten können (Willemer, 1992). Meistens wird das zu lyophilisierende Gut durch Herabsenken der Stellflächentemperatur („shelf freezing“) eingefroren. Entweder wird der Gefriertrockner bestückt und anschließend abgekühlt, oder die Stellflächen werden erst heruntergekühlt und das Gerät wird bestückt, wenn die gewünschte Einfriertemperatur erreicht ist. Letzteres führt zu einer höheren Einfriergeschwindigkeit. Es werden typischerweise Einfriergeschwindigkeiten von  $0,3^\circ\text{C}$  bei nicht vorgekühlter Stellfläche bis  $5^\circ\text{C}$  pro Minute bei vorgekühlter Stellfläche erreicht. Eine andere Möglichkeit ist das Einfrieren der Proben mit flüssigem Stickstoff ( $\text{LN}_2$ ) und anschließendes Einbringen der tief gefrorenen Proben in den Gefriertrockner. Mit dieser Methode werden Einfriergeschwindigkeiten von ca.  $100^\circ\text{C}/\text{min}$  erreicht (Grimm, 2008). Die Einfriergeschwindigkeit ist

entscheidend für die entstehende Porengröße und damit auch für die Lyophilisatstruktur und das Aussehen des Produktes. Die Porengröße kann durch die Kristallgröße und Kristallform des Eises variiert werden, wie Tabelle 2.4 veranschaulicht:

*Tabelle 2.4: Einfluss der Einfriergeschwindigkeit auf die Lyophilisatstruktur*

<b>Einfriergeschwindigkeit</b>	<b>Eiskristallgröße</b>	<b>Porengröße</b>	<b>Literatur</b>
langsam	groß	groß	(Willemer, 1992)
schnell	klein	klein	(Eckhardt <i>et al.</i> , 1991)

Der Vorteil langsamer Einfriergeschwindigkeiten ist die Verkürzung der benötigten Primärtrocknungszeit, da das Wasser durch die größeren Poren schneller sublimieren kann (Willemer, 1992). Als nachteilig anzusehen ist, dass die Sekundärtrocknung, in der das an amorphe Strukturen adsorbierte Wasser (Erklärung siehe Kapitel 2.2.4.3) entfernt wird, erschwert ist, da die geschaffene Oberfläche im Vergleich zu kleineren Porengrößen kleiner ist. Außerdem resultiert ein langsames Einfrieren in einer stärkeren Aufkonzentrierung der gelösten Stoffe, so dass es, gerade bei Verwendung eines Puffersystems, zu pH-Wert-Verschiebungen kommen kann (Varshney *et al.*, 2007). Der Vorteil einer schnelleren Einfriergeschwindigkeit liegt in der stärkeren Unterbindung der Gefrierkonzentration, da das Wasser durch die stärkere Unterkühlung der Lösung bei Erreichen der Nukleationstemperatur spontan gefriert (House und Mariner, 1996). Andererseits ist durch Bildung kleinerer Eiskristalle die generierte Oberfläche größer, so dass auch die Eis-Wasser-Grenzfläche größer ist und so grenzflächeninduzierte Denaturierung verstärkt auftreten kann. Um die Vor- und Nachteile des schnellen und langsamen Einfrierens in Balance zu halten, wird eine mode-

rate Einfriergeschwindigkeit empfohlen (Jiang und Nail, 1998). Diese ist für das betreffende Protein jeweils empirisch zu ermitteln.

### **2.2.4.1.3 ANNEALING**

Eine Möglichkeit, die Partikelgrößenverteilung der Eiskristalle durch Ostwald-Reifung positiv zu beeinflussen, ist das so genannte Annealing oder Tempern. Dieser Schritt findet nach dem Einfrieren unterhalb der Kollaps-temperatur und vor Beginn der Primärtrocknung statt. Dabei wird die Probe einige Zeit (bis zu sechs Stunden) auf eine Temperatur erwärmt, die über der kritischen Temperatur, aber unter dem Gefrierpunkt liegt (Searles *et al.*, 2001). Faustregel ist, die Produkttemperatur circa 15°C über der  $T_g'$  zu halten. Durch die Vergrößerung der Eiskristalle erhöht sich auch die Sublimationsrate (s.o.), der Prozess wird durch kürzere Laufzeit ökonomischer. Ein weiterer Vorteil ist die Reduzierung der Chargenheterogenität, die durch die unterschiedliche Kälte- und Wärmeversorgung der Stellfläche entsteht; durch das Tempern werden die Porengrößenverteilungen in den verschiedenen Vials angeglichen (Gieseler, 2008). Hilfsstoffe, die beim ersten Einfrieren nicht vollständig auskristallisiert sind, wandeln sich beim Annealing vom metastabilen, amorphen Zustand in den kristallinen Zustand, sie rekristallisieren (engl. „devitrification“) (Carpenter *et al.*, 1997). Die Wahrscheinlichkeit einer Rekristallisation der Hilfsstoffe während der Lagerung des späteren Produktes wird auf diese Weise reduziert.

### **2.2.4.2 PRIMÄRTROCKNUNG**

Die Primärtrocknung ist der zeitintensivste Prozessschritt in der Lyophilisation. Hier findet die Entfernung des Eises aus dem gefrorenen System durch Sublimation statt. Die dafür notwendige Energie wird dem Gefriergut als Wärme über eine beheizbare Stellfläche zugeführt. Es werden verschiedene Arten der Wärmeübertragung unterschieden: Konduktion (Wärmelei-

tung), Konvektion (Gasströmung) und Wärmestrahlung. Abbildung 2.8 veranschaulicht diese:

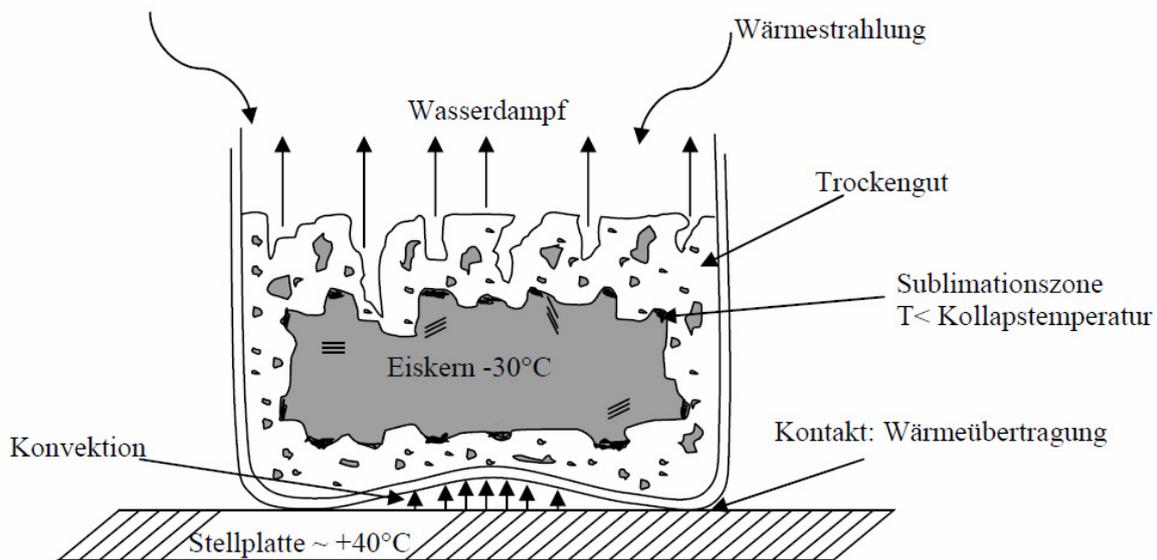


Abbildung 2.8: Wärmeübertragung während der Sublimation (Rupprecht, 1992)

Die Konduktion hat in der Gefrierdrying in der Regel den größten Anteil am Energieeintrag und erfolgt über den Kontakt zwischen Stellfläche und Vial in das Produkt. Der Wärmeübergang berechnet sich wie folgt:

$$\frac{dQ}{dt} = A_V * K_V * (T_S - T_B) \quad (2.1)$$

$A_V$  stellt die innere Fläche des Vials dar,  $T_S$  die Temperatur der Stellflächenoberfläche und  $T_B$  die Temperatur am Boden des Vials.  $K_V$  ist der Wärmeübertragungskoeffizient des Vials, der sich aus

$$K_V = K_c + K_r + K_g \quad (2.2)$$

berechnet.  $K_c$ ,  $K_r$  und  $K_g$  sind die Wärmeübertragungskoeffizienten aus Konduktion, Wärmestrahlung und Konvektion. Die treibende Kraft für die Sublimation des Wassers ist die Differenz zwischen Produkt- und Kondensator-temperatur und somit auch das Dampfdruckgefälle zwischen der

Sublimationsfront und der Eisschicht auf den Spulen des Kondensators (Wang, 2000). Der Kondensator stellt die kälteste Stelle im System dar. Um eine hohe Trocknungsrate zu erzielen, sollte die Produkttemperatur so hoch wie möglich eingestellt werden. Die Trocknungsrate  $v$  (in g/h) errechnet sich wie folgt:

$$v = \frac{dm}{dt} = \frac{(p_p - p_0)}{R_s + R_p} \quad (2.3)$$

$p_p$  ist der Dampfdruck des Wassers an der Sublimationsfront,  $p_0$  ist der Partialdruck im Vial (=Kammerdruck),  $R_p$  stellt den Stopfenwiderstand und  $R_s$  den Produktwiderstand dar (Nail und Johnson, 1992). Aus der Gleichung wird ersichtlich, dass eine bloße Änderung des Vakuums die Trocknungsrate beeinflusst, ohne an der Temperatur etwas zu verändern. Neben den oben genannten Faktoren beeinflussen auch Parameter wie die Morphologie der Eiskristalle (siehe Kapitel 2.2.4.1.2) und die Formulierung selbst die Trocknungsrate.

Um eine erfolgreiche Primärtrocknung ohne Produktkollaps zu erreichen, muss die Produkttemperatur über den gesamten Trocknungsverlauf unterhalb der  $T_g'$  gehalten werden, sofern glasartig erstarrende Hilfsstoffe verwendet werden (bzw. unter der  $T_e$  bei alleiniger Verwendung von kristallisierenden Substanzen, was aber in der Pharmazeutischen Technologie eine Ausnahme darstellt). Gleichzeitig sollte sie, wie oben beschrieben, so hoch wie möglich sein, um die Prozesszeiten so kurz wie möglich zu halten. Generell sollte die Formulierungsentwicklung von Lyophilisaten darauf abzielen, eine Rezeptur mit möglichst hoher  $T_g'$  zu schaffen, um den unökonomischen Prozess etwas ökonomischer zu gestalten. Die Primärtrocknung ist beendet, wenn das gesamte Eis sublimiert ist. Zur Endpunktdetektion gibt es viele verschiedene Ansätze: Die einfachste Methode ist, die Produkttemperatur zu überwachen. Ist die Sublimation beendet, nähert sich die

Produkttemperatur der Stellflächentemperatur. Um sicher zu gehen, dass sich wirklich kein Eis mehr in den Vials befindet, sollte nach erfolgtem Angleichen der Temperaturen noch circa drei Stunden gewartet werden, bevor die Sekundärtrocknung eingeleitet wird. Diese Methode der Endpunktdetektion kam im Rahmen dieser Doktorarbeit zur Anwendung. Weitere Möglichkeiten sind unter anderem der Druckanstiegstest und die Messung der Wärmeübertragungsrates. Für nähere Informationen sei auf Kramer (1999) verwiesen.

### 2.2.4.3 SEKUNDÄRTROCKNUNG

Nach Beendigung der Primärtrocknung verbleiben noch bis zu 20% des ursprünglich vorhandenen Wassers im Lyophilisat zurück (Beirowski, 2008). Das Ziel der Sekundär- oder Nachrocknung ist die Entfernung des gebundenen („unfrozen“ oder „bounded“) Wassers mit dem Ziel einer für die jeweilige Formulierung optimalen Restfeuchte. Das an amorphe Strukturen gebundene Wasser wird durch Diffusions- und Desorptionsvorgänge aus dem System entfernt. Für kristalline Materialien ist die Sekundärtrocknungszeit kurz, da der Betrag an adsorbiertem Wasser nur von der zur Verfügung stehenden Oberfläche abhängig ist. Für amorphe Strukturen ist sie dementsprechend lang, da das gebundene Wasser erst aus den amorphen Bereichen an die Oberfläche diffundieren muss. Dieser Diffusionsvorgang wird durch die Einstein-Gleichung (Einstein, 1905) beschrieben und ist geschwindigkeitsbestimmend und direkt temperaturabhängig:

$$D = \frac{RT}{N_A \cdot 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad (2.4)$$

R entspricht der allgemeinen Gaskonstanten, T der Temperatur,  $N_A$  der Avogadrokonstanten, r dem Radius des Vials und  $\eta$  der dynamischen Viskosität. Die Sekundärtrocknung wird üblicherweise bei erhöhter Stellflächen-

temperatur (25-60°C) und minimalem Druck durchgeführt, wobei die Änderung des Druckes nicht essentiell ist (Tang und Pikal, 2004). Es ist von großer Wichtigkeit, dass die Primärtrocknung vollständig abgeschlossen ist, da es sonst zu „meltback“, dem Schmelzen von Eis mit folgendem Zusammenfließen der porösen Struktur, und folglich zum Produktkollaps kommen kann. Weiterhin muss genau eruiert werden, welche Stellflächen- und damit auch welche Produkttemperatur das Protein ohne Wirkverlust verträgt.

### 2.3 PULMONALE APPLIKATION VON PROTEINEN

Aerosole sind eine relativ moderne Darreichungsform. Die Nutzung der Lunge als Applikationsziel für Arzneimittel begann in den 1950er Jahre mit den Asthmatherapeutika und hat sich im Verlauf der Jahre stark weiterentwickelt, so dass heute neben der lokalen Asthma- und COPD-Therapie auch die systemische Therapie verschiedenster Erkrankungen im Fokus der Forschung steht. Tabelle 2.5 zeigt die wichtigsten Entwicklungen inhalativer Produkte in tabellarischer Form.

*Tabelle 2.5: Meilensteine der inhalativen Therapie (Patton und Byron, 2007)*

<b>Jahr</b>	<b>Device</b>	<b>Wirkstoff</b>	<b>Krankheit</b>
1662	Bennet's Inhalation Treatment	?	Tuberkulose
1802	Potter's Zigaretten	?	Asthma
1860	Sales-Giron's tragbarer Vernebler	?	?
1925	Vernebler	Insulin	Diabetes
1945	Vernebler	Penicillin	Lungenentzündung
1955	Vernebler	Hydrocortison	Asthma
1956	erster MDI	Albuterol	Asthma
1960	erster DPI	Noradrenalin	Asthma
1988	erster Mehrdosen-DPI	Terbutalin	Asthma
1996	erster Protein-Vernebler	DNase	Cystische Fibrose
1997	erster MDI auf HFA-Basis	Albuterol	Asthma
2006	erster Protein-DPI	Insulin	Diabetes

Die pulmonale Applikation ist aus mehreren Gründen ein vielversprechendes Ziel der systemischen Arzneimitteltherapie: die Lungenperipherie bietet eine große und sehr aufnahmefähige Oberfläche von ca. 80-120 m<sup>2</sup>

Größe (Niven, 1995), eine umfangreiche Gefäßversorgung und ein ausgesprochen dünnes Alveolarepithel (Agu *et al.*, 2001); größtenteils trennt nur eine Zellschicht die Luft vom Blutkreislauf. Abbildung 2.9 zeigt die relative Größenordnung des Lungenepithels. Je feiner die Atemwege werden, desto flacher wird die Schicht an Lungensurfactant, die die Epithelien überzieht. Pulmonal applizierte Therapeutika, die in tiefe Lungenregionen gelangen, wirken daher in der Regel schneller als orale Darreichungsformen, da der Wirkstoff direkt ins Blut diffundieren kann und so den First-Pass-Effekt und Degradation durch im Gastrointestinaltrakt vorhandene Proteasen umgeht (Antosova *et al.*, 2009).

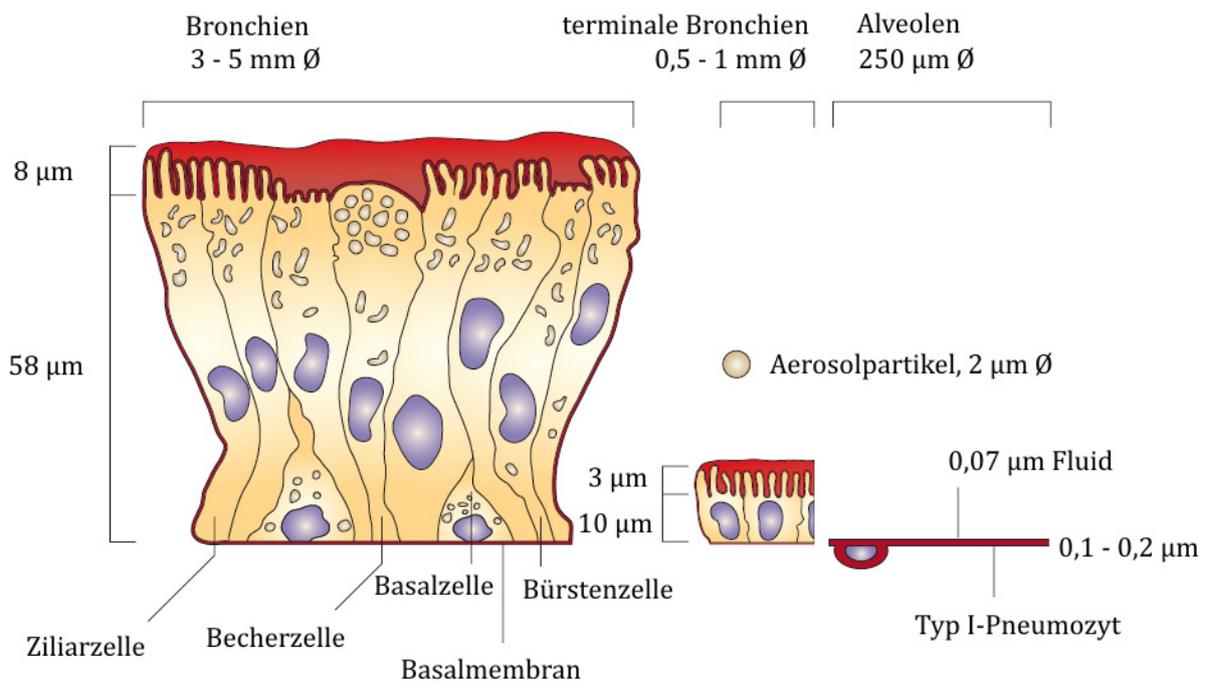


Abbildung 2.9: Illustration des Lungenepithels in verschiedenen Lungenregionen (Patton und Byron, 2007)

Die zuletzt genannten Gründe führen zu einer besseren Bioverfügbarkeit, die für kleine Moleküle nahezu 100% betragen kann (Brown und Schanker, 1983). Ein Nachteil ist das ausgeklügelte Abwehrsystem der oberen Atemwege. Es besteht aus anatomischen Barrieren, der mukoziliären Clearance, sekretorischem Immunglobulin A und dendritischen Zellen und führt dazu,

dass 90% der inhalierten Partikel über 3  $\mu\text{m}$  Größe abgehustet werden und schließlich im Gastrointestinaltrakt landen (Scheuch und Siekmeier, 2007). Auch die Lungenperipherie besitzt Abwehrmechanismen. Zum einen finden sich dort Makrophagen, die die Absorption von Makromolekülen verhindern, zum anderen sezerniert das Blut Proteasen in die Alveolen, die den Wirkstoff inaktivieren. Der Zusatz von Absorptionsverbesserern und Proteaseinhibitoren kann sowohl die Absorptionsrate, als auch die Bioverfügbarkeit verbessern (Yu und Chien, 1997). Um einen Arzneistoff inhalativ zur Verfügung zu stellen, muss er in ein Aerosol überführt werden, das heißt, als flüssige oder feste Partikel in einer Gasphase dispergiert. Damit ein ausreichend große Wirkstoffmenge in tiefen Lungenregionen deponiert wird, ist die Freisetzung eines geeigneten Partikelgrößenspektrums aus dem jeweiligen Inhalator erforderlich. Idealerweise sollte das therapeutisch relevante Partikelspektrum einen aerodynamischen Durchmesser ( $d_a$ ) von 2 bis 5  $\mu\text{m}$  aufweisen. Der  $d_a$  ist ein bedeutender Parameter zur Charakterisierung von pharmazeutischen Aerosolen und ist definiert als der Durchmesser einer Kugel mit der normierten Dichte von 1  $\text{g}/\text{cm}^3$ , welche die gleiche Sinkgeschwindigkeit in ruhender oder wirbelfrei strömender Luft hat wie die Partikel selbst. Gleichung (2.5) zeigt die Berechnung von  $d_a$ :

$$d_a = d_g \sqrt{\frac{\rho}{\lambda \rho_s}} \quad (2.5)$$

$D_g$  ist definiert als der geometrische Durchmesser des zu betrachtenden Partikels,  $\rho$  die wahre Dichte des Partikels,  $\rho_s$  ist = 1  $\text{g}/\text{cm}^3$  und  $\lambda$  stellt den dynamischen Formfaktor dar (Hassan und Lau, 2009). Der dynamische Formfaktor  $\lambda$  ist definiert als der Quotient aus der Zugkraft des Partikels und der eines runden Partikels des gleichen Volumens (Baron und Willeke, 2001), das heißt, runde Partikel haben einen Formfaktor von 1. Aus der Gleichung (2.5) wird weiterhin ersichtlich, dass der aerodynamische

Durchmesser eines Partikels stark von seinem geometrischen Durchmesser abweichen kann. Partikel mit hoher Porosität, wie in den vorliegenden Untersuchungen die aerosolisierten Lyophilisatpartikel, können einen  $d_g$  von 20  $\mu\text{m}$  aufweisen und sich dennoch wie ein kugelförmiges Partikel von 5  $\mu\text{m}$  Durchmesser verhalten. Die Abscheidung von Arzneistoffpartikeln in der Lunge basiert auf fünf Mechanismen. Davon besitzen Impaktion, Sedimentation und Diffusion die größte Bedeutung (siehe Abbildung 2.10), während Interzeption und elektrostatische Abscheidung eine untergeordnete Rolle spielen. Daher sollen hier nur die drei erstgenannten näher erläutert werden.

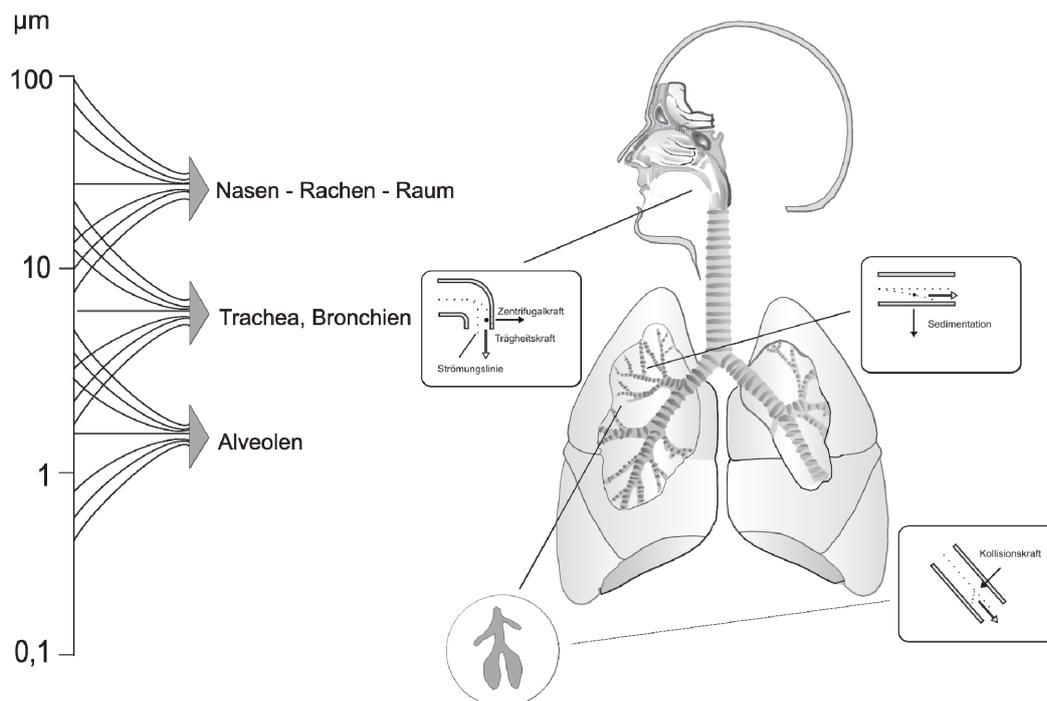


Abbildung 2.10: Pulmonale Abscheidemechanismen

Impaktion tritt immer dann auf, wenn inhalierte Partikel nicht mehr den sich verzweigenden Stromlinien der Atemluft folgen können und folglich aufgrund ihrer Trägheit an der Gabelung von Atemwegen an den Wandungen der Gefäße aufprallen. Dieser Vorgang ist abhängig von der Geschwindigkeit der Luft, dem Durchmesser des Partikels, seiner Dichte und seiner Partikelform.

### 2.3.1 PULVERINHALATOREN

Pulverinhalatoren stellen den größten Wachstumsmarkt im Bereich der inhalativen Darreichungsformen dar. Zurecht, denn sie bieten im Vergleich zu den älteren Technologien wie treibgasbetriebenen Dosieraerosolen (pMDIs) und Verneblern einige Vorteile (Hickey, 1994). Zum einen kommen sie ohne die Verwendung umweltschädigenden Treibgases aus, zum anderen muss das Auslösen und das nachfolgende Inhalationsmanöver vom Patienten nicht in dem Maße koordiniert werden, wie es bei pMDIs der Fall ist. DPIs sind zudem handlich, einfach zu benutzen und benötigen keinen Spacer (Geller, 2005). Ein idealer Pulverinhalator bringt unter anderem folgende Eigenschaften mit:

---

Er schützt den Wirkstoff vor Feuchtigkeit (Newman, 2004),

die abgegebene Dosis ist über einen weiten Flussratenbereich konstant (Ashurst *et al.*, 2000),

er liefert Partikel mit einer optimalen Partikelgrößenverteilung für die Deposition in tiefen Lungenregionen,

er ist nutzbar für ein weites Spektrum an Wirkstoffen und Dosierungen,

die Adhäsion von Wirkstoff an der Innenseite des Inhalators ist minimiert (Byron, 2004),

er ermöglicht eine möglichst hohe Feinpartikelfraktion (FPF) (Srichana *et al.*, 1998).

---

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein möglichst idealer DPI zur Applikation der optimierten Lyophilisate entwickelt werden.

### 3 MATERIALIEN UND METHODEN

#### 3.1 MATERIALIEN

Aufgrund der Vielzahl der auf Eignung getesteten Hilfsstoffe werden hier nur die bedeutendsten genauer erläutert. Für andere verwendete Hilfsstoffe sei auf Kapitel 4.3 verwiesen.

##### 3.1.1 INSULIN HUMAN

Im Rahmen der Untersuchungen wurde Insulin human als Modellprotein verwendet. Insulin human ist ein Peptidhormon (Molekulargewicht 5808 g/mol, (Ph. Eur., 2008b), Abbildung 3.1), das in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas biosynthetisiert wird und vornehmlich der Blutglucosespiegelregulation dient. Es besteht aus zwei Peptidketten, der A-Kette mit 21 und der B-Kette mit 30 Aminosäuren, welche durch zwei intermolekulare Disulfidbrücken kovalent verbunden sind (Cys-A7 mit Cys-B7 und Cys-A20 mit Cys-B19). Eine dritte intramolekulare Disulfidbrücke verbindet die Cysteinreste der Positionen 6 und 11 der A-Kette (Brange, 1987).

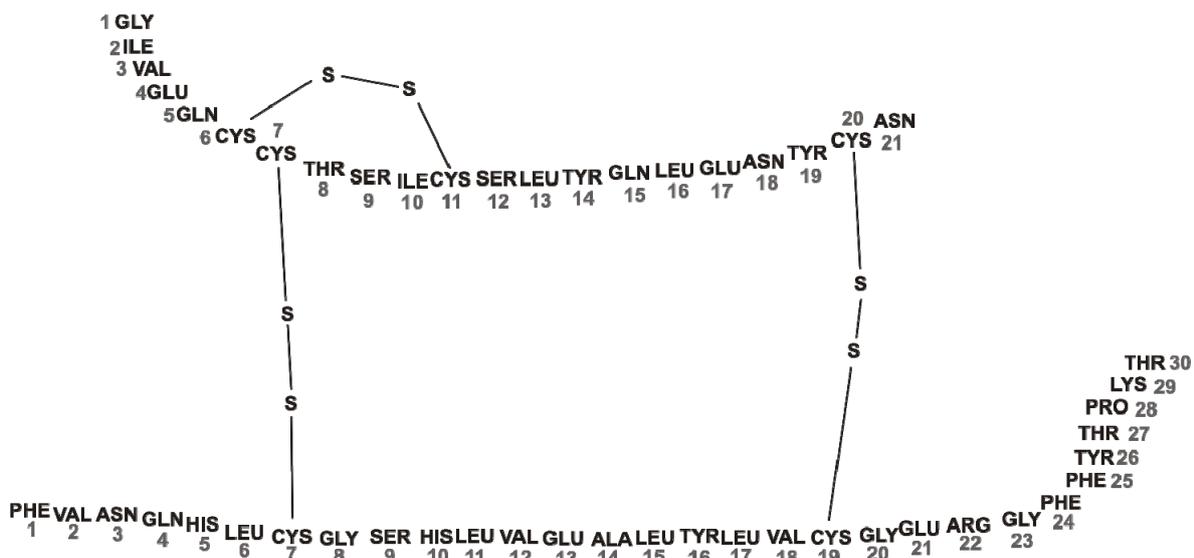


Abbildung 3.1: Insulin human in schematischer Darstellung

Insulin ist in Wasser praktisch unlöslich, löst sich jedoch in verdünnten Mineralsäuren (Ph. Eur., 2008b). Als Arzneistoff kommt das heutzutage meist rekombinant hergestellte Insulin bei der Therapie von Diabetes mellitus Typ I, der aufgrund der Zerstörung der Langerhans'schen Zellen mit absolutem Insulinmangel einhergeht, zur Anwendung. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Insulin stammt von der Wanbang Biochemical Pharmaceutical Company, Xuzhou, China. Laut Analysenzertifikat besitzt es eine biologische Aktivität von 30 Internationalen Einheiten (I.E.) pro mg. Eine I.E. ist äquivalent zu 0,0347 mg purem, wasserfreiem Insulin human (Ph. Eur., 2008b).

### 3.1.2 L-GLUTAMINSÄURE

(L)-Glutaminsäure (Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz, Abbildung 3.2), chemische Bezeichnung 2-Aminopentandisäure, zählt zu den nicht essenziellen  $\alpha$ -Aminosäuren. Sie ist in jedem proteinhaltigen Nahrungsmittel vorhanden und spielt eine wesentliche Rolle im Zellstoffwechsel, da sie über den Citratzyklus in Verbindung zum Kohlenhydratstoffwechsel steht. Da L-Glutaminsäure ubiquitär im menschlichen Körper zu finden ist und sie den GRAS-Status („generally recognized as safe“) trägt (US Food and Drug Administration, 1980), kann ihre Verwendung als Adjuvans in der Gefrier-trocknung als unbedenklich eingestuft werden. In wässriger Lösung liegt das Molekül dissoziiert vor, so dass, bedingt durch die beiden Carboxyl-funktionen, Glutaminsäurelösungen sauer reagieren.

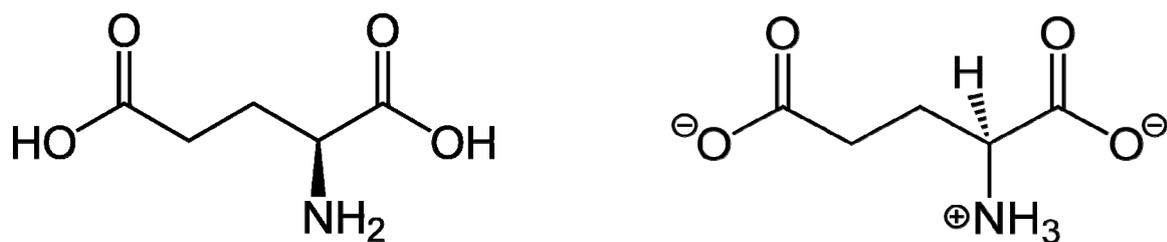


Abbildung 3.2: L-Glutaminsäure, ungeladen (links) und dissoziiert (rechts)

Der isoelektrische Punkt der L-Glutaminsäure beträgt 3,24 (Barrett, 1985). Sie ist schwer löslich in kaltem Wasser (11,1 g/l bei 25°C, (Deutsche Gesetzliche Unfallversicherung e.V., 2010)).

### 3.1.3 POLYSORBAT 80

Polysorbat 80 (Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Deutschland, Abbildung 3.3) oder auch Polyoxyethylen-(20)-sorbitanmonooleat gehört zur Stoffklasse der nichtionischen Tenside und findet sowohl in der Nahrungsmittel-, als auch in der pharmazeutischen Industrie breite Verwendung als Emulgator und Lösungsvermittler. Es stellt eines der wenigen Tenside dar, das von der FDA zur parenteralen Verwendung zugelassen ist (US Food and Drug Administration, 2010), und zwar in Konzentrationen bis zu 12,5% (m/m). Dieser Fakt lässt die Schlussfolgerung zu, dass Polysorbat 80, vor allem in niedrigen Dosen, auch pulmonal ohne Bedenken applizierbar ist.

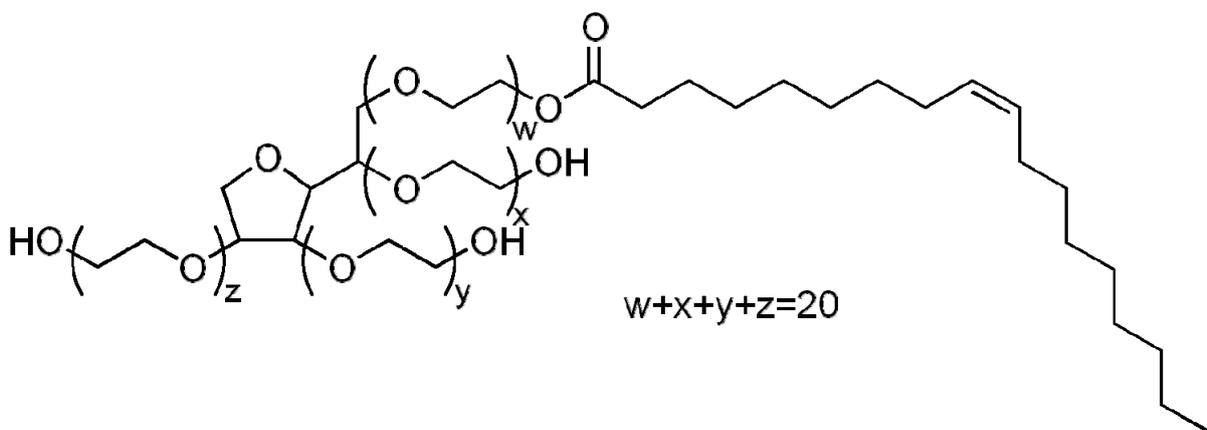


Abbildung 3.3: Polysorbat 80

Polysorbat 80 ist schon in geringen Konzentrationen in der Lage, Proteine während des Einfrierprozesses vor oberflächeninduzierter Denaturierung zu schützen (Chang *et al.*, 1996).

### 3.1.4 MYO-INOSITOL

Myo-Inositol (cis-1,2,3,5-trans-4,6-Cyclohexanhexol, Abbildung 3.4, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) ist analog zur L-Glutaminsäure eine körpereigene Substanz, die im menschlichen Körper vor allem mit Phosphatresten verestert als Inositol-1,4,5-triphosphat (IP<sub>3</sub>) auftritt und als „second messenger“ eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion spielt (Krauss, 2008). Die frühere Bezeichnung „Muskelzucker“ ist irreführend, da myo-Inositol nicht den Zuckern, sondern den cyclischen Alkoholen zuzuordnen ist.

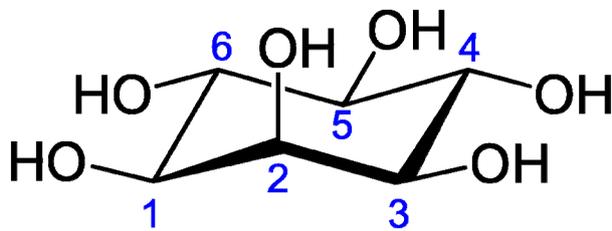


Abbildung 3.4: myo-Inositol

Myo-Inositol diente in den Untersuchungen als Modellstabilisator aus der Gruppe der Zuckeralkohole. Es zeigt nachweislich einen proteinstabilisierenden Effekt (Izutsu *et al.*, 1994).

### 3.1.5 L-LEUCIN

L-Leucin (2-Amino-4-methylpentansäure, Abbildung 3.5) ist eine für den Menschen essentielle, proteinogene  $\alpha$ -Aminosäure. Der isoelektrische Punkt liegt bei 5,98 (Barrett, 1985). L-Leucin diente in den vorliegenden Untersuchungen als im Vergleich zu den anderen verwendeten Substanzen relativ hydrophober Hilfsstoff bei der Gefriertrocknung. Die Hydrophobizität ist bedingt durch die beiden endständigen Methylgruppen. Es zeigt bei sprühgetrockneten Formulierungen eine Verbesserung der Dispergierbarkeit (Seville *et al.*, 2007), daher sollte getestet werden, ob dies auch für gefriergetrocknete Formulierungen gilt.

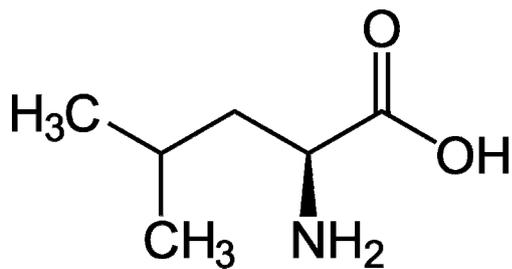


Abbildung 3.5: *L-Leucin in undissoziierter Form*

#### 3.1.6 AQUA BIDESTALLATA

Das in dieser Arbeit verwendete Wasser zum Ansetzen der Lösungen wurde der hauseigenen Destillationsanlage FinnAqua 75-E-4 (FinnAqua, Helsinki, Finnland) entnommen. Die Leitfähigkeit sowie der pH-Wert wurden regelmäßig überprüft.

#### 3.1.7 VIALS

Es kamen zwei verschiedene Glastypen bei der Gefriertrocknung zum Einsatz. Zunächst wurde in 2R-Injektionsflaschen (Pri-Pac e.K., Eschweiler, Deutschland) der hydrolytischen Klasse I lyophilisiert. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurde dann, bedingt durch den zu geringen Innendurchmesser des Halses der 2R-Vials, auf Klarglas-Flachbodengläser (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland), ebenfalls hydrolytische Klasse I, gewechselt. Abbildung 3.6 zeigt die zur Lyophilisation verwendeten Glastypen.



Abbildung 3.6: 2R-Vial (links) und Flachbodenglas (rechts)

## 3.2 METHODEN

### 3.2.1 PRÄPARATIVE METHODEN

#### 3.2.1.1 HERSTELLUNG DER LÖSUNGEN

Das Herstellen der zur Lyophilisation bestimmten Lösungen erfolgte nach folgendem Schema (Tabelle 3.1):

Tabelle 3.1: Herstellungsschema der zur Lyophilisation bestimmten Lösungen

---

1. Einwaage der erforderlichen Masse an L-Glutaminsäure in ein Becherglas
  2. Zugabe einer Polysorbat 80-Lösung von erforderter Konzentration und Rühren, bis sich die L-Glutaminsäure gelöst hat
  3. Messung des pH-Wertes, Sollwert ca. 3,3
  4. Zugabe der erforderlichen Masse an Insulin und Rühren, bis die Lösung klar ist
  5. Gegebenenfalls Lösen weiterer Hilfsstoffe
  6. Sterilfiltration der Lösung und Abfüllung in Vials
- 

Die Einwaage der Feststoffe erfolgte jeweils auf einer Sartorius MC5-Mikrowaage (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland). Flüssigkeitsvolumina wurden mit einer elektronischen Pipette (Eppendorf Research® pro,

---

Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) abgefasst. Sterilfiltriert wurde mit sterilen, pyrogenfreien Filtern einer Porenweite von 0,22 µm (Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland).

#### **3.2.1.2 LYOPHILISATION**

Die Lyophilisation als Verfahren wurde bereits im Theoretischen Teil, Kapitel 2.2, erläutert. Für die Untersuchungen standen zwei verschiedene Gefriertrockner zur Verfügung. Zum einen kam eine Labor-Gefriertrocknungsanlage der Firma Christ, Modell Alpha 1-4 (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, Deutschland) zum Einsatz, die aufgrund ihrer Größe optimal zur Formulierungsentwicklung genutzt werden konnte. Pro Gefriertrocknungszyklus konnten 64 Lyophilisate produziert werden. Die minimal erreichbare Produkttemperatur, die in bedeutendem Maße eine erfolgreiche Trocknung ohne Kollaps beeinflusst (Roy und Gupta, 2004), betrug je nach Umgebungstemperatur und Jahreszeit -27°C bis -29°C. Daher waren der Verwendung vieler verschiedener Hilfsstoffe Grenzen gesetzt, da nur Formulierungen mit einer Glasübergangstemperatur der maximal gefrierkonzentrierten Lösung von -27°C und höher ohne Bedenken getrocknet werden konnten, um einen (Teil)-Kollaps des Produktes und damit eine eventuelle Inaktivierung des Wirkstoffes zu vermeiden.

Zum Produzieren größerer Chargen diente ein Gefriertrockner im Pilotmaßstab der Firma Klein Vakuumtechnik, Modell GFT-6 (GHS Vakuumtechnik GmbH, Niederfischbach, Deutschland) Es standen drei Stellflächen mit jeweils 414 Vialstellplätzen zur Verfügung, so dass theoretisch 1242 Lyophilisate pro Zyklus produziert werden konnten. Die minimal erreichbare Vorlauftemperatur (Temperatur des Kühlmittels) betrug circa -40°C. Bedingt durch die räumliche Trennung von Stellflächen und Kondensator

konnte diese Temperatur aber nicht an das gefrorene Gut abgegeben werden, da die Stellflächen umgebende Volumen und folglich auch die direkte Umgebung der Vialwandungen nicht so stark abzukühlen waren. So lag die minimal erreichbare Produkttemperatur in der gefrorenen Lösung bei etwa  $-30^{\circ}\text{C}$ , ähnlich der des Christ-Gefriertrockners.

Tabelle 3.2 zeigt den üblicherweise verwendeten Gefriertrocknungszyklus. Sofern nicht anders gekennzeichnet, wurde mit diesem Protokoll getrocknet. Weiterhin wurden alternative Zyklen angewendet, die zum Beispiel auf eine Verkürzung der Prozessdauer abzielten oder einen Annealingschritt beinhalteten (Seite 22), um eine angepasste Porengrößenverteilung zu erhalten.

*Tabelle 3.2: Gefriertrocknungszyklus (Standard)*

<b>Teilschritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Druck</b>	<b>Dauer</b>
<b>Einfrieren</b>			
bei Raumtemperatur oder bei gekühlter Stellfläche	so tief wie möglich, im Normalfall $-28^{\circ}\text{C}$ bis $-27^{\circ}\text{C}$		16 h
<b>Primärtrocknung</b>			
	$-30^{\circ}\text{C}$ (Stellfläche)	0,370 mbar	24 h
<b>Sekundärtrocknung</b>			
	$30^{\circ}\text{C}$ (Stellfläche)	0,001 mbar	24 h
Gesamtdauer			64 h

## 3.2.2 ANALYTISCHE METHODEN

### 3.2.2.1 DYNAMISCHE DIFFERENZKALORIMETRIE

Die Dynamische Differenzkalorimetrie (differential scanning calorimetry, DSC) misst kalorimetrisch Enthalpieänderungen in einer Probe im Ver-

gleich zu einer Referenz. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde mit einem Dynamischen Leistungsdifferenzkalorimeter gearbeitet. Dazu stand ein Diamond DSC-Kalorimeter und die dazugehörige Software Pyris zur Verfügung (beides von Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA).

Die Glasübergangstemperatur der maximal gefrierkonzentrierten Lösung ( $T_g'$ ) ist eine der wichtigsten Kenngrößen in der Formulierungsentwicklung von lyophilisierten Zubereitungen (Wang, 2000). Zur Ermittlung von  $T_g'$  wurde mit folgendem Temperatur-Zeit-Programm (Tabelle 3.3) gearbeitet:

*Tabelle 3.3: Temperatur-Zeit-Programm zur Bestimmung von  $T_g'$*

---

1. Halten der Temperatur bei 25°C für 1 Minute
  2. Kühlen auf -50°C mit 10°C pro Minute
  3. Halten der Temperatur für 4 Minuten
  4. Heizen der Proben auf 25°C mit 10°C pro Minute
- 

Die zu untersuchenden Lösungen wurden vor der kalorimetrischen Vermessung sterilfiltriert, um heterogene Verunreinigungen abzutrennen, da diese als Kristallisationskeim wirken könnten (Cochran und Nail, 2009). Um Ungenauigkeiten der Einwaage durch Verdunsten des Wassers zu vermeiden, wurde zunächst der Aluminiumtiegel mitsamt Deckel auf der Mikrowaage tariert. Dann wurden 40  $\mu$ l der Lösung in den Tiegel pipettiert und dieser hermetisch verschlossen. Erst dann wurde die Einwaage notiert. Zur Auswertung der Messungen wurde stets der Aufheizschritt betrachtet, da dort thermisch schwache Ereignisse wie  $T_g'$  deutlicher zu erkennen sind als in der Abkühlkurve (Gloger, 2002). Es wurde zunächst das Peakmaximum der ersten Ableitung der Heizkurve ermittelt, da thermisch schwache Ereignisse mit dieser Methode besser auffindbar sind (Levine und Slade, 1988). Anschließend wurde der so identifizierte Glasübergang graphisch durch Extrapolation der halben spezifischen Wärmekapazität (half  $C_p$

extrapolated) ermittelt. Abbildung 3.7 zeigt exemplarisch die graphische Ermittlung der Glasübergangstemperatur einer maximal gefrierkonzentrierten Lösung.

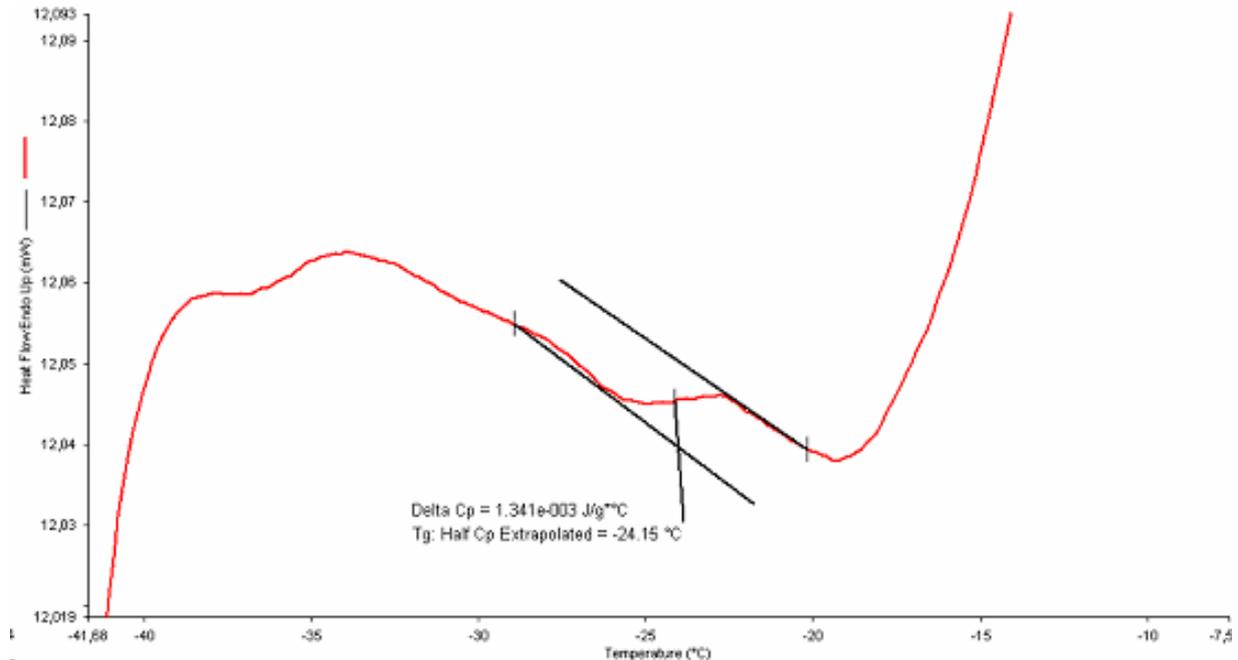


Abbildung 3.7: Exemplarisches Kalorigramm einer Lösung

### 3.2.2.2 GEFRIERTROCKNUNGSMIKROSKOPIE

Die Gefriertrocknungsmikroskopie (freeze dry microscopy, FDM) ist ein Verfahren zur visuellen Ermittlung der Kollapstemperatur ( $T_c$ ) von Lyophilisaten. Die  $T_c$  ist analog zur  $T_g'$  ein sehr wichtiger Parameter in der Lyophilisation und liegt im Allgemeinen etwas oberhalb dieser (Rambhatla *et al.*, 2005). Das Messsystem besteht aus einem Lichtmikroskop und einem Probenstisch. Dieser besteht aus einer evakuierbaren Vakuumkammer, in der ein kühl- und beheizbarer Silberblock steht. Ähnlich wie bei der DSC ist es durch eine entsprechende Temperatursteuerung möglich, die Probe einem kontrollierten Temperatur-Zeit-Programm zu unterwerfen und sie dabei lichtmikroskopisch durch ein Fenster im Deckel der Vakuumkammer zu betrachten. Abbildung 3.8 zeigt die Apparatur im Ganzen.

Zum Ablauf der Messung: Die Probe (in der Regel genügen 2  $\mu\text{l}$ ) wurde auf eine Glasscheibe, die auf dem Silberblock liegt, pipettiert und durch eine weitere Glasscheibe abgedeckt. Zwischen die beiden Glasscheiben wurde ein metallischer Ring gelegt, um die Probendicke in allen Versuchen nahezu konstant zu halten. Danach wurde die Vakuumkammer verschlossen (Ibrahim, 2010). Um den Gefriertrocknungsprozess zu simulieren, wurde die Probe mittels flüssigen Stickstoffs zunächst eingefroren. Nach Einstellen des Vakuums wurde die Temperatur des Silberblocks nun erhöht, wodurch das Eis am Rand der Probe zu sublimieren begann. Im weiteren Verlauf wandert diese Sublimationsfront in Richtung Mitte des aufgetragenen Tropfens. Ist der „onset of collapse“ erreicht, macht sich dies in beginnender Rissbildung der bereits getrockneten Strukturen bemerkbar (Meister und Gieseler, 2009).



Abbildung 3.8: Gefriertrocknungsmikroskop ([www.freeze-drying.eu](http://www.freeze-drying.eu))

Die eigentliche Kollapstemperatur ist erreicht, wenn sich die gesamte vormals trockene Struktur auflöst. Eine Kamera nahm ein Bild pro Sekunde auf,

um den Verlauf des Kollapses zu dokumentieren. Um abschätzen zu können, in welchem Temperaturbereich die Probe kollabiert, ist es grundlegend angebracht, vor der jeweiligen FDM-Messung eine kalorimetrische  $T_g'$ -Bestimmung durchzuführen. Tabelle 3.4 zeigt das verwendete Temperatur-Zeit-Programm zur Bestimmung von  $T_c$ .

*Tabelle 3.4: Temperatur-Zeit-Programm der FDM-Methode*

---

1. Kühlen von Raumtemperatur auf 0°C bei 10°C pro Minute
  2. Halten der Temperatur bei 0°C für 3 Minuten
  3. Kühlen von 0°C auf -25°C mit 1°C pro Minute
  4. Halten der Temperatur bei -25°C für 1 Minute
  5. Kühlen von -25°C auf -40°C mit 10°C pro Minute
  6. Halten der Temperatur bei -40°C für 10 Minuten
  7. Aufheizen bei 1°C pro Minute in Richtung Kollaps
- 

### **3.2.2.3 RÖNTGENDIFFRAKTOMETRIE**

Für die vorliegenden Untersuchungen diente ein Stadi P Röntgendiffraktometer (Stoe & Cie GmbH, Darmstadt, Deutschland), welches  $\text{CuK}_{\alpha 1}$ -Strahlung emittiert. Zur Beurteilung, ob die Lyophilisate kristallin, teilkristallin oder amorph vorliegen, dienten Transmissionsmessungen. Dabei wurde die Probe zwischen zwei Mylar®-Folien fixiert und auf einem rotierenden Probenhalter befestigt. Die gebeugte Röntgenstrahlung wurde dann über einen ortsempfindlichen Proportionalzähler detektiert und anschließend in ein charakteristisches Röntgendiffraktogramm umgewandelt. Während kristalline Substanzen charakteristische Beugungsintensitätsmaxima in Form von Peaks zeigen, weisen amorphe Stoffe nur eine diffuse Streuung auf, die als sogenanntes „Halo“ bezeichnet wird (Zhang *et al.*, 2009). Abbildung 3.9 zeigt beispielhaft Röntgendiffraktogramme einer amorphen und einer kristallinen Substanz. Des Weiteren wurden

---

Reflexionsmessungen in Kombination mit einer Feuchtezelle VGI2000M (Surface Measurement Systems Ltd., London, UK) durchgeführt. Dabei wird die Probe in einer Atmosphäre einstellbarer Feuchte und Temperatur gehalten, während die Messung stattfindet. Auf diese Weise lassen sich Veränderungen in der Morphologie der Probe in Abhängigkeit von Feuchtigkeit und Temperatur aufzeigen.

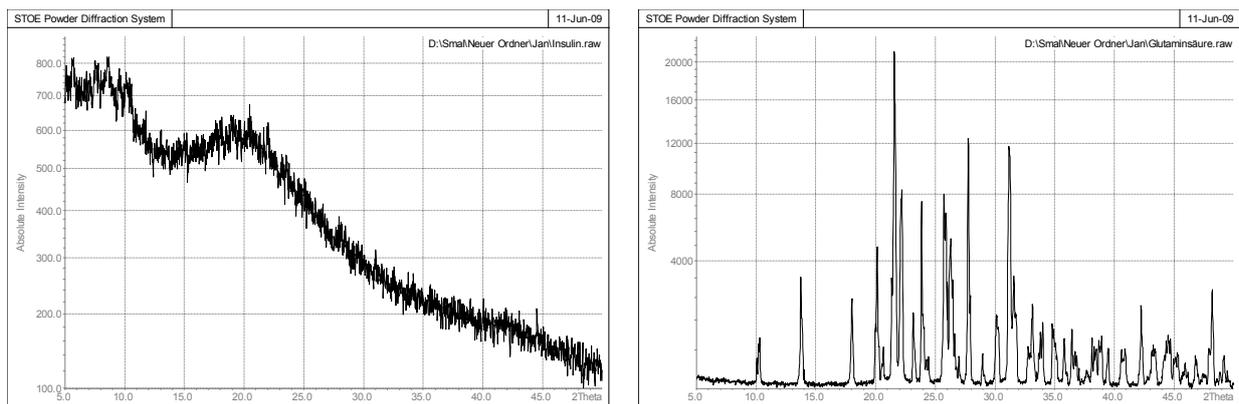


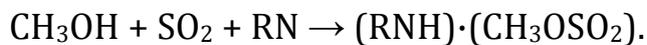
Abbildung 3.9: Röntgendiffraktogramme von Insulin (links, amorph) und L-Glutaminsäure (rechts, kristallin)

#### 3.2.2.4 DYNAMISCHE WASSERDAMPFSORPTION

Das Sorptionsverhalten der Lyophilisate wurde mit einer DVS-1 (Porotec GmbH, Hofheim/Taunus, Deutschland) untersucht. Hierzu wurde zunächst ein Lyophilisat im Ganzen entsprechend ca. 3-6 mg in das Wägeschälchen der Probenkammer überführt. Anschließend wurde die relative Feuchte des Stickstoffstroms in 10%-Schritten von 0% auf 90% angehoben und im Anschluss wieder schrittweise gesenkt. Jeder Feuchtigkeitsschritt wurde bis zur Massekonstanz der Proben, definiert als Masseänderung  $dm/dt < 0,0005\%$  oder bis zu einer maximalen Dauer von 120 Minuten pro Feuchtestufe aufrechterhalten. Dieser Zyklus wurde ein Mal wiederholt, um reversible Änderungen der Sorption von irreversiblen Änderungen unterscheiden zu können. Die Auswertung erfolgte mit der Software DVSWin (Surface Measurement Systems, Version 2.16) sowie Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA).

