

# **Fingerlyophilisation als schnelles Gefriertrocknungsverfahren.**

Untersuchungen zum Aktivitätsverlust von  $\beta$ - Galactosidase und  
Trypsin als Modellproteine  
in Abhängigkeit von Einfrier- und Trocknungsbedingungen

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. Nat.)  
der Mathematisch- Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich- Wilhelms- Universität Bonn

Vorgelegt von

**Anna Maria Grimm geb. Skorupa**

aus Katowice (Polen)

Bonn 2008



Angefertigt mit Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der  
ULB Bonn [http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr 2008

Erster Referent: Prof. Dr. R. Süverkrüp

Zweiter Referent: Prof. Dr. K.J. Steffens

Tag der Promotion : 28.03.2008

# Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Richard Süverkrüp am Institut für Pharmazeutische Technologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn.

Mein Dank gilt allen Beteiligten, die zum Gelingen dieser Promotionsarbeit beigetragen haben. Es fällt mir schwer meinen Dank auf wenige Personen zu beschränken. Daher danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für das sehr angenehme Arbeitsklima. Insbesondere möchte ich mich bedanken bei:

- meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. R. Süverkrüp für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die Betreuung meiner Promotion. Ich schätzte sehr seine großzügige und konstruktive Kritik sowie Unterstützung während meines wissenschaftlichen Exkurses.
- Herrn Prof. Dr. K.J. Steffens für die Übernahme des Koreferats.
- Günther Feldkeller und Jürgen Hohmann ohne deren tatkräftige Hilfe bei der Entwicklung und dem Bau des Fingerlyophilisators meine Promotionszeit nur halb so schön und effektiv gewesen wäre.
- Kristina Piskorz für die langen gemeinsamen Stunden und die eifrige Unterstützung im Analytiklabor.
- Bei Markus Pietsch für die freundliche Hilfe beim Einüben der Aktivitätsbestimmung von Trypsin bedanken.
- Meinen wunderbaren Bürokolleginnen Diana Fischer und Philippa Jeckel für die gemeinsamen unvergesslichen Stunden im Büro und während der Zeit, in der die Dissertation erstellt wurde. Für die Betreuung von Vinzent möchte ich Euch und Susanne Wiesweg herzlich danken.

Meinen Eltern und meinem Mann gilt ein besonderer Dank für die unerschöpfliche Unterstützung, Geduld und Zuversicht in meiner Promotionszeit. Meinem Sohn Vinzent danke ich für seine Schlafstunden, in den ich an der Erstellung der Dissertation arbeiten konnte.

# Vorwort

Proteine nehmen in der medikamentösen Therapie einen immer größeren Stellenwert ein. Sie können aus Mikroorganismen (wie z.B.  $\beta$ -Galactosidase aus E.coli [94]) oder tierischen Zellen (wie das Trypsin aus Rinder-, Schweine- oder menschlicher Bauchspeicheldrüse [85] oder wie das Humane Serum Albumin (HSA) aus menschlichem Blut [79]) isoliert oder auf dem biotechnologischen Wege hergestellt werden (wie z.B. die gentechnisch hergestellten Interferone wie das Interferon gamma in Pegasys<sup>®</sup>, Blutgerinnungsfaktor VIII in Beriate<sup>®</sup> P [80]).

Derzeit sind in Deutschland 131 Arzneimittel mit 96 verschiedenen gentechnisch hergestellten Wirkstoffen zugelassen [80]. Insgesamt wurde 2006 der Umsatz mit diesen Arzneimitteln in deutschen Apotheken auf etwa 10% geschätzt [80]. Die Tendenz ist steigend.

Zu den wichtigsten Klassen der therapeutischen Proteine gehören: Humaninsuline (Humaninsulin im Actrapid<sup>®</sup>) und Insulinanaloga (Glulisin in Apidra<sup>®</sup>, Insulin Aspart in Novorapid<sup>®</sup>), Wachstumshormone, Interferone (Interferon alpha im Infe-rax<sup>®</sup>, Interferon beta in Avonex<sup>®</sup> oder Interferon gamma in Pegasys<sup>®</sup>), monoklonale Antikörper z.B. Adalimumab in Humira<sup>®</sup>, tissue plasminogen activator (tPA), Fusionsproteine z.B. Etanercept (Enbrel<sup>®</sup>), Blutgerinnungsfaktoren, Interleukine und Plasminogenaktivatoren und das Erythropoetin (Erypo<sup>®</sup>)[91].

Die Applikation der therapeutischen Proteine erfolgt in der Regel parenteral, da ihre perorale Bioverfügbarkeit durch die enzymatische Spaltung im Magen-Darm-Trakt niedrig ist.

Viele Proteine sind in wässriger Lösung nicht für längere Zeit stabil und werden deshalb als Arzneimittel in Form von Lyophilisaten auf den Markt gebracht. Für die Erhaltung der Proteinaktivität ist es wichtig die Prozessbedingungen bei der Gefriertrocknung für jedes Abgabefäß exakt festzulegen und zu überwachen. Das ist bei sehr großen Anlagen nur mit unzumutbarem technischem Aufwand möglich.

In der pharmazeutischen Industrie verwendet man, um die Kosten für eine Produktionseinheit niedrig zu halten, Anlagen mit Stellflächen von 20 – 100 m<sup>2</sup> auf denen gleichzeitig bis zu 24 000 Produktvials oder Fertigspritzen lyophilisiert werden können [37]. Die Gefriertrocknungszyklen können je nach Formulierung und Füllmenge zwischen 24 h und 4 Tagen dauern. Die langen Prozesszeiten sind durch die Produktstruktur bedingt. Ein Lyophilisationsprozess dauert umso länger,

je höher die Schichtdicke im Produkt, je kleiner die im Gefriergut enthaltenen Poren und je größer der Abstand des Trockenguts zum Kondensator ist. Überdies ist die Temperaturführung während des Lyophilisationsvorgangs für die Dauer der Trocknung entscheidend. Je niedriger die Produkttemperatur ist, umso länger muss getrocknet werden.

Die Größe der Industriefriertrockner bedingt Schwierigkeiten bei der Steuerung der Prozessparameter. Es kommt zu einer Inhomogenität der Temperaturverteilung, weil im Randbereich höhere Temperaturen auftreten als in der Mitte der Stellflächen [61]. Dadurch besteht die Gefahr, dass es in Teilen einer Produktionsanlage zum Aufschmelzen des Produktes (engl. *meltback*) kommt, wenn die Temperatur zu früh angehoben wird und der Restwassergehalt noch nicht niedrig genug ist.

Für Proteinzubereitungen sind inhomogene Bedingungen während des Trocknungsprozesses besonders kritisch. Es kommt zur Schädigung der Proteine aufgrund von z.B. Konformationsänderungen oder zu hoher Temperaturen und dadurch zu einem erniedrigten Wirkstoffgehalt. Demzufolge wird einerseits die Aktivität des Produktes herabgesetzt und andererseits seine optische Qualität beeinträchtigt [29].

Diese Schwächen der derzeitigen Herstellungsverfahren bei Industriefriertrocknern können zu Qualitätsunterschieden innerhalb einer Charge und zu einer unzureichenden Reproduzierbarkeit in der Entwicklungsphase führen.

In dieser Arbeit soll deshalb ein Verfahren untersucht werden, bei dem jedes Abgabegefäß gleichzeitig als Trockenkammer dient. Die Produktparameter werden individuell eingestellt und kontrolliert und dadurch die Inhomogenität der Trocknungsbedingungen reduziert, die bei gleichzeitiger Trocknung vieler Gefäße unvermeidlich ist. Dabei wird der fingerförmige Kondensator vor der Trocknung in das Abgabegefäß eingeführt, um den Abstand des Trockengutes von der Kondensatoroberfläche zu minimieren. Deshalb wird das Verfahren als Fingerlyophilisation bezeichnet.

Bei der Fingerlyophilisation wird die Lösung in Form feinsten Tröpfchen auf die Wand eines vorgekühlten Behälters aufgesprüht und so rasch eingefroren. Dadurch entsteht eine dünne Schicht des Eises, die im Feinvakuum schnell getrocknet werden kann. Das verkürzt den Trocknungszyklus. Die Temperatur des Trockengutes kann durch die Gefäßwand kontrolliert werden.

Meiner Familie

# Inhaltsverzeichnis

<b><u>DANKSAGUNG .....</u></b>	<b><u>I</u></b>
<b><u>VORWORT.....</u></b>	<b><u>II</u></b>
<b><u>INHALTSVERZEICHNIS .....</u></b>	<b><u>1</u></b>
<b><u>1. EINLEITUNG .....</u></b>	<b><u>5</u></b>
<b><u>2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN.....</u></b>	<b><u>10</u></b>
<b>2.1 PROTEINE – AUFBAU UND STABILISIERUNG .....</b>	<b>10</b>
2.1.1 AUFBAU DER PEPTIDE UND PROTEINE .....	10
2.1.2 STABILITÄT VON PROTEINEN .....	15
2.1.2.1 Stabilisierung wässriger Proteinlösungen.....	18
2.1.2.2 Stabilisierung während der Gefriertrocknung .....	20
2.1.2.3 Zusätze .....	22
2.1.3 FORMULIERUNG VON PEPTIDEN UND PROTEINEN.....	24
<b>2.2 GEFRIERTROCKNUNG.....</b>	<b>28</b>
2.2.1 GEFRIERTROCKNUNGSPROZESS .....	29
2.2.2 EINSATZGEBIETE DER GEFRIERTROCKNUNG .....	30
2.2.3 VOR UND NACHTEILE DER GEFRIERTROCKNUNG .....	31
2.2.4 EINFRIEREN .....	32
2.2.4.1 Eigenschaften von Lösungen beim Einfrieren .....	34
2.2.4.2 Einfriermethoden.....	36
2.2.5 PRIMÄRTROCKNUNG .....	40
2.2.6 SEKUNDÄRTROCKNUNG .....	47
2.2.7 DIE ROLLE DES KONDENSATORS BEI DER GEFRIERTROCKNUNG.....	49
2.2.8 GLASZUSTAND UND KOLLAPSTEMPERATUR .....	49
<b><u>3. EXPERIMENTELLER TEIL.....</u></b>	<b><u>52</u></b>
<b>3.1 VERSUCHSPLANUNG. ....</b>	<b>52</b>
<b>3.2 VERWENDETE MATERIALIEN .....</b>	<b>56</b>
3.2.1 B-GALACTOSIDASE.....	56
3.2.2 TRYPSIN.....	58

3.2.3	HYPROMELLOSE (HPMC).....	59
3.2.4	MANNITOL .....	61
<b>3.3</b>	<b>GERÄTE UND METHODEN .....</b>	<b>62</b>
3.3.1	AKTIVITÄTSBESTIMMUNG VON B-GALACTOSIDASE UND TRYPSIN.....	62
3.3.2	UV-VIS SPEKTROSKOPIE.....	65
3.3.3	EINFRIERTEMPERATUREN .....	66
3.3.4	GEFRIERTROCKNUNGSMETHODEN.....	70
3.3.5	RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE.....	76
3.3.6	RÖNTGENDIFFRAKTOMETRIE.....	77
3.3.7	THERMISCHE ANALYSENVERFAHREN.....	80
3.3.7.1	Thermogravimetrie .....	80
3.3.7.2	Dynamisch Mechanische Analyse .....	82
3.3.7.3	Dynamische Differenzkalorimetrie.....	85
3.3.8	LASERBEUGUNGSSPEKTROSKOPIE.....	88
3.3.9	STATISTIK .....	90
<b>4.</b>	<b><u>ERGEBNISSE UND AUSWERTUNG .....</u></b>	<b><u>94</u></b>
<b>4.1</b>	<b>INAKTIVIERUNG VON B-GALACTOSIDASE NACH EINFRIEREN UND GEFRIERTROCKNUNG.....</b>	<b>94</b>
4.1.1	GEHALTSBESTIMMUNG VON B-GALACTOSIDASE .....	95
4.1.2	INAKTIVIERUNG VON B-GALACTOSIDASE NACH EINFRIEREN UND WIEDERAUFTAUEN 96	
4.1.2.1	Zusammenfassung der Einfrierversuche mit $\beta$ -Galactosidase.....	103
4.1.2.1.1	Statistische Auswertung der Einfrierversuche von $\beta$ -Galactosidase .....	104
4.1.3	INAKTIVIERUNG VON B-GALACTOSIDASE BEI DER KONVENTIONELLEN GEFRIERTROCKNUNG .....	111
4.1.3.1	Zusammenfassung der Versuche zur konventionellen Gefriertrocknung von $\beta$ - Galactosidase.....	121
4.1.3.1.1	Statistische Auswertung der Versuche zur konventionellen Gefriertrocknung von $\beta$ - Galactosidase.....	123
4.1.4	INAKTIVIERUNG VON B-GALACTOSIDASE BEI DER FINGERLYOPHILISATION .....	130
4.1.4.1	Vergleich des Einflusses der konventionellen Gefriertrocknung mit der Fingerlyophilisation auf die Restaktivität von $\beta$ -Galactosidase.....	137
4.1.4.1.1	Statistische Auswertung der Fingerlyophilisation und der konventionellen Gefriertrocknung von $\beta$ -Galactosidase.....	139
<b>4.2</b>	<b>INAKTIVIERUNG VON TRYPSIN NACH EINFRIEREN UND GEFRIERTROCKNUNG. ....</b>	<b>143</b>
4.2.1	GEHALTSBESTIMMUNG VON TRYPSIN .....	144

4.2.2	INAKTIVIERUNG VON TRYPSIN NACH EINFRIEREN UND WIEDERAUFTAUEN .....	145
4.2.2.1	Zusammenfassung der Einfrierversuche mit Trypsin.....	154
4.2.2.1.1.	Statistische Auswertung der Einfrierversuche von Trypsin.....	155
4.2.3	INAKTIVIERUNG VON TRYPSIN BEI DER KONVENTIONELLEN GEFRIERTROCKNUNG .	162
4.2.3.1	Zusammenfassung der Versuche zur konventionellen Gefriertrocknung von Trypsin. 173	
4.2.3.1.1.	Statistische Auswertung der Versuche zur konventionellen Gefriertrocknung von Trypsin.....	175
4.2.4	INAKTIVIERUNG VON TRYPSIN BEI DER FINGERLYOPHILISATION.....	183
4.2.4.1	Vergleich des Einflusses der konventionellen Gefriertrocknung und der Fingerlyophilisation auf die Restaktivität von Trypsin. ....	189
4.2.4.1.1.	Statistische Auswertung der Fingerlyophilisation und der konventionellen Gefriertrocknung von Trypsin .....	190
<b>4.3</b>	<b>EIGENSCHAFTEN DER ZU LYOPHILISIERENDEN LÖSUNGEN .....</b>	<b>193</b>
4.3.1	VISKOSITÄT DER KRYOPROTEKTOR-LÖSUNGEN.....	193
4.3.2.	PARTIKELGRÖÖE UND OBERFLÄCHENSPANNUNG DER VERSPRÜHTEN KRYOPROTEKTOR-LÖSUNGEN .....	195
4.3.3.	GLASÜBERGANGSTEMPERATUR DER LÖSUNGEN IM GEFRORENEN ZUSTAND .....	198
<b>4.4</b>	<b>CHARAKTERISIERUNG DER LYOPHILISATE .....</b>	<b>203</b>
4.4.1	OBERFLÄCHENSTRUKTUR. ....	203
4.4.2	RÖNTGENDIFFRAKTOMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN.....	210
4.4.2.1.	Röntgendiffraktogramme reiner Puffer-Lyophilisate .....	212
4.4.2.2.	Röntgendiffraktogramme der Lyophilisate mit Hypromellose.....	214
4.4.2.3.	Röntgendiffraktogramme der Lyophilisate mit Mannitol.....	219
4.4.3.	RESTWASSERGEHALT.....	225
<b><u>5.</u></b>	<b><u>DISKUSSION .....</u></b>	<b><u>228</u></b>
<b>5.1</b>	<b>VERGLEICH DER FINGERLYOPHILISATION MIT DER KONVENTIONELLEN GEFRIERTROCKNUNG. ....</b>	<b>231</b>
<b>5.2</b>	<b>EINFLUSS DER EINFRIERTEMPERATUR AUF DIE ENZYMAKTIVITÄT. ....</b>	<b>233</b>
<b>5.3</b>	<b>WIRKSAMKEIT DER KRYOPROTEKTOREN BEIM EINFRIEREN.....</b>	<b>236</b>
<b>5.4</b>	<b>ANALYTISCHER TEIL.....</b>	<b>238</b>
5.4.1	RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE .....	238
5.4.2	RÖNTGENDIFFRAKTOMETRIE .....	239
5.4.3	RESTWASSERGEHALT DER LYOPHILISATE .....	242
5.4.4	GLASÜBERGANGSTEMPERATUR DER GEFRORENEN LÖSUNGEN.....	244
<b>5.5</b>	<b>ABSCHLIEßENDE BEWERTUNG.....</b>	<b>246</b>

<b>6. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>248</b>
<b>7. ANHANG.....</b>	<b>250</b>
7.1 VERZEICHNIS DER VERWENDETEN MATERIALIEN UND GERÄTE .....	250
7.2 B-GALACTOSIDASE-KALIBRIERREIHEN.....	253
7.3 KALIBRIERREIHEN TRYPSIN.....	255
7.4 LASEBEUGUNGSSPEKTROSKOPIE. ....	257
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>260</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>261</b>
<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>270</b>
<b>ERKLÄRUNG.....</b>	<b>271</b>

---

# 1. Einleitung

Klassische Arzneistoffe sind vorwiegend kleine organische Moleküle, die durch chemische Synthese hergestellt oder aus Organismen isoliert werden. Peptide und Proteine sind dagegen große organische Moleküle, die, wie zuvor erwähnt, aus Mikroorganismen oder tierischen Zellen isoliert oder auf biotechnologischem Wege hergestellt werden (vgl. s.II).

Als Peptide bezeichnet man Moleküle mit vereinbarungsgemäß maximal 80 bis 100 Aminosäuren. Bei Proteinen ist die Anzahl der Aminosäuren erheblich größer [05]. Sie kann mehrere Tausend Aminosäuren betragen. Als Beispiel kann das Fibrinogen genannt werden, das aus über 1000 Aminosäuren aufgebaut ist [75]. Der Aufbau von Peptiden und Proteinen wird wie folgt charakterisiert.

Die sog. Primärstruktur des Proteins gibt die Reihenfolge der Aminosäuren in einem Strang an. Die Faltung des Aminosäurenstranges und seine räumliche Anordnung (z.B.  $\alpha$ -Helix oder  $\beta$ -Faltblatt) wird Sekundärstruktur genannt. Eine weitere Knäuelung (räumliche Anordnung) des Sekundärstranges und den Ort der aktiven Zentren beschreibt die Tertiärstruktur (vgl. Kap.2.1.1). Werden mehrere Polypeptidketten durch intermolekulare nichtkovalente Wechselwirkungen als stabiles oligomeres Peptid oder Protein zusammengehalten, dann spricht man von der Quartärstruktur. Ein Protein kann aus einer oder mehreren Untereinheiten (auch Monomer oder Proteindomäne bezeichnet) bestehen. Manche Proteine haben schon als Monomer eine biologische Aktivität, bei anderen ist dazu erforderlich, dass sich mehrere Einheiten zu einem Oligomer zusammenlagern (auch Quartärstruktur genannt). Als Beispiel für aus mehreren Proteinen zusammengelagerte Komplexe können Immunglobuline genannt werden, die aus zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Proteinen, über insgesamt vier Disulfidbrücken, zu einem funktionsfähigen Antikörper verbunden sind. Ein weiteres Beispiel ist das Hämoglobin, der rote Blutfarbstoff. Es ist ein Tetramer, das aus zwei Peptidkettenpaaren und vier Hämgruppen besteht [60], [31].

Die Wirksamkeit der Proteine ist an ihre intakte Struktur gekoppelt und kann durch äußere Einflüsse wie Wasser (Hydrolyse), Sauerstoff (Oxidation) und Temperatur (vgl. Kap. 2.1.2) beeinflusst werden. Durch Zusatz von Salzen oder Harnstoff kann es zu reversiblen Konformationsänderungen kommen, die die Aktivität des Proteins verändern können.

Proteine werden im Magen-Darm-Trakt enzymatisch bis hin zu freien Aminosäuren, durch Gastricisin und Pepsin im Magen, durch Trypsin, Chymotrypsin und Elastase im Pankreassaft und im Dünndarm durch Prolinase und Prolidase gespalten [68]. Deshalb ist ihre perorale Bioverfügbarkeit niedrig und sie werden als Arzneimittel vorwiegend parenteral appliziert.

Die meisten Peptide sind in wässriger Lösung so stabil, dass sie als gebrauchsfertige Injektionslösung gelagert werden können, z. B. Calcitonin, das Polypeptidhormon der Schilddrüse und das Hypophysenhinterlappenhormon Oxytocin [46].

Proteine jedoch müssen überwiegend aufgrund ihrer schnellen Inaktivierung in Lösung, in eine wasserfreie Form überführt werden, z. B. durch Lyophilisation. Vor der Verabreichung werden sie z.B. in isotonischer Kochsalzlösung gelöst, wie z. B. humanes Wachstumshormon, Interleukin-2, t-PA (tissue plasminogen activator) und Erythropoetin [46]. Das gilt auch für einige niedermolekulare hydrolyseempfindliche Arzneistoffe wie Acetylsalicylsäure (Aspisol<sup>®</sup>) und Penicilline (Pendysin 1,2 Mil. I.E<sup>®</sup>, Bipensaar 1,2 Mega<sup>®</sup>) [80]. Sie sind in Form von Lyophilisaten im Handel, die vor der Anwendung rekonstituiert werden

Ferner gibt es für therapeutische Proteine noch die nasale (Calcitonin Sandoz<sup>®</sup>) und pulmonale (inhalierbares Insulin Exubera<sup>®</sup>) Möglichkeit der Applikation.

Arzneistoffe, die in wässriger Lösung appliziert werden und gleichzeitig hydrolyseempfindlich sind, müssen als Halbfertigprodukt gelagert werden. Zur Herstellung dieser Präparate hat sich trotz hoher Kosten die Gefriertrocknung (auch Lyophilisation genannt) als adäquates Verfahren bewährt. Sie ist einerseits für thermolabile Güter geeignet, andererseits kann bei der Herstellung in pharmazeutischen Anlagen die Asepsis sichergestellt werden.

Bei der Gefriertrocknung werden Arzneistoffe bei niedriger Temperatur (ca. -20°C bis -40°C) durch das Entfernen des Lösungsmittels durch Sublimation, aufkonzentriert oder getrocknet [28]. Der Gefriertrocknungsprozess ist sehr komplex und für ein optimales Ergebnis müssen viele Faktoren berücksichtigt werden: die Einfriereschwindigkeit, stabilisierende Zusätze, die Temperaturführung der Stellflächen und die Temperaturprofile in den Gefäßen sowie der Gasdruck im Feinvakuum. All diese Parameter können die Qualität der Produkte beeinflussen.

-----  
Die Lyophilisation stellt neben der Sprühtrocknung (z. B. für Immunglobulin G IgG und humanes Serum Albumin HSA), bei der die Proteine kurzzeitig Temperaturen von etwa 60-70°C ausgesetzt werden, die Methode der Wahl zur Verarbeitung von empfindlichen Proteinen dar [46].

In dieser Arbeit wurde ein neuer Gefriertrockner, der Fingerlyophilisator (Abbildung 1-1), entwickelt, bei dem jedes Gefäß mit dem Produkt einzeln lyophilisiert wird. Bei Bedarf würde die erforderliche Produktionskapazität dadurch erreicht, dass viele gleichartige Trockenstationen automatisch beladen und im laufenden Betrieb enteist werden. Die Asepsis sollte dadurch sichergestellt werden, dass der gesamte Prozess mit vorsterilisierten Gefäßen in einem Isolator durchgeführt würde.

Die Fingerlyophilisation sollte gegenüber einem konventionellen Gefriertrockner eine Reihe von Vorteilen bieten:

- der Einfriervorgang wird beschleunigt, indem kleine Tröpfchen auf eine kalte Oberfläche gesprüht und damit in weniger als eine Sekunde durchgefroren werden,
- die Prozessdauer wird verkürzt
  - durch eine geringe Schichtdicke (max. 2 mm) des Produktes an der Behälterwand,
  - durch den geringen Abstand zwischen dem Trockengut und dem auf extrem niedrige Temperaturen gekühlten Kondensator,
  - sowie durch das Herabsetzen des Restgasdruckes im Gefäß mittels Feinvakuum,
- durch den direkten Kontakt von Behälterwand und Produkt kann dem Produkt die Sublimationswärme durch Wärmeleitung über die Gefäßwand zugeführt werden.

Bei der konventionellen Gefriertrocknung dagegen kann die Produktschichtdicke auf dem Boden der 10 ml- oder 20 ml- Vials bis zu 15 mm betragen. Eine direkte Kontrolle jedes einzelnen Produktes ist aufgrund einer größeren Anzahl von Gefäßen (ca. 100 Vials pro Stellfläche), die gleichzeitig auf mehreren Stellflächen

-----  
 verarbeitet werden, nicht möglich. Hinzu kommt eine langsame Wärmeübertragung durch Konvektion oder Wärmestrahlung auf das Produkt.

Bei der Fingerlyophilisation sind der Einfriervorgang und die Trocknung eng miteinander verknüpft. Dagegen können die Lösungen bei der konventionellen Gefriertrocknung unterschiedlich schnell und bei verschiedenen Temperaturen eingefroren werden. Dabei können Verluste der Enzymaktivität beim Einfrieren und Trocknen getrennt untersucht werden.

Die Aktivitätsverluste der Modellenzyme  $\beta$ -Galactosidase und Trypsin bei der Fingerlyophilisation wurden deshalb verglichen mit den Verlusten nach konventioneller Gefriertrocknung und bei drei verschiedenen Einfriertemperaturen ( $-27^{\circ}\text{C}$ ,  $-78^{\circ}\text{C}$  und  $-196^{\circ}\text{C}$ ). Dabei wurde auch untersucht, wie weit Zusätze von Hypro-mellose und Mannitol auf zwei Konzentrationsniveaus die Enzyme stabilisieren.

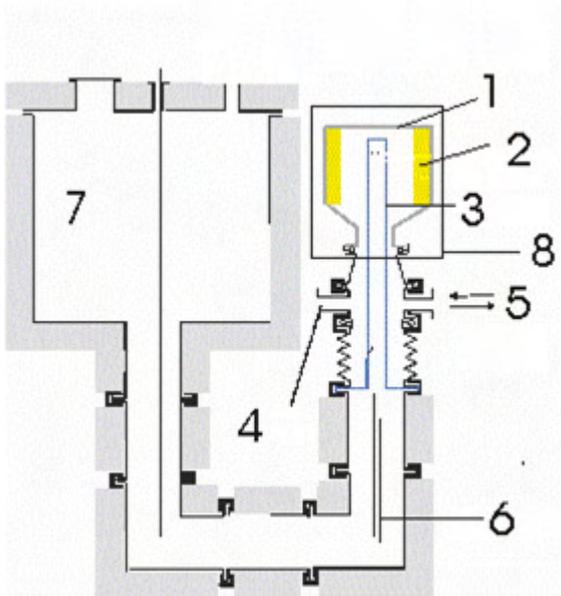


Abbildung 1-1: Fingerlyophilisator (1-Lyophilisationsgefäß; 2-Trockengut; 3-Kühlfinger; 4-Ausgang für die Druckmessung; 5-Ausgang für das Vakuum; 6-Entlüftungsrrohr; 7-Stickstoffreservoir; 8-Heizmantel)

Bei der Fingerlyophilisation bildet jedes Behältnis mit gefrorenem Gut eine eigene Trocknungseinheit. Für die Verarbeitung von Proteinzubereitungen ist es wichtig, dass in jedem einzelnen Gefäß die Trocknungsbedingungen geregelt und kontrolliert werden. Dies soll im Fingerlyophilisator realisiert werden können. Das Besondere am Fingerlyophilisator ist, dass das Gefäß gleichzeitig als Trocknungskammer ((1) in Abbildung 1-1) mit dem Trockengut (2) dient. Die Enzymlösungen

-----  
werden in einem Ultraschnellen Einfrierverfahren (Schockgefrieren) in einer dünnen Schicht an der Wand der im flüssigen Stickstoff vorgekühlten Infusionsflasche eingefroren (vgl. Kap. 3.3.3). Die Heizung des Produktes erfolgt mittels eines Heizmantels in den warme Luft eingeleitet wurde (8 in Abbildung 1-1).

## 2. Theoretische Grundlagen

Im theoretischen Teil der Arbeit wird zunächst auf den Aufbau, die Stabilität und verschiedene Stabilisierungsmechanismen der Proteine eingegangen. Im zweiten Teil des theoretischen Abschnitts wird der Gefriertrocknungsprozess erläutert und wichtige Aspekte in der Proteingefriertrocknung aufgezeigt.

### 2.1 Proteine – Aufbau und Stabilisierung

#### 2.1.1 Aufbau der Peptide und Proteine

Bausteine der Proteine sind die sog. proteinogenen Aminosäuren, von wenigen Ausnahmen abgesehen  $\alpha$ -Aminosäuren (vgl. Abbildung 2-1), die über eine peptidische Bindung zu einem längeren Strang verknüpft werden. Die Reihenfolge der Aminosäuren im Peptidstrang wird in den Genen, die auf den im Zellkern befindlichen Chromosomen lokalisiert sind, durch die Reihenfolge der Nucleotidbasen festgelegt [77]. Chromosomen bestehen aus Desoxyribonucleinsäure (DNS). Ein DNS-Molekül besteht aus zwei korrespondierenden Nucleinsäureketten und bildet eine Doppelhelix. Die Basen, aus denen die DNS aufgebaut ist (Adenin, Guanin, Thymin, Cytosin), sind nach innen gerichtet und werden durch Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehalten. Im DNS-Molekül codiert je eine Gruppe von drei aufeinanderfolgenden Basen (Basentriplett) eine Aminosäure. Die DNS ist allerdings keine direkte Matrize für die Proteinsynthese. Diese findet in den Ribosomen der Zellen statt. Die genetische Information wird zunächst im Vorgang der Transkription auf die messenger Ribonucleinsäure (m-RNS) übertragen. Dabei bildet die m-RNS mit mehreren Ribosomen ein Polysom. Die Aminosäuren werden durch die transfer-RNS (t-RNS) geliefert. Die Verknüpfung der Aminosäuren in den Ribosomen zu Peptidketten wird als Translation bezeichnet [05].

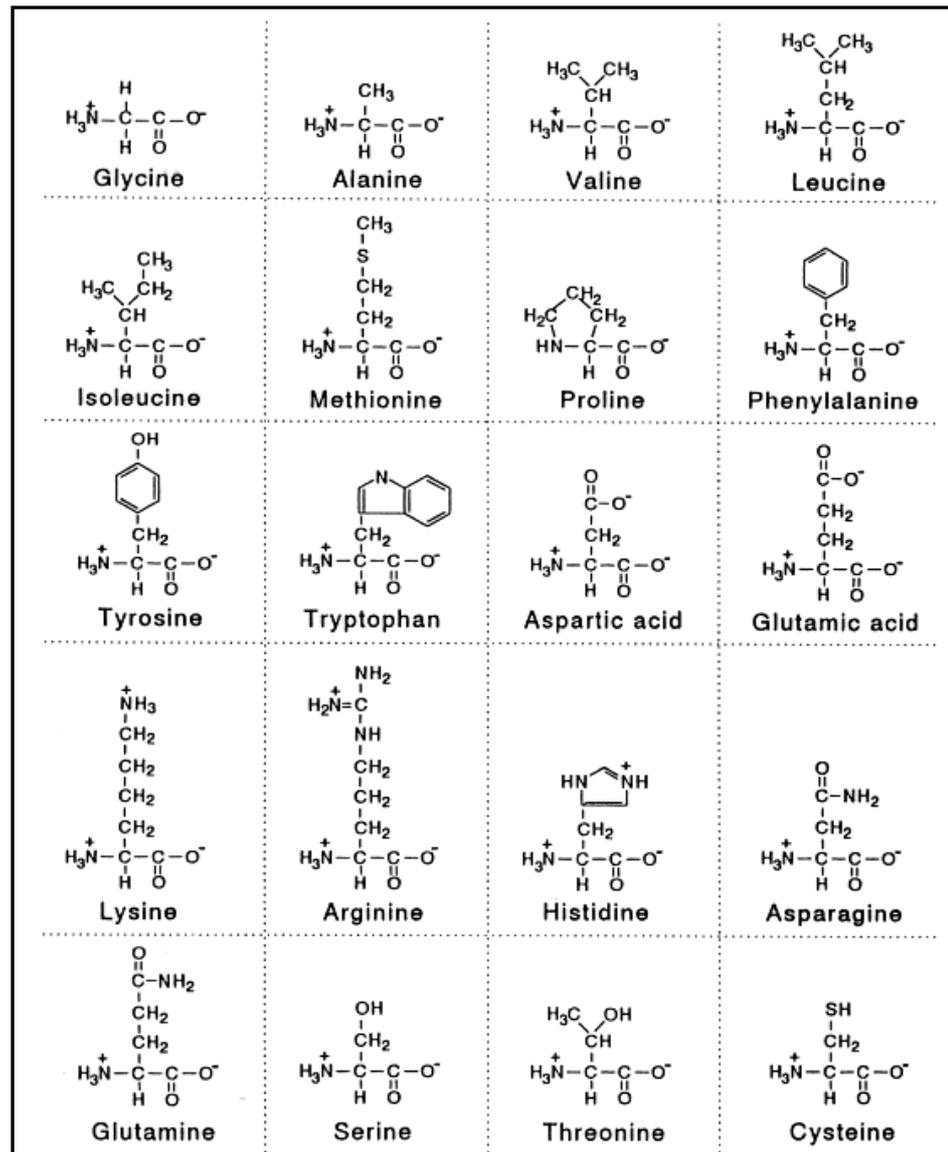


Abbildung 2-1: Proteinogene Aminosäuren.

Bei der Verknüpfung der Aminosäuren zu Peptiden reagiert die Carboxylgruppe des einen Reaktionspartners unter Wasseraustritt mit der  $\alpha$ -Aminogruppe des anderen Partners. So entsteht die Peptid- bzw. Säureamidbindung (Abbildung 2-2). An einem auf diese Weise entstandenen Dipeptid können weitere Aminosäuren anknüpfen, da jede Aminosäure sowohl eine Carboxylgruppe, als auch Aminogruppe besitzt und diese nach dem oben beschriebenen Prinzip zu einem Oligo- (weniger als 10 Aminosäuren) oder Polypeptid (mehr als 10 Aminosäuren) weiter reagieren können [60]. Proteine besitzen die gleiche Struktur wie die Polypeptide. Ab einer Kettenlänge von 80-100 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 10 000 Da (Dalton) liegt vereinbarungsgemäß ein Protein vor [05].

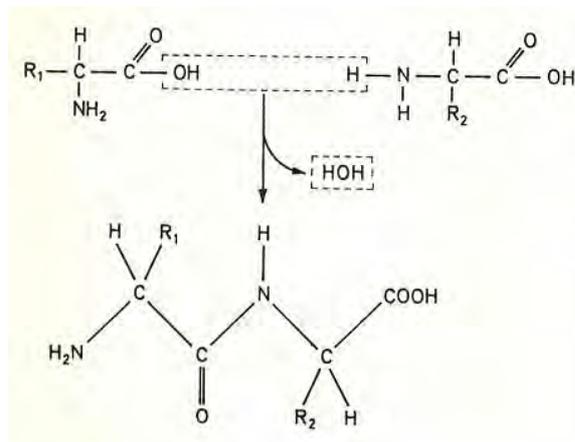


Abbildung 2-2: Verknüpfung von zwei Aminosäuren zu einem Dipeptid [04]. Die Seitenkette R stellt einen Aminosäurerest dar (z.B.  $R_{1/2}$ = lipophil z.B. wie bei Alanin, Valin, und Leucin oder  $R_{1/2}$ = hydrophil wie bei Cystein, Methionin, Tyrosin oder  $R_{1/2}$ = Carbonsäuregruppe wie bei Asparaginsäure oder Glutaminsäure)

Beim Aufbau von makromolekularen Proteinen unterscheidet man vier Stufen, die als Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur bezeichnet werden (vgl. Abbildung 2-3).

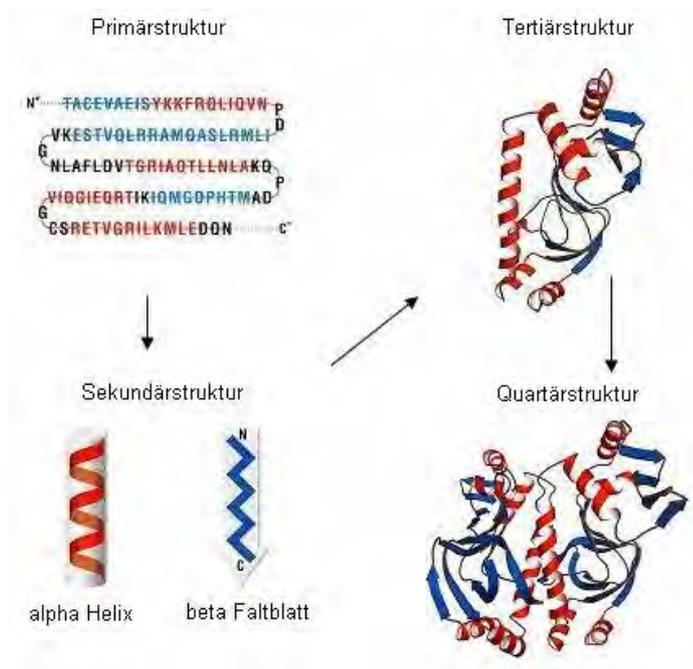


Abbildung 2-3: Schematischer Aufbau der Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur im Protein [60]

- Die Primärstruktur wird durch die Reihenfolge der kovalent gebundenen Aminosäuren im Strang festgelegt, die genetisch determiniert ist.
- Die Sekundärstruktur wird durch die Kettenfaltung, d.h. geometrische Anordnung der Polypeptidkette entlang einer Achse, bestimmt, die durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken (zwischen dem Sauerstoff der Carboxylgruppe und dem Wasserstoff der Amidgruppe gegenüberliegender Peptidbindungen) oder Disulfidbrücken (zwischen zwei Schwefelatomen) zustande kommt. Die drei wichtigsten Typen der Sekundärstruktur sind die  $\alpha$ -Helix-,  $\beta$ -Faltblatt- und Tripelhelixstruktur. Zur Strukturaufklärung können Röntgenstrukturanalyse, optische Rotationsdispersion (ORD), Zirkulardichroismus und Wasser-Deuterium-Austausch herangezogen werden [31].
- Die Tertiärstruktur gibt die räumliche Anordnung (Knäuelung) der in der entsprechenden Sekundärstruktur gefalteten Abschnitte einer Polypeptidkette an. Sie definiert die räumliche Anordnung reaktiver Aminosäurereste, z.B. im aktiven Zentrum von Enzymen oder im Antigenbindungsort von Antikörpern. Zur Aufklärung der Tertiärstruktur dient die Röntgenstrukturanalyse isomorph kristallisierter Schwermetallatomderivate des betreffenden Proteins.
- Die Quartärstruktur kommt durch Ausbildung intermolekularer nichtkovalenter Wechselwirkungen zwischen zwei oder mehreren Polypeptidketten (Monomere) zustande. Dadurch aggregieren diese zu stabilen oligomeren Peptiden. Monomere Formen sind meist inaktiv. Als Bindungskräfte dienen hier sowohl elektrostatische (Wechselwirkungen zwischen positiv und negativ geladenen Aminosäureresten) als auch apolare Bindungskräfte (hydrophobe Wechselwirkungen). Sie sind hinsichtlich Flexibilität ihrer Gestalt und Aktivität den physiologischen Erfordernissen am besten angepasst [60].

Zusätzlich zu den o.g. Strukturen werden Proteine durch ihre Ladung charakterisiert. Proteine können ähnlich wie die Aminosäuren auch Zwitterionen bilden. Je nach der herrschenden Wasserstoffionenkonzentration werden  $H^+$  Ionen angelagert oder sie dissoziieren ab. Das Protein liegt dann als Kation bzw. als Anion vor.

Am isoelektrischen Punkt, dem pH-Bereich, in dem die Summe der positiven Ladungen gleich der Summe der negativen Ladungen ist, liegt für die Aminosäure oder das Protein ein Minimum an elektrischer Ladung vor. Das bedingt zugleich:

- ein Minimum der Löslichkeit, des osmotischen Druckes, der Quellbarkeit und der Wanderung im isoelektrischen Feld
- und ein Maximum der Viskosität, der Koagulierbarkeit und der Spreitungsfähigkeit (d.h. die Fähigkeit zur mechanischen Entknäuelung) [03],[60].

Der chemische Aufbau der Seitenketten bedingt das Verhalten und die Konformation von Proteinen im wässrigen Milieu. Längere aliphatische oder aromatische Seitenketten (auch Reste „R=“ genannt) bedeuten hydrophobe Eigenschaften (wie Alanin  $R = -CH_3$ , oder Valin  $R = -C_3H_7$  vgl. Abbildung 2-1), was dazu führt, dass die Löslichkeit in Wasser abnimmt. Polare Gruppen dagegen, können mit den Wasserdipolen über die Wasserstoffbrücken wechselwirken. Wie z. B. bei Cystein  $R = CH_2SH$  oder Serin  $R = CH_2OH$ . Die Löslichkeit der Proteine wird zusätzlich durch das umgebende Milieu, also den pH-Wert, die Ionenstärke und die Temperatur beeinflusst.

Tendenziell werden unpolare Aminosäuren-Seitenketten eines Proteins zum Molekülinneren orientiert, während polare Seitenketten bevorzugt auf der Oberfläche angeordnet sind. Daraus ergibt sich die Eigenschaft der Proteine hydrophobe Substanzen einzuhüllen und vor dem Ausflocken zu schützen [46].

Werden native Proteine für kurze Zeit Hitze, extremen pH-Werten oder der Wirkung bestimmter Substanzen wie Harnstoff und Guanidin ausgesetzt, so werden sie denaturiert. Das führt zum Verlust der biologischen Aktivität. Oft wird das Protein dadurch unlöslich. Die Grundstruktur der Peptidbindungen bleibt dabei erhalten, es kommt lediglich zur Entfaltung der Polypeptidkette, was zum Verlust der Tertiär- und Quartärstruktur führt. Es bildet sich ein Zufallsknäuel (engl. *random coil*). Die Denaturierung ist häufig reversibel (vgl. Abbildung 2-4). Dies weist darauf hin, dass die biologische Aktivität von Proteinen stark von der dreidimensionalen Konfiguration der Polypeptidkette im nativen Zustand abhängig ist [31].

## 2.1.2 Stabilität von Proteinen

Die wirksame Form von Proteinen ist an die höheren Strukturen des Proteins, also das Vorliegen der Tertiär- oder Quartärstruktur, gekoppelt. Geht diese native Form verloren, ist die Aktivität des Proteins herabgesetzt oder sogar zerstört [60]. Grundsätzlich gibt es zwei Mechanismen, die die Stabilität der Proteine beeinflussen:

1. chemische Veränderungen z.B. Hydrolyse, Deaminierung, Oxidation,  $\beta$ -Elimination, Disulfidaustausch,
2. physikalische Veränderungen z.B. Änderung der höheren Struktur durch Entfaltung, Aggregation oder Dissoziation zu Monomeren.

Chemisch bedingte Instabilitäten kommen durch Veränderungen der kovalenten Bindungen im Protein oder an den Aminosäureresten zustande. Hydrolyse tritt beispielsweise an Peptidbindungen mit Asparaginsäure auf, die etwa 100 Mal empfindlicher sind als andere Peptidbindungen. Wird dieser Molekülteil dem Wasser ausgesetzt, kommt es zur Reaktion und Spaltung von Asparagin–Prolin und Asparagin–Tyrosin Bindungen. Externe Faktoren wie Temperatur, pH-Wert und die Anwesenheit von Metallionen können die Reaktion beschleunigen. Deaminierung erfolgt hauptsächlich an Seitenketten von Asparagin und Glutamin. Dabei wird unter Wassereinfluss eine Aminogruppe abgespalten. Begünstigt wird diese Reaktion durch eine direkte Nachbarschaft der Aminosäuren Glycin, Prolin und Serin. Diese Reaktion ist vom vorliegenden pH-Wert abhängig [46]. Die Oxidation der Proteine kann im festen und flüssigen Zustand stattfinden. Sie betrifft hauptsächlich die Aminosäuren Methionin und Cystein, die zu Methioninsulfoxid und Cysteindisulfid oxidiert werden. Voraussetzung für die Oxidation ist die Anwesenheit von Lösungsmittel (z.B. Wasser) oder die Verfügbarkeit von Sauerstoff [45]. Bei der  $\beta$ -Elimination wird unter Wasserabspaltung eine Doppelbindung zwischen zwei Kohlenstoffatomen gebildet. Dadurch können Disulfidbrücken zwischen zwei Cystein-Resten zerstört werden. Dabei bilden sich zwei Thiolgruppen. Die Reaktion verläuft basenkatalysiert [46]. Bei einem Disulfidaustausch kommt es zur Umlagerung einer Disulfidbrücke zu einem Cysteinrest, was Konsequen-

zen für eine andere Faltung und somit für die Wirksamkeit des Proteins hat. Auch diese Reaktion verläuft basenkatalysiert.

Bei physikalischen Instabilitäten handelt es sich vorwiegend um Veränderungen der Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur. Dadurch kann es zur Entfaltung des Proteinmoleküls kommen. Folgende Effekte sind möglich:

- Denaturierung durch z.B. Änderung des Lösungsmittels oder der Temperatur
- Adsorption an verschiedene Oberflächen wie z.B. Glas, Luft oder Wasser
- Aggregation: ein partiell entfaltetes Protein kann Aggregate (Zusammenschlüsse) aus mehreren Untereinheiten bilden, dabei sind Dimere und Trimere meist wasserlöslich, Oligomere fallen dagegen aus (Präzipitation) [46].

Die Denaturierung der Proteine ist ein Prozess, der nur sehr wenig Energie erfordert. Beim Übergang von der Nativstruktur zu einem entfaltetem Protein (engl.: *unfolded form*) werden lediglich 5-10 kcal/mol verbraucht. Das entspricht der Energie von 1-2 Wasserstoffbrücken [46]. Abbildung 2-4 zeigt welche Formen der Entfaltung die native Proteinform (N) einnehmen kann.

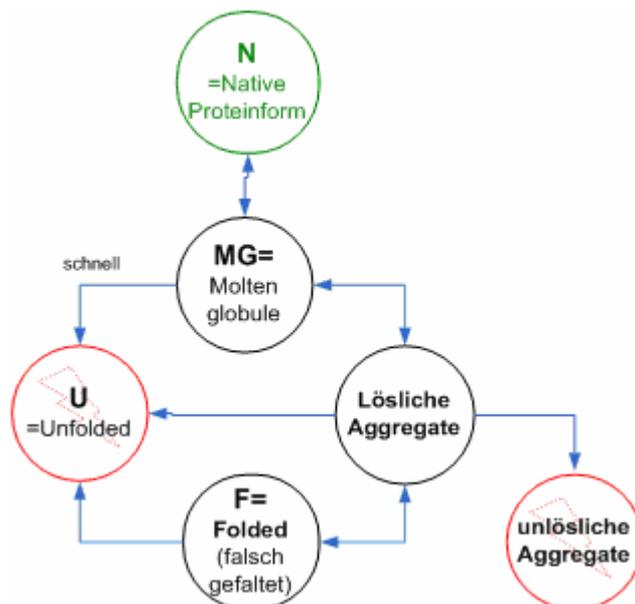


Abbildung 2-4: Physikalische Instabilität von Peptiden und Proteinen [46].

Die „molten globule“ Form (= MG-Form) ist ein partiell entfalteter Zwischenzustand. Durch die partielle Entfaltung werden lipophile Strukturen im Protein frei.

Es kommt zur Bildung von Aggregaten, die Oberfläche des Moleküls wird verkleinert. Diese MG-Zwischenform kann vollkommen entfaltet werden, wodurch sie irreversibel denaturiert wird (= Unfolded (U)). Zusätzlich können lösliche Aggregate ausgebildet werden. Diese wiederum können entweder in die MG-Form umgelagert werden oder es kommt zu einer falschen Faltung (F) des Proteins, die zu seiner Inaktivierung führt. Auch die löslichen Aggregate können vollkommen entfaltet werden und bilden dann die denaturierte U-Form. Die Umlagerung der löslichen Aggregate in die unlöslichen Aggregate ist irreversibel und führt zu einer vollständigen Zerstörung der aktiven Form [46].

Die beschriebenen chemischen und physikalischen Abbaureaktionen laufen nicht unabhängig voneinander ab. Häufig werden durch physikalische Instabilitäten chemische Abbaureaktionen im Inneren des Proteins begünstigt. So können durch teilweise Entfaltung des Proteins die im Inneren versteckten, meist hydrophoben, Aminosäuren freigelegt werden, wodurch sie für chemische Abbaureaktionen zugänglich werden [21].

### 2.1.2.1 Stabilisierung wässriger Proteinlösungen

Wässrige Proteinlösungen können durch Zusatz von Hilfsstoffen stabilisiert werden. Zurzeit sind zwei Mechanismen für die Wirkung der Hilfsstoffe bekannt:

- ~ bevorzugte Bindung (engl.: *preferential binding*) des Hilfsstoffes an der Proteinoberfläche
- ~ bevorzugter Ausschluss (engl.: *preferential exclusion*) des Hilfsstoffes von der Proteinoberfläche.

Die Abbildung 2-5 zeigt eine schematische Darstellung der beiden Mechanismen.

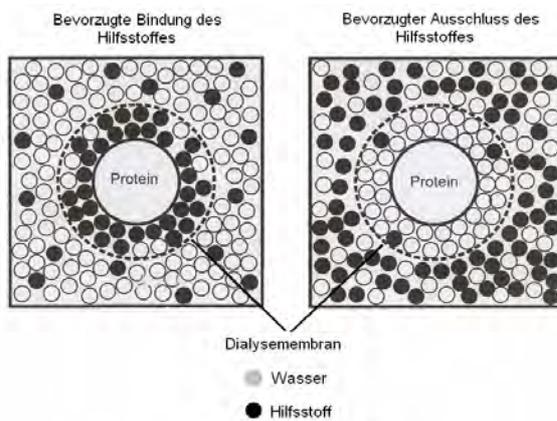


Abbildung 2-5: Dialysegleichgewicht eines Proteins in verschiedenen Hilfsstofflösungen. Linkes Bild: der Hilfsstoff wird verstärkt an der Proteinoberfläche gebunden (engl.: *preferential binding*); rechtes Bild: der Hilfsstoff wird verstärkt von der Proteinoberfläche ausgeschlossen (engl.: *preferential exclusion*) [27]

In Proteinlösungen tritt überwiegend die Stabilisierung der nativen Form des Proteins durch den bevorzugten Ausschluss (engl. *preferential exclusion*) der Hilfsstoffe von der Oberfläche auf, wodurch das Protein automatisch stärker hydratisiert wird (engl. *preferential hydration*).

Die stabilisierende Wirkung des Hilfsstoffes ist eng an seine Affinität zum nativen und zum denaturierten Protein gekoppelt. Im denaturierten Protein liegen die lipophilen Bereiche an der Oberfläche. Diese würden aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften nur wenige Wechselwirkungen mit den üblichen hydrophilen Hilfsstoffen (Zucker) eingehen können. Dadurch würde sich das Gleichgewicht zugunsten der nativen Form verschieben [11]. Die Art und Weise, wie der Hilfsstoff

von der Oberfläche ausgeschlossen wird, wird durch die Ladung an der Proteinoberfläche bestimmt. PEG (Polyethylenglykole) werden z.B. durch einen sterischen Ausschluss von der Proteinoberfläche verdrängt. Sie besitzen einen deutlich größeren Radius als Wassermoleküle. Dadurch bildet sich zuerst eine Wasserhülle auf der Proteinoberfläche [03].

Die Zucker Saccharose, Trehalose, Glucose und Lactose stabilisieren Proteine, indem sie von der Proteinoberfläche ausgeschlossen werden [78].

Substanzen, die die Oberflächenspannung des Wassers erhöhen (z.B. Zucker, bestimmte Salze wie  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgCl}_2$  und die Aminosäuren: Glycin und Alanin) stabilisieren das Protein durch Verkleinerung der freien Oberflächenenergie (definiert als Produkt aus Oberflächenspannung und der Größe der Oberfläche). Denaturierte Proteine weisen eine vergrößerte Oberfläche auf [78].

Durch das hydrophile Glycerin werden die einzelnen Wassermoleküle in größeren Aggregaten zusammengehalten, wodurch sich eine Clusterstruktur des Wassers bildet. Es kommt zu einer „Hydrophobisierung“ des Wassers, die Anzahl der freien Wassermoleküle sinkt, weniger Wasserstoffbrücken werden ausgebildet. Nach Tiamsheff [78] ist die Wechselwirkung polarer Proteinbereiche mit Glycerin entropisch ungünstiger als mit reinem Wasser. Dadurch reichert sich bevorzugt Wasser an den hydrophilen Proteinbereichen an und es kommt zu einer stärkeren Hydratisierung des Proteins (*preferential hydration* und *preferential exclusion*). Dies wird als solvophober Effekt bezeichnet.

Tiamsheff entwickelte ein thermodynamisches Modell, nach dem der Energieunterschied  $\Delta G$  zwischen der nativen (*N*-Form) und der denaturierten Form (*D*-Form) des Proteins möglichst groß sein muss, damit der intakte native Proteinzustand erhalten bleibt [78].

Es gibt drei verschiedene Möglichkeiten, um den oben erwähnten Energieunterschied  $\Delta G$  möglichst hoch zu halten:

1. durch die Bindung des Hilfsstoffes an die native Form wird das Energieniveau der nativen Form erniedrigt und damit der Energieunterschied  $\Delta G$  zwischen *N* und *D* erhöht. Aus dem niedrigeren Energiezustand der *N*-Form resultiert ihre Stabilisierung,
2. der Hilfsstoff wird von der *D*-Form verstärkt abgestoßen, was zu einer vermehrten Hydratisierung und Erhöhung des chemischen Potentials dieser

Form führt. Anschaulich kann es durch Veränderung der Grenzflächenverhältnisse erklärt werden: ein denaturiertes Protein weist eine größere Grenzfläche auf. Daraus resultiert eine höhere freie Energie, die wiederum zur Erhöhung von  $\Delta G$  führt. Dieser Fall stellt ein Problem bei der Stabilisierung der Proteine während der Gefriertrocknung dar, bei der das Wasser von der Proteinoberfläche durch Sublimation entfernt wird und somit zur Erhöhung des chemischen Potentials der D-Form nicht beitragen kann.

3. beide Proteinformen schließen den Hilfsstoff von ihrer Oberfläche aus. Je höher das Ausmaß der Abstoßung von der *D*-Form, umso größer ist der Unterschied der Energieniveaus beider Formen und umso stärker kommt es zu einer Stabilisierung der nativen Proteinform. Dieser Fall beschreibt den Stabilisierungsmechanismus der Ausschlußstabilisierung (engl. *preferential exclusion*) (vgl. Abbildung 2-5).

Untersuchungen von Jiang und Nail zeigen, dass eine höhere Proteinkonzentration in der Lösung stabilisierend wirkt. Bei Katalase,  $\beta$ -Galactosidase und Lactatdehydrogenase stieg mit zunehmender Enzymkonzentration die Restaktivität nach dem Einfrieren und Wiederauftauen an [38].

### 2.1.2.2 Stabilisierung während der Gefriertrocknung

Der Gefriertrocknungsprozess besteht aus drei aufeinander folgenden Schritten, bei denen das Protein ganz oder teilweise denaturiert werden kann. Dazu zählen:

- das Einfrieren,
- die Primärtrocknung
- die Sekundärtrocknung (vgl. Kap. 2.2).

Beim Einfrieren kann es zur Gefrierkonzentration und dadurch zur pH-Wertverschiebung kommen. Proteine können an der Oberfläche von Eiskristallen, die sich während des Einfriervorgangs bilden, denaturieren. Die Stabilisierung im gefrorenen Zustand kann mit Hilfe der gleichen Hilfsstoffe erreicht werden, die für wässrige Lösungen verwendet werden, wie z.B. Zucker und Aminosäuren. Für jedes Protein muss allerdings die Schutzwirkung jedes einzelnen Hilfsstoffes nachgewiesen werden. Weiterhin kann es an der Eisoberfläche zwischen Eis und Gas

zu erheblicher Denaturierung und Aktivitätsverlust der Proteine kommen. Die Größe der Grenzfläche zwiesch Eis und Luft ist direkt proportional zu dem auftretenden Aktivitätsverlust [27].

Sowohl bei der Primär- als auch bei der Sekundärtrocknung wird dem Protein Wasser entzogen [11]. Es gibt zwei verschiedene Vorstellungen darüber, wie Proteine während des Trocknungsprozesses stabilisiert werden. Auf der einen Seite steht die „Glasbildungstheorie“, nach der die Proteine in einer Glasmatrix immobilisiert werden, wodurch die translatorischen Molekülbewegungen verhindert werden, was wiederum der Proteinentfaltung vorbeugt. Gleichzeitig wird durch eine räumliche Trennung der Proteinmoleküle durch ihre Verteilung in der Glasmatrix ihre Aggregation unterbunden [10]. Auf der anderen Seite gibt es die Theorie der Lyoprotektion [09]. Sie beruht auf der Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen dem Protein und dem Hilfsstoff. Durch die Entfernung der Wasserhülle während der Trocknung kann das Protein mit dem Hilfsstoff direkt wechselwirken. Voraussetzung dafür ist der amorphe Zustand von Protein und Hilfsstoff. Da beide Partner in der gleichen Phase vorliegen, kann der Hilfsstoff als „Wasserersatz“ dienen und so das Protein stabilisieren (Wasserersatztheorie engl. *water replacement theory*) [65].

Bei der Gefriertrocknung kann zur Stabilisierung der Proteinlösungen Albumin hinzugesetzt werden [28]. Der Mechanismus für dieses Phänomen ist nicht geklärt, es existieren jedoch zwei Hypothesen:

- ~ durch eine höhere Proteinmenge ist die Grenzfläche zwischen Lösung und Luft oder zwischen Lösung und Eis gesättigt. An ihr kommt es höchstwahrscheinlich zur Denaturierung. Die Proteine, die im Inneren der Lösung vorliegen, werden dadurch geschützt [15],
- ~ die durch höhere Proteinkonzentration erreichte Kryoprotektion beruht auf dem Mechanismus der *preferential exclusion* nach Tiamsheff, wobei sich die Proteine gegenseitig von der Oberfläche ausschließen und somit die Aggregation verhindert wird [27].

Bei der Rekonstitution (Lösen des Lyophilisates im geeigneten Lösungsmittel) wird entweder die native Form zurückgebildet oder die denaturierte Form bleibt erhalten.

Ziel der Gefriertrocknung ist eine Konservierung des nativen Proteins über den gesamten Trocknungsprozess und während der Rekonstitution.

Hilfsstoffe, durch die die native Konformation beim Einfrieren und im gefrorenen Zustand geschützt wird, bezeichnet man als Kryoprotektoren.

Stoffe die die Proteinstruktur beim Wasserentzug und während der Lagerung als Lyophilisat stabilisieren, werden als Lyoprotektoren bezeichnet. Eine eindeutige Zuordnung der Funktion (Lyoprotektor/Kryoprotektor) eines Hilfsstoffes ist in der fertigen Zubereitung oft nicht möglich, die Grenzen der Zuordnung sind fließend [27].

Kohlenhydrate wie Trehalose und Maltose stabilisieren z.B. Phosphofruktokinase bei der Gefriertrocknung, und bei IgG wurde Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin als bester Lyoprotektor gefunden. Allerdings wirken nicht alle Zucker als Lyoprotektoren. Für Biomoleküle fungieren außerdem Saccharose und Lactose als Lyoprotektor. Die amorphe Form der Hilfsstoffe wird bevorzugt, da sie die Proteine in der Glasmatrix immobilisieren kann (vgl. Kap.2.2.8). PEG ist nach Banga aufgrund seiner kristallinen Form ein guter Kryoprotektor [03].

### 2.1.2.3 Zusätze

#### **Tenside**

Tenside können die Löslichkeit hydrophober Proteine erhöhen und gleichzeitig deren Aggregation und Adsorption an Oberflächen verhindern [21]. Ein Zusatz von z.B. 0,01% Tween<sup>®</sup> 80 kann die Oberflächendenaturierung während des Einfrierens verringern. Überdies besitzen Tenside die Fähigkeit, die Proteine zu hydrophobisieren. Dieses Phänomen beschreibt Webb am Beispiel von Polysorbat 20 in einer Konzentration von 0,03% [95]. Dabei wechselwirken die polaren Gruppen des Tensides mit den polaren Gruppen des Proteins, während die hydrophoben Reste in die Lösung hinausragen. Dadurch wird die Lösungsgeschwindigkeit des Lyophilisates bei der Rekonstitution herabgesetzt, was wiederum eine geringere Menge an Aggregaten bei diesem Schritt erzeugt [27].

### **Puffersubstanzen**

Der Einsatz von Puffersalzen bei Proteinzubereitungen ist aus den nachfolgenden Gründen als kritisch zu bewerten, deshalb sollten sie nur sparsam eingesetzt werden. Sie werden hauptsächlich zur Isotonisierung und pH-Wert-Einstellung der Lösung verwendet.

In Puffern kann es während des Einfriervorgangs zur Ausfällung schwerlöslicher Salze und dadurch zur Verschiebung des pH-Wertes aufgrund der Gefrierkonzentration kommen. Jiang und Nail beschreiben in diesem Zusammenhang einen höheren Aktivitätsverlust für  $\beta$ -Galactosidase und Lactatdehydrogenase (LDH) beim Einfrieren im Phosphatpuffer gegenüber dem Einfrieren im TRIS- oder Citratpuffer [38]. Um diesen pH-Veränderungen vorzubeugen, soll die Lösung sehr schnell eingefroren werden (vgl. Kap. 2.2.4) oder die Pufferkonzentration so niedrig wie möglich gewählt werden [27].

### **Andere Hilfsstoffe**

Um eine gute Lyophilisierbarkeit und ein stabiles Endprodukt zu erreichen, kann der Proteinlösung eine Reihe von kompatiblen Hilfsstoffen hinzugesetzt werden. Bei der Auswahl des richtigen Hilfsstoffes ist zu bedenken, dass dieser mehrere Funktionen erfüllen kann (z.B. Gerüstbildner und Kryoprotektor), z.B. können Aminosäuren als Gerüstbildner und Stabilisatoren dienen und gleichzeitig die Löslichkeit von Proteinen erhöhen.

Komplexbildner verhindern die Autoxidation, indem sie die vorhandenen Metallionen binden [21].

Zucker, Aminosäuren, mehrwertige Alkohole, synthetische Polymere und Proteine besitzen eine sehr kleine kritische Kühlrate und liegen deswegen meist amorph vor. Die kritische Kühlrate ist die langsamste Abkühlrate, die gerade noch zur Kristallisation eines Stoffes führt. Wird sie überschritten, so kommt es zur Glasbildung [27].

### 2.1.3 Formulierung von Peptiden und Proteinen.

Für die Formulierung von Peptiden und Proteinen sollten nach Essig, Oschmann drei Faustregeln beachtet werden:

1. Hilfsstoffe, die amorph oder zumindest teilamorph erstarren, beeinflussen die Proteinstruktur positiv und sollten daher bevorzugt verwendet werden,
2. die Glasübergangstemperatur oder eutektische Temperatur des Lyophilisates ist für die Lagerungsstabilität der Zubereitung entscheidend und sollte möglichst weit oberhalb der Raumtemperatur liegen,
3. hohe Pufferkonzentrationen sollten vermieden werden, weil sie die Sekundär- und Tertiärstruktur von Proteinen aufgrund des Gefrierkonzentrations-Effektes gefährden [21].

#### **Kritische Schritte in der Proteinformulierung**

Peptide besitzen sind im Allgemeinen schlecht im Wasser löslich. Daher werden zur Löslichkeitsverbesserung Cosolventien wie Ethanol oder Benzylalkohol eingesetzt.

Die meisten Peptidlösungen sind im Gegensatz zu Proteinlösungen in wässriger Lösung stabil. Eine fertige Peptid-Lösung kann dann bei 2-8 °C (z.B. für Calcitonin, Desmopressin, Leuprolid) oder bei 15-25°C (z.B. für Oxytocin, Vasopressin) aufbewahrt werden.

Proteine sind aufgrund der Entfaltungsfahr bei allen Formulierungsschritten schwieriger zu handhaben als die Peptide. Ihre Aktivität ist an die komplexe Proteinstruktur und insbesondere die intakte Tertiär- und Quartärstruktur gekoppelt (vgl. Kap.2.1.1). Wird diese durch Entfaltung, Aggregation oder auch Dissoziation der Untereinheiten zerstört, verliert das Protein seine Funktion.

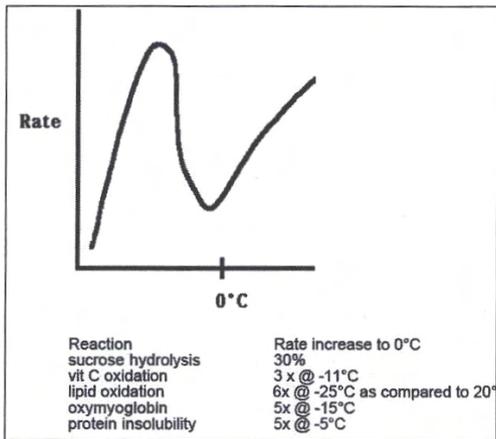
Manche Proteine sind in wässriger Lösung nur kurze Zeit stabil. Auch gefriergetrocknete Zubereitungen weisen eine begrenzte Haltbarkeit bei vorgegebener Temperatur auf, so ist z.B. das menschliche Wachstumshormon (engl. *human growth hormon*- HGH) bei 2-8°C 14 Tage und Interleukin-2 bei 2-25°C nur 48 h haltbar [46].

Bei der Herstellung von Proteinarzneimitteln sind folgende Prozessschritte besonders wichtig um Proteindenaturierung zu vermeiden. Proteinlösungen dürfen nicht stark geschüttelt werden, da es dadurch zur Aggregatbildung kommen kann und aufgrund der Schäumung eine große Oberfläche zwischen Wasser und Luft entsteht, was zu Proteinentfaltung führen kann. Bewährt hat sich bei diesem Schritt der Einsatz von Tensiden, die das Protein im Wasser solubilisieren und auf diese Weise zu einer schonenden Löslichkeit der Substanz bei geringeren Scherkräften beitragen. Da bei falscher Pumpen- und Leitungswahl zu hohe Scherkräfte auftreten können, ist dies vor ihrem Einsatz zu berücksichtigen.

Proteinlösungen dürfen nur begrenzt erwärmt werden. Temperaturen von mehr als 50°C können zur Entfaltung und Denaturierung der Proteine führen. Eine kurzzeitige Erwärmung der Lösung auf 60-70 °C ist jedoch oft gut verträglich wie das bei der Sprühtrocknung von Proteinen der Fall ist [03].

Wie zuvor im Kapitel 2.1.2.2 erwähnt, ist das Einfrieren ein weiterer kritischer Schritt bei der Proteingefriertrocknung. Hierbei kann es zur Kältedenaturierung der Proteine und Gefrierkonzentrierung in der Lösung kommen. Bei der Gefrierkonzentrierung kommt es zu Salzausfällung und dadurch zur pH-Verschiebung. Aufgrund der Konzentrationserhöhung der Lösungsbestandteile können chemische und physikalische Prozesse beschleunigt ablaufen (vgl. Abbildung 2-6).

Die Abbildung 2-6 gibt einige Beispiele beschleunigter Reaktionen. Bei -11°C verläuft die Oxidation von Vitamin C dreimal schneller als bei 0°C, bei -25°C erfolgt die Fettoxidation sechs Mal schneller als bei 20°C. Die Reaktionsgeschwindigkeit (im Diagramm *rate*) steigt im Niedrigtemperaturbereich durch Konzentrationserhöhung der Bestandteile steil an, erreicht ihr Maximum sobald die Lösung durchgefroren ist und fällt steil ab, um bei 0°C das Minimum zu erreichen.



Geoffrey Lee, Erlangen; Seminar Gefriertrocknung in der Praxis, März 2006

Abbildung 2-6: Beispiele beschleunigter Reaktionen [46]

Die Führung des Gefriertrocknungsprozesses hat einen entscheidenden Einfluss auf die Proteinaktivität.

So beeinflusst die Einfriergeschwindigkeit die Kristallstruktur und den Gefrierkonzentrationseffekt. Nach Jiang und Nail ist eine mittlere Gefriergeschwindigkeit mit längeren Temperaturlausgleichszeiten und einer geringfügigen Unterkühlung, die zu einer gleichmäßigen Kristallisation führt, für Proteinlösungen am günstigsten [38], während langsames Einfrieren ausgeprägte Gefrierkonzentrationen mit pH-Wert Verschiebung und Salzkonzentrierung auslöst. Schnelles Einfrieren kann dagegen eine unvollständige Kristallisation von gelösten Stoffen zur Folge haben, was sich in relativ großen Mengen von eingeschlossenem unterkühltem Wasser (engl. *non frozen water*) äußert (vgl. Kap. 2.2.) [21].

Amorph erstarrende Substanzen sollten möglichst schnell unter ihre Glasübergangstemperatur gekühlt werden (vgl. Kap. 2.2.8). Wird eine solche Lösung zu lange im „gummi-artigen“ Zustand gehalten, ein Zustand zwischen Lösung und amorphem Glas, so kann es trotz einer hohen Viskosität und niedriger Temperatur der Lösung zur Aufkonzentrierung der Reaktionspartner und pH-Verschiebung kommen, wodurch das Protein geschädigt wird [21]. Bei der Bildung von amorphen Gläsern sollte beachtet werden, dass Stoffe, die zur Übersättigung neigen, wie Saccharose, Trehalose und Sorbitol, viel unausfrierbares Wasser (engl. *non frozen water*) enthalten. Dieses Wasser ist schwer zu entfernen, wo-

durch sich die Sekundärtrocknungsperiode verlängert und das *meltback* Risiko zunimmt.

Auch der Entzug von Wasser ist in der Regel für die Erhaltung einer intakten Proteinstruktur kritisch. Die native Struktur eines Proteins bedarf einer „Hülle“ aus Wassermolekülen. Diese liefern die stabilisierenden Wasserstoffbrücken mit den Aminosäureresten des Proteins. Wird das Wasser entfernt, so kommt es zu Veränderungen der höheren Proteinstrukturen, wie der Sekundärstruktur. Durch Entfaltung geht die native Form verloren. Dieser Verlust kann je nach Art des Proteins reversibel oder irreversibel sein [46].

Bei Peptiden und Proteinen sind die therapeutischen Dosen klein. Der Zusatz der Gerüstbildner sorgt für ein optisch akzeptables Lyophilisat und für eine ausreichende Porosität. Je poröser der Lyophilisatkuchen ist, desto leichter rekonstituierbar ist er.

## 2.2 Gefriertrocknung

### Allgemeine Definition

Gefriertrocknung ist ein Prozess, bei dem dem zu trocknenden Material auf eine schonende Weise im Niedrigtemperaturbereich Wasser entzogen wird. Dabei wird dieses Material zuerst eingefroren und das vorhandene Lösungsmittel bzw. die darin enthaltene Flüssigkeit durch Sublimation aus der festen Phase (Eis) entfernt. Im Prozess der Sublimation wird das Lösungsmittel auf direktem Weg - meist unter verringertem Druck (Vakuum) - aus der festen in die gasförmige Phase überführt.

Bei der Gefriertrocknung unterscheidet man drei Prozessphasen:

- ~ Einfrieren des Produktes (vgl. Kap.2.2.4)
- ~ Primärtrocknung (vgl. Kap.2.2.5)
- ~ Sekundärtrocknung (vgl. Kap. 2.2.6)

Der Restfeuchtegehalt des Endproduktes sollte keine chemischen Reaktionen und kein biologisches Wachstum unterstützen. Die so hergestellten, meist hochporösen und leicht wasserlöslichen Produkte werden als Lyophilisate bezeichnet.

## 2.2.1 Gefriertrocknungsprozess

### Aufbau eines konventionellen Gefriertrockners.

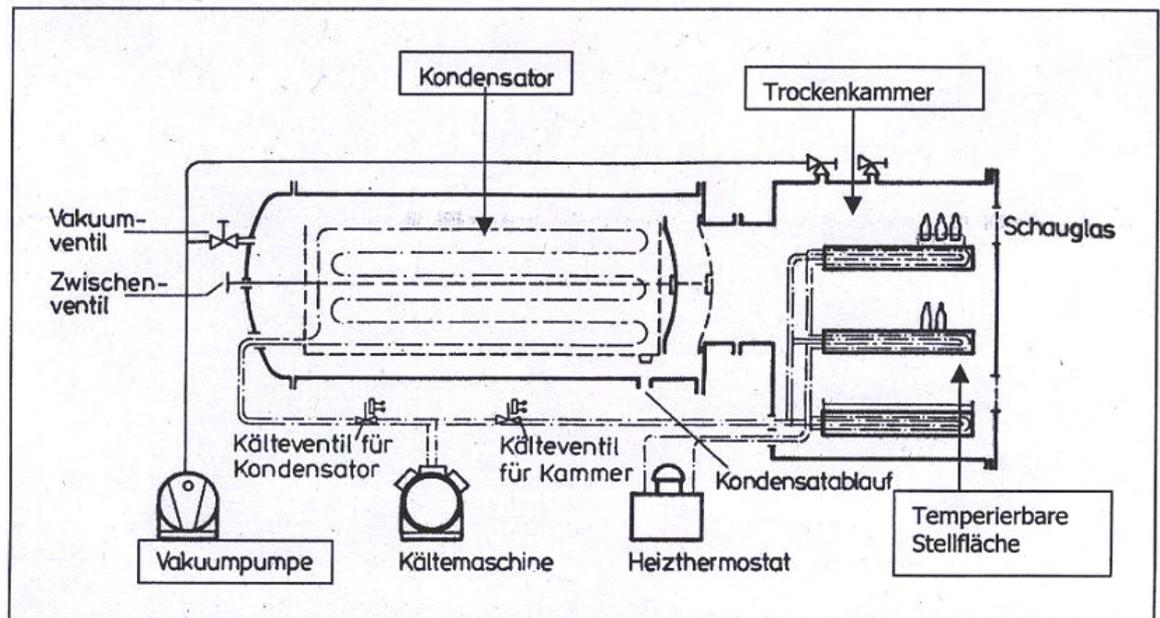


Abbildung 2-7: Aufbau und Komponenten einer Gefriertrocknungsanlage [47].

Eine konventionelle Gefriertrocknungsanlage besteht aus einer Trockenkammer, die evakuiert werden kann. Hier findet das Einfrieren und die Gefriertrocknung statt. In diesem Raum befinden sich Stellflächen, die gekühlt und beheizt werden können. Diese ermöglichen das Einfrieren des Produktes und sein Beheizen im Verlauf der Trocknung, um dem Produkt verbrauchte Sublimationsenergie wieder zuzuführen.

Die Trockenkammer ist durch ein Ventil mit der Kondensatorkammer verbunden. Der Kondensator wird mit einem Kältemittel auf eine niedrige Temperatur zwischen  $-60^{\circ}\text{C}$  bis  $-80^{\circ}\text{C}$  heruntergekühlt und dient als Kältefalle für den sublimierten Wasserdampf. Er schlägt sich aufgrund des niedrigeren Dampfdruckes am Kondensator ab.

Ein Hauptbestandteil der Gefriertrocknungsanlage ist die Vakuumpumpe. Sie entfernt die Luft aus dem System und erleichtert dadurch die Sublimation und Diffusion des Wasserdampfes.

Nach Beendigung des Trocknungsprozesses wird die Trockenkammer mittels eines Belüftungsventils auf Normaldruck gebracht. Wenn das Produkt es erfordert, können die Gefäße noch im Vakuum oder durch Einleitung eines Inertgases unter Schutzgasatmosphäre verschlossen werden.

In der Industrie werden die Gefriertrocknungsprodukte üblicherweise in Vials mit einem Volumen von 10 ml bzw. 20 ml oder in Fertigspritzen verarbeitet. Die Fertigspritzen bestehen in der Regel aus zwei Kammern, in denen das Lyophilisat und das Lösungsmittel getrennt vorliegen [74].

