

Name der Forschungsstelle(n)

12711 N /

AiF-Vorhaben-Nr. / GAG

01.12.00 bis 30.11.02

Bewilligungszeitraum

Schlußbericht für den Zeitraum : 01.12.00 bis 30.11.02

zu dem aus Haushaltsmitteln des BMWi über die



geförderten Forschungsvorhaben

Prof. Dr. Achim Göpferich
Fakultät für Chemie und Pharmazie
Universität Regensburg
93040 Regensburg

Forschungsthema : Entwicklung von Lipidmikropartikeln als Arzneiform für die Applikation von Problemарzneistoffen

Regensburg, 27. Februar 2003

Prof. Dr. Achim Göpferich

Regensburg, den 27.03.03
Ort, Datum

Unterschrift der/des Projektleiter(s)

AiF – Projekt

„Lipid-Mikropartikel als Depotarzneiform und Träger für Problemarzneistoffe“

Zusammenfassung der Ergebnisse in Forschung und Entwicklung

am

Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie
Prof. Dr. Achim Göpferich
Fakultät für Chemie und Pharmazie
Universität Regensburg
93040 Regensburg

**Abschlussbericht über den Zeitraum 01.12.2000 bis 30.11.2002
An die Forschungsvereinigung der Arzneimittel-Hersteller**

Regensburg, 27. Februar 2003

Prof. Dr. Achim Göpferich

I	EINLEITUNG	2
	ZIELSETZUNG UND ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	3
II	ANALYTIK	4
II.1.	HPLC-ANALYTIK	4
II.2.	GFC-ANALYTIK	6
II.3.	LIQUID CHROMATOGRAPHY - MASS SPECTROMETRY (LC-MS) - ANALYTIK	6
II.4.	STABILITÄTSPRÜFUNG	9
II.4.1	<i>Versuchsbeschreibung</i>	9
II.4.2	<i>Stabilität von Somatostatin und Insulin</i>	9
II.5.	EXTRAKTION VON ARZNEISTOFFEN AUS GLYCEROLTRIPALMITAT- MATRICES	11
II.5.1	<i>Methoden</i>	11
II.5.2	<i>Ergebnis</i>	11
III	ENTWICKLUNG VON ARZNEISTOFFTRÄGERN AUS LIPIDEN	12
III.1.	ENTWICKLUNG VON VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON LIPIDMIKROPARTIKELN DURCH SPRÜHERSTARRUNG	12
III.1.1	<i>Sprüherstarrungsverfahren</i>	13
III.1.2	<i>Aufbau einer Sprüherstarrungsapparatur</i>	13
III.1.3	<i>Herstellung mit der Einstoffdüse</i>	16
III.1.4	<i>Herstellung mit Zweistoffdüse</i>	16
III.1.5	<i>Upscaling</i>	17
III.2.	CHARAKTERISIERUNG VON LIPIDMIKROPARTIKELN	18
III.2.1	<i>Partikelgrößenverteilung</i>	18
III.2.1.1	<i>Einfluss von Druck, Sprühdüsenöffnung und Sprühtemperatur auf Partikelgrößenverteilung bei Sprüfung mit der Einstoffdüse</i>	18
III.2.1.2	<i>Vergleich Einstoffdüse - Zweistoffdüse bzgl. Partikelgrößenverteilung</i>	20
III.2.2	<i>Morphologie der Lipidmikropartikel</i>	21
III.2.3	<i>Kristallinität der Mikropartikel</i>	22
III.3.	FREISETZUNGSUNTERSUCHUNGEN VON WIRKSTOFFHALTIGEN LIPIDMATRICES	23
III.3.1	<i>Freisetzung von Peptiden aus Lipidmatrices</i>	23
III.3.2	<i>Freisetzungsmechanismus</i>	24
III.3.3	<i>Steuerung der Freisetzung</i>	27
III.3.4	<i>Freisetzung von Peptiden aus Lipidmikropartikeln</i>	28

III.3.5 Testung der biologischen Aktivität von Insulin nach Einarbeitung in Lipidmatrices

33

IV IN VIVO BIOKOMPATIBILITÄTSPRÜFUNG.....	35
IV.1. STUDIENDESIGN	35
IV.1.1 Herstellung der Zylinder-Matrices.....	36
IV.1.2 Ergebnisse	37
IV.1.3 Erosionsbeschleunigung durch Phospholipide	38
V LISTE DER VERÖFFENTLICHUNGEN	39
VI LITERATUR.....	40

I Einleitung

Viele Arzneistoffe besitzen problematische Eigenschaften wie z.B. geringe orale Bioverfügbarkeit, kurze In-vivo-Halbwertszeiten, hohen First-Pass-Metabolismus und mangelnde Stabilität. Proteine und Peptide stellen in besonderem Maße solche Problemarzneistoffe dar. Durch kurze Halbwertszeiten und Anfälligkeit gegenüber chemischen und physikalischen Instabilitäten nach oraler Verabreichung stellen Proteine und Peptide besonders hohe Anforderungen an die Entwicklung von geeigneten Applikationsformen. Aufgrund ihrer spezifischen Eigenschaften befinden sich auf dem Markt hauptsächlich Proteinlösungen bzw. -lyophilisate, die mehrmals täglich oder kontinuierlich parenteral appliziert werden müssen. Es besteht daher ein großer Bedarf an Depotarzneiformen, die es erlauben, Proteine und Peptide über einen den therapeutischen Anforderungen angepaßten Zeitraum freizusetzen. Einige wenige Depotarzneiformen für Proteine wurden auf der Basis von bioabbaubaren Polymeren entwickelt. Diese Systeme können den Wirkstoff über einen längeren Zeitraum freisetzen. Nachteilig auf die Stabilität der inkorporierten Proteine können sich dabei jedoch eine Änderung des Milieus in der Arzneiform und eine damit verbundene Entstehung von Abbauprodukten auswirken [1]. Deshalb wurde nach neuen Trägersubstanzen gesucht.

Die Verwendung von Lipiden als Trägersubstanzen bietet die Möglichkeit, sowohl wasserlösliche als auch schwerlösliche Substanzen zu verkapseln. Besonders attraktiv erscheint der Einsatz von Lipiden zur Applikation von Proteinen und Peptiden durch

ihren potenziell stabilisierenden Effekt während der Herstellung und der Lagerung sowie der Anwendungsdauer. Zusätzlich kann eine kontrollierte, retardierte Freisetzung der Substanzen erzielt werden [2]. Als vorteilhaft erweist sich die gute Bioverträglichkeit und Bioabbaubarkeit von Lipiden [3].

Zielsetzung und Zusammenfassung der Ergebnisse

Ziel des Projektes war es die Herstellung von Lipidmikropartikeln durch Sprüherstarrung zu optimieren, die Freisetzung von Wirkstoffen aus Lipidmikropartikeln zu untersuchen und die Biokompatibilität der Trägermaterialien zu testen. Diese Aufgabengebiete unterteilten sich in Entwicklung analytischer Methoden zur Partikelcharakterisierung, Analytik der Wirkstoffe im Trägermaterial, sowie Optimierung des Herstellungsverfahrens und der Rezeptur, Untersuchung des Freigabeverhaltens, der Stabilität und der Biokompatibilität. Zunächst wurde im Rahmen dieses Projektes ein Verfahren für die lösungsmittelfreie Herstellung von Lipidmikropartikeln zur kontrollierten Freisetzung von Proteinen etabliert und optimiert. Eine Sprüherstarrungsapparatur wurde entwickelt, die eine effiziente und upscale-bare Herstellung von Lipidmikropartikeln ermöglicht (Kapitel III). Damit wurde die Voraussetzung geschaffen, Partikel mit einer Ausbeute von 70 % bis 88 % herzustellen. Das Upscaling von der Chargengröße von 4g auf 20 g Lipidmikropartikel gelang durch Einsatz einer beheizbaren Zweistoffdüse. Ein weiteres Upscaling bis zum kg Maßstab kann durch Umbau der Düsen erfolgen. Durch den variablen Aufbau der Apparatur und Einsatz von Einstoff- und Zweistoffdüsen kann die Partikelgrößenverteilung gezielt gesteuert werden. Der Einsatz einer Zweistoffdüse bietet die Möglichkeit 94% Partikel < 150 µm zu produzieren, eine Größe bis zu der eine schmerzfreie Applikation gewährleistet ist. Der Einfluss unterschiedlicher Parameter (Druck, Temperatur, Sprühdüsentyp und Sprühdüsenöffnung) auf die Partikelgrößenverteilungen wurde ermittelt.

Während der Optimierung des Herstellungsverfahrens wurden analytische Methoden für Modellsubstanzen etabliert, um die Stabilität der inkorporierten Wirkstoffe nach Herstellung und während der Freisetzungsdauer in Lipidsystemen zu untersuchen. Es wurden HPLC –, GFC –, HPLC – MS – Verfahren entwickelt, die in Kapitel II detailliert beschrieben sind. Mittels dieser Methoden wurde die Stabilität der Modellsubstanzen

Insulin und Somatostatin, wie in Kapitel II beschrieben, untersucht. Proteinbeladene Lipidmikropartikel wurden mit einer Einstoffdüse unter den optimalen Sprühbedingungen hergestellt und charakterisiert. Das Freisetzungsverhalten von Somatostatin und Insulin als Modellsubstanzen aus Lipidmikropartikeln wurde über eine Freisetzungsdauer von 2 Wochen untersucht (Kapitel III 3.4).

In der letzten Projektphase wurde zur Untersuchung der Verträglichkeit der Lipidmatrix und der Bioaktivität von freigesetztem Insulin ein insulinsensitives, dreidimensionales, bovines Chondrocyten- Zellkulturmodell für die Testung von Insulin-Lipidmatrixen verwendet (Kapitel III 3.5). Zusätzlich wurden Biokompatibilitätsstudien für die in vivo Verträglichkeit der verwendeten Triglyceride als Matrixmaterial inklusive Substanzen, die sich zur Steuerung des Freisetzungsverhaltens und der Abbaubarkeit einsetzen lassen, durchgeführt. Dabei erwies sich das Matrixmaterial Dynasan[®] 116 als biokompatibel. Zusätzlich ermöglichen diese Studien eine Aussage über Stabilität und Abbaubarkeit der eingesetzten Stoffe in vivo und einen Vergleich zu bioabbaubaren Polymeren (Kapitel IV).

Als Ergebnis dieses Projektes konnte ein stabiles und robustes Verfahren zur Herstellung von proteinhaltigen Lipidmikropartikeln, das zusätzlich upscale-bar ist, entwickelt werden. Damit lassen sich lösungsmittelfrei Lipidmikropartikel herstellen, die parenteral applizierbar sind und aus einer biokompatiblen Matrix bestehen. Die inkorporierten Wirkstoffe werden aus dem biokompatiblen System über einen Zeitraum von mindestens 2 Wochen kontrolliert freigegeben. Zusätzlich stabilisiert die Lipidmatrix die inkorporierten Wirkstoffe und verhindert deren Degradierung bzw. Inaktivierung. Die Ziele der Forschung wurden erreicht.

II Analytik

II.1. HPLC-Analytik

Die Untersuchungen wurden mit einem HPLC - System durchgeführt, das sich wie folgt zusammensetzte: Degasser (Fa. Knauer, Berlin, Deutschland), LC-10AT Pumpe, FCV-10AT_{VP} Gradientenmischer, SIL-10AD_{VP} Autosampler, CTO-6A Säulenofen, SPD-10AV UV-Detektor, RF-551 Fluoreszenz-Detektor und SCL-10A_{VP} Controller (alle Shimadzu, Duisburg, Deutschland). Für Somatostatin diente ein linearer Gradient von

26-39% Acetonitril in Wasser (+0,1% Trifluoressigsäure (TFA)) über 15 Minuten bei einer Flußrate von 1,0 ml/min als mobile Phase. 100 µl der Proben wurden bei 40°C unter Verwendung einer Kombination aus einer C18-reversed phase Vorsäule (LC318, 4,6 mm x 50 mm) und einer analytischen Säule (LC318, 4,6 mm x 250 mm) von Supelco (Deisenhofen, Deutschland) aufgetrennt. Die Chromatogramme wurden bei 210 nm (UV-Detektion) und 274 nm / 308 nm (Absorption / Emission) mittels Fluoreszenz - Detektor aufgezeichnet. Die Verfahren für EGF, Insulin und IGF unterschieden sich von dem für Somatostatin in der Zusammensetzung der mobilen Phase. Für EGF wurde ein linearer Gradient von 16-39% Acetonitril in Wasser (+0,1% TFA) über 20 Minuten verwendet. Bei Insulin und IGF lag der lineare Gradient im Bereich von 26-39% Acetonitril in Wasser (+0,1% TFA) über eine Dauer von 24 Minuten. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit konnten hier jeweils die gleichen Bedingungen gewählt werden (siehe Abbildung 1). Auch bei EGF, Insulin und IGF lag die Flußrate bei 1,0 ml/min. Von Dexamethason wurden ebenfalls Proben zu 100 µl bei einem Fluß von 1,0 ml/min analysiert. Hier wurde ein linearer Gradient von 10-22% Acetonitril in Wasser ohne Zusatz von TFA verwendet, die restlichen Parameter waren identisch. Die Verfahren wurden auf Linearität und Reproduzierbarkeit getestet. Bei allen Verfahren war die Reproduzierbarkeit und in den Konzentrationsbereichen von 4 bis 150 µg/ml die Linearität gegeben. Mittels dieser HPLC - Analytik war es möglich, die untersuchten Stoffe zu trennen, zu detektieren und quantitativ zu bestimmen.

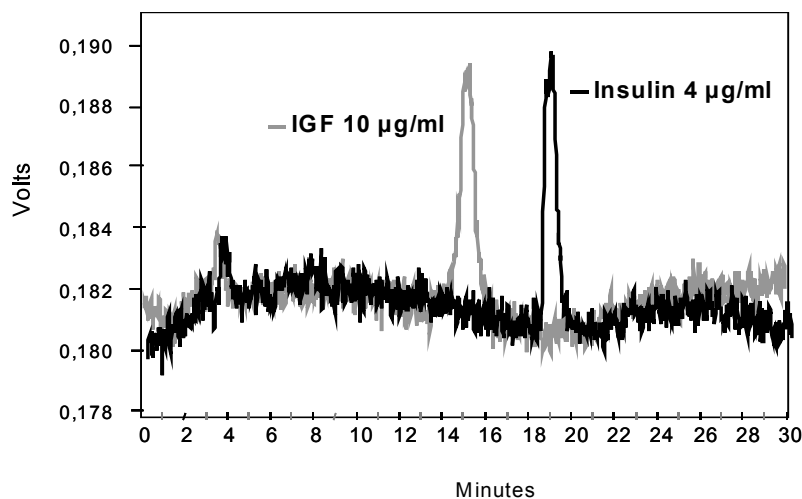


Abbildung 1: Chromatogramme einer IGF-Lösung (—) in 0,01N HCl der Konzentration 10 µg/ml und einer Insulin-Lösung (—) in 0,01N HCl (4 µg/ml).

II.2. GFC-Analytik

Ein analytisches Verfahren mittels Gelfiltrationschromatographie (GFC) wurde für Insulin entwickelt, um eine bessere Auftrennung von Stoffen unterschiedlicher Größe, aber ähnlichen Verhaltens gegenüber RP-18 Material zu erreichen. Als mobile Phase diente eine Mischung aus 90% 0,05 molarem Tris(hydroxyaminoethan) und 10% Acetonitril auf einer Shodex OHPak SB-802,5 HQ 8 mm x 300 mm Säule der Firma Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland). Die Messungen wurden isokratisch über 25 Minuten durchgeführt. Das Probenvolumen betrug 100 μ l, die Flußrate lag bei 0,8 ml/min und die Temperatur des Säulenofens betrug 40°C.