### 3.2.2.5 KARL FISCHER-TITRATION

Zur Ermittlung der Restfeuchte der gefriergetrockneten Formulierungen wurde das Titrationsverfahren nach Karl Fischer verwendet. Dazu diente eine V20 Compact KF Volumeter (Mettler Toledo GmbH, Giessen, Deutschland). Die Methode ist für die quantitative Bestimmung von Wasser spezifisch. Die Grundlage dieses Messverfahrens, die dieses erst ermöglicht, ist die Reaktion von Schwefeldioxid mit elementarem Iod, die nur in Anwesenheit von Wasser abläuft:



Bei der Titration, bei der als Maßlösung Iod in Methanol eingesetzt wurde, wird das Methylsulfit-Anion in Anwesenheit von Wasser durch das Iod zu Methylsulfat oxidiert. Das gelbbraune Iod wird dabei zum farblosen Iodid reduziert:

Es wurden 3 Messungen pro Charge durchgeführt. Dafür wurde das Lyophilisat jeweils auf einer Analysenwaage Sartorius Analytic A 200 S (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) abgewogen und direkt in das Volumeter überführt. Der Restwassergehalt errechnet sich wie folgt:

$$\text{Restfeuchte (\%)} = \frac{\text{titrierte Masse an H}_2\text{O in mg}}{\text{Einwaage in mg}} * 100 \quad (3.6)$$

### 3.2.2.6 RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE

Die in dieser Arbeit gezeigten rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Zeiss DSM 940 Rasterelektronenmikroskop (Carl Zeiss NTS GmbH, Oberkochen, Deutschland) aufgenommen. Dazu wurde zunächst das jeweilige Probenmaterial auf einen mit leitfähiger Folie beklebten Aluminiumträger aufgebracht. Anschließend wurde das Material mithilfe eines Sputter-Coaters (SCD 005, Bal-Tec AG, Vaduz, Liechtenstein)

bei 50 mA für 65 s unter Argonatmosphäre mit Gold bedampft, um es entsprechend leitfähig zu machen. Die Proben wurden mit Beschleunigungsspannungen von 15-20 kV gerastert und die entstandenen Aufnahmen anschließend mittels der Software Orion 6 (Orion Microscopy, Labuissière, Belgien) digitalisiert.

#### **3.2.2.7 AKTIVITÄTSBESTIMMUNG DES INSULINS**

Die spezifische Aktivität des Insulins vor und nach der Lyophilisation wurde mit dem Architect® CI 8200 Insulin System der Firma Abbott (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) evaluiert. Architect® Insulin ist ein Einzschritt-Immunoassay zum Nachweis von Insulin human in Humanserum oder -plasma und beruht auf der Technik des Chemilumineszenz-Mikropartikelimmunoassays (CMIA) mit flexiblen Assayprotokollen, die als Chemiflex bezeichnet wird (Moriyama *et al.*, 2006). Die Probe, in diesen Untersuchungen Lösungen oder rekonstituierte Lyophilisate, die mit anti-Insulin beschichteten Mikropartikel und das anti-Insulin-akridiniummarkierte Konjugat werden gemischt. Das in der Probe enthaltene Insulin bindet an die mit anti-Insulin beschichteten Mikropartikel und das anti-Insulin-akridiniummarkierte Konjugat. Nach dem Waschen werden eine pre-Trigger-Lösung und eine Triggerlösung hinzugegeben, so dass die Chemilumineszenzreaktion ausgelöst wird. Diese wird in relativen Lichteinheiten (RLE) gemessen. Die Menge an Insulin human ist zu den vom optischen System gemessenen RLE direkt proportional (Klingler, 2009). Da der Messbereich des Immunoassays zwischen 1 und 300  $\mu\text{U}/\text{ml}$  liegt und die untersuchten Lösungen einen Insulingehalt von 1-2 mg entsprechend circa 30-60 U pro ml haben, werden die Proben vorher 1:250000 mit Aqua bidest verdünnt, um im Messbereich zu liegen.

### 3.2.2.8 KASKADENIMPAKTION

Zur Beurteilung der Aerosolisierbarkeit der entwickelten Lyophilisate sowie zur Ermittlung der für die Charakterisierung pharmazeutischer Aerosole wichtigen Parameter Feinpartikeldosis (FPD), Feinpartikelfraktion (FPF), massebezogener medianer aerodynamischer Durchmesser (MMAD) sowie dessen geometrischer Standardabweichung (GSD) wurde der Next Generation Pharmaceutical Impactor (NGI) herangezogen. Zur eigentlichen Messung wird zunächst der zu verwendende Inhalator fest an den Rachen angebracht. Dies geschieht mithilfe eines von der Firma RPC Formatec (RPC Formatec GmbH, Mellrichstadt, Deutschland) zur Verfügung gestellten Adapters (Abbildung 3.10).

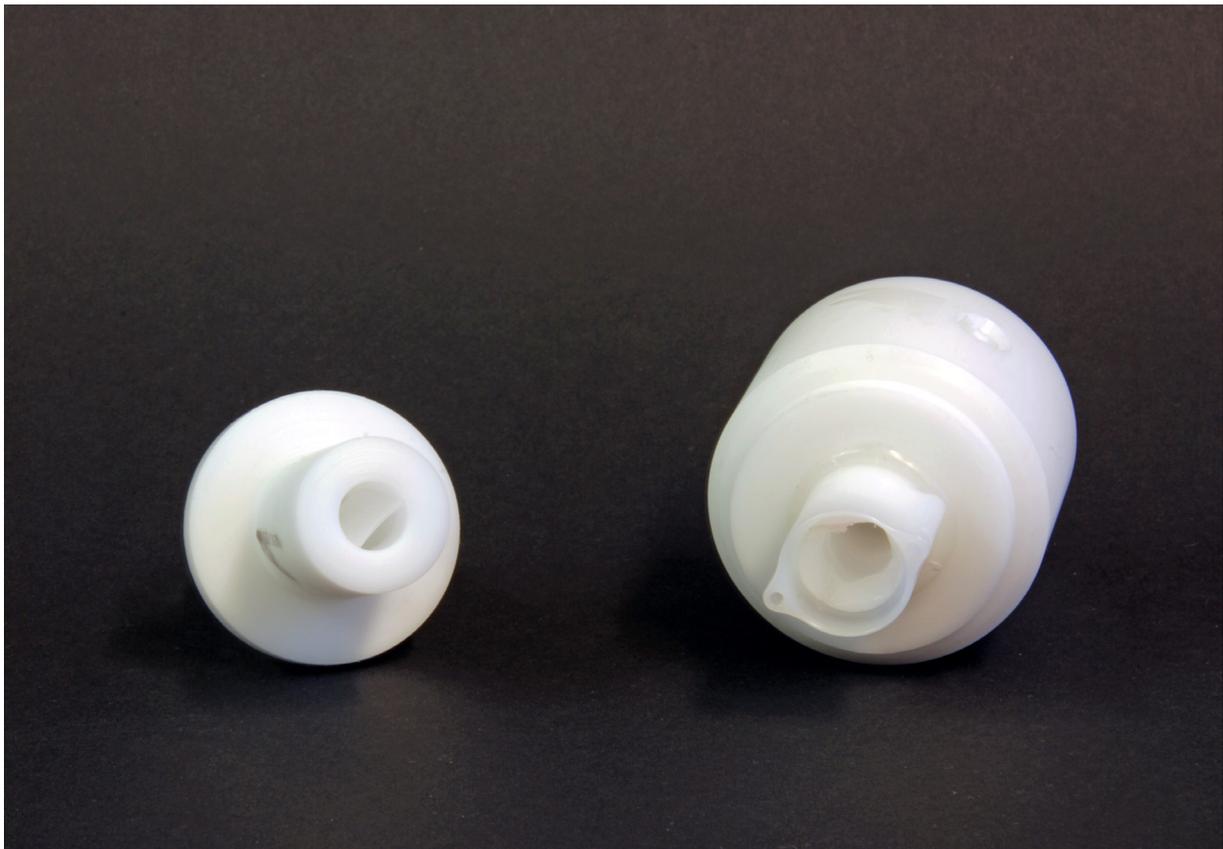


Abbildung 3.10: Adapter zur Verbindung des Inhalators mit dem Rachen des NGIs; links im Bild mit Vibrationsfolien, rechts ohne (RPC Formatec, Mellrichstadt, Deutschland)

Da das Europäische Arzneibuch die Messung zur aerodynamischen Beurteilung feiner Teilchen bei einem Druckabfall von 4 kPa über dem Inhalator

verlangt (Ph. Eur., 2008a), muss zunächst die Messflussrate ermittelt werden. Dies erfolgte unter Verwendung der in Abbildung 3.11 und Abbildung 3.12 gezeigten Apparaturen:

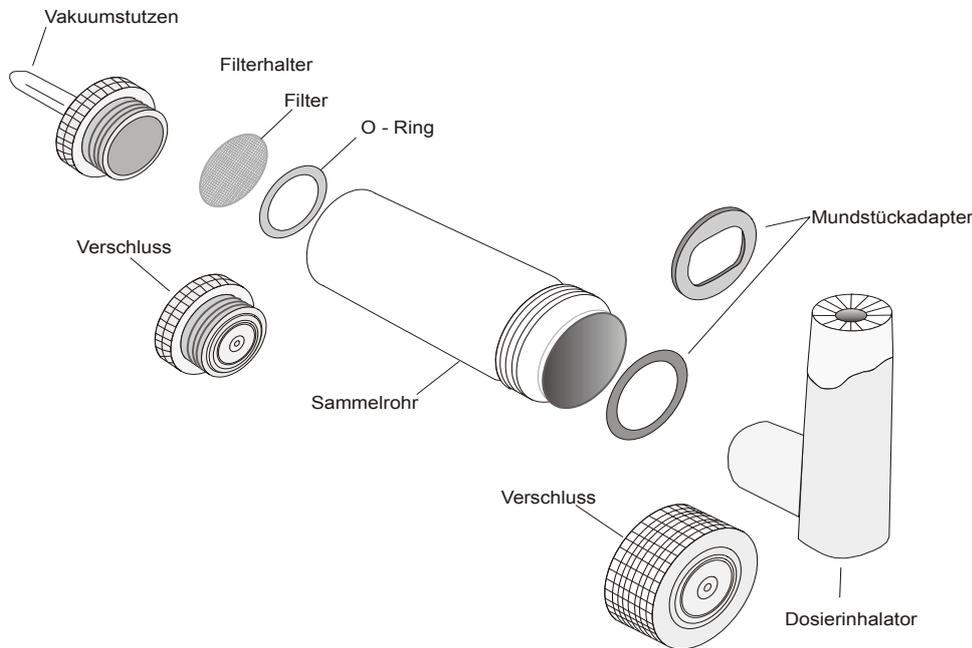


Abbildung 3.11: *Gerät zur Bestimmung der Gleichförmigkeit der abgegebenen Dosis nach Ph. Eur.*

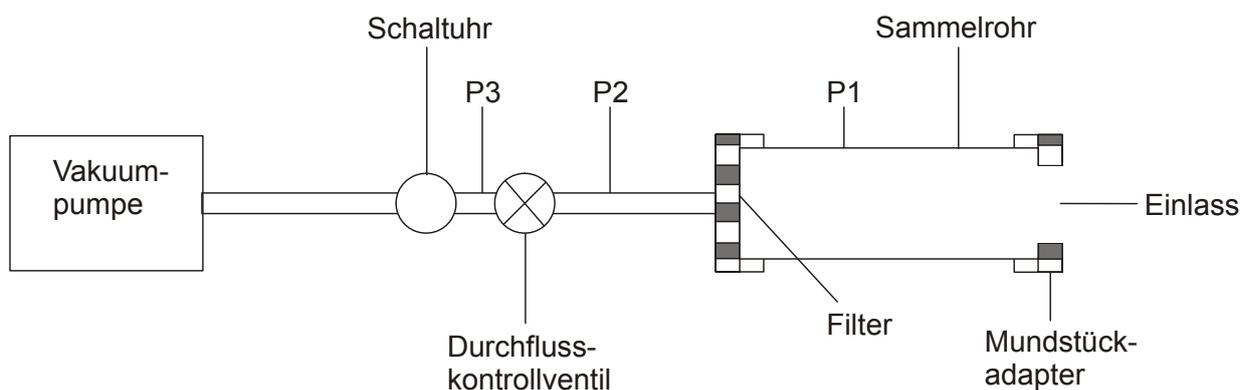


Abbildung 3.12: *Apparatur zur Bestimmung der Gleichförmigkeit der abgegebenen Dosis nach Ph. Eur. in schematischer Form*

Dazu wird der Inhalator mit dem Adapter luftdicht an das Sammelrohr angebracht und die Flussrate an der Vakuumpumpe (HCP5, Copley Scientific Ltd., Nottingham, UK) derart justiert, dass der Druck am Ventil P1 (siehe Abbildung 3.12) 4 kPa beträgt (Mitchell und Nagel, 2003). Zur Messung des

Druckes diente dabei eine Copley TPK-Box (Critical Flow Controller, Modell TPK, Copley Scientific Ltd., Nottingham, UK). Anschließend wird die tatsächliche Flussrate mithilfe eines Flow Meters (Flow Meter DFM2, Copley Scientific Ltd., Nottingham, UK) ermittelt, die dann die Messflussrate zur Bestimmung der Aerosolisierbarkeit der Lyophilisate darstellt. Die Dauer des Luftdurchflusses muss während der Messung so eingestellt werden, dass pro Messung 4 Liter Luft durch den Inhalator gezogen werden. Dies entspricht dem mittleren Einatemvolumen eines erwachsenen Mannes bei forcierter Inhalation (Westmeier, 2008). Kurz vor der Messung wurden die einzelnen Abscheideschalen mit „stage coating“, einem Gemisch aus 15% Brij 35, 34% Glycerol und 51% Ethanol, überzogen, um zu verhindern, dass die impaktierten Partikel wieder abprallen und das Messergebnis so verfälschen. Nach Auslösen des Luftstromes und der Aerosolisierung der Lyophilisate wurden die jeweiligen impaktierten Aerosolpartikel mit 0,001 M Salzsäure aufgenommen und zur Quantifizierung an der HPLC vermessen. Die Ergebnisse der HPLC-Analyse wurden anschließend in die Auswertungssoftware CITDAS (Copley Scientific Ltd., Nottingham, UK, Version 3.00) transferiert und daraus die charakteristischen Parameter FPF, FPD, MMAD, Rachendeposition sowie der Insulinerückstand im Vial und im Inhalator errechnet. Die FPD ist definiert als die Masse an Partikeln in  $\mu\text{g}$  mit einem aerodynamischen Durchmesser kleiner als  $5 \mu\text{m}$  in Abhängigkeit von der angelegten Flussrate. Die absolute FPF ist ein entscheidendes Kriterium hinsichtlich der Wirtschaftlichkeit des Arzneimittels. Ist sie hoch, kann der Wirkstoffgehalt in der Formulierung entsprechend reduziert werden, was gerade bei teuren Wirkstoffen wie Proteinen sinnvoll ist. Sie ergibt sich aus

$$FPF_{\text{absolut}} < 5 \mu\text{m} = \frac{FPD < 5 \mu\text{m} * 100\%}{M_g} \quad (3.7)$$

$M_g$  ist definiert als die Summe der Insulinmassen aller Abscheideschalen, des Rachens, des Vials und des Inhalators.

Um die Dispergierung der entwickelten Lyophilisate trotz teils stark schwankender Inhalator- und Vialrückstände vergleichen zu können, wird analog zu Klingler (2009) die relative FPF  $< 5 \mu\text{m}$  als Parameter eingeführt, die die Rückstände in Inhalator und Vial nicht berücksichtigt. Sie gibt Hinweise auf die Sicherheit des Arzneimittels. Hohe relative Feinpartikelfractionen bedingen eine niedrige unerwünschte Deposition im Mund- und Rachenraum, von wo aus die Aerosolpartikel durch den Schluckvorgang in den Gastrointestinaltrakt gelangen und dort Nebenwirkungen verursachen können. Die relative FPF berechnet sich wie folgt:

$$FPF_{\text{relativ } < 5 \mu\text{m}} = \frac{FPD < 5 \mu\text{m} * 100\%}{M_{\text{NGI}}} \quad (3.8)$$

$M_{\text{NGI}}$  ist definiert als die Summe der in den NGI abgegebenen Insulinmassen, also die der Abscheideschalen, des Vorabscheiders (falls verwendet) und des Rachens.

#### **3.2.2.9 QUANTITATIVE WIRKSTOFFBESTIMMUNG PER HPLC**

Zur quantitativen Bestimmung der im NGI impaktierten Insulinmassen, zur Gehaltsbestimmung des Insulins in den Lyophilisaten sowie zur Ermittlung der Gleichförmigkeit der abgegebenen Dosis (Ph. Eur., 2008c) der entwickelten Inhalatoren in Kombination mit den produzierten Lyophilisaten wurde eine HPLC-Anlage der Firma Hewlett-Packard verwendet, bestehend aus folgenden Komponenten (Tabelle 3.5):

Tabelle 3.5: Komponenten der HPLC-Anlage HP Series 1100

<b>Komponente</b>	<b>Modell</b>
Binäre Pumpe	BinPump G1312A
Entgaser	Degasser G1322A
Autosampler	ALS G1329A
Probenkühler	ALS Therm G1330A
Säulenofen	Colcom G1316A
Diodenarraydetektor	DAD G1315A

Der Säulenofen wurde bei allen Messungen auf 25°C temperiert, die Proben, die sich in der Warteschleife befanden, wurden auf 8°C gekühlt, um eventuelle Degradationsreaktionen des Insulins zu verlangsamen (Brange *et al.*, 1992). Die verwendete mobile Phase bestand zu 28% aus Acetonitril und zu 72% aus Puffer. Beide Komponenten wurden von der binären Pumpe gemischt, so dass Ungenauigkeiten beim manuellen Mischen umgangen werden konnten. Tabelle 3.6 zeigt die detaillierte Zusammensetzung der mobilen Phase.

Tabelle 3.6: Mobile Phase

<b>Komponente</b>	<b>Bestandteile</b>
Puffer	0,01 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,1 M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pH-Wert mit o-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> auf 3,00 eingestellt
Organische Phase	Acetonitril HPLC grade

Die Komponenten wurden vor jeder Analyse 30 Minuten im Ultraschallbad entgast. Die Flussrate betrug 1 ml/min., das Einspritzvolumen 50 µl. Als stationäre Phase diente eine HyPurity Advance-Säule (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 150 x 4,6 mm, Partikelgröße 3 µm. Die Kalibrierung erfolgte mittels externen Standards. Dazu wurde das gleiche Insulin,

welches auch zur Produktion der Lyophilisate diente, verwendet. Es wurde Linearität im Bereich von 0,5-100 µg/ml nachgewiesen bei einem Determinationskoeffizienten von 0,997-1.

#### **3.2.2.10 KLIMA-PRÜFKAMMER**

Die Dispergierbarkeit der entwickelten Lyophilisate wurde unter konstanten klimatischen Bedingungen durchgeführt, da insbesondere Trockenpulveraerosole teils empfindlich auf Feuchtigkeit reagieren und so jahreszeitbedingte Schwankungen in der natürlichen Umgebungsfeuchte die Messwerte verfälschen könnten. Es wurde bei 21°C und 35% relativer Feuchte gearbeitet, wobei Schwankungen in der Temperatur von  $\pm 1^\circ\text{C}$ , in der Feuchtigkeit von  $\pm 3\%$  zulässig waren. Die Messungen wurden in einer Klimaprüfkammer (Imtech Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) durchgeführt.

#### **3.2.3 STATISTISCHE METHODEN**

Zur Planung, Umsetzung und Auswertung statistischer Versuchspläne wurde die Software Design-Expert® 8 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, USA) verwendet. Die statistische Versuchsplanung ist aus mehreren Gründen sinnvoll. Zum einen kann durch Reduzierung der Versuchsanzahl Material und damit Kosten eingespart werden, zum anderen werden mehr Informationen über die Zusammenhänge der getesteten Faktoren erhalten, als wenn jeder Faktor einzeln untersucht werden würde. Außerdem lassen sich durch geschickte Versuchsplanung Projektlaufzeiten um 40-75% verkürzen (Kleppmann, 2009). Zur Untersuchung von Prozessparametern der Gefrier-trocknung, Parametern zur Formulierungsentwicklung und die Entwicklung der Inhalatoren wurden jeweils vollfaktorielle Versuchspläne (detaillierte Erläuterung in den Kapiteln 5.1.1, 6.4.1 und 7.4.1) erstellt.

## 4 FORMULIERUNGSENTWICKLUNG

### 4.1 HILFSSTOFFE IN DER GEFRIERTROCKNUNG UND DEREN FUNKTION

Obwohl einige Arzneistoffe problemlos ohne Adjuvantien lyophilisiert werden können wie beispielsweise Vancomycin, Cephalosporine und andere hochdosierte Antibiotika (Meister, 2008), benötigen die meisten Formulierungen zusätzliche Hilfsstoffe, um stabile, feste Kuchen zu bilden. Die zur Lyophilisation verwendeten Hilfsstoffe lassen sich grob in fünf Kategorien einteilen: Gerüstbildner, Stabilisatoren (Kryo- und Lyoprotektoren), Puffersalze und Tenside (Schwegman *et al.*, 2005).

**Gerüstbildner:** Um dem Produkt eine elegante und feste Struktur zu verleihen, werden Gerüstbildner eingesetzt. Diese kristallisieren während der Trocknung aus, haben also nur begrenzte Stabilisierungsfähigkeiten (vergleiche Kapitel 2.1.3). Prominente Vertreter sind Mannitol und Glycin (Varshney *et al.*, 2007). Insbesondere Formulierungen, die einen geringen Feststoffanteil besitzen (unter 1%), können während der Primärtrocknung durch den Wasserdampfstrom aus dem Produkt und durch das angelegte Vakuum aus dem Vial herausgetragen werden, so dass in diesen Fällen ein Einsatz von Gerüstbildnern sinnvoll ist (Jennings, 1999).

**Stabilisatoren:** Die Verwendung von Kryo- und Lyoprotektoren ist für nahezu jedes Protein essentiell. Kryoprotektoren schützen das Protein während des Einfrierens. Das Stabilisierungsprinzip ist der bevorzugte Ausschluss (preferential exclusion) der Hilfsstoffmoleküle von der Proteinoberfläche, wodurch das Protein selbst stärker hydratisiert wird (vergleiche Kapitel 2.1.3). Lyoprotektoren entfalten ihre Wirkung während der Trocknung. Als Hintergrund sind hier zwei verschiedene Theorien zu nen-

nen: zum einen die „water replacement theory“, wonach der Hilfsstoff die Rolle des Wassers übernimmt und ein Netzwerk aus Wasserstoffbrücken mit dem Protein aufbaut, was letztlich zur Erhaltung der räumlichen Gestalt führt; zum anderen die „vitrification theory“, wonach die Stabilisierung dadurch zustande kommt, dass sich die glasartig erstarrenden (amorphen) Hilfsstoffmoleküle um die ebenfalls amorph vorliegenden Proteinmoleküle legen. Bedingt durch die hohe Viskosität der amorphen Strukturen sind Degradationsreaktionen stark verlangsamt. Zum Einsatz sowohl als Kryo-, als auch als Lyoprotektoren kommen Polyole wie beispielsweise Zucker und Zuckeralkohole (darunter häufig Disaccharide wie Saccharose und Trehalose), aber auch Aminosäuren (L-Lysin, L-Leucin), Polymere (Dextrane, Polyvinylpyrrolidon, Gelatine) kommen zur Anwendung. Dabei muss für jedes Protein die optimale Hilfsstoffkomposition und -konzentration ermittelt werden. Die Angaben zum Verhältnis zwischen Stabilisator und Protein schwanken in der Literatur, sie reichen von 1:1 (Gieseler, 2008) bis 1:360 (Cleland *et al.*, 2001).

**Puffersubstanzen:** Zur Einstellung des für das Protein optimalen pH-Wertes werden Puffer eingesetzt. Ihre Verwendung ist nicht unproblematisch, da das Ausfallen eines Puffersalzes beim Einfrierprozess zu einer starken Verschiebung des pH-Wertes führen kann (Eriksson *et al.*, 2003). Am häufigsten wird Phosphatpuffer eingesetzt, aber auch Citrat- oder Acetatpuffer werden verwendet. Des Weiteren haben die meisten gebräuchlichen Puffersalze eine sehr niedrige  $T_g'$  (Natriumacetat beispielsweise  $-64^\circ\text{C}$ , (Chang und Randall, 1992)), was sich negativ auf die Trocknungsdauer auswirkt, da bei tieferen Temperaturen getrocknet werden muss. Daher sollten sie, wenn überhaupt nötig, so gering konzentriert wie möglich angewandt werden.

**Tenside:** Oberflächenaktive Substanzen spielen eine wichtige Rolle in der Gefriertrocknung. Ein Zusatz nichtionischer Tenside kann nachweislich die Adsorption der Proteine an Oberflächen (Gonzalez und MacRitchie, 1970), aber auch an der Eis-Wasser-Grenzfläche und an der Wasser-Luft-Grenzfläche reduzieren. Weiterhin vermögen sie Denaturierung und Aggregation zu vermindern (Wang *et al.*, 2008). Tabelle 4.1 gibt einen zusammenfassenden Überblick über die verschiedenen Stoffklassen und nennt bedeutende Beispiele.

*Tabelle 4.1: Gebräuchliche Hilfsstoffklassen und Beispiele (Parkins und Lashmar, 2000)*

<b>Kategorie</b>	<b>Beispiele</b>
Aminosäuren (L-Form)	Glycin, Arginin, Alanin, Glutaminsäure, Leucin, Lysin
Antioxidantien	Ascorbinsäure, Glutathion
Chelatbildner	EDTA, Tris, Inositolhexaphosphat
Polymere	PVP, PEG, Dextrane
Polyole	Cyclodextrine, Mannitol, myo-Inositol, Xylitol
Salze	Natriumsulfat, Natriumlactat, Kaliumphosphat
Tenside	Poloxamere, Polysorbate, Natriumlaurylsulfat
Zucker	Saccharose, Maltose, Fructose, Trehalose

## 4.2 ANFORDERUNGEN AN DIE FORMULIERUNG

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Lyophilisate mit Insulin als Modellprotein zur pulmonalen Applikation hergestellt werden (vergleiche hierzu Kapitel 1.2, Zielsetzung). Jedes Lyophilisat als Einzeldosisarzneiform sollte 1 mg Insulin human entsprechend 30 Internationalen Einheiten (I.E.) enthalten. 30 I.E. pulmonal appliziertem Insulin human entsprechen 3 I.E. subkutan appliziertem Insulin (Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Ge-

sundheitswesen, 2006). Es galten folgende Anforderungen und Limitierungen:

**Mechanische Stabilität:** Um eine erfolgreiche Lyophilisation ohne Produktkollaps und damit dem Verlust der porösen Struktur zu gewährleisten, durfte die Produkttemperatur während der Trocknung  $T_g'$  und vor allem  $T_c$  nicht überschreiten. Da die verwendeten Gefriertrockner jedoch nicht ermöglichten, das Produkt trotz Einfrierens über Nacht reproduzierbar tiefer als  $-28^\circ\text{C}$  zu kühlen, wurde die minimal tolerierbare  $T_g'$  auf  $-27^\circ\text{C}$  oder höher festgelegt, wobei mehrere Grad Celsius „Sicherheitsabstand“ von Vorteil wären. Dies hatte großen Einfluss auf die Auswahl der Hilfsstoffe, da die  $T_g$ 's vieler potentiell geeigneter Hilfsstoffe zu tief lagen. Die  $T_g'$  und die Kollapstemperatur ( $T_c$ ) der Formulierungen wurden mittels DSC bzw. mittels „freeze-dry microscopy“ (FDM) evaluiert.

**(Protein)-Stabilität der Formulierungen:** Die Formulierung sollte das Modellprotein vor jeglicher Art physikalischer und chemischer Denaturierung schützen, sowohl während der Gefriertrocknung, als auch bei Lagerung. Dazu sollten glasartig erstarrende Hilfsstoffe verwendet werden, die nach der Lyophilisation amorph oder teilkristallin mit großem amorphem Anteil vorliegen. Die Proteinaktivität wurde mithilfe eines Chemilumineszenz-Mikropartikelimmunoassays am Städtischen Krankenhaus Kiel bestimmt.

**Verträglichkeit der Hilfsstoffe:** Die Auswahl der verwendeten Hilfsstoffe erfolgte nach Verträglichkeit. Es wurden nur körpereigene Substanzen verwandt. Die Ausnahme ist Polysorbat 80, das aber, wie bereits in Kapitel 3.1.3 erwähnt, von der FDA als unbedenklich eingestuft wurde (US Food and Drug Administration, 2010) und daher dessen Verwendung nichts im Wege stand.

**Aussehen des Produktes:** Nicht zuletzt ist auch das visuelle Erscheinungsbild des Lyophilisates ein Kriterium in der Formulierungsentwicklung. Auch wenn die Wirksamkeit eines Produktes nicht unbedingt mit seinem Aussehen korreliert, so ist spätestens bei der Vermarktung das Aussehen ein wichtiger Aspekt.

**Aerosolisierbarkeit der Lyophilisate:** Ziel war, das Lyophilisat derart zu aerosolisieren, so dass eine möglichst hohe Feinpartikelfraktion mit möglichst geringem Vial- und Inhalatorrückstand daraus resultiert. Mögliche Einflussfaktoren auf die Aerosolisierbarkeit, die untersucht werden sollten, waren Feuchteempfindlichkeit, Lagerung unter Stressbedingungen und der Feststoffanteil in der Lösung. Alle Untersuchungen der Aerosolisierbarkeit erfolgten unter Verwendung des NGIs unter konstanten klimatischen Bedingungen von 21°C und 35% relativer Feuchte.

### 4.3 EVALUIERUNG DER AUSGANGSSTOFFE

Zunächst wurde ein Screening nach potentiell geeigneten Hilfsstoffen für die zu aerosolisierenden Lyophilisatzubereitungen durchgeführt. Durch Literaturrecherche wurden allgemein gebräuchliche Substanzen identifiziert und anschließend erste Voruntersuchungen durchgeführt. Yamashita *et al.* (2003) beschreiben in ihrem Patent „dry powder inhalation system for transpulmonary administration“ die Verwendung von Aminosäuren als optimal hinsichtlich der Dispergierbarkeit der Lyophilisate. Gerade hydrophobe Aminosäuren wie Leucin, Valin und Phenylalanin seien besonders geeignet. Es wurden daher neben Zuckern, Zuckeralkoholen und Polymeren vor allem Aminosäuren getestet.

Die Eignungsprüfung umfasste folgende Untersuchungen (Tabelle 4.2):

*Tabelle 4.2: Durchgeführte Untersuchungen im Rahmen der Eignungsprüfung*

---

Visuelle Analyse der Lyophilisate – ist das Produkt stabil oder kollabiert

Ermittlung der kritischen Formulierungsparameter Glasübergangstemperaturen der maximal gefrierkonzentrierten Hilfsstofflösungen und Kollaps-temperaturen der Formulierungen, ermittelt per DSC und FDM

Ermittlung der Morphologie der Lyophilisate (kristallin oder amorph), getestet mit XRPD

Bestimmung der biologischen Restaktivität des Insulins per Immunoassay

Bestimmung des Sorptionsverhaltens der Lyophilisate per DVS

---

Tabelle 4.3 führt die untersuchten Substanzen auf und nennt Argumente, die gegen die Verwendung als Hilfsstoff sprachen.

Tabelle 4.3: Getestete Substanzen im Rahmen des Screenings

<b>Substanz</b>	<b>Funktion</b>	<b>Ausschlusskriterium</b>
L-Histidin	Puffer, Stabilisator	zu hohe Konzentration nötig, resultierender Kuchen zu fest
Dextrane (1,5 bis 60 kDa)	Erhöhen der $T_g'$	Verfärbung der Lyophilisate bei Lagerung
Trehalose	Stabilisator	Lyophilisate zu klebrig, sehr hohe Wasseraufnahme
Saccharose	Stabilisator	Lyophilisate zu klebrig, sehr hohe Wasseraufnahme (DVS)
Meso-Erythritol	Stabilisator	Lyophilisate zu klebrig, sehr hohe Wasseraufnahme (DVS)
Glycin	Gerüstbildner	zu tiefe $T_g'$
L-Leucin	(relativ) hydrophober Stabilisator	–
L-Glutaminsäure	Stabilisator, Gerüstbildner	–
myo-Inositol	Stabilisator	(Rekristallisation bei Lagerung)
Polysorbat 80	Tensid	–

Am Ende der Evaluation wurden L-Glutaminsäure, myo-Inositol, L-Leucin und Polysorbat 80 ausgewählt, die im Folgenden zunächst charakterisiert werden sollen. Dazu wurden zunächst reine Hilfsstofflösungen hergestellt (analog zum Produktionsschema Kapitel Tabelle 3.1) und lyophilisiert. Die resultierenden Lösungen und Lyophilisate wurden weiteren Untersuchungen unterzogen.

### 4.3.1 INSULIN HUMAN

In jedem Lyophilisat sollte analog zu dem von Pfizer entwickelten inhalativen Insulin Exubera® (Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Ge-

sundheitswesen, 2006) 1 mg Insulin human enthalten sein. Dies bildete die Basis der zu entwickelnden Formulierung. Zunächst musste das Insulin gelöst werden. Das Europäische Arzneibuch schlägt verdünnte Mineralsäuren vor, da Insulin in moderat saurem Milieu besser löslich ist (Ph. Eur., 2008b). Im Rahmen dieser Arbeit wurden L-Glutaminsäurelösungen verschiedener Konzentrationen zum Lösen des Insulins verwendet. Es waren zwei Milligramm pro Milliliter notwendig, um ein Milligramm Insulin pro Milliliter zu lösen.

Da, wie bereits erwähnt, die  $T_g'$  außerordentlich ausschlaggebend für eine Trocknung ohne Produktkollaps ist, wurde zunächst  $T_g'$  einer reinen Insulinlösung in 0,001 M HCl ermittelt – sie lag bei  $-24^\circ\text{C}$  (Abbildung 4.1). Die Produktion reiner Insulinlyophilisate wäre also ohne weiteres mit den vorhandenen Gefriertrocknern möglich.

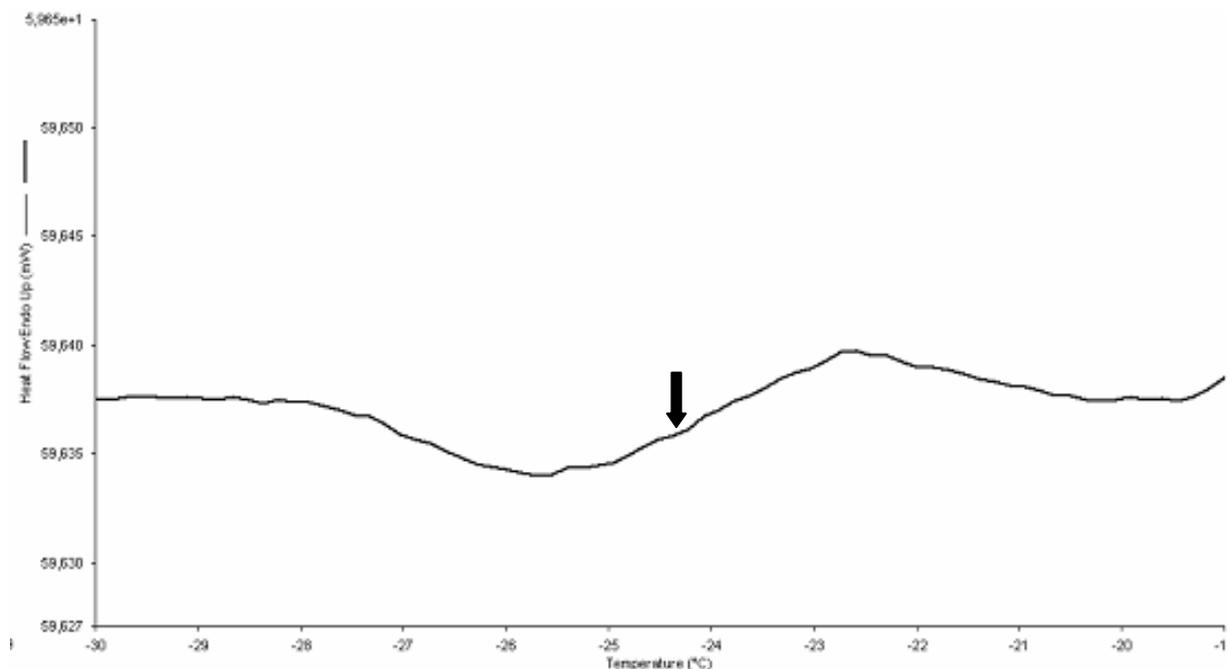


Abbildung 4.1: Kalorigramm einer Insulinlösung in 0,001 M HCl mit Glasübergang bei  $-24^\circ\text{C}$

Röntgendiffraktometrische Untersuchungen zeigten sowohl im Ausgangsprodukt, als auch in lyophilisierter Form vollständige Amorphie des Insulins (Abbildung 4.2).

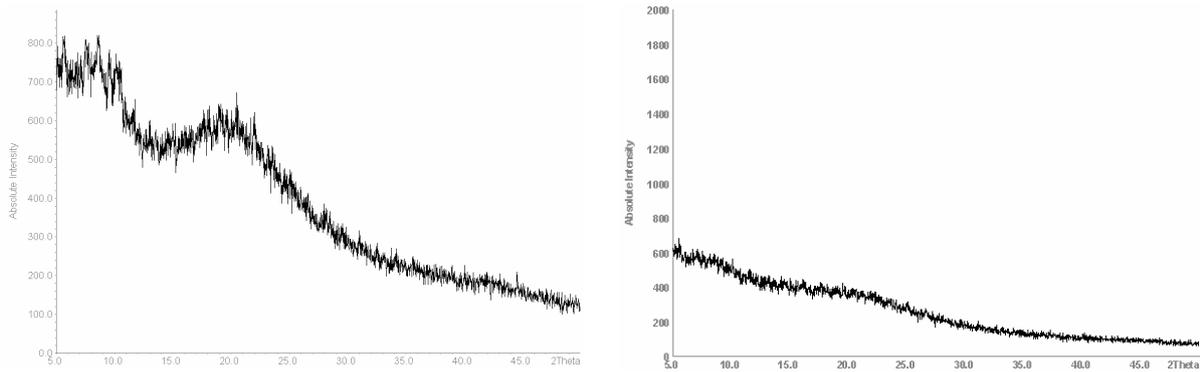


Abbildung 4.2: Röntgendiffraktogramm der Ausgangsware (links) und des Lyophilisates (rechts)

Dies war zu erwarten, da zum einen der Einfrierprozess zu schnell ablief, um eine Kristallisation des Insulins zu ermöglichen und zum anderen eine Kristallisation aufgrund der Molekülgröße und -form nicht bevorzugt war (Craig *et al.*, 1999). Die DVS-Analyse des reinen Insulinlyophilisates (Abbildung 4.3) zeigte eine deutliche Wasserdampfsorption sowohl im ersten, als auch im zweiten Zyklus (14,09 vs 13,45%). Es wurde mehr Wasser desorbiert, als vorher adsorbiert wurde. Die Bestimmung des Wassergehaltes nach Karl Fischer ergab für diese Charge einen Gehalt von 11,54%. Daher ist es wahrscheinlich, dass der Trocknungsschritt vor dem ersten Zyklus (120 Minuten) nicht ausreichte, um die Probe vollständig zu trocknen, so dass aufgrund des Trocknungsschrittes zwischen den beiden Zyklen das an amorphe Strukturen gebundene Wasser dann erst desorbierte. Diese These wird durch die Tatsache, dass sich Sorption und Desorption im zweiten Zyklus die Waage hielten, bekräftigt.

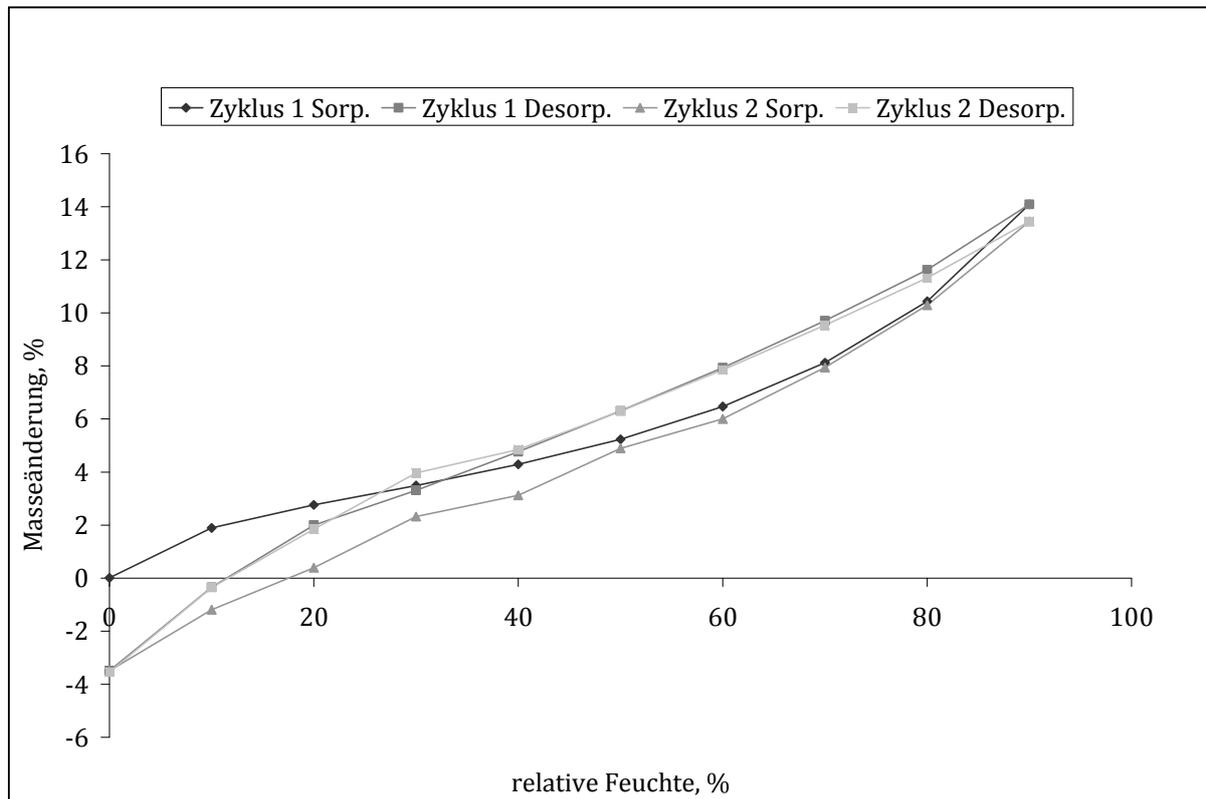


Abbildung 4.3: Sorptionsisothermen des Insulinlyophilisates

### 4.3.2 L-GLUTAMINSÄURE

L-Glutaminsäure hat in den entwickelten Formulierungen drei Funktionen. Sie ist Lösungsvermittler für das Insulin, hat proteinstabilisierende Funktion und bildet das Gerüst des Lyophilisates. Die Verwendung von L-Glutaminsäure als Hilfsstoff in der Gefriertrocknung ist nicht unbedingt weit verbreitet, beruht jedoch auf guten Argumenten. L-Glutaminsäure ist ubiquitär im menschlichen Organismus vorhanden. Kryoprotektive Eigenschaften wurden bisher zwar kaum publiziert, es ist jedoch anzunehmen, dass L-Glutaminsäure analog zu den meisten Aminosäuren und kleinen organischen Molekülen der „preferential exclusion“ unterliegt und so zur Stabilisierung in Lösung und während des Einfrierens beiträgt. Quinn und Andrade zeigten, dass eine L-Glutaminsäurelösung (0,00005 bis 0,05 M) bei einem pH-Wert von 3,5 signifikant die Aggregation von Insulin verhindern konnte (1983). Sie bietet fünf Wasserstoffbrückenakzeptoren und drei

Donoren pro Molekül (Drug Bank, 2010). Demnach ist sie befähigt, ein Protein nach dem Prinzip der „water replacement theory“ durch Wasserstoffbrückenbindungen zu schützen, was die Verwendung als Lyoprotektor ermöglicht. Bestätigt wird diese Annahme durch röntgendiffraktometrische Untersuchungen eines reinen Glutaminsäurelyophilisates. Abbildung 4.4 links zeigt die kristalline Ausgangsware, rechts zeigt partiell kristalline Strukturen nach Lyophilisation. Somit erfüllt L-Glutaminsäure die Anforderungen an einen Stabilisator.

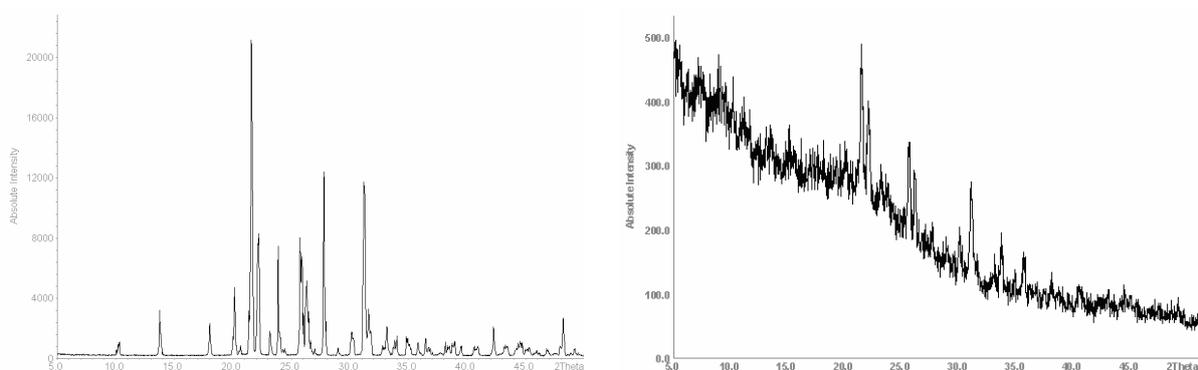


Abbildung 4.4: Röntgendiffraktogramme der Ausgangsware (links) und des Lyophilisates (rechts)

Chang und Randall (1992) beschreiben L-Glutaminsäure als partiell kristallisierende Substanz bei der Gefriertrocknung, die bei Überschreiten der  $T_g'$  rekristallisiert. Abbildung 4.5 zeigt die relevanten kritischen Temperaturen der L-Glutaminsäure, ermittelt per DSC (beschrieben in Kapitel 3.2.2.1). Die Substanz zeigt zwei Glasübergänge bei  $-31,5^\circ\text{C}$  und  $-17^\circ\text{C}$ . Weiterhin ist die beschriebene Rekristallisation (Chang und Randall, 1992) bei einer Devitrisierungstemperatur ( $T_{\text{dev}}$ ) von  $-8,5^\circ\text{C}$  bestätigt worden. Eine vollständige Rekristallisation ist in diesem Fall nicht gewünscht, da so die stabilisierende Wirkung der L-Glutaminsäure verloren ginge. Eine partielle Rekristallisation hingegen ist von Vorteil, da der kristalline Anteil als Gerüst fungiert und die Grundstruktur des Lyophilisates bilden kann. Ein weiterer Vorteil ist die äußerst geringe Wasseraufnahme in Sorptionsuntersuchungen.

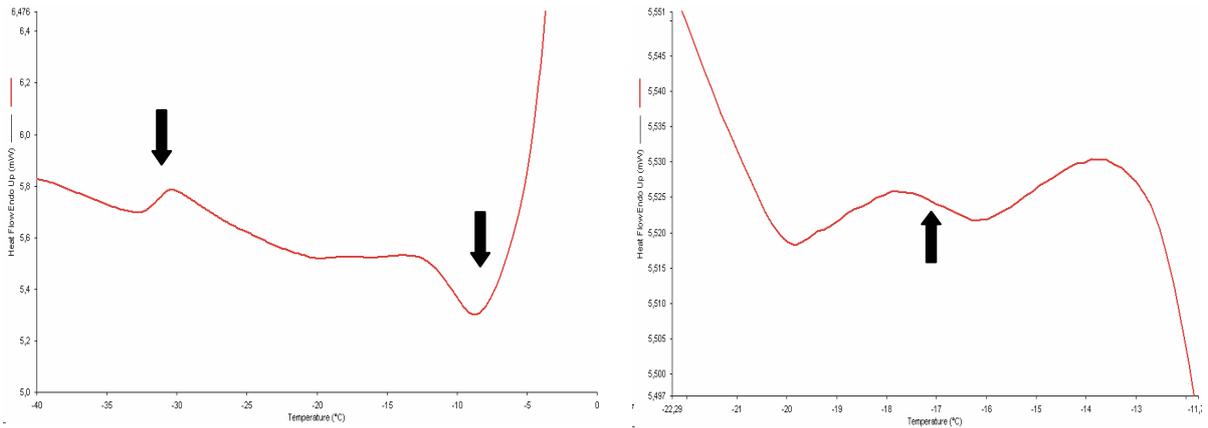


Abbildung 4.5: Kalorigramme einer Glutaminsäurelösung mit  $T_g''$  bei  $-31,5^{\circ}\text{C}$  und  $T_{dev}$  bei  $-8,5^{\circ}\text{C}$  (links) und  $T_g'$  bei  $-17^{\circ}\text{C}$  (rechts)

Abbildung 4.6 zeigt die Sorptionsisothermen, die mittels DVS ermittelt wurden.

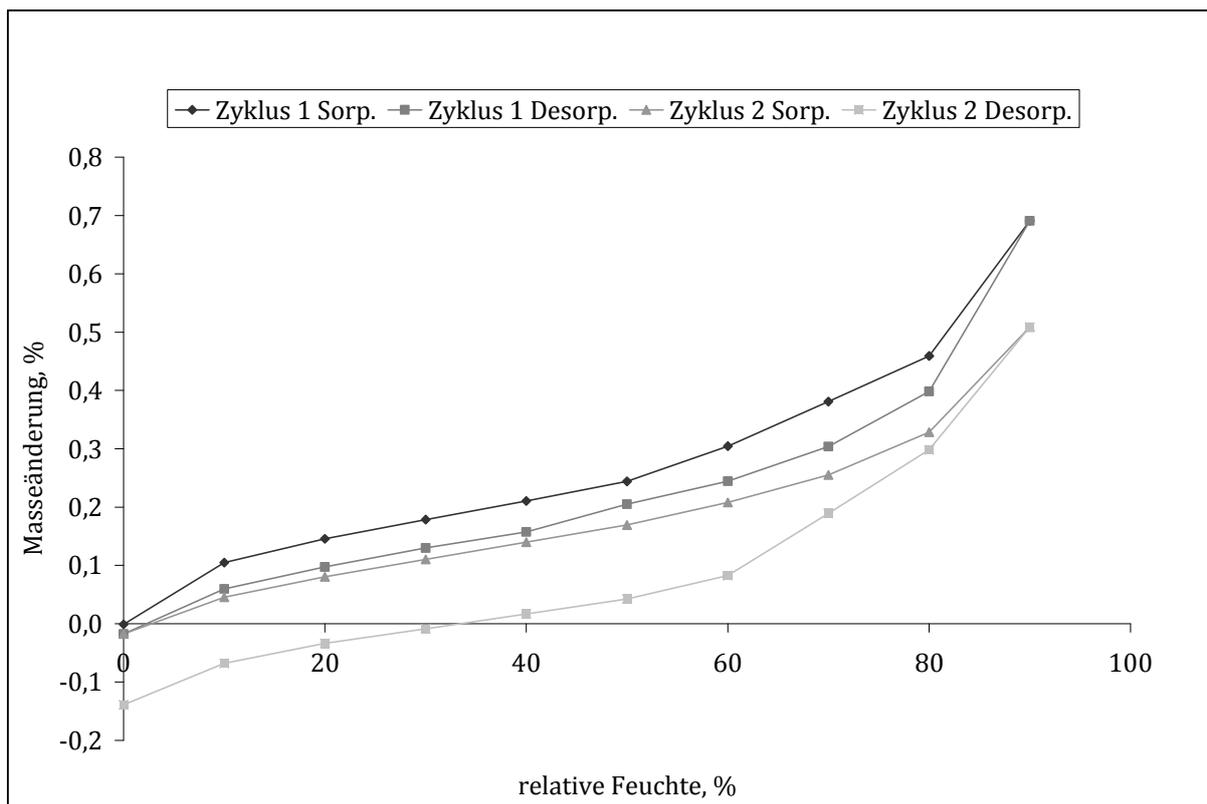


Abbildung 4.6: Sorptionsisothermen des L-Glu Lyophilisates

Das Lyophilisat nimmt im ersten Zyklus 0,69% Wasser auf, welches anschließend vollständig desorbiert wird. Im zweiten Zyklus erfolgt eine verringerte Sorption von 0,51% Wasser. Auffällig ist die Abnahme der

Masse unter die Einwaagemarke im darauf folgenden Desorptionsschritt. Möglicherweise ist an amorphe Strukturen gebundenes Wasser desorbiert worden, oder ein Teil der amorphen Struktur ist unter Wasserabgabe rekristallisiert.

### 4.3.3 MYO-INOSITOL

Myo-Inositol ist die einzige polyolische Verbindung, die neben den Aminosäuren als Stabilisator für aerosolisierbare Formulierungen im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurde. Es ist im Hinblick auf die Aerosolisierbarkeit anderen Polyolen überlegen, da es im Gegensatz zu untersuchten Zuckeralkoholen wie beispielsweise Isomalt (25% Wasseraufnahme in lyophilisierter Form) nur wenig Wasser aufnimmt. Die  $T_g'$  liegt mit  $-35^\circ\text{C}$  (Abbildung 4.7) unterhalb der erreichbaren Temperatur der zur Verfügung stehenden Gefriertrockner. Da sich aber die Glasübergangstemperaturen der einzelnen Bestandteile in einer Formulierung zu einer Gesamt- $T_g'$  ergeben, fällt dieser „Ausreißer“ bei entsprechend geringer Dosierung nicht ins Gewicht.

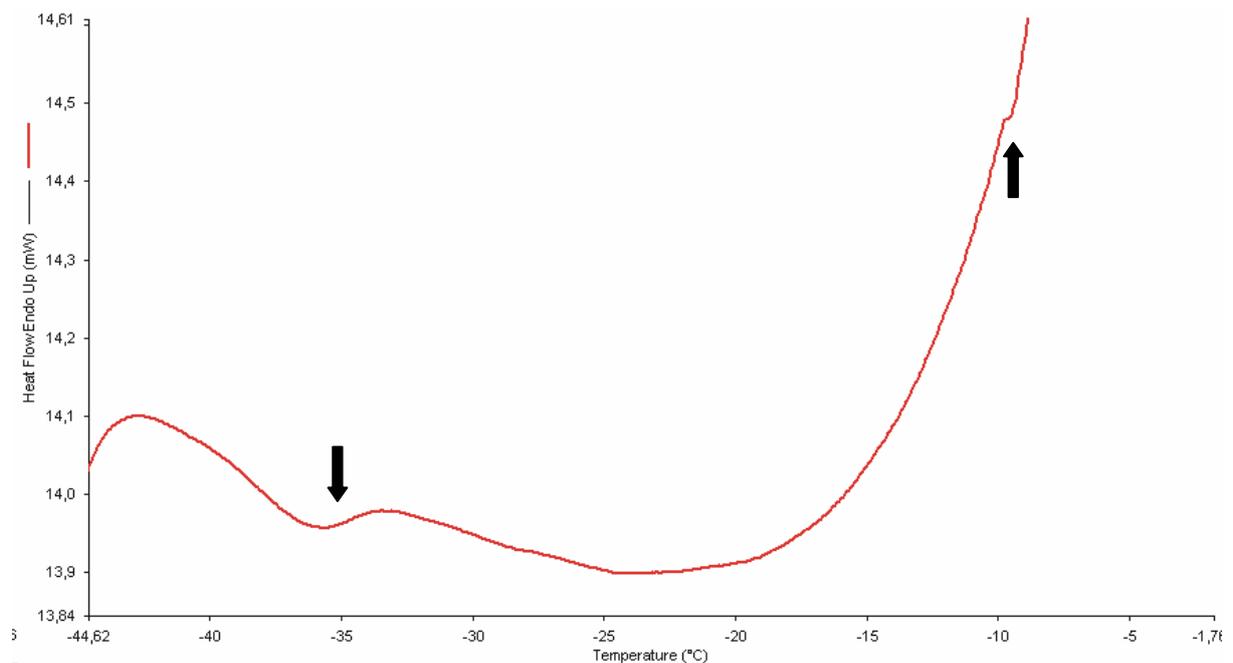


Abbildung 4.7: Kalorigramm einer myo-Inositol-Lösung mit  $T_g''$  bei  $-35^\circ\text{C}$  und  $T_g'$  bei  $-9,5^\circ\text{C}$

Problematisch ist die Rekristallisation bei Lagerung, die in Abbildung 4.8 dargestellt ist. Das Lyophilisat wurde vor der Messung 18 Monate bei Raumtemperatur unter Lichtschutz gelagert.

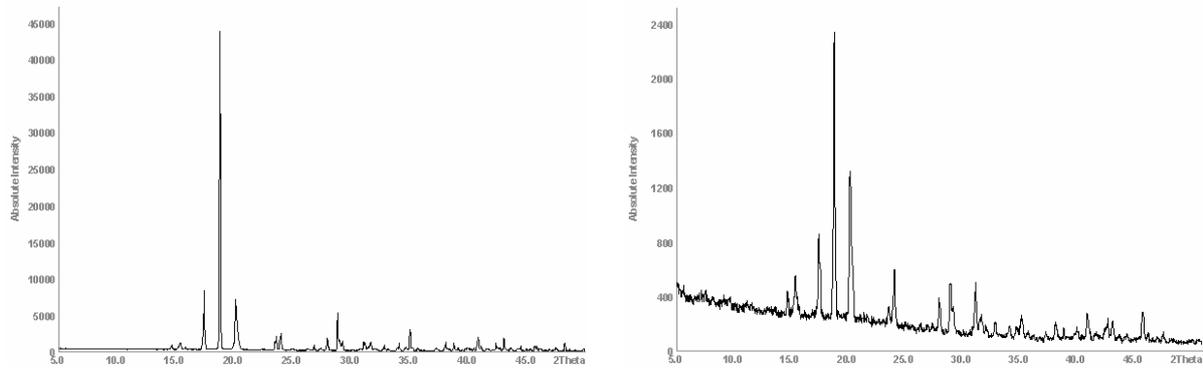


Abbildung 4.8: Röntgendiffraktogramme der Ausgangsware (links) und bei Raumtemperatur 18 Monate gelagertes Lyophilisat (rechts)

Sorptionsuntersuchungen an einem Lyophilisat der gleichen Charge, die bereits nach einem Monat Lagerung durchgeführt wurden, zeigten eine spontane Rekristallisation des myo-Inositols bei nur 9% relativer Feuchte (Abbildung 4.9) unter Aufnahme von 1,7% Wasser. Diese Tatsache deutet auf die Bildung eines Monohydrates hin. Die Einwaage an lyophilisiertem myo-Inositol nach dem Trocknungsschritt (0% rF für zwei Stunden) betrug 9,6239 mg, was bei Zugrundelegung des Molekulargewichtes von 180,16 g/mol 0,053 mmol entspricht. Die Masse nach dem ersten Sorptionszyklus betrug 9,8006 mg, was bei Zugrundelegung eines Molekulargewichtes des myo-Inositol-Monohydrates von 198,18 g/mol 0,049 mmol entspricht. Die errechneten Molekularmassen sind zwar nicht identisch, aber sehr ähnlich, was diese These stützt. Dieses im ersten Zyklus entstandene kristalline myo-Inositol-Monohydrat zeigte im zweiten Sorptionszyklus kaum Wasseraufnahme. Die Rekristallisation bei Lagerung ist unerwünscht und sollte in der Rezepturfindung Kapitel 4.4 bedacht werden.