Bei sterilen Zubereitungen kann die Anlage nach abgeschlossenem Trocknungszyklus mittels gespanntem Wasserdampf oder Wasserstoffperoxid von Keimen befreit werden.

### 2.2.2 Einsatzgebiete der Gefriertrocknung

Es gibt sehr vielfältige Einsatzmöglichkeiten für die Lyophilisation:

- Herstellung von parenteralen Pulvern (in Ampullen, Fläschchen, Fertigspritzen) in der Arzneimittelindustrie. Als Beispiele seien genannt: Lebendimpfstoffe von Bakterien oder Viren, Eiweiß und Hormonpräparate zur intramuskulären Injektion (Polyestradiolphosphat in Estradurin® [80]) [57];
- Proteine und Biotechnologische Produkte [64]
- In vivo und in vitro Diagnostika [55]
- Biologische Materialien wie Blut, Blutplasma, Haut, Ei- und Samenzellen, Bakterienstämme [55]
- Pflanzliche Zubereitungen (Teepulver) und Enzyme (Pankreatin)
- Nahrungsmittel: z.B. Gewürze, Kaffee, Säfte, Säuglingsmilch, Fertigsuppen
- Holz, Leder oder Papier beim Restaurieren und Konservieren historischer Objekte.

### 2.2.3 Vor- und Nachteile der Gefriertrocknung

Bei der Trocknung eines Materials mit dieser Methode kommt es in der Regel zu einer geringfügigen strukturellen Veränderung des Gutes.

Thermolabile Stoffe können schonend getrocknet werden, bei biologischen Materialien bleibt die Aktivität weitgehend erhalten, unter Umständen kann es zu Verlusten der aktiven Komponente kommen [29]. Die Lyophilisate weisen eine poröse Kuchenstruktur mit einer großen Oberfläche auf und können dadurch schnell und vollständig rehydratisiert werden. Dieser Prozess ist für die Herstellung steriler Produkte geeignet. Er ermöglicht eine aseptische Verarbeitung im Endbehältnis.

Lyophilisate sind sehr feuchtigkeitsempfindlich, wodurch es zur Verklumpung kommen kann. Ihre hochporöse Oberfläche begünstigt auch oxidative Prozesse, die zu Abbaureaktionen im Produkt führen können.

Der Gefriertrocknungsprozess verursacht einen erheblichen apparativen Aufwand und dadurch hohe Kosten. Lange Prozesszeiten (bis zu mehreren Tagen) und ein hoher Energieeinsatz (für die Aufrechterhaltung des Vakuums, Kühlung der Kondensatorfläche, Heizung der Stellfläche) verteuern den Prozess.

## 2.2.4 Einfrieren

Die Ausgangslösung wird beim Einfrieren bei Atmosphärendruck vom flüssigen in den festen Aggregatzustand überführt. Meist geschieht es durch Absenken der Stellflächentemperatur mit einem kalten Fluid z.B. Silikonöl, Kohlenwasserstoffen (z.B. Propan) oder durch Einleiten einer kalten Luft in die Trocknungskammer [98]. Beim Einfrieren von Vials auf Stellflächen beträgt die Abkühlgeschwindigkeit typischerweise zwischen 0,3 °C/Min und 5 °C/Min.

Die Einfriergeschwindigkeit entscheidet über die spätere Beschaffenheit des Lyophilisates. Sie hat Einfluss auf seine Porosität, die durch Kristallgröße und Kristallform verändert werden kann. Die beiden letztgenannten können durch die Einfrierbedingungen gesteuert werden:

- Langsames Abkühlen führt zu einer deutlichen Unterkühlung der Lösung, anschließend setzt eine spontane Kristallbildung ein und das Produkt friert durch – dabei bilden sich sehr kleine Kristalle [76].
- Hohe Abkühlraten bedingen eine ungleichmäßige Unterkühlung und eine rasche Kristallisation -auch hier entstehen viele kleine Kristalle, die eine unregelmäßige und heterogene Struktur zeigen [55] oder es entstehen amorphe, glasartige Bereiche. Die Gefrierkonzentration wird unterdrückt.
- Mittlere Abkühlraten lassen homogene Eisstrukturen mit großen hexagonalen Kristallen entstehen [76].

Auch die Nukleationstemperatur, die von der Zusammensetzung der Lösung abhängt, beeinflusst die Größe der Kristalle – je höher sie ist, desto größer werden die Kristalle [26].

Kleine Kristalle im Gefriertrockengut führen zu sehr feinporigen Lyophilisatkuchen. Die Sublimationsrate ist zu Beginn der Trocknung hoch und wird im weiteren Verlauf aufgrund des großen Produktwiderstandes niedriger. Dadurch entstehen einerseits lange Prozesszeiten, andererseits hat ein feinporiges Lyophilisat eine große innere Oberfläche und kann dadurch schneller gelöst werden [47].

Durch das so genannte Tempern (engl. *annealing*, Erklärung s. nächster Absatz) können zunächst kleine Kristalle durch vorübergehende Erwärmung vergrößert

werden. Während der Trocknung entsteht dadurch ein großporiges Lyophilisat mit einem geringen Produktwiderstand, was zur Verkürzung der Prozesszeiten führen kann [76].

Das Tempern ist eine Art des Einfrierens, das darauf abzielt, eine möglichst homogene Größenverteilung der Eiskristalle im gefrorenen Produkt zu erreichen. Das wird durch Einhaltung folgender Bedingungen erreicht:

- die Temperatur der Lösung wird so weit abgesenkt, dass sie noch nicht einfriert ( $-5^{\circ}\text{C}$  bis  $-10^{\circ}\text{C}$ ) und diese wird ca. 30 Min. konstant gehalten.
- anschließend wird rasch auf  $-40^{\circ}\text{C}$  abgekühlt und das Produkt und die Stellfläche equilibriert.
- durch die Erhöhung der Stellflächentemperatur auf ca.  $10-20^{\circ}\text{C}$  oberhalb von  $T_g'$  oder  $T_c$  (vgl. Kap. 2.2.8) über mehrere Stunden, wird die Bildung einheitlich großer Kristalle gefördert [26].

Da die Einfriergeschwindigkeit einen erheblichen Einfluss auf die Qualität des Endproduktes hat, muss für jedes Produkt sowohl die optimale Einfriertemperatur als auch die günstigste Einfriergeschwindigkeit ermittelt werden [06]. Ferner ist es wichtig, dass das zu trocknende Gut vollständig durchgefroren ist, da es sonst beim Evakuieren zu einer Schaumbildung aus den Flüssigkeitsnestern kommen kann. Dieses „Schäumen“ wird auch als *frothing* bezeichnet. Dieses Phänomen tritt ebenfalls beim Antauen (engl. *meltback*) des Gutes während der Gefriertrocknung auf [37].

### 2.2.4.1 Eigenschaften von Lösungen beim Einfrieren

Wasser und Lösungen kristallisieren nicht spontan am Gefrierpunkt, sondern neigen zur Unterkühlung. Reines Wasser lässt sich z.B. im flüssigen Zustand bis  $-40^{\circ}\text{C}$  unterkühlen [76]. Das Ausmaß der Unterkühlung beeinflusst die Morphologie des Produktes, die Eiskristallverteilung, die Produktmatrix und damit später das Rekonstitutionsverhalten des Lyophilisates [57].

Bei der Kristallkeimbildung unterscheidet man zwei Nucleationsarten: homogene und heterogene Keimbildung.

Die homogene Nukleation findet im reinen Wasser statt. Durch den polaren Molekülaufbau bilden Wassermoleküle so genannte Molekülcluster. Diese können je nach herrschender Temperatur als Kristallisationskeime dienen. Mit sinkender Temperatur nimmt die Lebensdauer der Cluster zu, und damit steigt ihre Fähigkeit zur Nukleation [76].

Heterogene Nukleation tritt in wässrigen Lösungen auf, in denen die dispergierten Teilchen die Keimbildung erleichtern. Diese Art der Nukleation ist energetisch günstiger.

Lösungen, die gut kristallisierende Stoffe enthalten, wie z.B. NaCl, Mannitol oder Saccharose (bis zu einer Konzentration von 50%) [21], zeigen eutektisches Einfrierverhalten. Der eutektische Punkt gibt das Mischungsverhältnis der Komponenten an, bei dem die tiefste Temperatur für das thermodynamische Gleichgewicht zwischen der festen und flüssigen Form erreicht wird [64], [57]. Unterhalb des eutektischen Punktes (EP) liegt ein Kristallgemisch aus Eis und Salz vor.

In Lösungen mit gut kristallisierenden Stoffen kommt es zu einer so genannten Gefrierkonzentration. Dabei scheiden sich in verdünnten Lösungen beim Einfrieren zuerst Eiskristalle ab und die Konzentration der vorhandenen Ionen steigt. Je verdünnter die Lösung, umso größer ist der Konzentrierungsfaktor. Wird die Temperatur weiter abgesenkt, kristallisieren Salzkristalle der in dieser Lösung anwesenden Ionen aus. In hochkonzentrierten Lösungen kommt es bei niedrigen Temperaturen zuerst zur Abscheidung der Substanzkristalle. Als relevantes praktisches Beispiel soll an dieser Stelle die unterschiedliche Löslichkeit von Puffer-

salzen genannt werden. Wird ein Puffersystem aus Zitronensäure und Dinatriumphosphat abgekühlt, so kristallisiert zuerst das Natriumphosphatsalz aus. Dadurch kommt es in diesem Fall zu einer pH-Abfall von pH 6 auf ca. pH 3,5. Dieser bereitet Probleme bei Substanzen, die nur bei bestimmten pH-Werten stabil sind, wie z.B. Benzylpenicillin, bei dem es bei niedrigeren pH-Werten zu einer Zersetzung kommt [64] oder Proteine, die bei niedrigen pH-Werten agglomerieren oder denaturieren [17].

Um gewährleisten zu können, dass die gesamte Flüssigkeit eingefroren ist, sollte die Endtemperatur beim Einfrieren ca. 20°C unter der eutektischen Temperatur liegen.

In Lösungen mit vielen Komponenten kristallisieren die gelösten Stoffe häufig nicht aus. Es kommt zu einer Übersättigung der Lösung. So kann sich eine viskose Lösung oder Suspension bilden, in der Diffusionsvorgänge, die für die Kristallisation nötig sind, fast zum Erliegen kommen. Wird diese Lösung weiter abgekühlt und die Temperatur des Glasübergangs erreicht, sinkt die Kristallisationsgeschwindigkeit so weit ab, dass unterkühltes Wasser nicht in der für Eis typischen Kristallstruktur, sondern in amorpher Form vorliegt [28]. Es entsteht eine kinetisch erstarrte, unterkühlte Flüssigkeit ohne vollständige Phasentrennung.

Lösungen, die zu Übersättigung neigen, z.B. Zucker, Polymere oder Proteine zeigen kein eutektisches Einfrierverhalten. Sie erstarren bei raschem Einfrieren zu einem Festkörper und bilden ein isotropes Glas. Die Temperatur, bei der der Übergang in den festen Zustand erfolgt heißt Glasübergangstemperatur ( $T_g$ ). Unterhalb dieser Temperatur frieren die translatorischen Molekülbewegungen ein. Die Diffusion kommt zum Erliegen und die Viskosität steigt auf über  $10^{14}$  Pas [43]. Dadurch wird die Kristallisation verhindert. Das entstehende Glas stellt einen Festkörper mit der Struktur einer Flüssigkeit und dem Energiegehalt einer Lösung dar. Die enthaltenen Moleküle sind statistisch verteilt. Die Eigenschaften solcher Hilfsstofflösungen eignen sich hervorragend für die Lyophilisation von Proteinen und Enzymen, da es durch die Erstarrung in einem Glas zu einer fast vollständigen Immobilisierung dieser Substanzen kommt und dadurch deren Agglomeration und Denaturierung verhindert werden kann. Ca. 1-5°C oberhalb der Glasübergangstemperatur liegt die Kollapstemperatur ( $T_c$ ) der erstarrten Lösung. Diese

darf beim Prozess der Gefriertrocknung nicht erreicht werden, da sonst die Glasmatrix in einen gummisartigen Zustand übergeht und kollabiert (vgl. auch Kap. 2.2.8).

#### 2.2.4.2 Einfriermethoden

- I. Die häufigste Methode, die in den Labor-, Pilot- und Produktionsanlagen angewandt wird, ist das *statische Einfrieren*. Dabei werden befüllte Ampullen, Flaschen oder Schalen auf gekühlten Stellflächen eingefroren. Diese werden von einem kalten Fluid wie z.B. Silikonöl durchströmt und können auf Temperaturen bis  $-60^{\circ}\text{C}$  abgekühlt werden. Soll das Produkt schnell eingefroren werden, können bereits vorgekühlte Stellflächen mit den Gefäßen beladen werden. Modifikationen der Einfriergeschwindigkeiten sind möglich. Durch das Variieren der Stellflächentemperatur kommt es zu Abkühlgeschwindigkeiten zwischen  $0,3\text{-}5^{\circ}\text{C}/\text{Min}$  [57]. In modernen Anlagen werden Prozesssteuerungsprogramme für die Einstellung reproduzierbarer Temperaturverläufe eingesetzt. Die Abkühlgeschwindigkeit ist bei dieser Einfriermethode stark von der Schichtdicke der Lösung abhängig: je höher diese ist, umso langsamer friert das Produkt durch und umso länger dauert der Prozess.
- II. Weiterhin besteht für schnelllösliche orale Arzneimittel (Bsp. Zofran<sup>®</sup>, Zydis<sup>®</sup>) die Möglichkeit eines *kontinuierlichen Einfrierens* der Lösung direkt in der Blisterverpackung. Dazu durchlaufen die mit Arzneistoffsuspension gefüllten Blister einen Gefriertunnel, der mit flüssigem Stickstoff, der sofort verdampft und so eine Kaltgasatmosphäre erzeugt, abgekühlt wird. Die Suspension ist nach ca. 4 Minuten durchgefroren [50].
- III. Um die Schichtdicke der einzufrierenden Lösung zu reduzieren und den Kontakt mit dem Wärmetauscher zu verbessern, kann das *Rotations- oder Zentrifugalgefrieren* eingesetzt werden. Dazu wird die Flasche mit dem Produkt in einem gekühlten Bad schnell gedreht (engl. *spin-freezing*) oder langsam rotiert (engl. *shell-freezing*). Abbildung 2-8 zeigt eine schematische Darstellung dieser beiden Verfahren. Um einen genügend tiefen Gefrierpunkt der Badflüssigkeit zu erreichen, wird häufig eine Mischung aus Ethanol (Smp.  $-114^{\circ}\text{C}$ ) und  $\text{CO}_2$  (Sdp. bei 1 atm ca.  $-80^{\circ}\text{C}$ ) verwendet. Das

Bad kann auch über Kühlschlangen oder Kältemaschinen gekühlt werden [57].

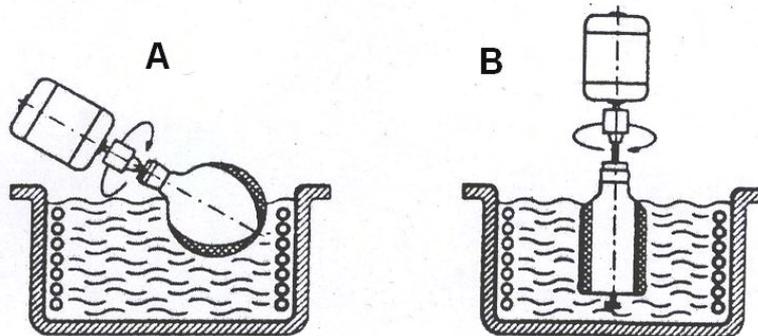


Abbildung 2-8: Einfriermethoden. Links: *Shell-freezing* (A): ein Kolben wird unter einem Winkel so in das Kühlbad getaucht, dass er bis zu seinem Hals von Kühlflüssigkeit bedeckt ist. Ein Motor dreht den Kolben, so dass das Produkt an der Kolbenwand anfriert. Rechts: *Spin-freezing* (B): eine oder mehrere Flaschen werden an einer Vorrichtung befestigt und in das Kühlbad eingetaucht. Die Vorrichtung dreht die Flaschen so schnell um ihre Achse, dass die Flüssigkeit sich gleichmäßig auf den zylindrischen Teil der Flaschen verteilt [57].

IV. Soll die Flüssigkeit sehr schnell eingefroren werden, so besteht die Möglichkeit sie *im flüssigen Stickstoff ( $LN_2$ ) einzufrieren*. Dazu werden die Flaschen mit eingefülltem Produkt in  $LN_2$  getaucht. Das Produkt kann auch in vorgekühlte Flaschen eingefüllt werden und anschließend in  $LN_2$  getaucht werden. Durch eine solche Behandlung werden Einfriereschwindigkeiten bis zu  $100^\circ C/Min$  erreicht. Die Gefrierkonzentration und Entmischung im Produkt werden weitgehend umgangen, allerdings entstehen bei dieser Art des Einfrierens sehr kleine Kristalle, die den Trocknungsprozess verlangsamen. Um das zu vermeiden, kann das Produkt anschließend auf Stellflächen bei ca.  $-40^\circ C$  getempert werden, um so Eiskristallwachstum hervorzurufen. Das Eiskristallwachstum ist von den Produkteigenschaften und der angewandten Temperatur abhängig – es kann im Gefriermikroskop beobachtet und durch Einstellen der erforderlichen Temperatur optimiert werden [57].

- a. Eine weitere Art des *Einfrierens im flüssigen Stickstoff* besteht darin, dass die Flüssigkeit in den flüssigen Stickstoff eingetropft wird. Dabei entsteht um den Tropfen eine Gasschicht, die sein Abkühlen und Einfrieren erschwert. Eine weitere Schwierigkeit des Verfahrens besteht

darin, gleichmäßige Tropfengröße zu erreichen. Dieses Verfahren eignet sich zur Herstellung von Pellets für die Gefriertrocknung [57].

- V. Craig et al. beschreiben in ihrem Patent [14] eine Methode zum *ultraschnellen Einfrieren von Proteinen, Peptiden und anderen Makromolekülen ohne Zusatz von Kryoprotektoren*. Bei dieser Methode wird die fein zerstäubte Flüssigkeit durch einen direkten Kontakt mit dem Kühlmittel in die gefrorene Phase übergeführt. Als Kühlmittel können komprimiertes Helium, Argon, Neon, Krypton, Stickstoff und Sauerstoff, als organische Substanzen Ethanol, Methanol, Propan und Freon verwendet werden. Durch unterschiedliche Zusammensetzung der Komponenten erreicht man die gewünschte Temperatur für die Kühlmischung. Diese Apparatur (s. Abbildung 2-9) zum ultraschnellen Einfrieren umfasst einen Vernebler (15), durch den die einzufrierende Flüssigkeit in einen mit Argon gefüllten Behälter (17), eingesprüht wird. Dieser Behälter befindet sich in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Container (19). Der flüssige Stickstoff friert das Argon-Gas im Behälter 17 an den Wänden ein. Auf diese gefrorene Argon-Schicht trifft die versprühte Flüssigkeit und gefriert. Die gefrorenen Partikel sammeln sich auf dem Boden des Argonbehälters. Dort können sie aufbewahrt werden oder durch Entfernen des Argons gesammelt und weiterverarbeitet werden [14].

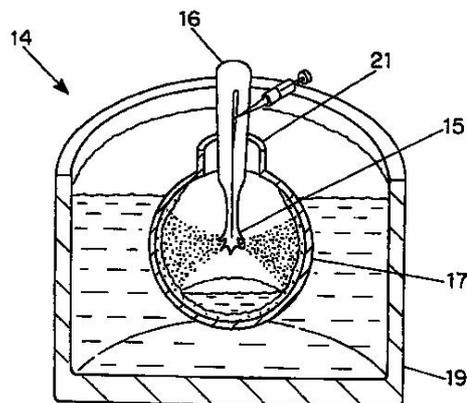


Abbildung 2-9: Aufbau der Apparatur zum Ultraschnellen Einfrieren von versprühten Flüssigkeiten nach Craig et al. [14]

VI. Hurwitz et al. [32] patentierten eine *Methode zum Einfrieren von zwei reaktiven, miteinander nicht kompatiblen Flüssigkeiten*. Dabei werden die zwei Flüssigkeitschargen, getrennt voneinander, auf entgegengesetzten Vialinnenflächen eingefroren (s. Abbildung 2-10). Die Flüssigkeiten werden zuerst auf eine Temperatur oberhalb ihres Gefrierpunktes heruntergekühlt und anschließend mittels zwei Pipetten (22 und 23) auf die entgegengesetzten Vialinnenwände (24 und 25) aufgebracht. Das Vial, befestigt in einer Halterung, wird in ein Bad aus flüssigem Stickstoff (12) getaucht und die Flüssigkeiten auf diese Weise vollständig durchgefroren (vgl. Abbildung 2-10).

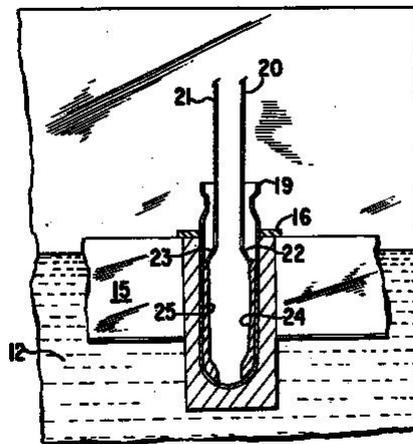


Abbildung 2-10: Aufbau der Apparatur zum getrennten Einfrieren von Multikomponentensystemen nach Hurwitz et al. [32]

VII. Der Vollständigkeit halber soll an dieser Stelle noch das *snap freezing* – das *vakuuminduzierte Einfrieren* erwähnt werden. Dieses Verfahren eignet sich besonders gut für sehr geringe Flüssigkeitsmengen und dünne Schichten [37]. Bei diesem Verfahren wird durch das Evakuieren der Trockenkammer ein Anteil des Lösungsmittels verdampft und so die notwendige Wärmeabgabe erreicht, die zum Durchfrieren des Produktes erforderlich ist [50].

Je nach Art der zu gefrierenden Lösung und dem späteren Verwendungszweck muss eine geeignete Einfrieremethode ausgewählt werden.

## 2.2.5 Primärtrocknung

Die Primärtrocknung wird auch als Haupttrocknung bezeichnet. Es ist der längste Schritt im Prozess der Gefriertrocknung. In dieser Phase wird das Eis aus dem Produkt durch Sublimation entfernt -also aus dem gefrorenen, festen Zustand in den gasförmigen Zustand überführt. Bei der Sublimation wird dem Produkt Energie entzogen. Die Energiemenge, die gebraucht wird, um das Eis in die Gasphase zu überführen, beträgt ca. 2800 kJ/kg [57]. Diese muss, um den Prozess am Fließen zu erhalten, dem Produkt stets zugeführt werden

Wie man dem Phasendiagramm des Wassers (Abbildung 2-11) entnehmen kann, findet Sublimation erst unterhalb des Tripelpunktes statt. Dieser befindet sich bei einem Druck von 6,13 mbar und der Temperatur  $T = 0,0098^\circ\text{C}$ .

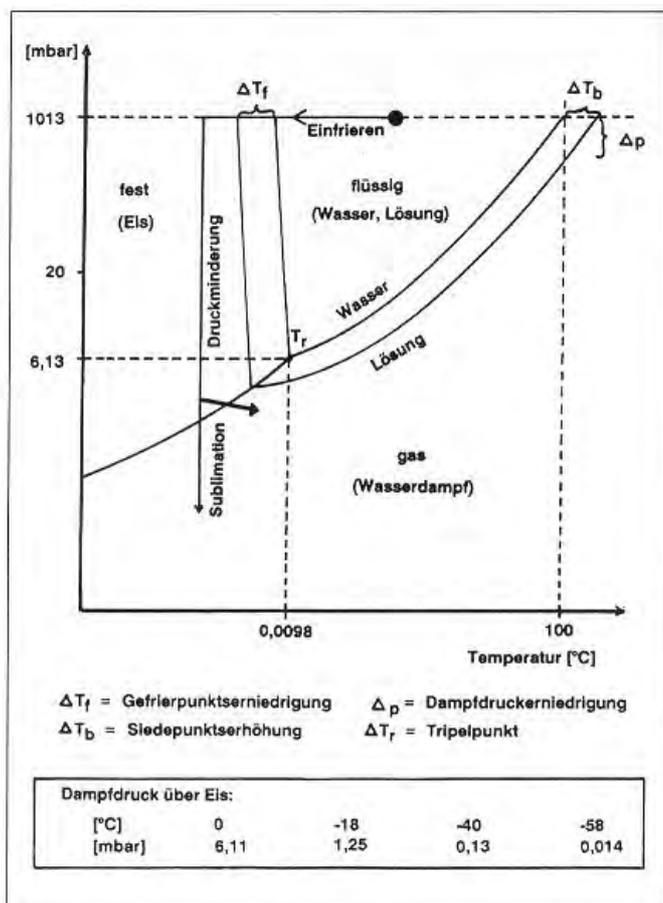


Abbildung 2-11: Zustandsdiagramm des Wassers und einer wässrigen Lösung incl. der Prozessschritte bei der Gefriertrocknung [76]

Die im Prozess der Sublimation verbrauchte Energie  $\Delta H_s$  wird dem Produkt über die Stellfläche in Form von Wärmeenergie  $dQ$  zugeführt.

Die verbrauchte Energie kann dem Produkt in drei verschiedenen Formen zugeführt werden (s. Abbildung 2-12):

- ~ durch Strahlung erwärmter Flächen
- ~ durch Wärmeleitung von Festkörpern und Gasen
- ~ durch Konvektion der vorhandenen Gase.

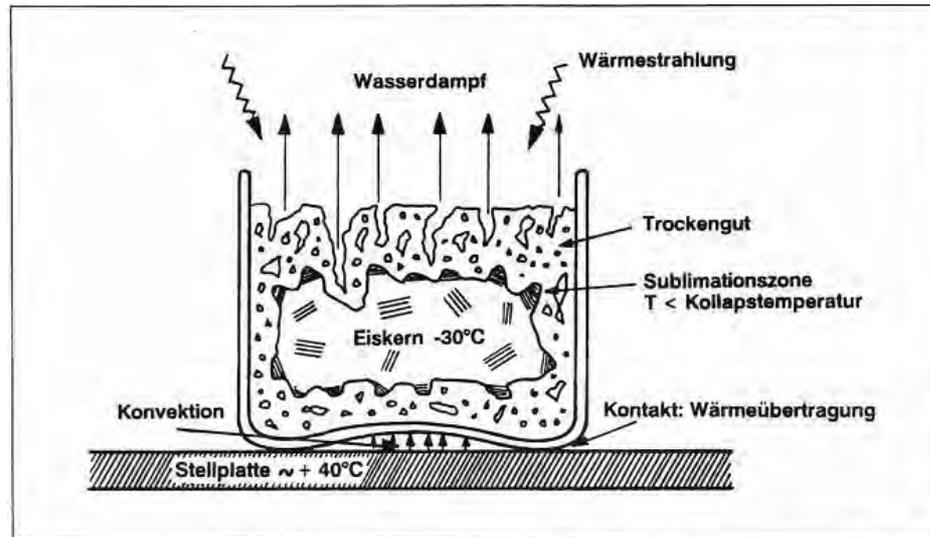


Abbildung 2-12: Wärmeübertragung und Wasserdampf-Transport im Verlauf der Sublimation [76].

Nach Pikal bildet sich ein „pseudo steady state“ zwischen verbrauchter und zugeführter Energie, bei dem die Trocknungsgeschwindigkeit und der Energiebedarf mit der Zeit abnehmen (s. Gl. 2-1) [65]. Der Quotient  $dm/dt$  gibt die Sublimationsgeschwindigkeit (*Masse/Zeit*) wieder.

$$\frac{dQ}{dt} = \Delta H_s \times \left( \frac{dm}{dt} \right) \quad \text{Gl. 2-1}$$

Die treibende Kraft für den Sublimationsprozess ist die Differenz zwischen dem Dampfdruck des Eises  $p_o$  und dem Wasserdampfpartialdruck  $p_c$  in der Trocknungskammer, wie aus Gl. 2-2 ersichtlich:

$$\frac{dm}{dt} = \frac{(p_o - p_c)}{(R_p + R_s)} \quad \text{Gl. 2-2}$$

Danach ist die Sublimationsgeschwindigkeit  $dm/dt$  direkt proportional den Dampfdruckdifferenzen  $(p_o - p_c)$  und umgekehrt proportional der Summe aus dem Pro-

duktwiderstand  $R_p$  und dem Widerstand der vom Gefäßstopfen  $R_s$  ausgeht [65]. Der Gefäßstopfen wird bei industrieller Herstellung locker auf die befüllten Vials aufgesetzt. Er schützt das Produkt vor einer Kontamination während des Transports in die Trocknungskammer. Der Spalt zwischen dem Stopfen und dem Vial gewährleistet den Gasaustausch zwischen dem Vialinneren und der Trocknungskammer.

Nach Clausius Clapeyron steigt der Dampfdruck exponentiell mit steigender Temperatur. Daraus folgt, dass die Sublimationsgeschwindigkeit bei höheren Trocknungstemperaturen höher wird und sich dadurch die Trocknungszeit verkürzt.

Der Produktwiderstand  $R_p$  beträgt durchschnittlich >80% des Gesamtwiderstandes und ist von mehreren Faktoren abhängig:

- Größe der vorhandenen Kristalle
- Schichtdicke des Produktes
- Konzentration der Lösung
- Produktoberfläche = Sublimationsfläche.

Die Sublimation verläuft umso langsamer, je kleiner die vorhandenen Kristalle und die Produktoberfläche, je dicker die Produktschicht (Eisschicht) und je höher die Konzentration der Lösung ist.

Die Energieübertragung ist abhängig von:

- dem Kammerdruck
- der verwendeten Energiequelle
- der Art des Gefäßes, entscheidend sind seine Form und das Material, aus dem es besteht. Häufig werden Glasvials auf beheizbaren Stellflächen eingesetzt.

Der Kammerdruck spielt für die Wärmeübertragung während der Trocknung eine wichtige Rolle. Er beeinflusst die Sublimationsrate. Wird der Kammerdruck unterhalb 0,1 mbar gesenkt, so sinkt die Sublimationsrate aufgrund der immer geringer werdenden Menge der vorhandenen Gasmoleküle stark ab. Dadurch wird die Wärmeübertragung mittels Konvektion in den meisten Prozessen vernachlässigbar klein und im Bereich unter 0,01 mbar kommt sie zum Erliegen [76]. Bei diesem Druck erfolgt die Wärmeübertragung durch Wärmestrahlung.

Die Wärmeübertragung kann durch Konvektion zwischen dem Vial und seiner Umgebung sowie durch Wärmestrahlung als auch Wärmeleitung durch den direkten Kontakt zwischen Stellfläche und Vialboden stattfinden (s. Abbildung 2-12) [64]. Aufgrund der konkaven Form des Vialbodens wird der Wärmeleitung ein geringerer Effekt als der Konvektion und Wärmestrahlung beigemessen. Durch diese Form entsteht ein Gaspolster zwischen der Stellfläche und dem Vialboden, was zu einem konvektiven Wärmetransport führt.

Brülls und Rasmuson stellten in einem theoretischen Modell für die Gefriertrocknung in Vials den Zusammenhang zwischen der Wärmestrahlung und verschiedenen Kammerdrücken dar. Darüber hinaus zeigten sie den Einfluss des Druckes auf den gesamten Wärmeübertragungskoeffizienten. Danach nimmt die mittlere Weglänge eines Gasmoleküls mit steigendem Kammerdruck von 1,4 mm bei 2 Pa auf 0,1 mm bei 100 Pa logarithmisch ab. Der Wärmeübertragungskoeffizient des Gesamtsystems steigt proportional mit steigendem Kammerdruck an. Die Wärmestrahlung dominiert in diesem Modell bei sehr niedrigem Druck (ca. 0,05 mbar). Konvektion überwiegt ab einem Druck von 0,16 mbar aufwärts [07].

Nail zeigte, dass die Gaspolster zwischen den Vials und der Stellfläche signifikant den Wärmetransport behindern und die Trocknungsrate mit besserem Vakuum geringer war [56]. Pikal beobachtete, dass sich bei einer Erhöhung der Temperatur um 1°C die Primärtrocknungsphase um 13% verkürzt [62].

Der Hauptteil der Energie wird nach Pikal [65] durch Wärmeleitung übertragen.

Die Energiemenge  $dQ$  pro Zeit  $dt$ , die von einer beheizten Stellfläche auf das Vial übertragen wird, wird in Gleichung 2-3 definiert. Dabei ist  $T_s - T_p$  die Temperaturdifferenz zwischen der Stellflächentemperatur  $T_s$  und der Produkttemperatur  $T_p$ ,  $A_v$  die Vialbodenfläche und  $K_v$  der Wärmeleitungskoeffizient. Die Effizienz der Wärmeübertragung ist vom Kammerdruck, von der Sublimationsgeschwindigkeit und dem Aufbau der Gefriertrocknungsanlage abhängig.

$$\frac{dQ}{dt} = A_v \times K_v (T_s - T_p) \quad \text{Gl. 2-3}$$

Je effizienter der Wärmeübergang, umso kürzer ist die Trocknungszeit.

Der Wärmeleitkoeffizient setzt sich aus drei Wärmeübertragungsmechanismen zusammen.  $K_c$  stellt den Anteil des direkten Kontaktes mit der Stellfläche dar,  $K_r$  gibt den Anteil der Strahlungsübertragung wider und  $K_g$  den Anteil der durch die Wärmeleitung über die Gasphase entsteht (vgl. Gl 2-4).

$$K_v = K_c + K_r + K_g \quad \text{Gl. 2-4}$$

Da durch das Wandern der Sublimationsfront von oben nach unten die trockene Produktschicht und damit die Barriere für den sublimierten Wasserdampf wächst, muss die Stellflächentemperatur entsprechend erhöht werden, damit dieser den Produktwiderstand überwinden kann. In der Praxis arbeitet man mit Erfahrungswerten. Die Stellflächentemperatur kann allerdings nicht willkürlich erhöht werden – die Produkttemperatur muss deutlich unterhalb der Kollapstemperatur liegen, da es sonst zum Ansteigen der Produkttemperatur und einem eventuellen Antauen, und damit zum Verlust der Gerüststruktur, kommen kann.

Die Produkttemperatur sollte daher kontinuierlich am Gefäßboden – dem Punkt der höchsten Eistemperatur – mittels eines Sensors kontrolliert werden. Im Idealfall ist die Produkttemperatur direkt von der Stellflächentemperatur und dem Kammerdruck abhängig. Daher ist es möglich, die Produkttemperatur über einen dieser Parameter zu regulieren [50].

Die nachfolgende Abbildung zeigt ein praktisches Beispiel eines computergesteuerten Gefriertrocknungsprozesses. Aufgezeichnet werden der Druck in der Trocknungskammer (graue gestrichelte Linie), die Temperatur der Stellfläche (schwarze durchgezogene Linie) sowie die Temperaturen am Produktboden ( $T_3$ ) und in der Mitte des Produktkuchens ( $T_2$ ). Über den elektrischen Widerstand  $R$  im Produkt sowie die Temperaturdifferenz zwischen der Referenztemperatur und den Produkttemperaturen im Vial wird die Haupttrocknung gesteuert. Mit Hilfe dieser Daten versucht der Prozesscomputer mit einer für das Produkt maximal zulässigen Temperatur und dem schlechtesten Vakuum den Prozess zu verkürzen [96].

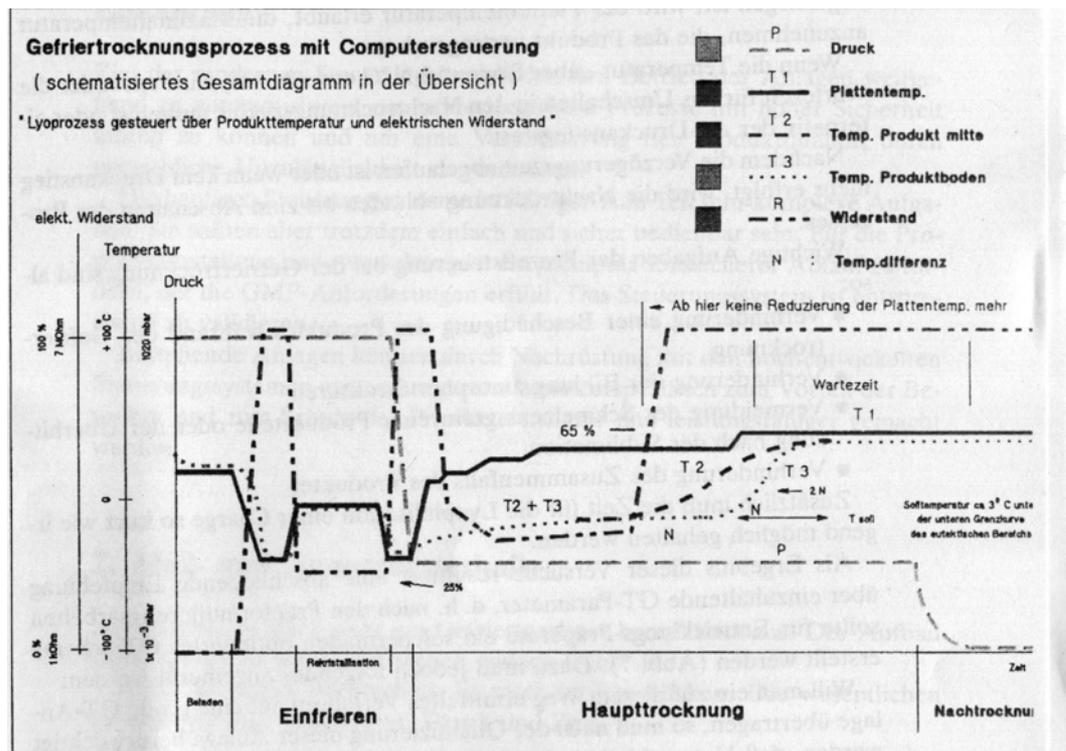


Abbildung 2-13: Gefrier- und Trocknungsprozess mit Computersteuerung [96].

Nachfolgend werden die für die Primärtrocknung wichtigsten Parameter und Bedingungen zusammengefasst:

- Kurze Prozesszeiten werden durch hohe Sublimationsraten erreicht.
- Die treibende Kraft für den Abtransport des Wasserdampfes von der Sublimationsfront ist die Differenz zwischen dem Gleichgewichtswasserdampfdruck des Eises und dem Kammerdruck. Dazu muss die Kondensatortemperatur deutlich niedriger sein, als die Eistemperatur. Auf diese Weise wird der Partialdruck in der Trocknungskammer niedrig gehalten und die Trocknung schreitet voran.
- Das Gas in der Trocknungskammer behindert die Diffusion der Wassermoleküle und verringert so die Sublimationsrate an der Eisoberfläche. Wird der Gasdruck gesenkt, so gehen pro Zeiteinheit mehr Wassermoleküle in die Gasphase über. Damit sinkt die Temperatur an der Produktoberfläche und der Dampfdruck nimmt ab. Das Kammergas ist aber gleichzeitig das Medium, durch das die Wärmeenergie von der geheizten Stellfläche auf die Eisoberfläche transportiert wird. Mit abnehmendem Gasdruck sinkt die Transportkapazität.

- Überdies ist die Kompensation der verbrauchten Energie im Produkt für das Voranschreiten des Prozesses wichtig. Diese wird durch Wärmeenergie geliefert.
- Die Vakuumpumpe entfernt die unkondensierbaren Gase aus der Trocknungskammer (vorwiegend Stickstoff und Sauerstoff). Dadurch wird eine ungehinderte Diffusion der Wassermoleküle von der Eisoberfläche zum Kondensator ermöglicht.
- Als Ziel für die Primärtrocknung kann definiert werden:
  - die Stellflächentemperatur sollte möglichst knapp (ca. 2-5°C) unterhalb der Kollapstemperatur liegen,
  - eine hohe Sublimationsrate soll angestrebt werden,
  - die Kapazität des Kondensators darf nicht überschritten werden.

## 2.2.6 Sekundärtrocknung

Die Sekundärtrocknung beginnt, wenn das gesamte im Produkt enthaltene Eis sublimiert ist. Das danach im Lyophilisat enthaltene Wasser (ca. 5-30%) kann bei kristallinen Matrices als Hydrat-, Kristallwasser oder als adsorptiv gebundenes Wasser vorliegen. In amorph erstarrten Produkten handelt es sich um das in der amorphen Masse molekulardispers gebundene Wasser [73].

Der Anfang der Sekundärtrocknung und gleichzeitig der Endpunkt der Primärtrocknung kann auf mehrere verschiedene Weisen erfasst werden:

- durch Messung der Produkttemperatur (sie steigt, wenn die Haupttrocknung beendet ist)
- durch Kontrolle des Wasserdampfanteils in der Trocknungskammer mit Hilfe von Gasanalysatoren. In der Haupttrocknung ist Wasser der Hauptbestandteil des Gases, in dem Moment, in dem das Gleichgewicht zur Seite von Stickstoff umschlägt, ist die Haupttrocknung zu Ende [65].

Die Messungen des Gases in der Trocknungskammer können z.B. mit einer *Pirani-Röhre* durchgeführt werden. Dort wird das Prinzip der Wärmeleitfähigkeit von Gasen ausgenutzt. Sie ist aufgebaut aus einem elektrischen Heizdraht, der seine Energie an die umgebende Atmosphäre abgibt. Je mehr Gasmoleküle vorhanden sind, d.h. je höher der Umgebungsdruck ist, desto größer ist der Energieverlust durch Wärmeleitung. Die Messungen sind stark von der Zusammensetzung der umgebenden Luft abhängig. Die Pirani Röhre wird üblicherweise auf Luft oder Stickstoff kalibriert, was zur Fehlmessungen in der Haupttrocknung führen kann, da sich in der Trocknungskammer hauptsächlich Wasserdampf befindet. Da Wasserdampf eine doppelt so große spezifische Wärmekapazität wie Stickstoff aufweist, werden meist zu hohe Werte angezeigt. Der Meßbereich der Pirani-Röhre erstreckt sich von etwa 0,01 bis 10 mbar [40].

- durch Überwachung der Abnahme des Probengewichtes (z.B. mit einer Mikrowaage) [73].

Die Geschwindigkeit in der Sekundärtrocknung wird bei kristallinen Gerüsten durch Desorption und Verdampfen des Wassers von der Oberfläche und bei

amorphen Produkten durch die Diffusion der Wassermoleküle aus dem Inneren des amorphen Gerüsts bestimmt [73].

Die Restfeuchte im Lyophilisat wird in der Sekundärtrocknung durch die Lyophilisattemperatur, den Partialdruck des Wasserdampfes über dem Produkt, als auch chemische Interaktionen zwischen der Formulierung und dem Wasserdampf beeinflusst. Sie kann reduziert werden, indem man:

- die Produkttemperatur durch Steigerung der Stellflächentemperatur erhöht (der Wasserdampfpartialdruck wird konstant gehalten und beträgt ca. 0,01-0,001 mbar)
- den Wasserdampfpartialdruck über dem Lyophilisat durch niedrige Kondensatortemperatur senkt (Produkttemperatur bleibt konstant) [50]

Je höher die Produkttemperatur, desto bessere Trocknungsraten werden erreicht. Zu hohe Temperaturen sollten hingegen vermieden werden, um einen Abbau oder Aktivitätsverlust des Produktes zu minimieren. Niedrige Temperaturen bei der Sekundärtrocknung führen zu langen thermischen Belastungen des Produktes [64].

Es besteht keine Proportionalität zwischen der Trocknungsrate und der Restfeuchtemenge. Aus kinetischen Gründen schreitet die Trocknung bei einem hohen Wassergehalt schnell voran, während bei einer niedrigen Restfeuchte die Geschwindigkeit des Wasserabtransportes deutlich sinkt. Die Bewegungen im Feststoff und das Verdampfen des Wassers an der Oberfläche des trockenen Produktes verhindern den schnellen Fortschritt des Prozesses. Der Restfeuchtegehalt ist im Lyophilisat nicht gleichmäßig verteilt – in der obersten Schicht herrscht immer eine niedrigere Restfeuchte als am Boden des Gefäßes. Die niedrigste Restfeuchte findet man an den Wänden des Behältnisses [65].

Die optimale Zielrestfeuchte muss für jedes Produkt experimentell ermittelt werden. Sie soll aufgrund der Wachstumsgefahr von Mikroorganismen und chemischen Reaktionen so niedrig wie möglich gehalten werden. Auch für Proteinzubereitungen ist eine niedrige Restfeuchte wegen eventueller Aktivitätsbeeinflussung von Vorteil.

## 2.2.7 Die Rolle des Kondensators bei der Gefriertrocknung

Die Aufgabe des Kondensators bei der Gefriertrocknung besteht darin, die in der Trocknungskammer sublimierten Wassermoleküle kontinuierlich zu entfernen. Dies geschieht durch die niedrige Temperatur des Kondensators in der Regel zwischen  $-50^{\circ}\text{C}$  und  $-90^{\circ}\text{C}$ .

Der Dampfdruck von Wasser über Eis, wird auch als Sättigungs- bzw. Gleichgewichtsdampfdruck bezeichnet. Er ist umso kleiner, je niedriger die Eistemperatur ist (vgl. Abbildung 2-11). Bei der Gefriertrocknung ist er ausschlaggebend für das Fortschreiten der Sublimation. Ist der Dampfdruck im Trocknungsraum größer als der des Eises, dann kondensieren die Wassermoleküle an der Eisoberfläche. Wird der Dampfdruck im Raum oberhalb des Eises verringert, so gibt das Eis Wassermoleküle an die Umgebung ab. Diese Abgabe der Wassermoleküle findet so lange statt, bis ein Gleichgewicht zwischen dem Dampfdruck im Gasraum und dem Dampfdruck über Eis erreicht wird. Die Einstellung des Gleichgewichtes wird durch die Anwesenheit des Kondensators (der kältesten Fläche im Gefriertrockner) verhindert. An ihm scheiden sich, aufgrund des niedrigsten Wasserdampfpartialdruckes, die Wassermoleküle aus dem Gasraum ab. So werden sie aus dem Gleichgewicht entfernt und der Prozess wird dadurch vorangetrieben.

## 2.2.8 Glaszustand und Kollapstemperatur

Wie bereits im Abschnitt 2.2.4 erläutert wurde, gehen Substanzen (z.B. Zucker, Polymere), die zur Übersättigung neigen, beim Einfrieren in ein Glas über. Sie konzentrieren sich in der Lösung über ihre Sättigungslöslichkeit auf, ohne dabei zu kristallisieren [76]. Bei diesem Vorgang entsteht zunächst eine metastabile, hochviskose, gummiartige Masse, in der keine Diffusionsvorgänge, die für das Auskristallisieren notwendig wären, möglich sind (Abbildung 2-14). Wird die Masse weiter abgekühlt, kommt es zu einer Erstarrung und es bildet sich ein festes amorphes Glas. Im Gegensatz zu einem Kristallisationspunkt erstreckt sich

die Erstarrung eines solchen Stoffes über einen breiteren Temperaturbereich und wird als Glasübergangstemperatur  $T_g'$  bezeichnet. [57].

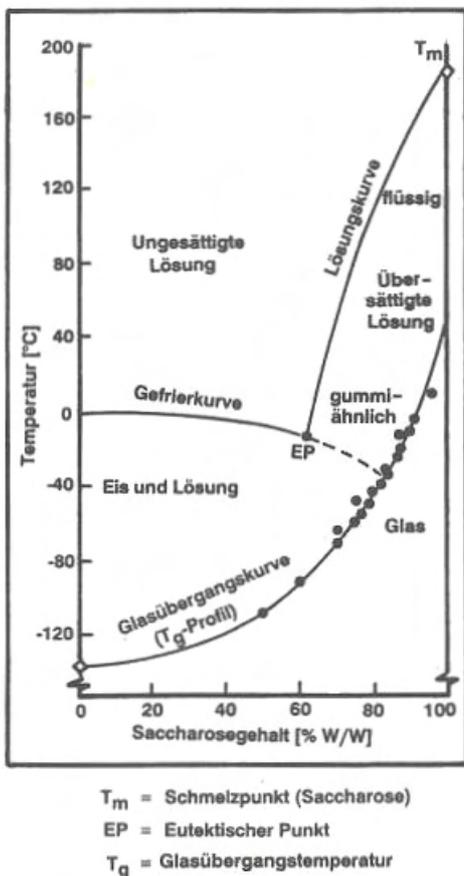


Abbildung 2-14: Zustandsdiagramm einer wässrigen Saccharoselösung [nach Franks] [76].

Steigt beim Gefriertrocknungsprozess die Temperatur des Glases über den  $T_g'$ , so erweicht die Matrix und die Struktur des Glases geht verloren. Es kommt zu einem so genannten Kollaps. Die Kollapstemperatur  $T_c$  liegt ca. 2-5°C oberhalb der  $T_g'$ . Ab dieser Temperatur steigt die Beweglichkeit der Polymerketten, es kommt zu einer Relaxation und translatorischen Diffusion in der Masse. Makroskopisch setzt hier das viskose Fließen ein.

Die Kollapstemperatur kann mit hoher Präzision mithilfe der Gefriertrocknungsmikroskopie bestimmt werden [52].

Zur Bestimmung der Glasübergangstemperatur verwendet man meistens die DSC (Dynamische Differenzkalorimetrie engl. *Differential Scanning Calorimetrie*) (s. Kap. 3.3.7.3.). Beim Erweichen des Glases finden nur sehr kleine Energieübergänge statt, da die Molekülanordnung im Glas weniger stabil ist als in einem Kristall.

Polymere, die verzweigt vorliegen können und eine hohe Molmasse aufweisen, tendieren aufgrund der schon vorhandenen Konformation der Makromoleküle leicht zu einer Glasbildung. Bei ihnen können amorphe und kristalline Bereiche in Form von Fransenmizellen vorliegen [76].

Bei hydrophilen Polymeren sinkt die  $T_g'$  mit steigendem Wassergehalt (s. Abbildung 2-14). Wasser gilt vor allem bei hydrophilen Polymeren wie Polysacchariden, Proteinen, PVP etc. als Weichmacher. Solche Polymergläser können bis zu 30% Wasser einschließen, das sich der Eisbildung entzieht (engl. *non frozen water*). Durch Bildung der Wasserstoffbrücken zu hydrophilen Gruppen (Carboxyl- und Aminogruppen) resultieren eine höhere Beweglichkeit und ein erhöhter Raumbedarf. In diesem Glaszustand ist Wasser nur beschränkt osmotisch verfügbar und kann daher als Schutz für empfindliche Substanzen, z.B. in Geweben, dienen [76]. Die Trocknung solcher Polymerlösungen kann unter Umständen schwierig sein.

### 3. Experimenteller Teil.

#### 3.1 Versuchsplanung.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Einfrier- und Gefrier-trocknungsverfahrens und der Kryoprotektoren auf die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase und Trypsin untersucht. Übersicht über die Versuchsplanung gibt Tabelle 3-1.

Faktor	Niveau
Einfrierbedingungen	Schock : -196°C
	-78°C
	-27°
Kryoprotektor	0% Kryoprotektor
	0,5% HPMC
	1% HPMC
	5% Mannitol
	10% Mannitol
Gefriertrocknung	Nicht gefriergetrocknet, nur eingefroren und aufgetaut
	Fingerlyophilisation
	Konventionelle Gefriertrocknung

Tabelle 3-1: Versuchsplan zur Einfrier- und Gefriertrocknungsversuchen mit  $\beta$ -Galactosidase und Trypsin.

Das Schockefrieren der Enzymlösung erfolgte durch Aufsprühen der Lösung auf die in flüssigem Stickstoff vorgekühlte Wand einer Infusionsflasche (vgl. Kap. 3.3.3).

Das Einfrieren bei  $-27^{\circ}\text{C}$  und  $-78^{\circ}\text{C}$  fand im Tiefkühlschrank statt, das Übertragungsmedium war Luft (vgl. Kap. 3.3.3).

Die Kryoprotektoren Hypromellose und Mannitol wurden auf unterschiedlichen Niveaus verwendet. Hypromellose wurde in den Konzentrationen 0,5% und 1% und Mannitol in 5% und 10% eingesetzt. Diese zwei Kryoprotektoren unterscheiden sich beträchtlich in ihrer Struktur und ihren Eigenschaften. Mannitol ist ein Zuckeralkohol, der häufig als Gerüstbildner bei der Gefriertrocknung angewendet wird (vgl. Kap.3.2.4). Hypromellose ist ein nichtionischer Celluloseether, das vorwiegend als Gelbildner und Verdickungsmittel genutzt wird (vgl. Kap. 3.2.3). Bei Versuchen zur Herstellung von Trägerlyophilisaten für die Augenheilkunde, auch Ophthalmic Lyophilisate Carrier System (OLCS) genannt, hat sich gezeigt, dass dieser Stoff gute strukturbildende Eigenschaften besitzt [41]. Die Aktivität der Enzyme wurde vor und nach dem Einfrieren oder vor und nach der Gefriertrocknung bestimmt. Eine genaue Übersicht über alle Versuche zur Aktivitätsbestimmung der Enzyme nach Einfrieren und Gefriertrocknung gibt die Tabelle 3-1. In der Tabelle 3-2 ist das Bezifferungsschema für die Aktivitätsversuche dargestellt.

### Bezifferungsschema : Enzymaktivität nach Einfrieren und Gefriertrocknung

Tabelle 3-2: Bezifferungsschema Enzymaktivität nach Einfrieren und Gefriertrocknung.

Stoff/ Verfahren = Ziffer				
<b>1.Ziffer</b>	Enzym	$\beta$ -Galactosidase =1	Trypsin =2	
<b>2.Ziffer</b>	Einfrierbedingungen	Schock =1	$-78^{\circ}\text{C}$ =2	$-27^{\circ}\text{C}$ =3
<b>3.Ziffer</b>	Kryoprotektor	Kein Kryoprotektor =1	HPMC 0,5% =2	Mannitol 5% =4
			HPMC 1% =3	Mannitol 10% =5
<b>4.Ziffer</b>	Gefriertrocknung	Nicht gefriergetrocknet =1	Fingerlyophilisation =2	Konventionelle Gefriertrocknung =3

Im zweiten Abschnitt des Experimentellen Teils wurden die Eigenschaften der verwendeten Lösungen (Glasübergangstemperatur, Viskosität) und der Lyophilisate (Oberflächenbeschaffenheit, kristallographische Form, Restwassergehalt) untersucht.

Die Glasübergangstemperatur einer eingefrorenen Lösung spielt eine zentrale Rolle beim Gefriertrocknungsprozess. Wird sie überschritten, kommt es zu einem Antauen des Kuchens. Dadurch geht die Produktstruktur verloren und die Trocknungsgeschwindigkeit geht erheblich zurück. In den angetauten Bereichen treten Herde mit einer höheren Restfeuchte auf. Die Glasübergangstemperatur der eingefrorenen Lösungen wurde durch Dynamisch Mechanische Analyse (DMA) und Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC) gemessen.

Die Viskosität und die Oberflächenspannung der verwendeten Lösungen sind für das Schockefrieren wichtig. Die Lösungen wurden bei diesem Einfrierverfahren auf eine im Stickstoff vorgekühlte Flaschenwand aufgesprüht. Beide Parameter Oberflächenspannung und Viskosität beeinflussen die Größe der Tröpfchen, die in dem Rotorsprüher erzeugt werden und damit ebenfalls die Gefriereschwindigkeit der Lösung (vgl. Kap. 3.3.3).

Das visuelle Erscheinungsbild der Lyophilisate hing deutlich von ihrer Zusammensetzung und der Einfriereschwindigkeit ab. Die Unterschiede zeigten sich besonders ausgeprägt auch in den Rasterelektronenmikroskopischen (REM) Aufnahmen. So wurden beispielsweise auf der Oberfläche der Mannitollyphilisate, die bei  $-27^{\circ}\text{C}$  eingefroren wurden, fächerartige kristalline Strukturen beobachtet, während nach Schockefrieren eine an Knochenspongiosa erinnernde Struktur entstand. Aufgrund der bei der Rasterelektronenmikroskopie erzielten Ergebnisse wurde mit der Röntgendiffraktometrie überprüft, ob die Lyophilisate amorph oder kristallin vorliegen. Außerdem wurde mit der Röntgendiffraktometrie der Einfluss der eingesetzten Puffer auf das Kristallisationsverhalten der Kryoprotektoren während des Einfriervorgangs gezeigt.

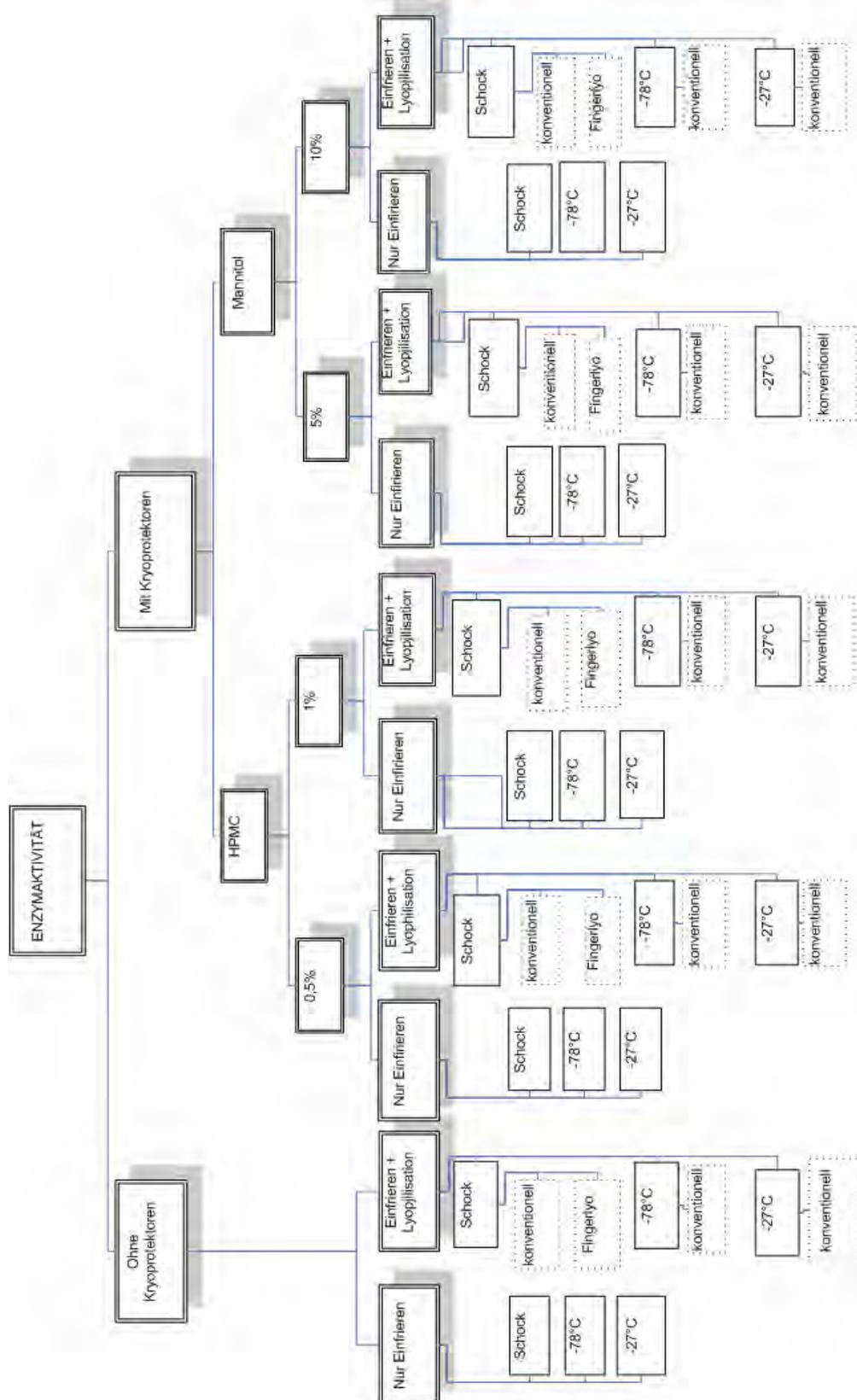


Abbildung 3-1: Aktivitätsbestimmung der Enzyme nach Einfrieren und Gefriertrocknung. (HPMC: Hypromellose, Schock: Schockefrieren im flüssigen Stickstoff, konventionell: konventionelle Gefriertrocknung, Fingerlyo: Fingerlyophilisation)

## 3.2 Verwendete Materialien

Für die Untersuchungen wurden folgende Materialien verwendet:

- zwei Modellenzyme:  $\beta$ -Galactosidase und Trypsin
- zwei Kryoprotektoren: Hypromellose und Mannitol

Bezugsquellen und Chargenbezeichnungen der Materialien wurden im Kap. 7.1 zusammengefasst.

### 3.2.1 $\beta$ -Galactosidase

$\beta$ -Galactosidase gehört zu der Enzymgruppe der Glykosidasen, die Glykosidbindungen spalten. Das Enzym  $\beta$ -Galactosidase kann aus unterschiedlichen Mikroorganismen gewonnen werden, wie z.B. aus Bakterien: *E. coli*, *Kluyvermyces fragilis*, *Kluyvermyces lactis*, *Saccharomyces fragilis* und aus dem Pilz *Aspergillus oryzae*. Im Handel gibt es außerdem  $\beta$ -Galactosidasen, die aus Rinderleber isoliert werden.

Das Enzym kommt nicht nur in Mikroorganismen vor, sondern auch in pflanzlichen, tierischen und menschlichen Geweben. In Bakterien spaltet die  $\beta$ -Galactosidase Laktose, die als Kohlenstoff- oder Energiequelle verwendet werden kann [82]. Für die Milchindustrie ist seine Anwendung als Laktose-Spalter für Milchprodukte bekannt [94]. Im menschlichen Dünndarm spaltet  $\beta$ -Galactosidase Laktose in  $\beta$ -Galactose und Glucose, die dann ins Blut aufgenommen werden können. Ein Mangel des Enzyms in der Dünndarmschleimhaut führt beim Menschen zu einer Laktose-Intoleranz. Unter anderem kann der Mangel an  $\beta$ -Galactosidase (neben anderen Enzymen) beim Menschen zur Erkrankung an Mucopolysaccharidose (MPS) und Sphingolipidose führen [81]. Mucopolysaccharidosen gehören zur Gruppe der lysosomalen Speichererkrankungen, bei denen es aufgrund eines lysosomalen Enzymdefektes zur Störung im Abbau der Glykosaminglykane kommt, die im medizinischen als Mukopolysaccharide bezeichnet werden. Die Therapie der MPS erfolgt zurzeit nur symptomatisch, da eine kausale Therapie in Form einer Korrektur des Enzymdefektes noch nicht möglich ist. Zukünftig sind drei Therapiemöglichkeiten denkbar: Enzymersatztherapie, Stammzellen-transplantation oder Gentherapie [25].

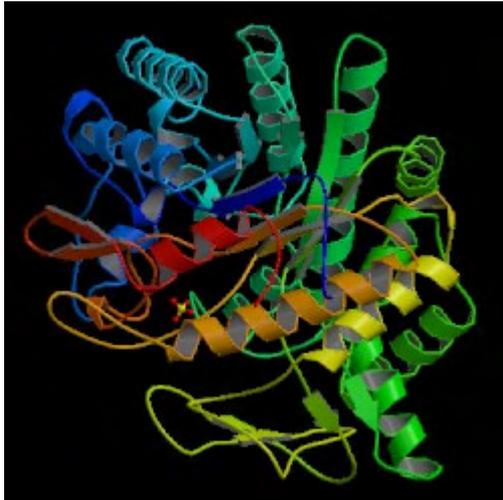


Abbildung 3-2: 6-Phospho- $\beta$ -D-Galactosidase [83].

Die für die Versuche verwendete  $\beta$ -Galactosidase stammte aus dem Pilz *Aspergillus oryzae*. Dieses Enzym ist ein Monomer und besitzt ein Molekulargewicht von 124 kDa. Der Stabilitätsbereich liegt zwischen pH 4 und 9 und das Temperaturoptimum bei 46°C [82]. In der Reaktion mit ortho-Nitrophenol- $\beta$ -d-Galactosid (ONPG) (näheres zur Aktivitätsbestimmung von  $\beta$ -Galactosidase vgl. Kap.3.3.1) zeigt es ein Aktivitätsoptimum bei pH 4,5.

### 3.2.2 Trypsin

Das Enzym Trypsin gehört zu der Gruppe der Proteasen. Es spaltet spezifisch die Bindung zwischen den Aminosäuren Lysin und Arginin.

Trypsin wird aus Rinder-, Schweine- und menschlicher Bauchspeicheldrüse gewonnen. Das für die Versuche verwendete Trypsin stammte aus Rinderleber.

Trypsin als auch das naheverwandte Chymotrypsin sind Verdauungsenzyme. Sie werden von der Bauchspeicheldrüse produziert und zum enzymatischen Abbau der Eiweiße benötigt [85]. Bei Mangel können beide Enzyme in magensaftresistenter Darreichungsform substituiert werden. Äußerlich kann Trypsin zur Wundbehandlung herangezogen werden.

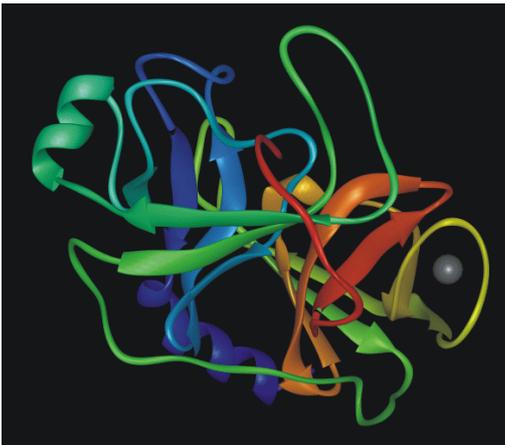


Abbildung 3-3: Trypsin aus dem Rinder – Pankreas [86]

Trypsin entsteht aus seiner Vorstufe, dem Trypsinogen, durch enzymatische Abspaltung von 6 Aminosäuren am N-terminalen Kettenende. Trypsin besteht aus 223 Aminosäuren, die in einer Einzelkette verknüpft sind. Innerhalb dieser Kette befinden sich sechs Disulfidbrücken. Sein Molekulargewicht beträgt 24 kDA [84]. Das Optimum seiner Aktivität liegt bei 40°C und einem pH Wert von 8.

### 3.2.3 Hypromellose (HPMC)

Hypromellose (Pharm Eu. 4.00/0348; Hydroxypropylmethylcellulose, HPMC) ist ein Celluloseether, der aus einer fein gemahlene Cellulose hergestellt wird. Diese wird mit Natronlauge zu einer so genannten Alkalicellulose umgesetzt. Durch Veretherung mit Monochlormethan und Propylenoxid entsteht die besser wasserlösliche Hypromellose [88]. Bei der für die Untersuchungen verwendeten HPMC der Firma Hercules liegt der Gewichtsprozent-Anteil an Methoxygruppen bei 19-30% und der Gewichtsprozent-Anteil der Hydroxypropylgruppen bei 3-12%.

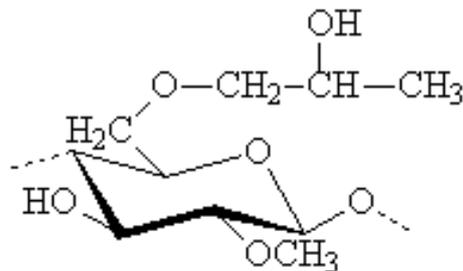


Abbildung 3-4: Hydroxypropylmethylcellulose (Hypromellose) [93].

Cellulose ist ein natürlich vorkommendes Biopolymer mit vielfältigen Möglichkeiten zur chemischen Veränderung. Aufgebaut ist der Rohstoff Cellulose aus Glucosebausteinen, die linear zu einer Polymerkette verknüpft sind. Pro Glucosebaustein stehen drei Hydroxylgruppen (OH-Gruppen) als reaktive Zentren zur Verfügung (vgl. Abbildung 3-5), an denen chemische Reaktionen durchgeführt werden können. Bei Hypromellose ist die OH-Gruppe am C<sub>2</sub>-Atom methyliert und am C<sub>6</sub>-Atom mit einem 2-Hydroxypropylrest substituiert (vgl. Abbildung 3-4).

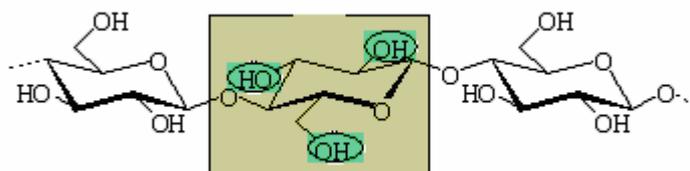


Abbildung 3-5: Anhydroglucose – Einheit [93].

Cellulose ist in Wasser unlöslich. Hypromellose dagegen vermag sich im kalten Wasser kolloidal zu lösen. HPMC wird im Körper nicht metabolisiert. Sie darf als Zusatzstoff in Lebensmitteln, als Hilfsstoff in pharmazeutischen Produkten und Kosmetika verwendet werden. Wird Hypromellose im Wasser gelöst, steigt die Viskosität der Lösung an. Der „Verdickungseffekt“ ist abhängig vom Polymerisationsgrad und Molekulargewicht der Hypromellose, als auch von der Konzentration des Hilfsstoffes in der Lösung [06].

Für die Herstellung der Lyophilisate wurde Hypromellose Culminal® vom Typ MHPC 400 in den Konzentrationen von 0,5% und 1% verwendet. Der Hersteller (Hercules, Wilmington, USA) macht für eine 2% wässrige Lösung folgende Angaben:

- eine Viskosität von 400 mPas bei 20°C (gemessen mit einem Viskosimeter der Firma Brookfield, Typ RV bei 20 rpm)
- das mittlere Molekulargewicht beträgt 41 000 DA
- mittlerer Polymerisationsgrad 220 [87].

Die Viskosität und das rheologische Verhalten der in der Arbeit verwendeten Lösungen wurden mit dem Viskosimeter Roto Visco RV1 der Firma Thermo Haake gemessen.

### 3.2.4 Mannitol

Mannitol ist ein 6-wertiger Zuckeralkohol und ein Isomer von Sorbitol. Mannitol gibt es als weißes, kristallines Pulver oder in Form von Körnchen, welche einen süßlichen Geschmack aufweisen. Sein Molekulargewicht beträgt 182 Da. Die Substanz hat bei 25°C eine Wasserlöslichkeit von ungefähr 182 mg/ml. Mannitol wird üblicherweise als Gerüstbildner in der Gefriertrocknung und Sprühtrocknung verwendet. Außerdem fungiert es in festen Arzneiformen als Füll- und Trockenbindemittel. Für zuckerfreie Arzneiformen kann es als Zuckeraustauschstoff eingesetzt werden [06].

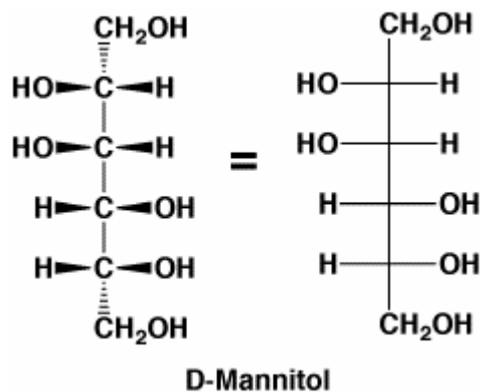


Abbildung 3-6: Strukturformel von Mannitol.

Mannitol (Pharm Eu 4.00/0559) wurde in der Arbeit zur Herstellung von Lyophilisaten in den Konzentrationen 5% und 10% verwendet.

## 3.3 Geräte und Methoden

### 3.3.1 Aktivitätsbestimmung von $\beta$ -Galactosidase und Trypsin.

#### **$\beta$ -Galactosidase**

Das Enzym  $\beta$ -Galactosidase spaltet das farblose Substrat ONPG (ortho Nitrophenol –  $\beta$  D Galactosid). Dabei entsteht der gelbe Farbstoff o-Nitrophenol (ONP). Seine Konzentrationszunahme wurde spektrophotometrisch vermessen. Diese ist bei 420 nm, einem pH Wert von 7 und bei Raumtemperatur proportional zur Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase.

#### Substrat:

Die ONPG-Lösung wurde täglich frisch hergestellt und bei 4°C und unter Ausschluss von Licht und Feuchtigkeit aufbewahrt. Dazu wurden 40 mg ONPG in (Meßkölbchen 10 ml) Phosphatpuffer aus 0,06 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  und 0,04 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  im Ultraschallbad gelöst.

#### Enzym:

$\beta$ -Galactosidase wurde trocken bei -4°C gelagert. Vor Beginn einer Versuchsreihe wurde eine entsprechende Menge an Enzympulver (0,5 mg/ml) im Phosphatpuffer (0,06 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  und 0,04 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,01 M KCl, 1 M  $\text{MgSO}_4$  und 0,05 M  $\beta$ -Mercaptoethanol) oder der HPMC-bzw. Mannitol-Lösung im Phosphatpuffer gelöst. Zum vollständigen Lösen wurde die Mischung 30 Min. ins Ultraschallbad (bei Raumtemperatur) gestellt.

#### Photometrische Aktivitätsbestimmung:

Für die Aktivitätsbestimmung wurden 200  $\mu\text{l}$  der ONPG Lösung in eine Küvette pipettiert, mit der Enzymlösung auf ein Volumen von 2 ml aufgefüllt und 15 sec mit einem Küvettenrührer durchmischt. Anschließend wurde die Messung gestartet. Die Absorptionzunahme wurde unter weiterem Mischen 60 sec lang gemessen. Die Steigung der erhaltenen Geraden ist das Maß der Enzymaktivität bei Raumtemperatur (s. Abbildung 3-7)

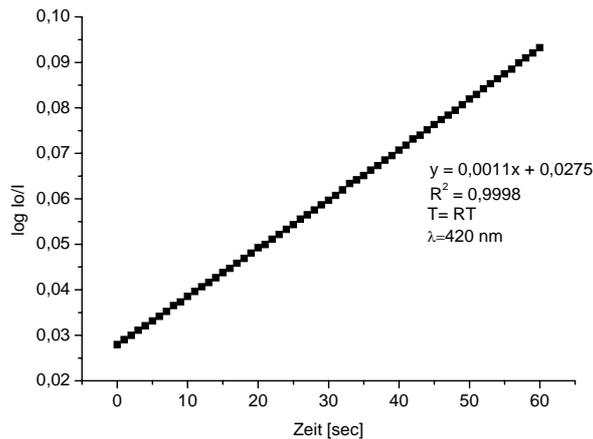


Abbildung 3-7: Zeitliche Absorptionszunahme bei der Aktivitätsbestimmung von  $\beta$ -Galactosidase (Enzymkonzentration 0,05 mg/ml)

Die Kalibrierreihen für die Aktivitätsbestimmung von  $\beta$ -Galactosidase werden genauer im Kapitel 4.1.1 erläutert.

## Trypsin

Das Enzym Trypsin spaltet das farblose Substrat Suc-Ala-Ala-Pro-Arg-p NA (para-Nitroanilin) in die Aminosäurekette Suc-Ala-Ala-Pro-Arg und den gelben Farbstoff para-Nitroanilin (p-NA).

Für die Aktivitätsbestimmung wurde die zeitliche Absorptionszunahme des entstehenden p-NA bei 405 nm und einem pH Wert von 7 gemessen. Die Messungen wurden bei 25°C durchgeführt.

Das Trypsinpulver wurde bei -30°C vor Licht und Feuchtigkeit geschützt aufbewahrt.

### Substrat:

Das Substrat in Pulverform Suc-Ala-Ala-Pro-Arg-p-NA wurde in DMSO (Dimethylsulfoxid) zu einer Konzentration von 40mM gelöst (Stammlösung). Diese Lösung wurde in 100 $\mu$ l Portionen aufgeteilt. Die Aliquote wurden in Eppendorf-Gefäßen bei -30°C gefroren gelagert und unmittelbar vor Gebrauch aufgetaut. Die Substrat-Stammlösung wurde in einem Verhältnis von 1:10 in Trispuffer (20 mM Tris HCl und 150 mM NaCl) verdünnt (entspricht 4 mM Substrat). Diese

-----  
 Substrat-Tagesverdünnung kann 12 h bei Raumtemperatur gelagert werden und verändert sich über diesen Zeitraum nicht.

