

Mikronisierung von Proteinen und Verarbeitung zu Arzneiformen

Laufzeit	01.06.2004 - 31.07.2006
Forschungsstelle	Universität Regensburg Lehrstuhl für pharmazeutische Technologie Universitätsstraße 31 93040 Regensburg
Projektleitung	Prof. Dr. Achim Göpferich
Förderung	Das IGF-Vorhaben 14128 N1 der Forschungsvereinigung der Arzneimittel-Hersteller e.V. (FAH), Bürgerstraße 12, 53173 Bonn wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der industriellen Gemeinschaftsforschung und -entwicklung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.



Problemstellung/Zielsetzung

Im Rahmen des Projektes wurden neue Verfahren wie z.B. die Hochdruckhomogenisierung zur Zerkleinerung von Proteinen im Festzustand entwickelt. Bereits etablierte Verfahren wie die Mahlung in der Luftstrahlmühle, die jedoch bisher kaum für die Zerkleinerung von Proteinen verwendet wurde, wurden für diese Anwendung optimiert.

Zunächst sollte die grundsätzliche Eignung der Verfahren zur Mikronisierung an verschiedenen Proteinen gezeigt werden. Die Mikronisierung durch Hochdruckhomogenisierung erfolgte dabei unter Einsatz von Proteindispersionen in Neutralöl. Mit der Luftstrahlmühle stand die Möglichkeit zur Verfügung, Proteine in fester Form ohne die Verwendung eines Dispersionsmittels zu mikronisieren. Anschließend stand die Optimierung der Prozesse in Bezug auf Effektivität und Steuerbarkeit im Vordergrund. Die Verfahren wurden detailliert unter Verwendung faktorieller Versuchsdesigns auf Mikronisierungseffizienz, Ausbeute, Stabilität und Bioaktivität der Proteine untersucht und bewertet. Die Luftstrahlmühle wurde zusätzlich mit einer Einheit zur Temperaturkontrolle ausgerüstet, um den Einfluss der Temperatur auf Stabilität und Partikelgröße beurteilen zu können. Als Modellproteine kamen bovines Insulin (kristallin) und Lysozym (amorph) aus Hühnereiweiß zum Einsatz.

Die eingesetzten Verfahren sollten eine Auswahl unterschiedlicher Mikronisierungsoptionen für verschiedene Anwendungszwecke und Proteine ermöglichen. Die Ergebnisse sollten ein profunderes Verständnis für die physikalischen/chemischen Gesetzmäßigkeiten der Zerkleinerungsmechanismen von Proteinen liefern.

Für die Beurteilung der erzielten Ergebnisse boten sich mehrere analytische Verfahren an. Für die Untersuchung von Partikelgrößen und Morphologie waren dies: Rasterelektronenmikroskopie, Laserlichtbeugung und dynamische Lichtstreuung. Der Einfluss der Mikronisierungsverfahren auf die physikalische Stabilität der mikronisierten Proteine wurde mittels

Weitwinkelröntgenbeugung und Differentialthermoanalyse untersucht. Zur Bestimmung der chemischen Stabilität der Proteine wurden angewendet: Gelelektrophorese, Größenausschlusschromatographie, HPLC gekoppelt mit Massenspektrometrie und MALDI-TOF. Zur Bestimmung der biologischen Aktivität der Proteine kamen Zellkulturassays sowie im Falle von Lysozym ein Enzymaktivitätsassay unter Verwendung von *Micrococcus lysodeikticus* zum Einsatz.

Weiterhin wurde die Verwendbarkeit der Produkte für die Herstellung von Arzneiformen überprüft. So wurden zum Beispiel die mikronisierten Proteine in bioabbaubare Mikropartikel zur kontrollierten retardierten Freisetzung eingearbeitet. Der Einfluss der Teilchengröße auf Freisetzungsprofile wurde untersucht und eine optimale Formulierung für Mikropartikel entwickelt.

Ergebnisse

Für die Hochdruckhomogenisation wurde der Einfluss der Parameter Druck, Mikronisierungszyklen und Wirkstoffgehalt der Suspension auf die Parameter Partikelgröße, Aktivität und Stabilität des Proteins ermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass der verwendete Druck und die Zahl der Mikronisierungszyklen für eine möglichst kleine Partikelgröße und eine enge Größenverteilung entscheidend sind. Auch kann durch die definierte Veränderung der Versuchsparameter gezielt eine bestimmte Partikelgröße erreicht werden. Bei der Untersuchung des mikronisierten Insulins mittels HPLC-MS konnten keinerlei Veränderungen zum unbehandelten Insulin festgestellt werden. Auch die Analyse der Aktivität mittels eines Chondrocyten-Proliferations-Assays zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen nativem und mikronisiertem Insulin.