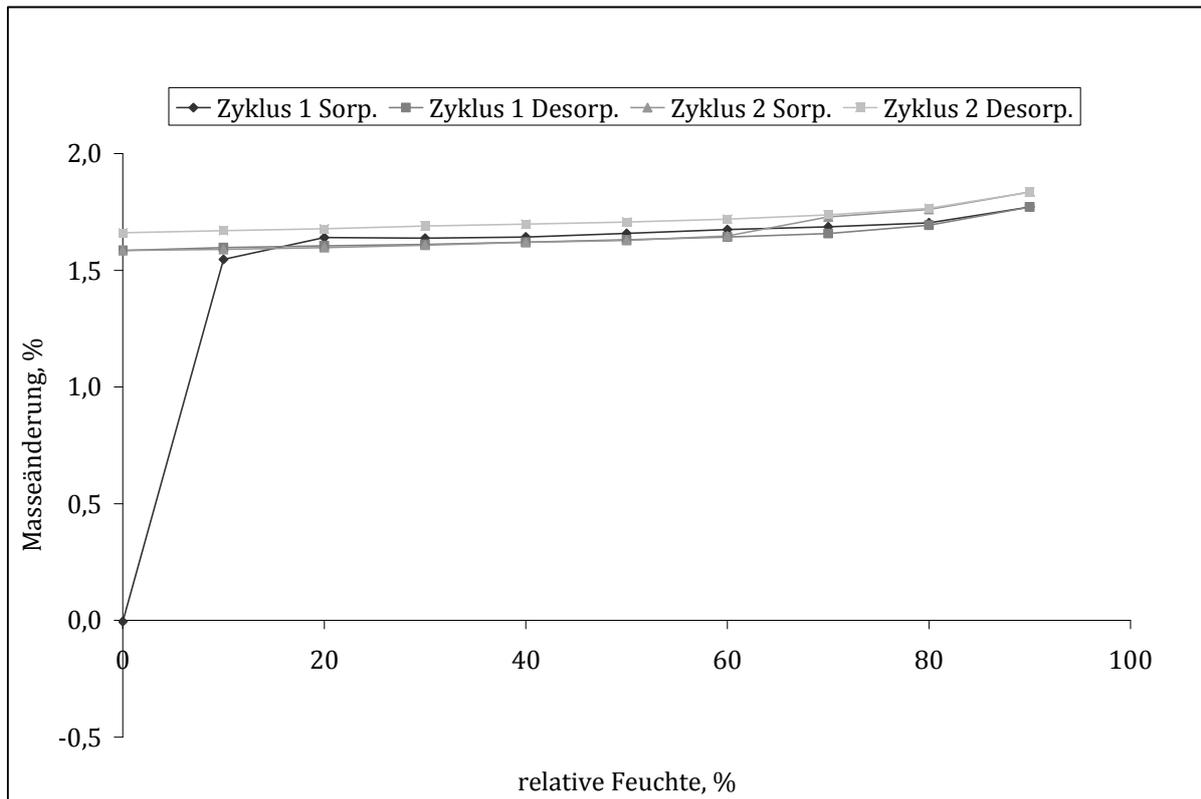


Abbildung 4.9: Sorptionsisothermen des myo-Inositols, lyophilisiert

#### 4.3.4 L-LEUCIN

L-Leucin ist als relativ hydrophobe Aminosäure ausgewählt worden, da es nach Ansicht mehrerer Autoren einen positiven Einfluss auf die Aerosolisierbarkeit habe, zumindest was sprühgetrocknete Formulierungen betrifft (Minne *et al.*, 2008; Padhi *et al.*, 2009; Seville *et al.*, 2007). Des Weiteren wurde es in einer Patentschrift als alleiniger Stabilisator für Wachstumshormone beschrieben (Sörensen, 1997). Abbildung 4.10 zeigt einen Glasübergang der L-Leucinlösung bei  $-26^{\circ}\text{C}$  und einen Rekristallisationspeak bei  $-6^{\circ}\text{C}$ . Somit gehört L-Leucin analog zu L-Glutaminsäure zu den partiell kristallisierenden Substanzen. Das Rekristallisationsereignis bei  $-38^{\circ}\text{C}$  spielt für die Anwendung als Stabilisator keine Rolle, da solch niedrige Temperaturen während der Trocknung nicht erreicht werden. L-Leucin bildet spröde, nicht klebrige Lyophilisate bei Verwendung des 3.2.1.2 beschriebenen Standardprotokolls

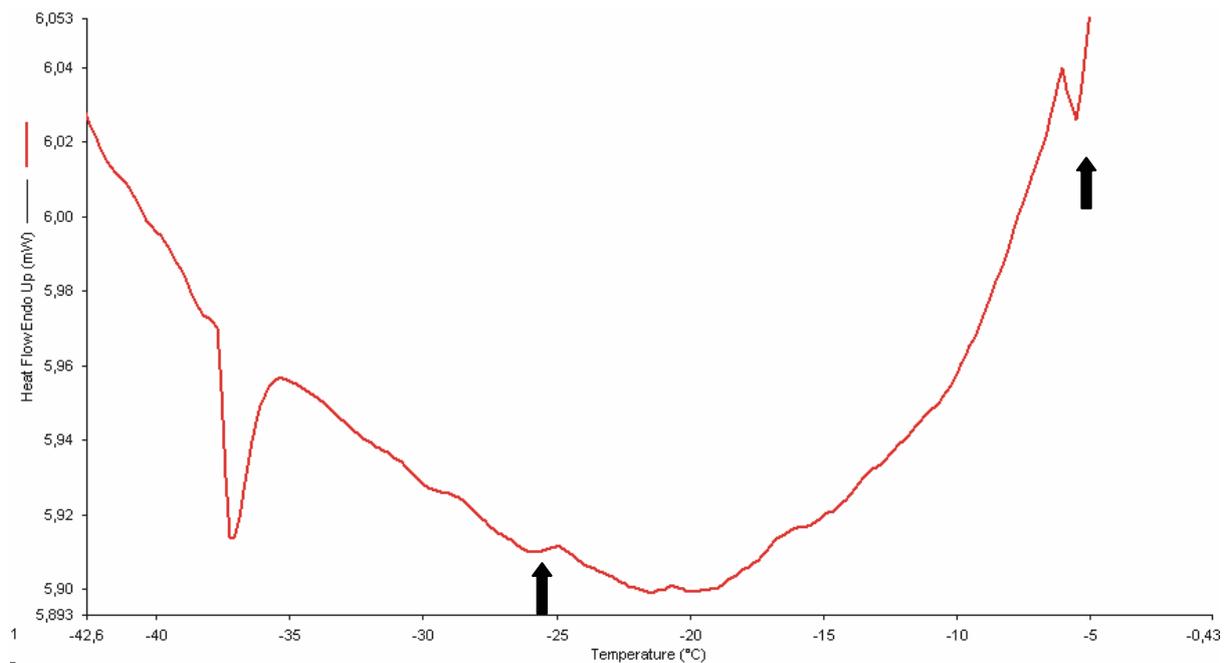


Abbildung 4.10: Kalorigramm einer L-Leucinlösung mit  $T_g'$  bei  $-25^\circ\text{C}$  und  $T_{dev}$  bei  $-6^\circ\text{C}$

Die Rekristallisation des L-Leucins ist nur partieller Natur, sichtbar an der kleinen Fläche des Peaks und noch anschaulicher in Abbildung 4.11 rechts. Das Diffraktogramm zeigt ein amorphes Rauschen, das von zwei Peaks überlagert wird. Diese sind eindeutig dem L-Leucin zuzuordnen.

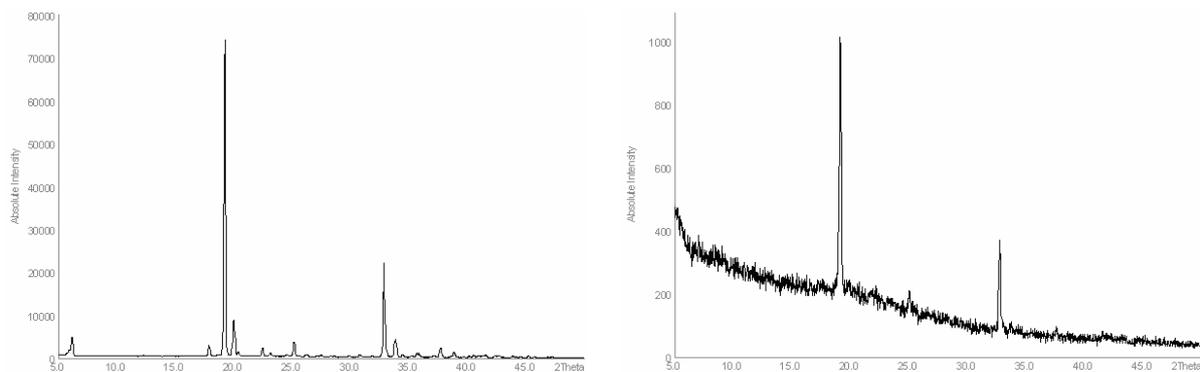


Abbildung 4.11: Röntgendiffraktogramme des L-Leucins kristallin (links) und nach Lyophilisation (rechts)

Das Ausmaß an Wasserdampfsorption ist im Vergleich zu L-Glutaminsäure erwartungsgemäß niedriger: Im ersten Zyklus wurde nur 0,26% Wasser adsorbiert, das aber im folgenden Desorptionsschritt nicht vollständig desorbiert wurde. Im zweiten Zyklus wurde 0,25% Wasser adsorbiert.

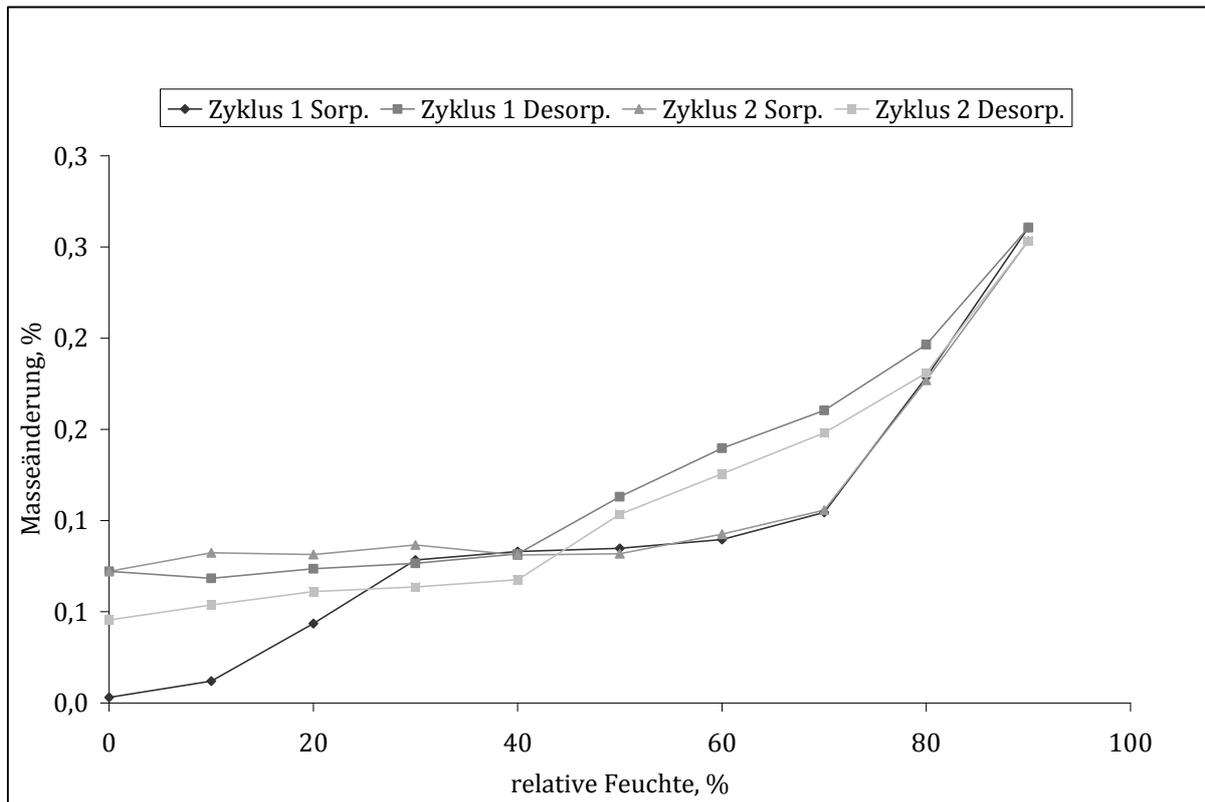


Abbildung 4.12: Sorptionsisothermen des L-Leucins, lyophilisiert

### 4.3.5 POLYSORBAT 80

Die Verwendung nichtionischer Tenside ist weit verbreitet in der Gefrier-trocknung. Es sollte geprüft werden, ob Polysorbat 80 zusätzlich zu seinen aggregationsinhibitorischen Eigenschaften weitere Vorteile hinsichtlich der Aerosolisierbarkeit der Lyophilisate aufweist. Die verwendete Konzentration lag im Bereich von 0,1 bis 1 mg/ml. Aufgrund des flüssigen Aggregatzustandes der Substanz erübrigt sich eine Evaluierung physiko-chemischer Parameter analog zu 4.3.1 bis 4.3.4.

### 4.3.6 ZUSAMMENFASSUNG

Die physiko-chemische Charakterisierung der favorisierten Hilfsstoffe legt nahe, dass prinzipiell alle der vier getesteten Substanzen geeignet sind. Die Glasübergangstemperaturen der maximal gefrierkonzentrierten Lösungen

sind mit den zur Verfügung stehenden Geräten applikabel. Tabelle 4.4 fasst die gemessenen  $T_g$ 's zusammen.

Tabelle 4.4: Glasübergangstemperaturen der maximal gefrierkonzentrierten Lösungen

Substanz	Konzentration	$T_g$ ' (Literatur)	$T_g$ ' (ermittelt)
Insulin	10 mg/ml	-10°C für Proteine generell	-24°C
L-Glutaminsäure	8 mg/ml	-33°C, -17°C (Chang und Randall, 1992)	-32°C, -17°C
Myo-Inositol	10 mg/ml	-	-35°C, -9,5°C
L-Leucin	3 mg/ml	-	-25°C
Polysorbat 80		-72°C (Beirowski <i>et al.</i> , 2009)	-

Die Rekristallisation des myo-Inositols bei Lagerung könnte jedoch problematisch werden. Bezüglich der Sorptionsuntersuchungen erwiesen sich die Aminosäuren als besonders vorteilhaft, da sie nur ein geringes Ausmaß an Wasserdampfsorption zeigten.

#### 4.4 REZEPTURFINDUNG

Nachdem die Hilfsstoffe ausgewählt und charakterisiert wurden, sollte im folgenden Schritt die Formulierung zusammengestellt werden. Um diese in ein inhalierbares Aerosol zu überführen, sollte das zu entwickelnde Lyophilisat sehr porös sein, dementsprechend sollte der Feststoffanteil pro Lyophilisat möglichst gering sein. Laut Yamashita *et al.* (2003) ist die Verwendung von 1 mg Wirkstoff und 20% Hilfsstoff, bezogen auf die Wirkstoffmasse, besonders geeignet. Des Weiteren sind Füllvolumina von 200 bis 500  $\mu$ l pro Vial genannt. Dies entspräche im Fall von 500  $\mu$ l einem Feststoffanteil von 1,2 mg pro Vial, beziehungsweise 2,4 mg pro Milliliter

Lösung. Die Angabe, welches Lösungsmittel verwendet wurde, fehlt. Derart geringe Feststoffkonzentrationen waren in den vorliegenden Untersuchungen nicht zu realisieren, da, wie bereits in Kapitel 4.3.1 erläutert, 2 mg/ml L-Glutaminsäure nötig waren, um 1 mg/ml Insulin zu lösen. Die niedrigste erreichbare Feststoffkonzentration betrug also 3 mg/ml. Insgesamt wurden Feststoffanteile von 3 bis 12 mg pro Lyophilisat untersucht, was Füllvolumina von 0,25 bis 1 Milliliter entsprach. Tabelle 4.4 führt die getesteten Formulierungen auf:

*Tabelle 4.5: Zusammensetzung der Formulierungen, bezogen auf eine Einzeldosis (ein Lyophilisat)*

<b>Formulierung</b>	<b>Insulin</b>	<b>L-Glu</b>	<b>Polysorbat 80</b>	<b>myo-Inositol</b>	<b>L-Leu</b>
<b>1</b>	1 mg	2 mg	0,1 mg	–	–
<b>2</b>	1 mg	2 mg	0,1 mg	1 mg	–
<b>3</b>	1 mg	2 mg	0,1 mg	–	1 mg

Es wurden auch Formulierungen ohne Zusatz von Polysorbat 80 produziert und untersucht. Die Evaluierung des Einflusses von Polysorbat 80 auf die Aerosolisierbarkeit befindet sich in Kapitel 5.1.1.

#### **4.4.1 EVALUIERUNG DER KRITISCHEN FORMULIERUNGSPARAMETER**

##### **4.4.1.1 GLASÜBERGANGSTEMPERATUR $T_g'$ DER FORMULIERUNGEN**

Nach der Fox-Gleichung, einer Vereinfachung der Gordon-Taylor/Kelley-Bueche-Gleichungen (Hancock und Zografi, 1994), entspricht die Gesamt- $T_g'$  einer Lösung mehrerer Substanzen der reziproken Summe der Quotienten aus Gewichtanteil und der  $T_g'$  der jeweiligen Substanz:

$$\frac{1}{T_{g' \text{ mix}}} = \frac{w_1}{T_{g'1}} + \frac{w_2}{T_{g'2}} \quad (4.19)$$

Voraussetzung ist, dass die Komponenten der Lösung die gleiche Dichte besitzen. Da dies nicht der Fall ist, sind die Ergebnisse der Berechnung nur annähernd korrekt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.6 dargestellt. Abbildung 4.13 zeigt die graphische Ermittlung der  $T_g$ 's der Lösungen. Die Glasübergänge sind durch Pfeile gekennzeichnet.

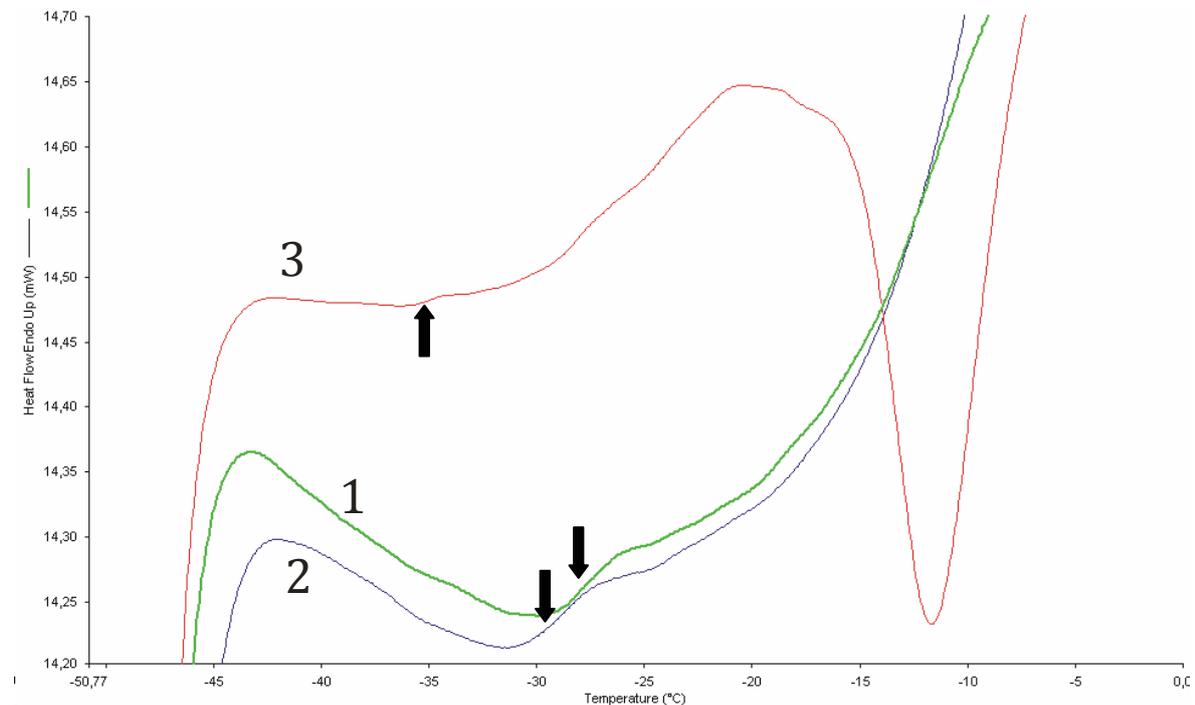


Abbildung 4.13: Relevanter Ausschnitt der Kalorigramme der Formulierungen 1-3

Es wird deutlich, dass die Lösung mit L-Leucin (Kurve 3) die niedrigste  $T_g$ ' von  $-33^{\circ}\text{C}$  aufweist. Dies war nicht zu erwarten, da eine reine Lösung aus L-Leucin ( $3\text{ mg/ml}$ ) einen Glasübergang bei  $-25^{\circ}\text{C}$  zeigt (siehe Kapitel 4.3.4) und die übrigen Komponenten mit Ausnahme von Polysorbat 80 eine ähnliche oder höhere  $T_g$ ' aufweisen, so dass die Gesamt- $T_g$ ' hätte höher sein müssen. Weiterhin ist der Rekristallisationspeak der Lösung bei  $-11^{\circ}\text{C}$  zu beachten; dieser ist, analog zu Abbildung 4.10 auf Seite 68, dem L-Leucin zuzuordnen. Die Lösung mit myo-Inositol als weiterem Stabilisator neben L-Glutaminsäure zeigt einen Glasübergang bei  $-29^{\circ}\text{C}$ . Den geeignetsten, da höchsten  $T_g$ ' besitzt die Lösung mit L-Glutaminsäure und Polysorbat 80 als alleinigen Hilfsstoffen. Sie liegt bei  $-28^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.4.1.2 KOLLAPSTEMPERATUR $T_c$

Mindestens genau so bedeutend, wenn nicht sogar noch bedeutender als die  $T_g'$  ist die Kollapstemperatur  $T_c$  der Formulierung und die Temperatur, bei der die Poren beginnen, aufgrund der durch Erniedrigung der Viskosität erlangten molekularen Mobilität zusammenzufließen. Diese Temperatur wird als „onset of collapse“ bezeichnet. Folglich ist  $T_{oc}$  die Temperatur, bei der der Kollaps der fragilen, bereits lyophilisierten Strukturen beginnt. Die  $T_{oc}$  ist deshalb aussagekräftiger und gerade im Hinblick auf die Aerosolisierbarkeit der Lyophilisate bedeutender als  $T_g'$ , da ihre Messmethode (beschrieben in Kapitel 3.2.2.2) den Gefriertrocknungsprozess im Kleinstmaßstab simuliert und nicht wie die DSC ein statisches Phänomen misst. Bei Erreichen der  $T_g'$  ist die Viskosität der maximal gefrierkonzentrierten Lösung bereits um ca. 50% reduziert (Meister und Gieseler, 2009), was zu einem Zusammenfließen der Poren des Lyophilisates führen kann. Bei der Bestimmung des „onset of collapse“ wird dieser Nachteil vermieden, da der beginnende Produktkollaps direkt am Mikroskop verfolgt werden kann. Abbildung 4.14 zeigt „freeze-dry microscopy“-Aufnahmen der Formulierung 1.

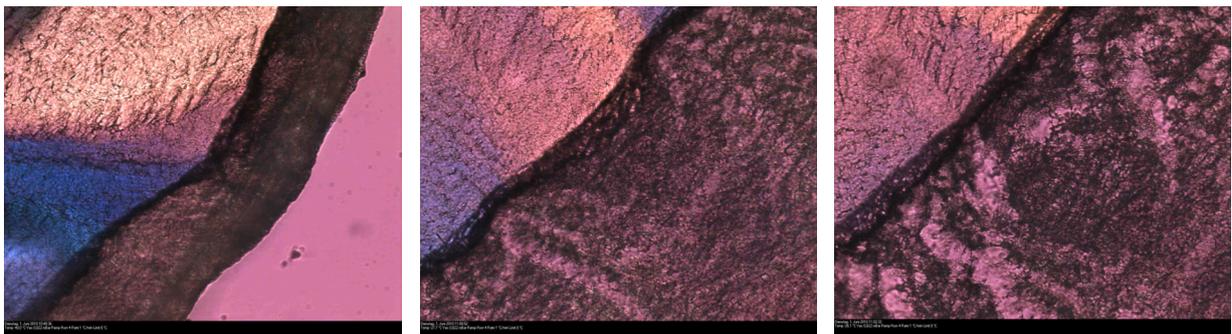


Abbildung 4.14: „Freeze-dry microscopy“-Aufnahmen der Formulierung 1: links bei  $-40^{\circ}\text{C}$ , mittig beginnender Kollaps bei  $-27,7^{\circ}\text{C}$  und rechts vollständiger Kollaps bei  $-26,1^{\circ}\text{C}$

Die linke Abbildung zeigt sehr anschaulich das Voranschreiten der Sublimationsfront (schwarzer Saum). Im mittigen Bild ist der „onset of collapse“ zu

beobachten, welcher sich in einem beginnenden Aufreißen der getrockneten Strukturen äußert. Im rechten Bild kollabiert die Struktur dann vollständig. In diesem Fall wäre die Trocknung also mit einer Produkttemperatur von unter  $-28^{\circ}\text{C}$  durchzuführen. Die gemessenen Werte decken sich gut mit der ermittelten  $T_g'$ . Oftmals liegt die Kollapstemperatur wenige Grad Celsius über der  $T_g'$  (Kadoya *et al.*, 2010). Abbildung 4.15 zeigt unter gleichen Bedingungen aufgenommene Bilder der Formulierung 2. Der beginnende Kollaps ist bereits bei einer Temperatur von  $-31,0^{\circ}\text{C}$  zu beobachten. Bei  $-28,7^{\circ}\text{C}$  findet vollständiger Kollaps statt. Auch bei dieser Formulierung korreliert  $T_c$  sehr gut mit  $T_g'$ .

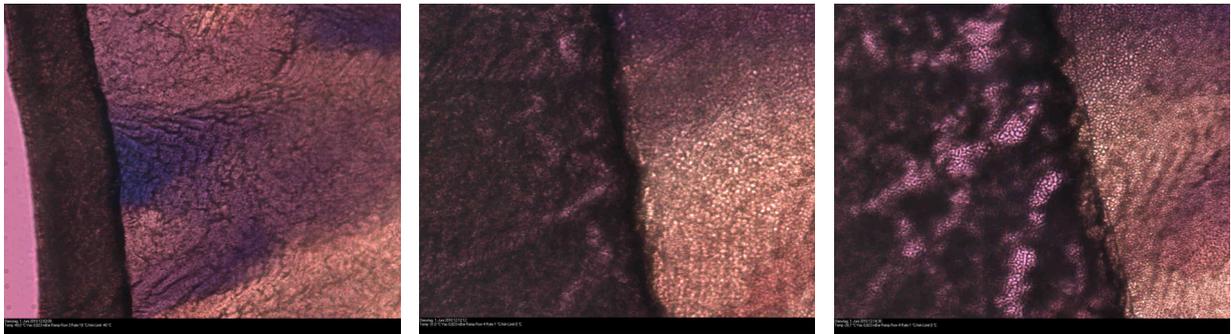


Abbildung 4.15: „Freeze-dry microscopy“-Aufnahmen der Formulierung 2: links bei  $-40^{\circ}\text{C}$ , mittig beginnender Kollaps bei  $-31,0^{\circ}\text{C}$  und rechts vollständiger Kollaps bei  $-28,7^{\circ}\text{C}$

Bei Formulierung 3 war überraschenderweise erst bei  $-8,8^{\circ}\text{C}$  ein Brechen der Struktur zu erkennen:

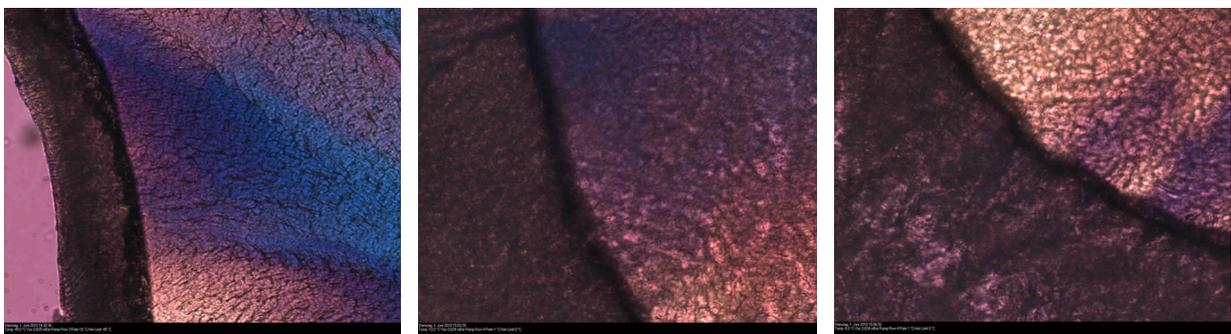


Abbildung 4.16: „Freeze-dry microscopy“-Aufnahmen der Formulierung 3: links bei  $-45^{\circ}\text{C}$ , mittig bei  $-12,0^{\circ}\text{C}$  und rechts bei  $-8,8^{\circ}\text{C}$

Ob dies mit dem Kollabieren gleichgesetzt werden kann, ist unklar. Kalorimetrische Untersuchungen der Formulierung 3 zeigten ein Rekristallisieren des L-Leucins bei  $-11^{\circ}\text{C}$ . Möglicherweise stellen die durchscheinenden Bereiche im rechten Bild rekristallisiertes L-Leucin dar, das aufgrund seiner erworbenen Kristallstruktur lichtdurchlässiger ist. Dies ist aber nur eine Vermutung und konnte bisher weder bestätigt, noch widerlegt werden. Tabelle 4.6 fasst noch einmal die ermittelten kritischen Formulierungsparameter zusammen.

*Tabelle 4.6: Kritische Formulierungsparameter*

<b>Formulierung</b>	<b><math>T_g'</math> errechnet</b>	<b><math>T_g'</math> ermittelt</b>	<b><math>T_{oc}</math></b>	<b><math>T_c</math></b>
<b>1</b>	$-19^{\circ}\text{C}$	$-28^{\circ}\text{C}$	$-27,7^{\circ}\text{C}$	$-26,1^{\circ}\text{C}$
<b>2</b>	$-15^{\circ}\text{C}$ ( $T_g'$ ) $-21^{\circ}\text{C}$ ( $T_g''$ )	$-29^{\circ}\text{C}$	$-31,0^{\circ}\text{C}$	$-28,7^{\circ}\text{C}$
<b>3</b>	$-20^{\circ}\text{C}$	$-33^{\circ}\text{C}$	–	–

Es fällt auf, dass die Vorberechnungen der  $T_g'$ s nicht mit den gemessenen Werten korrelieren; sie liegen in etwa  $10^{\circ}\text{C}$  zu hoch. Die Formulierungen 2 und 3 zeigen einen zu tiefen „onset of collapse“. Derart niedrige Produkttemperaturen von  $-31^{\circ}\text{C}$  wurden zwar bei Nutzung des Pilotmaßstab-Gefriertrockners zum Teil erreicht; dies geschah jedoch in nicht reproduzierbarer Weise und war stark von den Umgebungsbedingungen abhängig. Außerdem muss davon ausgegangen werden, dass nicht jedes Vial gleich stark abgekühlt wird. Vials, die direkt über der Kühlschleife stehen, werden stärker abgekühlt als Vials in der Peripherie.

## 4.5 CHARAKTERISIERUNG DER LYOPHILISATE

### 4.5.1 MAKRO- UND MIKROSKOPISCHE CHARAKTERISIERUNG

Abbildung 4.17 zeigt die drei lyophilisierten Modellformulierungen nach sieben Monaten Lagerung bei Raumtemperatur. Die Erkenntnisse aus der Evaluierung der kritischen Formulierungsparameter bestätigen sich bei Formulierung 2. Die für eine erfolgreiche Trocknung essentielle Produkttemperatur  $< T_{oc}$  wurde nicht erreicht. Das Lyophilisat 2 ist im Vergleich zu den erfolgreich getrockneten Produkten 3 und 1 kollabiert. Es kam zwar nicht zu vollständigem Verlust der Struktur, jedoch lässt sich eine Reduzierung des Lyophilisatdurchmessers schon mit bloßem Auge feststellen. Dies ist auf ein Zusammenfließen der Poren durch lokal erhöhte Mobilität der hochviskosen amorphen Strukturen im Bereich der Glasübergangstemperatur zurückzuführen (Bhattacharya und Suryanarayanan, 2009).



Abbildung 4.17: Formulierung 2, 3 und 1 nach sieben Monaten Lagerung bei Raumtemperatur

Die Hypothese des partiellen Kollapses der Formulierung 2 wird durch Abbildung 4.18 bestätigt. Ungeordnete, wabenartige Formierungen, wie sie für Lyophilisate typisch wären, sind einem Netzwerk aus stäbchenförmigen Strukturen gewichen, die teilweise aufgebrochen sind und ein tropfenför-

miges Ende aufweisen. An diesen Stellen ist der Kollaps sichtbar. Durch den Verlust der dreidimensionalen Struktur des Netzwerks fließt das Produkt während der Lagerung zusammen und verliert an Volumen, was auch als „shrinkage“ bezeichnet wird. Dies muss nicht immer mit einem Aktivitätsverlust des Proteins einhergehen (Schersch *et al.*, 2010), ist aber hinsichtlich des Aussehens des Produktes unerwünscht.

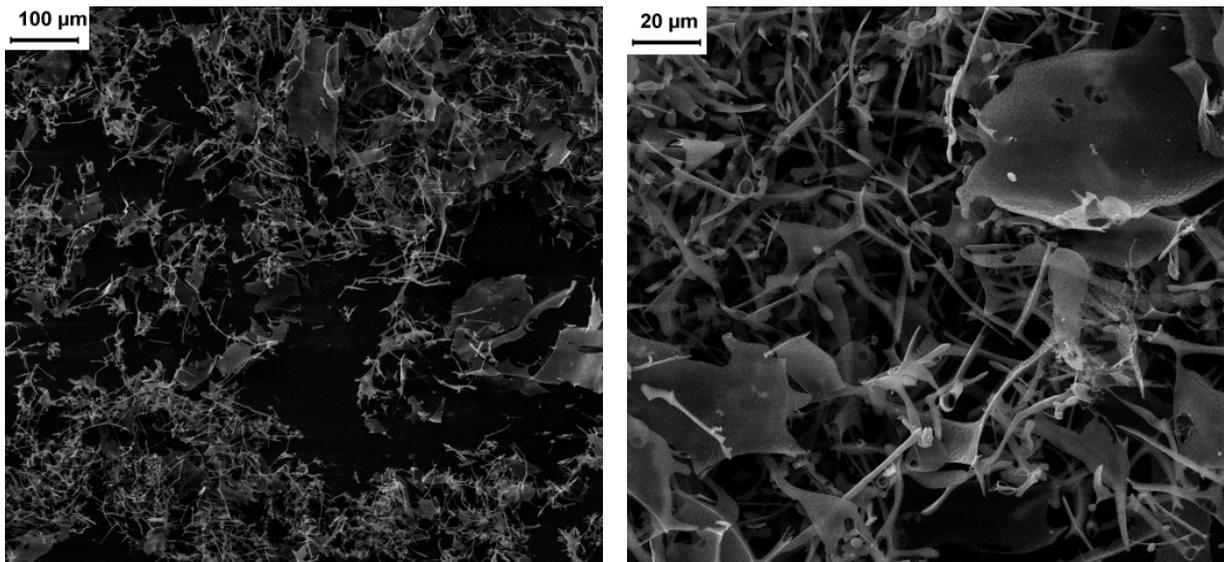


Abbildung 4.18: REM-Aufnahme der Formulierung 2 mit Mikrokollaps

Abbildung 4.19 zeigt REM-Aufnahmen der Formulierung 1. Da diese Charge bei Produkttemperaturen getrocknet werden konnte, die unterhalb des „onset of collapse“ lagen, ist das wabenartige Netzwerk auch nach sieben Monaten Lagerung intakt, was sich auch in der äußeren Gestalt des Kuchens (Abbildung 4.17, rechts) bemerkbar macht. Das linke Bild zeigt einen Querschnitt des oberen Teils des Kuchens mit der Grenzfläche zu Luft (schwarze Fläche am oberen Bildrand). Das rechte Bild ist eine Aufnahme des Lyophilisatinneren.

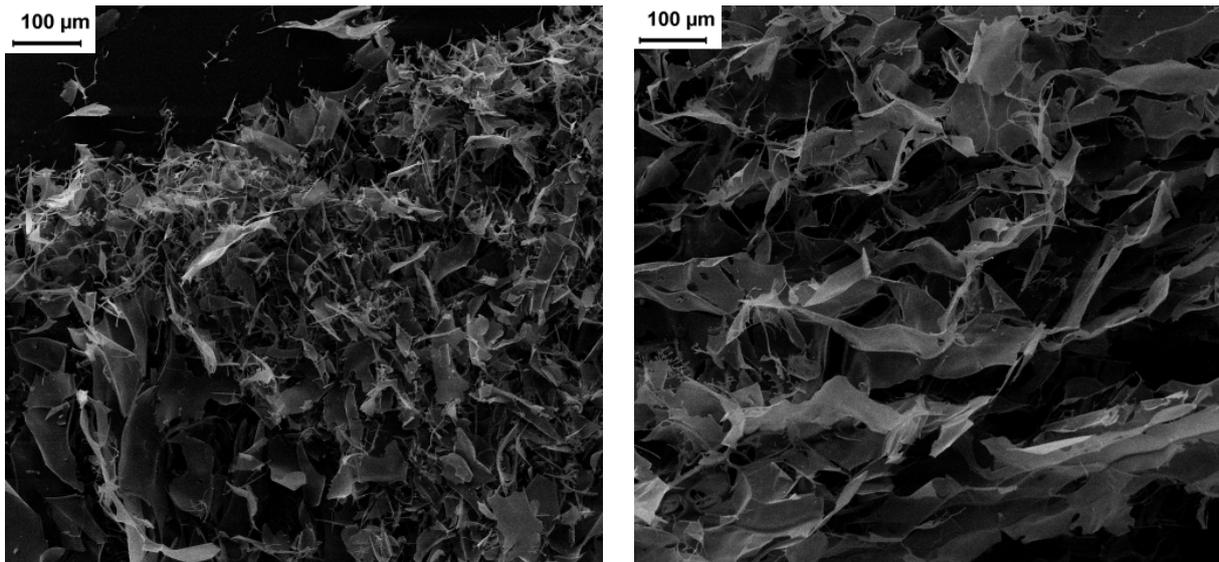


Abbildung 4.19: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Formulierung 1: links ein Querschnitt des oberen Bereiches, rechts eine Aufsicht des Inneren

Formulierung 3 weist ebenfalls eine nicht kollabierte Struktur nach Lyophilisation auf. Der Kuchen ist analog zu Formulierung 1 bei Raumtemperatur lagerstabil. Der  $T_g'$  nach zu urteilen hätte der Kuchen kollabieren sollen. Da dies nicht der Fall war, kann die  $T_c$  als aussagekräftiger angesehen werden.

### 4.5.2 MORPHOLOGIE

Um zu prüfen, ob und welche Inhaltsstoffe während der Lyophilisation und nach Lagerung kristallin vorliegen, wurden röntgendiffraktometrische Messungen einzelner Lyophilisate durchgeführt. Abbildung 4.20 führt die Diffraktogramme der Formulierungen 1 bis 3 auf. Formulierung 1 ist teilkristallin und ähnelt bei genauerer Betrachtung sehr stark dem reinen L-Glutaminsäurelyophilisat (Abbildung 4.4 rechts). Ein Teil des Hilfsstoffes ist rekristallisiert, jedoch scheint das amorph vorliegende Insulin eine Rekristallisation in dem Maße wie bei dem reinen L-Glutaminsäurelyophilisat zu verhindern, da die Peaks im Diffraktogramm nicht so stark ausgeprägt sind. Formulierung 2, die neben L-Glutaminsäure noch myo-Inositol enthält, zeigt ebenfalls einen teilkristallinen Aufbau. Bei einem Vergleich des Diffraktogrammes mit dem reinen L-Glutaminsäure- und

myo-Inositoldiffraktogramm wird ersichtlich, dass in Formulierung 2 beide Substanzen zum Teil rekristallisiert sind. Im Unterschied zu Formulierung 1 reicht dieses Kristallgerüst aber nicht aus, um die Kuchenstruktur bei Lagerung zu erhalten (siehe Abbildung 4.17 links). Formulierung 3 mit L-Leucin als weiterem Stabilisator liegt auch teilkristallin vor. Der Peak bei ca.  $19^\circ 2\theta$  ist eindeutig dem L-Leucin zuzuordnen (vergleiche Abbildung 4.11 links), die weniger intensiven Peaks zwischen  $20$  bis  $26^\circ 2\theta$  gehören zur L-Glutaminsäure.

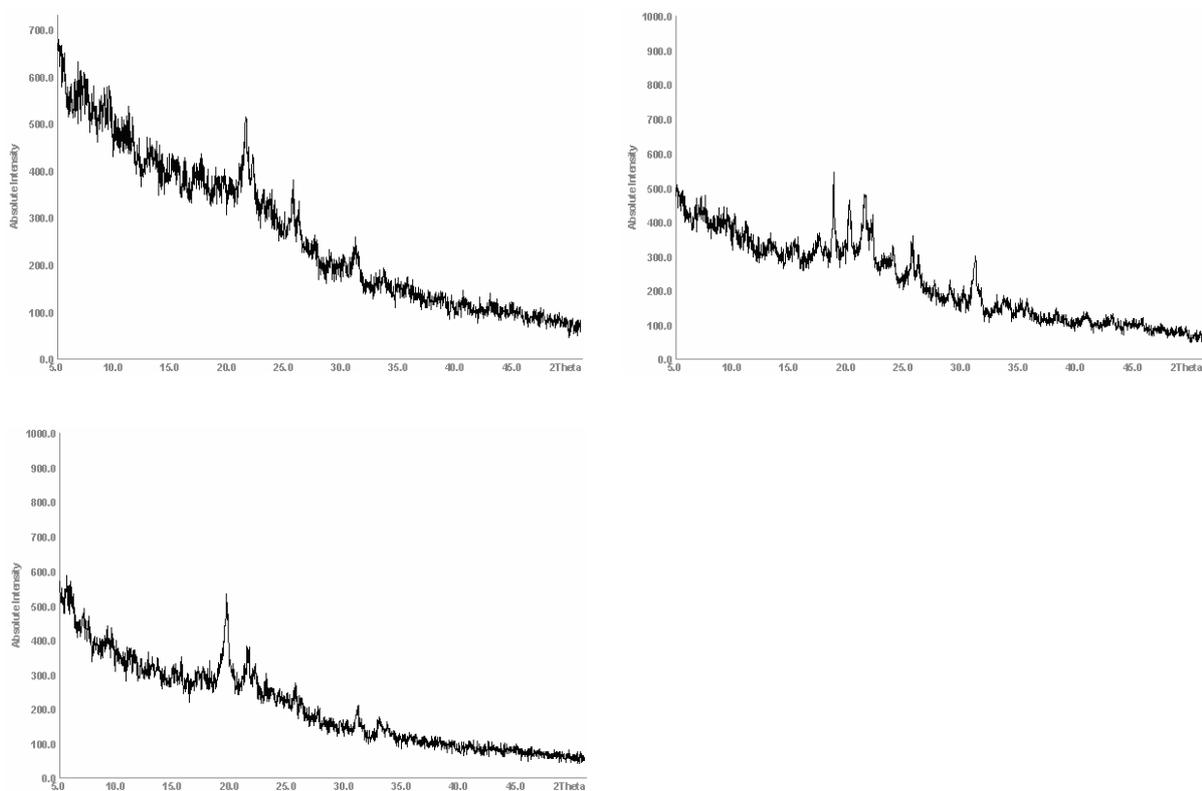


Abbildung 4.20: Röntgendiffraktogramme der Formulierungen 1 (oben links), 2 (oben rechts) und 3 (unten)

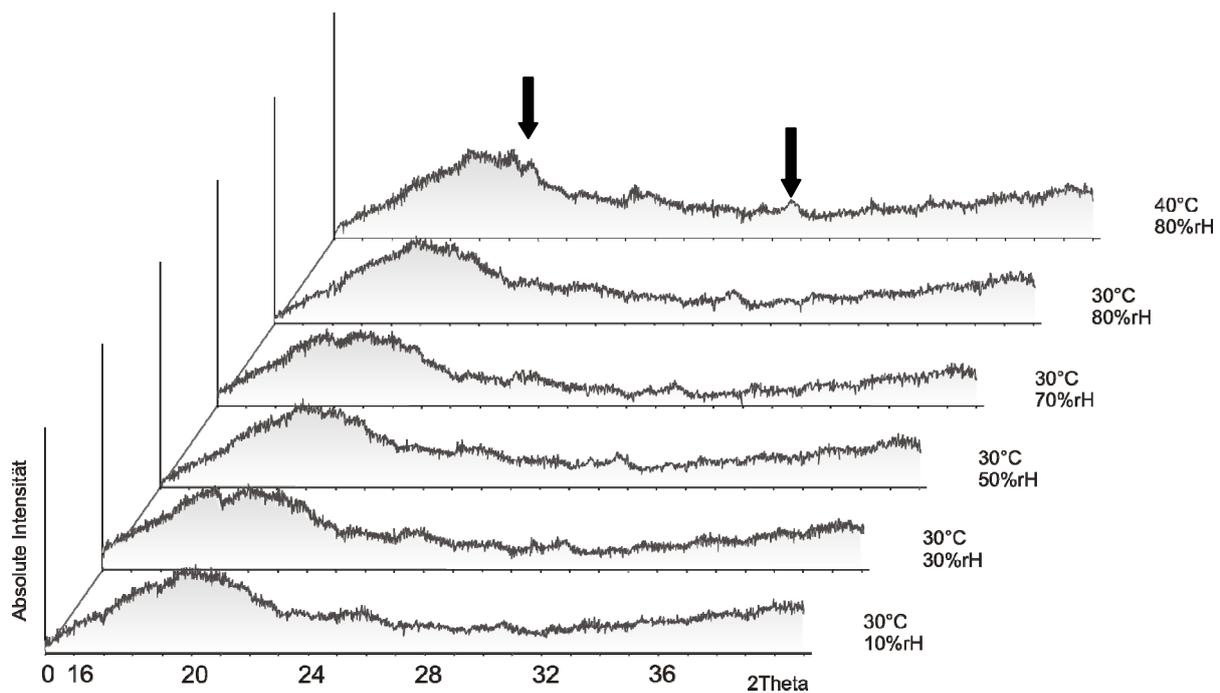


Abbildung 4.21: Einfluss von Temperatur und Luftfeuchtigkeit auf Morphologie der Formulierung 1

Anschließend wurde der Einfluss von erhöhter Temperatur und höherer Luftfeuchtigkeit auf das Röntgenbeugungsmuster der Formulierung 1 untersucht (Abbildung 4.21). Die vordere Kurve zeigt das Lyophilisat bei 30°C und 10% relativer Feuchte. Die teilkristallinen Peaks, die die Probe bei Transmissionsmessungen aufwies, sind hier nicht in der Deutlichkeit zu erkennen, da es sich um Reflexionsmessungen handelt. Bei steigender Luftfeuchtigkeit bis zu 80% und gleich bleibender Temperatur ist nur eine geringfügige Änderung des Beugungsmusters bei ca. 30° 2θ zu erkennen, was als Rekristallisation der L-Glutaminsäure gedeutet werden kann. Bei Erhöhung der Temperatur auf 40°C ist eine weitere Rekristallisation zu erkennen, die sich in kleinen Peaks bei 19° und 20° 2θ äußert.

### 4.5.3 SORPTIONS- UND DESORPTIONSVERHALTEN

Abbildung 4.22 zeigt die per DVS ermittelten Sorptions- und Desorptionsisothermen für Formulierung 1 bei 25°C. Im ersten Zyklus werden 9,9% Wasser adsorbiert und auch 9,9% wieder desorbiert. Im zweiten Zyklus

werden jeweils 9,3% ad- und desorbiert. Zyklus 1 und 2 unterscheiden sich somit nur geringfügig, was auf eine stabile Lyophilisatstruktur mit geringer Tendenz zum feuchtigkeitsbedingten Produktkollaps schließen lässt. Bei einem Vergleich der Wasseraufnahme und -abgabe des Lyophilisates mit der der einzelnen Komponenten (Kapitel 4.3) fällt auf, dass das Maß an Sorption zwischen den Werten der Einzelkomponenten liegt. Generell ist eine Wasseraufnahme von fast 10% insbesondere für eine zu aerosolisierende Formulierung sehr hoch; andererseits sind Lyophilisate per se hygroscopisch, so dass ein hohes Maß an Sorption zu erwarten war. Diesem Phänomen muss bei der Lagerung des Produktes Sorge getragen werden.

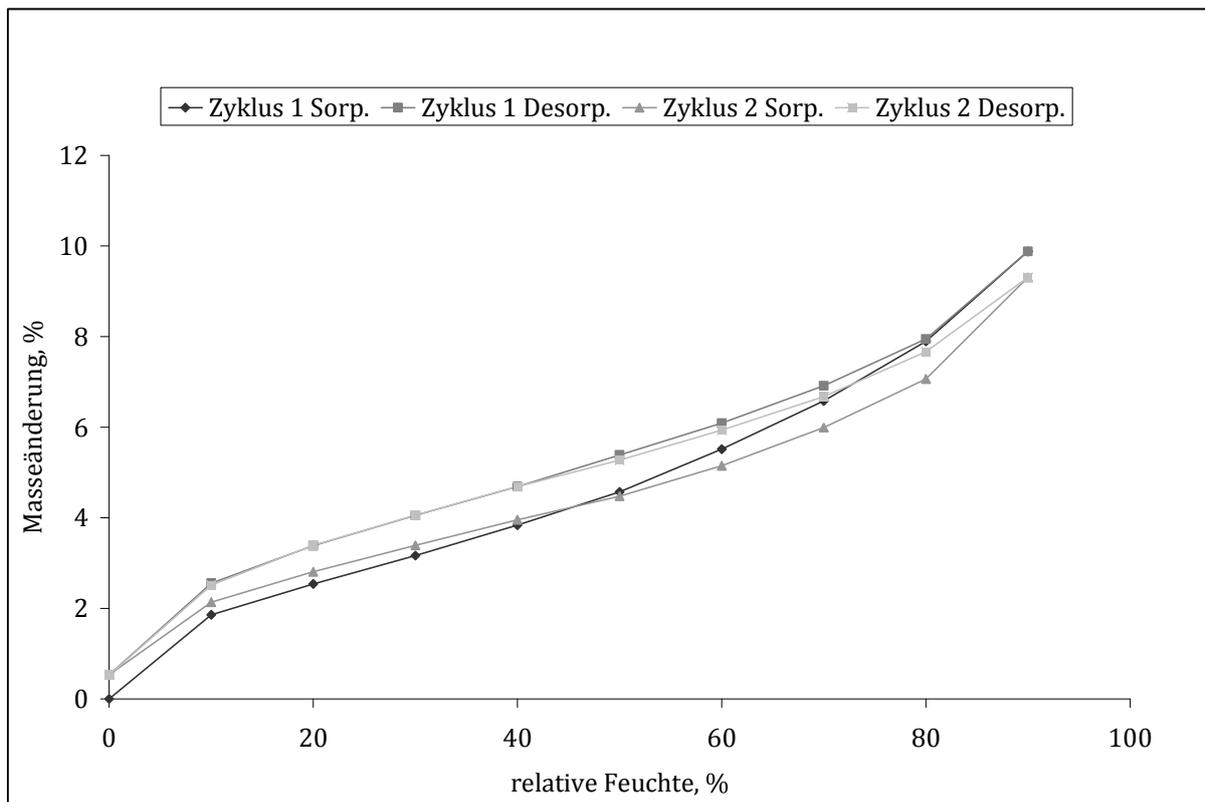


Abbildung 4.22: Sorptionsisothermen einer Formulierung bestehend aus 1 mg Insulin, 2 mg L-Glutaminsäure und 0,1 mg Polysorbat 80

#### 4.5.4 PROTEINSTABILITÄT

Die Stabilität des Modellproteins Insulin wurde vor und nach der Lyophilisation sowie nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen und Luft-

feuchtigkeiten ermittelt. Der verwendete Assay, ein Chemilumineszenz-Mikropartikelimmunoassay der Firma Abbott, ist zur Untersuchung von Serum- und Plasmaproben zugelassen und findet in der Routinemessung in der Klinik Verwendung. Bei der Untersuchung der wässrigen Lösungen kam es jedoch zu Unstimmigkeiten in der Ermittlung der realen Restaktivität. Es wurde in allen Messungen eine zum Teil nicht unbeträchtliche Minderaktivität gemessen. Beispielsweise führte eine Kontrollmessung einer Charge Insuman rapid zu einem Ergebnis von 16 I.E./ml, obwohl 40 I.E./ml angegeben sind. Die Aktivitätsmessung des in allen Untersuchungen verwendeten Insulins kam je nach verwendetem Lösungsmittel, ob verdünnte Salzsäure oder L-Glutaminsäurelösung, zu unterschiedlichen Ergebnissen. Daher wird hier lediglich ein Vergleich der Insulinaktivität vor und nach der Lyophilisation und nach Lagerung angestellt. Formulierung 1, die neben 0,1 mg Polysorbat 80 nur 4 mg/ml L-Glutaminsäure als Stabilisator enthält, wies nach Gefriertrocknung eine Restaktivität von 78% bezogen auf die Aktivität seiner Ausgangslösung auf. Dieser Wirkverlust kann verschiedenste Gründe haben. Mehrere Autoren beschreiben den Verlust an Aktivität von Proteinen durch zu hohe Restfeuchte im Lyophilisat (Miller und Lechuga-Ballesteros, 2006; Sarciaux *et al.*, 1999). Cleland *et al.* (2001) belegen, allerdings für einen Antikörper, dass ein bestimmtes Verhältnis von Stabilisator zu Protein notwendig ist, um es effektiv zu stabilisieren. Dieser Erklärungsansatz könnte auch in dem vorliegenden Fall in Betracht gezogen werden. In Formulierung 1 beträgt das Verhältnis zwischen Stabilisator und Protein 2:1 mit deutlichem Aktivitätsverlust. Eine Formulierung mit 0,2 mg/ml Insulin und 4 mg/ml L-Glutaminsäure entsprechend einem Verhältnis von 20:1 zeigt, wie in Tabelle 4.7 zu sehen, keinen Wirkverlust nach Lyophilisation.

*Tabelle 4.7: Übersicht über die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmungen von Formulierung 1. Aufgrund teils erheblicher Schwankungen zwischen den an verschiedenen Messtagen ermittelten Aktivitätswerten werden nur Chargen verglichen, die am selben Tag untersucht wurden*

<b>Messtag</b>	<b>Charge</b>	<b>Mittelwert der Aktivität in <math>\mu</math>I.E./ml</b>	<b>Aktivität in I.E./ml</b>	<b>in % von der Referenz</b>
<b>1</b>	Formulierung 1 vor Lyophilisation	30,4	7,6	100
	Formulierung 1 rekonstituiert	23,8	5,9	78,3
zum Vergleich:				
<b>2</b>	Insulin 0,2 mg/ml in L-Glutaminsäurelösung vor Lyophilisation	21,5	5,4	100
	Insulin 0,2 mg/ml in L-Glutaminsäurelösung lyophilisiert und rekonstituiert	22,9	5,7	106,5
<b>3</b>	Formulierung 1 rekonstituiert	59,9	15,0	100
	Formulierung 1 nach 7 Wochen offener Lagerung bei 25°C und 60% rF	38,9	9,7	65,0
	Formulierung 1 nach 7 Wochen offener Lagerung bei 40°C und 75% rF	31,6	7,9	52,7

Die Lagerung bei 25°C und 60% rF führte ebenfalls zu einem deutlichen Aktivitätsverlust. Nach sieben Wochen betrug sie nur noch 65%. Noch klarer wurde der Einfluss der Lagerbedingungen bei Lagerung unter Stressbedingungen. Hier führten die Umgebungsbedingungen zu einer

annähernden Halbierung der Aktivität. Die Bestimmung der Restaktivität der Formulierungen 2 und 3 führte zu keinen repräsentativen Ergebnissen. Es wäre eine erhöhte Restaktivität der Formulierung 2 aufgrund des Vorhandenseins des Polyols myo-Inositol im Vergleich zu den Formulierungen 1 und 3 zu erwarten gewesen. Dies ließ sich jedoch nicht bestätigen.

#### 4.5.5 RESTWASSERGEHALT NACH LYOPHILISATION

Der Restwassergehalt der Produkte nach Lyophilisation betrug zwischen 1,5% nach verlängerter Sekundärtrocknung bei Formulierung 1 und knapp 7% bei Formulierung 1 bei Trocknung nach Standardprotokoll (Tabelle 3.2). Teilweise wurden in ersten Formulierungsansätzen Werte von 10% ermittelt. Dabei handelte es sich um reine Insulinlyophilisate, die hier aber nicht mit aufgeführt sind. Bei allen Formulierungen war der Restwassergehalt stark abhängig von der Dauer der Sekundärtrocknung und der Produkttemperatur bei Entnahme der Lyophilisate aus dem Trockner. Tabelle 4.8 führt die gemessenen Werte auf.