Enzym:

Das Enzym wurde in 1 mM HCl zu einer Konzentration von 0,5 mg/ml gelöst und einen Tag lang auf Eis aufbewahrt. Für die Aktivitätsbestimmung wurde die Enzym-Stammlösung (0,5 mg/ml) in einem Verhältnis 1:100 in 1 mM HCl verdünnt und ebenfalls auf Eis gelagert. Unmittelbar vor der Messung wurde die 1:100 Enzym-Verdünnung mit Tris-Puffer in einem Verhältnis von 1:40 verdünnt (wird nachfolgend als Trypsin-Tris-Verdünnung bezeichnet).

Photometrische Aktivitätsbestimmung:

Für die Messung wurden 900 µl Puffer (auf 25°C temperiert) und 50 µl Substrat-Tagesverdünnung vorgelegt und gemischt. Die Extinktion dieser Mischung wurde gleich Null gesetzt. Unmittelbar vor Beginn der Messung wurden 50 µl der Trypsin-Tris-Verdünnung hinzu gegeben und mit einer Pipette vollständig gemischt. Mit der Enzymzugabe wurde die Reaktion gestartet. Die Absorptionzunahme wurde 5 Minuten lang bei 25°C aufgezeichnet. Mithilfe eines temperierten Küvettenwechslers (s. Abbildung 3-9 Kap. 3.3.1.) wurden drei Proben aus einer Trypsin-Tris-Verdünnung parallel vermessen. Die Steigung der Absorptionsgeraden ist ein Maß für die Enzymaktivität bei 25°C (s. Abbildung 3-8).

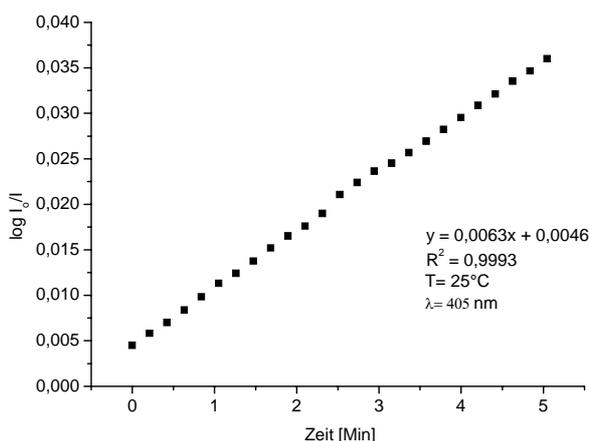


Abbildung 3-8: Zeitliche Absorptionzunahme bei der Aktivitätsbestimmung von Trypsin (Enzymkonzentration 0,6 mg/ml)

Eine genauere Erläuterung der Kalibrierreihen für die Gehaltsbestimmung von Trypsin wird im Kapitel 4.2.1. gegeben.

### 3.3.2 UV-VIS Spektroskopie

In dieser Arbeit wurde die Aktivitätsbestimmung der Enzyme mithilfe des Spektrometers vom Typ Lambda 12 von Perkin Elmer durchgeführt. Es wurden zeitliche Konzentrationsänderungen der Produkte detektiert, die bei einer enzymatischen Reaktion entstehen (vgl. Kap. 3.3.1).

Die Abbildung 3-9 zeigt ein Schema des UV/VIS Spektrometers. Der Planspiegel *P1* lenkt die Strahlung der Deuterium-(*DL*) oder Halogenlampe (*HL*) in den optischen Strahlengang. Die durch *P1* reflektierte Strahlung trifft auf den Toroidspiegel *T2*, passiert das Filtrerrad *FW* und gelangt über den Eintrittsspalt *ES1* auf den Monochromator.

Die Strahlung gelangt durch den Austrittsspalt *ES2* auf den sphärischen Spiegel *S3* und von dort auf den 50:50 Strahlungssteiler *BS*. Der Strahl wird über die Planspiegel *P4* und *P5* durch die Probenküvette (*Sample*) und die Referenzküvette (*Ref*) auf dem Photodetektor fokussiert. Das Spektrometer verfügt über einen temperierbaren beweglichen Probenwechsler (Küvettenwechsler), der in der Abbildung 3-9 als roter Rahmen angedeutet wurde. Der Probenwechsler fährt vor und zurück und bringt so die einzelnen Proben in den Strahlengang.

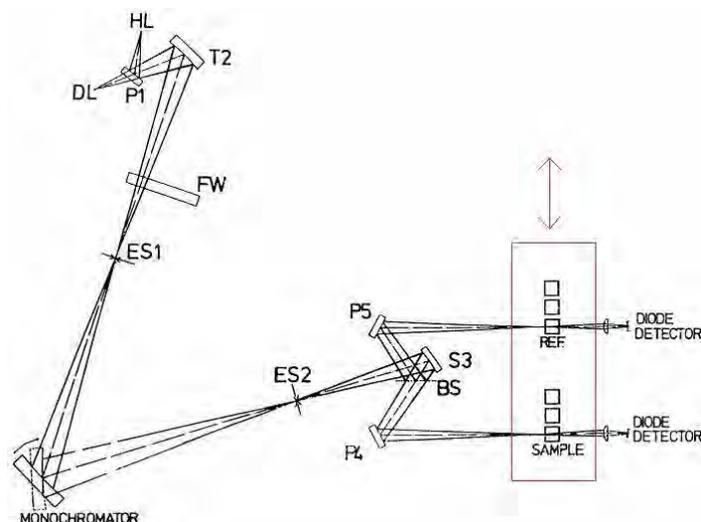


Abbildung 3-9: UV/VIS Zweistrahl-Spektralphotometer Lambda 2 von Perkin Elmer.

### 3.3.3 Einfriertemperaturen

Die Enzymlösungen wurden bei drei verschiedenen Temperaturen eingefroren:

- bei  $-27^{\circ}\text{C}$
- bei  $-78^{\circ}\text{C}$
- bei  $-196^{\circ}\text{C}$  (Schockgefrieren).

#### Einfrieren bei $-27^{\circ}\text{C}$ und $-78^{\circ}\text{C}$

Behältnisse mit 5 ml Enzymlösung wurden bei  $-27^{\circ}\text{C}$  (Tiefkühlschrank Liebherr) oder bei  $-78^{\circ}\text{C}$  im Tiefkühlschrank (Tiefkühlschrank Thermo Forma) eingefroren. Die Temperaturmessung bei beiden Versuchsreihen wurde mit dem Widerstandsthermometer Pt- 100 Klasse B durchgeführt. Die Abbildung 3-10 zeigt den Temperaturverlauf in der Lösung während des Einfrierens im Tiefkühlschrank.

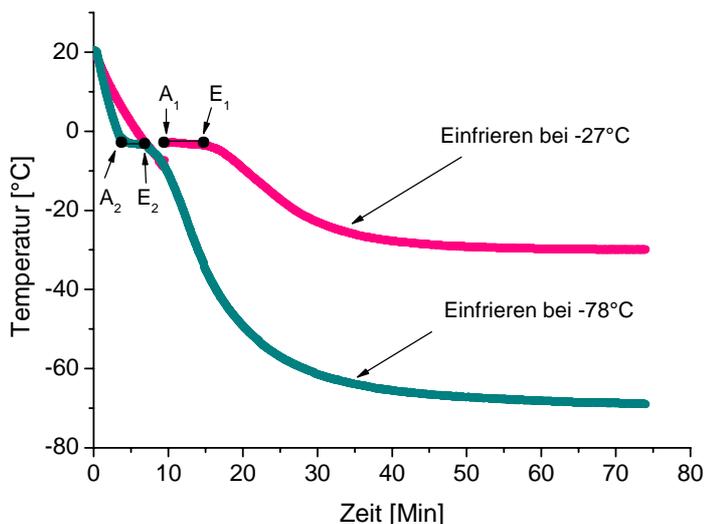


Abbildung 3-10: Temperaturverlauf in einer 5% Mannitol-Lösung während des Einfrierens bei  $-27^{\circ}\text{C}$  und bei  $-78^{\circ}\text{C}$ .

Wie die Abbildung 3-10 zeigt, kommt es in beiden Lösungen knapp unterhalb von  $0^{\circ}\text{C}$  zu einer Kristallisation, was die beiden vorhandenen Plateaus verdeutlichen. Je länger das Plateau, desto größer der Zeitraum in der die Lösung kristallisiert. Die Kristallisationszeit beginnt bei  $-27^{\circ}\text{C}$  nach 10 Minuten ( $A_1$  in der Abbildung

3-10) und endet nach 18 Minuten ( $E_1$  in der Abbildung 3-10). Bei  $-78^\circ\text{C}$  fängt die Kristallisationsphase nach 3 Minuten an ( $A_2$ ) und ist nach 6 Minuten abgeschlossen ( $E_2$ ). Die Lösungen sind bei beiden Einfriertemperaturen nach 60 Minuten bis auf ihre entsprechende Endtemperatur heruntergekühlt.

Zur Berechnung der Einfriergeschwindigkeit wurde der Abschnitt des Temperaturverlaufs hinter dem Kristallisationsplateau herangezogen.

Um die ungefähre Einfriergeschwindigkeit zu ermitteln, wurde die zeitliche Temperaturabnahme in Kelvin dargestellt (s. Abbildung 3-11). An den linearen Bereich der Kurven wurde jeweils eine Tangente angelegt. Die Steigung dieser Tangenten entspricht in etwa der Einfriergeschwindigkeit. In der Abbildung wurde sie als Änderung der Temperatur durch Änderung der Zeit ( $\delta T/\delta t$ ) benannt.

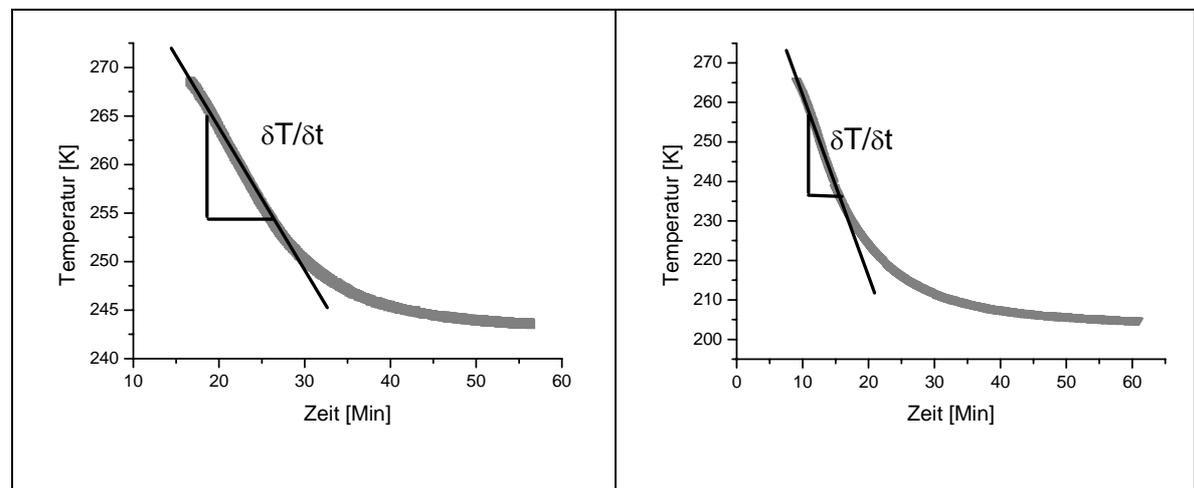


Abbildung 3-11: Temperaturverlauf beim Einfrieren bei  $-27^\circ\text{C}$  (linke Seite) und  $-78^\circ\text{C}$  (rechte Seite).

Für die Temperaturabnahme bei  $-27^\circ\text{C}$  wurde folgende Tangentengleichung errechnet [58]:

Grundformel:  $y = ax + b$

- $y$  = die Temperatur [K]
- $x$  = Zeit [Min]
- $a$  = Steigung der Tangenten [K/Min]
- $b$  = Schnittpunkt mit der Ordinate [K]

Daraus ergibt sich in unserem Anwendungsfall bei  $-27^\circ\text{C}$  folgender Mediumstemperaturabfall:  $y = -1,5174x + 294,06$ .

Die Messdatenpunkte und die Tangente korrelieren miteinander mit  $R^2 = 0,9987$ .

Die Steigung der Tangenten beträgt in diesem Fall  $k=-1,5$  K/Min und gibt die Einfriereschwindigkeit bei  $-27^{\circ}\text{C}$  wieder. Das negative Vorzeichen der Geschwindigkeitskonstanten kommt durch die Abnahme der Temperatur zustande.

Für das Einfrieren bei  $-78^{\circ}\text{C}$  ergibt sich folgender Mediumstemporalabfall:

$$y = -4,5866x + 307,74 \quad (\text{mit } R^2 = 0,9968)$$

Daraus folgt, dass die Einfriereschwindigkeit (Tangentensteigung  $k= -4,6$  K/Min) bei dieser Temperatur ( $-78^{\circ}\text{C}$ ) ca. dreifach höher ist als bei  $-27^{\circ}\text{C}$ .

### Schockgefrieren (bei $-196^{\circ}\text{C}$ )

Beim Schockgefrieren wurden 5 ml Enzymlösung auf die Wände einer, im flüssigen Stickstoff, 2 Min. lang vorgekühlten, 100 ml Infusionsflasche mit dem Rotorprüher in Form feinsten Tröpfchen aufgebracht (s. Abbildung 3-12, rechts). Durch das manuelle Auf-und Abbewegen des Rotorprühers wurde die Enzymlösung in einer dünnen Schicht auf die kalten Flaschenwände aufgesprüht (s. Abbildung 3-13). Für die Aktivitätsbestimmung wurden die Flaschen bis zum völligen Auftauen (45 Min.) bei Raumtemperatur (ca.  $20^{\circ}\text{C}$ ) aufbewahrt. Für die Lyophilisation wurde die eingefrorene Lösung direkt in den Gefriertrockner überführt.

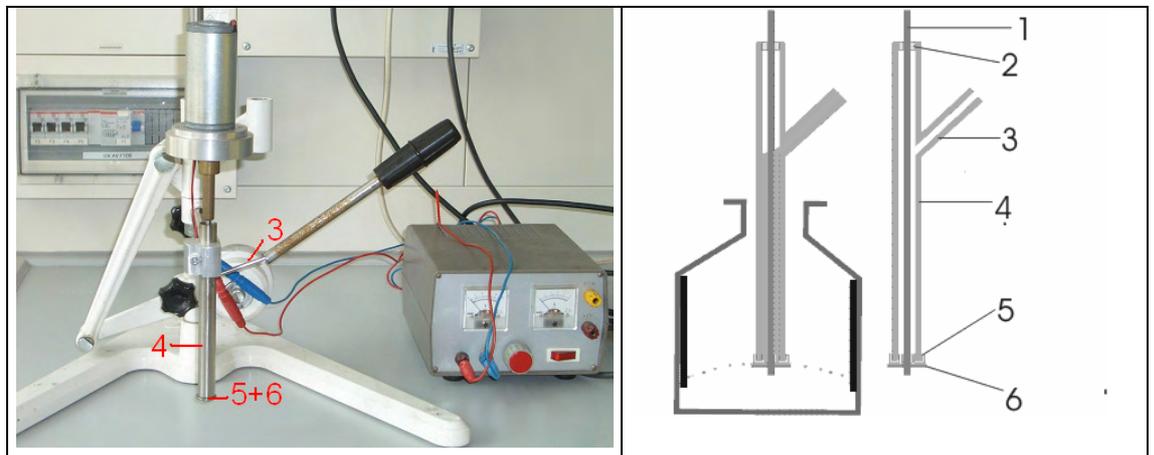


Abbildung 3-12: Rotorprüher; rechte Seite: Aufbau des Rotorprühers und schematischer Verlauf des Schockgefrierens. 1. Rotor; 2. Oberes Lager; 3. Zulaufrohr; 4. Schaftrohr; 5. Unteres Lager; 6. Sprühteller.



Abbildung 3-13: Infusionsflasche mit der schockgefrorenen Enzymlösungsschicht (1). Senkrechter Pfeil stellt die Auf- und Abbewegungen des Rotorprühers dar.

### 3.3.4 Gefriertrocknungsmethoden

#### **Lyophilisation im konventionellen Gefriertrockner.**

Die Behältnisse mit der auf dem Flaschenboden gefrorenen oder an der Flaschenwand schockgefrorenen Enzymlösung (vgl Kap. 3.3.3.) wurden 16 h lang im Laborgefriertrockner (Christ alpha 2-4, s.Abbildung 3-14) lyophilisiert. Die Stellfläche war unbeheizt. Der Druck in der Trocknungskammer betrug während des Prozesses 0,037 mbar (absolut).

Für die Feststellung der tatsächlichen Trocknungszeit im Laborgefriertrockner wurde die Gewichtsabnahme der mit Lösung befüllten Gefäße während des Gefriertrocknungsprozesses mit der Vakuumwaage der Firma Sartorius aufgezeichnet. Aufgrund der gegebenen Empfindlichkeit der Waage (Auflösungsvermögen 2 g) und einer begrenzten Stellflächengröße konnten ca. 10 Schnappdeckelgläserchen mit jeweils 4 ml schockgefrorener Lösung gefriergetrocknet werden. Das entspricht einem Flüssigkeitsvolumen von 40 ml. Bei allen anderen Versuchsreihen wurden 9 Gefäße mit 5 ml Lösung getrocknet.



Abbildung 3-14: Laborgefriertrockner der Firma Christ (Christ alpha 2-4).

Die Abbildung 3-15 zeigt den Verlauf der Gewichtsabnahme der Gefäße während des Gefriertrocknungsvorgangs. Es ist zu erkennen, dass sich das Gewicht der beladenen Stellfläche nach ca. 10 h nicht mehr ändert. Damit kann die Trocknung nach dieser Zeit beendet werden.

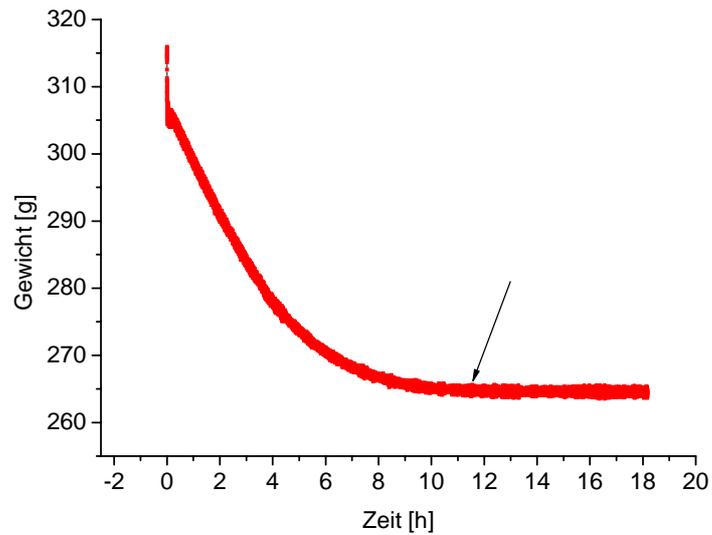


Abbildung 3-15: Gewichtsmonitoring während der konventionellen Gefriertrocknung (Testlösung schockgefroren)

## Fingerlyophilisation

Die Abbildung 3-16 zeigt den Aufbau und die schematische Darstellung des Fingerlyophilisators. Die Infusionsflasche (Gefäß (1)) stellt gleichzeitig die Trocknungskammer dar. Ihr kleines Volumen ermöglicht eine schnelle Evakuierung. Die Lösung (2) ist in einer dünnen Schicht an der Flaschenwand eingefroren und befindet sich in unmittelbarer Nähe (ca.10 mm) zum Kondensator (3) (hier vergrößert dargestellt). Dieser wird mit flüssigem Stickstoff aus dem Vorratsgefäß (7) gekühlt. Das Vorratsgefäß und der Kondensator sind nach dem Prinzip der miteinander kommunizierenden Röhren aufgebaut, bei denen das eine Gefäß nach oben offen und das andere geschlossen ist. Unten sind die Röhren miteinander verbunden. Der Stickstoffpegel im Vorratsgefäß (7) wird auf einer konstanten Höhe gehalten, so dass der Kühlfinger ununterbrochen gefüllt wird. Für die Ableitung des verdampfenden Stickstoffgases wurde ein Entlüftungsrohr (6) in den Kondensator eingeführt. Das Vorratsgefäß wurde außen mit Polystyrol und die Stickstoffleitung mit synthetischem Kautschukrohr (Armaflex<sup>®</sup>) isoliert.

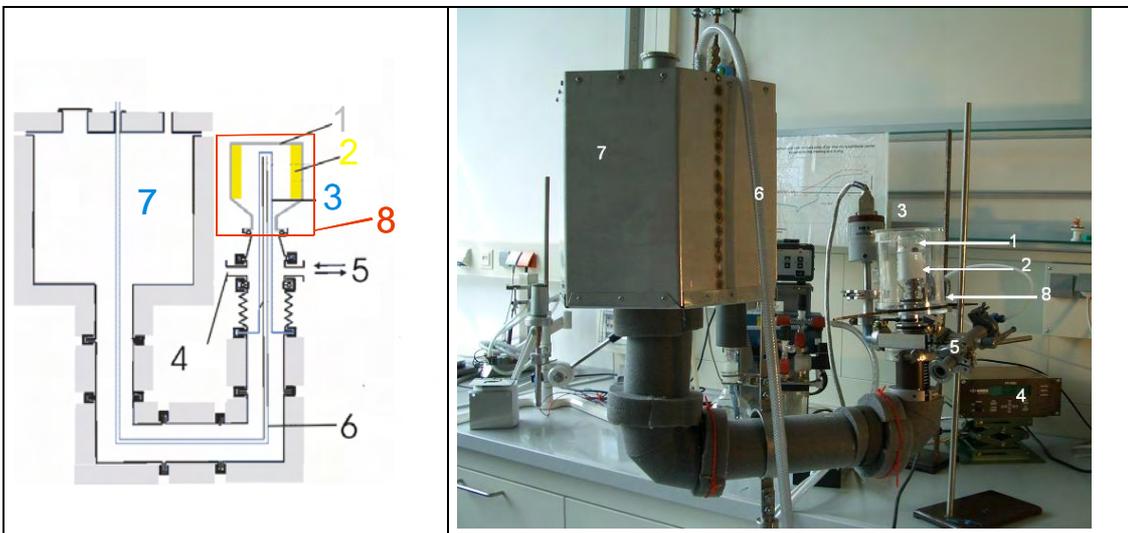


Abbildung 3-16: Aufbau des Fingerlyophilisators, links schematisch . 1. Gefäß, 2. Lyophilisat, 3. Kühlfinger/Kondensator, 4. Druckmessung, 5. Vakuum/ Belüftung, 6. Entlüftungsrohr, 7. Stickstoffvorrat, 8. Heizmantel.

Das Gefäß (1) befindet sich in einem Heizmantel (8), in den mit Hilfe einer Heißluftpistole 45°C warme Luft eingeleitet wird. Dadurch wird die Flasche von außen mit warmer Luft umspült ().

Für die Fingerlyophilisation wurden die Enzymlösungen an der Wand der Infusionsflasche schockgefroren. Die so präparierte Infusionsflasche wurde auf den Kühlfinger des Fingerlyophilisators gesetzt und durch Evakuieren die Trocknung unmittelbar gestartet. Nach 30 Min. wurde mit der Heizung begonnen. Mittels einer Heißluftpistole wurde automatisch im 5 Minuten –Takt 2 Minuten lang eine 45°C warme Luft in den Heizmantel eingeleitet (vgl. Abbildung 3-17). Ein *meltback* während des Prozesses, d.h. ein Antauen der gefrorenen Probe, wurde nicht beobachtet. Die Länge des Trocknungszyklus wurde auf 2,5 h festgelegt. Der Druck in der Flasche während des Prozesses wurde mit dem Kapazitätsmanometer MKS Baratron gemessen und betrug  $1,9 \cdot 10^{-3}$  mbar. Die Belüftung des Produktes erfolgte mit Stickstoffgas.



Abbildung 3-17: Trocknungseinheit des Fingerlyophilisators.

In der Abbildung 3-18 ist der Versuchsaufbau für die Überwachung des Temperaturverlaufs während der Fingerlyophilisation dargestellt.

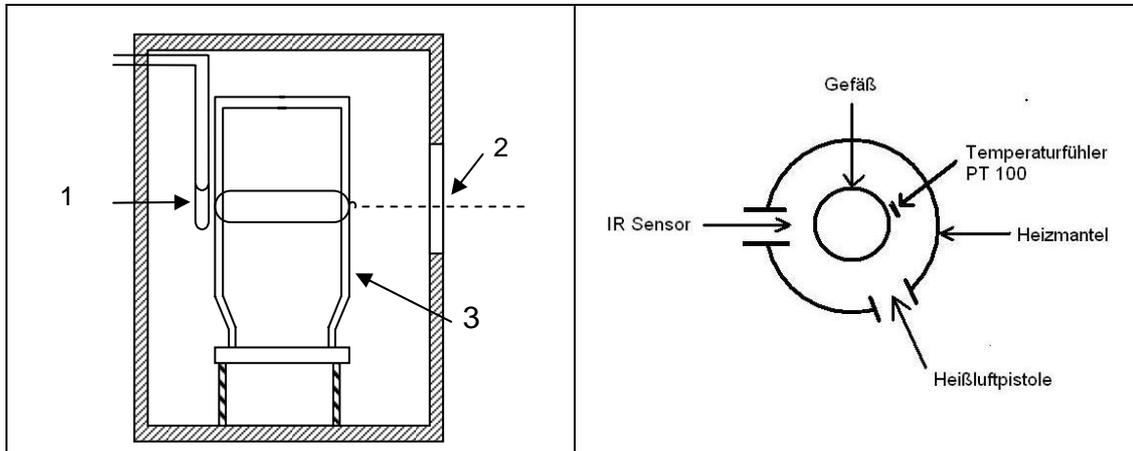


Abbildung 3-18: Überwachung des Temperaturverlaufs während der Fingerlyophilisation. (1) Temperaturfühler Pt100, (2) IR Sensor (3) Gefäß. Links: Seitenansicht; Rechts : Aufsicht.

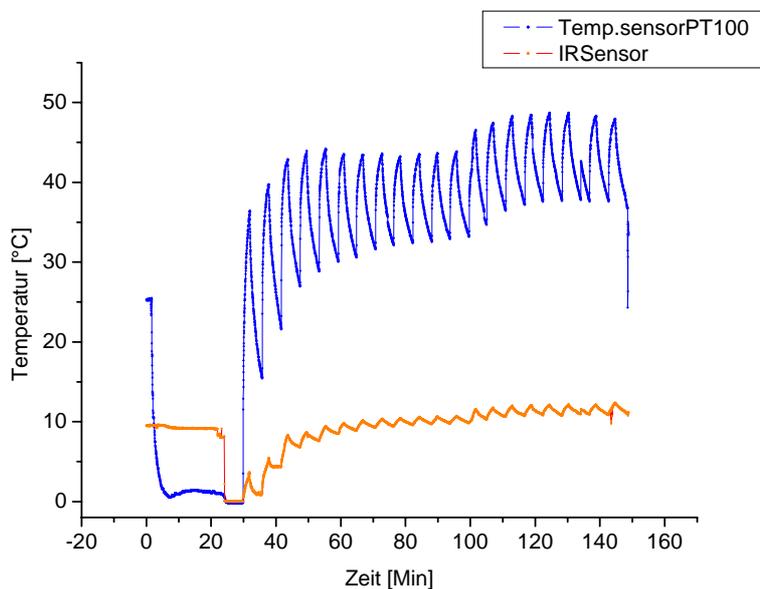


Abbildung 3-19: Temperaturverlauf im Heizmantel bei der Fingerlyophilisation.

Die Abbildung 3-19 zeigt die Temperaturverläufe der verwendeten Sensoren während der Fingerlyophilisation. Eine direkte Messung der Produkttemperatur war aus nachfolgenden technischen Gründen nicht möglich. Die Infusionsflasche

-----  
stand während der Fingerlyophilisation unter Vakuum. Das Anbohren der Wand, um den Temperaturfühler an der Innenseite der Flasche (im Produktkuchen) zu befestigen, war nicht möglich. Der Temperatursensor konnte ebenfalls nicht am Kühlfinger vorbeigeführt werden, da die im Kühlfinger herrschende Temperatur von ca.  $-190^{\circ}\text{C}$  die Messergebnisse verfälschte.

Die Überwachung erfolgte mittels eines Temperatursensors Pt 100, der außen an der Flaschenwand befestigt war (Abbildung 3-18 links (1)), sowie an der Flaschenoberfläche mittels eines IR-Sensors (Infrarotsensor - Infratherm Pyrometer) (Abbildung 3-18 links (2)). Es zeigte sich, dass die Temperatur an der Flaschenoberfläche während des gesamten Prozesses niedriger ist, als im Heizmantel. Zwischen beiden Messmethoden bestand eine Temperaturdifferenz von ca.  $27^{\circ}\text{C}$ . Das kann einerseits daran liegen, dass der Strahl des IR Sensors an der Glasoberfläche reflektiert wird und dadurch eine niedrigere Temperatur gemessen wird, andererseits wird die Flaschenoberfläche während des Prozesses stets von innen durch das eingefrorene Produkt gekühlt. Der Temperaturfühler Pt 100 befindet sich im direkten Heißluftstrom, wodurch die tatsächlich eingeleitete Temperatur detektiert wird. Ist die Heizperiode abgeschlossen, erreicht der Temperatursensor Pt 100 die herrschende Raumtemperatur.

### 3.3.5 Rasterelektronenmikroskopie

Im Rasterelektronenmikroskop wird ein zu vergrößerndes Objekt mit einem Elektronenstrahl in einem bestimmten Muster abgetastet. Die Wechselwirkungen der Elektronen mit dem Objekt werden zur Erzeugung eines Bildes genutzt [31].

Das Rasterelektronenmikroskop (REM) erreicht eine um den Faktor 100 bessere Auflösung als ein Lichtmikroskop. Der maximale Vergrößerungsfaktor liegt bei dem REM bei etwa 500 000:1, während bei einem Lichtmikroskop der Vergrößerungsfaktor in der Regel 2 000:1 beträgt [89].

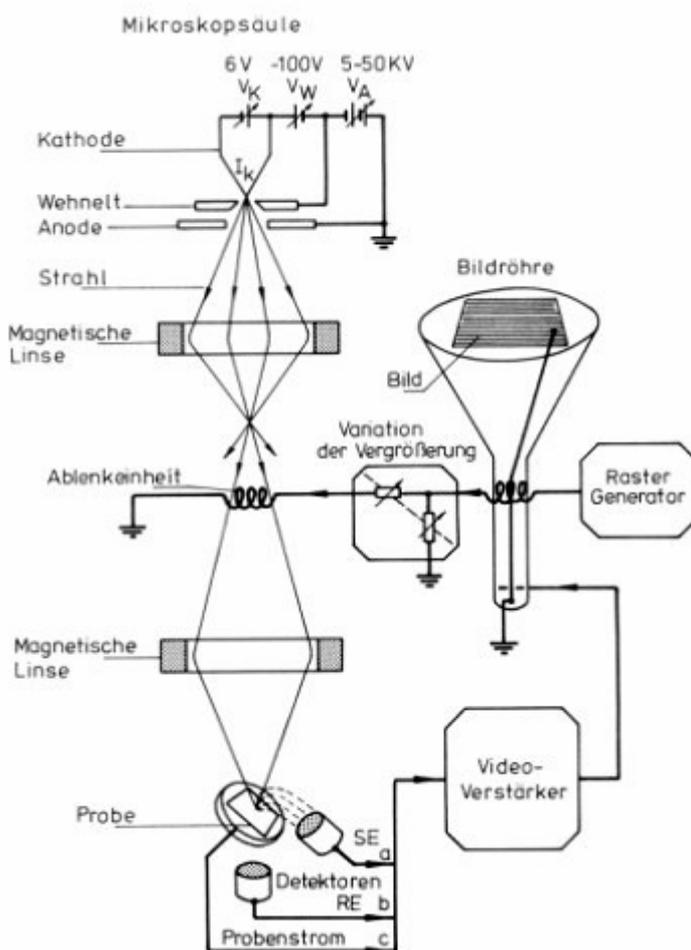


Abbildung 3-20: Schematischer Aufbau eines Rasterelektronenmikroskops [89].

Im Vorfeld der Untersuchung wird die Probe mit einer dünnen Goldschicht überzogen (engl. *sputtern*).

Der Elektronenstrahl wird in einer Elektronenquelle (haarnadelförmiger Draht aus Wolfram oder ein  $\text{LaB}_6$  Kristall) erzeugt. Die emittierten Elektronen werden dann in einem elektrischen Feld mit einer Spannung von ca. 8-30 kV beschleunigt und fein gebündelt auf die Probe geleitet. Diese Elektronen können direkt von der Objektoberfläche gestreut werden oder die Emission von Sekundärelektronen aus der Probenoberfläche bewirken. Die emittierten und gestreuten Elektronen werden von einem Detektor erfasst und elektronisch zu Abbildungen verarbeitet. Im Detektor erfolgt die Umwandlung der eintreffenden Elektronen in Spannung und das Signal wird verstärkt [90]. Die Intensität der erzeugten Spannung spiegelt sich letztlich in der Helligkeit der Lichtpunkte auf dem Abbildungsschirm wieder.

Um Wechselwirkungen mit Atomen und Molekülen in der Luft zu vermeiden, findet der Vorgang im Hochvakuum statt.

### 3.3.6 Röntgendiffraktometrie

Bei Röntgenstrahlen handelt es sich um sehr kurzwellige, elektromagnetische Strahlen mit Wellenlängen von 0,01-10 nm. Damit sind sie um ca. den Faktor 1000 kurzwelliger als das sichtbare Licht. Sie zeigen ebenso wie Licht das Phänomen der Streuung, d.h. Reflexion, Brechung und Beugung und somit auch Interferenz [31].

Das Phänomen der Beugung der Röntgenstrahlen definierter Wellenlänge ( $\lambda$ ) an Kristallen wird bei der Röntgendiffraktometrie (auch Röntgenstrukturanalyse bezeichnet) genutzt. Mit dieser Methode kann der morphologische Zustand und die Kristallstruktur von Substanzen untersucht werden.

Die Beugung der monochromatischen Röntgenstrahlen an Kristallen stellte W.L. Bragg mit dem in Abbildung 3-21 gezeigtem Modell dar.

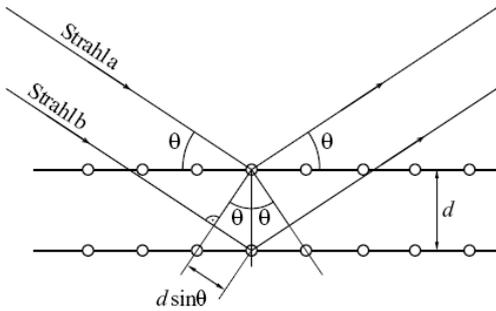


Abbildung 3-21: Bragg'sche Reflexionsbedingung [42].

Die Bedingung, dass eine Reflexion tatsächlich auftritt und ein Reflex zu beobachten ist, wird durch die Bragg'sche Gleichung beschrieben:

$$2d \times \sin \theta = n \times \lambda \quad \text{Gl. 3-1}$$

$n$  = Beugungsordnung

$\lambda$  = Wellenlänge des monochromatischen Röntgenstrahls

$d$  = Abstand der benachbarten Netzebenen im Kristallgitter

$\theta$  = Winkel zwischen Primärstrahl und gebeugtem Strahl

In den Röntgendiffraktogrammen wird der Winkel  $2\theta$  ( $2\theta$ ) gegen die Intensität aufgetragen. Das Verhältnis der Flächen unter den Peaks zur Gesamtfläche spiegelt den kristallinen Anteil in der Probe wider.

Kristalline Bereiche werden durch spitze hohe Peaks, amorphe Bereiche durch flache breite Halos charakterisiert. Der prozentuale Anteil der kristallinen Peaks an der Gesamtfläche wird als Kristallinitätsindex ( $KI$ ) bezeichnet.

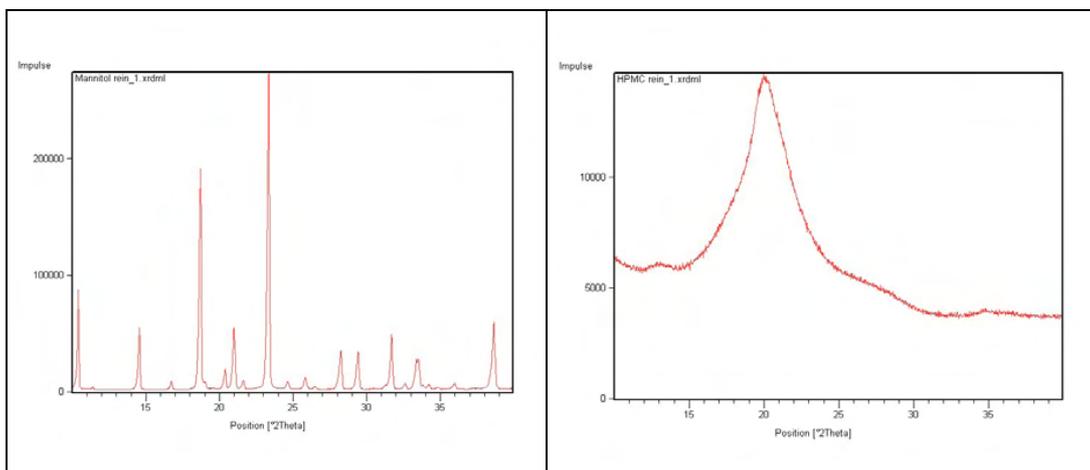


Abbildung 3-22: Röntgendiffraktogramm einer kristallinen Substanz am Beispiel von Mannitol (links) und einer amorphen Substanz am Beispiel von Hypromellose (rechts).

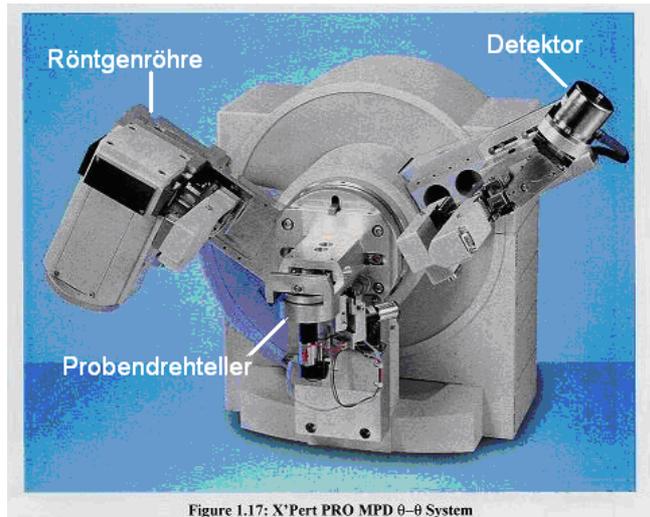


Abbildung 3-23: Röntgendiffraktometer X'Pert Pro PANalytical.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Messungen der Struktur von Lyophilisten mit Hypromellose und Mannitol nach unterschiedlichen Einfriertemperaturen mit dem Diffraktometer X'Pert Pro MPD  $\theta$  -  $\theta$  System der Firma PANalytical durchgeführt. Bei diesem Diffraktometer sind die Röntgenröhre (Special Ceramic Tube Cu LONG Fine Focus) und der Detektor beweglich, die Probenstation dagegen fest montiert (vgl. Abbildung 3-23).

### 3.3.7 Thermische Analysenverfahren

Das europäische Arzneibuch definiert die Thermische Analyse wie folgt:

„Die Thermoanalyse umfasst Methoden, mit deren Hilfe physikalische Eigenschaften einer Substanz als Funktion der Temperatur gemessen werden. Die vorwiegend verwendeten Methoden sind die, bei denen die Änderung des Zustandes oder der Masse der Substanz gemessen werden“ [22].

Thermische Analysenverfahren werden zur Charakterisierung von Arzneistoffen, Arzneiformen und Verpackungsmaterialien herangezogen.

Die thermische Analyse fasst mehrere Methoden zusammen. Dazu gehören die Thermogravimetrie, Differenzthermoanalyse (DTA), Dynamische-Differenz-Kalorimetrie (DDK auch DSC genannt) und Dynamisch-Mechanische-Analyse (DMA).

Bei der Thermoanalyse werden physikalische oder chemische Eigenschaften einer Substanz oder eines Stoffgemisches als Funktion der Temperatur oder Zeit gemessen. Dabei wird die Probe einem kontrollierten Temperaturprogramm unterzogen.

#### 3.3.7.1 Thermogravimetrie

Mit Hilfe der Thermogravimetrischen Analyse (TGA) können Massenänderungen einer Probe in Abhängigkeit von Temperatur und Zeit erfasst werden.

Massenänderungen treten bei Verdampfung, Zersetzung oder chemischen Reaktionen auf.

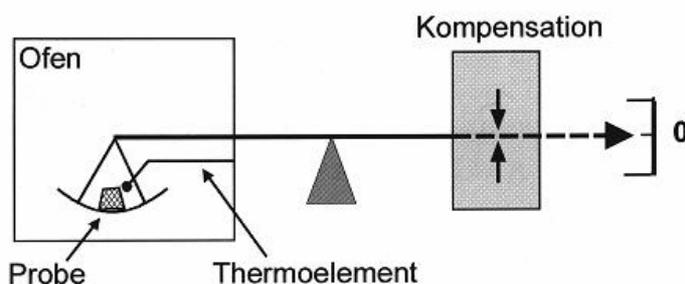


Abbildung 3-24: Schematische Darstellung einer horizontalen Thermowaage [18].

Für die TGA Messungen werden hochempfindliche (Empfindlichkeit im  $\mu\text{g}$ -Bereich) Thermowaagen verwendet (s. Abbildung 3-24). Bei einer TGA wird die Probe einem festen Temperaturprogramm unterzogen [70]. Abbildung 3-25 zeigt einen typischen Verlauf einer TGA Kurve.

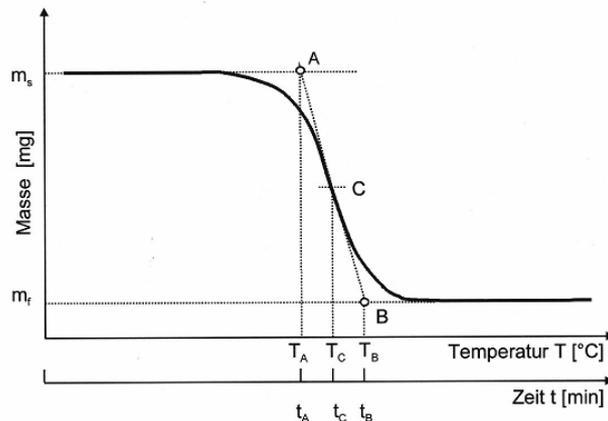


Abbildung 3-25: Typischer Verlauf einer TGA Kurve [18].

Für die Ermittlung der prozentualen Massenabnahme werden anhand von Tangenten die Punkte A, B und C sowie die zugehörigen Temperaturen  $T_A$  als Anfangs-,  $T_B$  als End- und  $T_C$  als Mittenpunkttemperatur bestimmt.

Die Massenabnahme  $M_L$  in % ergibt sich aus den Massen  $m_s$  (vor dem Aufheizen) und  $m_f$  (bei der Endtemperatur  $T_B$ ) anhand folgender Gleichung [18]:

$$M_L = \frac{m_s - m_f}{m_s} \times 100 \quad \text{Gl. 3-2}$$

Bei der Thermogravimetrie wird mit Probenmengen im Milligrammbereich gearbeitet, daher hat die Probenziehung einen erheblichen Einfluss auf das Ergebnis. Es muss gewährleistet werden, dass die Probe repräsentativ für das Gesamtkollektiv ist. Die Empfindlichkeit dieser Methode liegt im  $\mu\text{g}$ -Bereich. Bei der Analyse muss auf die Einwaage und die Heizrate geachtet werden. Ebenso ist der Einsatz eines Spülgases (meistens Stickstoff) für die Heizkammer wichtig, um den Einfluss des Luftsauerstoffes und der Luftfeuchtigkeit auf die Probe zu minimieren [70].

### 3.3.7.2 Dynamisch Mechanische Analyse

Die Dynamisch Mechanische Analyse (DMA) liefert Informationen über die viskoelastischen Eigenschaften einer Probe unter geringer, meist sinusförmigen Belastung.

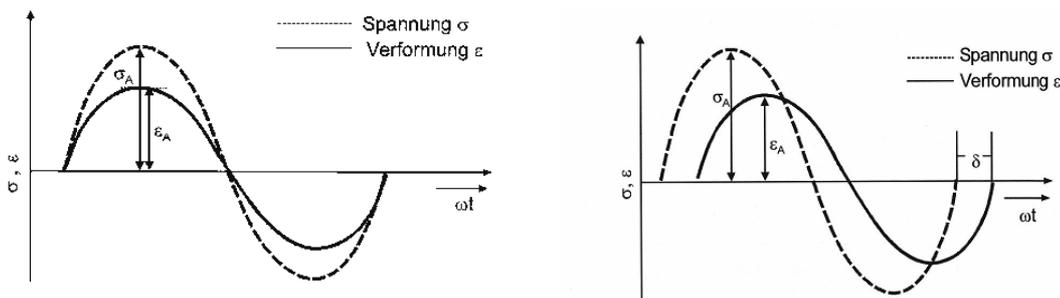


Abbildung 3-26: Sinusförmige Belastung und Antwortsignal eines elastischen (links) und eines viskoelastischen (rechts) Probekörpers.

Die Materialprobe wird zwischen zwei Klemmen eingespannt und mit einer oszillierenden Kraft belastet. Gemessen wird die auftretende Deformation des Materials. Dabei werden die Amplitude und die Phasenverschiebung der Deformation gegenüber der angelegten Kraft bestimmt (s. Abbildung 3-26).

Den schematischen Aufbau eines DMA-Gerätes zeigt die Abbildung 3-27.

Aus den Messwerten können die viskoelastischen Eigenschaften einer Probe als Funktion der Zeit und Temperatur bestimmt werden (Bsp. vgl. Abbildung 3-28).

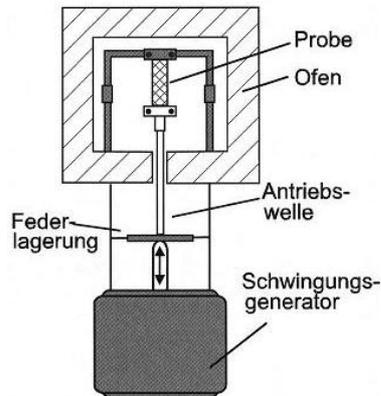


Abbildung 3-27: Schematischer Aufbau eines DMA-Gerätes [18].

Folgende Parameter eines Materials können mit Hilfe der DMA bestimmt werden: das Speichermodul  $E'$ , Verlustmodul  $E''$ , die Glasübergangstemperatur  $T_g$  und der mechanische Verlustfaktor  $\tan \delta$ . Auch Informationen über Aushärtungsvorgänge und rheologische Materialeigenschaften können gewonnen werden.

Das komplexe Modul  $E^*$  kennzeichnet die Materialsteifigkeit der Probe und wird als Quotient zwischen Spannungs- ( $\sigma_A$ ) und Verformungsamplitude ( $\varepsilon_A$ ) bestimmt.

Es ist definiert als:

$$|E^*| = \frac{\sigma_A}{\varepsilon_A} \quad \text{Gl. 3-3}$$

Das komplexe Modul  $E^*$  wird in Speichermodul  $E'$  und Verlustmodul  $E''$  aufgeteilt.

$$|E^*| = \sqrt{(E'(\omega))^2 + (E''(\omega))^2} \quad \text{Gl. 3-4}$$

Das Speichermodul  $E'$  stellt die Steifigkeit des Materials dar und ist proportional zur maximal während der Belastung elastisch gespeicherten Arbeit.

$$E'(\omega) = |E^*| \times \cos \delta \quad \text{Gl. 3-5}$$

Das Verlustmodul  $E''$  ist proportional zur Arbeit, die während einer Belastungsperiode im Material als Wärme verloren geht. Das Verlustmodul spiegelt die viskosen Materialeigenschaften wieder. Die Modulwerte werden mit der Einheit [MPa] oder [N/mm<sup>2</sup>] angegeben.

$$E''(\omega) = |E^*| \times \sin \delta \quad \text{Gl. 3-6}$$

Der Phasenwinkel  $\delta$  kennzeichnet die Phasenverschiebung zwischen der dynamischen Spannung und der dynamischen Verformung eines viskoelastischen Materials, das einer sinusförmigen Schwingung ausgesetzt ist. Er wird in [rad] ausgedrückt.

Der Verlustfaktor  $\tan \delta$  kennzeichnet das Verhältnis zwischen Verlust- und Speichermodul. Er kennzeichnet die mechanische Dämpfung oder innere Reibung eines viskoelastischen Systems. Der Verlustfaktor ist dimensionslos. Elastische Materialien weisen einen niedrigen, nichtelastische Materialien dagegen einen hohen  $\tan \delta$ -Wert auf [18].

$$\tan \delta = \frac{E''(\omega)}{E'(\omega)} \quad \text{Gl. 3-7}$$

Der Verlustfaktor macht eine Aussage über das Verhältnis des viskosen und des elastischen Anteils an der Verformung.

Die Abbildung 3-28 zeigt ein Beispiel für einen typischen Verlauf der DMA-Kurven eines amorphen Kunststoffes.

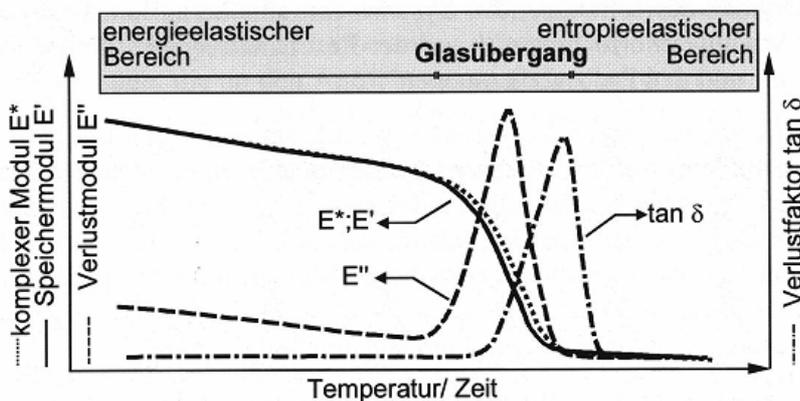


Abbildung 3-28: Schematische Darstellung typischer DMA Kurven eines amorphen Kunststoffes [18].

In der vorliegenden Arbeit wurde die DMA Analyse zur Ermittlung der Glasübergangstemperatur in eingefrorenen Hilfsstofflösungen herangezogen.

### 3.3.7.3 Dynamische Differenzkalorimetrie

Dynamische Differenzkalorimetrie (auch differential scanning calorimetry DSC genannt) ist eine Thermische Analyse, bei der die Wärmemenge festgestellt wird, die bei einer physikalischen oder chemischen Umwandlung eines Stoffes oder Stoffgemisches benötigt oder frei wird.

Die innere Energie, auch Enthalpie  $H$  genannt, des Stoffes oder Stoffgemisches ändert sich. Die auftretende Enthalpieänderung  $\Delta H$  wird nach Gleichung 3-8 definiert:

$$\Delta H = \int c_p \times dT \quad \text{Gl. 3-8}$$

$c_p$  = spezifische Wärmekapazität [ $J/^\circ C \times g$ ]

Dabei ist  $c_p$  die spezifische Wärmekapazität, die angibt, wieviel Energie aufgewendet werden muss, um 1 g Stoff bzw. Stoffgemisch um  $1^\circ C$  zu erwärmen.

Nach DIN 51005 werden zwei Methoden unterschieden:

- DWDK – Dynamische Wärmestrom-Differenzkalorimetrie
- DLDK – Dynamische Leistungs-Differenzkalorimetrie.

Die in der Arbeit aufgeführten Messungen wurden mit der DLDK Methode durchgeführt. Eine DLDK Messzelle, dargestellt in der Abbildung 3-29, besteht aus zwei getrennten kleinen Öfen, die unabhängig voneinander nach einem definierten Grundleistungsheizprogramm geregelt werden. Kommt es beim Aufheizen durch eine exotherme oder endotherme Reaktion zur Temperaturdifferenz  $\Delta T$  zwischen Proben- und Referenzofen wird diese durch verstärktes Heizen des Probeofens idealerweise zu Null ausgeglichen [69].

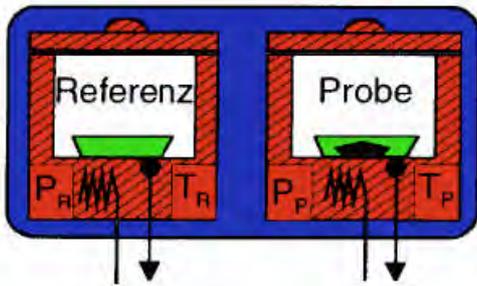


Abbildung 3-29: Schematischer Aufbau – Leistungs-Differenzkalorimeter.[2];  $T_R$  = Temperatur der Referenz;  $T_P$  = Temperatur der Probe;  $P_R$  = Heizleistung des Referenzofens;  $P_P$  = Heizleistung des Probenofens [69].

Vorgänge, die zu einer Erhöhung der Enthalpie (Schmelzen, Verdampfen, Glasübergang) führen, werden als endotherm, Vorgänge, welche die Enthalpie erniedrigen (Kristallisation, Härtingsverlauf, Zersetzen), als exotherm bezeichnet [18]. Die Abbildung 3-30 zeigt eine schematische Darstellung einer DSC Kurve mit Effekten, die detektiert werden können.

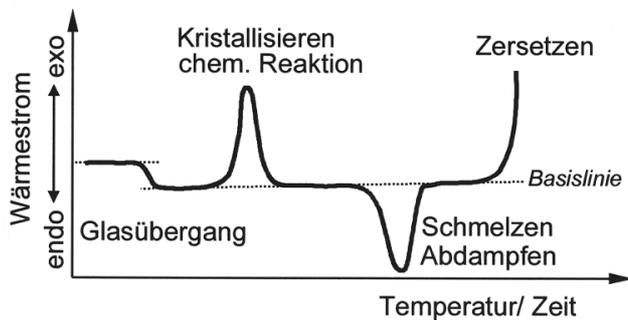


Abbildung 3-30: Schematische Darstellung einer DSC-Kurve mit möglichen Effekten [18].

„Die Änderung der Enthalpie wird mit Hilfe des Kalorimeters als abweichender Verlauf des Wärmestroms  $Q$  von der Basislinie gemessen [18].“ Die Basislinie ist der Teil der Kurve außerhalb des Reaktions- oder Umwandlungsbereichs, auf dieser Geraden ist die Reaktions- und /oder Umwandlungswärme gleich Null.

Da die oben genannte Wärmekapazität  $c_p$  aufwendig zu bestimmen ist, wird bei der Dynamischen Differenzkalorimetrie der Wärmestrom  $Q$ , d.h. die Wärmemenge pro Zeiteinheit und Masse  $m$  ermittelt. Der Wärmestrom ist der spezifischen Wär-

-----  
mekapazität direkt proportional. Der Proportionalitätsfaktor ist die Heizrate  $\nu$ .

$$\frac{Q}{m} = \nu \times c_p$$

Gl. 3-9

In der vorliegenden Arbeit wurde mit der DSC die Glasübergangstemperatur von eingefrorenen Lösungen bestimmt. Dieser für die Gefriertrocknung von Proteinen wichtige Parameter wird im Kapitel 2.2.8 ausführlich behandelt.

Die Messungen der Glasübergangstemperatur mit der DMA und mit der DSC liefern gewöhnlich etwas abweichende Temperaturen. Elias differenziert in seinem Buch zwischen den statischen und dynamischen Messverfahren. Bei statischen Verfahren (DSC) wird die Wärmekapazität bestimmt und bei dynamischen (DMA) wird die Breitlinienkernresonanz, der mechanische und dielektrische Verlust gemessen. Da oberhalb der Glasübergangstemperatur die Kettensegmente in einem Molekül sich mit einer bestimmten Frequenz bewegen, muss die Deformationszeit der Probe je nach angewandter Methode der beobachteten Glasübergangstemperatur folgen [19]. Dies geschieht bei der DSC zügiger als bei der DMA.

### 3.3.8 Laserbeugungsspektroskopie

Die Laserbeugungsspektroskopie wird zur Charakterisierung der Partikelgrößenverteilung und der mittleren Korngröße herangezogen.

Das Messprinzip beruht auf der Ablenkung des einfallenden Lichtstrahls durch die Partikel. Ein Partikel stellt für eine Lichtwelle eine Inhomogenität im Raum dar. An ihm wird die Lichtwelle durch Reflexion, Brechung und Beugung gestreut (Abbildung 3-31).

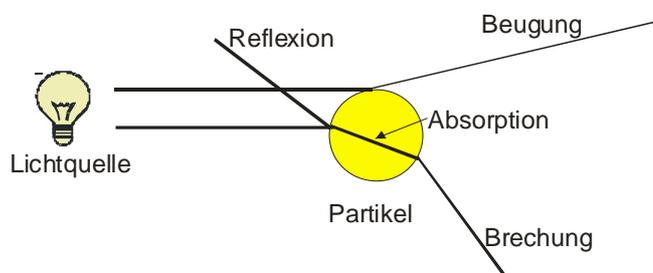


Abbildung 3-31: Lichtstreuung an einem Einzelpartikel.

Das Ausmaß der Beugung ist abhängig von der Partikelgröße und der Wellenlänge des Lichtes. Das Licht wird umso stärker abgelenkt, je kleiner die Teilchen sind. Dabei entsteht ein so genanntes Beugungsmuster.

Die Streulichtstrahlung, die von einem Partikel ausgeht kann anhand des Mie-Parameters  $\alpha$  in drei Bereiche unterteilt werden:

- $\alpha \ll 1$  : Bereich der Rayleigh Streuung: vollständige Symmetrie des Streulichtes  $\rightarrow$  keine Streulichtpartikelanalyse möglich
- $0,1 < \alpha < 10$  : Bereich der Mie-Streuung: Analyse ab ca.  $1 \mu\text{m}$  möglich, je größer  $\alpha$ , umso stärker ist das nach vorne gestreutes Licht
- $\alpha \gg 1$  : Fraunhofer-Bereich: Streulicht nach vorne im Wesentlichen durch Beugung erzeugt, die Streulichtpartikelgrößenanalyse ist unproblematisch [54].

Der Mie-Parameter  $\alpha$  ist definiert als [54]:

$$\alpha = \frac{\pi \cdot x}{\lambda} \quad \text{Gl. 3-10}$$

$x$  = Partikeldurchmesser ;  $\lambda$  = Wellenlänge des Lichtes

Die gebeugten Strahlen werden durch die Fourierlinsen (Sammellinsen) unterschiedlicher Brennweiten auf dem Detektor gebündelt (s. Abbildung 3-32). Die Intensität des Streulichtes auf dem einzelnen Detektorring macht sowohl eine Aussage über die Größe als auch über die Häufigkeit der vorkommenden Partikel.

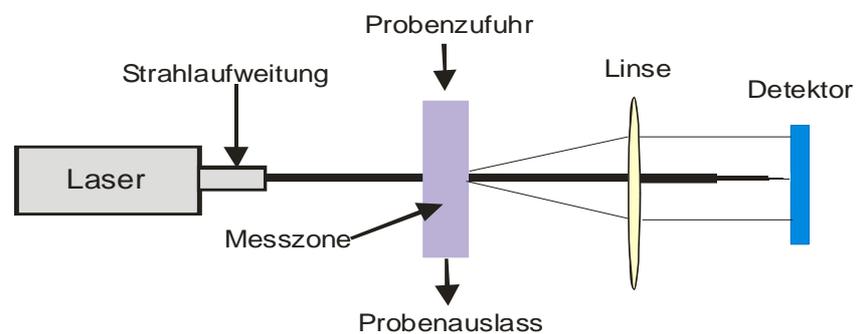


Abbildung 3-32: Aufbau eines HELOS-Laserdiffraktometers.

Die Ergebnisse werden mit Hilfe der Fraunhofer-Berechnung ermittelt. Sie können als Dichteverteilungskurve oder Summenverteilungskurve dargestellt werden. Die Lage der Verteilung wird mit dem charakteristischen Kurvenparameter - dem  $x_{50}$ -Wert [ $\mu\text{m}$ ] beschrieben. Dieser Parameter gibt die Partikelgröße an, unterhalb derer 50 % des Gesamtvolumens der Partikel liegen [97].

In dieser Arbeit wurde die Laserbeugungsspektroskopie zur Tröpfchengrößenbestimmung verwendet, die beim Schockgefrieren der Lösung, mittels eines Rotorsprühers auf die vorgekühlte Flaschenwand aufgesprüht werden. Die Messungen wurden mit dem Laserbeugungsspektrometer HELOS (Helium-Neon-Laser optisches Beugungsspektrometer) durchgeführt, in dem ein Gaslaser ein kohärent monochromatisches Licht der Wellenlänge von 632,8 nm aussendet. Der Messbereich kann unter Verwendung von Fourierlinsen unterschiedlicher Brennweite zwischen 0,1  $\mu\text{m}$  und 8750  $\mu\text{m}$  abgedeckt werden.

Die Ergebnisse wurden als volumenbezogene Dichteverteilungskurve logarithmisch ( $q3lg$ ) dargestellt.

### 3.3.9 Statistik

Die Varianzanalyse wurde mit dem Programm „Jump in 5.1“ (JMP) [39] durchgeführt.

#### Varianzanalyse

Mit der Varianzanalyse wird untersucht, ob verschiedene Stufen eines Einflussfaktors z.B. Einfriertemperatur oder Gefriertrocknungsart statistisch signifikante Wirkungen auf das interessierende Merkmal, hier die Enzymaktivität, zeigen. Die Varianzanalyse quantifiziert außerdem die Effekte.

Dazu wird eine Nullhypothese gestellt, in der angenommen wird, dass alle miteinander verglichenen Stichproben aus einer Population stammen.

Der Prüfung der Nullhypothese dient der  $F$ -Test, in dem die Mittleren Quadrate  $MQ$  zwischen den Gruppen und innerhalb der Gruppen ins Verhältnis gesetzt werden:

$$F = \frac{MQ_{\text{zwischen}}}{MQ_{\text{innerhalb}}} \quad \text{Gl 3-11}$$

Die Mittleren Quadrate ergeben sich aus der Summe der Abweichungsquadrate  $SAQ$  geteilt durch die zugehörigen Anzahlen der Freiheitsgrade:

$$MQ = \frac{SAQ}{df} \quad \text{Gl 3-12}$$

Folgt der errechnete  $F$ -Wert der entsprechenden  $F$ -Verteilung, d.h. ist die errechnete Größe kleiner, als der  $F$ -Wert in der Tabelle für die gegebenen Freiheitsgrade, gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen den geprüften Gruppen. Ist der  $F$ -Wert größer, unterscheiden sie sich signifikant. Das Signifikanzniveau gibt der  $p$ -Wert an: bei  $p=0,05$  besteht ein signifikanter Einfluss, bei  $p=0,01$  ist er sehr signifikant und bei  $p=0,001$  hochsignifikant [99].

### t-Test nach Student

Dieser Test dient dem Vergleich zweier unabhängiger Stichproben, die der Normalverteilung folgen, hinsichtlich ihrer Mittelwerte. Zuerst muss geprüft werden, ob sich die Varianzen signifikant voneinander unterscheiden. Dazu wird die Prüfgröße  $F$  aus dem Verhältnis von  $s^2_{minor}$  (kleinere der beiden Standardabweichungen) und  $s^2_{major}$  (größere der beiden Standardabweichungen) berechnet:

$$F = \frac{s_{major}^2}{s_{minor}^2} \quad \text{Gl. 3-13}$$

Abhängig vom Ergebnis dieser Prüfung wird die  $t$ -Größe berechnet:

Bei Varianzhomogenität gilt:

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{(n_1 - 1) \times s_1^2 + (n_2 - 1) \times s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}} \times \sqrt{\frac{n_1 \times n_2}{n_1 + n_2}} \quad \text{Gl. 3-14}$$

$$df = n_1 + n_2 - 2 \quad \text{Gl. 3-15}$$

Wenn sich die Varianzen signifikant unterscheiden, wird  $t$  nach folgender Formel berechnet:

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad \text{Gl. 3-16}$$

$$df = \frac{(c_1 + c_2)^2}{\frac{c_1^2}{n_1 - 1} + \frac{c_2^2}{n_2 - 1}} \quad \text{Gl. 3-17}$$

Dabei errechnet sich  $c_1$  und  $c_2$

$$c_1 = \frac{s_1^2}{n_1} \quad \text{und} \quad c_2 = \frac{s_2^2}{n_2} \quad \text{Gl. 3-18}$$

Der errechnete  $t$ -Wert wird mit dem für die gegebenen Freiheitsgrade tabellierten Wert verglichen. Ist er größer, besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den

-----  
 Stichproben. Das Signifikanzniveau kann aus den statistischen Tabellen entnommen werden [99].

### **Streudiagramme (engl. *leverage plot*)**

Leverage plots dienen der Darstellung der Signifikanz der Effekte im errechneten Modell. Sie zeigen, wie gut das Modell an die gemessenen Werte angepasst ist.

Ein Regressionsmodell wird wie folgt beschrieben:

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + \varepsilon \quad \text{Gl. 3-19}$$

Hierbei sind  $y$  die Zielgröße (hier Enzymaktivität),  $a_0$  der Mittelwert, und  $x_1$ ,  $x_2$  und  $x_3$  die untersuchten Faktoren: Einfrieren, Kryoprotektoren und Gefriertrocknungsart sind.  $a_1$ ,  $a_2$  und  $a_3$  stellen die Haupteffekte des linearen Teils,  $\varepsilon$  die Reststreuung des Modells dar.

Im *leverage plot* werden zwei Linien dargestellt, eine waagerechte und eine aufsteigende oder absteigende Gerade. Um diese Linien herum sind die wahren Meßpunkte angeordnet. Die waagerechte Linie bildet den absoluten Mittelwert ab. Die auf- bzw. absteigende Gerade zeigt den Verlauf der Punkte für das Modell [39].

Der Abstand von jedem Punkt zu der schrägen Linie misst das Residuum (die Differenz) zum Modell. Die Summe der Abweichungsquadrate dieser Residuen bildet den sog. Error Sum of Squares (SSE).

Der Abstand eines jeden Meßpunktes zu der waagerechten Linie stellt die Differenz zum Modell dar, in dem die Effekte nicht berücksichtigt wurden.

Der *leverage plot* interpretiert einen Effekt in der gleichen Weise wie eine einfache Regression. An die aufsteigende Gerade werden die 95% Konfidenzintervalllinien (vgl. Abbildung 3-33) gelegt. Kreuzen die Konfidenzintervalllinien die Mittelwertgerade, dann ist der untersuchte Effekt signifikant. Wird die Mittelwertlinie von den Kurven des Konfidenzintervalls umschlossen, dann ist der Effekt nicht signifikant. Die folgende Abbildung zeigt Beispiele von *leverage plots*, bei den die Effekte der Faktoren signifikant (links) und nicht signifikant (rechts) sind. Zusätzlich wird in diesen Diagrammen der p-Wert dargestellt.

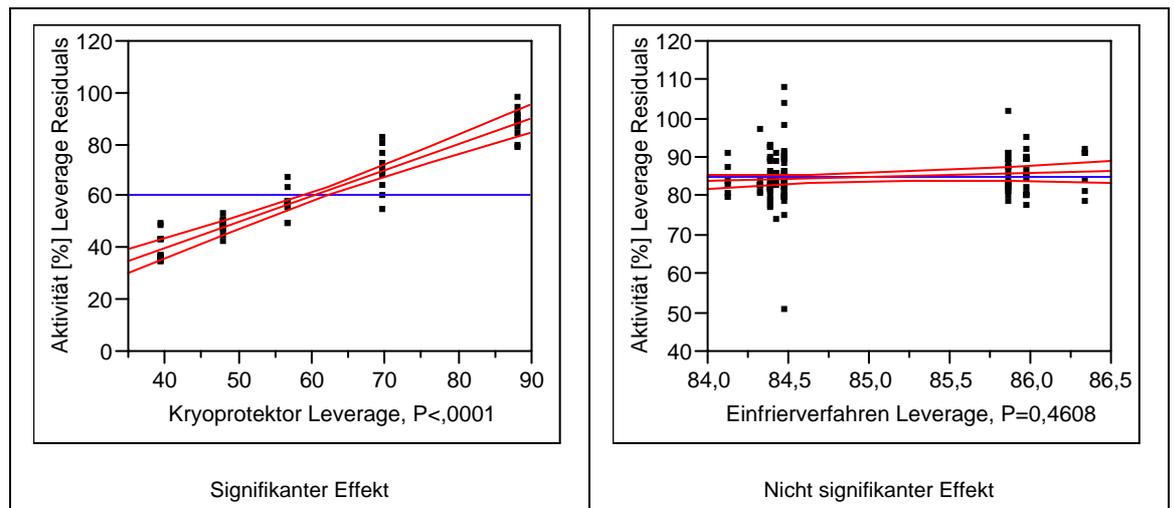


Abbildung 3-33: Beispiel eine Streudiagrammes (engl. Leverage plot) [39].

Der Standardfehler auch Stichprobenfehler genannt, ist ein Streuungsmaß für eine Stichprobenverteilung. Der Standardfehler des Stichproben-Mittelwertes ist definiert als der Quotient aus der Standardabweichung und der Wurzel des Stichprobenumfangs. Er gibt die Streuung der Stichproben-Mittelwerte von gleichgroßen, zufällig aus einer Grundgesamtheit gezogenen Stichproben um den wahren Grundgesamtheitsmittelwert  $\mu$  an [39].

## 4. Ergebnisse und Auswertung

### 4.1 Inaktivierung von $\beta$ -Galactosidase nach Einfrieren und Gefriertrocknung

In den nachfolgend vorgestellten Versuchsreihen wurde die Inaktivierung von  $\beta$ -Galactosidase nach dem Einfrieren ohne Gefriertrocknen und nach Einfrieren mit Gefriertrocknung untersucht. Der Einfluss der Hilfsstoffe Hypromellose und Mannitol auf die Aktivitätsänderung wurde auf zwei Niveaus getestet:

- Hypromellose 0,5% und 1%
- Mannitol 5% und 10%

Als Referenz diente eine Lösung ohne Kryoprotektoren. Die Enzymlösungen wurden bei verschiedenen Temperaturen:  $-27^{\circ}\text{C}$ ,  $-78^{\circ}\text{C}$  und bei  $-196^{\circ}\text{C}$  eingefroren (vgl. Kap. 3.3.3).

Die Proben wurden sowohl in einem konventionellen Gefriertrockner als auch in einem Fingerlyophilisator gefriergetrocknet.

Im ersten Fall wurde die Lösung auf dem Boden der 100 ml-Infusionsflaschen bei  $-27^{\circ}\text{C}$  bzw.  $-78^{\circ}\text{C}$  eingefroren sowie auf die unter  $-190^{\circ}\text{C}$  abgekühlte Wand der Infusionsflaschen aufgesprüht und schockgefroren.

Die Proben für die Fingerlyophilisation müssen aufgrund des Aufbaus des Fingerlyophilisators an der Flaschenwand eingefroren werden. Deswegen wurden sie für dieses Verfahren schockgefroren.

Für die Prüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurden für jede Versuchsreihe (z.B. Schockgefrieren von  $\beta$ -Galactosidase ohne Kryoprotektoren) drei Proben unter gleichen Bedingungen verarbeitet. Die Aktivität jeder Probe wurde anschließend zweimal vermessen. Die Standardabweichung wurde jeweils in den dazugehörigen Tabellen eingetragen.

### 4.1.1 Gehaltsbestimmung von $\beta$ -Galactosidase

Für die Kalibrierreihen wurden fünf bis sechs  $\beta$ -Galactosidase-Lösungen im Phosphatpuffer (pH 7) im Konzentrationsbereich zwischen 0,05 mg/ml und 1 mg/ml hergestellt. Für die Anfertigung der Kalibrier-Lösungen wurde eine Stammlösung verwendet. Aufgrund größerer zeitlicher Abstände zwischen den Versuchsreihen wurde viermal kalibriert. Die Messungen fanden bei Raumtemperatur (ca. 20°C) statt. Die Bauform des Spektrophotometers lässt keinen gleichzeitigen Einsatz der Kühlung und des Küvettenrührers zu, der zur vollständigen Vermischung der Enzymlösung eingesetzt wurde. Alle Kalibrierreihen werden im Kap. 7.2 Anhang aufgeführt.

Gemessen wurde die zeitabhängige Absorptionzunahme des Farbstoffes Ortho-Nitro-Phenol (ONP), der bei der enzymatischen Reaktion entsteht (Aktivitätsbestimmung von  $\beta$ -Galactosidase s. Kap. 3.3.1). Anschließend wurden die Steigungen der Absorptionsgeraden berechnet.

Die Auftragung der Mittelwerte (n=3) der errechneten Steigungen gegen die Enzymkonzentration in mg/ml ergab die Kalibriergeraden für Aktivitätsbestimmungen des Enzyms (s. Abbildung 4-1).

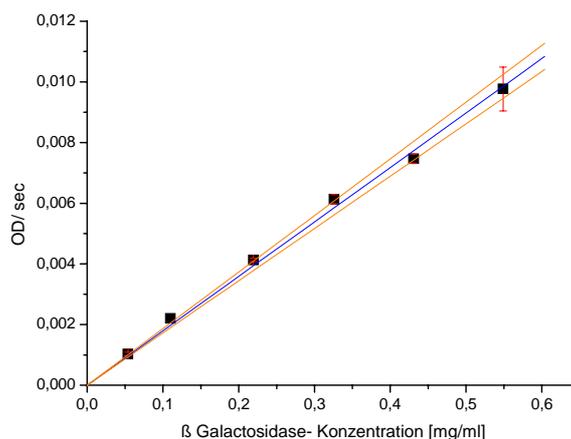


Abbildung 4-1: Kalibrierreihe  $\beta$ -Galactosidase. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei Messungen (schwarze Kästchen) und ihre Standardabweichung. Die mittlere Linie stellt die lineare Regression dar:  $y=0,0179x$   $R^2=0,9953$ ; die äußeren Linien geben das 95% Konfidenzintervall an. Die Standardabweichungen unterhalb der Konzentration von 0,5 mg/ml sind kleiner als die Symbole.

## 4.1.2 Inaktivierung von $\beta$ -Galactosidase nach Einfrieren und Wiederauftauen

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Inaktivierung von  $\beta$ -Galactosidase bei den Einfrierversuchen dargestellt. In den Tabellen der Teilversuchsreihen (z.B. Einfrieren ohne Kryoprotektoren) wurden die Enzymrestaktivitäten nach den drei Einfriertemperaturen Schockeinfrieren, Einfrieren bei  $-78^{\circ}\text{C}$  und bei  $-27^{\circ}\text{C}$  zusammengefasst.

Aufgrund verschiedener Referenzmessungen (Aktivität unbehandelter Enzymlösung am betreffenden Versuchstag) wurden die nachfolgenden Ergebnisse bei manchen Versuchsreihen in getrennten Tabellen zusammengefasst.

### Einfrieren ohne Kryoprotektoren.

Tabelle 4-1: Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase nach dem Einfrieren ohne Kryoprotektoren.

Aktivität									
	vor Einfrieren			nach Schock einfrieren Ziff: 1111		nach Einfrieren $-78^{\circ}\text{C}$ Ziff: 1211		nach Einfrieren $-27^{\circ}\text{C}$ Ziff: 1311	
	IE/ml	%		IE/ml	%	IE/ml	%	IE/ml	%
Probe 1	9,027	96,2	Probe 1	4,855	82,8	0,110	1,2	0,053	0,6
				5,802	99,0	0,114	1,2	0,029	0,3
Probe 2	9,359	99,8	Probe 2	5,477	93,4	0,125	1,3	0,035	0,4
				5,605	95,6	0,124	1,3	0,035	0,4
Probe 3	9,759	104,0	Probe 3	5,682	96,9	0,13	1,4	0,029	0,3
				5,046	86,1	0,128	1,4	0,025	0,3
<b>MW</b>	<b>9,382</b>	<b>100,0</b>	<b>MW</b>	<b>5,412</b>	<b>92,3</b>	<b>0,122</b>	<b>1,3</b>	<b>0,035</b>	<b>0,4</b>
Std. Abw.	0,367	3,9	Std. Abw.	0,371	6,33	0,008	0,1	0,009	0,1

$\beta$ -Galactosidase wird nach dem Einfrieren bei  $-78^{\circ}\text{C}$  und  $-27^{\circ}\text{C}$  fast vollständig inaktiviert. Das Schockeinfrieren hingegen schädigt das Enzym kaum.

