

5. Zusammenfassung

In vitro Freisetzung von Lysozym aus *in situ* Arzneiformen – Methodische Aspekte

Es wurde eine Methode zur Freisetzung von Lysozym aus sich *in situ* bildenden, bioabbaubaren Darreichungsformen entwickelt, welche sowohl die Konzentration als auch die biologische Aktivität des in Acetat-Puffer gelösten Modelproteins während der Inkubation bei Körpertemperatur für bis zu 70 Tage erhielt. HPLC-Ergebnisse deuteten jedoch an, dass Lysozym in der wässrigen Lösung zeit- und temperaturabhängigen, wahrscheinlich chemischen Veränderungen unterworfen war. Proteinadsorption an die Oberfläche von Partikeln aus wasserunlöslichem PLGA war der Hauptgrund für Lysozymverluste während der Inkubation von wässrigen Proteinlösungen in Gegenwart des bioabbaubaren Polymers und Sesamöl, als typische Formulierungsbestandteile der *in situ* Arzneiformen. Während der hydrolyse-bedingten Erosion der PLGA-Partikel im wässrigen Medium konnte eine partielle Wiederauflösung von adsorbiertem Lysozym beobachtet werden. Allgemein waren Lysozymverluste während der Inkubation geringer, wenn die Proben in vertikaler Lage gelagert und damit nur geringfügig agitiert wurden. Der zu einer verbesserten Proteinstabilität führende leicht-saure pH-Wert des wässrigen Mediums hatte dabei keinen Einfluss auf die Hydrolysegeschwindigkeit von PLGA. Die Abbauraten waren in sehr guter Übereinstimmung mit berichteten *in vivo* und *in vitro* Daten.

Eine Extraktionsmethode wurde entwickelt, welche eine komplette Wiedergewinnung von nativem Lysozym aus nichtwässrigen Proteinlösungen und -suspensionen, *in situ* Implantaten (PLGA-Lösungen), *in situ* Mikropartikelemulsionen und getrockneten Implantaten ermöglichte. Auf Bedingungen, wie zum Beispiel Wasser / Lösemittel Gemische oder die Gegenwart von Phasengrenzen zwischen wässrigen Proteinlösungen und organischem Lösemitteln, die einen negativen Einfluss auf die strukturelle Integrität von Proteinen nehmen können, wurde dabei vollständig verzichtet. Die nichtwässrige Präzipitation von Lysozym in DMSO führte offensichtlich zur Bildung von renaturierten Proteinaggregaten, welche sich in wässrigem Medium wiederauflösen ließen und volle Aktivität zeigten. Die vollständige Extraktion von nativem Lysozym aus Öl-in-Öl *in situ* Mikropartikelemulsionen deutete darauf hin, dass zu keinen Verlusten oder irreversiblen Veränderungen des Proteins an der ausgebildeten Grenzfläche kam.

Formulierungsparameter von proteinbeladenen in situ Arzneiformen

In situ Systeme basierend auf wasserunmischbaren Polymerlösemittel

Die Erhöhung der PLGA-Konzentration in in situ Implantatformulierungen mit Triacetin als Polymerlösemittel verringerte die anfängliche Lysozymfreisetzung innerhalb der ersten Woche, während kein Einfluss auf die nachfolgende Kinetik zu verzeichnen war. Die Ergebnisse offenbarten eine unerwartet späte Freisetzungsphase noch nach 42 Tagen, welche wahrscheinlich auf eine verzögerte erosionsbedingte Proteinfreisetzung aus der Implantathülle zurückzuführen war. Trotz der zusätzlich gefundenen Freisetzungsphase konnten nicht mehr als 90 % der Lysozymbeladung der Formulierungen wiedergefunden werden.

Die Freisetzung von Lysozym aus in situ Implantaten mit triacetin als Polymerlösemittel wurde erheblich beschleunigt, wenn geringe Mengen Sesamöl in die proteinhaltigen PLGA-Lösungen einemulgiert wurden. Die beschleunigte Freisetzung von dispergierten Proteinpartikeln könnte dabei mit einer beobachteten Phasenseparation zwischen Öl und Polymerlösung in Zusammenhang stehen.

In situ Systeme basierend auf wassermischbaren Polymerlösemittel

Lysozym zeigte Instabilitäten in Zusammenhang mit NMP. Das Protein aggregierte, wenn Lösungen des Proteins in NMP mit wässrigem Medium verdünnt wurden. Des Weiteren konnten Inkubationszeit-abhängige Veränderungen des Proteins in NMP während der Lagerung bei Raumtemperatur mittels HPLC-Analyse gezeigt werden. Die Veränderungen in den HPLC-Chromatogrammen entsprachen dabei denen, die auch im wässrigen Medium allerdings nach längerer Inkubationszeit auftraten, was auf eine chemische Modifikationen vermuten lassen könnte. Eine Identifikation des Abbauprodukts wurde nicht vorgenommen.