*Tabelle 4.8: Bestimmung des Wassergehaltes der Formulierungen 1-3 nach Trocknung mittels des Christ-Gefriertrockners nach Standardprotokoll*

Charge	Wassergehalt in mg			Mittelwert	Stabw.	in %
	1	2	3			
Formulierung 1	0,2804	0,2071	0,2051	0,2069	0,0017	6,78
Formulierung 2	0,2667	0,1864	0,2456	0,2329	0,0416	5,75
Formulierung 3	0,2084	0,2042	0,2105	0,2077	0,0032	5,13

Die ermittelten Prozentwerte an Restwasser der Formulierungen 1 bis 3 sind mit 5-7% bei Trocknung nach Standardprotokoll recht hoch. In der Literatur werden üblicherweise Restfeuchten von unter einem Prozent für optimal angesehen, gerade im Hinblick auf die Proteinstabilität. Obwohl die

Werte hoch sind, sind sie dennoch reproduzierbar und schwanken nur marginal, was für eine einheitliche Trocknung spricht.

Anschließend sollte die Dauer der Sekundärtrocknung in einem Optimierungsschritt angepasst werden. Gerade bei Verwendung des Labormaßstab-Gefriertrockners waren die Restfeuchten zu hoch. Der Grund dafür könnte das Einkammersystem sein. Da die auf bis zu 40°C beheizte Stellfläche direkt neben dem Eiskondensator (-53°C) steht und dieser die Proben umgibt, erwärmen sich diese nicht so stark. Dies machte sich in der Produkttemperatur bemerkbar. Selbst nach einer Sekundärtrocknung von 24 Stunden bei 30°C Stellflächentemperatur lag sie nur bei 10-12°C. Folglich war die direkt temperaturabhängige Diffusion des Wassers (vergleiche Kapitel 2.2.4.3), die die Grundlage bildet für den Desorptionsvorgang, erschwert. Tabelle 4.9 zeigt die Messwerte der Restfeuchtebestimmung bei angepasster Sekundärtrocknung. Die Dauer von 24 Stunden wurde beibehalten, jedoch wurde die Stellfläche schrittweise bis auf 50°C beheizt, was in einer Produkttemperatur bei Entnahme von 21°C resultierte. Die so erreichte Restfeuchte von 1,45% ist zufriedenstellend.

*Tabelle 4.9: Wassergehalt der Formulierung 1 nach angepasster Sekundärtrocknung*

Charge	Wassergehalt in mg			Mittelwert	Stabw.	in %
	1	2	3			
Formulierung 1	0,0453	0,0483	0,0395	0,0443	0,0045	<b>1,45</b>

#### **4.5.6 ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNGEN**

Im Rahmen der Formulierungsentwicklung wurden zahlreiche Hilfsstoffe zunächst charakterisiert und die am geeignetsten erscheinenden in Formulierungen zusammen mit Insulin zunächst in Lösung gebracht und lyophilisiert. Es wurden insgesamt drei Formulierungen evaluiert.

Formulierung 2 mit myo-Inositol als weiterem Hilfsstoff zeigte eine problematische  $T_{oc}$ , die mit den verwendeten Geräten nicht applikabel war. Aufgrund dessen kam es, bedingt durch die Trocknung oberhalb der Kollapstemperatur, zu einem Mikrokollaps und „shrinkage“ des Produktes während der Lagerung. Als ungünstig ist auch das Rekristallisationsverhalten des myo-Inositols zu werten, da dies zu einer Inaktivierung des Insulins führen kann.

Formulierung 3 mit L-Leucin als zusätzlichem Stabilisator zeigte ebenso wie Formulierung 2 ungünstige kritische Trocknungsparameter  $T_{oc}$  und  $T_g'$ , dies führte aber nicht zum Kollaps während der Trocknung und bei Lagerung. Die entstandenen Lyophilisate waren mechanisch stabil.

Als besonders geeignet stellte sich Formulierung 1 heraus. Die Glasübergangstemperatur der maximal gefrierkonzentrierten Lösung sowie der „onset of collapse“ lagen in dem Temperaturbereich, der mit den zur Verfügung stehenden Gefriertrocknern mit geringem Sicherheitsbereich durchführbar war. Röntgendiffraktogramme der Formulierung 1 zeigten die gewünschte teilkristalline Struktur, die zum einen amorphe Strukturen zur Stabilisierung des Insulins aufweist, zum anderen ein kristallines Gerüst, das die mechanische Stabilität trotz des sehr geringen Feststoffanteils erhält. Die Restaktivität des Insulins von 78% nach Trocknung ist noch zu optimieren. Fraglich ist, ob sich ein derart hoher Proteinanteil von 33% der Gesamtmasse mit einem derart geringen Hilfsstoffanteil überhaupt vollständig stabilisieren lässt. Die Aktivitätsuntersuchung der Formulierung mit 0,2 mg/ml Insulin zeigte keinen Verlust. Es gibt womöglich einen Konflikt zwischen hinreichender Stabilisierung des Insulins und Aerosolierbarkeit der Lyophilisate mit maximierter Feinpartikelfraktion. Bei einem Verhältnis von 20 (Stabilisator):1 (Insulin) und der Vorgabe, 1 mg Insulin pro Lyophilisat zu formulieren, entspräche dies mindestens 20 mg Feststoff pro

Lyophilisat. Dies steht im Gegensatz zu den von Yamashita *et al.* (2003) postulierten Feststoffanteilen von möglichst unter 1 mg Wirkstoff und 20 bis 100% entsprechend 0,2 bis 1 mg Hilfsstoff pro Einzeldosis. Inwiefern der Feststoffanteil die Aerosolisierbarkeit beeinflusst, wird in Kapitel 5 erläutert.

Aufgrund der besseren Eignung werden die kommenden Untersuchungen zur Dispergierbarkeit und der Inhalatorentwicklung mit Formulierung 1 durchgeführt. Formulierungsansatz 3 führte zwar auch zu mechanisch stabilen und ansehnlichen Lyophilisaten, war bezüglich des aerodynamischen Verhaltens Formulierung 1 aber nicht überlegen. Der Vergleich befindet sich im Kapitel 5.1.2.9.

### 5 AEROSOLISIERBARKEIT DER LYOPHILISATE

Die Dispergierung der Lyophilisate in lungengängige Partikel war ein weiteres Ziel dieser Arbeit. Die Entwicklung einer inhalierbaren lyophilisierten Formulierung hätte viele Vorteile gegenüber der Entwicklung eines „konventionellen“ Trockenpulverinhalates: Es könnte beispielsweise auf den Mikronisierungsprozess des Wirkstoffes verzichtet werden und es bräuchte keinen Trägerpartikel wie Lactose, ganz von der Tatsache abgesehen, dass Mahlung der Aktivität der zu formulierenden Proteine wahrscheinlich schaden würde (Schlocker *et al.*, 2006). Um die Aerosolisierbarkeit der entwickelten Lyophilisate von geringer Dichte zu testen, galt es generell zu klären, welche Faktoren sich auf sie auswirken könnten. Diese wurden zunächst wie folgt eingeteilt:

Formulierungseinflüsse:

*Gegenwart eines Tensids (Polysorbat 80):* Es sollte getestet werden, ob die Anwesenheit von Polysorbat 80, dessen positiver Einfluss auf die Protein-stabilität viel beschrieben ist (Osterberg und Wadsten, 1999; Sarciaux *et al.*, 1999; Steckel *et al.*, 2003; Webb *et al.*, 2003), auch die Dispergierbarkeit verbessert.

*Feststoffanteil pro Lyophilisat:* Es wird vermutet, dass der Feststoffanteil einen großen Einfluss auf die Dispergierbarkeit hat. Ein großer Feststoffanteil führt zu einem dichteren Lyophilisat mit weniger Lufteinschlüssen. Geringe Feststoffanteile führen zu einem voluminösen, sehr flockigen Lyophilisat mit einer sehr porösen Struktur. Feststoffanteile von 2 mg/ml oder weniger, wie in dem Patent von Yamashita *et al.* (2003) empfohlen, wurden im Rahmen dieser Arbeit getestet, führten aber zu einem vakuumbedingten Austrag des Kuchens aus dem Vial während der Trocknung.

Deshalb wurde auf die weitere Untersuchung derart niedriger Feststoffanteile verzichtet.

### Einfluss des Gefriertrocknungsprozesses

*Einfriergeschwindigkeit:* Die Einfriergeschwindigkeit bestimmt die Größe der Eiskristalle und so auch die daraus resultierende Porengröße und Porengrößenverteilung im Lyophilisat. Es wird vermutet, dass große Poren aufgrund höherer Porosität ein Netzwerk von sehr feinen Strukturen nach der Trocknung hinterlassen, während kleine Poren ein weniger poröses Produkt bedingen.

### Einfluss der Umgebungsbedingungen

Die Umgebungsbedingungen Temperatur und insbesondere die herrschende Luftfeuchtigkeit während der Messung haben einen nachgewiesenen Einfluss auf die Eigenschaften von Trockenpulveraerosolen (Chougule *et al.*, 2007; Maggi *et al.*, 1999). Insbesondere hinsichtlich der Hygroskopizität der Lyophilisate ist eine konstante Messumgebung überaus wichtig. Daher wurden alle Untersuchungen zur Aerosolisierbarkeit unter konstanten klimatischen Bedingungen bei 21°C und 35% relativer Feuchte durchgeführt. Ein Einfluss wechselnder Umgebungsbedingungen konnte so minimiert werden.

### Einfluss des Inhalators

Der Einfluss des verwendeten Inhalationssystems auf die Aerosolisierbarkeit wird in den Kapiteln 6.4.1 und 7.3.3 untersucht und ist hier nur aus Gründen der Vollständigkeit mit aufgeführt.

## 5.1 EINFLÜSSE DER FORMULIERUNG UND DER EINFRIERGESCHWINDIGKEIT

### 5.1.1 VERSUCHSPLANUNG

Zur Untersuchung des Einflusses der Formulierung und des Lyophilisationsprozesses auf die Aerosolisierbarkeit wurde mithilfe der Software Design-Expert® 8 ein vollfaktorieller 2<sup>3</sup>-Versuchsplan erstellt. Als Dispergiersystem diente dabei ein aktiver Inhalator, dessen Entwicklung und Testung ausführlich in Kapitel 6 beschrieben wird. Der Versuchsplan enthielt die Faktoren Einfriergeschwindigkeit, Feststoffkonzentration in mg/ml und Konzentration an Polysorbat 80 in mg pro Vial. Die Einfriergeschwindigkeit wurde als kategorischer Faktor eingestuft. Die zugehörigen Stufen waren schnell (Proben wurden für 90 Sekunden in flüssigen Stickstoff (LN<sub>2</sub>) eingetaucht) und langsam (Beladung des Gefriertrockners und anschließender Start der Kältemaschine). Die Feststoffkonzentration war der erste numerische Faktor und wurde auf den Stufen 3 mg/ml und 12 mg/ml variiert. Zusätzlich wurde noch eine mittlere Konzentration von 6 mg/ml in den Versuchsplan mit einbezogen. Den zweiten numerischen Faktor stellte die Konzentration an Polysorbat 80 dar, die zwischen 0 mg und 0,1 mg pro Vial variiert wurde.

*Tabelle 5.1: Faktoren im Versuchsplan*

---

<b>Faktor</b>	<b>Name</b>	<b>Typ</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>
<b>A</b>	Feststoffanteil, mg/ml	numerisch	3,0	12,0
<b>B</b>	Einfriergeschwindigkeit	kategorisch	langsam	schnell
<b>C</b>	Polysorbat 80, mg/Vial	numerisch	0,0	0,1

---

Die drei Faktoren wurden auf jeder Stufe miteinander kombiniert, was zu 12 Kombinationen führte. Jede Faktorenkombination wurde drei Mal evaluiert, so dass insgesamt 36 Einzelmessungen durchgeführt wurden. Eine

Versuchsplanübersicht und alle ermittelten Messwerte finden sich im Anhang in Kapitel 10.3. Zur Evaluierung wurde Formulierung 1, bestehend aus 1 mg Insulin, 2 mg L-Glutaminsäure und 0,1 mg Polysorbat 80 in einem Ansatz in ausreichender Stückzahl lyophilisiert und bis zum Tag der jeweiligen Untersuchung verschlossen und unter Lichtschutz gelagert. Es kam schon während der kurzen Lagerung zu Schrumpfen der mittels LN<sub>2</sub> eingefrorenen Lyophilisate. Insbesondere die Chargen mit dem größten Feststoffanteil von 12 mg/ml zeigten starke Schrumpfung, was eine Aerosolisierung erschwerte. Dies machte sich in den Messwerten bemerkbar.

*Tabelle 5.2: Cut-off-Durchmesser bei einer Flussrate von 30 l/min*

<b>Stage im NGI</b>	<b>&lt; d<sub>50</sub>, µm</b>
1	> 11,719
2	11,719
3	6,395
4	3,988
5	2,299
6	1,357
7	0,834
MOC	0,541

Das zur Aerosolisierung benutzte Inhalationssystem basierte auf einer Druckgasdispergierung (Dispergierparameter 0,1 Sekunde bei 1 at Druck) des Lyophilisates in einen Spacer. Diese Applikationshilfen kommen üblicherweise in Kombination mit Druckgas-Dosieraerosolen (pressurized metered dose inhalers, pMDIs) bei der Therapie von Asthmaerkrankungen und vor allem bei Kindern zum Einsatz. Das Europäische Arzneibuch schreibt für die Bestimmung des Anteils feiner Teilchens in Zubereitungen aus pMDIs eine Messung bei einer Flussrate von 30 l/min vor. Diese Anfor-

derung wurde in den vorliegenden Untersuchungen angewendet. Die Messung bei 30 l/min führt zu den in Tabelle 5.2 aufgeführten cut-off-Durchmessern der Trennstufen im Impaktor. Der Wert  $< d_{50}$  sagt aus, dass Partikel dieser Größe, wenn Fehlabscheidungen außer Betracht gelassen werden, zu 50% in der betrachteten Impaktorstufe abgeschieden und zu 50% durchgelassen werden.

### 5.1.2 ERGEBNISSE

Die errechneten Modelle für die Zielgrößen FPD, relative FPF und absolute FPF sowie Rückstand im Vial sind höchst signifikant, für die DD und den Rückstand im Inhalator konnten hoch signifikante Modelle gebildet werden (Tabelle 5.3). Das gebildete Modell für den MMAD ist schwach signifikant.

Tabelle 5.3: Modellparameter der untersuchten Zielgrößen

Zielparameter	Daten- trans- formati- on	p value		R-squared		
		Modell	lack of fit	adjusted	predicted	Aus- reißer
FPD	square root	< 0,0001	0,0004	0,6244	0,5494	–
absolute FPF	–	< 0,0001	0,0001	0,6315	0,5436	–
relative FPF	–	< 0,0001	0,0218	0,7480	0,6822	–
DD	–	0,0027	0,0036	0,3208	0,1876	–
Rachen- deposition		< 0,0001	0,0018	0,7709	0,7086	
Rückstand im Vial	square root	< 0,0001	0,0009	0,6380	0,6046	Run 11
Rückstand im Inhalator	square root	0,0005	0,003	0,4378	0,2963	Run 35
MMAD	–	0,0497	0,0155	0,0824	-0,0003	–

Auffällig ist der signifikante „lack of fit“ für alle gebildeten Modelle. Der „lack of fit“ ist der Quotient aus der Streuung zwischen gemessenen und

vom Modell vorhergesagten Werten und der Streuung der Messwiederholungen.

$$\text{lack of fit } F\text{-test} = \frac{\text{lack of fit } MS}{\text{pure error } MS} \quad (\text{MS} = \text{mean of squares}) \quad (5.1)$$

Ein signifikanter „lack of fit“ bedeutet also, dass die Streuung der Messwiederholungen kleiner ist als die Streuung der Designpunkte um die vom Modell vorhergesagten Werte. Die Begründung ist in der Herstellung der Lyophilisate zu suchen: Zwar wurden alle Messungen mit  $n=3$  durchgeführt, es wurde aber nur ein Mal lyophilisiert. Der „pure error“ ist also vermutlich unterschätzt in dieser Berechnung. Wäre drei Mal lyophilisiert worden, wäre wahrscheinlich auch die Streuung der Messwiederholungen größer und somit auch der „lack of fit“ womöglich nicht mehr signifikant. Die ermittelten „adjusted R-squared“ und „predicted R-squared“-Werte liegen trotzdem so eng beieinander, dass die Daten nicht als fragwürdig eingestuft werden müssen. Für die Feinpartikeldosis sowie die Rückstände in Vial und Inhalator war eine Datentransformation nötig, um die Daten besser zu beschreiben.

Weiterhin können schwankende Messwerte dadurch begründet werden, dass das verwendete Inhalationssystem ein erster Prototyp war, der vor Beginn der Messreihe zwar schon auf Eignung getestet wurde, aber noch nicht ganz ausgereift war. So kam es insbesondere bei der abgegebenen Dosis zu starken Schwankungen, da das System aus mehreren Komponenten besteht und womöglich nicht an allen Stellen dicht war, so dass eventuell ein Teil der Aerosolwolke bei dem Dispergiervorgang aus dem System herausgetragen wurde. Dies spiegelt sich in den schlechten Werten der Modellparameter der abgegebenen Dosis wider.

Abbildung 5.1 (langsames Einfrieren) und Abbildung 5.2 (schnelles Einfrieren) zeigen einen Überblick über die ermittelten aerodynamischen Partikelgrößenverteilungen der dispergierten Lyophilisate. Es handelt sich hierbei um die mittleren Abscheidedurchmesser, die ihrer kumulativen Summenhäufigkeit nach aufgetragen sind. Aus dieser Darstellung lässt sich bei einer relativen Summenhäufigkeit von 0,5 direkt der massebezogene mittlere aerodynamische Partikeldurchmesser für jede Formulierung bei einer Flussrate von 30 l/min ablesen. Die Evaluierung der aerodynamischen Partikelgrößenverteilung führte trotz des sich noch in Entwicklung befindenden Inhalationssystems zu erfreulichen Ergebnissen hinsichtlich des lungengängigen Anteils. So konnten für die Formulierungen mit Tensid und mittlerem Feststoffanteil spontan massebezogene mittlere aerodynamische Partikeldurchmesser von  $< 5 \mu\text{m}$  erreicht werden, wie in Abbildung 5.1 und Abbildung 5.2 ersichtlich ist.

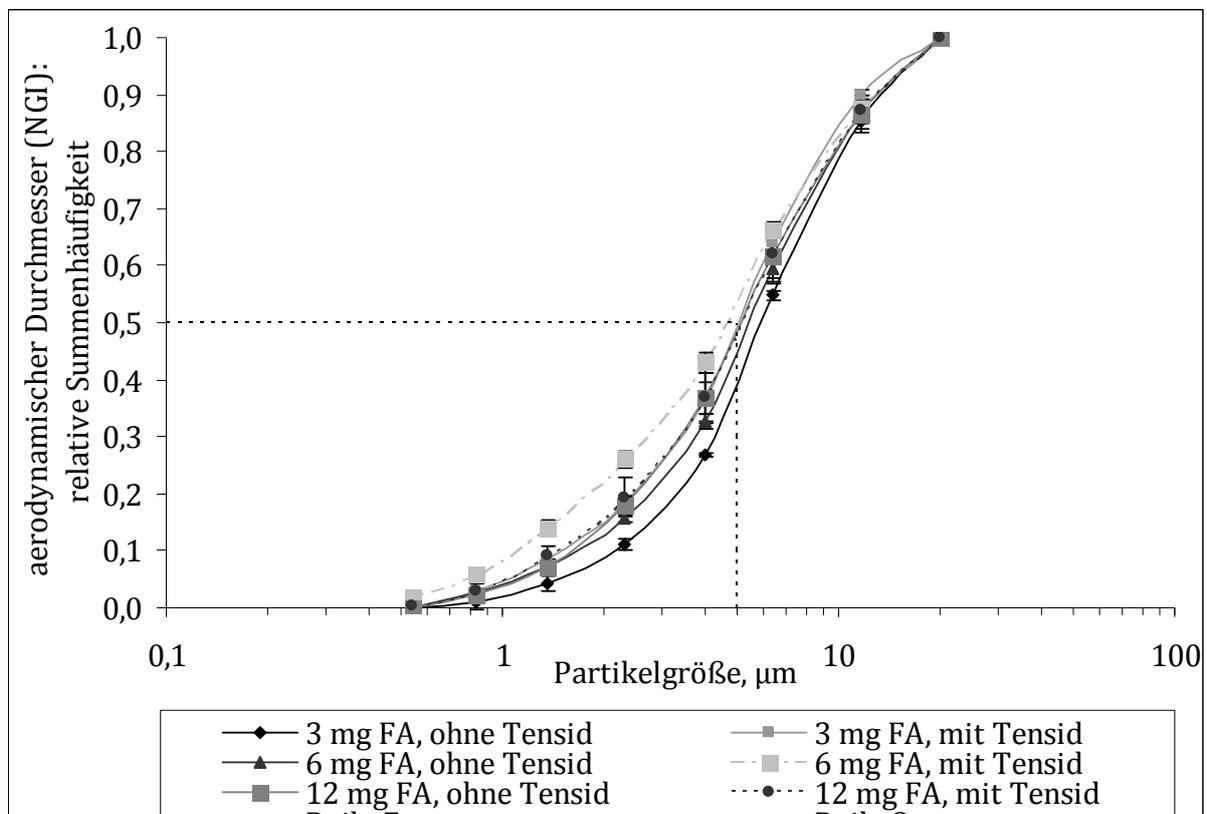


Abbildung 5.1: Vergleich der Partikelgrößenverteilungen bei **langsamer** Einfriereschwindigkeit: FA ist der Feststoffanteil in mg/ml

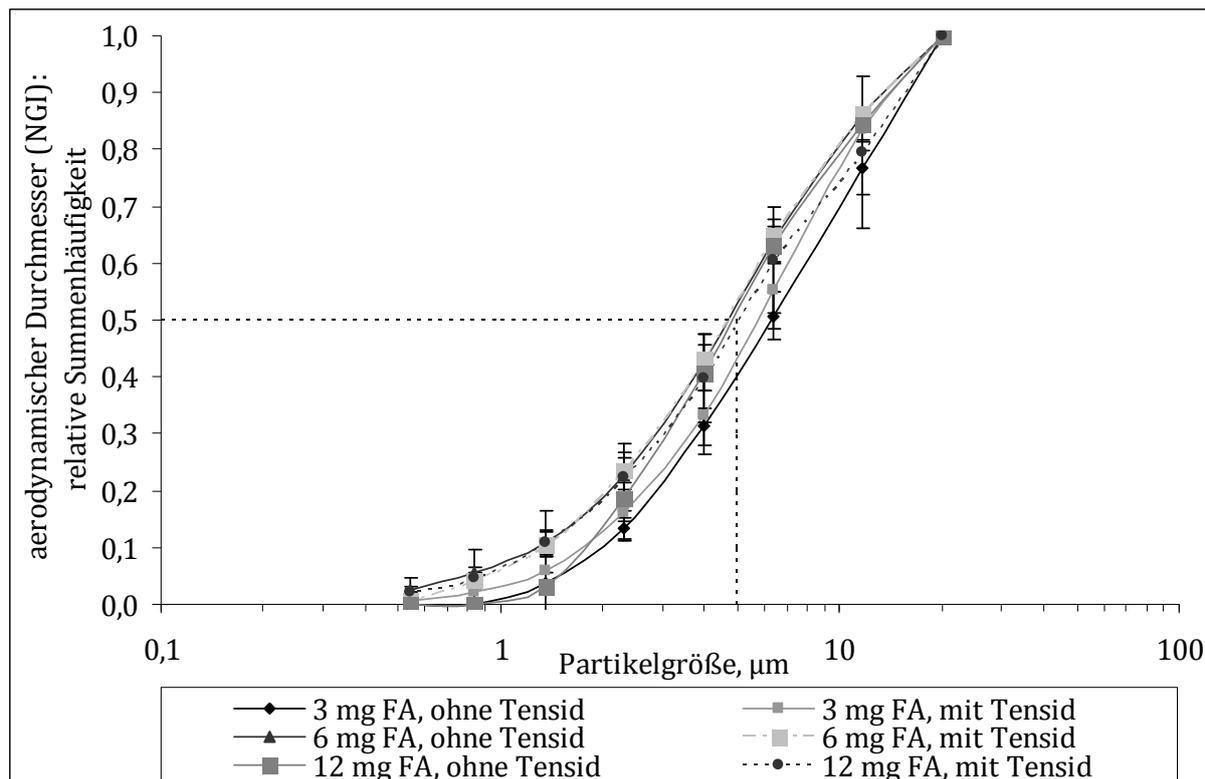


Abbildung 5.2: Vergleich der Partikelgrößenverteilungen bei **schneller** Einfriergeschwindigkeit: FA ist der Feststoffanteil in mg/ml

Auf den ersten Blick scheint langsames Einfrieren zu Dispergierung in feinere Teilchen zu führen, wobei eine mittlere Feststoffkonzentration von 6 mg/ml als besonders geeignet zu sein scheint. Auffällig ist die größere Streuung der Messwerte bei schnellem Einfrieren. Diese kommt vermutlich durch Heterogenitäten beim Einfrierprozess zustande.

### 5.1.2.1 FEINPARTIKELDOSIS

Die Feinpartikeldosis ist definiert als die Masse an Arzneistoff mit einer aerodynamischen Durchmesser  $< 5 \mu\text{m}$  und stellt somit den lungengängigen Anteil des Trockenpulveraerosols dar. Sie sollte so groß wie möglich sein. Die erreichten Werte schwanken deutlich und liegen zwischen 19 und 423  $\mu\text{g}$  pro Einzeldosis. Bei Zugrundelegung der ausgewiesenen Dosis von 1000  $\mu\text{g}$  entsprechen diese Werte lungengängigen Anteilen von 1,9 bis 42,3%. Letzterer Wert entspricht ungefähr dem Wert, den das inhalierbare Insulin-Marktprodukt Exubera<sup>®</sup> der Firma Pfizer erreicht hat (Klingler, 2009).

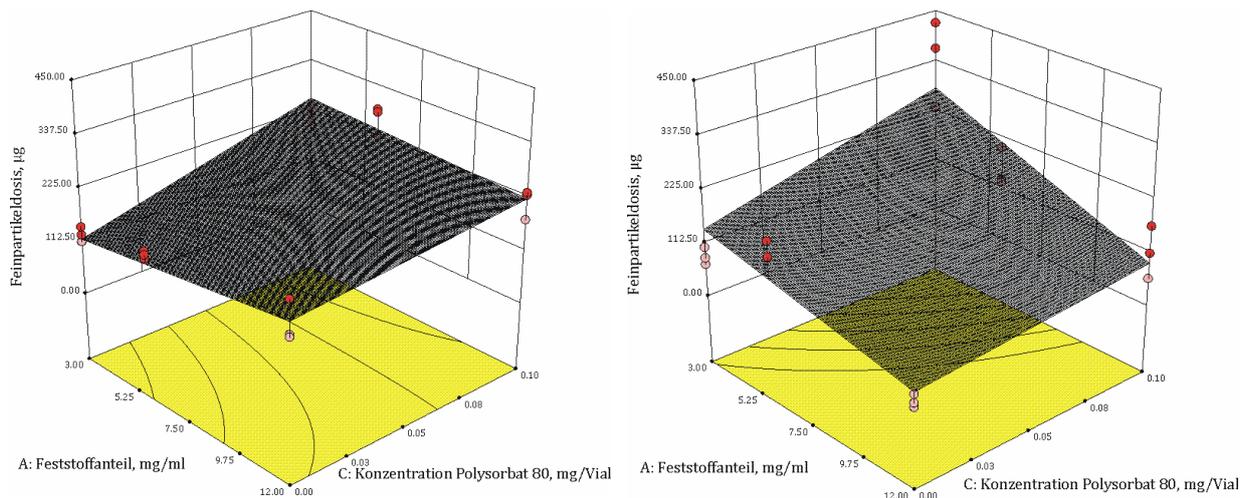


Abbildung 5.3: Einfluss der Feststoff- und Tensidkonzentration auf die Feinpartikeldosis: **links bei langsamer, rechts bei schneller** Kühlrate

Die statistische Auswertung legt einen signifikanten Einfluss aller drei Faktoren nahe. Der Einfluss des Polysorbates 80 (Faktor C) auf die Feinpartikeldosis war mit einem p-Wert von  $< 0,0001$  am größten, gefolgt von der Einfriergeschwindigkeit (B) ( $p = 0,0006$ ) und dem Feststoffanteil (A) ( $p = 0,0042$ ). Die Interaktion zwischen dem Feststoffanteil und der Einfriergeschwindigkeit hat ebenfalls einen hoch signifikanten Einfluss ( $p = 0,0005$ ). Insgesamt streuen die Messwerte bei langsamer Einfriergeschwindigkeit weitaus weniger als bei schneller Einfriergeschwindigkeit. Bei langsamer Kühlrate (Abbildung 5.3 links) sind die gemessenen Feinpartikeldosen bei Zugabe von Polysorbat 80 am größten und der Einfluss des Feststoffanteils tritt etwas in den Hintergrund. Bei Fehlen von Polysorbat 80 liegen die Werte um etwa  $100 \mu\text{g}$  (was einem Zehntel der Gesamtdosis entspricht) niedriger. Der Einfluss des Feststoffanteils ist nicht so ausgeprägt wie anfänglich vermutet. Eine hohe Konzentration führt zu etwas höheren Messwerten. Bei schneller Einfriergeschwindigkeit zeigt sich ein stärkerer Einfluss der Feststoffkonzentration. Hohe Konzentrationen führen hier im Gegensatz zu langsamer Einfriergeschwindigkeit zu drastisch niedrigen Feinpartikeldosen, was durch das bereits erwähnte Schrumpfen

des Lyophilisates begründet werden kann. Die Gegenwart von Tensid führt auch hier zu einer deutlich besseren Dispergierbarkeit.

### 5.1.2.2 ABSOLUTE FEINPARTIKELFRAKTION

Die absolute Feinpartikelfraktion ist der Quotient aus Feinpartikeldosis und der deponierten Totaldosis, also der Summe aller Abscheideschalen, des Vorabscheiders, des Rachens, des Inhalators und des Vials, multipliziert mit 100, um eine Prozentangabe zu erhalten.

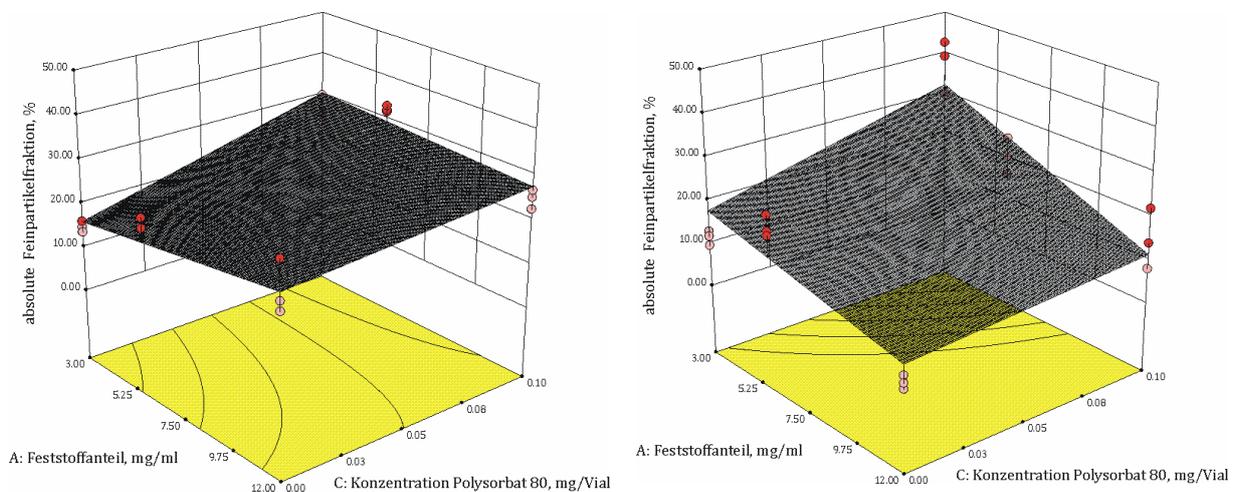


Abbildung 5.4: Einfluss der Feststoff- und Tensidkonzentration auf die absolute Feinpartikelfraktion: **links bei langsamer, rechts bei schneller** Kühlrate

Die ermittelten FPF-Werte liegen zwischen 4 und 42%, wobei analog zur FPD der Einfluss des Polysorbates auf die erfolgreiche Dispergierung in lungengängige Partikel am größten ist, gefolgt von Einfriereschwindigkeit und Feststoffkonzentration. Die Interaktion aus Feststoffanteil und Einfriereschwindigkeit hat ebenfalls einen hoch signifikanten Einfluss ( $p = 0,0005$ ). Langsames Einfrieren führt bei steigender Feststoffkonzentration bei Fehlen von Tensid zu einer Erhöhung der FPF, während schnelles Einfrieren zu einer Verringerung führt. Ist Tensid zugegen, sinkt bei steigender Feststoffkonzentration die FPF bei langsamem Einfrieren nur leicht, während sie bei schnellem Einfrieren stark fällt.

### 5.1.2.3 RELATIVE FEINPARTIKELFRAKTION

Die relative Feinpartikelfraktion ist der Quotient aus Feinpartikeldosis und der abgegebenen Dosis. Sie liegt also immer höher als die absolute FPF, da sie Rückstände im Vial und Inhalator nicht berücksichtigt.

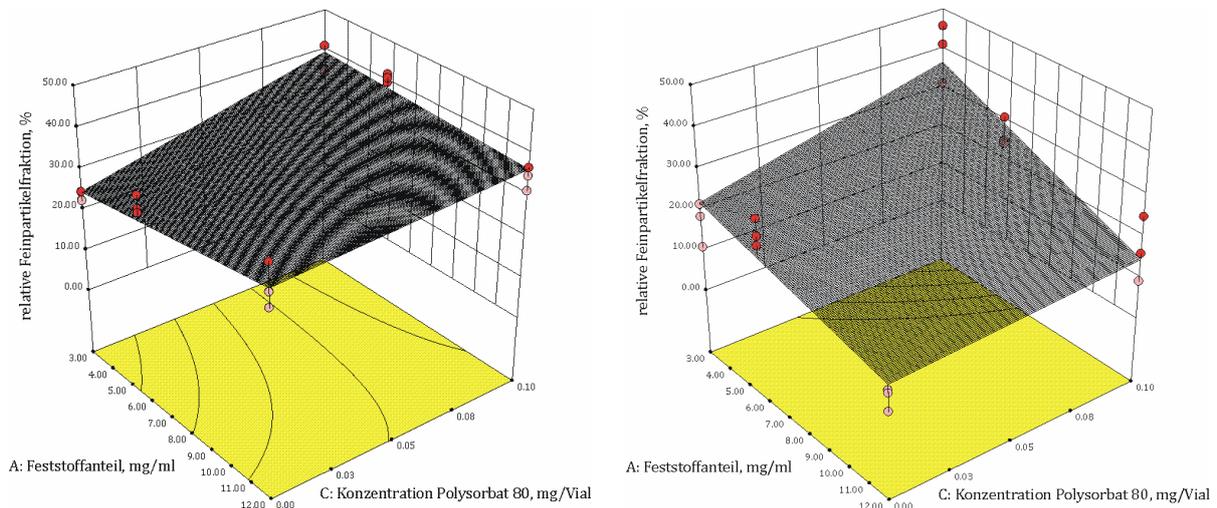


Abbildung 5.5: Einfluss der Feststoff- und Tensidkonzentration auf die relative Feinpartikelfraktion: **links bei langsamer, rechts bei schneller** Kühlrate

Die Faktoren B und C sowie die Interaktion AB zeigen einen höchst signifikanten Einfluss mit  $p < 0,0001$ . Faktor A zeigt mit  $p = 0,026$  einen signifikanten Einfluss. Unter langsamem Einfrieren und Fehlen von Tensid sinkt die relative FPF mit steigender Feststoffkonzentration, wohingegen sie bei dessen Anwesenheit leicht steigt. Bei schnellem Einfrieren sinkt sie mit steigendem Feststoffanteil deutlich, gleichgültig, ob Polysorbat 80 zugegen ist oder nicht. Bei geringem Feststoffanteil von 3 oder 6 mg hat die Anwesenheit in jedem Fall einen deutlich positiven Einfluss auf die Zielgröße.

### 5.1.2.4 ABGEBEBENE DOSIS

Das Modell für die abgegebene Dosis zeigte die schlechteste Korrelation zwischen tatsächlich gemessenen und vom Modell vorhergesagten Werten. Wie bereits erwähnt, liegt die Ursache in der Undichtigkeit des Inhalationssystems, die zu Verlust an Aerosolpartikeln führte. Die statistische Auswer-

tung ergibt nur für die Konzentration von Polysorbat 80 einen signifikanten Einfluss ( $p = 0,001$ ). Generell liegen die erhaltenen Werte der abgegebenen Dosis bei dessen Anwesenheit höher. Schnelles Einfrieren führt bei steigendem Feststoffanteil zu kleineren abgegebenen Dosen, während bei langsamem Einfrieren leicht höhere Werte ermittelt werden konnten.

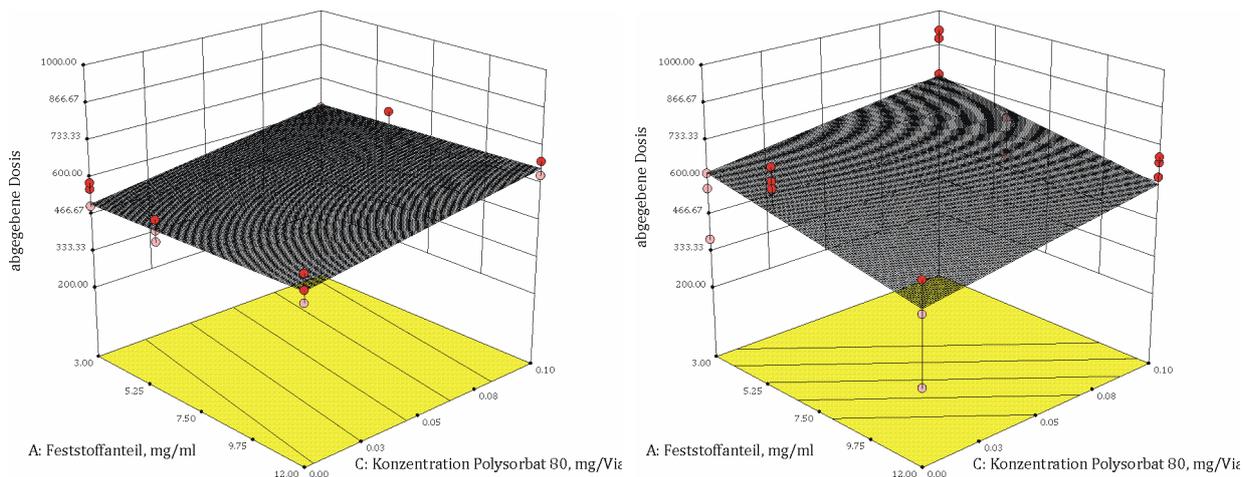


Abbildung 5.6: Einfluss der Feststoff- und Tensidkonzentration auf die abgegebene Dosis: **links bei langsamer, rechts bei schneller** Kühlrate

### 5.1.2.5 RACHENDEPOSITION

Der Teil des Aerosols, der schon im Rachen des NGI impaktierte, zeigte eine hoch signifikante Abhängigkeit aller Hauptfaktoren Feststoffanteil A ( $p = 0,0031$ ), der Einfriereschwindigkeit B ( $p = < 0,0001$ ) und der Anwesenheit von Polysorbat 80 ( $p = 0,0291$ ). Die Interaktion aus AC ( $p = 0,0006$ ) zeigt ebenfalls einen hoch signifikanten Einfluss auf die Rachendeposition. Abbildung 5.7 illustriert sehr deutlich die geringere Abscheidung, wenn eine schnelle Einfriereschwindigkeit angewandt wurde. Die Abwesenheit von Polysorbat 80 sorgt bei steigender Feststoffkonzentration für signifikant geringere Deposition. Dies darf aber nicht als positiv bewertet werden, da die Begründung in der nicht vollständigen Dispergierung zu suchen ist. Bei Anwesenheit des Tensids bleibt die Rachendeposition unabhängig von der Feststoffkonzentration relativ konstant. Auch bei langsamer Einfriereschwindigkeit ist dieses Phänomen zu beobachten. Mit Depositionswerten

von 0 bis 121  $\mu\text{g}$  Insulin ist die Rachendeposition hohen Schwankungen unterworfen.

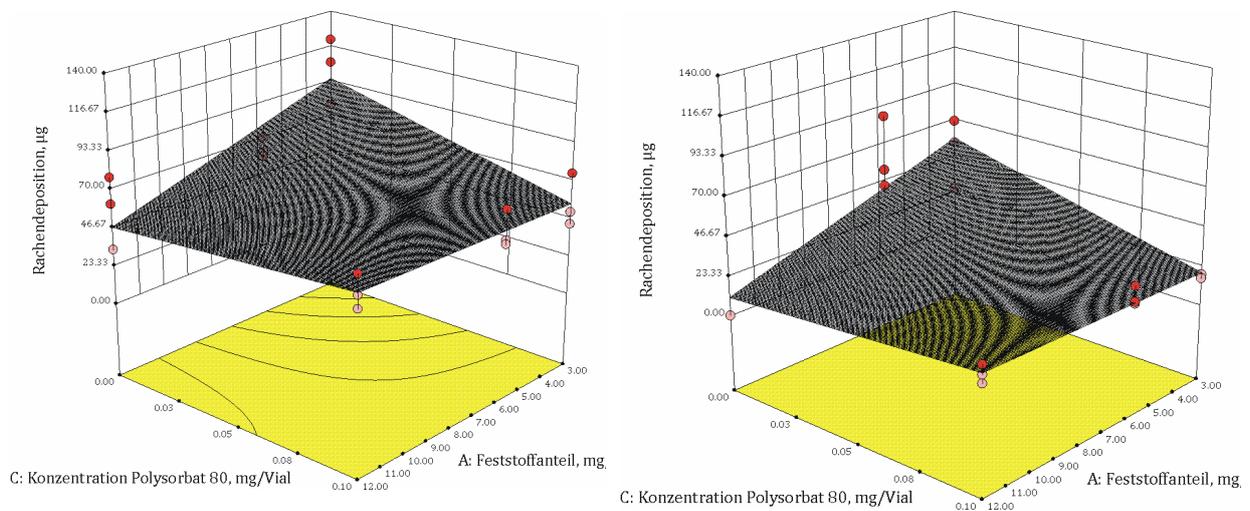


Abbildung 5.7: Einfluss der Feststoff- und Tensidkonzentration auf die Rachendeposition: **links** bei **langsamer**, **rechts** bei **schneller** Kühlrate

### 5.1.2.6 RÜCKSTAND IM INHALATOR

Der Rückstand im Inhalator ist so gering wie möglich zu halten. Sowohl die Konzentration an Polysorbat 80 ( $p = 0,0005$ ), als auch die Wechselwirkung aus dieser und der Einfriergeschwindigkeit ( $p = 0,0045$ ) haben einen signifikanten Einfluss auf die Deposition (Abbildung 5.8). Die Rückstände sind mit etwa 200  $\mu\text{g}$  besonders hoch bei geringer Feststoffkonzentration und Abwesenheit von Polysorbat 80, unabhängig von der Einfriergeschwindigkeit. Wie bereits erwähnt, unterlagen die schnell eingefrorenen Lyophilisate starkem Schrumpfen, so dass durch den Verlust der Porosität die Dispergierung nur unvollständig ablief. Daher wurden teils undispergierte „Kuchensstücke“ im Inhalator gefunden, die den Rückstand in die Höhe trieben. Der geringste Rückstand konnte bei schnellem Einfrieren und 0,1 mg Polysorbat 80 pro Lyophilisat erreicht werden.

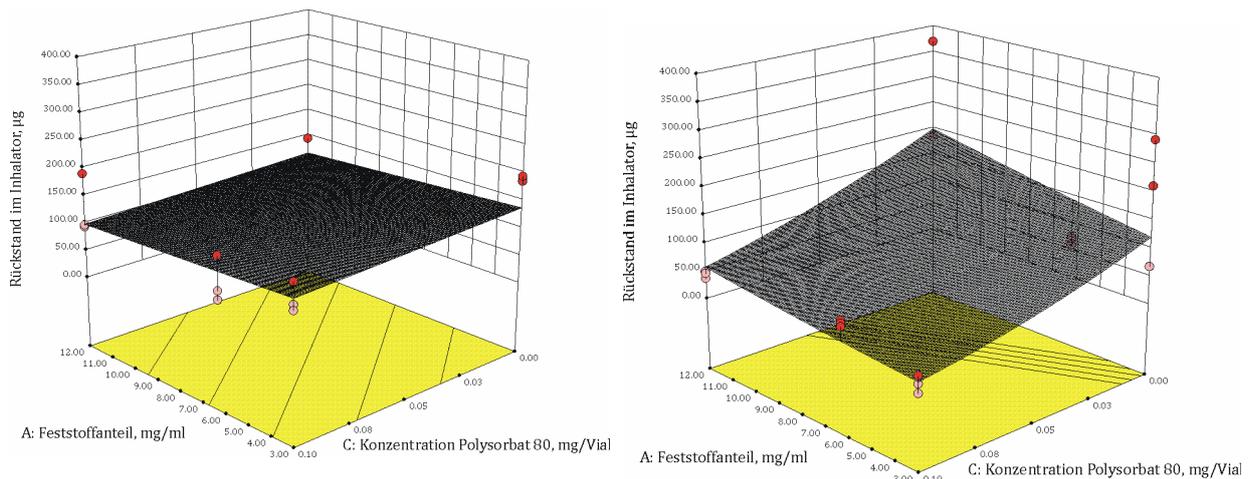


Abbildung 5.8: Einfluss der Feststoff- und Tensidkonzentration auf den Rückstand im Inhalator: **links** bei **langsamer**, **rechts** bei **schneller** Kühlrate

### 5.1.2.7 RÜCKSTAND IM VIAL

Der Rückstand im Vial sollte im besten Fall so gering wie möglich sein.

Abbildung 5.9 zeigt den Einfluss der Faktoren auf den Rückstand im Vial.

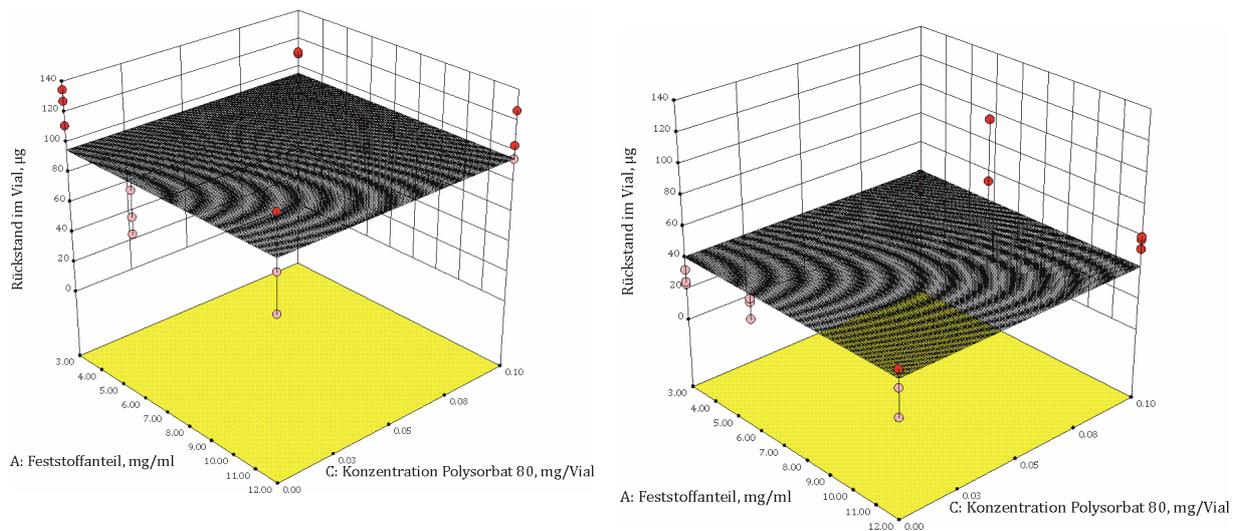


Abbildung 5.9: Einfluss der Feststoff- und Tensidkonzentration auf den Rückstand im Vial: **links** bei **langsamer**, **rechts** bei **schneller** Kühlrate

Im Gegensatz zu den bereits evaluierten Parametern sind die Responseflächen (grau) parallel zu den Hilfslinien der Achsen, was auf das Fehlen von Zwei-Faktor-Wechselwirkungen schließen lässt. Tatsächlich hat nur die Einfriergeschwindigkeit einen höchst signifikanten Einfluss ( $p < 0,0001$ ) auf den Rückstand im Vial nach Dispergierung in den Spacer. Dieser Rückstand fällt wesentlich kleiner aus, wenn die Lösungen in flüssigem Stickstoff

eingefroren wurden. Ein schnelleres Einfrieren resultiert in reduzierter Proteinadsorption an der Glaswandung: Es ließ sich bei den auf der Stellfläche eingefrorenen Proben stets ein weißer „Saum“ im Vial beobachten, der sich auf Höhe des ehemaligen Füllvolumens befand. Dieser „Saum“ war in den mittels LN<sub>2</sub> eingefrorenen Proben nicht in der Deutlichkeit zu erkennen.

### 5.1.2.8 MMAD

Bezüglich des massebezogenen mittleren aerodynamischen Durchmessers konnte kein Modell gebildet werden, was die ermittelten Daten gut beschreibt. Die Werte schwanken grob zwischen 4 und 7 µm.

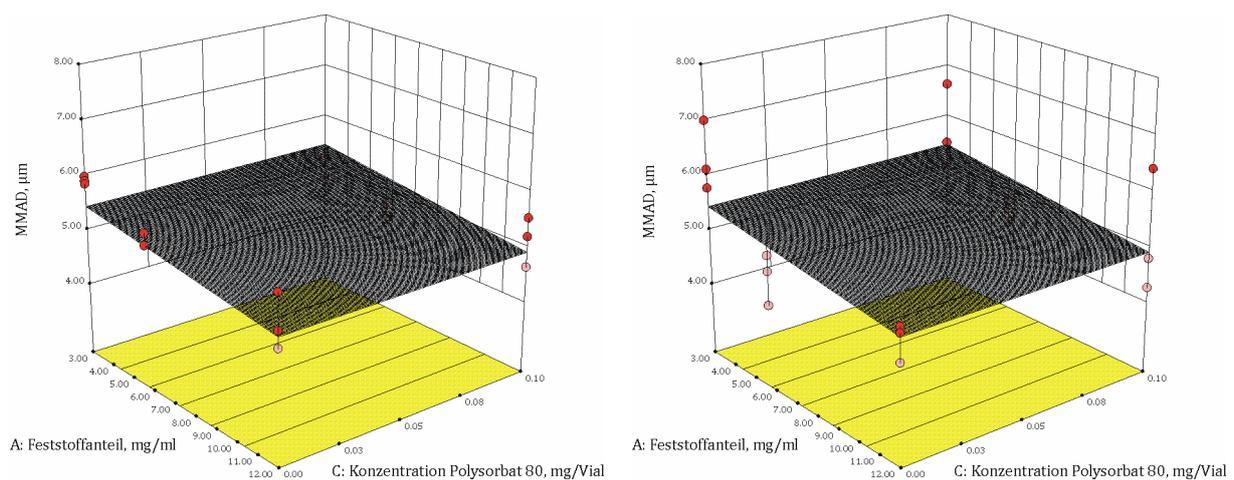


Abbildung 5.10: Einfluss der Feststoff- und Tensidkonzentration auf den MMAD: **links** bei **langsamer**, **rechts** bei **schneller** Kühlrate

Die Varianzanalyse ergibt einen schwach signifikanten Einfluss der Feststoffkonzentration ( $p = 0,0497$ ). Die errechneten MMADs sind kleiner bei schneller Einfriergeschwindigkeit und unerwarteterweise auch bei steigender Feststoffkonzentration. Die Begründung für die schlechte Korrelation ist in der Berechnung des MMADs zu suchen. Die verwendete Software CITDAS (Copley Scientific Ltd., Nottingham, UK, Version 3.00) berücksichtigt für dessen Kalkulation die Deposition auf den Abscheideschalen eins bis acht, nicht aber jene des Vorabscheiders und des Rachens. Kommt es nun,

wie im vorliegenden Fall, zu einem teils hohen Maß an Deposition im Rachen, wird ein beträchtlicher Teil des Aerosols nicht mit einbezogen. Folglich ist der resultierende MMAD fälschlicherweise zu niedrig berechnet. Das Modell ist also bedingt aussagekräftig.

### **5.1.2.9 EINFLUSS VON ADDITIVEN AUF DIE AEROSOLISIERBARKEIT**

Zusätzlich zu dem statistischen Versuchsplan wurden separat noch Impaktionsanalysen in Dreifachbestimmungen zur Überprüfung des Einflusses verschiedener Additive auf die Aerosolisierbarkeit durchgeführt. Um den beschriebenen Einfluss der Feststoffkonzentration auf die Aerosolisierbarkeit für die Untersuchung dieser Fragestellung zu eliminieren, wurden die aus Kapitel 4.4 bekannten Formulierungen auf eine identische Feststoffkonzentration von 6 mg/ml und einem Insulingehalt von 1 mg pro Einzeldosis normalisiert. Formulierung 1 wurde dementsprechend aus 0,5 ml Lösung lyophilisiert, während Formulierungen 2 und 3 aus 0,67 ml lyophilisiert wurden. Der Gehalt an Polysorbat 80 wurde auf 0,1 mg pro Lyophilisat eingestellt. Zur Aerosolisierung wurde dieses Mal allerdings ein Prototyp des atemzuggesteuerten Inhalators verwendet. Während die erreichten MMADs bei aktiver Dispergierung noch zwischen 4 bis 7  $\mu\text{m}$  lagen, konnte dieser Prototyp des atemzuggesteuerten Inhalators in ersten Untersuchungen das Lyophilisat nur in Partikel mit einem MMAD von 8 bis 10  $\mu\text{m}$  dispergieren. Formulierung 2, die neben L-Glutaminsäure noch myo-Inositol enthielt, zeigte eine schlechtere Aerosolisierbarkeit (Abbildung 5.11 und Abbildung 5.12), was in dem in Kapitel 4 beschriebenen Mikrokolaps und „shrinkage“ begründet ist.