Mittels GFC war es z. Bsp. möglich ein in der Literatur [4] beschriebenes kovalentes Insulin-Dimer von Insulin zu trennen (siehe Abbildung 2).

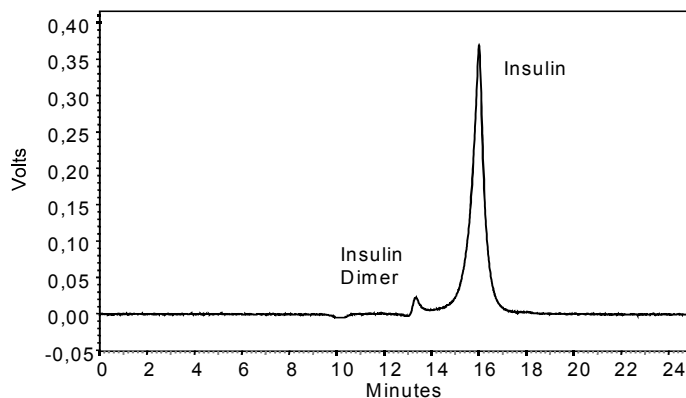


Abbildung 2: GFC-Chromatogramm einer Insulin-Lösung (150 μ g/ml) in isotonem Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,40.

II.3. Liquid chromatography - Mass spectrometry (LC-MS) - Analytik

Um über eine Möglichkeit zur Identifikation detektierter Stoffe zu verfügen wurden im Rahmen der analytischen Arbeiten auch Verfahren erprobt, die Substanzen mittels Massenspektrometrie gekoppelt an eine chromatographische Auftrennung zu untersuchen. Hierbei war es möglich, die Versuchsbedingungen der HPLC-Analytik zu übernehmen und bei der Säulentemperatur von 40°C mit den gleichen Gradienten zu arbeiten.

Das verwendete HPLC-System war ein Hewlett-Packard HPLC System der Serie 1100 mit Degasser, binärer Pumpe, Autosampler, Säulenofen und Diodenarraydetektor (alle

von Hewlett-Packard, Waldbronn, Deutschland), gekoppelt mit einem TSQ7000 electrospray-Massenspektrometer (ThermoQuest, San José, CA, USA) mit API2-Quelle (kapillare Temperatur: 350°C, Sprühspannung: 4,5 kV). Zur Auftrennung kam die Säulenkombination aus der HPLC-Analytik. zur Anwendung. Um die Daten auszuwerten wurde mit dem XCalibur[®] Software Paket (ThermoQuest, San José, CA, USA) gearbeitet. Es wurden die Totalionenströme der Proben aufgezeichnet. Die Substanzen wurden nach ihren individuellen Massenspektren charakterisiert.

Als Auszug der Ergebnisse zeigen die Abbildungen 3, 4 und 5 ein HPLC-MS Chromatogramm und die zugehörigen Totalionenströme des Massenspektrogramms von Somatostatin. Somatostatin ist bei einer Retentionszeit (RT) von 8,87 Minuten zu sehen, seine Deamidierungsprodukte (Hydrolyse des Asn-5) bei 8,56 und 9,59 Minuten. Dieser Unterschied in der Retentionszeit ist durch die Strukturisomerie von Asp und iso-Asp zu erklären, die bei der Deamidierungsreaktion entstehen können. In den Ellipsen sind die errechneten Massen dargestellt. Somatostatin bzw. seine Deamidierungsprodukte liegen bei der Detektion zweifach geladen vor.

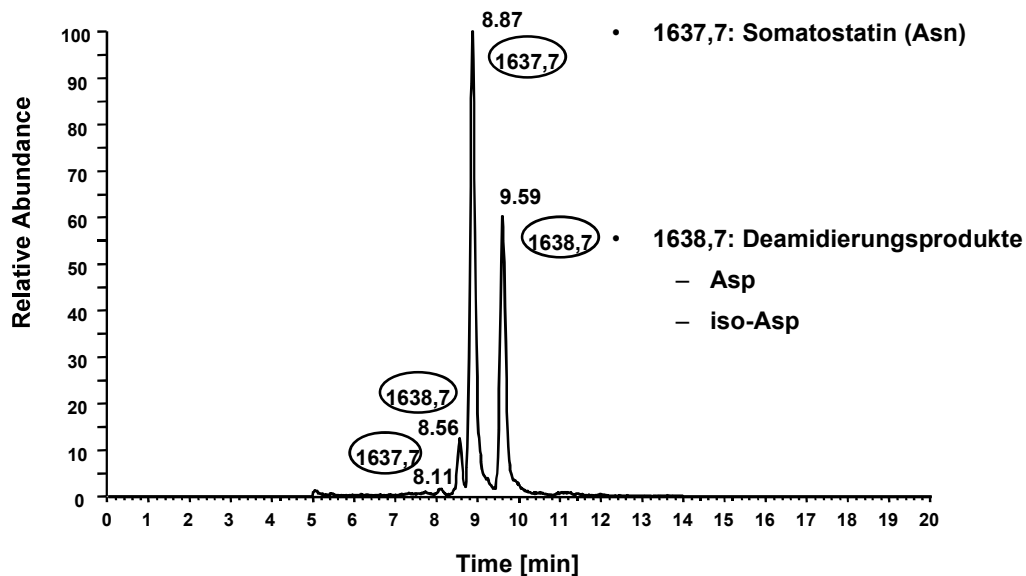


Abbildung 3: Chromatogramm der HPLC-MS Untersuchung einer Somatostatin-Lösung (150 µg/ml, Probenvolumen: 10 µl) in isotonem Phosphatpuffer.

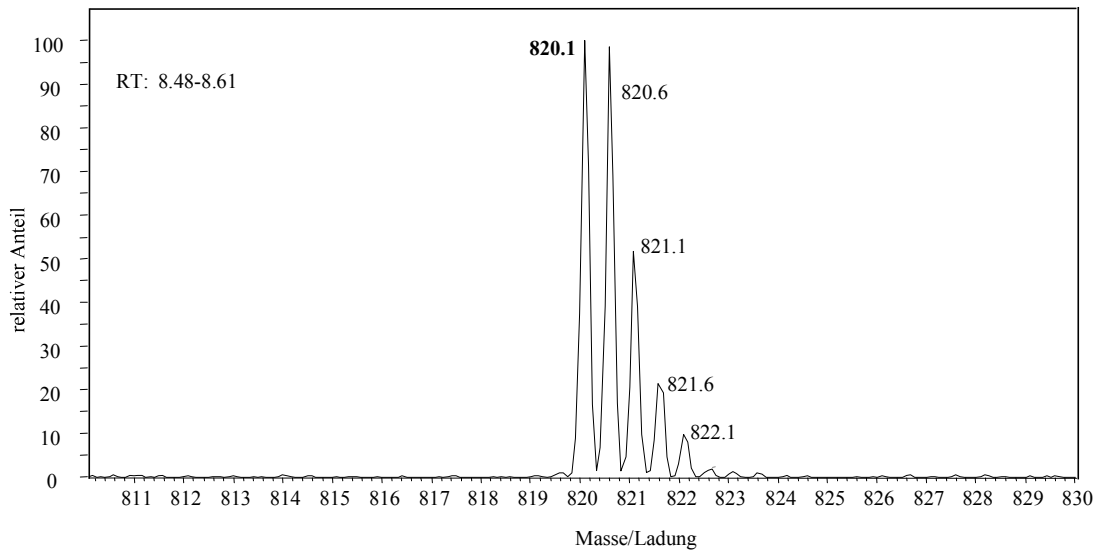


Abbildung 4: Totalionenstrom des Massenspektrogramms des deamidierten Somatostatins bei der Retentionszeit von 8,56 Minuten (siehe Abbildung 3).

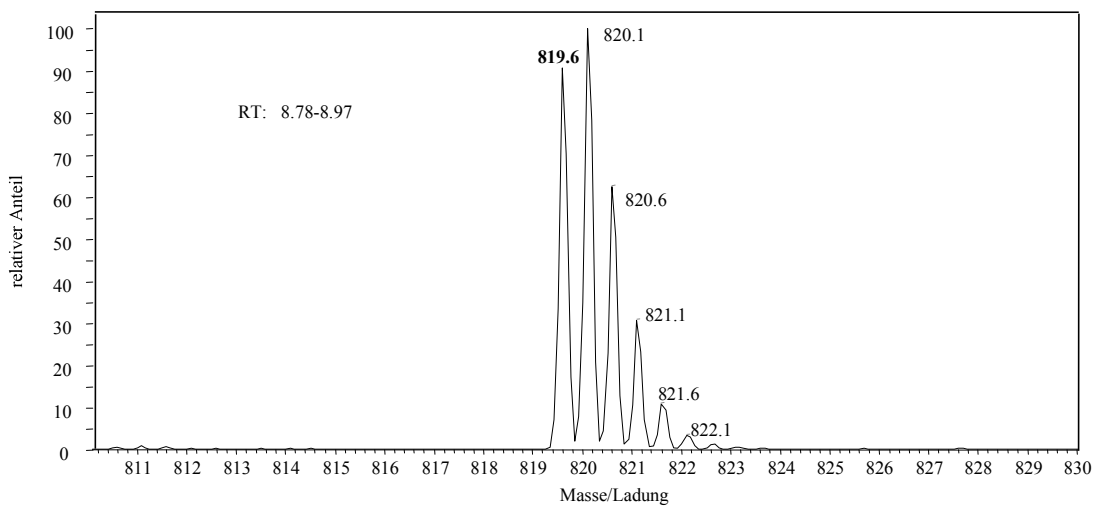


Abbildung 5: Totalionenstrom des Massenspektrogramms des Somatostatins (Peak bei Retentionszeit 8,87 min aus Abbildung 3).

II.4. Stabilitätsprüfung

II.4.1 Versuchsbeschreibung

Lösungen der Wirkstoffe Somatostatin und Insulin in isotonem Phosphat-Puffer (pH 7,4, Konzentration 150 µg/ml) wurden über 5 Wochen bei 37 °C statisch im Trockenschrank temperiert. Als Gefäße dienten 1 ml HPLC-Vials, die zu verschiedenen Zeitpunkten (siehe Abbildung 6) entnommen und bei –80°C eingefroren wurden. Nach Ablauf der gesamten Versuchsdauer wurden alle Proben zusammen mittels HPLC quantitativ untersucht. Bei ausgewählten Proben wurden auch HPLC-MS- Analysen durchgeführt (siehe Abb. 3 - 5, Punkt II.1.3)

II.4.2 Stabilität von Somatostatin und Insulin

Wie aus Abbildung 6 ersichtlich wird, blieb Insulin über ca. zwei Wochen stabil und liegt nach einem Zeitraum von 35 Tagen noch zu zwei Dritteln unverändert vor, wohingegen Somatostatin einem stetigen Abbau unterlag. Nach Ablauf der Versuchsdauer waren noch knapp über 40 % des eingesetzten Somatostatins stabil (siehe Abbildung 6). Über HPLC-MS wurde ermittelt, dass es sich bei dem Abbauprodukt um deamidiertes Somatostatin handelte (siehe Abbildungen 3 - 5). Dies wird noch durch die Reaktionskinetik unterstützt. Es handelt sich um eine Hydrolysereaktion mit einer Kinetik erster Ordnung. Bei Insulin war kein einheitlicher Abbau zu einem speziellen Abbauprodukt zu erkennen, vielmehr bildete sich eine Anzahl mehrerer kleiner Nebenpeaks (siehe Abbildung 7). Aufgrund dieser Ergebnisse und der Tatsache, dass Insulin unter in vitro Freisetzungsbedingungen (Schüttelwasserbad; 37°C) Aggregate bildet, war es nicht möglich, die Gehaltsbestimmung bei Freisetzungsversuchen aus dem Freisetzungsmedium durchzuführen. Deshalb wurden Verfahren zur Extraktion von Wirkstoffen aus Lipidmatrices entwickelt.

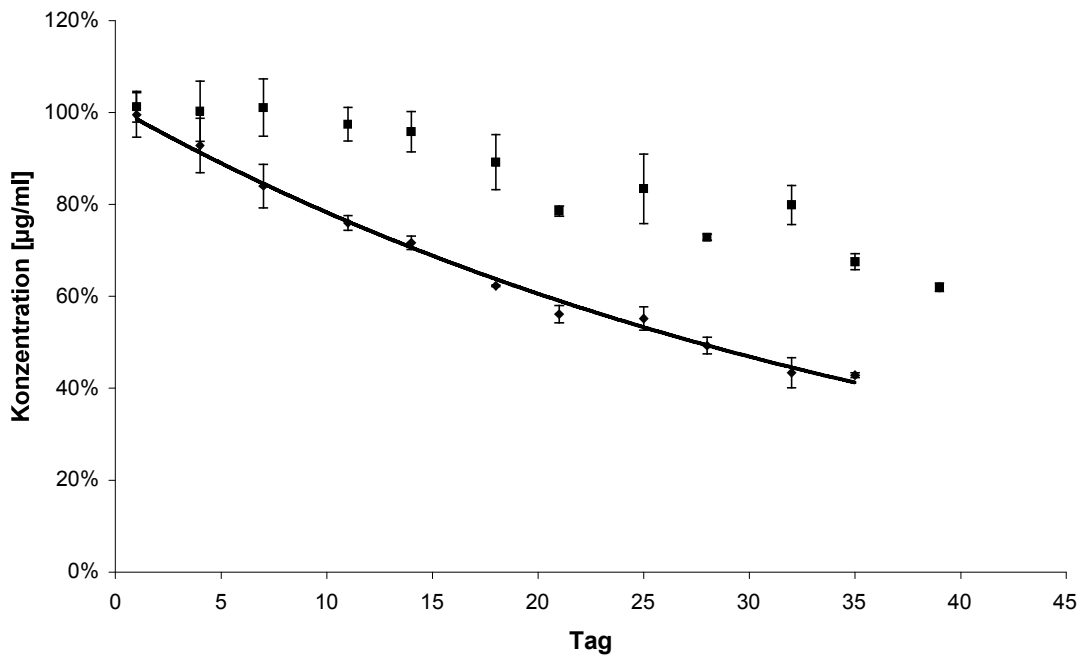


Abbildung 6: Stabilität von Insulin (■) und Somatostatin (◆, —) in isotonem Phosphatpuffer statisch bei pH 7,40 und 37°C. Ausgangskonzentration: 150 µg/ml.

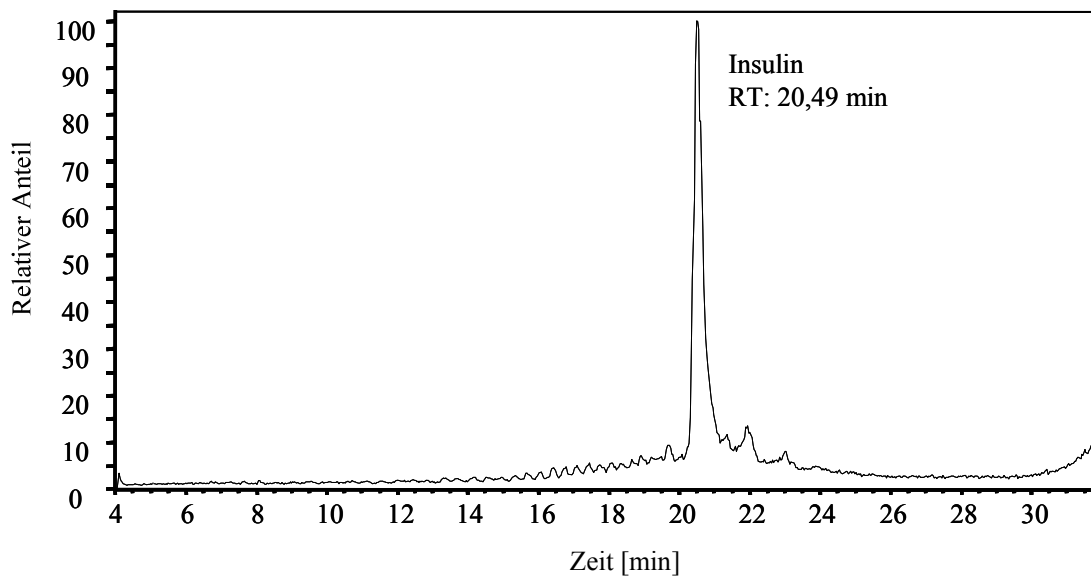


Abbildung 7: Chromatogramm einer Insulin- Lösung nach 35 Tagen statischer Temperierung bei 37°C in isotonem Phosphatpuffer mit pH 7,40.

