

Arzneimittelhersteller

14128 N / 1

Name der Forschungsstelle(n)

AiF-Vorhaben-Nr. / GAG

01.06.2004 - 31.07.2006

Bewilligungszeitraum

**Schlussbericht für den Zeitraum : 01.06.2004 - 31.07.2006**

zu dem aus Haushaltsmitteln des BMWA über die



geförderten IGF-Forschungsvorhaben

Normalverfahren

Fördervariante ZUTECH

Forschungsthema :

Mikronisierung von Proteinen und Verarbeitung zu Arzneiformen

Für ein ZUTECH-Vorhaben sind folgende zusätzliche Angaben zu machen:

Der fortgeschriebene Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft

ist beigefügt

liegt bereits vor

wird fristgerecht nachgereicht

Regensburg, den 30.10.2006

Ort, Datum

**Prof. Dr. A. Göpferich**  
Lehrstuhl für Pharm. Technologie  
Institut für Pharmazie  
Universität Regensburg  
93040 REGENSBURG  
Tel. (09 41) 9 43 48 42  
Fax (09 41) 9 43 48 07

  
Unterschrift der/des Projektleiter(s)

<b>I.</b>	<b>Zusammenfassung der im Projekt erzielten Ergebnisse .....</b>	<b>2</b>
<b>II.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>3</b>
<b>III.</b>	<b>Mikronisierung mittels Luftstrahlmahlung.....</b>	<b>5</b>
III.1.	Materialien und Methoden.....	7
III.2.	Vorversuche mit unterschiedlichen Modellsubstanzen .....	10
III.3.	Modifikationen und Anpassungen der Luftstrahlmühle .....	12
III.4.	Mikronisierung von Lysozym und Insulin mittels Luftstrahlmahlung.....	14
III.5.	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Luftstrahlmahlung.....	25
<b>IV.</b>	<b>Mikronisierung mittels Hochdruckhomogenisation .....</b>	<b>26</b>
IV.1.	Materialien und Methoden.....	27
IV.2.	Mikronisierung von Insulin und Lysozym mittels Hochdruckhomogenisation .....	29
IV.3.	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Hochdruckhomogenisation .....	40
<b>V.</b>	<b>Zusammenfassung Mikronisierung .....</b>	<b>41</b>
<b>VI.</b>	<b>Herstellung von Lipidmikropartikeln durch Sprüherstarrung.....</b>	<b>42</b>
VI.1.	Materialien und Methoden.....	43
VI.2.	Einflusses des verwendeten Sprühdruks auf die Partikelgrößenverteilung .....	46
VI.3.	Herstellung von lysozymbeladenen Lipidmikropartikeln .....	47
VI.4.	Herstellung von insulinbeladenen Lipidmikropartikeln .....	53
VI.5.	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Herstellung von Lipidmikropartikeln .....	56
<b>VII.</b>	<b>Veröffentlichungen .....</b>	<b>57</b>
<b>VIII.</b>	<b>Förderungshinweis .....</b>	<b>58</b>
<b>IX.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>59</b>

# **I. Zusammenfassung der im Projekt erzielten Ergebnisse**

Im Rahmen des Projektes „Mikronisierung von Proteinen und Verarbeitung zu Arzneiformen“ sollten Methoden für die Gewinnung mikronisierter Proteine entwickelt und etabliert werden. Diese Proteinpartikel sollten anschließend zu Arzneiformen, die z.B. eine retardierte Freisetzung ermöglichen, weiterverarbeitet werden.

Mit der Luftstrahlmahlung und der Hochdruckhomogenisation konnten zwei Verfahren für die Verarbeitung und Handhabung von Proteinen etabliert werden. Während der Versuche wurden mögliche Probleme und Risiken identifiziert und behoben. Zum Beispiel konnte der negative Einfluss von Luftfeuchtigkeit auf die Mikronisierung mit der Luftstrahlmühle nachgewiesen werden und eine kostengünstige Lösung durch Integration der Anlage in einen Isolator entwickelt werden. Der Einfluss der unterschiedlichen Prozessparameter wurde genau untersucht und die Einstellungen für ein optimales Ergebnis konnten ermittelt werden. Die resultierenden Partikelgrößen aus Verwendung beider Verfahren lassen eine Vielzahl möglicher Anwendungen zu. Sie liegen in einem Bereich der für die pulmonale Anwendung gefordert wird und auch für die einfache Einarbeitung in Depotarzneiformen wie Mikropartikel geeignet ist. Die Stabilität und Aktivität der verwendeten Proteine wurde eingehend untersucht und die Prozessabläufe dementsprechend optimiert. Für beide Verfahren können je nach gewünschtem Ergebnis spezifische Empfehlungen für die Wahl der Parameter gegeben werden.

Mittels der Einarbeitung der Proteine in Lipidmikropartikel konnte eine Depotarzneiform entwickelt werden, die die Proteine über einen langen Zeitraum ohne einen „Burst-Release“ zu Beginn freisetzen können. Dabei konnte die Sprüherstarrung als ein einfaches Verfahren für diese Herstellung etabliert werden. Auch hier wurden die Arzneiform und die verwendeten Proteine eingehend experimentell untersucht. Dort konnte auch die Verbesserung des Arbeitsablaufes und der Ergebnisse durch die Verwendung mikronisierter Ausgangssubstanzen eindrucksvoll nachgewiesen werden.

Mit Luftstrahlmahlung, Hochdruckhomogenisation und Sprüherstarrung konnte für drei allgemein zugängliche Verfahren ein zusätzliches Einsatzgebiet erschlossen werden. Dies dürfte besonders für kleinere Betriebe und Unternehmen eine interessante und kostengünstige Möglichkeit für die Verarbeitung von Proteinanzneistoffen sein.

Das Ziel des Vorhabens wurde somit erreicht.

## II. Einleitung

Durch die immer weiter optimierte und vereinfachte Entwicklung und Herstellung von Proteinen gewinnen diese als mögliche Wirkstoffe immer mehr an Bedeutung [1]. Dies zeigt sich besonders deutlich an der stark angestiegenen Zahl an zugelassenen proteinhaltigen Arzneimitteln. Proteine bieten dabei den Vorteil, dass sie sehr spezifische Wirkungen vermitteln, da sie teilweise mit den physiologisch vorkommenden Substanzen identisch oder zumindest sehr ähnlich sind. So konnten für eine Vielzahl von Krankheitsbildern neue wirksame und verträgliche Therapien entwickelt werden.

Leider bringt die Verwendung von Proteinen als Arzneistoffe auch viele teilweise schwer handhabbare Probleme mit sich. So ist die Herstellung und Entwicklung trotz aller Innovationen immer noch deutlich teurer als bei niedermolekularen Wirkstoffen. Ein weit größeres Problem stellt allerdings die Applikation der Proteine dar [2]. Die orale Verabreichung ist noch nicht möglich, da Proteine im sauren Milieu des Magens denaturiert und abgebaut werden. Daher werden Proteine zurzeit fast alle parenteral über Injektionen und Infusionen verabreicht. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass die meisten Proteine in wässriger Lösung nur eine sehr kurze Halbwertszeit haben [3]. Dies bedingt eine mehrmals tägliche Applikation für den Patienten, was häufig zu einer schlechten Compliance führt. Um eine Degradation des Wirkstoffes während der Lagerung bis zur Applikation zu vermeiden, werden die Proteinlösungen häufig lyophilisiert und dann erst frisch vor der Injektion wieder gelöst [4].

Ein neuer Ansatz ist, sich diese deutlich bessere Stabilität der Proteine in fester Form zu Nutze zu machen [5]. So ergibt sich zum einen die Möglichkeit, langzeitstabile Arzneiformen zu entwickeln. Zum anderen kann man auch das Spektrum der möglichen Darreichungsformen erweitern. Eine Möglichkeit ist die pulmonale Applikation, für die gerade ein Insulinpräparat zugelassen wurde [6]. Die Einarbeitung fester Proteine in Depotarzneiformen stellt eine weitere Alternative dar. Proteine könnten so über Wochen oder Monate konstant freigesetzt werden [7], was die Anwendungshäufigkeit deutlich senkt und somit die Compliance erhöht. Auch die Entwicklung von Pulverinjektionen in die Haut kann in Betracht gezogen werden.

Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten ist für alle diese Zubereitungen eine enge Partikelgrößenverteilung wünschenswert. Zudem spielt die Partikelgröße eine entscheidende Rolle. Für die pulmonale Applikation sind Größen im Bereich von 1-10  $\mu\text{m}$

nötig [8]. Auch wenn man an Mikropartikel als eine mögliche Depotarzneiform denkt, sind Proteinpartikel in einem ähnlichen Größenbereich wünschenswert.

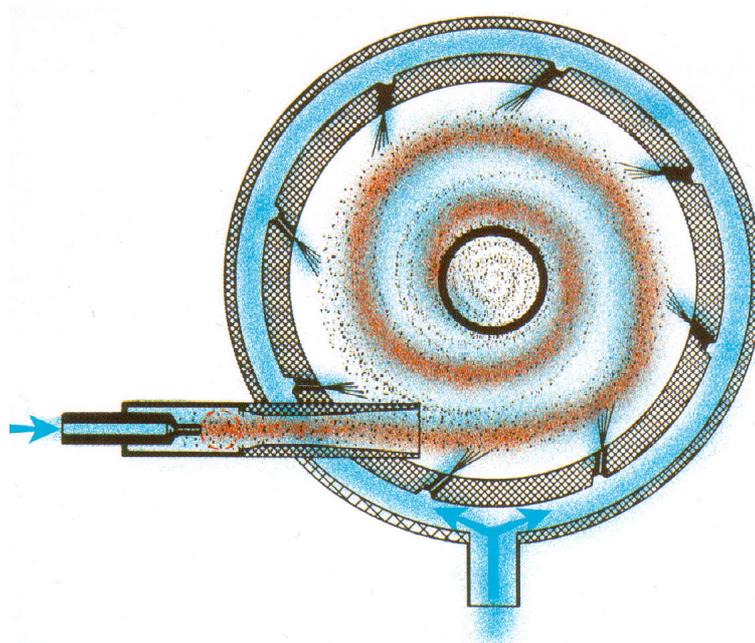
Ziel dieses Projektes war es nun verschiedene Verfahren für die Mikronisierung von Proteinen in ihrer festen Form zu testen, da auf diesem Gebiet bisher erst wenige Erfahrungswerte vorliegen. Gebräuchliche Verfahren wie Präzipitation, Sprühtrocknung, Spray-Freeze-Drying usw., haben häufig den Nachteil, dass die Partikelgrößen nur sehr unzureichend reproduzierbar sind oder sehr große Mengen an Protein für den Prozess gebraucht werden. Daher wurden zwei bereits für die Mikronisierung etablierte Verfahren ausgewählt, die jedoch bisher für die Mikronisierung von Proteinen kaum Anwendung gefunden haben: die Luftstrahlmahlung und die Hochdruckhomogenisation. Diese Auswahl dürfte gerade für kleinere Firmen interessant sein, da man keine neuen Verfahren entwickeln muss sondern evtl. sogar auf bestehende Einrichtungen zurückgreifen kann. Als Modellproteine wurden dabei das kristalline bovine Insulin und amorphes Lysozym ausgewählt.

Die beiden Verfahren sollten hinsichtlich ihrer Zerkleinerungseffektivität und ihres Einflusses auf die Stabilität und die Aktivität der verwendeten Proteine untersucht werden. Dabei sollte besonders der Einfluss variierbarer Prozessparameter auf das resultierende Produkt untersucht werden.

Die resultierenden Proteinpartikel wurden dann in Lipidmikropartikel als eine mögliche Depotarzneiform eingearbeitet und das Freisetzungsverhalten sowie evtl. vorhandene Veränderungen am Protein untersucht.

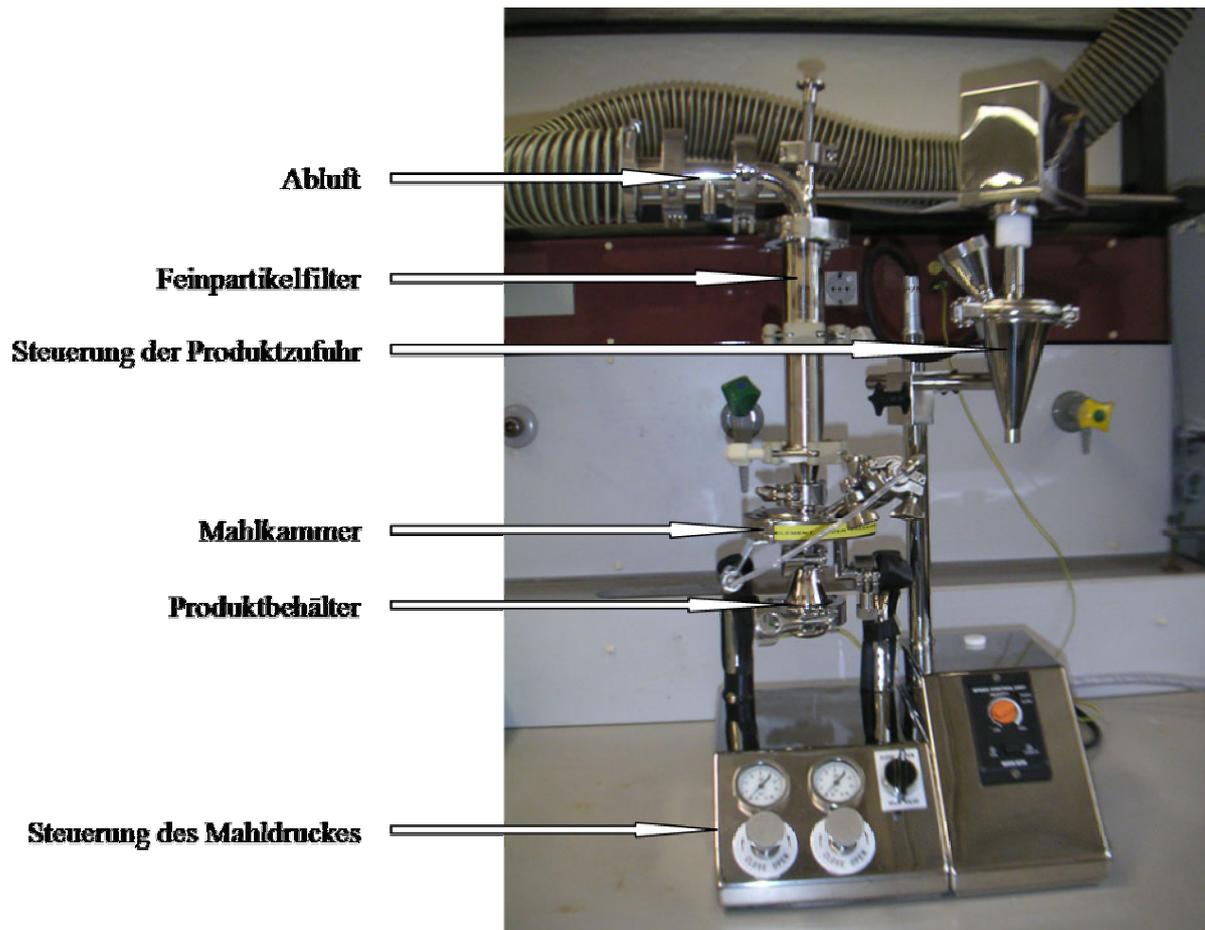
### III. Mikronisierung mittels Luftstrahlmahlung

Die Luftstrahlmahlung ist ein allgemein verbreitetes Verfahren, das häufig für die Feinmahlung eingesetzt wird. Die Zerkleinerung erfolgt dabei durch den Prall der Produktteilchen in einem Gasstrom gegeneinander oder gegen eine starre Oberfläche (Abb. 1) [9]. Bei uns kam eine Spiralstrahlmühle der Firma Jetpharma (MC One) (Abb. 2) zum Einsatz. Es handelt sich dabei um eine Mühle für den Laboreinsatz, mit der sehr geringe Substanzmengen mikronisiert werden können (Minimum von 200 mg).



**Abbildung 1:** Prinzip der Luftstrahlmahlung

Da bei dieser Mikronisierungsmethode keinerlei bewegliche Teile vorhanden sind, ist eine Kontamination durch Schmiermittel nahezu ausgeschlossen. Auch werden keinerlei Lösungs- oder Dispersionsmittel verwendet, so dass ein aufwändiges Abtrennen mit der Gefahr von Rückständen nicht nötig ist. Daher erlaubt die Luftstrahlmahlung ein relativ problemloses Arbeiten unter GMP-Bedingungen.



**Abbildung 2:** Luftstrahlmühle MC One mit Nanofeeder, Jetpharma

Bei der Prallzerkleinerung besteht zwar grundsätzlich die Gefahr, dass kurzfristig hohe Temperaturen auf das Mahlgut einwirken können, allerdings wird dies durch die mit der Expansion des Mahlgases verbundene Abkühlung kompensiert. Somit ist auch eine Zerkleinerung von thermolabilen Stoffen möglich. Im Bedarfsfall kann das Mahlgas zusätzlich vorgekühlt werden. Nachteilig ist, wie bei den meisten Mikronisierungsverfahren, der hohe Energieverbrauch. Auch neigen die feinen Partikel nach dem Mahlvorgang zu Agglomeration und sie sind häufig elektrostatisch aufgeladen. Die Substanzverluste während des Mahlprozesses hängen dabei stark von der eingesetzten Substanzmenge ab. Bei sehr geringen Mengen kann die Ausbeute deutlich absinken.

Für die Mikronisierung von Proteinen in fester Form mittels Luftstrahlmahlung liegen bis jetzt, trotz der oben genannten Vorteile, nur sehr wenige Daten vor [10].

### **III.1. Materialien und Methoden**

#### Modellproteine:

Verwendet wurden amorphes Lysozym aus Hühnereiweiß (Sigma, Deutschland) mit einem Molekulargewicht von 14 kDa und einem d90-Wert von 673 µm und kristallines bovines Insulin (Aventis, Deutschland) mit einem Molekulargewicht von 5,7 kDa und einem d90-Wert von 30 µm.

#### Mikronisierung mittels Luftstrahlmahlung:

Die Proteine wurden mittels einer Mc One® Luftstrahlmühle (Jetpharma, Schweiz) mikronisiert. Als Mahlgas wurde Stickstoff 5.0 aus einer Druckgasflasche verwendet. Das gesamte System war in einen mit Stickstoff gespülten Isolator integriert (rel. Luftfeuchtigkeit <2%). Für die Cryomahlung wurden die Gasleitungen durch flüssigen Stickstoff geführt und die Temperatur des Mahlgases direkt hinter der Mahlkammer gemessen. Es wurden jeweils 500 mg Protein verwendet. Die Produktzufuhr lag bei ca. 120 mg/min.

#### Partikelgrößenbestimmung:

Die Partikel wurden mit Hilfe der Laserdiffraktometrie als Suspension vermessen (Mastersizer 2000; Malvern, UK). Die mit der Luftstrahlmühle mikronisierten Substanzen wurden dazu in Isobutanol dispergiert. Als charakteristische Größe wurde der d90-Wert und der d50-Wert ausgewertet. Sie geben die Größe an, die von 90% bzw. 50% der Partikel unterschritten wird.

#### Morphologie der mikronisierten Partikel:

Die Partikelmorphologie wurde mit rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen bei unterschiedlichen Vergrößerungen untersucht. Verwendet wurde ein JSM 840 (Jeol, Deutschland). Die Proben wurden zuvor in einer SEM Autocoating Unit E2500 (Polaron equipment LTD) mit Gold beschichtet.

### Bestimmung des Eisenabriebs

Eine mikronisierte Probe wurde in der Qualitätskontrolle der Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co. KG in Karlsruhe auf Verunreinigungen mit Metallabrieb untersucht. Die Proben wurden mit Salpetersäure/Salzsäure in einem Hochdruckverascher HPA-S (Anton Paar, Österreich) aufgeschlossen und anschließend mittels Atomabsorptionsspektrometrie (AAS 4100 ZL, Perkin-Elmer, Deutschland) auf ihren Eisengehalt hin untersucht.

### HPLC-Analyse von Lysozym und Insulin:

Die Stabilität des mikronisierten Lysozyms wurde mit einer am Lehrstuhl etablierten HPLC-Methode untersucht. Verwendet wurde dazu eine HPLC-Anlage bestehend aus einer LC-10AT VP HPLC Pumpe, einem DGU-14A Entgaser, einem SIL-10AD VP Injektor, einem SCL-10A VP System Controller, einem CTO-10AS VP Säulenofen und einem SPD-10A VP UV-Detektor (alles Shimadzu, Deutschland).

Lysozym wurde dazu in zweifach destilliertem Wasser gelöst und 50 µl dieser Lösung wurden bei 40°C unter Verwendung einer C-18 RP Analysensäule (Supelcosil, LC-318, 250 mm x 4,6 mm, Supelco, USA) mit einem linearen Fließmittelgradienten (Mobile Phase A: 90% H<sub>2</sub>O, 10% Acetonitril, 0,1% TFA; Mobile Phase B: 10% H<sub>2</sub>O, 90% Acetonitril und 0,1% TFA) bei einer Flussrate von 1 ml/min analysiert. Der Anteil der mobilen Phase B wurde dabei in einen Zeitraum von 25 min linear von 25% auf 40% erhöht. Detektiert wurde das Protein mit dem UV-Detektor bei den Wellenlängen 210 nm und 274 nm.

Insulin wurde in 0,01N HCl gelöst und 50 µl dieser Lösung wurden bei 37°C unter Verwendung einer C-18-RP Analysensäule (Supelcosil, LC318, 4,6 mmx250 mm, Supelco, USA) mit einem linearen Gradienten (Mobile Phase A: 90% H<sub>2</sub>O, 10% Acetonitril, 0,1% TFA; Mobile Phase B: 10% H<sub>2</sub>O, 90% Acetonitril und 0,1% TFA) und mit einer Fließrate von 1 ml/min analysiert. Der Anteil der mobilen Phase B wurde über einen Zeitraum von 24 min linear von 20% auf 36% erhöht. Detektiert wurde mit dem UV-Detektor bei 210 nm und 274 nm, mit dem Fluoreszenz-Detektor bei einer Anregung von 274 nm und einer Emission von 308 nm.

