



**MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT, HALLE-WITTENBERG**

**UNTERSUCHUNGEN ZUR STERILISATION VON  
BIOABBAUBAREN DEPOT-INJEKTIONSFORMEN**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der  
Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Biowissenschaften  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von  
Manuela Pfeifer  
geboren am 05. März 1973 in Zeulenroda

Gutachter:

1. Prof. Dr. Karsten Mäder
2. Prof. Dr. Reinhard Neubert
3. Prof. Dr. Michaela Schulz-Siegmund

Halle (Saale), den 08.04.2010

**Meiner Familie gewidmet**

Die vorliegende Arbeit entstand auf Anregung und unter Leitung von

Frau Dr. Sabine Fricke

in der Abteilung Pharmazeutische Entwicklung der Jenapharm GmbH & Co. KG in Zusammenarbeit mit dem Institutsbereich Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Meiner Mentorin, Frau Dr. Sabine Fricke, gilt mein besonderer Dank für die Unterstützung bei der Realisierung dieser Arbeit, die vielen anregenden Diskussionen und Ideen und die Motivation zur wissenschaftlichen Arbeit im Tagesgeschäft.

Mein weiterer Dank gilt meinem Betreuer an der Martin-Luther-Universität, Herrn Prof. Karsten Mäder, der durch seine Geduld, die ständige Bereitschaft zur Diskussion und Kooperation zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen hat.

Der Firma Jenapharm GmbH & Co. KG danke ich für die Unterstützung über den langen Zeitraum. Bedanken möchte ich mich ferner bei allen Mitarbeitern der Pharmazeutischen Entwicklung, insbesondere Herrn Ralf Ladwig, Frau Petra Zielke und Frau Kathrin Hennig, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und mich während der gesamten Zeit mit Rat und Tat und aufmunternden Worten unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt weiterhin:

- Herrn Prof. H. Ludwig für die Gelegenheit Hochdruckbehandlungen am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Universität Heidelberg durchzuführen.
- Frau Michaela Köhler, Jenahexal Jena, für die gute Zusammenarbeit und die Ausführung der mikrobiologischen Untersuchungen.
- Frau Annette Eichardt, Schering GmbH und Co. Produktions KG, für die Ausführung der Partikelgrößenanalyse.

Ich bedanke mich last but not least bei meiner ganzen Familie und meinen Freunden, die mir den Rücken freigehalten haben und mich auf meinem Weg bestärkten.

Manuela Pfeifer

Jena, Oktober 2009

**UNTERSUCHUNGEN ZUR STERILISATION VON  
BIOABBAUBAREN DEPOT-INJEKTIONSFORMEN**

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>IV</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 BIOABBAUBARE POLYMERE UND DEREN DEPOTINJEKTIONSFORMEN .....	1
1.1.1 Bioabbaubare Polymere .....	1
1.1.2 Parenterale Depotformulierungen .....	4
1.2 STERILISATIONSVERFAHREN .....	11
1.2.1 Standard-Sterilisationsverfahren .....	13
1.2.1.1 Dampfsterilisation .....	13
1.2.1.2 Heißluftsterilisation .....	14
1.2.1.3 Strahlensterilisation .....	14
1.2.1.4 Sterilisation mit mikrobiziden Gasen (Ethylenoxid).....	15
1.2.1.5 Filtration durch bakterienzurückhaltende Filter .....	15
1.2.1.6 Aseptische Herstellung .....	16
1.2.2 Alternative Sterilisationsverfahren .....	16
1.2.2.1 Mikrowellenbehandlung .....	17
1.2.2.2 Hochdruckinaktivierung .....	18
1.3 ZIEL DER ARBEIT .....	19
<b>2 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>21</b>
2.1 MATERIALIEN .....	21
2.1.1 Poly(laktide) (PLA), Poly(laktid-co-glykolid) (PLGA) .....	21
2.1.2 Weitere Rezepturbestandteile .....	21
2.1.3 Sonstige Substanzen.....	22
2.2 REZEPTUR UND HERSTELLUNG DER IN SITU FORMULIERUNG .....	22
2.3 METHODEN ZUR CHARAKTERISIERUNG DER RESOMERE® .....	23
2.3.1 Bestimmung der Säurezahl .....	23
2.3.2 Bestimmung der Molmassen und der -verteilung .....	25
2.3.3 Bestimmung der inhärenten Viskosität .....	25
2.3.4 Bestimmung der Glasübergangstemperatur .....	27
2.4 METHODEN ZUR CHARAKTERISIERUNG VON CcC .....	28
2.4.1 UV-VIS-spektralphotometrische Bestimmung von CcC .....	28
2.4.2 HPLC-Methode zur Bestimmung von CcC .....	29
2.4.3 Untersuchung der Stabilität von CcC in wässrigen Lösungen .....	31
2.4.4 Untersuchung der Adsorption von CcC an der Polymeroberfläche .....	33
2.4.5 CcC-Stabilitätsuntersuchung .....	34
2.4.6 Extraktion von CcC aus der Resomer®-Formulierung .....	35
2.5 METHODEN ZUR CHARAKTERISIERUNG DER DEPOTFORMULIERUNG .....	36
2.5.1 Bestimmung der PEG-Abflutung.....	36
2.5.2 Freisetzungsuntersuchung .....	37
2.6 STERILISATIONSVERFAHREN .....	38
2.6.1 Verfahren und Geräte .....	38
2.6.2 Prüfung auf Sterilität .....	42
2.6.3 Partikelgrößenanalyse .....	42
<b>3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>	<b>43</b>
3.1 DIE MODELLFORMULIERUNG: IN SITU IMPLANTAT .....	43
3.1.1 Beschreibung der Modellformulierung .....	43
3.1.2 Die Modells substanz Cytochrom C .....	44

3.1.3 Auswahl der Polymermatrix (verwendete Polymere).....	45
3.1.4 Herstellung einer in situ Formulierung .....	46
3.2 UNTERSUCHUNGEN ZUR CHARAKTERISIERUNG DES MODELLS .....	48
3.2.1 Methoden zur Charakterisierung der Resomere® .....	48
3.2.1.1 Bestimmung der Säurezahl .....	48
3.2.1.2 Bestimmung der Molmassen und -verteilung .....	49
3.2.1.3 Bestimmung der inhärenten Viskosität .....	50
3.2.1.4 Bestimmung der thermischen Eigenschaften .....	50
3.2.2 Charakterisierung der Modellformulierung.....	51
3.2.2.1 Stabilität der Resomere® in der Modellformulierung.....	51
3.2.2.2 Untersuchung der Formulierungen in Abhängigkeit vom Polymeranteil.....	53
3.2.3 Charakterisierung der Modellsubstanz CcC .....	56
3.2.3.1 Stabilität von CcC in wässrigen Lösungen .....	56
3.2.3.2 Stabilität von CcC in der Resomer®-Formulierung .....	61
3.2.3.3 Untersuchungen zur Lagerstabilität von CcC in der Modell- formulierung .....	64
3.2.4 Charakterisierung der finalen Modellformulierung .....	66
3.2.4.1 Vergleich der Methoden zur Bestimmung des Wirkstoffgehaltes .....	66
3.2.4.2 Vergleich der Freisetzungsmethoden .....	68
3.3 STERILISATION.....	70
3.3.1 Möglichkeiten zur Sterilisation einer Resomer®-Formulierung für ein in situ Implantat .....	70
3.3.2 Sterilisation mit Heißluft.....	74
3.3.2.1 Einfluss der Heißluftsterilisation auf die Säurezahl.....	75
3.3.2.2 Einfluss der Heißluftsterilisation auf die inhärente Viskosität.....	77
3.3.2.3 Einfluss der Heißluftsterilisation auf die Molmassen und -verteilung ...	77
3.3.2.4 Einfluss der Heißluftsterilisation auf die thermischen Eigenschaften ...	80
3.3.2.5 Einfluss der Heißluftsterilisation auf die Freisetzung .....	81
3.3.2.6 Untersuchung des Einflusses der Heißluftsterilisation auf physikochemische Eigenschaften der Resomere® in Abhängigkeit von Temperatur und Zeit.....	82
3.3.2.7 Untersuchung des Einflusses der Behandlung im Autoklaven auf physikochemische Eigenschaften der Resomere® .....	84
3.3.2.8 Diskussion und Schlussfolgerung.....	87
3.3.3 Strahlensterilisation .....	89
3.3.3.1 Einfluss der Strahlensterilisation auf die Säurezahl.....	89
3.3.3.2 Einfluss der Strahlensterilisation auf die inhärente Viskosität.....	91
3.3.3.3 Einfluss der Strahlensterilisation auf die Molmassen und -verteilung ...	91
3.3.3.4 Einfluss der Strahlensterilisation auf die Freisetzung .....	94
3.3.3.6 Diskussion und Schlussfolgerung.....	96
3.3.4 Mikrowellenbehandlung.....	97
3.3.4.1 Einfluss der Mikrowellenbehandlung auf die Säurezahl .....	99
3.3.4.2 Einfluss der Mikrowellenbehandlung auf die Molmassen und -verteilung.....	100
3.3.4.3 Einfluss der Mikrowellenbehandlung auf die Freisetzung.....	102
3.3.4.4 Prüfung der mikrowellenbehandelten Resomer®-Lösung auf Sterilität .....	105
3.3.5.5 Diskussion und Schlussfolgerungen.....	106
3.3.5 Hochdruckinaktivierung .....	109
3.3.5.1 Einfluss der Hochdruckinaktivierung auf die Säurezahl.....	110

---

3.3.5.2 Einfluss der Hochdruckinaktivierung auf die inhärente Viskosität.....	112
3.3.5.3 Einfluss der Hochdruckinaktivierung auf die Molmassen und -verteilung.....	113
3.3.5.4 Einfluss der Hochdruckinaktivierung auf die thermischen Eigenschaften.....	115
3.3.5.5 Einfluss der Hochdruckinaktivierung auf die Freisetzung .....	116
3.3.5.6 Untersuchungen zur Keimreduzierung und Prüfung auf Sterilität.....	118
3.3.5.7 Diskussion und Schlussfolgerungen.....	120
3.3.6 Stabilität von CcC unter dem Einfluss der Sterilisation.....	122
<b>4 ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSBETRACHTUNG.....</b>	<b>125</b>
<b>5 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>130</b>

## Abkürzungsverzeichnis

CcC	Cytochrom C
EMA	European Medicines Agency (Europäische Arzneimittelagentur)
GC	Gaschromatographie
GPC	Gelpermeationschromatographie
$\eta$	inhärente Viskosität
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
i.m.	intramuskulär
KS	Kühlschrank
$M_w$	gewichtsmittlere Molmasse
$M_n$	zahlenmittlere Molmasse
NDS	Natriumdodecylsulfat
PD	Polydispersität oder Molmassenverteilung
PEG	Polyethylenglykol
Ph. Eur.	Pharmacopoea Europaea (Europäisches Arzneibuch)
PLA	Poly(laktid)
PLGA	Poly(laktid-co-glykolid)
RI	Refractive Index (Brechungsindex)
RT	Raumtemperatur
s.c.	subcutan
SZ	Säurezahl
TBAH	Tetra-n-butylammoniumhydroxid
$T_g$	Glasübergangstemperatur
UV	Ultraviolett
UV-VIS	Ultraviolett-sichtbares (visible) Licht

# 1 Einleitung

## 1.1 Bioabbaubare Polymere und deren Depotinjektionsformen

### 1.1.1 Bioabbaubare Polymere

Eine Vielzahl von Polymeren natürlicher und synthetischer Herkunft wurde in den letzten Jahren zur Herstellung bioabbaubarer parenteraler Depotformulierungen entwickelt. In der Literatur sind detaillierte Übersichten zu den verfügbaren Polymeren zu finden <sup>1-4</sup>. Dabei werden unter bioabbaubaren Polymeren solche Materialien verstanden, die im Körper über einen Zeitraum von Wochen bis Monaten meist durch hydrolytischen Abbau und nachfolgende Metabolisierung eliminiert werden können. Der Begriff „bioabbaubar“ ist etwas missverständlich gewählt, da er eigentlich auf den beschleunigten Abbau von Polymeren durch Enzyme oder bakteriellen Einfluss anspielt <sup>2</sup>. Die verwendeten Materialien werden nach Implantation in den Körper zu nicht-toxischen Produkten abgebaut und resorbiert. Der Einsatz von bioabbaubaren Polymeren in parenteral anzuwendenden Depotformen hat den Vorteil, dass sich keine Reste an körperfremden, polymeren Trägern ansammeln neben der kontrollierten Arzneistofffreigabe.

Anfänglich wurden die bioabbaubaren Polymere in der Chirurgie als resorbierbare Nahtmaterialien, Klammern, Stifte eingesetzt <sup>2,5</sup>, später wurde ihre Eignung zur Herstellung von Arzneiformen mit kontrollierter Freigabe erkannt <sup>6,7</sup>. Diese Erkenntnis weckte das Interesse an der Anwendung dieser Materialien in der Pharmazie. Zahlreiche Untersuchungen wurden mit dem Ziel durchgeführt, die Anforderungen und Freigabepprofile solcher Arzneistoffsysteme besser erfüllen zu können <sup>8-11</sup>. In diesem Zusammenhang stieg auch das Interesse an neuartigen, resorbierbaren Polymeren. Dabei wurden natürlich vorkommende Polymere wie Albumine, Fibrine, Kollagene, Gelatine, Stärke oder Chitin diskutiert und untersucht <sup>12</sup>. Probleme, die bei solchen Verbindungen auftreten, sind zum Beispiel erhöhte Immunogenität, Biokompatibilität oder Schwankungen in Reinheit und Zusammensetzung. Die heute am häufigsten verwendeten biokompatiblen, bioabbaubaren Polymere zur Herstellung von parenteralen Depotformen sind die synthetischen Polymere, insbesondere die Polyester und Polyanhydride <sup>1</sup>. Es gibt aber auch Bestrebungen, Vertreter aus folgenden Polymer-Klassen als Matrix für parenterale Depotformen zu verwenden: Polyorthoester <sup>13,14</sup> und Polyphosphazene.

Bevorzugt untersucht wurden die kommerziell erhältlichen Polyester aus Milchsäure und Glykolsäure, die sich aufgrund verschiedener Eigenschaften wie der

breiten Palette an Anwendungsmöglichkeiten, der guten Biokompatibilität und geringen Toxizität als günstig erwiesen <sup>12</sup>. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Verwendung dieser Homo- und Copolymere.

**Poly(laktide) (PLA)** (Abb.1.1) sind Polyester des cyclischen Diesters der Milchsäure, dem Laktid, und werden über eine ringöffnende Polykondensation und den Einsatz von Katalysatoren hergestellt <sup>2,15,16</sup>. Milchsäure kommt in zwei verschiedenen optisch aktiven stereoisomeren Formen vor, weshalb drei verschiedene PLA sich bilden können: Poly-(L(-)-Laktid), Poly-(D(+)-Laktid) und das racemische optisch inaktive Poly-(D,L-Laktid) <sup>17</sup>. Diese drei Formen unterscheiden sich vor allem in ihrer Kristallinität, welche entscheidend die physikalischen Eigenschaften und somit auch das Abbauverhalten des Polymers bestimmt <sup>2</sup>. Aber auch das Molekulargewicht, die Viskosität und das Verhältnis zwischen Oberfläche und Volumen beeinflussen die Erosion.

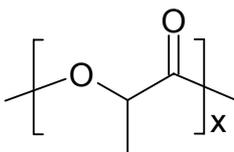


Abb. 1.1: chemische Strukturformel eines Poly(laktides)

Poly-(D,L-Laktide) mit einem 1/1 Verhältnis von D-Laktid zu L-Laktid sind vollständig amorph und bilden daher eine homogene Matrix aus, die eine gute Einarbeitung von Wirkstoffen ermöglichen <sup>18</sup>.

**Poly(laktid-co-glykolide) (PLGA)** (Abb. 1.2) entstehen durch Copolymerisation von unterschiedlichen Anteilen der beiden cyclischen Dimere Laktid und Glykolid in Anwesenheit eines Katalysators <sup>2,15</sup>. Für die physikochemischen Eigenschaften und das Abbauverhalten des Polymers sind neben den bereits genannten Eigenschaften auch das Monomerenverhältnis und die Anzahl gleichartiger aufeinander folgender Monomereinheiten von Bedeutung <sup>19</sup>.

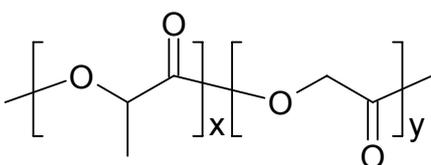


Abb. 1.2 chemische Strukturformel eines Poly(laktid-co-glykolides)

Milchsäure ist, bedingt durch die zusätzlichen Methylgruppen im Molekül, das hydrophobere Monomer. Mit abnehmender Konzentration des Milchsäureanteils im Copolymer wird daher die Hydrophilie erhöht und gleichzeitig die Abbaugeschwindigkeit beschleunigt <sup>19</sup>. Die schnellere Wirkstofffreisetzung ist durch

die bessere Wasseraufnahme der Matrix und die damit erleichterte Zugänglichkeit der hydrolyseempfindlichen Estergruppen bedingt<sup>19</sup>. Der Anteil der hydrophilen Komponente darf dabei nicht zu hoch gewählt werden, da sonst der retardierende Effekt zu gering ausgeprägt ist. Ein zu lipophiler Polymercharakter kann hingegen zur Denaturierung der eingebetteten Proteine führen<sup>12</sup>. In der Praxis haben sich bisher das Verhältnis Laktid zu Glykolid von 50/50 (Zoladex®) und 75/25 (Profact Depot®) als günstig erwiesen.

Die terminalen Carboxylgruppen der PLGA-Polymere können mit Alkoholen verestert (end-capped) oder als freie endständige Säuregruppen (non end-capped) vorliegen. Dabei sind die Polymere mit blockierten Endgruppen eher hydrophober Natur und meist hohen Molekulargewichts. Beide Eigenschaften bedingen einen langsamen Abbau, daher werden diese PLGA-Polymere eher für die diffusionskontrollierte Freigabe von Stoffen mit niedrigem Molekulargewicht eingesetzt<sup>18</sup>. Eine schnellere Wirkstofffreigabe kann durch die Verwendung hydrophiler und niedermolekularer PLGA-Derivate mit freien terminalen Gruppen erreicht werden. Die freien Carboxylgruppen führen zu einer raschen Wasseraufnahme und schnellerem Abbau<sup>20</sup>. Diese hydrophilen Polymere werden als Matrixbildner zur Freigabe von höhermolekularen Wirkstoffen wie Peptiden eingesetzt<sup>18</sup>.

### **1.1.2 Parenterale Depotformulierungen**

Unabhängig vom Applikationsweg kann die Verlängerung der Wirkungsdauer von Arzneimitteln nach unterschiedlichen Prinzipien erfolgen:

- auf chemischem Wege (schwerlösliche Wirkstoffderivate wie Ester, schwerlösliche Komplexe oder Salze, Molekülumbwandlungen),
- durch pharmazeutisch-technologische Maßnahmen (Wahl des Arzneiträgers, Art und Menge der Hilfsstoffe, Wahl der Umhüllung oder Einbettung)
- und durch Nutzung physiologischer bzw. pharmakologischer Möglichkeiten (Applikationsort bzw. -art, Gefäßkonstriktoren, Ausscheidungsblocker)<sup>21</sup>.

Die Wirkungsverlängerung durch pharmazeutisch-technologische Maßnahmen beruht im Wesentlichen auf einer Verzögerung der Wirkstofffreisetzung durch Verringerung der Lösungsgeschwindigkeit und/oder der Diffusionsgeschwindigkeit.

Für Depotformulierungen werden unterschiedliche Prinzipien, die einzeln oder kombiniert Anwendung finden, benutzt. Im Allgemeinen werden unter Depotarzneiformen solche Formen verstanden, deren verlängerte Wirkung auf einer allmählichen Freisetzung und Resorption aus einem Depot beruht. Implantate oder eine i.m. Applikation einer öligen Suspension sind parenterale Formulierungsbeispiele. Mit der Anwendung von herkömmlichen Implantaten werden Freisetzungszeiträume bis zu mehreren Jahren, z.B. Implanon<sup>®</sup>, erreicht, jedoch muss der Wirkstoffträger wieder operativ entfernt werden.

In jüngerer Vergangenheit sind parenterale Depotformulierungen, insbesondere solche, die auf polymeren bioabbaubaren Trägersystemen basieren, Gegenstand intensiver Forschungsaktivitäten gewesen. Ihren Ursprung fand die Entwicklung neuer Injektionspräparate mit verlängerter Arzneistofffreigabe in der wachsenden Anzahl an Wirkstoffen aus der biotechnologischen Forschung, wie beispielsweise Peptide und Proteine sowie gentherapeutische Arzneistoffe wie DNA. Diese Substanzen werden häufig als „Problemarnzeistoffe“ bezeichnet, denn sie werden aufgrund ihrer Aminosäurekettenstruktur bei oraler Gabe schon im Magen-Darm-Trakt abgebaut. Ein optimaler Einsatz dieser Arzneistoffe stellt durch kurze Plasmahalbwertszeiten, hohe Clearance-Raten und geringe orale Bioverfügbarkeit eine große Herausforderung an die Wahl der Formulierung dar. Mehrfache Injektionen pro Tag über einen längeren Zeitraum werden von vielen Patienten nicht akzeptiert. Für solche Wirkstoffe werden Trägersysteme benötigt, die eine kontrollierte Wirkstoffabgabe mit reproduzierbarem und vorbestimmtem Profil ermöglichen. Die parenteral anwendbaren Depotformen, die auf der Basis bioabbaubarer Polymere gründen, stellen ein mögliches Wirkstoff-Darreichungssystem dar. Mit der Entwicklung solcher Formulierungen wird das Ziel verfolgt, konstante Plasmaspiegel an Wirkstoffen (wie die problembehafteten Peptide und Proteine) über mehrere Wochen hinweg erreichen zu können. Das matrixbildende Polymer übernimmt dabei wichtige Funktionen wie die Kontrolle der Wirkstofffreigabegeschwindigkeit, den Schutz des Wirkstoffes vor chemischer und/oder enzymatischer Zersetzung oder den Abbau des Trägers. Hinsichtlich der Wirkstoffverteilung im Trägersystem lassen sich Reservoir-Systeme, bei denen der Arzneistoff vom Polymer umhüllt wird, von Matrixsystemen unterscheiden, bei denen der Arzneistoff als Dispersion oder in Form einer festen Lösung vorliegt<sup>10</sup>. Bei Reservoir-Systemen erfolgt die Freigabe des Wirkstoffes mittels Diffusion durch die

bioabbaubare, geschwindigkeitskontrollierende Membran. Bei Matrixsystemen wird die Freigabe des Arzneistoffes durch Diffusion und auch durch den Abbau der Polymermatrix gesteuert<sup>9,22</sup>. In Abhängigkeit von der Löslichkeit des Wirkstoffes im Polymer und der verwendeten Herstellungstechnologie lassen sich Reservoir- oder Matrix-Systeme herstellen<sup>10</sup>. Prinzipiell wird zwischen zwei parenteral anwendbaren Arzneiformen unterschieden, zu denen sich bioabbaubare Polymere verarbeiten lassen:

- Implantate, die aus einer Einheit bestehen und
- multipartikuläre Systeme.

Bei der Herstellung von Implantaten und multipartikulären Systemen kommen verschiedene Herstellungstechnologien zur Anwendung (Tab. 1.1)<sup>18</sup>.

Implantate sind kleine Formlinge, die mit Arzneistoff beladen sind. Sie sind häufig von zylindrischer Geometrie, wie z.B. feste Stäbchen oder kleine Tabletten, die durch einen kleinen chirurgischen Eingriff oder durch eine Fertigspritze subkutan appliziert werden wie beispielsweise Zoladex<sup>®</sup><sup>23</sup>.

Multipartikuläre Systeme sind häufiger unter dem Begriff Mikropartikel zu finden. Bei der Herstellung wird der Wirkstoff in Polymerpartikel von etwa 1 – 1000 µm Durchmesser eingebettet. Mikropartikel eignen sich zur subkutanen und intramuskulären Applikation. Unter Mikropartikel werden Mikrokapseln, bei denen feine Wirkstoffpartikel mit einem Polymer umhüllt sind, und Mikrosphärulen, in denen der Arzneistoff in der Polymermatrix gelöst oder dispergiert vorliegt, subsumiert<sup>10</sup>.

Tab.: 1.1 Übersicht zu bioabbaubaren Depotformulierungen und ihrer Herstellungstechnologien

Depot-formulierung	Herstellungstechnologie	Bemerkungen	Anwendungsbeispiele
Implantat	Extrusion <sup>24,25</sup>	- mittels Schneckenextruder - Polymerschmelzen – höhere Temperaturen erforderlich, Stabilität der Polymere, Wirkstoffe <sup>26,27</sup> - s.c. Injektion unter die Bauchhaut, Fremdkörpergefühl	Zoladex <sup>®23</sup> Profact <sup>®</sup> Depot <sup>12</sup> Leupro <sup>®</sup> HEXAL <sup>®</sup> Leupro-Sandoz <sup>®</sup>
	Verpressen <sup>28</sup>	- Herstellen von Mikrokapseln, dann tablettieren, technologisch aufwendig - Restlösungsmittelgehalt	
	Filmen <sup>29</sup>	- Sedimentation und ungleichmäßige Verteilung des Wirkstoffes durch lange Aushärtungsphase	
	In situ Formung <sup>30,31</sup>	- In situ Inkorporation des Wirkstoffes durch Ausfällung (Immobilisierung) der Polymer-Lösung oder -Suspension - parenteral applizierbare Lösungsmittel erforderlich wie PEG 400 <sup>32</sup> , Glycofurol <sup>33</sup> , Dimethylsulfoxid <sup>34</sup> , N-Methylpyrrolidon <sup>35</sup> - direkt an den Wirkungsort applizierbar	Atrigel <sup>® 36,37</sup> Eligard <sup>®</sup> Atridox <sup>®</sup>

Tab.1.1: Fortsetzung

Depot-formulierung	Herstellungstechnologie	Bemerkungen	Anwendungsbeispiele
Mikropartikel	Sprühtrocknung <sup>38-40</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Versprühen einer Polymerlösung, in welcher der Wirkstoff gelöst oder suspendiert wird, in einem heißem Luftstrom <sup>41</sup></li> <li>- kontinuierlicher und technologisch ausgereifter Prozess, gute Reproduzierbarkeit</li> <li>- Nachteil: thermische Belastung des Polymers und des Wirkstoffes, polymorphe Zustände des Wirkstoffes</li> </ul>	Suprecur MP <sup>®</sup> <sup>42</sup>
	Phasenseparation (Koazervation) <sup>43,44</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Induktion einer Polymer-Koazervation auf dem Wirkstoff durch Zugabe eines Phasenseparators zur Dispersion oder Emulsion des Wirkstoffes in einer organischen Polymerlösung</li> <li>- Nachteil: hoher Restlösungsmittelgehalt <sup>41</sup></li> </ul>	Decapeptyl LP <sup>®</sup> <sup>42</sup>
	W/O/W-Emulsion	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Emulsion aus wässriger Wirkstofflösung und organischen Polymerlösung, Koazervation des Polymers durch Zugabe der Emulsion in eine damit nicht-mischbare, äußere Phase, Verdampfung oder Extraktion des Lösungsmittels</li> <li>- Nachteil: komplexes Verfahren <sup>45,46</sup>, hoher Restlösungsmittelgehalt</li> </ul>	Lupron Depot <sup>®</sup> <sup>42</sup> Enantone Monats-Depot <sup>®</sup>
	Schmelzverkapselung <sup>47</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Wirkstoff in eine Polymerschmelze einmischen, Mischung in einem nicht-mischbaren Lösungsmittel dispergieren, abkühlen, waschen mit geeignetem Lösungsmittel <sup>48</sup></li> <li>- Nachteil: thermische Belastung, Auskristallisieren des Wirkstoffes <sup>49</sup></li> </ul>	

Tab.1.1: Fortsetzung

Depot-formulierung	Herstellungs-technologie	Bemerkungen	Anwendungsbeispiele
Mikropartikel	Anwendung überkritischer Gase <sup>50</sup>	<ul style="list-style-type: none"><li>- zwei Verfahren: RESS (= Rapid Expansion of Supercritical Solutions) und ASES (= Aerosol Solvent Extraction System)<sup>51,52</sup></li><li>- ASES nutzt die Extraktionseigenschaft überkritischer Gase (häufig genutzt: CO<sub>2</sub>); Polymerlösung, in welcher der Wirkstoff gelöst oder suspendiert wird, wird in die überkritische Gasphase gesprüht, das Lösungsmittel ist löslich im Gas und wird extrahiert, ausfällen des Polymers</li><li>- Nachteil: Agglomeratbildung<sup>53</sup></li></ul>	

Wie aus der Tabelle 1.1 ersichtlich wird, sind bioabbaubare Implantate und Mikropartikel auf dem Arzneimittelmarkt erhältlich. Die Depotpräparate, die auf den multipartikulären Systemen basieren, wie beispielsweise Decapeptyl LP<sup>®</sup> oder Enantone Monats-Depot<sup>®</sup>, weisen einen Freigabezeitraum der Wirkstoffe von ca. einem Monat auf. Sie können dem Patienten ohne Probleme injiziert werden<sup>54</sup>. Nachteile dieser Präparate sind vor allem Restgehalte an bedenklichen Lösungsmitteln, eine aufwendige und teure Herstellung und ungleichmäßige Wirkstoffkonzentration, bedingt durch den Herstellungsprozess<sup>12,55</sup>.

Parenterale Depotformulierungen in Form von Implantaten sind beispielsweise Zoladex<sup>®</sup>-GYN mit einer Depotwirkung von einem Monat oder Profact<sup>®</sup> Depot 3-Monatsimplantat mit einer Freigabedauer von drei Monaten. Sie werden s.c. unter die Bauchhaut injiziert, dabei kann jedoch ein Fremdkörpergefühl auftreten. Die Verarbeitung der bioabbaubaren Polymere zu diesen Implantaten erfolgt durch Verpressen oder Extrusion<sup>12</sup>. Durch die dabei auftretenden mechanischen und thermischen Belastungen ergeben sich Probleme mit der Stabilität der Polymere und der Wirkstoffe<sup>26,27</sup>.

Eine viel versprechende Methode zur Bildung bioabbaubarer Formen ist die Herstellung von in situ Implantaten. Dabei werden Lösungen oder Suspensionen von bioabbaubarem Polymer und dem Arzneistoff durch Injektion in wässrige Medien eingebracht, in welchem die Polymere zur spontanen Ausfällung neigen und den Wirkstoff einschließen<sup>30-35</sup>. Eine in situ Formulierung kann die Vorteile der Mikropartikel sowie der gepressten Implantate vereinen. Eine Depotwirkung kann über mehrere Wochen, wie beispielsweise für das Präparat Eligard<sup>®</sup> (je nach Dosierung über 1 – 6 Monate), erreicht werden. Ein Vorteil sind die parenteral besser verträglichen Lösungsmittel der Polymer-Lösungen, aus denen sich die in situ Implantate ausformen. Hinsichtlich der eingesetzten Lösungsmittel und ihrer parenteralen Anwendbarkeit gibt es jedoch Unterschiede. Beispielsweise ist das in Eligard<sup>®</sup> verwendete Lösungsmittel N-Methylpyrrolidon<sup>35</sup> hinsichtlich der parenteralen Verträglichkeit kritisch zu bewerten<sup>56</sup>. Es kann zu lokalen Reizungen führen. Auch wurde von embryotoxischen Wirkungen bei oraler Verabreichung in Ratten berichtet<sup>57</sup>. Geeigneter scheint die Verwendung von PEG 400 zu sein, wobei hier aufgrund der hygroskopischen Eigenschaften hämolytische Effekte festgestellt wurden<sup>58</sup>. Eine andere Alternative stellt die im Patent<sup>59</sup> beschriebene Technologie

dar. Hier werden niedermolekulare flüssige Oligolaktide zum Lösen der matrixbildenden PLGA-Polymere eingesetzt.

Für den Einsatz von Arzneiformen als Parenteralia ist Sterilität erforderlich<sup>60</sup>. Die beschriebenen parenteralen Depotformulierungen stellen dabei hohe Anforderungen an die Sterilisationsverfahren, da die Präparate bei Anwendung der Sterilisationsmethoden des Arzneibuches ihre biopharmazeutischen und physikochemischen Eigenschaften ändern und so unbrauchbar werden können. Zweifellos ist damit ein sehr wichtiger Aspekt benannt, der in der Entwicklung solcher innovativer Formulierungen berücksichtigt werden muss. Ein parenterales Präparat, welches nur unter Stabilitätsverlust steril hergestellt werden kann, wird keine Markteinführung erreichen. Die vorliegende Arbeit wird daher Methoden zur Bewertung von Depotinjektionsformen an einem ausgewählten Beispiel herausarbeiten. Die erarbeiteten Prüfverfahren werden dann zur Bewertung von Sterilisationsverfahren und deren Einfluss auf die Stabilität einer Modellformulierung herangezogen.

## **1.2 Sterilisationsverfahren**

Für alle parenteral anzuwendenden Produkte wird Sterilität gefordert. Sterilisation heißt Eliminierung (Abtrennung, Abtöten) der an Stoffen, Zubereitungen und an Gegenständen vorkommenden lebensfähigen Formen von Mikroorganismen sowie Inaktivierung aller Viren<sup>61</sup>. In den Arzneibüchern wird Sterilität, die ein absolutes Maß ist, dahingehend konkretisiert, dass die Verfahren und Maßnahmen derart sein sollen, dass die Wahrscheinlichkeit für Unsterilität  $\leq 10^{-6}$  ist<sup>60,62</sup>. Das bedeutet, bei einer Charge von 1 Million sterilisierten Einheiten darf nicht mehr als ein Behältnis kontaminiert sein. Der Nachweis der Sterilität des Arzneimittels wird durch Prüfung nach in den Arzneibüchern festgelegten Vorschriften erbracht (Prüfung auf Sterilität nach Ph. Eur. 2.6.1.<sup>60</sup>), die belegen, dass unter den angegebenen Bedingungen keine vermehrungsfähigen Mikroorganismen nachweisbar sind. Verschiedenste Verfahren stehen zur Verfügung, um sterile oder keimreduzierte Produkte herzustellen. Dabei gilt es je nach Einsatzbereich, Verwendungszweck des Präparates oder Gegenstandes, das optimale Behandlungsverfahren zu finden, das den gestellten Anforderungen oder Erwartungen genügt und unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten realisierbar ist. Die Methoden zur Abtötung, Beseitigung und zum Fernhalten von Mikroorganismen werden wie folgt eingeteilt (Tab. 1.2).

Tab. 1.2: Methoden zur Keimreduzierung und deren Verfahren und Anwendung<sup>61</sup>

Methoden	Definition	Verfahren	Anwendung
Sterilisation	Abtötung aller Mikroorganismen und Inaktivierung aller Viren	Behandlung mit - Heißluft - gespanntem Dampf - ionisierenden Strahlen - Ethylenoxid	Arzneimittel, Verbandstoffe, Geräte, Instrumente
Entkeimungsfiltration	Abtrennung aller Mikroorganismen, auch der toten Formen, jedoch nicht aller Viren	Filtration mit - Filtern	Wasser, flüssige und lösliche Arzneimittel, flüssige Lebensmittel, Gase
Desinfektion	Inaktivierung eines Teiles der Keime, beispielsweise aller pathogenen Keime	Behandlung mit - chemischen Mitteln - feuchter Hitze (Pasteurisieren, Stassanieren, Uperisation, Einwecken)	Oberflächen (Material, Hände, Kleidung), Räume, hitzelabile Lebensmittel
Konservierung	Hemmung aller vermehrungsfähigen vegetativen Keime und Auskeimung der Sporen	Behandlung mit - chemischen Mitteln	Arzneimittel (Parenteralia in Mehrdosenbehältnissen), leichtverderbliche Lebensmittel, Kosmetika

Zur Herstellung von sterilen Injektionspräparaten sind die Sterilisationsverfahren und die Entkeimungsfiltration von vorrangigem Interesse. In jedem Fall ist die Eignung des Sterilisationsverfahrens an sich und für das zu behandelnde Produkt speziell zu prüfen. Die ausgewählte optimale Methode muss validiert werden, d.h. es ist experimentell unter Beweis zu stellen, dass mit dem Verfahren Sterilität erzeugt werden kann. Andererseits muss sich die Auswahl des Verfahrens auch nach den Eigenschaften des zu behandelnden Präparates, seiner Stabilität gegen das wirksame Agens (Hitze, ionisierende Strahlen, Ethylenoxid) sowie der Ausgangskeimzahl (Art und Umfang) richten. Eine Sterilisation des Produktes im Endbehältnis muss immer der aseptischen Herstellung vorgezogen werden<sup>63,64</sup>. Einer Sterilisation mit feuchter oder trockener Hitze ist hinsichtlich des Wirkungsgrades zur Verminderung der Keimzahl Vorrang zu geben. Da die bioabbaubaren Depotinjektionsformen zu den thermolabilen Produkten gehören, sollen neben den Standardverfahren der Arzneibücher auch alternative Verfahren zur Sterilisation geprüft werden.

### **1.2.1 Standard-Sterilisationsverfahren**

Zur Sterilisation im pharmazeutischen und medizinischen Bereich werden in den Arzneibüchern folgende Verfahren aufgeführt<sup>60</sup>:

- thermische Sterilisation
  - mit feuchter Hitze (Heißwasser, Dampf, Dampf-Luft-Gemische)
  - mit trockener Hitze (Heißluft)
- Sterilisation mit ionisierenden Strahlen (Gamma-Strahlen)
- Sterilisation mit mikrobiziden Gasen (Ethylenoxid)
- Entkeimungsfiltration (Filtration durch bakterienzurückhaltende Filter)
- aseptische Herstellung.

Im Nachfolgenden sollen die Standardverfahren zur Sterilisation im Einzelnen kurz vorgestellt und deren Anwendbarkeit auf bioabbaubare Depotinjektionsformen bewertet werden.

#### *1.2.1.1 Dampfsterilisation*

Bei der Dampfsterilisation kommt gespannter, gesättigter Wasserdampf zur Anwendung. Dieses Verfahren ist bei wässrigen Zubereitungen, falls dies möglich ist, zu bevorzugen. Die Standardbedingungen betragen 15 min langes Erhitzen auf mindestens 121 °C<sup>60</sup>. Gespannter Dampf entsteht beim Erhitzen von Wasser in einem geschlossenen Gefäß (Innenraum des Autoklaven). Bei einer Sterilisiertemperatur von 121 °C steigt der Dampfdruck auf 2,05 bar an<sup>61</sup>. Der Dampf und dessen Kondensat üben bei der Oberflächensterilisation eine direkte bakterizide Wirkung aus. Bei der Sterilisation von Lösungen in geschlossenen Behältnissen dient er lediglich zur Wärmeübertragung. Die verschlossenen Gefäße übernehmen selbst die Funktion eines Autoklaven. Zum Erreichen der vollen Wirkung des Dampfes muss die Luft aus dem Sterilisiererraum entfernt sein. Zur Verdrängung der Luft stehen verschiedene Verfahren wie Strömungsverfahren, Gravitationsverfahren und Vakuumverfahren zur Verfügung. Bevorzugt findet die Dampfsterilisation Anwendung zur Oberflächensterilisation von Geräten wie Filter einschl. Filtergehäuse, Pumpen, Nadeln, Wäsche, Filtratbehälter sowie zur Sterilisation im Endbehältnis von wässrigen Zubereitungen thermostabiler Substanzen. Jedoch eignet sich dieses thermische Standardverfahren nicht zur Sterilisation von bioabbaubaren Depotinjektionsformen. Zum einen sind die matrixbildenden Polymere und häufig auch die Wirkstoffe wie Peptide und Proteine thermolabil, zum anderen handelt es

sich bei den Depotformulierungen um nicht wässrige Systeme. Dampfsterilisation unter Standardbedingungen von chirurgischem Fixationsmaterial basierend auf PLA-Polymeren führte zu Deformation und Abbau. Eine kurzzeitige (60 s) Behandlung mit höheren Temperaturen (129 °C) war Erfolg versprechend hinsichtlich dem geringen Abbau und der kaum sichtbaren Verformung des Materials<sup>65,66</sup>.

#### *1.2.1.2 Heißluftsterilisation*

Bei der Sterilisation mit Heißluft sind die Standardbedingungen mindestens 2 h bei mindestens 160 °C, wobei andere Temperatur-Zeit-Kombinationen ebenfalls möglich sind, wenn der Nachweis erbracht wird, dass eine angemessene und reproduzierbare Letalitätssrate gewährleistet wird<sup>60</sup>. Heißluft ist das Verfahren der Wahl zur Sterilisation von nicht-wässrigen Zubereitungen im Endbehältnis<sup>63</sup>. Jedoch kommt die Behandlung mit trockener Hitze für parenterale Produkte aufgrund von hitzeempfindlichen Wirk- und/oder Hilfsstoffen nur selten zur Anwendung. Hauptsächlich wird die Heißluftsterilisation zur Sterilisation und Entpyrogenisierung bei Temperaturen > 220 °C von Primärpackmitteln wie Ampullen und Rollrandflaschen (Vials) eingesetzt.

Untersuchungen von Gogolewski et al. zur thermischen Behandlung von Fixationsmaterial, die auf PLA-Polymeren basieren, haben gezeigt, dass bei Temperaturen < 135 °C und unter Vakuum und/oder Inertgasatmosphäre eine erfolgreiche Sterilisation ohne Molekulargewichtsverlust der Polymere und Änderung der mechanischen Eigenschaften durchführbar ist<sup>67,68</sup>. Die Sterilisation mit trockener Hitze von PLGA-Stiften war ohne Molekulargewichtsverlust hingegen nicht möglich<sup>69</sup>.

#### *1.2.1.3 Strahlensterilisation*

Von den ionisierend wirkenden Korpuskularstrahlen ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Strahlen) und Elektronenstrahlen ( $\gamma$ - und Röntgenstrahlen) werden nach Arzneibuch die  $\gamma$ -Strahlen aufgrund des besseren Eindringvermögens eingesetzt<sup>60</sup>. Die  $\beta$ -Strahlen werden nur in untergeordnetem Umfang für Sterilisationszwecke genutzt. Beide Strahlenarten besitzen ähnliche mikrobizide Wirksamkeit gegen Bakterien, Pilze und Viren, wobei der Keimabtötungseffekt von vielen Faktoren wie Alter der Keime, Keimdichte, Sauerstoffkonzentration, Feuchtigkeitsgehalt abhängt<sup>61</sup>. Bei dieser Sterilisationsmethode beträgt die Standardabsorptionsdosis 25 kGy, andere Dosen

können bei Nachweis einer angemessenen und reproduzierbaren Letalitätsrate verwendet werden. Für die Erzeugung von  $\gamma$ -Strahlen wird fast ausschließlich das Radionuklid  $^{60}\text{Co}$  eingesetzt. Die ionisierenden Strahlen können zur Sterilisation von Arzneimitteln nur eingesetzt werden, wenn der Nachweis erbracht wurde, dass kein anderes Sterilisationsverfahren (thermische Verfahren) zum Erfolg führt<sup>63</sup>. Aufgrund der thermolabilen Eigenschaften der bioabbaubaren Polymere ist die Strahlensterilisation im Moment die wichtigste Methode, mit der auf dem Arzneimittelmarkt befindliche Implantate und Mikropartikel behandelt werden<sup>12,70</sup>. Bekannt ist aber auch, dass die Anwendung von  $\gamma$ -Strahlen zum Abbau der Polymere und damit Veränderung der Wirkstofffreisetzung führen kann<sup>71-74</sup>.

#### *1.2.1.4 Sterilisation mit mikrobiziden Gasen (Ethylenoxid)*

Die Sterilisation mit dem mikrobiziden Gas, Ethylenoxid, ist eine chemische Sterilisationsmethode. Sie dient in erster Linie zur Verminderung der Keimzahl an Oberflächen, kann aber auf diese Weise auch in porösem Material wirken. Da ein direkter Kontakt des Gases mit der Mikroorganismenzelle erforderlich ist, versagt dieses Verfahren, wenn Kontaminationskeime in Kristallen, Proteinpartikeln oder Schutzhüllen eingeschlossen sind<sup>61</sup>. Die Wirksamkeit des Gases ist weiterhin in hohem Maße von der vorhandenen Feuchte sowie von der Temperatur und dem Druck abhängig. Ethylenoxid wirkt als Protoplasmagift. Der Einsatz als Sterilisationsverfahren ist wegen der kanzerogenen Wirkung des Ethylenoxids stark eingeschränkt. Die Sterilisation von Arzneimitteln mit Ethylenoxid kann nur eingesetzt werden, wenn der Nachweis erbracht wurde, dass kein anderes Sterilisationsverfahren (thermische Verfahren) zum Erfolg führt<sup>63</sup>.

#### *1.2.1.5 Filtration durch bakterienzurückhaltende Filter*

Ist eine Sterilisation im Endbehältnis nachweislich nicht durchführbar, so kann ein Filtrationsverfahren als sterilisierendes Verfahren eingesetzt werden<sup>63</sup>. Alle Schritte nach der Filtration, beispielsweise Abfüllung in Primärpackmittel, müssen unter aseptischen Bedingungen erfolgen. Das eigentliche Agens der Entkeimungsfiltration ist der Filter, welcher in der Lage sein muss, aus einer klaren Flüssigkeit die darin vorhandenen Keime abzuscheiden<sup>61</sup>. Geeignet zur Filtration sind vor allem niedrigviskose echte Lösungen, weniger kolloidale und hochviskose flüssige Zubereitungen. Für bioabbaubare Depotinjektionsformen wie starre, zylinderförmige

Implantate ist die Sterilfiltration nicht anwendbar. Bei der Herstellung von Mikropartikeln sind die Polymerlösungen und Emulsionen vor der Ausbildung zu filtrieren. Das bedeutet, alle weiteren Schritte müssten in aseptischer Arbeitsweise erfolgen, was technologisch enorm aufwendig und kostenintensiv ist.

#### *1.2.1.6 Aseptische Herstellung*

Können Zubereitungen aus Stabilitätsgründen nicht einem Sterilisationsprozess unterworfen werden, müssen die Einzelbestandteile oder Zwischenprodukte sterilisiert werden. Die Weiterverarbeitung muss aseptisch erfolgen. Unter der aseptischen Herstellung von Arzneizubereitungen ist zu verstehen, dass die Wirk- und Hilfsstoffe sterilisiert zum Einsatz kommen und ihre Verarbeitung mit sterilisierten Geräten und das Abfüllen in sterilisierte Primärpackmittel erfolgt. Alle Arbeitsschritte sind so aufeinander abzustimmen, dass jeder einzelne zu dem angestrebten Endziel, dem sterilen Produkt, beiträgt. Eine solche Arbeitstechnik ist äußerst aufwendig und stellt besonders hohe Anforderungen an das Personal, die Betriebshygiene, an Räume und Geräte.

#### **1.2.2 Alternative Sterilisationsverfahren**

Es gibt eine Vielzahl moderner Wirkstoffe, die aus dem Bereich der biotechnologischen Forschung kommen, deren Anwendung auf die parenterale Applikation beschränkt ist. Dazu zählen vor allem Proteine, Peptide<sup>54</sup>, rekombinante DNA<sup>75</sup> und Vaccine<sup>76</sup>, welche häufig in modernen Depotinjektionsformen oder mit Hilfe neuester medizinischer Geräte, wie Mikrochips oder implantierbare Pumpen, angewendet werden. Wie alle Parenteralia müssen auch solche Systeme steril sein. Standard-Sterilisationsverfahren können häufig nicht angewandt werden, da die Formulierungen dann unbrauchbar werden. Die Alternative ist dann die technologisch sehr aufwendige und kostenintensive aseptische Herstellung. Jedoch ist eine Sterilisation der Präparate im Endbehältnis einer aseptischen Herstellung nicht aus Kostengründen, sondern aus Sicherheitsgründen vorzuziehen<sup>63,64</sup>. Die Suche nach alternativen Sterilisationsverfahren erscheint daher sinnvoll. In der Literatur werden eine ganze Reihe anderer Sterilisationsmethoden für instabile Zubereitungen beschrieben, wie beispielsweise:

- die Mikrowellenbehandlung<sup>77-79</sup>,
- die Niedrigtemperatur-Plasmasterilisation<sup>80,81</sup>,

- die Pulsed-Light-Sterilisation<sup>82-84</sup>,
- die Sterilisation mit überkritischem Kohlendioxid<sup>85</sup>,
- die Hochdruckinaktivierung<sup>86</sup>
- die Hochdruckbehandlung mit Kohlendioxid und explosiver Dekompression<sup>87</sup>.

Zur Etablierung anderer Methoden ist deren Eignung nachzuweisen. Dazu sind umfangreiche Untersuchungen erforderlich, welche die Validität des neuen Verfahrens hinsichtlich Letalitätsrate, Reproduzierbarkeit, geeigneter Bioindikatoren etc. belegen. Die Behandlung mit Mikrowellen, ein Sterilisationsverfahren des Japanischen Arzneibuches<sup>79</sup>, und die Hochdruckinaktivierung<sup>86</sup> sind alternative Methoden, die hinsichtlich ihrer Wirksamkeit intensiv untersucht wurden und deren Etablierung als alternative Sterilisationsverfahren realistisch erscheint. Beide Verfahren sollen neben den Standardverfahren hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit für parenterale Depotinjektionsformen am Beispiel einer ausgewählten Modellformulierung in dieser Arbeit bewertet werden.

#### *1.2.2.1 Mikrowellenbehandlung*

Mikrowellen sind elektromagnetische Wellen, deren Wellenlänge zwischen 1 m und 1 mm liegt, was einem Frequenzbereich von etwa 300 MHz bis etwa 300 GHz entspricht. Die Mikrowellengeräte benutzen elektromagnetische Strahlung mit einer Frequenz von typischerweise 2,45 GHz. Mikrowellen stellen ein elektrisches Wechselfeld dar, in dem die Feldrichtung innerhalb einer Sekunde fast 2,5 Milliarden Mal wechselt. Durch den ständigen Polaritätswechsel werden Dipolmoleküle wie beispielsweise das Wasser im zum behandelnden Gut zum Schwingen gebracht. Dadurch wird ein erheblicher Teil der Energie in Reibungsverluste umgesetzt und das Produkt erwärmt sich.

Im Japanischen Arzneibuch ist die Mikrowellenbehandlung zur Sterilisation von wässrigen Lösungen oder flüssigen Arzneistoffen zugelassen<sup>79</sup>. Von Eisai Co. wurde Ende der 80iger Jahre erfolgreich ein Mikrowellengerät zur Sterilisation von wässrigen Ampullenpräparaten entwickelt und in die Produktion eingeführt<sup>88,89</sup>. Mit diesen kontinuierlich arbeitenden Sterilisatoren kann innerhalb von 20 bis 30 s eine Produkttemperatur von 140 °C erreicht werden. Die Temperaturerfassung erfolgt für jede einzelne Ampulle getrennt<sup>78</sup>.

In umfangreichen Untersuchungen wurde die Validität des Verfahrens hinsichtlich Temperaturhomogenität, Auswahl der geeigneten Bioindikatoren, Reproduzierbarkeit sowie einer ausreichenden Letalität nachgewiesen<sup>78,90-93</sup>. Aufgrund der kurzen Aufheizzeiten und der Sterilisierzeit eignet sich das Verfahren besonders für thermolabile wässrige Ampullenpräparate<sup>94</sup>. In Arbeiten von Gröning et al. wurde berichtet, dass auch Sterilisation von nicht wässrigen Flüssigkeiten, wie Macrogol 300 und Erdnussöl, erfolgreich durchgeführt wurde<sup>95</sup>. Daher soll die Mikrowellenbehandlung am Beispiel einer Modellformulierung im Rahmen dieser Arbeit bewertet werden.

### *1.2.2.2 Hochdruckinaktivierung*

Die Hochdruckinaktivierung ist ein aus der Lebensmittelindustrie bekanntes Verfahren zur Pasteurisierung und Sterilisierung<sup>96,97</sup>. So wird die Behandlung mit Hochdruck als eine Methode beschrieben, bei der beispielsweise der Vitamingehalt der Nahrungsmittel weitgehend erhalten bleibt, was bei thermischen Verfahren oftmals nicht der Fall ist<sup>98</sup>. Es ist nahe liegend, diese Technologie auch zur Keimreduzierung in thermo- und strahlensensitiven Injektionszubereitungen sowie medizinischen Anwendungen einzusetzen<sup>99-102</sup>. Es liegen Veröffentlichungen von H. Ludwig et al. vor, in denen die Hochdruckbehandlung zur Sterilisation von Formulierungen wie Liposomen oder PLGA-Stiften beschrieben wird<sup>103-105</sup>. Selbst solche empfindlichen Arzneiformen wie Liposomen sind über einen längeren Zeitraum bei einem isostatischem Druck bis ca. 250 MPa stabil<sup>104</sup>. H. Ludwig untersuchte auch das Molekulargewicht von PLGA vor und nach der Hochdruckinaktivierung, wobei es dabei zu keiner Änderung kam<sup>103</sup>.

Es gibt zahlreiche Untersuchungen dazu, dass alle Arten von Mikroorganismen einschließlich Viren mit Druckbereichen zwischen 100 und 1000 MPa inaktiviert werden können<sup>106,107</sup>. Problematisch war die Inaktivierung der Bakteriensporen. Die Arbeitsgruppe um H. Ludwig hat jedoch in zahlreichen Arbeiten die druckinduzierte Keimung und Inaktivierung von Bakteriensporen untersucht und daraus Strategien zur effektiven Sporeninaktivierung abgeleitet<sup>106,108-111</sup>.

Die Hochdruckbehandlung stellt aufgrund der vorliegenden Untersuchungen und Ergebnisse eine weitere Methode dar, die als alternatives Sterilisationsverfahren für bioabbaubare Depotinjektionsformen bewertet werden soll.

### 1.3 Ziel der Arbeit

Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es, den Einfluss verschiedener Sterilisationsverfahren auf die physikochemischen und biopharmazeutischen Eigenschaften der PLA bzw. PLGA als Matrix von Depotformulierungen zu untersuchen.

Dazu galt es zunächst, die ausgewählte Depotinjektionsform zu charakterisieren. Zu erwähnen seien hierbei die Lagerstabilität in Bezug auf die matrixbildenden Bestandteile und auf den Wirkstoff, die Gehaltsbestimmung und in vitro Freisetzung.

Ein weiterer wichtiger Aspekt zur Bewertung des Einflusses der Sterilisationsverfahren auf die Eigenschaften der Matrix und der Formulierung ist die Eignung der ausgewählten Untersuchungsmethoden. Zur Beurteilung der Stabilität der matrixbildenden Polymere sollen unterschiedliche Parameter herangezogen werden. Aus physikochemischer Sicht sollten Veränderungen im Molekülaufbau, wie beispielsweise Kettenbrüche, erfasst werden. Dies konnte durch die Bestimmung der Molmassen mittels Gelpermeationschromatographie (GPC)<sup>112</sup> oder alternativ durch die Bestimmung der inhärenten Viskosität<sup>113,114</sup> erreicht werden. Mit Hilfe der Säurezahlbestimmung durch Säure-Base-Titration der Säureendgruppen der ausgewählten Polyester sollten ebenfalls Aussagen über strukturelle Veränderungen getroffen werden. Eine Bewertung der Einflüsse der Sterilisationsverfahren auf biopharmazeutische Eigenschaften erfolgte durch die Untersuchung der Freisetzung eines Modellwirkstoffes aus den betrachteten Depotformulierungen. Aus der Literatur<sup>36,64,115-117</sup> ist bekannt, dass strukturelle Veränderungen eines Polymers auch zur Änderung der Depotwirkung der Formulierung führen können.