II.5. Extraktion von Arzneistoffen aus Glyceroltripalmitat- Matrices

II.5.1 Methoden

Für diesen Versuch wurden Insulin und Somatostatin in Lipidmatrices eingearbeitet. Es wurden zwei unterschiedliche Verfahren entwickelt, die bei beiden Arzneistoffen anwendbar waren. Bei einer Extraktionsmethode wurde versucht ein einphasiges Verfahren zu entwickeln, in dem keine Phasengrenzen vorhanden sind, an denen die Proteinwirkstoffe denaturieren. Hierbei wurden ca. 5 mg der Probe genau in ein Eppendorf-Cup eingewogen. Nach Zugabe von 500 µl Tetrahydrofuran (THF) wurde kurz erwärmt (Wasserbad, 35°C) um das Lipid zu lösen. Anschließend wurde bei 13200 rpm zentrifugiert um die Sedimentation des Arzneistoffes zu erreichen. Nachdem 450 µl des Überstandes abpipettiert wurden, folgten zwei Waschschriffe mit 450 µl THF, nach denen jeweils zentrifugiert und anschließend wiederum 450 µl des erhaltenen Überstandes abpipettiert wurden. Das restliche Lösungsmittel wurde über Nacht im Exsikkator unter Vakuum entfernt. Der verbleibende Arzneistoff wurde in 1000 µl eines Gemisches aus H₂O und Acetonitril im Verhältnis 70,1 : 29,9 für Insulin und 67,4 : 32,6 für Somatostatin mit jeweils 0,1% TFA aufgenommen. Anschließend wurde sein Gehalt mittels HPLC bestimmt. Die Zusammensetzung dieses Gemisches entsprach der mobilen Phase zum Elutionszeitpunkt des jeweiligen Arzneistoffes in der HPLC-Analytik um beste Lösungseigenschaften zu erhalten.

Des weiteren wurde eine Zweiphasenmethode zur Extraktion der hydrophilen Wirkstoffe aus der Lipidgrundlage entwickelt. Wiederum wurden ca. 5 mg der zu extrahierenden Probe genau in ein Eppendorf-Cup eingewogen. Anschließend wurde die Probe mit 600µl Chloroform versetzt und danach mit 600µl 0,01N HCl überschichtet. Dieses Zweiphasensystem wurde zwei Mal auf einem Vortexmischer für 10 s durchmischt, wobei zwischen den Mischvorgängen eine Pause von 10 Minuten zur vollständigen Phasentrennung eingehalten wurde. Danach wurde die HCl-Phase abpipettiert und mittels HPLC-Analytik untersucht.

II.5.2 Ergebnis

Die erzielten Extraktionsquoten bei der einphasigen Extraktionsmethode betragen für Somatostatin 94,5 % mit einer Standardabweichung von 0,85 % und für Insulin 91,31%

mit einer Standardabweichung von 5,11 %. Die schnellere zweiphasige Extraktionsmethode lieferte für Insulin eine Extraktionsquote von 96,33 % mit einer Standardabweichung von 3,14 %. Somatostatin wurde mit einer Quote von 89,41 % und einer Standardabweichung von 5,91 % extrahiert. Mit diesen Methoden zur Extraktion der Wirkstoffe aus Dynasan® 116 stand ein Werkzeug zur Verfügung um Restgehaltsbestimmungen durchzuführen und somit auch Freigaben aus Lipidmatrices zu untersuchen.

III Entwicklung von Arzneistoffträgern aus Lipiden

Während der ersten Projektphase (8 Monate) wurde die Herstellung von Mikropartikeln durch das Sprüherstarrungsverfahren optimiert. Um Erkenntnisse über das Freisetzungsprofil von Peptiden aus Lipiden zu gewinnen, wurden Untersuchungen zum Freisetzungsmechanismus von Somatostatin und Insulin aus Lipidmatrices durchgeführt. Gleichzeitig wurden Experimente zur Steuerung der Freisetzung von Wirkstoffen durch ergänzenden Einsatz von Hilfsstoffen durchgeführt. In den folgenden Monaten wurde die Herstellung von proteinbeladenen Lipidmikropartikeln entwickelt und diese Partikel bezüglich Morphologie, Partikelgrößenverteilung und Freisetzungsverhalten untersucht.

III.1. Entwicklung von Verfahren zur Herstellung von Lipidmikropartikeln durch Sprüherstarrung

Die Herstellung von Lipidmikropartikeln kann mit unterschiedlichen Verfahren erfolgen: durch Schmelzdispersionsverfahren, Lösungsmittelverdampfungsverfahren oder Sprüherstarrung. Allen Methoden ist gemein, dass der Wirkstoff entweder als Lösung oder als Feststoff in der Lipidphase dispergiert werden kann [2].

Sprüherstarrungsverfahren bieten die Möglichkeit, Mikropartikel ohne Einsatz von organischen Lösungsmitteln herzustellen und den Einsatz von Emulsionsstabilisatoren zu vermeiden. So können gemäß ICH- Richtlinien biokompatible Mikropartikel für die parenterale Anwendung erhalten werden. Gleichzeitig kann die Stabilität des Wirkstoffs während des Herstellungsprozesses durch Vermeidung von flüssig/flüssig Grenzflächen, die zur Denaturierung bzw. Inaktivierung von Peptiden und Proteinen führen können, erhöht werden. Deshalb wurde in diesem Projekt die Sprüherstarrungsmethode als Herstellungsmethode gewählt und optimiert.

III.1.1 Sprüherstarrungsverfahren

Zur Herstellung von Lipidmikropartikeln durch Sprüherstarrung wurde die entsprechende Modellsubstanz in einer Lipidschmelze als Feststoff oder Lösung dispergiert und die Zubereitung anschließend unter Druck in einen Sprühturm versprüht (siehe Abbildung 8). Die flüssigen Lipidtröpfchen konnten in der Trockenkammer abkühlen und erstarren. Die Mikropartikel konnten in den Auffanggefäßen gesammelt werden.

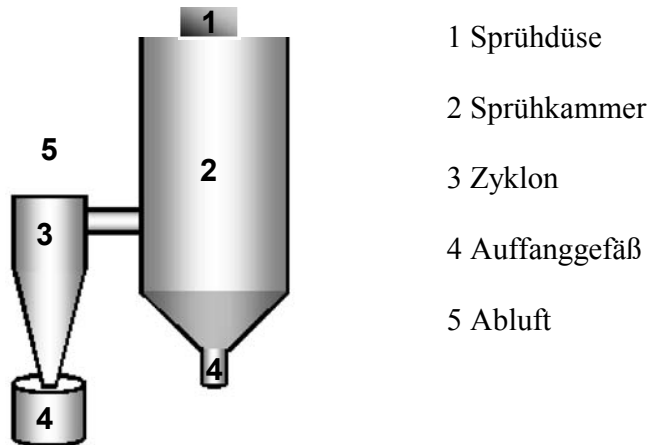


Abbildung 8: Sprühtrocknungsapparatur aus Komponenten eines Mini-Spray-Dryers von Büchi

III.1.2 Aufbau einer Sprüherstarrungsapparatur

Bei der Untersuchung des Herstellungsvorgangs von wirkstofffreien Lipidmikropartikeln aus Glyceroltripalmitat (Dynasan[®] 116) mit der Sprüherstarrungsapparatur, die baugleich mit einem Büchi Mini-Spray-Dryer war (Abbildung 8), stellte sich als ein wesentlicher Nachteil heraus, dass ein Großteil des eingesetzten Lipids erst an der Innenwand des Gefäßes erstarrte. Deshalb konnte nur eine Ausbeute von 25% an Lipidmikropartikeln im Verhältnis zur eingesetzten Lipidmenge gewonnen werden. Um eine hohe Effizienz des Herstellungsprozesses zu gewährleisten wurde deshalb eine optimierte Apparatur entwickelt. Die Apparatur wurde dahin gehend verändert, dass die Fallstrecke der Lipidtröpfchen durch ein auf die Trockenkammer aufgesetztes Fallrohr (Plastik; 140 cm) verlängert wurde. Das Resultat des Tests dieser modifizierten Apparatur zeigte jedoch, dass keine wesentliche Verbesserung des Sprühvorgangs erreicht werden konnte. Die Länge der Kühlstrecke reichte zwar zur Abkühlung der Partikel aus; allerdings konnte sich der Sprühkegel der Lipidtröpfchen nicht ausreichend ausbreiten, und nicht erstarrte Lipidtröpfchen schieden sich weiterhin an der Seitenwand des Fallrohrs ab.

Um die Erstarrung der Partikel zu beschleunigen wurde deshalb eine zusätzliche Luftkühlung integriert. Der Vorteil einer zusätzlichen Kühlung der Partikel zeigte sich beim Sprühen einer Lipidschmelze in flüssigen Stickstoff (Abbildung 9). Die Ausbeute an Mikropartikeln lag bei 80%. Allerdings waren die hergestellten Partikel nicht einheitlich rund geformt, sondern wiesen Kanten und Ecken eines im Fluge erstarrten Tropfens auf. Da Ecken und Kanten bevorzugte Angriffspunkte für Erosionsvorgänge sind, könnte diese Morphologie zu einem beschleunigten Abbau und einer schnellen Wirkstofffreigabe führen (Abbildung 10). Als weiterer Nachteil dieses Verfahrens ist der Kontakt der Lipidschmelze mit flüssigem Stickstoff zu nennen, der eine industrielle Nutzung dieses Verfahrens für die sterile Herstellung von Lipidmikropartikeln zur parenteralen Anwendung erschwert.

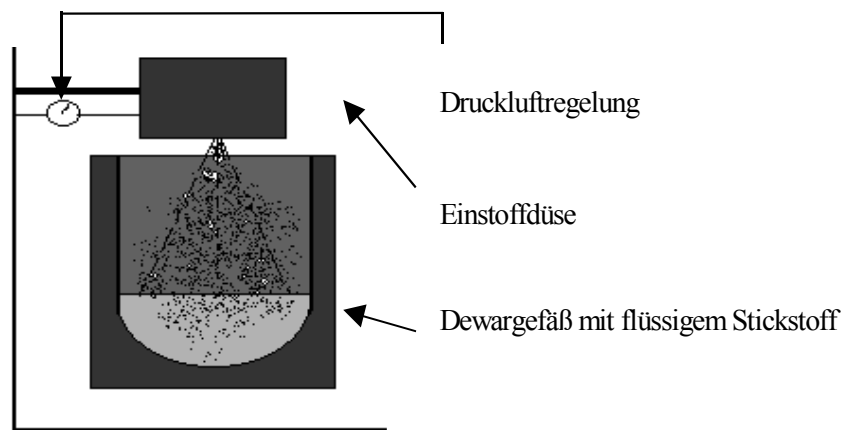


Abbildung 9: Apparatur zur Herstellung von Lipidmikropartikeln durch Sprühung in flüssigen Stickstoff.

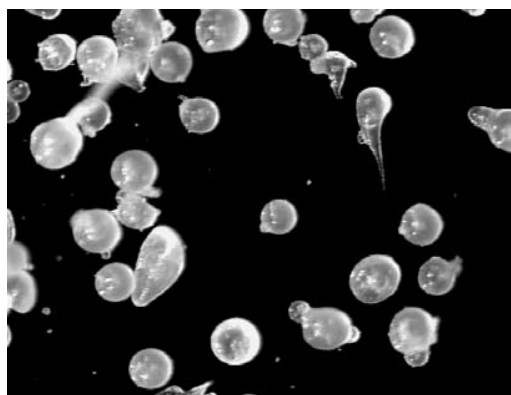


Abbildung 10: Durch Sprühung in flüssigen Stickstoff hergestellte Lipidmikropartikel.

Um dieses Problem zu umgehen, wurde die Sprüherstarrungsapparatur mit einer zusätzlichen Kühlung ausgestattet (Abbildung 11). Dazu wurde die Apparatur mit 4 Luftdüsen neben der Einstoffsprühdüse versehen. Die Lufttemperatur konnte durch eine externe Kühlung mit flüssigem Stickstoff auf -80°C gesenkt werden. Dies führte zu einer schnellen Erstarrung der Partikel in der Sprüherstarrungsapparatur und gleichzeitig wurde der Kontakt der Mikropartikel mit der Apparaturinnenwand durch einen kontinuierlichen Luftstrom minimiert. Um eine vollständige Expansion des Sprühkegels in der Apparatur zu gewährleisten, wurde das Fallrohr von 10 auf 15 cm Durchmesser verbreitert.

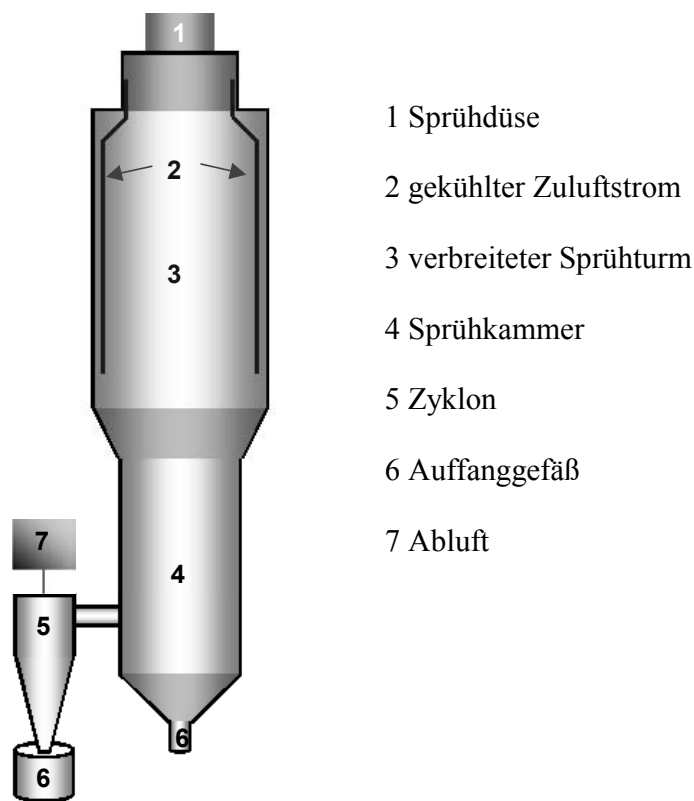


Abbildung 11: Modifizierte Sprüherstarrungsapparatur mit zusätzlichem Fallrohr und Luftkühlung

Der Erfolg dieser Umbaumaßnahmen spiegelt sich in einem stabilem Sprühvorgang und einer hohen Ausbeute an Mikropartikeln wieder. Die prozentuale Ausbeute konnte von 25% in der ursprünglichen Apparatur auf 69% erhöht werden.

III.1.3 Herstellung mit der Einstoffdüse

Für die Herstellung der Lipidmikropartikel durch Sprüherstarrung wurde am Lehrstuhl eine spezielle beheizbare Einstoffdüse mit integriertem Vorratsgefäß entwickelt und gebaut (Abbildung 12). Diese Düse wurde für die zuvor genannten Versuche eingesetzt. Die zu versprühende Lipidschmelze wird in eine beheizbare Druckkammer gefüllt. Die Schmelze wird durch Druckluft versprüht. Aufgrund der variablen Bauweise kann die Düse durch Austauschen der Sprühdüsenöffnung (Durchmesser von 0,5; 0,3 und 0,2 mm) schnell umgebaut werden.

