

Prilled Microgels in Lipid Dispersions for Oral Delivery of Biologicals

Jan Kendall de Kruif^{1,2}, Elizaveta Fasler-Kan³, Felipe Varum⁴, Roberto Bravo⁴, Martin Kuentz¹

Ziel dieser Arbeit ist die Einführung einer Sprühaushärtungs-Methode unter Verwendung eines lipid-basierten Härtebads. Ein wasserfreies System kann direkt in Kapseln abgefüllt und somit zu einer Darreichungsform verarbeitet werden.

Bei der Sprühaushärtung («Prilling») werden Lösungen aus aktiven pharmazeutischen Substanzen und Polymeren in ein Härtebad getropft, wo die Polymere durch Quervernetzung aushärten [1]. Dadurch entstehen Mikrogele in denen die aktive Substanz eingeschlossen wird. Die klassische Sprühaushärtung kann durch den Einsatz einer vibrierenden Düse (Abbildung 1) verbessert werden [2]. Durch die Vibration wird der Flüssigkeitsstrahl in gleichmässige Tropfen unterteilt, wodurch eine enge Partikelgrössenverteilung bei den hergestellten Mikrogele erreicht wird. Um letztendlich eine Arzneiform herzustellen, müssen die Partikel von dem Härtebad getrennt werden. Dieser Schritt kann jedoch die eingeschlossenen Makromoleküle schädigen [3].

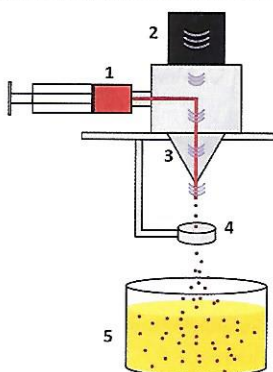


Abbildung 1. Darstellung der vibrierenden Düse. 1 Pumpensystem (Spritze), enthält Polymerlösung; 2 Vibrationseinheit; 3 Düse; 4 Elektrodenring; 5 Härtebad.

Materialien und Methoden

Eine Lösung aus Rinderalbumin (BSA) und mono-N-Carboxymethylchitosan (MCC) wurde unter der Verwendung einer vibrierenden Düse in wasserfreie Aushärtungsbäder getropft. Durch den Zusatz von Calciumchlorid wurde eine ionotropische Gelbildung erreicht. Die Härtebäder bestanden ausserdem aus einem Glycerid und einem komplementären Hilfsstoff.

Tabelle 1

Härtebad	Zusammensetzung	Verhältnis
EtOH	Ethanol	–
HBA	Transcutol® HP	–
HBB	Transcutol® HP Imwitor 742 Propylencarbonat	1:1:1
HBC	Transcutol® HP Capmul MCM-C8 Propylencarbonat	2:1:1
HBD	Transcutol® HP Capmul MCM PEG 600	2:1:1
HBE	Transcutol® HP Labrafil M2125CS Pfefferminzöl	1:1:1

Die Partikelgrössen und -Formen der Mikrogele wurden mittels dynamischer Bildanalyse und Mikroskopie ermittelt. Mittels des Lowrys-Protein-Assays wurde quantifiziert, wie effizient das BSA in den Mikrogele eingeschlossen wurde («encapsulation-efficiency»). Untersucht wurde die Freisetzung von BSA mit einer USP2-Apparatur (Blattrührer, 37°C und 100 upm) in Phosphatpuffer bei pH 6.8. Zur Untersuchung der Stabilität wurden die Mikrogele über vier Wochen bei Raumtemperatur im Härtebad gelagert. Das Herausdiffundieren des Wirkstoffes («leakage») der Mikrogele wurde in Bezug auf die Verkapselungs-Effizienz bestimmt. Ausserdem wurde die Denaturierung von BSA über einen Zeitraum von vier Wochen mittels Zirkulardichroismus und SDS-PAGE gemessen.

Ergebnisse

Abhängig von der Zusammensetzung des genutzten Härtebades war die Form der erhaltenen Mikrogele sphärisch bis toroidal (Abbildung 2). Der Durchmesser lag jedoch bei allen Härtebädern um 300 µm.