**Einfrieren mit 0,5% Hypromellose.**

Tabelle 4-2: Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase nach dem Einfrieren mit 0,5% Hypromellose.

Aktivität									
	vor Einfrieren			nach Schock-einfrieren Ziff: 1121		nach Einfrieren -78°C Ziff: 1221		nach Einfrieren -27°C Ziff: 1321	
	IE/ml	%		IE/ml	%	IE/ml	%	IE/ml	%
Probe 1	5,497	102,1	Probe 1	4,759	88,3	5,710	101,1	0,224	2,7
	5,436	100,9		4,838	89,8	5,242	92,83	0,244	2,9
Probe 2	5,470	101,6	Probe 2	4,555	84,6	5,210	92,3	0,229	2,7
	5,392	100,1		4,648	86,3	5,772	102,2	0,253	3,0
Probe 3	5,562	103,2	Probe 3	5,075	94,2	5,522	97,8	0,242	2,9
	4,963	92,1		4,839	89,8	5,626	99,7	0,248	3,0
<b>MW</b>	<b>5,387</b>	<b>100,0</b>	<b>MW</b>	<b>4,786</b>	<b>88,8</b>	<b>5,514</b>	<b>97,7</b>	<b>0,24</b>	<b>2,9</b>
Std. Abw.	0,215	4,0	Std. Abw.	0,180	3,3	0,238	4,2	0,011	0,1

Die Restaktivität von  $\beta$ -Galactosidase nach dem Einfrieren bei -78°C wird gegenüber dem Einfrieren ohne Kryoprotektoren durch Zusatz von 0,5% Hypromellose signifikant erhöht. Beim Schockgefrieren und Einfrieren bei -27°C ist kein Unterschied zu der Referenzmessung (Einfrieren ohne Kryoprotektoren) zu erkennen.

**Einfrieren mit 1% Hypromellose.**

Tabelle 4-3: Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase nach dem Schockgefrieren mit 1% Hypromellose.

	Aktivität			
	vor Einfrieren		nach Schockgefrieren Ziff: 1131	
	IE /ml	%	IE /ml	%
Probe 1	2,004	88,9	2,053	91,1
	2,260	100,3	2,194	97,3
Probe 2	2,309	102,5	2,188	97,1
	2,375	105,4	2,172	96,4
Probe 3	2,357	104,6	2,219	98,5
	2,217	98,4	2,178	96,6
<b>MW</b>	<b>2,254</b>	<b>100,0</b>	<b>2,167</b>	<b>96,2</b>
Std.Abw.	0,136	6,0	0,058	2,6

Tabelle 4-4 zeigt das Ergebnis der Aktivitätsbestimmung von  $\beta$ -Galactosidase nach Einfrieren mit 1% Hypromellose bei  $-78^{\circ}\text{C}$ . Es konnten lediglich die Aktivitäten von zwei Proben dargestellt werden, da eine Probe verloren ging.

Tabelle 4-4: Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase nach dem Einfrieren bei  $-78^{\circ}\text{C}$  mit 1% Hypromellose.

	Aktivität			
	vor Einfrieren		nach Einfrieren $-78^{\circ}\text{C}$ Ziff: 1231	
	IE/ml	%	IE/ml	%
Probe 1	6,205	104,1	5,257	88,2
	5,807	97,4	5,228	87,7
Probe 2	5,848	98,1	5,239	87,9
	5,988	100,4	5,318	89,2
<b>MW</b>	<b>5,962</b>	<b>100,0</b>	<b>5,260</b>	<b>88,2</b>
Std. Abw.	0,219	3,7	0,040	0,67

Tabelle 4-5: Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase nach dem Einfrieren bei  $-27^{\circ}\text{C}$  mit 1% Hypromellose

	Aktivität			
	vor Einfrieren		nach Einfrieren $-27^{\circ}\text{C}$ Ziff: 1331	
	IE/g	%	IE/g	%
Probe 1	7,449	101,1	2,322	31,5
	7,260	98,6	2,325	31,6
Probe 2	7,777	105,6	2,309	31,3
	6,944	94,3	2,070	28,1
Probe3	7,571	102,8	2,161	29,3
	7,199	97,7	2,211	30,0
<b>MW</b>	<b>7,367</b>	<b>100,0</b>	<b>2,233</b>	<b>30,3</b>
Std. Abw.	0,295	4,0	0,105	1,4

Vergleicht man die Restaktivität von  $\beta$ -Galactosidase nach dem Einfrieren mit 1% Hypromellose mit den Ergebnissen ohne Kryoprotektoren und mit Zusatz von 0,5% Hypromellose, so zeigt sich nach dem Einfrieren bei  $-27^{\circ}\text{C}$  bei 1% Hypromellosezusatz eine deutliche Erhöhung der Restaktivität. Die Aktivität nach dem Schockgefrieren und Einfrieren bei  $-78^{\circ}\text{C}$  verändert sich im Vergleich zum Einfrieren mit 0,5% Hypromellose nicht d.h., dass die Erhöhung der Kryoprotektorkonzentration keine Verbesserung für die Restaktivität von  $\beta$ -Galactosidase nach diesen beiden Einfrierbedingungen mit sich bringt.

**Einfrieren mit 5% Mannitol.**

Tabelle 4-6: Aktivität von  $\beta$  Galactosidase nach dem Einfrieren mit 5 % Mannitol.

	Aktivität							
	vor Einfrieren		nach Schockgefrieren Ziff: 1141		nach Einfrieren -78°C Ziff: 1241		nach Einfrieren -27°C Ziff: 1341	
	IE/ml	%	IE/ml	%	IE/ml	%	IE/ml	%
Probe 1	6,466	90,5	6,913	96,79	4,665	64,2	3,890	53,6
	7,095	99,3	6,789	95,06	4,556	62,7	4,591	63,2
Probe 2	6,948	97,3	6,375	89,26	4,593	63,2	5,474	75,4
	7,095	99,3	6,941	97,19	5,107	70,3	5,232	72,0
Probe 3	7,568	106,0	6,709	93,94	5,238	72,1	5,254	72,3
	7,680	107,5	5,958	83,42	5,386	74,2	4,966	68,4
<b>MW</b>	<b>7,142</b>	<b>100,0</b>	<b>6,745</b>	<b>94,45</b>	<b>4,924</b>	<b>67,8</b>	<b>4,901</b>	<b>67,5</b>
Std. Abw.	0,441	6,2	0,380	5,33	0,363	5,0	0,580	8,0

Die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase bleibt nach dem Schockgefrieren mit 5% Mannitol weitgehend erhalten. Nach dem Einfrieren bei -78° und -27°C wird das Enzym nur wenig geschädigt. Gegenüber dem Einfrieren ohne Kryoprotektoren kommt es zu einer deutlichen Erhöhung der Enzymaktivität bei Einfrieren bei -78°C und -27°C. Hier wirkt der Zusatz von 5% Mannitol kryoprotektiv.

**Einfrieren mit 10% Mannitol.**

Tabelle 4-7: Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase nach Schockgefrieren mit 10 % Mannitol.

	Aktivität			
	vor Einfrieren		nach Schockgefrieren Ziff: 1151	
	IE/g	%	IE/g	%
Probe 1	2,833	92,1	3,20	104,1
	3,144	102,3	2,633	85,7
Probe 2	3,168	103,0	3,008	97,8
	3,637	118,3	2,756	89,6
Probe 3	2,916	94,9	2,766	90,0
	2,749	89,4	3,225	104,9
<b>MW</b>	<b>3,074</b>	<b>100,0</b>	<b>2,931</b>	<b>95,3</b>
Std. Abw.	0,322	10,5	0,249	8,1

Tabelle 4-8: Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase nach dem Einfrieren bei -27°C und -78°C mit 10 % Mannitol.

\*Messung mißlungen.

	Aktivität					
	vor Einfrieren		nach Einfrieren -78°C Ziff: 1251		nach Einfrieren -27°C Ziff: 1351	
	IE/ml	%	IE/ml	%	IE/ml	%
Probe 1	2,539	92,8	2,148	78,5	0,589	21,5
	2,832	103,5	2,139	78,2	0,583	21,3
Probe 2	2,782	101,6	2,088	76,3	0,590	21,6
	2,767	101,1	1,886	68,9	0,547	20,0
Probe 3	2,764	101,0	2,515	91,9	0,601	22,0
	*	*	1,923	70,3	0,604	22,1
<b>MW</b>	<b>2,737</b>	<b>100,00</b>	<b>2,117</b>	<b>77,3</b>	<b>0,586</b>	<b>21,4</b>
Std. Abw.	0,114	4,17	0,224	8,2	0,021	0,8

Die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität nach dem Einfrieren bei -27°C mit 10% Mannitol sinkt überraschenderweise um weitere 46 % gegenüber der Restaktivität in der

## Ergebnisse und Auswertung

---

Lösung mit 5 % Mannitol. Beim Einfrieren bei  $-78^{\circ}\text{C}$  und Schockefrieren kommt es ähnlich wie bei Hypromellosezusatz trotz Erhöhung der Kryoprotektor-Konzentration zu keiner Verbesserung der Enzymaktivität.

#### 4.1.2.1 Zusammenfassung der Einfrierversuche mit $\beta$ -Galactosidase.

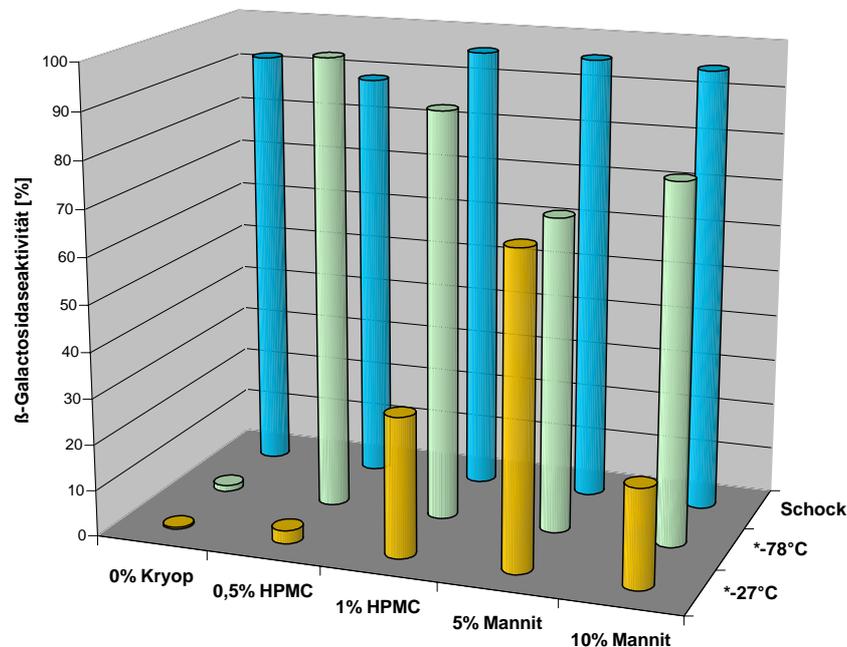


Abbildung 4-2: Abhängigkeit der  $\beta$ -Galactosidaseaktivität von den Einfrierbedingungen mit und ohne Kryoprotektorzusatz.

Die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase nach dem Schockgefrieren liegt bei über 90% unabhängig davon, ob einer der beiden Kryoprotektoren zugesetzt wird oder nicht. Damit erscheint dieses Einfrierverfahren als das am besten geeignete für die Verarbeitung dieses Enzyms. Der Effekt ist statistisch signifikant (vgl. Tabelle 4-10).

Nach dem Einfrieren bei  $-78^{\circ}\text{C}$  liegt die Restaktivität in den Lösungen mit Kryoprotektoren deutlich höher als in der Lösung ohne Kryoprotektorzusatz. Hypromellose wirkt bei dieser Einfriertemperatur etwas stärker kryoprotektiv als Mannitol. Die Restaktivität beträgt in den Hypromellose-Lösungen 90-100% und in der Mannitol-Lösung 70-80%. Eine Erhöhung der Hypromellosekonzentration von 0,5% auf 1% bringt keine Verbesserung der Aktivität mit sich, sondern verringert sie ein wenig. Dagegen ist ein geringer Anstieg in der Restaktivität von  $\beta$ -Galactosidase in der Lösung mit 10% Mannitol gegenüber der mit 5% Mannitol zu beobachten.

## Ergebnisse und Auswertung

Unter allen drei untersuchten Einfriertemperaturen schädigt das Einfrieren bei  $-27^{\circ}\text{C}$  das Enzym am stärksten. Der Zusatz von 0,5% Hypromellose in der Lösung führt zu keiner signifikanten Erhöhung der Aktivität. In der Lösung mit 1% Hypromellose kommt es zu einem deutlichen Anstieg der Restaktivität, diese liegt bei 30%.

Die  $\beta$ -Galactosidase-Lösung mit 5% Mannitol liefert das beste Ergebnis nach dem Einfrieren bei  $-27^{\circ}\text{C}$ , die Restaktivität liegt bei 70%.

### 4.1.2.1.1. Statistische Auswertung der Einfrierversuche von $\beta$ -Galactosidase

Die Statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mit dem Programm JMP 5.1 durchgeführt [39]. Die zugrunde liegende Versuchsplanung wurde im Kap. 3.1 genauer erläutert.

Tabelle 4-9: Varianzanalyse der Ergebnisse des Einfrierens von  $\beta$ -Galactosidase. df: Anzahl der Freiheitsgrade; SAQ: Summe der Abweichungsquadrate; MQ: das mittlere Abweichungsquadrat;  $F_{\text{Tab}}$ : kritischer F-Wert, (Erläuterungen vgl. Kap. 3.3.9)

Modell						
Quelle	df	SAQ	MQ	F-Wert	Prob>F	Bewertung
Einfrierbedingungen	2	69873,4	34936,7	587,6	<0,0001	Hoch signifikant
Kryoprotektor	4	21455,7	5363,9	90,3	<0,0001	Hoch signifikant
Wechselwirkungen	8	28756,4	3594,5	60,5	<0,0001	Hoch signifikant
Gesamt						
Quelle	df	SAQ	MQ	F-Wert	$F_{\text{Tab}}$	Bewertung
Effekt	14	120598,45	8614,18	144,9	1,84	signifikant
Fehler	73	4339,79	59,45			
C. Total	87	124938,24				

Die Einflüsse der einzelnen Faktoren und die Wechselwirkungen zwischen den Faktoren Einfrieren und Kryoprotektor zeigt der erste Abschnitt vonr Tabelle 4-9 (Modell).

Den höchsten Einfluss auf die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase besitzt das Einfrierverfahren. Dagegen beeinflusst der Faktor Kryoprotektor die Enzymaktivität sechsfach weniger. Der Effekt der Wechselwirkungen zwischen den Faktoren Einfrieren und Kryoprotektor ist noch etwas geringer, aber alle Effekte sind signifikant. Der relativ niedrige p-Wert im zweiten Teil der Tabelle zeigt, dass die Effekte stark streuen.

In den nachstehenden Tabellen und Diagrammen soll der Einfluss der einzelnen Faktoren und deren Wechselwirkungen auf die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase näher untersucht werden.

### **Einfluss der Einfriertemperatur auf die Aktivität von $\beta$ -Galactosidase.**

Nachfolgend wird der Einfluss der drei Einfrierbedingungen: Schockgefrieren bei  $-196^{\circ}\text{C}$ , Einfrieren bei  $-78^{\circ}\text{C}$  und  $-27^{\circ}\text{C}$  auf die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase statistisch ausgewertet und verglichen.

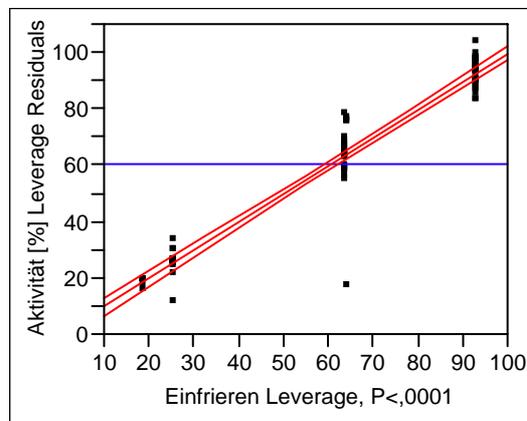


Abbildung 4-3: Einflussdiagramm der Einfriertemperatur auf die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase.

Tabelle 4-10: Einfluss des Einfrierverfahrens auf die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase.

<i>Faktor</i>	<i>Skalierte Schätzwerte</i>	<i>Standard-Fehler</i>	<i>t Wert</i>	<i>Prob&gt; t </i>
<b>Gesamtmittel</b>	60,6345	0,8236	73,63	<0,0001
<b>Einfrieren [-27°C]</b>	-36,1044	1,1684	-30,90	<0,0001
<b>Einfrieren [-78°C]</b>	3,4756	1,1684	2,97	0,0040
<b>Einfrieren [Schock]</b>	32,6289	1,1571	28,20	<0,0001

Die Einflüsse der Einfrierverfahren auf die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase sind in Abbildung 4-3 und Tabelle 4-10 zusammengefasst. Der Mittelwert über alle Beobachtungen (Gesamtmittel) wird in Abbildung 4-3 als eine waagerechte Linie dargestellt. Die aufsteigenden Geraden geben das Maß des Effektes Einfriertemperatur auf die abhängige Variable Aktivität wider. Je steiler sie sind, umso ausgeprägter ist der Effekt (vgl. Kap 3.3.9 Statistik).

Die skalierten Schätzwerte in der Tabelle 4-10 sind Maßzahlen für den Einfluss der Faktoren auf die Enzymaktivität. Negative Werte bedeuten eine stärkere Beeinträchtigung, positive Zahlen eine Erhöhung der Enzymaktivität gegenüber dem Mittelwert.

Die mittlere Enzymaktivität nach dem Einfrieren über alle Versuchsbedingungen (Gesamtmittel) beträgt 60,63%. Wie man an dem skalierten Schätzwert erkennen kann, tritt nach dem Einfrieren bei -27°C eine Aktivitätsabnahme um 36% auf. Entschieden positiven Einfluss auf die Restaktivität von  $\beta$ -Galactosidase nach dem Einfrieren hat das Schockgefrieren bei -196°C. In diesem Fall ist der skalierte Schätzwert um ein Drittel höher als der absolute Mittelwert (+33%). Das Einfrieren bei -78°C führt zur leichten Abnahme der Enzymaktivität, allerdings hat der Effekt etwa die Größe des Mittelwertes.

### **Einfluss der Kryoprotektoren auf die Aktivität von $\beta$ -Galactosidase.**

Den Einfluss der Kryoprotektoren Hypromellose und Mannitol auf die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase beim Einfrieren zeigt Abbildung 4-4 und Tabelle 4-11. Die Konzentration von Hypromellose beträgt 0,5% und 1%, die von Mannitol 5% und 10% (s. Kap. 3.1). Die Lösung ohne Kryoprotektorzusatz diente als Referenz.

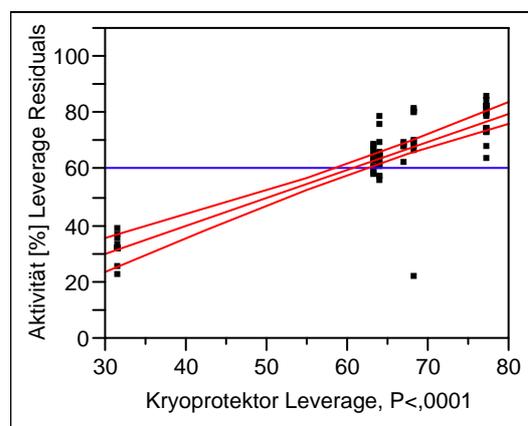


Abbildung 4-4: Einflussdiagramm der Kryoprotektoren auf die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase beim Einfrieren.

Tabelle 4-11: Einfluss der Kryoprotektoren auf die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase beim Einfrieren.

<b>Faktor</b>	<b>Skalierte Schätzwerte</b>	<b>Standardfehler</b>	<b>t-Wert</b>	<b>Prob&gt; t </b>
<b>ohne Kryoprotektor</b>	-29,30	1,6309	-17,97	<0,0001
<b>0,5% HPMC</b>	2,48	1,6309	1,52	0,1320
<b>1% HPMC</b>	7,07	1,7100	4,14	<0,0001
<b>5% Mannitol</b>	16,50	1,6309	10,12	<0,0001
<b>10% Mannitol</b>	3,24	1,6309	1,99	0,0505

Die Kryoprotektoren haben einen positiven Einfluss auf die Restaktivität. Das Ausmaß ist aber etwas geringer als der Einfluss unterschiedlicher Einfriertemperaturen. Das erkennt man an der flacheren Steigung der Gerade in Abbildung 4-4 gegenüber der Geradensteigung für die Einfriertemperaturen in Abbildung 4-3.

Am stärksten ausgeprägt ist die Schutzwirkung bei 5% Mannitol. Auch die höhere Hypromellosekonzentration ist günstig für die Erhaltung der Aktivität bei dieser Behandlung, allerdings ist der Effekt etwa um die Hälfte kleiner als bei 5 % Mannitol. Der Zusatz von 0,5% Hypromellose und 10% Mannitol haben keinen signifikanten Einfluss auf die Restaktivität von  $\beta$ -Galactosidase nach dem Einfrieren.

### **Einfluss der Kryoprotektoren auf die $\beta$ -Galactosidaseaktivität beim Einfrieren bei -27°C.**

Die relative Schutzwirkung der Kryoprotektoren beim Einfrieren bei -27°C auf die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase gibt die Tabelle 4-12 wider.

Tabelle 4-12: Einfluss Kryoprotektoren auf die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase bei Einfrieren bei -27°C.

<i>Faktor</i>	<i>Skalierte Schätzwerte</i>	<i>Standardfehler</i>	<i>t Wert</i>	<i>Prob&gt; t </i>
<i>ohne Kryoprotektor</i>	5,16	2,3083	2,24	0,0285
<i>0,5% HPMC</i>	-24,1478	2,3083	-10,46	<0,0001
<i>1% HPMC</i>	-1,1044	2,4472	-0,45	0,6531
<i>5% Mannitol</i>	26,4489	2,3083	11,46	<0,0001
<i>10% Mannitol</i>	-6,3567	2,3083	-2,75	0,0074

Wird  $\beta$ -Galactosidase bei -27°C eingefroren, so hat lediglich 5% Mannitol eine deutliche Schutzwirkung. Der skalierte Schätzwert beträgt hier 26%. Die stärkste Schädigung des Enzyms bei dieser Einfriertemperatur tritt in der Lösung mit 0,5% Hypromellose auf. Bei Zusatz von 10% Mannitol sinkt die Restaktivität singnifikant. Keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität bei dieser Einfriertemperatur hat 1% Hypromellose.

**Einfluss der Kryoprotektoren auf die  $\beta$ -Galactosidaseaktivität beim Einfrieren bei -78°C.**

Tabelle 4-13 zeigt die relative Schutzwirkung von Kryoprotektoren beim Einfrieren bei -78°C auf die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase.

Tabelle 4-13: Einfluss der Kryoprotektoren auf die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase bei Einfrieren bei -78°C.

<i>Faktor</i>	<i>Skalierter Schätzwerte</i>	<i>Standardfehler</i>	<i>t Wert</i>	<i>Prob&gt; t </i>
<i>ohne Kryoprotektor</i>	-33,50	2,3083	-14,51	<0,0001
<i>0,5% HPMC</i>	31,06	2,3083	13,46	<0,0001
<i>1% HPMC</i>	5,28	2,4472	2,16	0,0344
<i>5% Mannitol</i>	-12,83	2,3083	-5,56	<0,0001
<i>10% Mannitol</i>	9,99	2,3083	4,33	<0,0001

Wird  $\beta$ -Galactosidase bei -78°C eingefroren, weisen sowohl Hypromellose als auch Mannitol eine Schutzwirkung auf.

Die stärkste Schutzwirkung tritt in der Lösung mit 0,5% Hypromellose auf. Etwas schwächer kryoprotektiv wirkt der Zusatz von 10% Mannitol.

Wird  $\beta$ -Galactosidase bei -78°C in Gegenwart von 5% Mannitol eingefroren, so liegt die Restaktivität mit nur 67% zwar deutlich unter dem Durchschnitt dieser Versuchsreihe, allerdings ist sie erheblich höher, als die der Proben ohne Kryoprotektor (vgl. Abbildung 4-2).

Insgesamt kommt es bei dieser Einfriertemperatur in allen Enzymlösungen mit Hilfsstoffzusatz zu einer Kryoprotektion.

**Einfluss der Kryoprotektoren auf die  $\beta$ -Galactosidaseaktivität beim Schock-einfrieren.**

In der Tabelle 4-14 sind die relativen Schutzwirkungen der Kryoprotektoren beim Schockgefrieren auf die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase dargestellt.

Tabelle 4-14: Einfluss der Kryoprotektoren auf die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase beim Schockgefrieren.

<i>Faktor</i>	<i>Skalierte Schätzwerte</i>	<i>Standardfehler</i>	<i>t Wert</i>	<i>Prob&gt; t </i>
<i>ohne Kryoprotektor</i>	28,34	2,3026	12,31	<0,0001
<i>0,5% HPMC</i>	-6,91	2,3026	-3,00	0,0037
<i>1% HPMC</i>	-4,17	2,3593	-1,77	0,0812
<i>5% Mannitol</i>	-13,62	2,3026	-5,91	<0,0001
<i>10% Mannitol</i>	-3,64	2,3026	-1,58	0,1182

Wie aus Tabelle 4-10 ersichtlich, wird  $\beta$ -Galactosidase durch das Schockgefrieren am wenigsten geschädigt. In der Lösung ohne Kryoprotektoren ist der skalierte Schätzwert deutlich positiver gegenüber den Lösungen mit Kryoprotektoren (Tabelle 4-14). Es fällt auf, dass alle untersuchten Zusätze die Restaktivität bei diesem Einfrierverfahren herabsetzen. Dieser Effekt ist bei den niedrigeren Konzentrationen stärker, als bei den höheren.

### 4.1.3 Inaktivierung von $\beta$ -Galactosidase bei der konventionellen Gefriertrocknung

Im Kapitel 4.1.2 wurde gezeigt, dass beim Einfrieren eine Schädigung des Enzyms aufgetreten ist. Jetzt soll ermittelt werden, ob es bei der Trocknung zu einem weiteren Aktivitätsverlust kommt.

Die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase wurde nach drei Einfriertemperaturen ( $-27^{\circ}\text{C}$ ,  $-78^{\circ}\text{C}$ ,  $-196^{\circ}\text{C}$  = Schockgefrieren) und der konventionellen Gefriertrocknung (kGT) getestet (vgl. Kap.3.3.4, s. 70). In den Diagrammen und Tabellen wurde der Vergleich aller drei Methoden, abhängig vom Zusatz des Kryoprotektors, dargestellt. Die Diagramme zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen der Messwerte.

#### Konventionelle Gefriertrocknung ohne Kryoprotektoren.

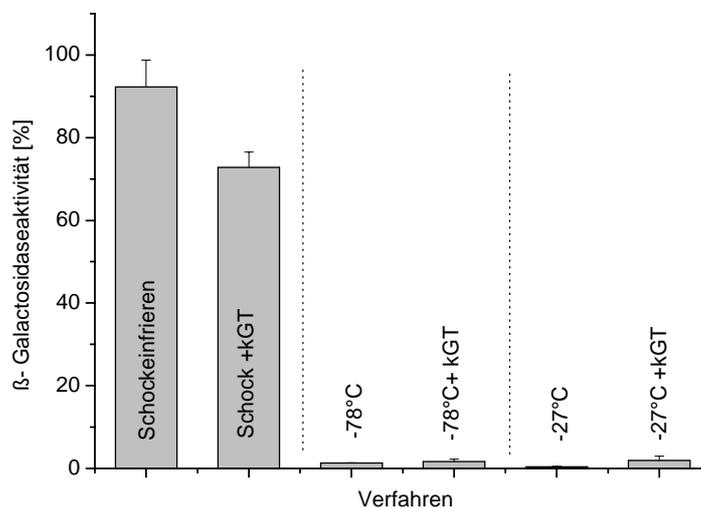


Abbildung 4-5: Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase nach Einfrieren und konventioneller Gefriertrocknung ohne Kryoprotektoren.

Tabelle 4-15: Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase nach konventioneller Gefriertrocknung (kGT) ohne Kryoprotektoren.

	Aktivität							
	vor Einfrieren		Schockgefrieren + kGT Ziff: 1113		Einfrieren -78°C + kGT Ziff: 1213		Einfrieren -27°C + kGT Ziff: 1313	
	IE/ml	%	IE/ml	%	IE/ml	%	IE/ml	%
Probe 1	6,014	92,8	4,458	68,8	0,127	2	0,139	2,2
	6,343	97,9	4,547	70,2	0,157	2,4	0,053	0,8
Probe 2	6,464	99,8	4,499	69,4	0,065	1	0,209	3,2
	6,499	100,3	4,910	75,8	0,104	1,6	0,089	1,4
Probe 3	7,043	108,7	4,950	76,4	0,13	2	0,061	0,9
	6,514	100,5	4,951	76,4	0,070	1,1	0,196	3
<b>MW</b>	<b>6,479</b>	<b>100</b>	<b>4,719</b>	<b>72,8</b>	<b>0,109</b>	<b>1,7</b>	<b>0,125</b>	<b>1,9</b>
Std.Abw.	0,333	5,1	0,241	3,7	0,036	0,6	0,067	1,0

Die  $\beta$ -Galactosidaseaktivität sinkt in der Lösung ohne Kryoprotektoren nach dem Einfrieren bei -78°C und -27°C und konventioneller Gefriertrocknung auf weniger als 2% der Aktivität der unbehandelten Lösung ab. Nach Schockgefrieren und konventioneller Gefriertrocknung bleiben noch ca. 70% des Enzyms aktiv.

Vergleicht man das Ergebnis der konventionellen Gefriertrocknung mit dem nach dem Einfrieren und Wiederauftauen (vgl. Tabelle 4-1), so zeigt sich, dass die Enzymaktivität bei der Lyophilisation durch den Wasserentzug um weitere 20%, gegenüber dem Schockgefrieren (Abbildung 4-5) abnimmt (s. Kap. 4.1). Die Aktivität nach dem Einfrieren bei -78°C und -27°C und nach konventioneller Gefriertrocknung verändert sich nicht gegenüber dem alleinigen Einfrieren, sie liegt unter 2%.

**Konventionelle Gefriertrocknung von  $\beta$ -Galactosidase mit 0,5% Hypromellose.**

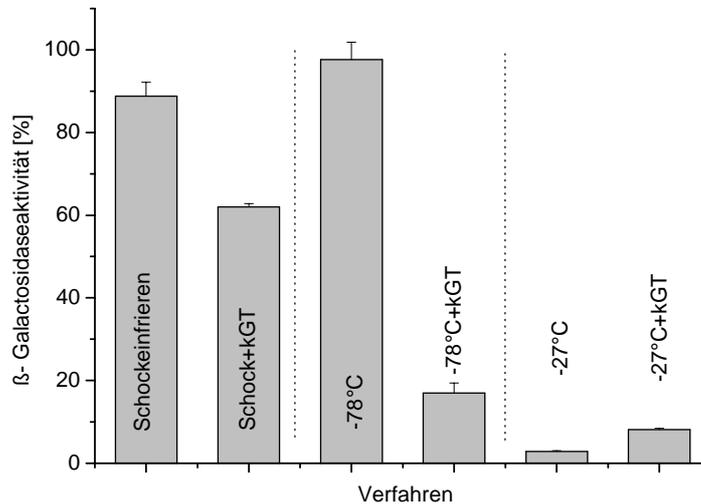


Abbildung 4-6: Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase nach Einfrieren und konventioneller Gefriertrocknung mit 0,5% Hypromellose.

Tabelle 4-16: Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase nach Schockgefrieren und Einfrieren bei -78°C und konventioneller Gefriertrocknung mit 0,5% Hypromellose.

	Aktivität					
	vor Einfrieren		Schockgefrieren + kGT Ziff: 1123		Einfrieren -78°C + kGT Ziff: 1223	
	IE /ml	%	IE /ml	%	IE /ml	%
Probe 1	1,966	99,0	1,235	62,2	0,416	21,0
	1,982	99,8	1,239	62,4	0,358	18,0
Probe 2	2,009	101,2	1,243	62,6	0,341	17,2
	1,986	100,0	1,225	61,7	0,325	16,4
Probe 3	1,997	100,6	1,244	62,7	0,303	15,2
	1,974	99,4	1,203	60,6	0,282	14,2
<b>MW</b>	<b>1,986</b>	<b>100,0</b>	<b>1,232</b>	<b>62,0</b>	<b>0,337</b>	<b>17,0</b>
Std. Abw.	0,016	0,8	0,016	0,8	0,047	2,4

Tabelle 4-17: Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase nach Einfrieren bei  $-27^{\circ}\text{C}$  und konventioneller Gefriertrocknung mit 0,5% Hypromellose.

	Aktivität			
	vor Einfrieren		Einfrieren $-27^{\circ}\text{C}$ + kGT Ziff: 1323	
	IE/ml	%	IE/ml	%
Probe 1	5,431	95,5	0,430	7,6
	5,688	100,0	0,464	8,2
Probe 2	5,766	101,4	0,460	8,1
	5,789	101,8	0,470	8,3
Probe 3	5,694	100,2	0,483	8,5
	5,744	101,0	0,471	8,3
<b>MW</b>	<b>5,685</b>	<b>100,0</b>	<b>0,463</b>	<b>8,1</b>
Std. Abw.	0,131	2,3	0,018	0,3

Nach der konventionellen Gefriertrocknung wurde durch Zusatz von 0,5% Hypromellose in der Enzymlösung nur eine geringfügige Verbesserung der Enzymaktivität gegenüber der Lösung ohne Kryoprotektoren erreicht. Nach dem Schockgefrieren liegt die Aktivität in der Lösung mit 0,5% Hypromellose bei 62% ist also um 10% niedriger als in der Lösung ohne Kryoprotektoren.

Eine deutliche Verbesserung der Enzymaktivität ist in den Lösungen mit 0,5% Hypromellose nach Einfrieren bei  $-78^{\circ}\text{C}$  (um ca. 20%) und bei  $-27^{\circ}\text{C}$  (um ca. 10%) gegenüber der Aktivität in der Lösung ohne Kryoprotektoren zu verzeichnen.

Vergleicht man die Aktivität in der Lösung mit 0,5% Hypromellose nach dem Einfrieren (Abbildung 4-6) und nach konventioneller Gefriertrocknung, so fällt auf, dass die Restaktivität von  $\beta$ -Galactosidase durch den Trocknungsprozess nach Einfrieren bei  $-78^{\circ}\text{C}$  um 80%, nach Schockgefrieren um 30% abnimmt (vgl. Kap. 4.1.2).

**Konventionelle Gefriertrocknung von  $\beta$ -Galactosidase mit 1% Hypromellose.**

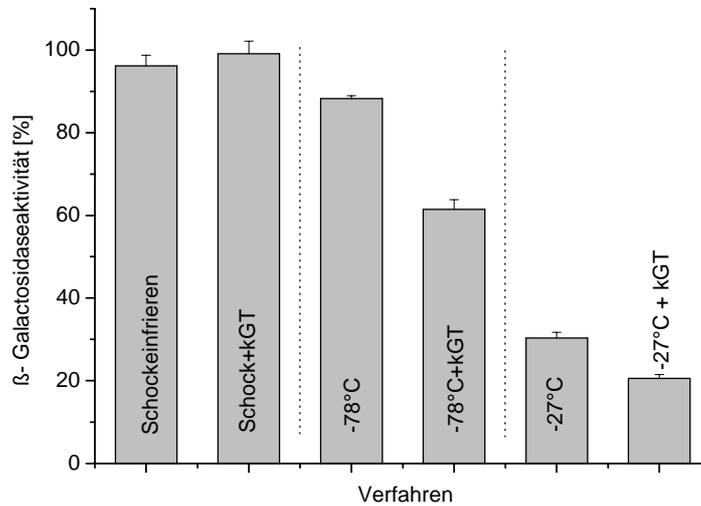


Abbildung 4-7: Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase nach Einfrieren und konventioneller Gefriertrocknung mit 1% Hypromellose.

Tabelle 4-18: Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase nach Einfrieren und konventioneller Gefriertrocknung mit 1% Hypromellose.

	Aktivität							
	vor Einfrieren		Schockgefrieren + kGT Ziff: 1133		Einfrieren -78°C +kGT Ziff: 1233		Einfrieren -27°C +kGT Ziff: 1333	
	IE/ml	%	IE/ml	%	IE/ml	%	IE/ml	%
Probe 1	5,807	92,1	6,118	97,0	4,728	64,2	1,594	21,6
	6,393	101,4	5,969	94,7	4,331	58,8	1,408	19,1
Probe 2	6,259	99,3	6,257	99,2	4,570	62,1	1,592	21,6
	6,408	101,6	6,242	99,0	4,541	61,6	1,511	20,5
Probe 3	6,468	102,6	6,486	102,9	4,313	58,6	1,498	20,3
	6,495	103,0	6,423	101,9	4,679	63,5	1,499	20,4
<b>MW</b>	<b>6,305</b>	<b>100,0</b>	<b>6,249</b>	<b>99,1</b>	<b>4,527</b>	<b>61,5</b>	<b>1,517</b>	<b>20,6</b>
Std. Abw.	0,257	4,1	0,191	3,0	0,173	2,4	0,070	0,9

Nach Schockgefrieren mit 1% Hypromellose bleibt die Enzymaktivität erhalten, nach Einfrieren bei  $-78^{\circ}\text{C}$  sind noch 60% des Enzyms aktiv. Bei dem Einfrieren bei  $-27^{\circ}\text{C}$  wird das Enzym am stärksten geschädigt.

Gegenüber der gleichen Behandlung mit 0,5% Hypromellose kommt es bei Zusatz von 1 % Hypromellose bei allen drei Einfrieremethoden zu einer Erhöhung der  $\beta$ -Galactosidase- Aktivität.

Gegenüber dem ausschließlichen Einfrieren mit 1% Hypromellose (Abbildung 4-7) sinkt die Restaktivität nach dem Einfrieren bei  $-78^{\circ}\text{C}$  und Gefriertrocknung um 30%. Nach Schockgefrieren und konventioneller Gefriertrocknung sowie Einfrieren bei  $-27^{\circ}\text{C}$  und konventioneller Gefriertrocknung tritt keine signifikante Änderung der Aktivität gegenüber dem Einfrieren auf.

**Konventionelle Gefriertrocknung mit 5% Mannitol.**

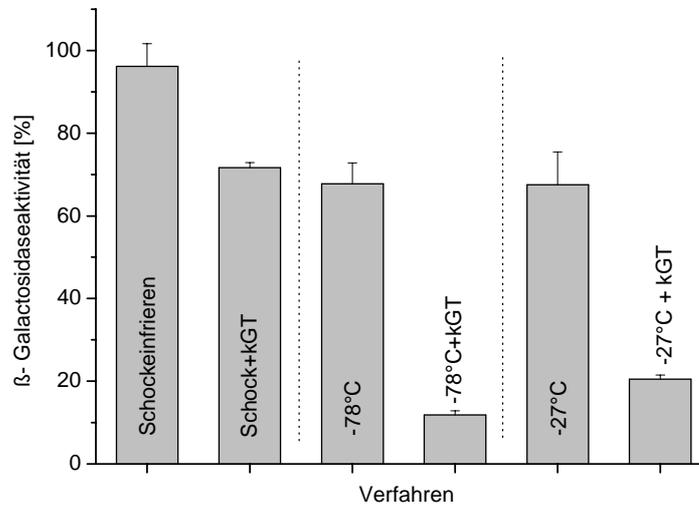


Abbildung 4-8: Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase nach Einfrieren und konventioneller Gefriertrocknung mit 5% Mannitol.

Tabelle 4-19: Aktivität von  $\beta$  Galactosidase nach Schockgefrieren und konventioneller Gefriertrocknung mit 5 % Mannitol.

	Aktivität			
	vor Einfrieren		Schockgefrieren + kGT Ziff: 1143	
	IE /ml	%	IE /ml	%
Probe 1	3,471	85,3	2,862	70,3
	3,851	94,7	2,964	72,9
Probe 2	4,090	100,5	2,927	72,0
	4,299	105,7	2,892	71,1
Probe 3	4,314	106,0	2,861	70,3
	4,385	107,8	2,978	73,2
<b>MW</b>	<b>4,068</b>	<b>100,0</b>	<b>2,914</b>	<b>71,6</b>
Std. Abw.	0,352	8,6	0,051	1,2

## Ergebnisse und Auswertung

---

Tabelle 4-20: Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase nach Einfrieren bei  $-78^{\circ}\text{C}$  und  $-27^{\circ}\text{C}$  und konventioneller Gefriertrocknung mit 5 % Mannitol.

Aktivität							
	vor Einfrieren			Einfrieren $-78^{\circ}\text{C}$ + kGT Ziff: 1121		Einfrieren $-27^{\circ}\text{C}$ + kGT Ziff: 1221	
	IE/ml	%		IE/ml	%	IE/ml	%
Probe 1	5,356	96,4	Probe 1	0,669	12,0	1,043	18,8
				0,621	11,2	1,122	20,2
Probe 2	5,715	102,8	Probe 2	0,566	10,2	1,187	21,3
				0,689	12,4	1,157	20,8
Probe 3	5,606	100,8	Probe 3	0,684	12,3	1,200	21,6
				0,721	13,0	1,133	20,4
<b>MW</b>	<b>5,559</b>	<b>100,0</b>	<b>MW</b>	<b>0,658</b>	<b>11,8</b>	<b>1,140</b>	<b>20,5</b>
Std. Abw.	0,184	3,3	Std. Abw.	0,056	1,0	0,056	1,0

Die Aktivität des Enzyms nach der konventionellen Gefriertrocknung mit 5 % Mannitol sinkt gegenüber dem Einfrieren alleine stark ab.

Nach dem Einfrieren bei  $-78^{\circ}\text{C}$  und  $-27^{\circ}\text{C}$  und konventioneller Gefriertrocknung beträgt die Aktivitätsabnahme gegenüber dem Einfrieren i ca. 50-60%. Nach Schockgefrieren ist der Aktivitätsverlust mit ca. 20% am niedrigsten.

Allerdings ist eine deutliche Verbesserung der Restaktivität gegenüber der konventionellen Gefriertrocknung ohne Kryoprotektoren zu verzeichnen (vgl. Abbildung 4-5).

**Konventionelle Gefriertrocknung mit 10% Mannitol.**

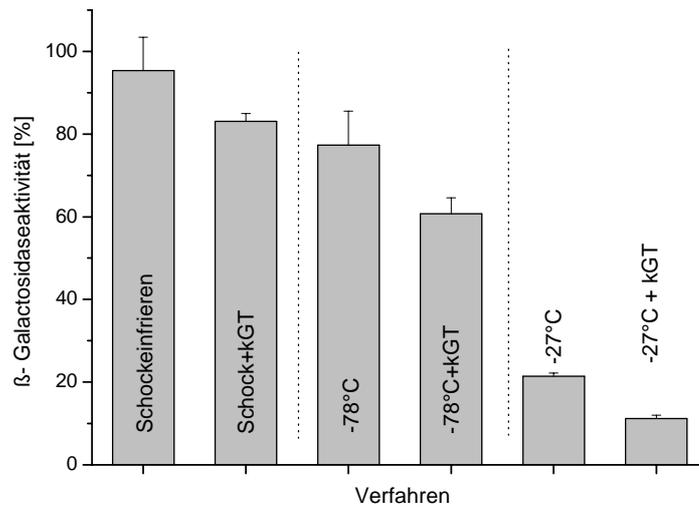


Abbildung 4-9: Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase nach Einfrieren und konventioneller Gefriertrocknung mit 10 % Mannitol.

Tabelle 4-21: Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase nach Schockgefrieren und konventioneller Gefriertrocknung mit 10 % Mannitol.

	Aktivität			
	vor Einfrieren		Schockgefrieren + kGT Ziff: 1153	
	IE /ml	%	IE /ml	%
Probe 1	3,184	97,4	2,642	80,8
	3,353	102,5	2,720	83,2
Probe 2	3,306	101,1	2,812	86,0
	3,247	99,3	2,667	81,6
Probe 3	3,211	98,2	2,698	82,5
	3,320	101,5	2,762	84,5
<b>MW</b>	<b>3,270</b>	<b>100,0</b>	<b>2,717</b>	<b>83,1</b>
Std. Abw.	0,067	2,0	0,063	1,9

Tabelle 4-22: Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase nach Einfrieren bei  $-27^{\circ}\text{C}$  und  $-78^{\circ}\text{C}$  und konventioneller Gefriertrocknung mit 10 % Mannitol.

	Aktivität					
	vor Einfrieren		Einfrieren $-78^{\circ}\text{C}$ + kGT Ziff: 1253		Einfrieren $-27^{\circ}\text{C}$ + kGT Ziff: 1354	
	IE/ml	%	IE/ml	%	IE/ml	%
Probe 1	3,143	87,4	2,033	56,5	0,383	10,6
	3,717	103,3	2,016	56,1	0,440	12,2
Probe 2	3,670	102,0	2,150	59,8	0,434	12,1
	3,709	103,1	2,347	65,3	0,375	10,4
Probe 3	3,721	103,5	2,309	64,2	0,383	10,6
	3,620	100,7	2,239	62,3	0,400	11,1
<b>MW</b>	<b>3,597</b>	<b>100,0</b>	<b>2,183</b>	<b>60,7</b>	<b>0,403</b>	<b>11,7</b>
Std. Abw.	0,226	6,3	0,139	3,9	0,028	0,8

Mit der Erhöhung der Mannitol-Konzentration von 5% auf 10% steigt die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität.

Nach dem Einfrieren bei  $-78^{\circ}\text{C}$  und konventioneller Gefriertrocknung liegt sie bei 60% und damit ist sie fast 50% höher als bei 5% Mannitol. Nach Schockgefrieren und konventioneller Gefriertrocknung ist die Restaktivität in Gegenwart von 10% Mannitol um 10% höher als mit 5% Mannitol nach der gleichen Behandlung (vgl. Abbildung 4-8, und Abbildung 4-9).

Dagegen sinkt die  $\beta$ -Galactosidaseaktivität um 10% nach Einfrieren bei  $-27^{\circ}\text{C}$  und konventioneller Gefriertrocknung mit 10% Mannitol gegenüber den gleichen Bedingungen mit 5% Mannitol.

Vergleicht man die Ergebnisse nach der konventionellen Gefriertrocknung (Abbildung 4-9) mit denen nach dem Einfrieren mit 10% Mannitol, so wird deutlich, dass die Aktivität nach dem Trocknungsprozess bei allen drei Verfahren um 10-20 % niedriger ist.

#### 4.1.3.1 Zusammenfassung der Versuche zur konventionellen Gefriertrocknung von $\beta$ -Galactosidase

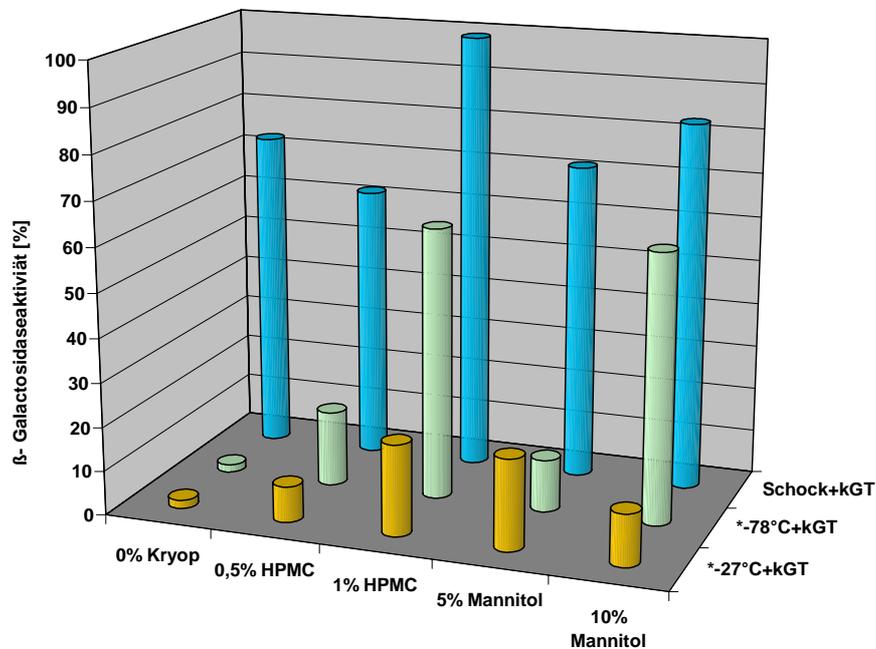


Abbildung 4-10: Abhängigkeit der  $\beta$ -Galactosidaseaktivität nach der konventionellen Gefriertrocknung von drei Einfrierverfahren mit und ohne Kryoprotektorzusatz.

Die Aktivität in der Enzymlösung ohne Kryoprotektoren nach Schockgefrieren und konventioneller Gefriertrocknung liegt bei ca. 70%. Gegenüber dem Schockgefrieren (Restaktivität bei 90% vgl. Abbildung 4-2 ) kommt es also zu einer Abnahme der Aktivität um 20%. Das Enzym wird somit durch den Wasserentzug bei der Gefriertrocknung nur wenig geschädigt. In den Lösungen mit 0,5% Hypromellose und 5% oder 10% Mannitol beobachtet man keine signifikante Erhöhung der Enzymaktivität gegenüber der Lösung ohne Kryoprotektoren. Dagegen zeigt Hypromellose in der Konzentration von 1% bei der konventionellen Gefriertrocknung nach Schockgefrieren kryoprotektive Eigenschaften, d.h. die Enzymaktivität bleibt in dieser Lösung fast vollständig erhalten.

Nach dem Einfrieren bei  $-78^{\circ}\text{C}$  und der konventionellen Gefriertrocknung beobachtet man eine deutliche Abnahme der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität gegenüber dem Schockgefrieren und konventioneller Gefriertrocknung. Die Restaktivitäten in den Lösungen ohne Kryoprotektoren, mit 0,5% Hypromellose und 5% Mannitol,

liegen deutlich unter 20%. Auffällig ist die relativ hohe Restaktivität des Enzyms (60%) in den Lösungen mit 1% Hypromellose und 10% Mannitol. Das zeigt, dass bei diesem Verfahren eine Erhöhung der Hilfsstoff-Konzentration das Enzym vor Schädigungen während des Einfrier- und Gefriertrocknungsprozesses schützt.

Von allen drei verglichenen Einfrier-temperaturen schädigt das Einfrieren bei  $-27^{\circ}\text{C}$  und die konventionelle Gefriertrocknung das Enzym am meisten. Die Restaktivität liegt in allen Lösungen unter 30%. Nach den Ergebnissen der Einfrier-versuche war das zu erwarten (vgl. Kap. 2.1.2.1.). Niedrige Kryoprotektor-Konzentrationen, d.h. 0,5% Hypromellose und 5% Mannitol eignen sich bei  $\beta$ -Galactosidase lediglich für eine konventionelle Gefriertrocknung nach Schock-einfrieren.

Die nachfolgende statistische Auswertung verdeutlicht den Einfluss der Einfrier-temperaturen und der konventionellen Gefriertrocknung auf die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase.

#### 4.1.3.1.1. Statistische Auswertung der Versuche zur konventionellen Gefrier-trocknung von $\beta$ -Galactosidase

Nachfolgend wird das Ergebnis der Varianzanalyse zur konventionellen Gefrier-trocknung von  $\beta$ - Galactosidase dargestellt. Darüber hinaus wird der Einfluss der Einfriertemperatur und der verwendeten Kryoprotektoren auf die Enzymaktivität bei konventioneller Gefriertrocknung näher erläutert.

Tabelle 4-23: Varianzanalyse zur konventionellen Gefriertrocknung von  $\beta$ -Galactosidase. df : Anzahl der Freiheitsgrade; SAQ: Summe der Abweichungsquadrate; MQ: das mittlere Abweichungsquadrat;  $F_{Tab}$ : kritischer F-Wert

<b>Modell</b>						
Quelle	df	SAQ	MQ	F-Wert	Prob>F	Bewertung
Einfrieren	2	64875,8	32437,9	7554,5	<0,0001	Hoch signifikant
Kryoprotektor	4	19000,9	4750,2	1106,3	<0,0001	Hoch signifikant
Wechselwirkung	8	8458,2	1057,3	246,3	<0,0001	Hoch signifikant
<b>Gesamt</b>						
Quelle	df	SAQ	MQ	F-Wert	$F_{Tab}$	Bewertung
Effekt	14	92335,0	6595,36	1536,0	1,82	signifikant
Fehler	75	322,0	4,29			
C. Total	89	92657,0				

Die Varianzanalyse zeigt, dass beide untersuchten Faktoren: das Einfrieren und der Zusatz von Kryoprotektoren einen hochsignifikanten Einfluss auf die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase haben (vgl. Tabelle 4-23). Es kommt zu einer Abnahme der Restaktivität.

Am stärksten wird die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase durch das Einfrieren beeinflusst, die Kryoprotektoren besitzen einen etwa siebenfach schwächeren Effekt. Der Effekt der Wechselwirkungen zwischen Einfrieren und Kryoprotektor ist auf die Enzymaktivität am wenigsten ausgeprägt.

Die nachstehenden Tabellen und Diagramme verschaffen einen genaueren Überblick über die Einflüsse der einzelnen Faktoren auf die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase und deren Wechselwirkungen.

### **Einfluss der Einfriertemperatur auf die Aktivität von $\beta$ -Galactosidase bei konventioneller Gefriertrocknung.**

Nachfolgend wird der Einfluss der bei der konventionellen Gefriertrocknung verwendeten Einfriertemperaturen: Schockgefrieren (bei  $-196^{\circ}\text{C}$ ), Einfrieren bei  $-78^{\circ}\text{C}$  und bei  $-27^{\circ}\text{C}$  auf die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase statistisch ausgewertet und verglichen.

Tabelle 4-24: Einfluss des Einfrierens auf die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase bei konventioneller Gefriertrocknung

<i>Faktor</i>	<i>Skalierte Schätzwerte</i>	<i>Standardfehler</i>	<i>t Wert</i>	<i>Prob&gt; t </i>
<b>Gesamtmittel</b>	40,96	0,2184	187,52	<0,0001
<b>Einfrieren [<math>-27^{\circ}\text{C}</math>]</b>	-26,54	0,3089	-85,94	<0,0001
<b>Einfrieren [<math>-78^{\circ}\text{C}</math>]</b>	-10,23	0,3089	-33,14	<0,0001
<b>Einfrieren [Schock]</b>	36,78	0,3089	119,08	<0,0001

Tabelle 4-24 und Abbildung 4-11 zeigen den Einfluss der drei Einfriertemperaturen auf die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase bei der konventionellen Gefriertrocknung. Der Mittelwert der Enzymaktivität (Gesamtmittel) nach konventioneller Gefriertrocknung über alle Versuchsbedingungen beträgt 40,96% und ist damit um 20 % niedriger als der Mittelwert der Aktivität nach dem Einfrieren (vgl. Tabelle 4-10). Die skalierten Schätzwerte in der zweiten Spalte der Tabelle 4-24 sind Maßzahlen für den Einfluss des Faktors Einfrieren auf die Enzymaktivität. Negative Werte bedeuten eine stärkere Schädigung, positive Zahlen eine verringerte Abnahme der Enzymaktivität.

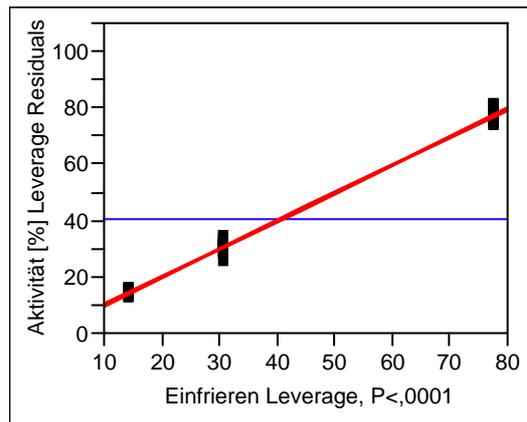


Abbildung 4-11: Einflussdiagramm der Einfriertemperatur auf die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase bei konventioneller Gefriertrocknung.

Die aufsteigende Gerade in Abbildung 4-11 zeigt den Einfluss des Effektes Einfriertemperatur auf die  $\beta$ -Galactosidaseaktivität. Je steiler sie ist, desto ausgeprägter ist der Effekt. Die waagerechte Linie im Diagramm stellt den Gesamtmittelwert dar. Punkte unterhalb des Gesamtmittelwertes weisen einen negativen Einfluss auf die abhängige Variable Aktivität auf.

Der negative Effekt ist beim Einfrieren bei  $-27^{\circ}\text{C}$  stärker ausgeprägt als beim Einfrieren bei  $-78^{\circ}\text{C}$ . Weit oberhalb der Mittelwertgeraden liegen die Werte für das Schockgefrieren. Dadurch wird ein starker positiver Einfluss der letztgenannten Einfriertemperatur auf die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase bei der konventionellen Gefriertrocknung sichtbar.

Wie aus Tabelle 4-24 und Abbildung 4-11 ersichtlich, hat das Schockgefrieren (bei  $-196^{\circ}\text{C}$ ) einen starken positiven Einfluss auf die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase bei der konventionellen Gefriertrocknung. Der skalierte Schätzwert liegt 36% über dem absoluten Mittelwert. Dagegen ist das Einfrieren bei  $-27^{\circ}\text{C}$  bei der konventionellen Gefriertrocknung am ungünstigsten für die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase. Der skalierte Schätzwert liegt bei  $-26,5\%$ . Diese Ergebnisse sind mit denen der statistischen Auswertung der Einfrierversuche von  $\beta$ -Galactosidase vergleichbar (s. Tabelle 4-10).

### Einfluss der Kryoprotektoren auf die Aktivität von $\beta$ -Galactosidase bei konventioneller Gefriertrocknung.

Den Einfluss der Kryoprotektoren Hypromellose und Mannitol auf die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase bei der konventionellen Gefriertrocknung zeigen Abbildung 4-12 und Tabelle 4-25. Die Konzentration von Hypromellose betrug 0,5% und 1% und von Mannitol 5% und 10% (s. Kap. 3.1). Die Lösung ohne Kryoprotektorzusatz diente als Referenz.

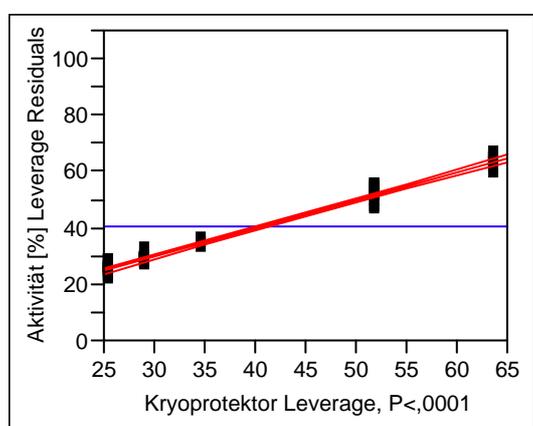


Abbildung 4-12: Einflussdiagramm der Kryoprotektoren auf die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase bei konventioneller Gefriertrocknung.

Tabelle 4-25: Einfluss der Kryoprotektoren auf die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase bei konventioneller Gefriertrocknung.

<b>Faktor</b>	<b>Skalierte Schätzwerte</b>	<b>Standardfehler</b>	<b>t Wert</b>	<b>Prob&gt; t </b>
<b>ohne Kryoprotektor</b>	-15,48	0,4369	-35,44	<0,0001
<b>0,5% HPMC</b>	-11,89	0,4369	-27,23	<0,0001
<b>1% HPMC</b>	22,66	0,4369	51,89	<0,0001
<b>5% Mannitol</b>	-6,29	0,4369	-14,41	<0,0001
<b>10% Mannitol</b>	11,00	0,4369	25,18	<0,0001

Der Einfluss der Kryoprotektoren auf die  $\beta$ -Galactosidaseaktivität ist nicht so hoch wie der des Einfrierens bei der konventionellen Gefriertrocknung. Das verdeutlicht die flachere Steigung der Geraden im Einflussdiagramm (Abbildung 4-12) verglichen mit der Geradensteigung in Abbildung 4-11. Beide Kryoprotektoren haben in der höheren Konzentration (1% für HPMC und 10% für Mannitol) einen positiven Einfluss, wobei der Hypromelloseeffekt doppelt so stark ist wie der von Mannitol. Bei der niedrigeren Kryoprotektor-Konzentration ist eine geringere Schutzwirkung erkennbar.

**Schutzwirkung der Kryoprotektoren auf die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase bei konventioneller Gefriertrocknung und drei Einfriertemperaturen.**

Tabelle 4-26 veranschaulicht die relative Schutzwirkung von Kryoprotektoren beim Einfrieren bei  $-27^{\circ}\text{C}$  auf die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase bei konventioneller Gefriertrocknung.

Tabelle 4-26: Einfluss von Kryoprotektoren auf die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase bei Einfrieren bei  $-27^{\circ}\text{C}$  und konventioneller Gefriertrocknung.

<i>Faktor</i>	<i>Skalierte Schätzwerte</i>	<i>Standard-Fehler</i>	<i>t Wert</i>	<i>Prob&gt; t </i>
<i>ohne Kryoprotektor</i>	2,98	0,6178	4,83	<0,0001
<i>0,5% HPMC</i>	5,64	0,6178	9,14	<0,0001
<i>1% HPMC</i>	-6,78	0,6178	-10,98	<0,0001
<i>5% Mannitol</i>	12,39	0,6178	20,07	<0,0001
<i>10% Mannitol</i>	-14,25	0,6178	-23,06	<0,0001

Bei der konventionellen Gefriertrocknung nach Einfrieren bei  $-27^{\circ}\text{C}$  zeigt sich ein positiver Einfluss bei der niedrigeren Kryoprotektor-Konzentration. Der positive Einfluss von 5% Mannitol ist mehr als doppelt so hoch wie der von 0,5% Hypromellose. Die höheren Kroyoprotektorkonzentrationen dagegen führen zur Schädigung des Enzyms. Dieser negative Effekt ist bei 10% Mannitol zweifach stärker ausgeprägt als bei 1% Hypromellose.

## Ergebnisse und Auswertung

Die Relative Schutzwirkung der Kryoprotektoren beim Einfrieren bei  $-78^{\circ}\text{C}$  auf die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase bei konventioneller Gefriertrocknung zeigt Tabelle 4-27.

Tabelle 4-27: Einfluss der Kryoprotektoren auf die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase bei Einfrieren bei  $-78^{\circ}\text{C}$  und konventioneller Gefriertrocknung.

<b>Faktor</b>	<b>Skalierte Schätzwerte</b>	<b>Standardfehler</b>	<b>t Wert</b>	<b>Prob&gt; t </b>
<b>ohne Kryoprotektor</b>	-13,56	0,6178	-21,95	<0,0001
<b>0,5% HPMC</b>	-1,83	0,6178	-2,96	0,0041
<b>1% HPMC</b>	8,08	0,6178	13,07	<0,0001
<b>5% Mannitol</b>	-12,58	0,6178	-20,36	<0,0001
<b>10% Mannitol</b>	19,89	0,6178	32,20	<0,0001

Beim Einfrieren bei  $-78^{\circ}\text{C}$  (Tabelle 4-27) beobachtet man im Gegensatz zum Einfrieren bei  $-27^{\circ}\text{C}$  (Tabelle 4-26) einen deutlich positiven Effekt der höheren Kryoprotektorkonzentration. Der Effekt hat sich im Vergleich zur konventionellen Gefriertrocknung nach Einfrieren bei  $-27^{\circ}\text{C}$  umgekehrt: hier schädigen die Kryoprotektoren in niedriger und schützen in hoher Konzentration.

In der folgenden Tabelle ist die relative Schutzwirkung von Kryoprotektoren beim Schockefrieren auf die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase bei konventioneller Gefriertrocknung zusammengefasst.

Tabelle 4-28: Einfluss der Kryoprotektoren auf die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase bei Schockefrieren und konventioneller Gefriertrocknung.

<b>Faktor</b>	<b>Skalierte Schätzwerte</b>	<b>Standardfehler</b>	<b>t Wert</b>	<b>Prob&gt; t </b>
<b>ohne Kryoprotektor</b>	10,57	0,6178	17,11	<0,0001
<b>0,5% HPMC</b>	-3,82	0,6178	-6,18	<0,0001
<b>1% HPMC</b>	-1,29	0,6178	-2,10	0,0395
<b>5% Mannitol</b>	0,18	0,6178	0,30	0,7675
<b>10% Mannitol</b>	-5,64	0,6178	-9,14	<0,0001

Bei der konventionellen Gefriertrocknung nach Schockgefrieren beobachtet man in der Lösung ohne Kryoprotektorzusatz eine um 10% höhere Enzymaktivität gegenüber dem Mittelwert. In den Lösungen mit 0,5% und 1% Hypromellose und 5% Mannitol-Zusatz kommt es zu keiner Kryoprotektion verglichen mit dem Referenzwert. Die größte Enzymschädigung tritt in der Lösung mit 10% Mannitol auf (Abweichung vom absoluten Mittelwert um -5,6%).

Die Ergebnisse der Untersuchung des Einflusses der Kryoprotektoren auf die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase nach Schockgefrieren waren ähnlich. Auch da erschien der Zusatz von Kryoprotektoren für die Erhaltung der Enzymaktivität nicht notwendig.

#### 4.1.4 Inaktivierung von $\beta$ -Galactosidase bei der Fingerlyophilisation

Bei der Fingerlyophilisation wurden jeweils drei Muster unter gleichen Bedingungen getrocknet. Dabei wurde die Enzymlösung an den Wänden der Infusionsflasche schockgefroren und anschließend im Fingerlyophilisator 2,5 h lang getrocknet. Die genauen Bedingungen wurden im Kap. 3.3.4. Gefriertrocknungsmethoden erläutert.

Mittelwerte und Standardabweichung der Aktivität der Lyophilisate sind in der Abbildung 4-13 dargestellt. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte von 9 Gehaltsbestimmungen (Aktivität der Lösung nach Fingerlyophilisation). Vor der Fingerlyophilisation wurden 6 Referenzmessungen durchgeführt.

#### Fingerlyophilisation von $\beta$ -Galactosidase mit Hypromellose und Mannitol.

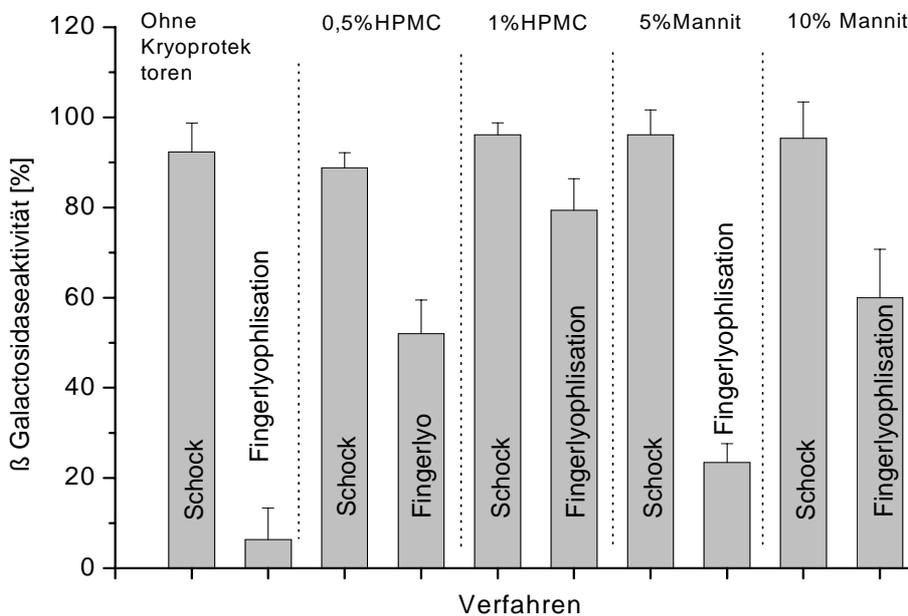


Abbildung 4-13: Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase nach Fingerlyophilisation ohne Kryoprotektoren und mit 0,5% und 1% Hypromellose sowie mit 5% und 10 % Mannitol.

Die Abbildung 4-13 zeigt, dass in Gegenwart von Hypromellose und Mannitol die Restaktivität nach der Fingerlyophilisation um etwa 20-70% höher ist als bei der Lyophilisation ohne Kryoprotektoren.

Gegenüber dem Schockgefrieren ist eine deutliche Abnahme der Aktivität nach der Fingerlyophilisation zu verzeichnen. Am höchsten ist sie in der Lösung ohne Kryoprotektoren (92% nach Schockgefrieren; nach Fingerlyophilisation Abnahme auf 6%) und mit 5% Mannitol (96% nach Schockgefrieren; nach Fingerlyophilisation Abnahme auf 23%), am niedrigsten in der Lösung mit 1% Hypromellose (um 16% gegenüber dem Schockgefrieren).

Die protektive Wirkung auf  $\beta$ -Galactosidase ist bei der Fingerlyophilisation an die eingesetzte Konzentration der Hilfsstoffe gekoppelt: je höher ihre Konzentration, desto höher ist die Restaktivität des Enzyms.

Tabelle 4-29: Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase nach Fingerlyophilisation ohne Kryoprotektoren.

Aktivität					
	vor Einfrieren			nach Fingerlyophilisation Ziff: 1112	
	IE/ml	%		IE/ml	%
Probe 1	7,410	97,4	Probe 1	0,104	1,4
	7,674	100,9		0,077	1,0
	7,618	100,2		0,093	1,2
Probe 2	7,905	104,0	Probe 2	0,124	1,6
	7,542	99,2		0,251	3,3
	7,477	98,3		0,138	1,8
			Probe 3	1,212	16,0
				1,161	15,3
				1,189	15,6
<b>MW</b>	<b>7,604</b>	<b>100,0</b>	<b>MW</b>	<b>0,484</b>	<b>6,4</b>
Std. Abw.	0,175	2,3	Std. Abw.	0,532	7,0

Die Restaktivität von  $\beta$ -Galactosidase nimmt nach der Fingerlyophilisation ohne Kryoprotektoren auf weniger als 10% ab. Dagegen betrug sie nach der konventionellen Gefriertrocknung und Schockgefrieren 73% (vgl. Tabelle 4-15).

Tabelle 4-30: Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase nach Fingerlyophilisation mit 0,5 % Hypromellose.

Aktivität					
	vor Einfrieren			nach Fingerlyophilisation Ziff: 1122	
	IE/ml	%		IE/ml	%
Probe 1	8,273	94,4	Probe 1	4,385	50,1
	8,841	100,9		4,561	52,1
	8,796	100,4		4,422	50,5
Probe 2	9,452	107,9	Probe 2	3,886	44,4
	8,668	98,9		3,870	44,2
	8,532	97,4		3,856	44,0
			Probe 3	5,405	61,7
				5,089	58,1
				5,548	63,3
<b>MW</b>	<b>8,760</b>	<b>100,0</b>	<b>MW</b>	<b>4,558</b>	<b>52,0</b>
Std. Abw.	0,396	4,5	Std. Abw.	0,656	7,5

Bei Zusatz von 0,5% Hypromellose liegt die  $\beta$ -Galactosidase-Restaktivität um 40% höher als bei der Fingerlyophilisation ohne Kryoprotektoren. Sie beträgt 50%. Im Vergleich zur konventionellen Gefriertrocknung nach Schockgefrieren wird die Restaktivität nicht signifikant verändert (vgl. Tabelle 4-16). Nach dieser Behandlung betrug die  $\beta$ -Galactosidaseaktivität 62%.

Tabelle 4-31: Aktivität von  $\beta$  Galactosidase nach Fingerlyophilisation mit 1 % Hypromellose.

Aktivität					
	vor Einfrieren			nach Fingerlyophilisation Ziff: 1132	
	IE/ml	%		IE/ml	%
Probe 1	7,449	101,1	Probe 1	5,748	78,0
	7,260	98,6		5,073	68,9
	7,777	105,6		5,919	80,3
Probe 2	6,944	94,3	Probe 2	5,851	79,4
	7,571	102,8		6,418	87,1
	7,199	97,7		6,310	85,7
			Probe 3	4,980	67,6
				6,162	83,6
				6,170	83,8
<b>MW</b>	<b>7,367</b>	<b>100,0</b>	<b>MW</b>	<b>5,848</b>	<b>79,4</b>
Std. Abw.	0,295	4,0	Std. Abw.	0,514	7,0

Mit 0,5% Hypromellose beträgt die Aktivität nach der Fingerlyophilisation 50% und mit 1% Hypromellose steigt sie auf ca. 80%. Die Erhöhung der Hypromellosekonzentration in der Enzymlösung von 0,5% auf 1% trägt deutlich zu einer Steigerung der Restaktivität nach der Fingerlyophilisation bei (vgl. Tabelle 4-30 und Tabelle 4-31). Allerdings liegt sie um 20% niedriger als nach der konventionellen Gefrier-trocknung und Schockgefrieren (s. Tabelle 4-18).

Tabelle 4-32: Ergebnis der Varianzanalyse der Versuchsreihen zur Fingerlyophilisation von  $\beta$ -Galactosidase ohne Kryoprotektoren und mit Hypromellose.

Art der Variation	df	QS	MQ	F	Prob > F
Zwischen den Gruppen	2	22518,82	11259,4	81,32	<0,0001
Innerhalb der Gruppen	23	3184,61	138,5		
total	25	25703,44			

## Ergebnisse und Auswertung

Die in Tabelle 4-32 dargestellten Ergebnisse der Varianzanalyse zeigen, dass zwischen den Restaktivitäten nach der Fingerlyophilisation ohne Kryoprotektoren und den Restaktivitäten nach der Fingerlyophilisation mit Hypromellose hochsignifikante Unterschiede bestehen. Vergleicht man die Restaktivitäten nach der Fingerlyophilisation mit 0,5% und 1% Hypromellose und die Restaktivität ohne Kryoprotektoren, so fällt auf, dass der Hypromellosezusatz die Aktivität signifikant erhöht und damit kryoprotektiv wirkt.

Tabelle 4-33: Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase nach Fingerlyophilisation mit 5 % Mannitol. \*Messung mißlungen.

Aktivität					
	vor Einfrieren			nach Fingerlyophilisation Ziff: 1142	
	IE/ml	%		IE/ml	%
Probe 1	5,239	96,2	Probe 1	0,995	18,3
	5,959	109,5		1,346	24,7
	5,278	97,0		*	*
Probe 2	5,357	98,4	Probe 2	1,611	29,6
	5,324	97,8		1,487	27,3
	5,497	101,0		1,454	26,7
/	/	/	Probe 3	1,129	20,7
				1,137	20,9
				1,050	19,3
<b>MW</b>	<b>5,442</b>	<b>100,0</b>	<b>MW</b>	<b>1,276</b>	<b>23,4</b>
Std. Abw.	0,268	4,9	Std. Abw.	0,228	4,2

Mannitol wirkt bei der Fingerlyophilisation von  $\beta$ -Galactosidase etwas weniger protektiv als Hypromellose. Mit 5% Mannitol liegt die Restaktivität nach der Fingerlyophilisation bei 23%. Auch hier ist die Restaktivität nach der Fingerlyophilisation deutlich niedriger als nach der konventionellen Gefriertrocknung und Schock-einfrieren.

Tabelle 4-34. Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase nach Fingerlyophilisation mit 10 % Mannitol

Aktivität					
	vor Einfrieren			nach Fingerlyophilisation Ziff: 1152	
	IE/ml	%		IE/ml	%
Probe 1	0,302	87,4	Probe 1	0,218	62,9
	0,357	103,4		0,232	67,1
	0,3539	102,1		0,239	69,2
Probe 2	0,356	103,1	Probe 2	0,144	41,5
	0,358	103,5		0,162	46,9
	0,348	100,7		0,174	50,2
			Probe 3	0,222	64,1
				0,229	66,3
				0,246	71,1
<b>MW</b>	<b>0,346</b>	<b>100,0</b>	<b>MW</b>	<b>0,208</b>	<b>59,9</b>
Std. Abw.	0,022	7,0	Std. Abw.	0,037	10,8

Die Restaktivität von  $\beta$ -Galactosidase mit 10% Mannitol liegt nach der Fingerlyophilisation bei 60%. Damit ist erkennbar, dass die höhere Mannitolkonzentration stärker kryoprotektiv wirkt als die niedrigere Mannitolkonzentration (Restaktivität lag bei 23%). Auch hier ist die Restaktivität des Enzyms nach Fingerlyophilisation niedriger als nach konventioneller Gefriertrocknung und Schockgefrieren.