Im Herstellungsprozess der Depotformulierungen gibt es verschiedene Ansatzpunkte zur Sterilisation. Die Eingriffspunkte bei der Herstellung werden bei den nachfolgenden Betrachtungen berücksichtigt und entsprechend diskutiert.

Die Depotformulierungen stellen dabei hohe Anforderungen an die Sterilisationsverfahren, da thermische und mechanische Belastungen sowie Strahleneinwirkung strukturelle Veränderungen der PLA und PLGA auslösen können<sup>24,66,68,69,115</sup>.

Um trotz des thermo- und strahlensensitiven Charakters der Depotformulierungen eine Sterilisation im Endbehältnis zu erreichen<sup>63,64</sup>, sollten in der vorliegenden Arbeit alternativ zu den Standard-Sterilisationsverfahren weitere aus der Literatur bekannte Sterilisationsmethoden, wie beispielsweise die bereits

erwähnte Hochdruckinaktivierung<sup>86</sup> und die Mikrowellenbehandlung<sup>79</sup>, betrachtet werden.

Die Zielstellung der vorliegenden Arbeit besteht somit darin, geeignete Sterilisationsverfahren für bioabbaubare Depotformulierungen, im Idealfall als Sterilisation im Endbehältnis, zu finden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Poly(laktide) (PLA), Poly(laktid-co-glykolid) (PLGA)

Es wurden die PLA- und PLGA-Polymere, welche von der Firma Boehringer Ingelheim GmbH (Ingelheim, Deutschland) unter dem Handelsnamen Resomer<sup>®</sup> vertrieben werden, verwendet (Tab. 2.1). Die Polymere wurden unter Lichtschutz und kühl (2 – 8 °C) gelagert.

Tab. 2.1: Verwendete PLA- und PLGA-Polymere

Substanz	Polymerzusammensetzung	Charge
Resomer <sup>®</sup> R 202H	Poly(D,L-laktid)	200479
Resomer <sup>®</sup> RG 752	Poly(D,L-laktid-co-glykolid) 75:25	15056; 760/640657
Resomer <sup>®</sup> RG 503H	Poly(D,L-laktid-co-glykolide) 50:50	261541
Resomer <sup>®</sup> RG 503	Poly(D,L-laktid-co-glykolide) 50:50	260411
Resomer <sup>®</sup> RG 502H	Poly(D,L-laktid-co-glykolide) 50:50	34035
Resomer <sup>®</sup> RG 502	Poly(D,L-laktid-co-glykolide) 50:50	241846

#### 2.1.2 Weitere Rezepturbestandteile

Das Protein Cytochrom C (CcC) wurde im Gefrierschrank bei –25 °C aufbewahrt. Erst unmittelbar vor dem Gebrauch wurde die geforderte Teilmenge entnommen und aufgetaut. Polyethylenglykol (PEG) 400 wurde in Arzneibuchqualität (Ph.Eur.) eingesetzt und bei Raumtemperatur aufbewahrt (Tab.2.2).

Tab. 2.2: Verwendete Rezepturbestandteile

Substanz	Hersteller	Charge
CcC	Fluka Chemie AG	K31285804
PEG 400	MERCK-Schuchardt	S37083 S320403

### 2.1.3 Sonstige Substanzen

Die im Rahmen der Untersuchungen verwendeten Substanzen sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt (Tab.2.3). Die für HPLC-Analysen und GPC-Untersuchung notwendigen Lösungsmittel und Referenzsubstanzen waren chromatographischer Qualität und sind im Methodenteil explizit aufgeführt.

Tab. 2.3: Sonstige Substanzen

Substanz	Hersteller	Charge
Tetra-n-butylammoniumhydroxid	Merck KgaA Darmstadt	040421471 OB 165821
Chloroform p. a.	Merck KgaA Darmstadt	K28735345 106
Methanol p. a.	Laborchemie Apolda GmbH	51017 51068 0201
Dioxan p. a.	Merck KgaA Darmstadt	K 26141971 905
Ethanol	Laborchemie Apolda GmbH	1427K4874
0,1 mol/l Lithiumchlorid in Ethanol	Schott-Geräte GmbH	285138308
Benzoessäure	Merck KgaA Darmstadt	K 21206730 502
Natriumazid	Fluka Chemie AG	360878/1 34596
Natriumdodecylsulfat (NDS)	Carl-Roth GmbH & Co KG	24836218
D,L-Milchsäure	Fluka Chemie AG	351951
Trifluoressigsäure	Merck KgaA Darmstadt	ZA2392062
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	Merck KgaA Darmstadt	K91556645
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	Merck KgaA Darmstadt	K20897580

### 2.2 Rezeptur und Herstellung der in situ Formulierung

Es wurde das Lösungsmittel PEG 400 in einem Erlenmeyerkolben vorgelegt, anschließend das Resomer<sup>®</sup> zugewogen und mit dem Magnetrührer gleichmäßig verteilt. Der Lösungsprozess dauerte ca. 12 Stunden. Dazu kann die PEG 400-Resomer<sup>®</sup>-Mischung auf maximal 80 °C erwärmt werden. Nach Vorliegen der Resomer<sup>®</sup>-Lösung (Zwischenprodukt) wurde CcC unter Rühren homogen suspendiert. Die nachfolgende Abbildung zeigt die Ausformung des in situ Implantates [5]. Diese findet im Freisetzungsmedium [4] in einer 6R Injektionsflasche [3] statt. Dazu wird die wirkstoffhaltige Resomer<sup>®</sup>-Formulierung [2] zu je 500 mg eingespritzt (Abb. 2.1).

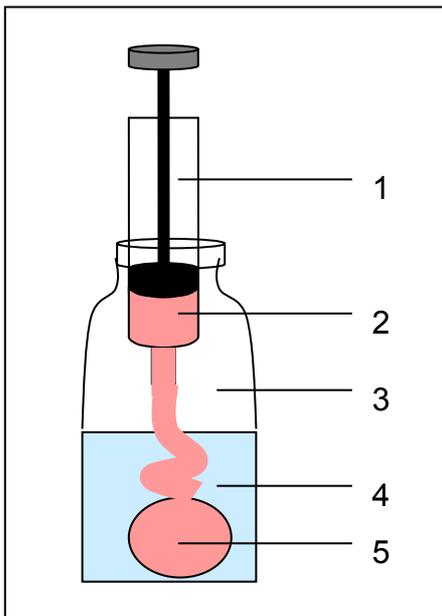


Abb. 2.1: Darstellung der Ausformung des in situ Implantates

- 1 Spritze mit Kanüle
- 2 Resomer<sup>®</sup>-Formulierung
- 3 6R-Injektionsflasche
- 4 Freisetzungsmedium
- 5 In situ Implantat

Die untersuchten Resomer<sup>®</sup>-Formulierungen waren wie folgt zusammengesetzt (Tab. 2.4):

Tab. 2.4: Zusammensetzung der Resomer<sup>®</sup>-Formulierung

Substanz	Anteil [%]
Resomer <sup>®</sup>	9,98
Cytochrom C	0,2
PEG 400	89,82

## 2.3 Methoden zur Charakterisierung der Resomere<sup>®</sup>

### 2.3.1 Bestimmung der Säurezahl

Die Bestimmung der Säurezahl (SZ) der Resomere<sup>®</sup> erfolgte durch Titration der freien Säureendgruppen als schwache Säure im wasserfreien Milieu. Der Titrator Tetra-n-butylammoniumhydroxid reagiert dabei als starke Base mit den freien Carboxylgruppen der Laktide und Glykolide. Die potentiometrische Titration zur Bestimmung der SZ wurde in Anlehnung an das Ph. Eur., 2.5 Gehaltsbestimmungsmethoden<sup>60</sup> sowie die Methodenbeschreibung von Boehringer Ingelheim<sup>118</sup> durchgeführt<sup>63</sup>.

**Gerät:** Titroline alpha von Schott-Geräte GmbH

**Aufbau:** Ag/AgCl-Einstabmesselektrode zur wasserfreien pH-Bestimmung

Elektrolytlösung: 0,1 mol/l ethanolisches Lithiumchlorid

Magnetrührer

Titervorratsgefäß

Dosieraufsatz für Titer 20 ml

Titrierspitze (0,8 mm Kapillare)

*Geräteeinstellung:* Titrationsart: mV

Titrationsrichtung: fallend

Titrationsende: festgelegt, ml

Titrationsregelung: lineare Zugabe von 0,025 ml TBAH alle 3 s

*Lösungsmittel:* Chloroform p. a. (80 Volumenteile)

Dioxane p. a. (15 Volumenteile)

Methanol p. a. (15 Volumenteile)

*Titrationsmittel:* 0,1 mol/l Tetra-n-butylammoniumhydroxid (TBAH)

*Titerbestimmung:* 50 mg Benzoessäure ( $m_{BS}$  in mg) wurden in 60 ml Methanol gelöst und der Titer (T in mol/l) berechnet nach:

$$T = m_{BS} / V * M_{BS}$$

$M_{BS}$  = Molare Masse der Benzoessäure 122,12 g/mol

V = Verbrauch an TBAH in ml

*Blindwertbestimmung:* Verbrauch an TBAH bei der Titration von 60 ml Lösungsmittelgemisch (BW in ml)

*Titration:* Einwaage von ca. 1 g PLGA oder PLA bzw. diesem entsprechende 10 g Resomer<sup>®</sup>-Lösung oder 10 g PEG 400 in ein 100 ml Becherglas und Lösen in 60 ml Lösungsmittelgemisch unter Rühren (15 Minuten).

*Berechnung:* 1 ml einer 0,1 mol/l TBAH Lösung entspricht 5,61 mg KOH / g PLA oder PLGA

$$SZ = (V - BW) * T * M_{KOH} / m$$

SZ = Säurezahl der Substanz in mg/g

V = Verbrauch an TBAH [ml]

$M_{KOH}$  = Molare Masse KOH 56,1 g/mol

m = Einwaage PLA/ PLGA in g

Die Säurezahl der Resomer<sup>®</sup>-Lösung wurde bezogen auf das enthaltene Resomer<sup>®</sup> unter Berücksichtigung der Säurezahl des PEG 400 berechnet.

$$SZ = ((V - BW) * T * M_{KOH} / m) - SZ_{PEG}$$

### **2.3.2 Bestimmung der Molmassen und der -verteilung**

Die Bestimmung von  $M_n$ ,  $M_w$  und  $D$  für die PLA und PLGA erfolgte mittels GPC unter Anwendung einer Methode, die in Zusammenarbeit mit Innovent e.V. entwickelt wurde. Die Methode wurde für GPC-Untersuchungen an den Resomer<sup>®</sup>-Lösungen entwickelt und ermöglichte gleichzeitig auch die Charakterisierung der Einzelsubstanzen. Die Proben selbst sind nur mittels RI-Detektion zugänglich.

**Geräte / Software:** GPC-Anlage (Firma Shimadzu) bestehend aus:

- Systemcontroller LC-10 AD VP
- HPLC-Pumpen LC-10 AD VP
- Entgaser DGU-14A
- UV-Detektor SPD-M10 A VP
- RI-Detektor RID-10 A
- Säulenofen CTO-10 AC VP
- Autoinjektor SIL-10 AD VP
- Software Shimadzu GPC for Class VP 6.11

**Methode:** Säule:- Typ: PSS SDV 10<sup>3</sup>Å / 100Å + Vorsäule

- Dimension: 8 x 300 mm
- Partikelgröße: 5 µm
- Säulentemperatur: 25°C

Eluent: - Lösungsmittel: Tetrahydrofuran (THF)

- Fluss: 1,0 ml/min

Injektionsvolumen: 100 µl

**Kalibrierung:** RI- und UV-Detektor im Bereich von 162 g/mol bis 1040000 g/mol mit Polystyrol-Standards

**Probenaufbereitung:** Polymer: 3 mg/ml THF  
Polymer / PEG 400-Lösung 3 mg/ml THF bezogen auf das Polymer

### **2.3.3 Bestimmung der inhärenten Viskosität**

Die Bestimmung der inhärenten Viskosität erfolgte nach dem Prinzip eines Kugelfallviskosimeters und orientiert sich damit an der Methodenbeschreibung von Boehringer Ingelheim <sup>118</sup>, die diese Bestimmung als routinemäßige Untersuchung nach jeder Chargenherstellung durchführen.

**Gerät:** Mikroviskosimeter HAAKE mit geeigneter Präzisionspritze

<i>Messsystem:</i>	Präzisionsspritze: 300 µl Durchmesser Kugel: 3,175 mm
<i>Temperatur:</i>	20 °C ± 1K HAAKE Thermostat
<i>Bestimmung des K-Wertes:</i>	Die Bestimmung erfolgte mit Aqua purificata zur Kalibrierung der Kugel-Spritzen-Kombination, danach wurde die Viskosität des Lösungsmittels (Chloroform p. a.) bestimmt, um die relative Viskosität errechnen zu können.
<i>Bestimmung der Kugelfallzeit:</i>	0,1 g PLA oder PLGA wurden in einen 25 ml Maßkolben eingewogen und mit Chloroform aufgefüllt, so dass eine 0,4 %ige Lösung entstand. Das Einfüllen der jeweiligen Probe erfolgte durch vorsichtiges Aufziehen in die Präzisionsspritze, um Luftblasen zu vermeiden, die eine der größten Fehlerquellen darstellen.
<i>Berechnung:</i>	Bestimmung des K-Wertes: $K = \eta_{H_2O} / (\rho_1 - \rho_2) * t$ <p>K = Kugelkonstante in mPa*s*cm<sup>3</sup>/(g*s)  <math>\eta_{H_2O}</math> = dynamische Viskosität der Normalflüssigkeit (1 mPa*s)  <math>\rho_1</math> = Dichte der Kugel (7,08 g/cm<sup>3</sup>)  <math>\rho_2</math> = Dichte Testsubstanz (<math>\rho_{H_2O}</math> = 1 g/cm<sup>3</sup>)  t = Fallzeit der Kugel in ms  Viskositäten: Tabelle 2.5</p>

Tab. 2.5: Berechnung der verschiedenen Viskositäten

Viskosität	Berechnungsformel
Dynamische Viskosität	$\eta$ [mPa * s] = K * t * ( $\rho_1 - \rho_2$ )
Relative Viskosität	$\eta_{rel}$ (dimensionlos) = $\eta / \eta_{Lösungsmittel}$
Inhärente Viskosität	$\eta_{inhärent}$ [dl / g] = $\ln \eta_{rel} / c$
Grenzviskosität oder Intrinsische Viskosität	$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \eta_{red} (c \rightarrow 0, d_v/d_z \rightarrow 0)$ $[\eta] = K * M^\alpha$

$\rho_1$  = Dichte der Kugel (7,08 g/cm<sup>3</sup>)

$\rho_2$  = Dichte der Testsubstanz (1,48 g/cm<sup>3</sup>)

- t = Fallzeit der Kugel in ms  
 c = Konzentration des Resomeres<sup>®</sup> im Lösungsmittel in g / dl  
 K = Konstante (abhängig von der gelösten Substanz und vom Lösungsmittel)  
 M = viskositätsmittleres Molekulargewicht  
 $\alpha$  = Mark-Houwink-Exponent (von der Molekülgestalt abhängiger, zwischen 0 und 2 liegender Exponent)

### 2.3.4 Bestimmung der Glasübergangstemperatur

*Gerät/ Software:* Netzsch DSC 200 mit der Proteus<sup>®</sup> Software

*Durchführung:* Al-Tiegel und –deckel wurden auf der Mikrowaage tariert, die Probe eingefüllt, die Tiegel mit dem Tiegelverschlussapparat verschlossen und das Nettogewicht an der Waage abgelesen. Die Proben- und Referenztiegel (leer) wurden in die DSC-Messzelle eingesetzt, die Inertbegasung (Stickstoff) der Messzelle einreguliert und das Temperaturprogramm gestartet.

*Versuchsparameter:* Die Versuchsparameter sind in Tabelle 2.6 zusammengefasst. Zur Bestimmung der Glasübergangstemperaturen wurde die Probe in einem ersten Lauf erhitzt, definiert abgekühlt und erneut erhitzt. Die Lage der Glasübergangstemperaturen wurde mit dem Auswertprogramm der Proteus<sup>®</sup> Software ermittelt.

Tab. 2.6 DSC-Versuchsparameter

Versuchsparameter	Einstellung
Starttemperatur [°C]	20, 25
Heizrate [K/min]	10
Endtemperatur [°C]	150
Flussrate Stickstoff [ml/min]	30
Tiegelsorte	Al-Tiegel
Probenanzahl	3
Einwaage [mg]	3 - 7

## 2.4 Methoden zur Charakterisierung von CcC

### 2.4.1 UV-VIS-spektralphotometrische Bestimmung von CcC

Der CcC-Gehalt mittels UV-VIS-Spektrometer wurde bei 406 nm mit folgenden Einstellungen bestimmt (Tab. 2.7):

Tab. 2.7: Geräteeinstellung zur UV/VIS-spektral-photometrischen Gehaltsbestimmung von CcC

Geräteeinstellungen/ Parameter
Detektor: Photomultiplier R-928
Spektrale Bandbreite: variabel
Photometrisches System: Doppelspalt
Messmethode: Absorption
Ordinate: 0,1 – 1,0
Wellenlängenbereich [nm]: 375 – 650
Scangeschwindigkeit: schnell
Spaltbreite [nm]: 0,8

Die Berechnung der Konzentration erfolgte aus einer Geradengleichung, die aus einer Verdünnungsreihe einer Stammlösung (0,010 g CcC in 100,0 ml Medium) ermittelt wurde (Abb.2.2).

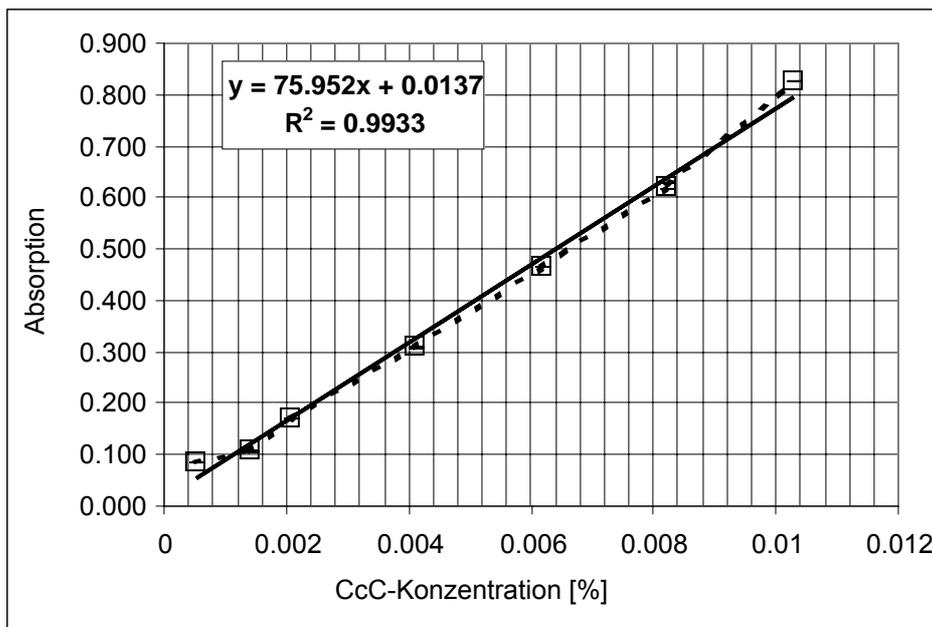


Abb. 2.2: Kalibriergerade CcC (x, n = 3)

Geradengleichung der linearen Regression der Eichgerade:

$$c \text{ [g/100ml]} = (A + b) / a$$

Freigesetztes CcC in 2 ml Freisetzungsmittel:

$$c \text{ [mg/2ml]} = c \cdot 2 \text{ ml} \cdot 1000 / 100 \text{ ml}$$

Berechnung des Anteils an freigesetztem CcC vom gesamten im Implantat enthaltenen CcC:

$$c \text{ [%]} = 100 \cdot c \text{ [mg/2ml]} / c_{\text{gesamt}}$$

Gesamter Anteil an freigesetztem CcC nach jeder Entnahme:

$$C_{\text{kumulativ}} = C_{n-1} \text{ [%]} + C_n \text{ [%]}$$

c	berechnete Konzentration in g/100 ml
A	gemessene Absorption
a und b	Regressionskoeffizienten aus der Geradengleichung
c [mg/2ml]	Konzentration an CcC im entnommenen Freisetzungsmittel
c [%]	prozentualer Anteil am gesamten CcC des Implantates
C <sub>kumulativ</sub>	Summe der prozentualen Anteile am gesamten CcC des Implantates in %
C <sub>gesamt</sub>	gesamte Konzentration an CcC im Implantat in mg
C <sub>n</sub>	CcC Konzentration der Probe n
C <sub>n-1</sub>	kumulative Konzentration an CcC der vorangegangenen Probe

#### 2.4.2 HPLC-Methode zur Bestimmung von CcC

In nachfolgender Tabelle sind die chromatographischen Bedingungen zusammengefasst (Tab. 2.8):

Tab. 2.8: Chromatographische Bedingungen

Bedingungen	Parameter
Gerät	LC 10 A Shimadzu
Stationäre Phase	VYDAC C4 (250 mm x 4 mm)
Mobile Phase	LM A: 0,1% Trifluoressigsäure in Wfl LM B: 0,1% Trifluoressigsäure in Acetonitril/Wfl 90/10

Tab. 2.8: Fortsetzung

Bedingungen	Parameter
Gradient	A/B 90/10 zu 50/50 in 25 Minuten
Fluss	1,5 ml/min
Säulentemperatur	30 °C
Injektionsvolumen	50 µl
Detektor	UV Detektor Shimadzu SPD-M10A VP
Wellenlänge	400 nm
Retentionszeit	CcC ca. 20 min
Laufzeit	25 min
Auswertung	Peakfläche, Retentionszeit
Integrationsparameter	Width 5 Slope 1000
Nachweisgrenze	2 µg/ml

Chromatographie:

## 1. Systemeignungstest

Für die Prüfung der Trennsäule werden sechsmal je 50 µl einer CcC-Lösung (5 µg/ml) injiziert. Folgende Bedingungen müssen hierfür erfüllt sein:

- Variationskoeffizient der Reproduzierbarkeit kleiner als 2 %
- Variationskoeffizient der Flusskonstante kleiner als 1 %

## 2. Injektion von 50 µl Blindlösung BL

Die Blindlösung entspricht dem wässrigen Medium der Stabilitätsprobe.

## 3. Kalibrierung

Für die Kalibrierung werden jeweils zweimal 50 µl der Standardlösungen S1 und S2 mit je ca. 5 µg/ml CcC injiziert. Weichen die um die Einwaage korrigierten Peakflächen der Lösungen S1 und S2 um mehr als 2,5 % von ihrem Mittelwert ab, so ist die Kalibrierung zu wiederholen. Anderenfalls dient der Mittelwert als 100 %-Standard.

## 4. Chromatographie der Proben P

Die Probelösungen werden zu 50 µl injiziert.

Berechnung des Gehaltes an CcC

Der Gehalt wird auf Grundlage der Standardlösungen S1 und S2 nach den folgenden Formeln berechnet:

1. Berechnung der korrigierten Peakflächen der Standardlösungen S1 und S2:

$$A_{Korr} = A_{gem} * \frac{EW_{theo}}{EW_{prak}} * \frac{100}{C_S}$$

2. Korrigierter Mittelwert der Peakflächen der Standardlösungen S1 und S2:

$$A_S = (A_{S1} + A_{S2}) * 0,5$$

3. Berechnung CcC Gehalt in der Stabilitätsprobe:

$$GH[\%] = \frac{A_P * \frac{EW_{theo}}{EW_{prak}}}{A_S} * 100$$

$A_{korr}$	korrigierte Peakfläche
$A_{gem}$	gemessene Peakfläche
$EW_{theo}$	Einwaage theoretisch
$EW_{prak}$	Einwaage praktisch
$C_S$	Gehalt der Standardsubstanz in %
$A_S$	Mittelwert der korrigierten Peakflächen der Standardlösungen S1 und S2
$A_{S1}$	Mittelwert der korrigierten Peakflächen der Standardlösung S1
$A_{S2}$	Mittelwert der korrigierten Peakflächen der Standardlösung S2
GH	Gehalt an CcC in %
$A_P$	Peakfläche der Probe

**2.4.3 Untersuchung der Stabilität von CcC in wässrigen Lösungen**

Die Stabilität von CcC in wässriger Lösung wurde unter dem Einfluss verschiedener pH-Werte und osmotisch wirksamer Zusätze untersucht. Eine detaillierte Aufstellung der pH- und Pufferkombinationen gibt Tabelle 2.9 wieder.

Tab. 2.9: Zusammensetzung der Medien zur Untersuchung der Stabilität von CcC

Milchsäurezusatz [%]	Freisetzungsmedium	Phosphat-Pufferlösung			
	pH 7,3	0,05 M pH 7,0	0,05 M pH 7,4	0,1 M pH 7,4	0,05 M pH 10,0
0	+	+	-	-	+
0,01	-	-	+	-	-
0,05	-	-	+	+	-
0,1	-	-	+	+	-
0,5	-	-	-	+	-
5	+	+	-	-	-
10	+	+	-	-	-
20	+	+	-	-	-

Die Zusammensetzung der verwendeten Phosphat-Pufferlösungen ist wiederum in der Tabelle 2.10 aufgeführt.

Tab. 2.10: Zusammensetzung der Phosphat-Pufferlösungen

Phosphat-Pufferlösung	0,05 M pH 7,0	0,05 M pH 7,4	0,1 M pH 7,4	0,5 M pH 7,4	0,05 M pH 10,0
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	15,6 g	1,36 g	2,72 g	13,6 g	1,36 g
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	-	5,39 g	10,78 g	53,9 g	5,39 g
Wasser für Injektionszwecke	ad 1000,0ml	ad 1000,0ml	ad 1000,0ml	ad 1000,0ml	ad 1000,0ml
pH-Wert-Einstellung mit	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O (43,89 g/l)	-	-	-	1M NaOH

Die Stabilitätsuntersuchungen erfolgten nach folgender Versuchsanordnung: (Tab. 2.11).

Tab. 2.11: Versuchsanordnung für Stabilitätsuntersuchungen unter Bedingungen der Polymererosion

Bedingungen	Parameter
Ansatzvolumen je Medium	3 Parallelansätze mit je 25 ml
Konzentration Probenansatz	500 µg/ml
Konzentration Prüflösung	5 µg/ml

Tab. 2.11: Fortsetzung

Bedingungen	Parameter
Gefäß	sterilisierte 30R-Injektionsflasche, Braunglas
Temperatur	37 °C
Versuchsvorrichtung	Schüttelinkubator mit 100 U/min
Probenahme [d]	0; 0,125; 1; 2; 4; 7; 14; 21
Entnahmenvolumen	je Parallelansatz 2 ml
CcC-Bestimmung	HPLC-Methode

Zu den festgelegten Zeiten wurden jeweils 2,0 ml aus den Injektionsflaschen entnommen und mittels einer HPLC-Methode der CcC-Gehalt darin bestimmt. Zur Gehaltsbestimmung der Stabilitätsproben wurden je Ansatz zwei Standardlösungen mitgeführt. Die Standardlösungen wurden über den Versuchszeitraum von 21 Tagen im Kühlschrank gelagert. Zu jeder Probennahme wurden ebenfalls die Standardlösungen analysiert.

#### **2.4.4 Untersuchung der Adsorption von CcC an der Polymeroberfläche**

Zur Untersuchung der Adsorptionserscheinungen von CcC an polymeren Oberflächen wurde CcC mit den ausgewählten Resomeren<sup>®</sup> R 202H, RG 752 und RG 502H im Freisetzungsmedium inkubiert. Dazu wurde die Modellsubstanz CcC im Freisetzungsmedium gelöst und das wasserunlösliche Resomer<sup>®</sup> (PLA bzw. PLGA) suspendiert. Da die Adsorption konzentrationsabhängig ist, wurde das Verhältnis CcC/Resomer<sup>®</sup> variiert (Tab. 2.12).

Tab. 2.12: Zusammensetzung der Mischungen zur Untersuchung der Adsorptionserscheinungen

Bestandteile	Mischung I	Mischung II
CcC	0,5 mg	0,05 mg
Polymergrundlage (R 202H, RG 752, RG 502 H)	94,5 mg	94,5 mg
Freisetzungsmedium	1,0 ml	1,0 ml

Die CcC-Gehaltsbestimmung erfolgte nach Filtration der Proben mittels HPLC. Die Versuchsanordnung hierzu ist anhand Tabelle 2.13 nachzuvollziehen.

Tab. 2.13: Versuchsanordnung zur Adsorptionsuntersuchung

Bedingungen	Parameter
Probenanzahl je Mischung	14 (2 Proben je Probenahme)
Probenahme nach [d]	0; 1; 2; 5; 7; 14; 21
Volumen je Probenahme	ca. 3 ml
Probengefäße	6R Injektionsflasche, Braunglas
Inkubationstemperatur	37 °C
Umdrehung	100 U/min
CcC-Bestimmung	HPLC-Methode
Filtration der Proben	Spritzenaufsatzfilter aus Celluloseacetat; 0,45 µm; Carl Roth GmbH

Zum Nachweis, dass infolge der Filtration kein Protein adsorbiert wird, wurde der Gehalt einer CcC-Lösung vor und nach der Filtration bestimmt. Der CcC-Gehalt der filtrierten Probe betrug 99,45 % im Vergleich zur unfiltrierten Probe.

#### 2.4.5 CcC-Stabilitätsuntersuchung

Für die Untersuchung der Lagerstabilität wurden je 10 g Resomer<sup>®</sup>-Formulierung basierend auf den Resomeren<sup>®</sup> R 202H bzw. RG 502H hergestellt. Beide Formulierungen wurden zu je neun Proben á 1,0g aufgeteilt (drei Probennahmen bei drei unterschiedlichen Temperaturen), in Injektionsflaschen gefüllt und verschlossen (Tab. 2.14). Zur Bestimmung des CcC-Gehaltes war eine Extraktion des Proteins aus der Formulierung notwendig. Die quantitative CcC-Bestimmung erfolgte UV-VIS spektralphotometrisch.

Tab. 2.14: Versuchsanordnung zur Stabilitätsuntersuchung

Bedingungen	Parameter
verwendete Polymergrundlage	Rezepturen basierend auf den Resomeren <sup>®</sup> R 202 H bzw. RG 502 H
Lagerbedingungen	Kühlschrank mit 2-8 °C Raumtemperatur (20-25 °C) Klima VI (30 °C, 60 % rH)
Gefäß	5R-Injektionsflasche, Braunglas
Probenahme [d]	0; 14; 28
Probenaufbereitung	Extraktion von CcC, Methode C

### 2.4.6 Extraktion von CcC aus der Resomer<sup>®</sup>-Formulierung

Zur CcC-Extraktion aus der Formulierung können verschiedene Methoden angewendet werden. Folgende Extraktionsmethoden wurden miteinander verglichen und durchgeführt.

#### 1. Wässrige Extraktion aus der Dichlormethanphase, Methode A1

In Tab. 2.15 ist die Vorgehensweise der CcC-Extraktion aus der organischen Polymer-Dichlormethanphase dargestellt (= Methode A1).

Tab. 2.15: Durchführung der CcC-Extraktion, Methode A1

Aufarbeitungsstufe
I: 200 mg Formulierung + 25,0 ml Dichlormethan in einem Scheidetrichter: Auflösen der Formulierung und CcC-Verteilung
II: dreimaliges Ausschütteln von CcC mit jeweils 8 ml 0,9 %ige Natriumchloridlösung,
III: CcC-Bestimmung UV-VIS Spektralphotometrisch, siehe 2.4.1

#### 2. Zentrifugation von CcC aus der gelösten Polymerphase, Methode A2

Nachfolgend wird die CcC-Extraktion mittels Zentrifugation aus der gelösten Polymerphase (=Methode A2) tabellarisch zusammengefasst (Tab. 2.16).

Tab. 2.16: Durchführung der CcC-Extraktion mittels Zentrifugation; Methode A2

Aufarbeitungsstufe
I: 200 mg Formulierung + 0,9 ml Dichlormethan in ein Zentrifugenglas: Auflösen der Formulierung und CcC-Verteilung
II Zugabe von 2,1 ml Aceton, Zentrifugation (5000 U/min)
III Abnahme des Überstandes, Rückstand mit jeweils 1 ml einer Mischung aus Dichlormethan und Aceton (3:1) waschen und zentrifugieren (5000 U/min)
IV Trocknung des Rückstandes im Trockenschrank bei 25 °C, 30 Minuten
V: Aufnahme des Rückstandes mit 0,9 %iger Natriumchloridlösung
VI: CcC-Bestimmung UV-VIS Spektralphotometrisch, siehe 2.4.1

#### 3. Hydrolyse des Polymers, Methode B

Eine weitere Möglichkeit CcC der Gehaltsbestimmung aus der Formulierung zuzuführen, ist die Hydrolyse der Polymermatrix (= Methode B). Die Durchführung dieser Methode ist in Tabelle 2.17 aufgeführt.

Tab. 2.17: Durchführung der Hydrolyse; Methode B

Aufarbeitungsstufe
I: 200 mg Formulierung in 25-ml Maßkolben ad 25,0 ml Mischung aus 0,1M NaOH und 5 % SDS: klare Lösung
II Schütteln, Ultraschallbad, 5 Minuten
III: CcC-Bestimmung UV-VIS Spektralphotometrisch, siehe 2.4.1

#### 4. Lösung in DMSO und Hydrolyse des Polymers, Methode C

Zur Beschleunigung der Hydrolyse kann die Methode wie folgt durchgeführt werden (= Methode C) (Tab. 2.18).

Tab. 2.18: Durchführung der Hydrolyse; Methode C

Aufarbeitungsstufe
I: 200 mg Formulierung + 4,0 ml DMSO in einem 25-ml-Maßkolben
II: ad 25,0 ml 0,05M NaOH/ 0,5 % SDS
III: CcC-Bestimmung UV-VIS spektralphotometrisch, siehe 2.4.1

## 2.5 Methoden zur Charakterisierung der Depotformulierung

### 2.5.1 Bestimmung der PEG-Abflutung

Es wurden drei verschiedene Rezepturen mit unterschiedlichem PEG-Gehalt hergestellt (Tab.2.19).

Tab. 2.19: Formulierungen zur Untersuchung des Einflusses des Polymeranteils auf die Freisetzung

10% RG 752/ PEG 400		15% RG 752/ PEG 400		20% RG 752/ PEG 400	
RG 752	0,200 g	RG 752	0,300 g	RG 752	0,400 g
PEG 400	1,800 g	PEG 400	1,700 g	PEG 400	1,600 g
Cytochrom C	0,012 g	Cytochrom C	0,012 g	Cytochrom C	0,012 g

Jeweils 1 g der Mischung wurde in 20 ml Freisetzungsmedium mit einer Omnifix® 2-ml-Spritze ohne Kanülenaufsatz gespritzt und bei 37 °C aufbewahrt. Zu definierten Probezeiten wurde das gebildete Implantat vorsichtig entnommen, in ein Wägegglas überführt und bei Raumtemperatur im Exsikkator 24 h lang getrocknet. Das Gewicht des getrockneten Implantates wurde bestimmt und anschließend in 10,0 ml Aceton unter kräftigem Schütteln gelöst. Das CcC ist in Aceton nicht löslich. Die Probe wurde filtriert und der PEG-Gehalt des Filtrates bestimmt.

Parameter der GC-Chromatographie:

<i>Gerät:</i>	GC 13 Hewlett Packard
<i>Detektion:</i>	FID 1 B
<i>Säule:</i>	DB - (9678021B) 14,6 x 0,324 mm/0,25 µm
<i>Injektionsvolumen:</i>	1 µl (0,5 ml Ist + 0,5 ml Probe)
<i>Interner Standard:</i>	1-Decanol
<i>Trägergas:</i>	Helium
<i>Druckprogramm:</i>	30 (2,5) → 60 kPa/min → 150 (4,5)
<i>Temperatur:</i>	310 // 140 (2,5) → 60 °C/min → 320 (4,5) // 350

**2.5.2 Freisetzungsuntersuchung**

In vitro Freisetzungsprofile von CcC-haltigen in situ Implantaten wurden nach folgendem Schema ermittelt: Zur Ausformung des in situ Implantates wurden ca. 500 mg der Resomer<sup>®</sup>-Formulierung in 2,0 ml FreisetzungsmEDIUM in eine 6R Injektionsflasche gespritzt (Abb.2.1). Dabei wurde die Spritze vor und nach dem Injizieren der Formulierung gewogen, um das Implantatgewicht zu ermitteln. Während des Einspritzens durfte die Spritze nicht in das FreisetzungsmEDIUM eintauchen, um vorzeitige Ausfällungen zu vermeiden. Die Freisetzungsuntersuchung erfolgte nach folgender Versuchsanordnung (Tab. 2.20). Der Medien austausch erfolgte zu den angegebenen Probenahmezeiten mit Hilfe von Eppendorf-Pipetten (Eppendorf Euroset 2,5 ml). Auszutauschendes FreisetzungsmEDIUM und Pipetten wurden hierfür auf 37 °C temperiert. Das entnommene MEDIUM musste aufgrund der Trübung durch Polymerpartikel filtriert werden.

Tab. 2.20: Versuchsanordnung zur Freisetzungsuntersuchung

Bedingungen	Parameter
CcC-Konzentration FreisetzungsmEDIUM	Sink-Bedingungen
Zusammensetzung des FreisetzungsmEDIUMs	Natriumlaurylsulfat 2,5 g; Natriumazid 0,2 g; Aqua purificata ad 1000,0 ml
Volumen des FreisetzungsmEDIUMs	2,0 ml
Gefäß	6R-Injektionsflasche, Klarglas
Temperatur	37 °C

Tab. 2.20: Fortsetzung

Bedingungen	Parameter
Drehvorrichtung	Schüttelinkubator mit 100 U/min
Austauschvolumen	2,0 ml
Probennahme [d]	0,04; 1; 2; 4; 7
Probenanzahl	6
Filtration Probe	Spritzenaufsatzfilter aus Celluloseacetat; 0,45 µm; Carl Roth GmbH & Co.
CcC-Bestimmung	UV-VIS Spektroskopie

## 2.6 Sterilisationsverfahren

### 2.6.1 Verfahren und Geräte

Die nachfolgende Tabelle gibt eine Übersicht über die bewerteten Sterilisationsverfahren, die eingesetzten Geräte und den Standort des Gerätes (Tab 2.21).

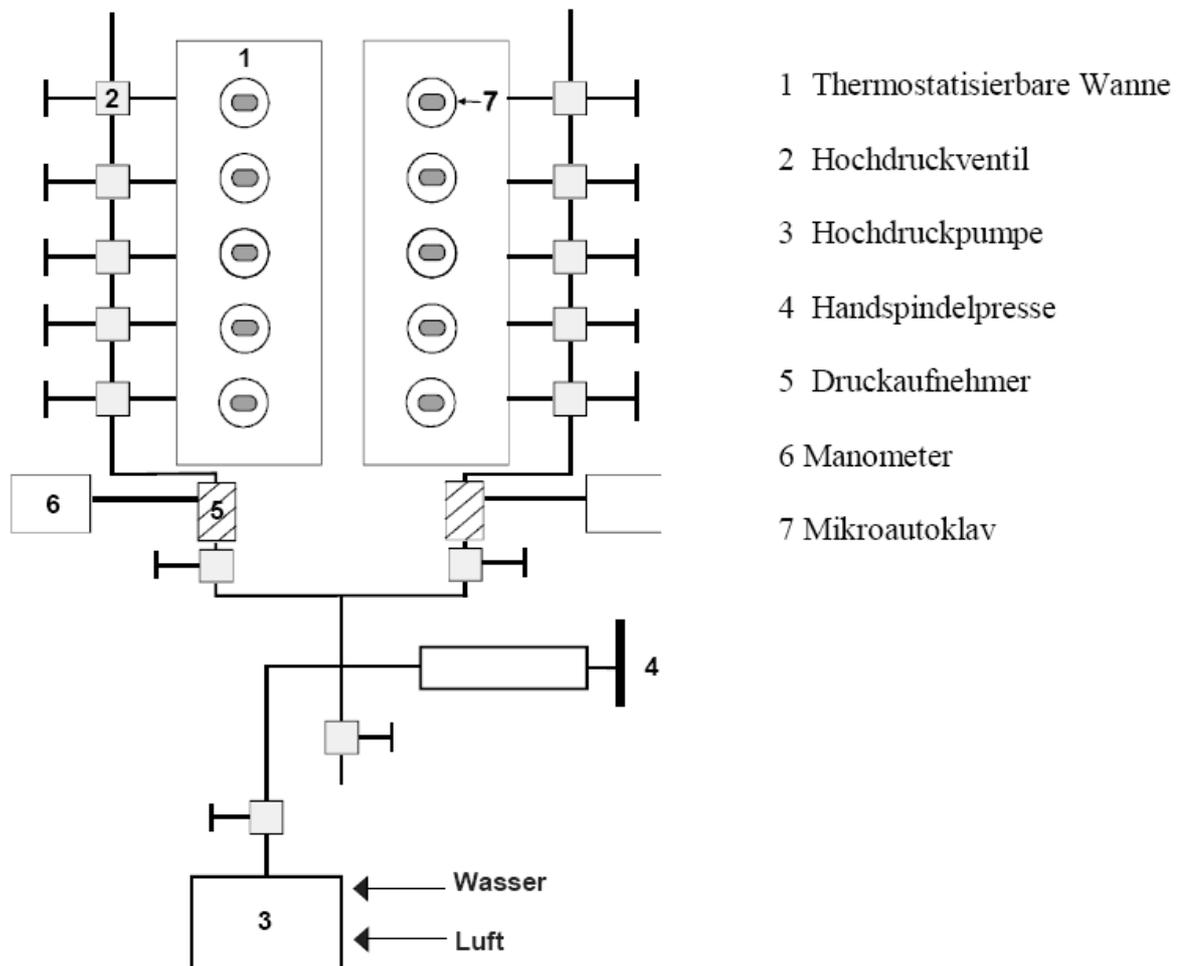
Tab.2.21: Sterilisationsverfahren, eingesetzte Geräte und Standort

Verfahren	Gerät	Standort des Gerätes	Primärpackmittel
Autoklaven- behandlung	Durchreichautoklav ADV-666/2F	Jenapharm GmbH & Co.KG	5 ml Klarglasampullen
Heißluft- sterilisation	Memmert 600 SPS oder Reinraum- Heißluftsterilisator NTSFD 75/100-300°C	Jenapharm GmbH & Co.KG	5 ml Klarglasampullen
Strahlen- sterilisation	<sup>60</sup> Co-Quelle	Isotron Deutschland GmbH	5R Klarglas Injektionsflaschen
Mikrowellen- behandlung	Ethos 1600	Microwave-Laboratory- Systems (MLS), Leutkirch	5 ml Klarglasampullen
Hochdruck- behandlung	Hochdruckkammer von „Dunze Hochdrucktechnik“	Universität Heidelberg Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie	sterile Polyethylenbeutel
	Mini Foddlab FPG5620	Universität Halle Institut für Pharma- zeutische Technologie und Biopharmazie	sterile PP-Röhrchen mit Schraubdeckel

Die Geräte, die für die Standardverfahren genutzt wurden, waren qualifiziert und entsprachen den GMP-Anforderungen, welche beim Einsatz in der Herstellung von parenteralen Injektionsformen bestehen.

Da auf dem deutschen Markt keine Mikrowellengeräte mit einer Leistung von 5 kW, wie sie beispielsweise in Japan durchaus eingesetzt werden, verfügbar sind, wurde für die Untersuchungen ein Industriemikrowellengerät der Firma MLS eingesetzt. Solche Geräte finden vor allem in der präparativen Chemie Anwendung. Von allen Proben wurde mit einem IR-Thermometer der Temperaturverlauf während der Behandlung im Mikrowellengerät aufgenommen. Die Proben wurden während der Behandlung permanent über den Kopf gedreht (ca. 3 Sekunden pro Umdrehung). Dies bewirkte eine homogene Erwärmung der ganzen Ampulle einschließlich ihres Inhaltes.

Die Hochdruckapparatur, die an der Universität Heidelberg eingesetzt wurde, ist schematisch in nachfolgender Abbildung dargestellt (Abb. 2.4). Die Behandlung der Proben erfolgte in thermostatisierbaren Kammern, die in Reihe angeordnet sind. Der Druck wurde über eine Hydraulikpumpe der Firma Wepuko, Typ P 160-5-1-100, erzeugt. Das den Druck übertragende Medium war ein Gemisch aus Wasser und Glykol. Die Proben wurden in flexiblen Polyethylenschläuchen eingeschweißt und in die Druckkammern, die mit druckübertragendem Medium gefüllt waren, eingebracht. Vor der Druckbehandlung wurden die Proben in der Hochdruckanlage temperiert. Der Druckaufbau erzeugte in der Probe einen Temperaturanstieg (10-15 °C bei 5 kbar), der jedoch relativ schnell durch die Thermostatisierung wieder ausgeglichen wurde.

Abb.2.4: Schematische Darstellung der Hochdruckapparatur <sup>119</sup>

In nachfolgender Tabelle sind die Sterilisationsbedingungen, die für die einzelnen Untersuchungen gewählt wurden, aufgeführt (Tab 2.22).

Tab.2.22: Sterilisationsverfahren, gewählte Parameter, eingesetzte Geräte und Primärpackmittel

Verfahren	Bedingungen	Beschreibung der Probe	Primärpackmittel
Autoklaven- behandlung	Temperatur: 121 °C Zeit: 20 min	Resomer <sup>®</sup> -Lösungen Resomer <sup>®</sup> -Formulierung zur Matrixbewertung	5 ml Klarglasampullen, geschlossen
	Temperatur: 121 °C Zeit: 15 min	Resomer <sup>®</sup> -Formulierung zur Bewertung der CcC-Stabilität	5 ml Klarglasampullen, geschlossen
Heißluft- sterilisation	Temperatur: 180 °C Zeit: 30 min und andere Temperatur-Zeit- Kombinationen	Resomere <sup>®</sup> Resomer <sup>®</sup> -Lösungen zur Matrixbewertung	5 ml Klarglasampullen, geschlossen

Tab. 2.22: Fortsetzung

Verfahren	Bedingungen			Beschreibung der Probe	Primärpackmittel	
Strahlensterilisation	<sup>60</sup> Co-Quelle Dosis: 25 kGy Temperatur: Raumtemperatur			Resomere <sup>®</sup> Resomer <sup>®</sup> -Lösungen Resomer <sup>®</sup> -Formulierung zur Matrixbewertung und CcC-Stabilität	5R-Klarglasinjektionsflaschen, Gummistopfen, Bördelekappe	
Mikrowellenbehandlung	Leistung: 1 kW Temperatur: 100 °C Aufheiz- und Haltezeit: 300 s			Resomer <sup>®</sup> -Lösungen Resomer <sup>®</sup> -Formulierung zur Matrixbewertung	5 ml Klarglasampullen, geschlossen	
	Leistung: 1 kW Temperatur: 140 °C Haltezeit: 15 s Aufheizzeit: 50-100 s			Resomer <sup>®</sup> -Lösungen Resomer <sup>®</sup> -Formulierung zur Matrixbewertung und CcC-Stabilität		
	Leistung: 1 kW Temperatur: 160 °C Haltezeit: 15 s Aufheizzeit: 50-100 s			Resomer <sup>®</sup> -Lösungen Resomer <sup>®</sup> -Formulierung zur Matrixbewertung und CcC-Stabilität		
Hochdruckbehandlung	Temperatur: 50 °C Druck: ca. 7 kbar Zeit: 60 min			Resomere <sup>®</sup> Resomer <sup>®</sup> -Lösungen Resomer <sup>®</sup> -Formulierung zur Matrixbewertung und CcC-Stabilität*	sterile Polyethylenbeutel	
	Temp. (°C)	Druck (kbar)	Zeit (min)	Proben zur Prüfung auf Sterilität*	sterile Polyethylenbeutel	
	*Gerät: Universität Heidelberg	50	6,8			60
	**Gerät: Universität Halle	50	2			10
			4			10
			6			10
	70	2	10			
		4	10			
		6	10			
	20-41	2	10			Proben zur Prüfung der Keimreduzierung**
4-49	4	10				
8-56	6	10				

### **2.6.2 Prüfung auf Sterilität**

Aufarbeitung der Proben: Die sterilisierten Resomer<sup>®</sup>-Lösungen (2 g) wurden in 5 ml steriles Wasser in einem Mahlbecher der Schwingmühle MM301 (Retsch GmbH) gegeben. Das Resomer<sup>®</sup> koagulierte bzw. verfestigte sich zu einem festen Gebilde (Implantat). Zwei Zirkoniumkugeln wurden in den Becher gegeben. Das Implantat wurde 3 Minuten bei 30 Schwingungen/ Minute gemahlen. Der Prozess wurde unter aseptischen Bedingungen durchgeführt.

Sterilitätstest: Der Sterilitätstest des gemahlenden Implantats (Resomer<sup>®</sup>-Suspension) wurde nach der Membranfiltrationsmethode entsprechend Ph. Eur. 2.6.1 durchgeführt. Die Millipore-Einheit TZhVAB210 wurde zur Filtration genutzt. Die Filtereinheit wurde dreimal mit Peptonwasser gewaschen. Die Prüfung auf Sterilität wurde im Reinraum, Klasse A durchgeführt.

### **2.6.3 Partikelgrößenanalyse**

Die Partikelgrößenanalyse des gemahlenden Implantates wurde mit dem Partikelgrößenanalyser HELOS, H0445 (Sympatec GmbH) durchgeführt and die Summenverteilung bestimmt. Es wurde eine zweifach Bestimmung durchgeführt.

## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Die Modellformulierung: in situ Implantat

#### 3.1.1 Beschreibung der Modellformulierung

Zur Untersuchung und Bewertung der Sterilisierbarkeit von bioabbaubaren Depot-Injektionsformen wurden die in situ Implantate als Modellformulierung gewählt<sup>1,59</sup>. Hierbei handelt es sich um ein System, bei welchem die Eigenschaften der PLA bzw. PLGA genutzt werden, in verschiedenen Lösungsmitteln wie PEG 400<sup>32</sup>, Polyvinylalkohol, Dimethylsulfoxid<sup>36,37</sup> oder Triacetin<sup>31</sup> löslich zu sein. Die Ausformung des Implantates findet in situ statt. In dieser Arbeit wurden in Anlehnung an das Patent „Verfahren zur Herstellung eines Implantates“ die bioabbaubaren Polymere (PLA oder PLGA) in PEG 400 gelöst<sup>32</sup>. Der entscheidende Vorteil des Lösungsmittels PEG 400 ist die parenteral gute Verträglichkeit. Der Wirkstoff liegt in der Polymer-Lösung gelöst oder suspendiert vor. Wird dieses System in ein wässriges Milieu injiziert, kommt es zu einer spontanen Ausbildung eines festen Implantates, dem so genannten in situ Implantat (Abb. 3.1).

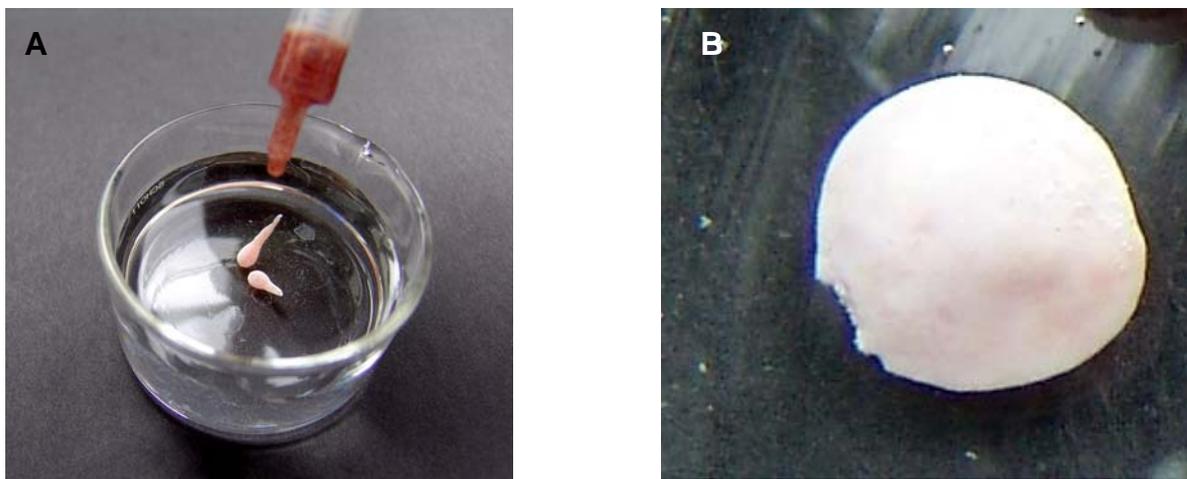


Abb. 3.1: Einbringen der PLA/ PLGA-Formulierung in wässriges Milieu (A) und Ausformung des in situ Implantates (B, gezoomt)<sup>120</sup>

Der Wirkstoff wird dabei in dem sich ausbildenden Implantat eingeschlossen. Es entsteht eine Arzneiform mit verzögerter Wirkstofffreigabe<sup>2,31,32,36,59,121</sup>. Die Präzipitation der nicht wasserlöslichen PLA oder PLGA zu einem festen Implantat wird durch die Wasserlöslichkeit und die Abflutung des Lösungsmittels in das umliegende Gewebe bedingt<sup>122</sup>. Der Ausformungsprozess ist in nachfolgender Abbildung schematisch dargestellt (Abb.3.2).

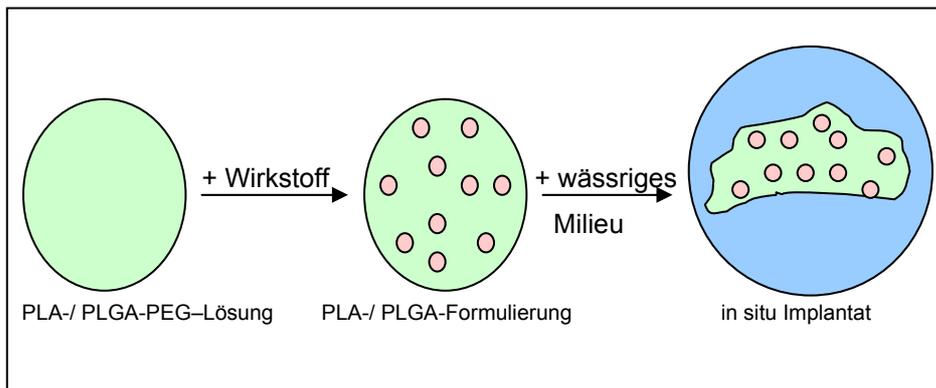
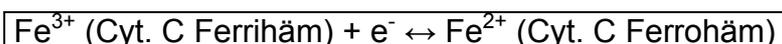


Abb. 3.2: Herstellung einer PLA/ PLGA-Formulierung und anschließende Ausformung zum in situ Implantat

### 3.1.2 Die Modellsubstanz Cytochrom C

Mit der Entwicklung von parenteralen Depotsystemen wie beispielsweise der in situ Implantate wird das Ziel verfolgt, konstante Plasmaspiegel an Wirkstoffen wie den problembehafteten Peptiden und Proteinen über mehrere Wochen hinweg erreichen zu können. Langzeitwirkungen sind natürlich nur bei hoher Wirkstärke und einer angemessenen therapeutischen Breite möglich. Zur Charakterisierung der Depotwirkung werden häufig auch Modellproteine wie beispielsweise verschiedene Albumine<sup>35,123-126</sup> oder Cytochrom C (CcC)<sup>31,55,121</sup> verwendet. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde ein Modell gewählt, das die Eigenschaften hochpotenter Wirkstoffe besitzt und gut zugänglich ist. In Cytochrom C<sup>127,128</sup> wurden die gewünschten Eigenschaften, wie gute Einarbeitbarkeit in eine Formulierung, Wasserlöslichkeit, einfacher spektrophotometrischer Nachweis, vergleichbare Charakteristika mit therapeutisch interessanten Proteinen wie z.B. Interleukinen oder Interferonen, vorgefunden. Eine nicht unbedeutende Rolle spielte bei der Auswahl auch der Preisvorteil des CcC gegenüber therapeutisch verwendeten Proteinen.