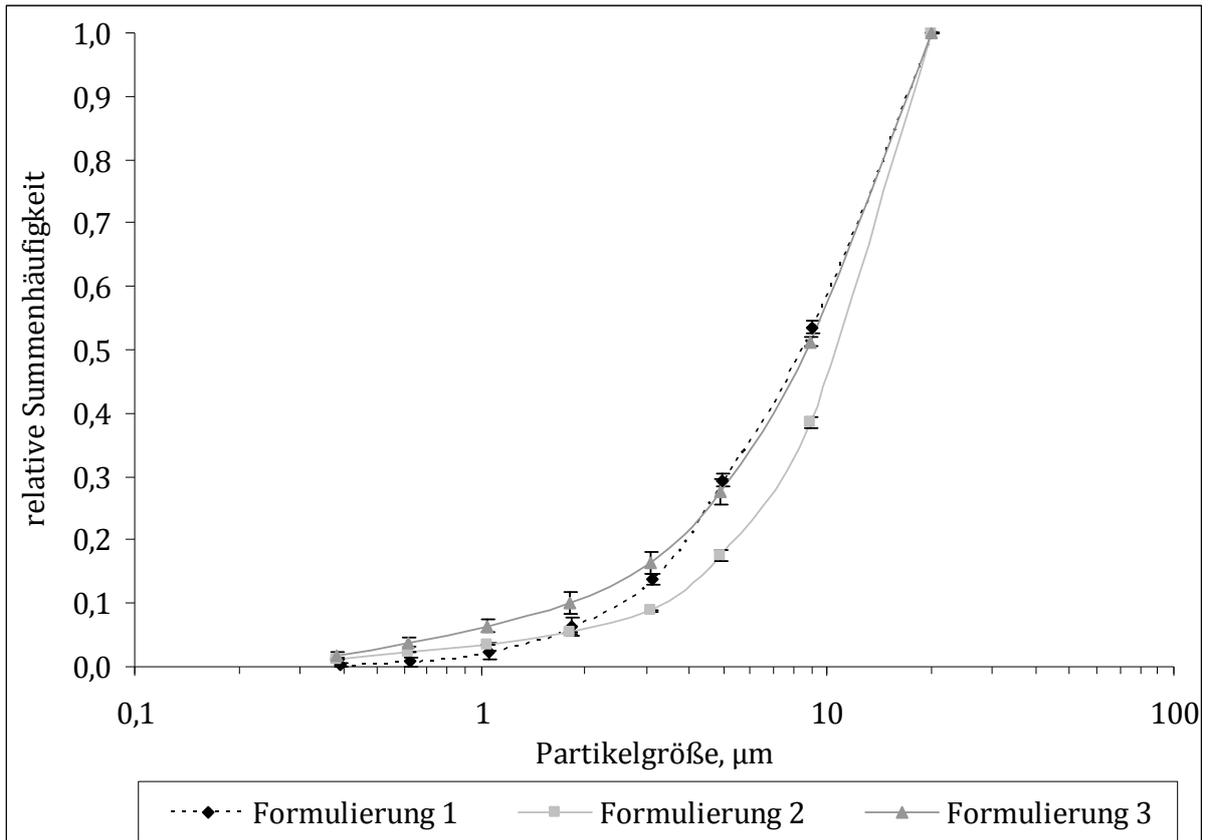


Abbildung 5.11: Einfluss von L-Leucin (Formulierung 3) und myo-Inositol (Formulierung 2) auf die Aerosolisierbarkeit der Standardformulierung 1

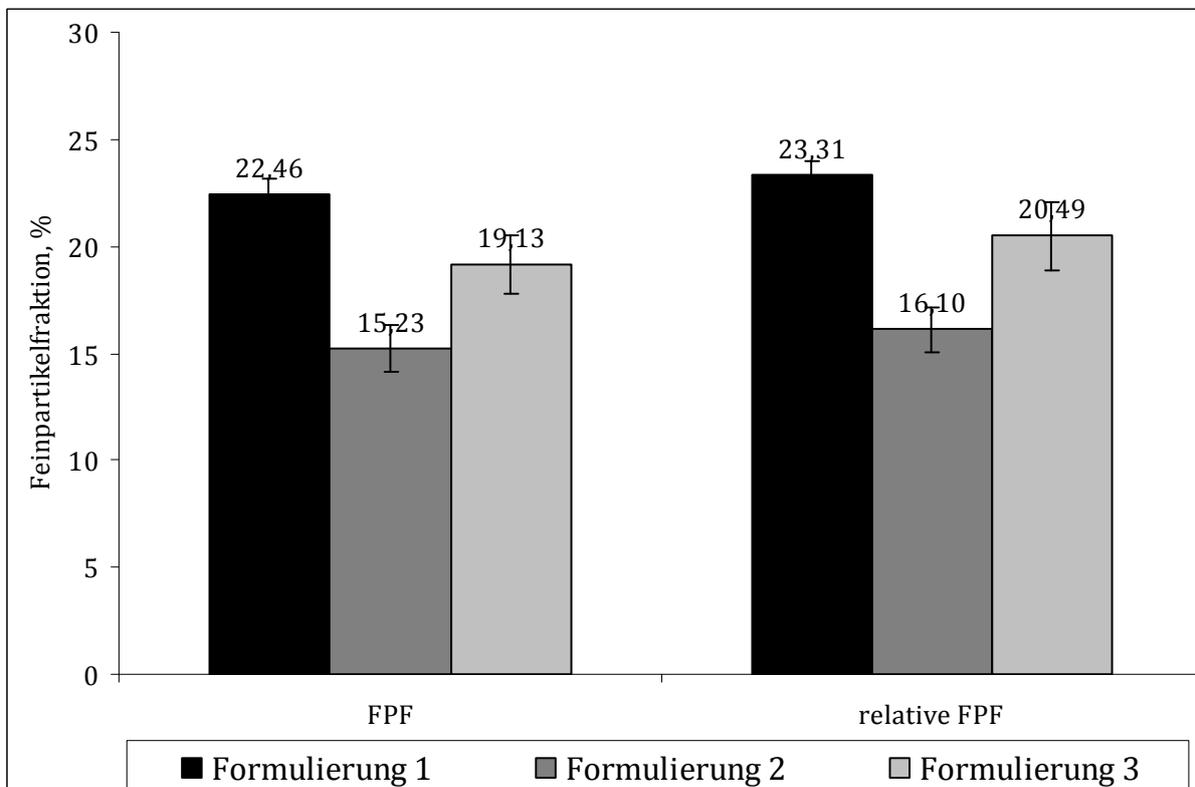


Abbildung 5.12: Feinpartikelfractionen der Formulierungen 1-3 im Vergleich

Die erhaltene Feinpartikelfraktion lag mit etwa 15% deutlich niedriger als die der Formulierungen 1 und 3. Formulierung 3 mit L-Leucin zeigte im Partikelgrößenbereich  $< 5 \mu\text{m}$  leicht höhere Summenhäufigkeitswerte und einen fast identischen MMAD wie Formulierung 1 (8,6 vs 8,3  $\mu\text{m}$ ), führte jedoch zu etwas niedrigeren Feinpartikelfraktionen. Der von Seville *et al.* (2007) beschriebene positive Einfluss des L-Leucins auf die Aerosolisierbarkeit von sprühgetrockneten Präparaten war in diesen Untersuchungen statistisch nicht signifikant und konnte daher für lyophilisierte Zubereitungen nicht bestätigt werden. Die höchsten und damit erstrebenswertesten Werte erreichte die Formulierung 1 ohne zusätzliche Hilfsstoffe.

### **5.1.2.10 EINFLUSS DER LAGERUNG AUF DIE AEROSOLISIERBARKEIT**

Um den Einfluss von erschwerten Lagerungsbedingungen auf die Aerosolisierbarkeit zu untersuchen, wurde Formulierung 1 für jeweils zwei und vier Wochen bei 25°C und 60% und bei 40°C und 75% relativer Luftfeuchtigkeit offen eingelagert. Für diese Untersuchungen wurde die finale Version des atemzuggesteuerten Inhalators verwendet, die in Kapitel 7.4.2 beschrieben ist. Die Lagerung bei 25°C und 60% relativer Feuchte, welche der subtropisch-mediterranen Klimazone II entspricht (Grimm, 1998), führte nur zu geringen Schwankungen der Feinpartikeldosis (Abbildung 5.13). Die leichte Erhöhung derer nach zwei und vier Wochen Lagerung ist nicht signifikant. Zum Vergleich sind noch die Gesamtdosis und die abgegebene Dosis mit aufgeführt. Die Lagerung bei 40°C und 75% relativer Feuchte entsprechend beschleunigter Lagerung nach den ICH-Richtlinien Q1A (EMA, 2003) zeigte deutlichere Auswirkungen auf die Dispergierbarkeit (Abbildung 5.14). Die Feinpartikeldosis stieg nach zwei Wochen Lagerung leicht an, was aber nur durch Messschwankungen begründet werden kann. Nach vier Wochen verringerte sie sich jedoch deutlich unter Zunahme der Streuung

der Messwerte. Die Gesamtdosis sowie die abgegebene Dosis sanken gleichermaßen.

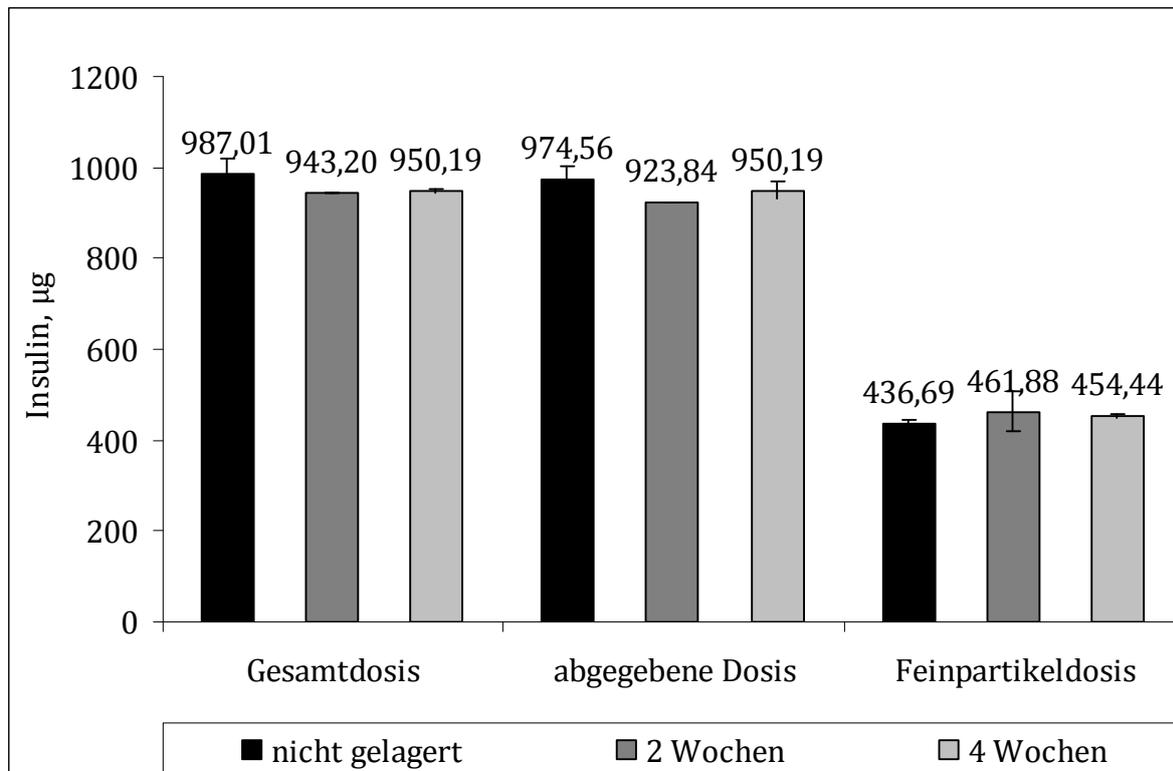


Abbildung 5.13: Lagerung der Formulierung 1 bei 25°C und 60% relativer Feuchte

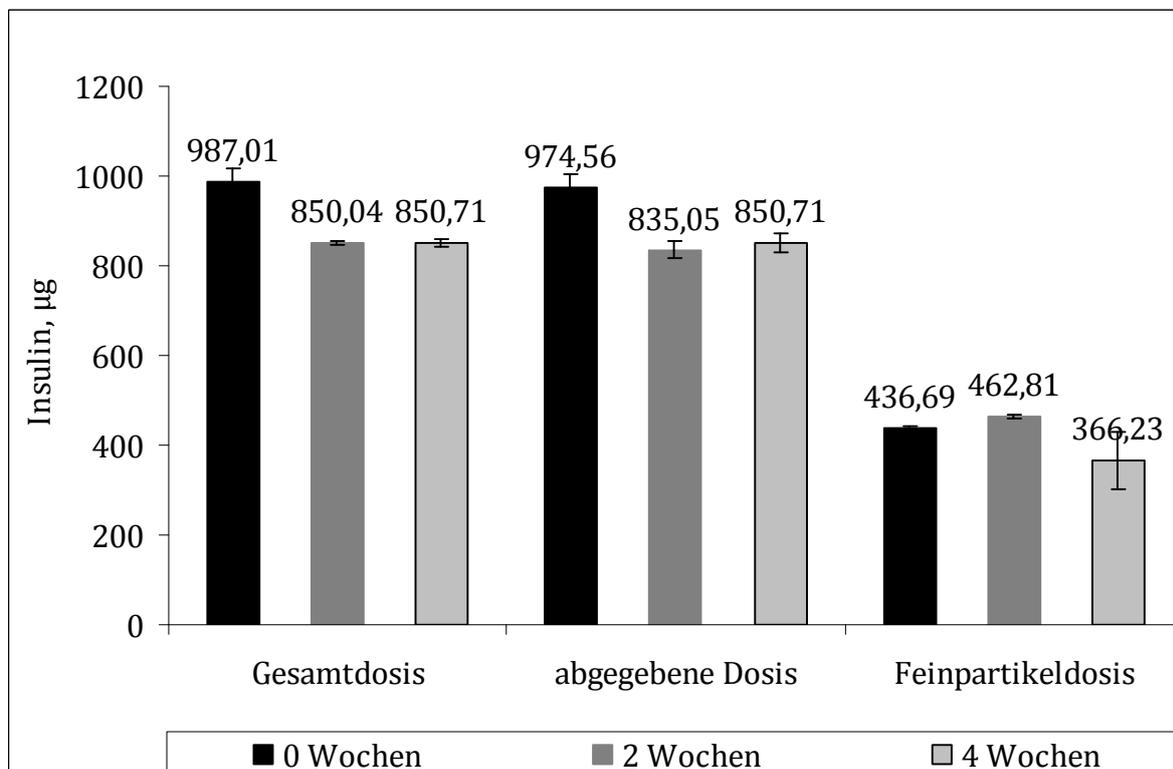


Abbildung 5.14: Lagerung der Formulierung 1 bei 40°C und 75% relativer Feuchte

### 5.1.2.11 CHARAKTERISIERUNG DES ERZEUGTEN AEROSOLS

Die Besonderheit der aerosolisierten Lyophilisatpartikel ist deren sehr geringe Dichte. Abbildung 5.15 zeigt beispielhaft im NGI deponierte Aerosolpartikel. Die für diesen Zweck dispergierte Formulierung 1 enthielt 6 mg/ml Feststoff. Das heißt, die Gefriertrocknung hinterlässt bei Prozessende ein Lyophilisat, das 6 mg Feststoff mit einem Volumen von 1 ml enthält, entsprechend einer Dichte von  $0,006 \text{ g/cm}^3$ . Damit hat das entwickelte Lyophilisat eine nur ca. fünf mal höhere Dichte als Luft, die unter Normbedingungen eine Dichte von  $0,0013 \text{ g/cm}^3$  aufweist (Stöcker, 2007). Formel (5.2) zeigt noch einmal die Berechnung des aerodynamischen Durchmessers:

$$d_a = d_g \sqrt{\frac{\rho}{\lambda \rho_s}} \quad (5.2)$$

Bei Annahme von  $d_a = 5 \text{ }\mu\text{m}$  und  $\rho = 0,006 \text{ g/cm}^3$  wird unter Vernachlässigung des dynamischen Formfaktors einen Wert von etwa  $64 \text{ }\mu\text{m}$  für  $d_g$  erhalten. Das bedeutet, dass sich selbst Lyophilisatpartikel mit einem geometrischen Partikeldurchmesser von  $64 \text{ }\mu\text{m}$  verhalten wie ein kugelförmiges Partikel mit einem  $d_a$  von  $5 \text{ }\mu\text{m}$ . Dies spiegelt sich in den REM-Aufnahmen wider. Bei einem Vergleich der bei einer Flussrate von  $30 \text{ l/min}$  ermittelten cut-off-Durchmesser aus Tabelle 5.2 mit den Durchmessern der Partikel auf den Abscheideschalen wird der Einfluss der Dichte deutlich: Auf Stage 3 mit einem cut-off von  $6,395 \text{ }\mu\text{m}$  finden sich teils Partikel von  $100 \text{ }\mu\text{m}$  Durchmesser. Dieser deutliche Unterschied in den geometrischen und aerodynamischen Partikelgrößen bestätigt sich auch auf den anderen Abscheideschalen.

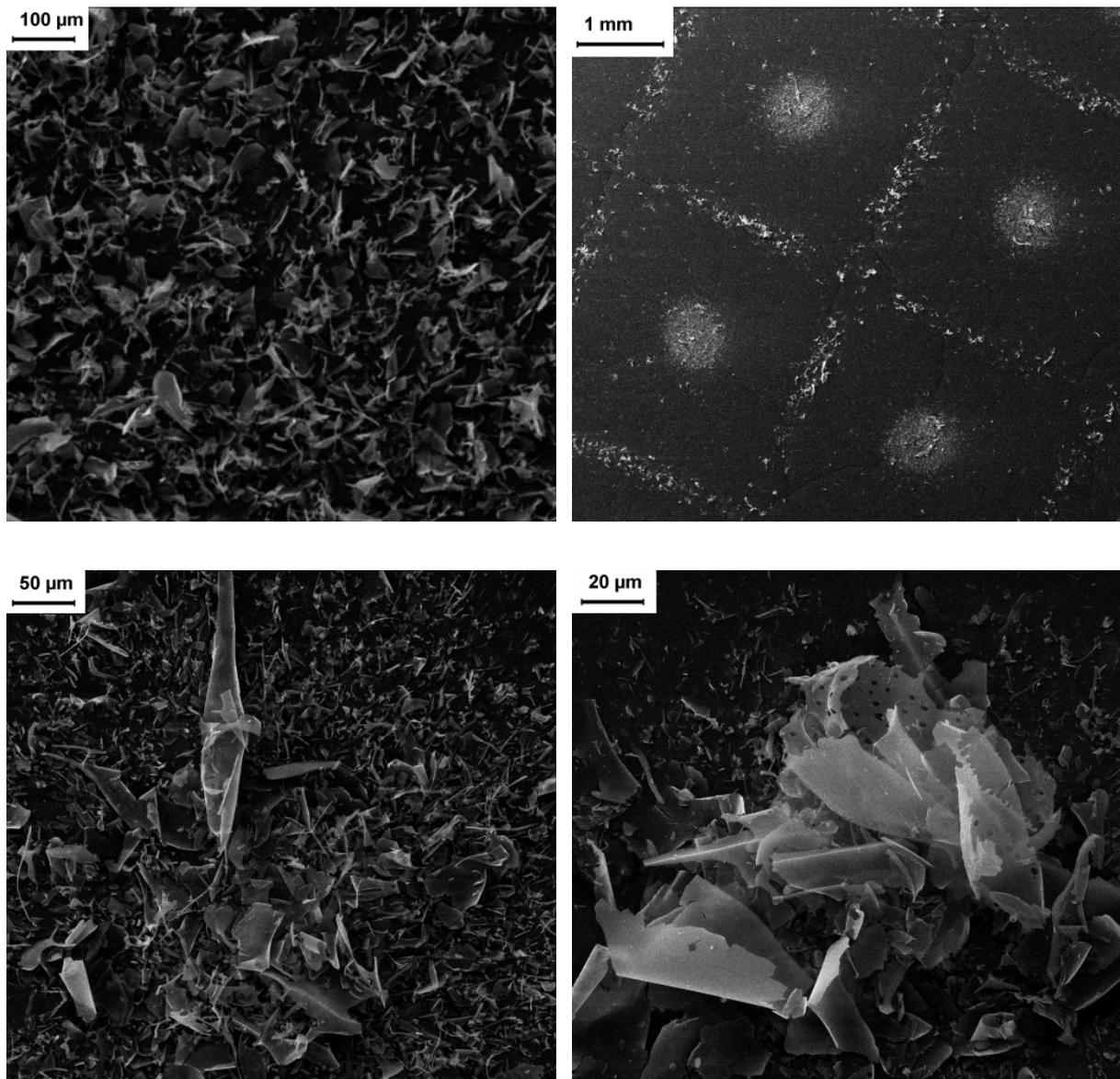


Abbildung 5.15: REM-Aufnahmen der im NGI deponierten Aerosolpartikel aus Formulierung 1, langsam eingefroren, mit Polysorbat 80, Feststoffkonzentration 6 mg/ml: links oben Abscheideschale 3, rechts oben eine Übersicht über das durch die Düsen erzeugte Depositionsmuster von Abscheideschale 6; links unten Abscheideschale 5 und rechts unten Abscheideschale 7

## 5.2 ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die beschriebenen Untersuchungen zur Aerosolisierbarkeit beweisen, dass Lyophilisate geeignete Darreichungsformen zur direkten Dispergierung in Trockenpulveraerosole darstellen. Sie besitzen eine sehr große Oberfläche und haben eine geringe Dichte. Die hohe Porosität, die sich aus der geringen Dichte ergibt, in Kombination mit dem amorph vorliegenden Insulin führt

zu einer hohen Lösungsgeschwindigkeit und folglich einer rapiden Absorption des Wirkstoffes in den Blutkreislauf. Die Bioverfügbarkeit kann über 80% betragen (Rabinowitz *et al.*, 2006). Es gibt jedoch, von dem Patent von Yamashita *et al.* (2003) abgesehen, keine Literatur zur direkten Aerosolisierung gefriergetrockneter Produkte. Im Rahmen dieser Untersuchungen hat sich die Gefriertrocknung als geeignetes Verfahren zur Herstellung von Trockenpulveraerosolen erwiesen. Es konnten Lyophilisate von sehr geringer Dichte hergestellt werden, die mit einem eigens entwickelten Inhalationssystem ohne Optimierungsversuche im besten Fall schon knapp 42% Feinanteil < 5 µm nach Dispergierung in ein Trockenpulveraerosol aufwiesen. Die Auswertung des für die Evaluierung der Aerosolisierbarkeit erstellten Versuchsplanes enthüllte für die Beurteilung der Aerosolisierbarkeit wichtigsten Parameter FPD und FPF statistische Signifikanz für alle drei Faktoren. Dabei stellte sich die Anwesenheit von Polysorbat 80 in einer Konzentration von nur 0,1% als besonders positiv hinsichtlich der Dispergierbarkeit heraus. Die Anwesenheit des Tensids erhöhte den lungengängigen Anteil im Schnitt um 60%, wenn die Mittelwerte der Messungen mit Polysorbatanteil mit denen ohne Polysorbat verglichen wurden. Die erlangten Feinpartikeldosen (zusammengefasst in Abbildung 5.16) zeigten eine Überlegenheit der langsam eingefrorenen Chargen mit Ausnahme der schnell eingefrorenen Proben mit 3 mg/ml Feststoffanteil und Anwesenheit von Polysorbat 80. Während sonst im Durchschnitt etwa 170 µg des Insulins lungengängig waren, betrug die FPD bei dieser Charge ungewöhnliche 340 µg bei hoher Streuung der Messwerte. Üblicherweise würde diese Charge als geeignetsten aus einer derartigen Evaluierung herausgehen; Trotz dieser hohen FPD wird von einer weiteren Verwendung dieser Charge abgesehen. Die Lyophilisate waren, wie alle schnell eingefrorenen Proben, nach kurzer Lagerung von einigen Wochen stark zusammengeschrumpft. Ein Erklärungsansatz ist das Ausbleiben der Teilkristallisation

der L-Glutaminsäure, die maßgeblich die Kuchenstruktur aufrechterhält, beim Schockgefrieren mit LN<sub>2</sub>. Vollständige Amorphie konnte jedoch nur für die Formulierung mit einem Feststoffanteil von 3 mg/ml ohne Tensid nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

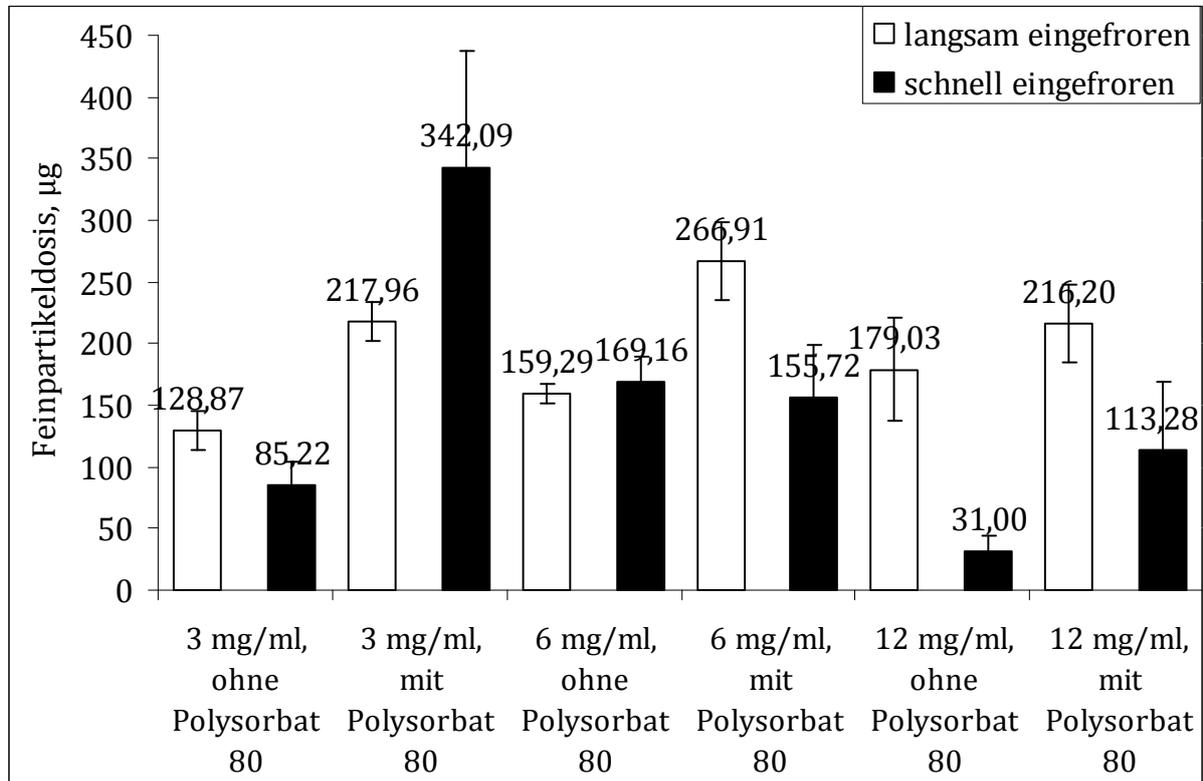


Abbildung 5.16: Übersicht über die erreichten Feinpartikeldosen nach Dispergierung; n=3

Abbildung 5.17 unten zeigt die stark kollabierten Lyophilisate nach 15-monatiger Lagerung bei Raumtemperatur. Der Produktkollaps ist hinsichtlich der Lagerstabilität ein Ausschlusskriterium, daher wird für folgende Untersuchungen von der Einfrieremethode via flüssigen Stickstoff abgesehen. Die auf der Stellfläche langsam eingefrorenen Proben (Abbildung 5.17 oben) hingegen sind auch nach 15 Monaten Lagerung nicht kollabiert und zeigen das gleiche Erscheinungsbild wie nach Produktion. Des Weiteren hat die Feststoffkonzentration bei präferiertem langsamem Einfrieren und Polysorbatanteil von 0,1 mg pro Einzeldosis nur geringen Einfluss auf die FPD bei leichter Überlegenheit der geringeren Anteile. Daher wird sich

für die mittlere Konzentration entschieden, da sich bei gleichem Output die Trocknungszeiten durch Halbieren des zu trocknenden Volumens verkürzen lassen und den Prozess ökonomischer gestalten.



3 mg/ml

6 mg/ml

12 mg/ml



*Abbildung 5.17: Aufnahmen der untersuchten Formulierungen, sortiert nach aufsteigender Feststoffkonzentration: oben langsam eingefroren, unten schnell eingefroren*

Von der Verwendung zusätzlicher Additive kann abgesehen werden, da sie die Dispergierfähigkeit der Formulierungen nicht signifikant verbessern. Formulierung 3 mit L-Leucin zeigte zwar in etwa identische Partikelgrößenverteilungen wie die favorisierte Formulierung 1, ist ihr hinsichtlich FPF aber unterlegen. Formulierung 2 mit myo-Inositol zeigte eine schlechtere Performance. Die Lagerung der Formulierung 1 bei Stressbedingungen führte schon nach kurzer Einlagerungszeit von vier Wochen zu einer deutli-

chen Verschlechterung der Aerosolisierbarkeit. Da auch Aktivitätsuntersuchungen einen deutlichen Einfluss der Lagerung auf die Restaktivität des Insulins anzeigten, wird eine Lagerung der Lyophilisate bei moderaten Temperaturen unter 25°C empfohlen.

Für die Optimierung des aktiven Inhalationssystems und alle weiteren Untersuchungen wird aufgrund der besten Eignung die Formulierung des Typs 1 mit mittlerem Feststoffanteil und Polysorbat 80 verwendet.

## 6 ENTWICKLUNG EINES AKTIVEN INHALATORS

### 6.1 EINLEITUNG

Die Entwicklung geeigneter Applikationssysteme zur Dispergierung der Lyophilisate war neben der Formulierungsentwicklung ein zentrales Ziel der vorliegenden Untersuchungen. Ein Aerosol ist definiert als ein disperses System aus festen oder flüssigen Bestandteilen (disperse Phase) in Gas (kontinuierliche Phase). Um den insulinhaltigen, porösen Kuchen in ein inhalierbares Trockenpulveraerosol zu überführen, musste zunächst nach Lösungen gesucht werden, wie die disperse Phase, in diesem Fall das Lyophilisat, in der kontinuierlichen Phase (Luft bzw. Stickstoff) dispergiert werden kann. Eine Anforderung war, das Lyophilisat im Produktionsgefäß zur Anwendung zu bringen.

### 6.2 AUFBAU UND FUNKTIONSPRINZIP DES AKTIVEN INHALATORS

Auf Basis dieser Gegebenheiten wurde ein aktives Inhalationssystem konzipiert und aus einfachen Mitteln gefertigt. Abbildung 6.1 zeigt das entwickelte System im Ganzen, bestehend aus einem modifizierten Spacer und einer Dispergiereinheit, in die das Produkt eingelegt wird. Das Prinzip dieses Systems beruht auf einer aktiven Dispergierung des Lyophilisates durch ein Druckgas aus dem Produktionsgefäß in einen Spacer, aus welchem das Aerosol dann inhaliert werden kann. Als Druckgas wurde aus praktischen Gründen Stickstoff verwendet, es ist aber auch ohne weiteres die Verwendung von Druckluft oder komprimierbaren Gasen in Kartuschen vorstellbar. Der modifizierte Spacer besteht aus Metall (AstraZeneca GmbH Deutschland, Wedel, Deutschland). Dieser war als Applikationshilfe für pMDIs im Handel und hat daher der Größe des Mundstücks des pMDIs

entsprechend eine kleine Öffnung am patientenabgewandten Ende. Diese wurde vergrößert, um die Dispergiereinheit anbringen zu können.

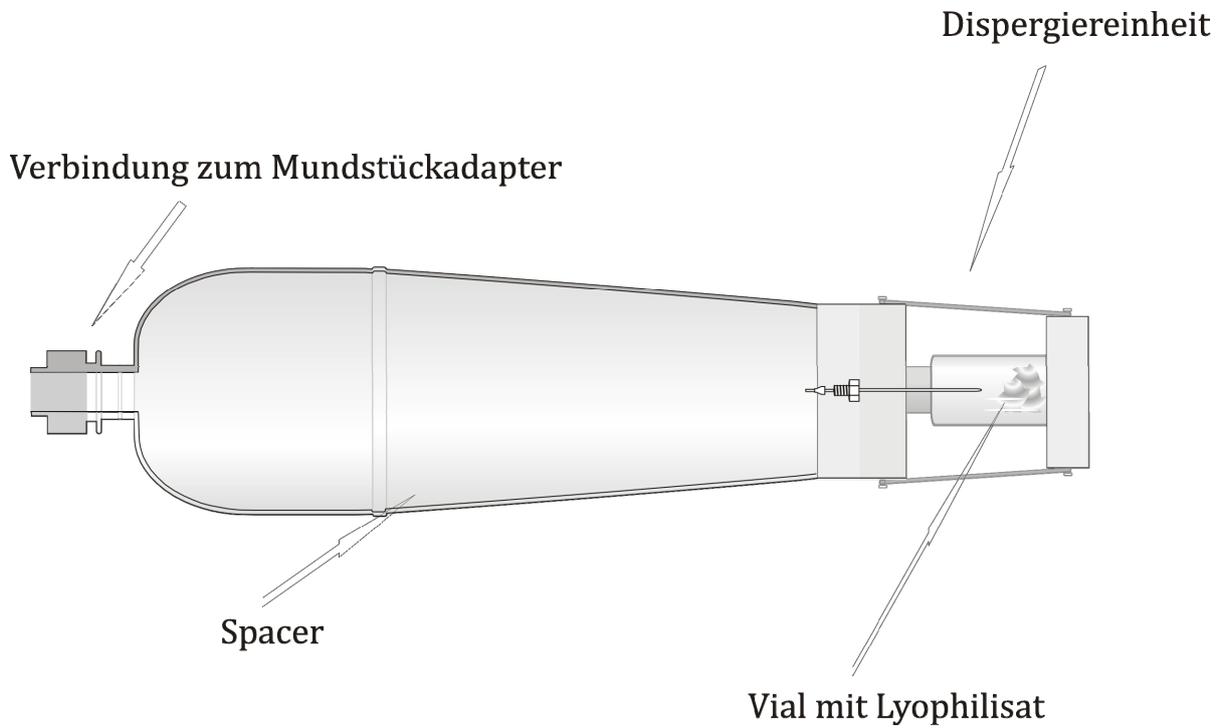


Abbildung 6.1: Aktiver Inhalator in schematischem Aufbau

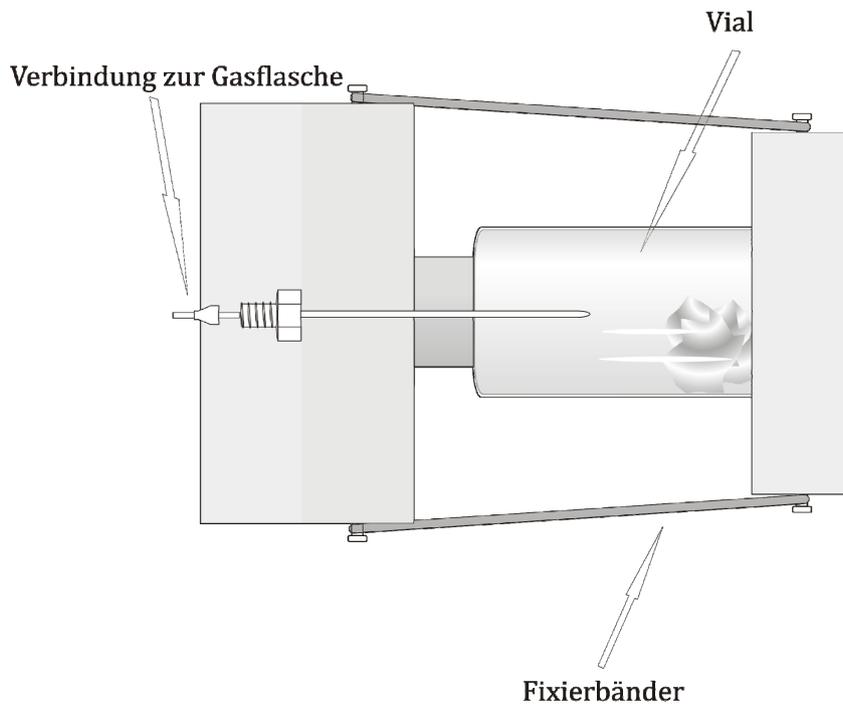


Abbildung 6.2: Dispergiereinheit im Detail

Die Dispergiereinheit selbst wurde aus einem Aluminiumblock gedreht und verbindet das Produktvial mit dem Spacer. Das Kernstück der Dispergiereinheit (Abbildung 6.2) ist eine dünne Metallkanüle mit einem Innendurchmesser von 1 mm, die die Gasquelle mit dem Vialinneren verbindet.

### 6.3 ANWENDUNG

Zur eigentlichen Anwendung wird zunächst der Spacer durch einfaches Zusammenstecken mit der Dispergiereinheit verbunden. Anschließend wird der Stopfen des Vials entfernt und das Vial, wie in Abbildung 6.2 abgebildet, mithilfe der Fixierbänder am unteren Ende der Dispergiereinheit angebracht.

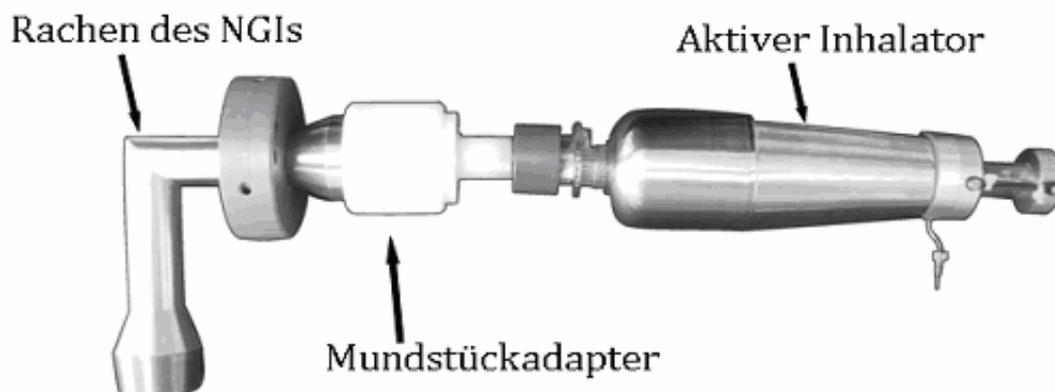


Abbildung 6.3: Aktiver Inhalator mit Mundstückadapter und Rachen des NGI

Sowohl zwischen Dispergiereinheit und Spacer, als auch zwischen Dispergiereinheit und Vial werden zur Abdichtung Silikonringe platziert. In einem nächsten Schritt wird ein Gasimpuls durch die Metallkanüle auf die Lyophilisatoberfläche gerichtet, so dass es, bedingt durch die sehr geringe Dichte, spontan aerosolisiert und in den Spacer herausgetragen wird. Von dort aus kann es nach Abnehmen der Dispergiereinheit bequem und, falls ge-

wünscht, in mehreren Atemzügen inhaliert werden. Für die Impaktionsmessungen wurde der Gasimpuls durch die Verwendung eines Flussreglers kontrolliert. So konnte der Druck des Gases und die Zeit, die Gas auf das Lyophilisat geleitet wurde, variiert werden.

## 6.4 EVALUIERUNG DER EINFLUSSPARAMETER

### 6.4.1 VERSUCHSPLANUNG

Nachdem in Kapitel 5.1.1 die Einflüsse der Formulierung und des Lyophilisationsprozesses auf das resultierende Aerosol beschrieben wurden, sollte an dieser Stelle in einem weiteren statistischen Versuchsplan der Einfluss des aktiven Inhalationssystems auf die Aerosolisierbarkeit der Lyophilisate in lungengängige Partikel  $< 5 \mu\text{m}$  evaluiert werden. Es galt, die erreichten Feinpartikeldosen der favorisierten Formulierung 1 mit 6 mg/ml Feststoffanteil und 0,1 mg Polysorbat 80 pro Einzeldosis aus Kapitel 5 von durchschnittlich 267  $\mu\text{g}$  durch Optimierung des Dispergierprozesses zu erhöhen.

*Tabelle 6.1: Faktoren im Versuchsplan*

<b>Faktor</b>	<b>Name</b>	<b>Minimum</b>	<b>Zentralpunkt</b>	<b>Maximum</b>
A	Dispergierdruck, at	1	2	3
B	Dispergierzeit, s	0,1	0,55	1

Es wurde ein vollfaktorieller  $2^2$  Versuchsplan erstellt, um die variablen Parameter Dispergierdruck und Dispergierzeit zu untersuchen. Der Dispergierdruck war am Reduzierventil der Stickstoffflasche einzustellen und wurde zwischen 1 at und 3 at variiert. Die Einheit „technische Atmosphäre“ ist veraltet (Lindner, 2006) und wurde nur verwendet, da das verwendete Reduzierventil diese noch anzeigte. Eine at entspricht etwa 0,98 bar. Die Dispergierzeit wurde am Flussregler eingestellt und variierte zwischen 0,1 und 1 s. Die Faktoren wurden auf jeder Stufe miteinander kombiniert.

Jeder Designpunkt wurde drei mal, der Zentralpunkt sechs Mal gemessen, so dass dieser Versuchsplan in 18 Impaktionsmessungen resultierte. Im Gegensatz zu dem in Kapitel 5.1.1 beschriebenen Versuchsplan stammten die für jede Dreifachbestimmung verwendeten Lyophilisate aus jeweils eigenen Trocknungsansätzen. Es wurde analog zu den Untersuchungen in Kapitel 5.1.1 mit einer Flussrate von 30 l/min gemessen.

## 6.4.2 ERGEBNISSE

Tabelle 6.2: Modellparameter der untersuchten Zielgrößen

Zielparameter	p value			R-squared	
	Modell	curvature	lack of fit	adjusted	predicted
FPD	< 0,0001	0,9039	0,9261	0,7078	0,6224
absolute FPF	kein passendes Modell gefunden				
relative FPF	Kein passendes Modell gefunden				
DD	< 0,0001	0,9157	0,9309	0,6852	0,5697
Rachen- deposition	kein passendes Modell gefunden				
Rückstand im Vial	0,0013	0,4273	0,8604	0,4856	0,4534
Rückstand im Inhalator	kein passendes Modell gefunden				
MMAD	kein passendes Modell gefunden				

Die statistische Auswertung konnte für die Zielgrößen Feinpartikeldosis, abgegebene Dosis (DD) und den Rückstand im Vial jeweils signifikante Modelle erstellen. Für die Zielgrößen absolute und relative FPF, den Rückstand im Inhalator sowie den MMAD konnte kein passendes Modell innerhalb der festgelegten Signifikanzschwelle von  $p < 0,05$  errechnet werden (Tabelle 6.2). Der „lack of fit“ ist bei allen untersuchten Zielgrößen nicht

signifikant, ebenso der Wert „curvature“. Bei dessen Signifikanz kann von einer Nichtlinearität der Effekte ausgegangen werden, was für die Effekte dieses Versuchsplans jedoch nicht der Fall ist. Die „adjusted“ und „predicted R-squared“-Werte liegen nicht mehr als 0,2 Einheiten auseinander. Dies spricht für Plausibilität der ermittelten Daten. Eine Aufstellung aller relevanten Messdaten findet sich im Anhang (Kapitel 10.4) in tabellarischer Form.

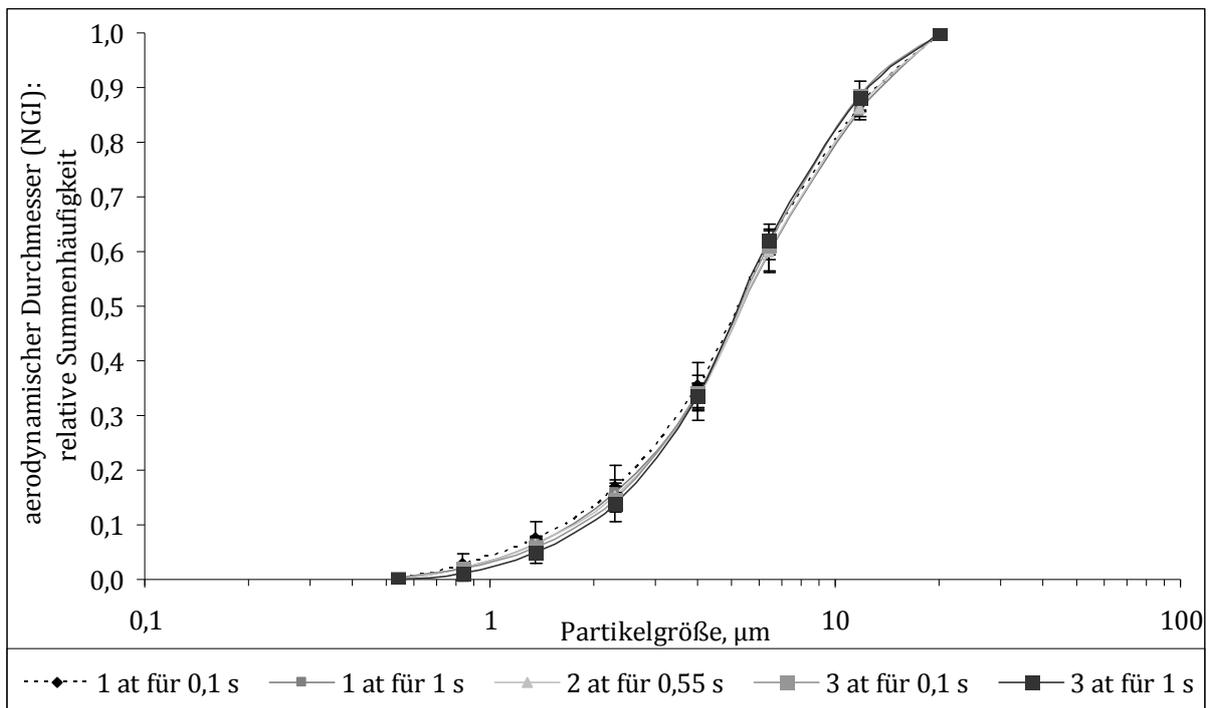


Abbildung 6.4: Vergleich der Partikelgrößenverteilungen bei unterschiedlichen Dispergierparametern, gemessen mit dem NGI ( $n=3$ )

Die aerodynamischen Partikelgrößenverteilungen der mit unterschiedlichen Parameterkombinationen dispergierten Lyophilisate ähneln sich, wie Abbildung 6.4 belegt, stark. Die Werte  $< d_{50}$  liegen zwischen 5,19 und 5,39  $\mu\text{m}$ , was generell für eine inhalative Anwendbarkeit des Lyophilisates spricht. Ein niedrigerer Dispergierdruck führt zu einer stärkeren Dispergierung des fragilen Kuchens in Partikel  $< 5 \mu\text{m}$ , wie die gestrichelte Kurve belegt.

### 6.4.2.1 FEINPARTIKELDOSIS

Der Dispergierdruck übt einen negativen Einfluss auf das Ausmaß des Feinanteils aus, ebenso wie die Dispergierzeit. Höhere Feinanteile werden bei einem kurzen Gasimpuls von geringem Druck erzeugt, während steigender Druck und längere Impulsdauer zu signifikant geringeren Feinanteilen führen. Die Dispergierung bei 1 at Druck und 0,1 s Dauer, die bereits als Standardeinstellung bei der Evaluierung der Formulierungs- und Prozesseinflüsse in Kapitel 5 eingesetzt wurde, lieferte die besten Ergebnisse mit durchschnittlich 196  $\mu\text{g}$  Feinanteil pro Einzeldosis. Run 13 wurde als Ausreißer erkannt und ist daher in der Evaluation der FPD sowie aller davon abhängiger Parameter nicht mit berücksichtigt.

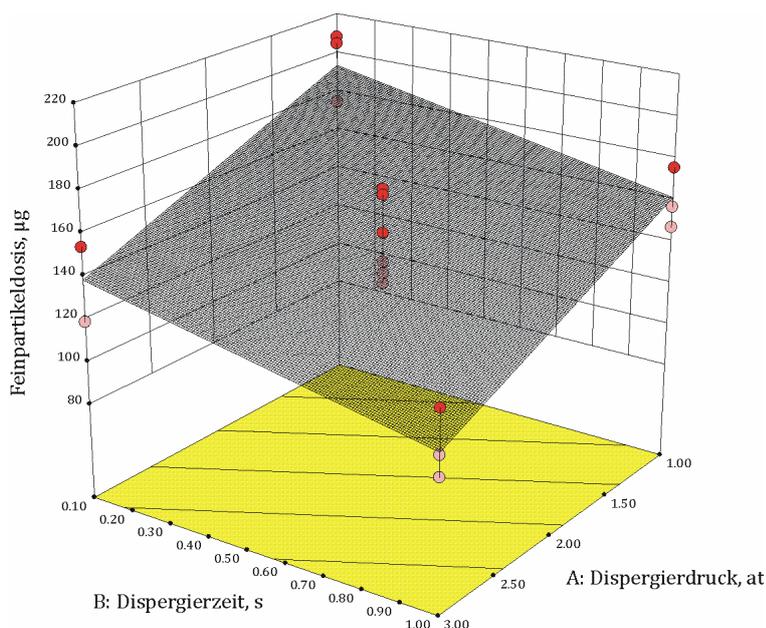


Abbildung 6.5: Einfluss des Dispergierdrucks und der -zeit auf die Feinpartikeldosis

### 6.4.2.2 ABSOLUTE UND RELATIVE FEINPARTIKELFRAKTION

Wie bereits in Tabelle 6.2 aufgeführt, konnte kein passendes Modell zur Beschreibung der Feinpartikelfractionen gebildet werden. Die ermittelten Werte schwanken zwischen 19 und 27% für die absolute FPF und zwischen 25 und 34% für die relative FPF, wobei die höchsten und damit erstrebenswertesten Werte bei geringsten Faktoreinstellungen gefunden werden.

Die Feinpartikelfractionen sind keine direkt gemessenen, sondern relative Größen. Ihre jeweiligen Bezugsparameter Gesamtdosis im Falle der absoluten FPF und abgegebene Dosis im Falle der relativen FPF waren in diesen Untersuchungen erheblichen Schwankungen durch Undichtigkeiten des entwickelten Systems unterworfen, so dass die statistische Auswertung trotz Signifikanz der Modelle für FPD und abgegebene Dosis keine adäquaten Modelle zur Beschreibung der Daten bilden konnte.

### 6.4.2.3 ABGEBEBENE DOSIS

Die abgegebene Dosis ist mit höchster Signifikanz abhängig vom Dispergierdruck ( $p = \leq 0,0001$ ) und hoch signifikant abhängig von der Dispergierzeit ( $p = 0,0053$ ).

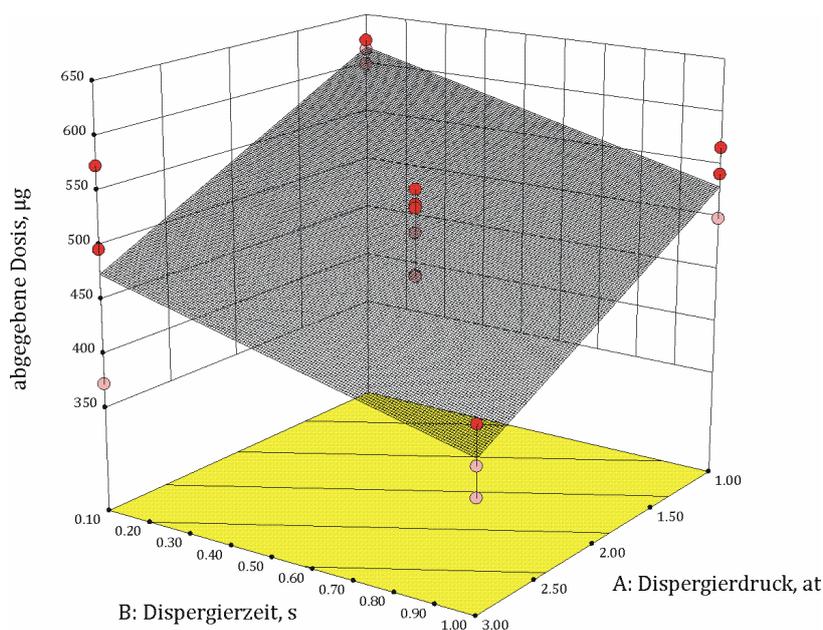


Abbildung 6.6: Einfluss des Dispergierdrucks und der -zeit auf die abgegebene Dosis

Es werden die höchsten Werte von durchschnittlich 613 µg bei kleinster Parameterkombination von 1 at und 0,1 s gefunden. Erhöhung des Druckes und Verlängerung der Dispergierdauer führen zu signifikant geringeren abgegebenen Dosen. Eine Interaktion der Parameter besteht nicht. Die Verringerung der abgegebenen Dosis, die bekanntlich die Summe aus den

Depositionsmassen der Abscheideschalen eins bis acht, des Rachens und des Vorabscheiders darstellt, ist sicherlich auch an die Undichtigkeit des Systems geknüpft. Es ist anderweitig nicht zu erklären, warum im besten Fall nur 613 von 1000  $\mu\text{g}$  Insulin in der HPLC-Analyse quantifiziert werden konnten.

#### 6.4.2.4 RACHENDEPOSITION

Die Rachendeposition zeigte keine Abhängigkeit von den untersuchten Einflussgrößen. Sie schwankte in den Messungen zwischen 34 und 77  $\mu\text{g}$  Insulin.

#### 6.4.2.5 RÜCKSTAND IM INHALATOR

Für den Rückstand im Inhalator konnte ebenfalls kein adäquates Modell zur Dateninterpretation gefunden werden. Die gemessenen Werte bewegen sich zwischen 48 und 146  $\mu\text{g}$ . Dies entspricht einem Anteil von 4,8 bis 14,6% der ausgewiesenen Dosis von 1 mg.

#### 6.4.2.6 RÜCKSTAND IM VIAL

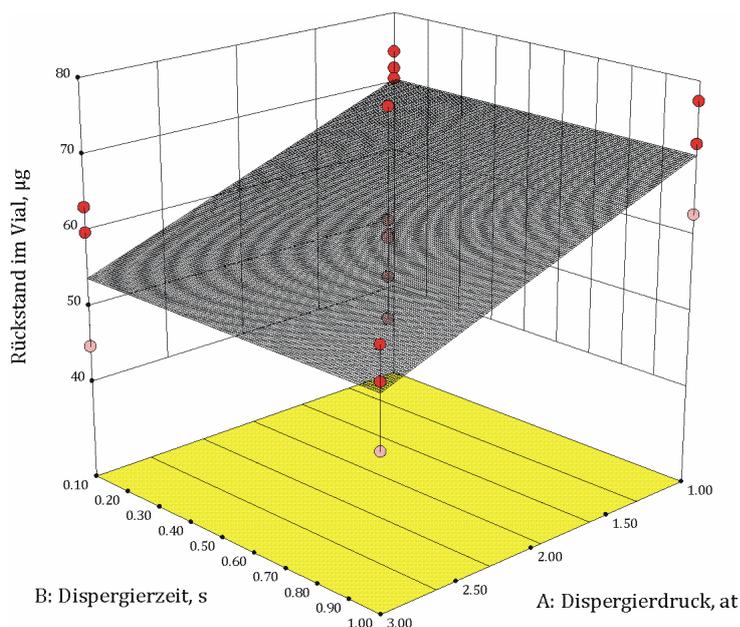


Abbildung 6.7: Einfluss des Dispergierdrucks und der -zeit auf den Rückstand im Vial

Der Rückstand im Vial ist, wie Abbildung 6.7 verdeutlicht, signifikant abhängig von dem Dispergierdruck ( $p = 0,0013$ ). Mit steigendem Druck bleibt weniger Lyophilisat im Vial zurück, während die Dispergierzeit keinen Einfluss ausübt.

#### **6.4.2.7 MMAD**

Die Varianzanalyse ergab kein passendes Modell zur Beschreibung der Daten. Da auch in diesem Versuchsplan teils erhebliche Deposition in Rachen und Vorabscheider zu beobachten war, ist eine Betrachtung des MMAD nicht zielführend im Hinblick auf die Optimierung des Inhalators.

#### **6.4.3 ZUSAMMENFASSUNG UND ABSCHLIEßENDE BEWERTUNG**

Das Ziel dieses Versuchsplans, die in Kapitel 5 erzielten Feinanteile durch geeignete Variation des Dispergiervorgangs noch zu verbessern, ist fehlgeschlagen. Es wäre zu erwarten gewesen, dass ein höherer Dispergierdruck zu stärkerer Dispergierung des Lyophilisates führt. Dies konnte durch die vorliegenden Daten nicht bestätigt werden. Die bereits in Kapitel 5 zur Dispergierung verwendeten Parametereinstellungen von 1 at Dispergierdruck und 0,1 s Dispergierzeit haben sich als effektivste Einstellung zur Erzeugung eines Trockenpulveraerosols erwiesen. Die resultierenden Feinpartikeldosen von 196  $\mu\text{g}$  Insulin entsprechen einer FPF in Bezug auf die ausgewiesene Dosis von etwa 20%. Es ist davon auszugehen, dass ein Teil der erzeugten feinen Partikel  $< 5 \mu\text{m}$  den NGI aufgrund von Undichtigkeit nicht erreicht hat. Insbesondere ein hoher Dispergierdruck von 3 at führte bedingt durch das Volumen des ausgeströmten Gases beim Dispergiervorgang teilweise zu spontaner Öffnung des Spacers am Übergang vom Kopf- zum Endstück. Somit könnte an dieser Stelle ein Verlust stattgefunden haben, obwohl er mit bloßem Auge nicht sichtbar war. Diese Beobach-

tung gilt nicht nur für die FPD, sondern auch für die abgegebene Dosis, da davon auszugehen ist, dass nicht nur feine Partikel verloren gingen.

Ein weiterer Nachteil des entwickelten aktiven Inhalators, den bereits der von Pfizer entwickelte Inhalator zur Applikation des ersten inhalierbaren Insulins (Exubera®) aufwies, ist dessen Größe. Mit einer Länge des Spacers mit gekoppelter Dispergiereinheit von etwa 23 cm ist er zu groß, um praktisch zu sein. Kleinere Dimensionen waren jedoch nicht umsetzbar, da ein kleineres Spacervolumen eine kürzere Dispergierzeit als die untersuchten benötigt hätte, um nicht, wie im oben beschriebenen Fall, aufzuspringen. Die kürzeste Dispergierzeit, die am verwendeten Flussregler einzustellen war, betrug 0,1 s.

Nichtsdestotrotz hat die Entwicklung dieses Inhalators die Erkenntnis nahegelegt, dass Lyophilisate geringer Dichte geeignete Arzneiformen zur pulmonalen Applikation von aktiven Substanzen darstellen. In weiteren Untersuchungen sollte daher ein Inhalator entwickelt werden, der die positiven Charakteristika des aktiven Inhalators nutzt, ohne dabei dessen Nachteile zu adaptieren.

## 7 ENTWICKLUNG EINES ATEMZUGGESTEUERTEN INHALATORS

### 7.1 EINLEITUNG

Nach Entwicklung und Evaluation des aktiven Inhalationssystems sollte nun ein System entwickelt werden, das ebenso wie das aktive System einen Gasimpuls zur Aerosolisierung der Lyophilisate verwendet. Die Dispergierung sollte aber ohne Treibgas auskommen und durch normale Atemluft ausgelöst werden. Der Impuls selbst sollte dabei durch den Inhaliervorgang des Patienten gesteuert werden. Außerdem sollte das zu entwickelnde System klein und handlich sein, um es auch unterwegs anwenden zu können. Alle Messungen wurden mit Formulierung 1 mit einem Feststoffanteil von 6 mg/ml und 0,1 mg Polysorbat 80 pro Einzeldosis durchgeführt.

### 7.2 IDEE

Es musste zunächst überlegt werden, wie der benötigte Luftimpuls auf die Lyophilisatoberfläche gerichtet werden kann. Yamashita *et al.* (2003) nutzen eine Bohrung auf der Inhalatoraußenseite als Lufteinlass (Abbildung 7.1). Durch dieses Loch wird beim Inhaliervorgang ein Luftstrom über eine Luftführung auf das Lyophilisat gerichtet. Bedingt durch die geringe Dichte des Lyophilisates wird es durch diesen Luftstrom verwirbelt und bei weiterem Einatmen mitgerissen, wodurch die fragilen Strukturen brechen und ein Trockenpulveraerosol generiert wird. Der im genannten Patent beschriebene Inhalator hat eine Breite von 2 – 50 mm. Das zu verwendende Vial sollte 1 – 15 ml Lösung fassen können und die Luft- und Aerosoldurchlässe sollten vorzugsweise einen Durchmesser von einem bis vier Millimetern aufweisen. Die Flussrate durch den Inhalator sollte 1 – 180 l/min betragen. Die Angaben sind sehr weit gefasst, um möglichen Nachahmern

keine Möglichkeit zu lassen, gleichartige Produkte auf den Markt zu bringen.