Neben kristallinem Insulin wurde auch das amorphe Lysozym mittels Hochdruckhomogenisation mikronisiert und ebenfalls mittels faktoriellen Designs untersucht. Wie bei dem kristallinen Protein Insulin erwiesen sich die Faktoren Anzahl der Zyklen sowie der verwendete Druck als die bedeutendsten hinsichtlich der Mikronisierungseffizienz. Das verwendete Versuchdesign ergab jedoch, dass bei der Mikronisierung von Lysozym, im Gegensatz zum Insulin, auch die eingesetzte Proteinkonzentration einen gewissen Einfluss auf die Partikelgröße besitzt. So ergab sich die höchste Mikronisierungseffizienz bei einer Konzentration von 1 mg/ml Lysozym.

Durch das faktorielle Design konnten für beide Modellproteine Einstellungen identifiziert werden, die zu einer zufriedenstellenden Reduktion der Partikelgröße auf d_{90} -Werte kleiner 15 μm führen. Im Allgemeinen sind dies 1000 bar Druck, eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml sowie 3 bis 4 Homogenisierungszyklen. Eine Erhöhung der Zyklenzahl auf 6 Zyklen würde zwar bei beiden Proteinen zu einer weiteren Verringerung des d_{90} Wertes führen, da jedoch die Produktverluste bei dem angewendeten, diskontinuierlichen Mikronisierungsverfahren mit durchschnittlich 11,5% pro Zyklus relativ hoch sind, würde sich dieses Vorgehen möglicherweise als ineffizient erweisen. Eine Möglichkeit, diese Verluste zu umgehen, wäre mit einem Umbau des verwendeten Hochdruckhomogenisators auf ein kontinuierliches Verfahren verbunden. Eine weitere Auffälligkeit, die sich bei dem Modellprotein Lysozym ergab, betraf die chemische Stabilität dieses Proteins nach der Hochdruckhomogenisation. HPLC-Daten wiesen auf eine gewisse Instabilität von Lysozym gegenüber dem angewendeten Mikronisierungsverfahren hin.

Es ist festzustellen, dass die Hochdruckhomogenisation prinzipiell für die Mikronisierung von Proteinen geeignet ist. Besonders geeignet erscheint diese Art der Mikronisation, wenn das Protein in einem Vehikel mikronisiert werden kann, welches direkt zur Weiterverarbeitung zu Depotarzneiformen geeignet ist, da dabei jeglicher Kontakt zu äußeren Einflüssen, wie zum Beispiel Luftfeuchtigkeit und Sauerstoff, vermieden werden kann. Im Verlauf des Projekts konnte gezeigt werden, dass sich Lipidschmelzen für ein derartiges Vorgehen eignen.

Für die Mikronisierung in der Luftstrahlmühle konnten in Vorversuchen an einem weiten Spektrum von Substanzen gute Ergebnisse erzielt werden. Dabei konnte die Luftfeuchtigkeit als ein

negativer Faktor auf das Mikronisierungsergebnis identifiziert werden. Um die Agglomeration der mikronisierten Partikel durch die Luftfeuchtigkeit zu verhindern, wurde die Mühle in einen mit Stickstoff gespülten Isolator integriert.

Um auch den Einfluss der Temperatur auf die Mikronisierung und die Stabilität der Proteine untersuchen zu können, wurde für die Luftstrahlmühle eine Einheit zur Temperaturmodifizierung entwickelt. Damit konnte das Mahlgas auf eine Temperatur von -60 °C während des Mahlvorgangs gekühlt werden.

Mit Hilfe eines faktoriellen Designs wurde die Eignung der Luftstrahlmahlung für die Mikronisierung von Proteinen untersucht. Als entscheidende Faktoren wurden die identifiziert, die Partikelgröße, Stabilität und Aktivität beeinflussenden. Es wurden der Mahldruck, die Anzahl der Mahlzyklen und die Temperatur des Mahlgases variiert. Dabei wurde mit jeweils 500 mg gearbeitet, einer für die Luftstrahlmahlung sehr geringen Menge.

Für Insulin wurden d_{90} -Werte von $7,1\text{ }\mu\text{m}$ für einen Mahlzyklus bei 7 bar und von $3,3\text{ }\mu\text{m}$ bei 3 Zyklen und 15 bar Druck erreicht. Für Lysozym lagen die Partikelgrößen im Bereich von $12,6\text{ }\mu\text{m}$ bis $4,1\text{ }\mu\text{m}$. Höherer Mahldruck und eine größere Anzahl von Zyklen resultiert dabei in kleineren Korngrößen und einer engeren Verteilung. Für eine Mahlung bei tiefen Temperaturen (-60 °C) konnte kein positiver Effekt auf die Vermahlbarkeit festgestellt werden. Die Untersuchung der chemischen Stabilität der Proteine mittels HPLC-Untersuchungen zeigte keinerlei Veränderungen im Vergleich zu den unbehandelten Proben. Auch die Untersuchung der Bioaktivität des Insulins mittels eines Chondrozyten-Assays zeigte keine Veränderung gegenüber der Kontrolle. Bei Lysozym allerdings konnte eine leichte Abnahme der Aktivität abhängig von Mahldruck und Zyklenzahl festgestellt werden.