### MALDI Analyse

Als Matrix wurde  $\alpha$ -Cyanohydroxyzimtsäure gelöst in 50% Acetonitril und 0,1% TFA verwendet. Die Proteine wurden in 0,1% TFA gelöst und in der Matrix auf eine Endkonzentration von ca. 5  $\mu$ M verdünnt. Die Messung wurde an einem MALDI TOFTOF (4700 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems, USA) im linearen Modus durchgeführt.

### Biologische Aktivität von Lysozym

Die biologische Aktivität des mikronisierten Lysozyms wurde mit dem Micrococcus Assay bestimmt. Lysozym wurde dazu in 66mM Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer pH 6,24 gelöst und 100  $\mu$ l dieser Lösung mit 2,5 ml einer Zellsuspension von *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma, Deutschland) vermischt. Die Abnahme der Absorption bei 450 nm, bedingt durch die Lyse der Zellen, wurde über 1 min mit dem Uvikon (Kontron Instruments, UK) vermessen. Die Enzymaktivität ergibt sich dabei aus der Geschwindigkeitskonstante der Absorptionsabnahme.

### Biologische Aktivität von bovinem Insulin [11]

Bei diesem Assay macht man sich den Effekt von Insulin auf die Proliferation von Knorpelzellen (Chondrocyten) und die Entwicklung von Knorpelgewebe zu Nutze.

Knorpel wurden unter sterilen Bedingungen aus einem Kälberknie isoliert. Die Gewebestücke wurden über Nacht mit Collagenase verdaut. Die Suspension wurde anschließend durch einen 149  $\mu$ m Filter filtriert und dreimal mit PBS Puffer gewaschen. Die Zellzahl wurde mit einem Hemocytometer bestimmt. Diese frisch isolierten Zellen wurden in einer Fibrinogen-Lösung (100 mg/ml) mit Aprotinin (10000 KIE/ml) suspendiert. Durch Zugabe desselben Volumens einer Thrombin Lösung (5 U/ml) wurden Gele mit einem Volumen von jeweils 40 $\mu$ l hergestellt. Diese Gele wurden für 5 Wochen in jeweils 4 ml Medium kultiviert. Dreimal in der Woche wurde das Medium erneuert. Dem Medium wurde Insulin in einer Konzentration von 0,5  $\mu$ g/ml bzw. 2,5  $\mu$ g/ml zugesetzt.

Nach 5 Wochen wurden die Konstrukte gewogen, die Zellzahl und die Bestandteile der Extrazellulärmatrix (ECM) des entstandenen Knorpelgewebes analysiert. Auch wurden histologische Schnitte angefertigt, in denen die Glycosaminoglycane (GAG), ein Bestandteil der ECM, mit Safranin-O angefärbt wurden.

### III.2. Vorversuche mit unterschiedlichen Modellsubstanzen

In Vorversuchen mit Saccharose, Hydroxylapatit, Dynasan 116 und Alginat wurde die Mühle zu Beginn getestet, um einen gut handhabbaren Ablauf des Mahlprozesses zu entwickeln und evtl. auftretende Probleme frühzeitig zu erkennen. Die Modellsubstanzen deckten dabei ein weites Spektrum an Härtegrad, Kristallstruktur und Hygroskopizität ab. Bei diesen Versuchen konnten der Mahldruck und die Anzahl der Mahlzyklen als entscheidende Faktoren für die resultierende Partikelgrößenverteilung identifiziert werden. Für Saccharose, Hydroxylapatit und Dynasan 116 konnten so Partikelgrößen unter 10  $\mu\text{m}$  erreicht werden (Beispiel siehe Abbildung 3). Für das Alginat waren die Ergebnisse deutlich schlechter (Abb. 4), was sehr wahrscheinlich auf die elastischen Eigenschaften des Produktes zurückzuführen ist.

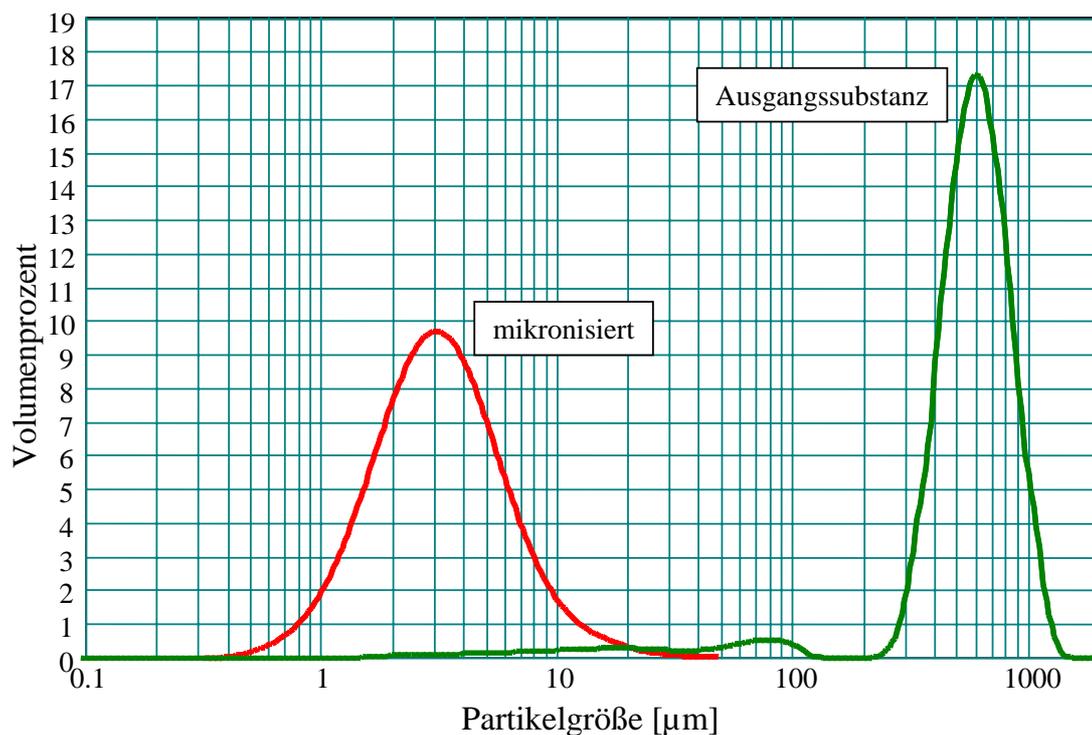
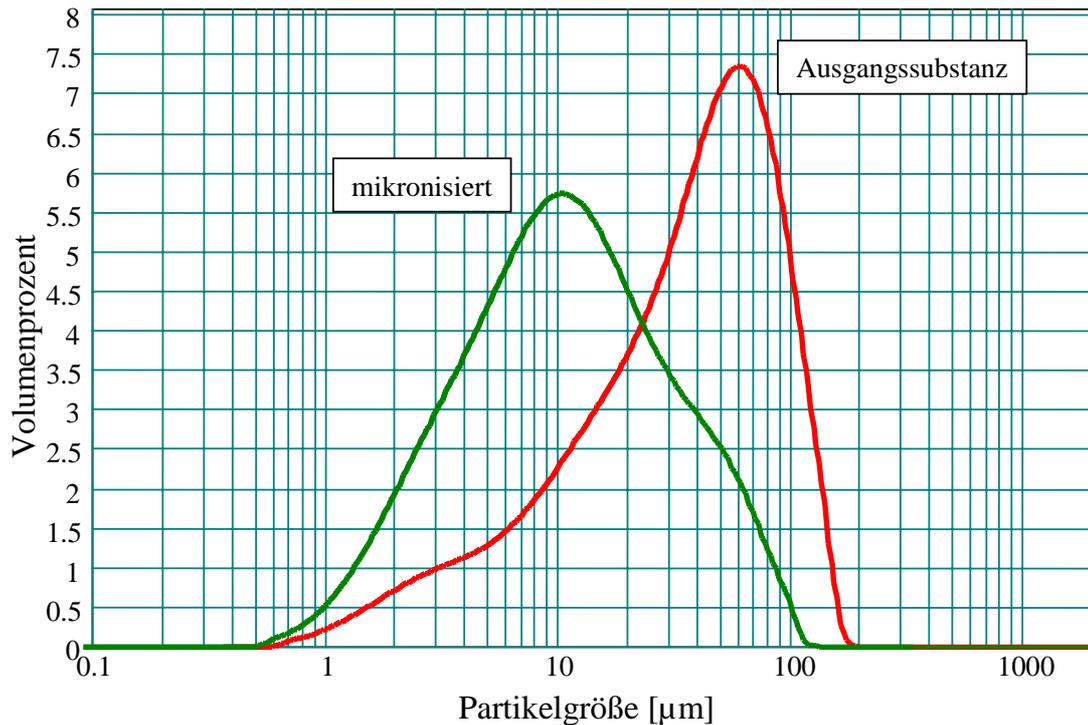
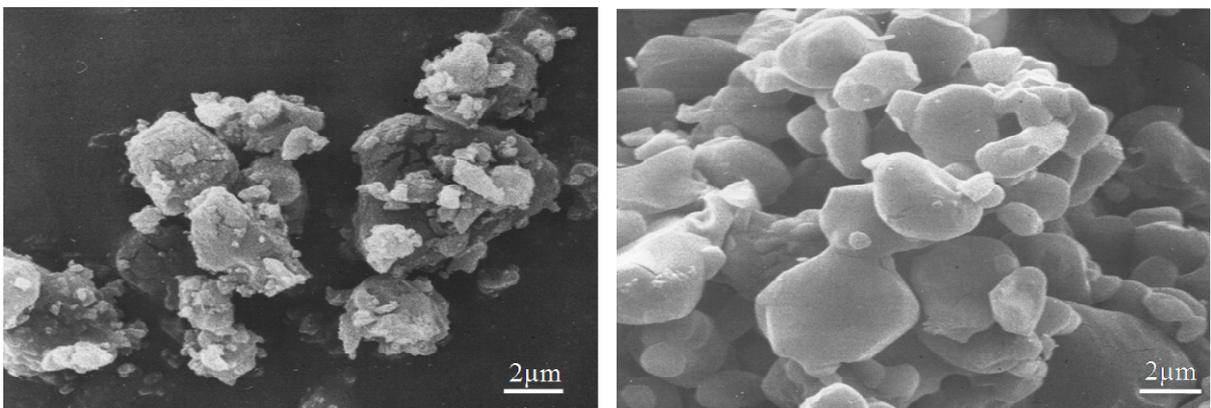


Abbildung 3: Partikelgrößenverteilung von Saccharose vor und nach dem Mikronisieren



**Abbildung 4:** Partikelgrößenverteilung von Alginat vor und nach dem Mikronisieren

Besonders bei der mikronisierten Saccharose konnte bei Lagerung an der Luft ein deutlicher Anstieg der Partikelgröße festgestellt werden. Dieser Effekt wurde mit der Luftfeuchtigkeit in Verbindung gebracht. Um diese Annahme zu bestätigen wurde frisch mikronisierte Saccharose bei 2% und bei 75% rel. Luftfeuchtigkeit gelagert und anschließend die Partikel mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM) untersucht (Abb. 5). Der Einfluss der Luftfeuchtigkeit ist deutlich zu erkennen.

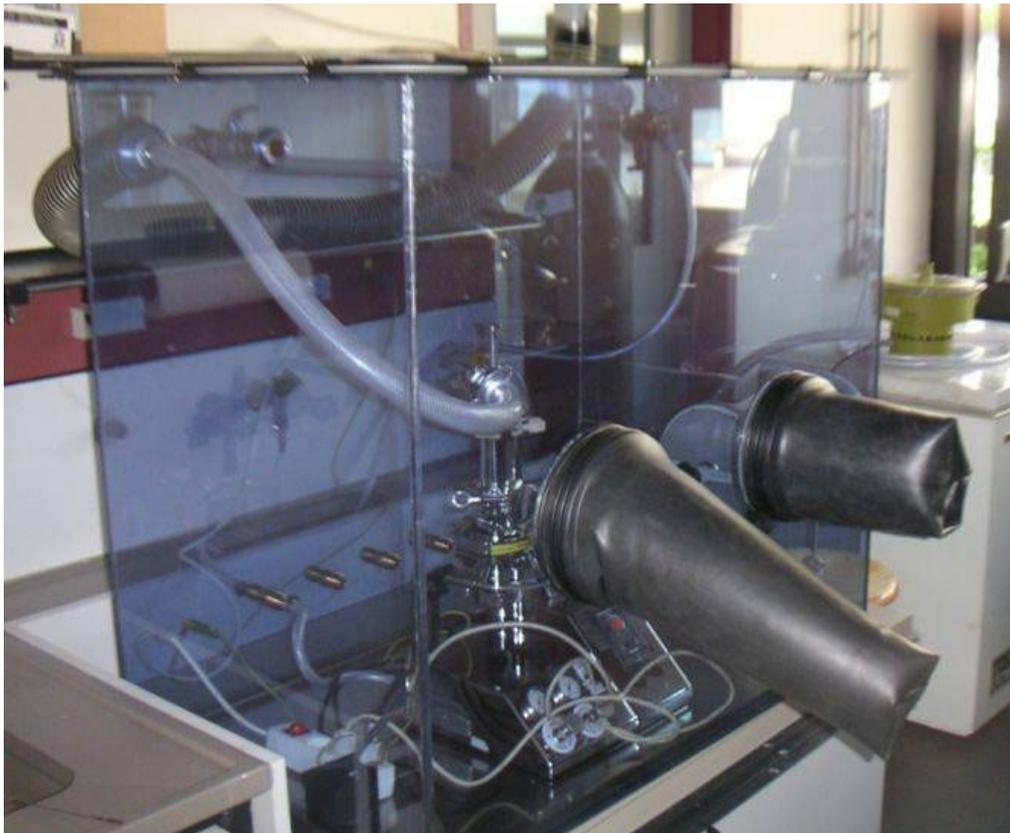


**Abbildung 5:** REM-Bilder von mikronisierter Saccharose a) bei trockener Lagerung, b) nach einer Lagerung bei 75% rel. Luftfeuchtigkeit

### **III.3. Modifikationen und Anpassungen der Luftstrahlmühle**

#### **Ausschluss von Luftfeuchtigkeit**

Wie zuvor beschrieben scheint die Luftfeuchtigkeit ein Hauptfaktor für die Agglomeration der Partikel nach dem Mikronisieren zu sein. Zudem kann auch die biologische Aktivität und chemische Stabilität von Proteinen durch Feuchtigkeit negativ beeinflusst werden [12]. Daher wurde eine Möglichkeit gesucht das Produkt während und nach dem gesamten Mahlprozess vor Luftfeuchtigkeit zu schützen. Dazu wurde die komplette Mühle in einen Isolator integriert (Abb. 6). Der Isolator wurde kontinuierlich mit trockenem Stickstoff gespült. Somit konnten alle im Folgenden beschriebenen Versuche bei einer relativen Luftfeuchtigkeit kleiner als 2% durchgeführt werden.



**Abbildung 6:** Luftstrahlmühle integriert in den mit Stickstoff gespülten Isolator

## Umrüstung der Luftstrahlmühle für die Cryomahlung

In einigen Fällen, besonders bei elastischen Festsubstanzen, kann die Vermahlung bei niedrigen Temperaturen zu einer deutlichen Verbesserung des Mahlergebnisses führen, da es zu einer Versprödung der Substanz kommt [13]. Auch ist ein positiver Effekt auf die chemische Stabilität empfindlicher Substanzen zu erwarten, da mögliche Abbaureaktionen bei niedrigeren Temperaturen reduziert sind.

Das gebräuchlichste Hilfsmittel zur Durchführung einer Cryomahlung ist flüssiger Stickstoff. Da die Mühle und im Besonderen die Ventile zur Regelung des Mahldrucks nicht für diese tiefen Temperaturen ausgelegt sind, musste eine Lösung unter Umgehung dieser Elemente erreicht werden, um noch weitergehende Umbaumaßnahmen zu vermeiden. In mehreren Schritten wurde so eine effektive Kühlung entwickelt.

Nach dem Passieren der Ventile werden die zwei Zuleitungen der Gasströme für die Venturidüse des Produkteinlasses und die Mahlkammer in Wendeln durch Behälter mit flüssigem Stickstoff geführt (Abb. 7). Zur Kontrolle der erreichten Gastemperatur wurde die Temperatur in der Abluft der Mühle kurz hinter der Mahlkammer gemessen. Mit dieser Modifikation konnten Temperaturen von  $-60^{\circ}\text{C}$  erreicht werden.



**Abbildung 7:** Entwickelte Kühlvorrichtung für das Mahlgas. Links die Kühlung der Gaszuleitung der Produktzufuhr, rechts die Kühlung des Gases für die Mahlkammer.

### **III.4. Mikronisierung von Lysozym und Insulin mittels Luftstrahlmahlung**

Der Versuchsplan für die Mikronisierung von Lysozym und Insulin wurde mit Hilfe eines faktoriellen Versuchsdesigns unter Verwendung des Computerprogramms Modde 7.0 (Umetrics AB, Schweden) geplant. Dadurch war es möglich, mit wenigen Versuchen Einflüsse verschiedener Faktoren auf das Ergebnis genau zu analysieren.

Als variable Faktoren wurden basierend auf den Vorversuchen der Mahldruck, die Anzahl der Mahlzyklen und die Temperatur des Mahlgases ausgewählt. Für Druck und Zyklenzahl wurden ein minimaler und ein maximaler Wert festgelegt. Daraus ergab sich eine mittlere Stufe, der so genannte Centerpoint. Für die Temperatur des Mahlgases wurden die Stufen „Kühlung an“ und „Kühlung aus“ festgelegt.

<b>Faktoren</b>	<b>Minimum</b>	<b>Mittlere Stufe</b>	<b>Maximum</b>
<b>Druck</b>	7 bar	11 bar	15 bar
<b>Anzahl der Mahlzyklen</b>	1	2	3
<b>Kühlung des Mahlgases</b>	an		aus

Daraus ergab sich ein Versuchsdesign mit 22 einzelnen Experimenten:

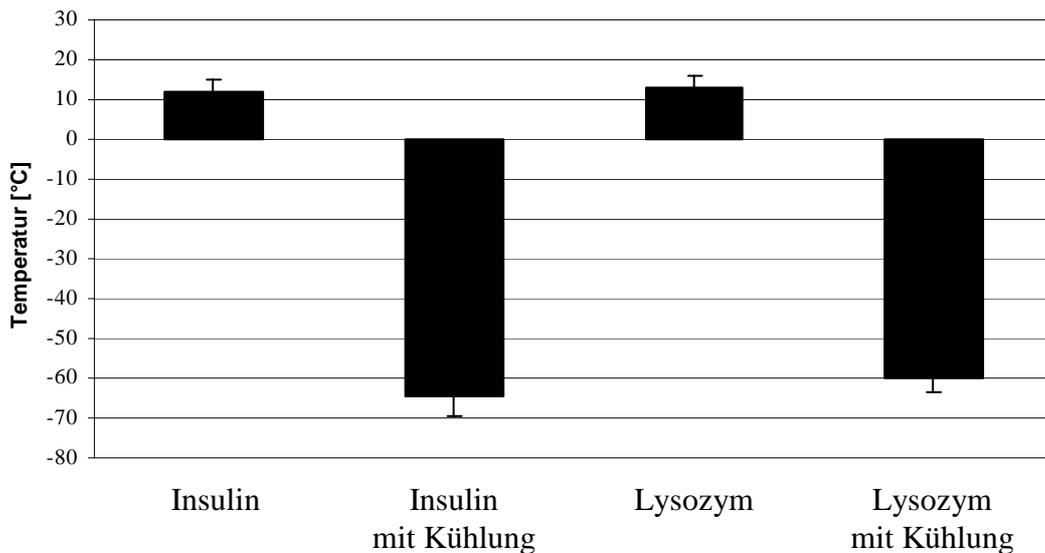
Experiment	Mahldruck	Mahlzyklenzahl	Kühlung
1	7	1	an
2	15	1	an
3	7	3	an
4	15	3	an
5	7	2	an
6	15	2	an
7	11	1	an
8	11	3	an
9	11	2	an
10	11	2	an
11	11	2	an
12	7	1	aus
13	15	1	aus
14	7	3	aus
15	15	3	aus
16	7	2	aus
17	15	2	aus
18	11	1	aus
19	11	3	aus
20	11	2	aus
21	11	2	aus
22	11	2	aus

Die Morphologie, Stabilität und Aktivität der erhaltenen Produkte wurden einheitlich charakterisiert (siehe Abschnitt Materialien und Methoden).

## Ergebnisse:

### Messung der Temperatur als ein Parameter

Bei der Messung der Temperatur der Abluft konnte gezeigt werden, dass die entwickelte Vorrichtung für die Cryomahlung gut funktioniert und reproduzierbare Temperaturen erreicht werden konnten (Abb. 8).



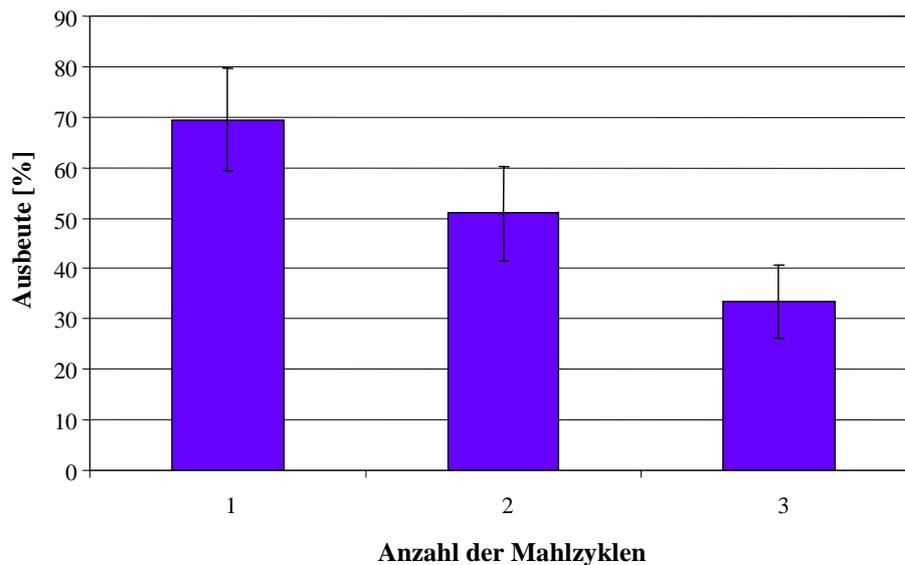
**Abbildung 8:** In der Abluft gemessene Temperatur während des Mahlvorgangs

### Bestimmung des Eisenabriebs

Bei der Analyse des Eisengehaltes von Lysozym vor der Mikronisierung und nach dreimaligem Mahlen bei 11 bar konnte eine Erhöhung der Eisenkonzentration festgestellt werden. Der Gehalt vergrößerte sich dabei von 4  $\mu\text{g/g}$  in der Ausgangssubstanz auf 25,1  $\mu\text{g/g}$  nach den Mikronisierungsschritten. Dies kann aus dem Prall der sehr schnellen Partikel (bis zu 300 m/s) auf die Wandung der Mahlkammer resultieren.