CcC ist ein natürliches Hämoprotein der Atmungskette und kommt in den Mitochondrien aller eukaryotischen Zellen, besonders aber in der Herzmuskulatur vor. Das membrangebundene Enzym gehört zu den Redoxkatalysatoren und ist durch den Wertigkeitswechsel des im Häm gebundenen Eisenions für die Elektronenübertragung in der Atmungskette sowie im Stoffwechsel vieler Bakterien mit verantwortlich<sup>127</sup>.



In der Atmungskette ist CcC am letzten Schritt, also bei der Übertragung der Elektronen auf den Sauerstoff, beteiligt. Je nach Herkunft sind über 100 verschiedene Formen mit unterschiedlichen Aminosäuresequenzen bekannt<sup>129</sup>. Unabhängig von der Herkunft und der Kettenlänge ist bei allen CcC-Molekülen das

Häm an der gleichen Stelle der Polypeptid-Kette über Thioethergruppen gebunden<sup>127,128</sup>. Häm bezeichnet einen Eisen-Porphyrin-Koordinationskomplex, in dem das Eisenion reduziert als  $\text{Fe}^{2+}$  vorliegt. Dies ist die prosthetische Gruppe des CcC und für dessen rote Farbe verantwortlich. Das Häm wird im Innern durch hydrophobe Aminosäuren abgeschirmt, wo hingegen die hydrophil geladenen Reste die polare Peripherie bilden<sup>128</sup>. Dies bedingt die gute Löslichkeit in Wasser. CcC ist aufgrund des hohen Lysingehaltes von 18 % ein basisches Protein mit einem isoelektrischen Punkt von pH 10<sup>128</sup>. Im festen Zustand ist eine ausreichende Stabilität aufgrund der Hydrolyseempfindlichkeit nur bei einer lichtgeschützten Lagerung zwischen -20 °C und 0 °C gewährleistet. Der optimale pH-Bereich im Hinblick auf die Stabilität liegt bei 10, allerdings weist das Protein in diesem Fall seine geringste Löslichkeit auf, da am isoelektrischen Punkt das Molekül ungeladen vorliegt und somit eine Hydratation nur bedingt möglich ist. Im sauren pH-Bereich muss mit einer Abnahme der Stabilität und der Bildung von Abbauprodukten gerechnet werden. Um den Einfluss der Modellformulierung auf die Stabilität von CcC beurteilen zu können, wurden Untersuchungen über das Verhalten des Proteins bei solchen Bedingungen, die während der *in vitro* und *in vivo* Freisetzung und der Erosion der Polymermatrix auftreten können, durchgeführt.

### 3.1.3 Auswahl der Polymermatrix (verwendete Polymere)

Alle zur Herstellung der *in situ* Implantate verwendeten Poly(laktide) und Poly(laktid-co-glykolide) wurden von der Firma Boehringer Ingelheim bezogen, die diese unter dem Handelsnamen RESOMER<sup>®</sup> vertreiben (Tab. 3.1).

Tab. 3.1: verwendete Resomere<sup>®</sup>

Resomer <sup>®</sup>	Polymerzusammensetzung	Endgruppe	Molekulargewicht [Da]
RG 752	Poly(D,L-laktid-co-glykolid) 75:25	verestert	17 000
R 202H	Poly(D,L-laktid)	frei	11 000
RG 502	Poly(D,L-laktid-co-glykolid) 50:50	frei	14 100
RG 502H	Poly(D,L-laktid-co-glykolid) 50:50	verestert	8 000
RG 503H	Poly(D,L-laktid-co-glykolid) 50:50	frei	28 000
RG 503	Poly(D,L-laktid-co-glykolid) 50:50	verestert	48 000

Die Typenbezeichnung (Nomenklatur) der Resomere<sup>®</sup>, z.B. RG 752, ist in Tabelle 3.2 dargestellt (Tab. 3.2)<sup>118</sup>.

Tab. 3.2: Nomenklatur der Resomere<sup>®</sup> (Beispiel Resomer<sup>®</sup> RG 752)

Nomenklatur	Eigenschaft
R	Hergestellt aus racemischen D,L-Laktiden
G	Hergestellt aus Glykoliden
75	Anteil der Laktide z.B. 75 %
2	Bereich der inhärenten Viskosität z.B. ca. 0,2 dl/g *

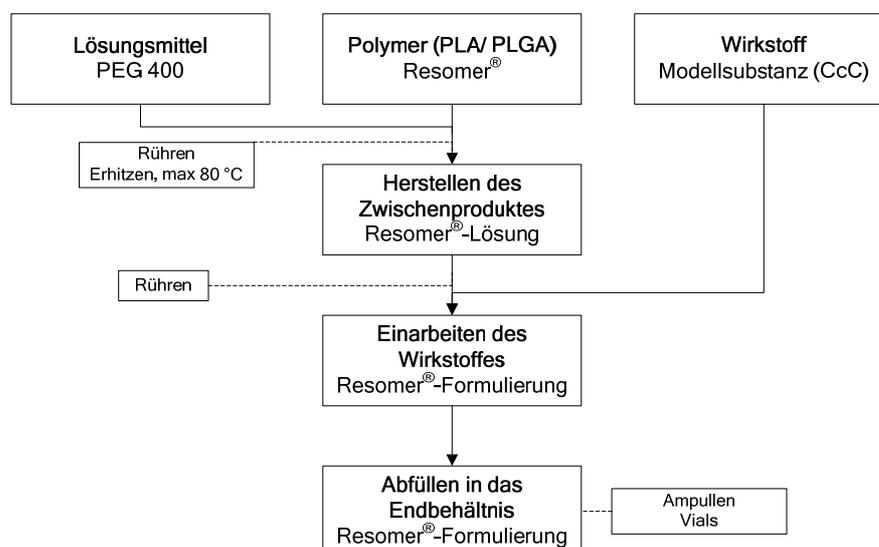
\* Das entspricht etwa einem Molekulargewicht von 10-20 kDa<sup>118</sup>.

Alle Resomere mit dem Anhang „H“ in der Bezeichnung sind hydrophilere Varianten der Polymere, bei welchen die endständigen Carboxylgruppen nicht mit Alkoholen verestert sind.

Für die vorliegende Arbeit wurden Vertreter der PLA- und PLGA-Polymere, die sich im Monomerenanteil, aber auch im Säuregruppenenschutz und Molekulargewicht unterscheiden, modellhaft ausgewählt (Tab. 3.1).

### 3.1.4 Herstellung einer in situ Formulierung

Im nachfolgenden Fließschema ist der Herstellungsprozess einer in situ Formulierung dargestellt (Abb. 3.3). Zunächst wird aus dem Lösungsmittel PEG 400 und dem matrixbildenden Polymer die Resomer<sup>®</sup>-Lösung hergestellt. Der Polymeranteil kann zwischen 10 % und 25 % in Abhängigkeit von der Löslichkeit und der Spritzbarkeit der Formulierung liegen<sup>120</sup>. In einem zweiten Herstellungsschritt wird die Modellsubstanz, CcC, in der Lösung suspendiert. Es liegt dann die Resomer<sup>®</sup>-Formulierung vor, aus der sich bei Applikation ins wässrige System letztlich das in situ Implantat bildet.

Abb.3.3: Fließschema zur Herstellung einer Resomer<sup>®</sup>-Formulierung

Die entscheidende Voraussetzung für die Anwendbarkeit einer solchen parenteralen Arzneiform ist deren Sterilität. Die Auswahl eines geeigneten Sterilisationsverfahrens richtet sich in erster Linie nach dem zu sterilisierenden Gut. Dabei sollte grundsätzlich immer eine Sterilisation des Endproduktes angestrebt werden<sup>63,64</sup>. Zunächst ist einmal zwischen thermostabilen und thermolabilen Produkten zu unterscheiden. Bei den zu untersuchenden Resomer<sup>®</sup>-Formulierungen, die mit Proteinen beladen sind, handelt es sich um thermolabile Formulierungen<sup>65,68,69</sup>. Das bedeutet, dass die thermischen Standardverfahren wie Dampfdruck- und Hitzesterilisation hier nicht oder nur eingeschränkt angewandt werden können<sup>12</sup>. Häufig werden in der Polymertechnologie deshalb  $\gamma$ -Strahlen zur Sterilisation eingesetzt<sup>71</sup>. Die anzuwendende Dosis von 25 kGy führt zur Radikalbildung im Polymer und/oder im Protein<sup>73,130-133</sup>. Umfangreiche Untersuchungen und die sorgfältige Wahl von Polymer und Wirkstoffart sind dazu notwendig, um den Abbau der Matrix und des Wirkstoffes bei Strahlensterilisation in geringen, reproduzierbaren Maßen zu halten. Daher wird zur Herstellung von mit Proteinen beladenen Resomer<sup>®</sup>-Formulierungen die technologisch sehr aufwendige und damit preisintensive aseptische Herstellung eingesetzt<sup>70</sup>.

Trotz des thermo- und strahlensensitiven Charakters der zu untersuchenden Resomer<sup>®</sup>-Formulierungen war die Zielstellung dieser Arbeit, eine Sterilisation im Endbehältnis entsprechend der Forderung nach der EMEA-Guideline<sup>63,64</sup> anzustreben. Daneben wurden aber auch alternative, in der Literatur beschriebene Verfahren betrachtet. An erster Stelle sei hier die aus der Lebensmittelindustrie bekannte Hochdruckinaktivierung genannt<sup>86</sup>. Hierzu liegen eine Reihe von Veröffentlichungen von H. Ludwig et al. vor<sup>103,104,107,134,135</sup>. Dabei wurden grundlegende Untersuchungen, wie beispielsweise die Inaktivierung einer hochdruckunempfindlichen Spore von *Bacillus subtilis*, zur Etablierung eines solchen Verfahrens durchgeführt<sup>106</sup>. Aber auch der Einfluss der Hochdruckinaktivierung auf die Stabilität von thermo- und strahlensensitiven Formulierungen wie Liposomen oder PLGA-Stiften werden anhand dieser Untersuchungen beschrieben<sup>104</sup>. Liposomen, eine sehr empfindliche Arzneiform, war über einen längeren Zeitraum hinweg bei einem Druck bis zu ca. 2,5 kbar stabil<sup>104</sup>. H. Ludwig untersuchte auch das Molekulargewicht von PLGA vor und nach der Hochdruckinaktivierung, wobei es hier zu keiner Änderung kam<sup>103</sup>. Auf der Grundlage dieser ersten Untersuchungen soll die

Anwendbarkeit der Hochdruckinaktivierung zur Sterilisation einer Resomer<sup>®</sup>-Formulierung im Rahmen dieser Arbeit eingehend geprüft werden.

Eine weitere bedeutende Methode zur Sterilisation von hitze- und strahlenlabilen Formulierungen ist die Mikrowellensterilisation. Die Mikrowellensterilisation ist bereits im Japanischen Arzneibuch für wässrige Lösungen oder flüssige Arzneistoffe zugelassen<sup>79</sup>. Dabei wird mit leistungsstarken Geräten (5 kW) und einer Frequenz von 2,5 kHz gearbeitet. Im Vergleich dazu sei erwähnt, dass gewöhnliche Haushaltsmikrowellen lediglich zu einer Leistung von 0,9 – 1 kW fähig sind. Die wässrigen Ampullenpräparate werden mit validierten Verfahren über einen Zeitraum von ca. 45 s mit den Mikrowellen zur Sterilisation bestrahlt<sup>77,78,90,136</sup>. Auf der Grundlage der Erfahrungen mit der Mikrowellen-Sterilisation in Japan und Untersuchungen von Gröning et al. über die Behandlung von PEG 300 und Rizinusöl<sup>137</sup> sollte die Anwendbarkeit des Verfahrens auf Resomer<sup>®</sup>-Formulierungen bewertet werden.

In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluss der Standard-Sterilisationsverfahren nach Ph. Eur.<sup>60</sup> im Vergleich zu den alternativen Methoden auf die Stabilität der Matrixbildner, die Resomere<sup>®</sup>, und auf die Formulierungseigenschaften hin geprüft. Dazu werden im folgenden Abschnitt zunächst verschiedene Methoden zur Charakterisierung des Modells vorgestellt und die Stabilität der PLA bzw. PLGA sowie der Modellsubstanz CcC unter den gewählten Untersuchungsbedingungen bewertet.

## **3.2 Untersuchungen zur Charakterisierung des Modells**

### **3.2.1 Methoden zur Charakterisierung der Resomere<sup>®</sup>**

#### *3.2.1.1 Bestimmung der Säurezahl*

Die Säurezahl (SZ) gibt an, wieviel Milligramm Kaliumhydroxid zur Neutralisation der in 1 g Substanz vorhandenen freien Säuren notwendig sind<sup>60</sup>. Im Fall der Polyester, der Resomere<sup>®</sup>, ist die SZ eine Maßzahl über die Anzahl freier Säuregruppen. Je größer die Änderung der SZ ist, desto wahrscheinlicher ist die Spaltung der Resomer<sup>®</sup>-Ketten durch Verseifungsreaktionen (Abb. 3.4). Damit kann die Angabe der SZ dazu dienen, Aussagen über den Abbau der Resomere<sup>®</sup> treffen zu können<sup>133,138</sup>.

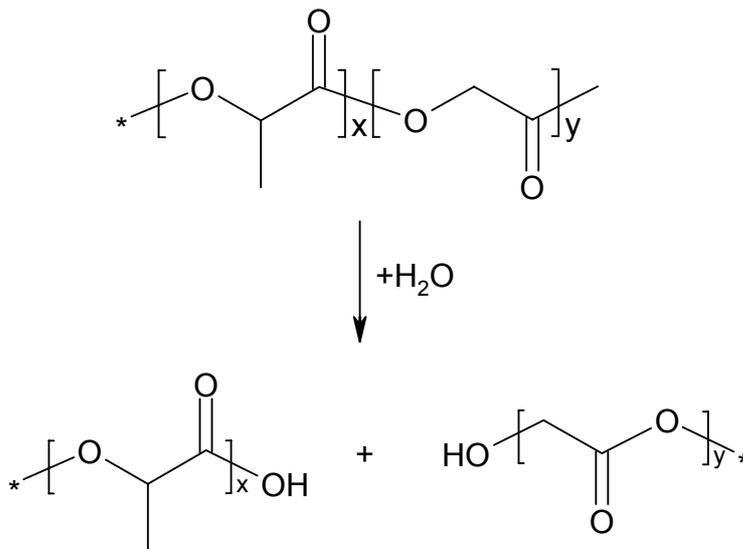


Abb. 3.4: Verseifungsreaktionen der Resomere<sup>®</sup>, die zum Anstieg der SZ führen können

### 3.2.1.2 Bestimmung der Molmassen und -verteilung

Bei den Polymeren, wie beispielsweise den Resomeren<sup>®</sup>, handelt es sich um ein Gemisch verketteter Monomere unterschiedlicher Kettenlänge und damit auch unterschiedlicher Molmassen. Die wichtigste chromatographische Charakterisierungsmethode für Polymere stellt die Gelpermeationschromatographie (GPC) dar, die auch Gelfiltration (GFC) oder Ausschlusschromatographie (englisch: size-exclusion chromatography, SEC) genannt wird<sup>139-141</sup>. Das Prinzip der GPC beruht auf der Trennung der in einem geeigneten Lösungsmittel gelösten Polymere infolge der unterschiedlichen Eindringmöglichkeiten und -dauer in die Poren der stationären Phase. Die Elution erfolgt vor allem in Abhängigkeit von der Größe der Moleküle und damit vom Molekulargewicht. Kleinere Moleküle können dabei in die Poren eindringen, während größere Moleküle nicht in die Poren hinein diffundieren können, d.h. größere Moleküle werden schneller eluiert als kleinere. Dieser sehr spezielle Trennmechanismus ermöglicht erst die Bestimmung der für alle Polymere wichtigen Molmassenverteilung oder Polydispersität (PD). Polymere sind häufig heterodispers, d.h. sie haben unterschiedliche Kettenlängen und umfassen einen mehr oder weniger breiten Massenbereich. Dies kann durch die zahlenmittlere Molmasse  $M_n$ , die gewichtsmittlere Molmasse  $M_w$  und die Polydispersität  $D$  ( $M_w/M_n$ ) beschrieben werden. Dabei wird  $M_n$  stärker durch die Polymerfraktion mit der niedrigeren Molmasse,  $M_w$  dagegen stärker durch die Fraktion mit der hohen Molmasse beeinflusst.

### 3.2.1.3 Bestimmung der inhärenten Viskosität

Neben der oder alternativ zur GPC-Methode ist die Bestimmung der intrinsischen Viskosität (auch Grenzviskosität) ein genutztes Verfahren zur Charakterisierung des Molekulargewichtes. Die intrinsische Viskosität  $[\eta]$  stellt eine charakteristische Kenngröße von gelösten Polymeren dar<sup>142-144</sup>. Häufig wird die inhärente Viskosität  $\eta_{\text{inhärent}}$ , die auf ein bestimmtes Lösungsmittel mit einer definierten Polymerkonzentration bezogen ist, angegeben. Sie ist einfach über Viskositätsmessungen von Polymerlösungen zu bestimmen und daher im technischen Bereich ein häufig genutzter Parameter zur Charakterisierung von Polymeren. Der Bestimmung der inhärenten Viskosität liegt die Annahme zu Grunde, dass sich bei einer stark verdünnten Lösung die Moleküle unabhängig voneinander bewegen. Somit ist in diesem Grenzbereich die Viskosität proportional der mittleren Molmasse. Als Maß für die Änderung des Molekulargewichtes kann deshalb die inhärente Viskosität herangezogen werden.

### 3.2.1.4 Bestimmung der thermischen Eigenschaften

Eine weitere wichtige Charakterisierungsmöglichkeit bioabbaubarer Polymere ist die Bestimmung der Kristallinität.

Die Kristallinität der Polymere beeinflusst entscheidend ihre physikalischen Eigenschaften und ihr Verhalten, vor allem ihre Abbaucharakteristik<sup>112,145</sup>. Während der Herstellung, Sterilisation und Lagerung von Implantaten und Mikropartikeln sowie der Polymere selbst kann sich die Kristallinität verändern. Daher ist der Bestimmung der Kristallinität große Aufmerksamkeit zu schenken. Bestimmungsmethoden hierfür sind beispielsweise die Pulverdiffraktometrie und die modulierte Differential Scanning Calorimetry (mDSC)<sup>21</sup>.

Für die Herstellung injizierbarer Depotformulierungen werden in der Regel amorphe Polymere eingesetzt, da kristalline Polymere aufgrund ihrer hohen Ordnungsstruktur zu langsam abgebaut werden<sup>2</sup>. Amorphe Polymere weisen im Gegensatz zu den kristallinen Polymeren mit definiertem Schmelzpunkt eine sogenannte Glasübergangstemperatur ( $T_g$ ) auf. Sie gibt diejenige Temperatur an, die den Übergang von dem festen Glaszustand in den kautschukelastischen (gummiartigen) Zustand beschreibt<sup>146</sup>. Da dieser Übergang durch eine Änderung der Wärmekapazität (Enthalpie) gekennzeichnet ist, kann die Glasübergangstemperatur mittels DSC bestimmt werden<sup>147</sup>.

Bei der DSC wird der Wärmestrom gemessen, der erforderlich ist, um die Probe und die Referenz auf identischer Temperatur zu halten. Der Wärmestrom ist ein direktes Maß für die Wärmekapazität einer Substanz<sup>148</sup>.

Eine Abnahme der Glasübergangstemperatur ist immer auch mit einer Abnahme/Änderung des Molekulargewichtes eines Polymeres verbunden<sup>142,149-151</sup>.

### **3.2.2 Charakterisierung der Modellformulierung**

#### *3.2.2.1 Stabilität der Resomere<sup>®</sup> in der Modellformulierung*

Bei der ausgewählten Modellformulierung liegen die Resomere<sup>®</sup> gelöst vor und sind damit Abbaureaktionen besser zugänglich. PLA und PLGA sind Polyester, die unter dem Einfluss von Wasser hydrolytisch gespalten werden können<sup>19,151,152</sup>. Da in PEG 400 immer geringe Spuren von Wasser zu finden sind, sollte mit den nachfolgend beschriebenen Untersuchungen die Stabilität von PLA am Beispiel von Resomer<sup>®</sup> R 202H und die von PLGA am Beispiel von Resomer<sup>®</sup> RG 752, beide gelöst in PEG 400, bewertet werden. Dazu wurden die Resomer<sup>®</sup>-Lösungen jeweils bei Raumtemperatur (20-25 °C) und im Kühlschrank (2-8 °C) eingelagert und die Molmassen (zahlenmittlere  $M_n$  und gewichtsmittlere  $M_w$ ) der Polymere mittels GPC bestimmt. Die Ergebnisse der Stabilitätsprüfung sind in Tabellen 3.3 und 3.4 dargestellt.

Tab. 3.3:  $M_w$ ,  $M_n$  und  $D$  von RG 752, gelöst in PEG 400 in Abhängigkeit von der Lagertemperatur und -zeit ( $x, n = 2$ )

Lagertemperatur	Raumtemperatur (~23 °C)				
Zeit [d]	Start	1	6	12	20
$M_w$ [g/mol]	14071	13680	12510	11299,5	10241
$M_n$ [g/mol]	8310	7909	7499	6932	6376
$D (M_w/M_n)$	1,693	1,730	1,668	1,668	1,606
Lagertemperatur	Kühlschrank (2-8 °C)				
Zeit [d]	Start	1	6	12	20
$M_w$ [g/mol]	14071	13969	13947	13950	13635
$M_n$ [g/mol]	8310	8031	8191	8333	8195
$D (M_w/M_n)$	1,693	1,739	1,703	1,674	1,664

Tab. 3.4:  $M_w$ ,  $M_n$  und  $D$  von R 202H, gelöst in PEG 400 in Abhängigkeit von der Lagertemperatur und -zeit ( $x, n=2$ )

Lagertemperatur	Raumtemperatur (~23 °C)				
Zeit [d]	Start	1	6	13	20
$M_w$ [g/mol]	10067	9741	9523	9754	10066
$M_n$ [g/mol]	7065	6988	7136	7083	7458
$D (M_w/M_n)$	1,425	1,394	1,335	1,377	1,350
Lagertemperatur	Kühlschrank (2-8 °C)				
Zeit [d]	Start	1	6	13	20
$M_w$ [g/mol]	10067	9833	9967	9491	10136
$M_n$ [g/mol]	7065	6868	7075	7042	7320
$D (M_w/M_n)$	1,425	1,432	1,409	1,348	1,385

Das Homopolymer R 202H, gelöst in PEG 400, zeigte keine Veränderungen von  $M_w$  und  $M_n$  über den Untersuchungszeitraum bei Raum- und Kühlschranktemperatur. Demgegenüber wurden die Werte für  $M_w$  und  $M_n$  für das Copolymer RG 752, in PEG 400 gelöst, bei Lagerung unter Raumtemperatur reduziert. Bei Einlagerungsbeginn wurden für  $M_w$  14071 g/mol bestimmt, nach 20tägiger Lagerung bei Raumtemperatur waren es nur noch 10241 g/mol. Das lässt darauf schließen, dass RG 752, in PEG 400 gelöst, abgebaut wird.

Über den untersuchten Zeitraum von 20 Tagen hinweg ist die Geschwindigkeit der Abnahme von  $M_w$  nahezu konstant geblieben (Abb. 3.5).

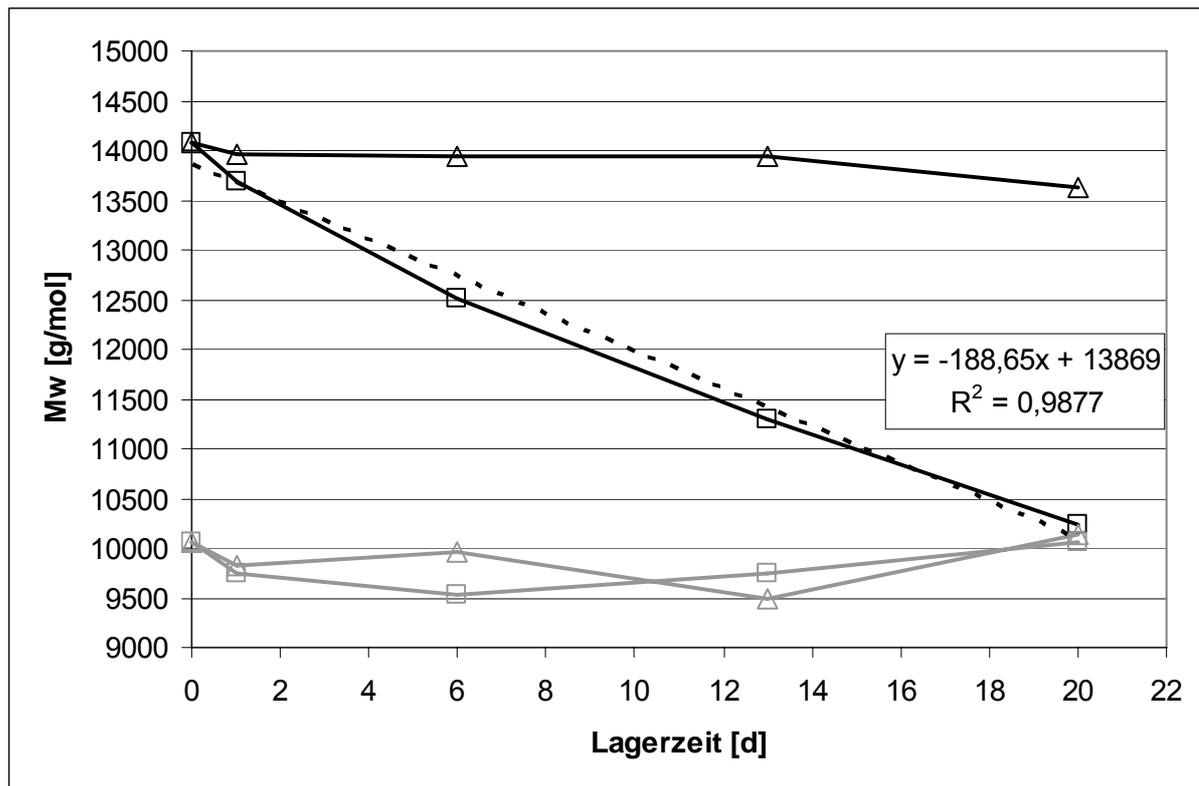


Abb. 3.5:  $M_w$  von RG 752 (schwarz) und R 202H (grau) gelöst in PEG 400 in Abhängigkeit von der Lagerzeit bei (Δ) Kühlschranks- und (□) Raumtemperaturlagerung ( $x, n = 2$ ); - - - Trendlinie (linear) zum Abbau von RG 752 bei Raumtemperatur

Unter der Annahme, dass die Hydrolyse des Polyesters RG 752 als Reaktion pseudo-nullter Ordnung verläuft, kann die Halbwertszeit nach ( $t^{1/2} = C_0 (M_w) * 0,5 * k^{-1}$ ), also die Zeit, in der 50 % vom Ausgangsmolekulargewicht  $M_w$  reduziert wurden, berechnet werden. Die mittlere Molmasse  $M_w$  von RG 752, gelöst in PEG 400, hätte sich nach 37 Tagen Lagerung bei Raumtemperatur auf die Hälfte reduziert.

Somit ist in der Formulierungsentwicklung und Untersuchung solcher Resomer<sup>®</sup>-Formulierung die eingeschränkte Stabilität des Copolymeres RG 752 zu berücksichtigen. Die Resomer<sup>®</sup>-Formulierungen müssen bei 2-8 °C gelagert werden.

### 3.2.2.2 Untersuchung der Formulierungen in Abhängigkeit vom Polymeranteil

Die ausgewählten Resomer<sup>®</sup>-Formulierungen sind viskose Zubereitungen, die an den Wirkungsort, z.B. unter die Haut, appliziert werden sollen. Die Spritzbarkeit der Polymerlösungen ist dabei Voraussetzung für die Anwendbarkeit der Formulierung<sup>120</sup>. Nachfolgend wurde die Viskosität in Abhängigkeit vom PLGA-Anteil bestimmt (Tab. 3.5). Die Untersuchung wurde modellhaft mit einer RG 752-PEG-Lösung in verschiedenen Konzentrationsstufen durchgeführt.

Tab. 3.5: Abhängigkeit der Viskosität\* vom Polymeranteil der RG 752-Lösung (n = 1)

Formulierung	Wasser	RG 752-Anteil in der Formulierung [%]				
		0 (PEG 400)	10	15	20	30
Viskosität $\eta$ [mPas]	0,94	117	544	585	1304	3418
Spritzbarkeit	ja	ja	ja	ja	ja	nein

\* bestimmt mit Rotationsviskosimeter RS600, bei 20 °C, Scherrate  $\dot{\gamma}$  150 s<sup>-1</sup>

Mit Polymeranteilen zwischen 5 % und 20 % ist die RG 752-Lösung spritzbar und bildet ein Implantat. Unterhalb von 5 % bildet sich kein festes, zusammenhängendes Implantat. Oberhalb von 20 % konnte die Resomer<sup>®</sup>-Lösung aufgrund der hohen Viskosität nicht mehr gespritzt werden (Tab. 3.5). Die Untersuchungen zur Spritzbarkeit in Bezug auf die Resomer<sup>®</sup>-Konzentration können jedoch nicht verallgemeinert werden, sondern stellen lediglich eine Richtgröße dar, da höher molekulare Resomere<sup>®</sup> bereits im unteren Konzentrationsbereich (10 % Polymer) stark viskose Lösungen ausbilden. Des Weiteren ist die Löslichkeit der Resomere<sup>®</sup> in PEG 400 vom Polymertyp abhängig<sup>120</sup>. Kristalline Homopolymere wie L 104 lösen sich nur unter Erwärmung und im unteren Konzentrationsbereich (max. bis 10 % Polymer) im Solvent.

Das Polymerverhältnis hat nicht nur Einfluss auf die Viskosität und damit Spritzbarkeit der Formulierung, sondern auch auf die Ausformungseigenschaften, die Abflutung des Lösungsmittels PEG 400 und das Freisetzungverhalten der in situ Implantate. In der Abbildung 3.6 ist die Freisetzung der Modellsubstanz CcC und die PEG-Abflutung in Abhängigkeit von der Zeit für zwei Konzentrationsverhältnisse (10 % und 20 %) des Resomers<sup>®</sup> RG 752 in der Formulierung dargestellt.

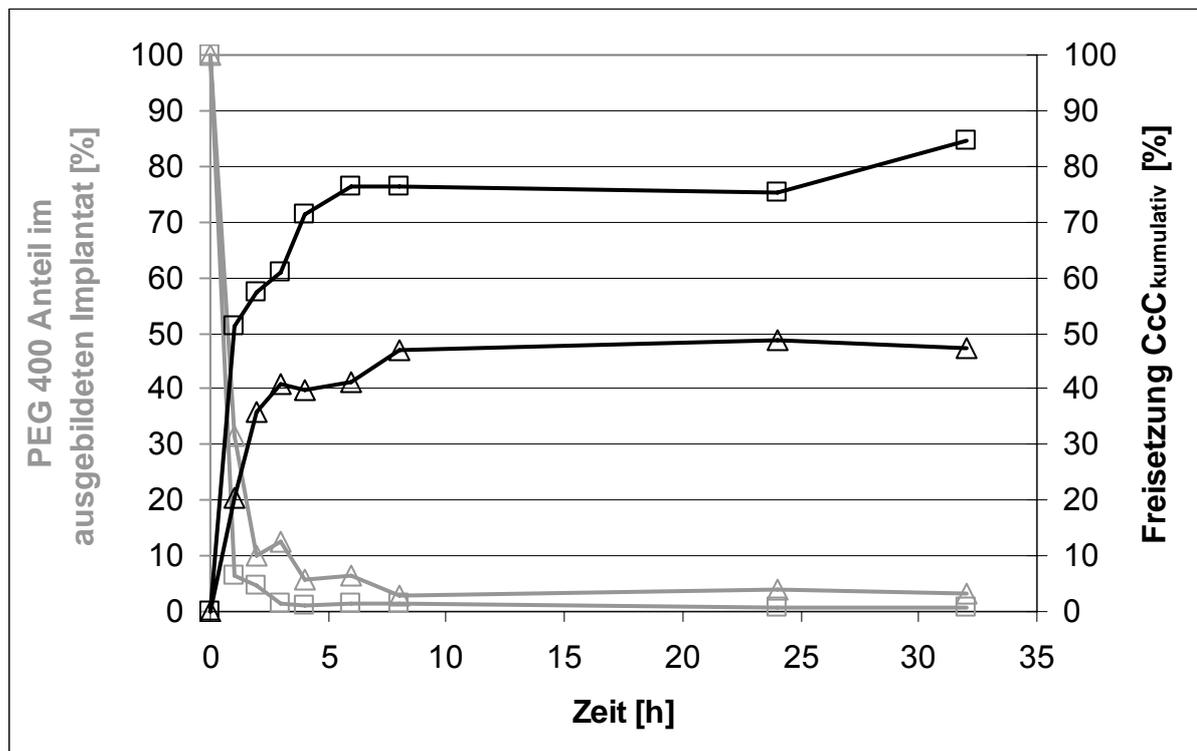


Abb. 3.6: PEG 400 Anteil im ausgebildeten Implantat und CcC-Freisetzung in Abhängigkeit von der Zeit für die RG 752-Formulierung mit 10 % RG 752-Anteil (□) und 20 % RG 752-Anteil (Δ) (x, n = 2)

Zur Bestimmung der Lösungsmittel-Abflutung wurde der PEG-Anteil im sich ausbildenden Implantat in Abhängigkeit von der Zeit mittels GC bestimmt. In der Formulierung mit 10 % RG 752-Anteil waren nach einer Stunde nur noch 6,5 % PEG, im Implantat hingegen mit 20 % Polymer-Anteil noch 31 % PEG nachweisbar (Abb. 3.6). Die PEG-Abflutung in das wässrige Medium erfolgte für den geringeren Polymeranteil wesentlich rascher. Diese Ergebnisse wurden durch die Beobachtungen bestätigt, dass sich nach dem Einspritzen der Resomer<sup>®</sup>-Formulierung in das Freisetzungsmittel die Ausbildungsdauer der Implantate mit steigendem Polymeranteil verkürzt. Bei 20 % RG 752 in der Formulierung verfestigte sich das Implantat bereits fünf Minuten nach der Injektion, sichtbar als weißes Gebilde. Nach vier Stunden war das Implantat fest. Bei der RG 752-Formulierung mit 10 % Polymeranteil war nach einer Stunde ein glasiges Gebilde beobachtbar, nach sechs Stunden war das Implantat verfestigt.

Vergleichend zur Untersuchung der PEG-Abflutung wurde die CcC-Freisetzung bestimmt (Abb. 3.6). Der CcC-Initialburst nach Injektion der RG 752-Formulierung betrug 51 % CcC für das in situ Implantat mit 10 % RG 752, während das in situ Implantat mit 20 % RG 752 nur noch ca. 20 % CcC freisetzte. Die Ergebnisse korrelieren mit den Resultaten zur PEG-Abflutung. Die Modellsubstanz CcC wurde

mit der Ausschwemmung des Lösungsmittels PEG 400 während der Ausformung des Implantates abtransportiert, ein hoher Initialburst an CcC resultierte daraus. Mit steigendem Polymeranteil wurde das Implantat schneller ausgebildet, weniger PEG flutete ab und damit wurde mehr PEG und CcC in das sich ausformende Implantat eingeschlossen. Der Initialburst kann durch Erhöhung des Polymeranteiles in der Formulierung reduziert werden.

### 3.2.3 Charakterisierung der Modellsubstanz CcC

Kenntnisse zur Stabilität von CcC sind von grundlegender Bedeutung, um Untersuchungsergebnisse, z.B. in vitro Freisetzung, beurteilen zu können. In der Literatur werden hauptsächlich Angaben zur Lagerung und Verarbeitung der Substanz gemacht<sup>127,128</sup>. Für die Entwicklung einer Formulierung werden Daten benötigt, die Aufschluss über das Verhalten des Proteins CcC unter Bedingungen geben, die in der Polymermatrix, während der Freisetzung und des Abbaus der Polymere auftreten und sich negativ auf die Stabilität auswirken können. Dabei hat der pH-Wert des umgebenden Mediums Einfluss auf die Stabilität<sup>153</sup>.

#### 3.2.3.1 Stabilität von CcC in wässrigen Lösungen

Zunächst wurde die Stabilität von CcC im ausgewählten Freisetzungsmedium, welches in allen Untersuchungen eingesetzt wurde, im Vergleich zu Wfl, 0,05 M Phosphat-Pufferlösungen von pH 7,0 und pH 10,0 untersucht (Tab. 3.6).

Tab.3.6: Übersicht zu den wässrigen Versuchsmedien

Medium	pH-Wert	Zusätze
Wasser für Injektionszwecke (Wfl)	7,1	keine
Freisetzungsmedium (FSM)	7,3	0,25% NDS 0,02% NaN <sub>3</sub>
Phosphat-Pufferlösung 0,05 M	7,0	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O
	10,0	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O

Für folgende Stabilitätsuntersuchungen wurde CcC zu 500 µg/ml in das jeweilige Medium eingebracht und bei 37 °C inkubiert. Dabei entsprach die Konzentration von 500 µg/ml der maximalen Menge an CcC, die bei den Freisetzunguntersuchungen bei Applikation von 500 mg Resomer<sup>®</sup>-Formulierungen in 2 ml Freisetzungsmedium vorliegen können. Die gewählte Temperatur entsprach den physiologischen Bedingungen. Nach zuvor definierten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und

der CcC-Gehalt mittels HPLC bestimmt. Das Abbauverhalten von CcC in den verschiedenen wässrigen Medien ist in Abbildung 3.7 dargestellt.

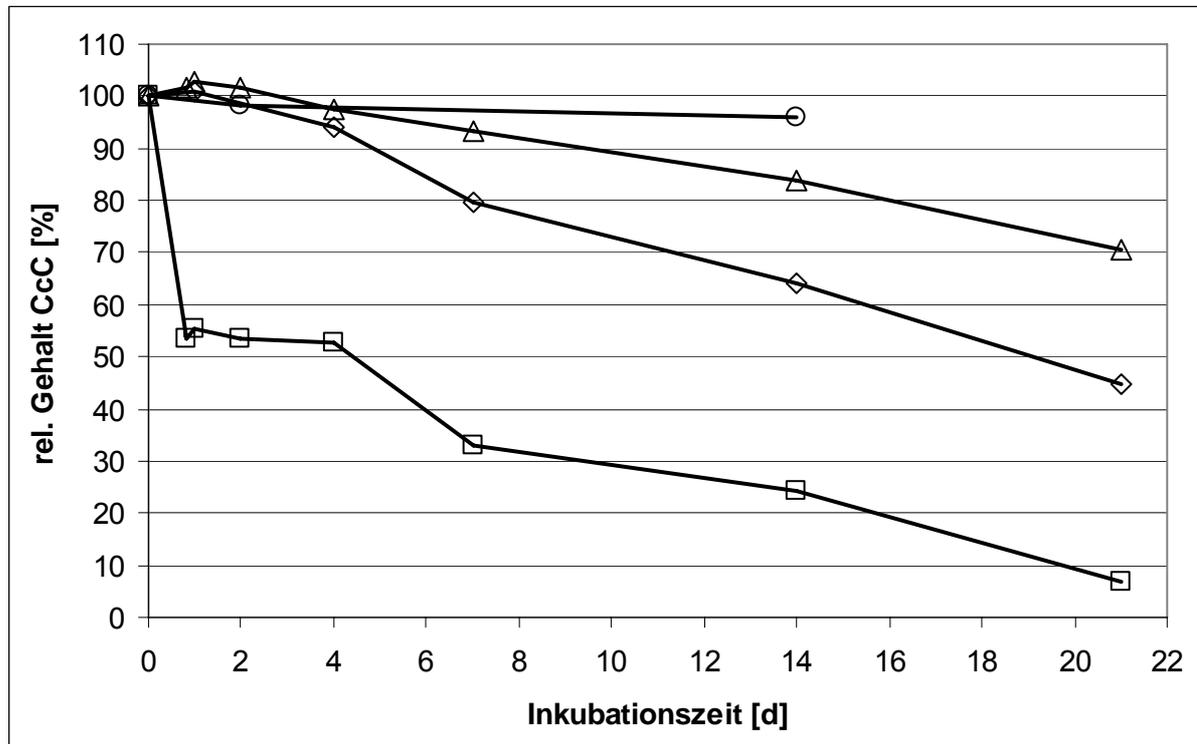


Abb. 3.7: CcC–Gehalt in Abhängigkeit von der Inkubationszeit in verschiedenen Medien (x, n = 3)

- Wfl
- ◇ Freisetzungsmedium
- △ Puffer pH 7
- Puffer pH 10

Der Abbau von CcC in Wfl war im Vergleich zu den Phosphat-Puffern pH 7 bzw. 10 und dem Freisetzungsmedium am stärksten ausgeprägt. Bereits nach 20 Stunden konnten nur noch 50 % des eingesetzten Proteins in der Lösung nachgewiesen werden. Der Vergleich der Stabilität von CcC in den Phosphat-Puffern, die sich nur hinsichtlich des pH-Wertes unterscheiden, machte deutlich, dass CcC am isoelektrischen Punkt bei pH 10 am stabilsten ist. Nach 14 Tagen befanden sich im Puffer pH 10 noch nahezu 100 % des Proteins unverändert in der Lösung, während im Phosphat-Puffer pH 7 zu dieser Zeit nur noch 85 % CcC in der Lösung vorlagen. Die Stabilität von CcC im Freisetzungsmedium war für die ersten sieben Tage mit der im Phosphat-Puffer pH 7 zu vergleichen, der Verlust an Protein in der Lösung war gering. Nach siebentägiger Inkubation im Freisetzungsmedium konnte jedoch ein zunehmender Stabilitätsverlust von CcC beobachtet werden, nach 21 Tagen betrug der CcC-Gehalt in Lösung nur noch 50 %. Neben dem pH-Wert scheinen auch die Ionenstärke und –art in Bezug auf die Stabilität von CcC eine Rolle zu spielen, da

sich die pH-Werte des Wfl mit 7,1, des Phosphat-Puffers mit pH 7,0 und des Freisetzungsmediums mit pH 7,3 geringfügig voneinander unterscheiden.

Um die Milchsäurefreisetzung und die Auswirkung auf den CcC-Gehalt zu simulieren, die während des Abbaus der Polymermatrix auftritt, wurde Milchsäure in verschiedenen Konzentrationen zur Phosphat-Pufferlösung 0,05 M pH 7,4 zugesetzt (Tab. 3.7).

Tab. 3.7: pH-Wert von Freisetzungsmedium und Phosphat-Puffer vor und nach Milchsäurezusatz

Milchsäure-zusatz [%]	Phosphat-Pufferlösung 0,05 M
	pH-Wert
0	7,4
0,01	7,2
0,05	6,9
0,1	6,6

In Abbildung 3.8 ist der CcC-Gehalt von Phosphat-Pufferlösungen, versetzt mit unterschiedlichen Mengen an Milchsäure (0,01 % bis 0,1 %), in Abhängigkeit von der Lagerzeit dargestellt.

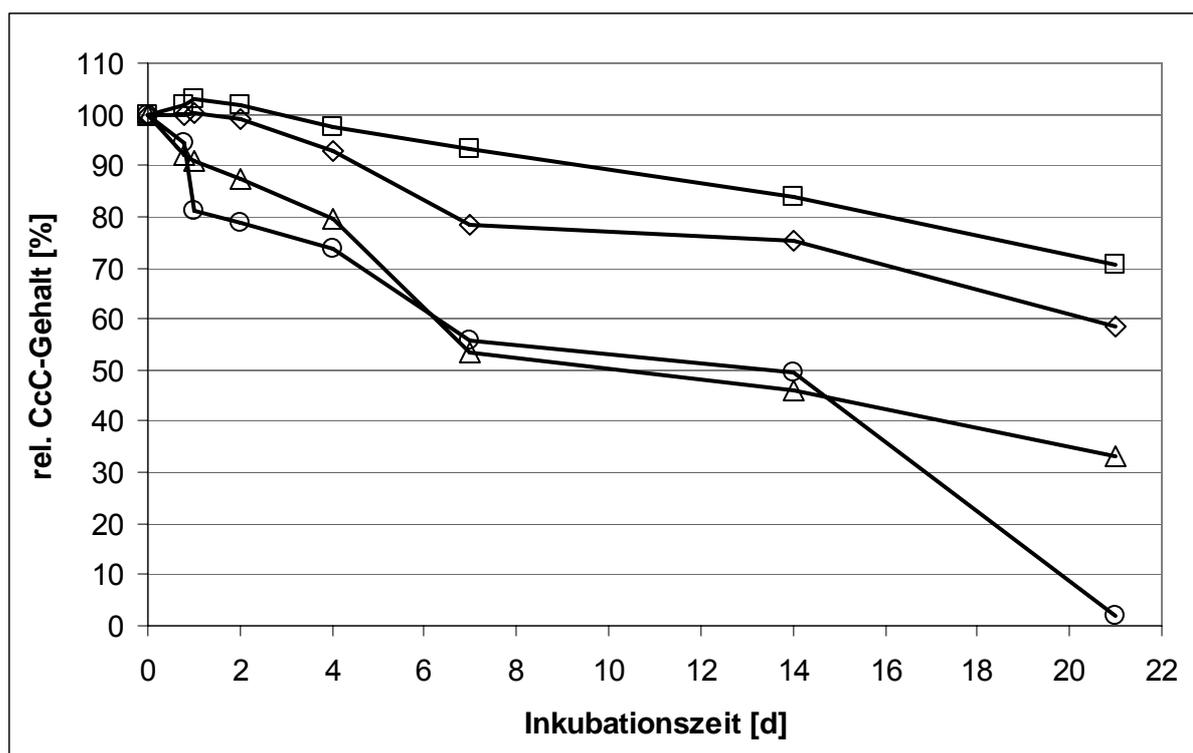


Abb. 3.8: CcC-Gehalt in Phosphat-Pufferlösungen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (x, n = 3)

- Phosphat-Pufferlösung 0,05 M pH 7,4
- ◇ 0,01 % Milchsäure in Phosphat-Pufferlösung (pH 7,2)
- △ 0,05 % Milchsäure in Phosphat-Pufferlösung (pH 6,9)
- 0,1 % Milchsäure in Phosphat-Pufferlösung (pH 6,6)

In allen Lösungen nahm der CcC-Gehalt ab. Dabei war der CcC-Verlust in Lösung umso geringer, je weniger Milchsäure dem Phosphat-Puffer zugesetzt wurde

und je geringer die pH-Verschiebung und die Erhöhung der Ionenstärke war. Die aus dem Milchsäurezusatz resultierenden pH-Werte stellten sich über die gesamte Versuchsdauer zwischen pH 6,6 (0,1 % Milchsäure) und pH 7,2 (0,01 % Milchsäure) ein. Bei Zusatz von nur 0,01 % Milchsäure gleicht der CcC-Abbau über die Versuchsdauer dem Abbau bei dem reinen Phosphatpuffer. Hingegen war der CcC-Verlust bei Zusatz von 0,05 % und 0,1 % Milchsäure im Vergleich zur Phosphatpuffer-Lösung erhöht, wobei es kaum einen Unterschied zwischen 0,05 % und 0,1 % Milchsäurezusatz gab. In allen Proben traten spätestens nach sieben Tagen makroskopische Zeichen der Aggregation, wie weiße gallertartige Flocken, auf.

Wie bereits diskutiert, hat neben dem pH-Wert auch die Ionenstärke Einfluss auf den Aggregationsprozess. In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Pufferkapazität erhöht, so dass die zugesetzte Milchsäure nur zu geringfügigen pH-Änderungen führte. In Abbildung 3.9 sind die Ergebnisse der CcC-Stabilität in einem Phosphat-Puffer der Kapazität 0,1 M mit und ohne Milchsäurezusatz aufgezeigt.

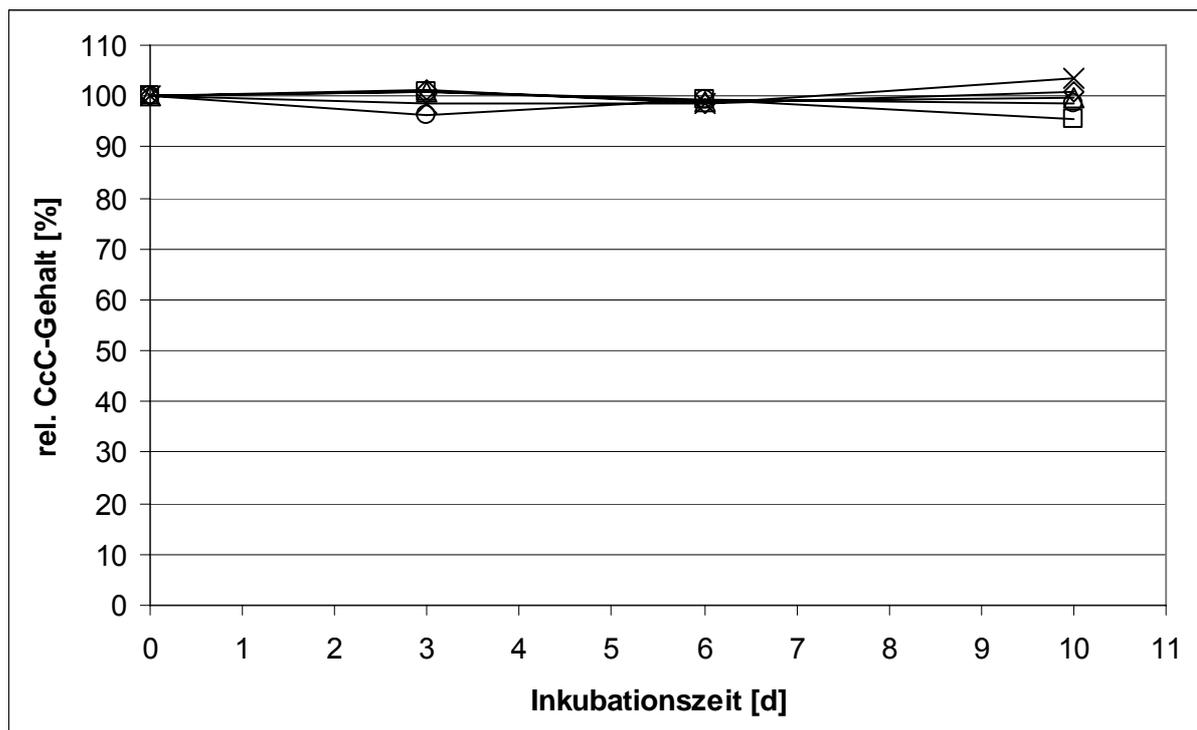


Abb. 3.9: CcC-Gehalt in Phosphat-Pufferlösungen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (x, n = 3)

- Phosphat-Pufferlösung 0,1 M pH 7,4
- ◇ 0,01 % Milchsäure in Phosphat-Pufferlösung (pH 7,3)
- △ 0,05 % Milchsäure in Phosphat-Pufferlösung (pH 7,2)
- o 0,1 % Milchsäure in Phosphat-Pufferlösung (pH 7,1)
- x 0,5 % Milchsäure in Phosphat-Pufferlösung (pH 6,1)

Nach zehn Tagen Inkubation von CcC in Phosphat-Pufferlösung erhöhter Pufferkapazität waren noch mehr als 95 % unabhängig vom Milchsäurezusatz nachweisbar. Bis zum Ende der Inkubation waren keine sichtbaren Zeichen von Aggregation zu finden. Das Ergebnis lässt auf einen stabilisierenden Effekt der Ionenstärke schließen. Bereits in der Literatur wird darauf hingewiesen, dass Salze zu einer Löslichkeitsverbesserung von Proteinen beitragen können<sup>154</sup>. Damit wird bestätigt, dass neben dem pH-Wert auch die Ionenstärke und –art Einfluss auf die Stabilität von Proteinen haben. Die Stabilitätsproben wurden mittels HPLC nicht nur auf Abnahme des CcC-Gehaltes, sondern auch auf mögliche auftretende Abbauprodukte hin untersucht. Zur Gehaltsbestimmung wurden die Proben von 500 µg/ml auf eine Konzentration von 5 µg/ml verdünnt. In diesen Proben konnten keine Abbaupeaks detektiert, sondern nur ein Gehaltsverlust an CcC festgestellt werden. Die entstandenen Abbauprodukte lagen wahrscheinlich unter der Nachweisgrenze. Zur Detektion von Zersetzungsprodukten wurden die Proben von 500 µg/ml auf 100 µg/ml verdünnt. Entstandene Abbauprodukte waren nachweisbar.

Bei Inkubation von CcC in 0,05 M Phosphatpuffer von pH 7,4 und 1 % Milchsäurezusatz war bereits nach drei Tagen ein zweiter Peak im Abstand von etwa drei Minuten zum Hauptpeak zu finden (Abb. 3.10). Nach sieben Tagen war dieser Abbaupeak fast dreifach so groß, der CcC-Peak war kleiner geworden. Die detektierbare Gesamtfläche von Haupt- und Abbaupeaks zusammen nahm ebenfalls ab. Zum einen kann der Responsefaktor der entstehenden Abbauprodukte im Vergleich zum CcC geringer sein, zum anderen ist dieser Verlust mit den Aggregationsprozessen erklärbar.

