

Diss. ETH no. 19138

**ENGINEERING BIO-PHARMACEUTICAL  
MICRO- AND NANO-PARTICLES USING  
SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE AS  
ANTI-SOLVENT**

Dissertation submitted to the

ETH ZURICH

for the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

presented by

Johannes Kluge

Process Engineer, ETH Zurich

born on January 3<sup>rd</sup>, 1980

Citizen of Germany

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Marco Mazzotti (ETH Zurich), examiner

Prof. Dr. Raffaele Mezzenga (ETH Zurich), co-examiner

Dr. Gerhard Muhrer (Novartis Pharma AG), co-examiner

Zurich 2010

---

## Abstract

The combination of active pharmaceutical ingredients (APIs) with polymeric excipients into functional drug-polymer co-formulations bears huge potential for innovations in the field of drug formulation technology. However, tapping this potential requires novel and innovative processes, tailored to the particular needs of this range of products. In this category fall a number of techniques exploiting the favorable properties of near- and supercritical fluids, especially of supercritical CO<sub>2</sub> (scCO<sub>2</sub>), as antisolvents and solvent extracting agents. Such processes may be exploited for the direct manufacturing of high quality products exhibiting a maximum degree of purity. The aim of this work is to contribute to the development of such technology towards practical implementation on an industrial scale. First, pharmaceutical applications are identified where drug-polymer composites represent an especially promising strategy towards innovative products. Then, an experimental setup implemented at the Separation Processes Laboratory at ETH is used to evaluate the potential of supercritical processes in this field, especially by highlighting the quality of manufactured products using suitable analytical techniques.

A first study concerns APIs that are sparingly soluble in water. In order to improve their bioavailability upon oral administration, such drugs are often combined with a water-soluble polymeric excipient. In this context, co-formulations of the sparingly soluble anticonvulsant phenytoin and the water-soluble polymer poly-(vinyl pyrrolidone)-K30 (PVP) have been precipitated using dense scCO<sub>2</sub> as an antisolvent. While the pure API was precipitated in the form of needle-shaped crystals, the pure polymer yielded spherical and fully amorphous nanoparticles. Co-precipitation of both substances yielded products in which the drug was stabilized in the fully amorphous polymer matrix up to a phenytoin content of 40 wt.%; the morphology of these products was very similar to pure PVP. In products exhibiting a drug content in excess of 40 wt.%, phenytoin was also present in crystalline form. The same threshold concentration was found to apply at different operating conditions. Fully amorphous products did not recrystallize upon one year of storage at ambient

---

conditions, and hence are considered to be long-term stable.

A second and more comprehensive study focuses on the manufacturing of micro- and nanoparticles of the bio-compatible and bio-degradable polymer poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA). This water-insoluble polymer is widely used for the administration of sensitive biopharmaceuticals and in order to achieve controlled and prolonged drug release. In all these applications, the size of composite particles plays an important role. Therefore, the potential of manufacturing such particles by a novel process called Supercritical Fluid Extraction of Emulsions (SFEE) is investigated. First, the process is compared to conventional manufacturing techniques in order to highlight its general advantages. Moreover, different strategies are introduced that may be used for the encapsulation of drugs. Then, it is demonstrated in a series of experiments how process parameters like the PLGA concentration and the stirring rate during emulsion preparation may be varied in order to produce particles of pure PLGA with average sizes ranging between 100 nm and a few  $\mu\text{m}$  in a controlled and reproducible manner. Finally, three different methods for the encapsulation of lysozyme into composite particles have been investigated and evaluated experimentally. using the most successful method, an encapsulation efficiency of 48.5% has been achieved.

Further, the encapsulation of the non-steroidal antiinflammatory drug ketoprofen (KET) into PLGA is investigated. Here, the stability of composite nanoparticles is of interest, and has been investigated during one week of storage in aqueous suspension. Depending on their drug content, products could be grouped into three different categories according to their stability behavior. Products containing less than 5 wt.% KET were observed to be stable, while for polymeric particles containing in excess of 10 wt.% KET a significant decrease in drug content could be observed over time, together with the formation of KET crystals by recrystallization. Products with a drug content in between 5 to 10 wt.% exhibited a metastable behavior, i.e. their drug content remained constant while crystals were absent, however the addition of KET crystals led to desupersaturation and a decrease in drug content. In all sus-

---

pensions equilibrated with crystals of racemic KET, particles were observed to approach a KET level of approximately 5 wt.%, independent of their initial drug content. This behavior is rationalized assuming a solubility of approximately 5 wt.% for KET in PLGA at ambient temperature, together with a metastable zone extending to levels of at least 10 wt.%.