### Substanzausbeute nach der Mikronisierung

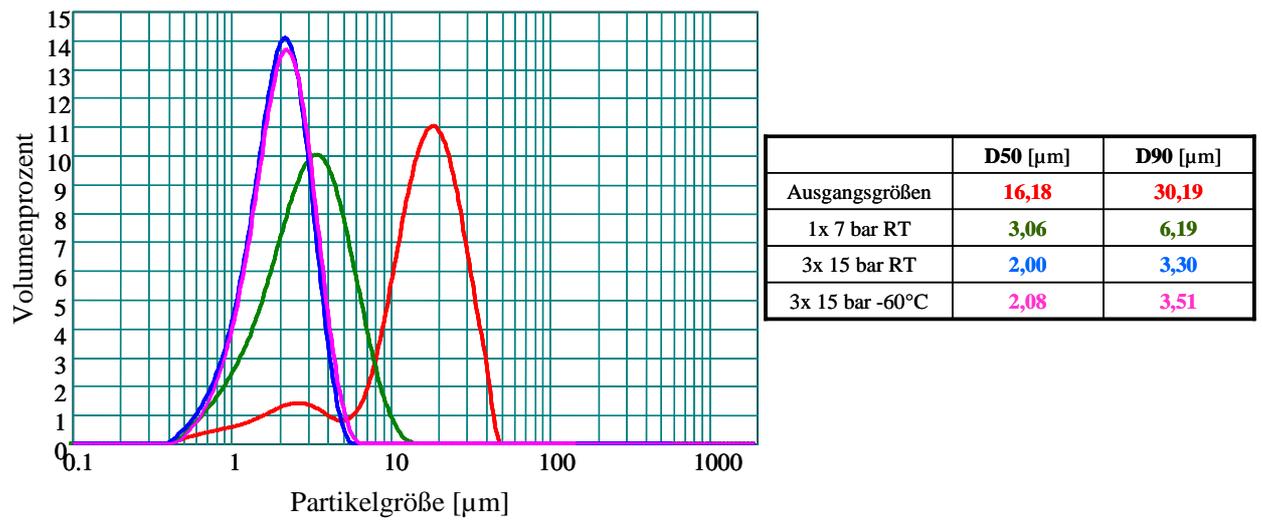
Wie man in Abbildung 9 deutlich sehen kann sinkt die Ausbeute bei einer Ausgangssubstanzmenge von 500 mg um 20-30% pro Mahlzyklus. Diese Abnahme ist bei so geringen Mengen wesentlich deutlicher ausgeprägt als bei der Vermahlung von mehreren Gramm.



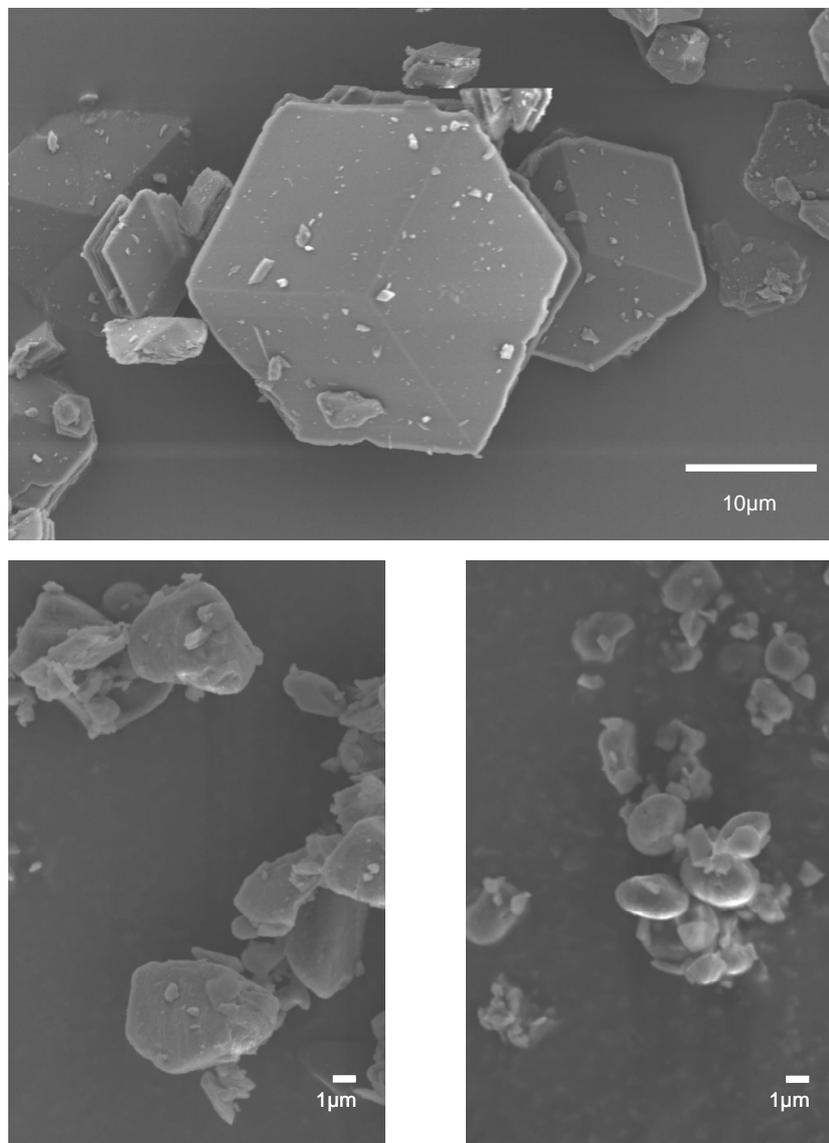
**Abbildung 9:** Abnahme der Substanzmenge in Abhängigkeit von der Anzahl der Mahlzyklen bei einer Einwaage von 500 mg

#### Partikelgrößen und Morphologie:

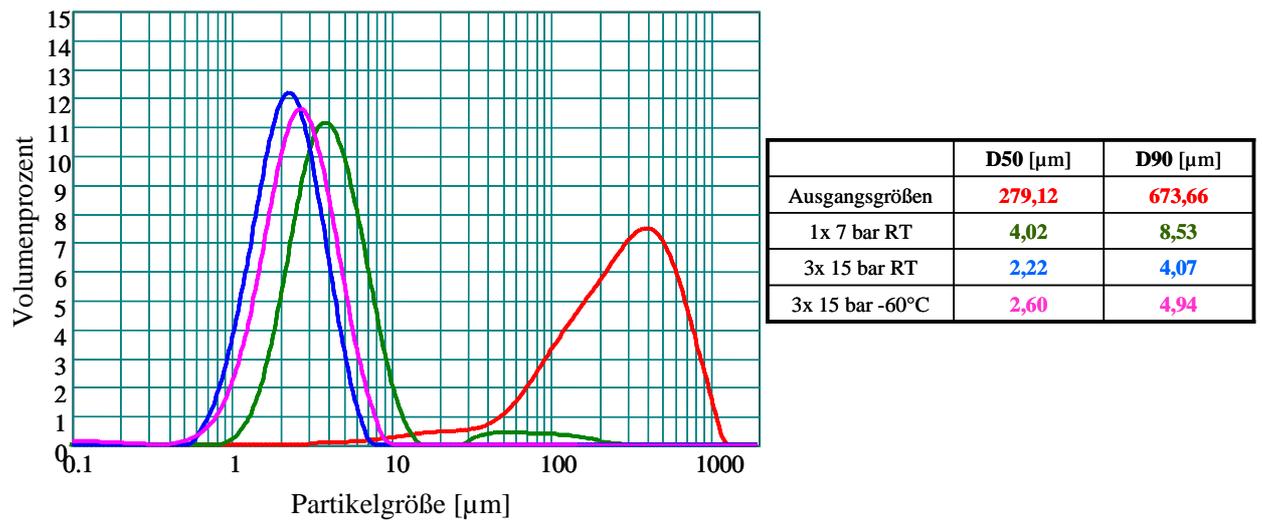
Bei beiden Modellproteinen führte die Mikronisierung mittels Luftstrahlmahlung zu einer deutlichen Verkleinerung der Partikelgröße. Die Insulinkristalle wiesen nach einem Zyklus bei 7 bar nur noch einen d90-Wert von 6,1  $\mu\text{m}$  auf. Nach 3 Zyklen bei 15 bar konnte der d90-Wert sogar auf 3,3  $\mu\text{m}$  reduziert werden (Abb. 10). Für Lysozym wurden nach einem Zyklus bei 7 bar 8,6  $\mu\text{m}$  und nach dreimaligem Mahlen bei 15 bar 4,1  $\mu\text{m}$  als d90-Wert gemessen (Abb. 12). Diese mittels Laserdiffraktometrie gemessenen Größen konnten mit den Rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen bestätigt werden (Abb. 11 und 13). Die Reduktion der Partikelgröße durch die Mikronisierung ist deutlich zu sehen. Auch kann man erkennen, dass mit einer steigenden Anzahl von Mahlzyklen und erhöhtem Druck wesentlich homogenere Partikelgrößenverteilungen erreichbar sind. Die Partikel werden dabei immer abgerundeter, sehr wahrscheinlich durch die wiederholte Reibung aneinander und an der Wandung des Zyklonabscheiders.



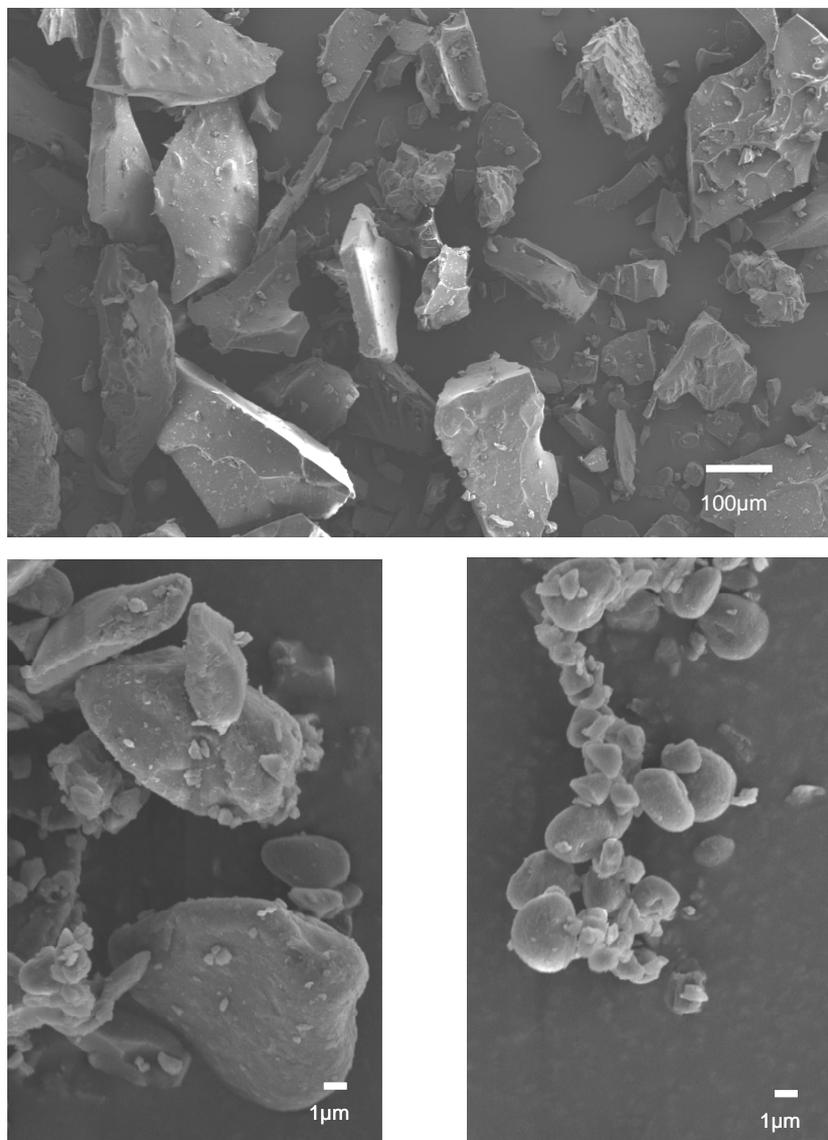
**Abbildung 10:** Vergleich der Partikelgrößenverteilungen von Insulin nach der Mikronisierung unter unterschiedlichen Bedingungen



**Abbildung 11:** REM-Bilder von a) den nativen Insulinkristallen, b) 1x bei 7 bar und c) 3x bei 15 bar mikronisiertem Insulin



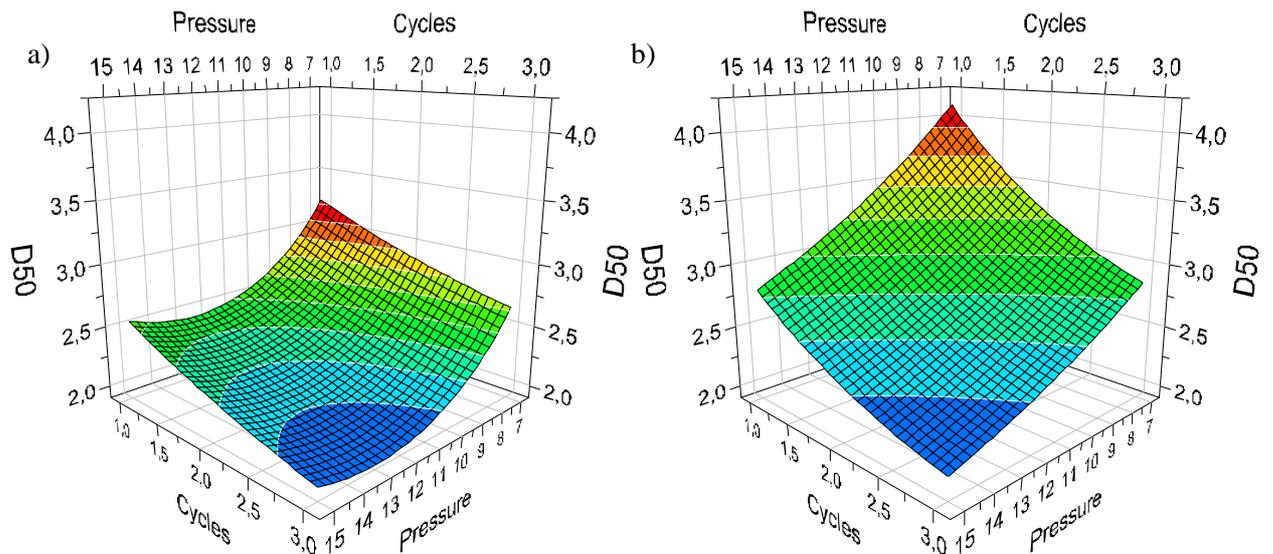
**Abbildung 12:** Vergleich der Partikelgrößenverteilungen von unter unterschiedlichen Bedingungen mikronisiertem Lysozym



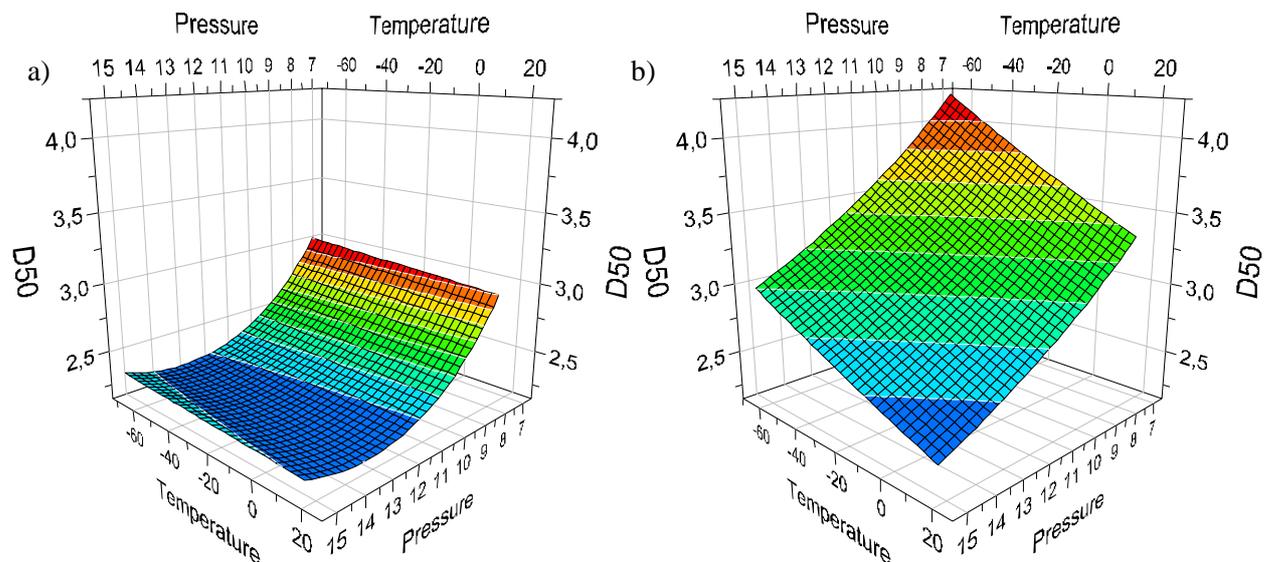
**Abbildung 13:** REM-Bilder von a) den nativen Lysozympartikeln, b) 1x bei 7 bar und c) 3x bei 15 bar mikronisiertem Lysozym

### Einfluss der verschiedenen Parameter auf die Partikelgröße:

Bei Auswertung der erzielten Partikelgrößen konnte die Größe des Einflusses der verschiedenen variierten Faktoren auf das Mahlergebnis untersucht werden. Der verwendete Mahldruck und die Anzahl der Mahlzyklen hatten wie erwartet einen deutlichen Einfluss auf die resultierende Partikelgröße (Abb. 14). Die Mahlung bei  $-60^{\circ}\text{C}$  brachte keinerlei verbesserte Mahlwirkung bei den verwendeten Proteinen. Bei Lysozym konnte sogar ein eher negativer Effekt beobachtet werden (Abb. 15).



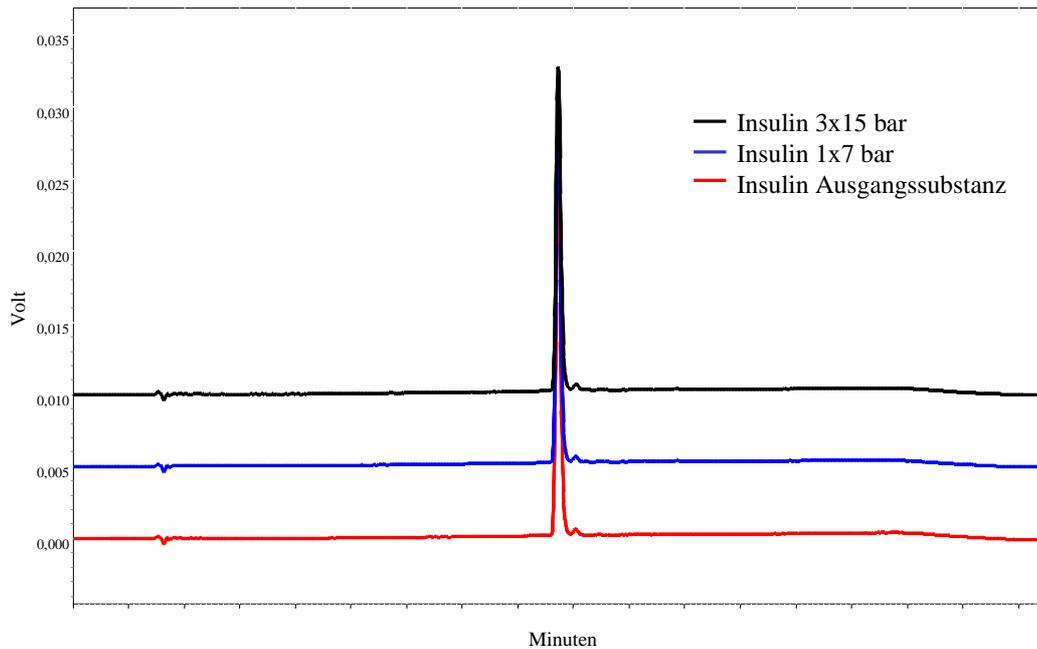
**Abbildung 14:** Darstellung des Einflusses von Mahldruck und Anzahl der Mahlzyklen auf die Partikelgröße (d50-Wert) für a) Insulin und b) Lysozym



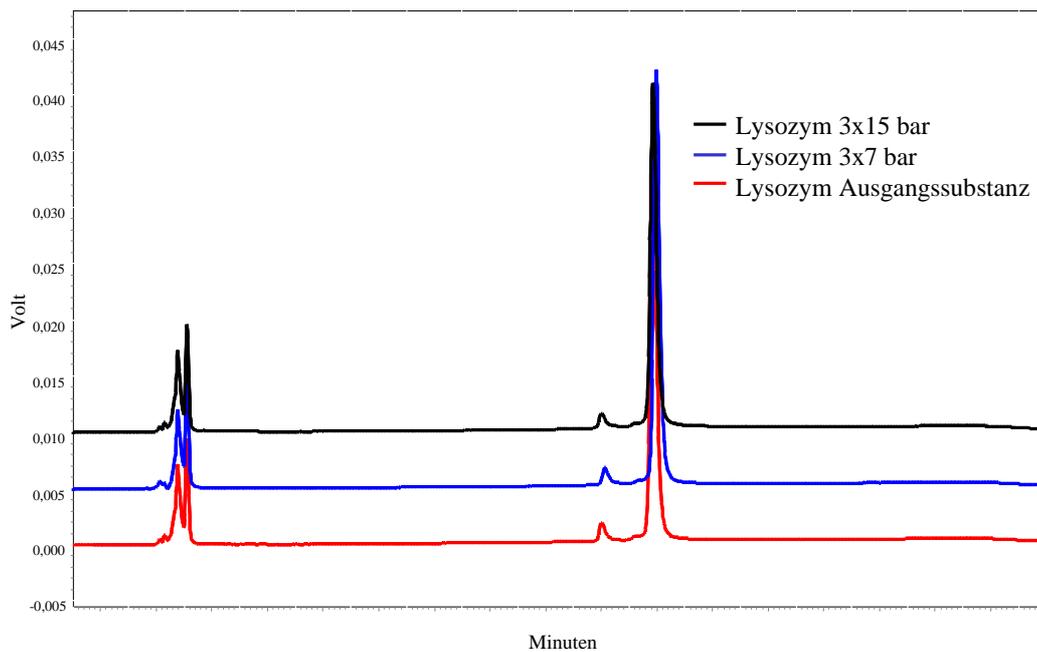
**Abbildung 15:** Darstellung des Einflusses von Mahldruck und Temperatur des Mahlgases auf die Partikelgröße (d50-Wert) für a) Insulin und b) Lysozym

### Untersuchung der chemischen Stabilität mittels HPLC:

Mittels der HPLC- Analytik konnten weder für das bovine Insulin (Abb. 16) noch für Lysozym (Abb. 17) Veränderungen durch den Mahlprozess festgestellt werden. Der zusätzliche kleine Peak im Diagramm des Insulins konnte als Desamidinsulin identifiziert werden, was auch im Zertifikat der Ausgangssubstanz aufgeführt ist. Der kleine Peak des Lysozyms ist aus der Literatur bekannt, wurde aber noch nicht näher charakterisiert [14].