Für die industrielle Anwendung empfiehlt sich, das Verfahren auf einen Mahlzyklus hin zu optimieren, da die Ausbeuten (ca. 80% nach jedem Zyklus) sonst nicht mehr wirtschaftlich sind. Höhere Mahldrücke führen zu kleineren Partikeln und einer engeren Korngrößenverteilung, allerdings wird das System bei maximalem Druck störanfällig, so dass man hier mit einem mittleren Druck arbeiten sollte. Somit kann auch das Risiko einer Inaktivierung der Proteine durch zu extreme Bedingungen minimiert werden.

Es konnte somit gezeigt werden, dass sich die Luftstrahlmahlung für die Mikronisierung von Proteinen in ihrer festen Form eignet. Dabei wurden Partikelgrößen erreicht, die eine breite Anwendung der erhaltenen Proteinpartikel ermöglichen. Besonders sei dabei auf die Möglichkeit einer pulmonalen Applikation hingewiesen, aber auch für die Verarbeitung in Mikropartikel für eine retardierte Freisetzung sind diese homogenen Partikelgrößenverteilungen im Bereich unter $10\text{ }\mu\text{m}$ eine gute Grundlage.

Auch bei der Weiterverarbeitung der mikronisierten Modellproteine zu langfreistzenden Lipidmikropartikeln wurden Ergebnisse erzielt. Zur Herstellung der proteinbeladenen Partikel erwies sich die Sprüherstarrung mit einer modifizierten Sprühtocknungsapparatur der Firma Büchi als exzellente Methode. Es konnten Partikel in einem für die parenterale Applikation optimalen Größenbereich von unter $150\text{ }\mu\text{m}$ hergestellt werden. Die Partikel ausbeuten der produzierten Chargen liegen mit bis zu 80% ebenfalls in einem hervorragenden Bereich. Bei Verwendung von mikronisiertem Lysozym konnten Verkapselungseffizienzen von bis zu über 90% und tatsächliche Beladungen von bis zu 7% erreicht werden. Freisetzungsuntersuchungen deuten auf (durch die eingesetzte Proteinmenge) steuerbare Freisetzungsprofile hin. Die chemische Stabilität beider Modellproteine während der Verarbeitung zu Lipidmikropartikeln konnte mittels HPLC-Untersuchungen bestätigt werden.

Versuche mit einem Einzeltropfenerzeuger führten zu zufriedenstellenden Ergebnissen. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Möglichkeit der Verarbeitung von Kleinstmengen gelegt. Dies konnte mit Chargengrößen von bis zu 500 mg realisiert werden. Es konnten sowohl Lipidschmelzen (z.B. Dynasan 114, Dynasan 116 und Softisan 154) als auch Polymerlösungen (v.a. Natrium-Alginate) verarbeitet werden.

Projektbezogene Veröffentlichungen

Maschke, A.; Calí, N.; Kiermaier, J.; Blunk, T.; Göpferich, A.
Micronization of insulin by high pressure homogenization
Pharmaceutical Research (2006), 23, 2220-2229

Maschke, A.; Cali, N.; Appel, B.; Blunk, T.; Goepferich, G.
Micronization of insulin by high pressure homogenization in non-aqueous environment
Poster auf dem AAPS Annual Meeting, 2004, Baltimore, USA, The AAPS Journal Vol. 6, No. 4,
Abstract W5042 (2004)

Becker, C.; Maschke, A.; Pelzer, R.; Heinzl, J.; Teßmar, J.; Blunk, T.; Goepferich, A.
First Steps Towards Protein Loaded Lipid Microparticles - A Drop On Demand Approach
Vortrag auf dem CRS German Chapter, 2006, Jena

Ehmer, A.; Kolb, S.; Tessmar, J.; Blunk, T.; Goepferich, A.
Micronization of Proteins by Jet Milling
Vortrag auf dem CRS German Chapter, 2006, Jena

Becker, C.; Maschke, A.; Pelzer, R.; Heinzl, J.; Teßmar, J.; Blunk, T.; Goepferich, A.
Lipid Microparticles Manufactured By A Drop an Demand Approach
Poster auf dem 5th World Meeting on Pharmaceutics Biopharmaceutics and Pharmaceutical
Technology, 2006, Genf, Schweiz

Becker, C.; Ehmer, A.; Mascke, A.; Teßmar, J.; Blunk, T.; Göpferich, A.
The influence of micronization of proteins on the properties of lipid microparticles for controlled
release
Vortrag auf dem Joint Meeting der Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesell-
schaft (DPhG) 2006

Ehmer, A.; Zaky, A.; Eyrich, D.; Tessmar, J.; Blunk, T.; Goepferich, A.
Micronization of insulin by jet milling
Poster auf dem Joint Meeting der Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft
(DPhG) 2006