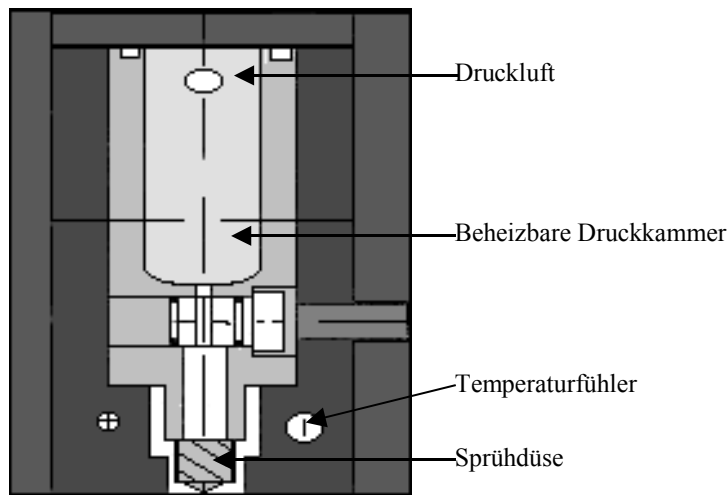


Abbildung 12: Beheizbare Einstoffdüse

III.1.4 Herstellung mit Zweistoffdüse

Neben Einstoffdüsen können auch Zweistoffdüsen für die Sprüherstarrung eingesetzt werden. Zweistoffdüsen weisen einige Vorteile auf: Flüssigkeiten können mit hoher Durchsatzmenge versprüht werden. Da die Zerstäubungsluft mit geringem Druck der Düse zugeführt wird, verlängern sich die Sprühzeiten. Mit einer Luftkappe kann der Sprühkegeldurchmesser eingestellt werden und es resultiert eine kleinere und schmalere Partikelgrößenverteilung. Deshalb wurde eine Apparatur mit beheizbarer Zweistoffdüse und integriertem Vorratsbehälter entwickelt, die in die Sprüherstarrungsapparatur eingebaut werden kann (Abbildung 13, 14). Die Verwendung der Zweistoffdüse erhöht zudem die Ausbeute an Lipidmikropartikeln bezüglich eingesetzten Lipids auf 88%.

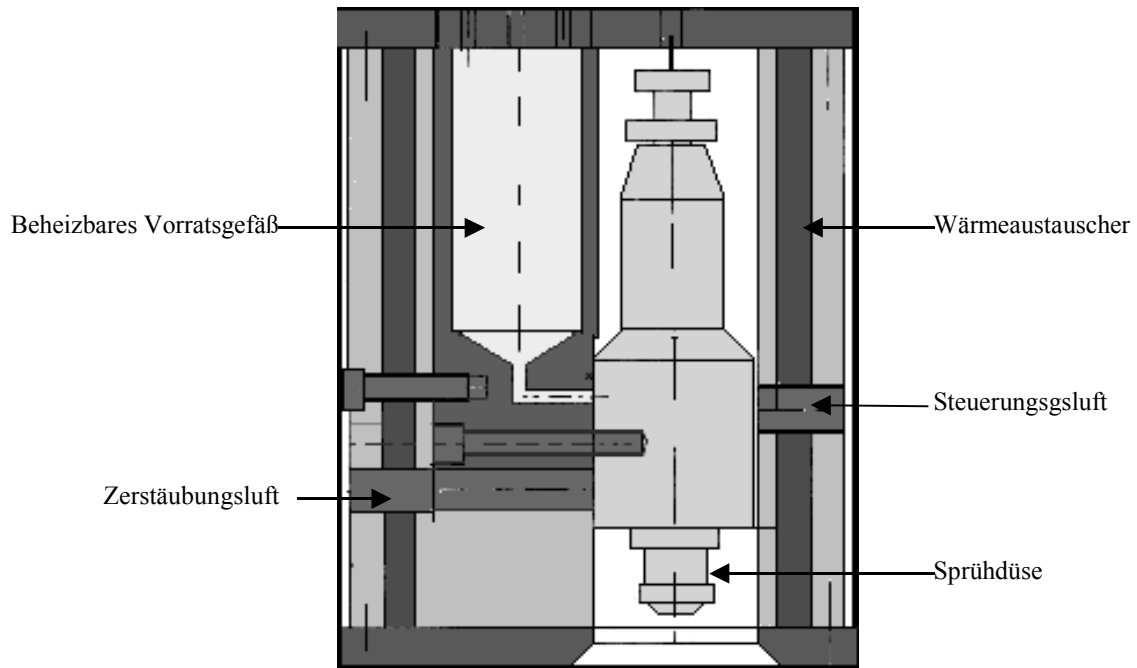


Abbildung 13: schematische Zeichnung einer heizbaren Zweistoffdüse

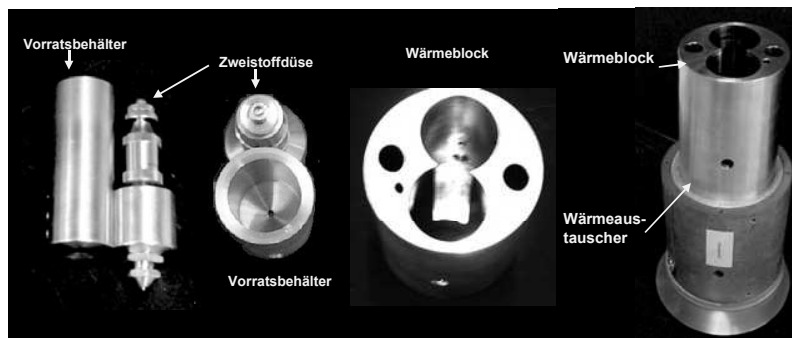


Abbildung 14: Beheizbare Zweistoffdüse

III.1.5 Upscaling

Die Entwicklung der Sprüherstarrungsapparatur wurde im Hinblick auf ein upscale-bares Verfahren für die Herstellung von Lipidmikropartikeln im industriellen Maßstab entwickelt. Im Labormaßstab können mit der modifizierten Sprüherstarrungsapparatur und Einsatz der beheizbaren Zweistoffdüse ca. 20 g Lipidmikropartikel durch eine Sprüherstellung hergestellt werden. Durch Austauschen des Vorratsgefäßes kann die Ansatzmenge beliebig erhöht werden. Ein Umbau der Apparatur für die Herstellung von Lipidmikropartikeln im Großmaßstab kann durch den variablen Aufbau ohne größeren

Aufwand erfolgen. Die Herstellung eines Prototyps der Sprühapparatur in Edelstahl würde eine sterile Herstellung der Partikel in industriellem Kleinmaßstab ermöglichen.

III.2. Charakterisierung von Lipidmikropartikeln

III.2.1 Partikelgrößenverteilung

Die Partikelgrößenverteilung ist ein wichtiges Charakteristikum einer partikulären Arzneiform, da sie sowohl die Wirkstofffreigabe als auch die parenterale Applizierbarkeit beeinflusst. Die Freigabe der Wirkstoffe aus Mikropartikeln wird neben Hilfsstoffen und Trägersubstanzen durch die Partikelgröße gesteuert, da die Oberfläche der Partikel bei einer kleinen Veränderung des Partikelradius überproportional zunehmen kann. Für die schmerzfreie parenterale Applikation von Mikropartikeln ist ein Partikeldurchmesser $< 150 \mu\text{m}$ notwendig. Deshalb wurden die Parameter, die die Partikelgrößenverteilung bei der Herstellung der Lipidmikropartikel beeinflussen, detailliert untersucht.

III.2.1.1 Einfluss von Druck, Sprühdüsenöffnung und Sprühtemperatur auf Partikelgrößenverteilung bei Sprühung mit der Einstoffdüse

Das Tropfenspektrum einer Einstoffdüse ist abhängig von Düsenöffnung, Sprühdruck und der Viskosität der zu versprühenden Flüssigkeit [5]. Deshalb wurde die Veränderung der Partikelgrößenverteilung durch Variation des Sprühdrucks, der Sprühtemperatur und der Sprühdüsenöffnung untersucht. Um den Einfluss von verschiedenen Herstellungsparametern auf die Partikelgrößenverteilung zu untersuchen, wurden mit der beheizbaren Einstoffdüse wirkstofffreie Triglyceridpartikel durch Sprüherstarrung hergestellt. Die Partikelgrößenverteilung der einzelnen Mikropartikelchargen wurde durch Siebanalyse bestimmt. Eine wichtige Kenngröße ist hierbei der prozentuale Anteil an Partikeln $< 150 \mu\text{m}$, um eine schmerzfreie parenterale Applikation der Lipidmikropartikel zu gewährleisten. Der Einfluss des Sprühdrucks und der Sprühdüsenöffnung auf die Partikelgrößenverteilung lässt sich aus Abbildung 15 anhand des prozentualen Anteils der Mikropartikel $< 150 \mu\text{m}$ an der Gesamtmasse der Mikropartikel ablesen.

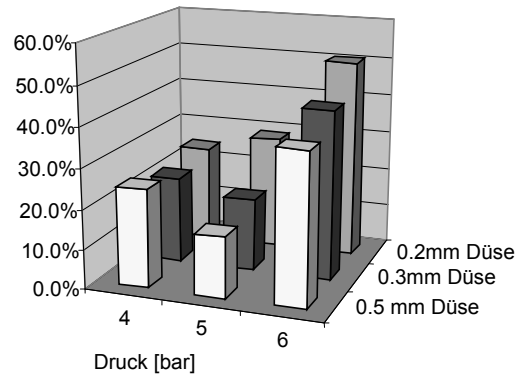


Abbildung 15: Einfluss von Druck und Sprühdüsenöffnung auf prozentualen Anteil von Lipidmikropartikeln < 150 µm (Sprüfung in flüssigen Stickstoff).

Bei Erhöhung des Druckes von 5 auf 6 bar verschiebt sich das Tropfenspektrum der Düse deutlich zu kleineren Partikeldurchmessern. Der gleiche Effekt wird bei diesen Drücken durch eine Verkleinerung der Düsenöffnung erreicht. Dagegen ist bei einem Sprühdruk von 4 bar kein deutlicher Effekt zu beobachten. Neben Sprühdruk beeinflusst die Viskosität der zu versprühenden Flüssigkeit wesentlich das Tropfenspektrum. Um den Einfluss der Temperatur auf die Viskosität der Lipidschmelze zu bestimmen wurde die Viskosität von Dynasan® 116 bei unterschiedlichen Temperaturen bestimmt. Die mit steigender Temperatur zu beobachtende Viskositätserniedrigung (Abbildung 16) schlägt sich in der Partikelgrößenverteilung nieder (Abbildung 17).

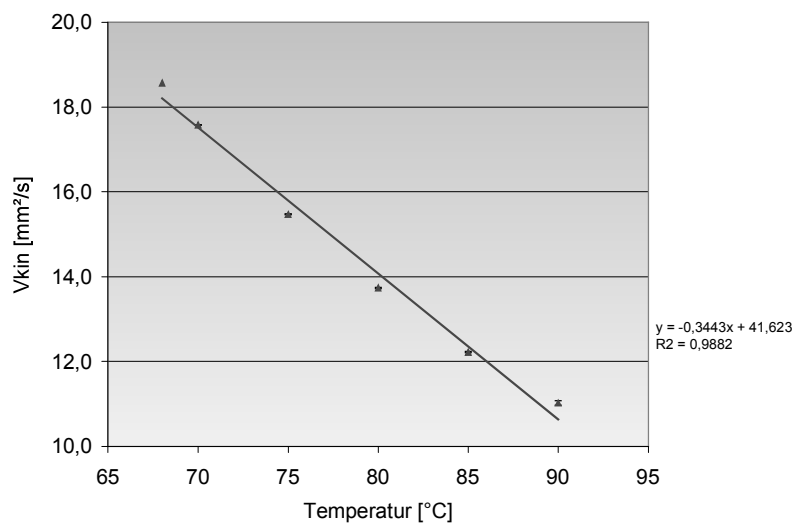


Abbildung 16: Kinematische Viskosität von Dynasan® 116 in Abhängigkeit von der Temperatur.

Bei einer Temperaturerhöhung von 70 auf 80°C kann eine Zunahme an Partikeln < 150 µm von 30% auf 56,01% beobachtet werden (Abbildung 17).

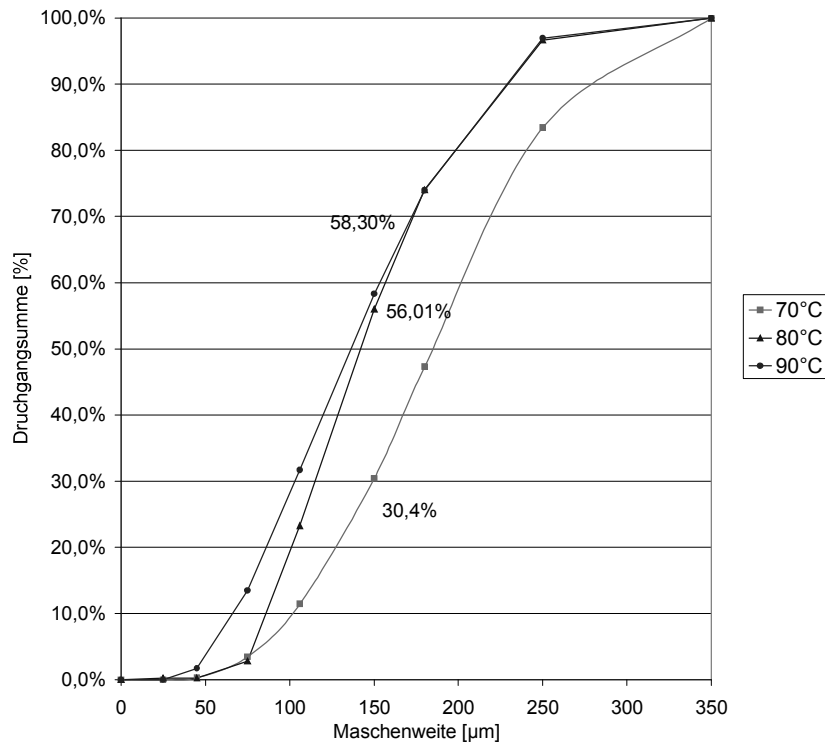


Abbildung 17: Einfluss der Temperatur auf die Partikelgrößenverteilung von Lipidmikropartikeln, die durch Sprühung mittels Einstoffdüse 0,2mm und 6 bar Sprühdruk in die modifizierte Sprüherstarrungsapparatur hergestellt wurden.

III.2.1.2 Vergleich Einstoffdüse - Zweistoffdüse bzgl. Partikelgrößenverteilung

Da eine weitere entscheidende Reduktion der Partikelgröße mit der vorliegenden modifizierten Einstoffdüse sich als nicht möglich erwies, wurde Dynasan[®] 116 bei 70°C mit einer Zweistoffdüse in die modifizierte Sprüherstarrungsapparatur gesprüht. Die Partikelgrößen wurden nach Dispergierung in Ethanol / Wassergemisch mittels Coulter Counter analysiert. Die erhaltenen Partikel weisen im Vergleich zu Mikropartikeln, die mit einer Einstoffdüse (0,5mm; 6 bar Sprühdruk) hergestellt wurden, eine engere Größenverteilung auf, die deutlich zu kleineren Durchmessern verschoben ist (Abbildung 18). Durch den Einbau der Zweistoffdüse (0,8 mm Durchmesser; 1bar Sprühdruk) in die Sprüherstarrungsapparatur konnte der Anteil an Partikeln < 150 µm von 30,41% auf 88,5% erhöht werden. Zusätzlich erlaubt der Einsatz

einer Düsenöffnung von 0,5 mm eine weitere Reduktion der Partikeldurchmesser und Erhöhung des Anteils an Partikeln $< 150\mu\text{m}$ auf 94,2 %.