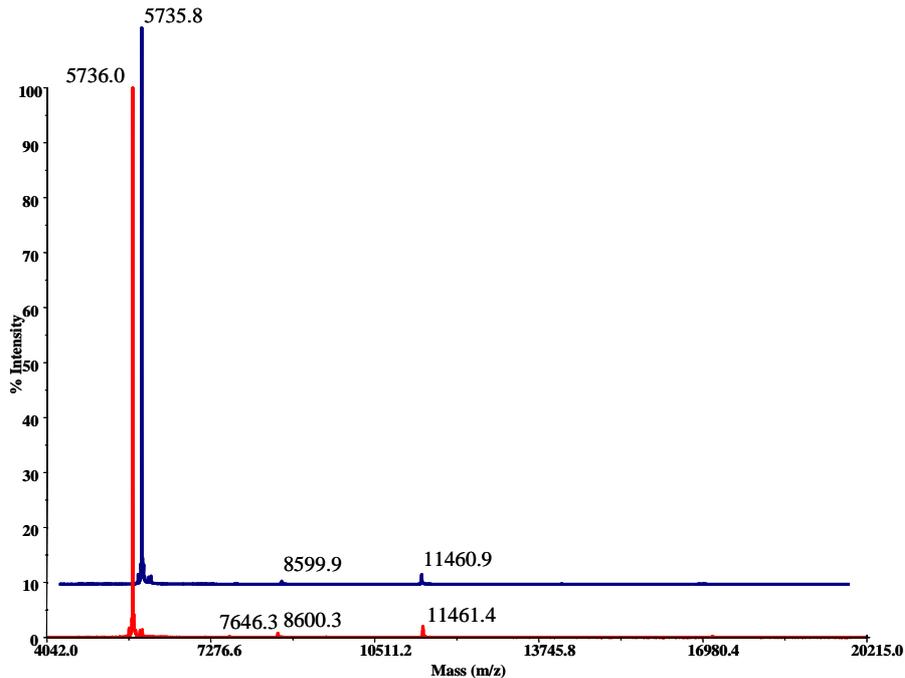
**Abbildung 16:** HPLC-Analyse von unbehandeltem und mikronisiertem Insulin



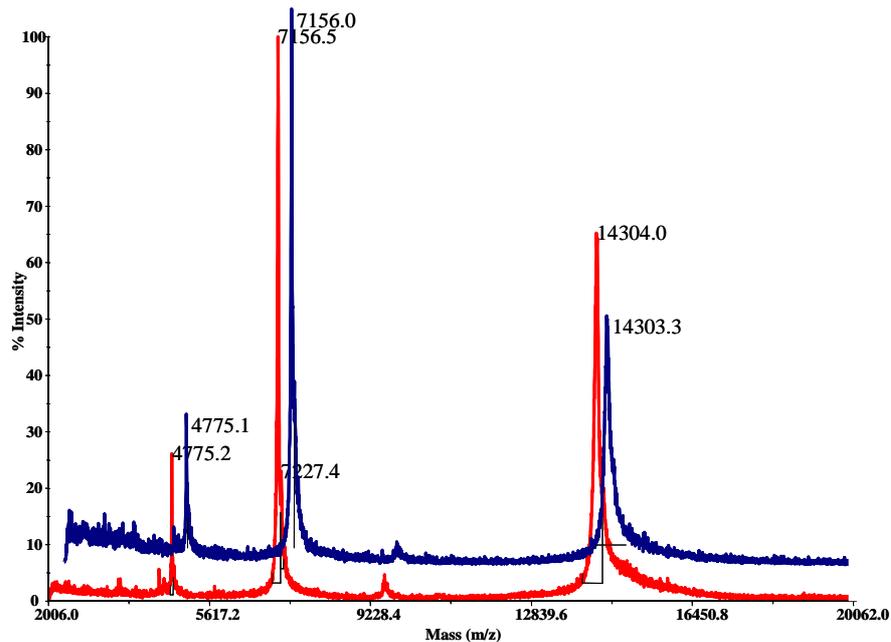
**Abbildung 17:** HPLC-Analyse von unbehandeltem und mikronisiertem Lysozym

## Untersuchung der chemischen Stabilität mittels MALDI

Auch in der massenspektrometrischen Untersuchung der beiden Proteine konnten keinerlei Unterschiede im Vergleich zur nicht mikronisierten Ausgangssubstanz festgestellt werden (Abb. 18 und 19). Das Desamidoinsulin ist auf Grund des Unterschieds von nur einer Masseneinheit zum nativen Insulin nicht nachweisbar. Zu beachten ist, dass der Hauptpeak mit 7156 m/z im Spektrum für Lysozym durch das zweifach geladene Molekül verursacht wird.



**Abbildung 18:** MALDI-Analyse von unbehandeltem und mikronisiertem Insulin

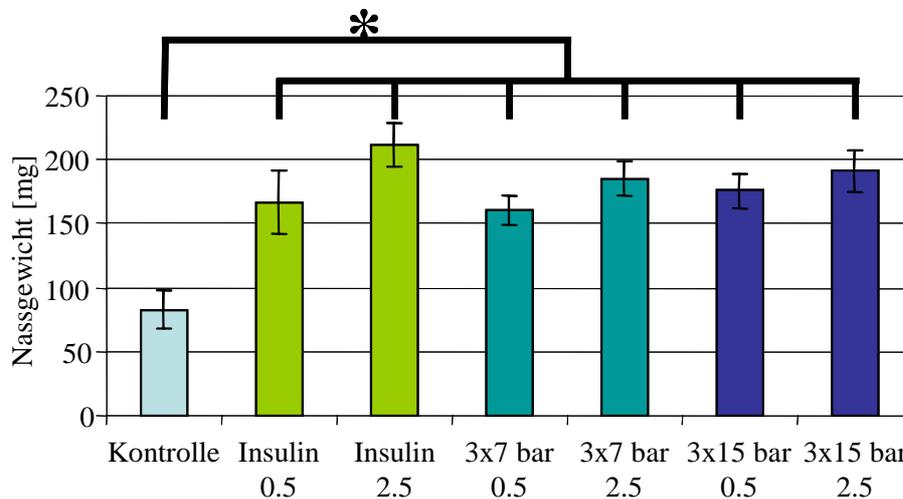


**Abbildung 19:** MALDI-Analyse von unbehandeltem und mikronisiertem Lysozym

## Untersuchung der Bioaktivität

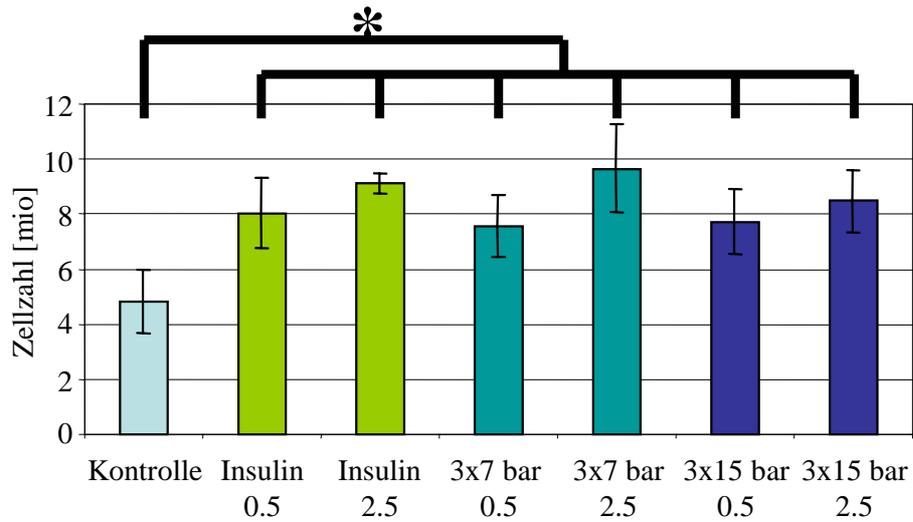
### Insulin

Mit Hilfe eines 3D-Chondrozyten-Assays konnte die Bioaktivität des mikronisierten bovines Insulins nachgewiesen werden. Insulin wirkt sich positiv auf die Bildung von Knorpelgewebe aus. So konnte bei den Gruppen, denen Insulin im Medium zugegeben wurde, eine deutliche Gewichtszunahme der Konstrukte nach 5 Wochen im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Insulin festgestellt werden (Abb. 20). Zwischen den Gruppen mit mikronisiertem Insulin und der Gruppe mit unbehandeltem Insulin konnten keinerlei Unterschiede festgestellt werden.



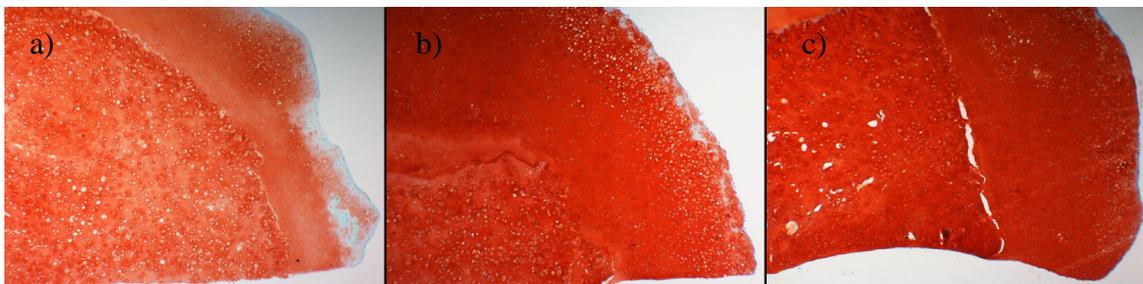
**Abbildung 20:** Gewicht der einzelnen Konstrukte nach einer Kultivierung von 5 Wochen ( $p < 0,01$ )

Mit der Bestimmung der Zellzahl konnte gezeigt werden, dass diese Gewichtszunahme sehr gut mit der Proliferation der Zellen korreliert (Abb. 21). Auch hier ist keine Abnahme in der Aktivität des gemahlten Insulins zu erkennen.



**Abbildung 21:** Zellzahl pro Konstrukt nach einer Kultivierung von 5 Wochen ( $p < 0,01$ )

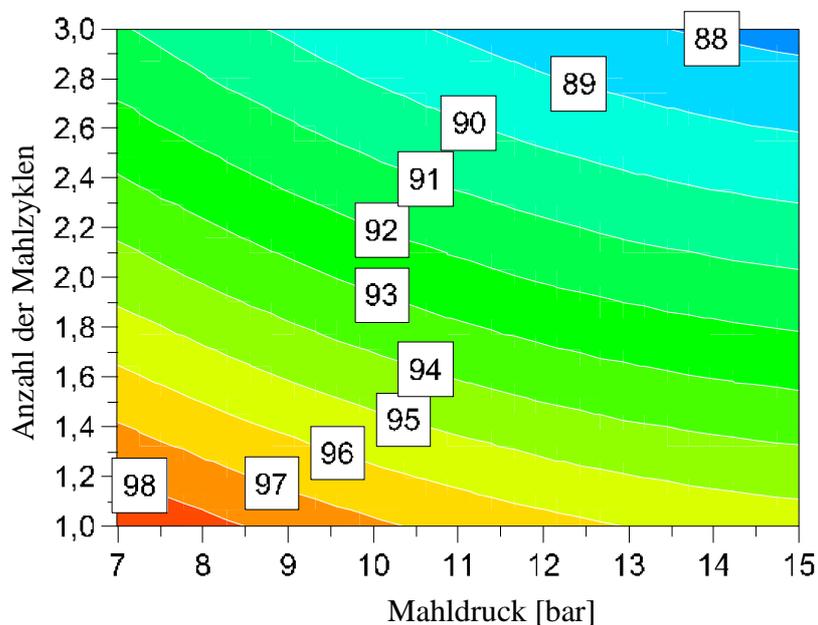
Diese Befunde werden bei Betrachtung der mit Safranin-O gefärbten histologischen Schnitte bestätigt (Abb. 22). Die Gruppen mit Insulin zeigen eine wesentlich intensivere Rotfärbung als die Kontrolle. Durch das Safranin-O werden die Glycosaminoglycane der Extrazellulärmatrix angefärbt, die ein Marker für die Qualität des entstandenen Knorpelgewebes sind.



**Abbildung 22:** Histologische Schnitte der Konstrukte. Anfärbung der Extrazellulärmatrix mit Safranin-O. a) Kontrolle ohne Insulin, b) unbehandeltes Insulin 2,5 µg/ml, c) Insulin 3x bei 15 bar mikronisiert 2,5 µg/ml

## Lysozym

Bei der Analyse der Aktivität des Lysozyms konnte eine gewisse Aktivitätsabnahme in Abhängigkeit vom verwendeten Mahldruck und der Anzahl der Mahlzyklen festgestellt werden (Abb. 23). So konnte bei den drastischsten Bedingungen von 15 bar und 3 Mahlzyklen eine Abnahme auf 88 Prozent im Vergleich zum Ausgangsmaterial beobachtet werden. Besonders die Anzahl der Mahlzyklen wirkte sich negativ auf die Bioaktivität des Lysozyms aus. Für die Cryomahlung konnte kein positiver Effekt auf die Aktivität festgestellt werden.



**Abbildung 23:** Darstellung des Einflusses von Druck und Zyklenzahl auf die Bioaktivität von Lysozym (Aktivität in Prozent der Ausgangssubstanz)

### **III.5. Zusammenfassung der Ergebnisse zur Luftstrahlmahlung**

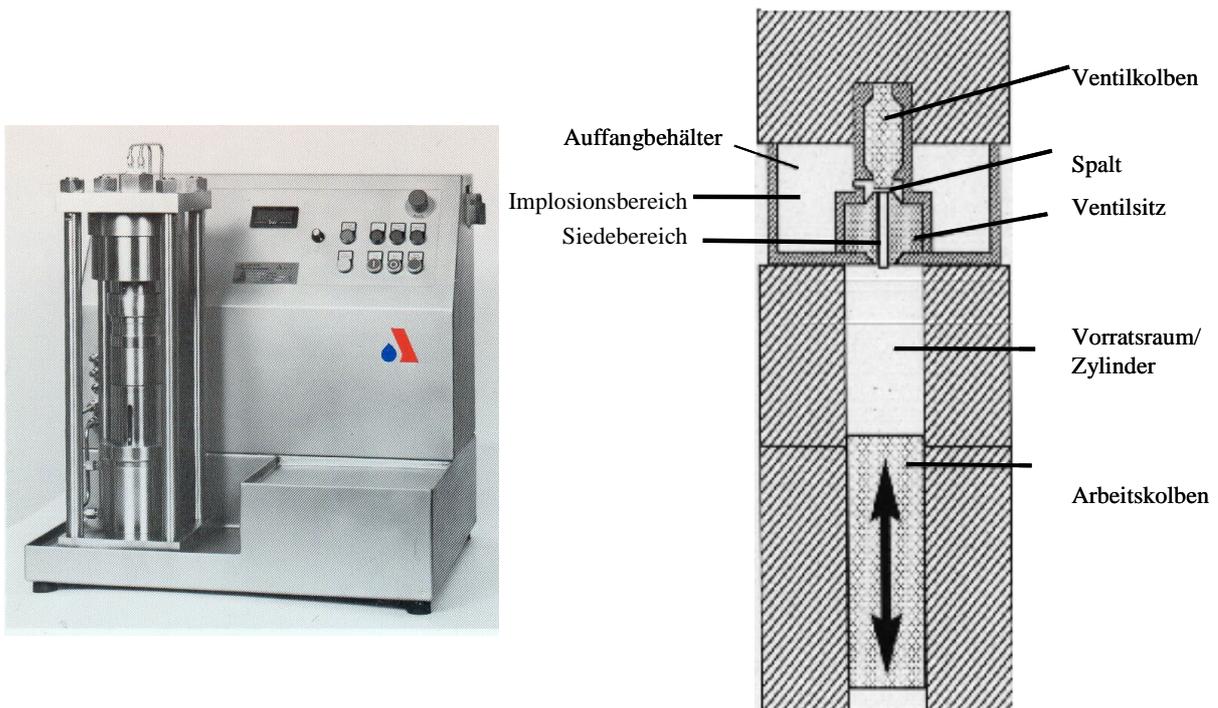
Die Eignung der Luftstrahlmahlung zur Mikronisierung von Proteinen konnte gezeigt werden. Es konnten Partikelgrößenverteilungen mit einem d50-Wert deutlich unter 5 µm ohne Probleme erreicht werden, was eine Vielzahl von Anwendungen ermöglichen könnte. Hinweise auf eine chemische Instabilität durch den Mahlprozess konnten nicht gefunden werden. Allerdings zeigt sich bei Lysozym ein negativer Einfluss bei hohem Mahldruck und einer vermehrten Anzahl von Mahlzyklen auf die Bioaktivität. Die Ursache für diese Abnahme muss noch weitergehend untersucht werden.

Basierend auf diesen Ergebnissen kann man folgern, dass 1 Mahlzyklus bei einem mittleren Mahldruck zu den besten Ergebnissen führt. So können sehr kleine Partikelgrößen mit einer engen Verteilung erreicht werden. Die Erhöhung von Druck und Zyklenzahl führt im Hinblick auf Partikelgröße und Verteilung zwar zu noch besseren Ergebnissen, allerdings sind diese Veränderungen eher gering, wenn man bedenkt, dass sich das Risiko der Schädigung der Proteine damit deutlich erhöht. Auch sinkt die Ausbeute des Mahlprozesses verständlicherweise mit jedem zusätzlichen Mahlzyklus.

## IV. Mikronisierung mittels Hochdruckhomogenisation

Die Hochdruckhomogenisation ist ein bekanntes Verfahren zur Herstellung von Mikro- und Nanoemulsionen sowie von Nanosuspensionen schwerlöslicher Arzneistoffe [15]. Allerdings wurden bis jetzt nur niedermolekulare Substanzen mit diesem Verfahren mikronisiert. Das disperse System wird dabei mit hohem Druck durch einen engen Spalt gepresst. Dabei kommt es durch die Abnahme des statischen Drucks zum Sieden der Flüssigkeit. Bei dem Austreten aus dem Spalt steigt der statische Druck wieder sprunghaft an und es kommt zur Implosion (Kavitation) der entstandenen Gasblasen. Die bei diesem Vorgang auftretenden Kräfte, führen zur Zerkleinerung der dispersen Phase.

Das Verfahren wird im Rahmen des Projektes für die Mikronisierung von wasserlöslichen Proteinen in lipophilen Dispersionsmedium (Miglyol) getestet.



**Abbildung 24:** Hochdruckhomogenisator und schematischer Querschnitt

## **IV.1. Materialien und Methoden**

### Modellproteine:

Verwendet wurden amorphes Lysozym aus Hühnereiweiß (Sigma, Deutschland) mit einem Molekulargewicht von 14 kDa und einem d90-Wert von 673 µm und kristallines bovines Insulin (Aventis, Deutschland) mit einem Molekulargewicht von 5,7 kDa und einem d90-Wert von 30 µm.

### Mikronisierung mittels Hochdruckhomogenisation

Die Proteine wurden in 40 ml sterilfiltriertem Miglyol 812 (Sasol AG, Deutschland) mit einem Ultra-Turrax für 2 min bei 10.000 UpM suspendiert und anschließend im Hochdruckhomogenisator (APV Gaulin Micron Lab 40, APV, Deutschland) (Abb. 24) mikronisiert. Nach jedem Zyklus wurde die Suspension wieder auf 20°C abgekühlt, um negative Einflüsse durch den Temperaturanstieg während des Prozesses zu vermeiden.

### Partikelgrößenbestimmung:

Die Partikel wurden mit Hilfe der Laserdiffraktometrie als Suspension vermessen (Mastersizer 2000; Malvern, UK). Die mittels Hochdruckhomogenisation mikronisierten Substanzen wurden dazu direkt im Dispersionsmittel Miglyol vermessen. Als charakteristische Größe wurde der d90-Wert und der d50-Wert ausgewertet. Er gibt die Größe an, die von 90% bzw. 50% der Partikel unterschritten wird.