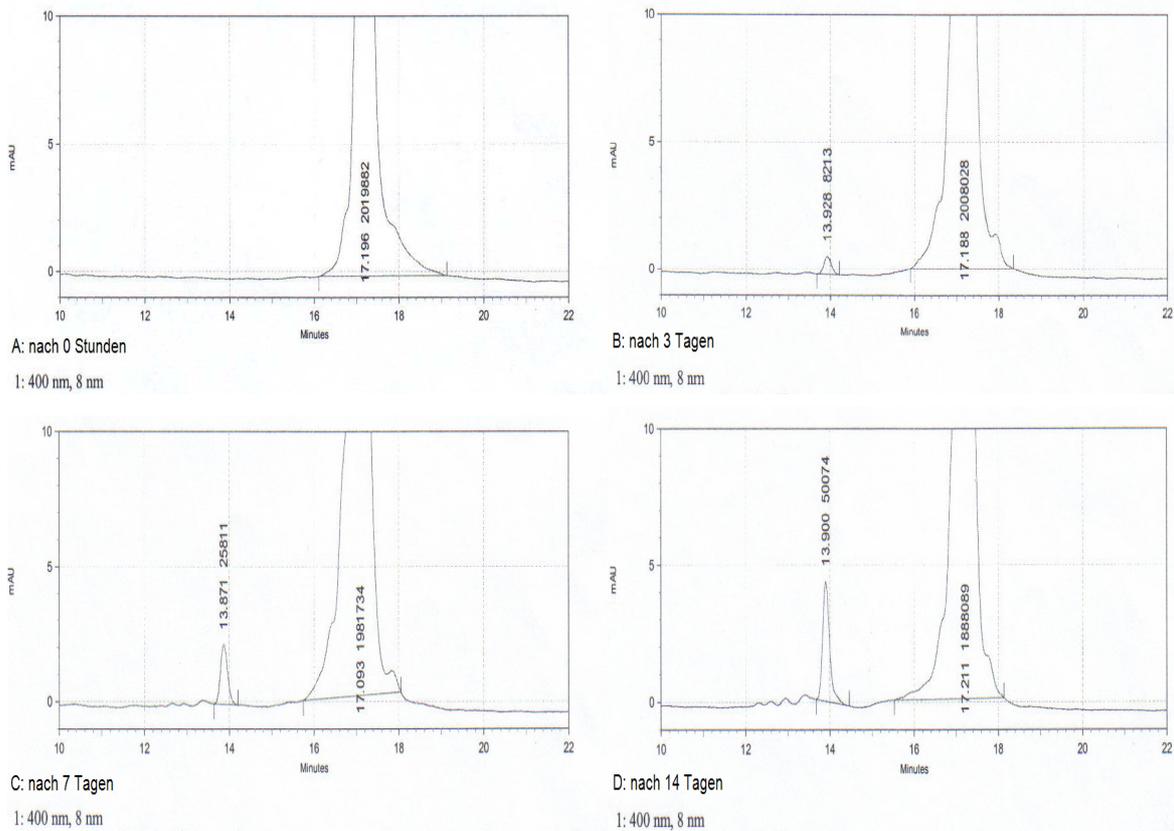


Abb.3.10: HPLC-Chromatogramme von CcC in 0,1 M Phosphatpuffer 0,05M pH 7,4 mit Zusatz von 1 % Milchsäure nach A) Start, B) nach drei Tagen, C) nach sieben Tagen und D) nach 14 Tagen Inkubation bei 37°C

### 3.2.3.2 Stabilität von CcC in der Resomer<sup>®</sup>-Formulierung

Da Proteine zu Adsorptionserscheinungen neigen<sup>155-157</sup>, ist das Ausmaß solcher Interaktionen zwischen Protein und Polymer in der Formulierung entscheidend für die erfolgreiche Entwicklung einer Depotformulierung. Dabei wird zwischen reversibel auftretenden physikalischen und chemischen Adsorptionserscheinungen, die eine strukturelle Veränderung des Proteins bewirken, unterschieden. Instabilitäten bedingt durch Denaturierung, deren Adsorptionsprozesse vor allem an hydrophoben Polymeroberflächen als Vorstufe dienen, können zu erheblichen Stabilitätsverlusten der Proteine führen<sup>18,26,27,124</sup>.

In dem in situ Implantat liegt das Modellprotein CcC in der Trägerformulierung suspendiert vor. Eine Reihe von Wechselwirkungen wie Adsorption, ionische Wechselwirkungen oder chemische Reaktionen mit dem Trägerpolymer sind vorstellbar<sup>18</sup>. Zur Beschreibung der Interaktionen zwischen CcC und dem Polymer wurde die Proteinadsorption an den Resomer<sup>®</sup>-Oberflächen untersucht. Dazu wurden Resomere<sup>®</sup> (R 202H, RG 752 und RG 502H), die sich in ihrer Zusammensetzung

sowie dem Säureendgruppenschutz unterscheiden und damit Unterschiede in der Hydrophilie aufweisen, ausgewählt (Tab. 3.1).

Zur Adsorptionsuntersuchung wurden die ausgewählten Resomere<sup>®</sup> jeweils in einer CcC-Lösung suspendiert. CcC wurde im Freisetzungsmedium gelöst. Aufgrund der Konzentrationsabhängigkeit von Adsorptionserscheinungen<sup>154</sup> wurde die CcC-Konzentration variiert, der Polymeranteil blieb konstant:

- Mischung I: CcC - 500 µg/ml; Resomer<sup>®</sup> - 94,5 mg/ml
- Mischung II: CcC - 50 µg/ml; Resomer<sup>®</sup> - 94,5 mg/ml

In Abbildung 3.11 ist der CcC-Gehalt in Abhängigkeit von der Inkubationszeit für die drei ausgewählten Resomere<sup>®</sup> in der konzentrierteren CcC-Lösung (Mischung I) abzulesen.

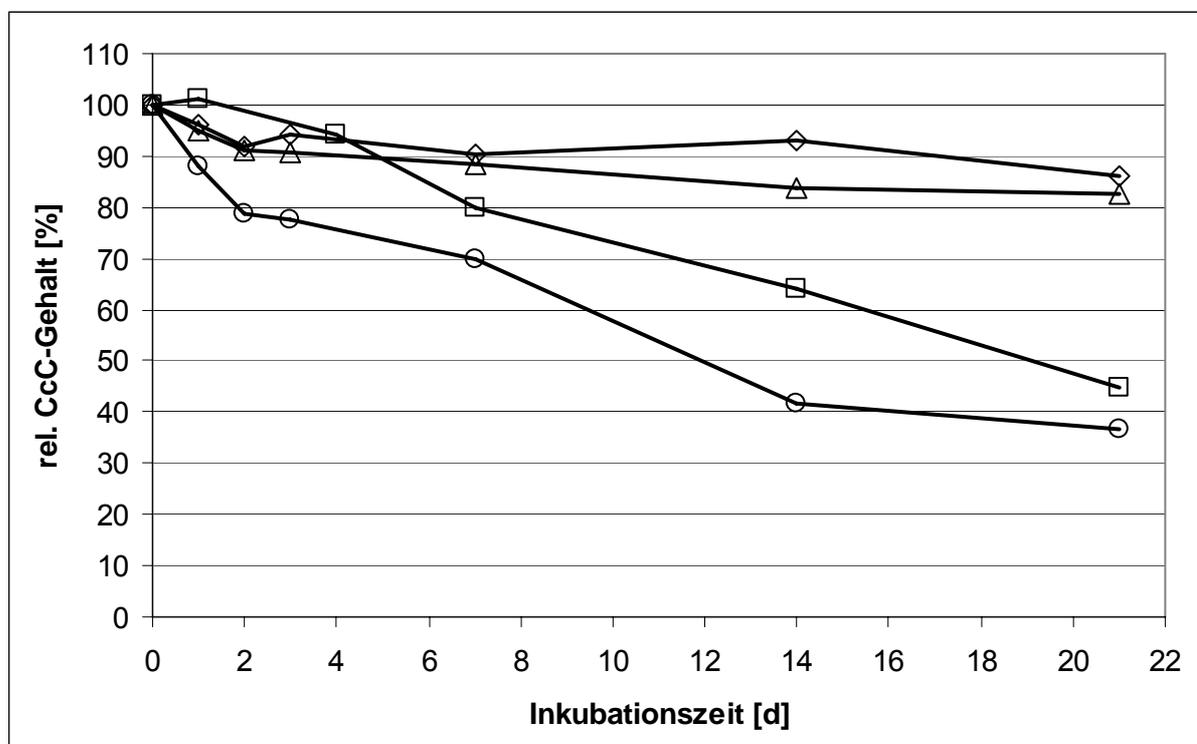


Abb. 3.11: CcC-Gehalt in Abhängigkeit von der Inkubationszeit in Mischung I mit dem jeweiligen Resomer<sup>®</sup> bzw. ohne Resomer<sup>®</sup> - Zusatz (x, n = 3)

- ohne Resomer<sup>®</sup>
- ◇ mit R 202H
- △ mit RG 752
- mit RG 502H

Erstaunlicherweise scheint der Zusatz der Resomere<sup>®</sup> RG 752 bzw. R 202H zur CcC-Lösung einen stabilisierenden Einfluss auf das Protein auszuüben. Nach 21 Tagen waren noch mehr als 80 % CcC in Lösung vorhanden, während in der Referenzlösung (CcC gelöst im Freisetzungsmedium (FSM)) selbst nur noch 45 % CcC nachweisbar waren. Jedoch sank der CcC-Gehalt unter Zusatz des Resomers<sup>®</sup>

RG 502H nach 21 Tagen auf unter 41 % des Ausgangsgehaltes. Die Proteinverluste können durch Interaktionen von RG 502H und CcC bedingt sein. Dabei ist das verwendete Resomer<sup>®</sup> RG 502H im Vergleich zu RG 752 und R 202H ein hydrophileres Polymer, bedingt durch den 50 %igen Glykolidanteil und die freien Säureendgruppen.

Da Adsorptionserscheinungen konzentrationsabhängig sind und in verdünnten Lösungen der Effekt deutlicher wird, wurde der Versuch mit einer geringeren CcC-Konzentration bei gleichem Polymeranteil durchgeführt.

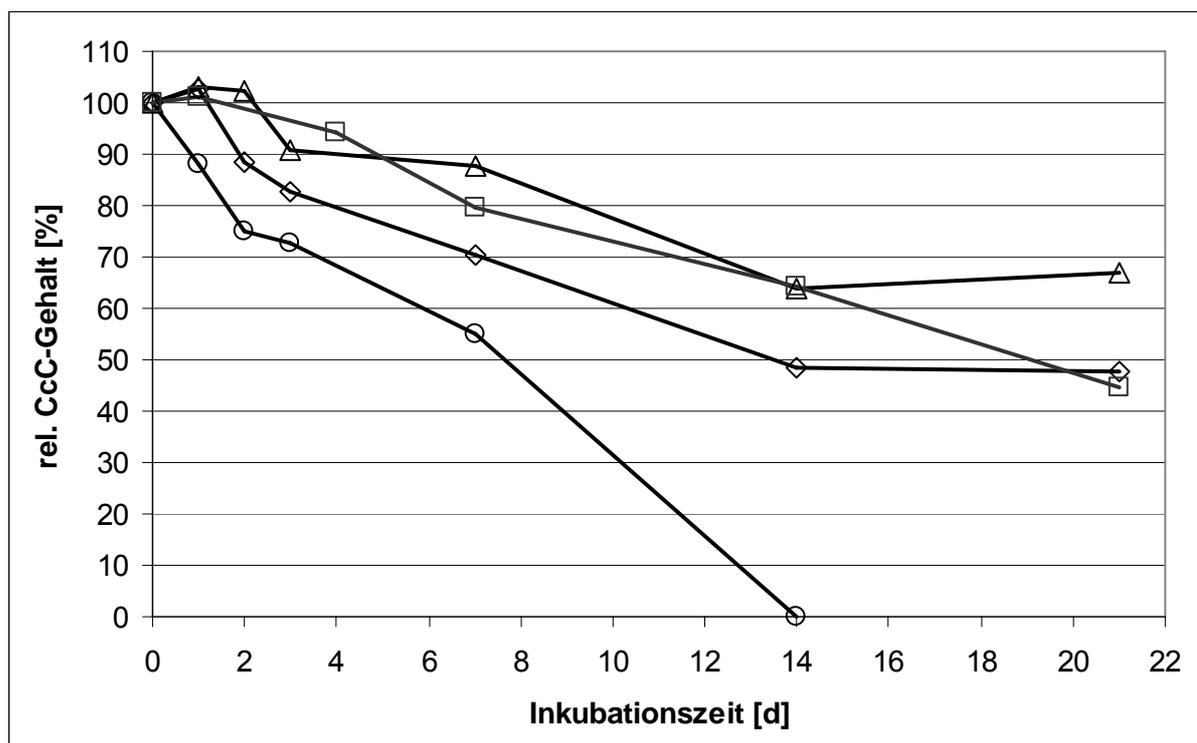


Abb. 3.12: CcC -Gehalt in Abhängigkeit von der Inkubationszeit in Mischung II mit dem jeweiligen Resomer<sup>®</sup> bzw. ohne Resomer<sup>®</sup>-Zusatz (x, n = 3)

- ohne Resomer<sup>®</sup>
- ◇ mit R 202H
- △ mit RG 752
- mit RG 502H

Wie bereits in der konzentrierteren CcC-Lösung deutlich wurde, hat das Resomer<sup>®</sup> RG 502H einen nachteiligen Einfluss auf die Stabilität von CcC (Abb. 3.12). Nach 14 Tagen Inkubation bei 37 °C war der Proteingehalt unter die Nachweisgrenze gesunken, was zum Abbruch der Untersuchung führte. Die Stabilität von CcC in der verdünnten Lösung mit Zusatz von R 202H bzw. RG 752 war mit der Referenzlösung (CcC gelöst im FSM) hingegen vergleichbar. Die Wechselwirkungen zwischen Resomeren<sup>®</sup> und CcC sind offensichtlich von der Art der PLA bzw. PLGA abhängig.

### 3.2.3.3 Untersuchungen zur Lagerstabilität von CcC in der Modellformulierung

In der Formulierungsentwicklung ist die Stabilität des Wirkstoffes von ausschlaggebender Bedeutung. Zur Abschätzung der Stabilität wird die Formulierung in unterschiedliche Klimata eingelagert. Hierzu wurden beispielhaft die Resomer<sup>®</sup>-Formulierungen basierend auf den Resomeren<sup>®</sup> R 202H und RG 502H bei 2-8 °C im Kühlschrank, bei 20-25 °C (Raumtemperatur) und bei 30 °C/ 60 % r.H. über vier Wochen in verschlossenen Injektionsflaschen eingelagert. Für eine Gehaltsbestimmung des Proteins muss dieses zuvor aus der Polymergrundlage extrahiert werden. Hierfür fand eine in der Literatur beschriebene Methode Verwendung, bei welcher die Matrix in Dimethylsulfoxid zunächst gelöst und anschließend in Natriumlaurylsulfat/NaOH hydrolysiert wird<sup>158</sup> (Kap. 3.2.4). In Abbildung 3.13 ist der CcC-Gehalt in Abhängigkeit von der Lagerzeit bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen nach der Extraktion aus der Polymergrundlage, R 202H, dargestellt.

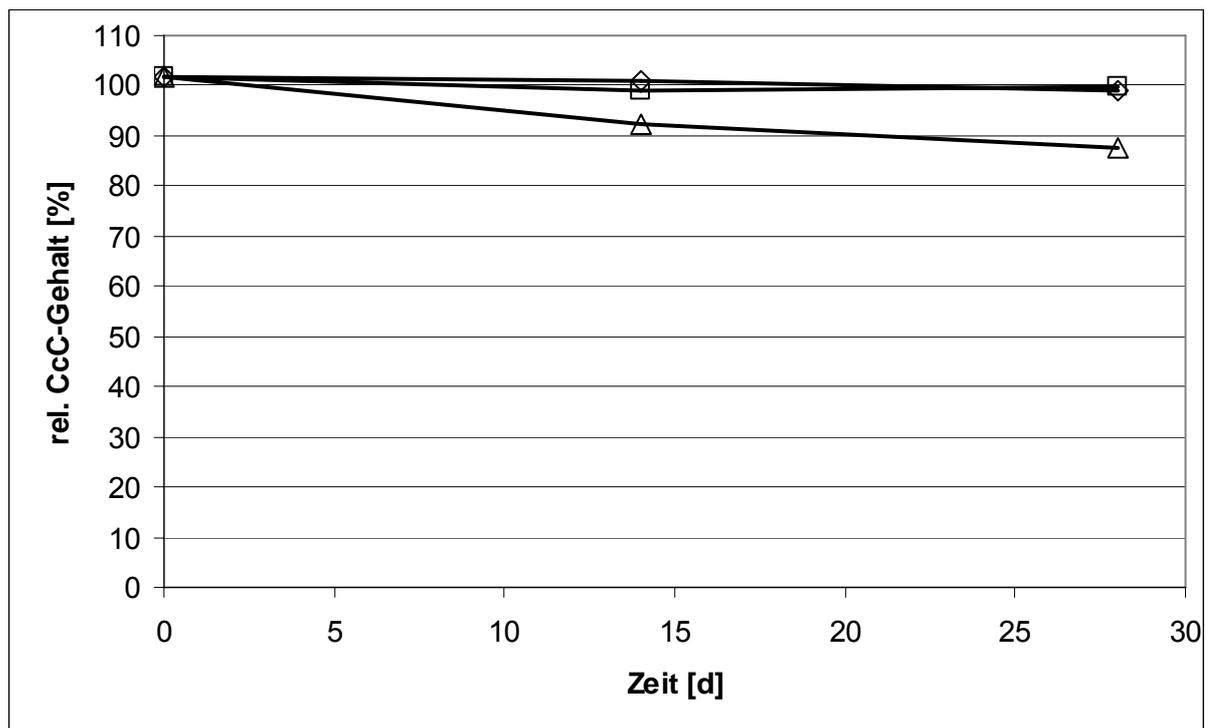


Abb.3.13: CcC-Gehalt der R 202H-Formulierungen in Abhängigkeit von der Lagerdauer für unterschiedlichen Lagerbedingungen (x, n = 3)

- RT: 20 – 25 °C
- ◇ KS: 2 – 8 °C
- Δ 30 °C/ 60 % r.H.

Die CcC-Stabilität in der R 202H-Formulierung ist temperaturabhängig. Während bei der Kühlschrank- und Raumtemperaturlagerung nach 28 Tagen noch 99 % des

Ausgangsgehalt nachweisbar waren, sank der CcC-Gehalt unter Lagerung bei 30 °C/ 60 % r.H. auf 87 %. Dieses Ergebnis wurde mit der Untersuchung der RG 502H-Formulierungen bestätigt (Abb. 3.14).

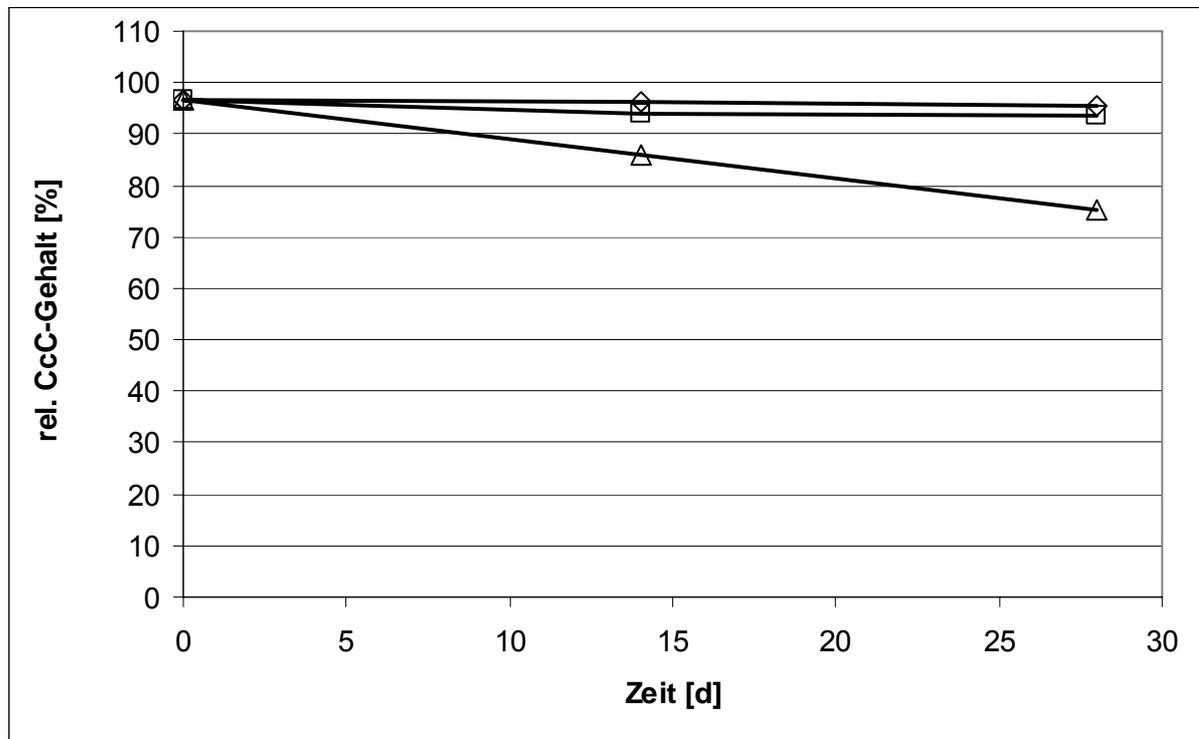


Abb.3.14: CcC-Gehalt der RG 502H-Formulierungen in Abhängigkeit von der Lagerdauer für unterschiedlichen Lagerbedingungen (x, n = 3)

- RT: 20 – 25 °C
- ◇ KS: 2 – 8 °C
- △ 30 °C/ 60 % r.H.

Die Stabilitätsprüfung bei verschiedenen Temperaturen ermöglicht die Auswertung der Konzentrationsabhängigkeit der Zersetzungsgeschwindigkeit (Reaktionskinetik) und der Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit (ARRHENIUS-Gleichung). Anhand dieser daraus erhaltenen Daten können Stabilitätsvorhersagen getroffen werden.

Unter der Annahme, dass der Proteinabbau in der Formulierung als Reaktion pseudo-nullter Ordnung verläuft, kann die Zeit, in der ein Wirkstoffrückgang auf 90 % stattfindet, über die Geradengleichungen berechnet werden. Am Beispiel der RG 502H-Formulierung wurden die Geschwindigkeitskonstanten bestimmt (Tab. 3.8). In nachfolgender Tabelle sind die Haltbarkeiten bei verschiedenen Temperaturen aufgeführt (Tab. 3.8).

Tab. 3.8:  $t_{90\%}$ -Werte für den CcC-Gehalt in einer RG 502H-Formulierung

Temperatur [°C]	Geradengleichung	$t_{90\%}$ [d]
5	$y = -0,0413x + 96,768$	164
23	$y = -0,1174x + 96,398$	54
30	$y = -0,7644x + 96,642$	9

Aus den ermittelten Werten ist deutlich zu erkennen, dass mit steigender Lagertemperatur die Abbaugeschwindigkeit von CcC erheblich zunimmt. Die RG 502H-Formulierung, die hier als Modellformulierung diente, kann 164 Tage im Kühlschrank gelagert werden, hingegen ist sie bei 30 °C nur noch 9 Tage lang haltbar.

### 3.2.4 Charakterisierung der finalen Modellformulierung

#### 3.2.4.1 Vergleich der Methoden zur Bestimmung des Wirkstoffgehaltes

Zur Bewertung von Depotformulierungen wie Mikropartikeln oder in situ Implantaten hinsichtlich Effizienz der Verkapselung und Kalkulation von Freisetzungsforschungen sind Methoden zur Gehaltsbestimmung von essentieller Bedeutung. Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurden dabei unterschiedliche Verfahren zur Isolierung der Wirkstoffe aus den Polymermatrizen auf der Basis von PLGA für Mikropartikel erarbeitet<sup>158-160</sup>. Die Eignung der vorgeschlagenen Vorgehensweisen wurde für die in situ Implantate am Beispiel der RG 752-Formulierung bewertet (Tab. 3.9). Die Isolierungsmöglichkeiten können der Übersichtlichkeit wegen in Gruppen eingeteilt werden<sup>158</sup>. Zum einen kann die Polymermatrix in einem geeigneten Lösungsmittel aufgelöst und das Protein aus dieser Lösung extrahiert werden, zum anderen kann die Isolierung des Proteins durch Hydrolyse des Polymers erfolgen (Tab 3.9).

Tab. 3.9: Isolierungsmöglichkeiten zur Gehaltsbestimmung eines Proteins bzw. Peptides aus einer Resomer-Matrix

A: Lösen des Resomers®	B: Hydrolyse des Resomers®	C: Kombination aus A und B
<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>A1:</b> in Dichlormethan (DCM) und anschließende wässrige Extraktion<sup>159</sup></li> <li>- <b>A2:</b> in DCM/Aceton und anschließende Zentrifugation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- alkalische Hydrolyse mit NaOH- und NDS-Zusatz<sup>160</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lösen in Dimethylsulfoxid (DMSO), anschließend Hydrolyse mit NDS/ NaOH<sup>158</sup></li> </ul>

Die Gehaltsbestimmung des isolierten CcC erfolgte UV-VIS-spektralphotometrisch. Die Extraktion aus der Dichlormethanphase (Methode A1) eignet sich dagegen nicht für die Isolierung von CcC. Es wurden Wiederfindungswerte zwischen 77 % und 86 % der eingesetzten Modellsubstanz gefunden (Abb. 3.15). Dies ist auf die zum Teil schlechte Phasentrennung zurückzuführen, die wiederum zur unvollständigen Abtrennung des wässrigen Anteils führt. Unter Anwendung der Zentrifugation (Methode A2) war es möglich CcC zu 95 % zu isolieren (Abb. 3.15). Im Überstand befanden sich jedoch feinste, rötliche Partikel, die mit Entfernen der Polymerlösung der Messung verloren gingen.

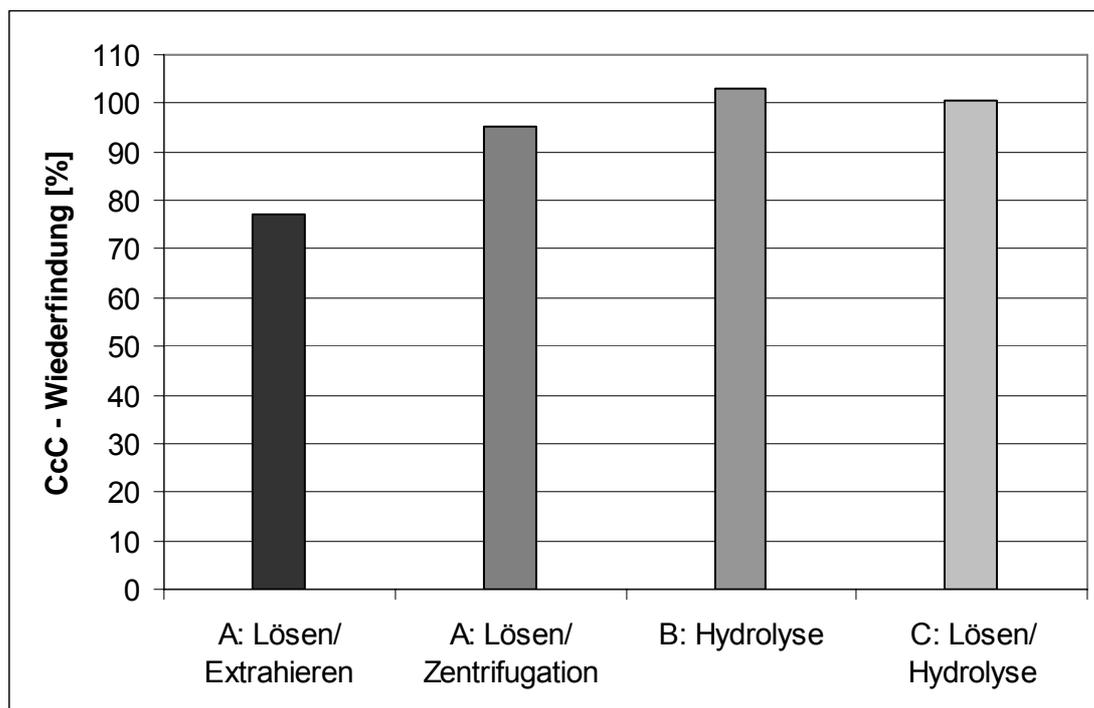


Abb. 3.15: CcC - Wiederfindung bezogen auf die eingearbeitete CcC-Menge (100%) für RG 752-Formulierungen in Abhängigkeit von der Isolierungsmethode (x, n = 2)

Mit der einfachen Hydrolyse (Methode B) der RG 752-Matrix im alkalischen Milieu (NDS/NaOH) wurden 100 % CcC wiedergefunden. Jedoch sollte beachtet werden, dass durch die alkalische Hydrolyse das Protein auch abgebaut werden kann, was in einem Vorversuch nachgewiesen wurde.

Zur Beschleunigung der Hydrolyse kann mit einer Verknüpfung von Methode A und B gearbeitet werden (Methode C). Dabei wird das Resomer<sup>®</sup> mit DMSO aus der Matrix gelöst. Durch die Zugabe von NDS/NaOH präzipitiert das RG 752 wieder. Damit ist es leichter für die Hydrolyse zugänglich<sup>158</sup>. Die Aufspaltung wird auf diese Weise beschleunigt, das Protein wird in dieser Zeit nicht abgebaut und steht der

Gehaltsbestimmung zur Verfügung. Mit der Methode C wurden 100 % des CcC wiedergefunden.

#### 3.2.4.2 Vergleich der Freisetzungsmethoden

Für injizierbare Depotzubereitungen ist die in vitro/in vivo Wirkstofffreigabe in hohem Maße qualitätsrelevant. Dabei ist auf die zu verwendenden Prüfbedingungen ein hohes Augenmerk zu legen. Veränderungen in den Bedingungen der Freisetzungsprüfung, wie beispielsweise beim pH-Wert, der Pufferzusammensetzung, Ionenstärke, Osmolalität oder Temperatur, können erhebliche Auswirkungen auf die in vitro Profile haben<sup>161</sup>. Die in den Arzneibüchern beschriebenen Apparaturen für feste Arzneiformen wie Blattrührer- oder Durchflusszellen-Apparatur eignen sich für injizierbare Depotformulierungen aufgrund der hohen Volumina an Prüfmedien nicht. Oft werden aus solchen Formulierungen sehr geringe Wirkstoffmengen je Zeiteinheit freigesetzt, so dass nur mit geringen Volumina im Milliliterbereich gearbeitet werden kann. In der Literatur werden in diesem Zusammenhang verschiedene Methoden diskutiert, die in verschiedene Kategorien eingeteilt werden können<sup>162</sup>. Im Folgenden werden die Methoden kurz vorgestellt und diskutiert.

- Trennen und Beprobieren („separate and sample methods“<sup>162</sup>)
  - meistverbreiteste Methode: Mikropartikel werden in ein Behältnis mit Freisetzungsmedium eingebracht und die Freisetzung in Abhängigkeit von der Zeit untersucht<sup>72,163,164</sup>.
  - Behältnisse: Röhrchen, Vials, Erlenmeyerkolben, Flaschen
  - Volumen des Freisetzungsmediums: < 10 ml bis mehrere 100 ml
  - Rührer: Blattrührer, Magnetrührer, Schüttelinkubatoren
  - Probenahme: Separation der Mikropartikel vom Freisetzungsmedium durch Filtration oder Zentrifugation
  - Nachteile: Aggregation der Mikropartikel<sup>165</sup>, bei der Probenahme Verstopfung der Filter durch Mikropartikel < 10 µm oder Schwierigkeiten bei der Redispersion des Mikropartikel-Rückstandes nach Zentrifugation<sup>162</sup>
- Durchflussapparaturen<sup>162</sup>
  - USP Apparatur IV oder Modifikationen der Apparatur (Abb. 3.16): Das Freisetzungsmedium zirkuliert durch eine röhrenähnliches Gefäß, in welchem sich die Mikropartikel befinden.

- Pumpen: Schlauch-, HPLC-Pumpen, Spritzen
- Durchfluss: 5  $\mu\text{l}/\text{min}$  bis 3,3  $\text{ml}/\text{min}$
- Nachteile: Schwankende Durchflussraten infolge des Verstopfens der Filter, zu niedrige Durchflussraten bedingt durch eingesetzte Filter führen zu einer zu geringen Wirkstofffreisetzung

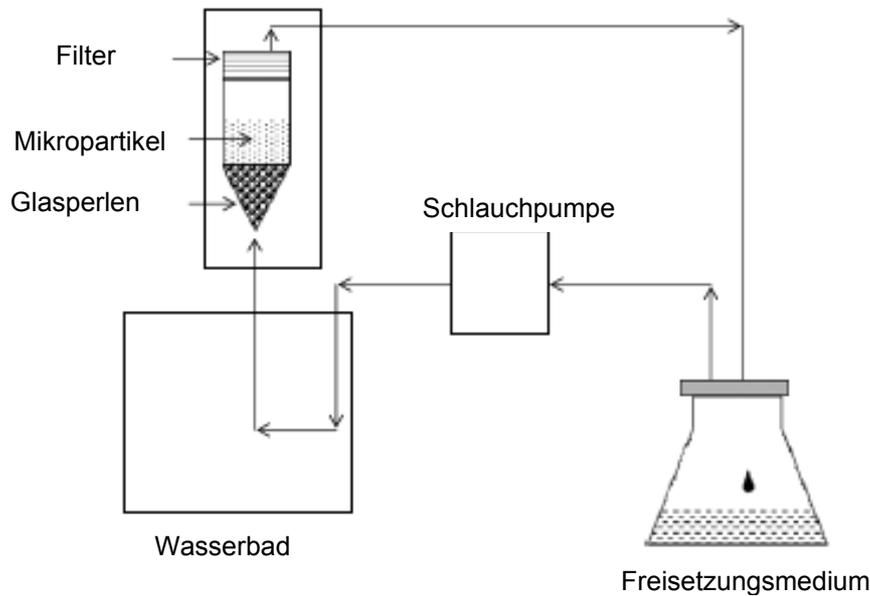


Abb. 3.16: Aufbau einer Durchflussapparatur mit einer Schlauchpumpe zum Zirkulieren des Freisetzungsmediums<sup>162</sup>

- Dialyse-Methode<sup>162</sup>
  - Die Mikropartikel sind über eine Dialysemembran vom Freisetzungsmedium getrennt (Abb. 3.17).
  - Rührer: horizontale Schüttler, Blattrührer
  - Nachteile: in vivo Korrelation gering, Adsorption des Wirkstoffes an der Membran, Einhaltung der Sink-Bedingungen

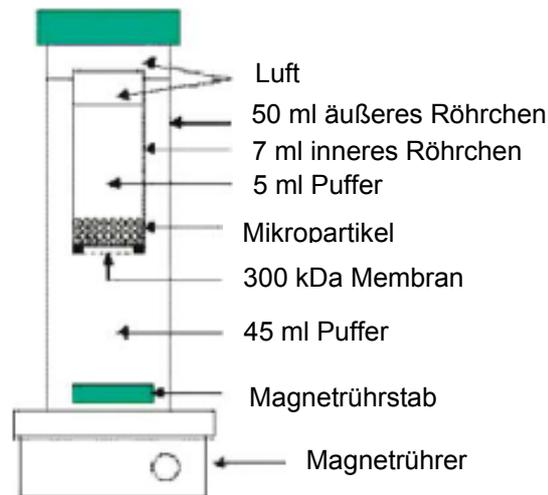


Abb. 3.17: Aufbau einer Dialyseapparatur <sup>162</sup>

Die Etablierung einer *in vitro* Methode für eine parenterale Depotformulierung, welche den regulatorischen Anforderungen genügt, anwenderfreundlich, robust und reproduzierbar, einsetzbar zur Qualitätskontrolle ist, stellt häufig eine große Herausforderung dar und erfordert umfangreiche Untersuchungen.

Zur Untersuchung der *in vitro* Freisetzung der *in situ* Implantate wurde die „separate and sample“ Methode genutzt. In ein mit Freisetzungsmittel befülltes Vial wurde das Implantat appliziert und im Schüttelinkubator temperiert.

### 3.3 Sterilisation

#### 3.3.1 Möglichkeiten zur Sterilisation einer Resomer<sup>®</sup>-Formulierung für ein *in situ* Implantat

Es bestehen verschiedene Möglichkeiten, in den Herstellungsprozess der ausgewählten Formulierung einzugreifen, um ein steriles Endprodukt zu erhalten (Abb. 3.18). Prinzipiell ist zwischen einer aseptischen Herstellung und Schlusssterilisation der Formulierung im Endbehältnis zu unterscheiden. Folgende Methoden sind dabei zur Herstellung einer sterilen Resomer<sup>®</sup>-Formulierung möglich:

- I Sterilisation der Ausgangsstoffe und aseptische Weiterverarbeitung
- II Sterilisation des Zwischenproduktes und der Resomer<sup>®</sup>-Lösung, anschließend aseptische Weiterverarbeitung
- III Sterilisation der Resomer<sup>®</sup>-Formulierung mit Wirkstoff im Endbehältnis

Nachfolgend sollen die einzelnen Prozessstufen und deren jeweiligen Sterilisationsmöglichkeiten diskutiert und analysiert werden.

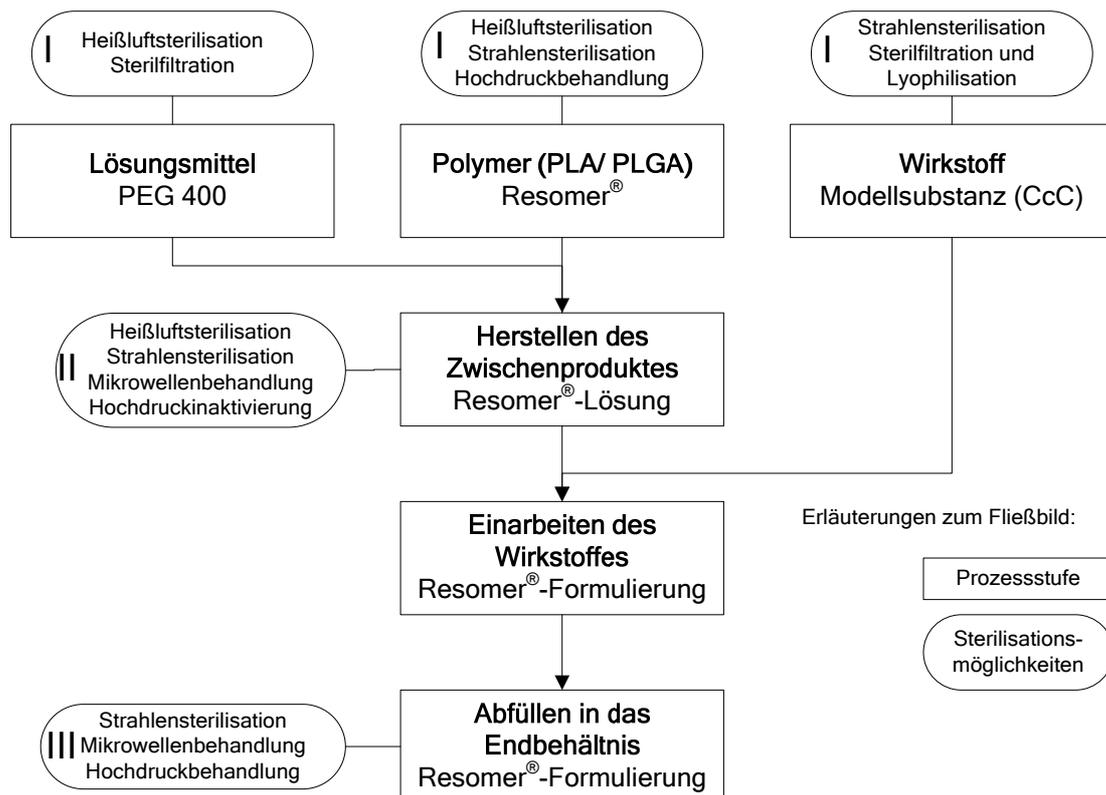


Abb. 3.18: Fließschema zur Herstellung einer Resomere®-Formulierung und Möglichkeiten zur Sterilisation

### ***I Sterilisation der Ausgangsstoffe***

Die Sterilisation der einzelnen Ausgangsstoffe hat zur Folge, dass diese dann unter aseptischen Bedingungen weiterverarbeitet werden müssen, was technologisch aufwendiger und damit teurer ist. Im Folgenden sollen die Sterilisationsmöglichkeiten der einzelnen Bestandteile einer Resomere®-Formulierung diskutiert werden. Für das Lösungsmittel **PEG 400** existieren etablierte Sterilisationsverfahren wie die Sterilisation mit trockener Hitze oder die Sterilfiltration (Abb.3.18). Die Wirksubstanz **CcC** als ein Vertreter der Klasse der Proteine ist eine hitze- und strahlenlabile Verbindung. Bei Sterilisation mit einem Ph. Eur.-Standardverfahren, wie Hitze- oder Strahlensterilisation, muss mit einem Stabilitäts- und Aktivitätsverlust gerechnet werden. Bisher werden Proteine in ihren Lösungen (wässrig oder gepuffert) sterilfiltriert und anschließend zur Stabilisierung lyophilisiert (Abb. 3.18)<sup>154,166</sup>. Das sterile Proteinpulver kann im Anschluss daran weiterverarbeitet werden.

Auch die Sterilisation der **Resomere®** stellt eine Herausforderung dar. Bei dieser Substanzklasse handelt es sich ebenfalls um hitze- und strahlensensitive Verbindungen. Wie in der Literatur bereits berichtet, kommt es durch Hitzesterilisation zu hydrolytischem Abbau der Polymere<sup>65,66,68,69,118,167</sup>. Die Sterilisation mit feuchter Hitze ist für Feststoffe nicht geeignet, da sich in den

Ampullen oder Vials kein zur Sterilisation zwingend notwendiger Dampfdruck entwickeln kann. Die Strahlensterilisation, ein Ph. Eur.-Standardverfahren, wird bisher zur Sterilisation der PLA bzw. PLGA eingesetzt. In zahlreichen Veröffentlichungen wurde berichtet, dass es durch die Behandlung mit  $\gamma$ -Strahlen zur Veränderung der Polymere durch Reduzierung des Molekulargewichts kommt<sup>71,130,131,168,169</sup>.

Alternative Verfahren zur Sterilisation von Resomeren<sup>®</sup> sind z.B. die Behandlung mit  $\beta$ -Strahlen, Mikrowellen oder isostatischem Hochdruck. Die Behandlung mit gerichteten und beschleunigten Elektronenstrahlen ist aufgrund der geringeren Eindringtiefe nur bedingt einsetzbar, also z.B. für die Sterilisation von thermosensitiven Packmaterialien<sup>170</sup>. Zur Sterilisation des Ausgangsmaterials, der Resomere<sup>®</sup>, sind Mikrowellen nicht geeignet, da für diese Methode die Anwesenheit von Wasser als Dipol im elektromagnetischen Feld nötig ist<sup>89,95</sup>. Die Hochdruckinaktivierung soll in der vorliegenden Arbeit als mögliche Alternative überprüft und anschließend bewertet werden.

## II Sterilisation der Resomer<sup>®</sup>-Lösung

Die Sterilisation des Zwischenproduktes, der Resomer<sup>®</sup>-Lösung und die anschließende aseptische Einarbeitung des sterilen Wirkstoffes, stellt eine weitere Möglichkeit dar, eine parenteral zu verabreichende Formulierung herzustellen (Abb. 3.18). Denkbar wäre auch eine Zweikammerspritze, befüllt mit der sterilen Resomer<sup>®</sup>-Lösung in der einen und die Wirksubstanz in der anderen Kammer. Vor Applikation der Formulierung wird diese in der Spritze durch Öffnen des „bypass“ hergestellt.

Zur Sterilisation des Zwischenproduktes können die herkömmlichen Sterilisationsverfahren des Ph. Eur. ‚Heißluft- und Strahlensterilisation, angewandt werden. Jedoch sind hier starke Abbaureaktionen zu erwarten<sup>36,65,66,68,69,71,130,131,167-169</sup>. In der Literatur werden Hydrolysereaktionen und die Abnahme des Molekulargewichtes von Resomeren<sup>®</sup> infolge Heißluftsterilisation beschrieben<sup>66,167</sup>.

Die Dampfdrucksterilisation ist für die Resomer<sup>®</sup>-Lösung nicht anwendbar, da es sich um ein nicht wässriges System handelt. Der zur Sterilisation notwendige Dampfdruck über der Lösung kann sich im geschlossenen Primärbehältnis nicht entwickeln.

Die Anwendbarkeit der Strahlensterilisation für Resomer<sup>®</sup>-Formulierungen wurde bereits in zahlreichen Veröffentlichungen diskutiert<sup>71,130,131,168,169</sup>. In einigen Studien wurde gezeigt, dass  $\gamma$ -Strahlung die Polymere abbaut und die Freisetzung des Wirkstoffs verändert<sup>71,72,169</sup>. Die Anwendung der Strahlensterilisation zur Herstellung parenteral anwendbarer Resomer<sup>®</sup>-Formulierungen zeigt aber auch, dass bei sorgfältiger Auswahl von Polymer und Wirkstoff die Veränderung der Formulierung in engen, reproduzierbaren Grenzen gehalten werden kann<sup>171,172</sup>.

In der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss der Standard-Sterilisationsverfahren des Ph. Eur. auf physikochemische und anwendungsrelevante Eigenschaften der ausgewählten Resomer<sup>®</sup>-Lösung untersucht werden.

Die Sterilisation der parenteralen Depotformulierung mit dem alternativen Verfahren, der Mikrowellensterilisation, ist ebenfalls möglich. Die vorhandenen Wassermoleküle und anderen polaren Gruppen in der Resomere<sup>®</sup>-Lösung führen im elektromagnetischen Feld der Mikrowellen zur Vibration sowie Rotation und damit zur Erwärmung der Lösung.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Sterilisation von Liposomen und von PLGA-/ PLA-Stiften mit Hochdruck lassen auch eine erfolgreiche Behandlung des Zwischenproduktes vermuten<sup>103,104</sup>.

### **III Sterilisation im Endbehältnis**

Die Sterilisation im Endbehältnis ist die anzustrebende Herstellungsmethode einer Resomer<sup>®</sup>-Formulierung. Dabei erfolgt die Herstellung und Abfüllung in das Endbehältnis unter keimreduzierten Bedingungen. Es kann im Anschluss daran eine Schlusssterilisation erfolgen (Abb. 3.18).

Bei Anwendung der Hitzeverfahren (trockene oder feuchte Hitze) zur Sterilisation wird die Formulierung zerstört. Zum einen kommt es infolge der hohen Temperaturen zur Denaturierung der Wirksubstanz CcC<sup>173,174</sup>, zum anderen wird die Matrix hydrolytisch abgebaut<sup>65,66,68,69,118,167</sup>. Die Standardverfahren, also Dampfdruck- und Heißluftsterilisation, kommen folglich zur Sterilisation der Resomer<sup>®</sup>-Formulierung nicht in Betracht.

Ein in Frage kommendes klassisches Sterilisationsverfahren ist die Behandlung mit  $\gamma$ -Strahlen, wobei der Einfluss der  $\gamma$ -Strahlen auf anwendungsrelevante Eigenschaften der Polymer-Formulierung untersucht werden muss.

In Untersuchungen wurde die erfolgreiche Anwendung der Hochdruckbehandlung zur Sterilisation/Keimreduzierung von hitze- und thermolabilen Formulierungen beschrieben<sup>103,104</sup>. Daher besteht die Hoffnung, mit der Hochdruckbehandlung eine Methode zu etablieren, die eine Sterilisation der Resomer<sup>®</sup>-Formulierungen im Endbehältnis ermöglicht.

Die Mikrowellensterilisation wird in Japan erfolgreich zur Keimreduzierung von hitzelabilen Vitaminzubereitungen bereits eingesetzt<sup>94</sup>. Die thermische Belastung bei der Behandlung mit Mikrowellen scheint sehr gering zu sein und stellt daher ein sinnvolles Verfahren zur Sterilisation der Resomer<sup>®</sup>-Formulierung im Endbehältnis dar.

### **3.3.2 Sterilisation mit Heißluft**

Die Europäische Arzneimittelagentur (EMA) sieht die Schlusssterilisation mit trockener Hitze als die Methode der Wahl für nicht wässrige Formulierungen an<sup>63,64</sup>. Ist die Heißluftsterilisation für die ausgewählte Formulierung nicht anwendbar, so ist die thermische Instabilität nachzuweisen, um ein anders Sterilisationsverfahren oder die aseptische Herstellungsweise zu begründen<sup>63</sup>. Auf Grund dieser Forderung wurde der Einfluss der trockenen Hitze auf die thermolabilen Resomer<sup>®</sup>-Formulierungen untersucht. Dabei wurden neben der Sterilisation im Endbehältnis auch die Möglichkeiten der Sterilisation des Zwischenproduktes, der Resomer<sup>®</sup>-Lösung, und der Ausgangsstoffe betrachtet. Der Vorteil der Untersuchung der Zwischenstufen ist der, dass der Einfluss der thermischen Belastung auf die Material- und Formulierungseigenschaften besser nachweisbar ist. In Tabelle 3.9 ist dargestellt, welche Parameter vor und nach der Heißluftsterilisation bewertet wurden. Die Sterilisation des Endproduktes im Endbehältnis mit trockener Hitze wurde von vornherein aufgrund der thermolabilen Proteinstruktur der Modellsubstanz CcC ausgeschlossen. Der Einfluss der thermischen Belastung auf die hitzelabilen Resomere<sup>®</sup> wurde bereits in der Zwischenstufe und im Ausgangsmaterial gezeigt.

Tab. 3.9: Übersicht der untersuchten Parameter der Resomere<sup>®</sup> und deren Formulierung vor und nach Hitzesterilisation

Herstellungsstufe	Parameter				
	Säurezahl	Molmassen	inhärente Viskosität	Glasübergangstemperatur	Wirkstofffreisetzung
Ausgangsstoff Resomere <sup>®</sup>	untersucht	untersucht	untersucht	untersucht	untersucht
Zwischenprodukt Resomere <sup>®</sup> -Lösung	untersucht	untersucht	—	—	untersucht
Endprodukt Resomere <sup>®</sup> -Formulierung	—	—	—	—	—

Die Untersuchungen zur Sterilisation mit trockener Hitze wurden mit einem validierten Verfahren zur Gerätesterilisation bei 180 °C über 30 Minuten durchgeführt. Das Europäische Arzneibuch empfiehlt 160 °C bei 120 Minuten, lässt aber andere Temperatur-Zeit-Kombinationen durchaus ebenso zu<sup>60</sup>.

Da zu erwarten war, dass durch die hohe thermische Beanspruchung bei der Sterilisation mit 180 °C die Polymerstrukturen der Resomere<sup>®</sup> zerstört und sie damit unbrauchbar werden, wurden weitere Temperatur-Zeit-Kombinationen zur Sterilisation bewertet. Zum einen wurden die Resomere<sup>®</sup> und deren PEG-Lösungen in Abhängigkeit von der Sterilisationstemperatur bei einer Sterilisationszeit von 30 Minuten, zum anderen in Abhängigkeit von der Sterilisationszeit bei einer Temperatur von 60 °C bzw. 180 °C behandelt. In einem weiteren Versuchsansatz wurden die Resomere<sup>®</sup> und deren PEG-Lösungen im Autoklav bei 121 °C, 20 Minuten behandelt. Diese Untersuchungen sind als reine Wärmebehandlungen zu betrachten, da die PEG-Formulierungen nicht wässrige Systeme darstellen. Für alle ausgewählten Wärmebehandlungen wurde der Einfluss auf die physikochemischen Eigenschaften der Resomere<sup>®</sup> untersucht.

### 3.3.2.1 Einfluss der Heißluftsterilisation auf die Säurezahl

Es wurden die Resomere<sup>®</sup> RG 752 und R 202H, die sich hinsichtlich ihrer Polymerzusammensetzungen unterscheiden, bewertet. Die SZ wurde einerseits vom Ausgangsmaterial und andererseits von der Resomere<sup>®</sup>-Lösung vor und nach der Behandlung mit trockener Hitze bestimmt. In Abbildung 3.19 ist der Einfluss der Heißluftsterilisation auf die SZ dargestellt.

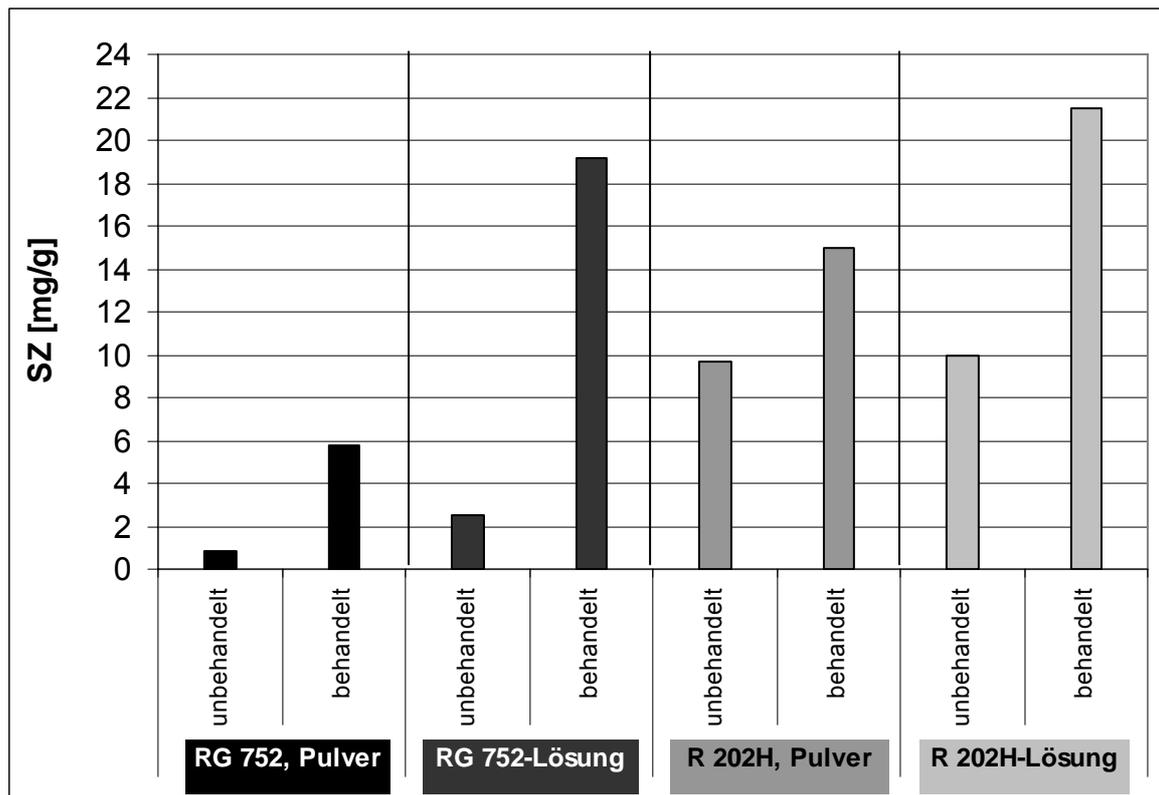


Abb. 3.19: Vergleich der SZ der unbehandelten mit den heißluftsterilisierten Resomeren<sup>®</sup> sowie deren Lösungen (x, n = 3)

Die Ergebnisse zeigen, dass infolge der thermischen Belastung die Zahl an freien Säureendgruppen stark ansteigt. Dabei wurde für das Resomer<sup>®</sup> RG 752 ein Anstieg der SZ von 0,9 mg/g auf 5,8 mg/g und für R 202H von 9,7 mg/g auf 15 mg/g gefunden (Abb.3.19). Damit wurde die SZ für beide Polymere um ca. 5 mg/g erhöht. Die Polymere waren infolge der Sterilisation mit trockener Hitze verflüssigt, nach Abkühlung erstarrt.

Die Heißluftsterilisation des Zwischenproduktes, der Resomer<sup>®</sup>-PEG-Lösung, führte erwartungsgemäß zur Erhöhung der SZ. Während die SZ für die RG752-Lösung von 2,5 mg/g auf 19,1 mg/g ( $\Delta$  16,6 mg/g) anstieg, erhöhte sich die SZ für die R202H-Lösung von 10 mg/g auf 21,5 mg/g ( $\Delta$  11,5 mg/g) (Abb. 3.19). Die Resomere<sup>®</sup> in Lösung wurden also im Vergleich zum Pulver stärker abgebaut.

Über den Anstieg der SZ wurde das Freiwerden von Säuregruppen nachgewiesen. Ursache dafür können Hydrolysereaktionen sein, die durch die Hitzeeinwirkung katalysiert werden und zum Abbau der Resomere<sup>®</sup> führen. Es ist anzunehmen, dass beide Polymere, RG 752 und R 202H, vor allem in den PEG-Lösungen durch die thermische Belastung nahezu vollständig zu Oligomeren abgebaut wurden. Jedoch war der Anstieg der SZ für das Copolymer RG 752 in Lösung größer als für das Homopolymer R 202H.