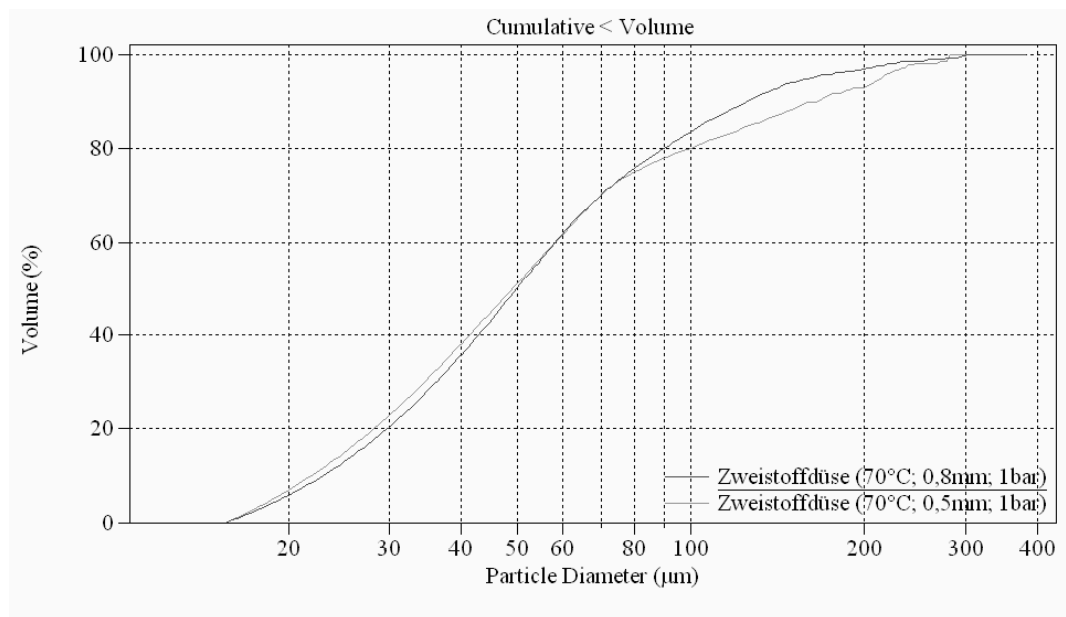


Abbildung 18: Einfluss der Düsenöffnung einer Zweistoffdüse auf die Partikelgrößenverteilung

III.2.2 Morphologie der Lipidmikropartikel

Die Morphologie von Lipidmikropartikeln wurde mit einem Rasterelektronenmikroskop nach Gold/Palladium-Beschichtung untersucht. Mikropartikel, die durch Lösungsmittelverdampfungsverfahren hergestellt werden, weisen eine glatte poröse Oberfläche auf. Die Herstellung von Partikeln durch Schmelzdispersion ergibt Partikel mit einer glatten Oberfläche [2]. Im Vergleich dazu weisen Partikel, die durch Sprüherstarrung und gleichzeitige Kühlung der Sprüherstarrungsapparatur hergestellt werden, eine faserige Struktur auf (Abbildung 19). Dieser Effekt verstärkt sich, sobald bei der Herstellung die Einstoffdüse gegen eine Zweistoffdüse ausgetauscht wird (Abbildung 20).

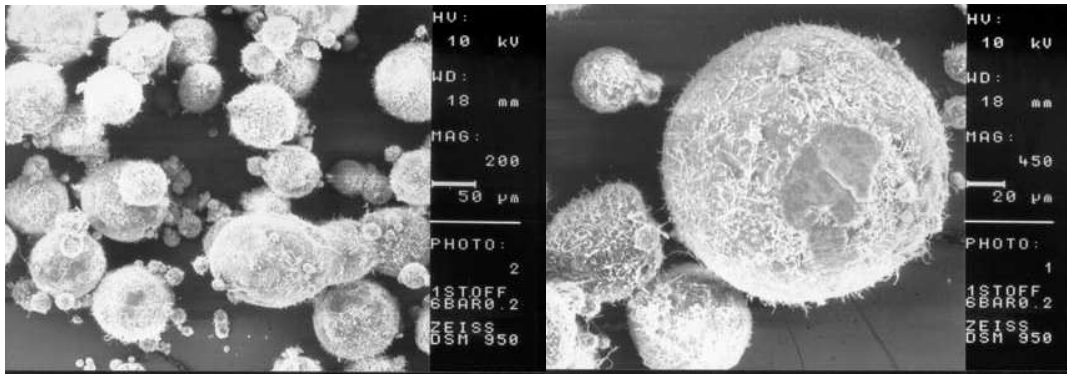


Abbildung 19: SEM-Aufnahmen von Lipidmikropartikeln, die mit einer Einstoffdüse 0.2 mm durch Versprühung einer Lipidschmelze bei 70°C und 6 bar hergestellt wurden.

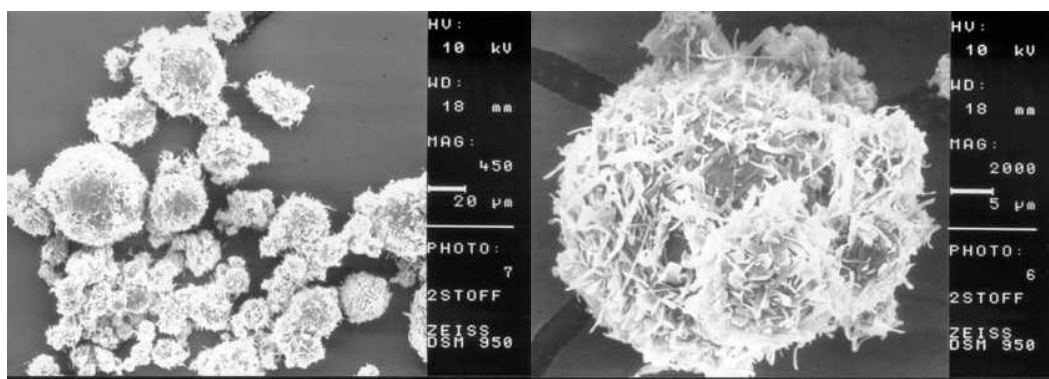


Abbildung 20: SEM-Aufnahmen von Lipidmikropartikeln, die mit einer Zweistoffdüse 0.8 mm durch Versprühung einer Lipidschmelze bei 70°C und 1 bar hergestellt wurden.

III.2.3 Kristallinität der Mikropartikel

Neben der Partikelgröße wurde bei der Herstellung auch die Kristallinität des Lipids beeinflusst. Polymorphes Verhalten von Triglyceriden wird von mehreren Autoren beschrieben [6]. Bei Triglyceriden können 3 verschiedene Modifikationen auftreten: eine α - , β' - und β - Modifikation. Die α - Modifikation stellt aufgrund der hexagonalen Molekülpackung und der damit verbundenen Rotationsmöglichkeit der Moleküle die thermodynamisch instabilste Modifikation dar. Veränderungen in der Modifikation des Lipids können zu einer Schwankung des Freigabeverhaltens und damit zu einer veränderten Bioverfügbarkeit des inkorporierten Wirkstoffes oder zur Expulsion von Wirkstoffen aus der Lipidmatrix führen. Deshalb ist es wichtig, den Einfluss der Herstellung auf die Kristallmodifikation der Lipidmikropartikel zu untersuchen.

Dynasan[®] 116 liegt in der reinen β - Modifikation vor. Bei der Sprühung der Lipidschmelze erstarrten die Partikel in unterschiedlichen Modifikationen. Der Anteil an instabiler α - Modifikation erhöhte sich, je schneller die Partikel abgekühlt wurden. Dieser Einfluss ließ sich in Thermogrammen der Lipidmikropartikel, die mittels Differential Scanning Calorimetry aufgenommen wurden, erkennen (Abbildung 21).

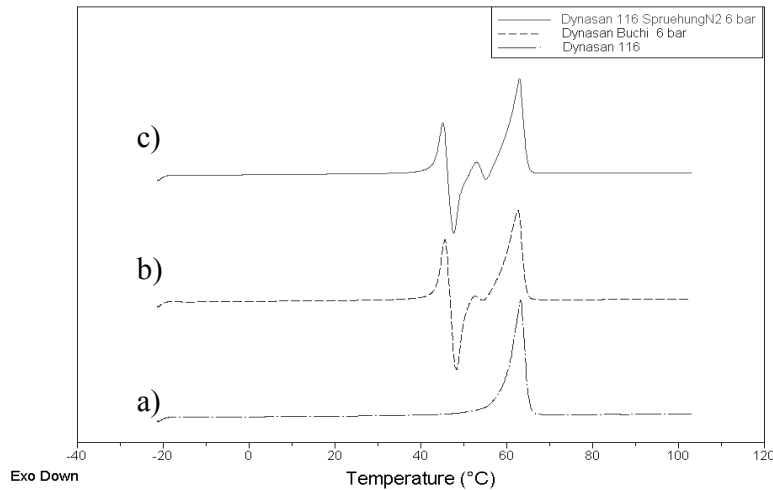


Abbildung 21: DSC-Thermogramme

- a) Dynasan[®] 116 unbehandelt
- b) Lipidmikropartikel hergestellt durch Sprühung in modifizierte Sprüherstarrungsapparatur
- c) Lipidmikropartikel aus Dynasan[®] 116 hergestellt durch Sprühung in flüssigen Stickstoff

Die Schmelzkurve des unbehandelten Dynasans zeigte einen definierten Schmelzpeak der β - Modifikation. Des weiteren wurden Thermogramme von Lipidmikropartikeln aufgenommen, die ohne zusätzliche Kühlung hergestellt bzw. direkt in flüssigen Stickstoff gesprüht wurden. Obwohl die Lipidtröpfchen durch rasches Abkühlen in der α - Modifikation auskristallisierten, konnte kein Einfluss auf die Wirkstoffinkorporation und -freigabe festgestellt werden (siehe Kapitel III.3.4).

III.3. Freisetzungsforschungen von wirkstoffhaltigen Lipidmatrices

III.3.1 Freisetzung von Peptiden aus Lipidmatrices

Die Freigabe eines Wirkstoffes aus Mikropartikeln ist stark abhängig von der Partikelgröße bzw. der zur Verfügung stehenden Grenzfläche zwischen Lipid und

Freisetzungsmatrix. Um Erkenntnisse über das Freisetzungsprofil und den Freisetzungsmechanismus unabhängig von der Partikelgrößenverteilung zu erhalten und entsprechende Dosisanpassungen vornehmen zu können wurden zylindrische Presslinge (2 x 2 mm) aus Insulin bzw. Somatostatin und Dynasan® 116 Mischungen hergestellt. Die Freisetzung von Insulin (1%) und Somatostatin (1%) aus der Lipidmatrix in Phosphatpuffer pH 7,4 bei 37 °C wurde über einen Zeitraum von 2 Monaten untersucht. Es wurde jeweils der Restgehalt des eingesetzten Proteins in den Lipidmatrices bestimmt (Abbildung 22).

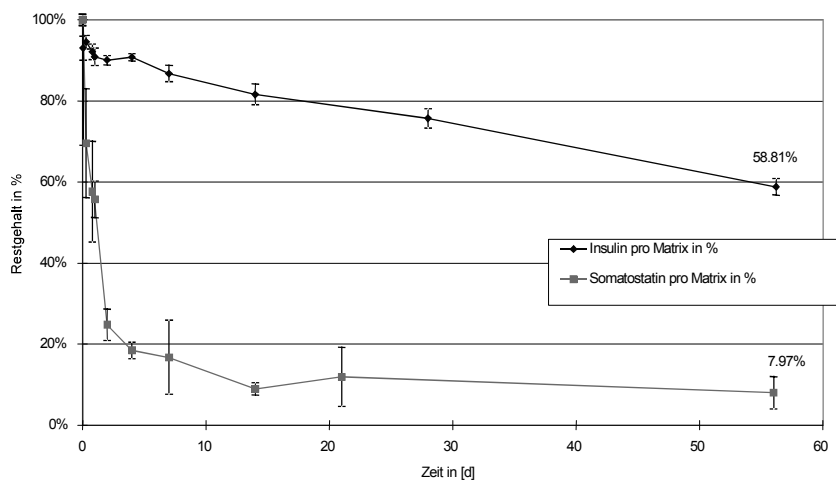


Abbildung 22: Freisetzung von Insulin und Somatostatin aus Lipidmatrices (Dynasan®116) über 2 Monate [7].

Innerhalb von 2 Monaten wurden 41,19 % Insulin bzw. 92,03% Somatostatin freigegeben. Insulin und Somatostatin blieben über 2 Monate stabil; es konnten keine Abbauprodukte in der HPLC-MS detektiert werden.

III.3.2 Freisetzungsmechanismus

Eine nähere Analyse der Freisetzungsprofile von Insulin und Somatostatin aus Lipidmatrices spricht für einen diffusionskontrollierten Freisetzungsmechanismus. SEM-Aufnahmen von wirkstoffbeladenen Matrices, die 2 Monate inkubiert waren, belegen diese Annahme. Die Lipidmatrices zeigten eine geringfügige Porenbildung (siehe Abbildung 23 und 24). An den Kanten der Matrices konnte Erosion des Trägermaterials beobachtet werden, die wahrscheinlich aus der mechanischen Belastung der Matrices während der Freisetzung resultiert, da in den Querschnitten der Matrices keine weiteren

Anhaltspunkte für eine Veränderung der inneren Struktur detektiert werden konnten (reine Dynasan® - Matrices hingegen wiesen eine glatte Oberfläche auf).

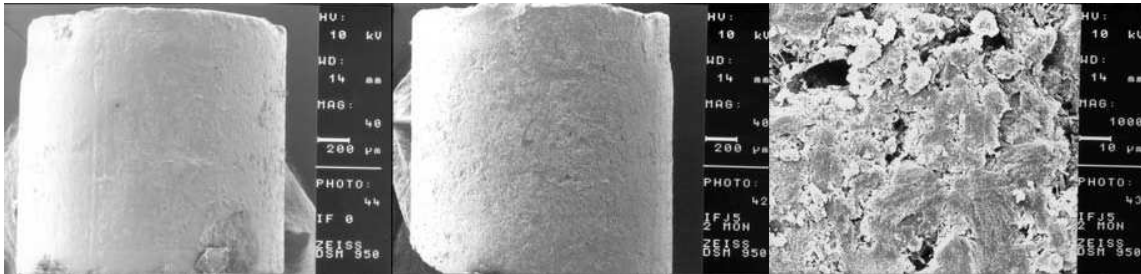


Abbildung 23: 1% Insulin-Lipidmatrix vor Inkubation (links)
1% Insulin-Lipidmatrix nach 2 Monaten Inkubation (Mitte); Detailansicht (rechts)

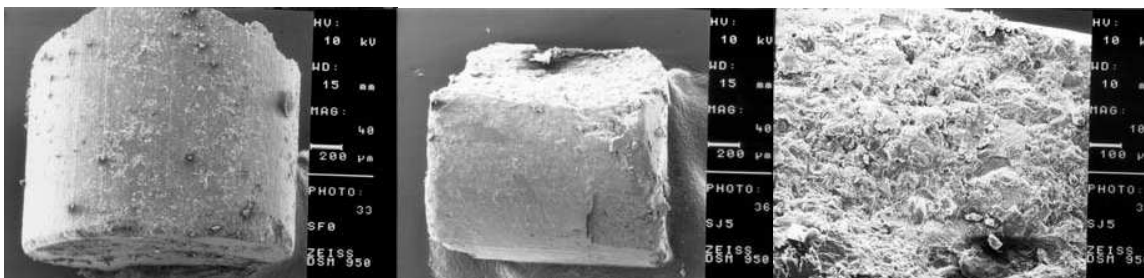


Abbildung 24: 1% Somatostatin-Lipidmatrix vor Inkubation (links)
1% Somatostatin-Lipidmatrix nach 2 Monaten Inkubation (Mitte); Detailansicht (rechts)

Neben Diffusion können auch weitere charakteristische Eigenschaften des Trägermaterials wie Kristallinität und Hydrophilie die Freisetzungsdauer von Proteinen aus der Matrix beeinflussen. Durch Spincasting wurden Lipid- bzw Polymerfilme aus Dynasan® 116, PLGA bzw PLA hergestellt und mit definierten Volumina Proteinlösungen für 30 min inkubiert, anschließend gewaschen und gefriergetrocknet. Die Spektren der vermessenen Filme wurden auf Auftreten eines Stickstoffsignals bei 380-420 eV untersucht, da bei den eingesetzten reinen Trägermaterialien, die keinen Stickstoff enthalten, nur Sauerstoff- und Kohlenstoffsignale detektiert werden. Tritt ein zusätzliches Stickstoffsignal auf, wurde dieses nur durch stickstoffhaltige adsorbierte Proteine verursacht.