Based on this concept, the solubility of KET in PLGA has been determined in an extended range of temperatures between 0°C and 50°C. Also the effect of KET chirality has been investigated by using two different crystalline forms of KET, namely enantiopure S-KET and a racemic compound, RS-KET, in equilibration experiments. It was found that the level of KET established in PLGA at equilibrium increases with temperature, e.g. from 6.9 wt.% at 20°C to 25.8 wt.% at 40°C for the case of S-KET. At each temperature level, the solubility of KET in PLGA was lower for equilibration with RS-KET, significantly higher for equilibration with S-KET, and the highest for simultaneous equilibration with both crystalline species. Experimental solubility data of KET in PLGA were also used in a model where the polymer solution was described by the Sanchez-Lacombe equation of state.

Finally, the SFEE based manufacturing of biocompatible magnetic nanocomposites made of magnetite nanocrystals dispersed in PLGA nanoparticles has been investigated. The influence of those parameters affecting the final particle size distribution and morphology, primarily the concentration of emulsifier and the magnetite content, has been investigated, so as to optimize the process. Analysis of the products indicated that narrower size distributions are obtained with larger amounts of emulsifier and lower amounts of magnetite. Using ricinoleic acid-stabilized magnetic nanocrystals, magnetite was observed to be distributed inhomogeneously in the polymer and to accumulate on one hemisphere of the particle, hence the morphology of the composite particles tended to be of Janus type. Using magnetite nanoparticles functionalized by polylactide, a much more homogeneous distribution of magnetite in the PLGA particles could be achieved.

---

## Zusammenfassung

Die Kombination von pharmazeutischen Wirkstoffen mit polymerischen Zuschlagstoffen birgt ein grosses Innovationspotential im Bereich pharmazeutischer Formulierungen. Um dieses Potential voll auszuschöpfen, werden neue Verfahren benötigt, welche optimal auf den Produktbereich Wirkstoff-Polymer Ko-Formulierungen zugeschnitten sind. In diesen Bereich fallen Prozesse, welche die vorteilhaften Eigenschaften von nah- bzw. überkritischem CO<sub>2</sub> als Antilösungsmittel ausnützen. Mit solchen Verfahren können direkt und ohne weitere Arbeitsschritte Produkte hergestellt werden, welche insbesondere bezüglich ihrer Reinheit eine hohe Produktqualität aufweisen. Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, dass solche Verfahren möglichst rasch zur industriellen Anwendung gelangen. Dazu werden zunächst pharmazeutische Anwendungsbereiche beschrieben, in denen besonders Ko-Formulierungen zu innovativen Produkten führen können. Mit Hilfe einer am Institut für Verfahrenstechnik realisierten Anlage werden dann verschiedene Herstellungsverfahren sowie die Qualität der damit hergestellten Produkte experimentell ausgewertet.

Die erste Studie behandelt schlecht wasserlösliche Wirkstoffe, welche zwecks einer verbesserten Bioverfügbarkeit oft mit einem gut wasserlöslichen Polymer zu einer Ko-formulierung verarbeitet werden. In diesem Zusammenhang wurde die gemeinsame Ausfällung von Phenytoin, einem schwer löslichen Wirkstoff, und Polyvinylpyrrolidon (PVP), einem wasserlöslichen Polymer, aus einer Lösung mittels superkritischem CO<sub>2</sub> als Antilösungsmittel untersucht. Hierbei wurde der Wirkstoff in Form von nadelförmigen Kristallen und das Polymer in Form von viel kleineren amorphen Nano-Kugeln ausgefällt; es ergaben sich also für beide Stoffe separat jeweils sehr unterschiedliche Produkte. Bei gemeinsamen Fällungsexperimenten konnte der Wirkstoff bis zu einer Konzentration von 40 Gew.% in der amorphen Polymermatrix stabilisiert werden; bei noch höheren Wirkstoffgehalten war Phenytoin im Produkt zusätzlich auch in kristalliner Form zu finden. Die Produktmorphologien und auch der Schwellenwert von 40 Gew.% für das Auftreten von Kristallen haben

---

sich als weitgehend unabhängig von Prozessparametern wie Temperatur und Druck erwiesen. Vollständig amorphe Produkte mit einem Wirkstoffgehalt unter 40 Gew.% zeigten über mehrere Jahre keine Anzeichen für Rekristallisation von Phenytoin und können somit als langfristig stabil bezeichnet werden.