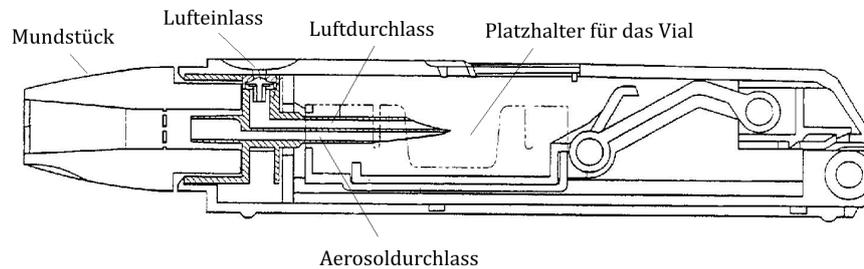


Abbildung 7.1: atemzuggesteuerter Inhalator (Yamashita et al., 2003)

### 7.3 ENTWICKLUNG

Alle in diesem Kapitel beschriebenen Untersuchungen wurden unter Verwendung der Formulierung 1 mit einem Insulingehalt von 1 mg pro Einzeldosis durchgeführt.

#### 7.3.1 ERSTE VERSION MIT 2R-VIALS

Auf Basis dieser aus dem Patent entnommenen Informationen wurde ein erster Prototyp eines atemzuggesteuerten Inhalators gefertigt. Da zu dem Zeitpunkt noch in 2R-Vials lyophilisiert wurde und eine Anforderung dieser Untersuchungen die Anwendung des Produktes im Produktionsgefäß war, wurde die Inhalatorgeometrie den Maßen der 2R-Vials angepasst. Analog zu dem in Kapitel 6 beschriebenen Inhalator wurde der Prototyp in der hauseigenen Werkstatt aus einem Aluminiumblock gedreht. Dieser Prototyp ist 26 mm lang, 18 mm breit und besitzt zusätzlich optionale Luft- und Aerosolführungsröhrchen von 2,5 Millimetern Innendurchmesser, die bei Bedarf durch einfaches Aufstecken einsetzbar sind. Der Lufteinlass misst vier Millimeter im Durchmesser. Zur eigentlichen Anwendung wird das Vial nach Entfernen des Stopfens mithilfe einer Klammer und eines Dichtungs-

ringes am patientenabgewandten Ende des Inhalators fixiert. Anschließend kann das Lyophilisat durch einfaches Einatmen durch den Inhalator appliziert werden.

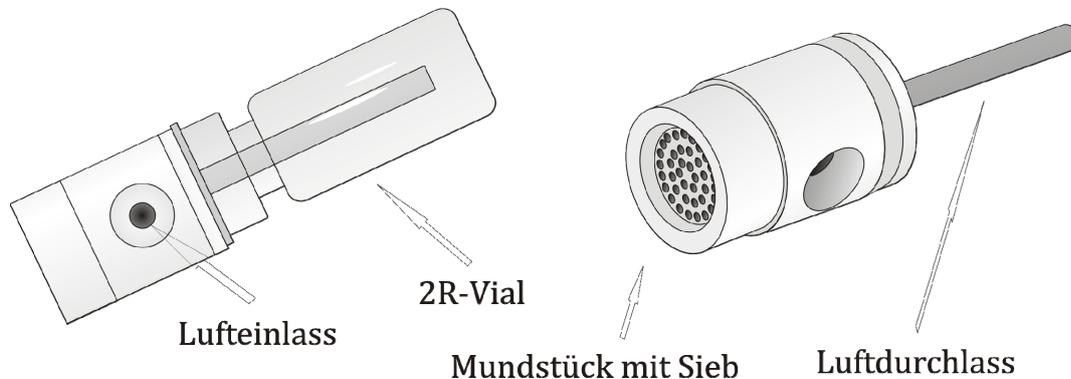


Abbildung 7.2: Atemzuggesteuerter Inhalator der ersten Generation

Zur Bestimmung der relevanten Aerosolparameter musste zunächst die vorgeschriebene Messflussrate bestimmt werden. Die Evaluierung mit der auf Seite 48 beschriebenen Apparatur ergab eine Flussrate von 25 l/min bei einem Druckabfall über dem Inhalator von vier Kilopascal. Inwieweit die Luft- und Aerosolführungsröhrchen die Dispergierung der Lyophilisate beeinflussen, wurde mit diesem Inhalator nicht getestet. Zur Untersuchung des Impaktionsverhaltens der Lyophilisate wurde der Inhalator ohne Röhrchen verwendet. Die Impaktionsanalyse dreier aerosolisierter Lyophilisate führte zu folgenden Ergebnissen (Abbildung 7.3). Bei Vergleich der erzielten abgegebenen Dosen des aktiven Inhalators (Abbildung 6.6) mit denen des atemzuggesteuerten Inhalators wird die deutliche Überlegenheit des neu entwickelten Systems deutlich. Es konnten schon in den ersten Testläufen gute Werte für die abgegebene Dosis mit im Vergleich zum aktiven Inhalator niedriger Streuung erreicht werden. Die Feinpartikeldosis von durchschnittlich 127  $\mu\text{g}$  ist noch zu verbessern; auch hier ist die besonders niedrige Messwertstreuung auffällig und spricht für eine reproduzierbare Dispergierung der Produkte. Bedingt durch die Tatsache, dass der neu entwickelte Inhalator aus nur einem Teil besteht, führt der Vorgang des

Dispergierens zu nur marginalem Verlust an Aerosol, was sich in den hohen Werten der Gesamt- und abgegebenen Dosis widerspiegelt.

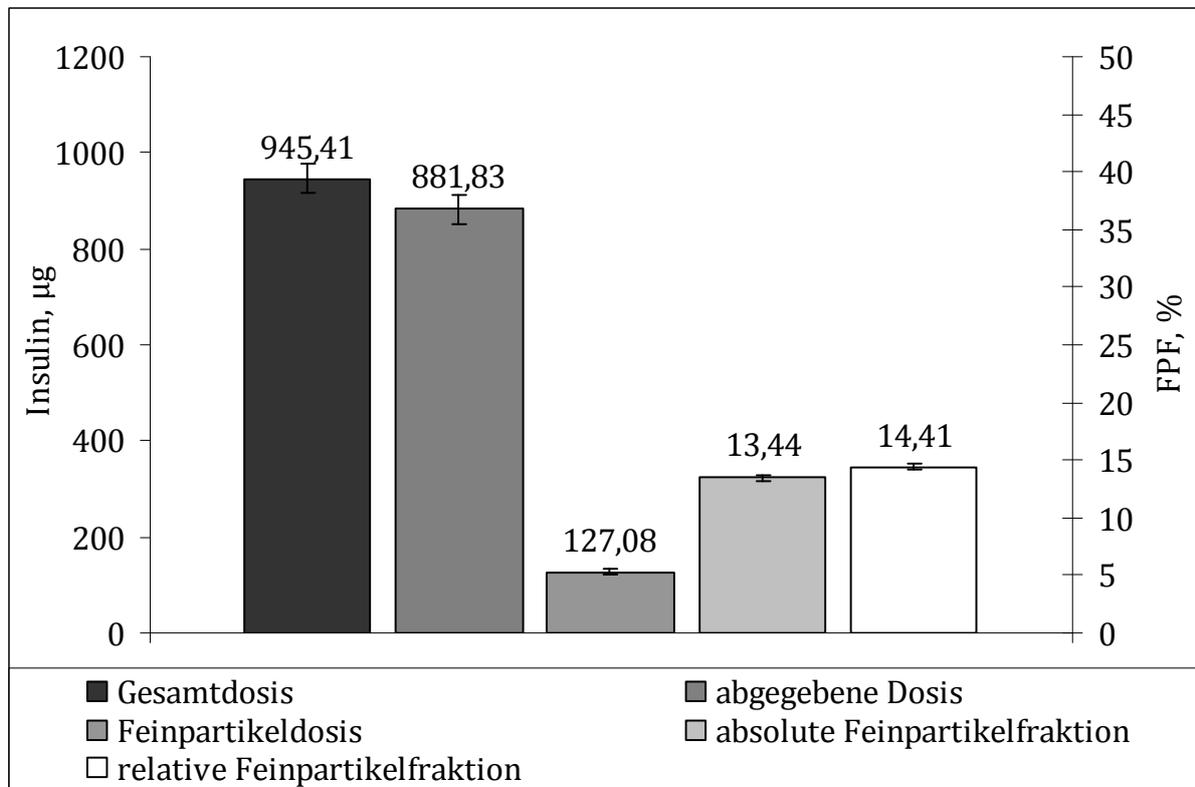


Abbildung 7.3: Erzielte Aerosolparameter bei Verwendung des ersten atemzuggesteuerten Inhalators ohne Luft- und Aerosolführungsröhrchen

Bedingt durch die enge Geometrie der verwendeten 2R-Vials, deren Innendurchmesser am Hals nur sieben Millimeter beträgt, weist der Prototyp einen relativ hohen Inhalatorwiderstand auf, so dass die vom Europäischen Arzneibuch (Ph. Eur., 2008a) vorgeschriebene Messflussrate von 25 l/min im für den Patienten unteren anwendbaren Bereich liegt. Im Hinblick auf die Verwendung dieses Prototyps bei Patienten mit Diabetes mellitus mag dieser hohe Widerstand kein Problem darstellen, da eine Diabeteserkrankung nicht mit Atembeschwerden korreliert. Soll jedoch ein anderer Wirkstoff, beispielsweise ein lokales Lungentherapeutikum, mit diesem Inhalator appliziert werden, kann der hohe Widerstand ein Problem darstellen. Denkbar ist, dass diese Patienten aufgrund ihrer Erkrankung, ebenso wie ältere Menschen oder Kinder, die für eine erfolgreiche Dispergierung und

eine hohe Feinpartikelfraktion benötigte inspiratorische Flussrate nicht aufbringen können und das Medikament auf diese Weise nicht in dem Maße wirkt, wie es beabsichtigt war.

In einem nächsten Schritt sollte daher versucht werden, den hohen Inhalatorwiderstand zu reduzieren. Die einzig geeignete Maßnahme war, die Bohrung des Aerosoldurchlasses zu erweitern. Die Vergrößerung der Durchmesser des Luftein- und durchlasses war nicht möglich, da bedingt durch die Verjüngung des verwendeten Vialtyps kein Platz mehr zur Verfügung stand. Die Vergrößerung des Aerosoldurchlasses von 2,5 auf 6,5 mm brachte eine nur geringfügige Verringerung des Widerstandes, was in einer Messflussrate von 27 l/min resultierte. Impaktionsmessungen legten eine nur marginale Verbesserung der Feinpartikeldosis nahe.

Aus diesem Grund wurde die Produktion der Lyophilisate auf die Verwendung eines anderen Vialtyps umgestellt. Es wurden Flachbodengläser der gleichen hydrolytischen Klasse I ausgewählt, die im Gegensatz zu den 2R-Vials keine Verjüngung am Glashals besitzen. Dies ermöglichte die Vergrößerung der Bohrungen für Luft- und Aerosolführung, wie im folgenden Abschnitt beschrieben wird.

### **7.3.2 ZWEITER PROTOTYP MIT BREITERER LUFT- UND AEROSOLFÜHRUNG**

Auf Basis des neuen Vialtyps wurde ein weiterer Inhalator gefertigt, der prinzipiell den gleichen Dispergiermechanismus nutzt, sich aber größerer Dimensionen bedient. Dieser zweite Prototyp (Abbildung 7.4) misst 40,5 mm in der Länge und 17 mm in der Breite. Der Lufteinlass wurde von 4 auf 5,5 mm erweitert, ebenso wie die Bohrungen für Luft- und Aerosoldurchlass, die von 2,5 mm auf 4,5 mm erweitert werden konnten. Der Inhalatorwiderstand reduzierte sich durch diese Maßnahmen drastisch, was

sich deutlich in der resultierenden Flussrate bei einem Druckabfall von vier Kilopascal äußert. Die Messflussrate betrug ohne Verwendung der Röhren für Luft- und Aerosolführung 50,8 l/min, was einer Verdoppelung im Vergleich zum ersten Prototyp entspricht.

Ein weiterer Vorteil des zweiten Prototyps ist die Art, das Vial an den Inhalator zu koppeln. Während beim ersten Prototyp noch ein weiteres Bauteil, die Klammer, zur luftdichten Befestigung des Vials am Inhalator benötigt wurde, kommt diese Version ohne die Klammer aus. Das Vial wird einfach in die dafür vorgesehene Einbuchtung (Abbildung 7.5) gesteckt, wodurch es durch den Dichtungsring zugleich luftdicht fixiert und arretiert wird, ohne herauszufallen.

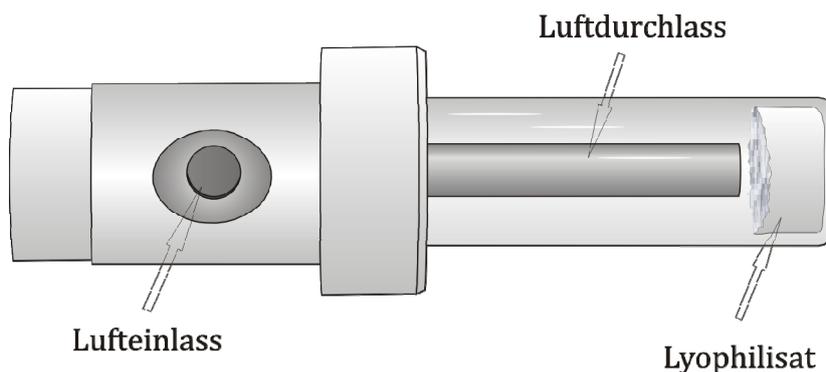


Abbildung 7.4: Atemzuggesteuerter Inhalator der zweiten Generation in Aufsicht

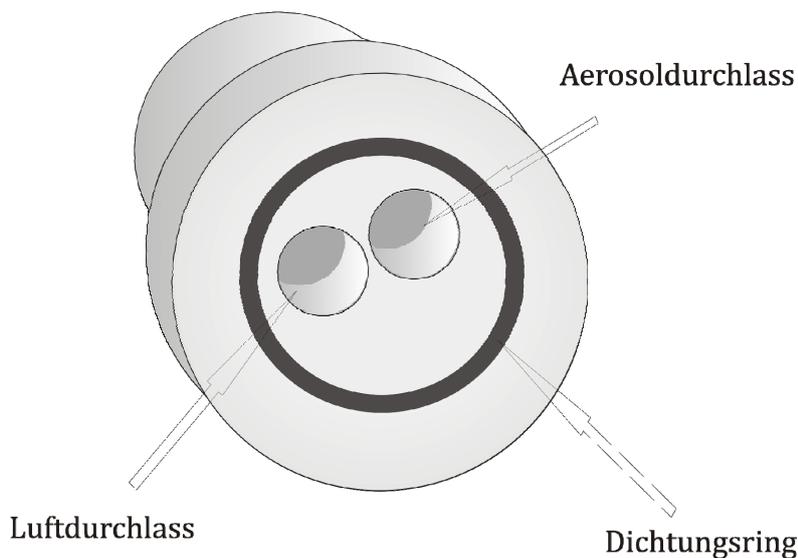


Abbildung 7.5: Atemzuggesteuerter Inhalator der zweiten Generation von der patientenabgewandten Seite

Erste Impaktionsmessungen zeigten einen deutlich positiven Einfluss der vergrößerten Geometrien auf die erzielten Aerosolparameter (Abbildung 7.6). Die relevanteste Kenngröße, die Feinpartikeldosis, konnte bei sonst identischen Faktoren wie Formulierung und Umgebungsbedingungen (alle Messungen wurden bei 21°C und 35% rF durchgeführt) im Vergleich zu dem ersten Prototypen annähernd verdoppelt werden.

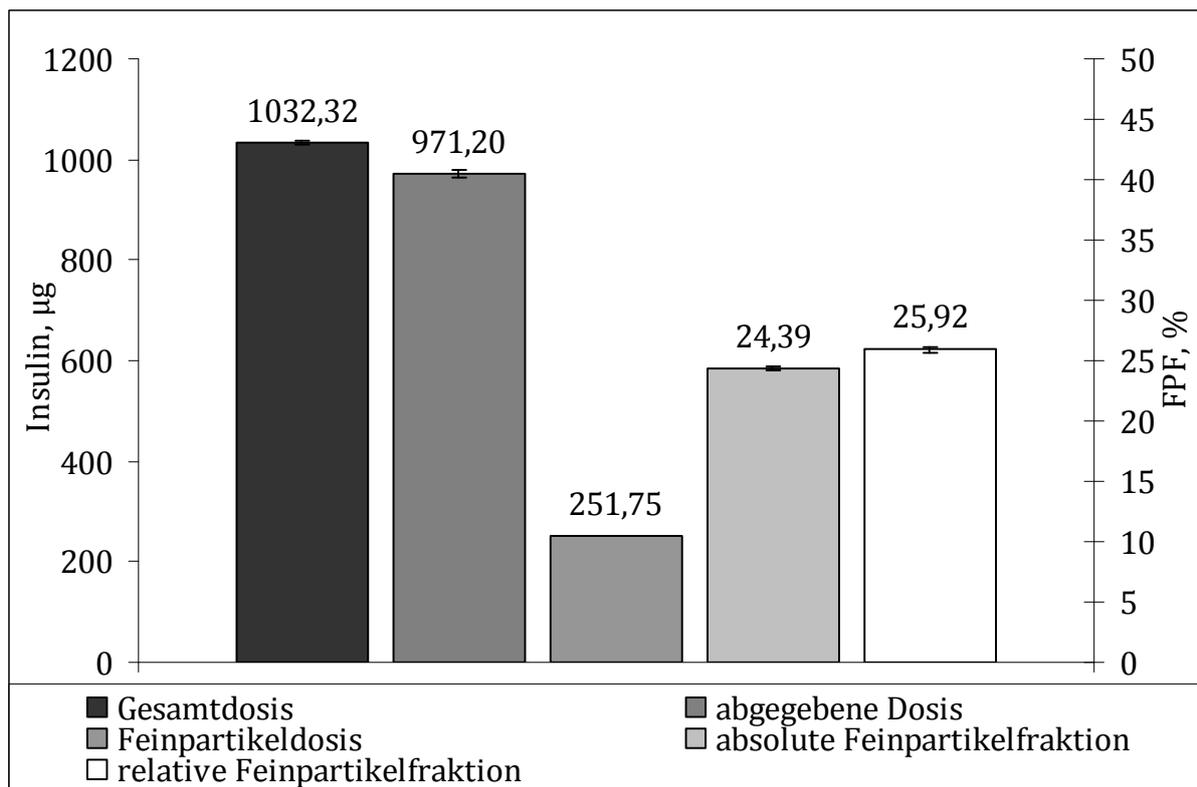


Abbildung 7.6: Erzielte Aerosolparameter bei Verwendung des zweiten atemzuggesteuerten Inhalators ohne Luft- und Aerosolführungsröhrchen

Weiterhin zeigten alle ermittelten Parameter eine hohe Reproduzierbarkeit. Es konnten im Durchschnitt 1032 µg Insulin pro Messung ermittelt werden, was einer nahezu vollständigen Detektion des in der Formulierung befindlichen Insulins entspricht. Im Durchschnitt konnten 971 µg Insulin im Impaktor detektiert werden; entsprechend blieben nur etwa 60 µg im Vial und im Inhalator zurück, was einer Retention von 6% entspricht. Die ermittelten Feinpartikelfraktionen liegen mit etwa 25% in einem noch zu optimierenden Bereich.

Im Folgenden sollte evaluiert werden, ob die Verwendung verschieden langer Luft- und Aerosolführungsröhrchen die Dispergierung der Lyophilisate in lungengängige Partikel  $< 5 \mu\text{m}$  optimieren kann.

### 7.3.3 EVALUIERUNG DER GEEIGNETSTEN INHALATORKONFIGURATION

Das Ziel dieser Untersuchungen war die Maximierung des lungengängigen Anteils des aerosolisierten Lyophilisates. Es sollte in einem weiteren Versuchsplan untersucht werden, inwieweit sich die Feinpartikeldosis durch veränderte Dispergiertechnik noch optimieren lässt. Es wird angenommen, dass die Verwendung von Luft- und Aerosolführungsröhrchen (Abbildung 7.7) einen Einfluss auf den Dispergierprozess nimmt.

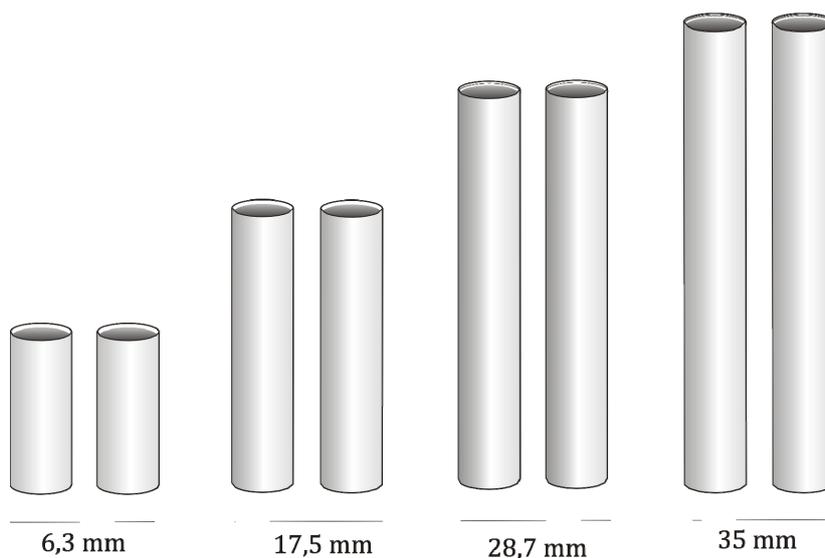


Abbildung 7.7: Verwendete Luft- und Aerosoldurchlässe

Diese Röhrchen sind auswechselbar und werden in die dafür vorgesehenen Bohrungen (Abbildung 7.5) gesteckt. Bei Verwendung eines langen Luftdurchlasses wird der Luftstrom direkt auf die Lyophilisatoberfläche gerichtet (das Röhrchen mit einer Länge von 35 mm endet bei fixiertem Vial knapp über dessen Oberfläche). Bei Verwendung eines kurzen Luftdurchlasses oder gar Verzicht auf diesen gelangt der Luftstrom eher diffus auf das Lyophilisat. Es wird erwartet, dass auch die Aerosoldurchlasslänge die

Feinpartikeldosis beeinflusst, wenn auch nicht in einem Maße wie die Luftdurchlasslänge. Außerdem wird eine Minimierung der Rückstände in Vial, Inhalator und Rachen angestrebt.

Des Weiteren kam bei diesem Versuchsplan der von der Firma RPC Formatec (RPC Formatec, Mellrichstadt, Deutschland) entwickelte „Flutter“ zum Einsatz (Abbildung 3.10). Dieser wird in den Mundstückadapter eingesteckt und trägt im Inneren zwei dünnen Kunststofffolien, die beim Inhaliervorgang durch den Luftstrom in Vibration versetzt werden. Es sollte untersucht werden, ob die erzeugten Schwingungen ein Brechen der fragilen Lyophilisatstrukturen begünstigen und so zu einer Erhöhung des lungengängigen Anteils beitragen. Um diese Einflussparameter zu testen, wurde ein zentral-zusammengesetzter Versuchsplan (central composite design, CCD) mit den in Tabelle 7.1 genannten zu untersuchenden Faktoren erstellt.

Tabelle 7.1: Faktoren im Versuchsplan

<b>Faktor</b>	<b>Name</b>	<b>Typ</b>	<b>-<math>\alpha</math></b>	<b>+<math>\alpha</math></b>	<b>Zentralpunkt</b>	<b>-1</b>	<b>+1</b>
<b>A</b>	Länge des Luftdurchlasses, mm	numerisch	0	35	17,5	6,3	28,7
<b>B</b>	Länge des Aerosoldurchlasses, mm	numerisch	0	35	17,5	6,3	28,7
<b>C</b>	Flutter	kategorisch				ohne	mit

Ein CCD zeichnet sich dadurch aus, dass ein vollfaktorieller Versuchsplan durch sogenannte Sternpunkte ergänzt wird. Diese ragen aus dem quadratischen Versuchsraum heraus, so dass sich bei dessen räumlicher Betrachtung eine Kugel ergibt. Durch die Addition dieser Sternpunkte wird jeder Faktor auf fünf Stufen untersucht, was eine sehr gute Vorhersage der Zusammenhänge ermöglicht. Alle Punkte des vollfaktoriellen Designs wurden drei Mal gemessen, diejenigen des Sterns zwei Mal. Der Zentralpunkt wurde

vier Mal gemessen. Insgesamt ergab sich dadurch eine Versuchsanzahl von 48 Impaktionsmessungen. Im Anhang (Kapitel 10.5) findet sich eine Übersicht über alle untersuchten Faktorenkombinationen und Ergebnisse.

### 7.3.3.1 ERGEBNISSE

Tabelle 7.2: Modellparameter der untersuchten Zielgrößen

Zielparameter	Daten- trans- formati- on	p value		R-squared		Aus- reißer
		Modell	lack of fit	adjusted	predicted	
FPD	–	0,0013	0,0562	0,3108	0,1571	
absolute FPF	–	0,0074	0,1870	0,2392	0,0680	
relative FPF	–	0,0108	0,2058	0,2216	0,0442	
DD	–	< 0,0001	0,2915	0,4708	0,4077	Run 36
Rachen- deposition	square root	< 0,0001	0,1594	0,6740	0,6297	
Rückstand im Vial		0,0001	0,8431	0,3336	0,2451	Run 22
Rückstand im Inhala- tor	square root	< 0,0001	0,3456	0,6487	0,5448	
MMAD		0,0035	0,1259	0,2763	0,0967	Run 23

Wie Tabelle 7.2 zeigt, konnten für alle untersuchten Zielgrößen jeweils signifikante Modelle errechnet werden, für die Faktoren abgegebene Dosis, den Rückstand im Inhalator und die Rachendeposition sogar Modelle mit

$p < 0,0001$  bei jeweiliger Nichtsignifikanz des „lack of fit“. Da die Ergebnisse der Bezugsgrößen Gesamtdosis und abgegebene Dosis in diesem Versuchsplan weitaus reproduzierbarer waren als in den vorangegangenen, wird von der detaillierten Beschreibung der absoluten und relativen FPF abgesehen, da die Beschreibung derer keinen weiteren Informationsgehalt übermittelt als die Beschreibung der Feinpartikeldosis. Ebenso wird auf die Auswertung des MMAD verzichtet, da auch in diesem Versuchsplan die Deposition im Rachen erheblich schwankte und so ein Vergleich der errechneten MMADs nur bedingt sinnvoll ist. Die Modelle zeigen mit Ausnahme des Modells für den Rückstand im Inhalator und die Rachendeposition (jeweils qualitativ gute Modelle) eine ausreichende Aussagekraft; die Werte „adjusted R-squared“ und „predicted R-squared“ liegen in allen Fällen jedoch nicht mehr als 0,2 Einheiten auseinander, so dass von Plausibilität der ermittelten Daten ausgegangen werden kann.

Abbildung 7.8 zeigt die erzielten Partikelgrößenverteilungen für alle evaluierten Faktorenkombinationen ohne Verwendung des Flutter (oben) und bei dessen Verwendung (unten). Auffällig ist, dass die Kurven, insbesondere bei Verwendung des Flutter, sehr eng beieinander liegen. Bei Dispergierung ohne Zuhilfenahme des Flutter scheint die Konfiguration bestehend aus dem Luftdurchlass von 17,5 mm Länge ohne Aerosoldurchlass (gestrichelte Linie) besonders geeignet zu sein hinsichtlich eines maximierten Feinanteils, da sie am weitesten nach links zu kleineren Partikelgrößen verschoben ist. Bei Verwendung des Flutter ermöglicht die Kombination 28,7/28,7 mm für die Länge des Aerosol- sowie des Luftdurchlasses die geeignetste Dispergierung in feine Teilchen.

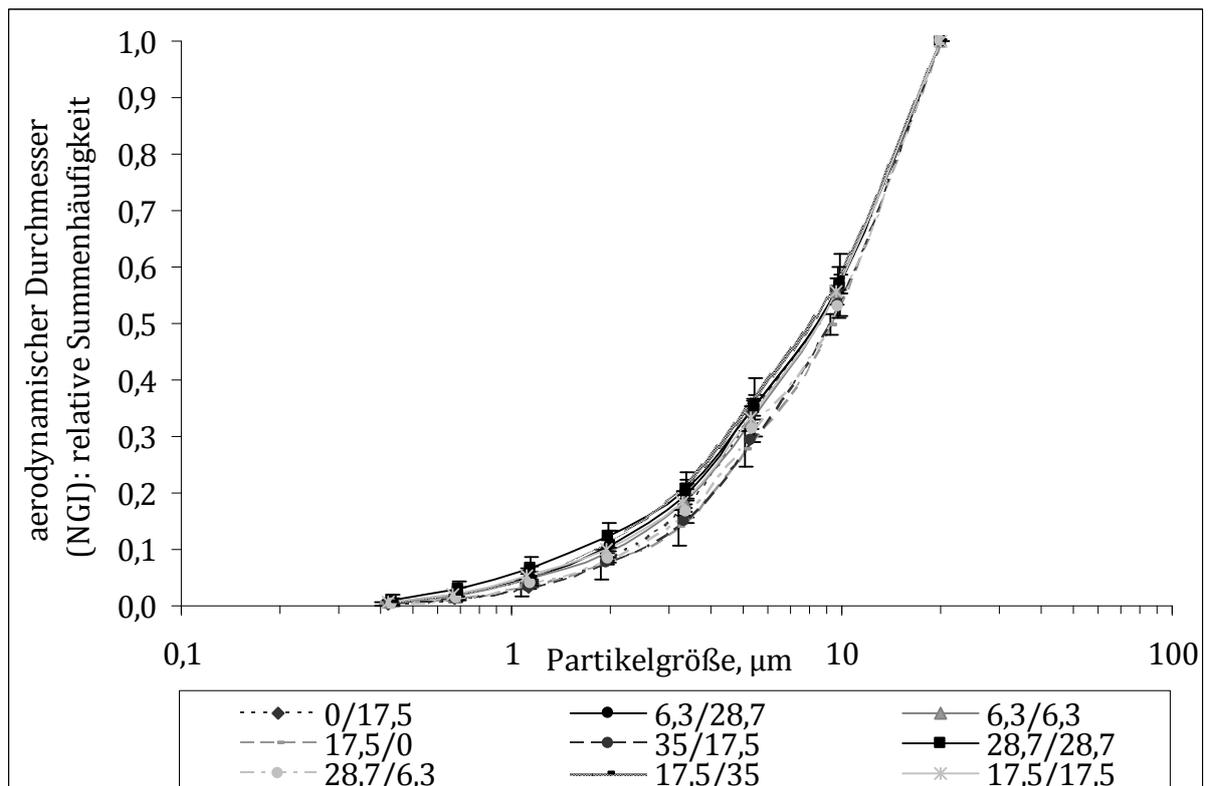
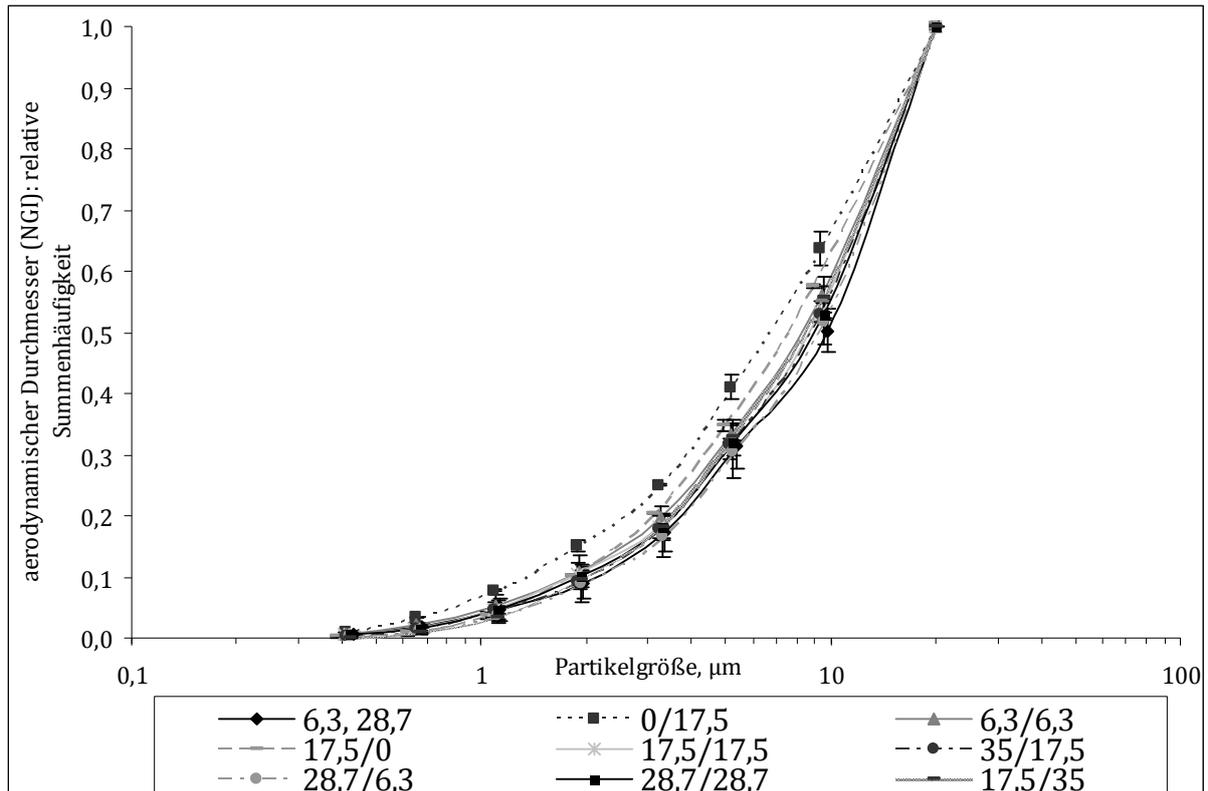


Abbildung 7.8: Erreichte Partikelgrößenverteilungen der aerosolisierten Lyophilisate: oben ohne Verwendung, unten bei Verwendung des Flutter. Die erste Zahl in der Legende gibt die Länge des Luftdurchlasses, die zweite die Länge des Aerosoldurchlasses an (jeweils in mm)

## 7.3.3.1.1 FEINPARTIKELDOSIS

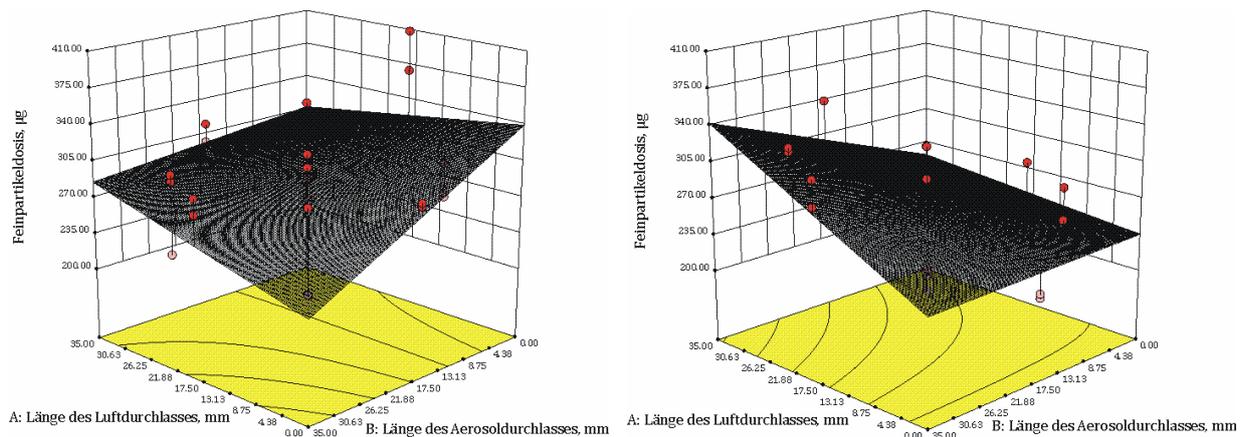


Abbildung 7.9: Einfluss der Luftdurchlass- und Aerosoldurchlasslänge auf die Feinpartikeldosis: links ohne Verwendung des Flutters, rechts mit

Die innerhalb dieses Versuchsplans erzielten Feinpartikeldosen schwankten grob zwischen 200 und 400  $\mu\text{g}$  Insulin pro Dosis. Abbildung 7.9 illustriert den Einfluss der Luftdurchlass- und Aerosoldurchlasslänge auf die FPD. Die statistische Auswertung legte zur Analyse der FPD die Verwendung eines Zwei-Faktor-Wechselwirkungsmodells aufgrund höchster Signifikanz im Vergleich zum ebenfalls denkbaren quadratischen Modell nahe. Die Länge des Luftdurchlasses und der Einfluss des Flutters sind demnach signifikant ( $p = 0,0196$  vs  $0,0236$ ), während die Aerosoldurchlasslänge keinen signifikanten Einfluss auf die FPD nimmt. Interessanterweise ist die Zwei-Faktor-Wechselwirkung aus Aerosoldurchlasslänge und Flutter mit einem  $p$ -Wert von  $0,0021$  signifikant. Bei Messung unter Verwendung des Flutters steigt die FPD mit steigender Länge des Luftdurchlasses. Einen zusätzlich positiven Einfluss übt der Aerosoldurchlass mit steigender Länge aus. Die höchsten vorhergesagten Werte würden laut den Modellberechnungen mit der Konfiguration 35/35 mm erzielt werden. Wird dagegen ohne Flutter gemessen, fällt die FPD mit steigender Länge des Aerosoldurchlasses. Generell führt die Verwendung eines längeren Luftdurchlasses zu höheren Feinpartikeldosen. Am auffälligsten sind die relativ hohen Feinpartikeldosen bei der Konfiguration 17,5/0 mm ohne Flutter. Es kann-

ten Werte von durchschnittlich  $388 \mu\text{g}$  erreicht werden. Auf den ersten Blick könnten diese Werte für Ausreißer gehalten werden; mehrere Wiederholungsmessungen unter Gebrauch dieser Konfiguration legten jedoch deren Richtigkeit dar. Es stellt sich die Frage, ob diese Werte durch Verwendung der Kombination 35/0 mm noch gesteigert werden können, da der generierte Luftstoß bei längerem Luftdurchlass noch gerichteter auf die Lyophilisatoberfläche trafe. Diese Kombination war jedoch nicht im Versuchsplan enthalten und wurde daher in einem weiteren Versuchsplan (Kapitel 7.4.1) evaluiert.

### 7.3.3.1.2 ABGEBEBENE DOSIS

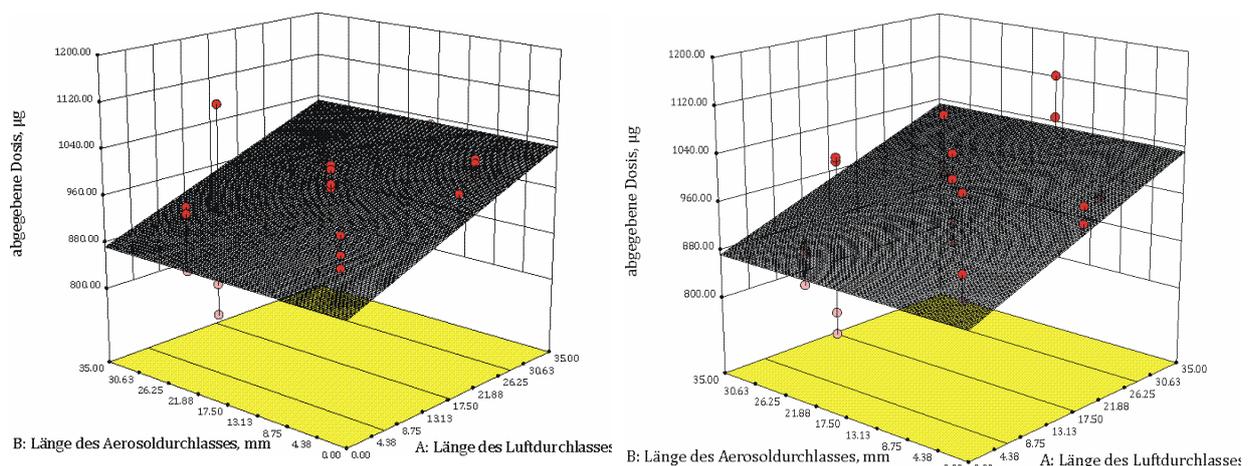


Abbildung 7.10: Einfluss der Luftdurchlass- und Aerosoldurchlasslänge auf die abgegebene Dosis: links ohne Verwendung des Flutters, rechts mit

Die abgegebene Dosis (Abbildung 7.10) schwankte in den 48 durchgeführten Messungen grob zwischen 800 und  $1120 \mu\text{g}$  pro Dosis, was bei Zugrundelegung einer Dosis von  $1000 \mu\text{g}$  zufriedenstellend ist. Die abgegebene Dosis aus Versuch Nummer 36 ( $1185 \mu\text{g}$ ) wurde als Ausreißer erkannt und ist in der Modellberechnung nicht berücksichtigt. Diese hohe Dosis ist vermutlich einem Pipettierfehler beim Abfüllen der Lösungen in die Vials zuzuschreiben. Das gebildete lineare Modell ist höchst signifikant, wobei die Länge des Luftdurchlasses mit einem p-Wert von  $< 0,0001$  als einziger

Faktor einen signifikanten Einfluss auf die DD ausübt. Mit dessen steigender Länge steigt auch die abgegebene Dosis, unabhängig davon, ob mit Flutter gemessen wurde oder nicht. Das heißt, Vial- und/oder Inhalatorrückstand sind geringer bei Verwendung eines längeren Luftdurchlasses. Der geringere Rückstand im Vial ist logisch erklärbar, da ein Luftstrom, der knapp über dem Vialboden einsetzt, mehr Lyophilisat aufwirbelt und aus dem Vial heraus trägt als ein Luftstrom, der schon an der Vialöffnung seine größte Kraft ausübt.

### 7.3.3.1.3 RACHENDEPOSITION

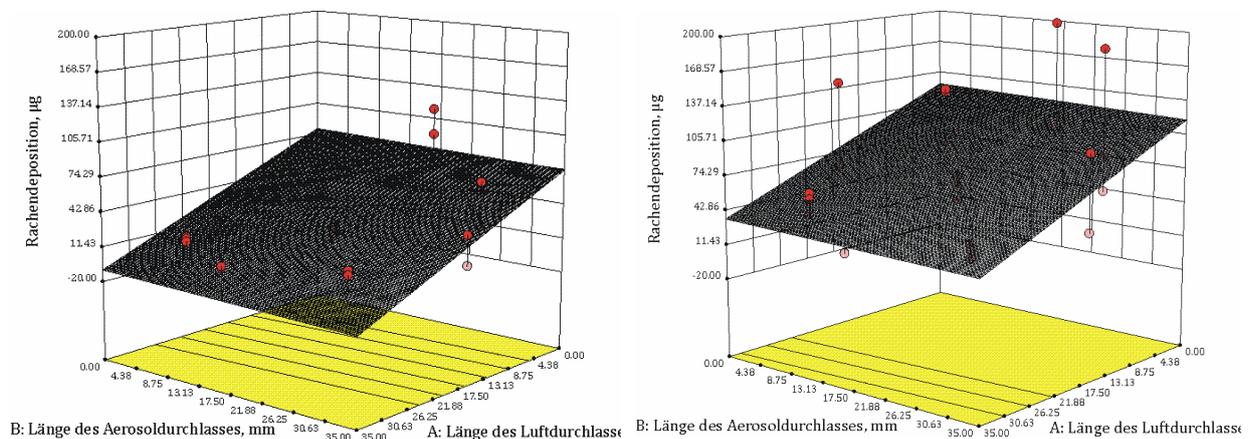


Abbildung 7.11: Einfluss der Luftdurchlass- und Aerosoldurchlasslänge auf die Rachendeposition: links ohne Verwendung des Flutter, rechts mit

Die im Rachen deponierten Aerosolpartikel stellen mit 1 bis 200 µg einen teils beträchtlichen Verlust an Aerosol dar, der pulmonal zumindest theoretisch nicht mehr zur Verfügung stände. Das Ziel ist also die Minimierung und im besten Fall die Vermeidung der Rachendeposition. Die Länge des Luftdurchlasses und der Flutter konnten mit p-Werten < 0,0001 als höchst signifikante Einflussgrößen identifiziert werden. Die Verwendung des Flutter führt zu erheblich höherer Rachendeposition. Dies war während der Durchführung der Messungen schon mit bloßem Auge zu erkennen. Die Begründung liefert die Nähe des Flutter zum Rachen: Bei dessen Verwendung werden die Aerosolpartikel durch die vibrierenden Folien in unge-

ordnete Bewegung versetzt und verlassen so den Luftstrom. Da der Flutter direkt in den Rachen des NGI mündet, schlagen sich die dem Luftstrom kurzzeitig nicht mehr folgenden Partikel dort nieder. Die Verwendung eines längeren Luftdurchlasses führt zu geringeren Rückständen, unabhängig davon, ob mit oder ohne Flutter gemessen wurde. Die Länge des Aerosolführungsröhrchens übt dabei keinen Einfluss aus. Wurde ohne Flutter gemessen, konnte die Rachendeposition bei Verwendung des Luftdurchlasses von 35 mm Länge nahezu verhindert werden.

### 7.3.3.1.4 RÜCKSTAND IM INHALATOR

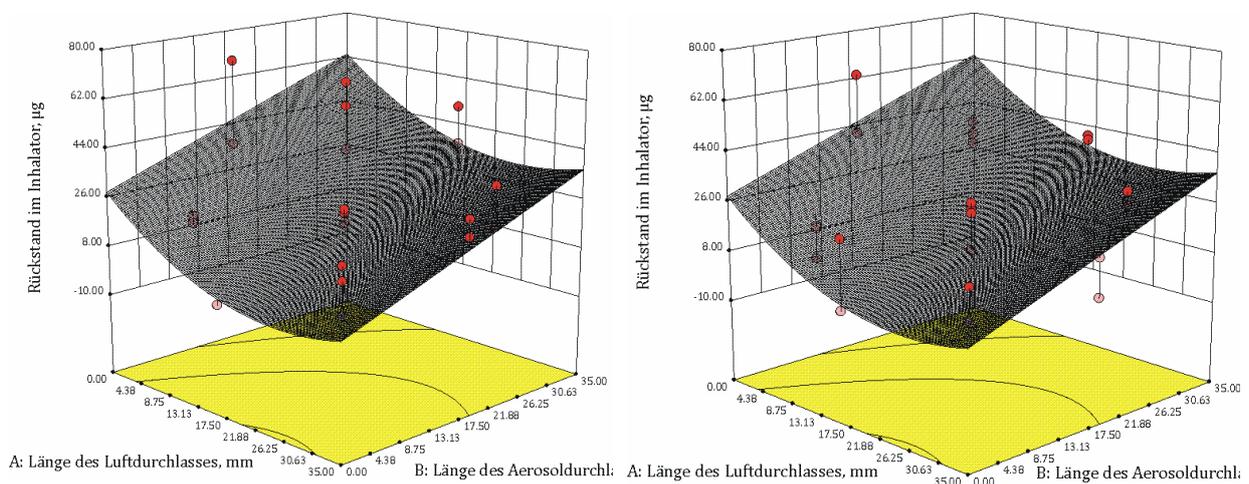


Abbildung 7.12: Einfluss der Luftdurchlass- und Aerosoldurchlasslänge auf den Rückstand im Inhalator: links ohne Verwendung des Flutters, rechts mit

Der Rückstand im Inhalator fluktuierte zwischen 0 und 68  $\mu\text{g}$  Insulin pro Einzeldosis. Die Varianzanalyse legte einen höchst signifikanten Einfluss sowohl des Luft- als auch des Aerosoldurchlasses nahe (in beiden Fällen  $p = < 0,0001$ ). Des Weiteren wird ein quadratischer Einfluss der Luftdurchlasslänge mit  $p = 0,0018$  dargelegt. Die Gegenwart des Flutters hat keinen Einfluss, wie aus Abbildung 7.12 ersichtlich ist. Ein kürzerer Aerosoldurchlass führt generell zu niedrigerer Retention; je kürzer der Luftdurchlass, desto höher ist sie. Bei Verzicht auf den Einsatz des Aerosoldurchlasses und

Verwendung des mittleren Luftdurchlasses von 17,5 mm konnte bei beiden Impaktionsmessungen kein Rückstand detektiert werden.

### 7.3.3.1.5 RÜCKSTAND IM VIAL

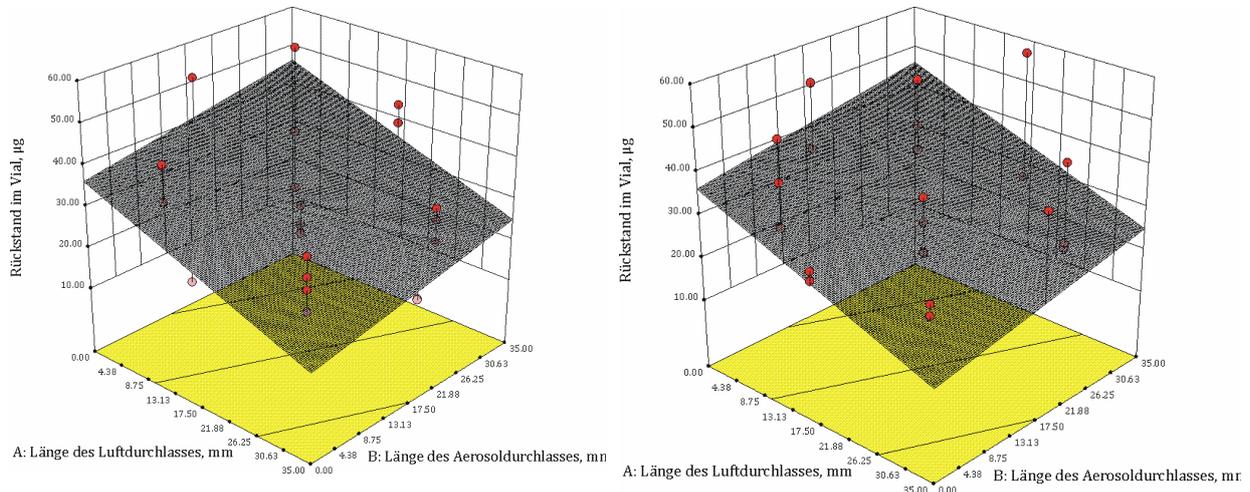


Abbildung 7.13: Einfluss der Luftdurchlass- und Aerosoldurchlasslänge auf den Rückstand im Vial: links ohne Verwendung des Flutter, rechts mit

Der Rückstand im Vial belief sich in diesen Untersuchungen auf 3 bis 56  $\mu\text{g}$  Insulin. Die Länge des Luftdurchlasses übt einen höchst signifikanten Einfluss ( $p = < 0,0001$ ), die Aerosoldurchlasslänge mit  $p = 0,0301$  einen signifikanten Einfluss auf ihn aus. Der Flutter beeinflusst auch hier die Zielgröße nicht, da er erst mit dem Aerosol interagiert, wenn es das Vial bereits verlassen hat. Ein längerer Aerosoldurchlass führt zu minimal höherer Retention an Insulin. Der Luftdurchlass übt einen inversen Effekt aus: Je länger dieser gestaltet ist, desto geringer ist die Retention.

### 7.3.3.2 ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNGEN

Abbildung 7.14 fasst die mit der geeignetsten Inhalatorkonfiguration erzielten relevanten Parameter zur Charakterisierung des erzeugten Aerosols zusammen. Die FPD konnte durch die bloße Verwendung eines Luftführungsröhrchens einer geeigneten Länge von 17,5 mm von 252  $\mu\text{g}$  (Abbildung 7.6) auf 388  $\mu\text{g}$  gesteigert werden, was einem Zuwachs von

knapp über 50% entspricht. Die Gesamtdosis und abgegebene Dosis liegen sehr nahe beieinander, was einen gewünschten geringen Rückstand des Wirkstoffes in Vial und Inhalator nahelegt.

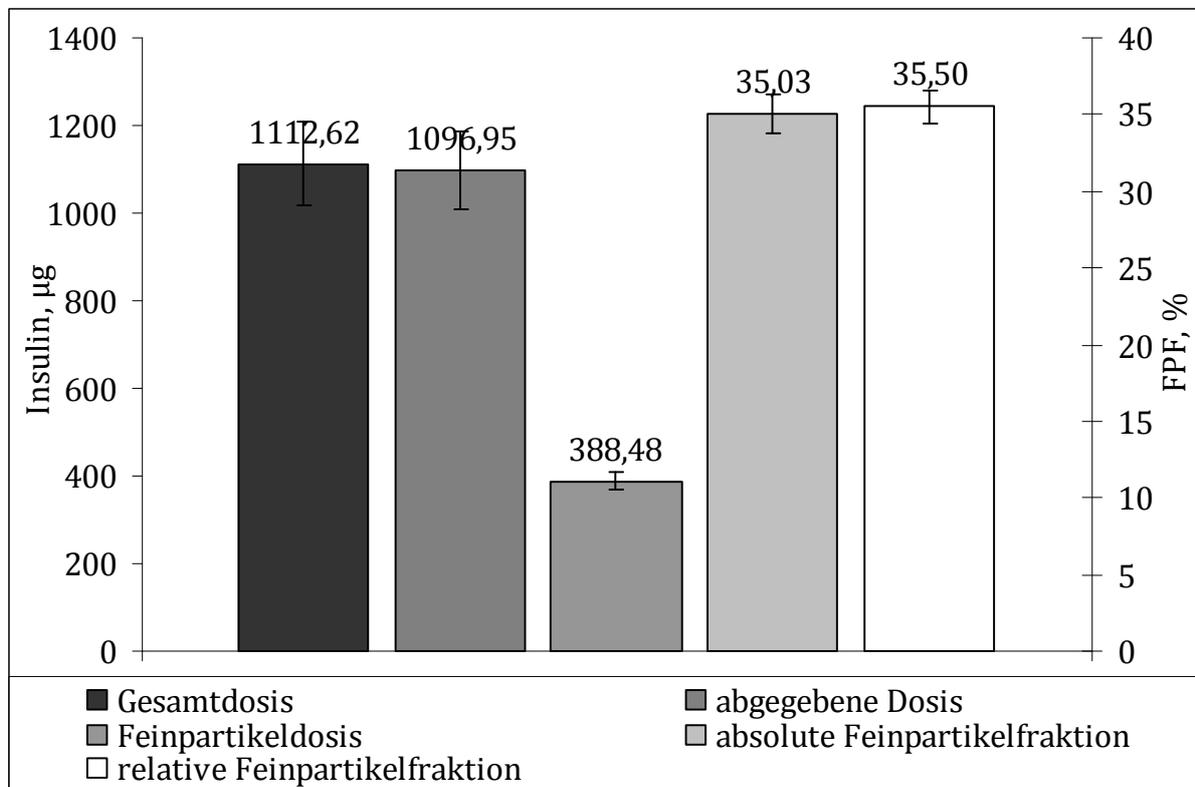


Abbildung 7.14: Erzielte Aerosolcharakteristika mit der geeignetsten Inhalatorkonfiguration: ohne Verwendung des Flutter, ohne Verwendung eines Aerosoldurchlasses, Länge des Luftdurchlasses 17,5 mm

Bei Betrachtung des erreichten Depositionsmusters (Abbildung 7.15, dunkelgraue Balken) fällt der ausgesprochen niedrige Verlust an Wirkstoff in Vial, Inhalator und Rachen auf. In der Summe gehen dort in etwa nur 2% verloren. Noch erfreulicher wäre eine stärkere Dispergierung in feinere Partikel mit geringerer Deposition auf der Stage 1. Dort impaktierte nahezu 50% der Gesamtdosis. Die hellgrauen Balken beschreiben das Depositionsmuster der geeignetsten Formulierung bei Verwendung des Flutter. Dieser scheint die Dispergierung in feinere Partikel minimal zu verbessern, insbesondere im sehr kleinen Größenbereich ab Stage 6 im NGI. Dort ist die Formulierung, die mit der Konfiguration 28,7/28,7 mm und Flutter disper-

giert wurde, leicht überlegen. Wie schon erwähnt, ist die Rachen-, Vial- und Inhalatordeposition bei Verwendung des Flutter vergleichsweise hoch. Weitere Optimierungsansätze sollten darauf abzielen, die klaren Vorteile des Flutter, nämlich die Feindispersierung des Lyophilisates, weiterzuentwickeln und dabei durch gezielte Lenkung des Aerosols die Abscheidung in den Kompartimenten vor Stage 1 zu minimieren.