Abbildung 2. Mikroskopbilder der mit BSA gefüllten Mikrogele mit EtOH (links), HBA (mitte), HBE (rechts). Massstab entspricht 1 mm.



Jan Kendall de Kruif, Universität Basel, hat am diesjährigen Swiss Pharma Science Day den Preis für das beste Poster in Pharmazeutischer Technologie erhalten: «Prilled Microgels in Lipid Dispersions for Oral Delivery of Biologicals». Das Technology Training Center Glatt (TTC) sponserte diesen Award.

¹ University of Applied Sciences and Arts Northwestern Switzerland, Institute of Pharma Technology, Muttensz

² University of Basel, Department of Pharmaceutical Sciences, Basel

³ University of Applied Sciences and Arts Northwestern Switzerland, Institute of Chemistry and Bioanalytics, Muttensz

⁴ Tillotts Pharma AG, Rheinfelden

Danksagung

Besonderer Dank gilt Benjamin Zaugg und Wiebke Kirchmeyer für ihre Hilfe bei der Übersetzung.

Die Bildanalyse (Abbildung 3) zeigt den Zusammenhang zwischen gemessener Grösse und Form der Partikel. Alle Mikrogele aus wasserfreien Aushärtungsbädern zeigten eine hohe Effizienz bei dem Einschluss von BSA (Verkapselungs-Effizienz >85%) und der Verlust von BSA aus den Mikrogele zeigte keine signifikanten Unterschiede mit Ausnahme des EtOH-Batches. (Abbildung 4).

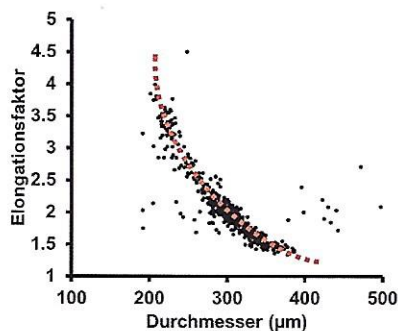


Abbildung 3. Streudiagramm von Partikelgrösse vs. -Formen aus HBA.

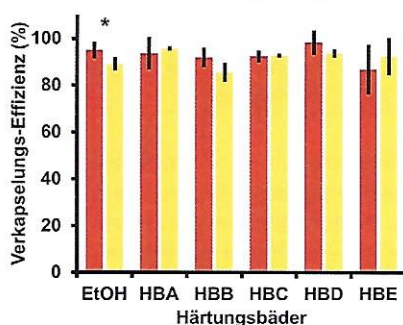


Abbildung 4. Verkapselungs-Effizienz unmittelbar nach der Herstellung (rot) und nach vier Wochen (gelb). * $p \geq 0.05$.

Die Mikrogele setzten schnell das BSA frei (>75% in den ersten 15 Minuten – Abbildung 5). Stabilitätsuntersuchungen mit SDS-PAGE (Abbildung 6) und zirkularem Dichroismus (Abbildung 7) zeigten nach einem Monat keine Denaturierung der Proteine mit Ausnahme des HBE-Systems.

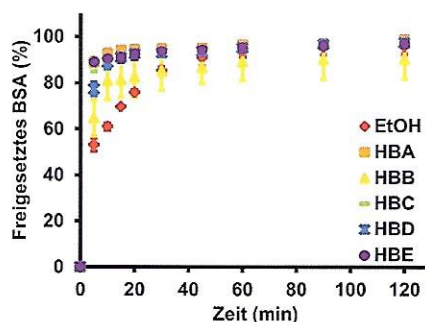


Abbildung 5. Freisetzung von BSA in Phosphatpuffer bei pH 6.8.

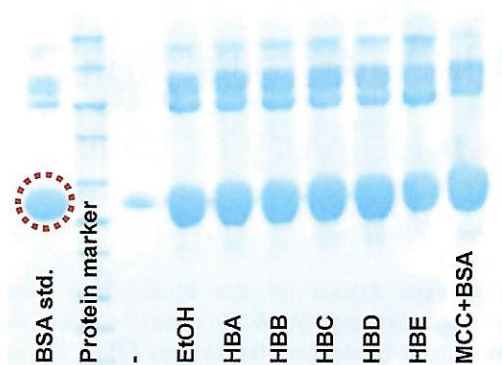


Abbildung 6. SDS-PAGE von BSA aus Mikrogele. Die Referenz für BSA (67 kDa) ist mit dem roten Kreis markiert.