### 3.3.2.2 Einfluss der Heißluftsterilisation auf die inhärente Viskosität

Es wurde die inhärente Viskosität ( $\eta_{\text{inhärent}}$ ) vor und nach der Sterilisation mit trockener Hitze am Beispiel des Resomers<sup>®</sup> G 752 untersucht. Die Bestimmung konnte nur am Polymerpulver vorgenommen werden, da in der Resomer<sup>®</sup>-Lösung die Moleküle des Resomers<sup>®</sup> zu PEG im Verhältnis 1:9 vorliegen. Bei einer stark verdünnten Lösung konnten keine zuverlässigen Rückschlüsse auf Änderungen der inhärenten Viskosität und damit des Molekulargewichtes des Resomers<sup>®</sup> gezogen werden. Folglich wurde mit dieser Methode der Einfluss der Hitzesterilisation auf das Ausgangsmaterial bewertet.

Die Bestimmung der dynamischen Viskosität des in Chloroform gelösten Resomers<sup>®</sup> RG 752 erfolgte mit einem Mikroviskosimeter. Aus der dynamischen Viskosität kann dann rechnerisch die inhärente Viskosität ermittelt werden.

Die inhärente Viskosität des Resomers<sup>®</sup> RG 752 vor und nach Sterilisation mit trockener Hitze ist in Tabelle 3.10 aufgeführt.

Tab. 3.10: inhärente Viskosität des unbehandelten und des mit trockener Hitze sterilisierten Resomers<sup>®</sup> RG 752 ( $x$ ,  $n = 10$ )

Untersuchungsparameter	RG 752	
	unbehandelt	nach Heißluftsterilisation
inhärente Viskosität einer 0,4%igen Lösung $\eta_{\text{inhärent}}$ [dl / g]	0,199	0,186

Entgegen der Ergebnisse der SZ-Bestimmung, bei welcher für RG 752 ein hoher Anstieg bestimmt wurde, wurde bei der Untersuchung der inhärenten Viskosität eine geringfügige Abnahme festgestellt. Da die inhärente Viskosität zum Molekulargewicht proportional ist<sup>144</sup>, bedeutet das für RG 752 eine geringe Veränderung in Bezug auf die Molmassen. Um den Einfluss der Heißluftsterilisation auf das Resomer<sup>®</sup> weiter zu verifizieren, wurden GPC-Untersuchungen durchgeführt.

### 3.3.2.3 Einfluss der Heißluftsterilisation auf die Molmassen und -verteilung

Der Einfluss der Sterilisation mit trockener Hitze auf die Molmassen und -verteilung wurde unter Verwendung der Resomere<sup>®</sup> RG 752 und R 202H und deren PEG-Lösungen untersucht. In Tabelle 3.11 sind die Ergebnisse der Molmassenbestimmung der Ausgangsmaterialien aufgeführt.

Tab. 3.11: Molmassenverteilung der Resomere<sup>®</sup> RG 752 und R 202H vor und nach Sterilisation mit trockener Hitze ( $x, n = 2$ )

Molmassen/ Polydispersität	RG 752		R 202 H	
	unbehandelt (Referenz)	behandelt (sterilisiert)	unbehandelt (Referenz)	behandelt (sterilisiert)
$M_w$ [g/mol]	14715	11602	10329	6230
$M_n$ [g/mol]	6920	3157	7264	3555
$M_w/M_n$	2,126	3,675	1,422	1,752

Im Elugramm des reinen RG 752 ist ein Peak bei 12,28 ml Elutionsvolumen (bei Fluss von 1 ml/min, Retentionszeit 12 min) zu finden. Es handelt sich um einen breit verteilten Peak, was sich deutlich in den Werten für die Polydispersität widerspiegelt. Beim Vergleich der erhaltenen Werte für  $M_w$  und  $M_n$  des unbehandelten RG 752 mit den erhaltenen Messwerten des thermisch behandelten Resomers<sup>®</sup> kann eine Verringerung von  $M_w$  und  $M_n$  festgestellt werden, wobei die Werte für  $M_w$  von 14715 g/mol auf 11602 g/mol und für  $M_n$  von 6920 g/mol auf 3157 g/mol reduziert wurden. Die etwas stärkere Reduktion der Molmassen im unteren Molekularbereich ( $M_n$ :  $\Delta$  3763 g/mol) im Vergleich zum oberen Molekularbereich ( $M_w$ :  $\Delta$  3113 g/mol) führt zu einer erhöhten Polydispersität (Tab. 3.11). Die Ergebnisse belegen, dass infolge der thermischen Belastung durch die Heißluftsterilisation das Resomer<sup>®</sup> RG 752 abgebaut wird.

Im Elugramm des reinen R 202H wurde ein weniger breiter Peak bei einem Elutionsvolumen von 12,68 ml detektiert. Es handelt sich um ein homogenes Polymer, das weniger polydispers ist. Für heißluftbehandeltes R 202H konnte auch eine Verringerung der Werte für  $M_w$  ( $\Delta$  4099 g/mol) und  $M_n$  ( $\Delta$  3709 g/mol) im Vergleich zum unbehandelten Polymer nachgewiesen werden (Tab. 3.11). Die Reduzierung der Molmassen liegt im ähnlichen Größenbereich wie die vom Resomer<sup>®</sup> RG 752. Die Polydispersität wurde erhöht.

Infolge der Sterilisation mit trockener Hitze kommt es für die beiden untersuchten Resomere<sup>®</sup> zu Kettenbrüchen, was sich in einer Abnahme der Werte für  $M_w$  und  $M_n$  niederschlägt.

Auch die Zwischenprodukte, die Resomer<sup>®</sup>-Lösungen, wurden vor und nach der Sterilisation mit trockener Hitze hinsichtlich Änderungen der Molmassen und -verteilung untersucht. Die untersuchten Gemische aus RG 752 bzw. R 202H enthielten ca. 10 % des Polymers bezogen auf die Gesamtmasse. In den unbehandelten Lösungen konnte das jeweilige Resomer<sup>®</sup> deutlich vom PEG 400

getrennt werden (Abb. 3.20). In der Tabelle 3.12 sind die Einzelergebnisse dazu aufgeführt.

Tab. 3.12: Molmassenverteilung der Resomer<sup>®</sup>-Lösungen vor und nach Sterilisation mit trockener Hitze ( $\bar{x}$ ,  $n = 2$ )

Molmassen/ Polydispersität	RG 752/PEG 400				R 202H/ PEG 400			
	unbehandelt (Referenz)		behandelt (sterilisiert)		unbehandelt (Referenz)		behandelt (sterilisiert)	
	RG 752	PEG 400	RG 752	PEG 400	R 202H	PEG 400	R 202H	PEG 400
$M_w$ [g/mol]	14304	148	218		10936	149	299	
$M_n$ [g/mol]	8478	89	111		7802	85	98	
$M_w/M_n$	1,687	1,663	1,964		1,402	1,753	3,051	

Für das Resomer RG 752 wurde ein mittlerer  $M_w$ -Wert von 14304 g/mol ermittelt. Diese Werte stimmen sehr gut mit den Ergebnissen aus der Bestimmung der Einzelverbindungen überein (RG 752:  $M_w = 14715$  g/mol). Für das Lösungsmittel PEG 400 wurde ein mittlerer  $M_w$ -Wert von 148 g/mol bestimmt. Damit liegt das Analysenergebnis für PEG 400 unter dem erwarteten Molekulargewicht von ca. 400 g/mol. Das kann dadurch bedingt sein, dass die Auftrennung im unteren Molekularbereich mit dem verwendeten Säulenmaterial mit einem größeren Fehler behaftet ist und nahe am Totvolumen liegt. Die Moleküle mit kleiner Molekülgröße permieren vollständig und werden nicht getrennt.

Im Ergebnis der Untersuchungen der RG 752-Lösung konnte nachgewiesen werden, dass der vom Resomer<sup>®</sup> verursachte Peak in den Elugrammen der thermisch behandelten Probengemische nicht mehr detektiert werden konnte (Abb. 3.20).

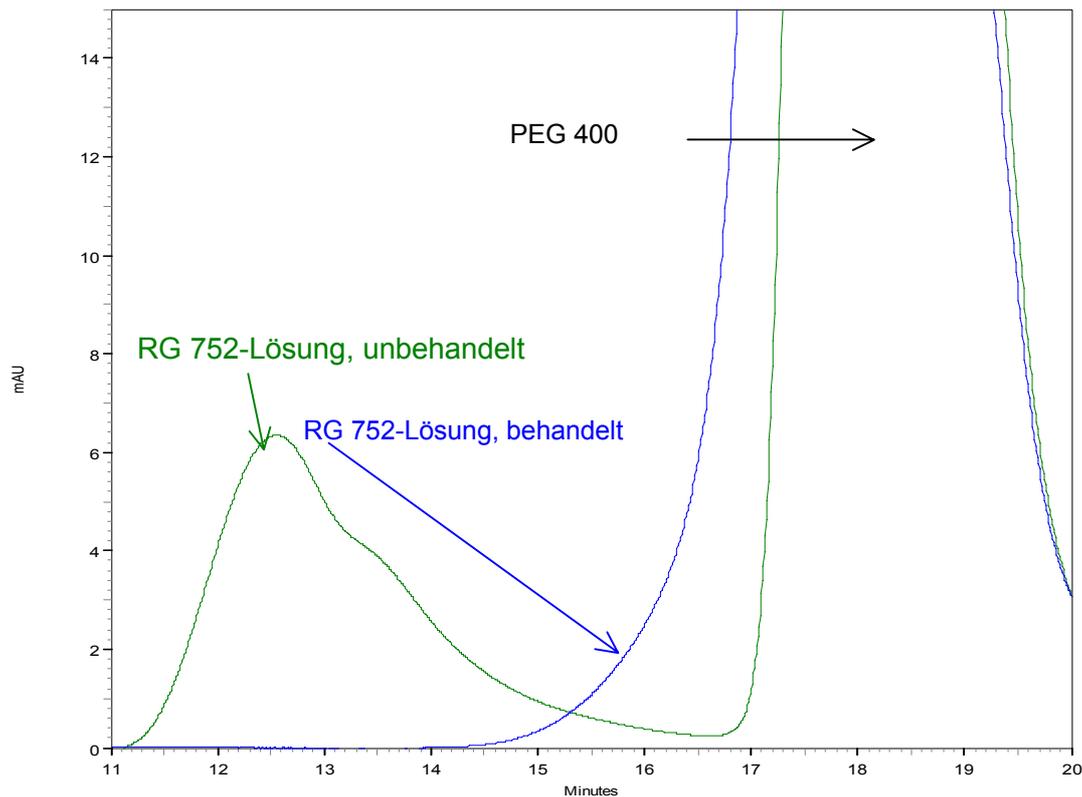


Abb. 3.20: GPC-Eluogramme der RG 752-Lösung vor und nach Heißluftsterilisation

Auf Basis dieser Ergebnisse ist ersichtlich, dass das in PEG 400 gelöste Resomer<sup>®</sup> RG 752 durch Hitzeeinwirkung abgebaut wird. Der Abbau kann durch Hydrolyse erfolgen. Weitere Reaktionsmöglichkeiten sind Umesterungsprozesse mit PEG 400, die aber vermutlich eine untergeordnete Rolle spielen. In jedem Falle werden Reaktionsprodukte gebildet, die ähnliche Molmassen wie das reine PEG 400 besitzen. Sowohl die Verbreiterung des PEG 400-Peaks als auch die starke Erhöhung der SZ (Kap. 3.3.2.1) unterstützen diese Schlussfolgerung. Das Zwischenprodukt, die RG 752-Lösung, ist unter den angewandten Bedingungen der Heißluftsterilisation nicht stabil.

Auch bei der heißluftsterilisierten R 202H-Lösung war eine Abtrennung des Resomers<sup>®</sup> vom PEG 400 nicht möglich. Das Resomer<sup>®</sup> R 202H, gelöst in PEG 400, wurde durch die Hitzeeinwirkung hydrolytisch bis hin zu kurzkettigen Oligomeren abgebaut. Die Ergebnisse der Molmassen- und der SZ-Bestimmung (Kap. 3.3.2.1) lassen so vermuten, dass auch das Resomer<sup>®</sup> R 202H als Pulver und in Lösung unter den angewandten Sterilisationsbedingungen nicht stabil ist.

#### 3.3.2.4 Einfluss der Heißluftsterilisation auf die thermischen Eigenschaften

Zur Untersuchung des Einflusses der Heißluftsterilisation auf die thermischen Eigenschaften wurden wiederum die Resomere<sup>®</sup> RG 752 und R 202H

herangezogen. Die thermoanalytischen Bestimmungen der Glasübergangstemperaturen der Polymere erfolgten mittels DSC.

Die Ergebnisse der thermoanalytischen Untersuchung der Resomere<sup>®</sup> sind in folgender Tabelle 3.13 zusammengestellt.

Tab. 3.13: Glasübergangstemperatur ( $T_g$ ) der Resomere<sup>®</sup> RG 752 und R 202H vor und nach Heißluftsterilisation ( $x$ ,  $n = 3$ )

RG 752		R 202H	
vor Sterilisation	nach Sterilisation	vor Sterilisation	nach Sterilisation
$T_g$ [°C]	$T_g$ [°C]	$T_g$ [°C]	$T_g$ [°C]
45,1	44,1	48,9	42,6

Die Heißluftsterilisation der Resomere<sup>®</sup> RG 752 und R 202H führt zu einer Abnahme der Glasübergangstemperaturen. Eine Verringerung der Glasübergangstemperatur ist mit einer Abnahme der Molmassen verbunden und umgekehrt<sup>24,142,150,151</sup>. Die erniedrigten Glasübergangstemperaturen der heißluftsterilisierten Resomere<sup>®</sup> resultieren demnach aus einer Reduzierung der Molmassen.

Damit belegen die Ergebnisse aus der Untersuchung der thermischen Eigenschaften erneut, dass die Resomere<sup>®</sup> RG 752 und R 202H unter den angewandten Bedingungen der Heißluftsterilisation nicht stabil sind.

### 3.3.2.5 Einfluss der Heißluftsterilisation auf die Freisetzung

Eine Untersuchung der Wirkstofffreisetzung aus in situ Implantaten, die aus heißluftsterilisierten Resomeren<sup>®</sup> oder deren PEG-Lösungen hergestellt werden, war nicht möglich. Die Erwärmung der Resomere<sup>®</sup> oberhalb der Glasübergangstemperatur führte zum Erweichen, zur Verflüssigung. Nach Erkalten lagen die Polymere wieder in einem festen Zustand vor, konnten jedoch nicht mehr in PEG 400 gelöst werden. Daher war eine Untersuchung der Freisetzung aus den in situ Implantaten nicht durchführbar.

Aus den heißluftsterilisierten Resomere<sup>®</sup>-Lösungen konnten keine in situ Implantate mehr hergestellt werden, weil keine Implantatausformung stattfand. Bei der Injektion vermischten sich die Resomere<sup>®</sup>-Lösungen mit dem Freisetzungsmittel und koagulierte nicht. Die Polymere wurden durch die thermische Belastung soweit abgebaut, dass in Wasser lösliche Oligomere und Monomere entstanden<sup>69</sup>.

### 3.3.2.6 Untersuchung des Einflusses der Heißluftsterilisation auf physikochemische Eigenschaften der Resomere<sup>®</sup> in Abhängigkeit von Temperatur und Zeit

Das Arzneibuch lässt neben 180 °C, 30 Minuten oder 160 °C, 120 Minuten andere validierte Temperatur–Zeit-Kombinationen zur Heißluftsterilisation zu<sup>60</sup>. Da es sich bei den untersuchten Resomeren<sup>®</sup> um hitzelabile Polymere handelt, wurden weitere Temperatur–Zeit-Kombinationen zur Sterilisation mit Heißluft untersucht. Die Behandlung mit Heißluft bei niederen Temperaturen ist vor allem aus der Lebensmittelindustrie bekannt. Es handelt sich um das Verfahren der Pasteurisation, welches zur Verminderung der Keimzahl thermolabiler Produkte eingesetzt wird<sup>61</sup>.

Der Einfluss der Temperatur vom Sterilisations- bis in den Pasteurisierungsbereich auf die SZ des RG 752 als Pulver und gelöst in PEG 400 wurde im Weiteren untersucht. Die Proben wurden jeweils 30 Minuten lang behandelt. In Abbildung 3.21 ist die SZ in Abhängigkeit von der Heißlufttemperatur für das Resomer<sup>®</sup> RG 752 und für die RG 752–Lösung dargestellt.

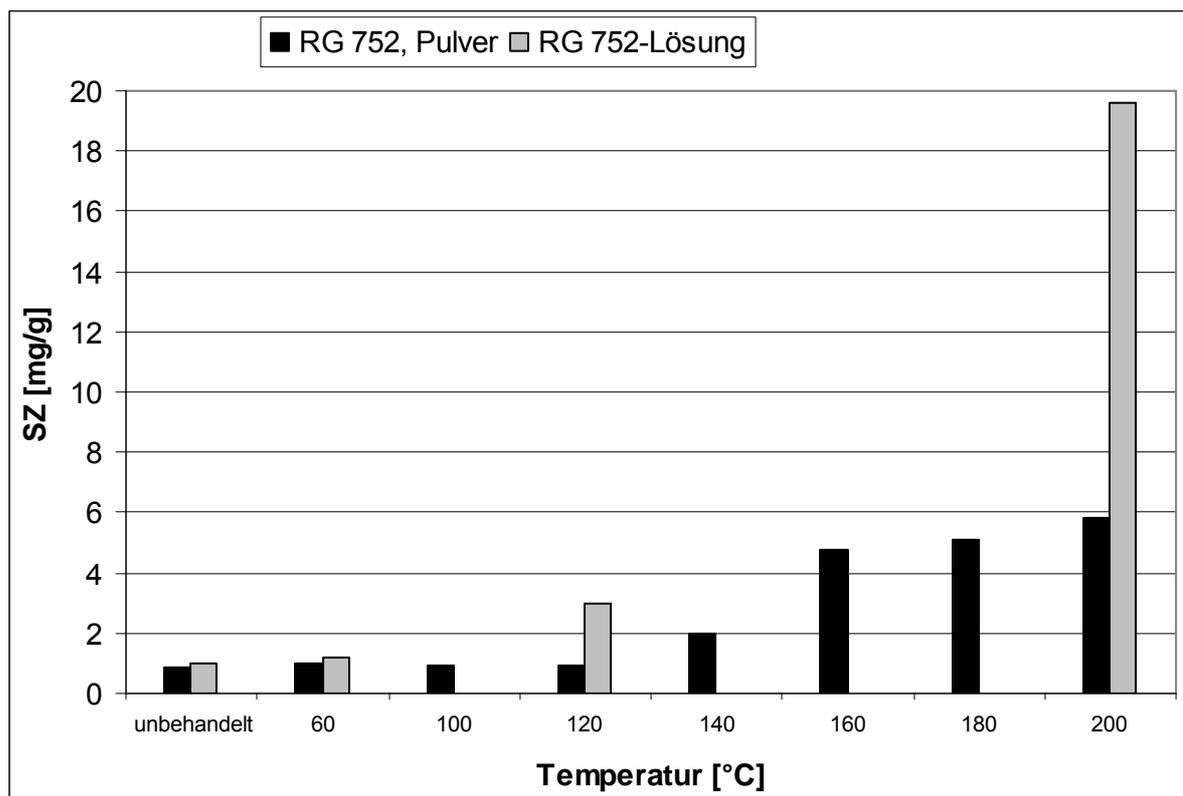


Abb. 3.21: SZ von RG 752 und RG 752–Lösung in Abhängigkeit von der Heißlufttemperatur bei konstanter Behandlungsdauer (x, n = 3)

Die SZ des Resomers<sup>®</sup> RG 752 blieb im unteren Temperaturbereich von 60 °C bis 120 °C nahezu unbeeinflusst. Dagegen wurde die SZ durch die Behandlung mit trockener Hitze bei Temperaturen von 140 °C bis 200 °C erhöht. Damit ist eine

Heißluftsterilisation des Resomers<sup>®</sup> RG 752 auch bei niedrigeren Temperaturen wie 140 °C oder 160 °C nicht möglich. Hinzu kommt, dass das Resomer<sup>®</sup> nach Heißluftsterilisation in einem starren, nicht weiterverarbeitbaren Zustand vorliegt. Die Behandlung mit trockener Hitze der RG 752-Lösung führt schon bei Temperaturen von 120 °C zum Anstieg der SZ (Abb. 3.21).

Niedrigere Temperaturen erfordern erhöhte Behandlungszeiten. In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Einfluss der Sterilisationszeit bei konstanter Temperatur auf die SZ des Resomers<sup>®</sup> RG 752 untersucht. In der Abbildung 3.22 ist die SZ in Abhängigkeit von der Zeit bei Heißlufttemperaturen von 60 °C bzw. 180 °C dargestellt.

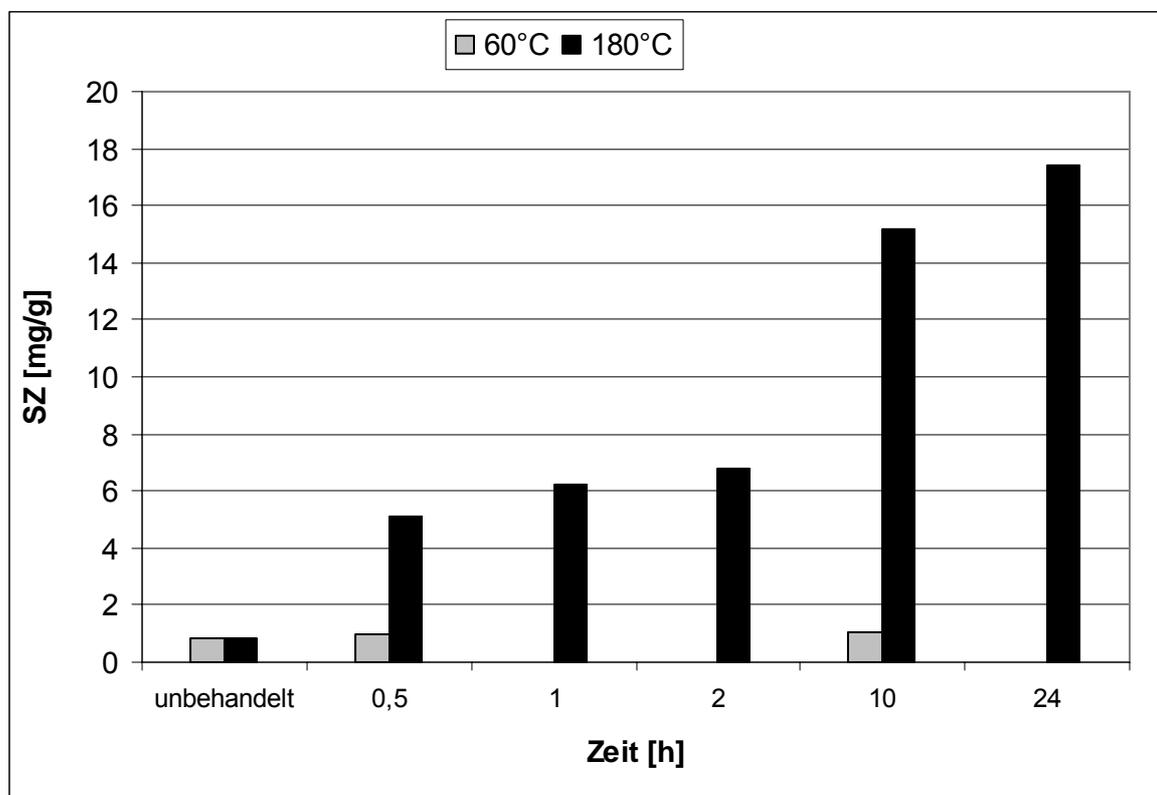


Abb. 3.22: SZ von RG 752 in Abhängigkeit von der Behandlungszeit bei konstanter Heißlufttemperatur ( $x$ ,  $n = 3$ )

Es ist ersichtlich, dass eine Heißluftsterilisation bei einer Temperatur von 180 °C schon nach einer halben Stunde zum Anstieg der SZ des Resomers<sup>®</sup> RG 752 führt. Dagegen bleibt die SZ bei einer Behandlung mit Heißluft von 60 °C auch über zehn Stunden konstant. Das Pulver RG 752 kann nach Heißluftbehandlung bei 60 °C weiterverarbeitet werden. Dies bedeutet, dass eine Pasteurisierung von RG 752 bei 60 °C über zehn Stunden in Bezug auf die bewerteten Eigenschaften (SZ, Weiterverarbeitung) möglich ist.

### 3.3.2.7 Untersuchung des Einflusses der Behandlung im Autoklaven auf physikochemische Eigenschaften der Resomere®

Die nachfolgend durchgeführten Behandlungen im Autoklav sind als eine Wärmebehandlung zu betrachten. Sie wurden durchgeführt, um den Einfluss von milderer Hitze auf die Stabilität der PLA bzw. PLGA bewerten zu können. Die Behandlung im Autoklaven wurde bei 121 °C über 20 Minuten durchgeführt.

➤ Einfluss der Behandlung im Autoklaven auf die Säurezahl

In der nachfolgenden Abbildung ist die SZ der unbehandelten Resomer®-Lösung im Vergleich zur autoklavierten Lösung aufgeführt (Abb. 3.23).

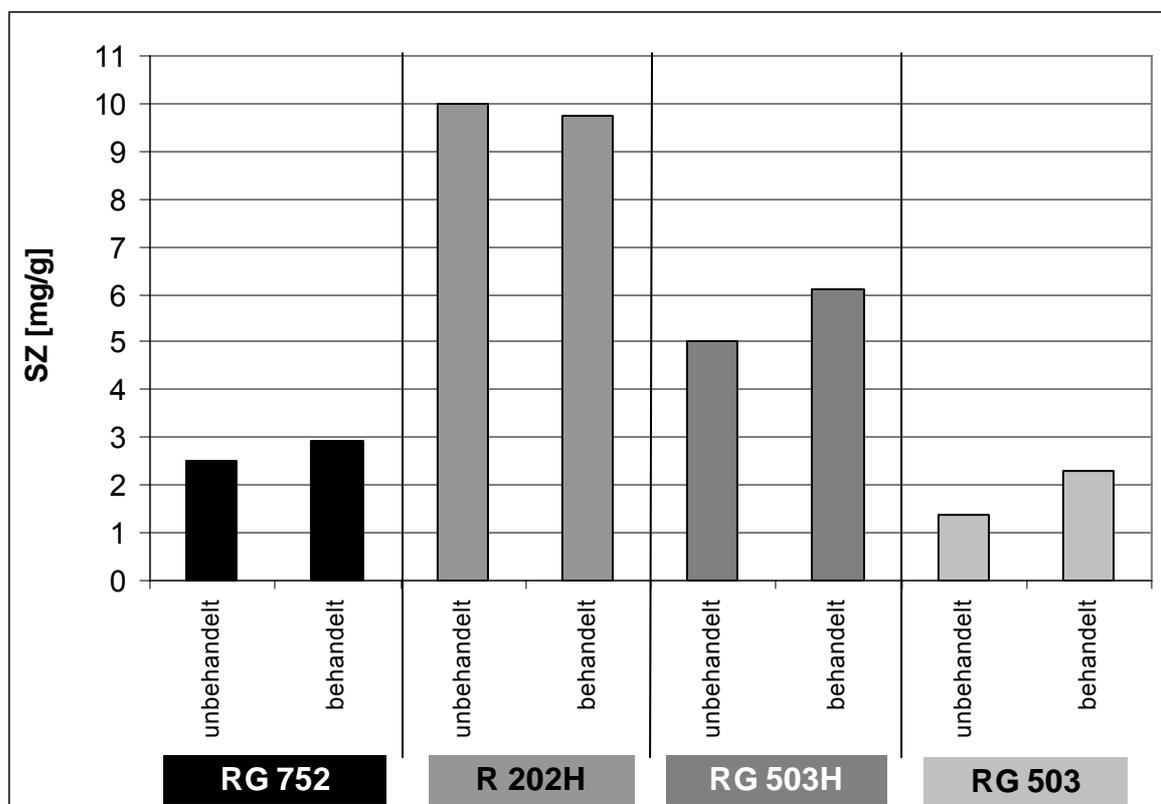


Abb. 3.23: Vergleich der SZ der unbehandelten Resomer®-Lösungen mit den autoklavierten Lösungen (x, n = 3)

Bei allen aus Copolymeren hergestellten Resomer®-Lösungen ist die SZ infolge der Autoklavenbehandlung angestiegen. Dabei ist die Änderung der SZ für die Resomere® RG 503 und RG 503H größer im Vergleich zum Resomer® RG 752. Demgegenüber wurde die SZ des Homopolymers R 202H, gelöst in PEG 400, infolge der Behandlung im Autoklaven nicht verändert (Abb. 3.23).

Anhand der Ergebnisse wird deutlich, dass mit steigendem Glykolidanteil des Resomer® das Hydrolyserisiko erhöht wird. Die Reihenfolge der Hydrolyseempfindlichkeit der untersuchten Resomer®-Lösungen lautet:

RG 503H > RG 503 >> RG 752 > R 202H.

Damit belegen die Ergebnisse die Angaben der Literatur, dass Copolymere wie RG 752, RG 503 ein erhöhtes Hydrolyserisiko aufweisen<sup>19,20</sup>.

Das Ausmaß der Änderungen der SZ ist jedoch für alle Copolymere sehr gering im Vergleich zu den mit trockener Hitze behandelten Polymer-Lösungen (Kap. 3.3.2.1).

➤ Einfluss der Behandlung im Autoklaven auf die Molmassen und -verteilung

Es wurden die Resomere<sup>®</sup> RG 752 und R 202H, die sich hinsichtlich ihrer Polymerzusammensetzungen unterscheiden, untersucht. Die Molmassenverteilung wurde einerseits vom Resomer<sup>®</sup>-Pulver, andererseits von der Resomer<sup>®</sup>-Lösung vor und nach der Behandlung im Autoklaven bestimmt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zu Änderungen der Molmassenverteilung von thermisch behandelten im Vergleich zu den unbehandelten Resomeren<sup>®</sup> (RG 752, R 202H) sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt (Tab. 3.14).

Tab. 3.14: Effekt der Behandlung im Autoklav auf die Molmassen und -verteilung der Resomere<sup>®</sup> RG 752 und R 202H (x, n = 2)

Molmassen/ Polydispersität	RG 752		R 202H	
	unbehandelt (Referenz)	behandelt	unbehandelt (Referenz)	behandelt
$M_w$ [g/mol]	14715	14440	10329	10104
$M_n$ [g/mol]	6920	7017	7265	5348
$M_w/M_n$	2,126	2,058	1,422	1,889

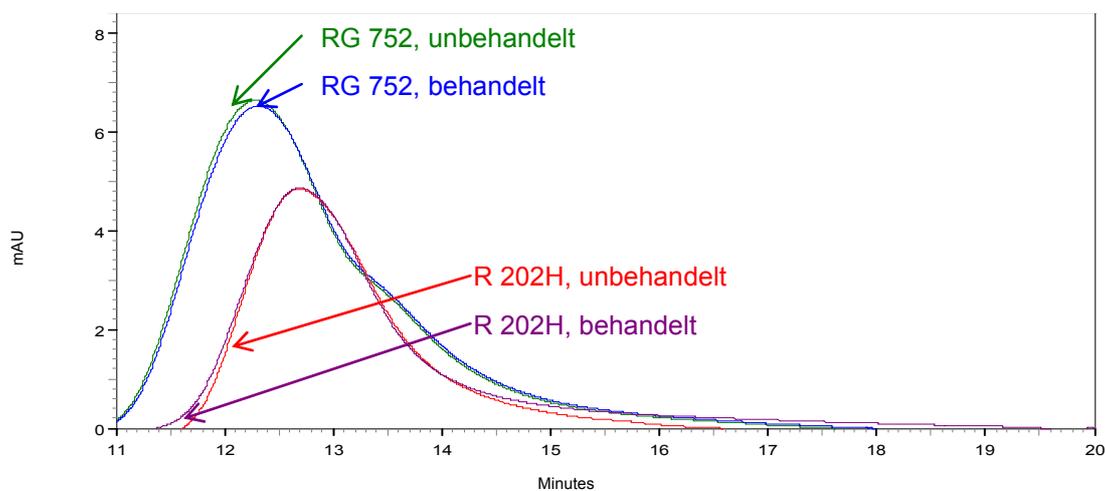


Abb. 3.24: GPC-Eluogramme der Resomere<sup>®</sup> RG 752 und R202H vor und nach Behandlung im Autoklaven

Beim Vergleich der erhaltenen Werte für  $M_w$  und  $M_n$  des unbehandelten RG 752 mit den erhaltenen Messwerten des thermisch behandelten Resomers<sup>®</sup> kann keine Veränderung festgestellt werden (Tab. 3.14, Abb. 3.24). Es kann somit geschlussfolgert werden, dass das Resomer<sup>®</sup>-Pulver RG 752 infolge der Behandlung im Autoklaven hydrolytisch nicht abgebaut wird.

Für autoklaviertes R 202H konnte eine geringfügige Verringerung der Werte für  $M_n$  im Vergleich zum unbehandelten Polymer nachgewiesen werden (Tab. 3.14, Abb. 3.24). Die Änderung ist dabei eher dem analytischen Fehler und der breiten Molmassenverteilung der Resomere<sup>®</sup> zu zuordnen.

Es wurden ebenfalls die Änderungen der Molmassenverteilung von autoklavierten Resomer<sup>®</sup>-Lösungen untersucht. In der Tabelle 3.15 sind die Einzelergebnisse dazu aufgeführt.

Tab. 3.15: Effekt der Behandlung im Autoklaven auf die Molmassen und -verteilung der Resomer<sup>®</sup> - Lösungen ( $x, n = 2$ )

Molmassen/ Polydispersität	RG 752/PEG 400				R 202H/ PEG 400			
	unbehandelt (Referenz)		behandelt		unbehandelt (Referenz)		behandelt	
	RG 752	PEG 400	RG 752	PEG 400	R 202H	PEG 400	R 202H	PEG 400
$M_w$ [g/mol]	14304	148	9414	154	10936	149	10461	148
$M_n$ [g/mol]	8478	89	5611	90	7802	85	6754	84
$M_w/M_n$	1,687	1,663	1,678	1,711	1,402	1,753	1,549	1,762

Wie bereits in Kapitel 3.3.2.3 beschrieben, ist die Abtrennung der Resomer<sup>®</sup>-Peaks vom PEG 400-Peak mittels GPC möglich. Anhand der Ergebnisse der Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass der vom Resomer<sup>®</sup> RG 752 verursachte Peak in den Elugrammen der thermisch behandelten Probengemische in den unteren Molekulargewichtsbereich verschoben wurde (Tab.3.15). Die Werte von  $M_w$  für RG 752 wurden von 14304 g/mol auf 9414 g/mol und von  $M_n$  für RG 752 wurden von 8478 g/mol auf 5611 g/mol reduziert. Ausgehend von diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass das Resomer<sup>®</sup> RG 752 geringfügig abgebaut wird. Eine weitere Reaktionsmöglichkeit sind Umesterungsprozesse mit PEG 400, die vermutlich jedoch lediglich eine untergeordnete Rolle spielen.

Weiterhin wurde die aus dem Homopolymeren hergestellte R 202H-Lösung vor und nach der Behandlung im Autoklaven untersucht. Sowohl das unbehandelte als

auch das autoklavierte Polymer R 202H konnte sehr gut vom PEG 400 abgetrennt werden (Abb. 3.25).

Der  $M_w$ -Wert des R 202H in Lösung ( $M_w = 10936$  g/mol) stimmte mit dem Wert aus der Einzelbestimmung ( $M_w = 10329$  g/mol) überein.

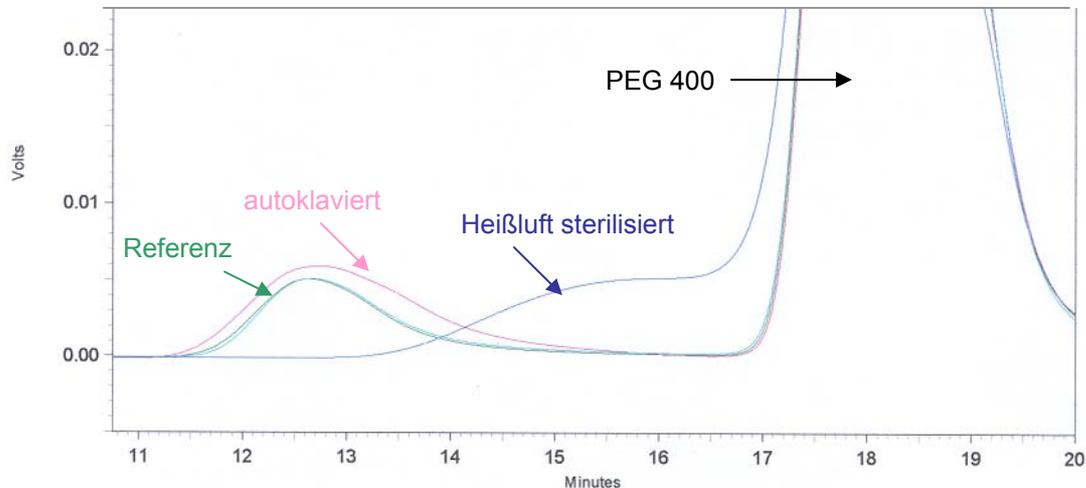


Abb. 3.25: GPC-Eluogramme der R 202H-Lösung vor und nach Behandlung im Autoklav und Heißluftsterilisator

Für die autoklavierten R 202H-Lösungen konnte festgestellt werden, dass die Werte für  $M_n$  von 7802 g/mol auf 6754 g/mol geringfügig reduziert wurden, während die Werte für  $M_w$  unverändert blieben (Tab.3.15).

Die Ergebnisse veranschaulichen, dass das Homopolymer R 202H, gelöst in PEG 400, hydrolytisch stabiler als das Copolymer RG 752 ist.

### 3.3.2.8 Diskussion und Schlussfolgerung

Die Sterilisation der ausgewählten Resomere<sup>®</sup>-Formulierungen mit trockener Hitze bei 180 °C für 30 Minuten ist nicht möglich. Dabei wurde der Einfluss des thermischen Verfahrens auf die physikochemischen Eigenschaften am Beispiel der Resomere<sup>®</sup>, dem Homopolymeren R 202H und dem Copolymer RG 752 untersucht. Dazu wurden zum einen die Ausgangsstoffe, die Resomere<sup>®</sup>, und zum anderen die Zwischenprodukte, die Resomere<sup>®</sup>-Lösungen, mit trockener Hitze sterilisiert. Eine Heißluftsterilisation im Endbehältnis, der Resomere<sup>®</sup>-Formulierung, wurde von vornherein aufgrund der thermolabilen Proteinstruktur des CcC ausgeschlossen. Eine Übersicht über die Ergebnisse zur Untersuchung des Einflusses der Sterilisation mit trockener Hitze auf die Eigenschaften der Resomere<sup>®</sup> gibt Tabelle 3.16.

Tab. 3.16: Einfluss der Heißluftsterilisation auf die physikochemischen Eigenschaften (SZ, inhärente Viskosität, Molmassen,  $T_g$ ) der Resomere<sup>®</sup>

Resomer <sup>®</sup>	Formulierung	Einfluss der Heißluftsterilisation auf			
		SZ	Inhärente Viskosität	Molmassen	Glasübergangstemperatur
R 202H	Pulver	↑↑	n.a.	↓	↓
	Lösung	↑↑↑	n.a.	↓↓↓	n.a.
RG 752	Pulver	↑↑	↓	↓	↓
	Lösung	↑↑↑↑	n.a.	↓↓↓↓	n.a.

↑ - ↑↑↑↑: erhöht – sehr stark erhöht; ↓ - ↓↓↓↓ erniedrigt - sehr stark erniedrigt; n.a. nicht analysiert

Bei diesem Verfahren gehen die Resomere<sup>®</sup> infolge der Erwärmung in einen elastischen Zustand über. In diesem Zustand kommt es, katalysiert durch die hohen Temperaturen, zur Hydrolyse. Das wurde im Anstieg der SZ deutlich, d.h. es lagen mehr freie Säureendgruppen infolge der Spaltung der Esterverbindungen vor. Diese Ergebnisse wurden mit der Untersuchung der Molmassen bestätigt. Die Werte für  $M_w$  und  $M_n$  wurden bei beiden Resomeren<sup>®</sup> infolge der Sterilisation erniedrigt, die Polydispersität wurde dagegen erhöht. Die Polymere wurden infolge der hohen Temperaturen in kleine Bruchstücke wie Oligomere abgebaut. Mit der Verringerung der Molmassen wurden auch die Glasübergangstemperaturen erniedrigt.

Die Polymere RG 752 und R 202H, beide in PEG 400 gelöst, wurden bei Sterilisation mit trockener Hitze vollständig zu Oligomeren und Monomeren abgebaut. Die SZ der Resomere<sup>®</sup> wurde erhöht. Bei der Untersuchung der Molmassen mittels GPC konnte festgestellt werden, dass der Resomer<sup>®</sup>-Peak nach Heißluftsterilisation nicht mehr detektiert werden konnte. Aus den behandelten Resomer<sup>®</sup>-Lösungen konnte kein in situ Implantat hergestellt werden, weil keine Implantatausformung stattfand. Bei der Injektion vermischte sich die Resomer<sup>®</sup>-Lösung mit dem Freisetzungsmittel und koagulierte nicht. Die aufgeführten Ergebnisse sind ein Nachweis dafür, dass infolge der Heißluftsterilisation die Resomere<sup>®</sup> in PEG-Lösung unabhängig vom Polymertyp soweit abgebaut wurden, dass in Wasser lösliche Oligomere und Monomere entstanden.

Nach Arzneibuch sind auch andere Temperatur-Zeit-Kombinationen zur Sterilisation mit trockener Hitze möglich, sofern diese validiert werden. Temperaturen ab 120 °C für Resomere<sup>®</sup> und deren Lösungen führten zu Veränderungen der physikochemischen Eigenschaften und sind daher nicht praktikabel. Eine Verminderung der Keimzahl kann bei 60 °C durchgeführt werden.

Des Weiteren wäre für die R202H-Lösung eine Keimreduzierung im Autoklaven in Bezug auf die untersuchten Parameter denkbar.

Das Verfahren der Sterilisation mit trockener Hitze ist für die Resomer<sup>®</sup>-Formulierungen in allen Herstellungsstufen aufgrund der thermolabilen Eigenschaft der Resomere<sup>®</sup> nicht geeignet.

### **3.3.3 Strahlensterilisation**

Die Sterilisation mit  $\gamma$ -Strahlen der Resomer<sup>®</sup>-Formulierungen scheint die einzig akzeptable Methode für eine Schlusssterilisation zu sein<sup>63,130,175</sup>. Aus der Literatur ist bekannt, dass auch die Strahlensterilisation in Abhängigkeit von der Strahlendosis zur Kettenverkürzung oder zu „cross-links“ im Polymer oder mit dem Wirkstoff führt<sup>71-73,116,131</sup>. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Strahlensterilisation der ausgewählten Resomere<sup>®</sup> und deren Formulierungen unter Einbeziehung von Literaturdaten ausführlich diskutiert.

Die Sterilisation mit  $\gamma$ -Strahlen wurde unter Nutzung einer Kobalt 60 (<sup>60</sup>Co) Quelle durchgeführt<sup>60</sup>. Die Proben wurden mit einer Strahlendosis von mindestens 25 kGy behandelt. Unter Anwendung dieser Methode wurden die Ausgangsstoffe, die Resomere<sup>®</sup> RG 752, RG 503H und R 202H, die Zwischenprodukte, die Resomer<sup>®</sup>-Lösungen, sowie die Resomer<sup>®</sup>-Formulierungen im Endbehältnis sterilisiert.

Die behandelten Proben wurden hinsichtlich der Änderung folgender Parameter untersucht:

- ◆ Säurezahl,
- ◆ inhärente Viskosität und
- ◆ Molmassen und -verteilung.

Auch technologische Eigenschaften, wie beispielsweise die Freisetzung aus der Formulierung, wurden vor und nach der Strahlensterilisation geprüft.

#### *3.3.3.1 Einfluss der Strahlensterilisation auf die Säurezahl*

Es wurden die Copolymere RG 752 sowie RG 503H, die sich hinsichtlich des Verhältnisses von Milchsäure zu Glykolsäure, des Endgruppenschutzes sowie der mittleren Molmassen unterscheiden, und das Homopolymer R 202H untersucht. Die SZ wurde einerseits von den Resomer<sup>®</sup>-Pulvern, andererseits von den Resomer<sup>®</sup>-Lösungen vor und nach der Behandlung mit  $\gamma$ -Strahlen bestimmt. In Abbildung 3.26 ist die SZ der unbehandelten Proben im Vergleich zu den sterilisierten dargestellt.

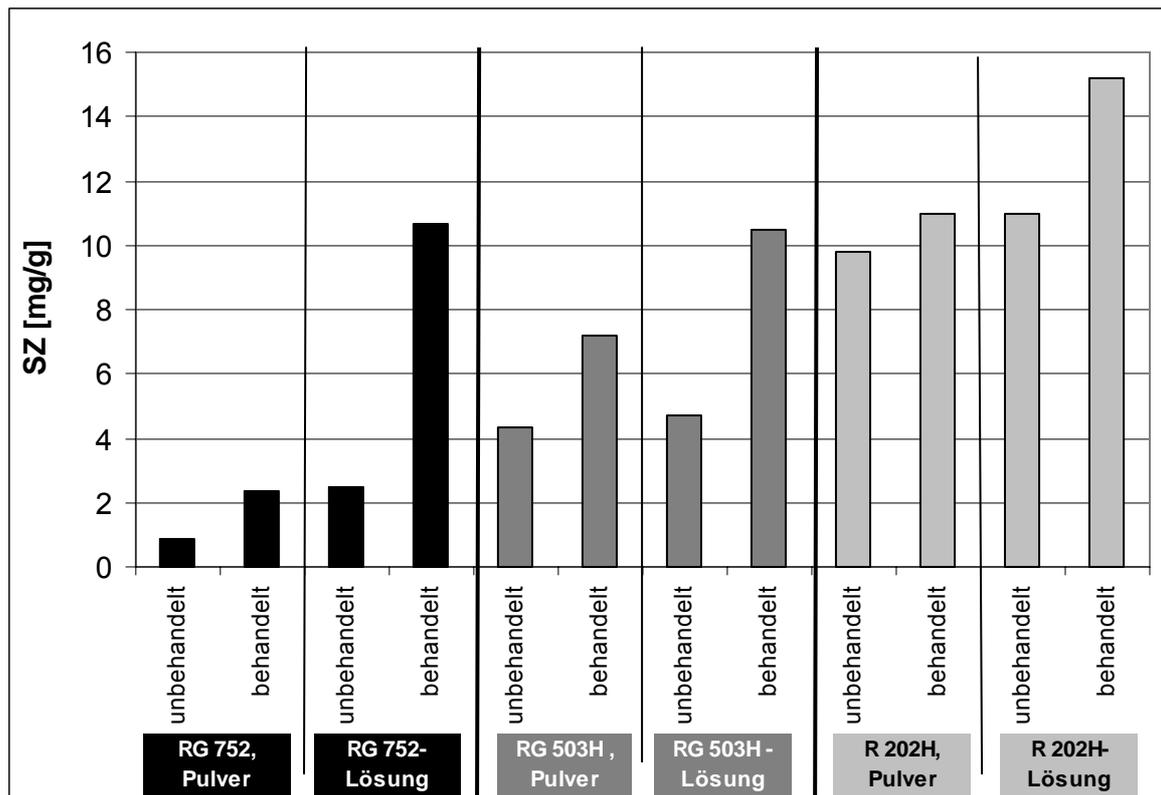


Abb. 3.26: SZ der unbehandelten und der strahlensterilisierten Resomere<sup>®</sup> sowie deren PEG-Lösungen (x, n = 3)

Die mit  $\gamma$ -Strahlen sterilisierten Ausgangsstoffe RG 752, RG 503H und R 202H zeigten eine im Vergleich zu den unbehandelten Proben erhöhte SZ. Dabei war beim Copolymer RG 503H der Anstieg der SZ von 4,3 mg/g auf 7,2 mg/g am größten. Die SZ des Resomeres<sup>®</sup> RG 752 erhöhte sich um 1,55 mg/g. Am unempfindlichsten gegenüber  $\gamma$ -Strahlen ist das Homopolymer R 202H. Die Strahlensterilisation des Homopolymers führt zu einem geringfügigen Anstieg der SZ von 9,7 mg/g auf 11 mg/g (Abb. 3.26). Damit steigt die Empfindlichkeit der untersuchten Resomere<sup>®</sup> gegenüber  $\gamma$ -Strahlen mit dem Glykolidanteil des Polymeres: RG 503H >> RG 752 > R 202H.

Der Anstieg der SZ der Resomere<sup>®</sup> infolge der Behandlung mit  $\gamma$ -Strahlen ist in Lösung deutlich ausgeprägter als im Ausgangsmaterial selbst. Während für RG 503H im Ausgangsmaterial eine 1,7fache Erhöhung bestimmt wurde, konnte in Lösung ein 2,2facher Anstieg der SZ festgestellt werden. Jedoch wurde in der PEG 400-Lösung das Copolymer RG 752 stärker abgebaut. Die SZ stieg von 2,5 mg/g auf 10,7 mg/g (Abb. 3.26). Der Anstieg der SZ des PLA um 4 mg/g war dabei am geringsten. Die Empfindlichkeit der Resomere<sup>®</sup> in Lösung gegenüber  $\gamma$ -Strahlen lautet: RG 752 >> RG 503H > R 202H.

Die größere Empfindlichkeit in Lösung ist zum einen auf den Wassergehalt des Lösungsmittels PEG 400 mit ca. 2 % und auf die freie Beweglichkeit der Polymere zum anderen zurückzuführen. Der Restwassergehalt kann eine gesteigerte Hydrolyse bedingen, Radikalkettenreaktion laufen in Lösung verstärkt ab und damit steigt die Zahl an freien Säuregruppen. Dabei sind die Copolymere empfindlicher als die Homopolymere. Auch in der Literatur werden Hydrolysereaktionen als auch Kettenbrüche durch Radikalbildung von PLA und PLGA infolge Strahlensterilisation beschrieben<sup>65,71,72,131,132,168</sup>.

### 3.3.3.2 Einfluss der Strahlensterilisation auf die inhärente Viskosität

Es wurden wiederum die Resomere<sup>®</sup> RG 752, RG 503H und R 202H vor und nach der Sterilisation mit  $\gamma$ -Strahlen untersucht. Der Einfluss der Strahlensterilisation auf die inhärente Viskosität der untersuchten Polymere ist in Tabelle 3.17 aufgeführt.

Tab. 3.17: inhärente Viskositäten der unbehandelten und der strahlensterilisierten Resomere<sup>®</sup> (x, n = 6)

Untersuchungsparameter	RG 752		RG 503H		R 202H	
	unbehandelt	strahlensterilisiert	unbehandelt	strahlensterilisiert	unbehandelt	strahlensterilisiert
inhärente Viskosität einer 0,4 %igen Lösung $\eta_{\text{inhärent}} [\text{dl} / \text{g}]$	0,199	0,184	0,383	0,293	0,230	0,199

Nach der Behandlung mit  $\gamma$ -Strahlen nimmt die inhärente Viskosität für alle untersuchten Resomere<sup>®</sup> ab. Die Reihenfolge der Abnahme der inhärenten Viskosität lautet: RG 503H >> R 202H > RG 752.

Dem Ergebnis der SZ-Bestimmung folgend, bei welcher für RG 503H der höchste Anstieg ermittelt wurde, wurde die inhärente Viskosität des Copolymeres am stärksten reduziert. Während für die Resomere RG 752 und R 202H die inhärente Viskosität nur geringfügig verringert wurde. Um den Einfluss der Strahlensterilisation auf die PLA bzw. PLGA weiter zu verifizieren, wurden GPC-Untersuchungen durchgeführt.

### 3.3.3.3 Einfluss der Strahlensterilisation auf die Molmassen und -verteilung

Der Einfluss der Strahlensterilisation auf die Molmassen und -verteilung der Ausgangsmaterialien wurde am Beispiel der Resomere<sup>®</sup> RG 752, RG 503H und R 202H bewertet. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tabelle 3.18 aufgeführt.

Tab. 3.18: Molmassen und -verteilung der unbehandelten und der strahlensterilisierten Resomere<sup>®</sup> RG 752, RG 503H und R 202H ( $\bar{x}$ ,  $n = 2$ )

Molmassen/ Polydispersität	RG 752		RG 503H		R 202H	
	unbehandelt (Referenz)	behandelt	unbehandelt (Referenz)	behandelt	unbehandelt (Referenz)	behandelt
$M_w$ [g/mol]	14286	13219	43376	27190	11801	11285
$M_n$ [g/mol]	8018	7474	30421	18462	7234	6851
$M_w/M_n$	1,782	1,769	1,426	1,473	1,631	1,647

Die Elugramme der unbehandelten Resomere<sup>®</sup> RG 752 und R 202H sind bereits im Abschnitt 3.3.2.3 beschrieben worden. Der Energieeintrag durch die Behandlung mit  $\gamma$ -Strahlen führte beim RG 752 und R 202H zu Esterspaltungen der Polymerketten. Die Werte für  $M_w$  und  $M_n$  wurden geringfügig erniedrigt, die Polydispersität wurde hingegen nicht verändert. Demgegenüber wurden die mittleren Molmassen des Copolymers RG 503H mit freien Säureendgruppen durch die Strahlensterilisation stärker beeinflusst. Für bestrahltes RG 503H konnte eine Verringerung der Werte für  $M_w$  und  $M_n$  im Vergleich zu unbehandeltem Resomer<sup>®</sup> nachgewiesen werden (Tab. 3.18). Das Polymer RG 503H zeigte unter der angewandten Sterilisation mit  $\gamma$ -Strahlen ausgeprägte Abbauerscheinungen.

Auch das Zwischenprodukt, die Resomer<sup>®</sup>-Lösungen, wurden vor und nach der Strahlensterilisation auf Änderungen der Molmassen und -verteilung, geschehen am Beispiel von RG 752 und R 202H, hin untersucht. In der Abbildung 3.27 sind die Ergebnisse grafisch aufgeführt.