Im Vergleich zu NMP ist DMSO ein besseres Lösemittel für Lysozym. Im Gegensatz zu NMP verursachte das Verdünnen von Lysozymlösungen in DMSO mit wässrigem Medium keine Proteinpräzipitation. Eine homogene Einarbeitung von Lysozym in DMSO-basierte PLGA-Lösungen konnte erreicht werden, wenn das Protein vor der Zugabe des Polymeren in DMSO gelöst wurde. Die Substanzen waren nicht phasenkompatibel in DMSO. In Übereinstimmung mit den in situ Formulierungen basierend auf Triacetin, wurden mit DMSO Freisetzungsprofile mit vier unterschiedlichen Charakteristiken erhalten, eine diffusionskontrollierte initiale gefolgt von einer erosionskontrollierten Phase, eine Phase mit nur geringer Lysozymfreisetzung und schließlich eine wahrscheinlich zweite erosionskontrollierte Phase. Die Freisetzungscharakteristik konnte unter der Annahme einer

Aufteilung der gesamten Lysozymbeladung auf drei verschiedene Kompartimente mathematisch beschrieben werden. Dabei wurde eine (semi-)empirische Beschreibung des Diffusionsvorgangs mit einem neuen theoretischen Model zur Beschreibung des Erosionsprozesses von PLGA kombiniert. Trotz den an das Stabilitätsoptimum von Lysozym angepassten Freisetzungsbedingungen waren die Freisetzungen aus den in situ Arzneiformen unvollständig. Eine wesentliche Verbesserung des Models wäre durch die Vorhersagbarkeit der Wiederfindungsrate des Proteins erreichbar. Eine breitere Anwendung des mathematischen Models auf andere, vornehmlich durch Polymererosion freigesetzte Arzneistoffe wäre vorstellbar.

Eine Steigerung der Freisetzung von Lysozym aus in situ Implantaten wurde durch die Einarbeitung der Hilfsstoffe Polyvinylpyrrolidon und Protaminsulfat erreicht, was sehr wahrscheinlich von der präferentiellen Adsorption an die PLGA-Oberfläche herrührte.

In situ Systeme basierend auf Gemischen von Polymerlösemittel

Die Auflösung von Lysozym in DMSO mit nachfolgender Präzipitation durch Zugabe von PLGA and Ethylacetat oder Triacetin ermöglichte die Einarbeitung von Lysozym als feinverteiltes Proteinpräzipitat in in situ Implantate (PLGA-Lösungen). Lysozym, welches nach dem Präzipitieren extrahiert wurde, zeigte volle biologische Aktivität. Die Anwendung der nichtwässrigen Proteinausfällung als Herstellungsschritt von bioabbaubaren Arzneiformen könnte damit eine aufwendige Mikronisierung von Proteinen erübrigen. Lysozym war stabil in DMSO-Triacetin-Mischungen bei Raumtemperatur unabhängig davon, ob es gelöst (DMSO), präzipitiert (DMSO / Triacetin) oder dispergiert (DMSO / Triacetin und Triacetin) vorlag. Allerdings bildeten sich scheinbar inaktive kovalente Aggregate in Lysozymbelösungen in DMSO, welche bei 40°C gelagert wurden. Die Lagerstabilität von Lysozym in in situ Implantaten (PLGA-Lösungen) hing davon ab, wie das Protein in der Formulierung vorlag. Je mehr Protein in dem System gelöst (solvatisiert) war, desto schneller aggregierte es. Das gelagerte und aggregierte Protein zeigte eine verzögerte Auflösung, wenn es nach der Extraktion in wässriges Medium eingebracht wurde, was auf eine zumindest partielle Reversibilität der Aggregate hindeutete.

Zusammensetzung der externen Phase der in situ Mikropartikelemulsionen

Das Entleeren von Injektionsspritzen, die mit unstabilierten in situ Mikropartikelemulsionen (ISM-Emulsionen) beladen waren, erforderte ähnliche Maximalkräfte verglichen mit den korrespondierenden, hoch-viskosen in situ Implantatformulierungen. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass eine schnelle Phasenseparation in den ISM-Emulsionen zur Entstehung von großen Polymerlösungstropfen führte, die den inneren Durchmesser der Injektionsnadel übertrafen und damit die Nadel zeitweilig blockierten. Daraus wurde geschlossen, dass eine ausreichende Qualität und Stabilität der in situ Mikropartikelemulsionen für eine verbesserte Injizierbarkeit im Vergleich zu den in situ Implantaten unerlässlich zu sein scheint. Eine Steigerung der Stabilität von Öl-in-Öl ISM-Emulsionen basierend auf DMSO konnte dabei mit Phospholipiden erreicht werden.