Eine zweite und umfangreichere Studie beschäftigt sich mit der Herstellung von Partikeln des bioabbaubaren und biokompatiblen Polymers Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA). Dieses Polymer ist wasserunlöslich, und daher geeignet für die Herstellung von Mikropartikeln zwecks kontrollierter Wirkstofffreisetzung oder zielgerichteter Wirkstoffverabreichung (Targeting). Da bei solchen Anwendungen die Partikelgrösse eine wichtige Rolle spielt, wird in dieser Arbeit die Herstellung solcher Partikel mittels Superkritischer Fluid Extraktion von Emulsionen (SFEE) untersucht. Zunächst wird beschrieben, welche Vorteile dieses Verfahren gegenüber anderen Herstellungsprozessen auszeichnet. Weiter werden verschiedene Strategien vorgestellt, mittels welcher die Einkapsulierung von Wirkstoffen erreicht werden kann. Dann wird in einer Serie von Experimenten gezeigt, wie über Parameter wie die PLGA-Konzentration in der Emulsion oder die Rührgeschwindigkeit bei der Emulsionsherstellung die Partikelgrösse zwischen ca. 100 nm und einigen  $\mu\text{m}$  gezielt kontrolliert werden kann. In einem letzten Schritt werden drei verschiedene Strategien zur Einkapsulierung von Lysozym experimentell ausgewertet und miteinander verglichen. Hierbei erreicht die beste Methode eine Einkapsulierungseffizienz von 48%.

Weiter wird die Einkapsulierung von Ketoprofen (KET), einem entzündungshemmenden Wirkstoff, in PLGA beschrieben. Hier ist vor allem die Produktstabilität von Interesse, welche in wässriger Suspension über einen Zeitraum von einer Woche beobachtet wurde. In Abhängigkeit vom Wirkstoffgehalt konnten die Produkte in drei verschiedene Kategorien eingeteilt werden. Solche mit weniger als 5 Gew.% KET waren stabil, während bei Produkten mit über 10 Gew.% KET eine deutliche Abnahme des Wirkstoffgehalts beobachtet werden konnte, einhergehend mit der Rekristallisation von KET. Produkte mit einem Gehalt zwischen 5 und 10 Gew.% KET zeigten ein metastabiles Verhalten, d.h. der Wirkstoffgehalt blieb in der Abwesenheit von Kristallen un-

---

verändert, eine Zugabe von KET-Kristallen führte jedoch zu einer Abnahme des Wirkstoffgehalts in den Partikeln der Ko-formulierung. Unabhängig vom Wirkstoffgehalt am Anfang haben alle Suspensionen, welche mit kristallinem KET ins Gleichgewicht gebracht wurden, allmählich einen Wirkstoffgehalt von 5 Gew.% erreicht. Dies wird damit erklärt, dass bei Umgebungstemperatur die Gleichgewichtslöslichkeit von KET in PLGA bei 5 Gew.% liegt.

Basierend auf dem eben vorgestellten Konzept wurde weiter die Löslichkeit von KET in PLGA in einem erweiterten Temperaturbereich zwischen 0°C und 50°C ermittelt. Zudem wurde bei KET der Einfluss der Chiralität auf die Löslichkeit untersucht. Dazu wurden zwei unterschiedliche Kristallformen von KET, nämlich enantiomerenreines S-KET und ein racemischer Mischkristall RS-KET, verwendet. Wie erwartet nimmt die Löslichkeit von KET in PLGA mit steigender Temperatur zu. Bei allen Temperaturen wurde für RS-KET eine wesentlich niedrigere Löslichkeit ermittelt als für S-KET, wobei die höchste Löslichkeit für gleichzeitiges Equilibrieren mit S-KET und RS-KET gemessen wurde. Die experimentellen Daten wurden für ein Modell des Löslichkeitsverhaltens herangezogen, in dem die Polymerlösung mit der Sanchez-Lacombe Zustandsgleichung beschrieben wurde.

Schliesslich wurde die Enkapsulierung von Magnetit-Nanopartikeln in PLGA mittels SFEE untersucht, wobei eine möglichst hohe Beladung der Partikel mit Magnetit sowie die Herstellung möglichst kleiner Partikel mit einer möglichst engen Grössenverteilung erreicht werden sollte. Untersucht wurde, welchen Einfluss die Konzentration des die Emulsion stabilisierenden Netzmittels auf die Produktqualität hat. Eine wichtige Rolle spielt auch die Funktionalisierung der Magnetit-Nanopartikel: Mit Ricinolsäure funktionalisierter Magnetit war ungleichmässig und einseitig in den PLGA-Partikeln verteilt, somit ergaben sich vorwiegend sogenannte Januspartikel. Hingegen war mit Polylactide funktionalisierter Magnetit auch bei höheren Konzentrationen gleichmässig im PLGA verteilt.