Tabelle 4-35: Ergebnis der Varianzanalyse der Versuchsreihe Fingerlyophilisation von  $\beta$ -Galactosidase ohne Kryoprotektoren und mit Mannitol

Art der Variation	df	QS	MQ	F	Prob > F
Zwischen den Gruppen	2	13438,27	6719,13	106,96	<0,0001
Innerhalb der Gruppen	23	1444,82	62,82		
total	25	14883,09			

Tabelle 4-35 zeigt das Ergebnis der Varianzanalyse der Versuchsreihen Fingerlyophilisation ohne Kryoprotektoren und mit Mannitol. Es zeigt sich, dass der Man-

nitolzusatz kryoprotektiv wirkt, da ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen der Versuchsreihen besteht.

#### 4.1.4.1 Vergleich des Einflusses der konventionellen Gefriertrocknung mit der Fingerlyophilisation auf die Restaktivität von $\beta$ -Galactosidase

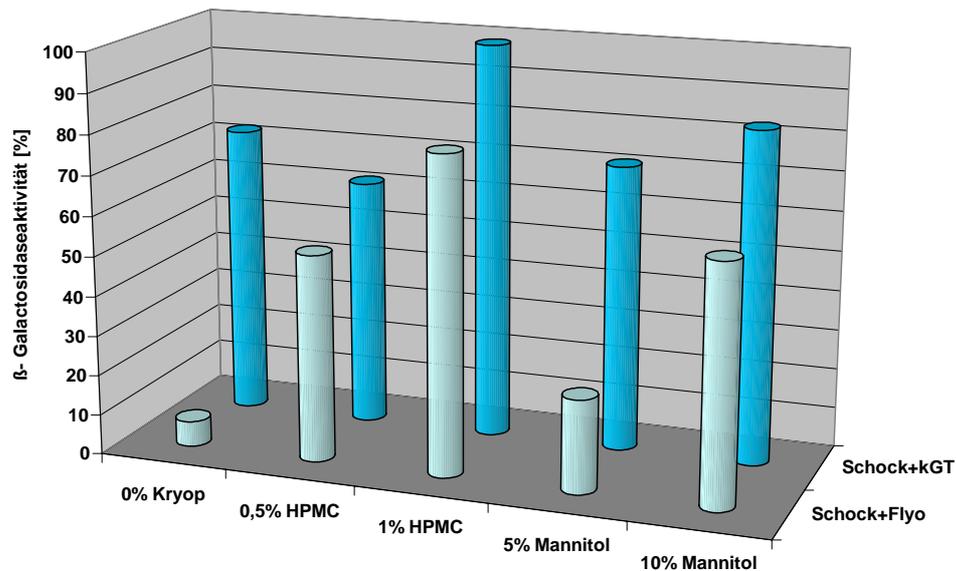


Abbildung 4-14: Einfluss der konventionellen Gefriertrocknung nach Schockgefrieren und der Fingerlyophilisation auf die Restaktivität von  $\beta$ -Galactosidase.

Abbildung 4-14. zeigt den Vergleich zwischen den Mittelwerten der Aktivitäten von  $\beta$ -Galactosidase nach Fingerlyophilisation und nach konventioneller Gefriertrocknung.

Nach dem Schockgefrieren und konventioneller Gefriertrocknung liegt die Restaktivität von  $\beta$ -Galactosidase unabhängig vom Kryoprotektorzusatz bei über 60%. In der Lösung mit 1% Hypromellose bleibt die Enzymaktivität weitgehend erhalten. Die eingesetzte Hilfsstoffkonzentration korreliert bei diesem Verfahren mit der Restaktivität. D.h. je höher die Kryoprotektorkonzentration, desto höher ist die Restaktivität. Mannitol und Hypromellose zeigen keine signifikanten Unterschiede in der kryoprotektiven Wirkung, allerdings darf nicht vergessen werden, dass die Mannitolkonzentration 10-fach höher liegt als die von Hypromellose.

Nach der Fingerlyophilisation ist die Enzymaktivität in jeder Lösung niedriger als nach der konventionellen Gefriertrocknung. Besonders hoch ist Differenz der Aktivitäten in den Lösungen ohne Kryoprotektoren (65%) und mit 5% Mannitol (48%). Eine akzeptable Restaktivität (80%) nach der Fingerlyophilisation tritt in der Lösung mit 1% Hypromellose auf. Bei diesem Verfahren korreliert die Kryoprotektorkonzentration in gleicher Weise mit der Restaktivität von  $\beta$ -Galactosidase. Je höher die Konzentration des Kryoprotektors, desto weniger wird das Enzym inaktiviert. Bei der Fingerlyophilisation wird das Enzym stärker von Hypromellose geschützt als von Mannitol. Die Restaktivität in der Lösung mit 0,5% Hypromellose liegt bei 52% und mit 1% Hypromellose bei 80%. Dagegen liegen die Restaktivitäten in der fingerlyophilisierten Lösung mit 5% Mannitol bei 23% und mit 10% Mannitol bei 60%.

**4.1.4.1.1. Statistische Auswertung der Fingerlyophilisation und der konventionellen Gefriertrocknung von  $\beta$ -Galactosidase**

Bei der statistischen Auswertung wurden Versuchsreihen zur Aktivitätsbestimmung von  $\beta$ -Galactosidase nach konventioneller Gefriertrocknung und Fingerlyophilisation verglichen, bei denen das Enzym vor dem Trocknungsschritt schockgefroren wurde. Die anderen Einfrierverfahren (Einfrieren bei  $-78^{\circ}\text{C}$  und  $-27^{\circ}\text{C}$ ) wurden bei der Berechnung nicht berücksichtigt (vgl. Kap. 3.1. Versuchsplanung.).

Tabelle 4-36: Varianzanalyse zur Gefriertrocknung von  $\beta$ -Galactosidase. df: Anzahl der Freiheitsgrade; SAQ: Summe der Abweichungsquadrate; MQ: mittleres Abweichungs-quadrat;  $F_{\text{Tab}}$ : kritischer F-Wert

Modell						
Quelle	df	SAQ	MQ	F-Wert	Prob>F	Bewertung
Gefriertrocknung	1	17791,7	17791,7	516,5	<0,0001	Hoch signifikant
Kryoprotektor	4	17492,85	4373,21	126,9	<0,0001	Hoch signifikant
Wechselwirkung	4	5953,9	1488,46	43,3	<0,0001	Hoch signifikant
Gesamt						
Quelle	df	SAQ	MQ	F-Wert	$F_{\text{Tab}}$	Bewertung
Effekt	9	41238,4	4582,04	133,0	2,07	signifikant
Fehler	50	1722,16	34,44			
C. Total	59	42960,57				

Der Effekt der einzelnen Faktoren und die Wechselwirkungen zwischen den Faktoren Gefriertrocknung und Kryoprotektor kann dem ersten Abschnitt (Modell) der Tabelle 4-36 entnommen werden. Beide haben einen signifikanten Einfluss auf die Variable Enzymaktivität. Der F-Wert des Faktors Gefriertrocknung ist um das fünffache höher als der F-Wert des Faktors Kryoprotektor. Damit beeinflusst die Gefriertrocknung die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase mehr als die verwendeten Kryoprotektoren. Die Einflüsse der einzelnen Faktoren und der Wechselwirkungen

werden genauer in den nachstehenden Tabellen und Diagrammen wiedergegeben.

### **Einfluss der Gefriertrocknungsart auf die $\beta$ -Galactosidaseaktivität.**

Tabelle 4-37 und Abbildung 4-15 verdeutlichen den Einfluss des Gefriertrocknungsverfahrens auf die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase.

Tabelle 4-37: Einfluss des Gefriertrocknungsverfahrens auf die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase.

<b>Faktor</b>	<b>Skalierte Schätzwerte</b>	<b>Standardfehler</b>	<b>t Wert</b>	<b>Prob&gt; t </b>
<b>Gesamtmittel</b>	60,52	0,7577	79,88	<0,0001
<b>Gefriertrocknung [Finger]</b>	-17,22	0,7577	-22,73	<0,0001
<b>Gefriertrocknung [konventionell]</b>	17,22	0,7577	22,73	<0,0001

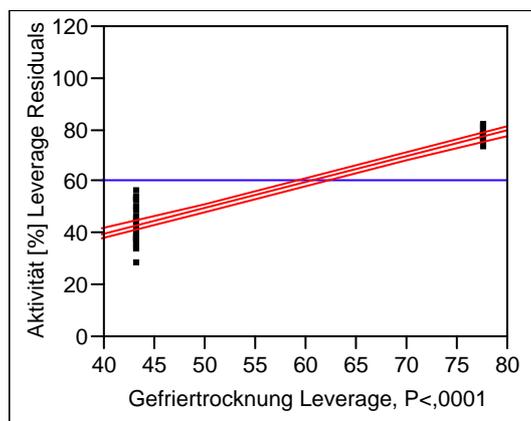


Abbildung 4-15: Einflussdiagramm des Gefriertrocknungsverfahrens auf die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase.

Der Mittelwert der Enzymaktivität nach konventioneller Gefriertrocknung und Fingerlyophilisation beträgt 60,52% (waagerechte Gerade in der Abbildung 4-15). Dieser Wert stellt die mittlere Beobachtung dar.

Die skalierten Schätzwerte in der zweiten Spalte der Tabelle 4-37 geben Auskunft über den Einfluss des untersuchten Faktors auf die Enzymaktivität. Negative Schätzwerte zeigen eine starke Schädigung des Enzyms durch diesen Faktor.

-----  
 Positive Zahlen verdeutlichen eine Schutzwirkung des untersuchten Faktors auf das Enzym.

Es zeigt sich, dass  $\beta$ -Galactosidase bei der konventionellen Gefriertrocknung im Vergleich zu der Fingerlyophilisation nur geringfügig geschädigt wird. Das wird an dem positiven Schätzwert für die konventionelle Gefriertrocknung in der Tabelle 4-37 sowie der Lage der Werte oberhalb der waagerechten Mittelwertgeraden in der Abbildung 4-15 sichtbar.

**Einfluss der Kryoprotektoren auf die  $\beta$ -Galactosidaseaktivität bei der Gefriertrocknung.**

Nachfolgend wird der Einfluss der Kryoprotektoren Hypromellose und Mannitol auf die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase statistisch ausgewertet. Die Konzentration von Hypromellose beträgt 0,5% und 1% und von Mannitol 5% und 10% (s. Kap. 3.1). Als Referenz dient eine Lösung ohne Kryoprotektorzusatz.

Tabelle 4-38: Einfluss der Kryoprotektoren auf die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase bei der Gefriertrocknung.

<i>Faktor</i>	<i>Skalierte Schätzwerte</i>	<i>Standard-fehler</i>	<i>t Wert</i>	<i>Prob&gt; t </i>
<b>ohne Kryoprotektor</b>	-20,87	1,5153	-13,77	<0,0001
<b>0,5% HPMC</b>	-3,62	1,5153	-2,39	0,0206
<b>1% HPMC</b>	27,75	1,5153	18,31	<0,0001
<b>5% Mannit</b>	-12,43	1,5153	-8,20	<0,0001
<b>10% Mannit</b>	9,18	1,5153	6,06	<0,0001

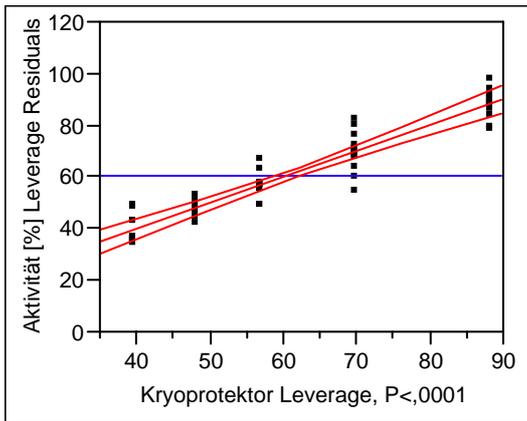


Abbildung 4-16: Einflussdiagramm der Kryoprotektoren auf die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase bei der Gefriertrocknung.

Beide Kryoprotektoren haben in der höheren Konzentration einen positiven Einfluss auf die Aktivität des Enzyms. Dieser ist bei 1% Hypromellose um das dreifache höher als bei 10% Mannitol (vgl. skalierte Schätzwerte in der Tabelle 4-38).

Die niedrigste Restaktivität beobachtet man in der Lösung ohne Kryoprotektoren. Diese ist um ein Drittel niedriger als der absolute Mittelwert. Dadurch wird deutlich, dass beide Kryoprotektoren, auch in der niedrigeren Konzentration, eine Schutzwirkung auf das Enzym bei der Gefriertrocknung nach Schockgefrieren haben.

## 4.2 Inaktivierung von Trypsin nach Einfrieren und Gefriertrocknung.

In den nachfolgend beschriebenen Versuchsreihen wurde das Ausmaß der Inaktivierung von Trypsin nach dem Einfrieren und nach Einfrieren und Gefriertrocknung untersucht.

Analog den Versuchen mit  $\beta$ -Galactosidase (vgl. Kap. 4.1, s. 94) wurden die Untersuchungen ohne Kryoprotektoren und mit den beiden Hilfsstoffen Hypromellose und Mannitol durchgeführt. Die Untersuchungslösungen wurden bei drei verschiedenen Temperaturen:  $-27^{\circ}\text{C}$ ,  $-78^{\circ}\text{C}$  und bei  $-196^{\circ}\text{C}$  eingefroren und wieder aufgetaut (vgl. Kap. 3.3.3.), als auch in einem konventionellen Gefriertrockner bzw. im Fingerlyophilisator gefriergetrocknet.

Bei der konventionellen Gefriertrocknung wurde die Lösung in Infusionsflaschen mit 100 ml Volumen bei  $-27^{\circ}\text{C}$  bzw.  $-78^{\circ}\text{C}$  eingefroren sowie auf die unter  $-190^{\circ}\text{C}$  abgekühlte Wand der Infusionsflaschen aufgesprüht und schockgefroren. Für die Fingerlyophilisation wurden die Lösungen ausschließlich an der Wand der Flasche schockgefroren. Tabelle 3-2 (s. S.90) gibt das Bezifferungsschema der Versuche an.

### 4.2.1 Gehaltsbestimmung von Trypsin

Für die Kalibrierung der Gehaltsbestimmung von Trypsin wurden Lösungen mit sechs Konzentrationen zwischen 0,1-0,6 mg/ml im Tris-Puffer mit einem pH-Wert von 8,3 hergestellt.

Bei der Gehaltsbestimmung wurde die zeitabhängige Absorptionszunahme des Farbstoffes p-NA (para-Nitroanilin), der bei der enzymatischen Spaltung des Substrats Suc-Ala-Ala-Pro-Arg-pNA entsteht, bei 25°C gemessen. (vgl. Kap. 3.3.1.)

Für die Erstellung der Kalibriergeraden wurden die Mittelwerte der drei gemessenen Steigungen der Absorptionsgeraden gegen die Trypsin-Konzentration (Abbildung 4-17) aufgetragen. Da die Versuche in größeren zeitlichen Abständen durchgeführt wurden, und zwei unterschiedliche Enzymchargen verwendet wurden, wurden drei Kalibrierreihen erstellt. Alle Kalibrierreihen werden im Kap. 7.3. Anhang aufgeführt.

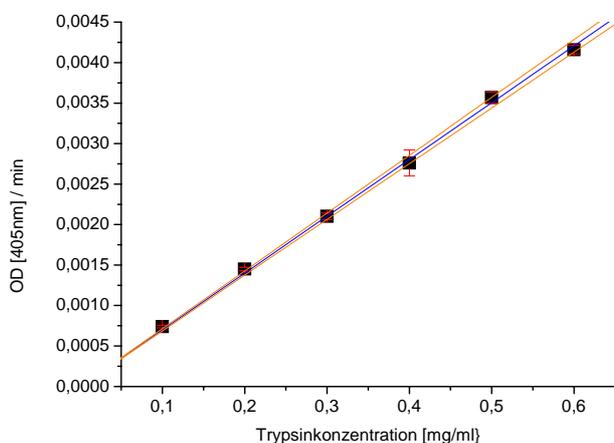


Abbildung 4-17: Kalibrierreihe Trypsin. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei Messungen (schwarze Kästchen) und ihre Standardabweichung. Die mittlere Linie stellt die Lineare Regression dar:  $y=0,0071x - 3^{-06}$ ;  $R^2 = 0,9979$ ; die äußeren Linien geben das 95% Konfidenzintervall an. Die Standardabweichungen aller Konzentrationen außer 0,4 mg/ml sind kleiner als die Symbole.

## 4.2.2 Inaktivierung von Trypsin nach Einfrieren und Wiederauftauen

Für die Einfrier-Versuche wurden für jeden Teilversuch (z. B. Schockefrieren ohne Kryoprotektoren) drei Flaschen mit Enzymlösung eingefroren (vgl. Kap. 3.3.3.). Aus jeder Flasche wurden drei Aktivitätsbestimmungen (= Gehaltsbestimmung) durchgeführt. In den unten aufgeführten Tabellen und Diagrammen werden je Teilversuch 9 Messergebnisse dargestellt.

In einigen Fällen sind Gehaltsbestimmungen fehlgeschlagen oder die Probe ist verloren gegangen. Dieses geht im Einzelnen aus den Tabellen hervor. Manche Versuchsreihen wurden teilweise wiederholt, da die erhaltenen Ergebnisse eine sehr hohe Standardabweichung aufwiesen. Diese Ergebnisse wurden aufgrund einer neuen Referenzmessung (Aktivität unbehandelter Enzymlösung am betreffenden Versuchstag) in getrennten Tabellen zusammengefasst.

**Einfrieren ohne Kryoprotektoren.**

Tabelle 4-39: Aktivität von Trypsin nach dem Einfrieren ohne Kryoprotektoren:(\* Probe verloren gegangen)

	Aktivität							
	vor Einfrieren		Schockgefrieren Ziff: 2111		Einfrieren -78°C Ziff: 2211		Einfrieren -27°C Ziff: 2311	
	IE/ml	%	IE/ml	%	IE/ml	%	IE/ml	%
Probe 1	4,488	98,6	3,449	90,3	2,793	77,0	3,504	77,0
	4,35744	95,7	3,387	88,7	2,926	80,6	3,798	83,5
	4,54716	99,9	3,402	89,1	3,047	84,0	3,839	84,4
Probe 2	4,32072	94,9	3,158	82,7	2,627	72,4	3,871	85,0
	4,4676	98,2	3,247	85,0	2,682	73,9	3,345	73,5
	4,3146	94,8	3,212	84,1	2,756	75,9	3,356	73,7
Probe 3	4,81236	105,7	3,128	81,9	*	*	3,491	76,7
	4,86132	106,8	3,956	103,6	*	*	3,496	76,8
	4,79502	105,3	3,186	83,5	*	*	3,358	73,8
<b>MW</b>	<b>4,5516</b>	<b>100,0</b>	<b>3,347</b>	<b>87,7</b>	<b>2,8052</b>	<b>77,3</b>	<b>3,562</b>	<b>78,3</b>
Std. Abw.	0,094	2,27	0,12	3,05	0,156	4,3	0,216	4,7

Tabelle 4-40: Varianzanalyse: Einfrieren von Trypsin ohne Kryoprotektoren.

Art der Variation	df	QS	MQ	F <sub>beob</sub>	F <sub>tab</sub> (p=0,05)
Zwischen den Gruppen	2	540,4	270,4	8,979	3,44
Innerhalb der Gruppen	21	632,5	30,1		
total	23	1173,4			

Trypsin wird bei allen drei Einfrieremethoden zu einem geringen Teil (max. 20%) inaktiviert. Zwischen den einzelnen Methoden treten allerdings signifikante Unterschiede in der Restaktivität des Enzyms auf (s. Tabelle 4-40). Der errechnete F<sub>beob</sub> Wert beträgt 8,97, er liegt oberhalb des tabellarischen F-Wertes und ist auf der Stufe p=0,05 signifikant (für die Freiheitsgrade df1, df2: 2,22; für p=0,05; F<sub>tab</sub>=3,44). Das bedeutet, dass die Aktivität nach dem Schockgefrieren signifikant höher liegt, als nach den anderen Einfriertemperaturen.

**Einfrieren mit 0,5% Hypromellose.**

Tabelle 4-41: Aktivität von Trypsin nach dem Einfrieren bei -78°C und -27°C mit 0,5% Hypromellose.

Aktivität							
	vor Einfrieren			Einfrieren -78°C Ziff: 2221		Einfrieren -27°C Ziff: 2321	
	IE/ml	%		IE/ml	%	IE/ml	%
Probe 1	6,159	102,5	Probe 1	5,619	93,5	4,967	88,9
	5,816	96,8		5,389	89,7	4,937	88,4
	5,694	94,8		5,576	92,8	5,146	92,2
Probe 2	6,095	101,5	Probe 2	4,784	79,6	4,939	88,5
	6,243	103,9		4,667	77,7	5,137	91,9
	6,043	100,6		4,927	82,0	5,041	90,3
			Probe 3	4,969	82,7	6,415	114,9
				5,025	83,6	3,219	57,7
				4,956	82,5	6,171	110,5
<b>MW</b>	<b>6,008</b>	<b>100,0</b>	<b>MW</b>	<b>5,160</b>	<b>85,9</b>	<b>5,108</b>	<b>91,5</b>
Std. Abw.	0,235	3,5	Std. Abw.	0,343	5,7	0,901	16,1

## Ergebnisse und Auswertung

Tabelle 4-42: Aktivität von Trypsin nach Schockgefrieren mit 0,5% Hypromellose. \*Probe verloren gegangen.

	Aktivität			
	vor Einfrieren		Schockgefrieren Ziff: 2121	
	IE/ml	%	IE/ml	%
Probe 1	3,616	94,4	3,309	86,4
	4,618	120,6	3,412	89,1
	3,702	96,6	3,523	91,9
Probe 2	3,799	99,2	3,79	98,9
	3,576	93,4	3,828	99,9
	3,712	96,9	3,791	98,9
Probe 3	3,620	94,5	*	*
	3,87	101,0	*	*
	3,964	103,5	*	*
<b>MW</b>	<b>3,831</b>	<b>100,00</b>	<b>3,609</b>	<b>94,2</b>
Std. Abw.	0,303	8,69	0,223	5,83

Tabelle 4-43: Varianzanalyse: Einfrieren von Trypsin mit 0,5% Hypromellose.

Art der Variation	df	QS	MQ	F <sub>beob</sub>	F <sub>tab (p=0,05)</sub>
Zwischen den Gruppen	2	357,8	178,9	1,49	3,44
Innerhalb der Gruppen	21	2511,5	119,5		
total	23	2869,4			

Der Zusatz von 0,5% Hypromellose erhöht, gegenüber dem Einfrieren ohne Kryoprotektoren, die Restaktivität von Trypsin nach allen drei Einfrieremethoden um bis zu 10%. Zwischen den Restaktivitäten des Enzyms nach den einzelnen Einfrieremethoden bestehen keine signifikanten Unterschiede (vgl. Tabelle 4-43). Das heißt die Einfrierbedingungen haben keinen Einfluss auf die Restaktivität von Trypsin.

$\beta$ -Galactosidase mit 0,5% Hypromellosezusatz reagierte auf Schockgefrieren und Einfrieren bei -78°C ähnlich wie Trypsin, ihre Aktivität lag bei 90-97%. Durch das Einfrieren bei -27°C wurde sie allerdings fast vollständig inaktiviert (Restaktivität 3%).

**Einfrieren mit 1% Hypromellose.**

Tabelle 4-44: Aktivität von Trypsin nach dem Einfrieren mit 1 % Hypromellose.\*\*Messung misslungen.

	Aktivität							
	vor Einfrieren		Schockgefrieren Ziff: 2131		Einfrieren -78°C Ziff: 2231		Einfrieren -27°C Ziff: 2331	
	IE/ml	%	IE/ml	%	IE/ml	%	IE/ml	%
Probe 1	5,931	103,0	3,790	65,8	4,868	84,6	2,944	47,4
	5,808	100,9	3,650	63,4	5,661	98,4	2,864	46,2
	5,670	98,5	4,044	70,2	4,838	84,0	3,294	53,1
Probe 2	5,895	102,4	3,807	66,1	4,963	86,2	3,249	52,4
	6,0414	104,9	4,664	81,0	4,761	82,7	2,939	47,4
	5,645	98,0	4,339	75,4	4,722	82,0	3,232	52,1
Probe 3	5,807	100,9	4,477	77,8	4,841	84,1	3,316	53,5
	5,814204	101,0	**	**	4,837	84,0	3,268	52,7
	5,203	90,4	**	**	**	**	4,078	65,7
<b>MW</b>	<b>5,757</b>	<b>100,00</b>	<b>4,322</b>	<b>71,4</b>	<b>4,937</b>	<b>85,8</b>	<b>3,243</b>	<b>52,3</b>
Std. Abw.	0,227	4,31	0,368	6,39	0,303	5,3	0,359	5,8

Wie aus Tabelle 4-45 ersichtlich unterscheiden sich die Restaktivitäten von Trypsin nach den Einfrieremethoden signifikant, da  $F_{beob} > F_{tab}$  ( $p=0,05$ ).

Tabelle 4-45: Varianzanalyse Einfrieren von Trypsin mit 1 % Hypromellose.

Art der Variation	df	QS	MQ	$F_{beob}$	$F_{tab}(p=0,05)$
Zwischen den Gruppen	2	4806,05	2403,03	68,56	3,44
Innerhalb der Gruppen	21	735,9	35,05		
total	23	5542,0			

Beim Einfrieren von Trypsin mit 1% Hypromellose sinkt seine Restaktivität nach dem Schockgefrieren auf 70% und nach dem Einfrieren bei -27°C auf 50%. Nach dem Einfrieren bei -78°C nimmt die Aktivität des Enzyms mit Zusatz von 1% HPMC am wenigsten von allen drei Einfrierbedingungen ab. Sie beträgt im Mittel 85%.

## Ergebnisse und Auswertung

-----  
 Gegenüber dem Einfrieren mit 0,5% Hypromellose sind die Restaktivitäten von Trypsin mit 1 % Hypromellose nach dem Schockefrieren um 20% und nach dem Einfrieren bei -27°C um 40% niedriger. Hier wirkt der Zusatz der höheren Hypromellosekonzentration nicht protektiv, im Gegenteil, er führt unerwartet zur Schädigung des Enzyms beim Einfrieren.

Bei analogen Versuchen mit  $\beta$ -Galactosidase blieb ihre Restaktivität ebenfalls nach Schockefrieren und Einfrieren bei -78°C weitgehend erhalten und sank nach dem Einfrieren bei -27°C auf 30%.

### Einfrieren mit 5% Mannitol.

Tabelle 4-46: Aktivität von Trypsin nach dem Einfrieren mit 5 % Mannitol. (vor dem Einfrieren 6 Messungen durchgeführt, \*\* Messung misslungen)

Aktivität									
	vor Einfrieren			Schockefrieren Ziff: 2141		Einfrieren -78°C Ziff: 2241		Einfrieren -27°C Ziff: 2341	
	IE/ml	%		IE/ml	%	IE/ml	%	IE/ml	%
Probe 1	4,389	99,9	Probe 1	3,674	84,9	3,749	85,3	4,097	110,7
	4,433	100,9		3,652	84,4	3,647	83,0	4,311	116,5
	4,499	102,4		3,685	85,2	3,798	86,4	3,695	99,8
Probe 2	4,214	95,9	Probe 2	3,287	76,0	3,465	78,9	4,239	114,5
	4,384	99,8		3,334	77,1	3,538	80,5	4,134	111,7
	4,446	101,2		**	**	3,568	81,2	4,136	111,7
			Probe 3	3,470	80,2	3,359	76,4	4,015	108,4
				3,471	80,2	3,430	78,1	4,051	109,4
				3,551	82,1	3,666	83,4	**	**
<b>MW</b>	<b>4,394</b>	<b>100,0</b>	<b>MW</b>	<b>3,811</b>	<b>81,3</b>	<b>3,628</b>	<b>81,5</b>	<b>4,368</b>	<b>110,3</b>
Std. Abw.	0,098	2,2	Std. Abw.	1,33	3,5	0,148	3,4	0,865	4,98

In dieser Versuchsreihe zeigte sich eine sehr hohe Aktivität des Enzyms nach dem Einfrieren bei -27°C (>100%). Dieses Ergebniss wurde in einer zusätzlichen Versuchsreihe überprüft und bestätigt (vgl. Tabelle 4-47). Die Aktivität von Trypsin mit 5% Mannitol nach dem Einfrieren bei -27°C liegt zwar höher als die Aktivität

der unbehandelten Lösung, aber Unterschied ist nicht statistisch signifikant. Trypsin mit Zusatz von 5% Mannitol wird beim Einfrieren bei -27°C nicht deaktiviert.

Gegenüber dem Einfrieren ohne Kryoprotektoren und mit Hypromellose erhöht sich die Enzymaktivität nach dem Schockgefrieren und dem Einfrieren bei -78°C mit 5% Mannitol nicht.

Tabelle 4-47: Aktivität von Trypsin nach dem Einfrieren bei -27°C mit 5 % Mannitol - Wiederholungsversuch

	Aktivität			
	vor Einfrieren		Einfrieren -27°C Ziff: 2341	
	IE/ml	%	IE/ml	%
Probe 1	5,199	93,4	5,764	103,5
	5,583	100,3	6,026	108,2
	5,746	103,2	7,029	126,3
Probe 2	5,884	105,7	6,101	109,6
	5,882	105,7	6,165	110,7
	5,922	106,4	7,158	128,6
Probe 3	5,257	94,4	5,714	102,6
	5,210	93,6	5,80	104,2
	5,420	97,4	5,69	102,4
<b>MW</b>	<b>5,567</b>	<b>100,8</b>	<b>6,162</b>	<b>110,7</b>
Std. Abw.	0,285	2,56	0,555	10,0

**Einfrieren mit 10% Mannitol.**

Tabelle 4-48: Aktivität von Trypsin nach dem Schockgefrieren und dem Einfrieren bei -27°C mit 10 % Mannitol.

Aktivität							
	vor Einfrieren			Schockgefrieren Ziff: 2151		Einfrieren -27°C Ziff: 2351	
	IE/ml	%		IE/ml	%	IE/ml	%
Probe 1	3,805	96,4	Probe 1	3,9525	100,2	3,46086	95,6
	3,909	99,0		3,657	92,7	3,336	92,2
	3,821	96,8		3,905	98,9	3,340	92,3
Probe 2	3,969	100,6	Probe 2	3,669	93,0	3,115	86,1
	4,118	104,3		3,911	99,1	3,413	94,3
	4,057	102,8		3,955	100,2	3,441	95,1
			Probe 3	3,467	87,9	3,188	88,1
				3,641	92,3	2,931	81,0
				3,750	95,0	3,232	89,3
<b>MW</b>	<b>3,946</b>	<b>100,0</b>	<b>MW</b>	<b>3,768</b>	<b>95,5</b>	<b>3,273</b>	<b>90,5</b>
Std. Abw.	0,127	3,2	Std. Abw.	0,14	3,58	0,174	4,8

Tabelle 4-49: Aktivität von Trypsin nach dem Einfrieren bei -78°C mit 10 % Mannitol.

	Aktivität			
	vor Einfrieren		Einfrieren -78°C Ziff: 2251	
	IE/ml	%	IE/ml	%
Probe 1	0,642	97,5	0,598	90,8
	0,664	100,8	0,592	89,9
	0,654	99,3	0,620	94,2
Probe 2	0,671	101,9	0,574	87,2
	0,674	102,4	0,563	85,5
	0,685	104,0	0,595	90,3
Probe 3	0,644	97,8	0,671	101,8
	0,6235	94,7	0,644	97,9
	0,667	101,4	0,665	100,9
<b>MW</b>	<b>6,715</b>	<b>100,0</b>	<b>6,257</b>	<b>93,2</b>
Std. Abw.	0,134	1,37	0,396	5,9

In den Lösungen mit 10% Mannitol verändert sich die Enzymaktivität nach allen drei Einfrierverfahren nur gering gegenüber der unbehandelten Lösung. Die Restaktivitäten betragen im Mittel 90%. Das Ergebnis der Varianzanalyse zeigt (Tabelle 4-50), dass die Unterschiede in den Restaktivitäten zwischen den Einfrierbedingungen nicht signifikant sind.

Diese Restaktivitäten liegen höher als die Aktivitäten in den Lösungen ohne Kryptoprotektoren und mit 0,5% und 1% Hypromellose sowie mit 5 % Mannitol.

$\beta$ -Galactosidase wurde in analogen Versuchen mit 10% Mannitol am meisten durch das Einfrieren bei -27°C geschädigt (Restaktivität 20%), moderater Aktivitätsverlust trat beim Einfrieren bei -78°C auf (Restaktivität 77%), nach Schockgefrieren verhielt sie sich ähnlich wie das Trypsin (Restaktivität 95%).

Tabelle 4-50: Varianzanalyse Einfrieren von Trypsin mit 10% Mannitol.

Art der Variation	df	QS	MQ	F <sub>beob</sub>	F <sub>tab</sub> (p=0,05)
Zwischen den Gruppen	2	114,2	57,1	2,23	3,44
Innerhalb der Gruppen	24	612,2	25,5		
total	26	726,5			

#### 4.2.2.1 Zusammenfassung der Einfrierversuche mit Trypsin

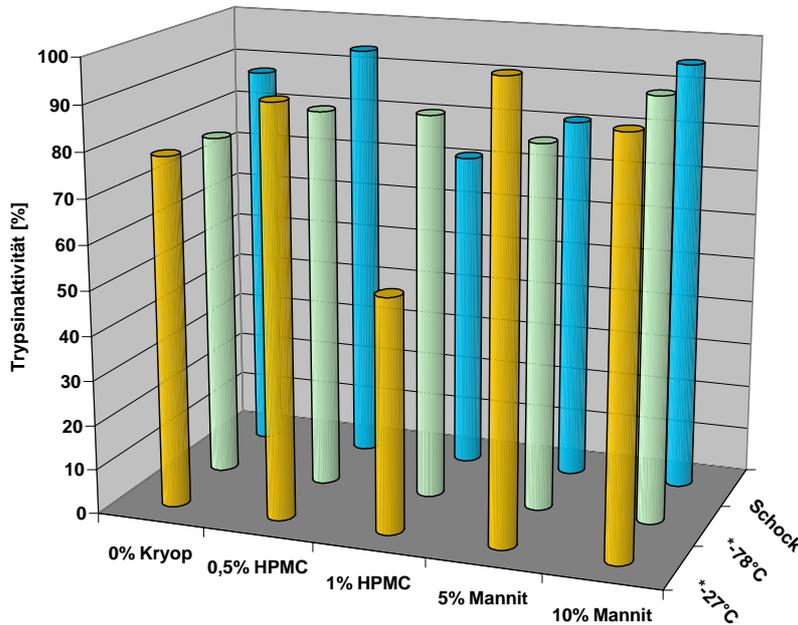


Abbildung 4-18: Abhängigkeit der Trypsinaktivität von den Einfrierbedingungen mit und ohne Kryoprotectorzusatz.

Trypsin wird durch das Schockgefrieren nicht wesentlich deaktiviert. Das wird besonders in der Lösung ohne Kryoprotektoren deutlich, in der die Restaktivität bei fast 90% liegt. Die Trypsinaktivität nach dem Schockgefrieren sinkt lediglich in der Lösung mit Zusatz von 1% Hypromellose auf fast 70%. Das bedeutet, dass der Zusatz von 1% Hypromellose beim Schockgefrieren nicht kryoprotektiv wirkt, sondern zur Enzymdeaktivierung beiträgt.

In den Lösungen ohne Kryoprotektoren, mit Zusatz von 0,5% Hypromellose und mit 5% und 10% Mannitol liegt die Aktivität nach dem Schockgefrieren bei 90-100%.

Die Aktivität von Trypsin ist nach dem Einfrieren bei -78°C geringfügig niedriger als nach dem Schockgefrieren. Sie liegt in allen untersuchten Lösungen zwischen 80-90%.

Nach dem Einfrieren bei -27°C sticht ein Abfall der Trypsinrestaktivität auf 52% in der Lösung mit 1% Hypromellose hervor. In den übrigen Lösungen ist die Restak-

.....  
 tivität vergleichbar bzw. höher wie nach dem Einfrieren bei -78°C und Schockefrieren. 10% Mannitol und 0,5% Hypromellose scheinen bei allen Einfriermethoden ähnlich gut kryoprotektiv zu wirken. Bei den untersuchten Einfrierverfahren diente der Zusatz von 1% Hypromellose nicht zum Schutz des Enzyms.

Die Deaktivierung von Trypsin nach dem Einfrieren ist deutlich weniger ausgeprägt als bei  $\beta$ -Galactosidase (vgl. Kap.4.1.2.7.).

#### 4.2.2.1.1. Statistische Auswertung der Einfrierversuche von Trypsin

Die nachfolgende statistische Auswertung der Ergebnisse der Trypsin-Einfrierversuche wurde mit dem Programm JMP 5.1 durchgeführt [39].

Es wurde eine Varianzanalyse durchgeführt. Darüber hinaus wurde der Einfluss der Einfriertemperatur, der Kryoprotektoren und der Wechselwirkungen von beiden auf die Trypsinaktivität untersucht.

Tabelle 4-51: Varianzanalyse der Ergebnisse des Einfrierens von Trypsin. df: Anzahl der Freiheitsgrade; SAQ: Summe der Abweichungsquadrate; MQ: das mittlere Abweichungsquadrat; FTab: kritischer F-Wert (vgl. auch Kap. 3.3.9)

Modell						
Quelle	df	SAQ	MQ	F-Wert	Prob>F	Bewertung
Einfrieren	2	68,85	34,4	0,78	0,4608	Nicht signif.
Kryoprotektor	4	9201,12	2300,3	52,14	<0,0001	Hoch signifikant
Wechselwirkung	8	10387,9	1298,5	29,43	<0,0001	Hoch signifikant
Gesamt						
Quelle	df	SAQ	MQ	F-Wert	F <sub>Tab</sub>	Bewertung
Effekt	14	19975,96	1426,85	32,34	1,79	signifikant
Fehler	110	4852,71	44,12			
C. Total	124	24828,67				

Der erste Abschnitt in der Tabelle 4-51 (Modell) zeigt den Einfluss der Faktoren Einfrieren und Kryoprotektor und deren Wechselwirkungen auf die Aktivität von

Trypsin bei allen drei angewandten Einfrierbedingungen. Der Faktor Einfrieren beeinflusst die Aktivität des Enzyms nicht. Dagegen ist der Effekt der Kryoprotektoren und der Wechselwirkungen zwischen Einfrieren und Kryoprotektor hochsignifikant. Dadurch liegt der F-Wert der Gesamt-Varianzanalyse oberhalb des tabellierten kritischen F-Wertes und ist damit für die Freiheitsgrade 14 und 110 signifikant.

Die Effekte auf die Trypsinaktivität, die von den einzelnen Faktoren und deren Wechselwirkungen ausgelöst werden, werden genauer in den nachstehenden Tabellen und Diagrammen dargelegt.

### **Einfluss der Einfriertemperatur auf die Aktivität von Trypsin.**

Den Einfluss des Einfrierverfahrens auf die Aktivität von Trypsin geben Abbildung 4-19 und Tabelle 4-52 wider.

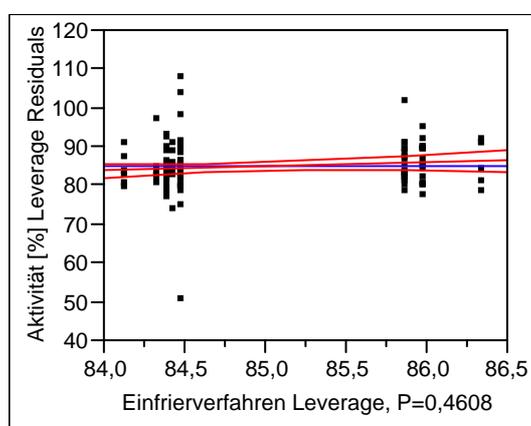


Abbildung 4-19: Einflussdiagramm des Einfrierverfahrens auf die Aktivität von Trypsin.

Tabelle 4-52: Einfluss des Einfrierens auf die Aktivität von Trypsin.

<b>Faktor</b>	<b>Skalierte Schätzwerte</b>	<b>Standard-Fehler</b>	<b>t Wert</b>	<b>Prob&gt; t </b>
<b>Gesamtmittel</b>	85,03	0,59	141,81	<0,0001
<b>Einfrieren [-27°C]</b>	-0,46	0,83	-0,56	0,5798
<b>Einfrieren [-78°C]</b>	-0,61	0,85	-0,71	0,4781
<b>Einfrieren [-196°C]</b>	1,07	0,85	1,25	0,2149

Der Mittelwert aller Beobachtungen (Gesamtmittel) der Trypsinaktivität nach dem Einfrieren beträgt 85%. Dieser Wert ist um 25% höher als der Mittelwert der  $\beta$ -Galactosidaseaktivität nach der gleichen Behandlung (vgl. Tabelle 4-10). Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei  $\beta$ -Galactosidase, bei denen deutliche Unterschiede zwischen den angewandten Einfriertemperaturen bestanden (Abbildung 4-3 und Tabelle 4-10), hat die Art des Einfrierens für sich keinen signifikanten Einfluss auf die Trypsinaktivität. Das erkennt man an den sehr niedrigen skalierten Schätzwerten in Tabelle 4-52 und der flach verlaufenden Geraden in der Abbildung 4-19. Diese skalierten Schätzwerte machen eine Aussage über den Einfluss des untersuchten Faktors auf die abhängige Variable Aktivität. Positive Zahlen bedeuten eine geringe, negative Zahlen eine starke Schädigung des Enzyms.

### Einfluss der Kryoprotektoren auf die Aktivität von Trypsin.

Den Einfluss der Kryoprotektoren Hypromellose und Mannitol auf die Aktivität von Trypsin beim Einfrieren zeigt die Abbildung 4-20 und Tabelle 4-53. Die Konzentrationen von Hypromellose betragen 0,5% und 1% und die von Mannitol 5% und 10% (s.Kap. 3.1). Als Referenz diente die Lösung ohne Kryoprotektoren.

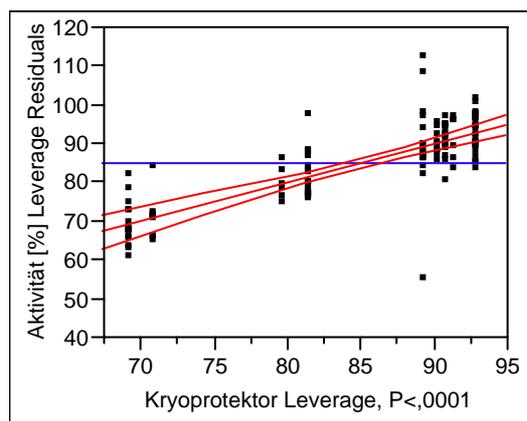


Abbildung 4-20: Einflussdiagramm der Kryoprotektoren auf die Aktivität von Trypsin beim Einfrieren.

Tabelle 4-53: Einfluss der Kryoprotektoren auf die Aktivität von Trypsin im Mittel über alle Einfrierbedingungen.

<i>Faktor</i>	<i>Skalierte Schätzwerte</i>	<i>Standard-Fehler</i>	<i>t Wert</i>	<i>Prob&gt; t </i>
<b>ohne Kryoprotektor</b>	-3,95	1,23	-3,22	0,0017
<b>0,5% HPMC</b>	5,164	1,23	4,21	<0,0001
<b>1% HPMC</b>	-15,06	1,19	-12,62	<0,0001
<b>5% Mannitol</b>	5,83	1,19	4,89	<,00001
<b>10% Mannitol</b>	8,01	1,16	6,92	<0,0001

Der Effekt der Kryoprotektoren auf die Trypsinaktivität ist hochsignifikant und gleichzeitig ausgeprägter als der Effekt der Einfrierbedingungen (vgl. auch Tabelle 4-51). Das wird beim Vergleich der Geradensteigungen in Abbildung 4-19 und Abbildung 4-20 sichtbar. In Abbildung 4-19 verlaufen diese Geraden nahezu waagrecht, dagegen sind sie in Abbildung 4-20 deutlich steiler.

Einen ungefähr gleichen positiven Einfluss (Schätzwert bei 5-8%) auf die Aktivität zeigen die Zusätze von 0,5% Hypromellose, 5% und 10% Mannitol. Eine deutliche Schädigung des Enzyms tritt in der Lösung mit 1% Hypromellose auf (Schätzwert bei -15% vgl. Abbildung 4-18).

Bei  $\beta$ -Galactosidase hingegen brachten die höheren Kryoprotektorkonzentrationen einen klaren Vorteil für die Enzymaktivität nach dem Einfrieren.

-----

**Einfluss der Kryoprotektoren auf die Trypsinaktivität beim Einfrieren bei -27°C.**

Die relative Schutzwirkung der Kryoprotektoren beim Einfrieren bei -27°C zeigt Tabelle 4-54.

Tabelle 4-54: Einfluss Kryoprotektoren auf die Aktivität von Trypsin bei Einfrieren bei -27°C

<i>Faktor</i>	<i>Skalierte Schätzwerte</i>	<i>Standardfehler</i>	<i>t Wert</i>	<i>Prob&gt; t </i>
<i>ohne Kryoprotektor</i>	-2,34	1,68	-1,40	0,1654
<i>0,5% HPMC</i>	1,75	1,68	1,04	0,2986
<i>1% HPMC</i>	-17,23	1,65	-10,42	<0,0001
<i>5% Mannitol</i>	19,95	1,69	11,79	<0,0001
<i>10% Mannitol</i>	-2,12	1,63	-1,30	0,1955

Das Ergebnis der Prüfung von Wechselwirkungen zwischen Einfrieren und Kryoprotektoren auf die Trypsinaktivität ist mit dem von  $\beta$ -Galactosidase vergleichbar. Bei beiden Enzymen tritt die Schutzwirkung von 5% Mannitol in den Vordergrund. In der Lösung mit 1% Hypromellose beobachtet man allerdings die stärkste Enzymschädigung des Trypsins, bei  $\beta$ -Galactosidase war das in der Lösung mit 0,5% Hypromellose der Fall.

-----  
**Einfluss der Kryoprotektoren auf die Trypsinaktivität beim Einfrieren bei -78°C.**

In der Tabelle 4-55 ist der Einfluss von Hypromellose und Mannitol auf die Restaktivität beim Einfrieren bei -78°C dargestellt.

Tabelle 4-55: Einfluss der Kryoprotektoren auf die Aktivität von Trypsin beim Einfrieren bei -78°C.

<i>Faktor</i>	<i>Skalierte Schätzwerte</i>	<i>Standardfehler</i>	<i>t Wert</i>	<i>Prob&gt; t </i>
<i>ohne Kryoprotektor</i>	-3,16	1,83	-1,73	0,0860
<i>0,5% HPMC</i>	-4,68	1,69	-2,77	0,0066
<i>1% HPMC</i>	16,38	1,70	9,63	<0,0001
<i>* 5% Mannitol</i>	-9,28	1,66	-5,58	<0,0001
<i>10% Mannitol</i>	0,74	1,64	0,45	0,6509

Beim Einfrieren von Trypsin bei -78°C tritt eine deutliche kryoprotektive Wirkung von 1% Hypromellose in den Vordergrund. In den Lösungen mit den niedrigeren Hilfsstoffkonzentrationen kommt es bei dieser Einfriertemperatur zu einer geringfügigen Schädigung des Enzyms. Bei 5% Mannitolzusatz ist die Aktivitätsabnahme nach Einfrieren bei -78°C hochsignifikant.

Die vergleichbare Prüfung des Einflusses dieser Faktoren auf die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase ergab einen klaren Vorteil bei Zusatz von 0,5% Hypromellose und eine weniger ausgeprägte Schutzwirkung bei 1% Hypromellose- und 10% Mannitol-Zusatz.

### **Einfluss der Kryoprotektoren auf die Trypsinaktivität beim Schockgefrieren.**

Nachfolgende Tabelle zeigt die Wirkung von Kryoprotektoren auf die Aktivität von Trypsin beim Schockgefrieren.

Tabelle 4-56: Einfluss der Kryoprotektoren auf die Aktivität von Trypsin beim Schockgefrieren

<i>Faktor</i>	<i>Skalierte Schätzwerte</i>	<i>Standardfehler</i>	<i>t Wert</i>	<i>Prob&gt; t </i>
<i>ohne Kryoprotektor</i>	5,51	1,6910	3,26	0,0015
<i>0,5% HPMC</i>	2,93	1,8302	1,60	0,1127
<i>1% HPMC</i>	0,85	1,7030	0,50	0,6203
<i>5% Mannitol</i>	-10,66	1,7030	-6,26	<0,0001
<i>10% Mannitol</i>	1,38	1,6419	0,84	0,4030

Die Restaktivität nach dem Schockgefrieren ist in der Referenzlösung um 5% höher als der Gesamtmittel. Die Abweichung ist allerdings nicht signifikant. Damit zeigt sich, dass der Zusatz von Hilfsstoffen für die Erhaltung der Aktivität von Trypsin beim Schockgefrieren nicht notwendig ist.

In den Lösungen mit 0,5% und 1% Hypromellose und 10% Mannitol liegt der skalierte Schätzwert knapp oberhalb des globalen Mittelwertes. Das bedeutet, dass Trypsin in diesen Lösungen nur wenig deaktiviert wird. Eine hochsignifikante Enzymschädigung tritt in der Lösung mit 5% Mannitol auf.

Das Schockgefrieren von  $\beta$ -Galactosidase zeigte in allen Lösungen mit Kryoprotektoren einen negativen skalierten Schätzwert im Bereich zwischen -3,5% bis maximal -13 %. Der skalierte Schätzwert in der Referenzlösung lag 28% über dem absoluten Mittelwert. Das zeigt, dass auch für  $\beta$ -Galactosidase kein Zusatz von Kryoprotektoren beim Schockgefrieren erforderlich wäre.

Wie diese Ergebnisse zeigen, ist das Schockgefrieren für die Erhaltung der Aktivität beider Enzyme am günstigsten. Der Zusatz von Hilfsstoffen ist aus Gründen der Kryoprotektion nicht notwendig.

### 4.2.3 Inaktivierung von Trypsin bei der konventionellen Gefriertrocknung

In dieser Versuchsreihe sollte gezeigt werden, ob und in welchem Maß Trypsin durch die konventionelle Gefriertrocknung (nach Schockgefrieren, Einfrieren bei  $-78^{\circ}\text{C}$  und  $-27^{\circ}\text{C}$ ) inaktiviert wird. Die Enzymaktivität wurde nach der im Kap. 3.3.1. beschriebenen Methode bestimmt.

Die Ergebnisse stellen einen Vergleich aller drei Einfrierverfahren abhängig vom Zusatz des Kryoprotektors dar.

In den Diagrammen wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen dreier Proben abgebildet. Aus jeder Probe wurde drei Mal die Aktivität bestimmt. Vor dem Einfrieren wurden jeweils sechs Aktivitätsmessungen durchgeführt.

In einigen Fällen sind Gehaltsbestimmungen fehlgeschlagen oder die Probe ist verloren gegangen. Sie konnten nicht wiederholt werden. Dieses geht im Einzelnen aus den Tabellen hervor.

Aufgrund verschiedener Referenzmessungen (Aktivität unbehandelter Enzymlösung am betreffenden Versuchstag) wurden die nachfolgenden Ergebnisse bei manchen Versuchsreihen in getrennten Tabellen zusammengefasst.

**Konventionelle Gefriertrocknung ohne Kryoprotektoren.**

Bei Schockeinfrieren scheint die Aktivität durch die anschließende Gefriertrocknung zuzunehmen, bei den beiden anderen Verfahren nimmt sie ab, aber die Unterschiede sind nicht signifikant.

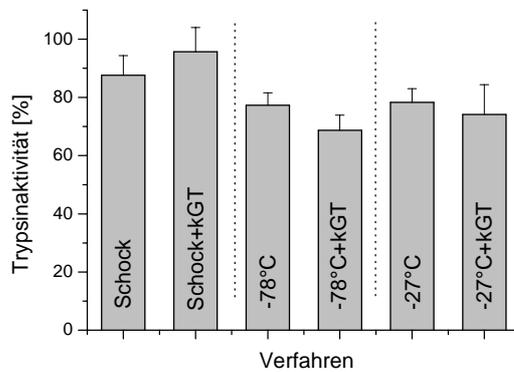


Abbildung 4-21: Aktivität von Trypsin nach Einfrieren und konventioneller Gefriertrocknung ohne Kryoprotektoren.

Tabelle 4-57: Aktivität von Trypsin nach Schockeinfrieren und Einfrieren bei -27°C und konventioneller Gefriertrocknung (kGT) ohne Kryoprotektoren; vor der Gefriertrocknung 6 Messungen durchgeführt.

Aktivität							
	vor Einfrieren		IE/ml	Schockeinfrieren + kGT Ziff: 2113		Einfrieren -27°C + kGT Ziff: 2313	
	IE/ml	%		%	IE/ml	%	
Probe 1	2,998	83,4	Probe 1	3,512	97,7	2,581	71,8
	4,8368	134,6		3,579	99,6	2,468	68,7
	4,692	130,6		3,112	86,6	2,6459	73,6
Probe 2	2,249	62,6	Probe 2	3,499	97,4	3,393	94,4
	3,892	108,3		3,440	95,7	2,589	72,0
	2,893	80,5		2,848	79,2	3,144	87,5
			Probe 3	3,737	104,0	2,502	69,6
				3,418	95,1	2,229	62,0
				3,81174	106,1	2,448	68,1
<b>MW</b>	<b>3,594</b>	<b>100,0</b>	<b>MW</b>	<b>3,440</b>	<b>95,7</b>	<b>2,667</b>	<b>74,2</b>
Std. Abw.	0,957	31,33	Std. Abw.	0,340	9,5	0,450	12,52

## Ergebnisse und Auswertung

---

Tabelle 4-58: Aktivität von Trypsin nach Einfrieren bei -78°C und konventioneller Gefriertrocknung ohne Kryoprotektoren; vor der Gefriertrocknung 6 Messungen durchgeführt.

Aktivität					
	vor Einfrieren			Einfrieren -78°C + kGT Ziff: 2213	
	IE/ml	%		IE/ml	%
Probe 1	3,397	87,9	Probe 1	2,564	66,3
	3,881	100,4		2,755	71,3
	3,701	95,7		2,984	77,2
Probe 2	4,007	103,7	Probe 2	2,855	73,9
	4,127	106,8		2,647	68,5
	4,08	105,6		2,749	71,1
/	/	/	Probe 3	2,353	60,9
				2,559	66,2
				2,442	63,2
<b>MW</b>	<b>3,865</b>	<b>100,0</b>	<b>MW</b>	<b>2,656</b>	<b>68,7</b>
Std. Abw.	0,252	4,4	Std. Abw.	0,188	4,9

**Konventionelle Gefriertrocknung mit 0,5% Hypromellose.**

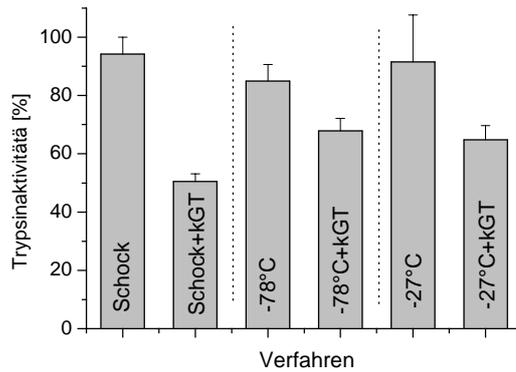


Abbildung 4-22: Aktivität von Trypsin nach Einfrieren und konventioneller Gefriertrocknung mit 0,5% Hypromellose.

Tabelle 4-59: Aktivität von Trypsin nach Schockeinfrieren und Einfrieren bei -27°C und konventioneller Gefriertrocknung mit 0,5% Hypromellose. \*\* Messung misslungen.

Aktivität							
	vor Einfrieren			Schockeinfrieren + kGT Ziff: 2123		Einfrieren -27°C + kGT Ziff: 2323	
	IE/ml	%		IE/ml	%	IE/ml	%
Probe 1	5,970	97,1	Probe 1	3,275	53,2	3,914	63,6
	5,905	96,0		3,122	50,8	4,030	65,5
	5,991	97,4		3,361	54,6	3,914	63,6
Probe 2	6,631	107,8	Probe 2	3,013	49,0	3,623	58,9
	6,518	106,0		2,836	46,1	3,562	57,9
	6,613	107,5		3,035	49,3	**	**
Probe 3	5,847	95,0	Probe 3	3,050	49,6	4,364	70,9
	5,863	95,3		3,150	51,2	4,097	66,6
	6,024	97,9		**	**	4,383	71,3
<b>MW</b>	<b>6,151</b>	<b>100,0</b>	<b>MW</b>	<b>3,105</b>	<b>50,48</b>	<b>3,986</b>	<b>64,80</b>
Std. Abw.	0,33	5,43	Std. Abw.	0,16	2,63	0,3	4,91

Tabelle 4-60: Aktivität von Trypsin nach Einfrieren bei -78°C und konventioneller Gefriertrocknung mit 0,5% Hypromellose.

Aktivität					
	vor Einfrieren			Einfrieren -78°C + kGT Ziff: 2223	
	IE/ml	%		IE/ml	%
Probe 1	0,355	94,4	Probe 1	0,280	74,5
	0,453	120,6		0,264	70,3
	0,363	96,6		0,275	73,1
Probe 2	0,373	99,2	Probe 2	0,252	67,1
	0,351	93,3		0,254	67,5
	0,364	96,9		0,255	67,9
Probe 3	0,355	94,5	Probe 3	0,237	63,1
	0,380	101,0		0,232	61,7
	0,389	103,5		0,245	65,4
<b>MW</b>	<b>0,376</b>	<b>100,0</b>	<b>MW</b>	<b>0,255</b>	<b>67,8</b>
Std. Abw.	0,032	8,4	Std. Abw.	0,016	4,3

Trypsin wird bei der konventionellen Gefriertrocknung mit 0,5% Hypromellose im Vergleich zur gleichen Behandlung ohne Kryoprotektor (Abbildung 4-21) und dem Einfrieren mit 0,5% Hypromellose deutlich inaktiviert. Am stärksten ist eine Abnahme der Aktivität nach dem Schockgefrieren und konventioneller Gefriertrocknung.

**Konventionelle Gefriertrocknung mit 1% Hypromellose.**

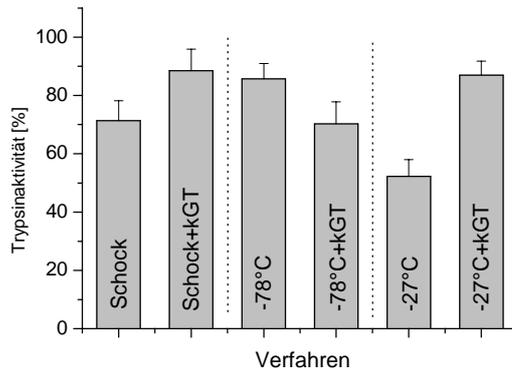


Abbildung 4-23: Aktivität von Trypsin nach Einfrieren und konventioneller Gefriertrocknung mit 1% Hypromellose.

Tabelle 4-61: Aktivität von Trypsin nach Schockeinfrieren und Einfrieren bei -78°C und konventioneller Gefriertrocknung mit 1 % Hypromellose.

Aktivität							
	vor Einfrieren			Schockeinfrieren + kGT Ziff: 2133		Einfrieren -78°C+ kGT Ziff :2233	
	IE/ml	%		IE/ml	%	IE/ml	%
Probe 1	5,148	100,2	Probe 1	4,131	80,1	3,571	69,5
	5,545	107,9		4,066	79,2	3,313	64,5
	4,721	91,9		4,343	84,5	4,418	86,0
Probe 2	5,346	104,1	Probe 2	5,249	102,2	3,435	66,9
	5,133	99,9		4,795	93,3	3,165	61,6
	4,934	96,0		4,848	94,4	3,241	63,1
			Probe 3	4,618	89,9	3,843	74,8
				4,479	87,2	3,679	71,6
				4,416	86,0	3,827	74,5
<b>MW</b>	<b>5,138</b>	<b>100,0</b>	<b>MW</b>	<b>4,549</b>	<b>88,6</b>	<b>3,610</b>	<b>70,3</b>
Std. Abw.	0,291	5,67	Std. Abw.	0,304	7,27	0,389	7,58

Tabelle 4-62: Aktivität von Trypsin nach Einfrieren bei -27°C und konventioneller Gefriertrocknung mit 1 % Hypromellose.

Aktivität					
	vor Einfrieren			Einfrieren -27°C + kGT Ziff: 2333	
	IE/ml	%		IE/ml	%
Probe 1	3,945	102,7	Probe 1	3,562	92,7
	3,952	102,8		3,379	87,9
	3,784	98,5		3,438	89,5
Probe 2	3,796	98,8	Probe 2	3,075	80,0
	3,773	98,2		3,155	82,1
	3,807	99,1		3,102	80,7
/	/	/	Probe 3	3,508	91,3
				3,385	88,1
				3,478	90,5
<b>MW</b>	<b>3,843</b>	<b>100,00</b>	<b>MW</b>	<b>3,343</b>	<b>86,98</b>
Std. Abw.	0,075	1,91	Std. Abw.	0,196	5,10

Nach Schockgefrieren und konventioneller Gefriertrocknung beobachtet man in der Lösung mit 1% Hypromellose, gegenüber der Lösung mit 0,5% Hypromellose nach gleicher Behandlung, eine Erhöhung der Restaktivität um 40%. Nach der konventionellen Gefriertrocknung kombiniert mit dem Einfrieren bei -27°C zeigt sich gegenüber der Lösung mit 0,5% Hypromellose eine Erhöhung der Trypsinaktivität um 20% (vgl. Abbildung 4-23 und Abbildung 4-22).

Verglichen mit dem Schockgefrieren und dem Einfrieren bei -27°C (Abbildung 4-23) steigt die Restaktivität nach der konventionellen Gefriertrocknung und den beiden Einfriertemperaturen um 20-40%.

In der Lösung, die bei -78°C eingefroren und konventionell gefriergetrocknet wurde, kommt es zu keiner Änderung der Aktivität gegenüber der Lösung mit 0,5% Hypromellose.

**Konventionelle Gefriertrocknung mit 5% Mannitol.**

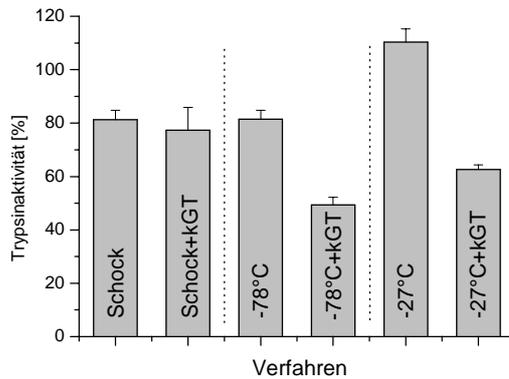


Abbildung 4-24: Aktivität von Trypsin nach Einfrieren und konventioneller Gefriertrocknung mit 5% Mannitol.

Tabelle 4-63: Aktivität von Trypsin nach Einfrieren bei -78°C und -27°C und konventioneller Gefriertrocknung mit 5 % Mannitol (\*nach dem Einfrieren 6 Messungen durchgeführt).

	Aktivität					
	vor Einfrieren		Einfrieren -78°C+ kGT Ziff: 2243		Einfrieren -27°C+ kGT Ziff: 2343	
	IE/ml	%	IE/ml	%	IE/ml	%
Probe 1	5,199	93,4	2,594	46,6	3,408	61,2
	5,584	100,3	2,572	46,2	3,561	64,0
	5,747	103,2	2,645	47,5	3,572	64,2
Probe 2	5,884	105,7	2,934	52,7	3,349	60,2
	5,882	105,7	2,853	51,2	3,475	62,4
	5,922	106,4	2,883	51,8	3,556	63,9
Probe 3	5,257	94,4	*	*	*	*
	5,210	93,6	*	*	*	*
	5,420	97,4	*	*	*	*
<b>MW</b>	<b>5,567</b>	<b>100,0</b>	<b>2,747</b>	<b>49,3</b>	<b>3,487</b>	<b>62,6</b>
Std. Abw.	0,287	5,2	0,041	0,73	0,104	1,87

## Ergebnisse und Auswertung

Tabelle 4-64: Aktivität von Trypsin nach Schockgefrieren und konventioneller Gefriertrocknung mit 5% Mannitol.

	Aktivität			
	vor Einfrieren		Schockgefrieren + kGT Ziff: 2143	
	IE/ml	%	IE/ml	%
Probe 1	3,529	88,9	3,3599	84,6
	2,819	71,0	3,130	78,8
	4,132	104,1	3,326	83,8
Probe 2	3,441	86,6	3,597	90,6
	3,714	93,5	2,919	73,5
	4,713	118,7	3,090	77,8
Probe 3	4,519	113,8	2,942	74,1
	3,937	99,1	2,842	71,6
	4,938	124,3	2,453	61,8
<b>MW</b>	<b>3,971</b>	<b>100,0</b>	<b>3,073</b>	<b>79,3</b>
Std. Abw.	0,640	17,71	0,373	9,38

Nach der konventionellen Gefriertrocknung kombiniert mit dem Einfrieren bei  $-78^{\circ}\text{C}$  nimmt die Trypsinrestaktivität mit Zusatz von 5% Mannitol am stärksten ab, sie beträgt ca. 50%. Gegenüber dem Einfrieren bei  $-78^{\circ}\text{C}$  und  $-27^{\circ}\text{C}$  wird die Trypsinaktivität durch den Trocknungsprozess (Abbildung 4-24) weiter um ca. 30% herabgesetzt.

Nach Schockgefrieren tritt durch die Gefriertrocknung keine weitere Schädigung des Enzyms auf.

Verglichen mit der Trypsinrestaktivitäten ohne Kryoprotektor liegen die Trypsinaktivitäten mit 5% Mannitol nach gleichen Behandlungen immer niedriger (vgl. Abbildung 4-21). Das deutet darauf hin, dass diese Mannitolkonzentration auf Trypsin keine kryoprotektive Wirkung aufweist.

**Konventionelle Gefriertrocknung mit 10% Mannitol.**

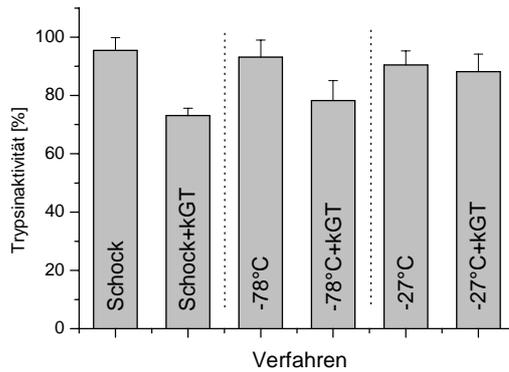


Abbildung 4-25: Aktivität von Trypsin nach Einfrieren und konventioneller Gefriertrocknung mit 10% Mannitol.

Tabelle 4-65: Aktivität von Trypsin nach Schockefrieren und Einfrieren bei -78°C und konventioneller Gefriertrocknung mit 10 % Mannitol (vor der Gefriertrocknung 6 Messungen durchgeführt).

Aktivität							
	vor Einfrieren			Schockefrieren + kGT Ziff: 2153		Einfrieren -78°C + kGT Ziff: 2253	
	IE/ml	%		IE/ml	%	IE/ml	%
Probe 1	4,08	97,7	Probe 1	3,003	71,9	3,365	80,6
	4,351	104,2		3,076	73,7	3,314	79,4
	4,176	100,0		2,948	70,6	3,382	81,0
Probe 2	4,086	97,9	Probe 2	3,151	75,5	3,471	83,2
	4,146	99,3		3,132	75,0	3,462	82,9
	4,204	100,7		3,241	77,6	3,676	88,1
			Probe 3	2,994	71,7	2,939	70,4
				2,920	70,0	2,924	70,1
				3,010	72,1	2,882	69,0
<b>MW</b>	<b>4,174</b>	<b>100,00</b>	<b>MW</b>	<b>3,052</b>	<b>73,1</b>	<b>3,268</b>	<b>78,3</b>
Std. Abw.	0,091	2,37	Std. Abw.	0,119	2,86	0,349	8,37

Tabelle 4-66: Aktivität von Trypsin nach Einfrieren bei -27°C und konventioneller Gefriertrocknung mit 10% Mannitol.

	Aktivität			
	vor Einfrieren		Einfrieren -27°C + kGT Ziff: 2353	
	IE/ml	%	IE/ml	%
Probe 1	3,979	108,9	3,146	86,1
	3,673	100,5	3,107	85,0
	3,631	99,4	3,157	86,4
Probe 2	2,851	78,0	3,551	97,2
	4,002	109,5	2,817	77,1
	3,605	98,7	3,092	84,6
Probe 3	3,790	103,7	3,310	90,6
	3,212	87,9	3,472	95,0
	4,139	113,3	3,333	91,2
<b>MW</b>	<b>3,654</b>	<b>100,0</b>	<b>3,221</b>	<b>88,2</b>
Std. Abw.	0,384	11,4	0,269	7,36

Durch die Erhöhung der Mannitolkonzentration von 5% auf 10% verringert sich der Aktivitätsverlust von Trypsin um ca. 30%. Dies geschieht sowohl beim vorherigen Einfrieren bei -78°C als auch bei -27°C.

Nach der konventionellen Gefriertrocknung und dem Schockgefrieren ist hingegen kein Unterschied in den Enzymaktivitäten zwischen den Mannitolzusätzen erkennbar (vgl. Abbildung 4-24).

Gegenüber dem Einfrieren mit 10% Mannitol sinkt die Enzymaktivität nach der konventionellen Gefriertrocknung kombiniert mit dem Schockgefrieren und um ca. 20%.

#### 4.2.3.1 Zusammenfassung der Versuche zur konventionellen Gefriertrocknung von Trypsin.

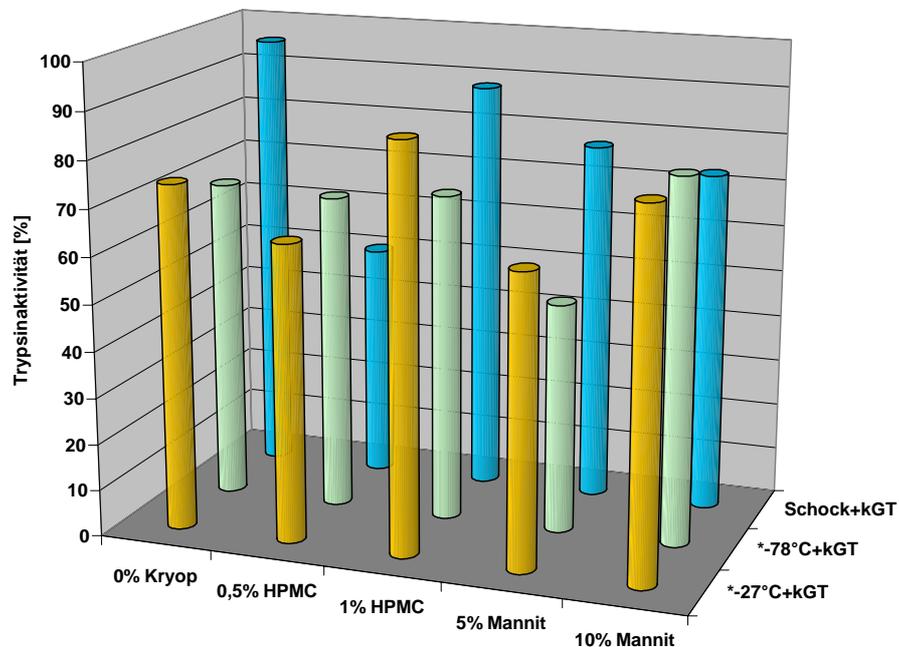


Abbildung 4-26: Abhängigkeit der Trypsinaktivität nach konventioneller Gefriertrocknung von drei Einfrierverfahren mit Kryoprotektoren bzw. ohne Kryoprotektor.

Die Trypsinaktivität sinkt nach der konventionellen Gefriertrocknung nicht so stark wie die  $\beta$ -Galactosidaseaktivität nach gleicher Behandlung (vgl. Abbildung 4-10). In der Lösung ohne Kryoprotektor bleibt die Trypsinaktivität nach dem Schockgefrieren und konventioneller Gefriertrocknung erhalten. Auffällig ist die niedrige Restaktivität nach Schockgefrieren und konventioneller Gefriertrocknung in der Lösung mit 0,5% Hypromellose – sie beträgt 50%. In den anderen Lösungen (mit 1% Hypromellose und 5% Mannitol und 10% Mannitol) liegen die Aktivitäten nach Schockgefrieren und konventioneller Gefriertrocknung zwischen 70-80%. Verglichen mit den Ergebnissen der Einfrierversuche (vgl. Abbildung 4-21) wird das Enzym durch die Gefriertrocknung nicht zusätzlich geschädigt. Trypsin kann also ohne Kryoprotektorzusatz schockgefroren und im konventionellen Gefriertrockner lyophilisiert werden, ohne dass seine Aktivität abnimmt,  $\beta$ -Galactosidase reagierte ähnlich auf diese Behandlung.

Nach der konventionellen Gefriertrocknung und dem Einfrieren bei  $-78^{\circ}\text{C}$  liegen die Trypsinrestaktivitäten bei 70%. Eine Ausnahme bildet die Enzymlösung mit 5% Mannitol die Aktivität dort liegt bei 50%. Auch gegenüber dem Einfrieren sinkt die Aktivität in der 5% igen Mannitollösung (vgl. Abbildung 4-18) im Gegensatz zu den anderen untersuchten Lösungen, in den die Abnahme ca. 10% beträgt, um 30%.

Die Trypsinaktivität ist in allen untersuchten Lösungen höher als die  $\beta$ -Galactosidaseaktivität nach der konventioneller Gefriertrocknung und dem Einfrieren bei  $-78^{\circ}\text{C}$ .

Nach der konventionellen Gefriertrocknung kombiniert mit dem Einfrieren bei  $-27^{\circ}\text{C}$  und liegen die Restaktivitäten von Trypsin zwischen 65-90%. Aus der Abbildung 4-26 wird deutlich, dass es bei diesem Verfahren mit einer Erhöhung des Hilfsstoffzusatzes zur Steigerung der Enzymaktivität kommt. Das steht im Gegensatz zu dem Ergebnis von  $\beta$ -Galactosidase, bei dem es nach der konventionellen Gefriertrocknung und dem Einfrieren bei  $-27^{\circ}\text{C}$  mit der Erhöhung der Mannitolkonzentration zu einer Abnahme der Restaktivität kam (Abbildung 4-18).

#### 4.2.3.1.1. Statistische Auswertung der Versuche zur konventionellen Gefriertrocknung von Trypsin.

Anschließend werden die Ergebnisse der konventionellen Gefriertrocknung von Trypsin statistisch ausgewertet. Zuerst wird das Ergebnis der Varianzanalyse zur konventionellen Gefriertrocknung von Trypsin gezeigt. Desweiteren wird der Einfluss der Einfrieretemperatur und der verwendeten Kryoprotektoren als auch deren Wechselwirkungen auf die Enzymaktivität bei konventioneller Gefriertrocknung näher dargelegt.

Tabelle 4-67: Varianzanalyse der Versuche zur konventionellen Gefriertrocknung von Trypsin. df: Anzahl der Freiheitsgrade; SAQ: Summe der Abweichungsquadrate; MQ: mittleres Abweichungsquadrat;  $F_{Tab}$ : kritischer F-Wert

Modell						
Quelle	df	SAQ	MQ	F-Wert	Prob>F	Bewertung
Einfrierbedingungen	2	2426,28	1213,14	31,13	<0,0001	Hoch signifikant
Kryoprotektor	4	9999,0	2499,75	64,15	<0,0001	Hoch signifikant
Wechselwirkungen	8	8487,19	1060,9	27,22	<0,0001	Hoch signifikant
Gesamt						
Quelle	df	SAQ	MQ	F-Wert	$F_{Tab}$	Bewertung
Effekt	14	19858,4	1418,5	36,41	1,79	signifikant
Fehler	113	4402,8	38,9			
C. Total	127	24261,2				

Der erste Abschnitt in der Tabelle 4-67 (Modell) zeigt den Einfluss der Faktoren Einfrierbedingungen und Kryoprotektorzusatz und deren Wechselwirkungen auf die abhängige Variable Aktivität.