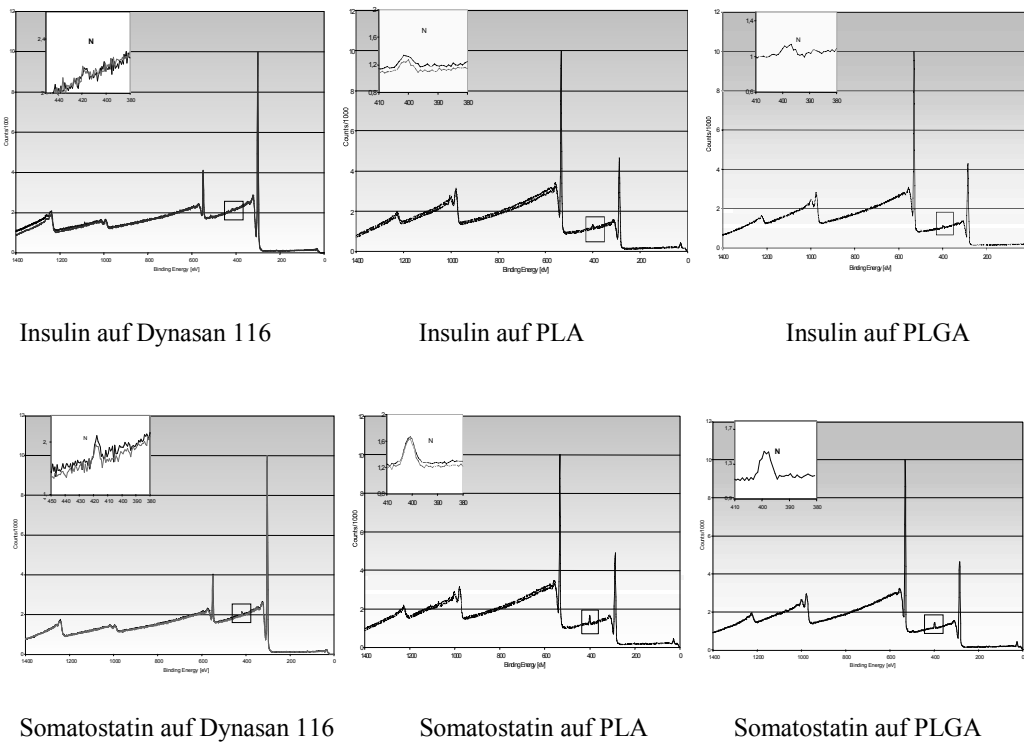


Abbildung 25: ESCA-Diagramme von Dynasan® 116 bzw. Polymerfilmen, die 30 min mit 200µl einer Insulin- oder Somatostatinlösung inkubiert wurden.

Sowohl Insulin, als auch Somatostatin adsorbieren auf Dynasan 116 (siehe Abbildung 25). Im Vergleich zu den gängigen bioabbaubaren Trägermaterialien, PLA und PLGA, fällt die Adsorptionstendenz von Insulin und Somatostatin auf Dynasan deutlich geringer aus. Dies kann durch eine Veränderung der Intensität des Stickstoffsignals bei den unterschiedlichen Materialien beurteilt werden, da alle Filme mit der äquivalenten Menge Proteinlösung inkubiert wurden (siehe Abbildung 26). Ein absoluter quantitativer Vergleich der Adsorption auf verschiedenen Materialien ist allerdings mit dieser Methode nicht möglich.

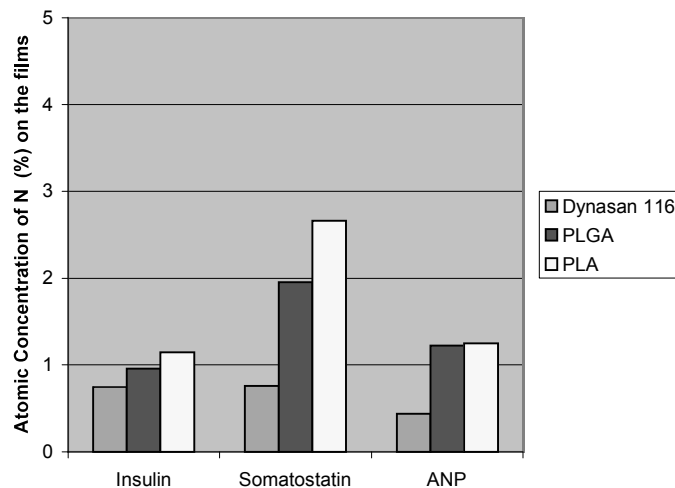


Abbildung 26: Stickstoffsignal auf inkubierten Filmen

III.3.3 Steuerung der Freisetzung

Die Verwendung von zylindrischen Lipidmatrices bietet die Möglichkeit schnell und effektiv den Einfluss von Hilfsstoffen auf die Freisetzung und die Stabilität der inkorporierten Wirkstoffe zu bestimmen.

Im Rahmen dieses Projektes wurde der Effekt von Gelatine auf die Freisetzung von Insulin und Somatostatin untersucht. Dafür wurden in mit 1% Insulin bzw. Somatostatin beladene Lipidpulvermischungen jeweils 1% Gelatine eingearbeitet und anschließend zu zylindrischen Matrices (2 x 2 mm) verpresst. Die Freisetzung von Insulin und Somatostatin aus den Lipidmatrices in Phosphatpuffer pH 7,4 bei 37 °C wurde über einen Zeitraum von 2 Monaten untersucht. Innerhalb von 2 Monaten wurden 42,67 % Insulin bzw. 88,69% Somatostatin freigegeben (siehe Abbildung 27). Die Einarbeitung von 1% Gelatine in die Lipidmatrices beschleunigte die Freisetzung der Proteine nicht.

Dieser Effekt konnte allerdings in früheren Studien für Matrices, die mit TAMRA- BSA beladen waren nachgewiesen werden [8]. Um eine raschere Freisetzung durch Zusatz von Porogenbildnern, wie zum Beispiel Gelatine, zu erzielen muss wahrscheinlich ein höherer Gesamtproteingehalt vorliegen.

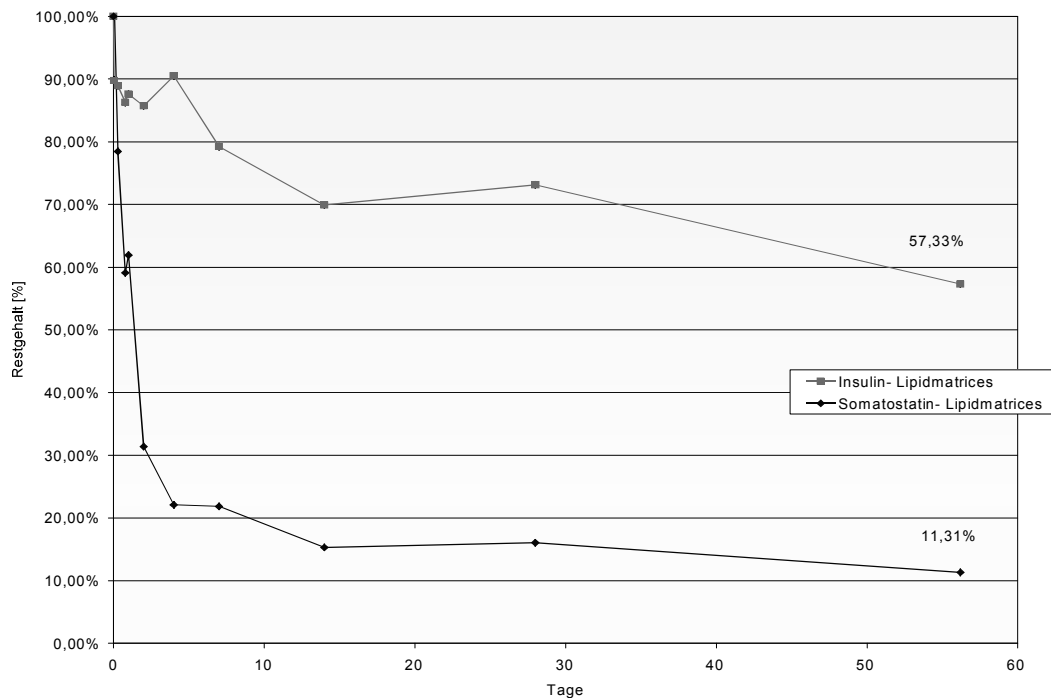


Abbildung 27: Freisetzung von Insulin bzw. Somatostatin aus Lipidmatrices mit 1% Gelatine als Porogenbildner (Dynasan®116) über 2 Monate.

III.3.4 Freisetzung von Peptiden aus Lipidmikropartikeln

Zur Untersuchung des Freisetzungsverhaltens von Proteinen aus Lipidmikropartikeln wurden Insulin und Somatostatin als Modellsubstanzen in Lipidmikropartikel inkorporiert. Die Proteine wurden als Feststoff mittels Ultraturrax (mindestens eine Minute) in einer auf 70°C temperierte Lipidschmelze dispergiert. Anschließend wurde die Suspension mit einer beheizbaren Einstoffdüse in die modifizierte Sprüherstarrungsapparatur versprüht. Lipidmikropartikel mit unterschiedlichem Proteingehalt wurden hergestellt, um den Effekt der Beladung auf die Partikelmorphologie und die Freisetzung aus Lipidmikropartikeln zu untersuchen.

Durch Suspendierung des Wirkstoffs in der Lipidmatrix konnte eine hohe Verkapselungseffizienz erzielt werden. Folgende Chargen wurden hergestellt: Insulin-Lipidmikropartikel 0,48%, 0,97% und 1,98% bzw. Somatostatin-Lipidmikropartikel 0,62% und 1,03%. Alle Chargen wurden mittels einer heizbaren Einstoffdüse durch

Versprühung in die modifizierte Sprüherstarrungsapparatur mit 6 bar Sprühdruk einer Sprühdüsenöffnung von 0,2 mm Durchmesser und 70°C hergestellt. Die Ausbeuten dieser Sprühungen lagen zwischen 69 und 87% (siehe Abbildung 28).

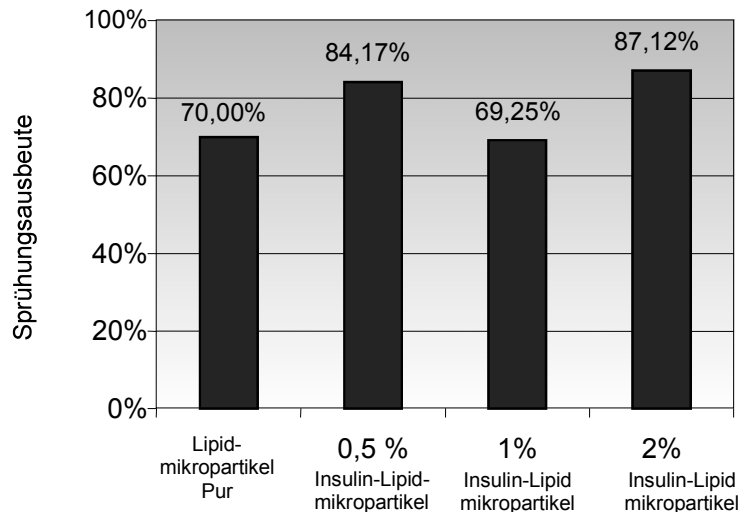


Abbildung 28: Abbildung Sprühungsausbeuten proteinhaltiger Lipidmikropartikel

Die Bestimmung der Verkapselungseffizienz erfolgte durch Extraktion der Proteine aus den Lipidmikropartikeln (siehe Kapitel II.5). Durch Verarbeitung der Proteine als Feststoff kann der Proteingehalt der Lipidmikropartikel ohne große Verluste eingearbeitet werden. Dadurch eignet sich diese Methode besonders gut für die Verarbeitung von geringen Substanzmengen. Die leichten positiven Abweichungen der effektiven Verkapselungseffizienz von der theoretischen resultieren aus Verlust von Matrixmaterial innerhalb der Düse (siehe Abbildung 29). Die Lipidmikropartikel wurden bezüglich Partikelgrößenverteilung und Kristallinität charakterisiert.

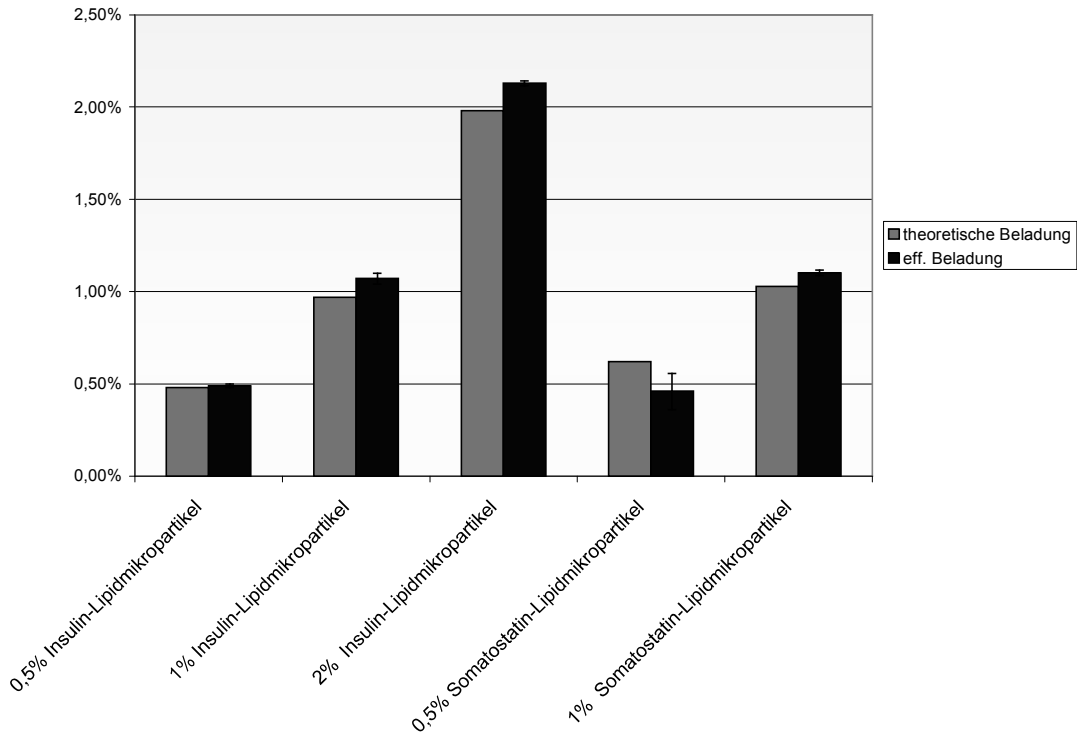


Abbildung 29: Verkapselungseffizienz proteinbeladener Lipidmikropartikel

Die Einarbeitung von Protein in Lipidmikropartikel führte zu größeren Partikeln als reine Lipidmikropartikel. Der Anteil an Mikropartikeln < 150µm sank von 30,41% (Abbildung 17) auf 13-25% (siehe Abbildung 30).