### Bestimmung des Eisenabriebs

Eine mikronisierte Probe wurde in der Qualitätskontrolle der Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co. KG in Karlsruhe auf Verunreinigungen mit Metallabrieb untersucht. Die Proben wurden mit Salpetersäure/Salzsäure in einem Hochdruckverascher HPA-S (Anton Paar, Österreich) aufgeschlossen und anschließend mittels Atomabsorptionsspektrometrie (AAS 4100 ZL, Perkin-Elmer, Deutschland) auf ihren Eisengehalt hin untersucht.

### Extraktion der Proteinpartikel aus Miglyol

Die zu untersuchende Suspension wird dreimal mit je 20 ml Ethanol gewaschen und bei 3500 UpM der Feststoff abzentrifugiert. Anschließend werden die Substanzproben bei Raumtemperatur zur Entfernung des Ethanol getrocknet.

### Morphologie der mikronisierten Partikel:

Die Partikelmorphologie wurde mit rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen bei unterschiedlichen Vergrößerungen untersucht. Verwendet wurde ein JSM 840 (Jeol, Deutschland). Die Proben wurden zuvor in einer SEM Autocoating Unit E2500 (Polaron equipment LTD) mit Gold beschichtet.

### HPLC-ESI von Insulin

Für die HPLC-ESI Analyse wurde eine Hewlett Packard HPLC mit einem Serie 11000 Entgaser, binärer Pumpe, Autosampler, Ofen und DAD (alles Hewlett Packard; Deutschland), kombiniert mit einer API2-Einheit (Kapillartemperatur 350°C, Sprühspannung 4,6 kV) verwendet. Insulin wurde dabei als dreifach geladenes Ion detektiert.

### Biologische Aktivität von Lysozym

Die biologische Aktivität des aus den Mikropartikeln extrahierten mikronisierten Lysozyms wurde mit dem Micrococcus Assay bestimmt. Lysozym wurde dazu in 66mM Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer pH 6,24 gelöst und 100 µl dieser Lösung mit 2,5 ml einer Zellsuspension von Micrococcus lysodeikticus (Sigma, Deutschland) vermischt. Die Abnahme der Absorption bei 450 nm, bedingt durch die Lyse der Zellen, wurde über 1 min mit dem Uvikon (Kontron Instruments, UK) vermessen. Die Enzymaktivität ergibt sich dabei aus der Geschwindigkeitskonstante der Absorptionsabnahme. Als Kontrolle wurde nicht mikronisiertes Lysozym den gleichen Extraktionsprozessen unterzogen.

#### Bestimmung der Bioaktivität des mikronisierten Insulins:

Die Bioaktivität wurde mit einem 2D Chondrozyten-Proliferationsassay getestet. Ausgenutzt wurde dabei der proliferationsfördernde Effekt von Insulin auf Chondrocyten. Dazu wurden Knorpelzellen aus einem Rinderknie isoliert und für die Zellkultur vorbereitet. Nach der dritten Passage wurden je 12.500 Zellen in 12 Well-Plates ausgesät und für drei Tage in 2 ml Zellkulturmedium versetzt mit nativen oder mikronisiertem Insulin in den Konzentrationen 0,1, 2,5 und 5 µg/ml (n=5 für jede Gruppe) kultiviert. Das Kulturmedium wurde alle 2 Tage erneuert. Nach drei Tagen wurden die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin-Lösung 30 min bei 37°C trypsinisiert. Die Reaktion wurde nach dieser Zeit durch Zugabe von 1ml CCM gestoppt. Die Zellen wurde anschließend in 200 ml sterilfiltrierter, isotonischer NaCl-Lösung suspendiert und mit einem Coulter Counter gezählt (Coulter Multisizer II; Beckmann Coulter, Deutschland).

#### **IV.2. Mikronisierung von Insulin und Lysozym mittels Hochdruckhomogenisation**

Die Eignung des Hochdruckhomogenisators für die Mikronisierung von Proteinen in fester Form wurde im Rahmen eines Box-Behnken Versuchdesigns mit bovinem Insulin und Lysozym als Modellproteine analysiert. Zum Erstellen des Versuchsplans und zur Auswertung wurde das Programm Modde 7.0 (Umetrics AB, Schweden) eingesetzt.

Als variable Faktoren der Mikronisierung wurden der Druck, die Anzahl der Homogenisationszyklen und die Wirkstoffkonzentration in der Suspension ausgewählt. Die einzelnen Stufen wurden wie folgt festgelegt:

Faktoren		Level		
		-1	0	1
X1	Druck [bar]	500	1000	1500
X2	Anzahl der Zyklen	1	4	6
X3	Wirkstoffkonzentration [mg/ml]	0,2	0,6	1

Daraus ergibt sich im Box-Behnken Design eine Matrix mit 15 einzelnen Experimenten:

Nr.	X1	X2	X3
1	500	1	0,6
2	1500	1	0,6
3	500	6	0,6
4	1500	6	0,6
5	500	4	0,2
6	1500	4	0,2
7	500	4	1,0
8	1500	4	1,0
9	1000	1	0,2
10	1000	6	0,2
11	1000	1	1,0
12	1000	6	1,0
13	1000	4	0,6
14	1000	4	0,6
15	1000	4	0,6

Diese Versuche wurden in einer zufälligen Reihenfolge durchgeführt.

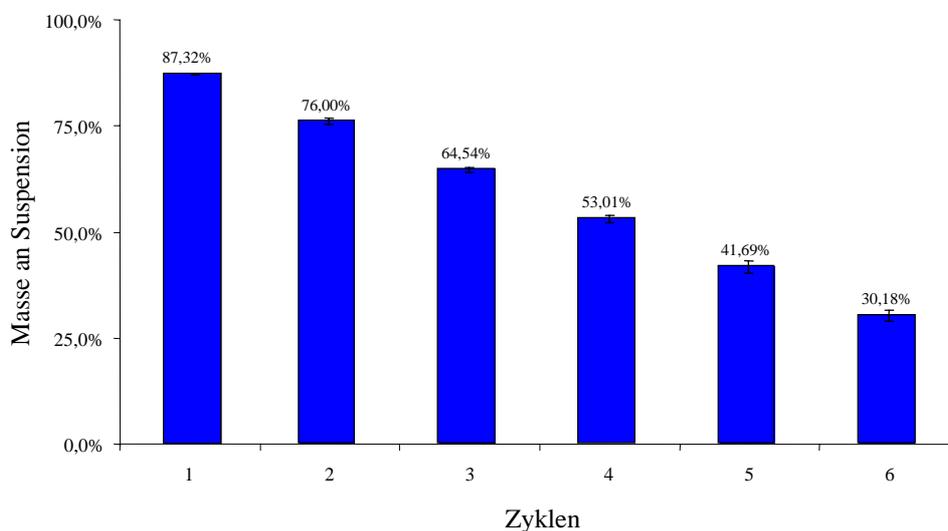
## Ergebnisse

### Bestimmung des Eisenabriebs

Eine für 6 Zyklen bei 1500 bar mikronisierte Probe (Lysozym in Miglyol) wurde analysiert. Es konnte dabei kein signifikanter Anstieg des Eisengehaltes festgestellt werden. Nach den 6 Homogenisierungszyklen lag der Gehalt bei 1,2 µg/g, was dem Gehalt in den unbehandelten Kontrollproben entspricht (Lysozym 4 µg/g, Miglyol <1 µg/g)

### Ausbeute nach den Homogenisierungszyklen

In Abbildung 25 sieht man deutlich die lineare Abnahme an Substanz in Abhängigkeit von der Anzahl der Homogenisierungszyklen.

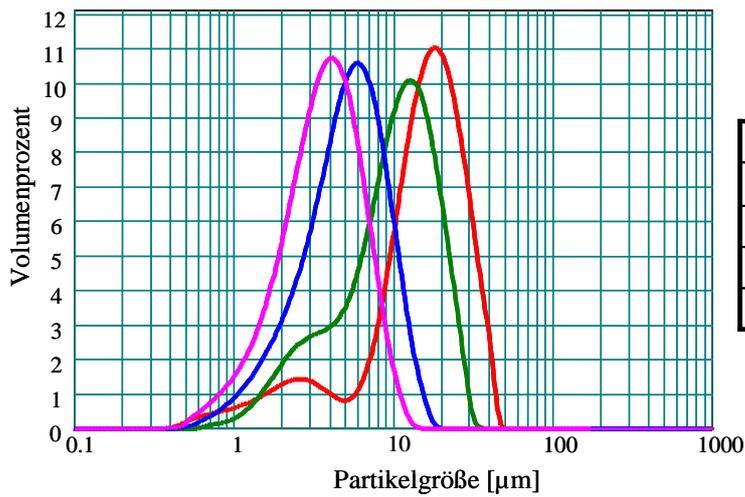


**Abbildung 25:** Zusammenhang zwischen Ausbeute und Anzahl der Homogenisierungszyklen

### Partikelgrößen und Morphologie

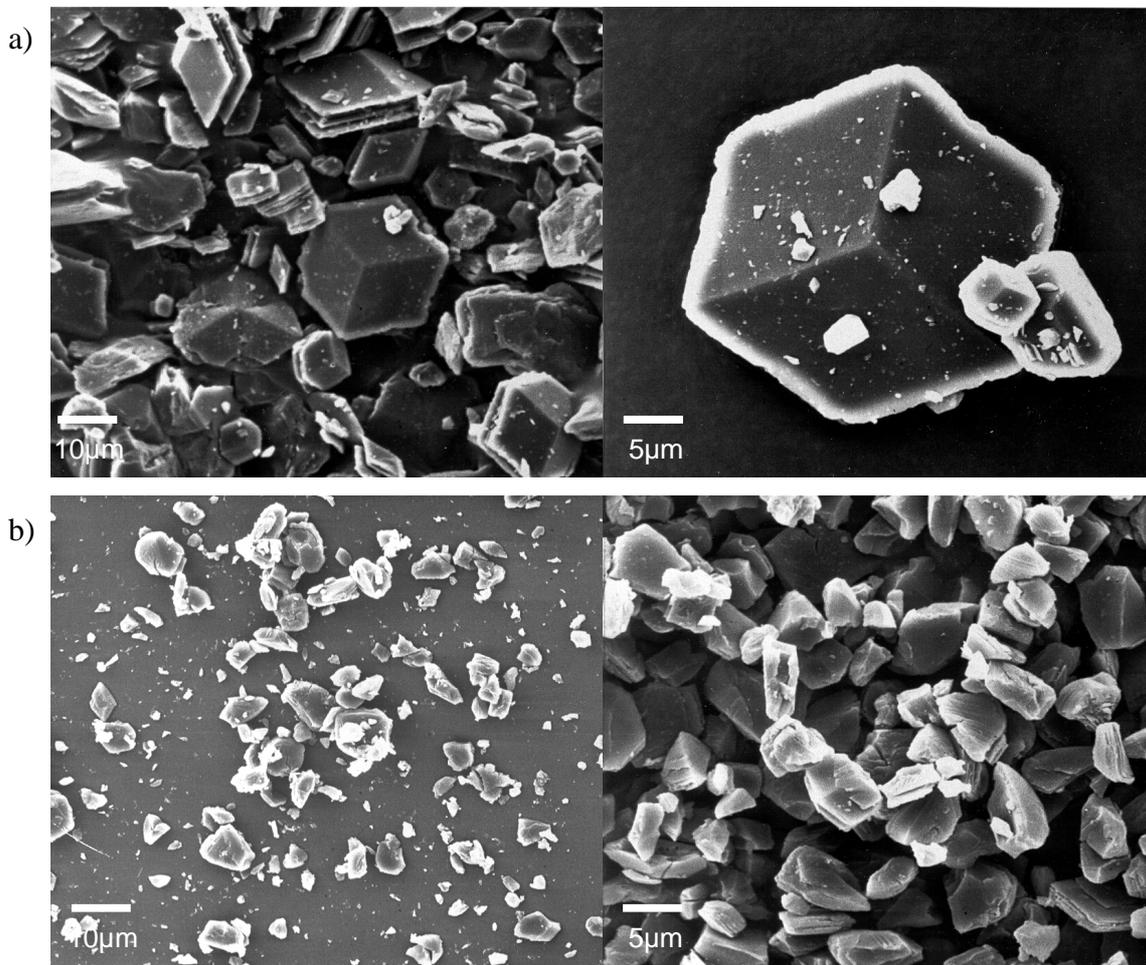
Die Vermessung der Partikel mittels Laserdiffraktometrie zeigt deutlich die Effektivität der Mikronisierungsmethode. Die Größe der Insulinkristalle konnte bei den „mildesten“ Bedingungen von einem Mikronisierungszyklus bei 500 bar von einem d90-Wert von 30,2  $\mu\text{m}$  auf 20,2  $\mu\text{m}$  reduziert werden. Bei 6 Zyklen bei 1500 bar nahm dieser Wert dann auf 7,1  $\mu\text{m}$  ab (Abb. 26). Für Lysozym wurden unter denselben Bedingungen 45,8  $\mu\text{m}$  und 11,0  $\mu\text{m}$  erreicht (Abb. 28). Die im Vergleich zum Insulin nicht so feinen Lysozympartikel bei milden Bedingungen sind dabei sehr wahrscheinlich auf die wesentlich größeren Partikel der Ausgangssubstanz zurückzuführen.

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen bestätigen diese Messungen (Abb. 27 und 29). Festzustellen ist, dass die Partikel im Gegensatz zu Luftstrahlmahlung ihre kantige Struktur behalten.

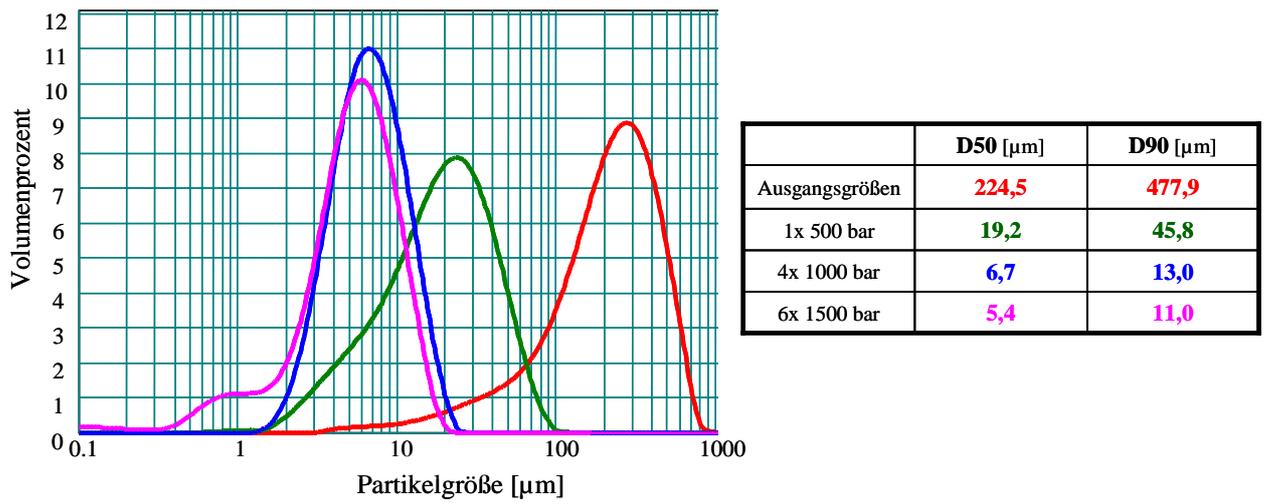


	D50 [µm]	D90 [µm]
Ausgangsgrößen	16,2	30,2
1x 500 bar	10,4	20,2
4x 1000 bar	5,2	10,0
6x 1500 bar	3,7	7,1

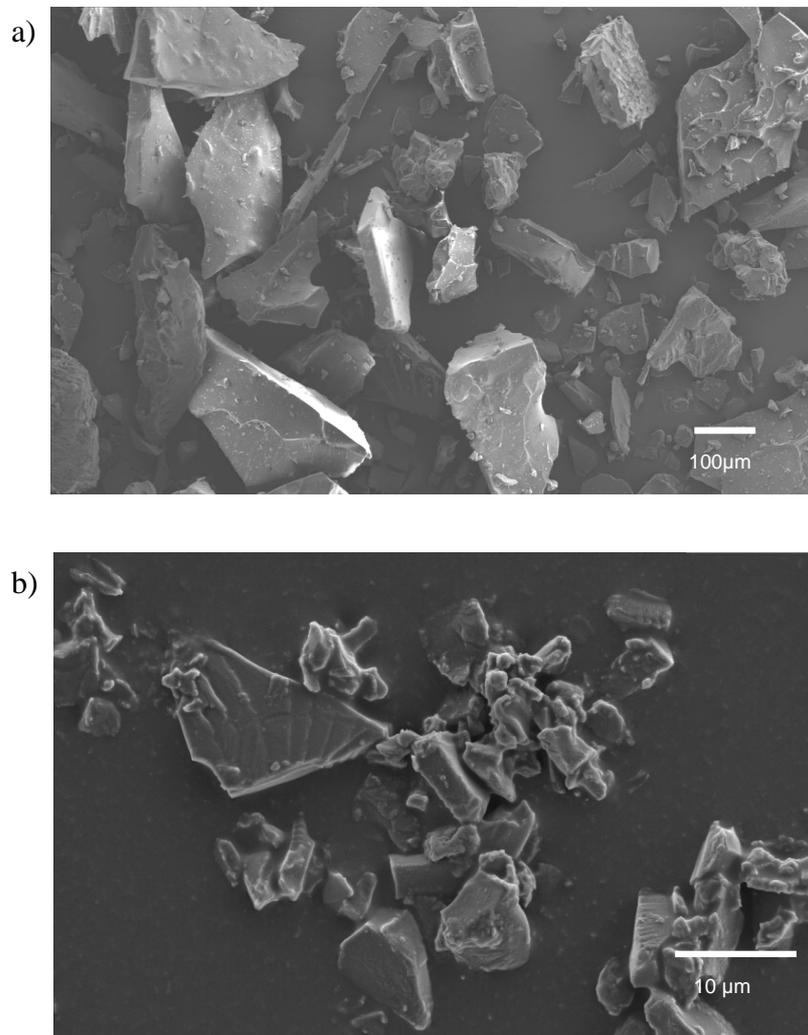
**Abbildung 26:** Vergleich der Partikelgrößenverteilungen von mittels Hochdruckhomogenisation mikronisiertem Insulin



**Abbildung 27:** REM-Aufnahmen von a) den nativen Insulinkristallen und b) 6x bei 1500 bar mikronisiertem Insulin



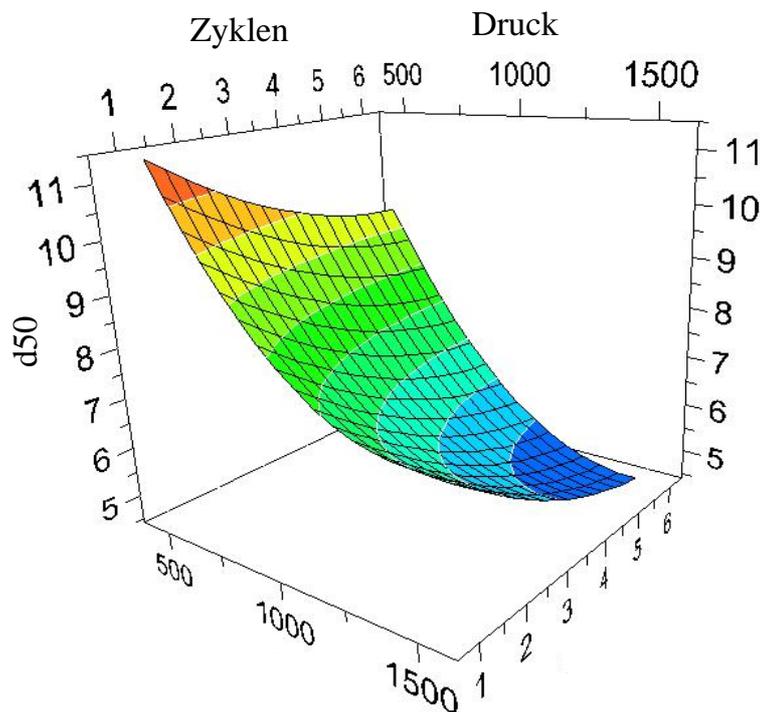
**Abbildung 28:** Vergleich der Partikelgrößenverteilungen von mittels Hochdruckhomogenisation mikronisiertem Lysozym



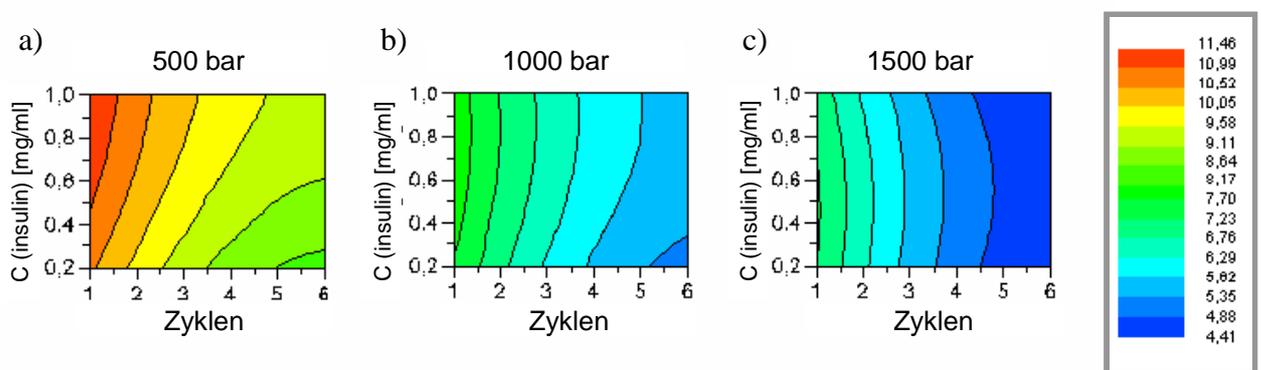
**Abbildung 29:** REM-Aufnahmen von a) nativem Lysozym und b) 4x bei 1000 bar mikronisiertem Lysozym