Der Faktor Kryoprotektor (Tabelle 4-67) hat einen doppelt so starken Einfluss auf die Aktivität von Trypsin als die Einfrierbedingungen und die Wechselwirkung der beiden Faktoren. Die Effekte sind bei der konventionellen Gefriertrocknung von

Trypsin um ein Vielfaches geringer als bei der konventionellen Gefriertrocknung von  $\beta$ -Galactosidase (vgl. Kap.4.1.3.1).

Die Einflüsse der einzelnen Faktoren und die Wechselwirkungen werden genauer in den nachstehenden Tabellen und Diagrammen wiedergegeben.

### Einfluss der Einfriertemperatur auf die Aktivität von Trypsin bei konventioneller Gefriertrocknung.

Nachfolgend wird der Einfluss der drei Einfriertemperaturen: Schockgefrieren (-196°C), -78°C und -27°C auf die Aktivität von Trypsin bei der konventionellen Gefriertrocknung dargelegt.

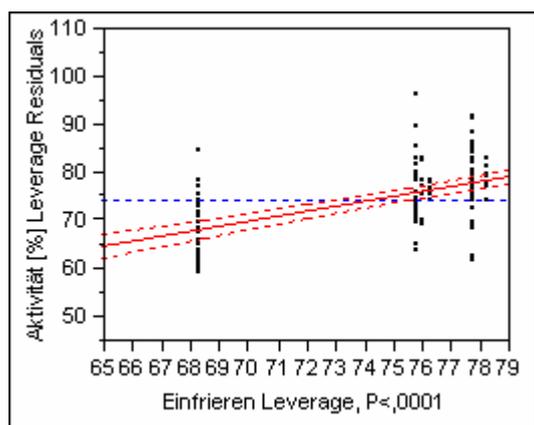


Abbildung 4-27: Einflussdiagramm des Einfrierverfahrens auf die Aktivität von Trypsin bei konventioneller Gefriertrocknung.

Tabelle 4-68: Einfluss des Einfrierens auf die Aktivität von Trypsin bei konventioneller Gefriertrocknung.

<b>Faktor</b>	<b>Skalierte Schätzwerte</b>	<b>Standardfehler</b>	<b>t Wert</b>	<b>Prob&gt; t </b>
<b>Gesamtmittel</b>	73,02	0,5555	131,45	<0,0001
<b>Einfrieren [-27°C]</b>	2,09	0,7880	2,65	0,0092
<b>Einfrieren [-78°C]</b>	-6,12	0,7912	-7,74	<0,0001
<b>Einfrieren [Schock]</b>	4,03	0,7774	5,19	<0,0001

Tabelle 4-68 und Abbildung 4-27 zeigen den Einfluss der drei Einfrierverfahren auf die Aktivität von Trypsin bei der konventionellen Gefriertrocknung.

Der Mittelwert der Trypsinaktivität (Gesamtmittel) nach konventioneller Gefriertrocknung beträgt 73%, damit liegt er um ca. 30% höher als bei  $\beta$ -Galactosidase nach gleicher Behandlung (vgl. Tabelle 4-24, Kap. 4.1.3.1).

Die Werte in der zweiten Spalte der Tabelle 4-68 geben Auskunft über den Einfluss des untersuchten Faktors auf die Enzymaktivität. Negative Zahlen bedeuten eine stärkere Schädigung des Enzyms, positive Zahlen eine geringe Abnahme der Enzymaktivität.

Bei der konventionellen Gefriertrocknung bestehen zwischen den eingesetzten Einfrierverfahren keine großen Unterschiede. Die geschätzten Aktivitäten weichen um maximal 6% vom absoluten Mittelwert ab. Eine signifikant positive Abweichung vom absoluten Mittelwert um 4% tritt beim Schockgefrieren auf. Einen signifikant negativen Effekt (um 6%) beobachtet man beim Einfrieren bei  $-78^{\circ}\text{C}$ . Das Einfrieren bei  $-27^{\circ}\text{C}$  hat keinen signifikanten Effekt.

Im Gegensatz dazu hatten alle drei Einfriertemperaturen keinen signifikanten Einfluss auf die Trypsinaktivität (vgl. Tabelle 4-52).

Diese Einflüsse auf die Trypsinaktivität sind, verglichen mit den Ergebnissen von  $\beta$ -Galactosidase nach der gleichen Behandlung, um das vier- bis sechsfache geringer (vgl. Tabelle 4-24 und Abbildung 4-11 im Kap. 4.1.3.1).

**Einfluss der Kryoprotektoren auf die Aktivität von Trypsin bei konventioneller Gefriertrocknung.**

Im Folgenden wird der Einfluss der Kryoprotektoren Hypromellose und Mannitol auf die Aktivität von Trypsin nach der konventionellen Gefriertrocknung statistisch ausgewertet. Als Referenz dient eine Lösung ohne Kryoprotektorzusatz.

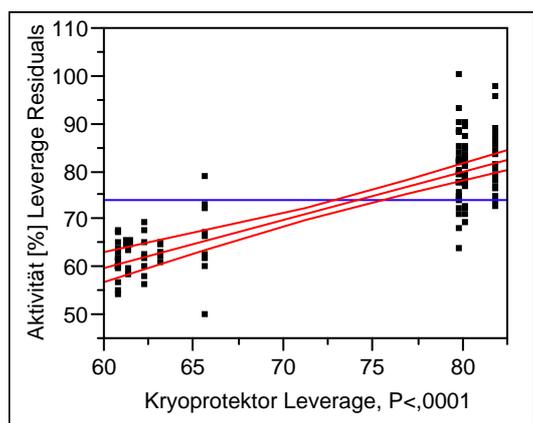


Abbildung 4-28: Einflussdiagramm der Kryoprotektoren auf die Aktivität von Trypsin bei konventioneller Gefriertrocknung.

Tabelle 4-69: Einfluss der Kryoprotektoren auf die Aktivität von Trypsin bei konventioneller Gefriertrocknung.

<b>Faktor</b>	<b>Skalierte Schätzwerte</b>	<b>Standardfehler</b>	<b>t Wert</b>	<b>Prob&gt; t </b>
<b>ohne Kryoprotektor</b>	6,5	1,084	6,03	<0,0001
<b>0,5% HPMC</b>	-11,9	1,12	-10,73	<0,0001
<b>1% HPMC</b>	8,5	1,084	7,86	<0,0001
<b>5% Mannitol</b>	-9,9	1,184	-8,37	<0,0001
<b>10% Mannitol</b>	6,83	1,084	6,31	<0,0001

Die Aktivität von Trypsin wird bei der konventionellen Gefriertrocknung durch die Kryoprotektoren signifikant beeinflusst.

Wie aus den skalierten Schätzwerten in der Tabelle 4-69 hervorgeht, sind die Aktivitätsunterschiede, die durch die Anwesenheit bzw. Art und Konzentration der Kryoprotektoren verursacht werden, etwas deutlicher, als die Unterschiede, die durch verschiedene Einfrierbedingungen hervorgerufen werden (s. Tabelle 4-68).

Die höheren Kryoprotektorkonzentrationen üben einen etwa gleich positiven Einfluss aus, die skalierten Schätzwerten liegen zwischen + 6 und + 8%. Sie sind mit dem Schätzwert der Lösung ohne Kryoprotektoren vergleichbar (ca. 6%).

In den Lösungen mit der geringeren Kryoprotektorkonzentration kommt es bei der konventionellen Gefriertrocknung zu einer Schädigung von Trypsin. Das geht aus den negativen skalierten Schätzwerten für diese Lösungen hervor.

Es fällt auf, dass Verzicht auf den Kryoprotektor zu einer höheren Restaktivität nach der konventionellen Gefriertrocknung führt.

Bei der niedrigeren Kryoprotektorkonzentration wird dagegen die Enzymaktivität sogar herabgesetzt. Diese Hilfsstoffkonzentrationen eignen sich somit nicht als Zusatz für die konventionelle Gefriertrocknung von Trypsin.

Diese Ergebnisse sind mit analogen Versuchsreihen mit  $\beta$ -Galactosidase vergleichbar (vgl. Tabelle 4-25 und Abbildung 4-12 im Kap. 4.1.3.1).

**Schutzwirkung der Kryoprotektoren auf die Aktivität von Trypsin bei konventioneller Gefriertrocknung und drei Einfriertemperaturen.**

Die nachfolgende Tabelle zeigt die relative Schutzwirkung von Kryoprotektoren bei einer Einfriertemperatur von -27°C auf die Aktivität von Trypsin bei der konventionellen Gefriertrocknung.

Tabelle 4-70.: Einfluss der Kryoprotektoren auf die Aktivität von Trypsin bei Einfrieren bei -27°C und konventioneller Gefriertrocknung

<b>Faktor</b>	<b>Skalierte Schätzwerte</b>	<b>Standardfehler</b>	<b>t Wert</b>	<b>Prob&gt; t </b>
<b>ohne Kryoprotektor</b>	-7,45	1,5338	-4,86	<0,0001
<b>0,5% HPMC</b>	1,66	1,5915	1,05	0,2982
<b>1% HPMC</b>	2,18	1,5338	1,42	0,1576
<b>5% Mannitol</b>	-2,59	1,6813	-1,54	0,1262
<b>10% Mannitol</b>	6,19	1,5338	4,04	<0,0001

Bei der Kombination von Einfrieren bei -27°C und der konventionellen Gefriertrocknung besteht in allen Lösungen mit Kryoprotektoren eine geringfügige Schutzwirkung auf die Enzymaktivität. Eine signifikant positive Ausnahme tritt in der Lösung mit 10% Mannitol auf (+6%).

Der Einfluss der Kryoprotektoren bei der Einfriertemperatur von -78°C auf die Aktivität von Trypsin bei konventioneller Gefriertrocknung kann der Tabelle 4-71 entnommen werden.

Tabelle 4-71: Einfluss der Kryoprotektoren auf die Aktivität von Trypsin beim Einfrieren bei -78°C und konventioneller Gefriertrocknung.

<i>Faktor</i>	<i>Skalierte Schätzwerte</i>	<i>Standardfehler</i>	<i>t Wert</i>	<i>Prob&gt; t </i>
<b>ohne Kryoprotektor</b>	-4,69	1,54	-3,06	0,0028
<b>0,5% HPMC</b>	12,93	1,56	8,29	<0,0001
<b>1% HPMC</b>	-5,14	1,54	-3,35	0,0011
<b>5% Mannitol</b>	-7,66	1,74	-4,41	<0,0001
<b>10% Mannitol</b>	4,57	1,54	2,98	0,0036

Wie auch schon aus Tabelle 4-68 ersichtlich war, beeinflusst von den angewandten Einfrierbedingungen das Einfrieren bei -78°C die Trypsinaktivität am negativsten.

Bei dieser Einfriertemperatur liegt die Aktivität nach konventioneller Gefriertrocknung in der Lösung mit 0,5% Hypromellose ca. 13% oberhalb des absoluten Mittelwertes. Damit zeigt sich eine signifikante Schutzwirkung.

Geringe Schutzwirkung tritt in der Lösung mit 10% Mannitol auf. Die Aktivitätsänderung gegenüber dem Mittelwert ist allerdings nicht signifikant.

In der Lösung mit 1% Hypromellose tritt eine geringfügige Trypsinschädigung auf. Der Zusatz von 5 % Mannitol hat keine kryoprotektive Wirkung, hier tritt eine signifikant negative Abweichung der Enzymaktivität vom Mittelwert auf.

Ein Zusammenhang zwischen der Konzentration der Kryoprotektoren und der resultierenden Aktivität nach dem Einfrieren bei -78°C und der Gefriertrocknung ist nicht zu erkennen.

Tabelle 4-72 zeigt die Wirkung von Kryoprotektoren beim Schockgefrieren auf die Aktivität von Trypsin bei konventioneller Gefriertrocknung.

Tabelle 4-72: Einfluss der Kryoprotektoren auf die Aktivität von Trypsin beim Schockgefrieren und konventioneller Gefriertrocknung.

<i>Faktor</i>	<i>Skalierte Schätzwerte</i>	<i>Standardfehler</i>	<i>t Wert</i>	<i>Prob&gt; t </i>
<b>ohne Kryoprotektor</b>	12,2	1,53	7,94	<0,0001
<b>0,5% HPMC</b>	-14,6	1,59	-9,20	<0,0001
<b>1% HPMC</b>	2,9	1,53	1,94	0,0552
<b>5% Mannitol</b>	10,3	1,6	6,40	<0,0001
<b>10% Mannitol</b>	-10,8	1,53	-7,04	<0,0001

Nach Schockgefrieren und anschließender konventioneller Gefriertrocknung liegt die Trypsinaktivität in der Lösung ohne Kryoprotektoren deutlich oberhalb (12%) des absoluten Mittelwertes. Dieses Ergebnis ist analog mit dem Versuch in dem  $\beta$ -Galactosidase verarbeitet wurde.

Eine deutliche Schutzwirkung auf das Enzym ist in der Lösung mit 5% Mannitol zu beobachten.

Eine signifikante Enzymschädigung dagegen tritt nach dem Schockgefrieren und der nachfolgenden konventionellen Gefriertrocknung in den Lösungen mit 0,5% Hypromellose (-14%) und 10% Mannitol (-10%) auf.

#### 4.2.4 Inaktivierung von Trypsin bei der Fingerlyophilisation.

Bei der Fingerlyophilisation wurde die Enzymlösung an den Wänden der Infusionsflasche schockgefroren und anschließend im Fingerlyophilisator 2,5 Stunden lang getrocknet (vgl. Kap.3.3.4. Gefriertrocknungsmethoden). Die Versuche wurden dreimal wiederholt.

In den nachfolgenden Diagrammen werden die Aktivitätswerte der Enzyme für jeweils drei Lyophilisationen dargestellt. Dargestellt werden die Mittelwerte und Standardabweichungen von 9 Messwerten.

##### Fingerlyophilisation mit Hypromellose und Mannitol.

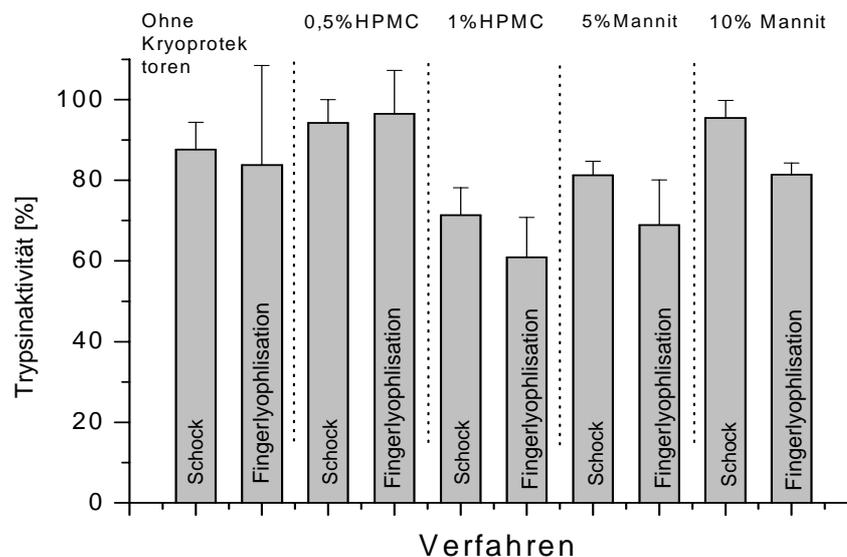


Abbildung 4-29: Aktivität von Trypsin nach Schockgefrieren und nach Schockgefrieren und Fingerlyophilisation ohne Kryoprotektoren und mit 0,5% und 1% Hypromellose sowie mit 5% und 10% Mannitol.

Der Zusatz von 0,5% Hypromellose zu der Enzymlösung wirkt sich positiv auf die Restaktivität von Trypsin nach der Fingerlyophilisation aus. Er schützt das Enzym fast vollständig vor der Deaktivierung. Eine Steigerung der Hypromellosekonzentration zeigt dagegen eine Verschlechterung der Trypsinrestaktivität.

## Ergebnisse und Auswertung

Bei der Fingerlyophilisation mit Mannitol wird Trypsin nur geringfügig deaktiviert. Zwischen den Restaktivitäten mit 5 und 10% Mannitol, die bei 70% und 80% liegen, besteht kein signifikanter Unterschied (vgl. Tabelle 4-79  $F_{\text{tab}} < F_{\text{ber}}$ ). Der Mannitol-Zusatz bei der Fingerlyophilisation verändert die Aktivität des Enzyms gegenüber der gleichen Behandlung ohne Kryoprotektoren nicht signifikant.

Der Mittelwert der Restaktivität nach der Fingerlyophilisation ohne Kryoprotektoren weist eine hohe Standardabweichung auf. Diese kommt durch die Bildung des Mittelwertes aus drei Messungen zustande. Beim zweiten Prozess sank die Aktivität plötzlich auf 50% ab und führte so zu einer hohen Standardabweichung des Gesamtmesswertes (vgl. Tabelle 4-73).

Tabelle 4-73: Aktivität von Trypsin nach Fingerlyophilisation ohne Kryoprotektoren.

	Aktivität			
	vor Einfrieren		nach Fingerlyophilisation Ziff: 2112	
	IE/ml	%	IE/ml	%
Probe1	3,0765	96,8	3,204	100,8
	3,014	94,8	3,054	96,1
	2,986	94,0	3,322	104,5
Probe2	3,076	96,8	1,772	55,8
	3,014	94,8	1,557	49,0
	2,986	94,0	1,543	48,6
Probe3	3,453	108,7	3,102	97,6
	3,462	109,0	3,086	97,1
	3,530	111,1	3,320	104,5
<b>MW</b>	<b>3,178</b>	<b>100</b>	<b>2,662</b>	<b>83,8</b>
Std. Abw.	0,232	1,3	0,787	24,8

Tabelle 4-74: Aktivität von Trypsin nach Fingerlyophilisation mit 0,5 % Hypromellose; vor der Fingerlyophilisation 6 Messungen durchgeführt.

Aktivität					
	vor Einfrieren			nach Fingerlyophilisation Ziff: 2122	
	IE/ml	%		IE/ml	%
Probe 1	4,105	94,0	Probe 1	4,307	98,7
	4,299	98,5		4,524	103,6
	4,325	99,1		4,667	106,9
Probe 2	4,644	106,4	Probe 2	4,520	103,5
	4,906	112,4		4,465	102,3
	3,914	89,7		4,632	106,1
			Probe 3	3,569	81,8
				3,695	84,6
				3,533	80,9
<b>MW</b>	<b>4,366</b>	<b>100,0</b>	<b>MW</b>	<b>4,213</b>	<b>96,5</b>
Std. Abw.	0,360	8,2	Std. Abw.	0,473	10,8

## Ergebnisse und Auswertung

---

Tabelle 4-75: Aktivität von Trypsin nach Fingerlyophilisation mit 1 % Hypromellose; vor der Fingerlyophilisation 6 Messungen durchgeführt.

Aktivität					
	vor Einfrieren			nach Fingerlyophilisation Ziff: 2132	
	IE/ml	%		IE/ml	%
Probe 1	5,031	107,1	Probe 1	3,479	74,0
	4,819	102,6		3,357	71,4
	4,413	93,9		3,427	72,9
Probe 2	4,804	102,2	Probe 2	2,402	51,1
	4,641	98,8		2,404	51,2
	4,486	95,5		2,363	50,3
/	/	/	Probe 3	2,578	54,9
				2,999	63,8
				2,757	58,7
<b>MW</b>	<b>4,6990</b>	<b>100,0</b>	<b>MW</b>	<b>2,863</b>	<b>60,9</b>
Std. Abw.	0,2308	4,9	Std. Abw.	0,465	9,9

Tabelle 4-76: Ergebnis der Varianzanalyse der Versuchsreihe Fingerlyophilisation von Trypsin ohne Kryoprotektoren und mit Hypromellose.

Art der Variation	df	QS	MQ	F	Prob > F
Zwischen den Gruppen	2	5846,0	2923,0	10,59	0,0005
Innerhalb der Gruppen	24	6619,6	275,8		
total	26	12465,6			

Die Varianzanalyse zeigt (vgl. Tabelle 4-76), dass sich die Versuchsreihen ohne Kryoprotektoren und mit Hypromellose signifikant voneinander unterscheiden.

Die niedrigere Hypromellosekonzentration wirkt bei der Fingerlyophilisation von Trypsin deutlich kryoprotektiver als die höhere. Im Gegensatz dazu hatte Hypromellose einen deutlichen Einfluss auf die Aktivität von Trypsin bei der konventionellen Gefriertrocknung. Die höhere Konzentration trug zur Erhöhung der Restaktivität bei, die Niedrigere brachte eine Senkung der Aktivität gegenüber der Referenzlösung

Tabelle 4-77: Aktivität von Trypsin nach Fingerlyophilisation mit 5 % Mannitol; vor der Fingerlyophilisation 6 Messungen durchgeführt.

Aktivität					
	vor Einfrieren			nach Fingerlyophilisation Ziff: 2142	
	IE/ml	%		IE/ml	%
Probe 1	4,681	91,7	Probe 1	4,031	79,0
	4,598	89,7		4,214	82,5
	4,396	86,1		4,398	86,1
Probe 2	6,127	120,0	Probe 2	3,713	72,7
	5,423	106,2		3,144	61,6
	5,428	106,3		3,138	61,5
			Probe 3	3,009	58,9
				3,061	60,0
				2,952	57,8
<b>MW</b>	<b>5,106</b>	<b>100,0</b>	<b>MW</b>	<b>3,518</b>	<b>68,9</b>
Std. Abw.	0,665	11,9	Std. Abw.	0,574	11,2

## Ergebnisse und Auswertung

Tabelle 4-78: Aktivität von Trypsin nach Fingerlyophilisation mit 10 % Mannitol.

	Konzentration			
	vor Einfrieren		nach Fingerlyophilisation Ziff: 2152	
	IE/ml	%	IE/ml	%
Probe1	4,376	95,8	3,678	80,6
	4,516	98,9	3,961	86,7
	4,676	102,4	3,641	79,7
Probe2	4,376	95,8	3,544	77,6
	4,516	98,9	3,714	81,3
	4,676	102,4	3,631	79,5
Probe3	4,456	97,6	3,865	84,6
	4,384	96,0	3,623	79,3
	5,123	112,2	3,800	83,2
<b>MW</b>	<b>4,567</b>	<b>100</b>	<b>3,718</b>	<b>81,4</b>
Std. Abw.	0,239	2,9	0,133	2,9

Tabelle 4-79: Ergebnis der Varianzanalyse der Versuchsreihe Fingerlyophilisation von Trypsin ohne Kryoprotektoren und mit Mannitol.

Art der Variation	df	QS	MQ	F	Prob > F
Zwischen den Gruppen	2	1149,99	574,9	2,30	0,1210
Innerhalb der Gruppen	24	5976,56	249,0		
total	26	7126,55			

Der Zusatz von Mannitol hat nach dem Ergebnis in der Varianzanalyse (s. Tabelle 4-79) keinen Einfluss auf die Trypsinrestaktivität nach der Fingerlyophilisation. Demnach könnte auf den Zusatz von Mannitol bei diesem Verfahren verzichtet werden. Dagegen hatte der Mannitolzusatz bei der konventionellen Gefriertrocknung einen signifikanten Einfluss auf die Aktivität. Die höhere Mannitol-Konzentration von 10% brachte einen deutlichen Vorteil, die niedrigere einen Nachteil für die Restaktivität (vgl. Abbildung 4-26).

#### 4.2.4.1 Vergleich des Einflusses der konventionellen Gefriertrocknung und der Fingerlyophilisation auf die Restaktivität von Trypsin.

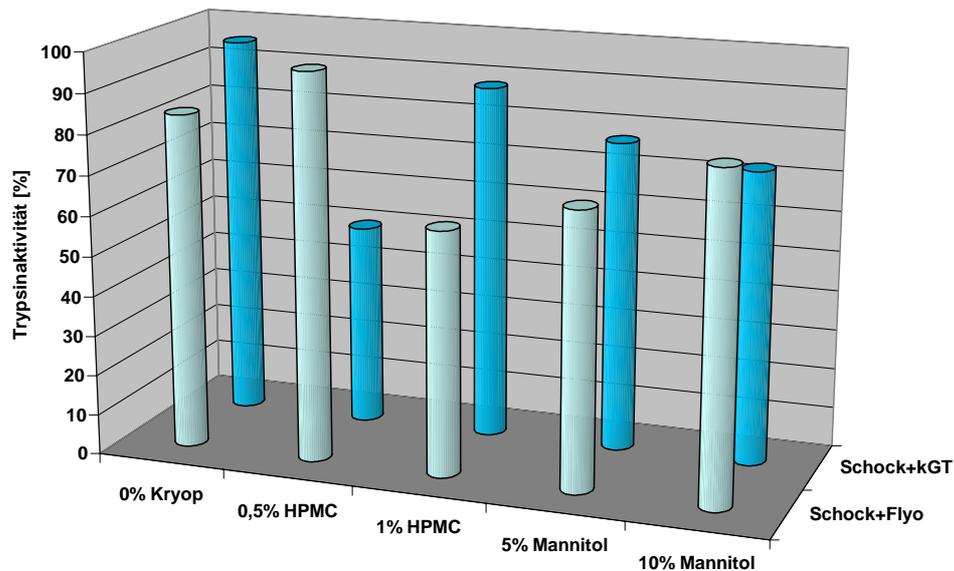


Abbildung 4-30: Einfluss der konventionellen Gefriertrocknung nach Schockgefrieren und der Fingerlyophilisation auf die Restaktivität von Trypsin.

In der Abbildung 4-30 sind die Mittelwerte der Trypsin-Aktivitäten nach Fingerlyophilisation und konventioneller Gefriertrocknung dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Restaktivität nach Schockgefrieren und konventioneller Gefriertrocknung in den überwiegenden Fällen höher liegt als nach Fingerlyophilisation. In der Lösung ohne Kryoprotektoren und mit 5% Mannitol beträgt die Differenz ca. 11-12%, mit 1% Hypromellose liegt sie bei ca. 30% zugunsten der konventionellen Gefriertrocknung. Dagegen ist die Trypsinaktivität nach der Fingerlyophilisation mit 0,5% Hypromellose erheblich höher als nach konventioneller Gefriertrocknung (50%), sie liegt bei 96%.

Abgesehen von der niedrigen Trypsin-Restaktivität nach konventioneller Gefriertrocknung mit 0,5% Hypromellose ist offensichtlich dieses Verfahren etwas günstiger für die Verarbeitung des Enzyms.

Bei der Fingerlyophilisation wirkt sich der Zusatz von 0,5% Hypromellose kryoprotektiv auf die Restaktivität von Trypsin aus, sie liegt bei 96%. Relativ hohe Restaktivitätswerte (81%-84%) beobachtet man in den Lösungen ohne Kryoprotektoren und mit 10% Mannitol.

Die Unterschiede zwischen den Restaktivitäten sowohl nach der Fingerlyophilisation als auch nach der konventionellen Gefriertrocknung sind nicht so gravierend wie bei  $\beta$ -Galactosidase bei gleichen Verfahren (vgl. Kap. 4.1.4.1).

Zur Verdeutlichung der Einflüsse von der Gefriertrocknungsart und von den Kryoprotektoren wurde eine statistische Analyse der Ergebnisse durchgeführt.

### **4.2.4.1.1. Statistische Auswertung der Fingerlyophilisation und der konventionellen Gefriertrocknung von Trypsin**

Bei der statistischen Auswertung erfolgte ein Vergleich der Versuchsreihen zur Trypsinaktivitätsbestimmung nach konventioneller Gefriertrocknung und Fingerlyophilisation, bei denen das Enzym vor dem Trocknungsschritt lediglich schockgefroren wurde. Die anderen Einfrierverfahren (Einfrieren bei  $-78^{\circ}\text{C}$  und  $-27^{\circ}\text{C}$ ) wurden bei der Berechnung nicht berücksichtigt (vgl. Kap. 3.1. Versuchsplanung.). Nachfolgend wurden die Ergebnisse in Tabellen und Diagrammen zusammengefasst.

Tabelle 4-80: Varianzanalyse zur Gefriertrocknung von Trypsin. df: Anzahl der Freiheitsgrade; SAQ: Summe der Abweichungsquadrate; MQ: mittleres Abweichungs-quadrat;  $F_{Tab}$ : kritischer F-Wert

<b>Modell</b>						
Quelle	df	SAQ	MQ	F-Wert	Prob>F	Bewertung
Gefriertrocknungsart	1	25,52	25,52	0,2137	0,6451	Nicht signif.
Kryoprotektor	4	3500,00	875,00	7,3269	<0,0001	Hoch signifikant
Wechselwirkung	4	13863,44	3465,86	29,0218	<0,0001	Hoch signifikant
<b>Gesamt</b>						
Quelle	df	SAQ	MQ	F-Wert	$F_{Tab}$	Bewertung
Effekt	9	17204,41	1911,60	16,01	1,97	signifikant
Fehler	79	9434,38	119,42			
C. Total	88	26638,79				

Die Einflüsse der Faktoren Gefriertrocknung und Kryoprotektor und deren Wechselwirkungen zeigt das Modell in der Tabelle 4-80.

Die Art der Gefriertrocknung hat keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Trypsinaktivität. Dagegen ist die Art des Kryoprotektors wichtig, sie beeinflusst die Aktivität signifikant. Die Wechselwirkungen von Gefriertrocknung und Kryoprotektor beeinflussen die Aktivität von Trypsin am stärksten.

Diese Ergebnisse unterscheiden sich von vergleichbaren Versuchen mit  $\beta$ -Galactosidase, bei denen die konventionelle Gefriertrocknung, im Gegensatz zur Fingerlyophilisation, einen deutlich positiven Einfluss auf die Enzymaktivität aufwies (vgl. Kap.4.1.4.1).

Das nachfolgende Diagramm und die Tabelle 4-81 zeigen den Einfluss der Kryoprotektoren Hypromellose und Mannitol auf die Aktivität von Trypsin. Die Konzentration von Hypromellose beträgt 0,5% und 1% und die von Mannitol 5% und 10% (s.Kap. 3.1). Die Lösung ohne Kryoprotektorzusatz dient als Referenz.

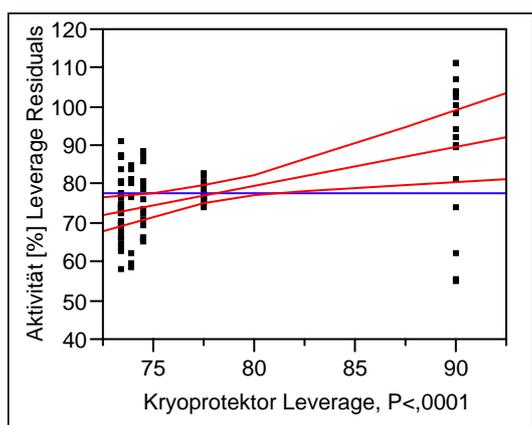


Abbildung 4-31: Einflussdiagramm der Kryoprotektoren auf die Aktivität von Trypsin bei der Gefriertrocknung.

Tabelle 4-81: Einfluss der Kryoprotektoren auf die Aktivität von Trypsin bei der Gefriertrocknung.

<b>Faktor</b>	<b>Skalierte Schätzwerte</b>	<b>Standard-fehler</b>	<b>t Wert</b>	<b>Prob&gt; t </b>
<b>Gesamtmittel</b>	77,58	1,1591	66,94	<0,0001
<b>ohne Kryoprotektor</b>	12,16	2,3074	5,27	<0,0001
<b>0,5% HPMC</b>	-4,12	2,3607	-1,75	0,0848
<b>1% HPMC</b>	-3,27	2,3074	-1,42	0,1597
<b>5% Mannit</b>	-4,43	2,3074	-1,92	0,0581
<b>10% Mannit</b>	-0,33	2,3074	-0,14	0,8864

Die skalierten Schätzwerte in der zweiten Spalte der Tabelle 4-81 sind ein Maß für die Höhe des Einflusses der untersuchten Faktoren auf die Enzymaktivität. Negative Zahlen bedeuten eine Schädigung des Enzyms, positive Zahlen weisen auf eine Kryoprotektion des Faktors hin.

Die eingesetzten Hilfsstoffe weisen keine kryoprotektive Wirkung auf die Trypsinaktivität bei der Gefriertrocknung auf. Im Gegensatz dazu war bei  $\beta$ -Galactosidase eine deutliche Kryoprotektion in den Lösungen mit der höheren Hilfsstoffkonzentration zu erkennen (vgl. Tabelle 4-38, Kap. 4.1.4.1). Der negative Effekt auf die Trypsinaktivität ist in den Lösungen mit der kleineren Hilfsstoffkonzentration etwas stärker als in den Lösungen mit der höheren Hilfsstoffkonzentration. Allerdings sind die Effekte in den Lösungen mit Kryoprotektoren nicht signifikant.

## 4.3 Eigenschaften der zu lyophilisierenden Lösungen

Im Folgenden werden einige physikalische Eigenschaften der Kryoprotektorlösungen zusammengefasst.

Die Viskosität der Kryoprotektorlösungen beeinflusst die Tröpfchengröße beim Versprühen der Lösungen während des Schockgefrierens. Die Einfriergeschwindigkeit der Tröpfchen ist von der Partikelgröße und der Oberflächenspannung der Lösung abhängig. Je kleiner die Tröpfchen, umso schneller frieren sie beim Auftreffen auf die kalte Flaschenwand durch.

Die Glasübergangstemperatur ist für die Führung des Gefriertrocknungsprozesses wichtig (vgl. Kap.2.2.8).

### 4.3.1 Viskosität der Kryoprotektor-Lösungen

Die rheologischen Eigenschaften der verwendeten Hilfsstofflösungen wurden mit dem Rotationsviskosimeter RotoVisco der Firma Thermo Haake bestimmt. Da es sich um Flüssigkeiten handelt, wurde die Zylinder– Becher-Methode verwendet. Die Messungen wurden bei 20°C durchgeführt, die Schergeschwindigkeit lag bei 0-1100 s<sup>-1</sup>, die Spaltgröße betrug 0,51 mm.

Mit dieser Methode wurde das Fließverhalten und die Viskosität von gepufferten Hypromellose-(0,5% und 1%) und Mannitol-Lösungen (5% und 10%) untersucht.

In den unten aufgeführten Rheogrammen charakterisiert die dunkle aufsteigende Linie das Fließverhalten der Lösung und die helle horizontal verlaufende Linie ihre Viskosität.

Die 0,5% ige Hypromellose-Lösung zeigt ein idealviskoses Fließverhalten (Abbildung 4-32 links). Ihre Viskosität liegt bei ca. 4 mPa\*s. Weist eine Lösung ein idealviskoses Fließverhalten, so ändert sich ihre Viskosität unter Scherung nicht. Bei der 1%-igen Hypromellose-Lösung nimmt die Viskosität unter Scherung leicht ab. Das charakterisiert pseudoplastische Substanzen. Am Anfang der Messung betrug die Viskosität ca. 17,5 mPa\*s und sank kontinuierlich ab der Scherge-

## Ergebnisse und Auswertung

schwindigkeit von  $300 \text{ [s}^{-1}]$  auf  $15 \text{ mPa*s}$  am Ende der Messung. Die Viskosität der 1%-igen Hypromelloselösung ist vierfach höher als die der 0,5%-igen Hypromelloselösung mit ( $4 \text{ mPa*s}$ ).

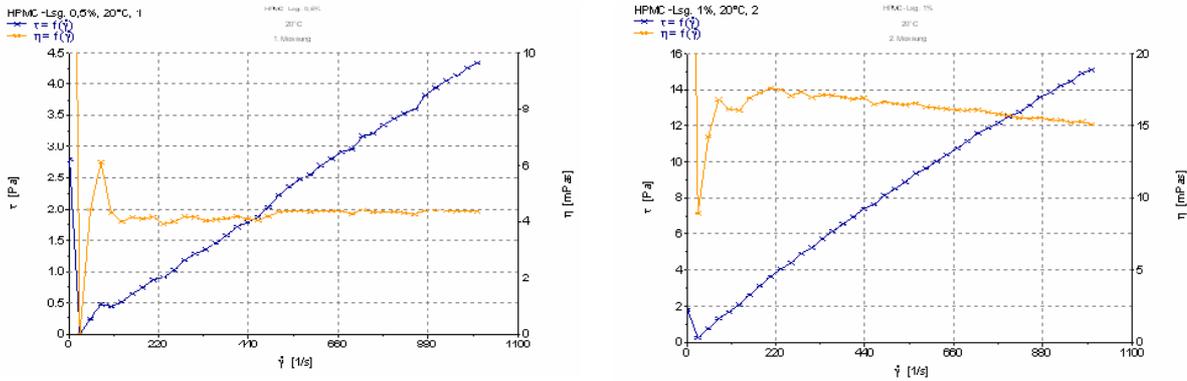


Abbildung 4-32: Rheogramm einer 0,5% (links) und 1% (rechts) Hypromellose-Lösung im Phosphatpuffer.

Die Viskosität der Mannitol-Lösungen ist sehr viel niedriger als die der Hypromelloselösungen. Sie liegt bei ca.  $1 \text{ mPa*s}$  unabhängig von der Mannitolkonzentration. Die Lösungen zeigen dasselbe Fließverhalten wie die 0,5%-ige Hypromellose-Lösung. Sie sind idealviskos. Durch die niedrige Viskosität der untersuchten Lösungen kommt es zu Schwankungen im Messsignal.

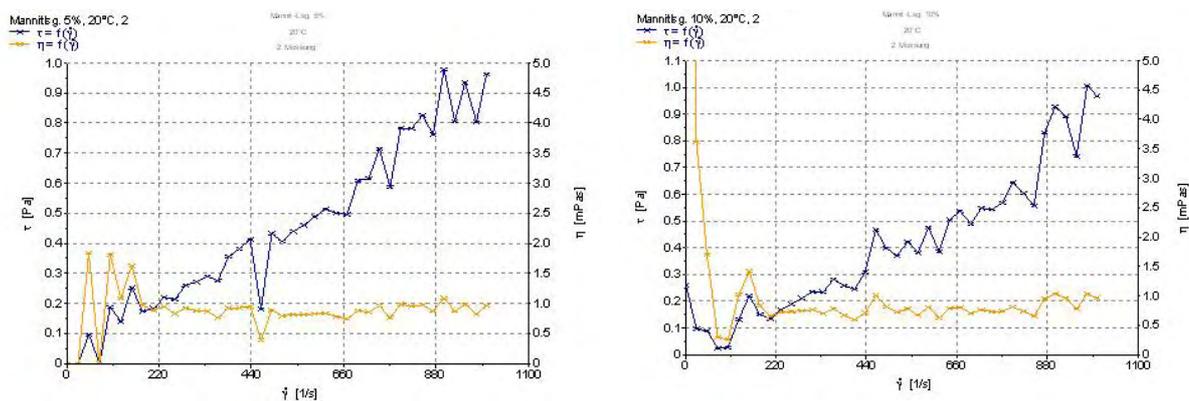


Abbildung 4-33: Rheogramm einer 5% (links) und 10% (rechts) Mannitollösung im Phosphatpuffer.

### 4.3.2. Partikelgröße und Oberflächenspannung der versprühten Kryoprotektor-Lösungen

Bei der Zerstäubung der Lösungen mit dem Rotorsprüher wurden die Lösungen in feinste Tröpfchen zerteilt. Die Größe der Tröpfchen kann ihre Einfriergeschwindigkeit auf der vorgekühlten Flaschenwand beeinflussen. Aufgrund der Viskositätsunterschiede der zwei eingesetzten Hilfsstofflösungen wurde angenommen, dass sich beim Zerstäuben der Lösungen unterschiedliche Tröpfchengrößen bilden. Die Viskosität der Hypromellose-Lösungen ist höher, als die der Mannitol-Lösungen. Die rheologischen Eigenschaften und Viskositäten der eingesetzten Hilfsstofflösungen wurden im Kapitel 4.3.1. zusammengefasst.

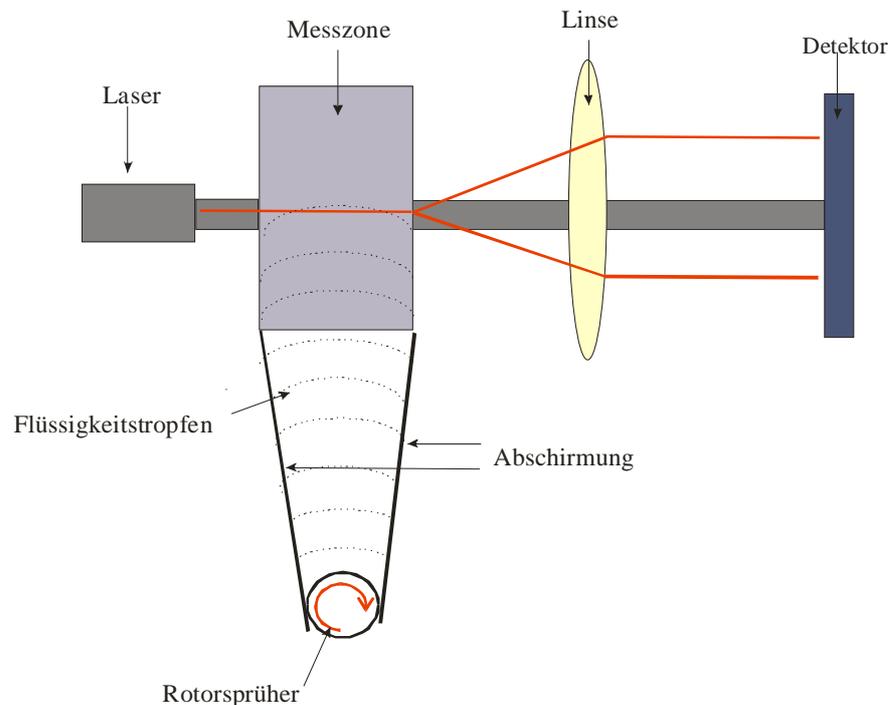


Abbildung 4-34: Versuchsanordnung zur Bestimmung von Tröpfchengröße.

Alle mit dem Laserbeugungsspektrometer (HELOS) ermittelten Tröpfchengrößenverteilungen werden im Kap. 7. Anhang abgebildet (vgl. Abbildung 7-3 bis Abbildung 7-7). In der Tabelle 4-82 werden zusammenfassend die für die Lage und Breite einer Verteilung charakteristischen Parameter  $x_{16}$ ,  $x_{50}$  und  $x_{84}$  dargestellt. Die Lage einer Verteilung charakterisiert der  $x_{50}$ -Wert. Er gibt die Partikelgröße in  $\mu\text{m}$  an, unterhalb derer 50 % des Gesamtvolumens der Partikel liegen.

Die Werte  $x_{16}$  und  $x_{84}$  zeigen die Breite der Verteilung an, ihre Differenz beschreibt die Einheitlichkeit bzw. Breite des Tröpfchenspektrums [16].

In der Tabelle 4-82 wurde ergänzend die Oberflächenspannung  $\sigma$  und Viskosität  $\eta$  der untersuchten Lösungen erfasst. Die Oberflächenspannung wurde mit der Plattenmethode des Prozessortensiometers K 100 der Firma Krüss gemessen.

Mit zunehmender Viskosität und zunehmendem Hilfsstoffanteil in der Lösung wurde eine steigende Tröpfchengröße erwartet. Das wurde durch die Messergebnisse nicht vollständig bestätigt. Die mittlere Tröpfchengröße der untersuchten Lösungen lag zwischen 530 und 780  $\mu\text{m}$ . Die Tröpfchengrößenverteilung reichte von 220  $\mu\text{m}$  bis 890  $\mu\text{m}$ .

Wie aus der Tabelle 4-82 ersichtlich, steigt der  $x_{50}$  Wert und damit die Tröpfchengröße in den Hypromellose-Lösungen mit zunehmender Konzentration. Den höchsten  $x_{50}$  Wert (781 $\mu\text{m}$ ) weist die Lösung mit 1% Hypromellose auf. Das ist ein Hinweis darauf, dass die Viskosität der Lösung einen Einfluss auf die Tröpfchengröße besitzen kann. Je höher die Viskosität der Lösung, umso größer können die bei der Zerstäubung entstehenden Tröpfchen werden.

Die Tröpfchengrößen der 5%-igen Mannitollösung ( $x_{50}= 637\mu\text{m}$ ) und der 0,5%-igen Hypromelloselösung ( $x_{50}= 623\mu\text{m}$ ) liegen dicht beieinander. Das kann durch die sehr ähnliche Viskosität dieser Lösungen (1 und 4  $\text{mPa}\cdot\text{s}$ ) bedingt sein. Auch der Phosphatpuffer ( $x_{50}= 563\mu\text{m}$ ) und die 10%-ige Mannitol-Lösung ( $x_{50}= 536\mu\text{m}$ ) weisen eine ähnliche mittlere Tröpfchengröße auf. Unter den untersuchten Lösungen bildeten diese beiden Lösungen beim Versprühen die kleinsten Tröpfchen.

In der fünften Spalte der Tabelle 4-82 wurde der sog. *Span b Wert* aufgeführt [97]. Er gibt eine Aussage über die Breite eines Tröpfchengrößenspektrums. Je kleiner dieser Wert ist, umso enger ist die Verteilung. Der *Span b Wert* wird errechnet aus Gl. 4-1:

$$b = \frac{x_{84} - x_{16}}{x_{50}} \quad \text{Gl. 4-1}$$

Die engste Verteilung zeigt die Lösung mit 1% Hypromellose. Das heißt, dass die Tröpfchen eine im Vergleich zu den anderen Lösungen relativ einheitliche Größe besitzen. Das könnte mit der hohen Viskosität der Lösung zusammenhängen. Am

weitesten war die Verteilung in den Lösungen mit 0,5% Hypromellose und 10% Mannitol.

Eine Korrelation zwischen der Tröpfchengröße und der Oberflächenspannung (vgl. Tabelle 4-82) ist nicht ersichtlich. Es fällt allerdings auf, dass die Oberflächenspannung in den Hypromelloselösungen um ca. 5-10 mN/m niedriger war, als in den übrigen Lösungen.

Tabelle 4-82: Charakteristische Parameter der Tröpfchengrößenverteilungen der Hilfsstofflösungen mit Hypromellose und Mannitol im Phosphatpuffer (PP), Oberflächenspannung und Viskosität der Lösungen.

\*Viskosität nicht bestimmt, da ähnlich wie die von Wasser.

Art der Lösung	X <sub>16</sub> [μm]	X <sub>50</sub> [μm]	X <sub>84</sub> [μm]	Span b	σ [mN/m]	η [mPa*s]
Phosphatpuffer(PP)	335	563	808	0,84	65,4	*
0,5% Hypromellose in PP	305	623	894	0,94	54,7	4
1% Hypromellose in PP	651	781	890	0,31	54,9	15
5% Mannitol in PP	331	627	832	0,79	68,1	1
10% Mannitol in PP	223	536	845	1,16	59,2	1

### 4.3.3. Glasübergangstemperatur der Lösungen im gefrorenen Zustand

Für Proteinzubereitungen spielt die Glasübergangstemperatur der Hilfsstoffe bei der Gefriertrocknung eine wichtige Rolle. Der Glasübergangsbereich der gefrorenen Lösung  $T_g'$  ist für die Prozessentwicklung und die festzulegenden Prozessparameter wichtig. Von ihm sind die Heiz- und damit die maximale Sublimationsrate abhängig. Knapp oberhalb der  $T_g'$  liegt die Kollapstemperatur. Wird sie überschritten, kann es zu einer Erweichung der Glasmatrix und damit zum Zusammenfallen (engl.: *meltback*) des Produktkuchens kommen (vgl. Kap. 2.2.8).

In dieser Arbeit war der Glasübergangsbereich der gefrorenen Lösung  $T_g'$  interessant, da Proteine durch die Immobilisierung im glasartigen Zustand vor der Denaturierung geschützt werden können. Oberhalb dieses Temperaturbereiches erhöht sich die Beweglichkeit der Proteine, wodurch eine Konformationsänderung, chemische Veränderungen und die Aggregation begünstigt werden.

Für die Ermittlung der Glasübergangstemperatur wurden zwei Methoden angewandt: die Dynamisch Mechanische Analyse (DMA) und die Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC) (vgl. auch Kap. 0 und Kap.3.3.7.3). Die Gerüstbildner wurden in Phosphatpuffer-Lösung in den für die Lyophilisate verwendeten Konzentrationen vermessen: Hypromellose 0,5%, 1% und Mannitol 5%, 10%.

Die DMA-Messungen wurden mit dem Eplexor 100 N der Firma GABO durchgeführt. Voraussetzung für eine exakte Messung ist eine biplane Geometrie der Probe. Aus diesem Grund wurden die Lösungen in einem speziell angefertigten Teflonkörper im flüssigen Stickstoff zu einem biplanen zylindrischen Block mit einer Höhe und einem Durchmesser von jeweils 10 mm eingefroren. Dieser wurde zwischen die Stempel des Eplexors eingespannt. Gemessen wurde mit einer Frequenz von 1 Hz im Temperaturintervall von  $-95^{\circ}\text{C}$  bis  $-10^{\circ}\text{C}$ , die Heizrate betrug 1 K/Min.

Die DSC Thermogramme wurden mit dem Pyris 1 DSC-Gerät der Firma Perkin Elmer aufgenommen.

Die Proben wurden wie folgt vorbereitet und vermessen:

- 20µl Probe wurden schockgefroren und in einem geschlossenen Tiegel 2 Min. lang in flüssigen Stickstoff getaucht,
- die DSC-Kammern wurden auf -140°C vorgekühlt
- die eingefrorene Probe wurde 5 min. in der DSC-Kammer bei -140°C temperiert
- anschließend wurde ein Step Scan bis 10-20°C durchgeführt, die Heizrate betrug 5°C /Min bzw. 1°C/Min.

Step Scan DSC ist eine temperaturmodulierte DSC Methode (TMDSC), die die Separation von DSC-Ergebnissen in thermodynamische (reversible) und kinetische (irreversible) Komponenten ermöglicht. Würde es bei der Vermessung einer Probe mit Standard DSC zur Überlagerung von Ereignissen kommen, so können diese Effekte mit der Step Scan Methode aufgetrennt werden. Dabei werden Heizschritte (z.B. 5°C/Min) mit isothermen Zeitintervallen kombiniert. Die resultierende Wärmekapazität der Probe spiegelt den reversiblen Anteil wie z.B. Moleküllibrationen (Wärmekapazität der Probe) oder Rotationsbewegungen (Glasübergang  $T_g'$ ) wider. Der kinetische IsoK Basisliniendatensatz gibt die irreversiblen oder langsamen Prozesse wider. Ein Beispiel dafür wäre eine Enthalpierreaxation, die bei physikalisch gealterten Proben den Glasübergang überlagern könnte. Diese wäre in der IsoK Basislinie zu erkennen.

Die eingefrorenen Lösungen mit 0,5% Hypromellose zeigten weder bei der DMA noch bei der DSC einen Glasübergang.

Bei den 1%-igen Hypromelloselösungen wurde der Glasübergang mit der DMA nicht gefunden. Das DSC-Thermogramm der 1%-igen Hypromelloselösung zeigt zwei Glasübergstemperaturen  $T_g'$  bei -20°C und -31°C (Abbildung 4-35).

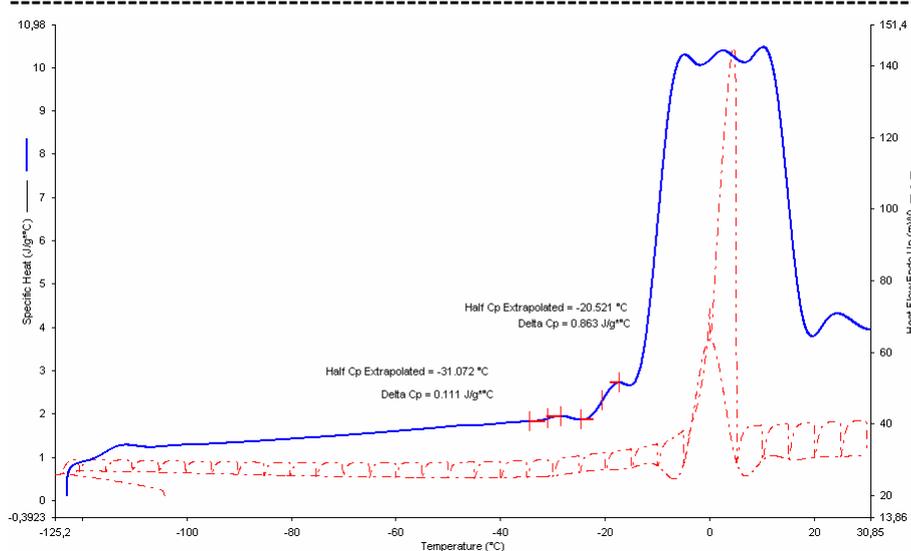


Abbildung 4-35: DSC Thermogramm einer 1%-igen Hypromellose-Lösung im Phosphatpuffer, Heizrate 5°C/Min.; durchgezogene Linie: geglättete Auftaukurve; gestrichelte Einschwingpeaks: Step Scan, gestrichelte Linie unter den Einschwingpeaks: IsoK Basislinie.

Die Abbildung 4-35 zeigt das DSC-Thermogramm einer 1% Hypromellose Lösung. Darin sind enthalten die Rohdaten des erhaltenen Wärmeflusses in der Probe (gestrichelte Einschwingpeaks), die irreversible IsoK Basislinie (gestrichelte Linie unterhalb der Einschwingpeaks) und das reversible thermodynamische  $C_p$  Signal (durchgezogene Linie). Im thermodynamischen  $c_p$  Signal sind die Glasübergänge  $T_g'$  zu erkennen.

Die Glasübergangsbereiche der 5%-igen Mannitollösung lagen, abhängig von der Messmethode bei unterschiedlichen Temperaturen. Die DMA-Messung lieferte einen Glasübergang bei -38°C (Abbildung 4-36) und die DSC-Messung einen bei -43,7°C (Abbildung 4-37). Dieses Phänomen ist in der Literatur bekannt [19] (s. auch Kap.3.3.7.2).

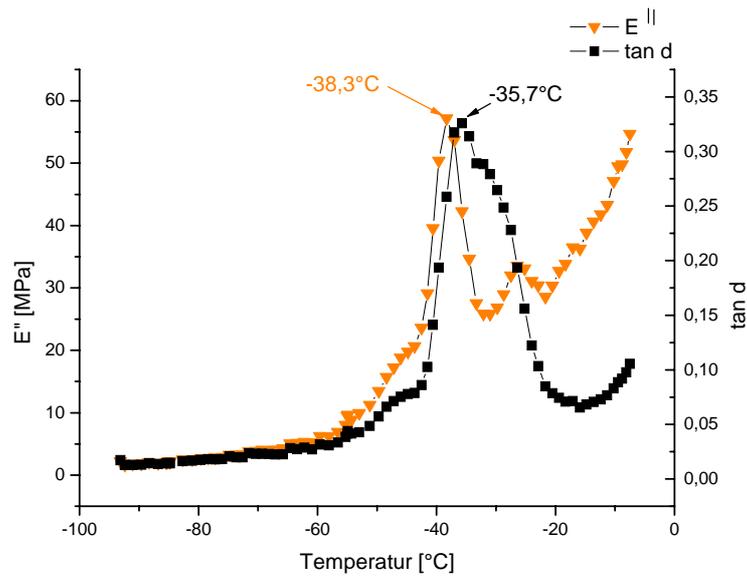


Abbildung 4-36: DMA Thermogramm einer schockgefrorenen 5% Mannitol –Lösung im Phosphatpuffer.

Der Glasübergang bei der DMA zeichnet sich durch ein Maximum des Verlustmoduls  $E''$  oder des  $\tan d$  aus, wobei das  $\tan d$ -Signal versuchsbedingt immer etwas dem  $E''$  Signal hinterherhinkt (vgl. Kap. 3.3.7.2.) .

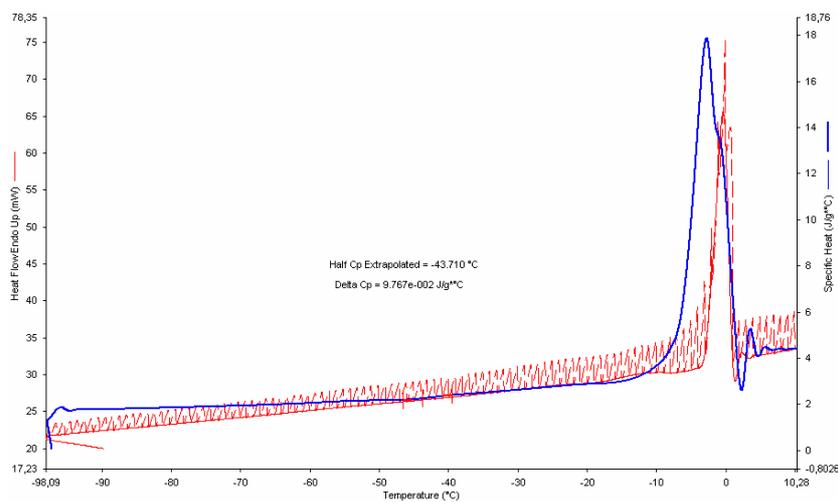


Abbildung 4-37: DSC Thermogramm einer 5%-igen Mannitol-Lösung im Phosphatpuffer. Die Heizrate betrug 1°C/Min.

Die Abbildung 4-37 zeigt das DSC-Thermogramm einer 5%-igen Mannitol-Lösung. Die durchgezogene Linie unterhalb der Einschwingpeaks (IsoK Basislinie) zeigt die Rohdaten des erhaltenen Wärmeflusses in der Probe. Im Thermo-

dynamischen  $C_p$  Signal (dunkle durchgezogene Linie) ist der Glasübergang  $T_g'$  zu erkennen.

Die Abbildung 4-38 und Abbildung 4-39 zeigen die mittels DMA und DSC ermittelten Glasübergänge der 10%-igen Mannitol Lösung. Die ermittelten Glasübergangstemperaturen liegen eng beieinander: die  $T_g'$  der DMA Messung beträgt  $-39^\circ\text{C}$  und diejenige der DSC Messung  $-40^\circ\text{C}$ :

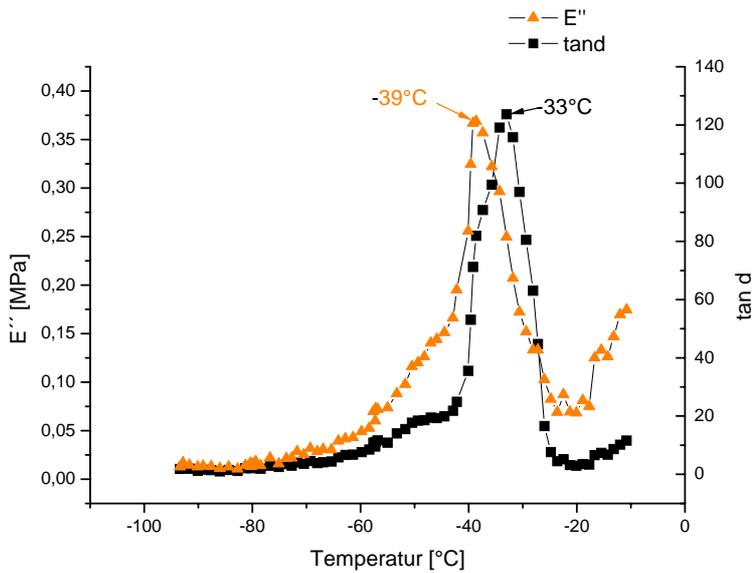


Abbildung 4-38: DMA Thermogramm einer schockgefrorenen 10% Mannitol-Lösung im Phosphatpuffer.

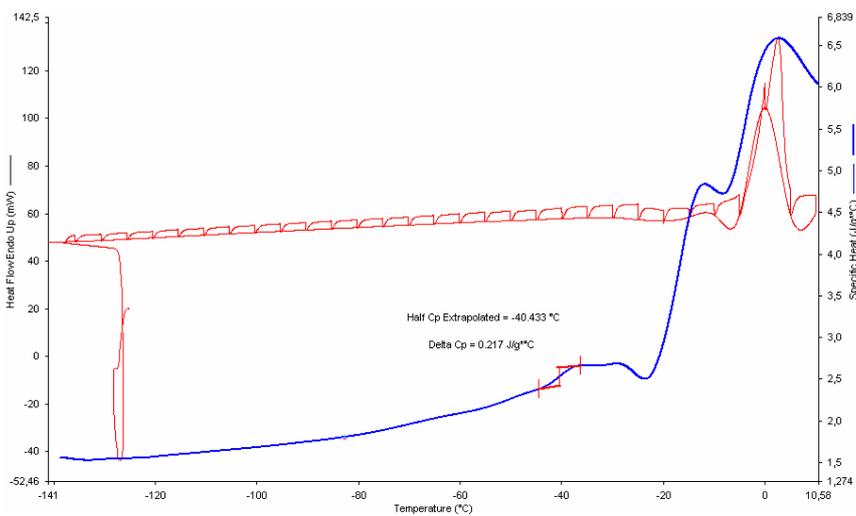


Abbildung 4-39: DSC Thermogramm einer 10%-igen Mannitol-Lösung im Phosphatpuffer. Die Heizrate betrug  $5^\circ\text{C}/\text{Min}$ .

## 4.4 Charakterisierung der Lyophilisate

### Wiederauflösungsverhalten der Lyophilisate.

Lyophilisate zeichnen sich allgemein durch eine sehr große, poröse Oberfläche aus. Diese ermöglicht eine sehr schnelle Wiederauflösung des Pulvers im gegebenen Lösungsmittel. Das trifft im Falle der Mannitollyophilisate zu. Diese lösen sich innerhalb weniger Sekunden auf.

Hypromelloselyophilisate dagegen, zeigen deutlich schlechtere Eigenschaften beim Wiederauflösen. Die Rekonstitutionszeit bei den Hypromelloselyophilisaten dauert mehrere Minuten.

Die Zeit, die für die Rekonstitution des Lyophilisates benötigt wird, als auch der Aufwand beim Wiederauflösen, spielt für den Verbraucher (z. B. Krankenhauspersonal) eine wichtige Rolle.

### 4.4.1 Oberflächenstruktur.

Mit den rasterelektronenmikroskopischen (REM) Aufnahmen sollte untersucht werden, wie die Oberflächenbeschaffenheit der Lyophilisate durch die Einfrierbedingungen und die Zusammensetzung der Lösung beeinflusst wird.

Die Abbildung 4-40 zeigt eine Übersicht über die genaue Versuchsplanung.

Es wurden konventionell gefriergetrocknete Lyophilisate nach dem Einfrieren bei  $-27^{\circ}\text{C}$  bzw.  $-196^{\circ}\text{C}$  verglichen, da bei den extrem ungleichen Einfrieretemperaturen ausgeprägte Unterschiede sichtbar sein sollten.

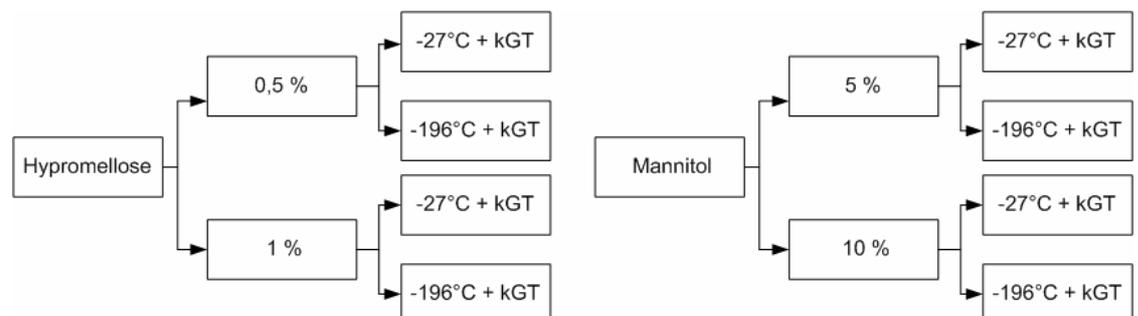


Abbildung 4-40: Übersicht über die Versuchsplanung für rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen. (kGT = konventionelle Gefriertrocknung)

Die REM Bilder wurden mit dem Rasterelektronenmikroskop der Firma Hitachi aufgenommen (vgl. Kap 7.1). Bei der Probenvorbereitung wurde jeweils ein Teil der Oberfläche des Lyophilisates vorsichtig entnommen und auf einem Träger fixiert. Die Oberfläche der Proben wurde vor dem Vermessen mit einer Goldschicht überzogen.

Die REM-Aufnahmen zeigen, dass die Oberfläche und die Porenstruktur der Lyophilisate mit Hypromellose sich von der mit Mannitol deutlich unterscheiden.

Für die Untersuchungen wurden Übersichtsaufnahmen mit 45-facher Vergrößerung und Detailaufnahmen mit 250-facher Vergrößerung der Lyophilisat-Oberfläche gemacht.

### **Oberfläche der Lyophilisate mit Hypromellose.**

Nach dem Einfrieren bei  $-27^{\circ}\text{C}$  beobachtet man an der Oberfläche der Lyophilisate mit 0,5% Hypromellose eine blätterteigartige Struktur (Abbildung 4-41, links). Die Porengrößenverteilung liegt zwischen 50 und 100  $\mu\text{m}$ . Die Porenränder sind glatt.

Nach dem Schockgefrieren fällt eine sehr unterschiedliche Porenstruktur auf (Abbildung 4-41 rechte Spalte). Neben sehr feinen Poren, die 20  $\mu\text{m}$  und kleiner sind beobachtet man große Poren mit einem Durchmesser von ca. 100  $\mu\text{m}$ . Die Porenränder sehen rau aus.

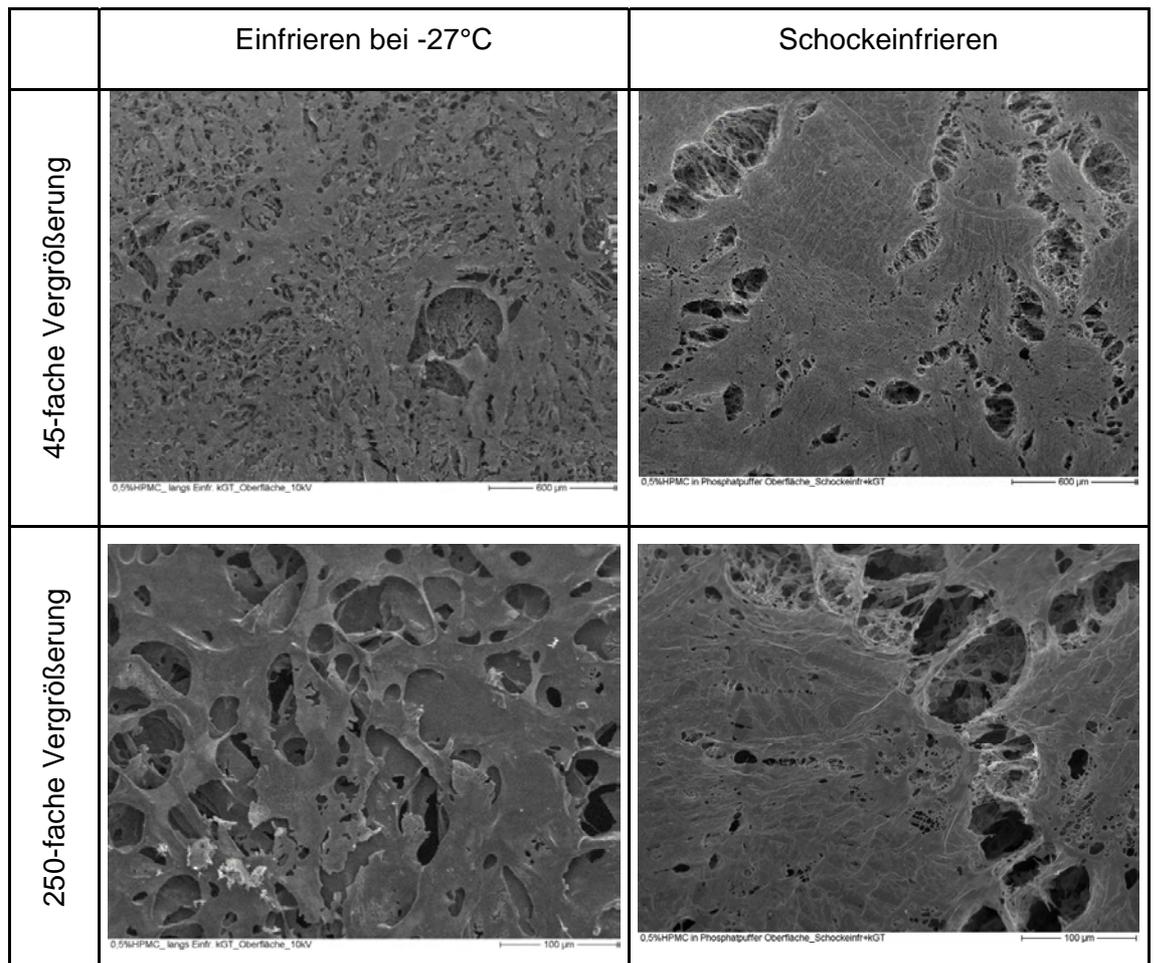


Abbildung 4-41: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Lyophilisate mit 0,5% Hypromellose nach dem Einfrieren bei -27°C (links) und Schockgefrieren (rechts).

Die Oberfläche der Lyophilisate mit 1% Hypromellose (Abbildung 4-42), die bei -27°C eingefroren wurden, unterscheidet sich nicht wesentlich von der mit 0,5% Hypromellose. Auch hier ist eine blätterteigartige Struktur mit glatten, runden, relativ einheitlichen Poren mit einem Durchmesser zwischen 40-100 µm zu erkennen.

Die Porenstruktur und die Oberfläche der Lyophilisate mit 1% Hypromellose nach dem Schockgefrieren unterscheidet sich deutlich von den mit 0,5% Hypromellose (Abbildung 4-42). Die Poren weisen eine lanzettenartige ovale Form auf. Ihre Größe liegt bei ca. 100 µm. Die Oberfläche ist glatt. Man erkennt helle und dunkle Bereiche in der Aufnahme.

## Ergebnisse und Auswertung

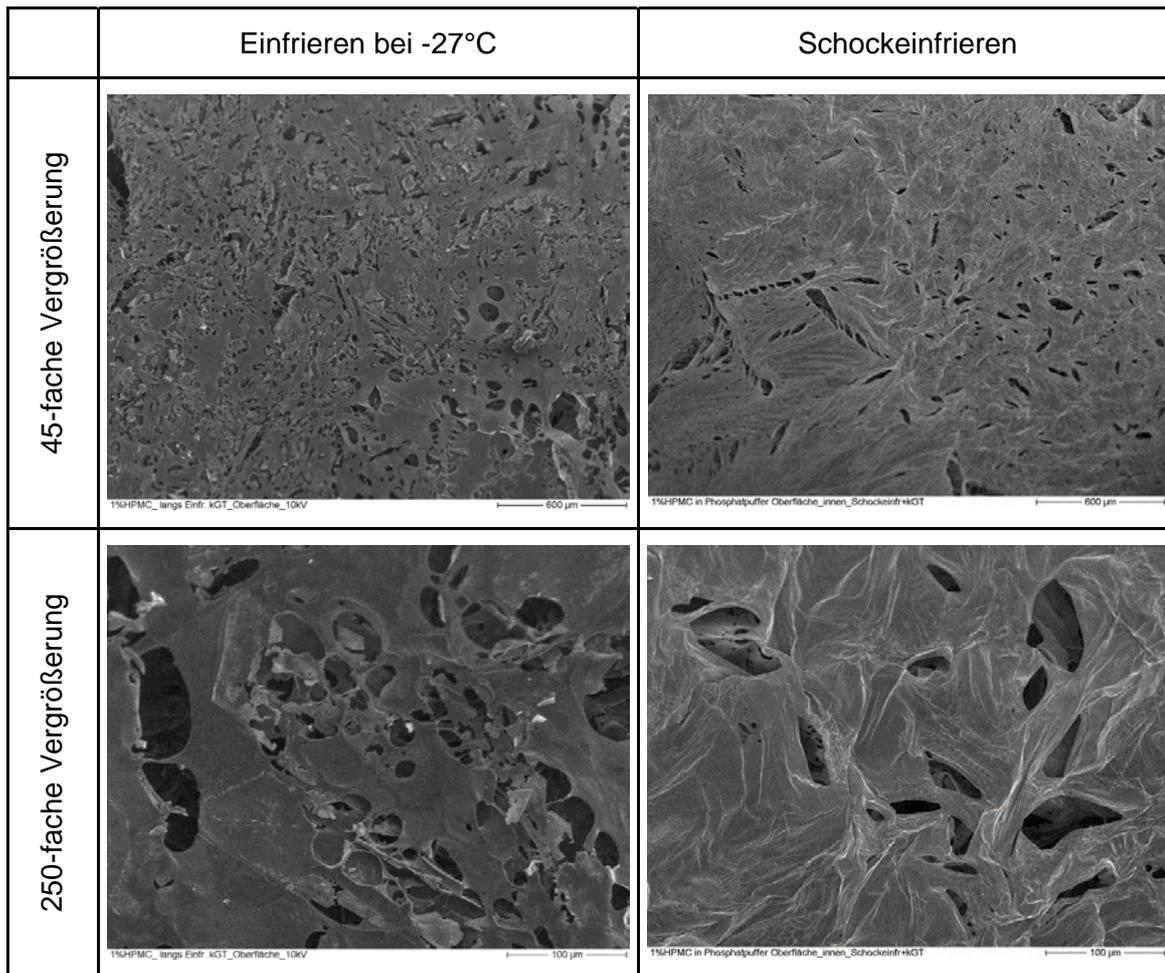


Abbildung 4-42: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Lyophilisate mit 1% Hypromellose nach dem Einfrieren bei -27°C (links) und Schockefrieren (rechts).

Das Aussehen der Hypromellose Lyophilisate implizierte, dass sie in Form eines amorphen Glases vorliegen. Das sollte mithilfe der Röntgendiffraktometrie geklärt werden.

**Oberfläche der Lyophilisate mit Mannitol.**

In der 5 % Mannitol-Lösung kommt es beim Einfrieren bei  $-27^{\circ}\text{C}$  zu einer Kristallisation. Mannitol bildet sternförmige, scharfkantige und dicht gepackte Kristalle (Abbildung 4-43). An der Oberfläche beobachtet man mehrere unterschiedlich tief liegende Feststoffschichten. Zwischen diesen Schichten mit dichter Feststoffpackung liegen unregelmäßig angeordnete „Luftareale“.

Beim Schockgefrieren und Lyophilisieren entstehen röhrenförmige Poren, deren Öffnungen ins Innere des Lyophilisates gerichtet sind. Sie sind oval bis rund. Die Oberfläche ist einheitlicher und glatter als beim Einfrieren bei  $-27^{\circ}\text{C}$  (s. Abbildung 4-43).