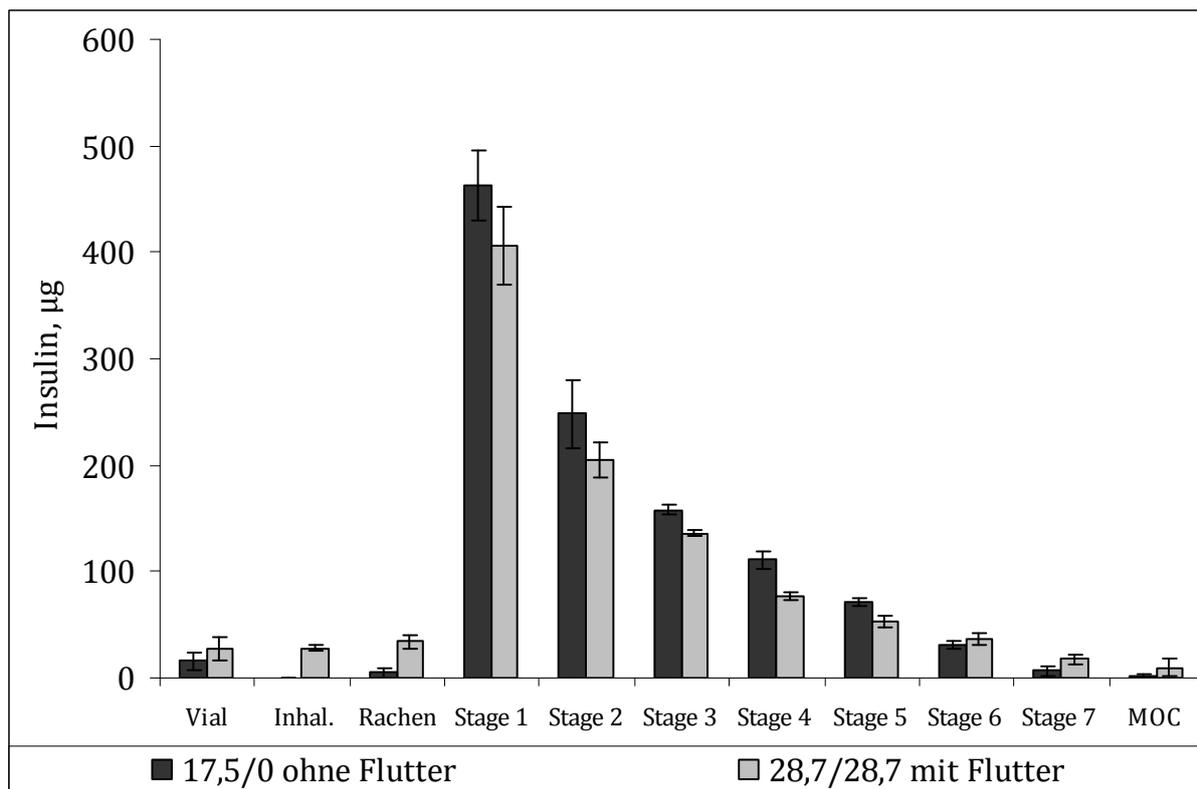


Abbildung 7.15: Vergleich der jeweils besten Inhalatorkonfiguration mit und ohne Verwendung des Flutter

### 7.3.3.3 GLEICHFÖRMIGKEIT DER ABGEBEBENEN DOSIS

Das Europäische Arzneibuch schreibt für Pulver zur Inhalation eine Bestimmung der Gleichförmigkeit der abgegebenen Dosis vor. Dazu wird die bereits auf Seite 48 vorgestellte Apparatur verwendet. Die Zubereitung entspricht der Prüfung, wenn, bezogen auf den Durchschnittswert, 9 der 10 zu ermittelnden Werte zwischen 75 und 125% und alle Werte zwischen 65 und 135% liegen. Wenn 2 oder 3 Werte außerhalb der Grenzen von 75 und 125% liegen, wird die Prüfung mit 2 weiteren Inhalatoren wiederholt.

Höchstens 3 der 30 Werte dürfen außerhalb der Grenzen von 75 und 125% und kein Wert darf außerhalb der Grenzen von 65 und 135% liegen (Ph. Eur., 2008c).

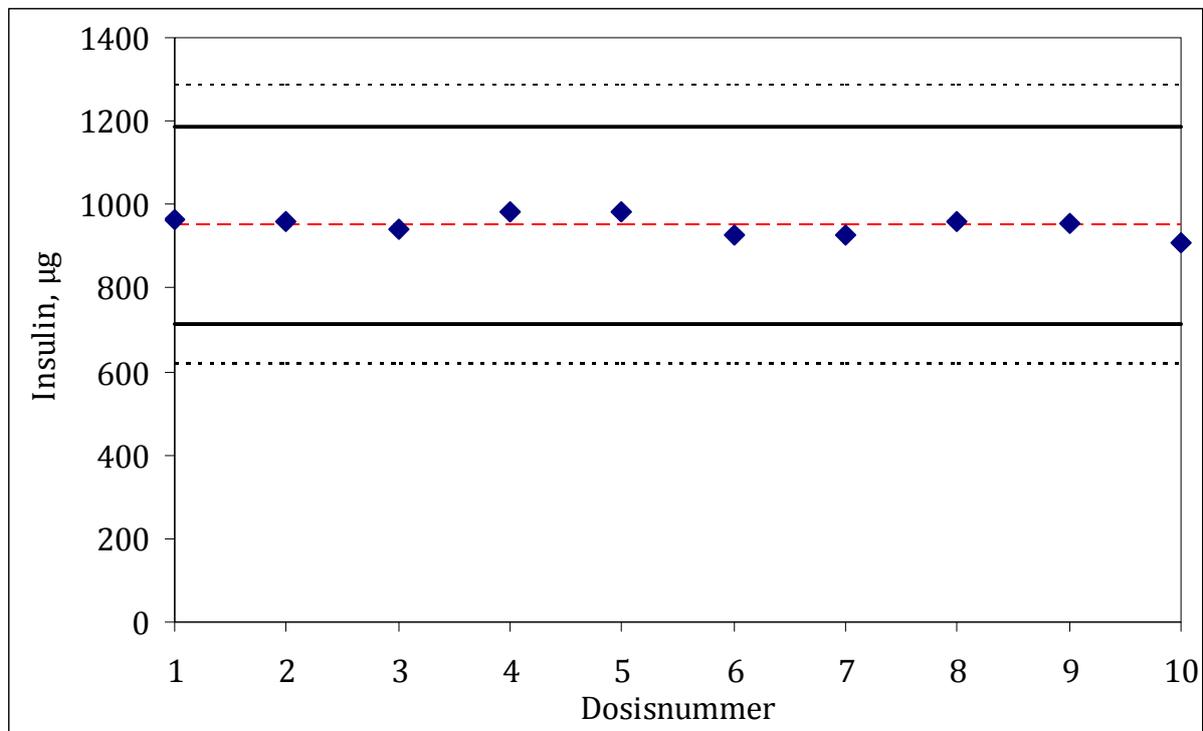


Abbildung 7.16: Prüfung auf Gleichförmigkeit der abgegebenen Dosis nach Ph. Eur. (2008c)

Eine arzneibuchkonforme Prüfung (Abbildung 7.16) mit der Konfiguration „17,5/0, ohne Flutter“ bewies die exzellente Eignung des entwickelten Inhalationssystems zur reproduzierbaren und gleichmäßigen Abgabe des Arzneistoffes. Der Mittelwert der abgegebenen Dosis aus zehn Messwerten betrug 950,82 µg bei einer relativen Standardabweichung von nur 2,61%. Keiner der Messwerte lag außerhalb der 25- und 75%-Grenzen (durchgezogene bzw. fein gestrichelte Linien über und unter den Messwerten). Die grob gestrichelte Linie gibt den Mittelwert der abgegebenen Dosen an.

## 7.4 OPTIMIERUNG DER ZWEITEN VERSION

### 7.4.1 ERWEITERUNG DES VORANGEGANGENEN VERSUCHSPLANS

Die Auswertung des vorangegangenen Versuchsplans zeigte die höchsten Werte für den relevantesten Parameter FPD unter Verwendung eines Luftdurchlasses von 17,5 mm und Verzicht auf den Aerosoldurchlass und den Flutter. Diese leicht als Ausreißer zu unterschätzenden Werte könnten bei Verwendung eines Luftdurchlasses von 35 mm Länge noch gesteigert werden, da erwartet wird, dass die Verwendung eines Luftführungsröhrchens von maximaler Länge den Kuchen durch den stärkeren Aufprall in feinere Partikel „zerreißt“. Da diese Faktorenkombination jedoch nicht in dem Versuchsplan evaluiert wurde, sollte im Folgenden ein weiterer statistischer Versuchsplan zur Untersuchung der fehlenden Eckpunkte des Sterns erstellt werden. Auf den Einsatz des Flutters wurde hierbei verzichtet, da er zwar positive Ansätze hinsichtlich der Feindispergierung zeigte, aber zu hoher Aerosoldeposition in Rachen, Vial und Inhalator führte. Es ergab sich ein vollfaktorieller  $2^2$ -Versuchsplan mit den bekannten Einflussgrößen Luft- und Aerosoldurchlasslänge, die auf den Stufen 0 (ohne) und 35 mm variiert wurden.

*Tabelle 7.3: Faktoren im Versuchsplan*

<b>Faktor</b>	<b>Name</b>	<b>Typ</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>	<b>Zentralpunkt</b>
<b>A</b>	Länge des Luftdurchlasses, mm	numerisch	0	35	17,5
<b>B</b>	Länge des Aerosoldurchlasses, mm	numerisch	0	35	17,5

Die Faktoren wurden auf jeder Stufe miteinander kombiniert. Jeder Designpunkt wurde zwei mal, der Zentralpunkt vier Mal gemessen, so dass dieser Versuchsplan in 12 Impaktionsmessungen resultierte.

**7.4.1.1 ERGEBNISSE**

Die statistische Auswertung ergab für alle Zielgrößen, mit Ausnahme der abgegebenen Dosis, signifikante Modelle zur Beschreibung der erzeugten Daten (Tabelle 7.4).

*Tabelle 7.4: Modellparameter der untersuchten Zielgrößen*

Zielparameter	p value			R-squared	
	Modell	curvature	lack of fit	adjusted	predicted
FPD	0,0028	0,9807	0,9807	0,7427	0,5748
absolute FPF	0,0070	0,4010	0,4010	0,7082	0,5858
relative FPF	0,0099	0,3686	0,3686	0,6439	0,5235
DD	kein passendes Modell gefunden				
Rachen-deposition	0,0006	< 0,0001	< 0,0001	0,8249	0,7503
Rückstand im Vial	0,0096	0,9531	0,9531	0,6467	0,2667
Rückstand im Inhalator	< 0,0001	0,8732	0,8732	0,9593	0,9404
MMAD	0,0016	0,5920	0,3450	0,6137	0,4563

Die p-Werte für „curvature“, die bei Signifikanz eine Nichtlinearität der Zusammenhänge andeuten, sind bis auf den der Rachendeposition nicht signifikant, ebenso die Werte für den „lack of fit“. Es konnten qualitativ hochwertige Modelle mit vergleichsweise hohen  $R^2$ -Werten errechnet werden. Das bedeutet, dass das Modell Werte möglicher zukünftiger Versuche gut vorhersagt und das Ausmaß der Streuung der tatsächlichen Messwerte um die vorhergesagten Werte gering ist.

Die erzielten Partikelgrößenverteilungen (Abbildung 7.17) konnten im Vergleich zur geeignetsten Inhalatorkonfiguration des vorangegangenen Versuchplanes (17,5/0, durchgezogene Linie) entgegen der Erwartungen nicht weiter zu höheren Depositionswerten in den hinteren Abscheideschalen und somit zu höhere Feinpartikeldosen verschoben werden. Die Konfiguration 35/0 mm ist der geeignetsten Konfiguration hinsichtlich der Partikelgrößenverteilung zwar am ähnlichsten, kann diese jedoch nicht überbieten.

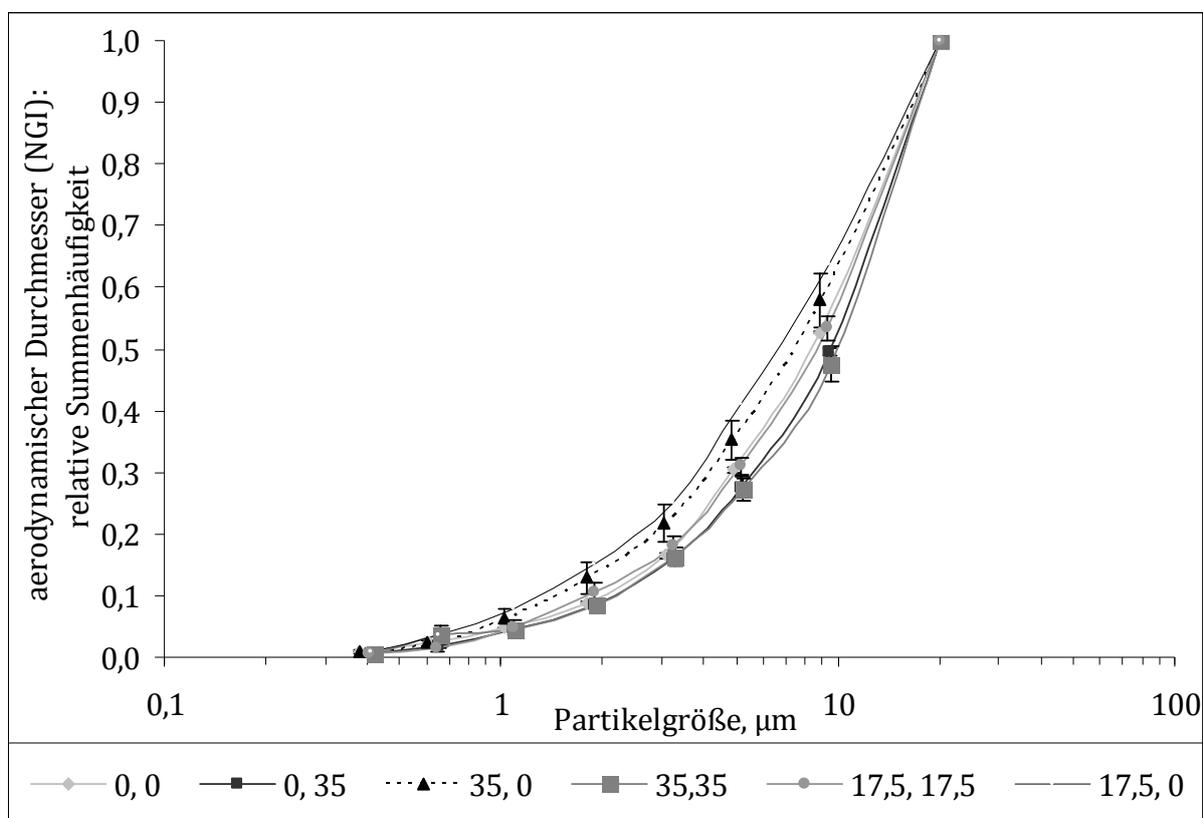


Abbildung 7.17: Erzielte Partikelgrößenverteilungen mit den getesteten Inhalatorkonfigurationen

#### 7.4.1.1.1 FEINPARTIKELDOSIS

Die Auswertung der Varianzanalyse ergab hinsichtlich der relevantesten Zielgröße FPD sowohl für die Faktoren A und B ( $p = 0,0056$  vs.  $0,0288$ ), als auch für deren Interaktion ( $p = 0,0062$ ) jeweils signifikante Zusammenhänge, wie Abbildung 7.18 verdeutlicht. Bei Verwendung des Aerosol-

durchlasses von 35 mm Länge hat die Luftdurchlasslänge keinen Einfluss auf die erzielte FPD; bei Verzicht auf den Aerosoldurchlass hat sie jedoch einen deutlich positiven Effekt. So steigt die FPD bei Verwendung des 35 mm-Röhrchens um etwa 125  $\mu\text{g}$  im Vergleich zur Messung ohne Luftdurchlass.

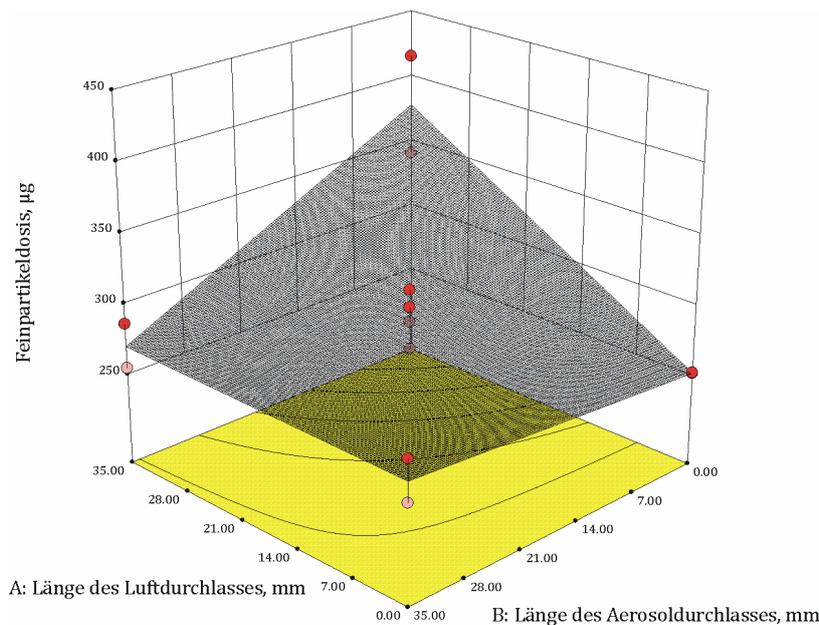


Abbildung 7.18: Einfluss der Luft- und Aerosoldurchlasslänge auf die Feinpartikeldosis

#### 7.4.1.1.2 RACHENDEPOSITION

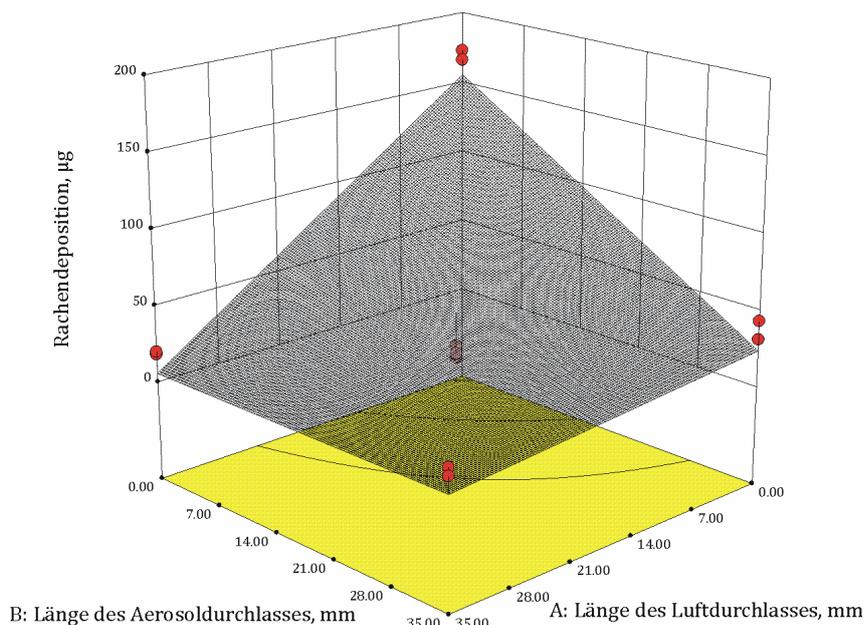


Abbildung 7.19: Einfluss der Luft- und Aerosoldurchlasslänge auf die Rachendeposition

Beide untersuchten Faktoren sowie deren Interaktion üben jeweils einen höchst signifikanten Einfluss auf die Deposition im Rachen aus. Bei Verwendung des Aerosoldurchlasses von 35 mm Länge impaktiert sehr viel weniger Aerosol im Rachen im Vergleich zu dessen Nichtverwendung. Das gleiche gilt für den Luftdurchlass: Bei dessen Fehlen impaktiert ein beträchtlicher Teil des Aerosols (im Durchschnitt etwa 170 µg) im Rachen. Durch das Verwenden des 35 mm-Luftdurchlasses konnte die Rachendeposition nahezu vermieden werden (vergleiche Kapitel 7.3.3.1.3). Das Aerosol wird durch die Verwendung der Röhrchen vermutlich in sich zusammengehalten.

#### **7.4.1.1.3 RÜCKSTAND IM VIAL**

Der Rückstand im Vial wird sowohl von der Aerosoldurchlasslänge ( $p = 0,0152$ ), als auch durch die Interaktion der Faktoren A und B ( $p = 0,0080$ ) beeinflusst. Am ungünstigsten erwies sich dabei die Nichtverwendung beider Röhrchen, wobei etwa 40 µg Insulin im Vial verblieben. Die Verwendung eines kurzen Aerosoldurchlasses ist bei längeren Luftdurchlässen von Vorteil. Die logischerweise niedrigsten Insulinrückstände werden bei Nichtverwendung eines Luftdurchlasses und langem Aerosoldurchlass erreicht, da das Lyophilisat so „abgesaugt“ wird.

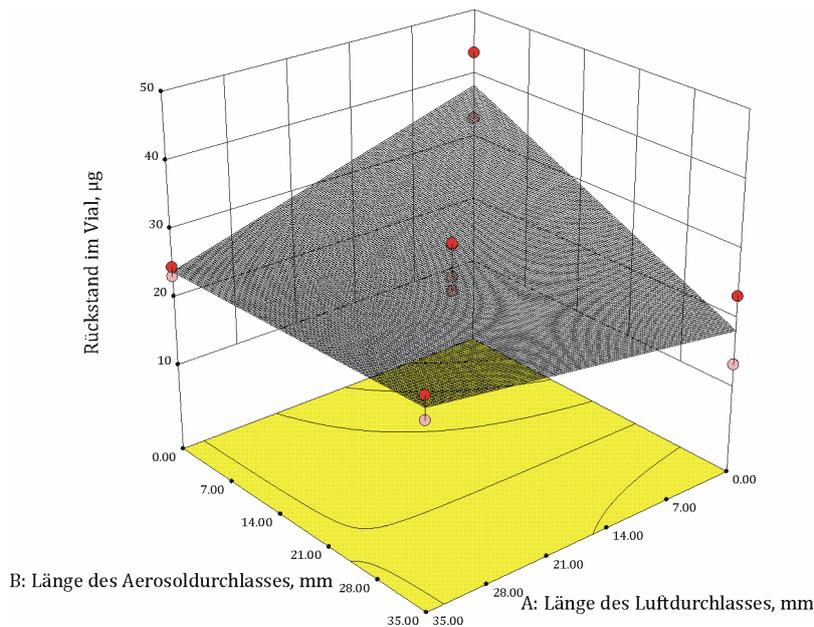


Abbildung 7.20: Einfluss der Luft- und Aerosoldurchlasslänge auf den Rückstand im Vial

### 7.4.1.1.4 RÜCKSTAND IM INHALATOR

Das Modell zur Beschreibung des Inhalatorrückstandes ist ebenso wie die Hauptfaktoren und deren Interaktion höchst signifikant ( $p < 0,0001$ ), wie Abbildung 7.21 veranschaulicht. Während ein langer Aerosoldurchlass bei gleichzeitiger Nichtanwesenheit eines Luftdurchlasses zu Rückständen zwischen etwa 20 und 30  $\mu\text{g}$  führt, kann durch Verzicht auf die Aerosolführung und Einsetzen der Luftführung von 35 mm die Inhalatordeposition nahezu vermieden werden.

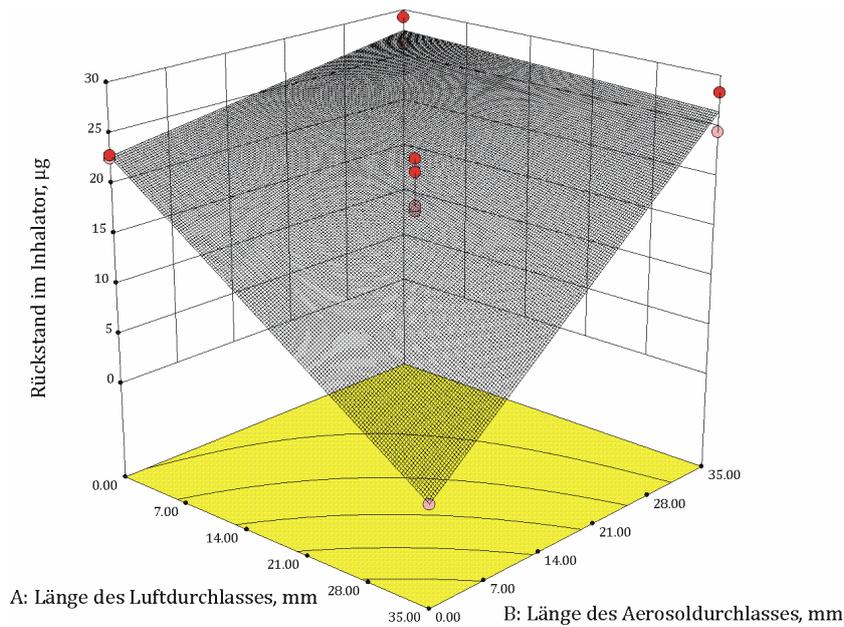


Abbildung 7.21: Einfluss der Luft- und Aerosoldurchlasslänge auf den Rückstand im Inhalator

#### 7.4.1.2 ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNGEN

Das Ziel dieses Versuchsplans, die Feinpartikeldosis der geeignetsten Formulierung aus dem vorangegangenen Versuchsplan noch zu steigern, ist fehlgeschlagen. Abbildung 7.22 zeigt die ermittelten Parameter. Der Durchschnitt der maximal erreichten FPD liegt mit 379  $\mu\text{g}$  knapp unter der Höchstmarke des letzten Versuchsplans, was in einer Feinpartikelfraktion bezogen auf die Gesamtdosis von 35% resultiert. Die Gesamt- sowie die abgegebene Dosis liegen weiterhin auf einem hohen, reproduzierbaren Niveau. Die Rückstände in Vial, Inhalator und Rachen sind bei Anwendung der besten Konfiguration zu vernachlässigen.

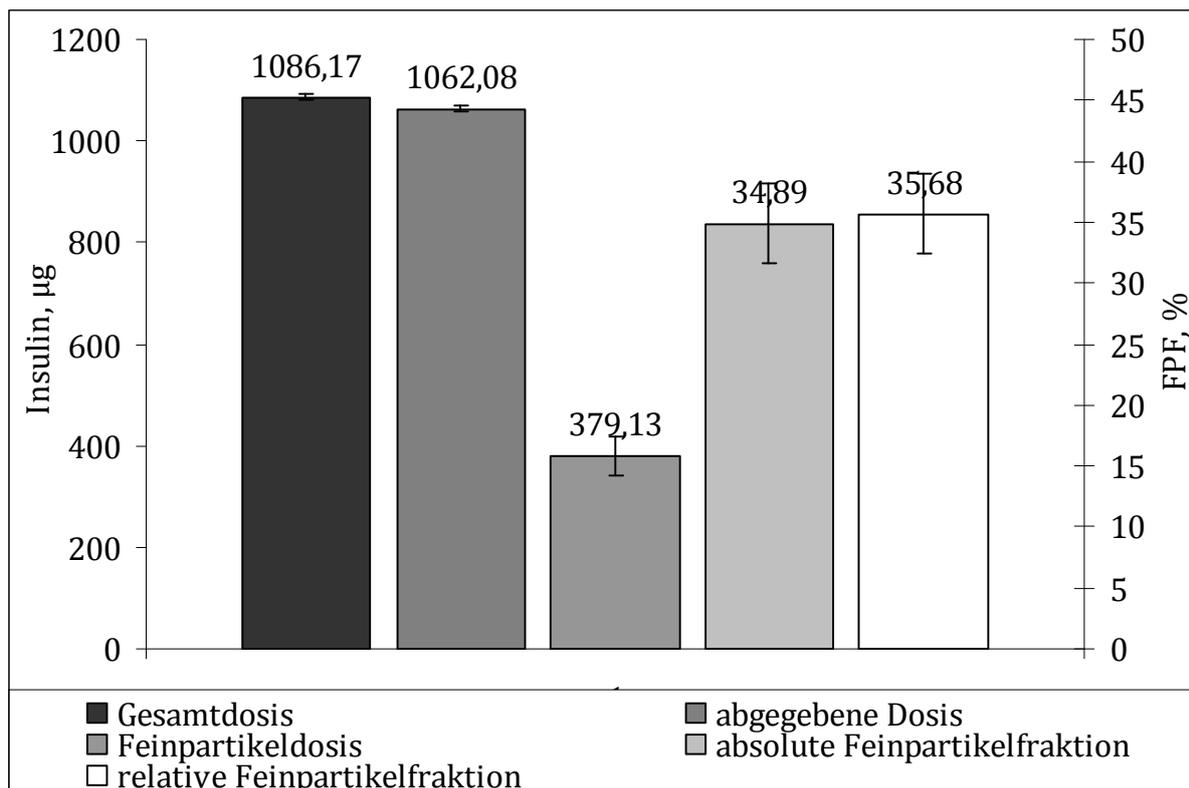


Abbildung 7.22: Erzielte Aerosolkenngößen unter Verwendung der geeignetsten Inhalator-konfiguration: ohne Verwendung des Flutter, ohne Verwendung eines Aerosoldurchlasses, Länge des Luftdurchlasses 35 mm

#### 7.4.2 OPTIMIERTES MODELL

Die in diesem Kapitel bereits beschriebenen Untersuchungen legten einen deutlichen Einfluss der Luftführung, die durch den Inhaliervorgang ausgelöst wird, auf die entstehende Feinpartikeldosis nahe. Dabei war die Länge des Luftführungsröhrchens von großer Bedeutung. Ab einer Länge von 17,5 mm und ohne die Verwendung eines Aerosolführungsröhrchens wurden akzeptable Feinpartikeldosen erzielt. In einem nächsten Schritt sollte evaluiert werden, inwiefern sich eine Verbreiterung der Aerosolführung, die mit einer Erniedrigung des Inhalatorwiderstandes einhergeht, zu einer optimierten Feindispersierung des Lyophilisates führt.

Dazu wurde der Aerosoldurchlass des Inhalators aus Abbildung 7.5 so weit wie möglich aufgebohrt, ohne die Fassung des Luftführungsröhrchens zu beschädigen. Dies resultierte in einem Aerosoldurchlass von fünf Millime-

tern Breite und zehn Millimetern Länge. Messungen der Flussrate bei entsprechendem Druckabfall über dem Inhalator von vier Kilopascal bestätigten die Reduzierung des Inhalatorwiderstandes. Die Messflussrate bei Verwendung des 35 mm-Luftführungsröhrchens stieg durch die Vergrößerung der Bohrung von 51,0 auf 53,6 l/min. Abbildung 7.23 zeigt die Partikelgrößenverteilungen, ermittelt durch jeweils drei Impaktionsmessungen.

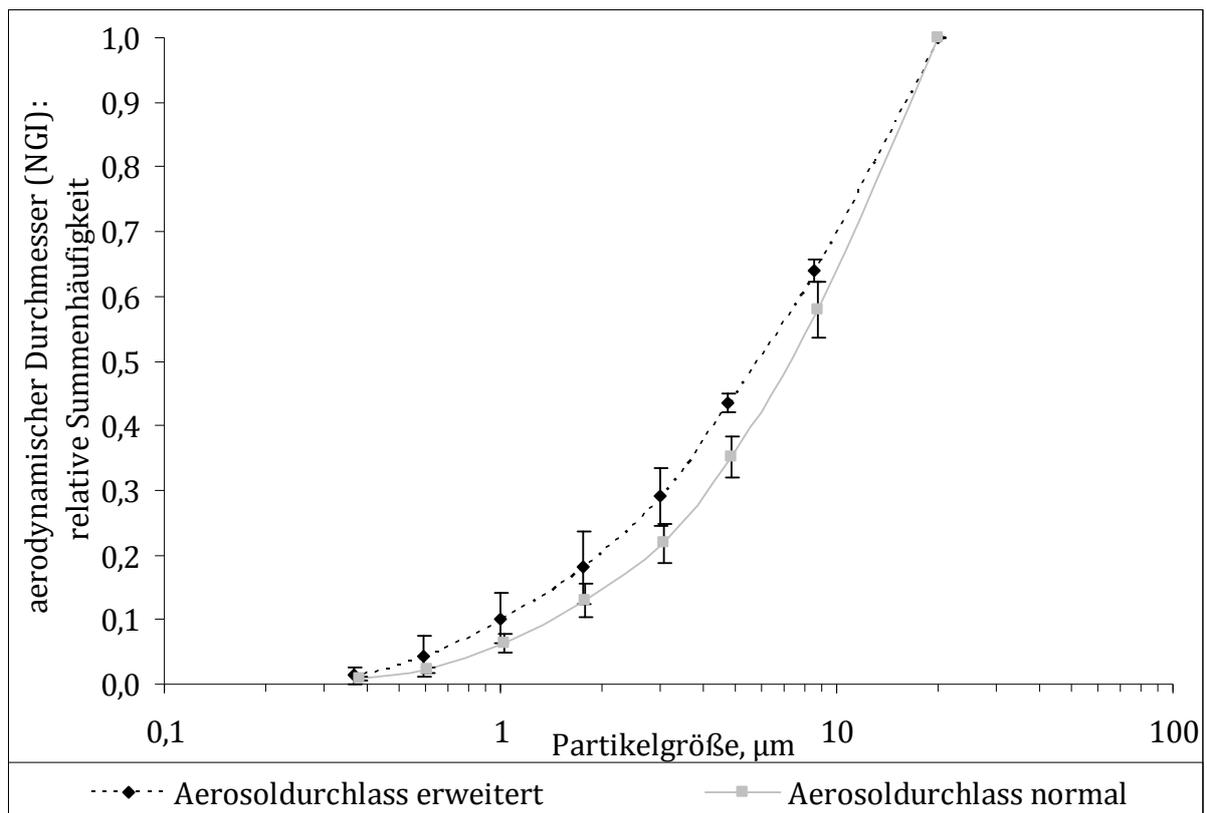


Abbildung 7.23: Vergleich der erzielten Partikelgrößenverteilungen unter Verwendung der Konfiguration 35/0 mm mit und ohne aufgebohrtem Aerosoldurchlass

Die erweiterte Aerosolführung hat einen deutlichen Effekt auf die resultierende Partikelgröße. Die Generierung feiner Partikel  $\leq 5 \mu\text{m}$ , die essentiell für eine inhalative Anwendbarkeit des Lyophilisates ist, geschieht in höherem Maße als durch die normale Aerosolführung. Dies wird ebenso deutlich bei Betrachtung der relevanten Aerosolparameter (Abbildung 7.24). Die Gesamtdosis und die abgegebene Dosis sind analog zu der geeignetsten Konfiguration des Inhalators aus Kapitel 7.3.3 konstant und reproduzierbar

auf einem hohen Niveau. So beträgt der Verlust an Insulin, der in Vial und Inhalator zurückbleibt, nur etwa 12  $\mu\text{g}$ , was einem prozentualen Anteil der Gesamtdosis von nur 1,2% entspricht.

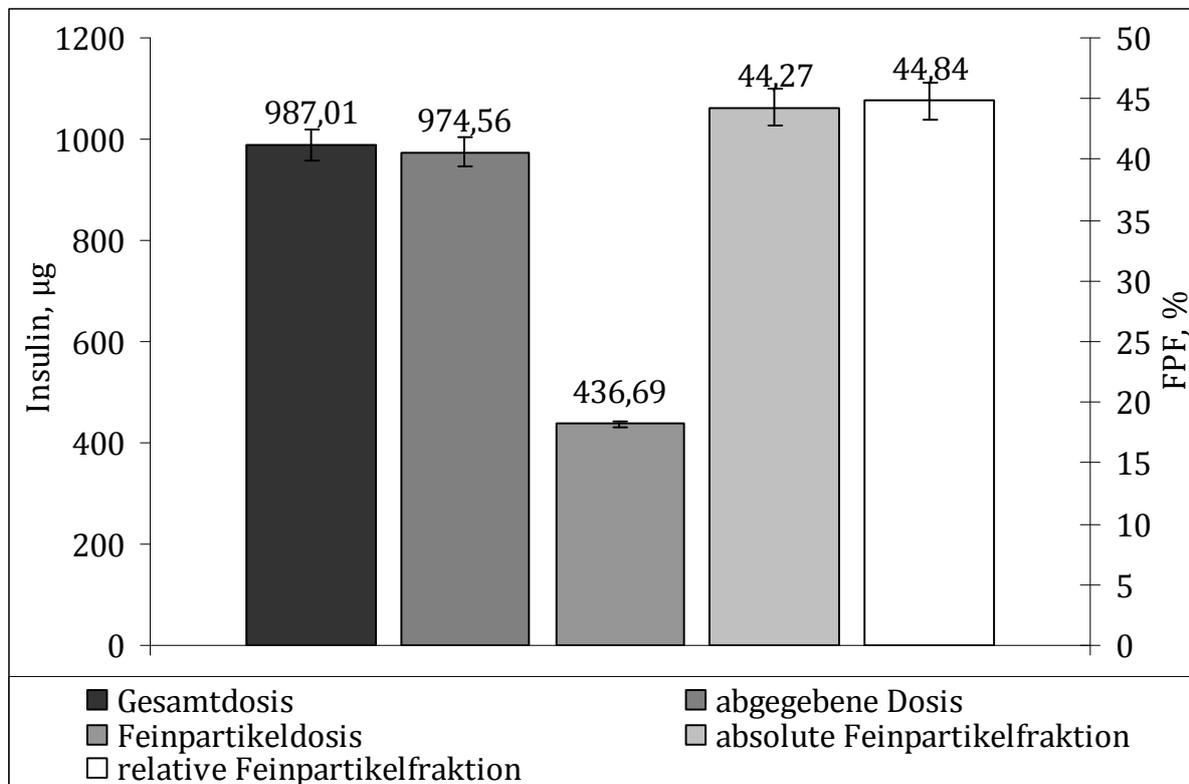


Abbildung 7.24: Ergebnisübersicht der erzeugten Aerosolparameter mit der finalen Version des atemzuggesteuerten Inhalators

## 7.5 ZUSAMMENFASSUNG UND ABSCHLIEßENDE BEWERTUNG DES ATEMZUGGESTEUERTEN INHALATORS

Die vorliegenden Untersuchungen unterstreichen die Eignung gefriergetrockneter Formulierungen geringer Dichte zur direkten Dispergierung in ein Trockenpulveraerosol. Es konnte mit einfachen Mitteln ein Inhalationssystem entwickelt werden, das ein Aerosol von hoher Reproduzierbarkeit erzeugt. Dieses besteht aus nur drei Teilen. Aufgrund des sehr einfachen Aufbaus des Inhalators ist es denkbar, ihn kostengünstig in großer Stückzahl aus Kunststoff herzustellen. Die Anforderung einer geringen Größe des Systems konnte umgesetzt werden. Mit nur 79,5 mm Länge inklusive des

aufgesteckten Vials ist es weniger als halb so groß im Vergleich zu dem von Pfizer entwickelten Exubera®-Inhalator, welcher mit ausgezogener Kammer etwa 200 mm misst (Heinemann, 2002). Es kann also analog zu pMDIs auch ständig mitgeführt werden, ohne zu stören.

Das erzeugte Aerosol ist hinsichtlich des lungengängigen Anteils dem in Kapitel 6 beschriebenen aktiven Inhalationssystem überlegen. Die erzielte Feinpartikeldosis konnte von durchschnittlich 196 µg bei Verwendung der geeignetsten Dispergierparameter auf 436 µg bei Aerosolisierung mithilfe der finalen Version des atemzuggesteuerten Inhalators gesteigert werden. Dies entspricht einer Feinpartikelfraktion von knapp 44% bezogen auf die ausgewiesene Dosis von 1 mg.

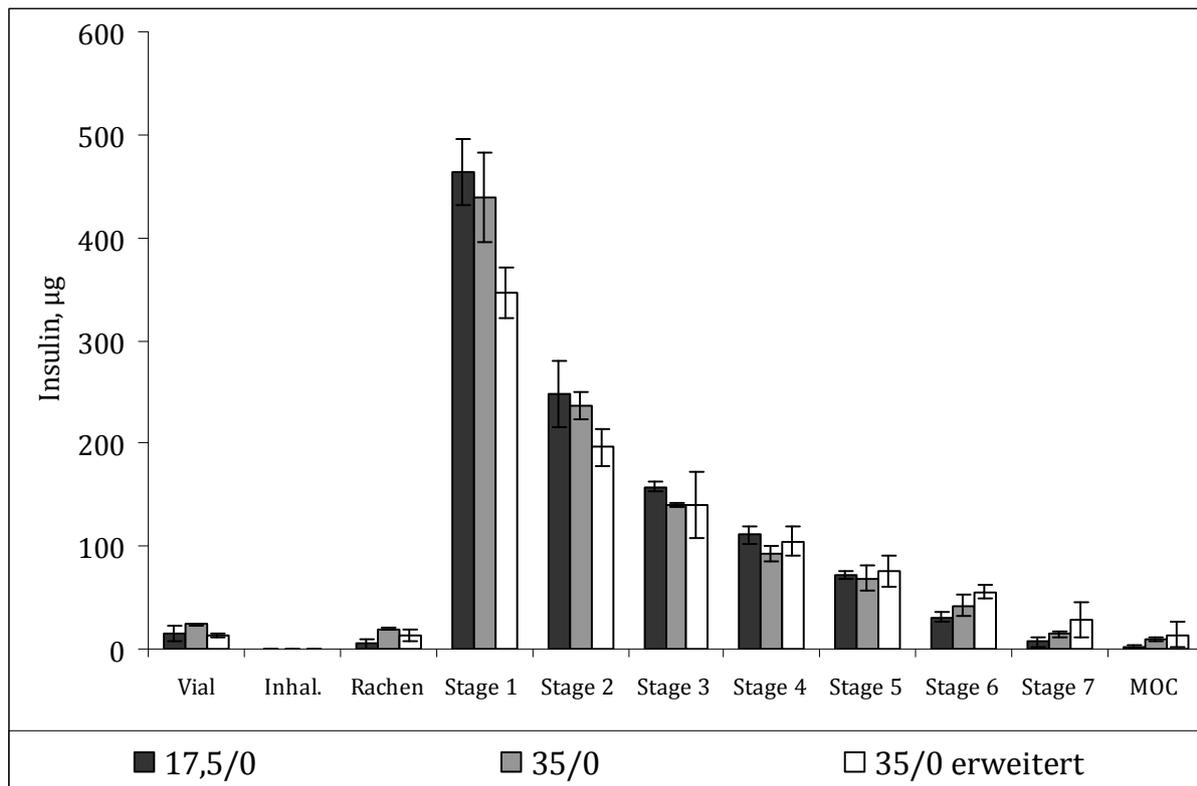


Abbildung 7.25: Vergleich der Depositionsmuster der Formulierung 1, dispergiert mit der jeweils geeignetsten Inhalatorkonfiguration aus den vorangegangenen Versuchsplänen

Abbildung 7.25 gibt die Depositionsmuster der aerosolisierten Formulierungen mittels der verschiedenen Entwicklungsstufen des atemzuggesteu-

erten Inhalators an. Die Aerosoldeposition auf den für die FPD relevanten Abscheideschalen (je nach Messflussrate unterschiedlich) konnte im Laufe der Entwicklung stetig gesteigert werden. Am vorteilhaftesten erwies sich die Dispergierung mit der finalen Version, deren erzeugtes Depositionsmuster sich am weitesten nach rechts zu kleineren MMADs verschob (weiße Balken).

Es konnte gezeigt werden, dass die verwendeten Führungsröhrchen einen positiven Einfluss sowohl auf die Feinpartikeldosis, als auch auf die Rückstände in Vial, Inhalator und Rachen haben. Der Einsatz eines langen Luftdurchlasses, der den Luftstoß direkt auf die Lyophilisatoberfläche richtet und gleichzeitiger Verzicht auf ein Aerosolführungsröhrchens führte zu der höchsten erreichten FPD und konnte die Rückstände in den drei Kompartimenten auf 2,6% reduzieren Zum Vergleich: Messungen an Exubera® (Dosisierung 1 mg/Blister) führten zu Rückständen in Vial, Inhalator und Rachen von insgesamt circa 62% (Klingler, 2009).

Der von der Firma RPC Formatec (RPC Formatec, Mellrichstadt, Deutschland) entwickelte Flutter zeigte eine Tendenz zur weiteren Zerkleinerung der erzeugten Aerosolpartikel durch Schwingungen, was sich in erhöhter Insulindeposition auf den hinteren Abscheideschalen im NGI äußerte. Unglücklicherweise führte die Vibration des Flutters zu einer diffusen Verwirbelung des Aerosols bei dessen Passage, so dass teils hohe Rückstände im Rachen detektiert werden konnten, die im schlechtesten Fall knapp 20% der ausgewiesenen Dosis von 1 mg Insulin entsprachen. Die Dispergierung des Lyophilisates ist hinsichtlich des erreichten MMADs noch verbesserbar, da der mengenmäßig größte Teil des Lyophilisates in allen Fällen auf der Stage 1 im NGI impaktierte.

## 8 ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT

In der vorliegenden Arbeit wird die Entwicklung pulmonal applizierbarer gefriergetrockneter Formulierungen mit Insulin als Modellprotein und geeigneter Inhalationssysteme zur Dispergierung dieser beschrieben.

Um diese Ziele zu erreichen, wurden zunächst Proteinformulierungen auf Basis von verträglichen und mit Ausnahme von Polysorbat 80 körpereigenen Substanzen entwickelt. Neben Insulin als Wirkstoff wurden L-Glutaminsäure, L-Leucin, myo-Inositol und Polysorbat 80 verwendet. Eine physiko-chemische Charakterisierung der verschiedenen Formulierungsansätze führte zur Auswahl einer besonders geeigneten Formulierung, bestehend aus Insulin, L-Glutaminsäure und Polysorbat 80. Diese Formulierung konnte hinsichtlich der kritischen Formulierungstemperatur von  $-28^{\circ}\text{C}$  überzeugen und ließ sich mit den vorhandenen Gefriertrocknern problemlos lyophilisieren. Das Insulin liegt in dieser Formulierung eingebettet in einer teilkristallinen Hilfsstoffmatrix vor. Die amorphe Phase der Hilfsstoffmatrix stabilisiert es während der Lyophilisation, während die kristalline Phase dem Lyophilisat Struktur verleiht und so dessen Kollaps verhindert. Langzeitbeobachtungen an gelagerten Lyophilisaten beweisen die mechanische Stabilität. Der Hilfsstoffkonzentration kommt dabei eine entscheidende Rolle zu: Hohe Hilfsstoffkonzentrationen führten zu einer vollständigen Stabilisierung des Wirkstoffes, waren aber im Hinblick auf die Generierung eines lungengängigen Aerosols nicht überzeugend. Niedrige Hilfsstoffkonzentrationen führten zu einer akzeptablen Feinpartikelfraktion des Aerosols, induzierten jedoch deutliche Einbußen an biologischer Aktivität während der Lyophilisation und damit zu inakzeptablem Wirkverlust. Insulin ist mit einem Milligramm pro Einzeldosis vergleichsweise hoch dosiert. Viele inhalativ zur Anwendung gebrachte Wirkstoffe sind hochpo-

tent und kommen daher, wie zum Beispiel das Anticholinergikum Tiotropiumbromid, in Konzentrationen von 18 µg pro Einzeldosis auf den Markt. Bei Verwendung eines ebenfalls niedrig dosierten Proteins nivelliert sich dieser Konflikt zwischen Dispergierbarkeit und Stabilität. Dies ist im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht worden. Messungen der aerodynamischen Partikelgrößenverteilung der dispergierten Lyophilisate zeigten die Eignung dieser Arzneiform zur pulmonalen Therapie. Bedingt durch die sehr geringe Dichte der entwickelten Formulierung von nur 0,006 g/cm<sup>3</sup> kann sie durch einen Gasimpuls beliebiger Natur spontan in ein Trockenpulveraerosol überführt werden. Dieses Prinzip der Dispergierung nutzen beide der entwickelten Inhalationssysteme. Der erste entwickelte Inhalator nutzt einen aktiven Dispergiermechanismus zur Aerosolisierung der gefriergetrockneten Zubereitung. Dieses System generierte Aerosole mit Feinpartikelfractionen von etwa 20%, bezogen auf die ausgewiesene Dosis. Diese konnten durch Optimierungsversuche nicht gesteigert werden, so dass von einer weiteren Entwicklung durch beispielsweise Testung weiterer Dispergierdrücke oder Verwendung eines größeren Spacers abgesehen wurde. Es wurde daher die Entwicklung eines weiteren Inhalationssystems angestrebt, das die aus der Entwicklung des vorangegangenen Inhalators gewonnenen Informationen zur Dispergierung nutzt. Dieser zweite entwickelte DPI ist atemzuggesteuert, das heißt, der Patient selbst steuert den Dispergiervorgang. Er weist einige Vorteile gegenüber der ersten Entwicklung auf: Er ist erheblich kleiner, benötigt kein Druckgas und generiert Aerosole von besserer Qualität. Die Dispergierleistung lag schon bei Verwendung eines ersten Prototypes bei der des optimierten aktiven Inhalators. Auf Basis von statistischen Versuchsplänen und Vergrößerung der Geometrien konnte diese Leistung schrittweise optimiert werden. Die finale Version des Inhalators zeigt eine akzeptable Feinpartikelfraction bezogen auf die ausgewiesene Dosis von 44% entsprechend ca. 440 µg Feinpartikel-

dosis bei marginalem Rückstand in Vial, Inhalator und Rachen von nur 2,6%.

Durch Anwendung der Lyophilisation als Herstellungsverfahren konnte ein labiler Wirkstoff in eine Formulierung gebracht werden, die pulmonal appliziert werden kann. Die mithilfe des atemzuggesteuerten Inhalators dispergierten Lyophilisate führten zu Trockenpulveraerosolen, die hinsichtlich des lungengängigen Anteils der Exubera<sup>®</sup>-Formulierung, die eine Feinpartikelfraktion von 41% erreichte, leicht überlegen sind. Der im Rahmen dieser Untersuchungen entwickelte atemzuggesteuerte Inhalator ist aufgrund seiner geringen Größe aber weitaus patientenfreundlicher. Das entwickelte System aus einem Lyophilisat geringer Dichte in Kombination mit dem einfach zu benutzenden Inhalator stellt durch seine Versatilität auch für viele andere inhalativ zu applizierende Wirkstoffe eine gute Alternative zu den auf dem Markt erhältlichen Inhalationssystemen dar.

## 9 ABSTRACT

The present study describes the development of low-density freeze-dried protein compositions intended for inhalation with human insulin as model protein and inhalation systems for application thereof. At first, various substances were evaluated regarding their ability to act as protein stabilizers. After accomplishing and analyzing the results of physicochemical measurements, one formulation seemed to be appropriate in particular, containing 1 mg of human insulin besides glutamic acid and polysorbate 80. This combination shows a favourable and applicable glass transition temperature of the maximally freeze-concentrated solution of about  $-28^{\circ}\text{C}$  and leads to mechanically stable semi-crystalline lyophilisates after freeze-drying. The protein is protected against perturbations during lyophilisation and storage by an amorphous matrix while semi-crystalline glutamic acid forms a framework warranting mechanical stability. The concentration of excipients was found to be essential in terms of maintaining biological activity of insulin and enabling dispersion into a fine aerosol. High concentrations led to fully active insulin after lyophilization but poor aerosolization performance. Low concentrations led to loss of activity but promising aerosolization properties indicating a lack between activity preservation and dispersibility. With a content of 1 mg per single dose, insulin is high dosed compared to other inhaled therapeutics, for example tiotropium-bromide with a single dose of only 18  $\mu\text{g}$ . By application of such a low-dosed API the conflict between dispersibility and stability will possibly be eliminated. Due to the extremely low density of the freeze-dried composition of  $0.006\text{ g/cm}^3$  it was easily dispersed into a fine aerosol by an impact of air suitable for lung delivery. This mechanism was used by both of the developed inhalation systems.

The first one was based on an active dispersion mechanism by an impact of a gas, regardless whether nitrogen or pressurized air was used. By this impact, the lyophilisate was dispersed in to a spacer device from which the patient can inhale the aerosol taking one or several breaths. Investigations to optimize the dispersion event by changing dispersion parameters like dispersion pressure and time were unsuccessful. Resulting fine particle doses were approximately 200 µg insulin per dose which is equal to 20% fine particle fraction related to the labeled dose of 1 mg. High amounts of insulin did not reach the impactor due to high retention in spacer, vial and induction port. The optimized inhaler was designed to be breath-actuated meaning the patient himself disperses the composition by inhaling deeply through the device. It was much smaller than the previous one and had several additional advantages. No pressurized gas was needed and the quality of generated aerosols was higher. A first prototype achieved fine particle fractions as high as the active inhaler but, in contrast, with better reproducibility and higher values for delivered dose. Retention in vial, inhaler and induction port nearly could be avoided amounting to approximately 2.6% using the latest version. Fine particle doses could be increased with every conducted design of experiment with highest values gained of about 440 µg which is equal to 44% fine particle fraction related to the labeled dose of 1 mg. By using lyophilisation as production method, a labile drug as insulin could be transferred into an inhalable formulation with promising aerosol performance. The customized patient-friendly breath-actuated inhalation system in combination with the low-density freeze-dried cake yielded fine particle fractions which slightly exceeded the performance of the first inhalable protein formulation on the market, Exubera® from Pfizer (44% vs. 41%), wherein the developed system was smaller and much easier to handle. Its versatility could make it capable of dispersing any possible drug into an aerosol.