### Einfluss der Verschiedenen Parameter auf die Partikelgröße:

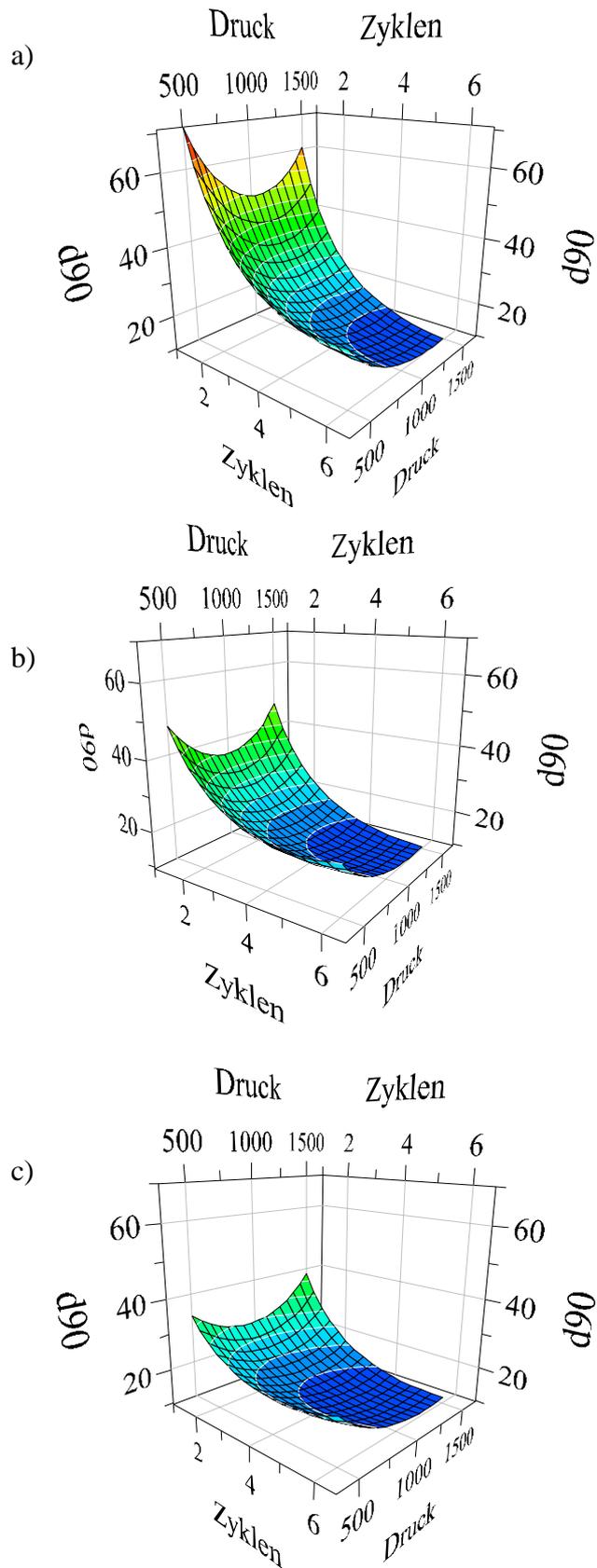
Bei beiden Proteinen zeigen Druck und die Anzahl der Homogenisierungszyklen einen deutlichen Einfluss auf die resultierende Partikelgrößenverteilung (Abb. 30 und 32). Während bei der Mikronisierung von Insulin die Konzentration des Insulins in der Suspension keinen Effekt auf den d50-Wert hat (nur bei 500 bar zeigt sich ein leicht negativer Einfluss) (Abb. 31), führt eine höhere Beladung bei Lysozym zu kleineren Partikeln. Dies ist am Abflachen der in Abbildung 32 gezeigten Flächendiagramme mit steigender Beladung zu erkennen.



**Abbildung 30:** Darstellung des Einflusses von Druck und Zyklenzahl auf die Partikelgröße von Insulin



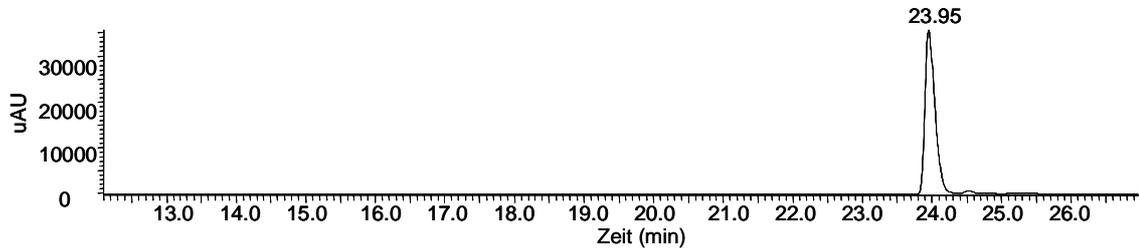
**Abbildung 31:** Einfluss der Insulinkonzentration auf die Partikelgrößenverteilung bei a) 500 bar, b) 1000 bar und c) 1500 bar



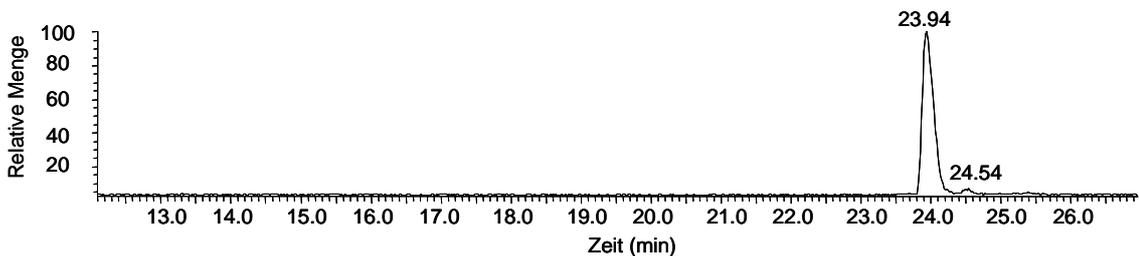
**Abbildung 32:** Einfluss von Druck, Zyklenzahl und Lysozymkonzentration auf die Partikelgröße von Lysozym (a) 0,2 mg/ml, b) 0,6 mg/ml und c) 1 mg/ml)

## Chemische Stabilität von Insulin

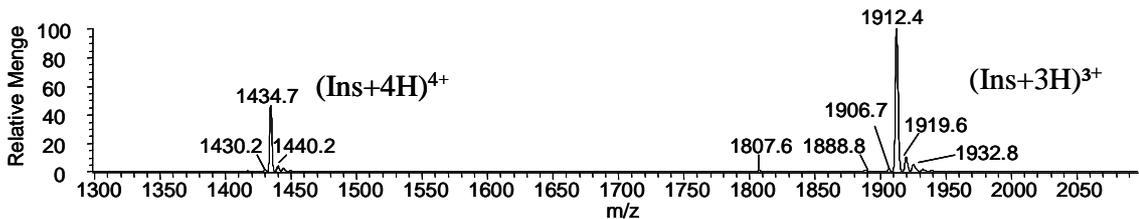
Die mikronisierten Insulinpartikel wurden mittels HPLC-ESI-MS auf Veränderungen und Abbauprodukte untersucht.



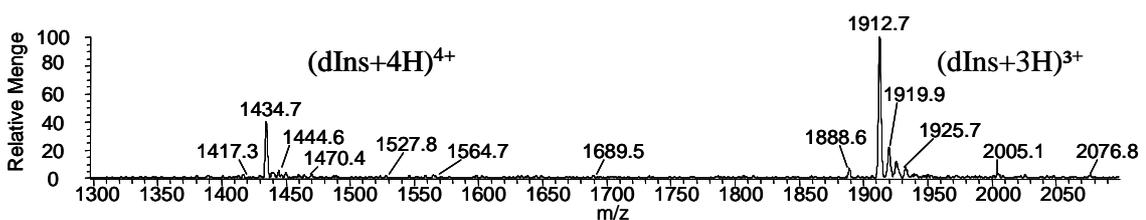
*HPLC UV-Detektor bei 274nm*



*Totalionenstrom (TIC)*



*ESI-MS bei einer Retentionszeit von 23,85-24,10 min*



*ESI-MS bei einer Retentionszeit von 24,46-24,60 min*

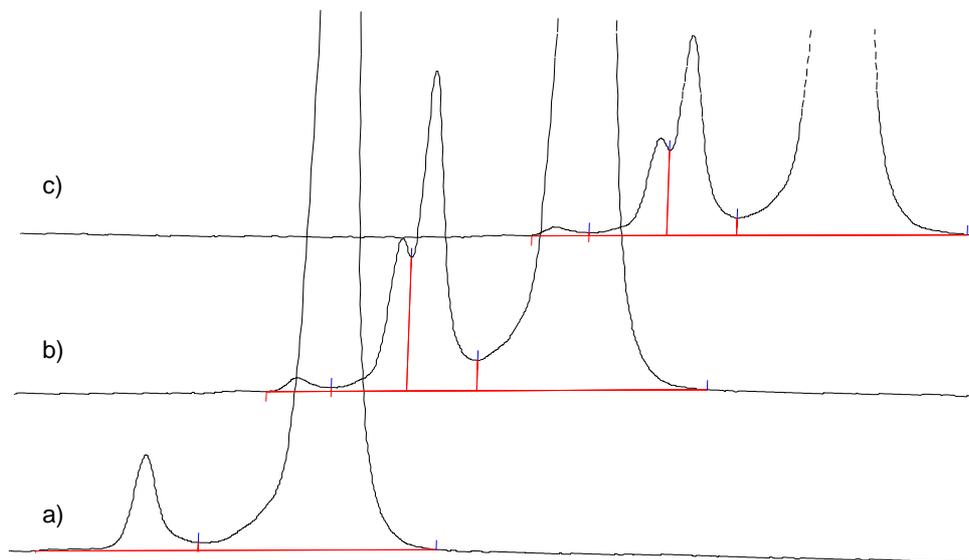
**Abbildung 33:** HPLC-MS Daten nach 6 Zyklen bei 1500 bar im Hochdruckhomogenisator

Bei der Analyse des 6mal bei 1500 bar mikronisierten Insulins lassen sich mit Hilfe der HPLC-ESI-MS mit dem UV-Detektor und im Totalionenstrom 2 Peaks detektieren (Abb. 33). Bei Untersuchung zu den entsprechenden Retentionszeiten mittels ESI-MS kann man ihnen die Massen 5734,2 Da und 5735,1 Da zuordnen. Dies sind die kennzeichnenden Massen für bovines Insulin und Desamidinsulin. Desamidinsulin entspricht dabei dem

Peak mit 5735,1 Da. Da dort eine Amino-Gruppe gegen eine Hydroxyl-Gruppe ausgetauscht wurde und somit eine um 1 erhöhte Masse gegenüber Insulin resultiert. Dabei handelt es sich jedoch nicht um ein während des Mikronisierens entstandenes Abbauprodukt, sondern um Desamidoinsulin welches in entsprechender Menge schon in der Ausgangssubstanz enthalten und in der Substanzspezifikation angegeben ist. Zersetzungsprodukte lassen sich nicht nachweisen

### Chemische Stabilität von Lysozym

Bei der Untersuchungen der chemischen Stabilität mittels HPLC zeigten sich einige Veränderungen bei den mikronisierten Proben (Abb. 34).



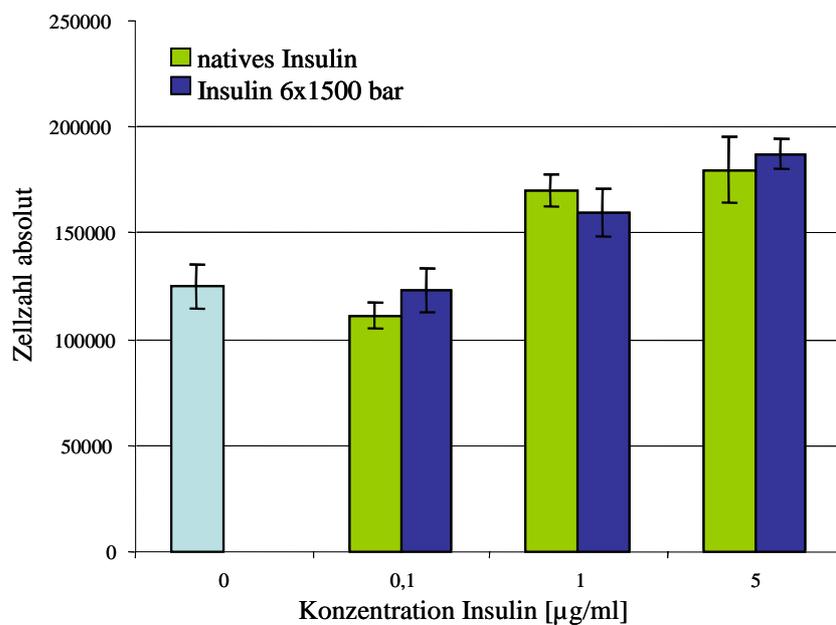
**Abbildung 34:** Vergleich der HPLC-Daten von a) nicht mikronisiertem und b) 4x bei 1500 bar bzw. c) 6x bei 1000 bar mikronisiertem Lysozym (die Ausgangssubstanz wurde den gleichen Extraktionsprozessen wie die mikronisierten Proben unterzogen)

Nach der Mikronisierung traten zwei zusätzliche Peaks im Chromatogramm auf, die auf chemische Veränderungen des Proteins während oder nach der Hochdruckhomogenisation schließen lassen. Ein Einfluss der Extraktionsmethode (siehe Materialien und Methoden) wurde durch die Prozessierung der Ausgangssubstanz unter identischen Bedingungen ausgeschlossen. Die Analyse der entstandenen Veränderungen, der zu Grunde liegenden Mechanismen und ihre Auswirkungen auf die Aktivität sind das Ziel weiterer Untersuchungen.

## Untersuchungen der Bioaktivität der hochdruckhomogenisierten Proteine

### Insulin

Die Bioaktivität des bovinen Insulins wurde in einem Proliferationsassay mit bovinen Knorpelzellen (Chondrozyten) untersucht.

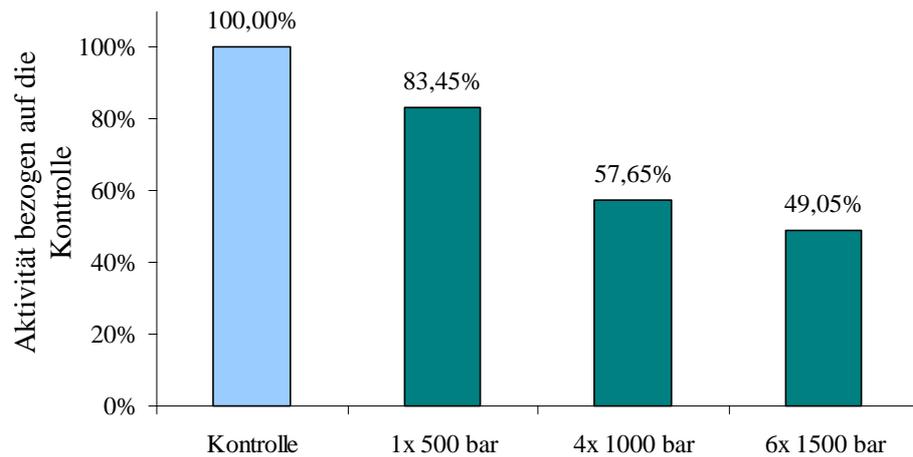


**Abbildung 35:** Vergleich von nativem Insulin mit 6mal bei 1500 bar mikronisiertem Insulin in einem Bioaktivitätsassay

Mit dem Bioaktivitätsassay konnte gezeigt werden, dass natives und mikronisiertes Insulin sich hinsichtlich ihrer proliferationsfördernden Effekte nicht unterscheiden (Abb. 35). Es konnten keinerlei signifikante Unterschiede hinsichtlich der Bioaktivität nachgewiesen werden.

## Lysozym

Bei der Untersuchung der Bioaktivität (Abb. 36) zeigt sich eine Abnahme der Aktivität in Abhängigkeit von Druck und Anzahl der Mahlzyklen. Nach der Mikronisierung bei den drastischsten Bedingungen nimmt die Aktivität bis auf 50% ab. Bei einem Zyklus und 500 bar ist ein Aktivitätsverlust von 16% zu erkennen.



**Abbildung 36:** Bioaktivität von Lysozym nach der Hochdruckhomogenisation

### ***IV.3. Zusammenfassung der Ergebnisse zur Hochdruckhomogenisation***

Es konnte gezeigt werden, dass eine effektive Zerkleinerung von Proteinpartikeln mittels der Hochdruckhomogenisation möglich ist. Mit mehreren Mahlzyklen können Partikelgrößenverteilungen mit einem d50-Wert von 5 µm erreicht werden. Der Einfluss verschiedener Prozessparameter konnte identifiziert werden und zur Steuerung der gewünschten Partikelgröße verwendet werden. Auch hier scheint Lysozym von extremeren Prozessbedingungen negativ beeinflusst zu werden, während für das kristalline bovine Insulin keinerlei solcher Effekte nachweisbar sind. Die Ursachen für die chemische Instabilität und die Abnahme der Aktivität des Lysozyms müssen allerdings noch weitergehend untersucht werden.

Auf Grund des möglichen Aktivitätsverlustes sollten für die Mikronisierung von Proteinen möglichst milde Bedingungen gewählt werden bzw. der Einfluss auf das Produkt vorher abgeklärt werden.

## V. Zusammenfassung Mikronisierung

Mit beiden getesteten Verfahren konnten gute Mikronisierungsergebnisse erzielt werden. Partikelgrößen unterhalb von 10 µm werden bei Luftstrahlmahlung und Hochdruckhomogenisation leicht erreicht. Dabei bietet die Luftstrahlmühle den Vorteil, dass etwas kleiner Partikelgrößen erreicht werden können und vollständig auf Dispersions- und Lösungsmittel verzichtet werden kann. Mit Hochdruckhomogenisator könnten hingegen die Proteine direkt in ihrer späteren Matrixsubstanz mikronisiert werden. Denkbar wäre z.B. die Mikronisierung in einer Lipidschmelze, die anschließend direkt mittels Sprüherstarrung zu Mikropartikeln weiterverarbeitet werden kann.

Es war somit möglich, zwei günstige und allgemein verfügbare Verfahren für die Mikronisierung von Proteinen weiterzuentwickeln. Dabei konnte der Einfluss der verschiedenen Prozessparameter genau untersucht werden und die Prozesse entsprechend optimiert werden. Zu beachten ist bei der Wahl dieser Prozessbedingungen, dass Proteine, wie in unseren Untersuchungen gezeigt, unterschiedlich auf die mechanischen Beanspruchungen reagieren, was zu Aktivitätsverlusten führen kann. Dieses unterschiedlich Verhalten wird Gegenstand weitergehender Untersuchungen sein.

## **VI. Herstellung von Lipidmikropartikeln durch Sprüherstarrung**

Die Sprüherstarrung ist ein häufig eingesetztes Verfahren zur Produktion von Mikropartikeln [16, 17]. Die Grundlage dieses Prozesses ist das Versprühen einer geschmolzenen Substanz mittels einer entsprechenden Düse. Die entstehenden Tröpfchen werden in einem kalten Luftstrom abgekühlt und erstarren. Mit Hilfe eines Zyklons werden diese Partikel dann abgeschieden.

Es besteht zudem die Möglichkeit, Wirkstoffpartikel in fester Form als Suspension in diese Schmelze einzuarbeiten und so beladene Partikel herzustellen. Die verwendeten Substanzen müssen verständlicherweise eine gewisse Hitzestabilität aufweisen.

Als Matrixmaterial wurden auf Grund mehrerer interessanter Eigenschaften Lipide gewählt. Sie bilden eine inerte Matrix, die physiologisch unbedenklich und daher auch für die parenterale Applikation geeignet ist. Sie besitzen einen definierten Schmelzpunkt, der durch Mischungen verschiedener Lipide individuell eingestellt werden kann. Durch ihren sehr langsamen Abbau im Körper eignen sie sich besonders für die Verarbeitung zu Depotarzneiformen [18]. Zudem handelt es sich im Vergleich zu anderen verwendeten Matrixmaterialien um sehr kostengünstige Materialien.

Für die Herstellung der Mikropartikel wirken sich weitere Vorteile der Lipide positiv aus. Es kann vollständig auf die Verwendung von organischen Lösungsmitteln verzichtet werden und die Einarbeitung von Feststoffen in die niedrigviskose Schmelze stellt kaum ein Problem dar. Dabei treten keinerlei Grenzflächen zwischen hydrophilen und lipophilen Lösungsmitteln, die zu einer Denaturierung von Proteinen führen können, auf. Außerdem ist das Risiko eines hydrolytischen Abbaus in dieser wasserfreien inerten Matrix sehr gering.

Ziel ist die Herstellung proteinbeladener Lipidmikropartikel, die als Depotarzneiform eingesetzt werden sollen. Dabei werden Partikelgrößen unter 150 µm angestrebt, um eine schmerzfreie parenterale Applikation zu ermöglichen.



**Abbildung 37:** Modifizierter Mini Spray Dryer B-290 (Büchi, Schweiz)

## ***VI.1. Materialien und Methoden***

### Verwendete Matrixmaterialien

Als Matrixmaterialien wurden Softisan 154® (hydriertes Palmöl) und Dynasan 114 (Glycerintrimyristat; Sasol AG, Deutschland) verwendet.

### Modellproteine:

Verwendet wurden amorphes Lysozym aus Hühnereiweiß (Sigma, Deutschland) mit einem Molekulargewicht von 14 kDa und einem d90-Wert von 673 µm und kristallines bovines Insulin (Aventis, Deutschland) mit einem Molekulargewicht von 5,7 kDa und einem d90-Wert von 30 µm.