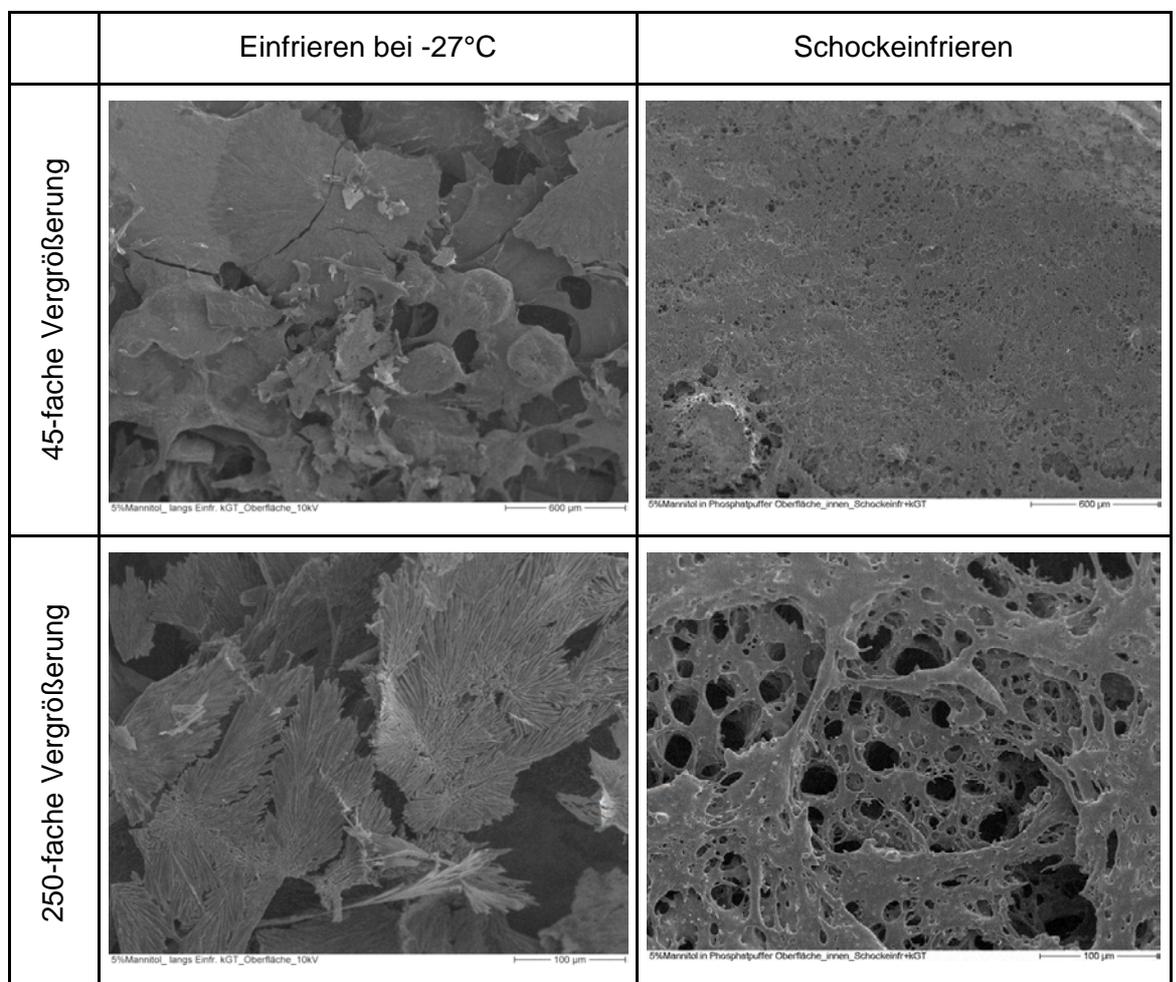


Abbildung 4-43: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Lyophilisate mit 5% Mannitol nach dem Einfrieren bei  $-27^{\circ}\text{C}$  (links) und Schockgefrieren (rechts).

Die Oberfläche der Lyophilisate mit 10% Mannitol ist nach dem Einfrieren bei  $-27^{\circ}\text{C}$  sehr uneben bis knotig (Abbildung 4-44). Man findet hier keine ausgeprägten Lufträume zwischen den Feststoffarealen, wie das bei den Lyophilisaten mit 5% Mannitol der Fall war. Die sternförmigen Kristalle, die beim Einfrieren bei  $-27^{\circ}\text{C}$  entstehen, sind in der 250-fachen Vergrößerung deutlich zu sehen. Sie sind aufgrund des höheren Feststoffanteils dichter gepackt als bei 5% Mannitol.

Bei den Lyophilisaten nach dem Schockgefrieren liegt wie in den Übersichtsaufnahmen zu sehen ist eine eher glatte Oberfläche mit sehr feinen Poren vor. Die Detailaufnahmen zeigen eine an Gewebe erinnernde Struktur, die von Inseln mit sehr kleinen Poren durchzogen wird.

In den Lyophilisaten mit 5% Mannitol, die bei  $-27^{\circ}\text{C}$  eingefroren wurden, sind die Kristalle größer, als in denen mit 10% Mannitol (Abbildung 4-43). Durch eine niedrigere Feststoffkonzentration besitzen die gelösten Teilchen eine größere „Bewegungsfreiheit“. Während die Lösung abgekühlt wird kommt es zur Diffusion der Teilchen im Wasser, wodurch Kristallwachstum begünstigt wird. Je langsamer die Lösung abkühlt, umso größere Kristalle können entstehen. Bei  $-27^{\circ}\text{C}$  ist die Lösung erst nach 60 Minuten durchgefroren.

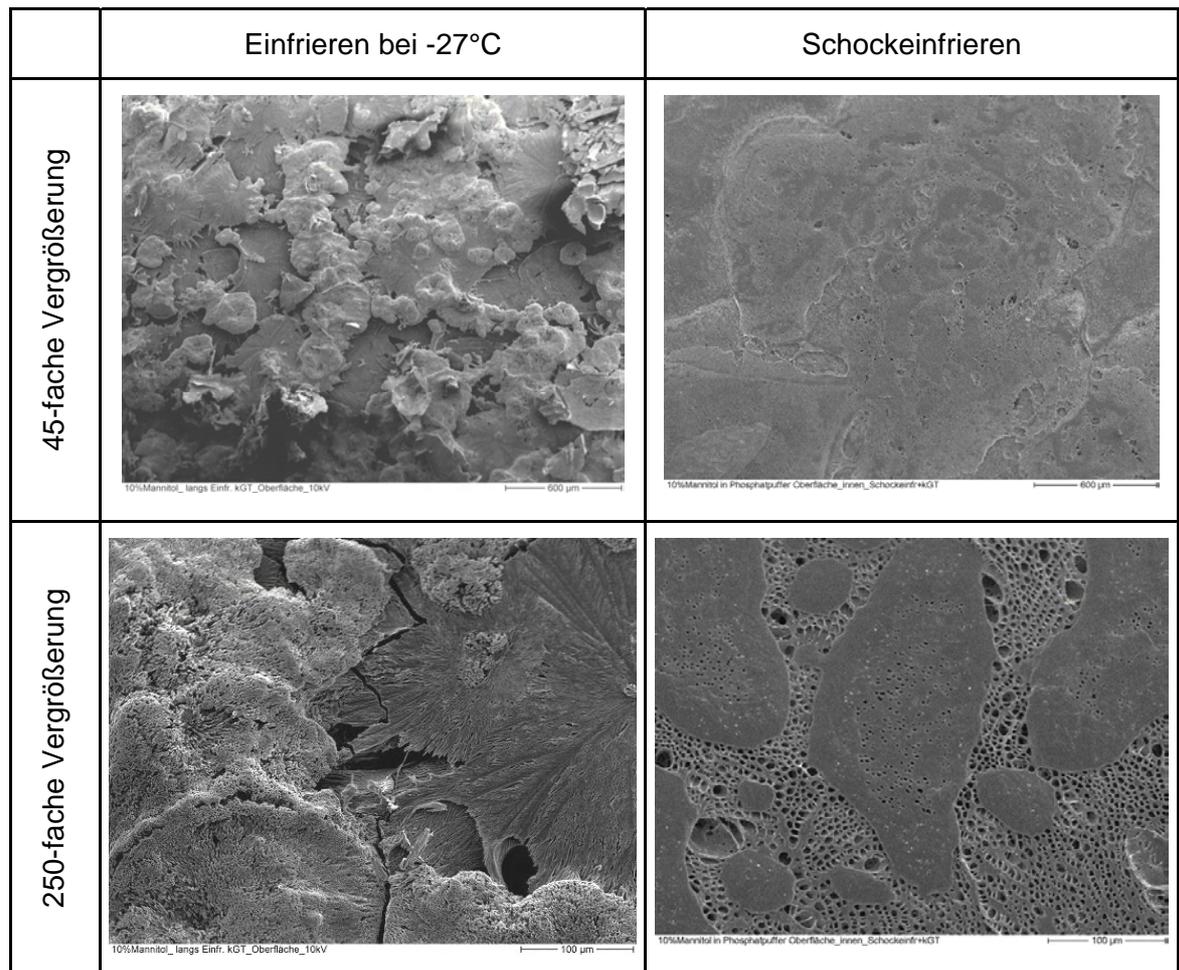


Abbildung 4-44: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Lyophilisate mit 10% Mannitol nach dem Einfrieren bei -27°C (links) und Schockefrieren (rechts).

Die vorliegende röhrenförmige Struktur in den Lyophilisaten nach dem Schockefrieren war ausschlaggebend für eine weitere Prüfung. Mit der Röntgendiffraktometrie (Rödiff) sollte geklärt werden, ob es sich um eine kristalline oder amorphe Struktur handelt. Die Ergebnisse der Rödiff-Untersuchungen sind im Kap. 4.4.2 dargestellt.

Anhand der Beobachtungen im Rasterelektronenmikroskop wurde bei Mannitol-Lyophilisaten ein kristalliner Zustand, bei HPMC-Lyophilisaten ein amorpher Zustand angenommen.

## 4.4.2 Röntgendiffraktometrische Untersuchungen.

In dieser Versuchsreihe wurde die Struktur der Lyophilisate mit Hilfe der Röntgendiffraktometrie untersucht.

Es sollte festgestellt werden, welche Strukturen die verwendeten Kryoprotektoren bei den drei eingesetzten Einfrieretemperaturen ausbilden. Weiterhin wurde untersucht, welchen Einfluss der Einsatz von Puffern in den Kryoprotektor-Lösungen auf das Kristallisations-bzw. Erstarrungsverhalten beim Einfrieren hat.

Um eine Aussage über den Einfluss des Puffers auf das Kristallisationsverhalten in einer Kryoprotektor-Lösung während des Einfrierens treffen zu können, wurden wässrige Hypromellose-Lösungen (0,5% und 1%) und wässrige Mannitol-Lösungen (5% und 10%) als auch Hypromellose- und Mannitol-Lösungen im Phosphatpuffer (PP) und im Tris-Puffer (TRIS) hergestellt. Alle Lösungen wurden

- bei -27°C eingefroren und konventionell lyophilisiert (kGT)
- bei -78°C eingefroren und konventionell lyophilisiert (kGT)
- Schockgefroren (LN<sub>2</sub>) und konventionell lyophilisiert (kGT) (Abbildung 4-45).

Die detaillierte Versuchsplanung kann der Abbildung 4-45 entnommen werden, die Zusammensetzung der Puffer wurde im Kap. 3.3.1 genannt.

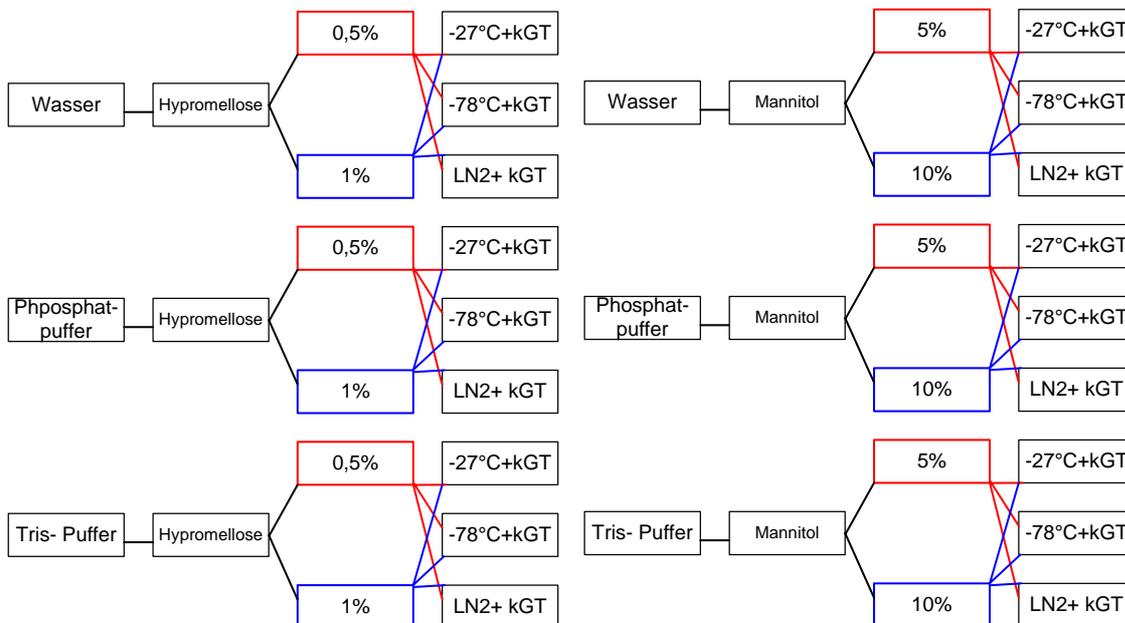


Abbildung 4-45: Versuchsplanung für röntgendiffraktometrische Untersuchungen.

Die für diese Untersuchungen verwendeten Proben konnten aus folgenden Gründen nicht fingerlyophilisiert werden. Für die röntgendiffraktometrische Messung ist eine plane Oberfläche der Proben erforderlich. Üblicherweise werden Proben bei der Fingerlyophilisation an der Wand getrocknet und weisen durch den Sprühvorgang eine unebene Oberfläche auf (vgl. Kap. 3.3.3 Einfriertemperaturen). Dagegen werden die Lyophilisate bei der konventionellen Gefriertrocknung auf dem Flaschenboden getrocknet, was zu einer planen Oberfläche des Lyophilisates führt.

Eine einheitliche Partikelgröße war für die Messungen unerheblich, weil lediglich eine qualitative Aussage getroffen werden sollte.

Nachfolgend werden Ergebnisse der röntgendiffraktometrischen Untersuchungen dargestellt.

### Reinsubstanzen

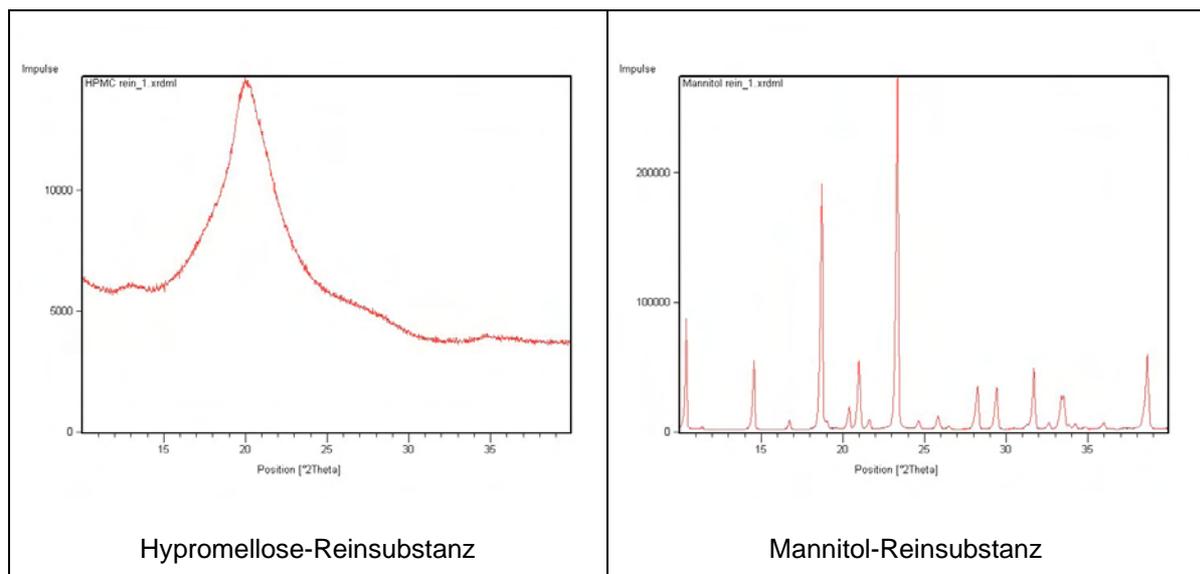


Abbildung 4-46: Röntgendiffraktogramme von Hypromellose- und Mannitol-Reinsubstanz.

Wie in Abbildung 4-46 dargestellt liegt die Hypromellose-Reinsubstanz amorph vor. Das Diffraktogramm zeigt ein sog. Halo bei 20° 2 Theta, was für amorphe Stoffe charakteristisch ist. Im Gegensatz dazu liegt Mannitol-Reinsubstanz im kristallinen Zustand vor. Die Anwesenheit scharfer Peaks in Verbindung mit einem niedrigen Untergrund untermauert diese Aussage [42].

#### 4.4.2.1. Röntgendiffraktogramme reiner Puffer-Lyophilisate

Die nachfolgenden Diffraktogramme zeigen das Beugungsmuster der Röntgenstrahlung folgender Lyophilisate:

- rot: konventionell gefriergetrocknet nach Einfrieren bei  $-27^{\circ}\text{C}$
- blau: konventionell gefriergetrocknet nach Einfrieren bei  $-78^{\circ}\text{C}$
- grün: konventionell gefriergetrocknet nach Schockgefrieren

Abbildung 4-47 zeigt die Diffraktogramme von Phosphat- und Trispuffer. Der Phosphatpuffer liegt unabhängig vom Einfrierverfahren teilkristallin vor. Das Abheben der scharfen Peaks aus dem noch deutlich zu erkennenden Halo bei ca.  $20^{\circ} 2\theta$  ist ein deutliches Indiz für diese Aussage.

Im Gegensatz dazu liegt der Tris-Puffer nach der Lyophilisation kristallin vor. Hinsichtlich der Einfriertemperaturen bestehen kaum Unterschiede zwischen den Diffraktogrammen.

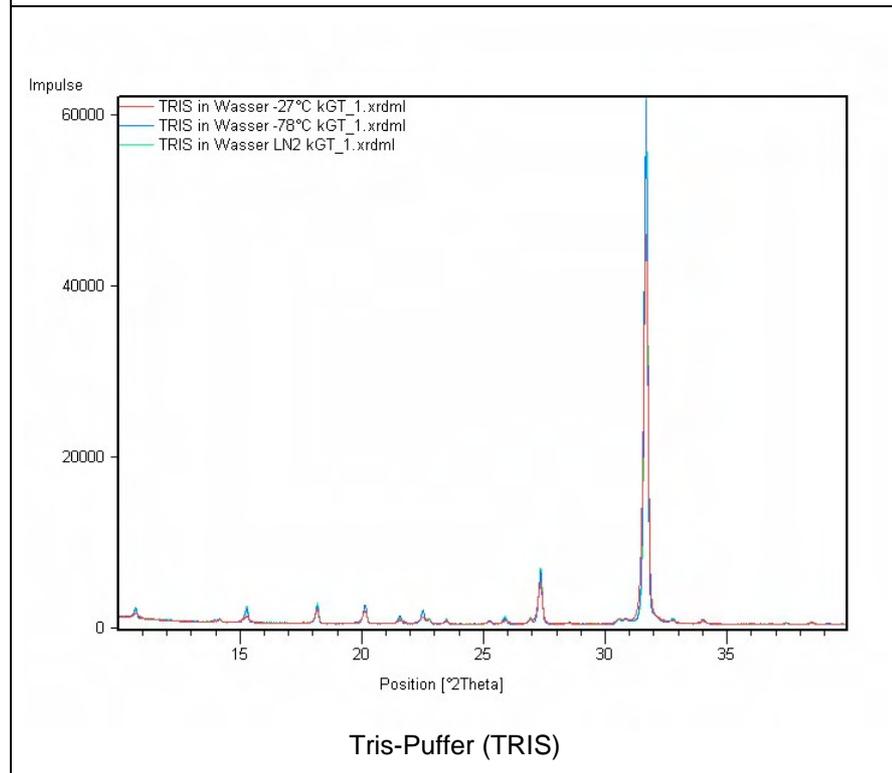
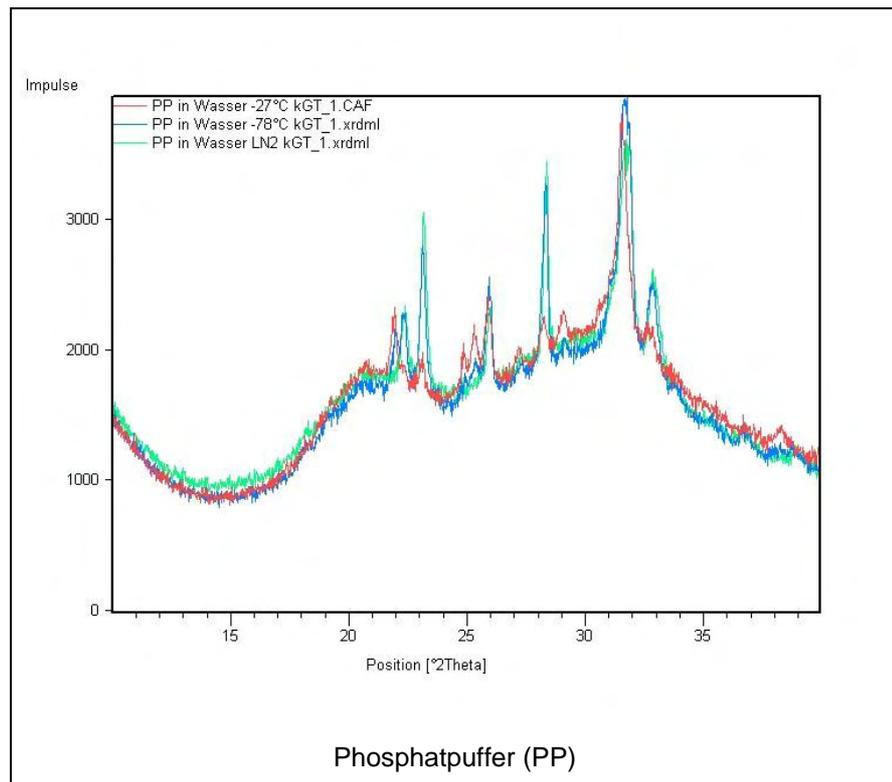


Abbildung 4-47: Röntgendiffraktogramme zweier Puffer nach Lyophilisation.

#### 4.4.2.2. Röntgendiffraktogramme der Lyophilisate mit Hypromellose.

Nachfolgend sind die Ergebnisse der röntgendiffraktometrischen Untersuchungen der Hypromellose Lyophilisate dargestellt. In den Röntgendiffraktogrammen werden wässrige und gepufferte (Phosphatpuffer und Trispuffer) Lösungen mit 0,5% und 1% Hypromellose, die bei drei Temperaturen eingefroren und konventionell gefriergetrocknet wurden verglichen (vgl. Abbildung 4-45).

#### Hypromellose im Wasser.

Unabhängig von der eingesetzten Konzentration und dem Einfrierverfahren liegt die Hypromellose aus einer wässrigen Lösung nach der Gefrierdrying amorph vor (Abbildung 4-48).

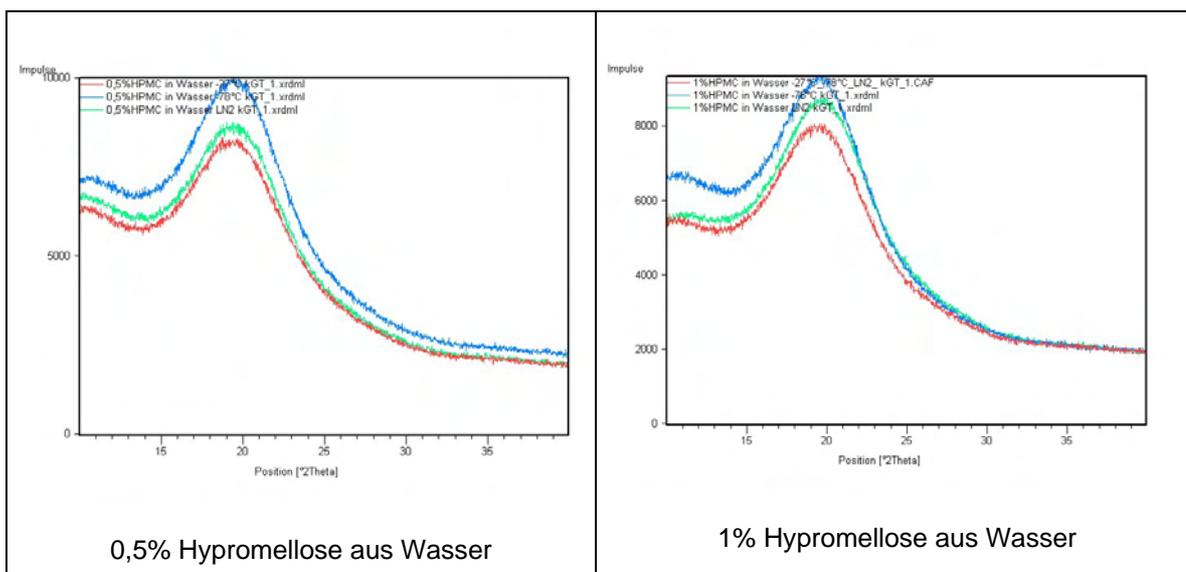


Abbildung 4-48: Röntgendiffraktogramme der 0,5% und 1%-igen Hypromellose-Lyophilisate (aus wässriger Lösung).

## **Hypromellose im Phosphatpuffer**

Der Phosphatpuffer (pH 7, 100 mM) liegt in den Lyophilisaten mit Hypromellose teilkristallin vor.

Bei 0,5% Hypromellose beobachtet man den höchsten kristallinen Anteil bei einer Einfriertemperatur von  $-27^{\circ}\text{C}$  (rot, Abbildung 4-49). Dies erkennt man anhand der größeren Intensitäten der Peaks und der damit verbundenen Peakflächenvergrößerung.

Dagegen findet sich der höchste kristalline Anteil im 1% Hypromelloselyophilisat bei der schockeingefrorenen Probe (grün, Abbildung 4-49).

Der höchste amorphe Anteil liegt bei den Hypromelloselyophilisaten bei den Proben, die auf  $-78^{\circ}\text{C}$  gekühlt wurden (blau, Abbildung 4-49).

Wird Hypromellose im Phosphatpuffer gelöst, so kristallisieren die Phosphatpuffersalze während des Einfriervorgangs aus. Das Ausmaß der Kristallisation ist umso höher, je niedriger die eingesetzte Hypromellosekonzentration.

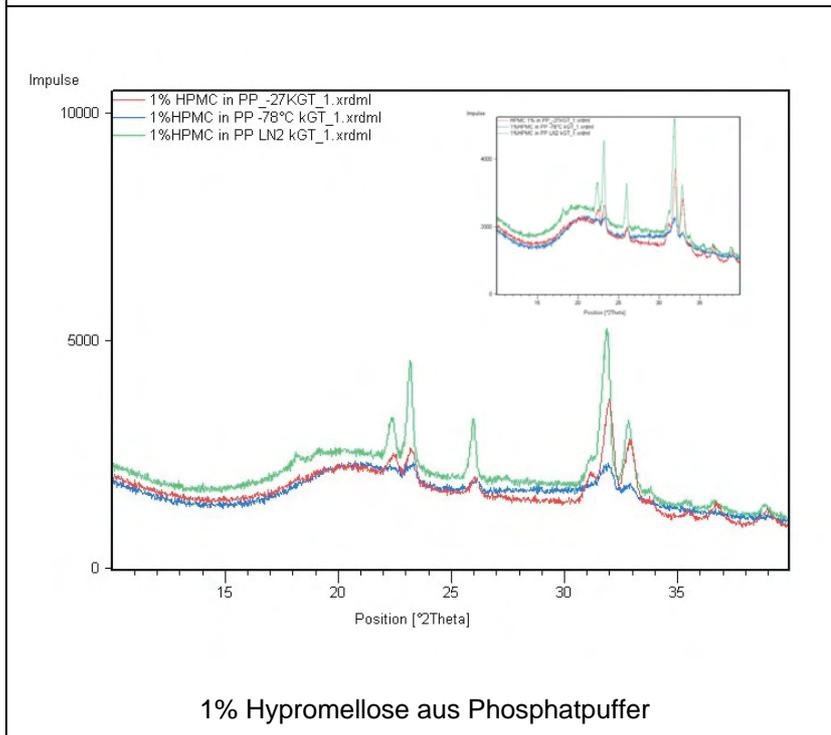
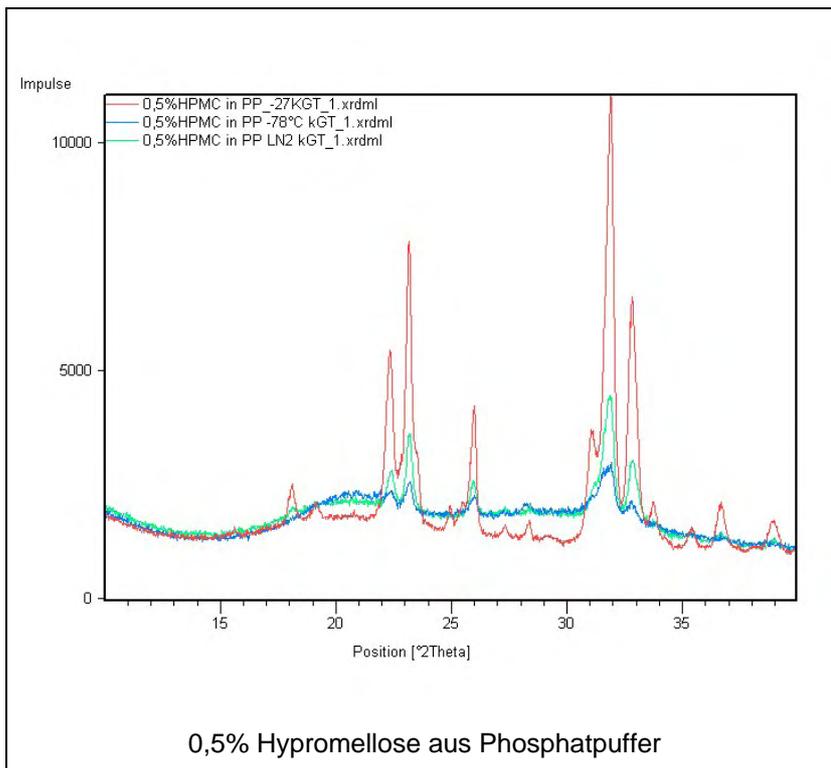


Abbildung 4-49: Röntgendiffraktogramme der 0,5% und 1%-igen Hypromellose-Lyophilisate (aus Phosphatpufferlösung).

### **Hypromellose im Trispuffer.**

Der kristalline Anteil in den Lyophilisaten mit 0,5% und 1% Hypromellose wird von den Tris-Puffersalzen verursacht. Das erkennt man an den für Tris-Puffer (pH 7 20 mM mit 150 mM HCl) typischen Peaks, die bei  $27,5^\circ$  2Theta und  $31,5^\circ$  2Theta auftreten (vgl. Abbildung 4-47). Hypromellose liegt dagegen im Lyophilisat amorph vor. In beiden Diffraktogrammen erkennt man einen sehr flachen Halo bei  $20^\circ$  2Theta (gekennzeichnet durch rote Ellipsen in der Abbildung 4-50), was auf einen geringen amorphen Anteil im Lyophilisat schließen lässt. Durch die in der Abbildung angegebene Skalierung wird der Halo flacher.

Die stärksten Peakintensitäten der 0,5%-iger Hypromelloselyophilisate treten bei der schockgefrorenen und der auf  $-78^\circ\text{C}$  gekühlten Probe auf. Die auf  $-27^\circ\text{C}$  gekühlte Probe hat eine um die Hälfte kleineren Peakintensitäten. Das bedeutet, dass der größte kristalline Anteil sowohl bei den schockgefrorenen und auf  $-78^\circ\text{C}$  heruntergekühlten Proben vorliegt.

Die Diffraktogramme der Lyophilisate mit 1% Hypromellose zeigen eine Abstufung in der Peakintensität:

- am höchsten ist sie nach Schockgefrieren,
- mittlere Peakintensität tritt tritt bei der  $-78^\circ\text{C}$  Probe auf,
- die niedrigste bei  $-27^\circ\text{C}$ .

Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, dass die Abnahme der kristallinen Anteile in den Lyophilisaten abhängig von der Temperatur ist. Je niedriger die Temperatur, desto höher der kristalliner Anteil.

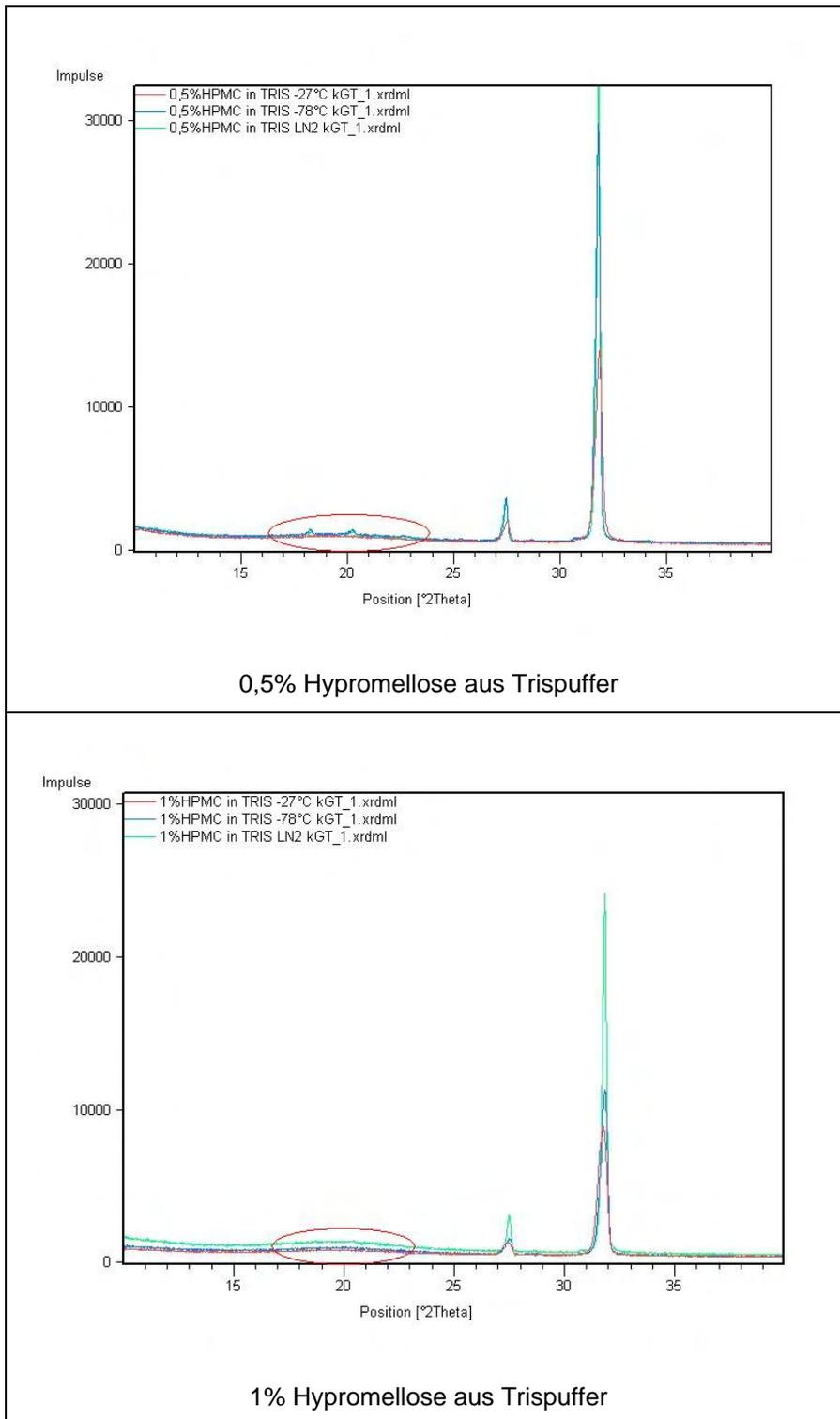


Abbildung 4-50: Röntgendiffraktogramme der 0,5%-und 1%-igen Hypromellose-Lyophilisate (aus Trispufferlösung).

#### 4.4.2.3. Röntgendiffraktogramme der Lyophilisate mit Mannitol.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der röntgendiffraktometrischen Analysen der Mannitol-Lyophilisate vorgestellt. Untersucht wurden wässrige und gepufferte (Phosphatpuffer und Trispuffer) Lösungen mit 5% und 10% Mannitol, die bei  $-27^{\circ}\text{C}$ ,  $-78^{\circ}\text{C}$  sowie schockgefroren und konventionell gefriergetrocknet wurden (vgl. Abbildung 4-40). Die Diffraktogramme zeigen jeweils einen Vergleich der Lyophilisate mit einer Mannitolkonzentration und drei Einfriertemperaturen.

Mannitol kann, wie aus der Literatur bekannt, in drei Modifikationen ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\delta$ ) vorliegen [30]. Tabelle 4-83 gibt charakteristische Peaks an, die zur Identifizierung der Mannitol Modifikationen herangezogen werden.

Modifikation	Haupt-Peaks [ $^{\circ}2\Theta$ ]	Intensität [%]	Peaks für Identifizierung [ $^{\circ}2\Theta$ ]
$\alpha$ -Mannitol	9,4	10	13,6
	13,6	20	17,2
	17,2	45	
	18,7	100	
$\beta$ -Mannitol	10,5	18	14,6
	14,6	65	16,8
	16,8	85	23,4
	18,8	100	
	23,4	90	
$\delta$ -Mannitol	9,7	100	9,7
	20,4	50	Kein Peak bei 17,9
Mannitol Hydrat	9,6	80	9,6
	17,9	100	17,9

Tabelle 4-83: Zuweisung der röntgendiffraktometrischen Peaks für verschiedene Mannitol-Modifikationen [30].

Mannitol im Wasser.

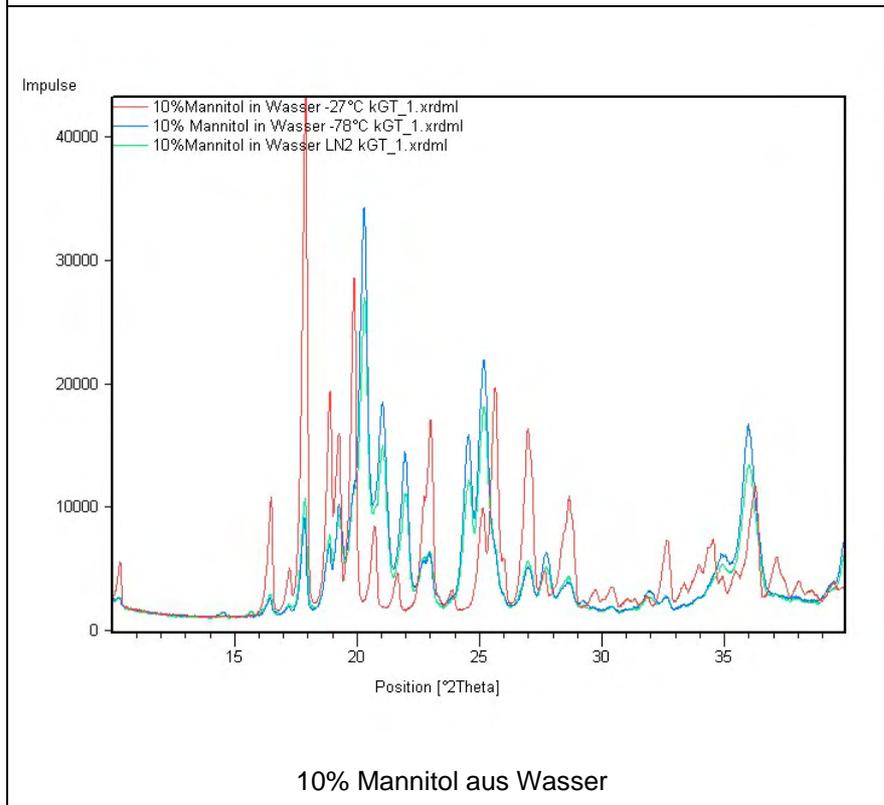
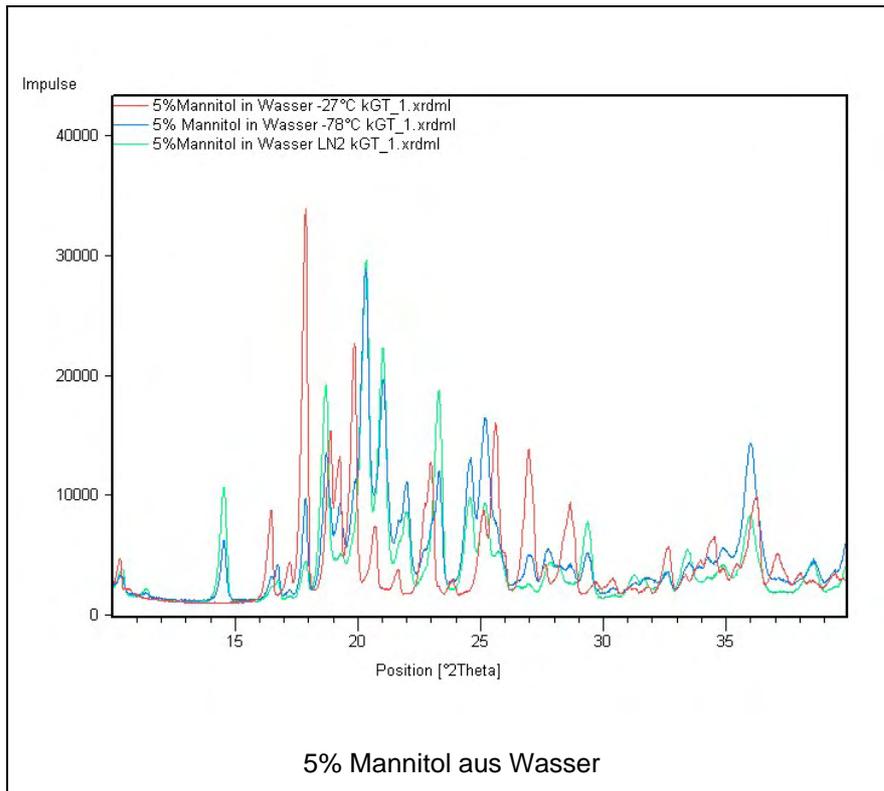


Abbildung 4-51: Röntgendiffraktogramme der 5 und 10%-igen Mannitol-Lyophilisate aus wässriger Lösung.

Unabhängig von der Einfriertemperatur bildet sich bei der Lyophilisation der wässrigen 5%- und 10%-igen Mannitollösungen eine  $\alpha$ - $\beta$ -Mischmodifikation aus.

Für die  $\alpha$ -Modifikation sind die Peaks bei  $13,6^\circ 2\theta$  und  $17,2^\circ 2\theta$  typisch [08]. Der Peak bei  $17,2^\circ 2\theta$  besitzt die stärkste Intensität in den Diffraktogrammen mit 5% und 10% Mannitol nach dem Einfrieren bei  $-27^\circ\text{C}$ .

Der für die  $\beta$ -Modifikation typische Peak bei  $14,6^\circ 2\theta$  ist bei 5% Mannitol stark und bei 10% Mannitol schwächer ausgeprägt. Allerdings findet man ihn nur in den Diffraktogrammen nach Einfrieren bei  $-78^\circ\text{C}$  und Schockefrieren. Die zwei anderen für die  $\beta$ -Form typischen Peaks bei  $16,8^\circ 2\theta$  und  $23,4^\circ 2\theta$  finden sich bei 5% Mannitol nach dem Einfrieren bei  $-78^\circ\text{C}$  und Schockefrieren.

Beim Einfrieren bei  $-27^\circ\text{C}$  tritt in den Diffraktogrammen der wässrigen Mannitol-Lyophilisate und deren mit Phosphatpuffer ein Peak bei  $17,9^\circ 2\theta$  auf. Dieser Peak kommt bei der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Modifikation nicht vor. Er ist für Mannitol-Hydrat charakteristisch [08].

Für das Schockefrieren und das Einfrieren bei  $-78^\circ\text{C}$  ist für die wässrigen Lyophilisate und die Lyophilisate mit Phosphatpuffer ein Peak bei  $20,4^\circ 2\theta$  kennzeichnend (Abbildung 4-51 und Abbildung 4-52). Dieser würde für das Vorliegen der  $\delta$ -Modifikation sprechen. Allerdings tritt in diesen Diffraktogrammen ein Peak bei  $17,9^\circ 2\theta$  auf, was das Vorkommen des  $\delta$ -Mannitols ausschließt.

Unterschiede in der quantitativen Zusammensetzung der einzelnen Lyophilisate wurden nicht bestimmt.

Die Lyophilisate mit 5% Mannitol im Phosphatpuffer weisen im Diffraktogramm deutlich niedrigere Intensitäten auf als diejenigen mit 5% Mannitol im Wasser und jene mit 10% Mannitol im Phosphatpuffer. Das weist auf einen geringeren kristallinen Anteil im Lyophilisat mit 5% Mannitol im Phosphatpuffer hin (Abbildung 4-52).

Nach dem Einfrieren bei  $-27^\circ\text{C}$  findet man bei 5% Mannitol vorwiegend die  $\beta$ -Modifikation (Peaks bei  $16,8^\circ 2\theta$  und  $18,8^\circ 2\theta$ ). Nach Schockefrieren und Einfrieren bei  $-78^\circ\text{C}$  der 5% igen Mannitol Lösung im Phosphatpuffer wird die  $\delta$ -Modifikation aufgrund der Peaks bei  $24,8^\circ 2\theta$  und  $25,2^\circ 2\theta$  angenommen [08]. Die Lyophilisate mit 10% Mannitol im Phosphatpuffer weisen eine Mischmodifikation aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Mannitol auf.

Mannitol im Phosphatpuffer.

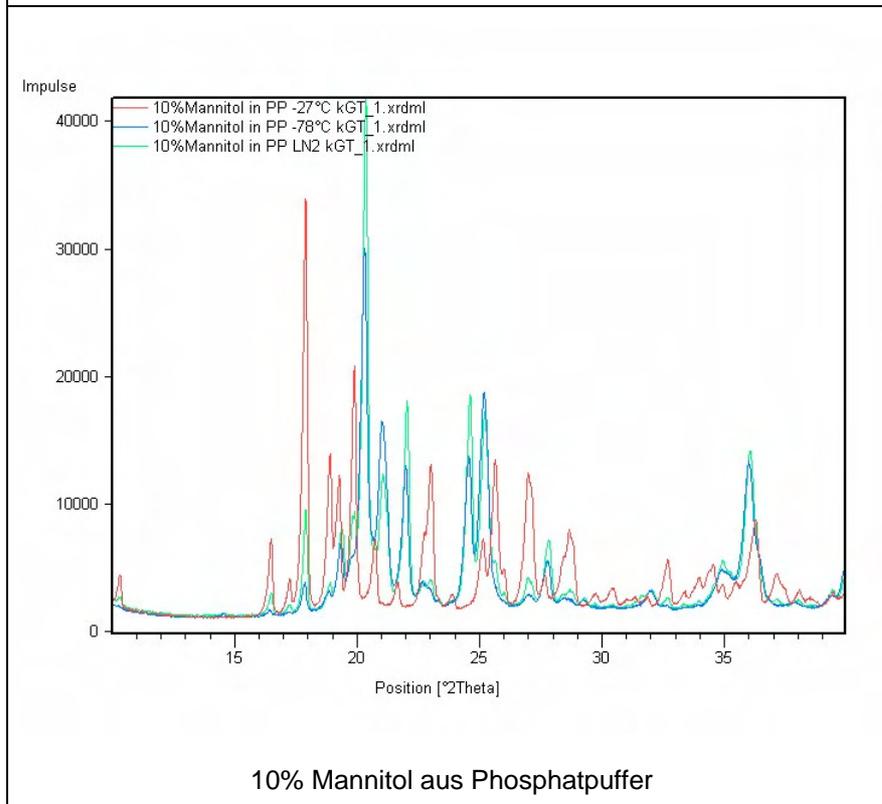
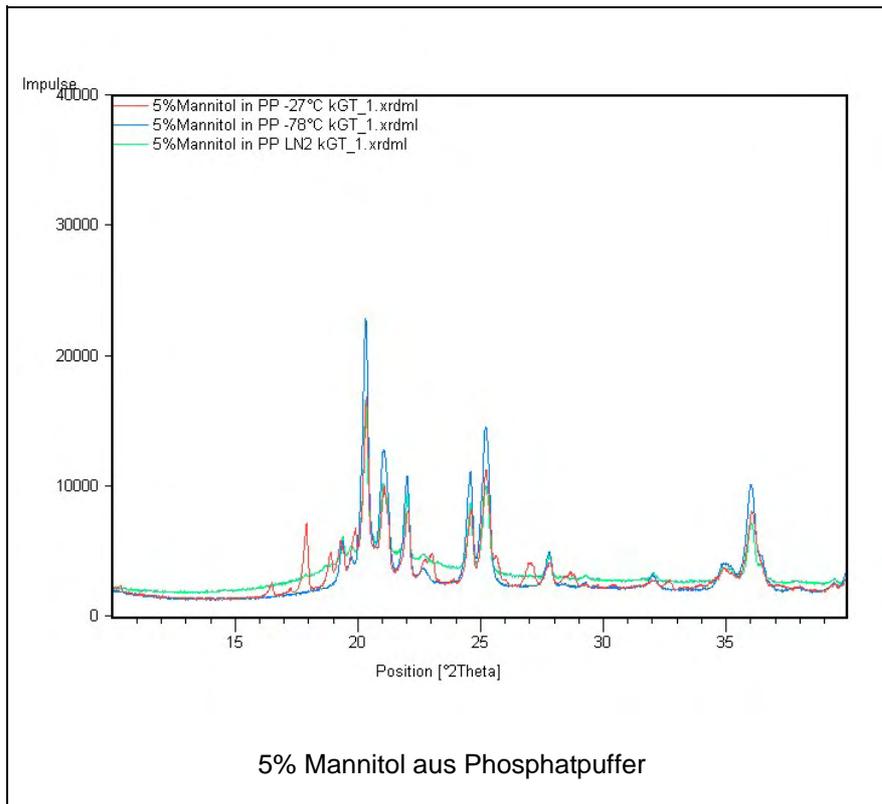


Abbildung 4-52: Röntgendiffraktogramme der 5%-igen und 10%-igen Mannitol-Lyophilisate (aus Phosphatpufferlösung).

**Mannitol im Trispuffer.**

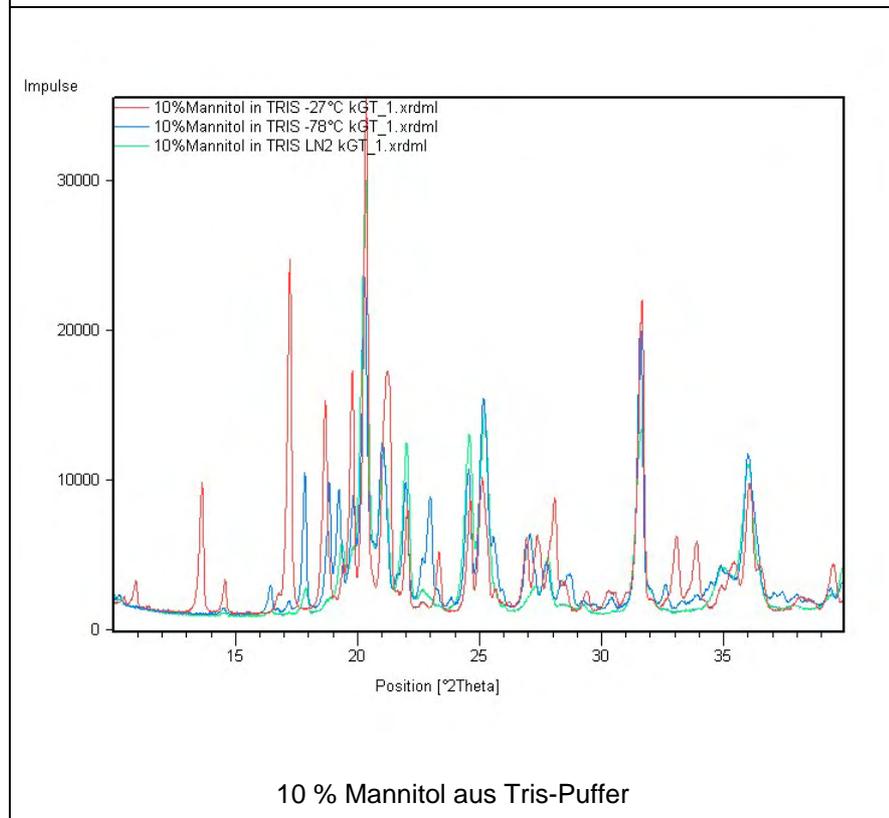
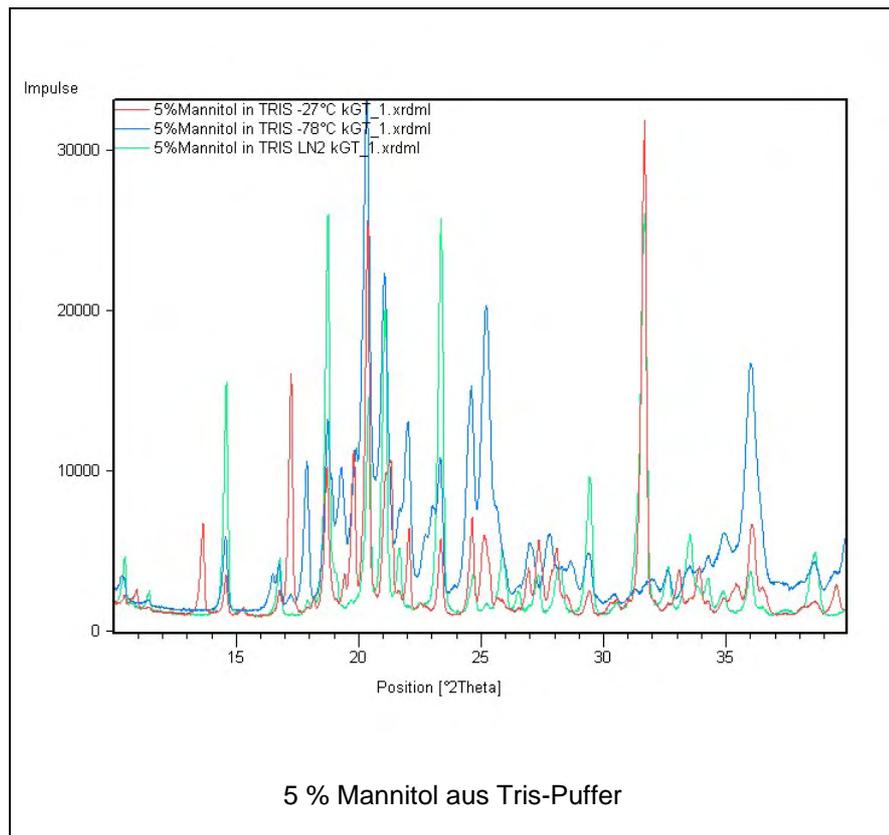


Abbildung 4-53: Röntgendiffraktogramme der 5%-igen und 10%-igen Mannitol-Lyophilisate (aus Trispufferlösung).

Lyophilisate mit 5% und 10% Mannitol im Tris-Puffer liegen unabhängig vom Einfrierverfahren kristallin vor. Der Zusatz der Puffersalze hat offensichtlich keinen großen Einfluss auf die Kristallinität der Lyophilisate. Ein für den Tris-Puffer charakteristischer Peak tritt bei  $31,5^\circ$   $2\theta$  auf.

Nach dem Einfrieren bei  $-27^\circ\text{C}$  liegt sowohl bei 5%, als auch bei 10% Mannitol vorwiegend die  $\alpha$ -Modifikation vor, die durch die Peaks mit hoher Intensität bei  $13,6^\circ$   $2\theta$  und bei  $17,2^\circ$   $2\theta$  charakterisiert wird.

Nach dem Schockgefrieren und Einfrieren bei  $-78^\circ\text{C}$  liegt eine Mischform aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Modifikation vor. Typische Peaks für die  $\beta$ -Modifikation befinden sich bei  $14,6^\circ$   $2\theta$ ,  $16,8^\circ$   $2\theta$  und  $23,4^\circ$   $2\theta$ . Die schockgefrorenen Lyophilisate mit 10% Mannitol zeigen eine relativ niedrige Kristallinität, was man an der geringen Intensität der Peaks erkennt.

### 4.4.3. Restwassergehalt.

Der Restwassergehalt im Lyophilisat hat einen Einfluss auf die Stabilität von Proteinen bei der Lagerung. Wasser begünstigt die Denaturierung der Proteine, wodurch der Gehalt der aktiven Proteine in der Zubereitung abnehmen kann. Idealerweise wird ein Restwassergehalt von unter 1% angestrebt

In der Versuchsreihe wurde der Restwassergehalt der Lyophilisate mit  $\beta$ -Galactosidase mittels Thermogravimetrie untersucht (TGA 7 Pyris). Es sollte festgestellt werden, ob der Zusatz der strukturell und in ihren Eigenschaften verschiedenen Kryoprotektoren Mannitol und Hypromellose einen Einfluss auf die Restfeuchte im Lyophilisat hat und ob der Restwassergehalt bei konventioneller Gefriertrocknung und Fingerlyophilisation unterschiedlich ist.

Folgende Enzymlösungen wurden schockgefroren und fingerlyophilisiert, sowie bei  $-78^{\circ}\text{C}$  eingefroren und anschließend konventionell gefriergetrocknet:

- $\beta$ -Galactosidase mit 5% und 10 % Mannitol im Phosphatpuffer,
- $\beta$ -Galactosidase mit 0,5% und 1% Hypromellose im Phosphatpuffer.

Anschließend wurde der Restwassergehalt thermogravimetrisch untersucht.

Für die Messungen wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet:

- Temperatur wurde 2 Min. auf  $60^{\circ}\text{C}$  konstant gehalten
- Probe wurde anschließend auf  $120^{\circ}\text{C}$  ( $10^{\circ}\text{C}/\text{Min}$ ) aufgeheizt
- Die Temperatur wurde 10 Min. bei  $120^{\circ}\text{C}$  konstant gehalten.

Die unten aufgeführten Diagramme zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen der Messergebnisse. Bei beiden Gefriertrocknungsverfahren betrug der Stichprobenumfang jeweils 2. Diese Proben wurden dreifach vermessen ( $n=6$ ).

Bei den fingerlyophilisierten Produkten wurden für diese Untersuchungen aufgrund der 2,5 stündigen Prozessdauer zwei nacheinander hergestellte Proben untersucht. Die thermogravimetrischen Messungen wurden noch am gleichen Tag durchgeführt.

Anhand der Abbildung 4-54 und Abbildung 4-55 wird deutlich, dass der Restwassergehalt der Lyophilisate nach konventioneller Gefriertrocknung niedriger ist als

nach der Fingerlyophilisation. Ebenso besteht ein klarer Unterschied in der Restfeuchte zwischen den Hypromellose- und Mannitol-Lyophilisaten.

Bei den Lyophilisaten mit Mannitol erkennt man mit steigendem Feststoffgehalt eine deutliche Abnahme der Restfeuchte nach beiden Lyophilisationsverfahren. Hypromellose zeigt dieses Phänomen lediglich bei der Fingerlyophilisation.

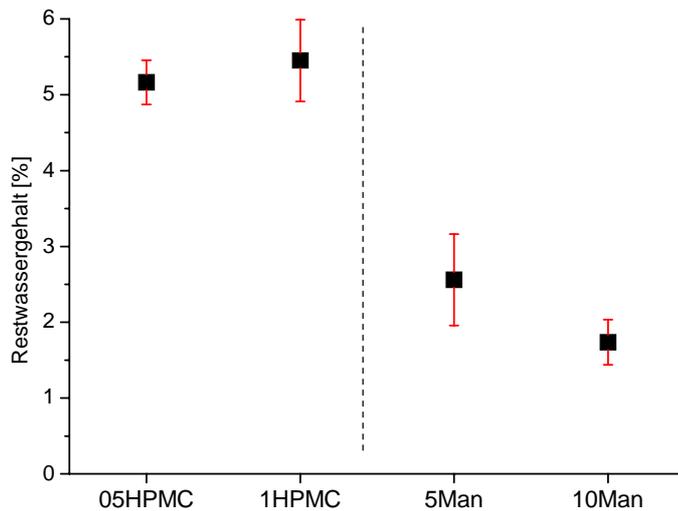


Abbildung 4-54: Restwassergehalt der Lyophilisate mit  $\beta$ -Galactosidase nach der konventionellen Gefriertrocknung. (05HPMC= 0,5% Hypromellose; 1HPMC= 1% Hypromellose; 5Man= 5% Mannitol; 10Man= 10% Mannitol)

Nach der konventionellen Gefriertrocknung liegt der Restwassergehalt für Hypromellose bei ca. 5-6% und für Mannitol bei ungefähr 2% (Abbildung 4-54) und nach der Fingerlyophilisation bei 10-20% für Hypromellose und 3-7% für Mannitol (Abbildung 4-55).

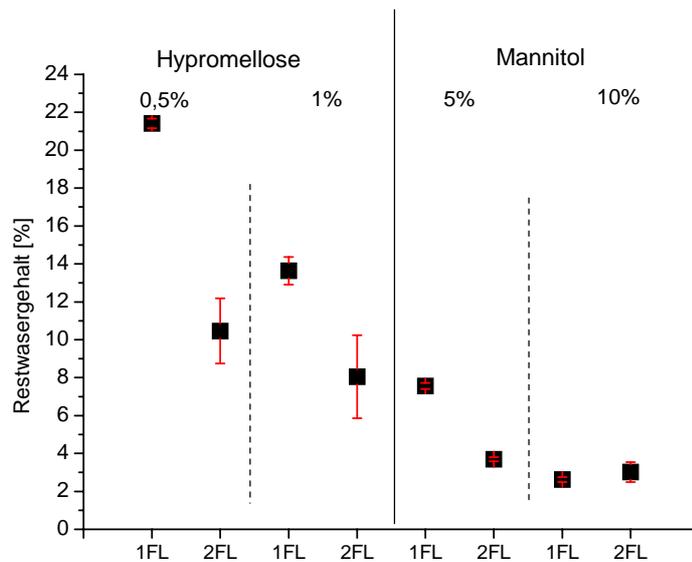


Abbildung 4-55: Restwassergehalt der Lyophilisate mit  $\beta$ -Galactosidase nach Fingerlyophilisation mit Hypromellose und Mannitol. 1FL – erste Fingerlyophilisation; 2FL – zweite Fingerlyophilisation.

Die Restfeuchte nach dem ersten Fingerlyophilisations-Prozess ist bei Lyophilisaten mit Hypromellose und 5% Mannitol doppelt so hoch, wie nach dem zweiten Prozess. Die hohe Menge des Restwassers in den Fingerlyophilisaten nach beiden Lyophilisationszyklen mit Hypromellose und 5% Mannitol zeugt davon, dass nach 2,5 h Prozesszeit lediglich die Primärtrocknung abgeschlossen wurde.

Die Restwasserwerte der Lyophilisate mit 10% Mannitol nach Fingerlyophilisation sind mit denen nach der konventionellen Gefriertrocknung vergleichbar.

---

## 5. Diskussion

Therapeutische Proteine nehmen einen immer größeren Stellenwert in der Behandlung von Krankheiten ein [80].

Ihre Herstellung und Lagerung ist problematisch, da sie gegenüber Wasser, Temperaturschwankungen, Salz und pH-Wert Einflüssen empfindlich reagieren. Dabei kann ihre native Struktur geschädigt bzw. zerstört werden, wodurch ihre Wirksamkeit herabgesetzt wird oder verloren geht.

Um die Proteine in eine lagerfähige, haltbare Form zu bringen, hat sich die Gefriertrocknung bewährt, da bei diesem Prozess Lösungen im Niedrigtemperaturbereich schonend getrocknet werden können. Die dabei entstehenden Lyophilisate enthalten sehr wenig Restwasser und weisen dadurch eine höhere Stabilität auf.

Während der Lyophilisatherstellung müssen die Prozessparameter Temperatur im Produkt und Druck in der Trocknungskammer, kontinuierlich überwacht werden, um die Stabilität des Proteins nicht zu gefährden. In größeren Produktionsanlagen ist das aufgrund großer Stellflächen nur eingeschränkt möglich. Der Fingerlyophilisator hingegen ermöglicht eine gezielte Prozessführung durch Überwachung der o.g. Prozessparameter in jedem einzelnen Produkt.

Die Fingerlyophilisation eignet sich daher für die Verarbeitung von kleinen Produktmengen und kann aufgrund von kurzen Prozesszeiten schnelle Ergebnisse bei der Entwicklung eines Produktes liefern.

Die biologische Aktivität von Proteinen kann durch chemische und physikalische Vorgänge herabgesetzt werden.

Bei chemischen Vorgängen spielen in wässriger Lösung vor allem Hydrolyse, Deaminierung, Oxidation und  $\beta$ -Elimination eine Rolle. Diese vier Reaktionen werden im Einzelnen durch Temperatur- und pH-Wert-Änderungen begünstigt. Wird außerdem die Oberfläche einer Proteinlösung durch Schütteln und der daraus folgenden Schaumbildung vergrößert, werden die Proteine vermehrt dem Luftsauerstoff ausgesetzt und oxidiert. Das Schütteln der Proteinlösung kann außerdem zu einer Aggregatbildung führen, die eine Proteinentfaltung nach sich

ziehen kann. Die Aggregation ist zum Teil reversibel. Di- und Trimere sind meist wasserlöslich, Oligomere fallen aus.

Bei physikalischen Veränderungen wird insbesondere die Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins angegriffen, wodurch das Protein entfaltet werden kann. Temperaturänderungen und der Einsatz organischer Lösungsmittel wie z.B. Ethanol können die Denaturierung begünstigen. Wird das Protein an Oberflächen wie Glas, Luft oder Wasser adsorbiert, so ist seine Deaktivierung möglich. Für das Erythropoetin ist z. B. bekannt, dass es an Glasoberflächen festklebt und dadurch seine native Struktur zerstört wird. Das kann durch Zusatz von oberflächenaktiven Stoffen wie Tween 20<sup>®</sup> vermieden werden [96].

Eine Proteinentfaltung oder Deaktivierung durch Zerstörung der Quartärstruktur resultiert meist aus einer Spaltung von Proteinuntereinheiten. Dabei entstehen kleinere Moleküle. Mit Hilfe der Gelelektrophorese, Gelchromatographie oder der Dünnschichtchromatographie können sie nach ihrer Größe getrennt werden.

Für die Stabilisierung von Proteinen in wässriger Lösung und beim Einfrieren gibt es zwei bekannte Mechanismen: die bevorzugte Bindung (engl. *preferential binding*) von Hilfsstoffen an der Oberfläche der Proteine wie z.B. Guanidin Hydrochlorid und Harnstoff und der bevorzugte Ausschluss (engl. *preferential exclusion*) von Hilfsstoffen von der Proteinoberfläche wie z.B. das Polyethylenglykol (PEG) [78]. Zur Erhaltung der Haltbarkeit von Proteinlösungen wird meistens der letztgenannte Mechanismus eingesetzt, durch den eine stärkere Hydratation des Proteins erreicht wird.

Im trockenen Zustand gibt es ebenfalls zwei Mechanismen, die das Protein vor der Inaktivierung schützen können: die Glasbildung und die Lyoprotektion. Bei der Glasbildung werden die Proteine in einer amorphen Matrix eingeschlossen. Dadurch werden sie gleichzeitig immobilisiert und räumlich voneinander getrennt, was ihre Entfaltung verhindert und der Aggregatbildung vorbeugt. Bei der Lyoprotektion wirkt der Hilfsstoff durch eine Wasserstoffbrückenbildung zum Protein als Wasserersatz.

Für den Vergleich der konventionellen Gefriertrocknung und der Fingerlyophilisation wurden bei den vorliegenden Untersuchungen zwei Modellenzyme  $\beta$ -Galac-

tosidase und Trypsin verwendet. Das Ausmaß ihrer Inaktivierung bei den jeweiligen Behandlungen sollte Aufschluss darüber geben, welche der beiden Methoden besser für ihre Verarbeitung geeignet ist. Darüber hinaus wurde der Einfluss von drei Einfriertemperaturen ( $-27^{\circ}\text{C}$ ,  $-78^{\circ}\text{C}$  und  $-196^{\circ}\text{C}$  = Schockgefrieren) und zweier Kryoprotektoren mit jeweils zwei Konzentrationen (Hydromellose 0,5% und 1% sowie Mannitol 5% und 10%) auf die Enzymaktivität getestet. Die Ergebnisse werden im ersten Teil der Diskussion erörtert.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Trypsin ein mäßig empfindliches Enzym ist. Millqvist et al. untersuchten den Einfluss der Sprüh- und Gefriertrocknung (nach Einfrieren bei  $-28^{\circ}\text{C}$ ) auf die Aktivität von Trypsin mit Zusatz von Kohlenhydraten wie Lactose, Saccharose, Mannitol, Dextrin und  $\alpha$ -Cyclodextrin. Sie fanden heraus, dass bei einem Feststoffanteil von 10% (davon 1% Trypsin und 99% Hilfsstoffe) der Aktivitätsverlust bei der Sprühtrocknung in allen Enzymhilfsstofflösungen kleiner war, als nach der Gefriertrocknung. Die mittlere Restaktivität lag nach der Sprühtrocknung bei 93% und nach der Gefriertrocknung bei 75% [53].

$\beta$ -Galactosidase dagegen wird in der Literatur als empfindliches Enzym beschrieben. Jiang und Nail zeigten, dass die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase abhängig von der eingesetzten Enzymkonzentration und dem Einfrierverfahren bis auf 20% herabfallen kann [38].

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen ebenfalls eine unterschiedliche Empfindlichkeit der Modellenzyme auf die angewandten Verfahren.  $\beta$ -Galactosidase wird deutlich mehr deaktiviert als Trypsin. Das wird im Folgenden erörtert.

Der zweite Teil der Diskussion beschäftigt sich mit den analytischen Untersuchungen der Lyophilisate. Dort werden die Oberflächenbeschaffenheit, die kristallographische Struktur sowie der Restwassergehalt der Lyophilisate behandelt. Zum Schluss wird kurz auf die Glasübergangstemperatur der Hilfsstofflösungen eingegangen.

---

## 5.1 Vergleich der Fingerlyophilisation mit der konventionellen Gefriertrocknung.

Bei der Fingerlyophilisation ohne Kryoprotektoren wurde  $\beta$ -Galactosidase fast vollständig inaktiviert, ihre mittlere Aktivität lag danach bei ca. 6% (vgl. Tabelle 4-29) Die Trypsinaktivität dagegen wurde nur wenig verändert, sie betrug ungefähr 84% (vgl. Tabelle 4-73).

Bei der konventionellen Gefriertrocknung nach Schockgefrieren dagegen verlor  $\beta$ -Galactosidase ohne Zusatz von Kryoprotektor nur 28% ihrer Anfangsaktivität. Ihre Restaktivität betrug danach 73% (vgl. Tabelle 4-15). Trypsin wurde bei diesem Verfahren fast überhaupt nicht inaktiviert (Restaktivität 96%) (vgl. Tabelle 4-57) .

Diese Ergebnisse zeigen, dass  $\beta$ -Galactosidase bei beiden Verfahren ein empfindlicheres Enzym ist als Trypsin. Beide Enzyme werden bei der Fingerlyophilisation stärker deaktiviert als bei der konventionellen Gefriertrocknung nach Schockgefrieren. Abbildung 4-14 (Kap. 4.1.4.1.) verdeutlicht diesen Sachverhalt.

Bei der Fingerlyophilisation von  $\beta$ -Galactosidase wirken beide Hilfsstoffe kryoprotektiv. Mit höherer Kryoprotektorkonzentration stieg die Restaktivität des Enzyms. Für 0,5% Hypromellose lag sie bei 52% und 1% Hypromellose bei 80%. Mannitol war etwas schwächer protektiv wirksam: Bei Zusatz von 5% Mannitol betrug die Restaktivität 23% und bei 10% Mannitol 60% (vgl. Abbildung 4-13).

Nach der Fingerlyophilisation von Trypsin war die höchste Restaktivität (96,5%) mit Zusatz von 0,5% Hypromellose zu beobachten. In den anderen Trypsinlösungen mit Kryoprotektoren sank die Restaktivität nicht unterhalb von 60% (vgl. Abbildung 4-29).

Bei der konventionellen Gefriertrocknung erwies sich bei beiden Enzymen die höhere Hilfsstoffkonzentration (1% Hypromellose und 10% Mannitol) als kryoprotektiv wirksam. Nach den Ergebnissen der statistischen Untersuchung ist dieser Effekt bei  $\beta$ -Galactosidase doppelt so stark ausgeprägt wie bei Trypsin (vgl. Tabelle 4-25 und Tabelle 4-69).

Der vermehrte Aktivitätsverlust von  $\beta$ -Galactosidase nach der Fingerlyophilisation gegenüber der konventionellen Gefriertrocknung nach Schockgefrieren kann durch die deutlich höhere Trocknungstemperatur von 40-45°C im Heizmantel (vgl. Kap. 3.3.4. Gefriertrocknungsmethoden., Abbildung 3-17) bedingt sein, wodurch die unmittelbar an der Flaschenwand befindliche Proteinschicht geschädigt werden könnte. Bei der konventionellen Gefriertrocknung hingegen wurde die Stellfläche nicht geheizt. Demnach kann die höhere Enzymaktivität bei der konventionellen Gefriertrocknung unter anderem durch die niedrige Stellflächentemperatur von 22°C begründet sein.

Ein weiterer Grund für die vermehrte Aktivitätsabnahme nach der Fingerlyophilisation kann der höhere Restwassergehalt dieser Produkte sein (s. Kap. 5.4.3). Eine höhere Restwassermenge im Lyophilisat kann wie bereits beschrieben zur Proteinschädigung führen, da dadurch die chemische Deaktivierung begünstigt werden kann.

Die Ergebnisse der Fingerlyophilisationsmethode zeigen, dass sie funktioniert. Die in sie gesetzten Erwartungen wurden nicht zur vollen Zufriedenheit erfüllt, dies kann eine Folge der unvollständigen Kontrolle der Prozessparameter sein. Insbesondere muss hier die intervallweise geregelte Umlufttemperatur im Heizmantel als Schwachstelle angesehen werden. Um den Prozess zu optimieren, sollte eine gleich bleibende Heiztemperatur am Gefriergut ermöglicht werden.

Nur der Zusatz von Kryoprotektoren ermöglichte ein nahezu zufriedenstellendes Ergebnis bei der Fingerlyophilisation von  $\beta$ -Galactosidase (vgl. Abbildung 4-14) und ein mit der konventionellen Gefriertrocknung vergleichbares Ergebnis bei Trypsin (vgl. Abbildung 4-30).

---

## 5.2 Einfluss der Einfriertemperatur auf die Enzymaktivität.

Für die Erhaltung der Proteinaktivität beim Einfrieren ist die Abkühlgeschwindigkeit entscheidend.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Aktivität beider Enzyme beim Schockefrieren fast vollständig erhalten bleibt. In der Lösung ohne Kryoprotektoren waren nach dem Schockefrieren bei  $\beta$ -Galactosidase noch 92 % aktiv und bei Trypsin 88%.

Das Einfrieren bei  $-78^{\circ}\text{C}$  und  $-27^{\circ}\text{C}$  ist für  $\beta$ -Galactosidase nicht angebracht. Ihre Restaktivität betrug nach beiden Einfriertemperaturen ca.1%. Trypsin reagierte erwartungsgemäß auf diese Verfahren nicht so empfindlich: seine Restaktivität betrug nach Einfrieren bei  $-78^{\circ}\text{C}$  und  $-27^{\circ}\text{C}$  ca. 78%.

Pikal-Cleland und Rodriguez-Hornedo haben ebenfalls gezeigt, dass schnelles Einfrieren von  $\beta$ -Galactosidase, durch zweiminütiges Eintauchen der Enzymlösung in flüssigen Stickstoff und schnelles Auftauen im  $25^{\circ}\text{C}$  warmen Wasser/ Ethylenglykolbad, die Enzymaktivität eher erhält (90-95%), als ein langsames Einfrieren, durch Absenken der Temperatur um  $0,4^{\circ}\text{C}/\text{Min}$  bis maximal  $-17^{\circ}\text{C}$  bis  $-19^{\circ}\text{C}$ , kombiniert mit langsamen Auftauen bei Raumtemperatur. Bei langsamem Einfrieren und Auftauen lag die Restaktivität bei 80-85% [66].