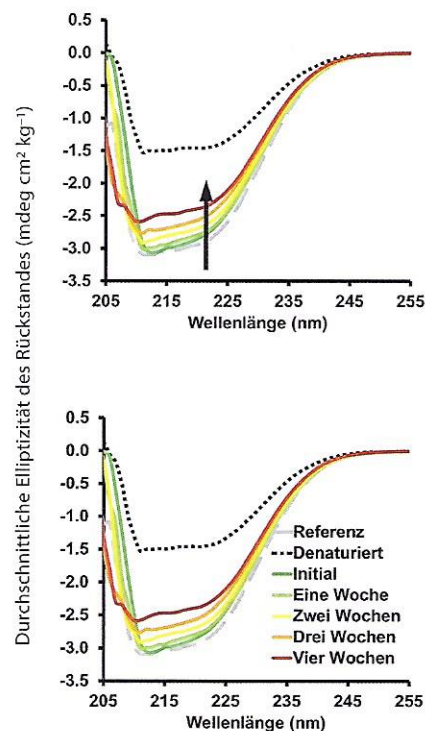


Abbildung 7. Zirkulardichroismus-Spektren der Batches HBE (oben) und EtOH (unten).

Zusammenfassung

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, makromolekül-enhaltende Mikrogele in nicht-wässrigen Medien mittels Sprühaushärtung herzustellen. Zur Verbesserung der Formulierung sind jedoch weitere biopharmazeutische Untersuchungen in Bezug auf die orale Verfügbarkeit von Proteinen nötig.

Korrespondenzadresse

Jan Kendall de Kruijff

E-mail: jankendall.dekruijff@fhnw.ch

Referenzen

- [1] Whelehan M, Marison IW. J Microencapsulation 2011; 28 (8): 669-88.
- [2] Zvonar A, Kristl J, Kerč J, Grabnar PA. J Microencapsulation 2009; 26 (8): 748-59.
- [3] Roy I, Gupta MN. Biotechnol Appl Biochem 2004; 39: 165-77.

Microgélules extrudées en milieu lipidique pour la formulation orale de produits biologiques

Jan Kendall de Kruif^{1,2}, Elizaveta Fasler-Kan³, Felipe Varum⁴, Roberto Bravo⁴, Martin Kuentz¹

Le but de ce travail est de développer une méthode d'extrusion utilisant un bain de trempe à base de lipides. Cette technique permet d'encapsuler des macromolécules biologiques dans des microgélules.

Au cours de la technique d'extrusion («prilling»), des solutions contenant à la fois des substances pharmaceutiques actives et des polymères tombent goutte à goutte dans un bain de trempe dans lequel les polymères se solidifient par réticulation transversale [1]. Des microgélules renfermant la substance active sont ainsi générées. La technique d'extrusion classique peut être améliorée par l'emploi d'une buse vibrante (fig.1) [2].

Sous l'effet des vibrations, le jet de liquide se divise en gouttelettes uniformes, ce qui permet d'obtenir une distribution relativement étroite de la taille des microgélules fabriquées. Les particules doivent ensuite être séparées du bain de trempe si l'on veut obtenir une forme galénique. Cette étape comporte cependant le risque d'endommager les macromolécules encapsulées [3].

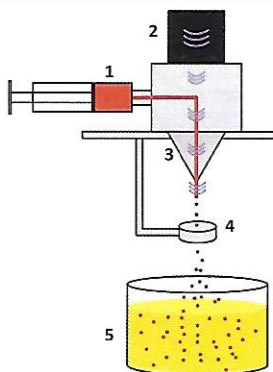


Fig. 1. Représentation de la buse vibrante.

1 Système de piston (seringue), qui contient la solution polymère. 2 Unité générant les vibrations. 3 Buse. 4 Anneau d'électrodes. 5 Bain de trempe.