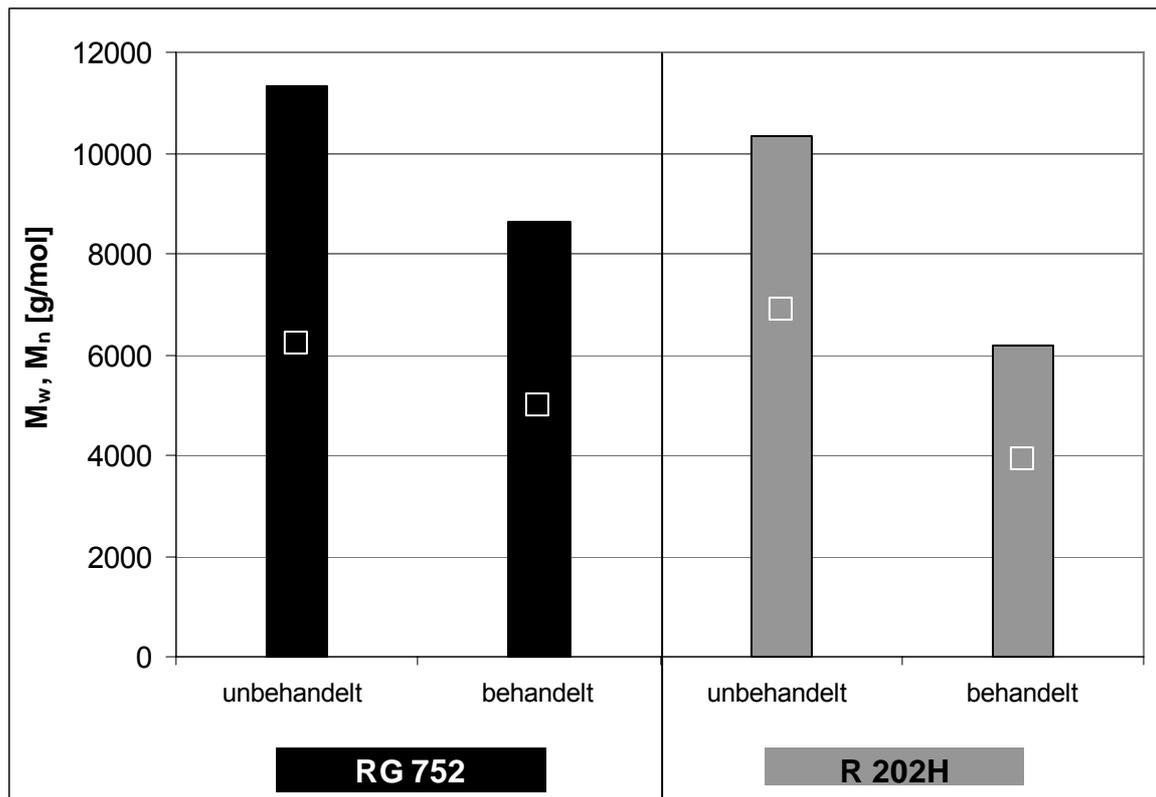


Abb. 3.27: Einfluss der Strahlensterilisation auf die Molmassen  $M_w$  (Säule) und  $M_n$  ( $\square$ ) der Resomer<sup>®</sup>-Lösungen von RG 752 und R 202H ( $x, n = 2$ )

In den untersuchten Resomer<sup>®</sup>-Lösungen konnte das jeweilige Resomer<sup>®</sup> deutlich vom PEG 400 getrennt werden. Im Ergebnis der Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass der vom Resomer<sup>®</sup> RG 752 verursachte Peak in den Elugrammen der strahlensterilisierten Probengemische in den unteren Molmassenbereich verschoben wurde. Die Werte von  $M_w$  wurden von 11329 g/mol auf 8646 g/mol und die von  $M_n$  von 6204 g/mol auf 4971 g/mol reduziert. Dabei wurde der durch das PEG 400 verursachte Peak infolge der Sterilisation mit  $\gamma$ -Strahlen nicht verändert. Die Verringerung der Werte für  $M_w$  und  $M_n$  des Resomers<sup>®</sup> R 202H war ähnlich ausgeprägt. Die Werte für  $M_w$  wurden von 10330 g/mol auf 6180 g/mol und die Werte für  $M_n$  von 6898 g/mol auf 3903 g/mol reduziert. Der Energieeintrag führt im höhermolekularen Bereich des Homopolymers zu größeren Veränderungen.

Im Ergebnis der Untersuchung der Molmassen der Resomere<sup>®</sup> ist erkennbar, dass die Strahlensterilisation zu Veränderungen der Polymerketten durch hydrolytischen oder radiolytischen Abbau führt.

#### 3.3.3.4 Einfluss der Strahlensterilisation auf die Freisetzung

Die Untersuchung des Einflusses der Sterilisation mit  $\gamma$ -Strahlen auf die Freisetzung der Modellsubstanz CcC aus dem in situ Implantat erfolgte am Beispiel des Resomers<sup>®</sup> RG 752. Eine Strahlensterilisation ist in allen Herstellungsstufen möglich, behandelt wurden die Resomere<sup>®</sup> als Ausgangsstoffe, die Zwischenprodukte, die Resomer<sup>®</sup>-Lösungen und die Endformulierungen, die Resomer<sup>®</sup>-Formulierungen.

Nach Strahlensterilisation des Ausgangsstoffs RG 752 wurden dieser in PEG 400 gelöst und anschließend die Modellsubstanz in den PEG-Lösungen suspendiert. Während der Ausformung des in situ Implantates nach Injektion in das FreisetzungsmEDIUM konnte keine sichtbare Veränderung der Koagulation der Resomere<sup>®</sup> festgestellt werden.

Das Zwischenprodukt, die RG 752-Lösung, wurde ebenfalls mit  $\gamma$ -Strahlen sterilisiert. In die sterile Lösung wurde CcC suspendiert und die Freisetzung aus der Formulierung untersucht. Nach Injizieren der Formulierung war eine langsamere Koagulation sichtbar.

Die Resomer<sup>®</sup>-Formulierung wurde im Endbehältnis strahlensterilisiert. Eine verlangsamte Ausformung der in situ Implantate war nach Injektion in das FreisetzungsmEDIUM beobachtbar.

Die Ergebnisse der Untersuchung der Freisetzung von CcC aus den strahlensterilisierten Formulierungen im Vergleich zu den unbehandelten sind in der nachfolgenden Abbildung 3.28 einzusehen.

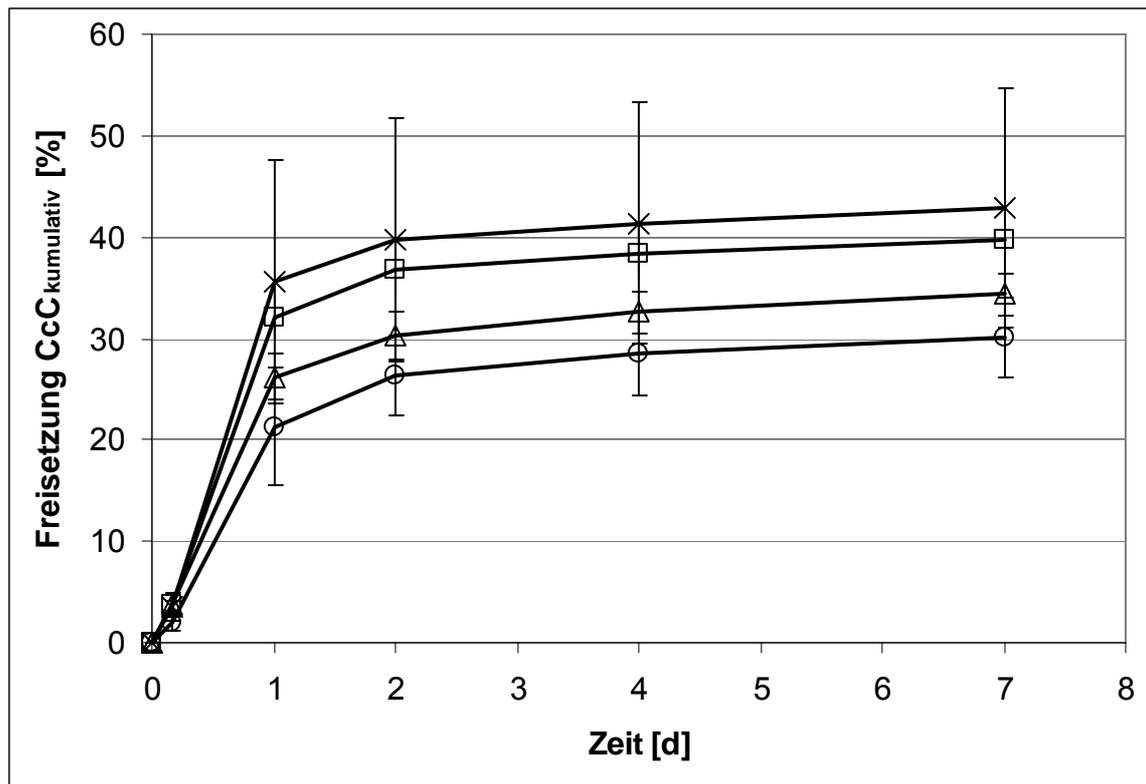


Abb. 3.28: CcC - Freisetzung aus den RG 752 - Implantaten vor und nach Strahlensterilisation ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

- Referenz
- Δ strahlensterilisiertes Resomer®
- x strahlensterilisierte Resomer®-Lösungen
- o strahlensterilisierte Resomer®-Formulierung im Endbehältnis

Das Freisetzungsprofil der im Endbehältnis sterilisierten RG 752-Formulierung weicht am meisten vom Referenzprofil ab. Die CcC-Freisetzung war nach sieben Tagen von 40 % auf 30 % CcC reduziert. Das kann einerseits durch den Abbau des Wirkstoffes infolge der Strahlensterilisation bedingt sein (siehe Kapitel 3.3.6). Andererseits kann wie bereits in der Literatur beschrieben ist, die Polymer-Matrix mit dem Wirkstoff reagieren<sup>72,130,131</sup>. Die Sterilisation mit energiereichen  $\gamma$ -Strahlen führt zu Kettenbrüchen und Radikalbildung. Die entstandenen Radikale können sich mit dem Modellwirkstoff oder dem Lösungsmittel PEG 400 vernetzen, was dazu führt, dass weniger CcC freigesetzt wird.

Die Freisetzung von CcC aus dem mit strahlensterilisiertem Resomer® hergestellten in situ Implantat ist nur geringfügig verlangsamt. Nach sieben Tagen wurden aus dem RG 752-Implantat ca. 5 % weniger CcC freigesetzt. Wie bereits aufgezeigt wurde, ist das Resomer® infolge Strahlensterilisation nur geringfügig abgebaut. Daher ist auch die Freisetzung kaum verändert.

Dagegen führte die Strahlensterilisation des Zwischenproduktes, der Resomer<sup>®</sup>-Lösung, zu einer geringfügigen Beschleunigung der Freigabe von CcC. Nach sieben Tagen sind aus dem RG 752-Implantat im Vergleich zum unbehandelten ca. 3 % mehr Modellwirkstoff freigesetzt worden.

In der Bewertung der Ergebnisse ist jedoch zu berücksichtigen, dass durch die Behandlung mit energiereichen  $\gamma$ -Strahlen Radikale entstehen, die sowohl zu chemischen Veränderungen der Resomere<sup>®</sup> als auch des Lösungsmittels PEG 400 während der Sterilisation bzw. auch während der Lagerung führen<sup>73,116,131</sup>. Die Ergebnisse stellen damit eine Momentaufnahme dar. Komplexe Wechselwirkungen zwischen dem Resomer<sup>®</sup> und dem PEG 400 können somit verursacht worden sein und eine Erklärung für die erhaltenen Ergebnisse darstellen<sup>72</sup>.

Die Untersuchung des Mechanismus des radiolytischen Kettenbruchs der PLA- und PLGA-Polymere durch die Sterilisation mit  $\gamma$ -Strahlen wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. In zahlreichen Veröffentlichungen wird der Mechanismus der Radiolyse diskutiert<sup>116,131</sup>. Es sollte hier lediglich die Eignung der Strahlensterilisation für die ausgewählten Formulierungen bewertet werden. Die Strahlensterilisation eignet sich nicht für die ausgewählten Rezepturen.

### 3.3.3.6 Diskussion und Schlussfolgerung

Die Sterilisation mit  $\gamma$ -Strahlen erfolgte mit mindestens 25 kGy unter Nutzung einer <sup>60</sup>Co-Quelle. Mit dieser Methode wurden die Resomere<sup>®</sup> als Ausgangsstoffe, die Resomer<sup>®</sup>-Lösungen, in der Form der Zwischenprodukte und die Resomer<sup>®</sup>-Formulierungen im Endbehältnis sterilisiert. Die Untersuchungen wurden an dem Homopolymer R 202H und den Copolymeren RG 752 und RG 503 H sowie deren Zubereitungen, die sich hinsichtlich Zusammensetzung, Molmassen und Endgruppenschutz unterscheiden, durchgeführt. Wie in der Literatur bereits beschrieben, bestätigen die Ergebnisse, dass die Strahlensterilisation zur Veränderung von SZ, inhärenter Viskosität, Molmassen und Freisetzungsprofil führen kann<sup>72,168,169,172,176,177</sup> (Tab. 3.19).

Tab. 3.19: Einfluss der Strahlensterilisation auf die physikochemischen Eigenschaften (SZ, Molmassen,  $\eta_{inhärent}$ ) und das Freigabeverhalten der Resomere<sup>®</sup>

Resomer <sup>®</sup>	Formulierung	Einfluss der Strahlensterilisation auf			
		SZ	Inhärente Viskosität	Molmassenverteilung	Freigabeverhalten
R 202H	Ausgangsstoff	↑	↓	↓	n.a.
	Lösung	↑↑	n.a.	↓↓	n.a.
RG 752	Ausgangsstoff	↑	↓	↓	↓
	Lösung	↑↑↑	n.a.	↓↓	↑
	Formulierung	n.a.	n.a.	n.a.	↓↓
RG 503H	Ausgangsstoff	↑↑	↓↓	↓↓	n.a.
	Lösung	↑↑	n.a.	n.a.	n.a.

↑ - ↑↑↑: wenig erhöht – stark erhöht; ↓ - ↓↓ wenig erniedrigt - erniedrigt; n.a. nicht analysiert

Die Sterilisation mit energiereichen  $\gamma$ -Strahlen der untersuchten Resomere<sup>®</sup> in allen Herstellungsstufen führte zu Veränderungen der physikochemischen Eigenschaften und damit auch zu Veränderungen im Freigabeverhalten. Das Ausmaß ist dabei einerseits von der Polymerart, d.h. der Zusammensetzung, Endgruppenschutz und Molmasse, andererseits vom Zustand des Resomers<sup>®</sup>, d.h. ob er als Ausgangsstoff, in PEG gelöst oder in der Endformulierung vorliegt, abhängig.

In der Bewertung ist zu berücksichtigen, dass durch die Behandlung mit energiereichen  $\gamma$ -Strahlen Radikale entstehen, die zu chemischen Veränderungen in den Resomeren<sup>®</sup> selbst, im CcC und in den Formulierungen während der Sterilisation als auch während der Lagerung führen<sup>73,116,131</sup>. Die Ergebnisse stellen damit eine Momentaufnahme dar. Komplexe Wechselwirkungen zwischen der Trägermatrix, dem Resomer<sup>®</sup> und dem PEG 400 sowie der Modellsubstanz CcC sind in der Bewertung der Ergebnisse zu berücksichtigen<sup>72</sup>. Deutlich wird jedoch, dass die Strahlensterilisation für die ausgewählten Resomere<sup>®</sup> und deren Formulierungen nicht anwendbar ist. Die Bildung von Radikalen und die Aufklärung des Mechanismus durch die Sterilisation mit  $\gamma$ -Strahlen wurden von anderen Arbeitsgruppen untersucht und bewertet<sup>73,130,131,178,179</sup>.

### 3.3.4 Mikrowellenbehandlung

Eine in Japan bereits etablierte Sterilisationsmethode für hitze- und strahlensensitive Formulierungen ist die Sterilisation mit Mikrowellen<sup>79</sup>. Mit validierten Verfahren werden unter Nutzung von leistungsstarken Geräten (5 kW) bei einer Frequenz von

2,5 kHz wässrige Lösungen sterilisiert<sup>77,78,90</sup>. Da die Sterilisation mit Mikrowellen in Europa bisher nicht angewendet wird, soll nachfolgend von einer Behandlung mit Mikrowellen gesprochen werden.

Es wurde hierzu der Einfluss der Mikrowellenbehandlung auf physikochemische und anwendungsrelevante Eigenschaften der Resomer<sup>®</sup>-Formulierungen untersucht. Dazu wurden die nachfolgenden Parameter bewertet:

- Säurezahl
- Molmassen und -verteilung
- Freisetzung
- Sterilität

Die Sterilität der sterilisierten Formulierungen wurde bisher nicht untersucht. Bei den aktuell bewerteten Sterilisationsverfahren handelt es sich um Standard-Sterilisationsverfahren des Europäischen Arzneibuches, mit denen mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Sterilität der Produkte erzielt werden kann. Da die Mikrowellenbehandlung ein alternatives Verfahren zur Sterilisation darstellt, wurden behandelte Resomer<sup>®</sup>-Lösungen auf Sterilität nach Ph. Eur. 2.6.1 geprüft.

Die Auswahl der Parameter zur Behandlung mit Mikrowellen erfolgte in Anlehnung an die Japanische Pharmakopoe<sup>79</sup> und Veröffentlichungen von Gröning et al.<sup>95</sup>. Auf dem deutschen Markt sind im Vergleich zum japanischen Markt jedoch keine Mikrowellengeräte mit einer Leistung von 5 kW verfügbar. Allerdings werden auch mit den zur Verfügung stehenden Industriemikrowellen von 1 kW die zur Keimzahlreduktion erforderlichen Temperaturen von ca. 140 °C bei erhöhter Behandlungsdauer erreicht. Es wurde eine Behandlungstemperatur von 140 °C ausgewählt. Temperaturen oberhalb und unterhalb davon sollten Extreme abstecken (Tab. 3.20). Die Dauer der Mikrowellenbehandlung wurde ebenfalls variiert. Die Bestrahlung erfolgte bei allen drei Verfahren mit einer Frequenz von 2500 Hz.

Tab. 3.20: Parameter zur Mikrowellenbehandlung von Resomer<sup>®</sup>-Lösungen und -Formulierungen

Behandelte Formulierung	Maximale Leistung [W]	Endtemperatur [°C]	Dauer der Behandlung [s]
Resomer <sup>®</sup> -Lösung und Resomer <sup>®</sup> -Formulierung im Endbehältnis	1000	100	Halte- und Aufheizzeit: 300 s
	1000	140	Haltezeit: 15 s Aufheizzeit: 50 s – 60 s
	1000	160	Haltezeit: 15 s Aufheizzeit: 90 s – 100 s

### 3.3.4.1 Einfluss der Mikrowellenbehandlung auf die Säurezahl

Es wurde der Einfluss der Mikrowellenbehandlung unter Variation der Parameter Temperatur und Zeit auf die SZ des Resomers<sup>®</sup> R 202H, gelöst in PEG 400, untersucht. Die Werte der SZ sind in Abbildung 3.29 dargestellt.

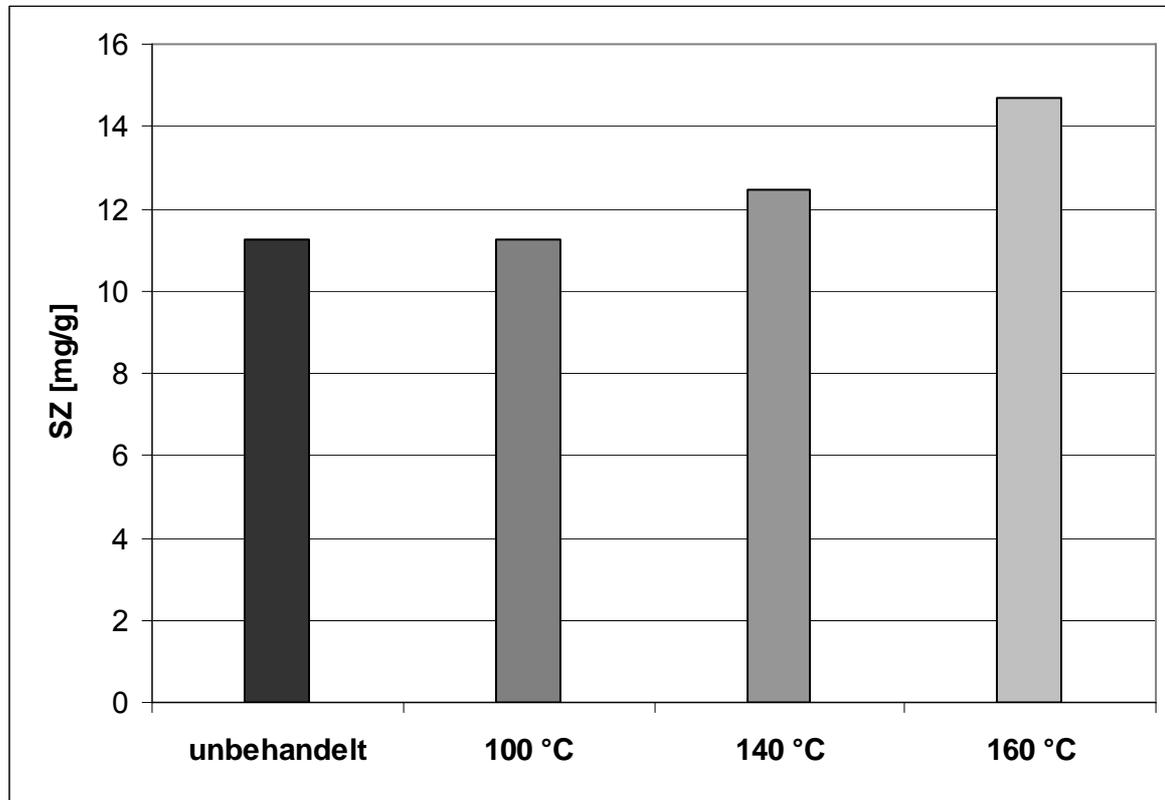


Abb. 3.29: SZ der unbehandelten und der mit Mikrowellen behandelten R 202H-Lösungen in Abhängigkeit von den Parametern Temperatur und Zeit ( $x$ ,  $n = 3$ )

Die Mikrowellenbehandlung bei 100 °C und 300 s mit einem 1000 Watt Gerät führt zu keiner signifikanten Veränderung der SZ. Im Gegensatz dazu weisen die Behandlungen bei höheren Temperaturen, aber verkürzten Zeiten (ca. 75 s bis 115 s) eine erhöhte SZ auf. Bei der Mikrowellenbehandlung mit 140 °C steigt die SZ geringfügig von 11,2 mg/g auf 12,5 mg/g und mit 160 °C auf 14,7 mg/g. Das bedeutet eine Zunahme der freien Säureendgruppen. Infolge der höheren Temperaturen wird die Hydrolyse initialisiert und führt somit zum Anstieg der SZ. Dabei nimmt mit steigender Temperatur die Erhöhung der SZ zu. Obwohl die thermische Belastung der Proben nur kurzzeitig ist, scheint diese schon auszureichen, um den Abbau des Resomers<sup>®</sup> einzuleiten.

### 3.3.4.2 Einfluss der Mikrowellenbehandlung auf die Molmassen und -verteilung

Der Einfluss der Mikrowellenbehandlung auf die Molmassen und -verteilung wurde am Beispiel der Resomer<sup>®</sup>-Lösungen von RG 752 und R 202H analysiert. Wiederum wurden die Parameter Temperatur und Zeit variiert. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abbildungen 3.30 und 3.31 zu sehen.

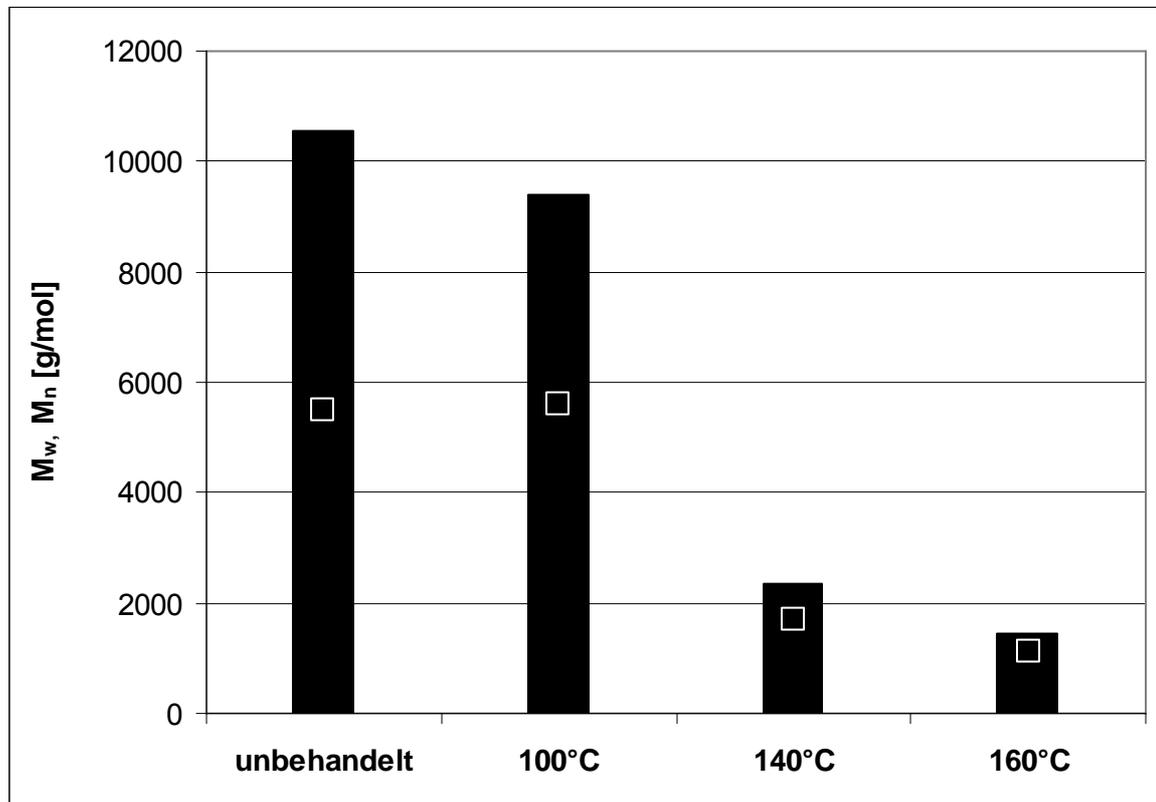


Abb. 3.30: Vergleich der Molmassen  $M_w$  (Säule) und  $M_n$  (□) der unbehandelten mit denen der mit Mikrowellen behandelten RG 752-Lösungen ( $x$ ,  $n = 2$ )

Die Werte für  $M_n$  und  $M_w$  der bei 100 °C über 300 s mit Mikrowellen behandelten Resomer<sup>®</sup>-Lösungen sind nicht signifikant verändert. Die Mikrowellenbehandlung mit dieser gewählten Temperatur-Zeit-Kombination führte zu keiner Änderung der Molmassen der Trägerpolymere. Die Behandlung der Resomer<sup>®</sup>-Lösungen mit Mikrowellen bei höheren Temperaturen (140°C und 160°C) führte trotz kürzerer Behandlungszeiten zu einer Reduzierung der Werte von  $M_w$  und  $M_n$ . Im Ergebnis der Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass der vom Resomer<sup>®</sup> RG 752 verursachte Peak in den Elugrammen der behandelten Probengemische deutlich in den unteren Molmassenbereich verschoben wurde. Die Werte von  $M_w$  für RG 752 wurden von 10565 g/mol auf 2335 g/mol bei 140 °C bzw. auf 1440 g/mol bei 160 °C und von  $M_n$  für RG 752 von 5481 g/mol auf 1709 g/mol bei 140 °C bzw. auf 1116 g/mol bei 160 °C reduziert (Abb.3.30). Die Reduzierung erfolgte für  $M_w$  wie auch für

$M_n$  gleichermaßen. Die Polydispersität wurde erniedrigt. Infolge Mikrowellenbehandlung bei 140 °C oder 160 °C wurde das Resomer<sup>®</sup> RG 752, gelöst in PEG 400 abgebaut. Der Abbau kann hydrolytisch bedingt sein, allerdings können auch Umesterungsprozesse mit PEG 400 eine Rolle spielen. Es verbleiben nur kurzkettigere Copolymerreste. Das Zwischenprodukt, die RG 752-Lösung, ist unter den angewandten Bedingungen (Temperatur 140 °C bzw. 160 °C) der Mikrowellenbehandlung nicht stabil.

Auch der R 202H-Peak im Elugramm der PEG-Lösung wurde durch die Mikrowellenbehandlung bei Temperaturen von 140 °C bzw. 160 °C in den unteren Molmassenbereich verschoben (Abb. 3.31 und Abb. 3.32).

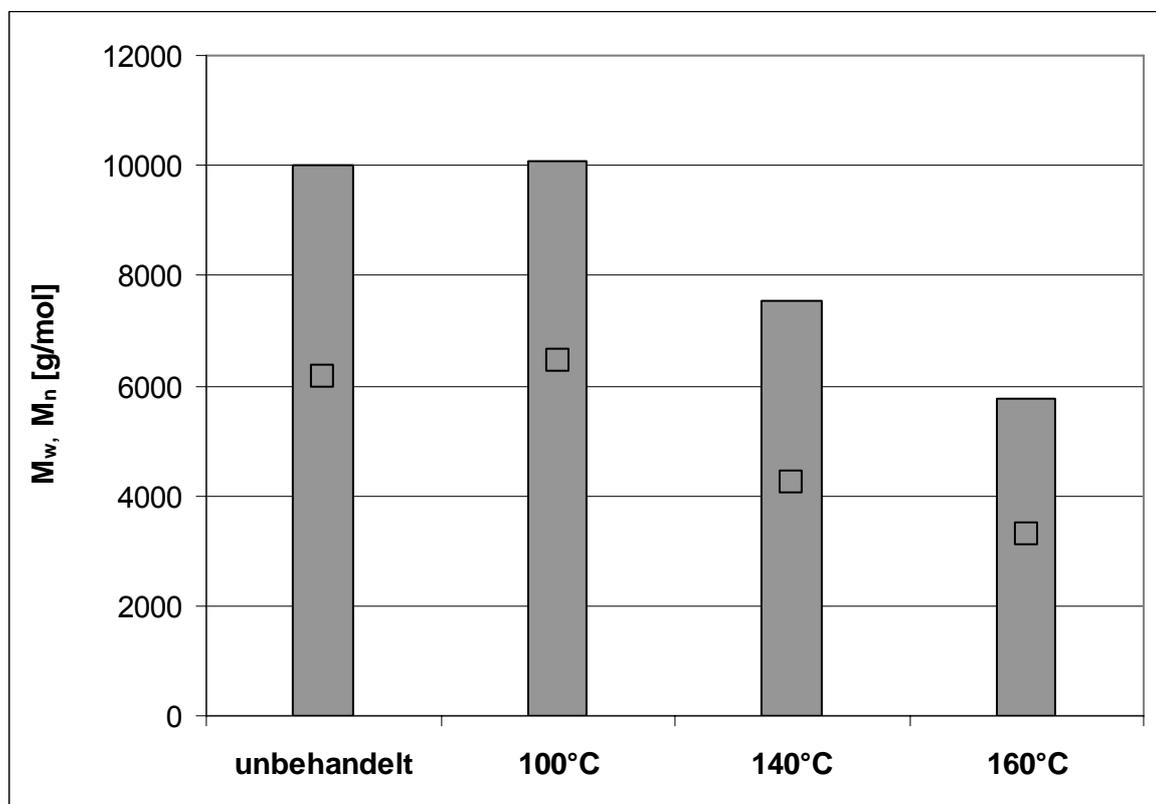


Abb. 3.31: Vergleich der Molmassen  $M_w$  (Säule) und  $M_n$  (□) der unbehandelten mit denen der mit Mikrowellen behandelten R 202H-Lösungen ( $\bar{x}$ ,  $n = 2$ )

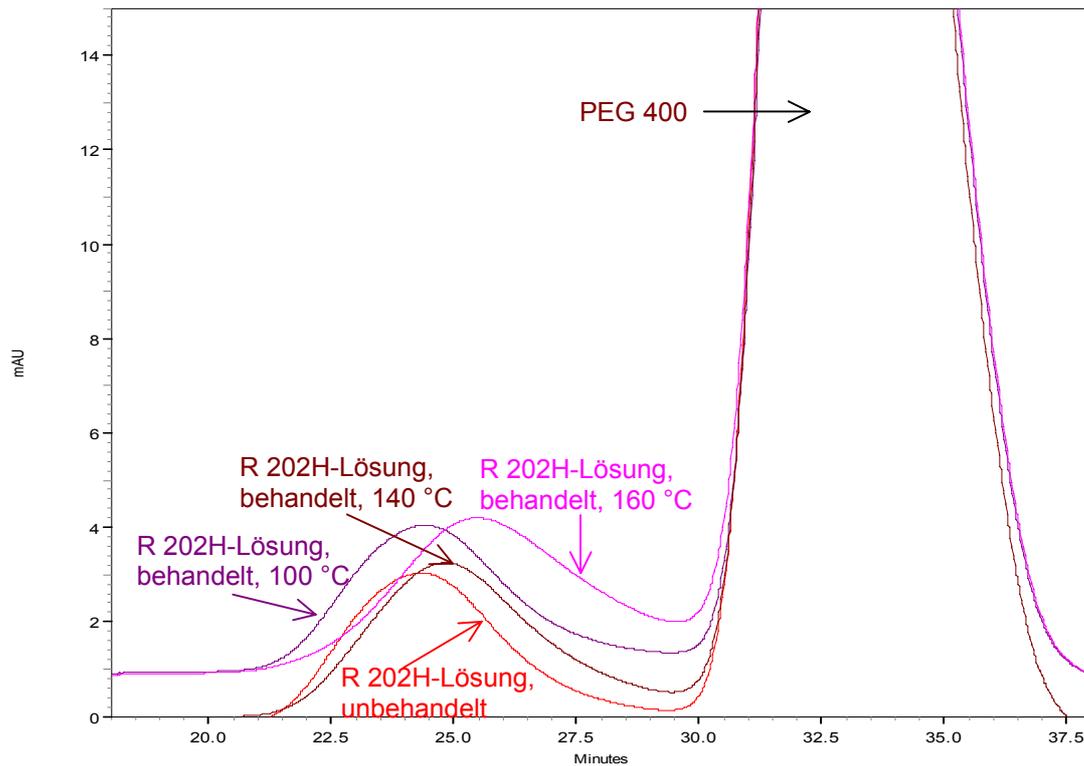


Abb. 3.32: GPC-Eluogramme der R 202H-Lösung vor und nach Mikrowellenbehandlung

Die Reduzierung der Werte für  $M_w$  und  $M_n$  war aber nicht so groß wie für das Copolymer RG 752. Das Copolymer RG 752 scheint, was bereits in den Untersuchungen zur Heißluftsterilisation festgestellt wurde, hydrolytisch anfälliger als das Homopolymer R 202H bei Wärmeeintrag zu sein.

#### 3.3.4.3 Einfluss der Mikrowellenbehandlung auf die Freisetzung

Zur Untersuchung des Einflusses der Mikrowellen auf die Freisetzung von CcC aus den in situ Implantaten wurden zum einen das Zwischenprodukt, die RG 752-Lösung, zum anderen die RG 752-Formulierung im Endbehältnis behandelt. Nach der Behandlung mit Mikrowellen wurde in die PEG-Lösungen CcC unter aseptischen Bedingungen eingearbeitet und anschließend die Freisetzung untersucht. Die Freisetzungsprofile des Zwischenproduktes sind in Abbildung 3.33 aufgezeichnet.

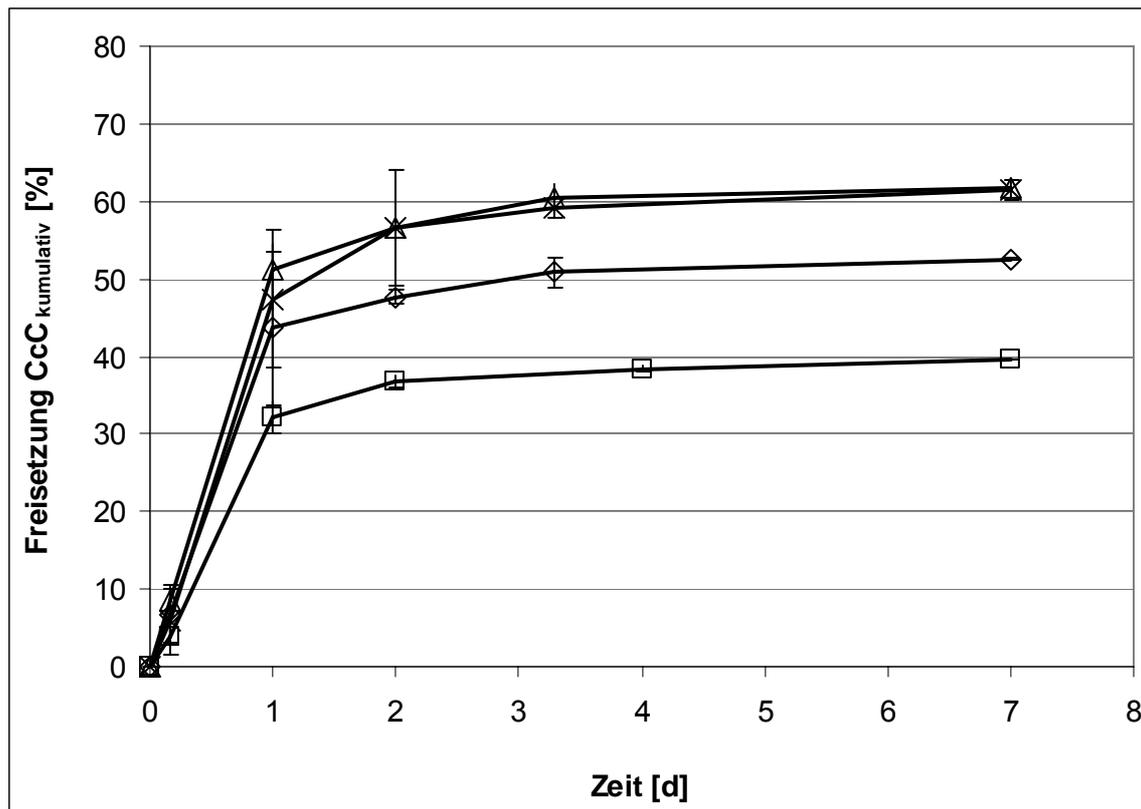


Abb. 3.33: CcC-Freisetzung aus in situ Implantaten vor und nach Mikrowellenbehandlung der RG 752-Lösung ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

- Referenz
- ◇ mikrowellenbehandelte (100 °C) RG 752-Lösung
- △ mikrowellenbehandelte (140 °C) RG 752-Lösung
- x mikrowellenbehandelte (160 °C) RG 752-Lösung

Nach der Behandlung mit Mikrowellen der RG 752-Lösung kommt es nach der Ausformung des in situ Implantates unabhängig von der gewählten Temperatur und Zeit zu einer Zunahme an freigesetztem CcC (Abb. 3.33). Die Freisetzung aus dem in situ Implantat nimmt bei der RG 752-Lösung, die bei 100 °C 300 s lang behandelt wurde, nicht so stark im Vergleich zu den Lösungen mit kürzerer Behandlungsdauer, aber höheren Temperaturen zu. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Temperatur einen größeren Einfluss als die Zeitdauer der Behandlung auf die Stabilität des Resomeres<sup>®</sup> hat. Der hydrolytische Abbau von Resomer<sup>®</sup>-Molekülen ist bei Temperaturen über 130 °C verstärkt<sup>66,68,69,167</sup> und damit kann es zu Veränderungen der Freisetzungprofile kommen. Die Ergebnisse aus der Untersuchung der Molmassenverteilung werden durch die Freisetzungskurven bestätigt. Die bei 140 °C und 160 °C entstandenen kurzkettigeren Moleküle bilden nach Injektion in das Freisetzungsmittel nicht so schnell ein Implantat aus, ein großer Teil an CcC kann während der Ausformung des Implantates abfluten und es resultiert ein erhöhter burst-Effekt im Vergleich zur unbehandelten Probe.

Da sich die Mikrowellenbehandlung in Japan insbesondere für hitze- und strahlensensible Lösungen etabliert hat, wurde auch die RG 752-Formulierung, die mit dem thermosensitiven Protein CcC beladen war, behandelt. Die Freisetzungsprofile der in situ Implantate sind in folgender Abbildung 3.34 dargestellt.

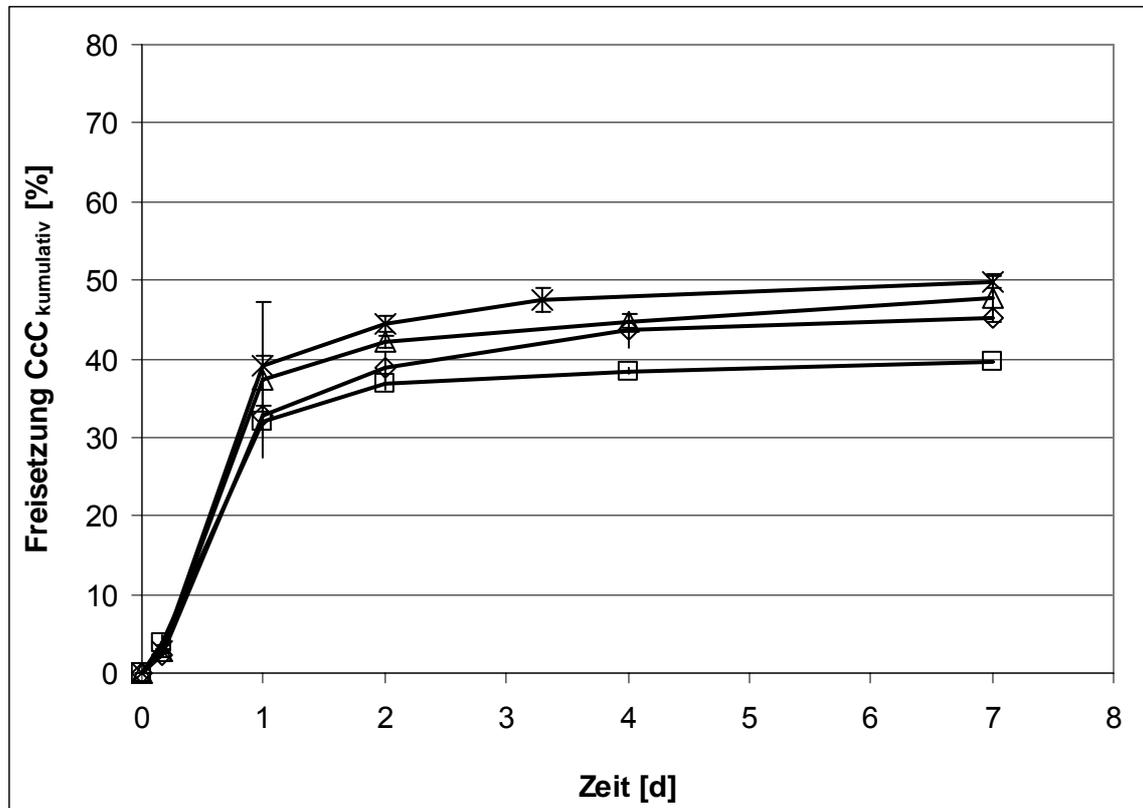


Abb. 3.34: CcC - Freisetzung aus in situ Implantaten vor und nach Mikrowellenbehandlung der RG 752-Formulierung im **Endbehältnis** ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

- Referenz
- ◇ mikrowellenbehandelte (100 °C) RG 752-Formulierung
- △ mikrowellenbehandelte (140 °C) RG 752-Formulierung
- x mikrowellenbehandelte (160 °C) RG 752-Formulierung

Die Freisetzung von CcC aus den in situ Implantaten ist nach der Mikrowellenbehandlung unabhängig von der gewählten Temperatur und Zeitdauer erhöht. Jedoch führt die Mikrowellenbehandlung der RG 752-Formulierung im Endbehältnis in geringerem Maße als die Behandlung des Zwischenproduktes, die RG 752-Lösung, zur Veränderung des Freisetzungsprofils. Bei der Mikrowellenbehandlung von Resomer<sup>®</sup>-Formulierungen im Endbehältnis können nicht nur die hitze- und strahlenempfindlichen RG 752-Moleküle, sondern auch das Protein CcC beeinflusst werden. Infolge der Belastung der Polymere mit Mikrowellen können sowohl Abbaureaktionen der Matrix als auch der Wirksubstanz hervorgerufen werden. Darüber hinaus sind Reaktionen zwischen Resomer<sup>®</sup>-Molekülen und CcC

denkbar. Der Einfluss der Mikrowellenbehandlung auf die Stabilität der Modells substanz CcC ist in Kapitel 3.3.6 beschrieben.

#### *3.3.4.4 Prüfung der mikrowellenbehandelten Resomer<sup>®</sup>-Lösung auf Sterilität*

Parenterale Zubereitungen müssen entsprechend des Europäischen Arzneibuches der Prüfung auf Sterilität entsprechen<sup>66</sup>. Die Methodik ist im Abschnitt 2.6.1 des Arzneibuches beschrieben. Eine Sterilitätsuntersuchung der Resomer<sup>®</sup>-Lösungen bzw. -Formulierungen ist nach Ph. Eur. nur bedingt möglich, da die zur Prüfung verwendeten Nährmedien, Sojapepton-Caseinpepton und Thioglycolat, wasserhaltig sind. Werden die mit Mikrowellen behandelten Resomer<sup>®</sup>-Lösungen in das wässrige Untersuchungsmedium eingebracht, so formen sich Implantate aus. Bei der Ausbildung können Sporen und die Sterilisation überlebende Bakterien im Inneren des sich ausbildenden Implantates eingeschlossen werden, ohne dass die Mikroorganismen in Verbindung zum Nährmedium stehen<sup>180</sup>. Ein negativer Befund bei der Sterilitätsprüfung ist nur dann negativ, wenn der Beweis erbracht wird, dass keine innere Kontamination vorliegt. Damit alle mikrobiellen Verunreinigungen bei der Prüfung auf Sterilität erfasst werden können, wurde eine Modifizierung der bestehenden Arzneibuch-Vorschrift vorgenommen. Die zu untersuchenden Resomer<sup>®</sup>-Lösungen wurden zuerst mit sterilem Wasser für Injektionszwecke versetzt, die Polymere präzipitierten zu einem festen Implantat. Anschließend wurde das ausgeformte Implantat in der sterilen Schwingmühle mit Mahlkugeln unter aseptischen Bedingungen gemahlen. Das Implantat wurde zerstört, es lagen feine Partikel ( $x_{100} = 113 \mu\text{m}$ ) suspendiert in sterilem Wasser vor (Abb. 3.35).

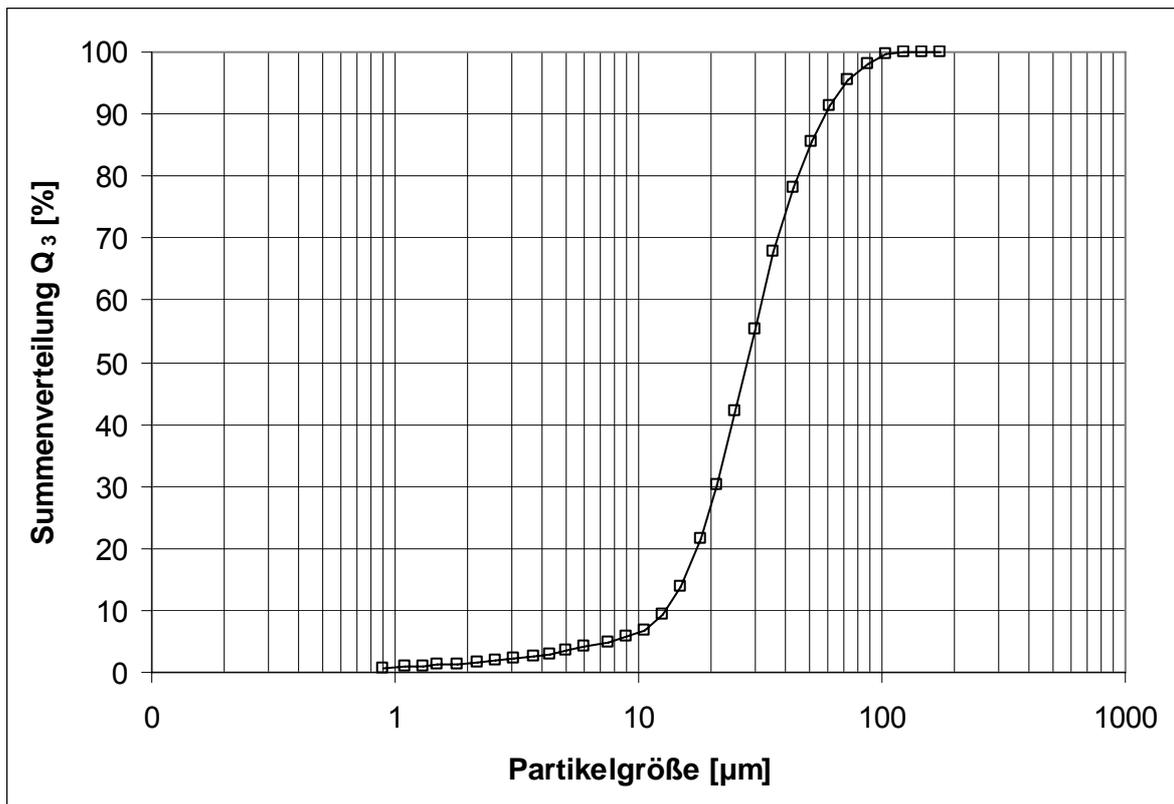


Abb. 3.35: Partikelgrößenverteilung des gemahlenden R 202H-Implantates (n = 2)

Die vorliegende Partikelsuspension wurde membranfiltriert und der Sterilitätstest nach Ph. Eur. 2.6.1 durchgeführt<sup>60</sup>. Durch die aus dem Mahlvorgang resultierende Zerstörung der Implantatstruktur werden eventuell eingeschlossene Keime wieder freigelegt. Auf Sterilität wurden eine R 202H- und eine RG 752-Lösung nach einer Mikrowellenbehandlung bei 160 °C geprüft. Beide Lösungen entsprachen der Prüfung auf Sterilität.

#### 3.3.5.5 Diskussion und Schlussfolgerungen

Durch Mikrowellenbehandlung können flüssige pharmazeutische Hilfsstoffe und Arzneizubereitungen keimfrei bzw. keimzahlreduziert werden<sup>95</sup>. Der Vorteil des Verfahrens liegt darin, dass lange Ausgleichzeiten, wie sie bei herkömmlichen thermischen Sterilisationsverfahren, z.B. bei der Anwendung der Heißluftsterilisation, notwendig sind, bei der Mikrowellenbehandlung entfallen. Die schnelle Aufheizung kommt durch die hochfrequenten elektromagnetischen Wellen, welche die polar aufgebaute Materie direkt zu Dipol-Dipol-Schwingungen anregt, zustande. Die dabei frei werdende Reibungswärme führt zur Erwärmung der Materie. Dadurch können auch thermisch sensible Zubereitungen mit diesem Verfahren keimfrei bzw. keimzahlreduziert hergestellt werden. Die Mikrowellenbehandlung ist nur für flüssige

Formulierungen anwendbar und damit nur für die Resomere<sup>®</sup>-Lösung sowie -Formulierung im Endbehältnis durchzuführen.

Es wurden verschiedene Temperatur-Zeit-Kombinationen zur Behandlung der Proben mit Mikrowellen verwendet. Die Bestrahlung erfolgte bei allen Verfahren mit einer Frequenz von 2500 Hz, die Leistung der Mikrowelle betrug 1000 W.

Untersucht wurde der Einfluss der Mikrowellenbehandlung auf die SZ und die Molmassen und -verteilung am Beispiel der RG 752- und R 202H-Lösung. Die Freisetzung wurde an unbehandelten im Vergleich zu mikrowellenbehandelten Proben am Beispiel von RG 752-Lösungen und -Formulierungen im Endbehältnis analysiert. Eine Übersicht über die Ergebnisse zur Untersuchung des Einflusses der Mikrowellenbehandlung auf die Eigenschaften der Resomere<sup>®</sup> gibt Tabelle 3.21.

Tab. 3.21: Einfluss der Mikrowellenbehandlung auf die SZ, Molmassen- und verteilung der Resomere<sup>®</sup> und die Freisetzung deren Formulierungen  
M1 = 100°C, 300 s; M2 = 140°C, 65 s – 75 s; M3 = 160°C, 105 s – 115 s

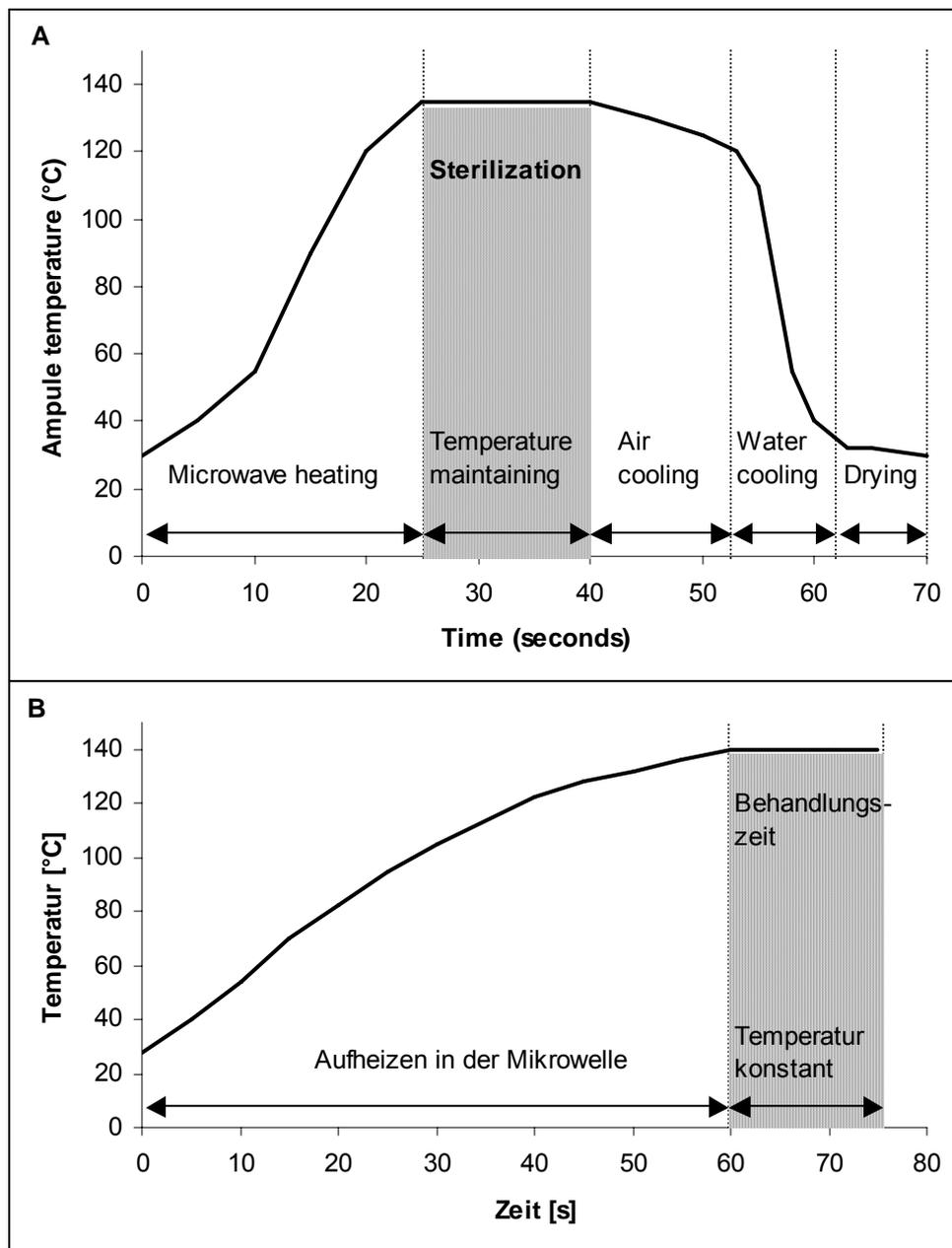
Resomere <sup>®</sup>	Formulierung	Einfluss der Mikrowellenbehandlung auf								
		SZ			Molmassen (M <sub>w</sub> , M <sub>n</sub> )			CcC - Freisetzung		
		M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3
R 202H	Lösung	—	↑	↑↑	—	↓	↓↓	n.a.	n.a.	n.a.
RG 752	Lösung	n.a.	n.a.	n.a.	↓	↓↓	↓↓	↑	↑↑	↑↑
	Formulierung	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	↑	↑	↑

— unverändert; ↑ - ↑↑: wenig erhöht – erhöht; ↓ - ↓↓ wenig erniedrigt - erniedrigt; n.a. nicht analysiert

Mit steigender Temperatur wurde ein verstärkter hydrolytischer Abbau der Resomere<sup>®</sup> nachgewiesen. Dabei ist RG 752, das Copolymer im Vergleich zum Homopolymer, R 202H, das instabilere Resomere<sup>®</sup>, was bereits bei den Untersuchungen zur Sterilisation mit feuchter und trockener Hitze festgestellt wurde.