Jiang und Nail fanden dagegen, dass das Einfrieren im flüssigen Stickstoff die niedrigste Restaktivität von  $\beta$ -Galactosidase lieferte [38]. Bei einer Enzymkonzentration von  $5\ \mu\text{g}/\text{ml}$  lag sie bei 20% und von  $50\ \mu\text{g}/\text{ml}$  bei 38%. Dagegen betrug die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität nach dem Einfrieren im Kühlschrank bei  $-40^{\circ}\text{C}$  bei  $5\ \mu\text{g}/\text{ml}$  80% und  $50\ \mu\text{g}/\text{ml}$  über 90% und war damit am höchsten von den untersuchten Methoden. Allerdings verwendeten sie Proteinkonzentrationen zwischen  $2$  und  $50\ \mu\text{g}/\text{ml}$ , während in der vorliegenden Arbeit die eingesetzte  $\beta$ -Galactosidase-Konzentration etwa zehnfach höher war ( $500\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ). Abweichend von der in dieser Arbeit eingesetzten Methode, bei der die Enzymlösung auf die im flüssigen Stickstoff vorgekühlten Flaschenwände aufgesprüht wurden, wurden

bei Jiang und Nail die mit Enzymlösung befüllten Gefäße in flüssigen Stickstoff getaucht [38]. Beide Faktoren, die Enzymkonzentration in der Lösung und die Modifikation des Schockgefrierens, könnten zu der gegebenen Variabilität in den Ergebnissen führen.

Jiang und Nail beschreiben weiterhin, dass die Empfindlichkeit von  $\beta$ -Galactosidase von der eingesetzten Enzymkonzentration abhängig ist. Mit steigender Enzymkonzentration nahm der Aktivitätsverlust bei den angewendeten Einfrier- und Gefriertrocknungsverfahren ab [38]. Pikal-Cleland, Rodriguez-Hornedo zeigten dagegen, dass die Proteinkonzentration keinen Einfluss auf die Restaktivität von  $\beta$ -Galactosidase bei den Frier-Tau-Versuchen hatte.  $\beta$ -Galactosidase wurde bei diesen Untersuchungen in einer Konzentration von 2-1000  $\mu\text{g/ml}$  eingesetzt [66].

Bei anderen Proteinen hat die Einfriergeschwindigkeit ebenfalls einen Einfluss auf ihre Aktivität: bei Lactatdehydrogenase (LDH) wurden festgestellt, dass mit steigender Einfrier- und Auftaugeschwindigkeit die Restaktivität des Enzyms steigt [01]. Essig und Oschmann erklären dieses Phänomen wie folgt: beim schnellen Einfrieren werden große Mengen unterkühltes Wasser (engl. *non frozen water*) eingelagert, die bei der Trocknung schwer zu entfernen sind. Dieses amorph erstarrte Wasser ist nur beschränkt osmotisch verfügbar und kann so einen Schutz für empfindliche Substanzen darstellen [21].

Die Inaktivierung von  $\beta$ -Galactosidase kann beim Einfrieren durch mehrere Faktoren verursacht werden:

- die pH-Wert Verschiebung im Phosphatpuffer während des Einfriervorgangs
- die Konzentration der in der Lösung enthaltenen Salze
- die Größe und Menge der Salzkristalle in der abzukühlenden Lösung.

Aus der Literatur ist bekannt, dass beim Einfrieren von Phosphatpuffer zu einer pH-Wert Verschiebung kommt. Nach den Untersuchungen von Pikal-Cleland und Rodriguez-Hornedo [66] ist die pH-Änderung von der eutektischen Temperatur, der Konzentration der Salze und ihren Löslichkeiten abhängig. Aufgrund der höheren Löslichkeit von  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  im Wasser fallen zuerst  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  Kristalle aus. Die eutektische Temperatur von  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  liegt bei  $-0,5^\circ\text{C}$  und die von  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  bei  $-9,7^\circ\text{C}$ . Das führt zu einer Präzipitation von  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .

-----  
Je höher die eingesetzte Phosphatpufferkonzentration ist, desto stärker ist die pH-Wert-Depression. In einem 100 mM Puffer kommt es zu einer pH-Reduktion von 7 auf 3,8, dagegen sinkt der pH-Wert in einem 10 mM Puffer lediglich von pH 7 auf pH 5,5 ab.

Die pH-Wert Änderung besitzt neben anderen Faktoren einen großen Einfluss auf die Inaktivierung der Proteine während des Einfriervorgangs. Pikal-Cleland und Rodriguez-Hornedo beschreiben außerdem, dass die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase in wässriger Lösung bei einem pH-Wert unter 4 irreversibel abnimmt. Das Optimum der Proteinestabilität liegt zwischen pH 6 und 8 [66].

Während des Einfrierprozesses können sich Proteine durch Aufkonzentrierung zu Aggregaten zusammenlagern, wodurch sie inaktiviert werden können. Außerdem sind die, in der abgekühlten Lösung entstehenden Eiskristalle imstande, mechanische Schäden der Proteine zu verursachen [66].

Beim Einfrieren von Trypsin ohne Kryoprotektoren traten zwischen den drei untersuchten Temperaturen keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Restaktivitäten auf (vgl. Tabelle 4-40). Sie lagen zwischen 78% und 88%. Mit diesem Ergebnis wurde die aus der Literatur bekannte geringe Empfindlichkeit von Trypsin bestätigt [53].

Gabert und Jensen stellten fest, dass die Trypsinaktivität im Pankreassaft nach zweimaligen Einfrieren bei  $-80^{\circ}\text{C}$  und anschließend einer zweiwöchigen Aufbewahrung im Gefrierfach auf 40% des Ausgangswertes sank. Andere Autoren berichten, dass Trypsin aus dem Pankreassaft vom Kalb nach mehrmaligem Einfrieren nicht nur nicht inaktiviert wird, sondern seine Aktivität sogar zunimmt [24]. Makkink et al. fanden ebenfalls keine Unterschiede in der Aktivität von Trypsin, Chymotrypsin und Lipase nach einer Aufbewahrung dieser Enzyme bei  $-20^{\circ}\text{C}$  und  $-80^{\circ}\text{C}$  über drei Wochen. Die Aktivität dieser Enzyme sank allerdings nach einer dreiwöchigen Lagerung bei  $4^{\circ}\text{C}$  [51].

---

### 5.3 Wirksamkeit der Kryoprotektoren beim Einfrieren.

Die durchgeführten Versuche bestätigen, dass beide Kryoprotektoren (Hypromellose in der Konzentration von 0,5% und 1% und Mannitol von 5% und 10%)  $\beta$ -Galactosidase unter bestimmten Voraussetzungen vor Einfrierschäden schützen können.

Die statistische Analyse der Ergebnisse zeigt, dass Hypromellose in der höheren Konzentration (1% Hypromellose) mit einer stärkeren Schutzwirkung gekoppelt (skalierter Schätzwert: +7%) (vgl. Tabelle 4-11, Kap. 4.1.2.1.), dagegen zeigt Mannitol in der niedrigeren Konzentration von 5% den stärksten positiven Effekt beim Einfrieren von  $\beta$ -Galactosidase (höchster skalierte Schätzwert: +16%) (vgl. Tabelle 4-11, Kap. Kap. 4.1.2.1).

Das Schockgefrieren von  $\beta$ -Galactosidase mit Kryoprotektoren lieferte Restaktivitäten zwischen 85% und 95%.

Beim Einfrieren bei  $-78^{\circ}\text{C}$  ist die höchste Schutzwirkung in der Lösung mit 0,5% Hypromellose zu beobachten (Restaktivität: 97,7%), allerdings sank die Restaktivität in den anderen Lösungen mit Kryoprotektoren nicht unter 60% (vgl. Abbildung 4-2).

Nach dem Einfrieren bei  $-27^{\circ}\text{C}$  lag die Restaktivität von  $\beta$ -Galactosidase in der Lösung mit 5% Mannitol bei 67,5%. In den Lösungen mit 1% Hypromellose und 10% Mannitol war sie um die Hälfte niedriger und betrug 20-30%. Nicht geeignet aufgrund einer starken Enzymschädigung ist für  $\beta$ -Galactosidase das Einfrieren bei  $-27^{\circ}\text{C}$  mit 0,5% Hypromellose (Restaktivität 3%).

Die Trypsinaktivität sank in Anwesenheit von Kryoprotektoren nach dem Einfrieren nicht so stark wie die von  $\beta$ -Galactosidase.

Einen positiven Effekt auf die Aktivität von Trypsin zeigte die statistische Analyse bei 0,5% Hypromellose, 5% und 10% Mannitol (vgl. Tabelle 4-53, Kap 4.2.2.1). Auffällig war der negative Effekt von 1% Hypromellose auf die Trypsinaktivität.

---

Beim Schockgefrieren ist ein Kryoprotektorzusatz, ähnlich wie bei  $\beta$ -Galactosidase, nicht notwendig. Im Gegensatz, der Zusatz von 1% Hypromellose erniedrigte die Restaktivität um ca. 20% gegenüber dem Schockgefrieren ohne Kryoprotektoren (vgl. Abbildung 4-18).

Beim Einfrieren bei  $-78^{\circ}\text{C}$  erwies sich dagegen der Zusatz von 1% Hypromellose als kryoprotektiv, die Restaktivität von Trypsin betrug nach dieser Behandlung 86%.

Beim Einfrieren von Trypsin bei  $-27^{\circ}\text{C}$  zeigte der Zusatz von 5 % Mannitol eine Schutzwirkung, die Restaktivität betrug 110%. Aufgrund einer starken Enzymschädigung ist das Einfrieren von Trypsin bei  $-27^{\circ}\text{C}$  in Anwesenheit von 1% Hypromellose nicht geeignet (Skalierter Schätzwert: -17%, Restaktivität: 52,3%). (vgl. Tabelle 4-54, Kap. 4.2.2.1). Hypromellose wirkte in diesem Fall nicht als Kryoprotektor, sondern schädigte sogar das Enzym.

---

## 5.4 Analytischer Teil

### 5.4.1 Rasterelektronenmikroskopie

Die Oberflächenstrukturen der Hypromelloselyophilisate unterschieden sich deutlich von denen der Mannitollyophilisate.

Die Hypromelloselyophilisate wiesen nach dem Einfrieren bei  $-27^{\circ}\text{C}$  im Gegensatz zu den Mannitollyophilisaten mit kristalliner Struktur einen blätterteigartigen Aufbau auf. Die relativ einheitlichen Poren hatten eine Größe zwischen  $50\text{-}100\ \mu\text{m}$ . Nach dem Schockgefrieren beobachtete man bei  $0,5\%$  Hypromellose eine erwartungsgemäß ziemlich „geschlossene“ Oberfläche mit sehr feinen Poren (Durchmesser ca.  $20\ \mu\text{m}$ ) und sehr großen Poren (Durchmesser ca.  $100\ \mu\text{m}$ ). Eine ähnlich „geschlossene“ Oberflächenbeschaffenheit zeigten die Lyophilisate mit  $1\%$  Hypromellose, allerdings wurden dort lanzettenartigen Poren gefunden, die kleiner als  $100\ \mu\text{m}$  waren (s. Abbildung 4-41, Abbildung 4-42, Kap. 4.4.1). Die vorliegende Oberflächenbeschaffenheit deutet darauf hin, dass die Hypromelloselyophilisate amorph vorliegen.

Die Mannitollyophilisate, die bei  $-27^{\circ}\text{C}$  eingefroren wurden, zeichneten sich durch eine deutliche stern- bis fächerförmige, scharfkantige Kristallstruktur aus. Bei  $5\%$  Mannitol war eine relativ lockere Packung größerer Kristalle zu erkennen. Mit  $10\%$  Mannitol dagegen traten feinere Kristalle auf, die ebenfalls sternförmig angeordnet waren. Durch einen höheren Feststoffanteil in der zu lyophilisierenden Lösung konnten sich in der  $10\%$ -igen Mannitollösung kleinere Kristalle mit einer sehr dichten Packung bilden. Das Mier-Ostwaldsche Gesetz besagt, dass durch einen langsamen Einfriervorgang das Kristallwachstum gefördert wird, da die Moleküle sich langsam aneinander nähern können. Schnelles Einfrieren dagegen liefert meistens kleine Kristalle [48].

Im Gegensatz zum Einfrieren bei  $-27^{\circ}\text{C}$  trat nach dem Schockgefrieren bei den Lyophilisaten mit  $5\%$  und  $10\%$  Mannitol eine fast geschlossene Oberfläche auf (Übersichtsaufnahmen). Die Großaufnahmen der Lyophilisate mit Mannitol verdeutlichen runde, kaminartige Poren, die wie erwartet ins Innere des Lyophilisates gerichtet waren. Bei  $5\%$  Mannitol war deren Durchmesser ca.  $20\text{-}100\ \mu\text{m}$ , hinge-

gen bei 10% Mannitol nur ca. 5-10  $\mu\text{m}$ . Die Struktur erinnert an Knochenspongiosa, die mit Inseln aus sehr feinen Poren durchzogen ist (vgl. Abbildung 4-43, Abbildung 4-44 Kap. 4.4.1).

## 5.4.2 Röntgendiffraktometrie

Hypromellose lag in den Lyophilisaten amorph vor. Die Kristallinität der Lyophilisate wurde durch den Zusatz der beiden Puffer (Phosphatpuffer und Tris- Puffer) verursacht.

Mannitol zeigte bei den Untersuchungen eine kristalline Struktur, die je nach dem angewandten Einfrierverfahren in der  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Modifikation oder einer Mischform aus beiden vorkommt.

Die Lyophilisate der wässrigen Hypromelloselösung lagen unabhängig von der eingesetzten Hilfsstoffkonzentration amorph vor.

Bei der Hypromelloselösung im Phosphatpuffer war deutlich zu erkennen, dass der Phosphatpuffer beim Einfrieren kristallin ausfällt. Der kristalline Anteil im Lyophilisat hing von der Menge der Hypromellose und vom Einfrierverfahren ab. Je größer der Anteil von Hypromellose, umso mehr amorphe Anteile wurden detektiert.

Der höchste amorphe Anteil in den Lyophilisaten mit Hypromellose fand sich nach dem Einfrieren bei  $-78^{\circ}\text{C}$  (Abbildung 4-49 Kap.4.4.2.2.). Den höchsten kristallinen Anteil beobachtete man bei 0,5% Hypromellose nach dem Einfrieren bei  $-27^{\circ}\text{C}$  und bei 1% Hypromellose nach dem Schockgefrieren (Abbildung 4-49 Kap.4.4.2.2.).

Die Kristallinität des Tris-Puffers wurde kaum vom Hypromellose-Zusatz beeinflusst (vgl. Abbildung 4-50, Kap.4.4.2.2.). Die Anwesenheit der amorph vorliegenden Hypromellose zeigte sich lediglich durch einen sehr flachen Halo bei ca.  $20^{\circ} 2\theta$ . Hypromellose war also nicht imstande die Kristallisation des Tris-Puffers zu unterdrücken. Die Kristallisation des Phosphatpuffers im Lyophilisat wurde hingegen durch steigenden Hypromellosegehalt behindert.

Die Diffraktogramme der Mannitollyophilisate im Wasser zeigten eine hohe Kristallinität. Es lag eine Mischmodifikation von  $\alpha$ - und  $\beta$ - Mannitol vor.

In den Lyophilisaten mit Phosphatpuffer (100 mM) lag bei 5% Mannitol ein etwas kleinerer Anteil kristallin vor als bei 10% Mannitol. Das kann aus den niedrigeren Intensitäten im Diffraktogramm des Lyophilisates mit 5% Mannitol im Phosphatpuffer entnommen werden (Abbildung 4-52, Kap. 4.4.2.3). Die Kristallinität der Lyophilisate mit 5% Mannitol im Wasser war höher, als der im Phosphatpuffer (vgl. Abbildung 4-51 und Abbildung 4-52, Kap.4.3.2.3.). Das deutet darauf hin, dass Phosphatpuffer die Kristallisation von Mannitol behindern kann, wodurch das amorphe Erstarren von Mannitol begünstigt wird. Diese Eigenschaft ist für die Gefriertrocknung von Proteinlösungen wichtig, denn durch das amorphe Erstarren der Hilfsstoffe während des Einfriervorgangs werden die Proteine stabilisiert.

Ähnliche Ergebnisse beschreiben Cavatur und Vemuri [12]. Danach können Puffersalze, insbesondere Phosphatpuffer, die Kristallisation von Mannitol behindern. Bei einer Abkühlrate von 5°C/min reduzieren Puffer mit 50, 100 und 150 mM die Kristallisation von 10% Mannitol. Je kleiner die Abkühlrate, umso höher muss die Pufferkonzentration sein, um die Mannitolkristallisation zu unterdrücken. Für die Lyophilisation von Proteinen ist die Eigenschaft, Kristallisation zu behindern wichtig, denn Kristallisationsvorgänge in der Lösung können zu Proteinschädigung durch Aggregatbildung und pH-Verschiebung führen. Pikal et al. [63] zeigten, dass der Zusatz von Glycin eine Mannitolkristallisation unterbindet und Izutsu [36] beschrieb eine Enzymstabilisierung durch Verhinderung der Mannitolkristallisation durch Zusatz von Natriumphosphat.

Nach dem Einfrieren bei -27°C trat bei den Lyophilisaten mit 5% Mannitol im Wasser vorwiegend die  $\alpha$ - Modifikation und bei den Lyophilisaten im Phosphatpuffer vorwiegend die  $\beta$ - Modifikation auf.

Nach dem Einfrieren bei -78°C und dem Schockgefrieren wurde in den Lyophilisaten mit Wasser die  $\beta$ - Modifikation gefunden. Die Lyophilisate mit 10% Mannitol im Phosphatpuffer wiesen eine Mischmodifikation aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Form auf.

Die Mannitol-Lyophilisate im Tris-Puffer zeigten nach dem Einfrieren bei -27°C vorwiegend die  $\alpha$ -Modifikation. Nach dem Schockgefrieren fand man eine Mischmodifikation aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Mannitol vor.

-----  
Wie aus der Literatur bekannt [30], [08] ist Mannitol ein kristalliner Hilfsstoff, der häufig als Zusatz bei der Gefriertrocknung verwendet wird. Je nach vorhandenen Bedingungen und Zusätzen kristallisiert er in der  $\alpha$ -  $\beta$ - oder  $\delta$ - Modifikation aus. Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Modifikationen bestehen aus orthorhombischen Kristallen, während die  $\delta$ -Modifikation aus monoklinen Kristallen aufgebaut ist [59]. Da beim Abkühlen einer Lösung ihre Zusammensetzung sich ständig ändert, können in einer Probe mehrere Modifikationen nebeneinander vorliegen. Außerdem ist in der Literatur beschrieben, dass beim Einfrieren kleinerer Mannitolkonzentrationen die  $\delta$ -Modifikation ausgebildet wird, während bei hohen Konzentrationen Mannitol in der  $\beta$ -Modifikation ausfällt [08]. Auch der Proteinzusatz hat einen Einfluss auf die Modifikation von Mannitol. Nach der Gefriertrocknung überwiegt die  $\beta$ - Form, wenn das Verhältnis von Mannitol zu Protein hoch ist. Die  $\alpha$ -Form fällt aus, wenn die Konzentration von Protein hoch und die von Mannitol niedrig ist [13].

### 5.4.3 Restwassergehalt der Lyophilisate

Der Restwassergehalt der Lyophilisate variierte je nach angewendetem Gefrier-trocknungsverfahren zwischen 2% und 21% (m/m). Nach der konventionellen Gefrier-trocknung war er um ca. die Hälfte niedriger als nach der Fingerlyophilisa-tion.

Ebenso bestand ein Unterschied in der Restfeuchte zwischen den Lyophilisaten mit Hypromellose und Mannitol. Bei Mannitol war sie tendenziell niedriger als bei Hypromellose. Das könnte einerseits durch die höheren Mannitol-Konzentrationen (5 % und 10 %) in den Lyophilisaten begründet sein. Andererseits wird Hypromellose in der pharmazeutischen Praxis auch als Gelbildner in einer Konzentration von 2% eingesetzt. Sie hat aufgrund der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Polymer Hydroxypropylmethylcellulose und Wasser ein gutes Wasserbin-dungsvermögen. Die „hydratisierte“ Hypromellose erstarrt beim Abkühlen zu einer festen Masse, dagegen kristallisieren Mannitol und Wasser beim Abkühlen ne-beneinander aus. Die Entfernung des Wassers ist aus der amorph erstarrten Hypromelloselösung schwieriger, als aus dem kristallinen Mannitol-Wasser-Gemisch.

Nach der konventionellen Gefrier-trocknung betrug der Restwassergehalt der Ly-ophilisate mit Hypromellose ca. 5-6% und der mit Mannitol 2-3%. Nach der Fin-gerlyophilisation nahm die Restfeuchte in den Lyophilisaten mit zunehmendem Feststoffanteil ab. Sie lag im Mittel bei 16% bei 0,5% Hypromellose und bei ca.11% bei 1% Hypromellose. Für 5% und 10% Mannitol betrug sie im Mittel 5% und 3%.

Die hohen Werte der Restfeuchte nach der Fingerlyophilisation deuten darauf hin, dass bei diesem Prozess lediglich die Primärtrocknung abgeschlossen wurde. Um die in der Literatur geforderte Produktfeuchte unter 1% zu erreichen wäre also ei-ne längere Trocknungszeit als 2,5 h oder eine Beheizung des Produktes bei hö-herer Temperatur als 45°C erforderlich. Pikal postuliert eine praktische Definition von trockenem Lyophilisat: „weniger als 1% Restfeuchte“. Er beschreibt, dass mit abnehmender Restfeuchte die Produktstabilität von Proteinen zunimmt. So z.B.

steigt die Aggregationsrate von HSA (Humanes Serum Albumin) mit einer Erhöhung des Restwassergehaltes im Lyophilisat von 1% auf 4% und die chemischen Abbauprozesse im hGH-Lyophilisat (human Growth Hormon) bei 25°C nehmen um den Faktor 10 zu, wenn man die Restfeuchte von 1% auf 2,5% erhöht [65].

Ein hoher Restfeuchtegehalt im Lyophilisat wird meist durch eine zu niedrige Produkttemperatur während des Trocknungsvorgangs verursacht.

Im Fingerlyophilisator befindet sich das Produkt sehr nah am Kondensator, der die kälteste Stelle in der, relativ gesehen, kleinen Trocknungskammer (Infusionsflasche, vgl. Kap. 3.3.4) darstellt. Dadurch wird das Lyophilisat von innen ständig gekühlt. Die Art der angewandten Heizung mit den 2 minütigen Temperaturperioden von 45°C (näheres vgl. Kap. 3.3.4) reichten anscheinend nicht aus, um das Wasser zügig aus dem Produkt zu entfernen. Die Produkttemperatur konnte aus technischen Gründen nicht gemessen werden. Die Trocknungszeit wurde nicht variiert.

Im Allgemeinen ist der Prozess umso schneller abgeschlossen, je höher die Temperatur im Produkt bei der Sekundärtrocknung ist. Allerdings ist eine hohe Trocknungstemperatur gerade für thermolabile Proteinzubereitungen problematisch. Die maximal mögliche Temperatur muss für jedes Protein ermittelt werden, um eine Schädigung des Produktes zu vermeiden.

#### 5.4.4 Glasübergangstemperatur der gefrorenen Lösungen

Für die 1%-ige Hypromelloselösung im Phosphatpuffer wurden mithilfe der DSC zwei Glasübergangsbereiche bei  $-20^{\circ}\text{C}$  und  $-31^{\circ}\text{C}$  detektiert. Bei den DMA-Messungen wurde keine Glasübergangstemperatur detektiert. In der Literatur wurde keine Angabe zur Glasübergangstemperatur gefunden.

Die 5%-ige Mannitollösung im Phosphatpuffer zeigte eine  $T_g'$  bei  $-38^{\circ}\text{C}$  bei der DMA-Messung und  $-43^{\circ}\text{C}$  bei der DSC-Messung. Bei der Lösung mit 10% Mannitol in Phosphatpuffer lag die  $T_g'$  bei  $-39^{\circ}\text{C}$  (DMA) und  $-40^{\circ}\text{C}$  (DSC). Die Diskrepanz der Messergebnisse zwischen der DMA und DSC ist allgemein bekannt und kann mehrere Grad betragen [19]. Die Glasübergangstemperatur, die mittels der DMA ermittelt wird, liegt generell höher als die, die mit der DSC gemessen wird. Das liegt an der verzögerten Reaktion des Messsignals auf die im Untersuchungskörper auftretenden Ereignisse. Durch die höhere Empfindlichkeit der DSC-Messung sind die Daten, die sie liefert, genauer.

In der Literatur liegen mehrere Angaben zu  $T_g'$  von Mannitol vor. Bei den Untersuchungen von Lueker et al. lag die  $T_g'$  einer 5 %-igen Mannitollösung bei  $-27^{\circ}\text{C}$  [49]. Hawe und Frieß zeigten bei ihren Untersuchungen für eine 5%-ige Mannitollösung ebenfalls zwei  $T_g'$  Temperaturen  $T_{g'1} = -30,0^{\circ}\text{C}$  und  $T_{g'2} = -25,5^{\circ}\text{C}$  [30].

Diese Literaturwerte liegen über denen, die in dieser Arbeit ermittelt wurden. Das ist auf den Zusatz des Phosphatpuffers zurückzuführen. Der Phosphatpuffer selbst besitzt in der Konzentration von 100mM einen Glasübergangsbereich bei  $-48,4^{\circ}\text{C}$  [27]. Salze erniedrigen im Allgemeinen die Glasübergangstemperatur.

Eriksson et al. fanden, dass die  $T_g'$  von Trehalose und Inulin mit zunehmender Trispufferkonzentration sank [20]. Gloger beschreibt, dass Puffersalze nicht als direkter Weichmacher fungieren (...), sondern als stark hydratisierte Elektrolyte den Wasseranteil im amorphen Glas erhöhen. Das Wasser wäre demnach der eigentliche Weichmacher, der für die Depression der Glasübergangstemperatur verantwortlich ist [27].

Allgemein liegt die Glasübergangstemperatur von Mischungen mehrerer Komponenten niedriger als die der reinen Komponenten. Lueker et al. zeigten, dass mit

-----  
steigendem Saccharoseanteil von 25 mg/ml auf 50 mg/ml in einer Saccharose/  
Mannitol Mischung ein  $T_g'$ - Abfall resultiert [49].

Je höher die Glasübergangstemperatur der gefrorenen Lösung liegt, umso einfacher ist die Temperaturführung während eines Gefriertrocknungsprozesses. Wird dieser Temperaturbereich beim Erhitzen überschritten, so können Teile des Lyophilisates kollabieren. Das in diesen durch *meltback* betroffenen Bereichen enthaltene Wasser ist für den Trocknungsvorgang sehr schwer zugänglich und kann nur mit sehr hohem Energieaufwand entfernt werden.

Betrachtet man die Ergebnisse dieser Untersuchung, so zeigt sich, dass Hypro-mellose aufgrund ihrer höheren Glasübergangstemperatur als Gerüstbildner für die Gefriertrocknung der Proteine besser geeignet ist als Mannitol.

---

## 5.5 Abschließende Bewertung.

Die Fingerlyophilisation wurde unter dem Gesichtspunkt der Musterherstellung zur klinischen Prüfung entwickelt. Der Vorteil dieses Verfahrens gegenüber der konventionellen Gefriertrocknung sollte in den präzise festlegbaren Trocknungsbedingungen und der Überwachung jedes einzelnen Produktes beim Herstellungsprozess liegen sowie in der Verkürzung der Prozesszeiten durch den speziellen Aufbau des neuen Gefriertrockners. Im Fingerlyophilisator wird jede Produkteinheit einzeln getrocknet. Die Infusionsflasche mit dem gefrierzutrocknendem Gut stellt gleichzeitig die Trocknungskammer dar. Durch den geringen Abstand des Trockengutes zum Kondensator (Aufbau des Fingerlyophilisators vgl. Abbildung 3-16) verkürzt sich der Diffusionsweg des sublimierten Wassers, wodurch der Prozess beschleunigt wird. Je schneller das Wasser aus der Atmosphäre über dem Trockengut durch das Abscheiden am Kondensator entfernt wird, umso schneller kann der Prozess voranschreiten.

Die in den Fingerlyophilisator gesetzten Hoffnungen wurden nicht zur vollen Zufriedenheit erfüllt:

- der Fingerlyophilisationsprozess eines Produkts dauerte verglichen mit einem Laborgefriertrockner, in dem mehrere Produkte gleichzeitig getrocknet werden, nicht wesentlich kürzer,
- die direkte Temperaturkontrolle im Produkt konnte noch nicht realisiert werden
- die Aktivität der Modellenzyme war verglichen mit der konventionellen Gefriertrocknung nach Schockgefrieren nach der Fingerlyophilisation nicht wesentlich höher.
- die Restfeuchte der Fingerlyophilisate war nach der eingesetzten Prozesszeit zu hoch, was auf eine nicht ausreichende Heizung des Produktes während der Herstellung hinweist.

Die Herstellung parenteraler Injektionspulver erfordert eine aseptische Umgebung. Zurzeit wird der Fingerlyophilisator unter nicht aseptischen Bedingungen

-----  
betrieben. Für diesen Prozess wäre der Betrieb des Fingerlyophilisators in einem Isolator möglich. Denkbar wäre darüber hinaus, nach einer umfangreichen mikrobiologischen Prüfung, eine aseptische Herstellung im Laminar-Air-Flow.

Der Stickstoffvorratsbehälter und die Stickstoffleitung zum Kühlfinger müssten sich aufgrund der partikulären Verschmutzung, die von ihnen ausgeht, in einem getrennten Raum befinden. Das Stickstoffgas zum Belüften des Trocknungsraumes könnte mittels Sterilfiltern gereinigt werden. Das Schockgefrieren der Lösungen im flüssigen Stickstoff müsste außerhalb der Reinraumklasse A stattfinden. Die Technische Durchführung erfordert noch eine weitere Entwicklung.

Die Fingerlyophilisation kann überdies folgende Risiken für die Proteine mit sich bringen: beim Aufsprühen der Proteinlösung auf die Behälterwand kann es zu einer Scherung kommen. Ein sehr rasches Abkühlen (hier ca. 100°C/Min. durch Schockgefrieren im flüssigen Stickstoff) kann zu einer Unterkühlung und dadurch zur Einlagerung des unausfrierbaren (engl. *non frozen water*) Wassers führen, das bei der Sekundärtrocknung schwierig zu entfernen ist. Die Flüssigkeit kann beim Auftreffen auf die Wandfläche spreiten, was zu Schädigung der Proteine führen kann.

Allerdings bestätigt der Fingerlyophilisator seine Anwendbarkeit als Pilotanlage. Durch relativ kurze Prozesszeiten, geringe Kosten und kleine Produktmengen können reproduzierbare Ergebnisse schnell zur Entwicklung neuer Produkte führen. Das Verfahren ist jedoch noch ausbaufähig, z.B. durch einen Abstreifring, der den Kondensator nach dem Abkoppeln des Produktes vom Eis befreit.

## 6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neuer Gefriertrockner - der Fingerlyophilisator - auf seine Funktion im Hinblick auf die Verarbeitung von Proteinzubereitungen getestet.

Als Modellproteine dienten  $\beta$ -Galactosidase und Trypsin. Anhand ihrer Aktivitätsänderung wurde ihre Empfindlichkeit auf das Einfrieren und die Gefriertrocknung untersucht.

Der Aktivitätsverlust der Enzyme nach den drei Einfrierverfahren: Einfrieren bei  $-27^{\circ}\text{C}$ , bei  $-78^{\circ}\text{C}$  und Schockgefrieren, sowie nach konventioneller Gefriertrocknung und Fingerlyophilisation sollte ein Aufschluss darüber geben, welche Verfahrensart für die Enzymverarbeitung am besten geeignet ist. Bei der konventionellen Gefriertrocknung wurden drei Einfriermethoden angewandt: Einfrieren bei  $-27^{\circ}\text{C}$ ,  $-78^{\circ}\text{C}$  und Schockgefrieren. Bei der Fingerlyophilisation wurde ausschließlich das Schockgefrieren eingesetzt.

Außerdem sollte das Ausmaß der protektiven Wirkung von Hypromellose und Mannitol auf die Modellenzyme bei den angewendeten Verfahren untersucht werden. Darüber hinaus wurden die Eigenschaften der Lyophilisate wie Oberflächenstruktur, kristallographische Struktur und der Restwassergehalt der Lyophilisate analysiert.

Es zeigte sich, dass  $\beta$ -Galactosidase erheblich empfindlicher auf das Einfrieren und die Gefriertrocknung reagierte als Trypsin. Nach dem Einfrieren lag die  $\beta$ -Galactosidaseaktivität im Mittel bei 60% und die von Trypsin bei 85%. Das Schockgefrieren war für beide Enzyme das beste Einfrierverfahren, da ihre Aktivität danach fast vollständig erhalten blieb.  $\beta$ -Galactosidase wurde am meisten durch das Einfrieren bei  $-27^{\circ}\text{C}$  geschädigt. Ihre Aktivität sank danach um ca. 36% gegenüber dem Mittelwert (60% vgl. Tabelle 4-10 S.106). Bei Trypsin sind keine deutlichen Unterschiede in der Restaktivität zwischen den drei Einfrierverfahren festgestellt worden.

Nach der konventionellen Gefriertrocknung ist die Restaktivität von  $\beta$ -Galactosidase und Trypsin höher als nach der Fingerlyophilisation. Die größte Differenz in der Restaktivitäten zwischen den beiden Gefriertrocknungsverfahren tritt in der  $\beta$ -Galactosidase-Lösung ohne Kryoprotektorzusatz auf (65%) (vgl.

Abbildung 4-14, Kap. 4.1.4.1). Die Unterschiede in der Trypsinrestaktivität nach beiden Verfahren betragen lediglich zu 30%, in der Lösung mit 1% Hypromellose, zugunsten der konventionellen Gefriertrocknung (vgl. Abbildung 4-30, Kap.4.2.4.1).

Beim Einfrieren von  $\beta$ -Galactosidase erwies sich der Zusatz von 5% Mannitol und 1% Hypromellose als kryoprotektiv. Bei der Gefriertrocknung von  $\beta$ -Galactosidase zeigten 1% Hypromellose und 10% Mannitol einen positiven Effekt auf ihre Restaktivität. Beim Einfrieren von Trypsin dagegen zeigten 0,5% Hypromellose 5% und 10 % Mannitol eine Schutzwirkung und bei der konventionellen Gefriertrocknung 1% Hypromellose.

Die Analyse der Oberflächenstruktur ergab deutliche Unterschiede zwischen den Lyophilisaten mit Hypromellose und Mannitol. Gefriergetrocknete Hypromellose weist nach langsamem Einfrieren bei  $-27^{\circ}\text{C}$  eine blättereartige Struktur auf. Nach Schockgefrieren und Gefriertrocknung wird eine geschlossene Oberfläche mit runden Poren gebildet. Mannitol kristallisiert während des langsamen Einfriervorgangs (bei  $-27^{\circ}\text{C}$ ) aus. Im Lyophilisat erkennt man eine stern- bis fächerförmige scharfkantige Kristallstruktur. Nach Schockgefrieren und Gefriertrocknen tritt eine „ebene“ Oberfläche mit kleinen Poren auf, die an Knochenspongiosa erinnert.

Die röntgendiffraktometrische Untersuchung zeigte, dass Hypromellose in den Lyophilisaten amorph vorliegt. Der Phosphat-Puffer und der Trispuffer fallen kristallin aus. Der Zusatz von Hypromellose setzt den kristallinen Anteil im Lyophilisat mit Phosphatpuffer herab. Mannitol kristallisiert je nach herrschenden Bedingungen in  $\alpha$ -,  $\beta$ - oder  $\delta$ -Modifikation aus. In den Lyophilisaten mit Wasser liegt nach dem Einfrieren bei  $-27^{\circ}\text{C}$  vorwiegend die  $\alpha$ -Form vor, nach dem Schockgefrieren und dem Einfrieren bei  $-78^{\circ}\text{C}$  dagegen die  $\beta$ -Modifikation. Der Zusatz des Phosphatpuffers vermindert den kristallinen Anteil in den Lyophilisaten mit Mannitol.

Der Restwassergehalt der Lyophilisate mit Mannitol ist bei beiden untersuchten Gefriertrocknungsverfahren niedriger als der der Hypromelloselyophilisate. Nach der Fingerlyophilisation liegt er zwischen 11-16% für Hypromelloselyophilisate und bei 3-5% für Mannitollyophilisate. Die konventionell gefriergetrocknete Hypromellose weist eine Restfeuchte von 5-6% auf und nach dem gleichen Verfahren getrocknetes Mannitol 2-3%.

## 7. Anhang

### 7.1 Verzeichnis der verwendeten Materialien und Geräte

Substanz	Chargen Bez.	Lieferant
$\beta$ - Galactosidase from <i>Aspergillus oryzae</i>	091K1450; 045K1500	Sigma Aldrich, D-München
Ortho-Nitrophenol- $\beta$ -D-Galactosid (ONPG)	120K5307	Sigma Aldrich, D-München
Trypsin from bovine pancreas	094K0881; 094K0882	Sigma Aldrich, D-München
Suc-Ala-Ala-Pro-Arg-pNA	0555920	Sigma Aldrich, D-München
Hydroxypropyl-methylcellulose Typ: Culminal MHPC 400	VK 1881	Hercules, USA-Wilmington
Mannitol	0307A075	Synopharm, D- Barsbüttel
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	50895325	Caelo, D-Hilden
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	7461117	Merck, D-Darmstadt
KCl	1598F- 01735	Caelo, D-Hilden
$\text{MgSO}_4$	1433092	Merck, D-Darmstadt
$\beta$ - Mercaptoethanol	101K1257	Sigma Aldrich, D-München
Tris Puffer	123K0181	Sigma Aldrich, D-München
NaCl	K32104204 324	Merck, D-Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	1137178	Fluka, CH-St.Gallen
Salzsäure 0,1N	42080	Sigma Aldrich, D-München

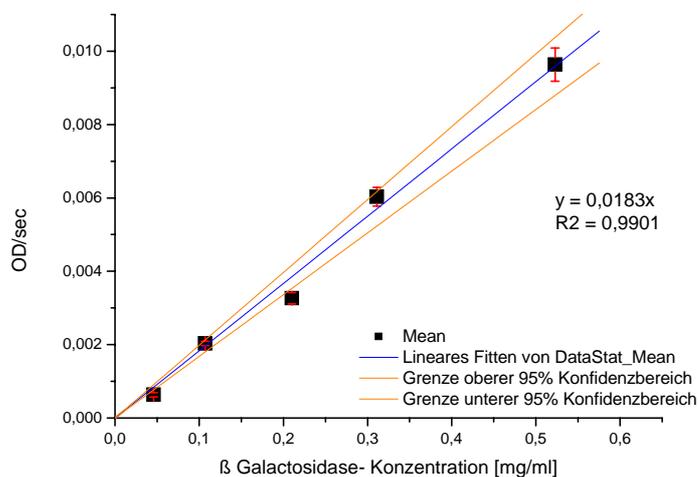
Gerät/ Methode	Geräte-Typ	Hersteller
UV- Spektrometer	Lambda 12	Perkin Elmer, D-Überlingen
Tiefkühlschrank -27°C	GS 5203; Typ 400352; Klasse SN	Liebherr, D-Biberach a.d. R.
Tiefkühlschrank -78°C	ULT Freezer-86°C ,Modell 984 REL #10 230 V	Thermo Forma, USA- Marietta, (OH)
Laborgefrietrockner	Christ Alpha 2-4	Christ, D-Marburg
Vakuumwaage	Typ 5406 A7035	Sartorius, D- Göttingen
Heißluftpistole	HL 2002 LE Typ 3449	Steinel, D-Herzebrock-Clarholz
Kapazitätsmanometer	MKS Baratron Typ 626	MKS, D- München
IR-Sensors	Infratherm Pyrometer, IN 5 plus	Impac, D- Frankfurt am Main
Widerstandsthermometer Pt- 100	Typ 40/25/2002 Klasse B	
Prozessor Tensiometer	K 100	Krüss GmbH, D-Hamburg
Dynamische Differenzkalorimetrie	Pyris 1 DSC-Gerät	Perkin Elmer, D-Überlingen
Dynamisch Mechanische Analyse	Eplexor 100 N Qualimeter	GABO, D- Ahlden
Thermogravimetrische Analyse	TGA 7 Pyris	Perkin Elmer, D-Überlingen

---

Gerät/ Methode	Geräte-Typ	Hersteller
Rheometer	RotoVisco RV1	Thermo Haake, D-Karlsruhe
Rasterelektronenmikroskop	S2460 N	Hitachi, J-Tokyo
Sputter Coater	S150 B	Edward High Vacuum International, UK -West Sussex
Diffraktometer	X'Pert Pro MPD $\theta$ - $\theta$ System	PAN alytical, NL-Almelo
Laserbeugungsspektrometer	HELOS (Helium-Neon-Laser optisches Beugungsspektrometer)	Sympatec, D-Clausthal Zellerfeld

## 7.2 $\beta$ -Galactosidase-Kalibrierreihen

$\beta$ -Galactosidase: Ch.Bez. 091K1450



$\beta$ -Galactosidase: Ch.Bez. 091K1450

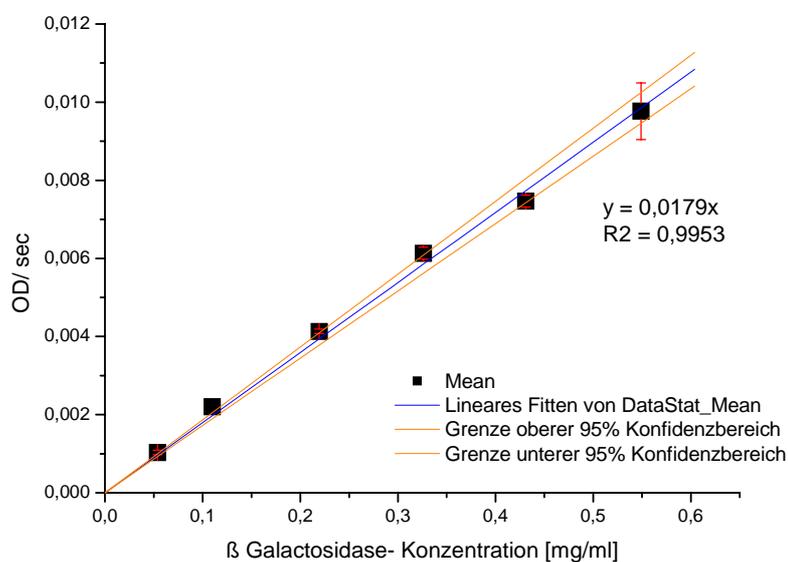
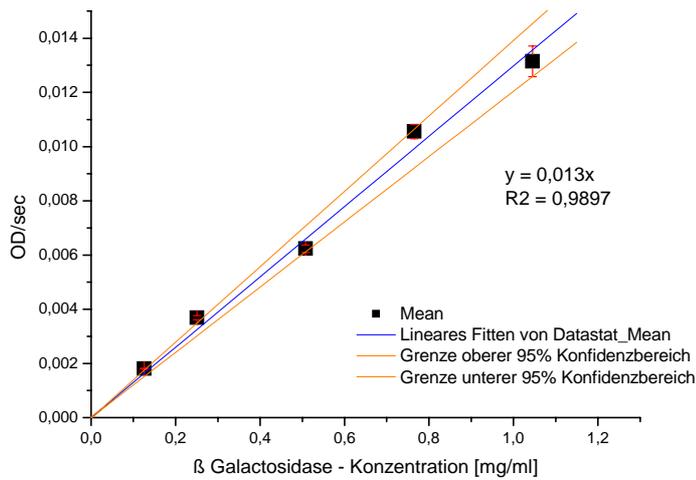


Abbildung 7-1: Kalibrierreihen für  $\beta$ -Galactosidase. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei Messungen (schwarze Kästchen) und ihre Standardabweichung. Die mittlere Linie stellt die Lineare Regression dar; die äußeren Linien geben das 95% Konfidenzintervall an.

β-Galactosidase: Ch.Bez. 091K1450



β-Galactosidase: Ch.Bez. 045K1500

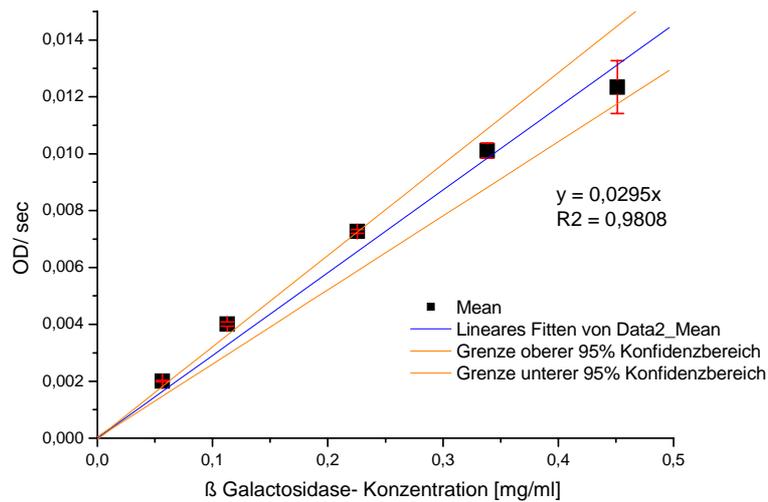
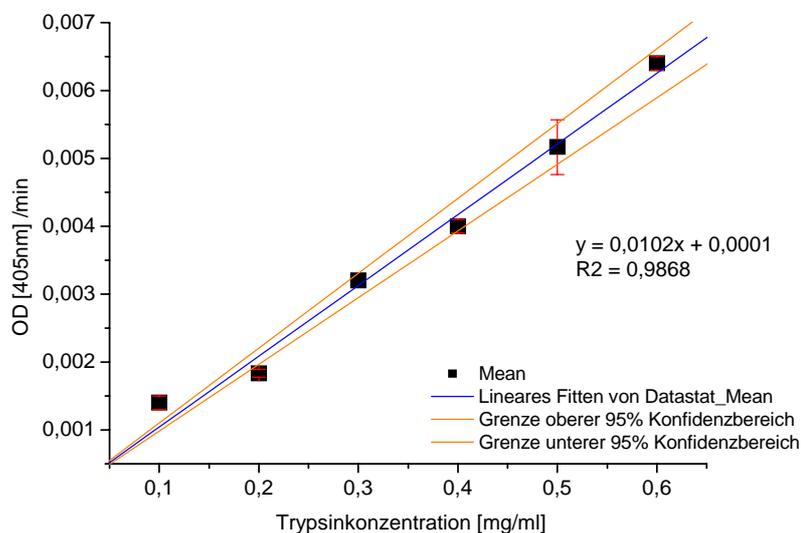


Abbildung 7-1: Kalibrierreihen für β-Galactosidase. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei Messungen (schwarze Kästchen) und ihre Standardabweichung. Die mittlere Linie stellt die Lineare Regression dar; die äußeren Linien geben das 95% Konfidenzintervall an.

## 7.3 Kalibrierreihen Trypsin

Trypsin : Ch.Bez. 094K0881



Trypsin: Ch.Bez. 094K0881

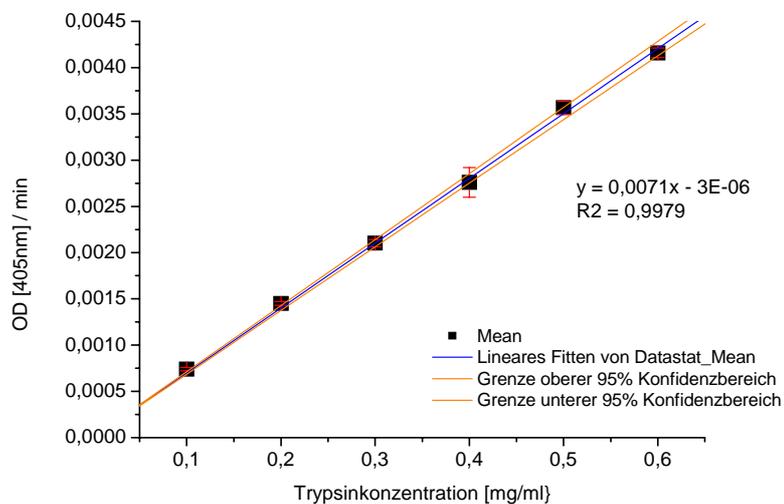


Abbildung 7-2: Kalibrierreihen für Trypsin. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei Messungen (schwarze Kästchen) und ihre Standardabweichung. Die mittlere Linie stellt die Lineare Regression dar; die äußeren Linien geben das 95% Konfidenzintervall an.

Trypsin :Ch.Bez. 094K0882

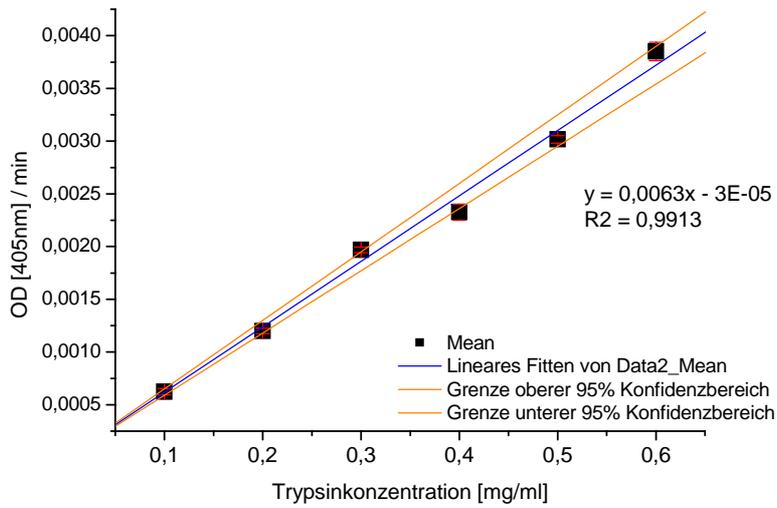


Abbildung 7-2: Kalibrierreihen für Trypsin. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei Messungen (schwarze Kästchen) und ihre Standardabweichung. Die mittlere Linie stellt die Lineare Regression dar; die äußeren Linien geben das 95% Konfidenzintervall an.

## 7.4 Laserbeugungsspektroskopie.

Die unten stehenden Diagramme stellen Summenverteilungen (schwarz) und volumenbezogene logarithmisch dargestellte Dichteverteilungskurven (grau) der zerstäubten Flüssigkeiten dar.

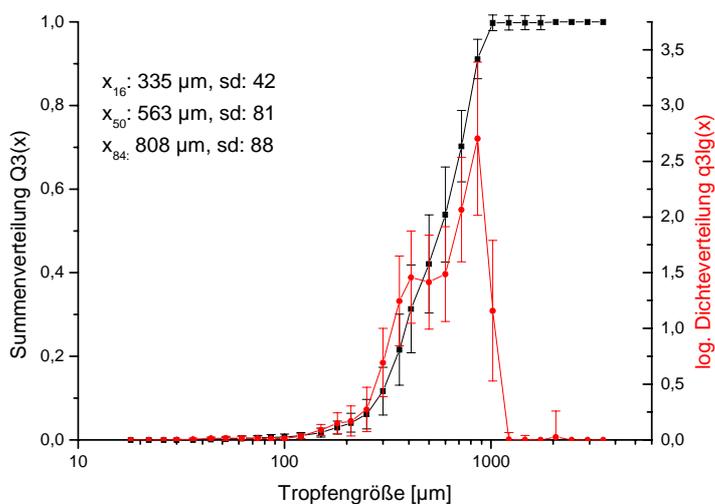


Abbildung 7-3: Tröpfchengrößenverteilung des Phosphatpuffers.

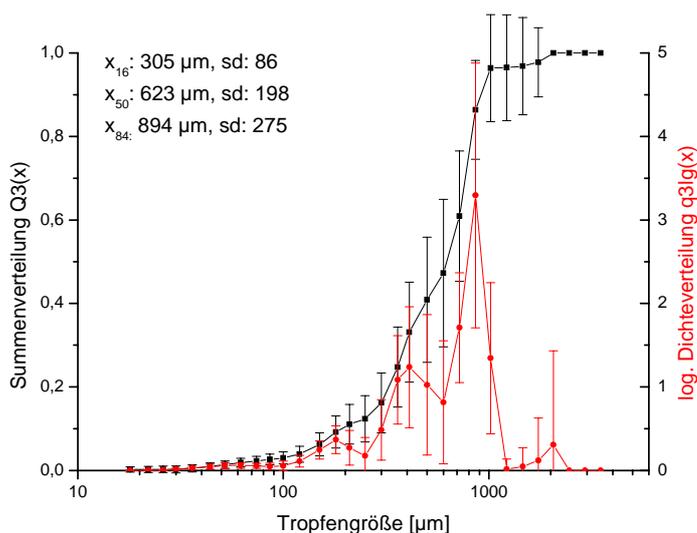


Abbildung 7-4: Tröpfchengrößenverteilung einer 0,5% Hypromellose-Lösung im Phosphatpuffer.

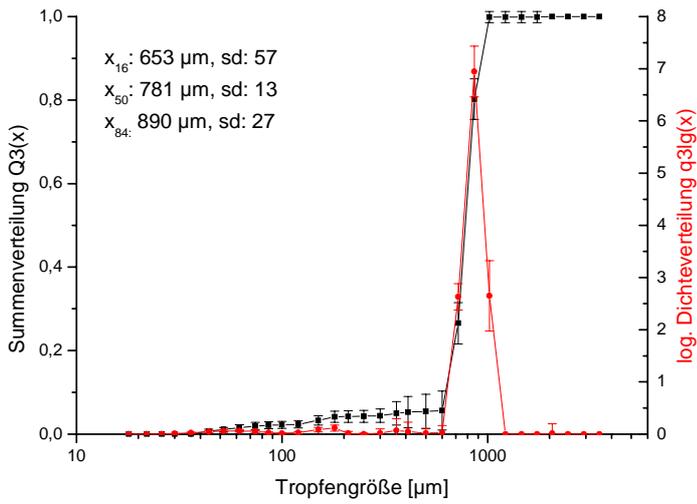


Abbildung 7-5: Tröpfchengrößenverteilung einer 1% Hypromellose-Lösung im Phosphatpuffer.

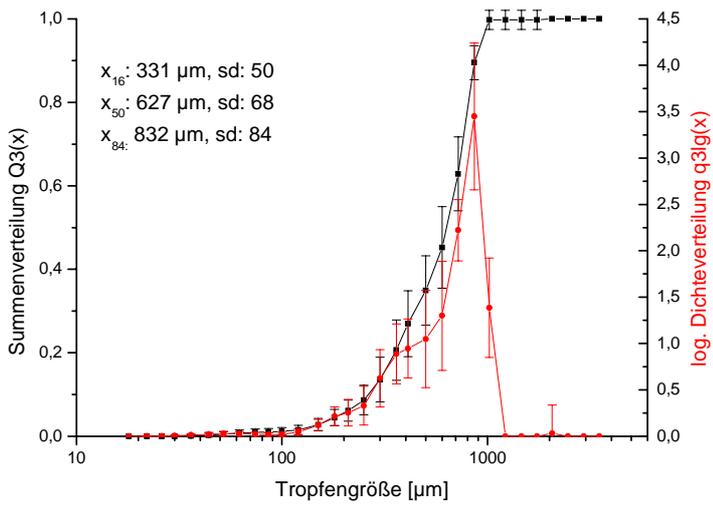


Abbildung 7-6: Tröpfchengrößenverteilung einer 5% Mannitol-Lösung im Phosphatpuffer.

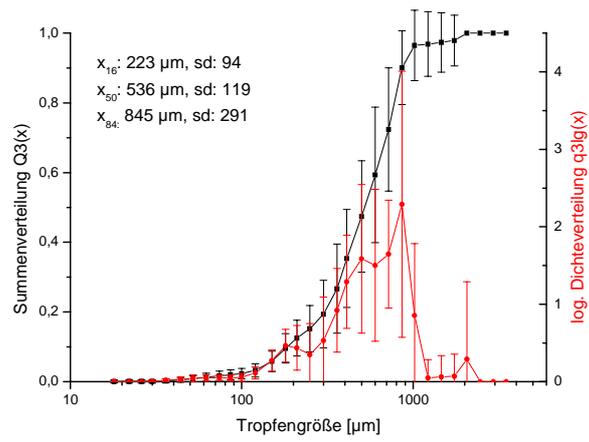


Abbildung 7-7: Tröpfchengrößenverteilung einer 10% Mannitol-Lösung im Phosphatpuffer.

---

# Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung:</b>	<b>Bedeutung:</b>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
bzw.	beziehungsweise
Da	Dalton
Flyo	Fingerlyophilisation
h	Stunden
HPMC	Hydroxypropylmethylcellulose
HSA	Humanes Serum Albumin
i.d.R.	in der Regel
I.E.	Internationale Einheiten
IgG	Immunglobulin G
kGT	konventionelle Gefriertrocknung
LN <sub>2</sub>	Flüssiger Stickstoff
Man.	Mannitol
Min.	Minuten
ml	Milliliter
MW	Mittelwert
o.g.	oben genannte
REM	Rasterelektronen Mikroskop
Std. Abw.	Standard Abweichung
TRIS (Tris)	Tris-(Hydroxymethyl-) Aminoethan
usw.	und so weiter
z.B.	zum Beispiel
Ziff.	Ziffer / Bezifferung

---

## Literaturverzeichnis

- [01] Anchordoquy, T.J., Carpenter, J.F. "Polymers protect LDH during freeze-drying by inhibiting dissociation in the frozen state" Arch. Biochem. Biophys. 332, S. 231-238, 1996
- [02] Atiaksheva L. F., Pilipenko O.S., Poltorak O. M. "Mechanism of the thermoinactivation of the  $\beta$ - Galactosidase from E. Coli" Biocatalysis 2000: Fundamentals & Applications Vol. 41. No. 6. Suppl. S. 95-96, 2000
- [03] Banga, K. A. „Therapeutic Peptides and Proteins, Formulation, Processing and Delivery Systems“ Second Edition, CRC Press Taylor and Francis Group, 2006
- [04] Betz A. „Enzyme-Gewinnung Analyse Regulation“, Verlag Chemie GmbH, 1974
- [05] Buddecke „Grundriss der Biochemie für Studierende der Medizin Zahnmedizin und Naturwissenschaften“, Walter de Gruyter, Berlin, New York, 9. Auflage, 1994
- [06] Bauer K.H., Frömming K.H., Führer C. „Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie“, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 7. Auflage, 2002
- [07] Brülls M., Rasmuson A. "Heat Transfer in Vial Lyophilization." Journal of Pharmaceutics; Vol. 246 S.1-16, 2002
- [08] Cannon A.J., Trappler E.H., „The Influence of Lyophilization on the Polymorphic Behavior of Mannitol“ PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology Research Article Vol. 54 No.1, S. 13-22, Jan-Feb. 2000
- [09] Carpenter J.F., Crowe J.H. "An Infrared Spectroscopic Study of the Interaction of Carbohydrates with Dried Proteins." Biochemistry 28, S. 3916-3922, 1989

- 
- [10] Carpenter, J. F., Prestrelski, S. J., Arakawa, T. "Separation of Freezing-and Drying-Induced Denaturation of Lyophilized Proteins using Stress-Specific Stabilization". Archives of Biochemistry and Biophysics. 303, S. 456-464, 1993
- [11] Carpenter J.F., Prestrelski S.J., Anchordoguy T.J., Arakawa T. „Interaction of Stabilizers with Proteins During Freezing and Drying“ School of Pharmacy, University of Colorado Health Sciences Center, Denver CO 80262; Amgen, Inc., Amgen Center, Thousand Oaks, CA 91320; Chapter 9, S. 134-147, 1994
- [12] Cavatur R. K., Vemuri Murti N., Pyne A., Chrzan Z., Toledo-Valasquez D., Sury-anarayanan R. „Crystallization behavior of mannitol in frozen aqueous solution“ Pharm. Res. Vol. 10 No. 6, S. 894-900, June 2002
- [13] Constantino H.R., Andya J.D., Nguyen P-A., Dasovich N., Sweeney T.D., Shire S.J., Hsu C.C., Maa Y-F. "Effect of crystallization on the stability and aerosol performance of a spray dried pharmaceutical protein, recombinant humanized Anti-IgE Monoclonal Antibody" Journal of Pharm. Sciences Vol. 87, No.11, S. 1406-1410, Nov. 1998
- [14] Craig Randall H., Dobson Rd., Chandler A.Z., "Cryogenic freezing of liquids", United States Patent 6,381,967 B1, Mai 2002
- [15] Chang B.S., Kendrick B.S., Carpenter J.F. „Surface-induced denaturation of proteins during freezing and its inhibition by surfactants" J.Pharm. Sci. 85, Nr. 12, S. 1325-1330, 1996
- [16] DIN 66141 „Darstellung von Korn-(Teilchen-) Größenverteilungen Grundlagen“, Beuth Verlag GmbH Berlin ,1974
- [17] Eckhardt, B. „Lyophilisation von niedermolekularen Substanzen, Peptiden und Proteinen“ aus Essig D., Oschmann R. "Lyophilisation" Ein Seminar der APV November 1992 in Würzburg, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, S.103-116, 1993
- [18] Ehrenstein G., Riedel G., Trawiel P. „Praxis der Thermischen Analyse von Kunststoffen“, Carl Hansa Verlag, 2. Auflage, 2003

- 
- [19] Elias, H.S. „Makromoleküle, Struktur-Eigenschaften-Synthesen, Stoffe-Technologie“ Hüthig & Wepf Verlag, Basel, Heidelberg, New York, S. 352-354, 1981
- [20] Eriksson, J.H.C., Hinrichs, W.L. J., de Jong G.J., Somsen, G. W., Frijlink, H. W. „Investigations into the stabilization of drugs by sugar glasses: III. The influence of various high-pH buffers“ *Pharmaceutical Research*, Vol. 20, No. 9, Sept. 2003
- [21] Essig D., Oschmann R. „Lyophilisation“ Ein Seminar der APV November 1992 in Würzburg, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1993
- [22] Europäisches Arzneibuch 2005, Kap. 2.2.3.4. „Thermoanalyse“ Ph.Eu.5 Grundwerk 2005
- [23] Fix I. „Anwendungen der quantitativen Röntgendiffraktometrie (QXRD) in der pharmazeutischen Analytik“ Dissertation, Bonn 2004
- [24] Gabert V.M., Jensen M.S. „ A Comparison of Two Methods to Measure Amylase, Lipase, Trypsin, and Chymotrypsin Activity and the Effect of Freezing and Thawing on Enzyme Activities in Pancreatic Juice“ *Pancreas*, Vol. 15, No. 2, S. 183, 1997
- [25] Gesellschaft für Mucopolysaccharidosen e.V, Informationsblatt „MPS eine fast unbekannte Krankheit“, Aschaffenburg 2003
- [26] Gieseler, H. Seminarunterlagen „Gefriertrocknung in der Praxis“ Erlangen Seminar 2006, „Formulierung I, Amorph versus kristallin“ und „Prozessentwicklung und Optimierung“
- [27] Gloger O. „Stabilisierung von rekombinanten Mistellektinen durch Gefriertrocknung“ Dissertation, Kiel 2002
- [28] Gölker Ch. „Gefriertrocknung biotechnologischer Produkte“ *Technol. J.* 10, S. 30-40, 1989
- [29] Graberg von, S. Seminarunterlagen „Gefriertrocknung in der Praxis“ Erlangen Seminar 2006, „Grundlagen der Gefriertrocknung“

- 
- [30] Hawe A., Frieß W. "Impact of freezing procedure and annealing on the physico-chemical properties and the formation of mannitol hydrate in mannitol – sucrose – NaCl formulations" *European Journal of Pharm. And Biopharm.* 64, S. 316-325, 2006
- [31] Hunnius, *Pharmazeutisches Wörterbuch*, Walter de Gruyter, Berlin, New York 1998, 8. Auflage, 1998
- [32] Hurwitz A., Michelucci J., Krupcy J., „Method of producing multicon-tent lyophilized product. “ *United States Patent 4,351,158*, September 1982
- [33] ICH Guideline Q5C "Stability Testing of Biotechnological/ Biological Products", 1995
- [34] ICH Guideline Q1Ar "Stability Testing of New Drug Substances and Products", 1999
- [35] ICH Guideline Q6B "Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/ Biological Products", 1999
- [36] Izutzu, K., Yoshioka, S. Terao, T. „, Effect of mannitol crystallinity on the stabilization of enzymes during freeze-drying" *Chem. Pharm. Bull.* 42, S. 5-8, 1994
- [37] Jennings T.A. „Lyophilisation: Introduction and Basic Principles" Den-ver, Colorado, USA: Interpharm Press; 1999
- [38] Jiang S., Nail S.L. „Effect of process condition on recovery of protein activity after freezing and freeze-drying. “ *Europ. J. Pharm* 45, S. 249-257, 1998
- [39] JMP Version 5. SAS Instiut Inc. Cary, NC, 1998-2002
- [40] Kramer M. „Innovatives Einfrierverfahren zur Minimierung der Pro-zesszeit von Gefriertrocknungszyklen“, *Dissertation Erlangen-Nürnberg*, 1999
- [41] Krasichkova O. „Trägerlyophilisate für die Augenheilkunde“ *Disserta-tion Bonn*, 2006
- [42] Krischner H., „Einführung in die Röntgenfeinstrukturanalyse“, *Vieweg Verlag*, 4. Auflage, 1990

- 
- [43] Kruss B. „Prozess-Parameter und ihre Auswirkungen auf die Produktqualität“ aus Essig D., Oschmann R. „Lyophilisation“ Ein Seminar der APV November 1992 in Würzburg, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, S. 85-101, 1993
- [44] Labeit S., Kolmerer B., Linke W. A. „The Giant Protein Titin“, Circ. Res. 80, S. 290-294, 1997
- [45] Lai M.C., Topp E.M. „Solid-State Chemical Stability of Protein and Peptides“; Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 88, Nr. 5 S. 489-500, Mai 1999
- [46] Lee, G. Seminarunterlagen „Gefriertrocknung in der Praxis“ Erlangen 2006, „Formulierung II: Proteine und Peptide“
- [47] List P.H., Schmidt P.C. „Technologie Pflanzlicher Arzneizubereitungen“. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; Stuttgart, 1984
- [48] List P.H. „Arzneiformenlehre“ Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft 4. Auflage S. 204-206, 1985
- [49] Lueker, B., Bodmer, D., Helk, B., Leuenberger H. „Formulation of sugars with amino acids or mannitol-influence of concentration ratio on the properties of the freeze-concentrate and the lyophilizate“ Pharm. Development and Technology, 3(3), S. 325-336, 1998
- [50] Maier S. „Entwicklung eines Mini-Gefriertrockners“ Dissertation Bonn 2003
- [51] Makkink C.A., van der Westerlaken LAJ, den Hartog L. A., van Baak M.J., Huisman J. „Storage of porcine pancreatic juice: effect on enzyme activities.“ J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 63, S. 267-272, 1990
- [52] Meister E., Seminarunterlagen „Gefriertrocknung in der Praxis“ Erlangen Seminar 2006, „Gefriertrocknungsmikroskopie – Bestimmung der Kollapstemperatur“
- [53] Millqvist-Fureby A., Malmsen M., Bergenstahl B. „ Spray-drying of trypsin – surface characterisation and activity preservation“ Int. J. of Pharm. Vol. 188, S. 243-253, 1999

- 
- [54] Müller R.H., Schuhmann R. "Teilchengrößenmessungen in der Laborpraxis" Wiss. Verlagsgesellschaft 1998
- [55] Murgatroyd K. „The Freeze Drying Process”, in Cameron P. Good Pharmaceutical Freeze-Drying Practice. Buffalo Grove, IL USA: Inerpharm Press, Inc.; 1997
- [56] Nail S.L. "Effect of pressure on heat transfer in the freeze-drying of parenteral solutions." Journal of the Parenteral Drug Association, Vol. 34 (5), S. 358-368, 1980
- [57] Oetjen GW. „Gefriertrocknen“. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1997
- [58] Origin 7G SR 2 v7. 0394 (B394), Origin Lab Corporation 1991-2002
- [59] PDF 2 Datenbank aus X´Pert Highscore<sup>®</sup> der Firma PANalytical
- [60] Petsko G.A., Ringe D. "Protein Structure and Function", New Science Press Ltd 2004 aus Protein Structure and Function, 2004
- [61] Pikal M.J., Roy M.L., Saroj S. „Mass and heat transfer in vial freeze drying of pharmaceuticals: role of the vial" J.of Pharm. Sci. Vol 73, No.9, S. 1224-1237, Sept. 1984
- [62] Pikal M.J. "Use of laboratory data in freeze drying process design: heat and mass transfer coefficients and the computer simulation of freeze drying" Journal of Parenteral Science and Technology 39 (3), 1985
- [63] Pikal, M.J., Dellermann K.M., Roy M.L., Riggin, R.M. "The effect of formulation variables on the stability for freeze-dried Human Growth Hormone" Pharm. Res. 8, S.427-436, 1991
- [64] Pikal M.J. "Freeze Drying" in: Swabrick J., Boylan JC. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. Volume 6. New York: Marcel Dekker, Inc.; 275-303, 1992
- [65] Pikal M.J. "Freeze drying of proteins - process, formulation and stability" aus dem Buch Formulation and Delivery of Proteins and Peptides, ACS Symposium Series 567, Washington DC, 1994

- 
- [66] Pikal-Cleland K.A., Rodriguez-Hornedo N., Amidon G.L, Carpenter J.F., "Protein denaturation during freezing and thawing in phosphate buffer systems: monomeric and tetrameric  $\beta$ -Galactosidase" Archives of Biochemistry and Biophysics, Vol 34, No. 2, S. 398-406, 2000
- [67] Prestrelski, S. J., Arakawa, T., Carpenter, J. F. „Separation of freezing- and drying-induced denaturation of lyophilized proteins using stress-specific stabilization". Archives of Biochemistry and Biophysics. 303, S. 465-473, 1993
- [68] „Psyhyrembel, Klinisches Wörterbuch“, 257 Auflage, Walter de Gruyter, Berlin, New York 1994
- [69] Rein H. Vorlesungsskript „Medizinprodukte“ Teil 2, Pharmazeutische Technologie - Universität Bonn, 2005
- [70] Rein H. „Thermogravimetrie“, DAZ 45, November 2005
- [71] Richter T. "Zerstäuben von Flüssigkeiten" Düsen und Zerstäuber in Theorie und Praxis, Excelsior Verlag, 2004
- [72] Rote Liste® 2005, Arzneimittelverzeichnis des BPI, VFA, BAH und VAP, Hrsg. Rote Liste® Service GmbH, Editio Cantor Verlag, Frankfurt, 2005
- [73] Roth C. „Ein Mikro-Waagen Verfahren zur Kontinuierlichen Bestimmung der Sublimationsgeschwindigkeit während der Gefriertrocknung“ Dissertation Erlangen Nürnberg 2000
- [74] Roth C. Seminarunterlagen „Gefriertrocknung in der Praxis“ Erlangen Seminar 2006 „Industrielle Gefriertrocknung: Herstellung von Lyophilisaten in Vials, Spritzen- und Karpulensystemen“ Vetter Pharmafertigung GmbH & Co.KG
- [75] Römpp –Lexikon der Biotechnologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart , New York, 1992
- [76] Rupprecht, H. "Physikalisch-chemische Grundlagen der Gefriertrocknung" aus Essig D., Oschmann R. "Lyophilisation" Ein Seminar der APV November 1992 in Würzburg, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, S. 13-37, 1993,

- 
- [77] Thornton J.M., Barlow D.J. "Peptide and Protein Structure" aus Hider R.C., Barlow D. Polypeptide and Protein Drugs, Ellis Horwood Limited, PO19 1EB, England, 1991
- [78] Tiamsheff S.N. "Control of protein stability and reactions by weakly interacting cosolvents: the simplicity of the complicated." Adv. Prot.Chem. 51, S. 355-432., 1998
- [79] URL <http://darwin.bth.rwth-aachen.de/opus3/volltexte/2005/1193> Mavittuna A. M. „Production of Recombinant Human Serum Albumin in Transgenic Plants and Plant Cells“
- [80] URL [www.vfa.de](http://www.vfa.de) „Gentechnisch hergestellte Wirkstoffe auf dem Weltmarkt“ Verband Forschender Arzneimittelhersteller [www.vfa.de](http://www.vfa.de) [Stand: 08.12. 2005]
- [81] URL: <http://www.medizindialog.com> [Stand: 01.12.2005]
- [82] URL [http://www.Sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com),  $\beta$ -Galactosidase Sigma Product-information 2004,
- [83] URL <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=2PBG> [Stand: 25.01.2007] Struktur von  $\beta$ -Galactosidase
- [84] URL [http://www.Sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com); Trypsin Sigma Productinformation 2005,
- [85] URL <http://www.dccv.de> [Stand: 25.06.2005]: (DCCV)
- [86] URL <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=2BLV> [Stand: 25.01.2007] ; Struktur von Trypsin
- [87] URL <http://www.herc.com> [Stand: 15.08.2005]
- [88] URL <http://www.setylose.de> [Stand 26.06.2007]
- [89] URL <http://www.moerike-g.es.bw.schule.de/forschung-lotus/methods/Rasterelektronenmikroskop> [Stand 23.11.2005]

- 
- [90] URL:  
[http://www.thueringen.de/de/lka/wissenschaft/kriminaltechnik/uc3/u\\_start.html](http://www.thueringen.de/de/lka/wissenschaft/kriminaltechnik/uc3/u_start.html) [Stand ;25.11.2005]
- [91] URL: [http://www.vfa.de/de/forschung/amf/amf\\_wirkstoffe.html](http://www.vfa.de/de/forschung/amf/amf_wirkstoffe.html) Verband Forschender Arzneimittelhersteller „Das Spektrum erweitern: Neue Wirkstoffe“ [Stand: 08.12.2005]
- [92] URL: <http://www.vfa.de/de/wirtschaft/statflashes/statflash002.html> Verband Forschender Arzneimittelhersteller „Gentechnisch hergestellte Wirkstoffe auf dem Weltmarkt“ [Stand: 08.12.2005]
- [93] URL: <http://www.wolff-cellulosics.de> [Stand: 15.08.2005]
- [94] Vian, A.V. Carrascosa, J.L. Garcia, E. Cortes „Structure of the  $\beta$ -Galactosidase gene from *Thermus* sp. Strain T2 expression in *E. coli* and purification in a single step of an active fusion protein“ ; Applied and Environmental Microbiology, S. 2187-2191, Juni 1998
- [95] Webb, S.D., Cleland, J.L., Carpenter J.F., Randolph T.W. “A new mechanism for decreasing aggregation of recombinant human Interferon-Gamma by a surfactant: slowed dissolution of lyophilized formulations in a solution containing 0.03% Polysorbate 20.” J. Pharm. Sci. 91, Nr. 2, S. 543-558, 2002
- [96] Wogg H. „Stabilisierung von Wirkstoffen durch Gefriertrocknung, Lyophilisation aus nicht wässrigen Lösungen sowie Optimierung von Gefriertrocknungsprozessen“ aus Essig D. ,Oschmann R. “Lyophilisation” Ein Seminar der APV November 1992 in Würzburg, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1993
- [97] Wozniak, G. „Zerstäubungstechnik Prinzipien, Verfahren, Geräte“ Springer Verlag, 2003
- [98] Zuber H. „Lyophilisationszyklus, Mess-und Steuerungsmöglichkeiten“ aus Essig D. ,Oschmann R. “Lyophilisation” Ein Seminar der APV November 1992 in Würzburg, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, S. 61-72, 1993
- [99] Zöffel P. „Statistik verstehen- Ein Begleitbuch zur computergestützten Anwendung“ Addison-Wesley Verlag, München 2002

# Lebenslauf

**Anna Maria Grimm geb. Skorupa**

## PERSÖNLICHE DATEN

Geburtsdatum, -ort 17.04.1975, Katowice (Polen)

Familienstand verheiratet

## SCHULBILDUNG

Septemer 1982- Juni 1990 Einschulung in die Grundschule Nr. 8 in Katowice

August 1990 - Juni 1995 Jung-Stilling-Gymnasium in Hilchenbach mit dem Abschluss Abitur

## HOCHSCHULSTUDIUM/ AUSBILDUNG

1996-2001 Studium der Pharmazie an der Rheinischen Friedrich Wilhelms Universität in Bonn

August 2002 Approbation als Apothekerin

Oktober 2000 - September 2001  
1. Halbjahr: Rheincenter Apotheke in Köln Weiden  
2. Halbjahr: Diplom in der pharmazeutischen Technologie der Universität Bonn

## BERUFSTAETIGKEIT

Seit Juni 2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Pharmazeutische Technologie, Universität Bonn

## PROMOTION

Seit Januar 2001 Institut für Pharmazeutische Technologie, Universität Bonn, Herr Professor Dr. Richard Süverkrüp

## Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich meine Dissertation ohne fremde Hilfe selbständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen habe ich unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Köln, 02.01.2008

---

Anna Maria Grimm