Matériel et méthodes

Une solution d'albumine de sérum bovin (BSA) et de mono-N-carboxyméthyle chitosane (MCC) a été versée goutte à goutte au moyen d'une buse vibrante dans différents bains de trempe non aqueux (voir tableau 1). L'adjonction de chlorure de calcium a permis d'obtenir une gélification ionotrope. Les

bains de trempe étaient composés par ailleurs de glycérol et d'un adjuvant complémentaire.

Tableau 1

Bains de trempe	Composition	Rapport
EtOH	Ethanol	–
HBA	Transcutol® HP	–
HBB	Transcutol® HP Imwitor 742 Carbonate de propylène	1:1:1
HBC	Transcutol® HP Capmul MCM-C8 Carbonate de propylène	2:1:1
HBD	Transcutol® HP Capmul MCM PEG 600	2:1:1
HBE	Transcutol® HP Labrafil M2125CS Huile essentielle de menthe poivrée	1:1:1

La taille et la forme des particules des microgélules ont été examinées par microscopie et par système d'imagerie dynamique. L'efficacité avec laquelle le BSA était incorporé dans les microgélules («encapsulation-efficacy») a été quantifiée par la méthode de Lowry. Le BSA libéré a été examiné avec un appareil USP-2 (agitateur à pales, 37°C et 100 upm) contenant un tampon phosphate de pH 6,8.

Pour examiner la stabilité des microgélules, ces dernières ont été entreposées dans le bain de trempe durant quatre semaines à température ambiante. La diffusion du principe actif («leakage») contenu dans les microgélules a ensuite été déterminée par rapport à l'efficacité de l'encapsulation. En outre, la dénaturation du BSA a été mesurée sur une période de quatre semaines par dichroïsme circulaire et SDS-PAGE.



Fig. 2. Images prises au microscope montrant les microgélules remplies de BSA, avec EtOH (à gauche), HBA (au milieu) et HBE (à droite). La règle correspond à 1 mm.



Jan Kendall de Kruif, de l'Université de Bâle, a reçu lors du dernier Swiss Pharma Science Day le prix du meilleur poster en technologie pharmaceutique pour son poster «Prilled Microgélules in Lipid Dispersions for Oral Delivery of Biologicals». Cet Award était sponsorisé par le Technology Training Center de Glatt (TTC).

¹ University of Applied Sciences and Arts North-western Switzerland, Institute of Pharma Technology, Muttens

² University of Basel, Department of Pharmaceutical Sciences, Basel

³ University of Applied Sciences and Arts North-western Switzerland, Institute of Chemistry and Bioanalytics, Muttens

⁴ Tillotts Pharma AG, Rheinfelden

10 **Références**

- [1] Whelehan M, Marison IW. J Microencapsulation 2011; 28 (8): 669-88.
- [2] Zvonar A, Kristl J, Kerč J, Grabnar PA. J Microencapsulation 2009; 26 (8): 748-59.
- [3] Roy I, Gupta MN. Biotechnol Appl Biochem 2004; 39: 165-77.

Résultats

La forme sphérique à toroïdale des microgélules obtenues dépendait de la composition du bain de trempé utilisé (Fig. 2). Leur diamètre était cependant d'environ 300 µm pour tous les bains.

L'analyse d'image (voir Fig. 3) montre le rapport qu'il y a entre la taille mesurée et la forme des particules. Toutes les microgélules fabriquées dans les bains de trempé non aqueux ont montré une grande efficacité (>85 %) dans l'encapsulation du BSA («encapsulation-efficiency»). Par ailleurs, il n'y a pas eu de différence significative en matière de pertes de BSA entre les différentes microgélules, à l'exception du système EtOH (voir Fig. 4).

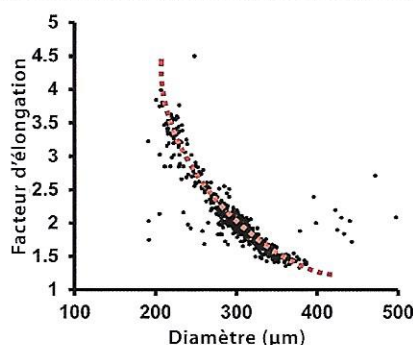


Fig. 3. Diagramme de dispersion représentant le rapport entre la taille et la forme des particules issues du système HBA.