**10 ANHANG****10.1 SYMBOLE UND ABKÜRZUNGEN**

$\theta$	Beugungswinkel
at	Technische Atmosphäre
CCD	Central composite design
CMIA	Chemilumineszenz-Mikropartikelimmunoassay
$d_a$	Aerodynamischer Durchmesser in $\mu\text{m}$
DD	Delivered dose
DPI	Dry powder inhaler
DSC	Differential scanning calorimetry
DVS	Dynamic vapor sorption
ECD	Effective cut-off diameter
FDA	US Food and Drug Administration
FDM	Freeze-dry microscopy
FPD	Feinpartikeldosis in $\mu\text{g}$
FPF	Feinpartikelfraktion in %
h	Stunde
HPLC	High performance liquid chromatography
I.E.	Internationale Einheiten

IEP	Isoelektrischer Punkt
K	Grad Kelvin
kDa	Kilodalton
L-Glu	L-Glutaminsäure
LN <sub>2</sub>	Flüssiger Stickstoff
M	Stoffmenge in mol/l
min	Minute
MMAD	Mass median aerodynamic diameter
MOC	Micro orifice collector
NGI	Next generation pharmaceutical impactor
nm	Nanometer
p	Druck
pH	Potentia hydrogenii
Ph. Eur.	Pharmacopoeia Europaea
pm	Picometer
pMDI	Pressurized metered dose inhaler
REM	Rasterelektronmikroskopie
rF	Relative Feuchtigkeit in %
s.c.	Subkutan
s	Sekunde

SD	Standard deviation
$T_c$	Kollapstemperatur in °C
$T_{dev}$	Rekristallisationstemperatur in °C
$T_g$	Glasübergangstemperatur in °C
$T_g'$	Glasübergangstemperatur der maximal gefrierkonzentrierten Lösung in °C
$T_n$	Onset of collapse
$T_p$	Produkttemperatur in °C
$T_{rc}$	Rekristallisationstemperatur in °C
$T_s$	Stellflächentemperatur in °C
TGA	Thermogravimetrische Analyse
XRPD	X-Ray powder diffraction

---

**10.2 VERWENDETE SUBSTANZEN**

Acetonitril	HPLC Qualität, J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Aqua bidestillata	frisch hergestellt aus hauseigener Anlage FinnAqua 75-E-4, Helsinki, Finnland
Brij 35	ICI Specialty Chemicals, Essen, Deutschland
Dextrane	Fluka AG, Buchs, Schweiz
Ethanol absolut	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Gelatine Typ B	Gelita AG, Eberbach, Deutschland
Glycin	Riedel-de-Haën, Seelze, Deutschland
Glycerol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
HCl 0,001 M	verdünnt aus konz. HCL, J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Insulin human	Wanbang Biochemical Pharmaceutical Company, Xuzhou, China
Isomalt	Südzucker AG, Mannheim, Deutschland
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
L-Glutaminsäure	Fluka AG, Buchs, Schweiz
L-Histidin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
L-Leucin	Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, USA
Mannitol	Roquette Frères, Lestrem, Frankreich
Maltodextrin	Cerestar Deutschland, Krefeld, Deutschland

Myo-Inositol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumsulfat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Polysorbat 80	Caelo, Hilden, Deutschland
Saccharose	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Trehalose-Dihydrat	Fluka AG, Buchs, Schweiz

## 10.3 ROHDATEN DES VERSUCHSPLANES AUS KAPITEL 5.1.1

Std	Run	Feststoffanteil mg	Einfrierrate	Konzentration Polysorbat 80, mg/Vial	FPF, %	relative FPF, %	FPD, µg	abgegebene Dosis, µg	Rachendeposition, µg	Rückstand im Vial, µg	Rückstand im Inhalator, µg
11	1	12,0	langsam	0,0	30,72	38,73	226,83	585,67	33,96	62,08	90,53
1	2	12,0	langsam	0,1	22,58	31,22	179,95	631,80	59,70	126,41	94,05
9	3	3,0	schnell	0,1	29,84	31,28	236,09	754,81	16,33	36,35	0,00
18	4	3,0	schnell	0,0	11,80	21,70	82,17	378,65	25,94	25,06	292,80
25	5	6,0	langsam	0,0	21,89	29,40	151,01	513,62	71,04	73,92	102,33
22	6	6,0	schnell	0,0	24,10	28,03	191,88	684,44	54,15	36,11	75,54
10	7	12,0	langsam	0,0	22,12	32,21	157,61	489,32	62,03	122,67	100,41
21	8	6,0	langsam	0,0	24,05	30,33	167,47	552,18	61,81	63,08	81,19
4	9	3,0	langsam	0,1	25,96	35,10	218,82	623,49	51,50	109,51	109,95
27	10	6,0	langsam	0,1	33,30	40,86	281,91	689,96	70,78	77,32	79,30
28	11	6,0	schnell	0,1	16,25	24,38	127,86	524,42	21,89	207,21	54,93
16	12	3,0	schnell	0,0	12,99	18,64	105,16	564,25	56,10	33,03	211,99
24	13	6,0	schnell	0,1	25,08	31,00	206,17	665,07	31,23	95,81	61,05
26	14	6,0	schnell	0,0	20,41	23,81	156,87	658,76	87,80	38,50	71,34
19	15	6,0	langsam	0,1	31,83	39,72	230,50	580,39	52,44	80,17	63,59
7	16	3,0	schnell	0,1	39,23	41,14	367,23	892,60	18,33	27,70	15,91
17	17	3,0	schnell	0,0	9,62	11,03	68,33	619,53	70,10	23,59	67,48
29	18	6,0	langsam	0,0	24,21	33,58	159,39	474,69	59,01	91,21	92,55
12	19	12,0	langsam	0,0	19,99	28,71	152,66	531,80	78,24	87,54	144,19
36	20	6,0	schnell	0,0	19,37	21,60	158,73	734,71	44,12	25,37	59,25
8	21	3,0	schnell	0,1	42,64	45,78	422,96	923,87	18,82	38,45	29,58
20	22	6,0	schnell	0,1	20,50	25,15	133,15	529,51	20,80	54,25	65,78
5	23	3,0	langsam	0,1	24,49	34,54	201,64	583,87	75,36	91,69	147,85
15	24	3,0	langsam	0,0	13,67	22,67	113,46	500,42	121,49	134,50	195,31
23	25	6,0	langsam	0,1	32,35	41,78	288,31	690,06	49,83	60,70	140,32
6	26	3,0	langsam	0,1	29,95	41,06	233,40	568,50	44,00	110,86	100,07
3	27	12,0	langsam	0,1	26,82	34,74	236,99	682,17	51,96	104,27	97,36
13	28	3,0	langsam	0,0	14,81	22,76	127,93	562,09	78,42	111,60	189,80
2	29	12,0	langsam	0,1	25,21	36,67	231,67	631,80	71,56	95,60	191,53
14	30	3,0	langsam	0,0	16,17	24,83	145,23	584,87	106,51	127,23	185,94
35	31	12,0	schnell	0,1	13,99	16,11	112,33	697,12	28,84	60,63	45,40
33	32	12,0	schnell	0,1	7,95	9,25	57,85	625,51	18,33	52,87	49,19
34	33	12,0	schnell	0,1	21,97	25,06	169,65	676,98	23,27	58,93	36,37
32	34	12,0	schnell	0,0	3,65	4,96	28,08	566,21	0,00	17,77	185,07
31	35	12,0	schnell	0,0	2,31	9,35	19,38	207,19	0,00	46,93	583,51
30	36	12,0	schnell	0,0	5,30	10,03	45,54	453,94	0,00	35,65	369,50

**10.4 ROHDATEN DES VERSUCHSPLANES AUS KAPITEL 6.4.1**

Std	Run	Dispergierdruck, at	Dispergierzeit, s	FPF, %	relative FPF, %	Feinpartikeldosis, $\mu\text{g}$	abgegebene Dosis, $\mu\text{g}$	Rachendeposition, $\mu\text{g}$	Rückstand im Inhalator, $\mu\text{g}$	Rückstand im Vial, $\mu\text{g}$	MMAD, $\mu\text{m}$
12	1	3	1,00	22,12	30,12	126,75	417,17	64,32	91,97	59,65	5,05
17	2	2	0,55	22,85	29,11	133,78	458,12	59,15	96,25	59,58	5,51
15	3	2	0,55	25,71	33,22	173,72	522,65	69,29	76,85	54,42	4,95
1	4	1	0,10	23,40	29,22	175,20	599,74	55,81	76,55	72,14	5,51
5	5	3	0,10	21,95	31,04	154,50	497,65	58,19	108,12	63,32	5,34
4	6	3	0,10	24,68	32,08	119,38	372,05	46,98	67,06	44,71	5,20
10	7	3	1,00	20,79	29,94	106,16	353,64	42,28	108,68	46,88	5,36
7	8	1	1,00	22,65	29,56	147,72	499,92	60,72	74,77	77,43	5,49
8	9	1	1,00	22,60	27,71	157,51	566,88	44,96	57,30	71,98	5,63
18	10	2	0,55	25,30	31,94	170,94	540,27	64,49	103,52	48,83	4,99
13	11	2	0,55	27,39	29,09	152,97	525,96	33,52	55,09	60,00	5,44
2	12	1	0,10	27,26	33,91	208,20	614,56	66,27	75,67	74,45	4,85
6	13	3	0,10	27,23	38,79	222,47	573,73	77,07	54,29	59,97	4,33
9	14	1	1,00	26,18	32,31	176,19	541,95	55,49	64,34	62,89	5,06
3	15	1	0,10	27,36	32,58	204,85	623,66	55,55	47,56	70,61	5,20
11	16	3	1,00	19,36	25,26	96,25	381,11	58,18	60,80	55,24	5,35
14	17	2	0,55	19,90	27,88	139,22	499,27	52,66	106,68	61,91	5,68
16	18	2	0,55	21,00	28,08	128,95	459,32	53,63	145,66	76,57	5,69

## 10.5 ROHDATEN DES VERSUCHPLANES AUS KAPITEL 7.3.3

Std	Run	Länge des Luftdurchlasses,	Länge des Aerosoldurchlasses,	Flutter	absolute PPF,	relative PPF,	FPD, µg	abgegebene Dosis,	Rachendeposition,	Rückstand im Vial,	MMAD,	Rückstand im Inhalator,	Flussrate, l/min
		mm	mm		%	%		µg	µg			µg	
33	1	6,32	28,68	ja	26,07	28,35	246,82	870,51	54,95	37,43	8,70	38,86	41,30
24	2	17,50	17,50	nein	26,31	27,58	269,07	975,51	25,67	29,58	8,80	17,58	45,80
23	3	17,50	17,50	nein	29,33	30,91	299,28	968,33	20,14	29,73	8,27	22,25	45,80
36	4	28,68	28,68	ja	31,49	33,88	319,36	942,64	27,73	41,00	7,69	30,45	43,50
19	5	17,50	35,00	nein	29,37	32,38	284,88	879,72	40,60	39,22	7,58	51,12	43,80
14	6	0,00	17,50	nein	30,98	34,11	295,80	867,22	91,33	51,26	6,94	36,39	45,50
27	7	6,32	6,32	ja	25,51	27,33	249,08	911,48	130,93	47,46	8,07	17,56	43,40
3	8	6,32	6,32	nein	28,48	30,27	274,53	906,93	57,93	40,12	7,97	16,87	45,00
2	9	6,32	6,32	nein	30,98	32,67	303,45	928,72	33,45	30,97	7,76	19,65	45,00
6	10	28,68	6,32	nein	31,84	32,84	329,81	1004,20	15,12	19,47	8,13	12,26	43,70
29	11	28,68	6,32	nein	26,09	26,75	263,02	983,29	52,13	24,65	9,93	0,00	42,00
12	12	28,68	28,68	nein	28,75	30,44	292,25	960,05	15,35	25,40	8,78	31,21	43,50
35	13	28,68	28,68	ja	28,90	30,20	315,45	1044,35	34,17	22,14	8,45	25,15	43,50
16	14	35,00	17,50	nein	29,98	31,43	315,25	1003,03	17,77	18,20	8,32	30,46	45,70
44	15	17,50	35,00	ja	30,28	32,32	318,19	984,47	40,29	27,20	8,17	39,21	41,80
17	16	17,50	0,00	nein	36,31	36,58	369,06	1008,85	0,87	7,69	7,28	0,00	50,00
46	17	17,50	17,50	ja	26,79	27,88	289,18	1037,08	70,88	33,47	8,73	8,82	43,50
28	18	28,68	6,32	ja	24,20	24,81	238,68	962,19	57,72	24,17	9,54	0,00	42,00
11	19	28,68	28,68	nein	21,60	22,61	213,67	945,13	19,17	28,24	8,15	15,86	43,50
30	20	28,68	6,32	ja	28,91	29,93	285,67	954,51	38,59	21,48	8,42	12,34	42,00
1	21	6,32	6,32	nein	26,60	28,19	270,86	960,97	59,68	39,72	8,44	17,56	45,00
13	22	0,00	17,50	nein	30,40	35,83	292,56	816,52	115,76	77,57	6,15	68,34	45,50
7	23	6,32	28,68	nein	29,78	31,95	300,41	940,12	24,67	20,10	11,43	48,70	42,20
39	24	35,00	17,50	ja	22,31	22,49	236,16	1049,97	27,63	3,41	9,62	4,92	42,70
9	25	6,32	28,68	nein	23,47	26,70	220,79	826,94	65,17	55,83	8,84	58,01	42,20
48	26	17,50	17,50	ja	26,32	27,75	255,54	920,70	70,50	27,63	8,65	22,37	43,50
40	27	35,00	17,50	ja	28,68	30,21	339,17	1122,81	26,99	41,11	8,29	18,83	42,70
22	28	17,50	17,50	nein	29,97	31,16	311,92	1000,87	17,88	22,73	8,17	17,04	45,80
4	29	28,68	6,32	nein	26,22	27,51	279,06	1014,35	19,57	32,47	9,35	17,62	43,70
34	30	28,68	28,68	ja	28,64	30,10	282,02	937,07	39,98	20,84	8,34	26,94	43,50
45	31	17,50	17,50	ja	28,48	29,89	265,06	886,80	49,52	20,24	8,14	23,78	43,50
41	32	17,50	0,00	ja	19,51	20,51	204,94	999,26	142,80	26,38	9,68	24,89	46,70
21	33	17,50	17,50	nein	27,95	28,64	288,77	1008,24	20,66	24,80	8,97	20,92	45,80
43	34	17,50	35,00	ja	27,26	29,99	293,04	977,04	109,96	56,92	7,61	40,88	41,80
8	35	6,32	28,68	nein	22,29	23,89	221,56	927,60	56,99	34,69	9,63	31,55	42,20
18	36	17,50	0,00	nein	33,75	34,42	407,90	1185,06	9,96	23,63	7,36	0,00	50,00
5	37	28,68	6,32	nein	23,82	24,47	246,47	1007,20	17,89	27,60	9,93	0,00	43,70
42	38	17,50	0,00	ja	27,68	28,50	276,65	970,70	61,72	28,62	8,84	0,00	46,70
38	39	0,00	17,50	ja	23,28	26,60	213,09	801,20	96,45	50,74	8,38	63,45	43,00
15	40	35,00	17,50	nein	27,69	28,84	296,99	1029,93	16,20	18,50	8,98	24,14	45,70
37	41	0,00	17,50	ja	22,91	25,02	209,10	835,89	197,69	35,02	8,08	41,61	43,00
32	42	6,32	28,68	ja	26,45	29,42	240,58	817,64	185,56	48,54	6,87	43,24	41,30
31	43	6,32	28,68	ja	23,96	25,77	227,11	881,35	87,29	31,47	9,12	35,19	41,30
20	44	17,50	35,00	nein	26,04	28,00	300,11	1072,01	13,48	43,77	9,08	36,88	43,80
25	45	6,32	6,32	ja	25,65	26,94	234,04	868,63	128,70	26,93	8,40	16,74	43,40
47	46	17,50	17,50	ja	30,81	32,25	320,53	993,87	60,96	20,49	7,63	26,10	43,50
10	47	28,68	28,68	nein	27,95	29,00	285,30	983,29	15,55	19,87	8,96	16,80	43,50
26	48	6,32	6,32	ja	25,96	27,04	280,84	1038,73	79,12	37,49	8,39	5,71	43,40

**10.6 FLUSSRATEN UND DURCHFLUSSZEITEN AUS KAPITEL 7.3.3**

<b>Luftdurchlass, mm</b>	<b>Aerosoldurchlass, mm</b>	<b>Flutter</b>	<b>Flussrate bei 4 kPa, l/min</b>	<b>Durchfluss- zeit, s</b>
6,3	28,7	Nein	42,2	5,69
6,3	28,7	Ja	41,3	5,81
28,7	6,3	Nein	43,7	5,49
28,7	6,3	Ja	42,0	5,71
6,3	6,3	Nein	45,0	5,33
6,3	6,3	Ja	43,4	5,53
28,7	28,7	Nein	43,5	5,52
28,7	28,7	Ja	41,4	5,79
17,5	17,5	Nein	45,8	5,24
17,5	17,5	Ja	43,5	5,52
0,0	17,5	Nein	45,5	5,27
0,0	17,5	Ja	43,0	5,58
17,5	0,0	Nein	50,0	4,8
17,5	0,0	Ja	46,7	5,14
17,5	35,0	Nein	43,8	5,48
17,5	35,0	Ja	41,8	5,74
35,0	17,5	Nein	45,7	5,25
35,0	17,5	Ja	42,7	5,62

## 10.7 ROHDATEN DES VERSUCHSPLANES AUS 7.4.1

Std	Run	Länge des Luftdurchlasses, mm	Länge des Aerosoldurchlasses, mm	absolute FPF, %	relative FPF, %	FPD, µg	abgegebene Dosis, µg	Rachendeposition, µg	Rückstand im Inhalator, µg	Rückstand im Vial, µg	MMAD, µm
6	1	0,00	35,00	23,28	23,72	254,59	1067,45	43,80	26,29	13,26	9,58
5	2	0,00	35,00	26,25	27,32	283,99	1052,71	31,60	29,16	23,45	9,34
12	3	17,50	17,50	27,95	28,64	288,77	1008,24	20,66	20,92	24,80	8,97
3	4	35,00	0,00	38,14	38,97	416,18	1091,23	18,39	0,00	23,39	6,48
9	5	17,50	17,50	29,97	31,16	311,92	1000,87	17,88	17,04	22,73	8,17
11	6	17,50	17,50	29,33	30,91	299,28	968,33	20,14	22,25	29,73	8,27
1	7	0,00	0,00	24,51	26,19	251,97	1005,47	173,37	22,64	43,43	8,26
7	8	35,00	35,00	22,63	22,63	254,24	1098,96	23,57	24,52	27,08	11,11
10	9	17,50	17,50	26,31	27,58	269,07	975,51	25,67	17,58	29,58	8,80
2	10	0,00	0,00	24,27	25,66	251,54	1013,59	166,74	22,93	33,23	8,19
4	11	35,00	0,00	31,64	32,38	342,07	1081,10	20,24	0,00	24,78	8,02
8	12	35,00	35,00	26,03	27,32	286,68	1073,17	18,20	28,34	23,69	9,41

**10.8 FLUSSRATEN UND DURCHFLUSSZEITEN AUS KAPITEL 7.4.1**

---

<b>Luftdurchlass, mm</b>	<b>Aerosoldurchlass, mm</b>	<b>Flussrate bei 4 kPa, l/min</b>	<b>Durchflusszeit, s</b>
35	0	51,0	4,7
0	35	45,5	5,3
35	35	44,0	5,5
0	0	50,8	4,7

---

**11 ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abbildung 2.1:	Proteinogene Aminosäuren	5
Abbildung 2.2:	Übersicht über die Proteinstrukturen	7
Abbildung 2.3:	Dialysegleichgewicht eines Proteins in verschiedenen Hilfsstofflösungen: Im linken Bild wird der Hilfsstoff bevorzugt an der Proteinoberfläche gebunden. Im rechten Bild wird er bevorzugt von der Proteinoberfläche ausgeschlossen (Gloger, 2002)	11
Abbildung 2.4:	Gleichgewicht zwischen nativer und denaturierter Form	12
Abbildung 2.5:	Zustandsdiagramm von Wasser und einer wässrigen Lösung (nicht maßstabsgetreu)	16
Abbildung 2.6:	Physikalische Vorgänge beim Einfrieren einer Lösung (Nail, 2005)	18
Abbildung 2.7:	Zustandsdiagramm einer wässrigen Saccharoselösung (Franks, 1992)	19
Abbildung 2.8:	Wärmeübertragung während der Sublimation (Rupprecht, 1992)	23
Abbildung 2.9:	Illustration des Lungenepithels in verschiedenen Lungenregionen (Patton und Byron, 2007)	28
Abbildung 2.10:	Pulmonale Abscheidemechanismen	30
Abbildung 3.1:	Insulin human in schematischer Darstellung	32

Abbildung 3.2: L-Glutaminsäure, ungeladen (links) und dissoziiert (rechts)	33
Abbildung 3.3: Polysorbat 80	34
Abbildung 3.4: myo-Inositol	35
Abbildung 3.5: L-Leucin in undissoziierter Form	36
Abbildung 3.6: 2R-Vial (links) und Flachbodenglas (rechts)	37
Abbildung 3.7: Exemplarisches Kalorigramm einer Lösung	41
Abbildung 3.8: Gefriertrocknungsmikroskop ( <a href="http://www.freeze-drying.eu">www.freeze-drying.eu</a> )	42
Abbildung 3.9: Röntgendiffraktogramme von Insulin (links, amorph) und L-Glutaminsäure (rechts, kristallin)	44
Abbildung 3.10: Adapter zur Verbindung des Inhalators mit dem Rachen des NGIs; links im Bild mit Vibrationsfolien, rechts ohne (RPC Formatec, Mellrichstadt, Deutschland)	47
Abbildung 3.11: Gerät zur Bestimmung der Gleichförmigkeit der abgegebenen Dosis nach Ph. Eur.	48
Abbildung 3.12: Apparatur zur Bestimmung der Gleichförmigkeit der abgegebenen Dosis nach Ph. Eur. in schematischer Form	48
Abbildung 4.1: Kalorigramm einer Insulinlösung in 0,001 M HCl mit Glasübergang bei -24°C	60
Abbildung 4.2: Röntgendiffraktogramm der Ausgangsware (links) und des Lyophilisates (rechts)	61
Abbildung 4.3: Sorptionsisothermen des Insulinlyophilisates	62

---

Abbildung 4.4:	Röntgendiffraktogramme der Ausgangsware (links) und des Lyophilisates (rechts)	63
Abbildung 4.5:	Kalorigramme einer Glutaminsäurelösung mit $T_g''$ bei $-31,5^\circ\text{C}$ und $T_{\text{dev}}$ bei $-8,5^\circ\text{C}$ (links) und $T_g'$ bei $-17^\circ\text{C}$ (rechts)	64
Abbildung 4.6:	Sorptionsisothermen des L-Glu Lyophilisates	64
Abbildung 4.7:	Kalorigramm einer myo-Inositollösung mit $T_g''$ bei $-35^\circ\text{C}$ und $T_g'$ bei $-9,5^\circ\text{C}$	65
Abbildung 4.8:	Röntgendiffraktogramme der Ausgangsware (links) und bei Raumtemperatur 18 Monate gelagertes Lyophilisat (rechts)	66
Abbildung 4.9:	Sorptionsisothermen des myo-Inositols, lyophilisiert	67
Abbildung 4.10:	Kalorigramm einer L-Leucinlösung mit $T_g'$ bei $-25^\circ\text{C}$ und $T_{\text{dev}}$ bei $-6^\circ\text{C}$	68
Abbildung 4.11:	Röntgendiffraktogramme des L-Leucins kristallin (links) und nach Lyophilisation (rechts)	68
Abbildung 4.12:	Sorptionsisothermen des L-Leucins, lyophilisiert	69
Abbildung 4.13:	Relevanter Ausschnitt der Kalorigramme der Formulierungen 1-3	72
Abbildung 4.14:	„Freeze-dry microscopy“-Aufnahmen der Formulierung 1: links bei $-40^\circ\text{C}$ , mittig beginnender Kollaps bei $-27,7^\circ\text{C}$ und rechts vollständiger Kollaps bei $-26,1^\circ\text{C}$	73

- Abbildung 4.15: „Freeze-dry microscopy“-Aufnahmen der Formulierung 2:  
links bei  $-40^{\circ}\text{C}$ , mittig beginnender Kollaps bei  
 $-31,0^{\circ}\text{C}$  und rechts vollständiger Kollaps bei  $-28,7^{\circ}\text{C}$  74
- Abbildung 4.16: „Freeze-dry microscopy“-Aufnahmen der Formulierung 3:  
links bei  $-45^{\circ}\text{C}$ , mittig bei  $-12,0^{\circ}\text{C}$  und rechts bei  
 $-8,8^{\circ}\text{C}$  74
- Abbildung 4.17: Formulierung 2, 3 und 1 nach sieben Monaten Lagerung  
bei Raumtemperatur 76
- Abbildung 4.18: REM-Aufnahme der Formulierung 2 mit Mikrokollaps 77
- Abbildung 4.19: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der  
Formulierung 1: links ein Querschnitt des oberen  
Bereiches, rechts eine Aufsicht des Inneren 78
- Abbildung 4.20: Röntgendiffraktogramme der Formulierungen 1 (oben  
links), 2 (oben rechts) und 3 (unten) 79
- Abbildung 4.21: Einfluss von Temperatur und Luftfeuchtigkeit auf  
Morphologie der Formulierung 1 80
- Abbildung 4.22: Sorptionsisothermen einer Formulierung bestehend aus  
1 mg Insulin, 2 mg L-Glutaminsäure und 0,1 mg  
Polysorbat 80 81
- Abbildung 5.1: Vergleich der Partikelgrößenverteilungen bei **langsamer**  
Einfriergeschwindigkeit: FA ist der Feststoffanteil in  
mg/ml 95

- Abbildung 5.2: Vergleich der Partikelgrößenverteilungen bei **schneller** Einfriergeschwindigkeit: FA ist der Feststoffanteil in mg/ml 96
- Abbildung 5.3: Einfluss der Feststoff- und Tensidkonzentration auf die Feinpartikeldosis: **links** bei **langsamer**, **rechts** bei **schneller** Kühlrate 97
- Abbildung 5.4: Einfluss der Feststoff- und Tensidkonzentration auf die absolute Feinpartikelfraktion: **links** bei **langsamer**, **rechts** bei **schneller** Kühlrate 98
- Abbildung 5.5: Einfluss der Feststoff- und Tensidkonzentration auf die relative Feinpartikelfraktion: **links** bei **langsamer**, **rechts** bei **schneller** Kühlrate 99
- Abbildung 5.6: Einfluss der Feststoff- und Tensidkonzentration auf die abgegebene Dosis: **links** bei **langsamer**, **rechts** bei **schneller** Kühlrate 100
- Abbildung 5.7: Einfluss der Feststoff- und Tensidkonzentration auf die Rachendeposition: **links** bei **langsamer**, **rechts** bei **schneller** Kühlrate 101
- Abbildung 5.8: Einfluss der Feststoff- und Tensidkonzentration auf den Rückstand im Inhalator: **links** bei **langsamer**, **rechts** bei **schneller** Kühlrate 102
- Abbildung 5.9: Einfluss der Feststoff- und Tensidkonzentration auf den Rückstand im Vial: **links** bei **langsamer**, **rechts** bei **schneller** Kühlrate 102

Abbildung 5.10: Einfluss der Feststoff- und Tensidkonzentration auf den MMAD: <b>links</b> bei <b>langsamer</b> , <b>rechts</b> bei <b>schneller</b> Kühlrate	103
Abbildung 5.11: Einfluss von L-Leucin (Formulierung 3) und myo-Inositol (Formulierung 2) auf die Aerosolisierbarkeit der Standardformulierung 1	105
Abbildung 5.12: Feinpartikelfractionen der Formulierungen 1-3 im Vergleich	105
Abbildung 5.13: Lagerung der Formulierung 1 bei 25°C und 60% relativer Feuchte	107
Abbildung 5.14: Lagerung der Formulierung 1 bei 40°C und 75% relativer Feuchte	107
Abbildung 5.15: REM-Aufnahmen der im NGI deponierten Aerosolpartikel aus Formulierung 1, langsam eingefroren, mit Polysorbat 80, Feststoffkonzentration 6 mg/ml: links oben Abscheideschale 3, rechts oben eine Übersicht über das durch die Düsen erzeugte Depositionsmuster von Abscheideschale 6; links unten Abscheideschale 5 und rechts unten Abscheideschale 7	109
Abbildung 5.16: Übersicht über die erreichten Feinpartikeldosen nach Dispergierung; n=3	111
Abbildung 5.17: Aufnahmen der untersuchten Formulierungen, sortiert nach aufsteigender Feststoffkonzentration: oben langsam eingefroren, unten schnell eingefroren	112
Abbildung 6.1: Aktiver Inhalator in schematischem Aufbau	115

---

Abbildung 6.2:	Dispergiereinheit im Detail	115
Abbildung 6.3:	Aktiver Inhalator mit Mundstückadapter und Rachen des NGI	116
Abbildung 6.4:	Vergleich der Partikelgrößenverteilungen bei unterschiedlichen Dispergierparametern, gemessen mit dem NGI (n=3)	119
Abbildung 6.5:	Einfluss des Dispergierdrucks und der -zeit auf die Feinpartikeldosis	120
Abbildung 6.6:	Einfluss des Dispergierdrucks und der -zeit auf die abgegebene Dosis	121
Abbildung 6.7:	Einfluss des Dispergierdrucks und der -zeit auf den Rückstand im Vial	122
Abbildung 7.1:	atemzuggesteuerter Inhalator (Yamashita et al., 2003)	126
Abbildung 7.2:	Atemzuggesteuerter Inhalator der ersten Generation	127
Abbildung 7.3:	Erzielte Aerosolparameter bei Verwendung des ersten atemzuggesteuerten Inhalators ohne Luft- und Aerosolführungsröhrchen	128
Abbildung 7.4:	Atemzuggesteuerter Inhalator der zweiten Generation in Aufsicht	130
Abbildung 7.5:	Atemzuggesteuerter Inhalator der zweiten Generation von der patientenabgewandten Seite	130

- Abbildung 7.6: Erzielte Aerosolparameter bei Verwendung des zweiten atemzuggesteuerten Inhalators ohne Luft- und Aerosolführungsröhrchen 131
- Abbildung 7.7: Verwendete Luft- und Aerosoldurchlässe 132
- Abbildung 7.8: Erreichte Partikelgrößenverteilungen der aerosolisierten Lyophilisate: oben ohne Verwendung, unten bei Verwendung des Flutters. Die erste Zahl in der Legende gibt die Länge des Luftdurchlasses, die zweite die Länge des Aerosoldurchlasses an (jeweils in mm) 136
- Abbildung 7.9: Einfluss der Luftdurchlass- und Aerosoldurchlasslänge auf die Feinpartikeldosis: links ohne Verwendung des Flutters, rechts mit 137
- Abbildung 7.10: Einfluss der Luftdurchlass- und Aerosoldurchlasslänge auf die abgegebene Dosis: links ohne Verwendung des Flutters, rechts mit 138
- Abbildung 7.11: Einfluss der Luftdurchlass- und Aerosoldurchlasslänge auf die Rachendeposition: links ohne Verwendung des Flutters, rechts mit 139
- Abbildung 7.12: Einfluss der Luftdurchlass- und Aerosoldurchlasslänge auf den Rückstand im Inhalator: links ohne Verwendung des Flutters, rechts mit 140
- Abbildung 7.13: Einfluss der Luftdurchlass- und Aerosoldurchlasslänge auf den Rückstand im Vial: links ohne Verwendung des Flutters, rechts mit 141

- Abbildung 7.14: Erzielte Aerosolcharakteristika mit der geeignetsten Flutter, ohne Verwendung eines Aerosoldurchlasses, Länge des Luftdurchlasses 17,5 mm 142
- Abbildung 7.15: Vergleich der jeweils besten Inhalatorkonfiguration mit und ohne Verwendung des Flutter 143
- Abbildung 7.16: Prüfung auf Gleichförmigkeit der abgegebenen Dosis nach Ph. Eur. (2008c) 144
- Abbildung 7.17: Erzielte Partikelgrößenverteilungen mit den getesteten Inhalatorkonfigurationen 147
- Abbildung 7.18: Einfluss der Luft- und Aerosoldurchlasslänge auf die Feinpartikeldosis 148
- Abbildung 7.19: Einfluss der Luft- und Aerosoldurchlasslänge auf die Rachendeposition 148
- Abbildung 7.20: Einfluss der Luft- und Aerosoldurchlasslänge auf den Rückstand im Vial 150
- Abbildung 7.21: Einfluss der Luft- und Aerosoldurchlasslänge auf den Rückstand im Inhalator 151
- Abbildung 7.22: Erzielte Aerosolkenngößen unter Verwendung der geeignetsten Inhalatorkonfiguration: ohne Verwendung des Flutter, ohne Verwendung eines Aerosoldurchlasses, Länge des Luftdurchlasses 35 mm 152
- Abbildung 7.23: Vergleich der erzielten Partikelgrößenverteilungen unter Verwendung der Konfiguration 35/0 mm mit und ohne aufgebohrtem Aerosoldurchlass 153

Abbildung 7.24: Ergebnisübersicht der erzeugten Aerosolparameter mit der finalen Version des atemzuggesteuerten Inhalators

154

Abbildung 7.25: Vergleich der Depositionsmuster der Formulierung 1, dispergiert mit der jeweils geeignetsten Inhalatorkonfiguration aus den vorangegangenen Versuchsplänen

155

**12 TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 2.1:	Beobachtete chemische Instabilitäten von Proteinen (Auswahl)	8
Tabelle 2.2:	Physikalische Instabilitäten von Proteinen	9
Tabelle 2.3:	Anwendungsmöglichkeiten der Gefriertrocknung (nach Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH (2009))	14
Tabelle 2.4:	Einfluss der Einfriergeschwindigkeit auf die Lyophilisatstruktur	21
Tabelle 2.5:	Meilensteine der inhalativen Therapie (Patton und Byron, 2007)	27
Tabelle 3.1:	Herstellungsschema der zur Lyophilisation bestimmten Lösungen	37
Tabelle 3.2:	Gefriertrocknungszyklus (Standard)	39
Tabelle 3.3:	Temperatur-Zeit-Programm zur Bestimmung von $T_g'$	40
Tabelle 3.4:	Temperatur-Zeit-Programm der FDM-Methode	43
Tabelle 3.5:	Komponenten der HPLC-Anlage HP Series 1100	51
Tabelle 3.6:	Mobile Phase	51
Tabelle 4.1:	Gebräuchliche Hilfsstoffklassen und Beispiele (Parkins und Lashmar, 2000)	55
Tabelle 4.2:	Durchgeführte Untersuchungen im Rahmen der Eignungsprüfung	58

Tabelle 4.3:	Getestete Substanzen im Rahmen des Screenings	59
Tabelle 4.4:	Glasübergangstemperaturen der maximal gefrierkonzentrierten Lösungen	70
Tabelle 4.5:	Zusammensetzung der Formulierungen, bezogen auf eine Einzeldosis (ein Lyophilisat)	71
Tabelle 4.6:	Kritische Formulierungsparameter	75
Tabelle 4.7:	Übersicht über die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmungen von Formulierung 1. Aufgrund teils erheblicher Schwankungen zwischen den an verschiedenen Messtagen ermittelten Aktivitätswerten werden nur Chargen verglichen, die am selben Tag untersucht wurden	83
Tabelle 4.8:	Bestimmung des Wassergehaltes der Formulierungen 1-3 nach Trocknung mittels des Christ-Gefriertrockners nach Standardprotokoll	84
Tabelle 4.9:	Wassergehalt der Formulierung 1 nach angepasster Sekundärtrocknung	85
Tabelle 5.1:	Faktoren im Versuchsplan	90
Tabelle 5.2:	Cut-off-Durchmesser bei einer Flussrate von 30 l/min	91
Tabelle 5.3:	Modellparameter der untersuchten Zielgrößen	93
Tabelle 6.1:	Faktoren im Versuchsplan	117
Tabelle 6.2:	Modellparameter der untersuchten Zielgrößen	118
Tabelle 7.1:	Faktoren im Versuchsplan	133
Tabelle 7.2:	Modellparameter der untersuchten Zielgrößen	134

Tabelle 7.3:	Faktoren im Versuchsplan	145
Tabelle 7.4:	Modellparameter der untersuchten Zielgrößen	146

### 13 LITERATURVERZEICHNIS

- Agu, R. U., Ugwoke, M. I., Armand, M., Kinget, R. und Verbeke, N. (2001). "The lung as a route for systemic delivery of therapeutic proteins and peptides". *Respiratory Research* **2**(4): 198-209.
- Andrade, F., Antunes, F., Nascimento, A., da Silva, S., das Neves, J., Ferreira, D. und Sarmento, B. (2010). "Chitosan Formulations as Carriers for Therapeutic Proteins." *Current Drug Discovery Technologies* **epub ahead of print**.
- Antosova, Z., Mackova, M., Kral, V. und Macek, T. (2009). "Therapeutic application of peptides and proteins: parenteral forever?" *Trends Biotechnol* **27**(11): 628-35.
- Ashurst, I. I., Malton, A., Prime, D. und Sumbly, B. (2000). "Latest advances in the development of dry powder inhalers". *Pharm Sci Technolo Today* **3**(7): 246-256.
- Baron, P. und Willeke, K. (2001). "Aerosol Measurement: Principles, Techniques, and Applications". New York, Wiley-Interscience.
- Barrett, G. C. (1985). "Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids". London, Chapman and Hall.
- Beirowski, J. (2008). "Einstieg in die Gefriertrocknung - Grundlagen". *Gefriertrocknung in der Praxis*. Erlangen, Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie der Universität Erlangen-Nürnberg.
- Beirowski, J., Passos, A. P., Inghelbrecht, S., Arien, T., Van Asche, I. und Gieseler, H. (2009). "Impact of steric stabilizer concentration on trehalose in freeze drying of nanosuspensions." *AAPS National Biotechnology conference*, Seattle, USA.

- Bhattacharya, S. und Suryanarayanan, R. (2009). "Local mobility in amorphous pharmaceuticals-characterization and implications on stability". *J Pharm Sci* **98**(9): 2935-53.
- Brange, J. (1987). "Galenics of Insulin". Berlin Heidelberg, Springer-Verlag.
- Brange, J., Langkjaer, L., Havelund, S. und Volund, A. (1992). "Chemical stability of insulin. 1. Hydrolytic degradation during storage of pharmaceutical preparations". *Pharm Res* **9**(6): 715-26.
- Brown, R. A., Jr. und Schanker, L. S. (1983). "Absorption of aerosolized drugs from the rat lung". *Drug Metab Dispos* **11**(4): 355-60.
- Byron, P. R. (2004). "Drug delivery devices: issues in drug development". *Proc Am Thorac Soc* **1**(4): 321-8.
- Canchi, D. R., Paschek, D. und Garcia, A. E. (2010). "Equilibrium Study of Protein Denaturation by Urea". *Journal of the American Chemical Society* **132**(7): 2338-2344.
- Carpenter, J. F., Arakawa, T. und Crowe, J. H. (1992). "Interactions of stabilizing additives with proteins during freeze-thawing and freeze-drying". *Dev Biol Stand* **74**: 225-38; discussion 238-9.
- Carpenter, J. F., Pikal, M. J., Chang, B. S. und Randolph, T. W. (1997). "Rational design of stable lyophilized protein formulations: some practical advice". *Pharm Res* **14**(8): 969-75.
- Chang, B. S., Kendrick, B. S. und Carpenter, J. F. (1996). "Surface-induced denaturation of proteins during freezing and its inhibition by surfactants". *J Pharm Sci* **85**(12): 1325-30.
- Chang, B. S. und Randall, C. S. (1992). "Use of Subambient Thermal-Analysis to Optimize Protein Lyophilization". *Cryobiology* **29**(5): 632-656.

- Chougule, M. B., Padhi, B. K., Jinturkar, K. A. und Misra, A. (2007). "Development of dry powder inhalers". *Recent Pat Drug Deliv Formul* **1**(1): 11-21.
- Chu, J. W., Yin, J., Brooks, B. R., Wang, D. I. C., Ricci, M. S., Brems, D. N. und Trout, B. L. (2004). "A comprehensive picture of non-site specific oxidation of methionine residues by peroxides in protein pharmaceuticals". *J Pharm Sci* **93**(12): 3096-3102.
- Cleland, J. L., Lam, X., Kendrick, B., Yang, J., Yang, T. H., Overcashier, D., Brooks, D., Hsu, C. und Carpenter, J. F. (2001). "A specific molar ratio of stabilizer to protein is required for storage stability of a lyophilized monoclonal antibody". *J Pharm Sci* **90**(3): 310-21.
- Cochran, T. und Nail, S. L. (2009). "Ice Nucleation Temperature Influences Recovery of Activity of a Model Protein after Freeze Drying". *J Pharm Sci* **98**(9): 3495-3498.
- Corkery, K. (2000). "Inhalable drugs for systemic therapy". *Respir Care* **45**(7): 831-5.
- Costa, B., Estopa, A., Borrás, J. und Sabate, A. (1995). "Diabetes and pharmaco-economics. Efficiency of insulin injection methods available in Spain". *Aten Primaria* **16**(7): 391-6.
- Craig, D. Q., Royall, P. G., Kett, V. L. und Hopton, M. L. (1999). "The relevance of the amorphous state to pharmaceutical dosage forms: glassy drugs and freeze dried systems". *Int J Pharm* **179**(2): 179-207.
- Cromwell, M. E. M., Hilario, E. und Jacobson, F. (2006). "Protein aggregation and bioprocessing". *AAPS Journal* **8**(3): E572-E579.
- Deutsche Gesetzliche Unfallversicherung e.V. (2010, 16.12.2010). "Glutaminsäure". from

<http://biade.itrust.de/biade/lpext.dll/Infobase/uberschrift26803?f=templates&fn=main-h.htm&2.0>.

Doyle, H. A., Gee, R. J. und Mamula, M. J. (2007). "Altered immunogenicity of isoaspartate containing proteins". *Autoimmunity* **40**(2): 131-7.

Drug Bank. (2010, 18.01.2011). "L-Glutamic Acid". from <http://www.drugbank.ca/drugs/NUTR00027?CARD=NUTR00027>.

Eckhardt, B. M., Oeswein, J. Q. und Bewley, T. A. (1991). "Effect of freezing on aggregation of human growth hormone". *Pharm Res* **8**(11): 1360-4.

Einstein, A. (1905). "Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen". *Ann Phys* **322**(8): 549 - 560.

EMA (2003). "ICH Topic Q 1 A (R2) - Stability Testing of New Drug Substances and Products". E. M. A.-C. f. P. M. Products: 1-20.

Eriksson, J. H., Hinrichs, W. L., de Jong, G. J., Somsen, G. W. und Frijlink, H. W. (2003). "Investigations into the stabilization of drugs by sugar glasses: III. The influence of various high-pH buffers". *Pharm Res* **20**(9): 1437-43.

Franks, F. (1992). "Freeze-drying: from empiricism to predictability. The significance of glass transitions". *Dev Biol Stand* **74**: 9-18; discussion 19.

Franks, F. (1998). "Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice". *Eur J Pharm Biopharm* **45**(3): 221-9.

Geller, D. E. (2005). "Comparing clinical features of the nebulizer, metered-dose inhaler, and dry powder inhaler". *Respir Care* **50**(10): 1313-21; discussion 1321-2.

- Gieseler, H. (2008). "Formulierung - amorph vs kristallin". Gefriertrocknung in der Praxis. Erlangen, Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie der Universität Erlangen-Nürnberg.
- Gloger, O. (2002), "Stabilisierung von rekombinantem Mistellektin durch Gefriertrocknung". Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Kiel, Christian-Albrechts-Universität, Thesis.
- Gonzalez, G. und MacRitchie, F. (1970). "Equilibrium adsorption of proteins". *J Colloid Interface Sci* **32**(1): 55-61.
- Grimm, A. M. (2008), "Fingerlyophilisation als schnelles Gefriertrocknungsverfahren". Pharmazeutische Technologie Bonn, Rheinische Friedrich-Wilhelm-Universität, Thesis.
- Grimm, W. (1998). "Extension of the International Conference on Harmonization Tripartite Guideline for Stability Testing of New Drug Substances and Products to countries of climatic zones III and IV". *Drug Dev Ind Pharm* **24**(4): 313-25.
- Hancock, B. C. und Zografi, G. (1994). "The relationship between the glass transition temperature and the water content of amorphous pharmaceutical solids". *Pharm Res* **11**(4): 471-7.
- Hassan, M. S. und Lau, R. W. (2009). "Effect of particle shape on dry particle inhalation: study of flowability, aerosolization, and deposition properties". *AAPS PharmSciTech* **10**(4): 1252-62.
- Heinemann, L. (2002). "Alternative delivery routes: inhaled insulin". *Diabetes Nutr Metab* **15**(6): 417-22.
- Hickey, A. J. (1994). "Factors influencing the dispersion of dry powders as aerosols". *J Pharm Technol*(18): 58-64.

- House, J. A. und Mariner, J. C. (1996). "Stabilization of rinderpest vaccine by modification of the lyophilization process". *Dev Biol Stand* **87**: 235-44.
- Ibrahim, W. (2010), "Entwicklung eines oralen Lyophilisates als Darreichungsform für Midazolam". Pharmazeutische Technologie, Würzburg, Julius-Maximilians-Universität Thesis.
- Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen (2006). "Inhalatives Insulin (Exubera) bei Diabetes mellitus - Rapid Report". Köln, Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen.
- Izutsu, K., Yoshioka, S. und Kojima, S. (1994). "Physical stability and protein stability of freeze-dried cakes during storage at elevated temperatures". *Pharm Res* **11**(7): 995-9.
- Jennings, T. A. (1999). "Lyophilization: Introduction and Basic Principles". New York, Interpharm/CRC.
- Jiang, S. und Nail, S. L. (1998). "Effect of process conditions on recovery of protein activity after freezing and freeze-drying". *Eur J Pharm Biopharm* **45**(3): 249-57.
- Kadoya, S., Fujii, K., Izutsu, K., Yonemochi, E., Terada, K., Yomota, C. und Kawanishi, T. (2010). "Freeze-drying of proteins with glass-forming oligosaccharide-derived sugar alcohols". *Int J Pharm* **389**(1-2): 107-13.
- Kayser, O. (2002). "Grundwissen pharmazeutische Biotechnologie". Stuttgart/Leipzig/Wiesbaden, Teubner.
- Kleppmann, W. (2009). "Warum Versuchsplanung?" München Wien, Carl Hanser Verlag.

- Klingler, C. (2009), "Insulin Mikro- und Nanopartikel zur pulmonalen Applikation". Pharmazeutisches Institut, Abteilung Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Kiel, Christian-Albrechts-Universität, Thesis.
- Kramer, M. (1999), "Innovatives Einfrierverfahren zur Minimierung der Prozesszeit von Gefriertrocknungszyklen". Pharmazeutische Technologie, Erlangen, Universität Erlangen-Nürnberg, Thesis.
- Krauss, G. (2008). "Biochemistry of Signal Transduction and Regulation". Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Levine, H. und Slade, L. (1988). "Thermomechanical properties of small-carbohydrate-water glasses and 'rubbers': kinetically metastable systems at sub-zero temperatures". Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases **84**(8): 2619-33.
- Lindner (2006). "Physik für Ingenieure". München Wien, Carl Hanser Verlag.
- Liu, J. (2006). "Physical characterization of pharmaceutical formulations in frozen and freeze-dried solid states: techniques and applications in freeze-drying development". Pharm Dev Technol **11**(1): 3-28.
- Maggi, L., Bruni, R. und Conte, U. (1999). "Influence of the moisture on the performance of a new dry powder inhaler". Int J Pharm **177**(1): 83-91.
- Manning, M. C., Chou, D. K., Murphy, B. M., Payne, R. W. und Katayama, D. S. (2010). "Stability of protein pharmaceuticals: an update". Pharm Res **27**(4): 544-75.
- Manning, M. C., Patel, K. und Borchardt, R. T. (1989). "Stability of protein pharmaceuticals". Pharm Res **6**(11): 903-18.

- Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH (2009) "Gefriertrocknung mit System". DOI: 06.01.2011
- Matheus, S., Friess, W., Schwartz, D. und Mahler, H. C. (2009). "Liquid High Concentration IgG1 Antibody Formulations by Precipitation". *J Pharm Sci* **98**(9): 3043-3057.
- Meister, E. (2008), "Methodology, data interpretation and practical transfer of FDM". Pharmazeutische Technologie, Erlangen, Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg, Thesis.
- Meister, E. und Gieseler, H. (2009). "Freeze-dry microscopy of protein/sugar mixtures: drying behavior, interpretation of collapse temperatures and a comparison to corresponding glass transition data". *J Pharm Sci* **98**(9): 3072-87.
- Miller, D. P. und Lechuga-Ballesteros, D. (2006). "Rapid assessment of the structural relaxation behavior of amorphous pharmaceutical solids: effect of residual water on molecular mobility". *Pharm Res* **23**(10): 2291-305.
- Minne, A., Boireau, H., Horta, M. J. und Vanbever, R. (2008). "Optimization of the aerosolization properties of an inhalation dry powder based on selection of excipients". *Eur J Pharm Biopharm* **70**(3): 839-44.
- Mitchell, J. P. und Nagel, M. W. (2003). "Cascade impactors for the size characterization of aerosols from medical inhalers: their uses and limitations". *J Aerosol Med* **16**(4): 341-77.
- Moriyama, Hayashi, Ohyabu, Mukai, Kawano und Kumagai (2006). "Performance evaluation and cross-reactivity from insulin analogs with the ARCHITECT insulin assay". *Clinical Chemistry* **52**(7).
- Mulder, G. J. (1839). "Ueber die Zusammensetzung einiger thierischer Substanzen". *Journal für praktische Chemie* **16**(1): 129-152.

- Nail, S. L. (2005). "Physical and chemical stability considerations in the development and stress testing of freeze-dried pharmaceuticals". *Pharmaceutical stress testing: Predicting drug degradation*. S. L. Nail. Boca Raton, USA, Taylor & Francis Group: 261-291.
- Nail, S. L. und Johnson, W. (1992). "Methodology for in-process determination of residual water in freeze-dried products". *Dev Biol Stand* **74**: 137-50; dicussion 150-1.
- Newman, S. P. (2004). "Dry powder inhalers for optimal drug delivery". *Expert Opin Biol Ther* **4**(1): 23-33.
- Niven, R. W. (1995). "Delivery of biotherapeutics by inhalation aerosol". *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* **12**(2-3): 151-231.
- Oetjen, G.-W. (1997). "Gefriertrocknen". Weinheim, VCH-Verlagsgesellschaft.
- Osterberg, T. und Wadsten, T. (1999). "Physical state of L-histidine after freeze-drying and long-term storage". *Eur J Pharm Sci* **8**(4): 301-308.
- Padhi, B. K., Chougule, M. B. und Misra, A. (2009). "Aerosol performance of large respirable particles of amikacin sulfate produced by spray and freeze drying techniques". *Curr Drug Deliv* **6**(1): 8-16.
- Papp, L. V., Holmgren, A. und Khanna, K. K. (2010). "Selenium and Selenoproteins in Health and Disease". *Antioxidants & Redox Signaling* **12**(7): 793-795.
- Parkins, D. A. und Lashmar, U. T. (2000). "The formulation of biopharmaceutical products". *Pharm Sci Technolo Today* **3**(4): 129-137.
- Patton, J. S. und Byron, P. R. (2007). "Inhaling medicines: delivering drugs to the body through the lungs". *Nat Rev Drug Discov* **6**(1): 67-74.

- Ph. Eur. (2008a). "2.9.18 Zubereitungen zur Inhalation: Aerodynamische Beurteilung feiner Teilchen", Europäisches Arzneibuch 6.0, amtliche deutsche Ausgabe: 364-378.
- Ph. Eur. (2008b). "Insulin human", Europäisches Arzneibuch 6.0, amtliche deutsche Ausgabe: 2848-2851.
- Ph. Eur. (2008c). "Zubereitungen zur Inhalation - Inhalanda", Europäisches Arzneibuch 6.0, amtliche deutsche Ausgabe: 1048-1053.
- Porter, W. R. (1997). "Chemical and physical properties of peptide and protein drugs". Inhalation delivery of therapeutic peptides and proteins. P. K. Gupta. New York, Marcel Dekker, Inc. **107**: 59.
- Quinn, R. und Andrade, J. D. (1983). "Minimizing the aggregation of neutral insulin solutions". J Pharm Sci **72**(12): 1472-3.
- Rabinowitz, J. D., Lloyd, P. M., Munzar, P., Myers, D. J., Cross, S., Damani, R., Quintana, R., Spyker, D. A., Soni, P. und Cassella, J. V. (2006). "Ultrafast absorption of amorphous pure drug aerosols via deep lung inhalation". J Pharm Sci **95**(11): 2438-51.
- Rambhatla, S., Obert, J. P., Luthra, S., Bhugra, C. und Pikal, M. J. (2005). "Cake shrinkage during freeze drying: a combined experimental and theoretical study". Pharm Dev Technol **10**(1): 33-40.
- Randolph, T. W., Bam, N. und Cleland, J. L. (1994). "Surfactant-Protein Interactions and Their Role in Protein Stabilization". Abstracts of Papers of the American Chemical Society **207**: 80-Biot.
- Robinson, A. B. und Rudd, C. J. (1974). "Deamidation of glutaminy and asparaginy residues in peptides and proteins". Curr Top Cell Regul **8**(0): 247-95.
- Roy, I. und Gupta, M. N. (2004). "Freeze-drying of proteins: some emerging concerns". Biotechnol Appl Biochem **39**(Pt 2): 165-77.

- Rupprecht (1992). "Physikalisch-chemische Grundlagen der Gefriertrocknung". Lyophilisation. Essig and Oschmann. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- Sarciaux, J. M., Mansour, S., Hageman, M. J. und Nail, S. L. (1999). "Effects of buffer composition and processing conditions on aggregation of bovine IgG during freeze-drying". *J Pharm Sci* **88**(12): 1354-61.
- Schersch, K., Betz, O., Garidel, P., Muehlau, S., Bassarab, S. und Winter, G. (2010). "Systematic investigation of the effect of lyophilizate collapse on pharmaceutically relevant proteins I: stability after freeze-drying". *J Pharm Sci* **99**(5): 2256-78.
- Scheuch, G. und Siekmeier, R. (2007). "Novel approaches to enhance pulmonary delivery of proteins and peptides". *J Physiol Pharmacol* **58 Suppl 5**(Pt 2): 615-25.
- Schlocker, W., Gschliesser, S. und Bernkop-Schnurch, A. (2006). "Evaluation of the potential of air jet milling of solid protein-poly(acrylate) complexes for microparticle preparation". *Eur J Pharm Biopharm* **62**(3): 260-6.
- Schwegman, J. J., Hardwick, L. M. und Akers, M. J. (2005). "Practical formulation and process development of freeze-dried products". *Pharm Dev Technol* **10**(2): 151-73.
- Scotchler, J. W. und Robinson, A. B. (1974). "Deamidation of glutaminy residues: dependence on pH, temperature, and ionic strength". *Anal Biochem* **59**(1): 319-22.
- Searles, J. A., Carpenter, J. F. und Randolph, T. W. (2001). "Annealing to optimize the primary drying rate, reduce freezing-induced drying rate heterogeneity, and determine T(g)' in pharmaceutical lyophilization". *J Pharm Sci* **90**(7): 872-87.

- Seville, P. C., Learoyd, T. P., Li, H. Y., Williamson, I. J. und Birchall, J. C. (2007). "Amino acid-modified spray-dried powders with enhanced aerosolisation properties for pulmonary drug delivery". *Powder Technology* **178**(1): 40-50.
- Shapira, R., Wilkinson, K. D. und Shapira, G. (1988). "Racemization of Individual Aspartate Residues in Human Myelin Basic-Protein". *J Neurochem* **50**(2): 649-654.
- Siekmeier, R. und Scheuch, G. (2009). "Treatment of systemic diseases by inhalation of biomolecule aerosols". *J Physiol Pharmacol* **60 Suppl 5**: 15-26.
- Sörensen, H. H., 1997. Composition and method comprising growth hormone and leucine. United States Patent Number 5/654/278, USA
- Srichana, T., Martin, G. P. und Marriott, C. (1998). "Dry powder inhalers: the influence of device resistance and powder formulation on drug and lactose deposition in vitro". *Eur J Pharm Sci* **7**(1): 73-80.
- Srinivasan, G., James, C. M. und Krzycki, J. A. (2002). "Pyrrolysine encoded by UAG in Archaea: Charging of a UAG-decoding specialized tRNA". *Science* **296**(5572): 1459-1462.
- Stadtman, E. R. (1993). "Oxidation of Free Amino-Acids and Amino-Acid-Residues in Proteins by Radiolysis and by Metal-Catalyzed Reactions". *Annual Review of Biochemistry* **62**: 797-821.
- Steckel, H., Eskandar, F. und Witthohn, K. (2003). "Effect of cryoprotectants on the stability and aerosol performance of nebulized aviscumine, a 57-kDa protein". *Eur J Pharm Biopharm* **56**(1): 11-21.
- Stöcker, P. D. H. (2007). "Taschenbuch der Physik". Frankfurt am Main, Verlag Harri Deutsch.

- Tang, X. und Pikal, M. J. (2004). "Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice". *Pharm Res* **21**(2): 191-200.
- Terakita, A., Matsunaga, H. und Handa, T. (2009). "The influence of water on the stability of lyophilized formulations with inositol and mannitol as excipients". *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **57**(5): 459-63.
- US Food and Drug Administration. (1980, 27.11.2010). "L-Glutamic acid".  
von  
[http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnDetailNavigation.cfm?  
rpt=scogsListing&id=187](http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnDetailNavigation.cfm?rpt=scogsListing&id=187).
- US Food and Drug Administration. (2010, 28.12.2010). "Polysorbate 80".  
from  
<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/getiigWEB.cfm>.
- Varshney, D. B., Kumar, S., Shalaev, E. Y., Sundaramurthi, P., Kang, S. W., Gatlin, L. A. und Suryanarayanan, R. (2007). "Glycine crystallization in frozen and freeze-dried systems: effect of pH and buffer concentration". *Pharm Res* **24**(3): 593-604.
- Verband Forschender Arzneimittelhersteller e.V. (2010). "Zugelassene gentechnische Arzneimittel in Deutschland". von  
[www.vfa.de/gentech](http://www.vfa.de/gentech).
- Volkin, D. B. und Klivanov, A. M. (1987). "Thermal-Destruction Processes in Proteins Involving Cystine Residues". *J Biol Chem* **262**(7): 2945-2950.
- Wang, W. (2000). "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals". *Int J Pharm* **203**(1-2): 1-60.
- Wang, W., Wang, Y. J. und Wang, D. Q. (2008). "Dual effects of Tween 80 on protein stability". *Int J Pharm* **347**(1-2): 31-8.

- Webb, S. D., Cleland, J. L., Carpenter, J. F. und Randolph, T. W. (2003). "Effects of annealing lyophilized and spray-lyophilized formulations of recombinant human interferon-gamma". *J Pharm Sci* **92**(4): 715-29.
- Westmeier, R. (2008), "Inhalative Kombinationspräparate durch Co-Präzipitation". *Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie*, Kiel, Christian-Albrechts-Universität, Thesis.
- Willemer, H. (1992). "Measurements of temperatures, ice evaporation rates and residual moisture contents in freeze-drying". *Dev Biol Stand* **74**: 123-34; discussion 135-6.
- Willmann, M. (2003), "Stabilisierung von pharmazeutischen Proteinlösungen durch Vakuumtrocknung". *Pharmazeutische Technologie*, München, Ludwig-Maximilians-Universität, Thesis.
- Yamashita, C., Ibaragi, S., Fukunaga, Y. und Akagi, A., 2003. Dry powder inhalation system for transpulmonary administration. United States Patent Number 2003/0101995 A1, Japan
- Yong, Z., Yingjie, D., Xueli, W., Jinghua, X. und Zhengqiang, L. (2008). "Conformational and bioactivity analysis of insulin: Freeze-drying TBA/water co-solvent system in the presence of surfactant and sugar". *Int J Pharm*.
- Yu, J. und Chien, Y. W. (1997). "Pulmonary drug delivery: physiologic and mechanistic aspects". *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* **14**(4): 395-453.
- Zhang, F., Aaltonen, J., Tian, F., Saville, D. J. und Rades, T. (2009). "Influence of particle size and preparation methods on the physical and chemical stability of amorphous simvastatin". *Eur J Pharm Biopharm* **71**(1): 64-70.

Zhang, Y., Ji, B., Ling, P. und Zhang, T. (2007). "Trehalose and hyaluronic acid coordinately stabilized freeze-dried pancreatic kininogenase". Eur J Pharm Biopharm **65**(1): 18-25.

---

## **DANKSAGUNG**

Ich möchte mich zuerst ganz herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Steckel für die Aufnahme in den Arbeitskreis der Kieler Technologen und die Überlassung des interessanten und vor allem sehr vielseitigen Forschungsthemas bedanken. Hardy, ich danke Dir für Dein stets offenes Ohr und die Freiheiten, die Du mir im Hinblick auf die eigenständige Bearbeitung der Arbeit gewährt hast.

Herrn Prof. Dr. Blaschek danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Rüdi möchte ich ganz herzlich danken für unzählige XRPD-Messungen, das Erstellen und Ändern ebenso vieler Grafiken und für alle kleinen Dinge, die er über die Jahre mit Freude und Gelassenheit für mich getan hat.

Dirk möchte ich ganz herzlich danken für die Fertigung der Prototypen und seine Ideen, die meine Inhalationssysteme erst zu dem gemacht haben, was sie sind.

Kalle möchte ich ganz herzlich danken für seine Bereitschaft, mir bei technischen Schwierigkeiten Hilfestellung zu geben.

Johannes von RPC Formatec danke ich für die Leihgabe des Flutters.

Herrn Prof. Dr. Gieseler von der Uni Erlangen möchte ich danken für die hilfreichen Tipps bei Fragen zur mDSC und die Ermöglichung der Messungen am Gefriertrocknungsmikroskop.

Frau Dr. Schulze vom Städtischen Krankenhaus Kiel möchte ich danken für den unkomplizierten Ablauf der Messungen der Insulinaktivität.

---

Bei Maren und Lars möchte ich mich ganz herzlich bedanken für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Maren, Hanna und Regina – ganz herzlichen Dank für die ständige Unterstützung an der HPLC und den ein oder anderen Plausch.

Arne und Detlef möchte ich für die schnelle Abhilfe von computerbezogenen Problemen danken.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei allen ehemaligen und aktuellen Kollegen und Kolleginnen für die angenehme und oft auch fröhliche Arbeitsatmosphäre bedanken, die am Institut herrscht. Ich werde viele Dinge, die das Arbeiten mit Euch so abwechslungsreich gemacht haben, ganz sicher sehr vermissen.

---

## **LEBENS LAUF**

### **Persönliche Daten**

Nachname	Pfeffer
Vorname	Jan Frederik
Geburtsdatum	08. Juli 1980
Geburtsort	Lübeck
Staatsangehörigkeit	deutsch

### **Schulbildung**

08/1987 – 07/1991	Grund- und Hauptschule Ratekau
08/1991 – 07/2000	Leibniz-Gymnasium, Bad Schwartau
07/2000	Abitur

### **Zivildienst**

09/2000 – 07/2001	Schule am Papenmoor, Förderzentrum für geistige Entwicklung, Bad Schwartau
-------------------	--

### **Studium**

10/2001 – 02/2002	Chemie an der CAU Kiel
04/2002 – 06/2006	Pharmazie an der CAU Kiel
08/2007	Approbation als Apotheker

### **Berufliche Erfahrung**

07/2006 – 12/2006	Pharmazie-Praktikum in der Förde-Apotheke, Kiel
01/2007 – 06/2007	Pharmazie-Praktikum bei der Beiersdorf AG, Hamburg
seit 10/2007	Promotion am Pharmazeutischen Institut der CAU Kiel, Abteilung Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie

---

## Erklärung nach § 9 der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich gemäß § 9 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, dass ich die vorliegende Arbeit, abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer, selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Weiterhin habe ich keine anderen als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis entstanden und wurde bei keiner anderen Universität zur Begutachtung eingereicht.

Jan Frederik Pfeffer