### Herstellung der Mikropartikel

Das verwendete Triglycerid wurde bei 70°C geschmolzen und das entsprechende Protein in die Schmelze eingebracht. Die Suspension wurde mittels eines Ultra-Turrax 2 min bei 10000 UpM vorhomogenisiert. Die Mikropartikel wurden dann mittels einer Sprüh-erstarungsapparatur hergestellt (modifizierter Mini Spray Dryer B-290, Büchi, Schweiz) (siehe Abb. 37). Die Ansatzgröße betrug jeweils 4 g. Verwendet wurde eine Düse mit einer Öffnung von 0,8 mm bei einem Sprühdruk von 0,4 bar und einem Stützdruck von 4 bar. Die Kühlluft hatte eine Temperatur von -10°C.

### Partikelgrößenbestimmung

Die entstandenen Partikel wurden mit Hilfe der Laserdiffraktometrie als Suspension vermessen (Mastersizer 2000; Malvern, UK). Die Lipidmikropartikel wurden dazu in 68,2% (V/V) Ethanol suspendiert. Als charakteristische Größen wurden der d50 und der d90-Wert untersucht.

### Extraktion von Lysozym und Insulin aus den Lipidmikropartikeln für die HPLC-Analyse

Es wurden 5-10 mg Lipidmikropartikel in ein 2 ml Eppendorff-Vial eingewogen und mit 600 µl Dichlormethan versetzt. Diese Mischung wurde 10 min bis zum Lösen der Partikel auf einem Schüttler geschüttelt. Anschließend wurden 600 µl PBS zugegeben und für Lysozym auf pH 4,0 bzw. für Insulin auf pH 2,0 mit 1N HCl eingestellt. Die Vials wurden nun für 20 min bei 15000 UpM zentrifugiert. 300 µl der wässrigen Phase wurden entnommen, in ein HPLC-Vial überführt und auf 1 ml mit PBS aufgefüllt. Mit den Referenzsubstanzen wurde analog verfahren.

### Freisetzung aus den Lipidmikropartikel

Eine genau gewogene Menge der Lipidmikropartikel wurde in 12 ml PBS (Gibco, USA) konserviert mit 0,2% Natriumazid (Merck, Deutschland) suspendiert. Die verwendeten Freisetzungszellen wurden bei 37°C unter leichtem Schütteln in einem Schüttelwasserbad inkubiert. Zu vorher festgelegten Zeitpunkten wurde jeweils 1 ml Puffer entnommen und durch frischen ersetzt. Die freigesetzte Menge an Lysozym wurde mittels HPLC bestimmt.

### HPLC-Analyse von Insulin und Lysozym

Die in den Mikropartikeln enthaltene Menge und die Stabilität des mikronisierten Lysozyms wurden mit einer am Lehrstuhl etablierten HPLC-Methode untersucht. Verwendet wurde dazu eine HPLC-Anlage bestehend aus einer LC-10AT VP HPLC Pumpe, einem DGU-14A Entgaser, einem SIL-10AD VP Injektor, einem SCL-10A VP System Kontroller, einem CTO-10AS Vp Säulenofen und einem SPD-10A VP UV-Detektor (alles Shimadzu, Deutschland).

50 µl der Lysozym-Lösung wurden bei 40°C unter Verwendung einer C-18 RP Analysensäule (Supelcosil, LC-318, 250 mm x 4,6 mm, Supelco, USA) mit einem linearen Fließmittelgradienten (Mobile Phase A: 90% H<sub>2</sub>O, 10% Acetonitril, 0,1% TFA; Mobile Phase B: 10% H<sub>2</sub>O, 90% Acetonitril und 0,1% TFA) bei einer Flussrate von 1 ml/min analysiert. Der Anteil der mobilen Phase B wurde dabei in einen Zeitraum von 25 min linear von 25% auf 40% erhöht. Detektiert wurde das Protein mit dem UV-Detektor bei den Wellenlängen 210 nm und 274 nm.

50 µl der Insulin-Lösung wurden bei 37°C unter Verwendung einer C-18-RP Analysensäule (Supelcosil, LC318, 4,6 mmx250 mm, Supelco, USA) mit einem linearen Gradienten (Mobile Phase A: 90% H<sub>2</sub>O, 10% Acetonitril, 0,1% TFA; Mobile Phase B: 10% H<sub>2</sub>O, 90% Acetonitril und 0,1% TFA) und mit einer Fließrate von 1 ml/min auf Menge und chemische Stabilität analysiert. Der Anteil der mobilen Phase B wurde über einen Zeitraum von 24 min linear von 20% auf 36% erhöht. Detektiert wurde mit dem UV-Detektor bei 210 nm und 274 nm, mit dem Fluoreszenz-Detektor bei einer Anregung von 274 nm und einer Emission von 308 nm.

### Thermische Analyse der Mikropartikel

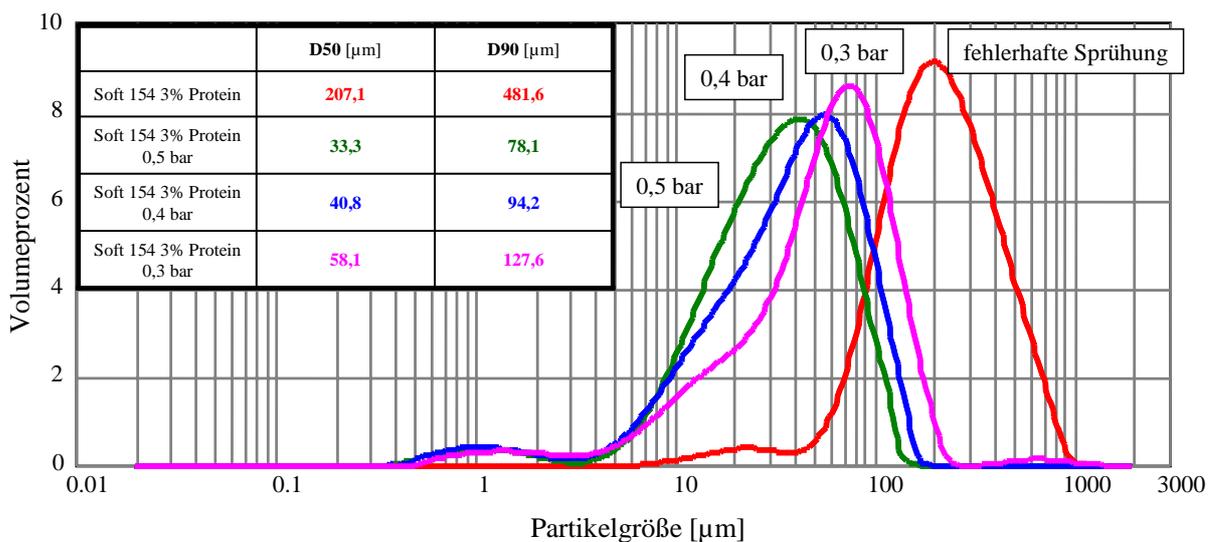
Die hergestellten Partikel wurden mittels DSC untersucht (DSC 2920, TA Instruments, USA). Die Proben wurden in einen Aluminiumtiegel eingewogen und hermetisch verschlossen. Im DSC-Ofen wurden sie auf -35°C abgekühlt. Für die Analyse wurde die Probe dann bei einer Heizrate von 5°C/min auf 120°C aufgeheizt und die thermischen Veränderungen aufgezeichnet.

## VI.2. Einfluss des verwendeten Sprühdruks auf die Partikelgrößenverteilung

Es wurde die Steuerbarkeit der resultierenden Partikelgrößenverteilung durch Änderungen des Sprühdruks untersucht. Dazu wurde eine mit 3% Protein beladene Schmelze von Softisan 154 bei Sprühdruken von 0,3 bis 0,5 bar versprüht und die entstandenen Mikropartikel mittels Laserdiffraktometrie vermessen.

### Ergebnisse

Der Einfluss des Sprühdruks konnte anhand der Partikelgrößenanalyse gezeigt werden (Abb. 38). Innerhalb bestimmter Grenzen kann die Größe der Mikropartikel durch diesen Parameter gesteuert werden. Wie wichtig die Kontrolle dieses Parameters ist, zeigt beispielhaft die Größenverteilung einer Sprühung, bei der eine Einstellung des Sprühdruks vergessen wurde (siehe Abb. 38 fehlerhafte Sprühung).



**Abbildung 38:** Partikelgrößenverteilung von bei unterschiedlichem Sprühdruk hergestellten Lipidmikropartikeln

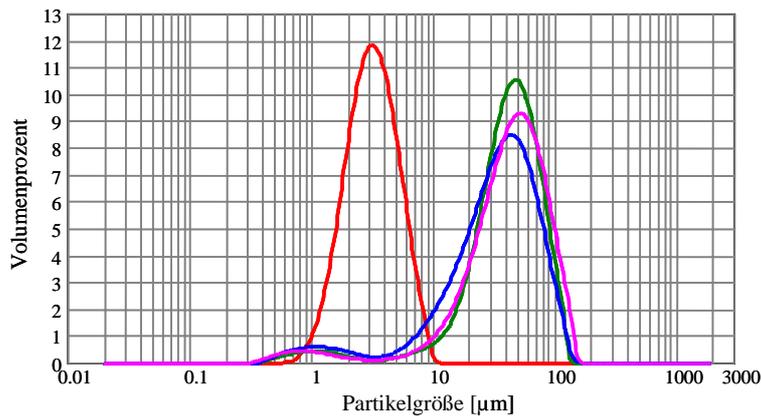
### **VI.3. Herstellung von lysozymbeladenen Lipidmikropartikeln**

Lysozym wurde nun als Modellprotein in Softisan 154 inkorporiert. Dabei sollte die grundsätzliche Eignung dieses Prozesses für proteinbeladene Arzneiformen getestet werden. Besonders wurde dabei untersucht, ob es einen Unterschied in der Verarbeitung von mikronisiertem Lysozym (d90-Wert von 6 µm) zu der gröberen Ausgangssubstanz (d90-Wert von 442 µm) gibt. Die erhaltenen Partikel wurden hinsichtlich Größe, Morphologie, Verkapselungseffizienz und Freisetzungverhalten untersucht.

#### **Ergebnisse**

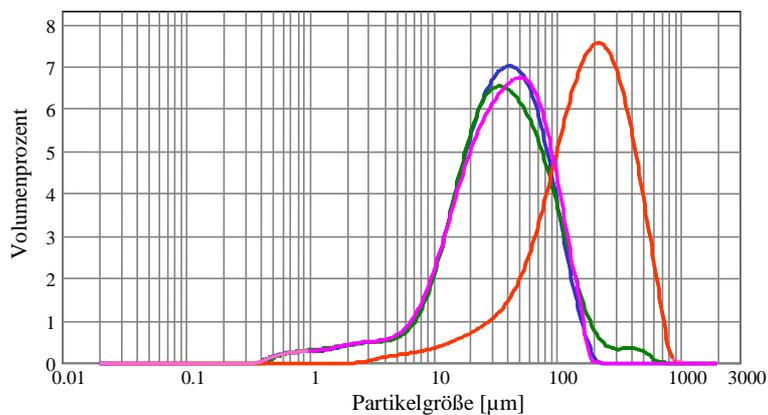
##### Partikelgrößenverteilung und Morphologie:

Wie man anhand der Partikelgrößenverteilungen erkennen kann, haben die Größe der verwendeten Proteinpartikel und die prozentuale Beladung kaum einen Einfluss (Abb. 39 und 40). Es ist nur ein leichter Anstieg der Partikelgrößen für die Chargen mit unbehandeltem Lysozym festzustellen. Auch die Bilder des Rasterelektronenmikroskops zeigen keine morphologischen Unterschiede und bestätigen die Ergebnisse der Laserdiffraktometrie (Abb. 41 und 42). Bei den gewählten Bedingungen wird die Forderung von Partikeln kleiner 150 µm (um die Applizierbarkeit mittels einer Spritze zu gewährleisten) für alle Chargen erfüllt. Bemerkenswert ist, dass die resultierenden Mikropartikel bei Verwendung der Ausgangssubstanz von Lysozym kleiner sind als die Proteinpartikel selbst. Die Vermutung, dass große Proteinpartikel nicht verkapselt worden sind, lässt sich mit den REM-Bildern nicht bestätigen. Dort sind keine unverkapselten Fraktionen erkennbar. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass es durch die Vorhomogenisierung mit dem Ultra-Turrax zu einer Verkleinerung der Proteinpartikel in der Lipidschmelze kommt. Diese Hypothese muss noch untersucht werden.



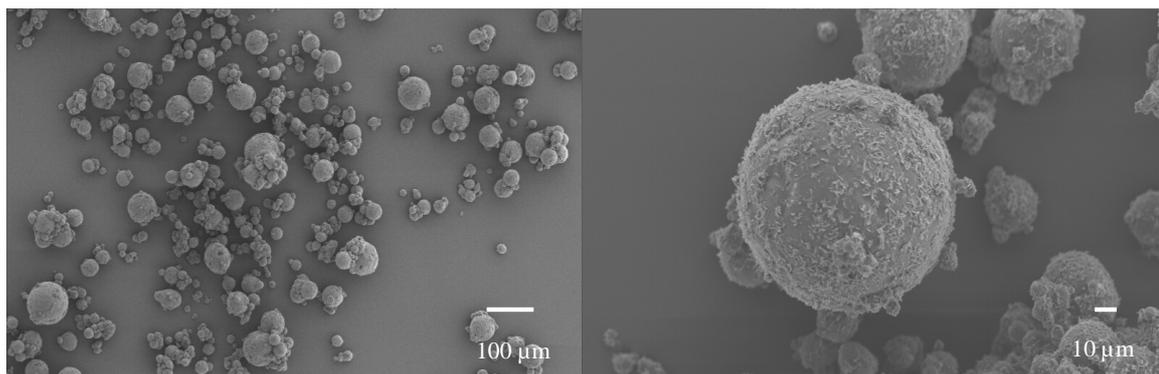
	D50 [µm]	D90 [µm]
Mikronisiertes Lysozym	3,2	6,0
Softisan +1% Lysozym	43,2	83,6
Softisan + 3% Lysozym	35,6	79,2
Softisan + 6% Lysozym	44,9	93,8

**Abbildung 39:** Partikelgrößenverteilung der mit mikronisiertem Lysozym beladenen Mikropartikel im Vergleich zur verwendeten Lysozympartikelgröße

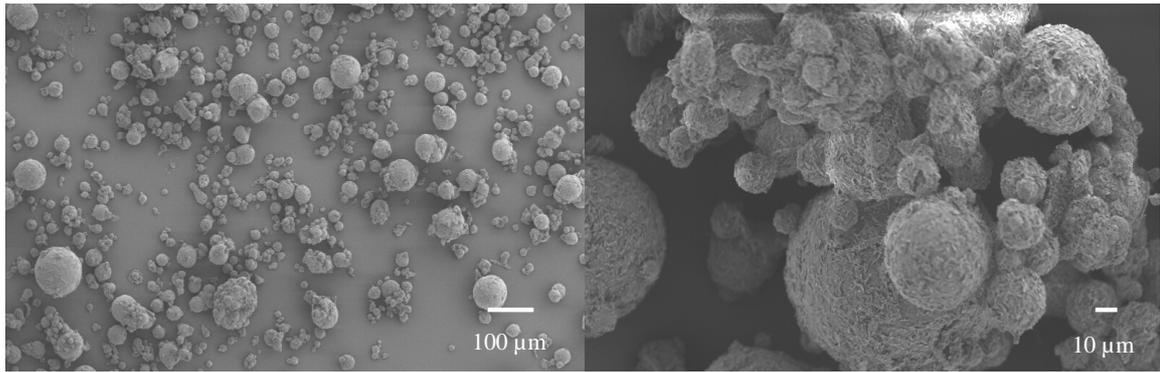


	D50 [µm]	D90 [µm]
Ausgangssubstanz Lysozym	179,7	441,6
Softisan +3% Lysozym	34,9	92,1
Softisan + 3% Lysozym	36,6	114,1
Softisan + 3% Lysozym	36,5	97,1

**Abbildung 40:** Partikelgrößenverteilung der mit unbehandeltem Lysozym beladenen Mikropartikel im Vergleich zur verwendeten Lysozympartikelgröße



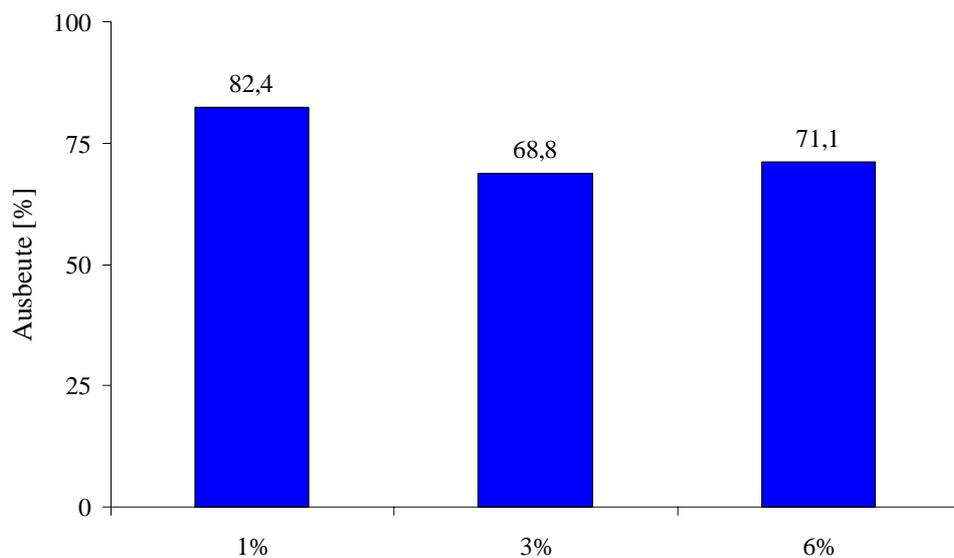
**Abbildung 41:** REM-Aufnahmen von Softisanpartikeln mit mikronisiertem Lysozym beladen



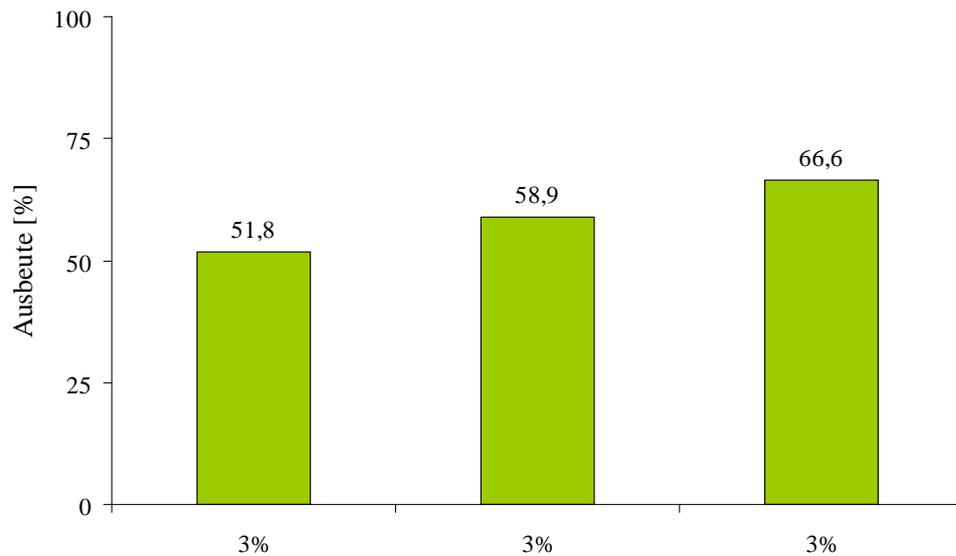
**Abbildung 42:** REM-Aufnahmen von Softisanpartikeln mit unbehandeltem Lysozym beladen

Ausbeute und Verkapselungseffizienz:

Bei Betrachtung der Ausbeuten ist erkennbar, dass es Schwankungen zwischen den einzelnen Chargen gibt (Abb. 43 und 44). Im Durchschnitt hat man jedoch bei Verwendung des mikronisierten Lysozyms geringere Verluste.

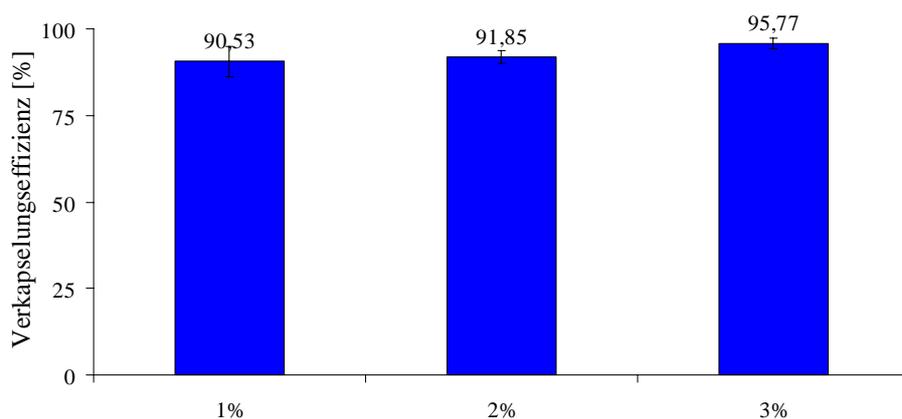


**Abbildung 43:** Ausbeute von mit verschiedenen Mengen mikronisiertem Lysozym beladenen Softisanpartikeln

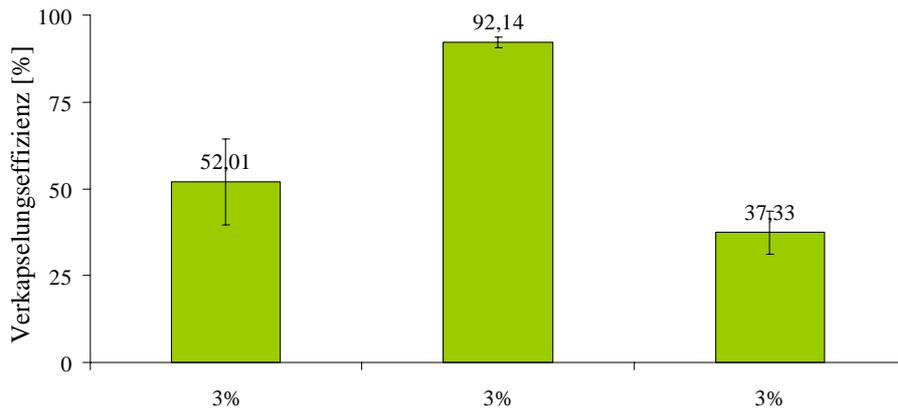


**Abbildung 44:** Ausbeute von mit 3% unbehandeltem Lysozym beladenen Softisanpartikeln

Bei Auswertung der Verkapselungseffizienz treten noch deutlichere Unterschiede zu Tage (Abb. 45 und 46). Hier können bei Chargen mit mikronisiertem Protein reproduzierbar sehr hohe Werte erreicht werden, während bei Verwendung des grobkörnigen Lysozyms deutliche Schwankungen auftreten und teilweise nur Verkapselungseffizienzen von weniger als 40% erreicht werden. Dies wäre evtl. auch wieder ein zusätzlicher Hinweis darauf, dass der Grobanteil der Proteinpartikel während des Sprühvorgangs verloren geht. Genaueres lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt jedoch noch nicht sagen.