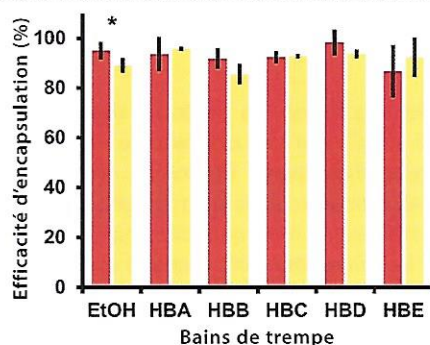


Fig. 4. Efficacité de l'encapsulation immédiatement après la fabrication (en rouge) et après 4 semaines (en jaune). * $p \geq 0.05$.

Les microgélules libèrent le BSA rapidement (>75 % dans les 15 premières minutes, voir Fig. 5). Les tests de stabilité effectués par SDS-PAGE (voir Fig. 6) et dichroïsme circulaire (voir Fig. 7) n'ont révélé aucune dénaturation des protéines après un mois, à l'exception du système HBE.

Résumé

Par ce travail, il a été montré qu'il est possible de fabriquer des microgélules contenant des macromolécules biologiques dans des milieux non aqueux au moyen de la technique d'extrusion. Pour améliorer la formulation, d'autres analyses biopharmaceutiques

en lien avec la disponibilité orale des protéines sont cependant nécessaires.

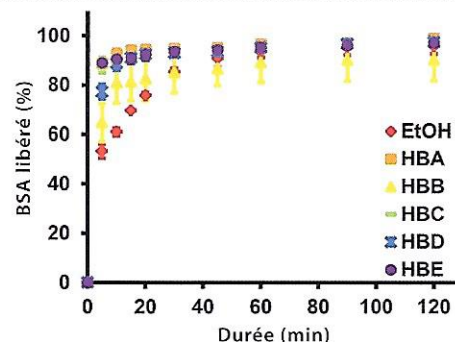


Fig. 5. Libération du BSA dans le tampon phosphate, de pH 6,8.

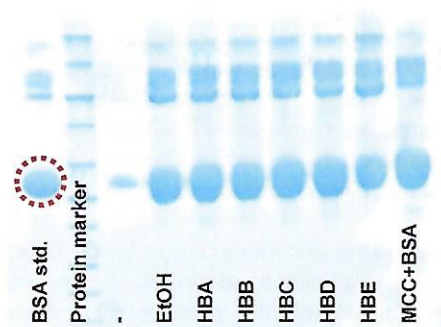


Fig. 6. Analyse par SDS-PAGE du BSA libéré par les microgélules. La référence du BSA (67 kDa) est indiquée par un cercle rouge.

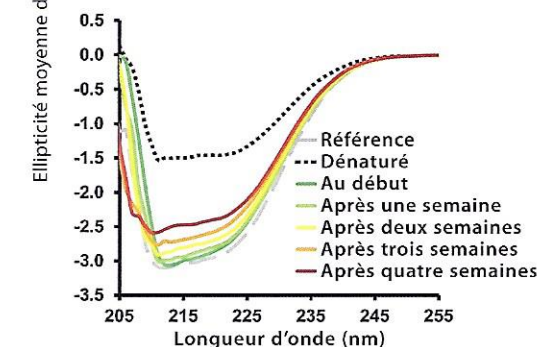
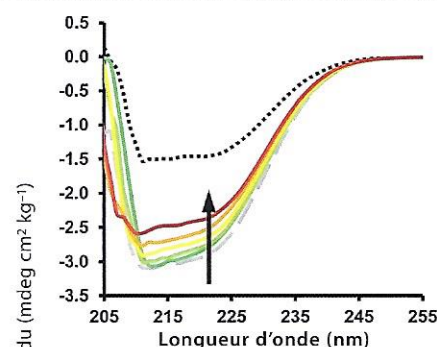


Fig. 7. Spectres du dichroïsme circulaire des systèmes HBE (en haut) et EtOH (en bas).

Adresse de
correspondance

Jan Kendall de Kruif
E-mail:
jankendall.dekruif@fnw.ch