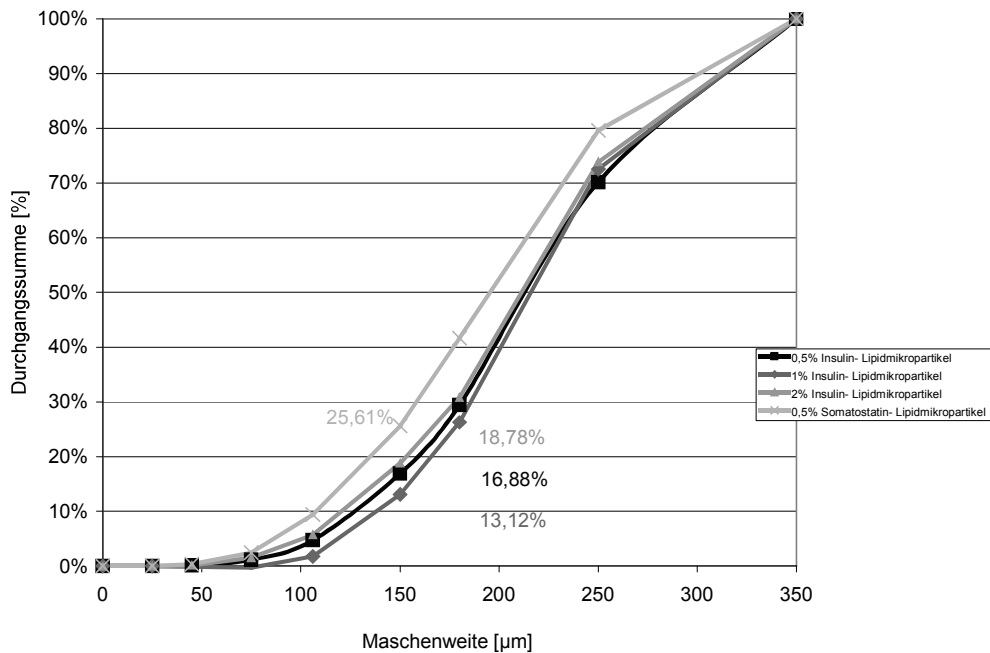


Abbildung 30: Partikelgrößenverteilung von wirkstoffbeladenen Lipidmikropartikeln

SEM- Aufnahmen von Insulin- und Somatostatin-Lipidmikropartikeln zeigen einheitlich geformte Partikel mit glatter Oberfläche. Die Querschnitte der Lipidmikropartikel ähneln strukturell reinen Lipidmikropartikeln, wohingegen die Oberfläche nicht so faserig ist (siehe Abbildung 31 und 32). DSC-Thermogramme der Partikel bestätigen, dass keine Veränderungen in der Kristallinität durch Einarbeitung von Proteinen auftreten (Daten nicht gezeigt).

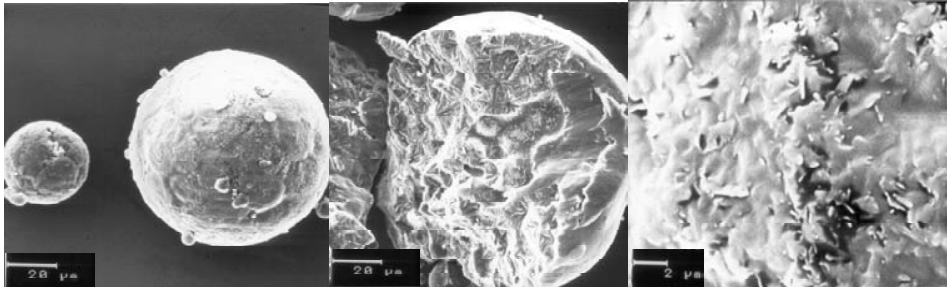


Abbildung 31: SEM- Aufnahmen von Insulin-Lipidmikropartikeln

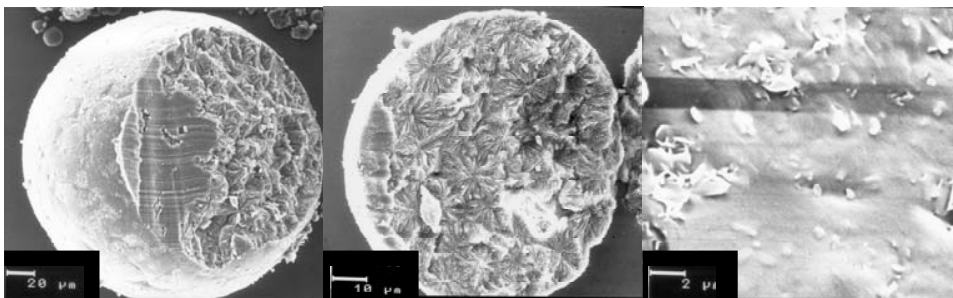


Abbildung 32: SEM-Aufnahmen von Somatostatin-Lipidmikropartikeln

Die Freisetzung von Insulin und Somatostatin aus den Lipidmikropartikeln in Phosphatpuffer pH 7,4 bei 37 °C wurde über einen Zeitraum von 1-2 Wochen untersucht. Aufgrund von Instabilitäten der Proteine im Freisetzungsmedium wurde jeweils der Restgehalt des eingesetzten Wirkstoffs der Lipidmikropartikel durch Extraktion des Proteins und anschließender HPLC-Analytik bestimmt. Insulin- Lipidmikropartikel gaben zwischen 19,72 bis 38,31% Wirkstoff frei (siehe Abbildung 33).

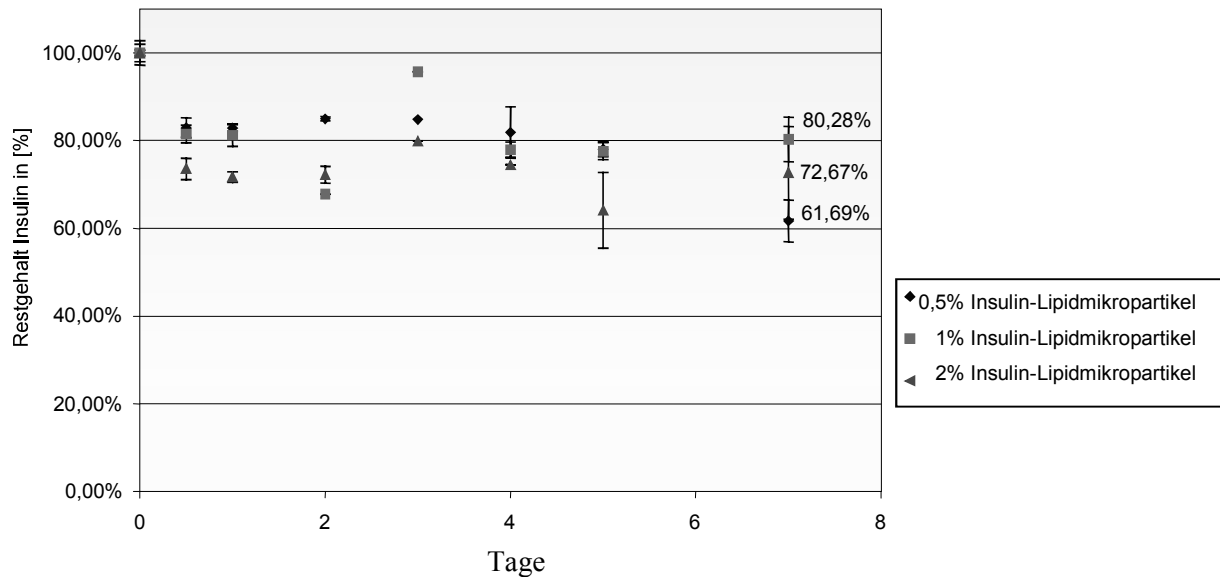


Abbildung 33: Freisetzung von Insulin aus Lipidmikropartikeln über 1 Woche

Die Freisetzung von Somatostatin aus den Lipidmikropartikeln erfolgte viel rascher (siehe Abbildung 34). Bereits nach 4 Tagen waren ca. 80% des inkorporierten Somatostatins freigesetzt.

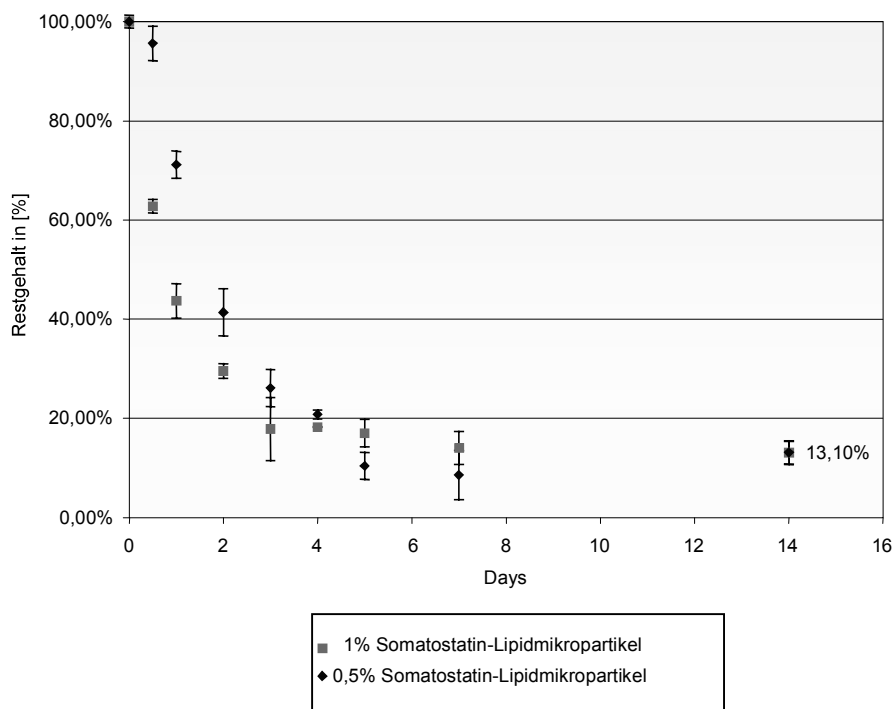


Abbildung 34: Freisetzung von Somatostatin aus Lipidmikropartikeln über 2 Wochen

Die Unterschiede im Freisetzungverhalten von Somatostatin- und Insulin-Lipidmikropartikeln konnte tendenziell auch in den Vorversuchen mit Lipidmatrices festgestellt werden. Ausgehend von diesen Ergebnissen hängt das Freisetzungverhalten der Peptide von den physiko-chemischen Eigenschaften, wie Molekulargewicht und Wasserlöslichkeit, ab.

III.3.5 Testung der biologischen Aktivität von Insulin nach Einarbeitung in Lipidmatrices

Obwohl die chemische Integrität der Proteine nach Einarbeitung in Lipidmatrices und Lipidmikropartikel durch HPLC-MS Analyse nachgewiesen wurde, kann die Bioaktivität der Proteine beeinträchtigt sein, ohne dass diese Veränderungen mit zuvor genannten Verfahren detektierbar sind. Eine Möglichkeit zur Testung der Bioaktivität von freigesetztem Insulin stellt die Applikation des Freisetzungssystems in ein Zellkulturmodell dar. Deshalb wurden insulinhaltige sterile Lipidmatrices hergestellt und in einem insulinempfindlichen dreidimensionalen bovinen Chondrozyten- Zellkulturmodell getestet [9,10]. Sterile Lipidmatrices wurden folgendermaßen hergestellt: Glyceroltripalmitat wurde mit trockener Hitze bei 160°C über 2 Stunden sterilisiert. Die Lipidschmelze wurde anschließend bei 55°C getempert, um eine Kristallisation in der stabilen β' -Modifikation zu ermöglichen. Insulin wurde mittels Filtration einer Insulinlösung durch einen 0,22µm Membranfilter sterilisiert und anschließend unter aseptischen Bedingungen gefriergetrocknet. Das sterile Triglycerid wurde unter aseptischen Bedingungen pulverisiert, mit gefriergetrocknetem Insulin in einem Mörser gemischt und zu Lipidmatrices verpresst. Bovine artikuläre Chondrozyten wurden auf PGA-Scaffolds 2 Wochen in Wellplates auf einem Orbitalschüttler kultiviert. Insulinhaltige Lipidmatrices (0,55% und 2,08% w/w) wurden mit den Zell-Polymer-Konstrukten inkubiert. Als Kontrollgruppen dienten zellbeladene Scaffolds, die mit oder ohne extern zugefügtem Insulin (alle 2-3 Tage) kultiviert wurden. Der Effekt des freigesetzten Insulins auf die Qualität des sich entwickelnden Knorpels wurde durch histologische und biochemische Analyse der Extrazellulärmatrixkomponenten, wie Glycosaminoglykane (GAG) und Kollagen, beurteilt.

Histologische Querschnitte von Zell-Polymerkonstrukten, die Insulin erhalten hatten, zeigten im Vergleich zu Konstrukten, die ohne Insulin kultiviert wurden, sowohl eine

reifere Morphologie als auch eine gleichmäßigere Verteilung von GAG (Abbildung 35). Die Effekte von freigesetzten Insulin aus Lipidmatrixen auf Knorpelstruktur und Zusammensetzung waren vergleichbar mit der Wirkung, die extern zugegebenes Insulin auf Zellpolymerkonstrukte hatte.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Bioaktivität von Insulin, das aus Lipidmatrixen freigesetzt wurde, während des Herstellungsprozesses und der Freigabe erhalten wurde. Dieses Verfahren kann nun auch für die Testung von Insulin-Lipidmikropartikeln eingesetzt werden.

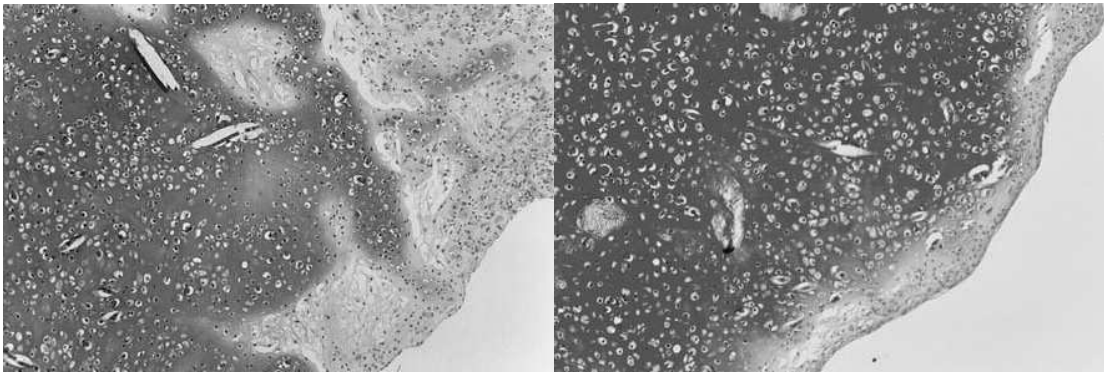


Abbildung 35: Effekte von Insulin- Lipidmatrixen auf mittels Tissue-Engineering hergestellten Knorpel. Ein höherer Glykosaminoglykangehalt und eine gleichmäßigere GAG- Verteilung im Gewebe konnte bei Zell-Polymerkonstrukten detektiert werden, die in Gegenwart von Insulin-Lipidmatrixen kultiviert wurden (rechts), verglichen mit Zell-Polymerkonstrukten, die in Abwesenheit von Insulin kultiviert wurden (links). GAG wurde mit Safranin O angefärbt (dunkelgraue Tönung auf diesem Schwarzweiß Foto).