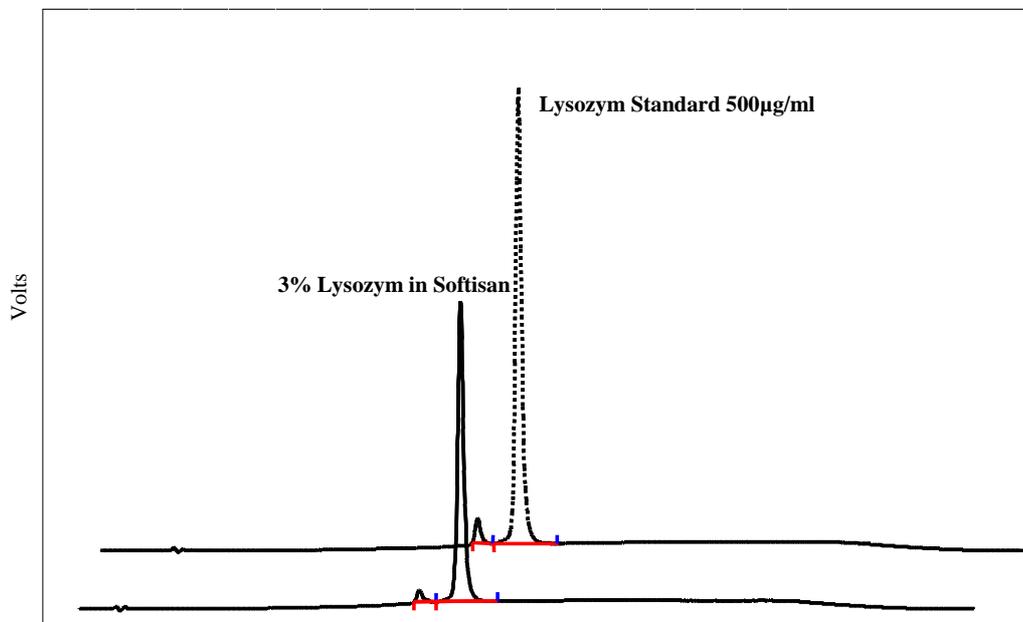
**Abbildung 45:** Prozentualer Anteil des tatsächlich in den Mikropartikeln vorhandenen mikronisierten Lysozyms bezogen auf die eingesetzte Menge



**Abbildung 46:** Prozentualer Anteil des tatsächlich in den Mikropartikeln vorhandenen unbehandelten Lysozyms bezogen auf die eingesetzte Menge

### Untersuchung der chemischen Stabilität des verkapselten Lysozyms mittels HPLC

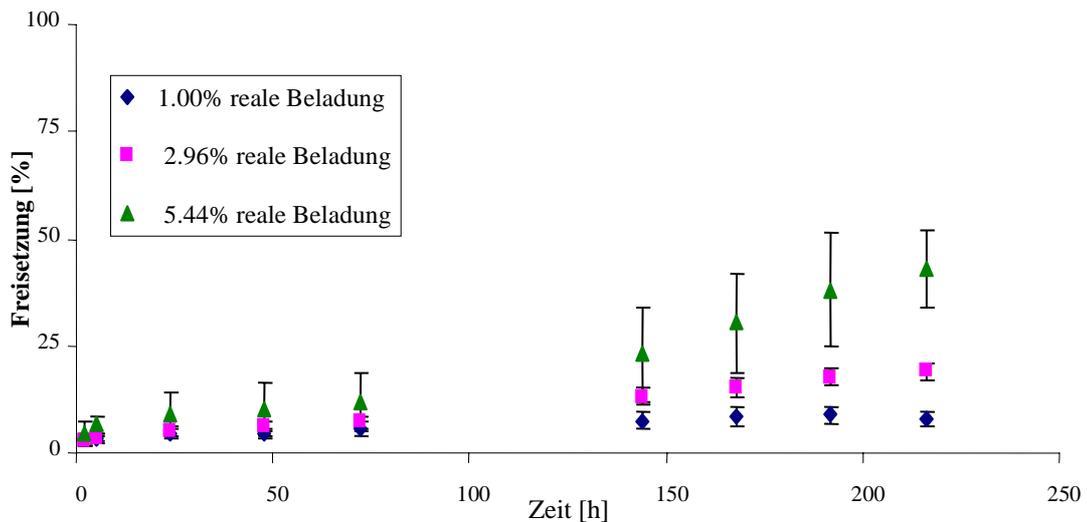
Das nach der Herstellung der Mikropartikel wurde das verwendete mikronisierte Lysozym wieder aus den Partikeln extrahiert und mittels HPLC-Analyse auf seine chemische Stabilität hin untersucht. Wie in Abbildung 47 zu sehen, hat der Prozess der Sprüherstarrung keinerlei negativen Einfluss auf die chemische Stabilität des verwendeten Lysozyms.



**Abbildung 47:** HPLC-Analyse der chemischen Stabilität von mikronisiertem Lysozym nach der Extraktion aus den Softisanpartikeln

### Untersuchung des Freisetungsverhaltens der lysozymbeladenen Mikropartikel

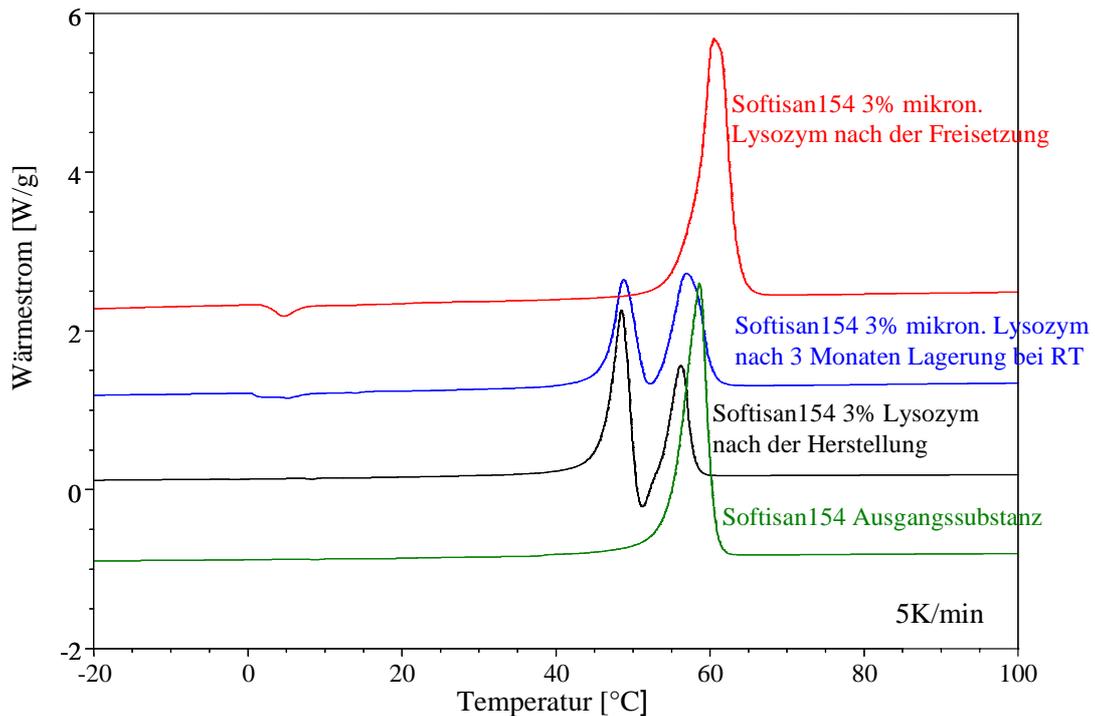
Die Auswertung des Freisetungsverhaltens der mit unterschiedlichen Mengen mikronisiertem Lysozym beladenen Softisanpartikel zeigt, dass eine Zubereitung mit retardierter Freisetzung ohne „Burst-Release“ entwickelt werden konnte (Abb. 48). So wurden, abhängig von der Beladung, nach zehn Tagen erst weniger als 50% des Lysozyms freigesetzt.



**Abbildung 48:** Freisetzungsprofil der mit mikronisiertem Lysozym beladenen Softisanmikropartikel

### Thermische Analyse der hergestellten Softisan Mikropartikel

Mittels DSC-Analyse konnte gezeigt werden, dass es durch das rasche Abkühlen der Partikel bei der Sprüherstarrung zu einer Modifikationsänderung des Softisans kommt (Abb. 49). Diese Modifikation ist bei Raumtemperatur stabil. Nach der Freisetzung bei einer Temperatur von 37°C kann man erkennen, dass Softisan wieder in die ursprüngliche Modifikation umgewandelt wurde. In wie weit dies die Lagerstabilität und das Freisetzungsverhalten beeinflusst muss noch weiter untersucht werden.



**Abbildung 49:** DSC-Analyse der aus Softisan 154 hergestellten Mikropartikel

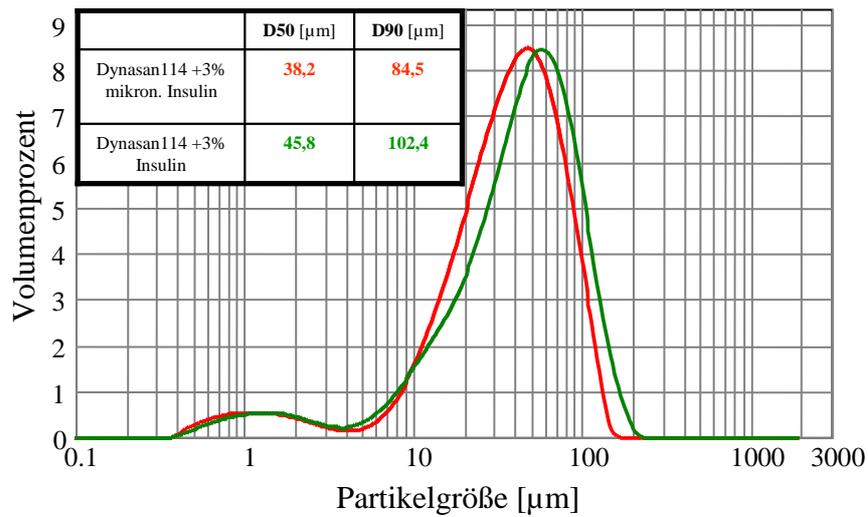
#### **VI.4. Herstellung von insulinbeladenen Lipidmikropartikeln**

Analog zum Lysozym wurde bovines Insulin in unbehandeltem (d90-Wert 30  $\mu\text{m}$ ) und mikronisierten (d90-Wert 5,2  $\mu\text{m}$ ) Zustand zu Lipidmikropartikeln verarbeitet. Allerdings wurde dieses Mal Dynasan 114 als Matrixsubstanz verwendet. Zum jetzigen Zeitpunkt wurden die hergestellten Partikel charakterisiert und die Stabilität des Insulins untersucht. Die weiteren Untersuchungen stehen noch aus.

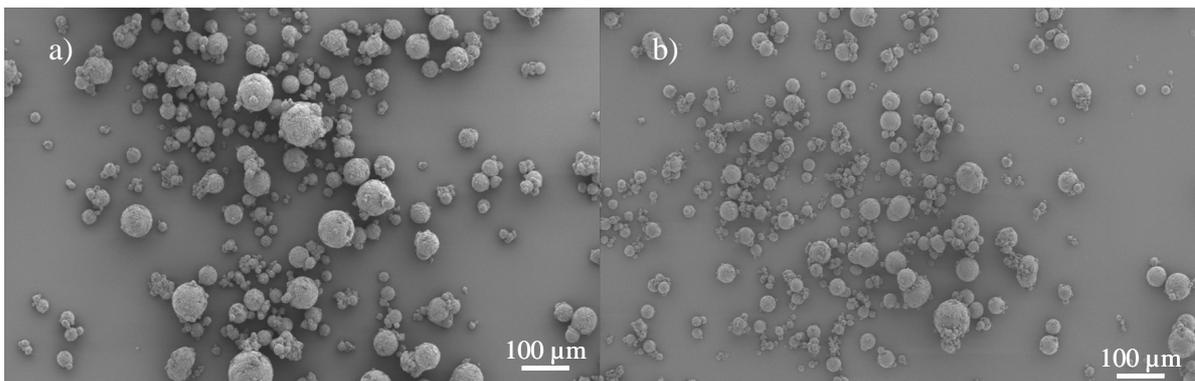
### **Ergebnisse**

#### Partikelgrößen und Morphologie

Wie man in Abbildung 50 gut erkennen kann sehen die resultierenden Partikelgrößenverteilungen wieder sehr ähnlich aus. In diesem Fall ist allerdings bei Verwendung des mikronisierten Insulins eine geringfügig kleinere Partikelgröße festzustellen. Die raster-elektronischen Bilder zeigen wieder die typische Form und Verteilung der Lipidpartikel (Abb. 51).



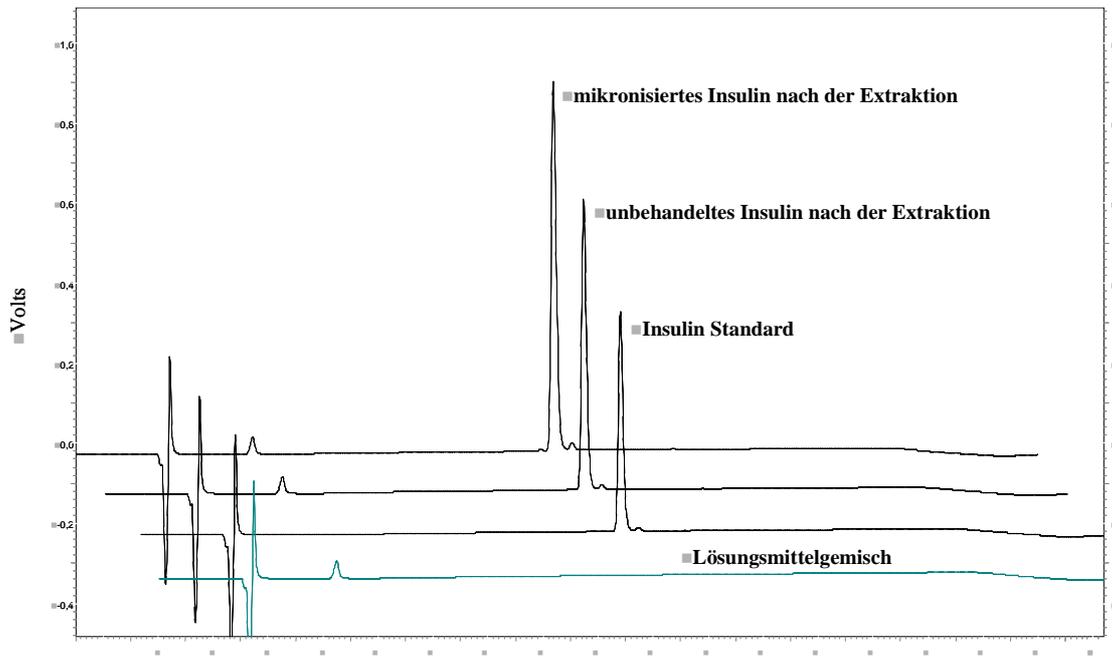
**Abbildung 50:** Partikelgrößenverteilung nach der Herstellung von Dynasan114-Partikeln mit einer 3%igen Beladung von unbehandeltem bzw. mikronisiertem Insulin



**Abbildung 51:** REM-Aufnahmen von Dynasanpartikeln mit a) mikronisiertem Insulin und b) unbehandeltem Insulin

### Untersuchung der chemischen Stabilität des verkapselten Insulins mittels HPLC

Nach der Extraktion wurde die chemische Stabilität von Insulin mittels HPLC untersucht. Wie man im Chromatogramm (Abb. 52) sehen kann, treten keinerlei Veränderungen bei dem verarbeiteten Insulin auf. Der kleine Peak zu Beginn konnte als ein Lösungsmittelrückstand aus dem Extraktionsprozess identifiziert werden.



**Abbildung 52:** HPLC-Analyse des Insulins nach der Sprüherstarrung

## **VI.5. Zusammenfassung der Ergebnisse zur Herstellung von Lipidmikropartikeln**

Mit der Verwendung der Kombination von Sprüherstarrung und Lipiden konnten sehr gute Ergebnisse erzielt werden. Die geringe Chargengröße von 4 g stellte keinerlei Probleme dar. So konnten Partikel mit einer Größe kleiner 150  $\mu\text{m}$ , die noch eine relativ schmerzfreie Injektion ermöglichen, mit reproduzierbaren Ergebnissen hergestellt werden. Die Einarbeitung von Proteinen stellte dabei keine Probleme dar. Vorteile lagen jedoch bei der Verwendung von mikronisiertem Protein, da so höhere Beladungen möglich sind und der Prozess zu wesentlich konstanteren Ergebnissen bezüglich der Ausbeuten und Verkapselungseffizienzen führt. Das Verfahren und das gewählte Matrixmaterial scheinen dabei die Stabilität der verarbeiteten Proteine nicht negativ zu beeinflussen.

Bei Untersuchung des Freisetzungsverhaltens zeigt sich, dass eine Depotarzneiform ohne Burst-Release entwickelt werden konnte, die je nach Beladung das Protein über Tage bis Wochen freisetzt.

Somit konnte eine günstige und vielseitige Methode für die Herstellung von proteinhaltigen Depotarzneiformen entwickelt werden.

## VII. Veröffentlichungen

Maschke,A.; Cali,N.; Appel,B.; Blunk,T.; Goepferich,G. Micronization of insulin by high pressure homogenization in non-aqueous environment *AAPS Annual Meeting*, Baltimore **2004** *The AAPS Journal* 6(4)

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

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

Maschke,A.; Cali,N.; Appel,B.; Kiermaier,J.; Blunk,T.; Göpferich,A. Micronization of Insulin by High Pressure Homogenisation submitted to *Pharmaceutical Research* **2006**

Becker,C.; Ehmer,A.; Maschke,A.; Meindorfer,A.; Ausbacher,D.; Tessmar,J.; Blunk,T.; Goepferich,A.: Influence of Micronisation of Proteins on the Properties of Lipid Microparticles for Controlled Release *DPhG Jahrestagung - Joint Meeting*, Marburg **2006**

Ehmer,A.; Zaky,A.; Eyrich,D.; Tessmar,J.; Blunk,T.; Goepferich,A.: Micronization of Insulin by Jet Milling *DPhG Jahrestagung - Joint Meeting*, Marburg **2006**

## **VIII. Förderungshinweis**

Das Projekt "Mikronisierung von Proteinen und Verarbeitung zu Arzneiformen" (AiF-Nummer 14128 N1) wurde vom Bundesministerium für Wirtschaft und Arbeit (BMWA) über die Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen "Otto von Guericke" e.V. (AiF), Köln, als Projektträger, gefördert.

## IX. Literaturverzeichnis

- [1] Pavlou,A.K. and Reichert,J.M. *Nat. Biotech.* **2004**, 22(12), 1513-1519
- [2] Zhou,X.H. *J. Control. Release* **1994**, 29, 239-252
- [3] Bummer,P.M.; Koppenol, S. *Drugs Pharm. Sci.* **1999**, 99, 5-69
- [4] Arakawa,T.; Prestrelski,S.J.; Kenney,W.C.; Carpenter,J.F. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, 46(1-3), 307-326
- [5] Manning,M.C.; Patel,K.; Borchartd,R.T. *Pharmaceutical Research* **1989**, 6(11), 903-918
- [6] White,S. et al. *Diabetes Techn. Therapeut.* **2005**, 7(6), 896-906
- [7] Koennings,S.; Sapin,A.; Blunk,T.; Menei,P.; Goepferich,A. *submitted to J. Control. Release* **2006**
- [8] Lalor,C.B.; Hickey,A.J. *Lung Biology in Health and Disease* **1997**, 107, 235-276
- [9] Rumpf,H. *Chemie Ingenieur Technik* **1960**, 32, 129-135
- [10] Phillips,E.; Allsopp,E.; Christensen,T.; Fitzgerald,M.; Zhao,L. *Respiratory Drug Delivery VI* **1998**, 161-168
- [11] Eyrich,D.; Brandl,F.; Appel,B.; Wiese,H.; Maier,G.; Wenzel,M.; Staudenmaier,R.; Goepferich,A.; Blunk,T. *Biomaterials in press* **2006**
- [12] Greco,G.Jr.; Pirozzi,D.; Toscano,G.; Maremonti,M. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1996**, 799, 108-114
- [13] Wilczek,M.; Bertling,J.; Hintemann,D. *International Journal of Mineral Processing* **2004**, 74(1), 425-434
- [14] Nam,Y.S. and Park,T.G. *J. Microencapsulation* **1999**, 16(5), 625-637
- [15] Mueller,R.H.; Jacobs,C.; Kayser,O. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, 47(1), 3-19
- [16] Guo, Q. Y.; Chan, L. W.; Heng, P. W. S. *J. Microencapsulation* **2005**, 22(3), 245-251
- [17] Passerini,N.; Perissutti,B.; Albertini,B; Voinovich,D.; Moneghini,M.; Rodriguez,L. *J. Control. Release* **2003**, 88(2), 263-275
- [18] Koennings,S.; Goepferich,A. *CRC Press* **2005**, 67-86