Der nachteilige Einfluss der Mikrowellenbehandlung auf die Stabilität der Resomere<sup>®</sup> war aufgrund des erfolgreichen Einsatzes dieses Verfahrens zur Sterilisation thermosensitiver wässriger Formulierungen in Japan unerwartet<sup>78,94</sup>. Eine Ursache für die Abbauerscheinung könnten die längeren Behandlungszeiten sein, die dem Einsatz von leistungsgeminderten Mikrowellen mit 1000 W zuzuschreiben sind. In Japan werden leistungsfähigere Apparaturen mit 5000 W zur Mikrowellensterilisation genutzt. Damit werden in sehr kurzer Zeit, ca. 25 s, Temperaturen zwischen 135 °C und 155 °C erreicht, während bei den für diese

Arbeit genutzten Geräten Aufheizzeiten von 50 s bis 60 s erforderlich waren (Abb. 3.36). Nach Erreichen der Temperatur wurde diese für 15 s beibehalten. Anschließend werden die behandelten Ampullen in Japan einer aktiven Abkühlung unterzogen, so dass die thermische Belastung maximal 60 s dauert. Die Aufheiz- und Behandlungszeit und damit die thermische Belastung war für diese Untersuchungen fast doppelt so lang (Abb. 3.36).



**A:** mit japanischem Mikrowellengerät, 5 kW<sup>94</sup>

**B:** mit eingesetztem Mikrowellengerät, 1 kW

Abb. 3.36 Temperatur-Zeit-Profil der Mikrowellenbehandlung

Ein weiterer Aspekt ist der, dass die bisher erfolgreich mit Mikrowellen behandelten hitzempfindlichen Injektionslösungen niedermolekular sind<sup>88,91,94</sup>. Die kurzzeitige Belastung der polymeren Proben mit hohen Temperaturen scheint bereits

ausreichend zu sein, um Abbaureaktionen wie Hydrolyse hervorzurufen. Die Behandlung der untersuchten Resomer<sup>®</sup>-Lösungen und -Formulierungen bei 100 °C für 300 s hatte keinen nachteiligen Einfluss auf die bewerteten Eigenschaften. Daraus kann wiederum geschlussfolgert werden, dass durch Optimierung der Parameter (Aufheizzeit, Kühlung nach Sterilisation) und Nutzung leistungsstärkerer Geräte zur Mikrowellenbehandlung eine materialschonende Sterilisation mit diesen Verfahren möglich wäre.

### **3.3.5 Hochdruckinaktivierung**

Ein weiteres alternatives Verfahren, das in der vorliegenden Arbeit als Sterilisationsmethode für Resomer<sup>®</sup>-Formulierungen bewertet werden soll, ist die Hochdruckinaktivierung. In zahlreichen Veröffentlichungen von H. Ludwig et. al. wird berichtet, dass sich dieses Verfahren insbesondere zur Sterilisation von hitze- und strahlenlabilen Produkten wie Liposomen oder PLGA-Stiften eignet<sup>86,103,104,107,108,111,135</sup>. Bei diesem Verfahren werden die zu sterilisierenden Formulierungen sehr hohen Drücken von über 2 kbar ausgesetzt. Untersuchungen an Liposomen zeigten, dass diese empfindlichen Arzneiformen über einen längeren Zeitraum hinweg bei isostatischem Druck bis ca. 2,5 kbar stabil sind<sup>104</sup>. H. Ludwig et. al. untersuchten auch das Molekulargewicht von PLGA vor und nach der Hochdruckinaktivierung, wobei es hier zu keiner Änderung kam<sup>103</sup>. Basierend auf den Ergebnissen dieser Studien und Empfehlungen von H. Ludwig wurden folgende Parameter für die Behandlung der Resomer<sup>®</sup>-Formulierungen erarbeitet: 7 kbar bei 50 °C über eine Stunde.

Mit dieser Methode wurden die Resomere<sup>®</sup> RG 752 und R 202H als Ausgangsstoffe, die PEG-Lösungen als Zwischenprodukte sowie deren Formulierungen im Endbehältnis sterilisiert. Die behandelten Proben wurden hinsichtlich der Änderung folgender physikochemischer Eigenschaften der Resomere<sup>®</sup> untersucht:

- ◆ SZ
- ◆ inhärente Viskosität
- ◆ Molmassen und –verteilung
- ◆ thermodynamische Eigenschaften

Auch die Freisetzung aus der herzustellenden Formulierung wurde vor und nach der Hochdruckbehandlung geprüft. Bei den nachfolgenden Untersuchungen der

physikochemischen Eigenschaften und der Freisetzung wurde weniger der Druckeinfluss negativ erwartet, dafür aber die mit dem Druckanstieg einhergehende Temperaturerhöhung.

Voraussetzung für die Anwendung der Hochdruckinaktivierung als Sterilisationsverfahren ist die Keimreduzierung der behandelten Produkte um mindestens  $10^6$  log-Stufen. Zur Nachweisführung der Reduzierung von Sporen und Bakterien werden dem Verfahren gegenüber unempfindliche Keime eingesetzt und deren Abtötung nachgewiesen. Gegenüber Hochdruck unempfindlich haben sich in zahlreichen Untersuchungen die Sporen von *Bacillus subtilis* gezeigt<sup>108-111,181</sup>. Die Anwendbarkeit der Hochdruckinaktivierung als Sterilisationsverfahren für die ausgewählten Formulierungen soll anhand der Keimreduzierung der mit Sporen von *Bacillus subtilis* beimpften Proben überprüft werden. Außerdem wird eine Prüfung auf Sterilität nach Ph. Eur. 2.6.1 durchgeführt.

#### *3.3.5.1 Einfluss der Hochdruckinaktivierung auf die Säurezahl*

Zur Untersuchung des Einflusses der Hochdruckinaktivierung auf die SZ wurden die Resomere<sup>®</sup> RG 752 und R 202H, als Ausgangsstoffe und deren Zwischenprodukte sowie die PEG-Lösungen vor und nach der Behandlung überprüft. Die SZ der unbehandelten im Vergleich zu den mit Hochdruck behandelten Resomer<sup>®</sup>-Proben ist in Abbildung 3.37 dargestellt.

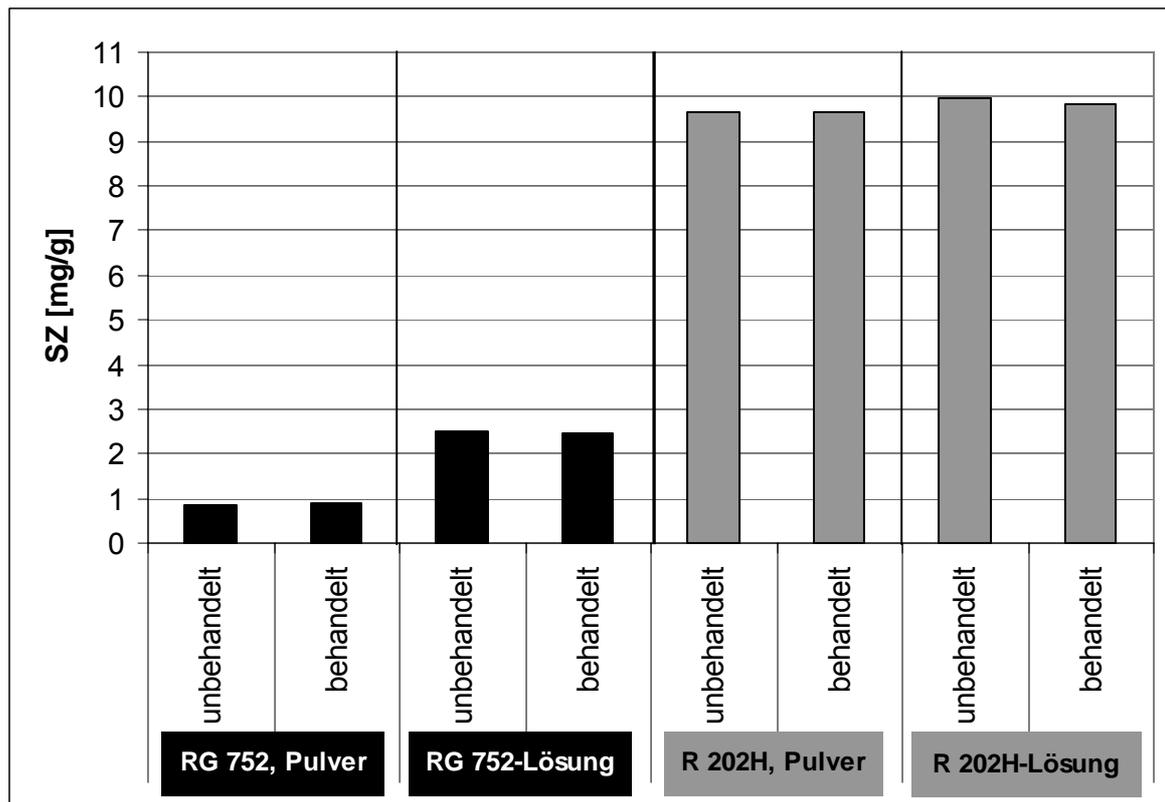


Abb. 3.37: SZ der unbehandelten und der mit Hochdruck behandelten Resomere<sup>®</sup> sowie deren PEG-Lösungen ( $\bar{x}$ ,  $n = 3$ )

Die Ergebnisse zeigen, dass trotz der Belastung mit Hochdruck von ca. 7 kbar und erhöhter Temperatur von 50 °C über eine Stunde keine Veränderungen der Resomere<sup>®</sup> und damit der SZ zu erwarten sind. Weder für das endgruppengeschützte Copolymer RG 752 mit niedrigerer SZ noch für das Homopolymer ohne Säurenendgruppenschutz R 202H und höherer SZ konnten Änderungen infolge der Hochdruckinaktivierung festgestellt werden. Die Druck- und Temperaturbelastung führten bei den untersuchten Polymeren nicht zur Erhöhung der SZ und damit werden wahrscheinlich auch keine hydrolytischen Abbaureaktionen verursacht. Mit weiteren Untersuchungen zum Einfluss der Hochdruckinaktivierung auf die physikochemischen und anwendungsrelevanten Eigenschaften der Resomere<sup>®</sup> sollte die Stabilität dieser gegenüber dem Verfahren geprüft werden.

Beim Vergleich der SZ der Ausgangsstoffe mit denen der Lösungen wird weiter deutlich, dass es zu geringfügigen Erhöhungen der SZ in der Lösung kommt. Das Resomer<sup>®</sup> RG 752 hat als Ausgangsstoff eine SZ von 0,85 mg/g. In Lösung wurde aber ein Wert von 2,51 mg/g gefunden. Die Änderung der SZ von R 202H von 9,66 mg/g auf 9,98 mg/g lag im analytischen Fehlerbereich. Untersuchungen und

Bewertungen zur Stabilität der Zwischenprodukte wurden bereits in Kapitel 3.2.2.1 näher beschrieben.

### 3.3.5.2 Einfluss der Hochdruckinaktivierung auf die inhärente Viskosität

Der Einfluss der Hochdruckinaktivierung auf die inhärente Viskosität wurde wiederum an den Resomeren<sup>®</sup> R 202H und RG 752 untersucht. Die Ergebnisse der Bestimmung der inhärenten Viskosität vor und nach der Hochdruckinaktivierung sind in Tabelle 3.22 aufgeführt.

Tab. 3.22: inhärente Viskositäten der unbehandelten und der mit Hochdruck behandelten Resomere<sup>®</sup> R 202H und RG 752

Untersuchungsparameter	R 202H		RG 752	
	unbehandelt	Hochdruck behandelt	unbehandelt	Hochdruck behandelt
Inhärente Viskosität einer 0,4 %igen Lösung $\eta_{\text{inhärent}} [\text{dl} / \text{g}]$	0,215	0,203	0,199	0,200

Die bestimmten Viskositätszahlen für das Resomer<sup>®</sup> R 202H unterscheiden sich geringfügig, während die Werte für RG 752 in diesem Bereich nahezu identisch sind. Zur Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den Wertegruppen vor und nach der Hochdruckinaktivierung wurde der t-Test durchgeführt. Voraussetzung hierfür war der F-Test auf Varianzhomogenität. Die Analyse der Varianzen der Mittelwerte mittels F-Test ( $\alpha = 0,01$ ) zeigte, dass sich diese nicht signifikant unterscheiden. Ein Vergleich der bestimmten inhärenten Viskositäten vor und nach Hochdruckbehandlung mittels t-Test ( $\alpha = 0,01$ ) ergab, dass sich die Mittelwerte der behandelten Proben **nicht signifikant** von den unbehandelten unterscheiden (Tab. 3.23).

Tab. 3.23: Vergleich der inhärenten Viskositäten der unbehandelten ( $n = 10$ ) und der Hochdruck behandelten R 202H ( $n = 10$ ) und RG 752 ( $n = 4$ ) durch einen F-Test und t-Test

Ergebnisse	R 202H		RG 752	
	unbehandelt	Hochdruck behandelt	unbehandelt	Hochdruck behandelt
Anzahl Messung n	10	10	10	4
Inhärente Viskosität einer 0,4 %igen Lösung $\eta_{\text{inhärent}} [\text{dl} / \text{g}]$	<b>0,215</b>	<b>0,203</b>	<b>0,199</b>	<b>0,200</b>
Standardabweichung s	0,01195	0,01113	0,01141	0,00985
Varianz $s^2$	0,00014	0,00012	0,00013	0,00010
$F_b$	1,15		1,34	
$F_t(n_1-1, n_2-1, 0,01)$	5,4		27,4	
Nullhypothese $H_0$	<b><math>F_b &lt; F_t</math> <math>H_0</math> angenommen</b>		<b><math>F_b &lt; F_t</math> <math>H_0</math> angenommen</b>	
$t_b$	2,31		0,15	
$t_t(n_1+n_2-2, 0,01)$	2,88		3,06	
Nullhypothese $H_0$	<b><math>t_b &lt; t_t</math> <math>H_0</math> angenommen</b>		<b><math>t_b &lt; t_t</math> <math>H_0</math> angenommen</b>	

Mittels t-Test wurde kein signifikanter Unterschied nachgewiesen. Die Behandlung mit Hochdruck hat somit keinen Einfluss auf das Molekulargewicht der untersuchten Resomere<sup>®</sup>. Dabei sind sowohl das untersuchte Copolymer RG 752 als auch das Homopolymer R 202H gleichermaßen stabil. Die Untersuchung der Molmassen und -verteilung mittels GPC sollte diese Ergebnisse bestätigen.

### 3.3.5.3 Einfluss der Hochdruckinaktivierung auf die Molmassen und -verteilung

Der Einfluss der Hochdruckbehandlung auf die Molmassen und deren -verteilung wurde am Beispiel des Copolymeres RG 752 und des Homopolymeres R 202H bewertet. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 3.38 aufgeführt.

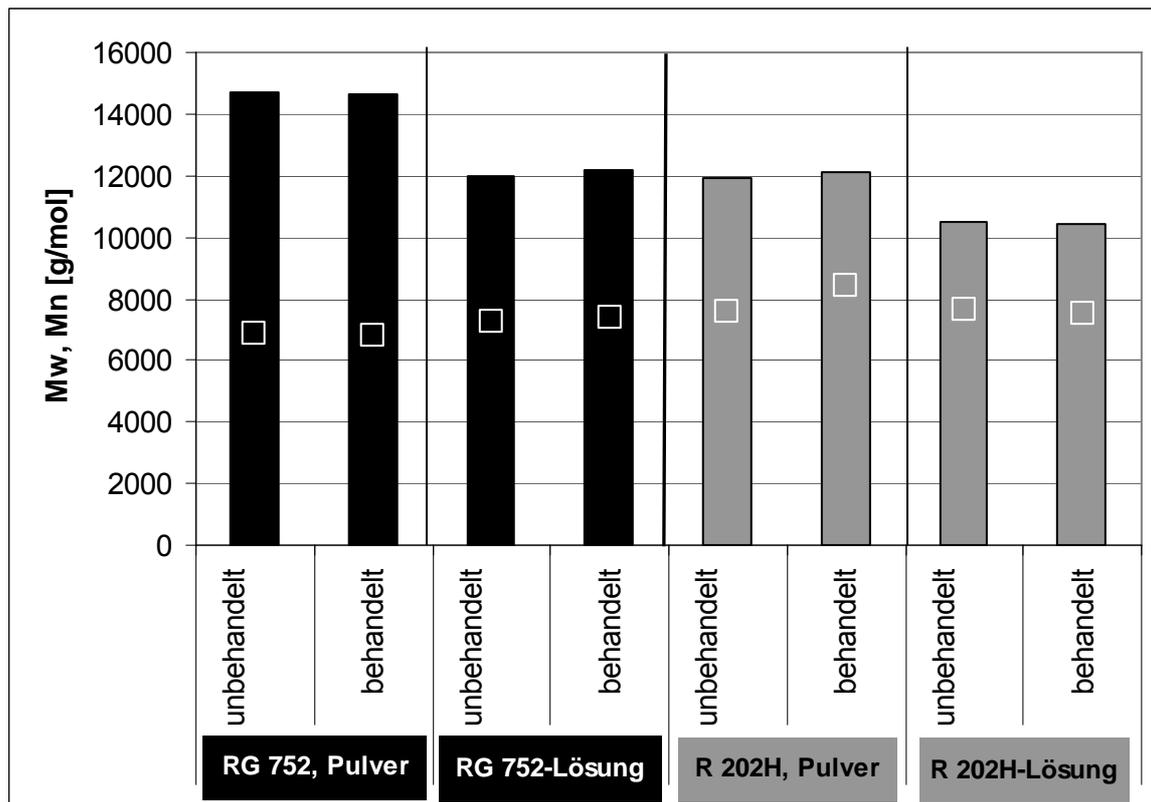


Abb. 3.38: Einfluss der Hochdruckbehandlung auf die Molmassen  $M_w$  (Säule) und  $M_n$  ( $\square$ ) der Resomere<sup>®</sup> RG 752 und R 202H und deren PEG - Lösungen; ( $x$ ,  $n = 2$ )

Die Werte für  $M_n$  und  $M_w$  der mit Hochdruck behandelten Resomere<sup>®</sup> sind nicht signifikant verändert. Auch die Behandlung der PEG-Lösungen unter den gewählten Bedingungen Druck (ca. 6 – 7 kbar), Temperatur (ca. 50 °C) und Zeit (60 min) führte zu keiner Änderung der Molmassen und deren –verteilung, was anhand der Abbildung 3.38 nachvollzogen werden kann.

Auch die Elugramme der untersuchten Proben machen deutlich, dass die Hochdruckbehandlung keinen nachteiligen Einfluss auf die Molmassen der Polymere hat. Der Peak des jeweiligen Resomers<sup>®</sup> wird nicht verschoben, die Eluierung erfolgt wie in der unbehandelten Probe (Abb. 3.39).

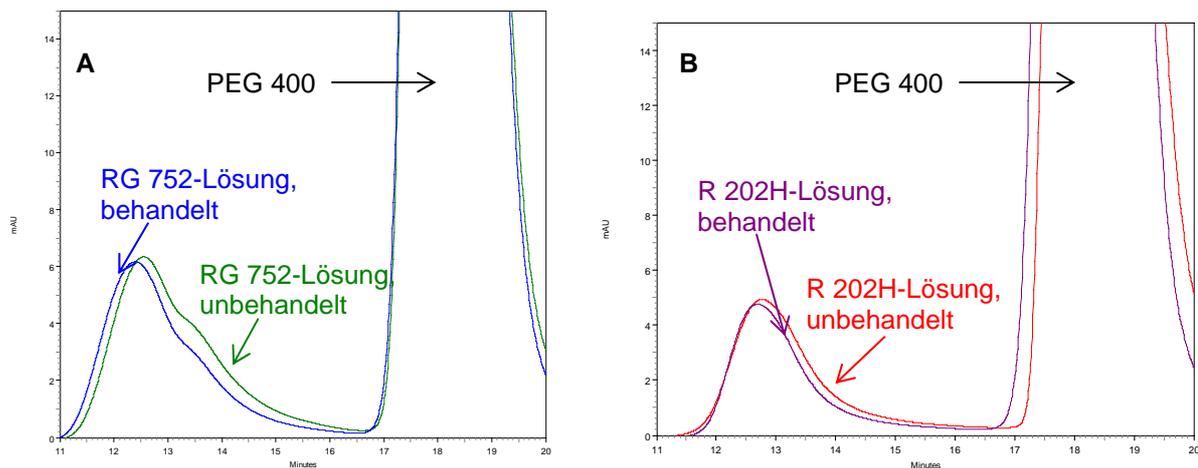
**A: RG 752****B: R 202H**

Abb.: 3.39 GPC-Elugramme vor und nach Hochdruckbehandlung der untersuchten Resomere<sup>®</sup>-Lösungen

Die Ergebnisse aus der Bestimmung der SZ und der inhärenten Viskosität wurden bestätigt. Die Hochdruckinaktivierung erwies sich unter den angewandten Bedingungen als ein materialschonendes Verfahren. Es wurden keine Abbaureaktionen hervorgerufen.

#### 3.3.5.4 Einfluss der Hochdruckinaktivierung auf die thermischen Eigenschaften

Die Untersuchung der thermischen Eigenschaften vor und nach der Hochdruckinaktivierung erfolgte wiederum am Beispiel des Copolymers RG 752 und des Homopolymers R 202H. Es konnte keine signifikante Änderung der Glasübergangstemperatur festgestellt werden (Tab. 3.24). Eine Änderung der Glasübergangstemperatur ist mit der Änderung der Molmassen verbunden und umgekehrt<sup>24,40,150,151,182,183</sup>. Mit der durchgeführten Untersuchung der thermischen Eigenschaften der Polymere konnte somit ein weiterer Nachweis erbracht werden, dass die Hochdruckinaktivierung unter den angewandten Bedingungen zu keinen Änderungen im molekularen Bereich der Polymere führt.

Tab. 3.24: Glasübergangstemperatur ( $T_g$ ) der Resomere<sup>®</sup> RG 752 und R 202H vor ( $n = 3$ ) und nach ( $n = 2$ ) Hochdruckbehandlung

RG 752		R 202H	
Referenz	behandelt	Referenz	behandelt
$T_g$ [°C]	$T_g$ [°C]	$T_g$ [°C]	$T_g$ [°C]
45,1	46,5	48,9	50,2

### 3.3.5.5 Einfluss der Hochdruckinaktivierung auf die Freisetzung

Die Behandlung der RG 752- und R 202H-Depotformulierungen sowie deren Vorstufen im Herstellungsprozess erfolgte wieder mit einem Druck von ca. 7 kbar bei 50 °C über einen Zeitraum von einer Stunde.

Durch die Einwirkungen des hohen Druckes auf die Ausgangsstoffe RG 752 oder R 202H kam es zur Verdichtung der Pulver und es entstand ein fester Klumpen. Eine anschließende Herstellung der Resomer<sup>®</sup>-Lösung war aufgrund der schlechteren Löslichkeit durch die kleinere Oberfläche der verdichteten Pulver in PEG 400 nicht möglich.

Es wurden die Zwischenprodukte, die PEG-Lösungen, mit Hochdruck behandelt und anschließend wurde das CcC zugesetzt. Die CcC-Freisetzungprofile der daraus geformten in situ Implantate sind in den Abbildungen 3.40 und 3.41 dargestellt. Es ist darin erkennbar, dass keine signifikanten Änderungen zwischen den einzelnen Implantaten in der CcC-Freisetzung auftraten. Nach sieben Tagen wurden aus dem RG 752-Implantat 40 % CcC im Vergleich zu 44 % CcC aus dem mit Hochdruck behandelten Implantat freigesetzt (Abb. 3.40).

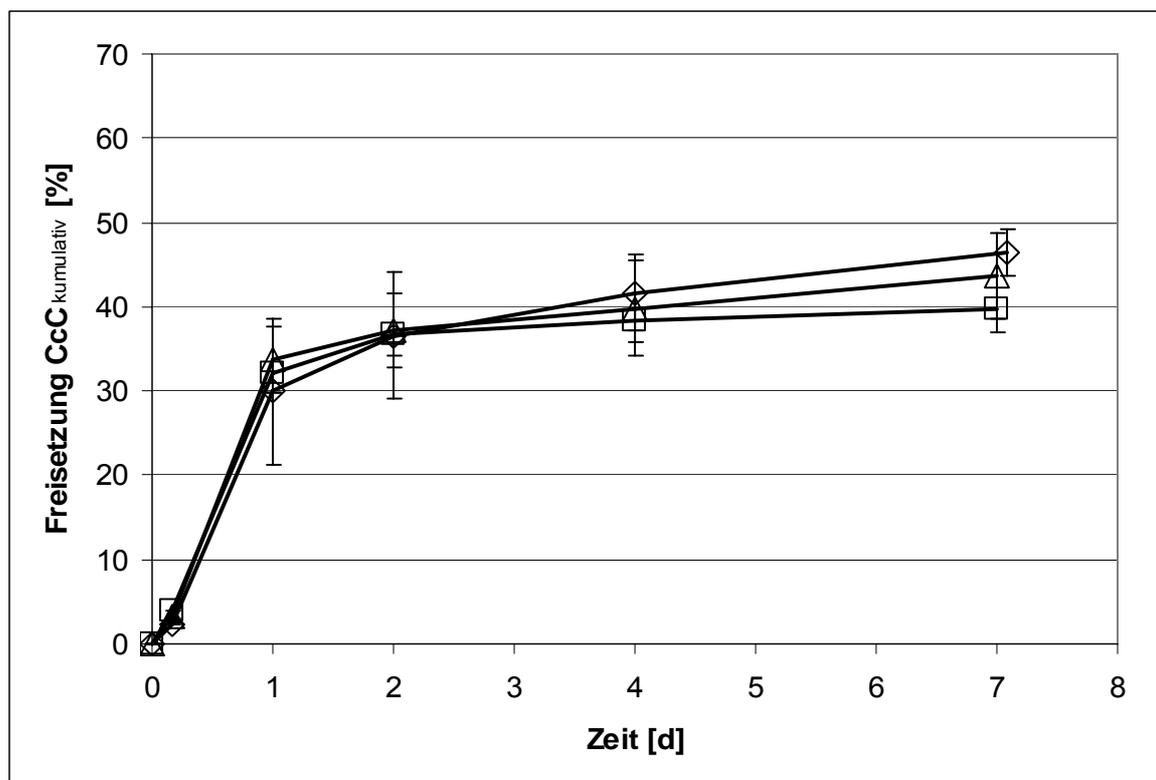


Abb. 3.40: CcC-Freisetzung aus in situ Implantaten von RG 752 vor und nach Hochdruckbehandlung ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

- Referenz
- △ hochdruckbehandelte Resomer<sup>®</sup>-Lösung
- ◇ hochdruckbehandelte Resomer<sup>®</sup>-Formulierung im **Endbehältnis**

Aus dem R 202H-Implantat wurden 67 % CcC im Vergleich zu 66 % aus der behandelten Probe über einen Zeitraum von sieben Tagen freigegeben (Abb. 3.41)

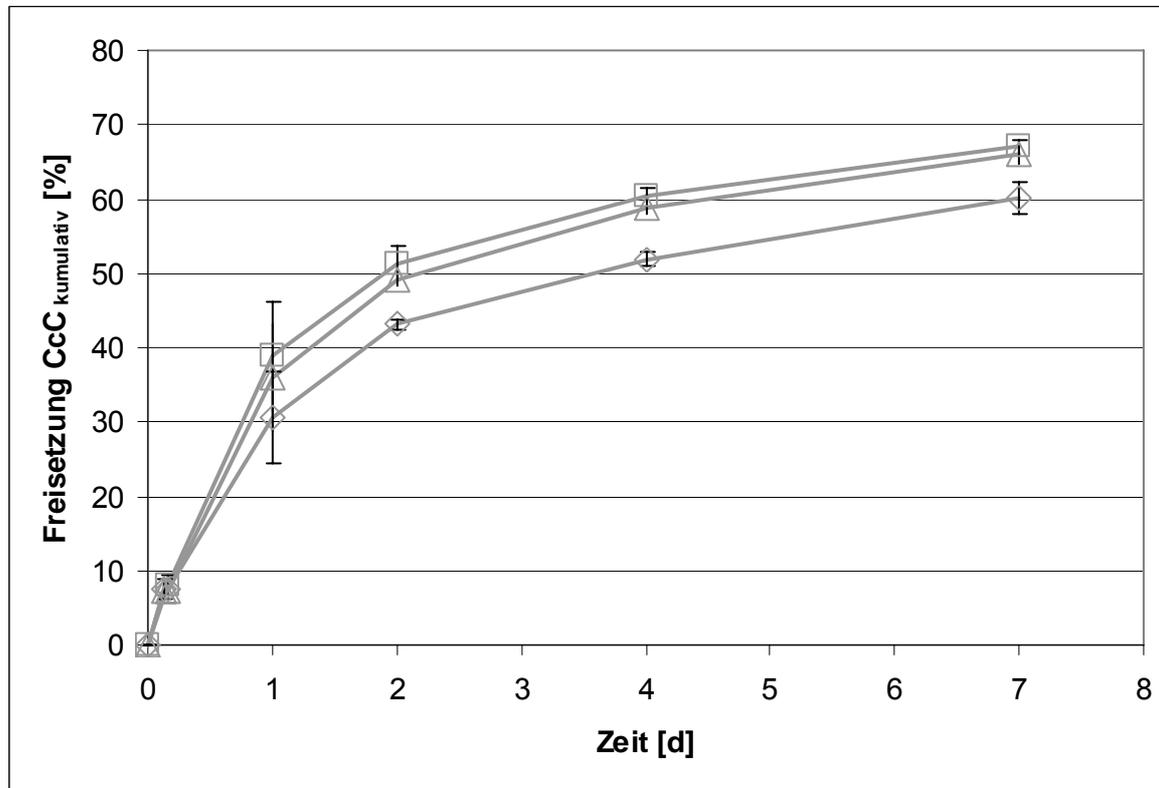


Abb. 3.41: CcC-Freisetzung aus in situ Implantaten von R 202H vor und nach Hochdruckbehandlung ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

- Referenz
- △ hochdruckbehandelte Resomer®-Lösung
- ◇ hochdruckbehandelte Resomer®-Formulierung im **Endbehältnis**

Die Hochdruckinaktivierung der Resomer®-Formulierungen im Endbehältnis führte ebenfalls zu keiner signifikanten Änderung der Freisetzung von CcC aus den in situ Implantaten. Der Verlauf der Freisetzungskurven der in situ Implantate der hochdruckinaktivierten RG 752- bzw. R 202H-Formulierung weicht über einen Zeitraum von sieben Tagen kaum vom Profil der unbehandelten in situ Implantate ab (Abb. 3.40 und 3.41).

Das gewählte Verfahren der Hochdruckinaktivierung hat keinen Einfluss auf die Freisetzung von CcC. Die Ergebnisse aus der Untersuchung der Materialeigenschaften der Resomere® werden durch die Bewertung der CcC-Freisetzung aus den in situ Implantaten bestätigt.

### 3.3.5.6 Untersuchungen zur Keimreduzierung und Prüfung auf Sterilität

Die Prüfung auf Sterilität erfolgte mit einer modifizierten Methode, die bereits in Kapitel 3.3.4.5 beschrieben wurde, am Beispiel von R 202H-Lösungen. Zur Prüfung der Keimfreiheit nach Hochdruckbehandlung wurden die Proben mit unterschiedlichen Druck-Temperatur-Zeit-Kombinationen behandelt (Tab. 3.25).

Tab. 3.25: Ergebnisse der Prüfung auf Sterilität von R 202H/ PEG-Lösungen in Abhängigkeit von den gewählten Parametern zur Hochdruckinaktivierung

Probe	Parameter zur Hochdruckbehandlung			Prüfung auf Sterilität nach Ph. Eur. 2.6.1, abgewandelte Methode
	Temperatur [°C]	Druck [kbar]	Zeit [min]	
#1 R 202H/ PEG-Lösung	50	6,8	60	entspricht
#2 R 202H/ PEG-Lösung	50	2	10	entspricht
		4	10	
		6	10	
#3 R 202H/ PEG-Lösung	70	2	10	entspricht
		4	10	
		6	10	

Eine Variation der Parameter wurde vorgenommen, weil aus der Literatur bekannt ist, dass eine Druckinaktivierung von Bakteriensporen, beispielsweise von *Bacillus subtilis*, schneller und effektiver erfolgt, wenn rasche Druckwechsel erfolgen<sup>108,135</sup>. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass auch ohne Druckwechsel mit den angewandten Standardparametern (Probe #1) zur Hochdruckinaktivierung bereits die notwendige Sterilität erreicht werden kann.

In zahlreichen Untersuchungen zur Hochdruckinaktivierung wurde gezeigt, dass die Sporen von *Bacillus subtilis* ein geeigneter Indikator zur mikrobiologischen Prüfung dieses Verfahrens darstellen<sup>100,108-110,135,181</sup>. Zum Nachweis, dass das Verfahren der Hochdruckinaktivierung zur Keimreduzierung führt, wurden in einem ersten Versuch Proben mit *Bacillus subtilis* Sporen definierter Zahl beimpft. Die Untersuchungen wurden modellhaft durchgeführt. Die Hochdruckbehandlung wurde bei isostatischem Druck (Probe #1) im Vergleich zu einem Druckstufenprogramm (Probe #2) ohne Thermostatierung der Hochdruckkammer getestet (Tab. 3.26, Abb. 3.43). Als Trägermedium für die Sporen wurde Wasser für Injektionszwecke (Wfi)

gewählt. Nach Beimpfung des Wfl mit den Sporenstreifen erfolgte bis zur Hochdruckbehandlung und auch nach der Hochdruckbehandlung bis zum Zeitpunkt der Keimzahlprüfung eine Kühlung bei 2 – 8 °C zur Vermeidung von Keimwachstum. Außerdem wurde eine Referenzprobe, die keiner Inaktivierung mit hohem Druck ausgesetzt wurde, mitgeführt. Alle Proben wurden einer Keimzahlprüfung unterzogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.26 aufgeführt.

Tab. 3.26: Ergebnisse aus der Keimzahlprüfung von mit *Bacillus subtilis* beimpften Wfl-Proben von hochdruckbehandelten im Vergleich zu einer unbehandelten Probe (Referenz)

Probe	Parameter zur Hochdruckbehandlung			Platte	Verdünnung $10^{-5}$	Verdünnung $10^{-4}$	Verdünnungen $10^{-3}$ ; $10^{-2}$ ; $10^{-1}$
	Temperatur [°C]	Druck [kbar]	Zeit [min]				
#1 behandelt	23-51-28	6,8	60	1	1	22	n.a.
				2	3	32	n.a.
#2 behandelt	20-41	2	10	1	3	24	n.a.
	4-49	4	10	2	2	11	n.a.
	8-56	6	10				
Referenz	unbehandelt			1	35	255	n.a.
	unbehandelt			2	23	258	n.a.

n.a.: nicht auszählbar, Anzahl der Kolonien zu hoch

Nach Vergleich der Koloniezahlen der behandelten Proben mit der Referenzprobe wird ersichtlich, dass die Hochdruckbehandlung unter den gewählten Bedingungen zu einer Reduktion der lebensfähigen Keime von einer Zehnerpotenz führte.

Eine Keimreduktion von  $10^6$  Keimen wird für eine erfolgreiche Sterilisation gefordert. Ursache der nicht ausreichenden Ergebnisse können die gewählten Bedingungen sein, unter denen die Hochdruckinaktivierung der Proben durchgeführt wurde (Abb. 3.42).

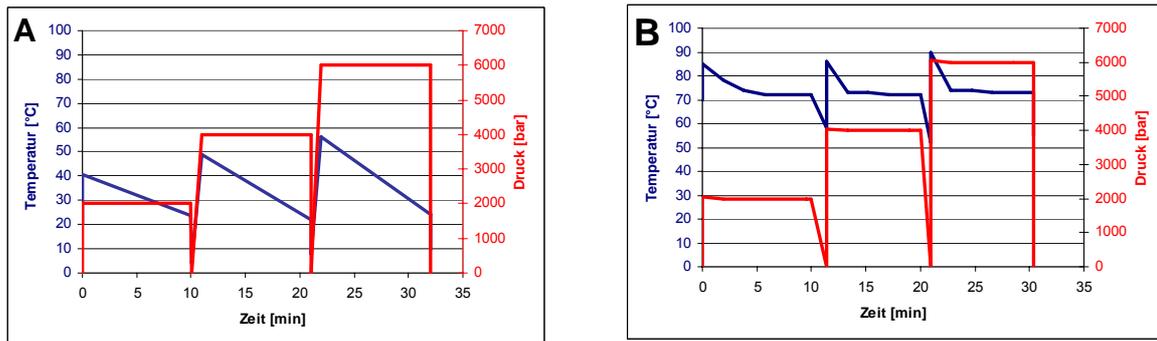


Abb. 3.42: Schematische Darstellung des Druck–Temperatur–Zeit-Verlaufes während der Druckbehandlung

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Inaktivierung von *Bacillus subtilis* Sporen deutlich schlechter ist, wenn die Druckstufen bei niederen Temperaturen erzeugt werden<sup>108</sup>. Zur erfolgreichen Reduktion der Keimsporen wurden Temperaturen um die 70 °C und rasche Druckwechsel eingesetzt. Bei einer Druckinkubation bei Raumtemperatur war eine Druckbehandlung von 48 Stunden erforderlich, um eine Reduktion von  $10^5$  Keimen pro ml zu erreichen<sup>135</sup>. Das bedeutet, dass die hohen Drücke und schnelle Wechsel allein zur ausreichenden Inaktivierung von *Bacillus subtilis* Sporen nicht genügen. Zur erfolgreichen Keimreduzierung muss vielmehr mit einer Kombination von erhöhten Temperaturen und raschen Druckwechseln gearbeitet werden<sup>108</sup>. Die mikrobiologische Validität der Hochdruckbehandlung war jedoch nicht Thema der Arbeit und wurde daher nicht weiterverfolgt.

### 3.3.5.7 Diskussion und Schlussfolgerungen

Die Empfindlichkeit von Keimen gegenüber hohen hydrostatischen Drücken ist Voraussetzung für den Einsatz der Hochdruckbehandlung zur Keimreduzierung von temperaturempfindlichen Produkten<sup>100,108-110,135,181</sup>. In den durchgeführten Untersuchungen wurde der Einfluss der Behandlung mit hohen Drücken auf die physikochemischen und anwendungsrelevanten Eigenschaften der ausgewählten Resomere<sup>®</sup> RG 752 und R 202H und deren Formulierungen untersucht. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 3.27 dargestellt.

Tab. 3.27: Einfluss der Hochdruckbehandlung (7 kbar, 50 °C, 1 h) auf die SZ, Molmassen und -verteilung, inhärente Viskosität, Glasübergangstemperatur der Resomere<sup>®</sup> und die Freisetzung deren Formulierungen

Resomer <sup>®</sup>	Formu- lierung	Einfluss der Hochdruckbehandlung auf				
		SZ	Inhärente Viskosität	Molmassen- verteilung	Glasüber- gangs- temperatur	Freigabe- verhalten
R 202H	Ausgangs- stoff	—	—	—	—	keine Lösung herstellbar
	Lösung	—	n.a.	—	n.a.	—
	Formu- lierung	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	—
RG 752	Ausgangs- stoff	—	—	—	—	keine Lösung herstellbar
	Lösung	—	n.a.-	—	n.a.	—
	Formu- lierung	n.a.	n.a.-	n.a.	n.a.	—

—: Parameter unverändert; n.a.: nicht analysiert

Die Annahme, dass die Struktur der temperatur- und strahlenempfindlichen Resomere<sup>®</sup> durch Hochdruck nicht beeinflusst wird, konnte bestätigt werden. Bei den beiden untersuchten Resomeren<sup>®</sup> konnten keine Änderungen der physikochemischen Eigenschaften (SZ, inhärenten Viskosität, Molmassen, Glasübergangstemperatur) noch der CcC-Freisetzung festgestellt werden. Dabei gab es keine Unterschiede zwischen dem Homopolymer R 202H und dem Copolymer RG 752, beide waren gleichermaßen stabil. Die hochdruckbehandelten Proben wurden auch erfolgreich bei der Prüfung auf Sterilität nach Ph. Eur. 2.6.1 getestet. Die Ergebnisse veranschaulichen deutlich, dass die Hochdruckinaktivierung ein geeignetes Verfahren darstellt, um materialschonend eine Keimreduzierung der ausgewählten Resomer<sup>®</sup>-Formulierungen durchzuführen.

Jedoch war die Untersuchung der Keimreduzierung für ein Sterilisationsverfahren unzureichend. Die Ursachen dafür sind aber in den ungenügenden Versuchsbedingungen zu suchen. Es ist anzunehmen, dass eine Optimierung der Parameter (Temperatur, Druck, Zeit) zu der geforderten  $10^6$  log-Stufen-Keimreduktion führen kann. Von B. Sojka und H. Ludwig wurde bereits gezeigt, dass unter Nutzung anderer Druck-Temperatur-Zeit-Kombinationen eine erfolgreiche Sterilisation mittels Hochdruck durchaus möglich ist <sup>108</sup>.

### 3.3.6 Stabilität von CcC unter dem Einfluss der Sterilisation

In den vorangegangenen Kapiteln wurde der Einfluss von Standard-Sterilisationsverfahren im Vergleich zu den alternativen Verfahren, Mikrowellensterilisation und Hochdruckinaktivierung, auf die Eigenschaften der Trägerpolymere, der Resomere<sup>®</sup>, hin untersucht. Dabei sollte immer eine Sterilisation des Endproduktes angestrebt werden<sup>63,64</sup> und somit ist auch die Stabilität des Wirkstoffes, des Modellproteins CcC, in den Bewertungen zu berücksichtigen. Nachfolgend sollen die Ergebnisse aus der Untersuchung des Einflusses der Sterilisationsverfahren auf CcC dargestellt werden. Dazu wurde eine Resomer<sup>®</sup>-Formulierung mit dem Copolymer RG 502H und eine Resomer<sup>®</sup>-Formulierung mit dem Homopolymer R 202H ausgewählt und der Einfluss der Schlusssterilisation auf die Stabilität von CcC bewertet. Leider war zum Zeitpunkt der Untersuchung der Stabilität von CcC unter den verschiedenen Sterilisationsverfahren das Copolymer RG 752 vom Hersteller nicht mehr lieferbar. Daher wurde mit dem verfügbaren PLGA RG 502H gearbeitet. Folgende Sterilisationsverfahren wurden in die Bewertung einbezogen (Tab. 3.28).

Tab. 3.28: Sterilisationsverfahren und deren Parameter zur Bewertung der Stabilität von CcC

Standard-Sterilisationsverfahren	Alternative Sterilisationsverfahren
Behandlung im Autoklav 121 °C, 15 min, 2 kbar	Mikrowellenbehandlung 140 °C bzw. 160 °C Haltezeit: 15 s; Aufheizzeit: 50 s – 100 s
Strahlensterilisation Dosis: min. 25 kGy $\gamma$ -Strahlen einer <sup>60</sup> Co-Quelle	Hochdruckinaktivierung 50 °C, 60 min, 7 kbar

Zur Bewertung der Stabilität von CcC wurde der Gehalt vor und nach der Sterilisation bestimmt. Dazu wurde CcC aus der Polymergrundlage extrahiert und spektralphotometrisch bestimmt.

Der Einfluss der Standardverfahren (Autoklavierung, Strahlensterilisation) im Vergleich zu den alternativen Verfahren (Hochdruckinaktivierung, Mikrowellenbehandlung) zur Sterilisation der RG 502H-Formulierung auf die Stabilität von CcC ist in Abbildung 3.43 dargestellt.

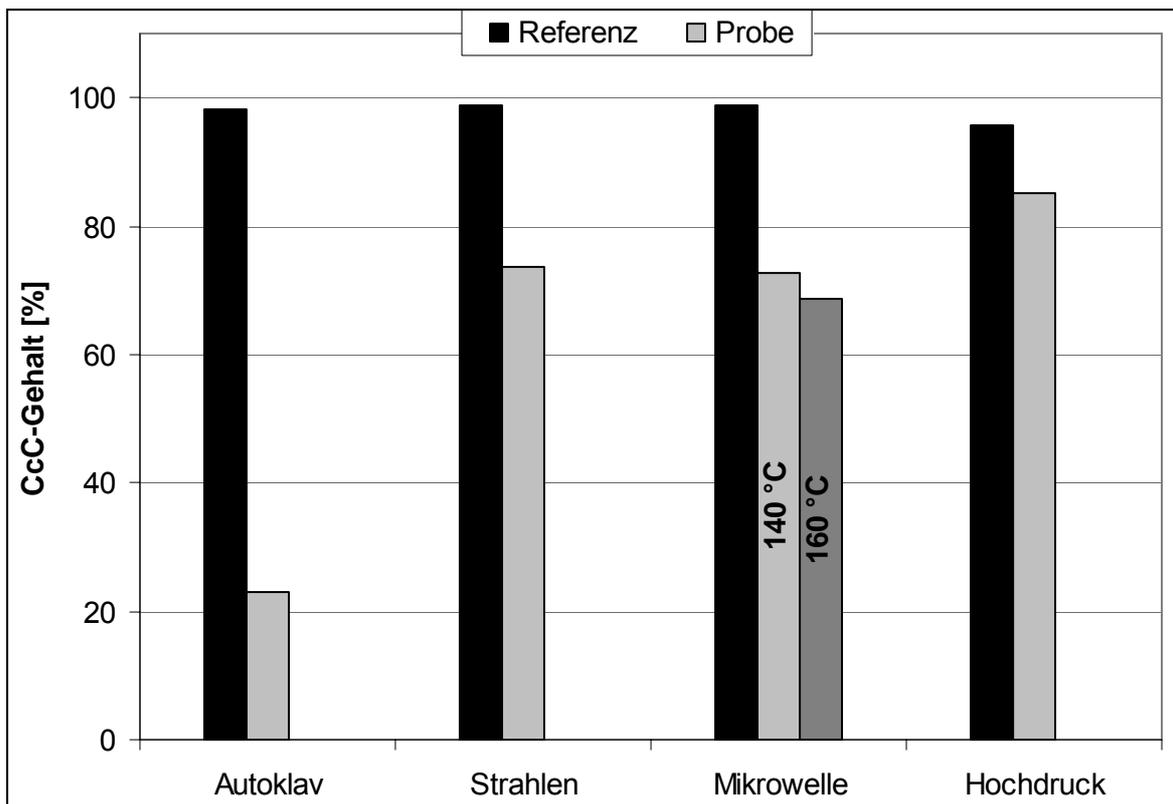


Abb. 3.43: CcC-Gehalt vor und nach Sterilisation der RG 502H - Formulierung (x, n = 3)

Unabhängig vom gewählten Sterilisationsverfahren führte die Behandlung zu einem CcC-Verlust, wobei der Gehaltsverlust unterschiedlich stark ausgeprägt war. Wie erwartet, wurde durch die Behandlung im Autoklaven CcC nahezu vollkommen zerstört, nur noch 23 % CcC waren nachweisbar. Die Strahlensterilisation, welche auch zur Sterilisation von Mikropartikeln<sup>24,116</sup> eingesetzt wird, führte zu einem geringeren CcC-Abbau, 74 % der Modellsubstanz waren noch nachweisbar. Die Ergebnisse der Untersuchung des Einflusses auf die Stabilität von CcC belegen erneut, dass die Hochdruckinaktivierung, welche hinsichtlich des Einflusses auf die Stabilität der Trägerpolymere viel versprechend bewertet wurde, ein Verfahren für thermo- und strahlensensitive Formulierungen ist. Nach der Behandlung mit Hochdruck konnten noch 85 % CcC im Vergleich zum Ausgangsgehalt nachgewiesen werden. Die Mikrowellenbehandlung führte zu ähnlichen Gehaltsverlusten an Modellprotein wie die Strahlensterilisation, ca. 70 % des eingesetzten Proteins fanden sich in der Formulierung wieder. Ursache für den Gehaltsverlust können die zu langen Aufheizzeiten im Vergleich zu den in Japan etablierten Verfahren sein. Die verlängerte Wärmeeinwirkung scheint offensichtlich auszureichen, um Eiweißdenaturierungen zu verursachen.

Die Auswertung der aus dem Resomer<sup>®</sup> R 202H hergestellten Formulierungen ergab vergleichbare Ergebnisse (Abb. 3.44).

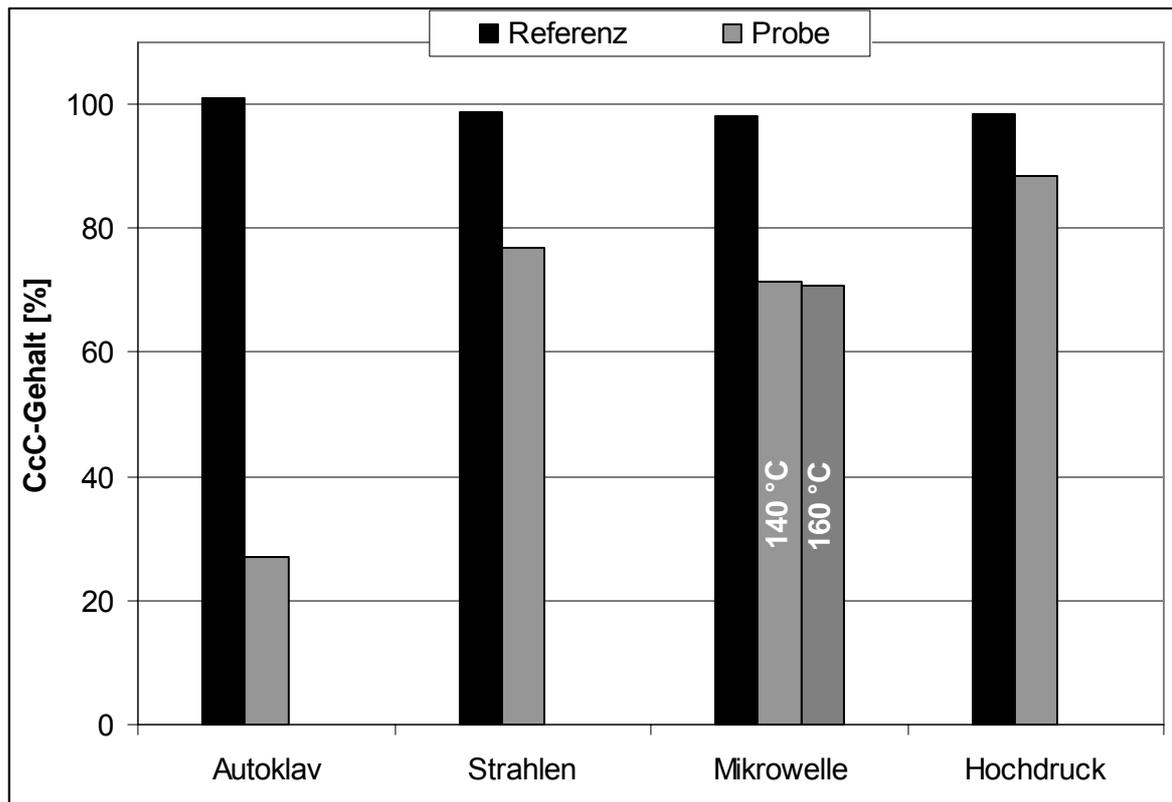


Abb. 3.44: CcC-Gehalt vor und nach Sterilisation der R 202H-Formulierung (x, n = 3)

Die Hochdruckinaktivierung führte wiederum zu den besten Resultaten, noch 88 % CcC fanden sich in der R 202H-Formulierung wieder. Die Behandlung im Autoklav verursachte auch in dieser Formulierung einen erheblichen CcC-Verlust. Vergleichbare Ergebnisse wurden wiederum durch die Mikrowellenbehandlung und die Strahlensterilisation erreicht.

In Auswertung der Untersuchung des Einflusses der Sterilisation auf die Stabilität der Trägerpolymere und Modellprotein stellt sich die Hochdruckinaktivierung als materialschonendes Verfahren dar. Damit wurden die Aussagen der Literatur bestätigt, dass die Sterilisation mit Hochdruck für hitze- und strahlenlabile Substanzen geeignet ist <sup>100,103</sup>. Thermische Verfahren wie die Behandlung im Autoklaven sind für Formulierungen, die mit einem Protein beladen sind, dagegen nicht anwendbar. Auch die Strahlensterilisation ist für die ausgewählte Depotformulierung nicht einsetzbar. Die Mikrowellenbehandlung könnte bei Reduzierung der Aufheizzeiten durch Einsatz von leistungsfähigeren Geräten eine möglich Alternative darstellen.

## 4 Zusammenfassung und Schlussbetrachtung

Die vorliegende Arbeit stellt Ergebnisse der Untersuchung zur Sterilisation von bioabbaubaren Depot-Injektionsformen vor. Dazu wurde zunächst die ausgewählte Depotformulierung, das in situ Implantat, unabhängig von den Resomer<sup>®</sup>-Formulierungen betrachtet. Die Modellformulierung wurde hinsichtlich der Stabilität der Resomere<sup>®</sup> und der Modellsubstanz, dem CcC, bewertet. Copolymere wie RG 752 sind in der Rezeptur instabiler als das Homopolymer R 202H. Es ist somit erforderlich, dass die Formulierungen im Kühlschrank bei 2 – 8 °C gelagert werden. Des Weiteren wurden Methoden zur Charakterisierung der Resomere<sup>®</sup> und der daraus hergestellten Arzneiformen aufgezeigt und vorgestellt. Es wurden analytische Verfahren ausgewählt, die Rückschlüsse auf die polymere Struktur der PLA bzw. PLGA zulassen. Zur Bestimmung der Molmassen und deren Verteilung wurde die direkte Bestimmungsmethode, die GPC, verwendet. Alternativ zur Charakterisierung des Molekulargewichtes wurde die Bestimmung der inhärenten Viskosität, die apparatetechnisch ein einfaches Verfahren darstellt, eingesetzt. Jedoch konnte diese Methode nur zur Bestimmung des Ausgangsmaterials verwendet werden.

Die Bestimmung der SZ, die eine Maßzahl über die Anzahl freier Säuregruppen ist, lässt Rückschlüsse auf die polymere Struktur der Resomere<sup>®</sup> zu. Je größer die Änderung der SZ ist, desto wahrscheinlicher ist die Spaltung der Resomer<sup>®</sup>-Ketten durch Verseifungsreaktionen. Im indirekten Zusammenhang mit dem Molekulargewicht der Polymere stehen die thermischen Eigenschaften wie beispielsweise die Glasübergangstemperatur. Eine Abnahme der Glasktemperatur ist mit einer Abnahme/Änderung des Molekulargewichtes eines Polymers verbunden. Zur Charakterisierung der Resomer<sup>®</sup>-Formulierungen wurde die Freisetzung der Modellsubstanz CcC aus den in situ Implantaten ausgewählt. Die Wirkstofffreigabe aus diesen Systemen ist in hohem Maße qualitätsrelevant.