IV in vivo Biokompatibilitätsprüfung

IV.1. Studiendesign

Die Studie wurde im Rahmen eines von der Regierung der Oberpfalz genehmigten Tierversuchsantrags und unter Beachtung der Richtlinien für Tierversuche durchgeführt. Alle operativen Maßnahmen wurden durch einen Veterinär durchgeführt, welcher die gesamte Studie beaufsichtigte. Der Versuch wurde mit weiblichen NMRI-Mäusen durchgeführt.

Ziel dieser Studie war es, die Bioverträglichkeit von Dynasan[®] 116 in vivo nachzuweisen. Da für manche hochwirksamen Wirkstoffe, wie z. B. Wachstumsfaktoren, ein zusätzlicher Träger nötig werden konnte, wurde außerdem der Effekt der Beimischung von 1 % Gelatine untersucht, welche zusätzlich noch zur Modulation der Freisetzung von Wirkstoffen dienen kann. Als Vergleich dienten Matrices aus reiner Gelatine und dem Polymer Resomer[®] RG502 (ein racemisches PLGA mit dem Verhältnis Milchsäure zu Glycolsäure 50:50, Mw: ca. 17000, Mn: ca. 9000). Alle Materialien wurden in Form von sterilen, zylindrischen Implantaten mit 2 mm Durchmesser (siehe Abbildung 36) s.c. beiderseits über den Rippenbögen appliziert. Die Höhe der Zylinder variierte je nach ihrer Masse, welche ca. 6 mg betrug. Die Studie wurde mit zylindrischen Implantaten durchgeführt, um bessere Eindrücke gewinnen zu können, was die Struktur der Matrices nach längerer Applikation anbelangt. Im Falle von Lipid-Mikropartikeln hätte es zu Schwierigkeiten zum einen bei der Wiederfindung und Explantation der Arzneiform, zum anderen bei der Untersuchung ihrer Struktur kommen können.

Verwendet wurden 80 weibliche NMRI-Mäuse im Alter von ca. 8 Wochen. Um bei fünf Entnahmetagen $n = 4$ zu erhalten wurden die Tiere nach den Materialien in vier Gruppen zu je 20 Mäusen aufgeteilt. Ihnen wurde rechts und links je ein Zylinder implantiert. So konnte je Maus ein histologisches Präparat und eine Zylindermatrix zur Untersuchung mittels Scanning Electron Microscopy (SEM) gewonnen werden. Zur besseren Veranschaulichung sind diese Zahlen in Tabelle 1 zusammengefasst. Die Matrices wurden an den Versuchstagen 2, 4, 8, 30 und 60 entnommen.

Gruppen- bez.	Funktion der Gruppe	Matrixmaterial	Anzahl der Mäuse je Explantationszeitpunkt	Explantationszeitpunkte
Dyn	Testgruppe 1	Dynasan [®] 116	4	d2, d4, d8, d30, d60-90
DynG	Testgruppe 2	Dynasan [®] 116 mit 1% Gelatine	4	d2, d4, d8, d30, d60-90
Pol	Kontrollgruppe 1	Resomer [®] RG502	4	d2, d4, d8, d30, d60-90
Gel	Kontrollgruppe 2	Gelatine	4	d2, d4, d8, d30, d60-90

Tabelle 1: Design der Biokompatibilitätsstudie.

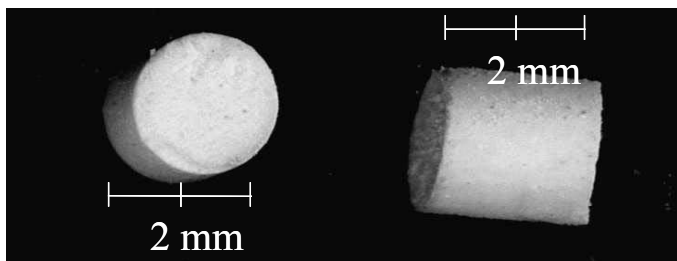


Abbildung 36: Dynasan[®] 116 Matrix vor der Implantation.

IV.1.1 Herstellung der Zylinder-Matrices

Die Matrices wurden unter Beachtung der Richtlinien für aseptische Herstellungsverfahren angefertigt. Hierzu wurde das Lipid mittels trockener Hitze (180°C, 1/2 h) sterilisiert. Eine ca. 3 %ige Gelatinelösung wurde gefriergetrocknet und unter flüssigem Stickstoff in einem Mörser zerkleinert. Gelatine und Polymer wurden mittels UV-Strahlung (2 h) sterilisiert und konnten im Anschluss daran direkt weiterverarbeitet werden, während das hitzesterilisierte Lipid 3 Tage bei 55°C im Trockenschrank temperiert wurde um die stabile Modifikation zu erhalten. Nach dem Abkühlen wurde das Dynasan[®] 116 verrieben und gesiebt (Maschenweite: 106 µm). Um die Lipidmatrices mit 1 % Gelatinegehalt herzustellen wurde eine sterile Pulvermischung (1 %ig) aus Dynasan[®] 116 und Gelatine verwendet. Zur Herstellung der Matrices diente ein Presswerkzeug aus Edelstahl (Sterilisation erfolgte mittels trockener Hitze, 180°C, 1/2 h). Die Sterilität der zu implantierenden Zylinder wurde durch mikrobiologische Untersuchungen am Institut für Mikrobiologie und Hygiene am Universitäts-Klinikum

Regensburg bestätigt. Geprüft wurden drei Matrices je Gruppe, die alle der Prüfung entsprachen.

IV.1.2 Ergebnisse

Bei keiner der vier Gruppen kam es zu makroskopisch sichtbaren Immunreaktionen der Tiere. Die Matrices aus reiner Gelatine waren schon nach zwei Tagen vollständig resorbiert. Unterschiede waren zwischen der Oberflächenstruktur der reinen Lipidmatrices und derer mit Gelatine-Beimischung zu erkennen. Die Anwesenheit der Gelatine bewirkte eine unregelmäßigere und rauere Oberflächenbeschaffenheit. Es bildeten sich kleine Krater, die vermutlich durch Herauslösen des Gelatineanteils entstanden sind (siehe Abbildung 37).

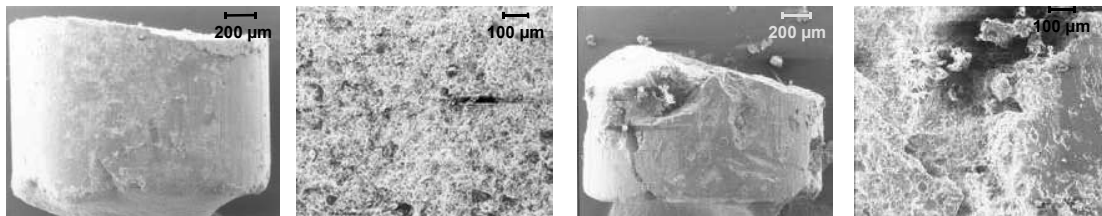


Abbildung 37: links: Matrix bestehend aus Dynasan® 116 Explantation nach 30 Tagen
rechts: Dynasan® 116 Matrix mit 1 % Gelatine nach Explantation an Versuchstag 30.

Die an Tag Zwei entnommenen Matrices wiesen eine geringe Zunahme der Masse auf, welche auf Anlagerungen von Bindegewebe zurückzuführen ist. Die gleiche Beobachtung wurde an den Tagen 4 und 8 gemacht. Ausserdem war eine Zunahme der Durchblutung im an die Implantationsstelle angrenzenden Gewebe festzustellen. An den Tagen 30 und 60 waren die Implantate vollständig von Bindegewebe umschlossen, was zu einer etwas höheren Zunahme der Implantatmassen führte. Es wurde wiederum eine Zunahme der Durchblutung im betroffenen Gewebe beobachtet.

Zur histologischen Untersuchung der Implantate wurden lichtmikroskopische Aufnahmen von Paraffinschnitten der Explantate angefertigt (siehe Abbildung 38). Die Histologie bestätigte die Beobachtung der Stabilität der Implantate über den untersuchten Zeitraum. Des weiteren wurde die Bildung mehrerer Bindegewebsschichten durch eine Vielzahl von Fibroblasten um die Implantate beobachtet. Abgesehen von dieser Einkapselung in Bindegewebe konnte weder im subkutanen Gewebe angrenzend an die

Implantationsstelle noch an anderen Stellen in den Tieren eine weitere Reaktion des Organismus auf die Implantate (wie z.B. eine Zunahme von mononuklearen Zellen) festgestellt werden. Zusammenfassend haben sich die Triglyceride im Vergleich zu den Kontrollgruppen als biokompatibles Material erwiesen.

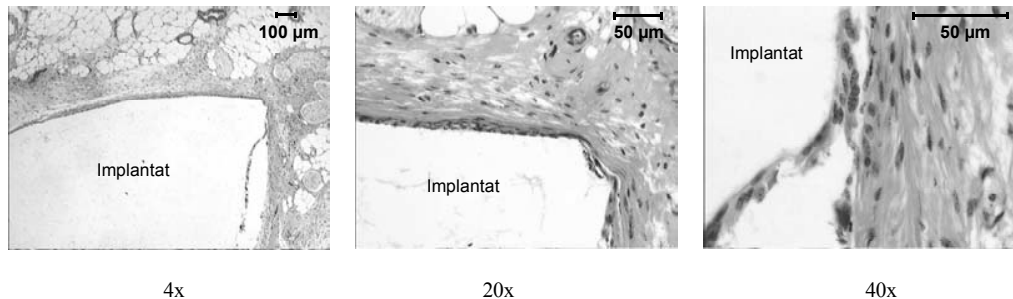


Abbildung 38: Histologische Schnitte (6µm) eines Dynasan[®] 116 Implantats 30 Tage nach Implantation (Masson – Goldner Färbung)

IV.1.3 Erosionsbeschleunigung durch Phospholipide

Da Lipidmatrices im Körper über längere Zeit stabil bleiben [8], wurde in die Biokompatibilitätsstudie ein Vorversuch integriert, in dem getestet werden sollte, wie sich die Erosion einer Arzneiform mit einem Lipid als Träger durch Zugabe von Phospholipiden verändert. Ziel war es, eine beschleunigte Degradation zu erreichen und somit ein Instrument zur Einstellung der Abbaugeschwindigkeit zur Verfügung zu haben.

In diesem Versuch wurden sechs Mäusen beidseitig zylinderförmige Lipidmatrices mit 10 % und 50 % Phospholipidanteil implantiert. Verwendet wurden die Phospholipide Lipoid[®] S 100-3 (aufgereinigtes Sojalecithin, > 95 % Phosphatidylcholin, Jodzahl < 3) und Lipoid[®] PC 14:0/14:0 (DMPC, ein synthetisches Phosphatidylcholin mit 100 % Myristinsäureanteil). So konnten drei Entnahmezeitpunkte je Matrixzusammensetzung bestimmt werden. Die Herstellung erfolgte unter aseptischen Bedingungen, wobei das verwendete Lipid wie in IV.1.1 beschrieben sterilisiert wurde. Die Phospholipidkomponente wurde von der Firma Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Deutschland) aseptisch hergestellt. Bisher wurde am dritten und am siebten Versuchstag eine Entnahme durchgeführt. Im Versuchsverlauf war zu erkennen, dass Matrices mit höherem Anteil an Phospholipid und Matrices mit DMPC als Phospholipidkomponente einer stärkeren Degradation unterlagen.

Nach drei Tagen fand die erste Entnahme statt. Die Matrices mit 10 % Phospholipidanteil wiesen im Vergleich zu einer reinen Dynasan[®] 116-Matrix eine geringere mechanische Stabilität auf. Die Zylinder mit 50 % Lipoid[®] S 100-3 hatten ihre Form verloren und bei den Matrices mit 50 % DMPC war bereits nach drei Tagen ein Verlust der zusammenhängenden Struktur zu beobachten. Die am siebten Tag entnommenen Matrices wiesen die gleichen Anzeichen der Degradation, nur in stärkerem Ausmaß auf. Man konnte beobachten, dass die Degradation der Matrices mit steigendem Anteil an Phospholipid und mit abnehmender Kettenlänge der Fettsäure im Phosphatidylcholin schneller fortschritt.

In vivo konnte sowohl festgestellt werden, dass das untersuchte Material Dynasan 116 verträglich ist als auch, dass die Degradation des Trägermaterials mit steigendem Anteil an Phospholipid und mit zunehmender Kettenlänge der Fettsäure im Phosphatidylcholin fortschritt.

V Liste der Veröffentlichungen

- A. Maschke, C. Guse, J. Herrmann, A. Göpferich; Triglyceride matrices for controlled release of peptides and proteins, 4th World Meeting on Pharmaceutics Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology 2002, 891-892, Florenz 2002
- A. Maschke, J. Herrmann, M. B. Schulz, T. Blunk, A. Göpferich; Optimization of Spray Congealing Process for Pure and Protein loaded Lipid Microparticles., DPhG Jahrestagung 2002, Berlin
- C. Guse, S. Schreiner, T. Spruß, T. Blunk, A. Göpferich; Phospholipids as a release modifier for triglyceride matrices, DPhG Jahrestagung 2002, Berlin
- A. Maschke, A. Lucke, W. Vogelhuber, C. Fischbach, B. Appel, T. Blunk, and A. Göpferich; Lipids: An Alternative Material for Protein and Peptide Release in Carrier Based Drug Delivery, ACS Books, in press

VI Literatur

- [1] Lucke A., Kiermaier J., Göpferich A.; Peptide acylation by poly(alpha-) hydroxy esters; *Pharmaceutical research* 19 (2), 175-81(2002)
- [2] Reithmeier H., Herrmann J., Göpferich A.; Development and characterization of lipid microparticles as a drug carrier for somatostatin; *Int. Journal of Pharmaceutics* 218, 133-143 (2001)
- [3] Müller R. H., Rühl D., Runge S., Schulze-Forster K., Mehnert W.; Cytotoxicity of solid lipid nanoparticles as a function of the lipid matrix and the surfactant; *Pharmaceutical Research*, 14 (4) 458-462 (1997)
- [4] Brange J., Havelund S., Hougaard P.; Chemical Stability of Insulin: 2. Formation of higher molecular weight transformation products during storage of pharmaceutical preparations; *Pharm. Res.*, 9(6), 727-34 (1992)
- [5] Juslin L., Antikainen O., Merkkü P., Yliruusi J.; Droplet size measurement: II. Effect of three independent variables on parameters describing the droplet size distribution from a pneumatic nozzle studied by multilinear stepwise regression analysis; *Int. Journal of Pharmaceutics* 123, 257-264 (1995)
- [6] Eldem T., Speiser P., Altorfer H.; Polymorphic behaviour of sprayed lipid micropellets and its evaluation by differential scanning calorimetry and scanning electron microscopy. *Pharmaceutical Research* 8 (2), 178-184 (1991 a)
- [7] Maschke, C.Guse, J. Herrmann, A. Göpferich, Triglyceride matrices for controlled release of peptides and proteins, , 4th World Meeting on Pharmaceutics Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology 2002 ,891-892, Florenz 2002
- [8] Vogelhuber W., Magni E., Mouro M., Spruß T., Gazzaniga A.,Göpferich A.; Monolithic triglyceride matrices: a controlled release system for proteins; *Dissertation Universität Regensburg*; 2001

- [9] Appel,B.; Maschke,A.; Guse,C.; Sarhan,H.; Kellner,K.; Blunk,T.; Göpferich,A.:
Lipid matrices release bioactive insulin in a 3-D cartilage engineering culture. CRS
German local chapter, Vienna, 2002
- [10] A. Maschke, A. Lucke, W. Vogelhuber, C. Fischbach, B. Appel, T. Blunk, and
A. Göpferich; Lipids: An Alternative Material for Protein and Peptide Release in
Carrier Based Drug Delivery, ACS Books, in press