Im Hauptteil der Arbeit wurde die Sterilisierbarkeit der ausgewählten Modellformulierung untersucht. Es wurde der Einfluss der Sterilisationsverfahren auf die Stabilität der Formulierungen insbesondere der matrixbildenden Resomere<sup>®</sup>, aber auch des Modellproteins CcC bewertet. Ziel war es, ein geeignetes Sterilisationsverfahren für bioabbaubare Depotformulierungen, im Idealfall als Sterilisation im Endbehältnis, zu finden. Dazu wurden Standard-Sterilisationsverfahren des Europäischen Arzneibuches mit alternativen Methoden

verglichen. Als Standardverfahren wurden die Sterilisation mit Hitze und die Strahlensterilisation betrachtet. Die Mikrowellenbehandlung und die Hochdruckinaktivierung wurden als alternative Methoden zur Keimreduzierung, die in Europa bisher nicht für humane Arzneimittel angewendet wurde, ausgewählt. Die Resomer<sup>®</sup>-Formulierungen stellten dabei hohe Anforderungen an die Sterilisationsverfahren, da davon auszugehen war, dass thermische und mechanische Belastungen sowie Strahleneinwirkung strukturelle Veränderungen der PLA und PLGA auslösen können.

Die Heißluftsterilisation ist die Methode der Wahl für nicht wässrige Formulierungen wie die Resomer<sup>®</sup>-Formulierungen<sup>63</sup>. Die Ergebnisse zur Untersuchung des Einflusses der trockenen Hitze auf die thermosensitiven Resomere<sup>®</sup>, als Ausgangsmaterial und in PEG 400 gelöst, veranschaulichen deutlich, dass dieses Verfahren für diese Produkte nicht praktikabel ist. Die Polymere wurden hierbei zerstört (Abb. 3.45 und 3.46).

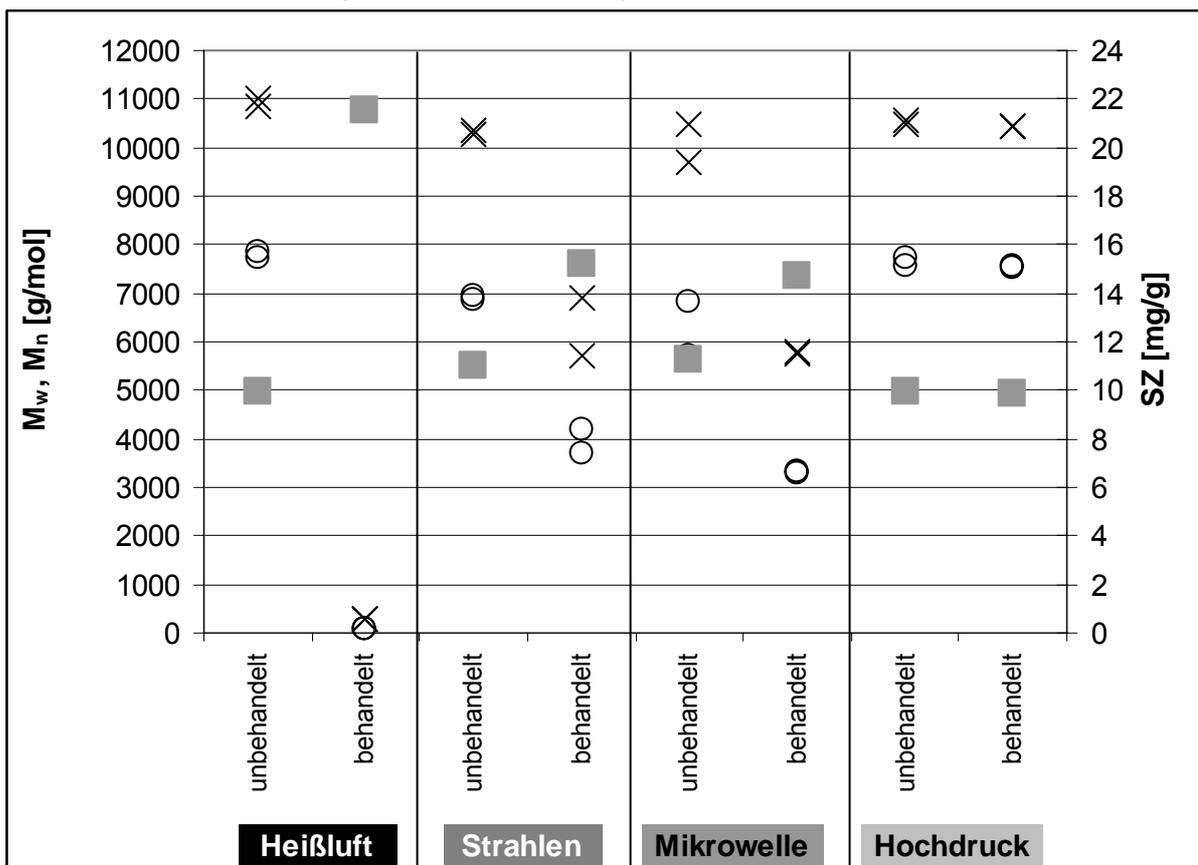


Abb. 3.45: M<sub>w</sub>, M<sub>n</sub> und SZ der R 202H-Lösungen in Abhängigkeit vom angewandten Sterilisationsverfahren

X M<sub>w</sub> (n = 2); O M<sub>n</sub> (n = 2); ■ SZ (x, n = 3)

Das Standardverfahren, die Sterilisation mit  $\gamma$ -Strahlen, ist die einzig akzeptable Methode für bioabbaubare Depotformulierungen mit den matrixbildenden Resomeren<sup>®</sup>. Die Ergebnisse belegen jedoch, dass die untersuchten Modellformulierungen in allen Herstellungsstufen nicht strahlensterilisiert werden können. Der Energieeintrag durch die  $\gamma$ -Strahlen führte zu signifikanten Veränderungen der physikochemischen Eigenschaften der Resomere<sup>®</sup> und damit auch zu Veränderungen im Freigabeverhalten der Implantate (Abb. 3.45 und Abb. 3.46).

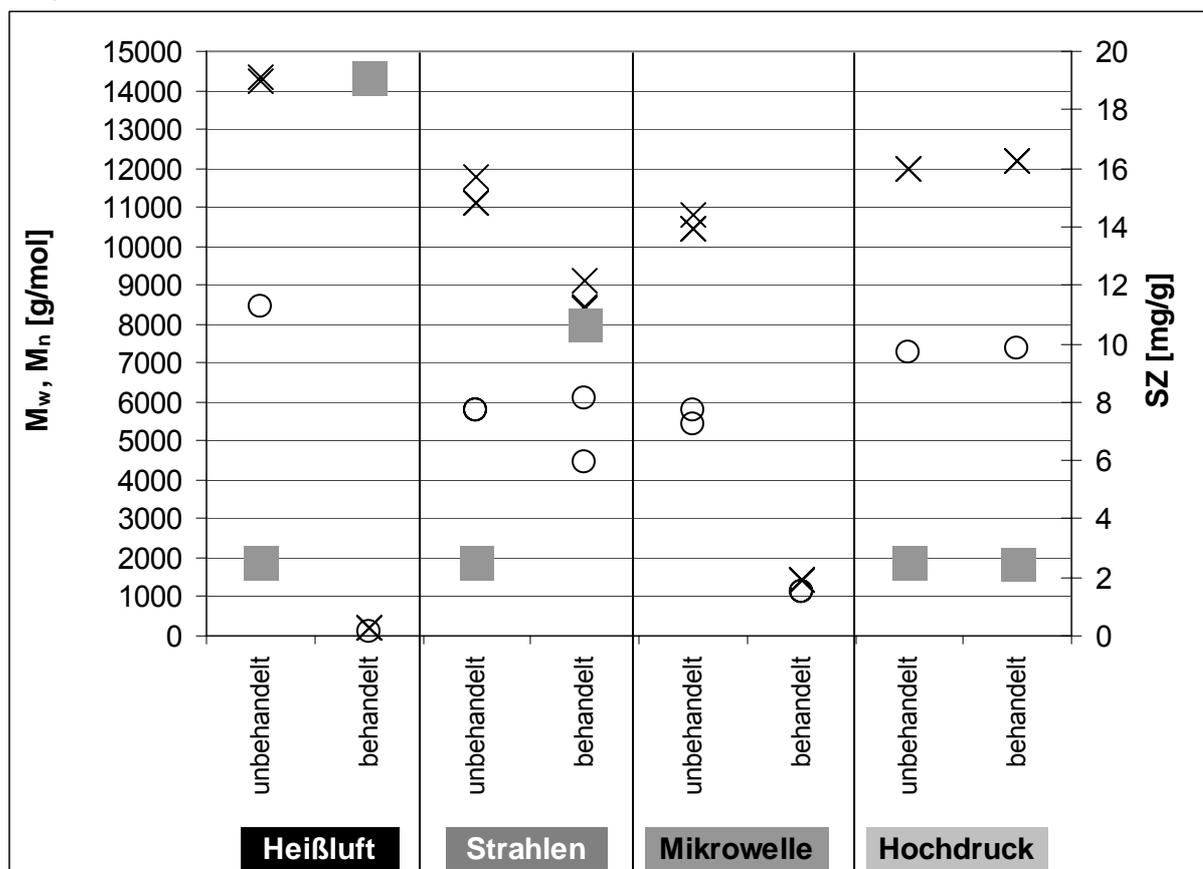


Abb. 3.46: M<sub>w</sub>, M<sub>n</sub> und SZ der RG 752-Lösungen in Abhängigkeit vom angewandten Sterilisationsverfahren

x M<sub>w</sub> (n = 2); o M<sub>n</sub> (n = 2); ■ SZ (x, n = 3)

Mit dem Ziel der Findung eines Sterilisationsverfahrens für bioabbaubare Depotformulierungen, im Idealfall als Sterilisation im Endbehältnis, wurden auch alternative Methoden zur Keimreduzierung untersucht. Ausgewählt wurden die Mikrowellenbehandlung und die Hochdruckinaktivierung.

Die Sterilisation mit Mikrowellen ist ein Verfahren zur Herstellung von sterilen Injektionspräparaten, die thermo- und strahlensensitive Eigenschaften aufweisen. Die untersuchten Parameter wie SZ, Molmassen der Resomere<sup>®</sup> und die Freisetzung aus

den Implantaten wurden unter Mikrowellenbehandlung verändert (Abb. 3.45 und 3.46). Diese Ergebnisse stehen der Anwendung des Verfahrens als materialschonendes Sterilisationsverfahren, wie es nach Japanischer Pharmakopoe möglich ist, entgegen. Möglicherweise sind die verlängerten Aufheizzeiten, die aufgrund der für diese Arbeit zur Verfügung gestandenen leistungsgeminderten Mikrowellen notwendig waren, Ursache für den nachteiligen Einfluss der Mikrowellengeräten auf die Resomer<sup>®</sup>-Eigenschaften. Eine Prüfung der Anwendbarkeit des Verfahrens mit veränderten Temperatur-Zeit-Profilen und leistungsstärkeren Mikrowellen für die Sterilisation der Resomer<sup>®</sup>-Formulierungen erscheint daher sinnvoll.

Des Weiteren wurde die Hochdruckinaktivierung als alternatives Verfahren zur Sterilisation der bioabbaubaren Depotformulierungen untersucht und bewertet. Es konnte gezeigt werden, dass die Hochdruckinaktivierung keinen nachteiligen Einfluss auf die Eigenschaften der Resomere<sup>®</sup> und deren Formulierung hat. Alle untersuchten Parameter wie SZ, Molmassen, inhärente Viskosität, Glasübergangstemperatur und Freisetzung wurden nicht verändert (Abb.3.45 und 3.46).

Hinsichtlich des Einflusses auf den Modellwirkstoff CcC wurde in den Resomer<sup>®</sup>-Formulierungen nach Hochdruckinaktivierung im Vergleich zu den anderen untersuchten Sterilisationsverfahren der höchste CcC-Gehalt wieder gefunden. Die Ergebnisse veranschaulichen deutlich, dass die Hochdruckinaktivierung ein materialschonendes Verfahren darstellt. Des Weiteren wurden die mit Hochdruck behandelten Resomer<sup>®</sup>-Formulierungen auf Sterilität getestet. Sie entsprachen der Prüfung auf Sterilität. Jedoch konnte bei den Untersuchungen zur Keimreduzierung von Bacillus subtilis Sporen mit Hochdruckbehandlung nur eine Reduktion um eine Zehnerpotenz nachgewiesen werden, was für ein Sterilisationsverfahren nicht ausreichend ist. Als Ursache für die unzureichenden Ergebnisse waren die gesetzten Temperatur-Druck-Zeit-Parameter zu sehen. Bei Optimierung dieser Inaktivierungsbedingungen (Temperatur, Druck, Zeit) ist eine ausreichende Keimreduktion von  $10^6$  Keimen des Bacillus subtilis wahrscheinlich. Jedoch wurden im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich der mikrobiologischen Sicherheit der Hochdruckinaktivierung keine weiteren Optimierungsversuche vorgenommen, da vorrangig der Einfluss der Sterilisationsverfahren auf die Resomer<sup>®</sup>-Formulierungen untersucht und bewertet werden sollte.

Zusammenfassend muss so festgestellt werden, dass eine Schlusssterilisation der untersuchten Resomer<sup>®</sup>-Formulierungen im Endbehältnis nicht möglich ist. Es ist beim aktuellen Stand der Untersuchung eine aseptische Herstellung erforderlich. Die Hochdruckinaktivierung stellt jedoch hinsichtlich der qualitätsrelevanten Parameter der Depotformulierungen ein viel versprechendes und anwendbares Verfahren dar. Es sind zur Etablierung dieses Verfahrens zur Sterilisation von humanen Injektionspräparaten jedoch noch umfangreiche Untersuchungen hinsichtlich der mikrobiologischen Sicherheit erforderlich, was ebenfalls ein Ergebnis dieser Arbeit ist.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Park, K.; Shalaby, W. S. W.; Park, H. Biodegradable Hydrogels for Drug Delivery. Basel, 1993.
2. Barrows, T. H. Degradable implant materials: a review of synthetic absorbable polymers and their applications. *Clinical Materials* **1986**, *1*, 233-257.
3. Singh, S.; Webster, D. C.; Singh, J. Thermosensitive polymers: Synthesis, characterization, and delivery of proteins. *Int. J. Pharm.* **2007**, *341*, 68-77.
4. Mundargi, R. C.; Babu, V. R.; Rangaswamy, V.; Patel, P.; Aminabhavi, T. M. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *J Control Release* **2008**, *125(3)*, 193-209.
5. Claes, L. E.; Ignatius, A. A.; Rehm, K. E.; Scholz, C. New bioresorbable pin for the reduction of small bony fragments: design, mechanical properties and in vitro degradation. *Biomaterials*. **1996**, *17*, 1621-1626.
6. Langer, R. Polymeric delivery systems for controlled drug release. *Chem. Eng. Commun.* **1980**, *6*, 1-48.
7. Langer, R.; Peppas, N. A. Present and future applications of biomaterials in controlled drug delivery systems. *Biomaterials* **1981**, *2*, 201-214.
8. Rafler, G.; Jobmann, M. Controlled release systems of biodegradable polymers. Part 4. Hydrophobic and hydrophilic polylactides for drug delivery systems. *Pharm. Ind.* **1996**, *58*, 1147-1151.
9. Kissel, T.; Brich, Z.; Bantle, S.; Lancranjan, I.; Vit, P.; et al Parenteral depot-systems on the basis of biodegradable polyesters. *J. Controlled Release* **1991**, *16*, 27-41.
10. Kissel, T.; Biodegradable polymers as potential drug carrier systems. In *Entwicklungen in der Pharmazeutisch-Technologischen Arzneimittelforschung*; Gröning, R., Schmidt, P. C., Eds.; Deutscher Apotheker Verlag: Stuttgart, 1999; pp. 47-57.
11. Tice, T. R.; Cowsar, D. R. Biodegradable controlled release parenteral systems. *Pharm. Technol.* **1984**, *8*, 26-30.
12. Müller, R. H.; Hildebrand, G. E. Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH: Stuttgart, 1998.
13. Schwach-Abdellaoui, K., Heller, J., and Gurny, R. Synthesis and Characterization of New Biodegradable Polymers Designed for Controlled Drug Release Applications. [2nd], Conference Proceeding. 275-276. 2001. Paris, World Meeting APGI/APV.
14. Zignani, M.; Merkli, A.; Sintzel, M. B.; Bernatchez, S. F.; Gurny, R.; et al New generation of poly(ortho esters): synthesis, characterization, kinetics, sterilization and biocompatibility. *J. Controlled Release* **1997**, *48*, 115-129.
15. Schwach, G.; Coudane, J.; Engel, R.; Vert, M. Ring Opening Polymerization of D,L-Lactide in the Presence of Zinc Metal and Zinc Lactate. *Polymer International* **1998**, *46*, 177-182.
16. Akutsu, F.; Inoki, M.; Sueyoshi, M.; Uei, H.; Kasashima, Y.; Naruschi, K.; Yamaguchi, Y. Synthesis of Poly(lactic acid) by Direct Polycondensation of Lactic Acid Using 1,1'-Carbonyldiimidazole, N,N,N',N'-Tertamethylchloroformamidinium Chloride, and N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide as Condensing Agents. *Polymer Journal* **1998**, *30*, 421-423.
17. Bendix, D. Chemical synthesis of polylactide and its copolymers for medical applications. *Polymer Degradation and Stability* **1998**, *59*, 129-135.

18. Brunner, A. Bioabbaubare Polymere als Träger von Peptid-Arzneistoffen. Dissertation. 1-158. 1998.
19. Park, T. G. Degradation of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: effect of copolymer composition. *Biomaterials* **1995**, *16*, 1123-1130.
20. Lill, N. and Sandow, L. Two poly(D,L-lactide-co-glycolide) 50:50 types: Same polymer but different? 23, Conference Proceeding. 329-330. 1996. Proc.Intern. Symp. Control. Rel. Bioact.Mater.
21. Voigt, R. Pharmazeutische Technologie. Ullstein Mosby: Berlin/ Wiesbaden, 1995.
22. Göpferich, A. Polymer Degradation and Erosion: Mechanisms and Applications. *Eur. J. Pharm. and. Biopharm.* **1996**, *42*, 1-11.
23. Hutchinson, F. G.; Furr, B. J. Biodegradable carriers for the sustained release of polypeptides. *TIBTECH* **1987**, *5*, 102-106.
24. Rothen-Weinhold, A.; Besseghir, K.; Gurny, R. Analysis of the influence of polymer characteristics and core loading on the in vivo release of a somatostatin analogue. *Eur. J. Pharm. Sciences* **1997**, *9*, 303-313.
25. Zhang, X.; Wyss, U. P.; Pichora, D.; Goosen, M. F.; Marte, C. L.; et al Controlled release of testosterone and estradiol-17beta from biodegradable cylinders. *J. Controlled Release* **1994**, *29*, 157-161.
26. Rothen-Weinhold, A.; Besseghir, K.; Vuaridel, E.; Sublet, E.; Oudry, N.; Gurny, R. Stability studies of a somatostatin analogue in biodegradable implants. *Int. J. Pharm.* **1998**, *178*, 213-221.
27. Rothen-Weinhold, A.; Oudry, N.; Schwach-Abdellaoui, K.; Frutiger-Hughes, S.; Hughes, G. J.; Jeannerat, D.; Burger, U.; Besseghir, K.; Gurny, R. Formation of peptide impurities in polyester matrices during implant manufacturing. *Eur. J. Pharm. and. Biopharm.* **2000**, *49*, 253-257.
28. Kader, A.; Jalil, R. Formulation Factors Affecting Drug Release from Poly(Lactic Acid) (PLA) Microcapsule Tablets. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1999**, *25*, 141-151.
29. Park, T. G.; Cohen, S.; Langer, R. Poly(L-lactid acid)/pluronic blends: Characterization of phase separation behavior, degradation and morphology and use as protein-releasing matrices. *Macromolecules* **1992**, *25*, 116-122.
30. Gurny, R.; Peppas, N. A.; Harrington, D. D.; Banker, G. S. Development of biodegradable and injectable latices for controlled release of potent drugs. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1981**, *7*, 1-25.
31. Shah, N. H.; Railkar, A. S.; Chen, F. C.; Tarantino, R.; Malick, A. W.; et al Biodegradable injectable implant for delivering micro and macromolecules using poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA) copolymers. *J. Controlled Release* **1993**, *27*, 139-147.
32. Dittgen, M., Fricke, S., Gerecke, H., Möller, I. P., and Völkel, C. Verfahren zur Herstellung eines Implantates. Patent [DE 9701912]. 1997.
33. Eliaz, R. and Kost, J. Biodegradable injectable in-situ forming implants for protein delivery. Conference Proceeding. 2002. Florence, World Meeting APV/APGI.
34. Shively, M. L.; Coonts, B. A.; Renner, W. E.; Southard, J. L.; Bennett, A. T. Physico-chemical characterization of a polymeric injectable implant delivery system. *J. Controlled Release* **1995**, *33*, 237-243.
35. Lambert, W. J.; Peck, K. D. Development of an in situ forming biodegradable poly-lactide-co-glycolide system for the controlled release of proteins. *J. Controlled Release* **1995**, *33*, 189-195.
36. Ravivarapu, H. B.; Moyer, K. L.; Dunn, R. L. Sustained Suppression of Pituitary-Gonadal Axis with an Injectable, In Situ Forming Implant of Leuprolide Acetate. *J. Pharm. Sci.* **2000**, *89*, 732-740.

37. Yewey, G. L.; Duysen, E. G.; Cox, S. M.; Dunn, R. L. Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant. In Protein Delivery Physikal Systems; 1997; pp. 93-117.
38. Bodmeier, R.; Wang, H.; Dixon, D. J.; Mawson, S.; Jonston, K. P. Polymeric microspheres prepared by spraying into compressed carbon dioxide. *Pharm. Res.* **1995**, *12*, 1211-1217.
39. Rafler, G.; Jobmann, M. Controlled release systems of biodegradable polymers. Part 2. Microparticle preparation by spray drying. *Pharm. Ind.* **1994**, *56*, 655-660.
40. Avgoustakis, K.; Nixon, J. R. Biodegradable controlled release tablets. Part 2. Preparation and properties of poly(lactide-co-glycolide) powders. *Int. J. Pharm.* **1993**, *99*, 239-246.
41. Benoit, J. P.; Marchais, H.; Rolland, H.; van de Velde, H. Biodegradable Microspheres: Advances in Production Technology. In Microencapsulation: Methods and Industrial Applications; Benita, S., Ed.; Marcel Dekker Inc.: New York, 1996; pp. 35-72.
42. Mäder, K. Herstellungstechnologie Mikropartikel. Personal Communication. 2009.
43. Ramchandani, M.; Pankaskie, M.; Robinson, D. The influence of manufacturing procedure on the degradation of poly(lactide-co-glycolide) 85:15 and 50:50 implants. *J. Controlled Release* **1997**, *43*, 161-173.
44. Thomasin, C.; Corradin, G.; Men, Y.; Merkle, H. P.; Gander, B. Tetanus toxoid and synthetic malaria antigen containing polylactide/poly(lactide-co-glycolide) microspheres: importance of polymer degradation and antigen release for immune response. *J. Controlled Release* **1996**, *41*, 131-145.
45. Yeh, M. K.; Coombes, A. G.; Jenkins, P. G.; Davis, S. S. Novel emulsification-solvent extraction technique for production of protein loaded biodegradable microparticles for vaccine and drug delivery. *J. Controlled Release* **1995**, *33*, 437-445.
46. Bodmeier, R.; McGinity, J. W. Preparation and evaluation of drug containing poly(dl-lactide) microspheres formed by the solvent evaporation method. *Pharm. Res.* **1987**, *4*, 465-471.
47. Wichert, B.; Rohdewald, P. A new method for the preparation of drug containing polylactic acid microparticles without using organic solvents. *J. Controlled Release* **1990**, *14*, 269-283.
48. Mathiowitz, E.; Cohen, M. D.; Langer, R. Novel microcapsules for delivery systems. *Reactive Polymers* **1987**, *6*, 275-283.
49. Mathiowitz, E.; Kline, D.; Langer, R. Morphology of polyanhydride microsphere delivery systems. *Scanning Microscopy 2* **1990**, *4*, 329-340.
50. Bleich, J.; Muller, B. W.; Wassmus, W. Aerosol solvent extraction system-new microparticle production technique. *Int. J. Pharm.* **1993**, *97*, 111-117.
51. Bleich, J.; Muller, B. W. Production of drug loaded microparticles by the use of supercritical gases with the aerosol solvent extraction system (ASES) process. *J. Microencapsul.* **1996**, *13*, 131-139.
52. Bleich, J.; Kleinebudde, P.; Muller, B. W. Influence of gas density and pressure on microparticles produced with the ASES process. *Int. J. Pharm.* **1994**, *106*, 77-84.
53. Engwicht, A.; Girreser, U.; Müller, B. W. Critical properties of lactide-co-glycolide polymers for the use in microparticle preparation by the Aerosol Solvent Extraction System. *Int. J. Pharm.* **1999**, *185*, 61-72.
54. Rothen-Weinhold, A.; Besseghir, K.; De Zelicourt, Y.; Gurny, R. Development and evaluation in vivo of a long-term delivery system for vapreotide, a somatostatin analogue. *J. Controlled Release* **1998**, *52*, 205-213.
55. Maskiewicz, R.; Roskos, K. V. Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery. In Protein Delivery Physical Systems; Sanders, L. M., Hendren, R. W., Eds.; Pharmaceutical Biotechnology: 1997; pp. 45-92.

56. Food and Drug Administration (FDA). International Conference on harmonisation. final recommendations on the revision of the permitted daily exposures for two solvents, N-methylpyrrolidone and tetrahydrofuran, according to the maintenance procedures for the guidance Q3C impurities: residual solvents; availability. Fed. Reg. 68[219], 64352-64353. 2003.
57. Flick, B.; Talsness, Ch. E.; Jäckh, R.; Buesen, R.; Klug, St. Embryotoxic potential of N-methylpyrrolidone (NMP) and three of its metabolites using the rat whole embryo culture system. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2009**, *237*, 154-167.
58. Smith, B. L.; Cadwallader, D. E. Behavior of Erythrocytes in Various Solvent Systems III. *J. Pharm. Sci.* **1967**, *56*, 351-355.
59. Völkel, C., Pfeifer, M., Fricke, S., Vogt, S., Bormann, E.-J., Schnabelrauch, M., and Beer, B. Bioabbaubare, injizierbare Oligomer-Polymer-Zusammensetzungen. Patent [DE 19908753]. 2000.
60. Europäisches Arzneibuch. 6. Ausgabe Deutscher Apotheker Verlag: Stuttgart, 2008.
61. Wallhäuser, K. H. Praxis Der Sterilisation Desinfektion - Konservierung Keimidentifizierung - Betriebshygiene. Georg Thieme Verlag: Stuttgart - New York, 1988.
62. USP 32-NF 27, General Chapters <71> Sterility Test, © 2009 The United States Pharmacopeial Convention, Inc. 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852
63. EMEA. Decision trees for the selection of sterilisation methods. Annex to note for guidance on development pharmaceuticals. CPMP/QWP/054/98, 1-3. 1999.
64. EMEA. Note for guidance on manufacture of the finished dosage form. CPMP/QWP/468/95. 1996.
65. Athanasiou, K. A.; Niederauer, G. G.; Agrawal, C. M. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials* **1996**, *17*, 93-102.
66. Rozema, F. R.; van Asten, J. A. A. M.; Nijenhuis, A. J.; Pennings, A. J. The effect of different steam-sterilization programs on material properties of poly(L-lactide). *J. Applied Biomaterials* **1991**, *2*, 23-28.
67. Gogolewski, S. and Perren, S. M. Method of sterilization of polymeric materials devices using heat treatment under dry, substantially oxygen-free inert gas and low moisture conditions. Patent PCT/EP94/03437, 1-19. 1995.
68. Gogolewski, S.; Mainil-Varlet, P. The effect of thermal treatment on sterility, molecular and mechanical properties of various polylactides I. Poly(L-lactide). *Biomaterials* **1996**, *17*, 523-528.
69. Gogolewski, S. Effect of thermal treatment on sterility, molecular and mechanical properties of various polylactides 2. poly(l/d-lactide) and poly(l/dl-lactide). *Biomaterials* **1997**, *18*, 251-255.
70. Groves, M. J. Parenteral Drug Delivery Systems. In Controlled Drug Delivery; Mathiowitz, E., Ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Providence, 1998; pp. 743-776.
71. Sintzel, M. B.; Merkli, A.; Tabatabay, C.; Gurny, R. Influence of irradiation sterilization on polymers used as drug carriers-review. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1997**, *23*, 857-878.
72. Volland, C.; Wolff, M.; Kissel, T. Influence of terminal gamma-sterilization on captopril containing poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *J. Controlled Release* **1994**, *31*, 293-305.
73. Friess, W.; Schlapp, M. Sterilization of gentamicin containing collagen/PLGA microparticle composites. *Eur. J. Pharm. and Biopharm.* **2006**, *63*, 176-187.
74. Jahan, M. S.; Stovall, J. C.; Davidson, J. A.; Hines, G. Long-term effects of gamma-sterilization on degradation of implant materials. *Appl. Radiat. Isot.* **1995**, *46*, 637-638.

75. Perez, C.; Sanchez, A.; Putnam, D.; Ting, D.; Langer, R.; Alonso, M. J. Poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) nanoparticles as new carriers for the delivery of plasmid DNA. *J. Controlled Release* **2001**, *75*, 211-224.
76. Johansen, P.; Men, Y.; Merkle, H. P.; Gander, B. Revisiting PLA/PLGA microspheres: analysis of their potential in parenteral vaccination. *Eur. J. Pharm. and. Biopharm.* **2000**, *50*, 129-146.
77. El-Azza, G. D. and Eisai Machinery GmbH Köln. Die Technik der Mikrowellensterilisation. Firmenschrift. 1998.
78. Sasaki, K.; Honda, W.; Ohsawa, S.; Miyake, Y. Validation of a Microwave Sterilizer for Injection Ampules. *PDA. J. Pharm. Sci. Technol.* **1999**, *53*, 60-69.
79. Sterilization / General Tests. In THE PHARMACOPOEIA of JAPAN, Twelfth ed.; THE SOCIETY OF JAPANESE PHARMACOPOEIA: 1991; pp. 138-139.
80. Höller, C.; Martiny, H.; Christiansen, B.; Rüden, H.; Gundermann, K. O. The efficacy of low temperature plasma (LTP) sterilization, a new sterilization technique. *Zbl. Hyg.* **1993**, *194*, 380-391.
81. Gogolewski, S.; Mainil-Varlet, P.; Dillon, J. G. Sterility, mechanical properties, and molecular stability of poly(lactide) internal-fixation devices treated with low-temperature plasmas. *J Biomed Mater Res* **1996**, *32*, 227-235.
82. Dunn, J.; Salisbury, K.; Bushnell, A.; Clarke, W. Sterilization using pulsed white light. *Med. Device. Technol.* **1997**, *8*, 24-26.
83. Bushnell, A.; Clark, W.; Dunn, J.; Salisbury, K. Pulsed light sterilization of products packaged by blow-fill-seal techniques. *Pharm. Eng.* **1997**, *17*, 74-80.
84. Takeshita, K.; Shibato, J.; Sameshima, T.; Fukunaga, S.; Isobe, S.; Arihara, K.; Itoh, M. Damage of yeast cells induced by pulsed light irradiation. *Int. J. of Food Microbiology* **2003**, *85*, 151-158.
85. Dillow, A. K.; Dehghani, F.; Hrkach, J. S.; Foster, N. R.; Langer, R. Bacterial inactivation by using near- and supercritical carbon dioxide. *Medical Sciences* **1999**, *96*, 10344-10348.
86. Ludwig, H. Hochdruckverfahren zur Erhöhung der mikrobiologischen Sicherheit in den Bereichen Lebensmittel, Pharmazie und Kosmetik.; 1994; pp. 429-437.
87. Enomoto, A.; Nakamura, K.; Nagai, K.; Hashimoto, T.; Hakoda, M. Inactivation of food microorganisms by high-pressure carbon dioxide treatment with or without explosive decompression. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1997**, *61*, 1133-1137.
88. Fukumura, M.; Sasaki, K.; Miyake, Y. Application of high-frequency wave (microwave) sterilization to pharmaceutical preparations. *J. Society for Antibacterial and Antifungal Agents* **1998**, 1-32.
89. Ebara, T.; Iijima, K.; Honda, K.; Shimizu, K.; Fukumura, M.; Sasaki, K.; Horie, T.; Miyake, Y. Development and practical application of high-frequency wave (microwave) continuous steriliser. *European Journal of Parenteral Sciences* **1998**, *3*, 39-47.
90. Sasaki, K.; Mori, Y.; Honda, W.; Miyake, Y. Selection of Biological Indicator for Validating Microwave Heating Sterilization. *PDA. J. Pharm. Sci. Technol.* **1998**, *52*, 60-65.
91. Sasaki, K.; Honda, W.; Miyake, Y. Evaluation of high temperature and short-time sterilization of injection ampuls by microwave heating. *PDA. J. Pharm. Sci. Technol.* **1998**, *52*.
92. Sasaki, K.; Honda, W.; Ohsawa, S.; Miyake, Y.; Kawashima, Y. Study of a microwave sterilizer for injection ampuls. Part 5. Evaluation of sterilization effect on the head space of ampuls. *Archives of Practical Pharmacy* **1998**, *58*, 136-146.
93. Wu, Q. Effect of high-power microwave on indicator bacteria for sterilization. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **1996**, *43*, 752-754.

94. Sasaki, K. H. W. O. S. M. Y. K. Y. Study of a microwave sterilizer for injection ampuls. Part 4 Application to sterilization of thermally labile drug solutions. *Archives of Practical Pharmacy* **1998**, *58*, 125-135.
95. Gröning, R.; Janske, U. Germ reduction by microwave specific effects. *Pharmazie*. **1987**, *42*, 167-168.
96. Cheftel, J. C. Review: High-pressure, microbial inactivation and food preservation. *Food Sci. Technol. Int.* **1995**, *1*, 75-90.
97. Ultra High Pressure Treatments of Food. Kluwer Academic/Plenum Publishers: New, York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, 2003.
98. Huland, H.; Kloppel, G.; Feddersen, I.; Otto, U.; Brachmann, W.; Hubmann, H.; Kaufmann, J.; Knipper, W.; Lantzius, B. F.; Huland, E. Comparison of different schedules of cytostatic intravesical instillations in patients with superficial bladder carcinoma: final evaluation of a prospective multicenter study with 419 patients. *J Urol*. **1990**, *144*, 68-71.
99. Brigger, I.; Armand-Lefevre, L.; Chaminade, P.; Besnard, M.; Rigaldie, Y.; Largeteau, A.; Andremont, A.; Grislain, L.; Demazeau, G.; Couvreur, P. The Stenlying Effect of High Hydrostatic Pressure on Thermally and Hydrolytically Labile Nanosized Carriers. *Pharm Res* **2003**, *20*, 674-683.
100. Ludwig, H. Hochdruckverfahren zur Erhöhung der mikrobiologischen Sicherheit in den Bereichen Lebensmittel, Pharmazie und Kosmetik. Conference Proceeding. 429-437. 1999. Berlin, Offenbach, VDE Verlag GmbH.
101. Ludwig, H., Stricker, H., and Entenmann, G. Verfahren zur Sterilisation von chirurgischem Material. Patent [EP 0 402 922], 1-7. 1990.
102. Silva, J. L.; Foguel, D.; Suarez, M.; Gomes, A. M. O.; Oliveira, A. C. High-pressure applications in medicine and pharmacology. *J. Phys. : Condens. Matter* **2004**, *16*, S929-S944.
103. Scigalla, W. and Ludwig, H. Sterilisation of radiation- and thermo- sensitive pharmaceutical materials by means of high pressure. Kamarád, J., Arnold, Z., and Kapicka, A. [XXXII. Annual Meeting EHPRG], Conference Proceeding. 195-198. 1994. Brno.
104. Mentrup, E.; Butz, P.; Stricker, H.; Ludwig, H. High pressure sterilization of liposomes. *Pharm. Ind.* **1988**, *50*, 363-366.
105. Lin, F.; Shen, Z. R.; Huang, C.; Lou, L. J.; Chen, W. B.; Shen, W. Z. Effect of cobalt-60 irradiation sterilization on physicochemical properties and in vitro drug release of NAO-PLA microspheres. *Chin. J. Pharm. Ind.* **1992**, *23*, 446-449.
106. Butz, P.; Ries, J.; Traugott, U.; Weber, H.; Ludwig, H. High pressure inactivation of bacteria and bacterial spores. *Pharm. Ind.* **1990**, *52*, 487-491.
107. Ludwig, H.; Gross, P.; Scigalla, W.; Sojka, B. Pressure Inactivation of Microorganisms. *High Pressure Research* **1994**, *12*, 193-197.
108. Sojka, B.; Ludwig, H. Effects of rapid pressure changes on the inactivation of *Bacillus subtilis* spores. *Pharm. Ind.* **1997**, *59*, 436-438.
109. Sojka, B.; Ludwig, H. Pressure sensitivity of *Bacillus subtilis* spores that survived previous high pressure treatments. *Pharm. Ind.* **1995**, *57*, 251-252.
110. Sojka, B.; Ludwig, H. Pressure-induced germination and inactivation of *Bacillus subtilis* spores. *Drugs Made. Ger.* **1995**, *38*, 95-98.
111. Sojka, B.; Ludwig, H. Pressure-induced germination and inactivation of *Bacillus subtilis* spores. *Pharm. Ind.* **1994**, *56*, 660-663.
112. Kissel, T. Injectable retard formulations. *Acta Pharm. Technol.* **1983**, *29*, 221-239.

113. Rafler, G.; Jobmann, M. Controlled release systems of biodegradable polymers. Part 1. Hydrolytic degradation of biodegradable aliphatic polyesters. *Pharm. Ind.* **1994**, *56*, 565-570.
114. Physikalische Pharmazie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft: Stuttgart, 1987.
115. Omelczuk, M. O.; McGinity, J. W. Influence of polymer glass transition temperature and molecular weight on drug release from tablets containing poly-(DL-lactic acid). *Pharm. Res.* **1992**, *9*, 26-32.
116. Mohr, D.; Wolff, M.; Kissel, T. Gamma irradiation of terminal sterilization of 17 $\beta$ -estradiol loaded poly-(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles. *J. Controlled Release* **1999**, *61*, 203-217.
117. Shameem, M.; Lee, H.; Burton, K.; Thanoo, B. C.; DeLuca, P. P. Effect of  $\gamma$ -Irradiation on Peptide-Containing Hydrophilic Poly(D,L-lactide-co-glycolide) Microspheres. *PDA. J. Pharm. Sci. Technol.* **1999**, *53*, 309-313.
118. Boehringer Ingelheim Pharma KG. Resorbierbare Polyester. Firmenschrift. 2000.
119. Merkulow, N. Auswirkungen von hohem hydrostatischem Druck auf Schimmelpilze und die Synthese des Mycotoxins Patulin. Dissertation. 1-145. 2001.
120. Völkel, C. Einfluß von Polymereigenschaften auf pharmazeutisch-technologische und biopharmazeutische Eigenschaften von gepreßten und in situ geformten Implantaten. Dissertation. 1-99. 2003.
121. Jain, R. A.; Rhodes, C. T.; Railkar, A. M.; Malick, A. W.; Shah, N. H. Comparison of Various Injectable Protein-Loaded Biodegradable Poly(Lactide-co-glycolide)(PLGA) Devices: In-Situ-Formed Implant Versus In-Situ-Formed Microspheres Versus Isolated Microspheres. *Pharm. Dev. Technol.* **2000**, *5*, 201-207.
122. Kempe, S.; Metz, H.; Mäder, K. Do in situ forming PLG/NMP implants behave similar in vitro and in vivo? A non-invasive and quantitative EPR investigation on the mechanisms of the implant formation process. *J Control Release* **2008**, *130*, 220-225.
123. Jeffery, H.; Davis, S. S.; O' Hagan, D. T. Preparation and characterization of poly(lactide-co-glycolide) microparticles. Part 2. Entrapment of a model protein using a (water-in-oil)-in-water emulsion solvent evaporation technique. *Pharm. Res.* **1993**, *10*, 362-368.
124. Crotts, G.; Park, T. G. Stability and release of bovine serum albumin encapsulated within poly(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles. *J. Controlled Release* **1997**, *44*, 123-134.
125. Cohen, S.; Yoshioka, T.; Lucarelli, M.; Hwang, L. H.; Langer, R. Controlled delivery systems for proteins based on poly(lactic/glycolic acid) microspheres. *Pharm. Res.* **1991**, *8*, 713-720.
126. Boury, F.; Marchais, H.; Proust, J. E.; Benoit, J. P. Bovine serum albumin release from poly(alpha-hydroxy acid) microspheres: effects of polymer molecular weight and surface properties. *J. Controlled Release* **1997**, *45*, 75-86.
127. Roempp, Stichwort: Cytochrom C. Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 2003.
128. Dickerson, R. E.; Takano, T.; Eisenberg, D.; Kallai, O. B.; Samson, L.; Cooper, A.; Margoliash, E. Ferricytochrome C: General features of the horse and bonito proteins at 2.8 Å Resolution. *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 1511-1535.
129. von Bruchhausen, F.; Ebel, S.; Frahm, A. W.; Hackenthal, E. Hagers Handbuch. Springer Verlag: 1993.
130. Montanari, L.; Costantini, M.; Signorette, E. C.; Valvo, L.; Santucci, M.; Bartolomei, M.; Fattibene, P.; Onori, S.; Faucitano, A.; Conti, B.; Genta, I. Gamma irradiation effects on Poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *J. Controlled Release* **1998**, *56*, 219-229.

131. Bittner, B.; Mäder, K.; Kroll, C.; Borchert, H.-H.; Kissel, T. Tetracycline-HCl-loaded poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres prepared by a spray drying technique: influence of  $\gamma$ -irradiation on radical formation and polymer degradation. *J. Controlled Release* **1999**, *59*, 23-32.
132. Yoshioka, S.; Aso, Y.; Kojima, S. Drug release from poly(DL-lactide) microspheres controlled by gamma-irradiation. *J. Controlled Release* **1995**, *37*, 263-267.
133. Yoshioka, S.; Aso, Y.; Otuska, T.; Kojima, S. The effect of  $\gamma$ -irradiation on drug release from poly(lactide) microspheres. *Radiat. Phys. Chem.* **1995**, *46*, 281-285.
134. Antanovich, A. and Sadkov, Yu. High-Pressure Apparatus for Investigation of Biological Systems. Ludwig, H. Conference Proceeding. 541-542. 1998. Heidelberg, Springer. Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology.
135. Butz, P.; Ries, J.; Traugott, U.; Weber, H.; Ludwig, H. Hochdruckinaktivierung von Bakterien und Bakteriensporen. *Pharm. Ind.* **1990**, *52*, 487-491.
136. Sasaki, K.; Honda, W.; Ohsawa, S.; Miyake, Y.; Kawashima, Y. Study of a microwave sterilizer for injection ampuls. *PDA. J. Pharm. Sci. Technol.* **1999**, *53*.
137. Gröning, R.; Janske, U. Keimzahlreduzierung durch Mikrowellen. *Pharm. Ztg.* **1985**, *130*, 2621-2625.
138. von Recum, H. A.; Cleek, R. L.; Eskin, S. G.; Mikos, A. G. Degradation of polydispersed poly(L-lactic acid) to modulate lactic acid release. *Biomaterials.* **1995**, *16*, 441-447.
139. Kilz, P. Qualitätssicherung von Polymeren mit GPC. *GIT Fachz. Lab.* **1995**, *10*, 944-949.
140. Gores, F., Kilz, P., Radke, W., and Schellhorn, M. Characterization of the Molecular Weight Distribution of Poly(lactides). Firmenschrift. 1998.
141. O' Hagan, D. T.; Jeffery, H.; Davis, S. S. Preparation and characterization of poly(lactide-co-glycolide) microparticles. Part 3. Microparticle/polymer degradation rates and the in vitro release of a model protein. *Int. J. Pharm.* **1994**, *37*, 103.
142. Thoma, K.; Schlutermann, B. Relationships between manufacturing parameters and pharmaceutical-technological requirements on biodegradable microparticles. Part 1. Analytical investigations of biodegradable polyesters for the preparation of injectable microspheres. *Pharmazie.* **1992**, *47*, 30-34.
143. Huggins, M. L. The viscosity of dilute solutions of long-chain molecules IV. Dependence on concentration. *J. Am. Chem. Soc.* **1942**, *64*, 2716-2718.
144. Lechner, M. D.; Gehrke, K.; Nordmeier, E. H. Makromolekulare Chemie. Birkhäuser Verlag: Basel Boston Berlin, 1998.
145. Shih, C.; Waldron, N.; Zentner, G. M. Quantitative analysis of ester linkages in poly(DL-lactide) and poly(DL-lactide-co-glycolide). *J. Controlled Release* **1996**, *38*, 69-73.
146. Deasy, P. B.; Finan, M. P.; Meegan, M. J. Preparation and characterization of lactic/glycolic acid polymers and copolymers. *J. Microencapsulation* **1989**, *6*, 369-378.
147. Hancock, B. C.; Zografi, G. Characteristics and Significance of the Amorphous State in Pharmaceutical Systems. *J. Pharm. Sci.* **1997**, *86*, 1-12.
148. Hoffmann, M.; Körner, H.; Kuhn, H. Polymeranalytik II. Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1977.
149. Reich, G. Use of DSC to study the degradation behavior of PLA and PLGA microparticles. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1997**, *23*, 1177-1189.

150. Avgoustakis, K.; Nixon, J. R. Biodegradable controlled release tablets. Part 1. Preparative variables affecting the properties of poly(lactide-co-glycolide) copolymers as matrix forming material. *Int. J. Pharm.* **1991**, *70*, 77-85.
151. Park, T. G. Degradation of poly(D,L-lactic acid) microspheres: effect of molecular weight. *J. Controlled Release* **1994**, *30*, 161-173.
152. Vert, M.; Li, S. M.; Spenlehauer, G.; Guerin, P. Bioresorbability and biocompatibility of acid of aliphatic polyesters. *J. Mater. Sci.* **1992**, *3*, 432-446.
153. Brunner, A.; Mäder, K.; Göpferich, A. pH and Osmotic Pressure Inside Biodegradable Microspheres During Erosion. *Pharm Res* **1999**, *16*, 847-852.
154. Wang, W. Instability, stabilization and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *Int. J. Pharm.* **1999**, *185*, 129-188.
155. Wahlgreen et al Interaction between Proteins and Surfactant. In *Biopolymers at Interfaces; Surfactant Science Series*: 1998; pp. 486-501.
156. Holmberg; Quash Control of Protein Adsorption. In *Biopolymers at Interfaces; Surfactant Science Series*: 1998; pp. 602-621.
157. Chittur Proteins on Surfaces. In *Biopolymers at Interfaces; Surfactant Science Series*: 1998; pp. 169-170.
158. Sah, H. A new strategy to determine the actual protein content of poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *J. Pharm. Sci.* **1998**, *86*, 1315-1318.
159. Sharif, S.; O' Hagan, D. T. Comparison of alternative methods for the determination of the levels of proteins entrapped in poly(lactide-co-glycolide) microparticles. *Int. J. Pharm.* **1995**, *115*, 259-263.
160. Hora, M. S.; Rana, R. K.; Nunberg, J. H.; Tice, T. R.; Hudson, M. E.; et al Release of human serum albumin from poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *Pharm. Res.* **1990**, *7*, 1190-1194.
161. Bodmer, D.; Kissel, T.; Traechslin, E. Factors influencing the release of peptides and proteins from biodegradable parenteral depot systems. *J. Controlled Release* **1992**, *21*, 129-138.
162. D'Souza, S. S.; DeLuca, P. P. Methods to Assess in Vitro Drug Release from Injectable Polymeric Particulate Systems. *Pharm Res* **2006**, *23*, 460-474.
163. Conti, B.; Genta, I.; Giunchedi, P.; Modena, T. Testing of in vitro dissolution behavior of microparticulate drug delivery systems. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1995**, *21*, 1223-1233.
164. Park, T. G.; Lu, W.; Crotts, G. Importance of in vitro experimental conditions on protein release kinetics, stability and polymer degradation in protein encapsulated poly(DL-lactic acid-co-glycolic acid) microspheres. *J. Controlled Release* **1995**, *33*, 211-222.
165. Bain, D. F.; Munday, D. L.; Smith, A. Modulation of rifampicin release from spray-dried microspheres using combinations of poly-(D,L-lactide). *J. Microencapsul.* **1999**, *16*, 369-385.
166. Schuhmacher, K.; Winter, G.; Mahler, H.-C. Instabilitäten von Proteinarzneimitteln. *PZ. Prisma.* **2003**, *10*, 15-18.
167. Omelczuk, M. O.; McGinity, J. W. The influence of thermal treatment on the physical-mechanical and dissolution properties of tablets containing poly(dl-lactic acid). *Pharm. Res.* **1993**, *10*, 542-548.
168. Hausberger, A. G.; Kenley, R. A.; DeLuca, P. P. Gamma irradiation effects on molecular weight and in vitro degradation of poly(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles. *Pharm. Res.* **1995**, *12*, 851-856.

169. Spenlehauer, G.; Vert, M.; Benoit, J. P.; Boddaert, A. In vitro and in vivo degradation of poly(D,L lactide/glycolide) type microspheres made by solvent evaporation method. *Biomaterials* **1989**, *10*, 557-563.
170. Rangwalla, I. J.; Fletcher, P. M.; Williams, K. E.; Nablo, S. V. Electron beam sterilization and its application to aseptic packaging. *Pharm. Technol.* **1985**, *9*, 36-47.
171. Hartas, S. R., Collett, J. H., and Booth, C. The influence of gamma irradiation on the release of melatonin from poly(lactide-co-glycolide) microspheres. 19, Conference Proceeding. 321-322. 1992. Controlled Release Society, Inc. Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.
172. Ruiz, J.-M.; Busnel, J.-P.; Benoit, J. P. Influence of average molecular weights of poly(DL-lactic acid-co-glycolic acid) copolymers 50/50 on phase separation and in vitro drug release from microspheres. *Pharm. Res.* **1990**, *7*, 928-934.
173. Geigert, J. Overview of the stability and handling of recombinant protein drugs. *J. Parenter. Sci. Technol.* **1989**, *43*, 220-224.
174. Barnickel, H. Formulation, filling and lyophilization of protein drugs. *Pharm. Ind.* **1990**, *52*, 912-915.
175. Hartas, S. R.; Collett, J. H.; Booth, C. The influence of  $\gamma$ -irradiation on poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *J. Pharm. Pharmacol.* **1992**, *43*, 29P.
176. Sanders, L. M., Kent, J. S., McRae, G. I., Vickery, B. H., Lewis, D. H., and et, al. Controlled release of a luteinizing hormone releasing hormone analog from poly(d,l-lactide-co-glycolide) microspheres. *J Pharm Sci* 73[Sep], 1294-1297. 1984.
177. Gupta, M. C.; Deshmukh, V. G. Radiation effects on poly(lactic acid). *Polymer* **1983**, *24*, 827-830.
178. Basly, J. P.; Duroux, J. L.; Bernard, M. Radiosterilization dosimetry by ESR spectroscopy: application to terbutaline. *Int. J. Pharm.* **1996**, *142*, 247-249.
179. Maeder, K. Pharmazeutische Anwendungen der Elektronenspinresonanzspektroskopie (ESR). *PZ. Prisma.* **1998**, *5*, 202-212.
180. Furkert, F. H. A Validated Test for Sterility of Microparticles Made of Polylactide-co-glycolide. *Pharm. Ind.* **1998**, *60*, 905-907.
181. Sojka, B.; Ludwig, H. Release of dipicolinic acid and amino acids during high pressure treatment of *Bacillus subtilis* spores. *Pharm. Ind.* **1997**, *59*, 355-359.
182. Avgoustakis, K.; Nixon, J. R. Biodegradable controlled release tablets. Part 3. Effect of polymer characteristics on drug release from heterogeneous poly(lactide-co-glycolide) matrices. *Int. J. Pharm.* **1993**, *99*, 247-252.
183. Thoma, K.; Schlutermann, B. Relationships between manufacturing parameters and pharmaceutical-technological requirements on biodegradable microparticles. Part 6. In vitro release characteristics of cinchocaine and bupivacaine from biodegradable microparticles. *Pharmazie.* **1992**, *47*, 436-439.

---

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmals um die Erlangung eines Doktorgrades bewerbe.

Ferner erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Jena, Oktober 2009

Manuela Pfeifer

---

## Lebenslauf

### **Persönliche Daten:**

Name: Manuela Pfeifer  
Geburtsdatum: 05.03.1973  
Geburtsort: Zeulenroda  
Familienstand: Lebensgemeinschaft,  
2 Kinder  
Anschrift: Geraer Str. 97  
07745 Jena



### **Schulbildung/ Studium:**

1979 – 1989 Allgemeinbildende Oberschule, Langenwetzendorf  
Abschluss: 10. Klasse

1989 – 1992 Berufsausbildung zum Facharbeiter für chemische  
Produktion mit Abitur in Bitterfeld  
Abschluss: Abitur  
Facharbeiter für chemische Produktion

1992 – 1997 Studium der Pharmazie an der Universität Leipzig  
Abschluss: Apothekerin

### **Praktika:**

11/ 1996 – 04/ 1997 Diplom, Jenapharm GmbH & Co. KG  
Abschluss: Diplom - Pharmazeutin

05/ 1997 – 10/ 1997 Praktikum, Apotheke Dresden

### **Berufstätigkeit:**

02/ 1998 – 01/1999 Doktorandin, Jenapharm GmbH & Co. KG  
02/1999 – 08/2003 Wissenschaftliche Mitarbeiterin „Parenterale Formu-  
lierungen und Sonderformen“, Jenapharm GmbH & Co.  
KG

08/2003 – 01/2005 Arbeitsgruppenleiter „Parenterale Formulierungen und  
Sonderformen“, Jenapharm GmbH & Co. KG

02/2005 – 04/2007 Wissenschaftliche Mitarbeiterin „Sonderformen -  
Klinikmuster“, Jenapharm GmbH & Co. KG

seit 05/2007 Arbeitsgruppenleiter „Pharmazeutische Entwicklung“ Jena,  
Jenapharm GmbH & Co. KG

---

## Veröffentlichungen

### Patent:

1. Völkel, C., Pfeifer, M., Fricke, S., Vogt, S., Bormann, E.-J., Schnabelrauch, M., and Beer, B. Bioabbaubare, injizierbare Oligomer-Polymer-Zusammensetzungen. Patent [DE 19908753]. 2000.

### Vortrag:

1. M. Pfeifer, Evaluation of poly(lactide-co-glycolide) in situ forming implants: assay and drug release in comparison to an analogous compressed implant, 3rd International Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Berlin April 2000

### Poster:

1. S. Fricke, C. Völkel, M. Pfeifer, M. Dittgen, Influence of poly(lactide-co-glycolide) on the release of testosterone from in situ forming implants, Proc. 2nd International Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Paris May 1998
2. M. Pfeifer, S. Fricke, K. Pawlik, Effect of sterilisation techniques on molecular and release properties of a parenteral depot formulation containing poly(lactide-co-glycolide) Proc. 4th International Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Florence April 2002
3. S. Fricke, M. Pfeifer, E. Kleemann, First experiences with alternative sterilisation techniques for biodegradable parenterals, Proc. 4th International Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Florence April 2002
4. M. Pfeifer, S. Fricke, H. Ludwig, C. Droscher, Effect of high pressure inactivation on physical and release properties of radiation- and heat-sensitive pharmaceuticals, Proc. 5th International Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Nuremberg March 2004
5. M. Pfeifer, S. Fricke, H. Ludwig, K. Leichenberg, Influence of different sterilization methods on properties of a model active ingredient in a parenteral depot formulation, Proc. CRS German Chapter Annual Meeting, Jena February 2006