



Doctoral Thesis

Novel strategies and technologies for the aseptic microencapsulation of pharmaceutical compounds

Author(s):

Freitas, Sergio L.P.

Publication Date:

2005

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005069007> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 16012

**Novel strategies and technologies for the aseptic
microencapsulation of pharmaceutical compounds**

A dissertation submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology Zurich

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by

Sergio L.P. Freitas

Chemical Engineer, Technische Universität Clausthal

Born November 24th 1973

Citizen of the Federal Republic of Germany

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. H.P. Merkle, examiner

PD Dr. B. Gander, co-examiner

Prof. Dr. J.P. Benoit, co-examiner

2005

Abstract

The development and production of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres for controlled parenteral drug delivery faces two main hurdles in an industrial setting, namely the necessity of preparing a sterile particulate product and the challenge of scale-up of relatively complex processes. As PLGA is sensitive to heat ($T_g \approx 40^\circ\text{C}$) and γ -rays (radiolytic chain scission), PLGA microspheres cannot be terminally sterilised by heat and γ -irradiation is detrimental to the product quality. Therefore, manufacturing under aseptic GMP conditions is the method of choice. In this work we developed new methodologies of emulsification and microsphere formation, which are particularly suited for aseptic processing and scaling-up. The novel processes were developed and assessed by microencapsulating bovine serum albumin (BSA), as a model protein drug, into PLGA and evaluating various process and formulation parameters.

Chapter I reviews the various existing techniques to prepare microspheres by solvent extraction/evaporation, the most frequently used method for microencapsulation. Initial lab-scale experiments are frequently performed in simple beaker/stirrer set-ups, which are not appropriate for the production of amounts suitable for clinical trials and market introduction. More sophisticated technologies are required allowing for economic, robust, well-controllable and aseptic production of microspheres. Microsphere preparation by solvent extraction/evaporation can be subdivided into four major sub-steps, namely (i) incorporation of the bioactive compound, (ii) formation of the microdroplets, (iii) solvent removal and (iv) harvesting and drying the particles. For the formation of microdroplets, stirring, static mixing, extrusion through needles, microfabricated microchannel devices or membranes, and dripping using electrostatic forces and ultrasonic jet excitation were examined. Removal of the biodegradable matrix's solvent may be achieved by evaporation, possibly assisted by heat or reduced pressure, or by extraction, for which aqueous or organic solutions may be employed.

Commonly, the first step in preparing drug-loaded microspheres is the formation of a dispersion of the bioactive compound in a solution of the biodegradable polymer. For the encapsulation of proteins, this is frequently achieved

by ultrasonic emulsification of an aqueous protein solution in an organic solution of the polymer using a standard ultrasonic probe and a small vessel. In **chapter II**, a flow-through ultrasonic cell is presented for this purpose, based on exciting a steel jacket, which transmitted the sound waves via pressurised water to a glass tube installed inside the jacket. This set-up prevents contamination of the sonicated dispersion with metallic particles eroded from the sonotrode as well as microbial contamination from the environment. To characterise the novel system, vegetable oil-in-water emulsions, which constitute a standard model system for evaluating emulsification equipment, were chosen. The starting materials were fed into the ultrasonic cell as coarse pre-emulsions. During passage through the cell, the emulsion mean droplet diameter was decreased by two orders of magnitude yielding Sauter diameters of 0.5 μm and below with very good repeatability. Increasing the residence time in the ultrasonic field and the sonication power both lowered the emulsion mean diameter, while higher disperse phase viscosity and interfacial tension tended to increase the droplet sizes. The energetic efficiency amounted to a rather low 10%, which was ascribed to the complex mechanism of energy transfer.

In **chapter III**, a static micromixer, consisting in essence of an array of microchannels was evaluated for the formation of BSA-loaded PLGA microspheres by solvent extraction. The mixer's simple set-up along with its small size, easy handling and suitability for continuous production makes it well suited for aseptic processing. Scale-up is easily feasible through parallel installation of a sufficient number of micromixers ("number-up"). The mean diameter of the microspheres was varied between 9 and 30 μm simply by modulating the flow rates of the mixed fluids. The microsphere size distributions were excellently reproducible and largely unaffected by the polymer solution concentration, polymer type and nominal BSA load, but depended on the type of polymer solvent. BSA encapsulation efficiencies were mostly in the region of 75 – 85%.

In **chapter IV**, the ultrasonic flow-through cell and the micromixer were combined to prepare BSA-loaded microspheres. While the ultrasonic cell produced an emulsion of a BSA solution in a PLGA solution, the micromixer further processed this emulsion along with the extraction medium to form microspheres. The BSA-in-PLGA emulsions exhibited mean droplet sizes of

<700 nm. Their further processing into microspheres of 15 – 40 μm mean diameter resulted in approx. 70% BSA encapsulation efficiency. Batch-to-batch reproducibility was excellent. Microsphere batches produced under aseptic conditions to assure product sterility exhibited no microbial contamination when examined by a simplified sterility test.

Finally, **chapter V** describes a spray-drying technology potentially suitable for aseptic processing. The process consists of feeding a fluid through an ultrasonic atomiser, drying the spray under reduced pressure and collecting the particles in a liquid bath. Drying by mild vacuum instead of warm air, as employed in conventional spray-drying, and simple particle recovery render this method suitable for aseptic microsphere preparation. As in the previous chapters, PLGA microspheres engulfing BSA were studied as a model system. Particle yields of above 80% exceeded largely values found for conventional laboratory-scale spray-drying. BSA encapsulation efficiency mostly ranged in the region of 60%, with losses probably occurring through partitioning into the aqueous collection bath. Mean particle sizes ranged from 13 to 24 μm , depending on the polymer type and solvent; particle size distributions were excellently reproducible. The microspheres were found to be very porous and exhibited a pronounced 24 h burst release of above 50% of total dose, probably promoted by the porosity. However, when more concentrated polymer solutions were employed, burst release was significantly reduced to an average of 16%.

Zusammenfassung

Die pilot- und grosstechnische Produktion von Mikrosphären aus Poly(milch-co-glykolsäure) (PLGA) als parenteral verabreichtes System zur kontrollierten Wirkstoffabgabe hat zwei Hürden zu überwinden: Einerseits die Notwendigkeit, ein steriles partikuläres Produkt zu erzeugen und andererseits die Aufstufung relativ komplexer Prozesse. Da PLGA hitzeempfindlich reagiert ($T_g \approx 40^\circ\text{C}$), ist eine Sterilisation des Endprodukts über Hitze oder Dampf nicht möglich. Der Einsatz von γ -Strahlen zur Sterilisation kann zu einer Spaltung der Polymerketten und damit zu einem negativ veränderten Freisetzungverhalten des Wirkstoffs aus den Mikrosphären führen. Aus diesen Gründen ist die aseptische Produktion der Mikrosphären zu präferieren. Im Rahmen dieser Arbeit sollten Verfahren zur Emulgierung und zur Produktion von Mikrosphären entwickelt werden, die für eine aseptische Prozessführung besonders gut geeignet sind und sich einfach aufstufen lassen. Die entwickelten Verfahren wurden anhand der Verkapselung von bovinem Serumalbumin (BSA) als Modellprotein in PLGA-Mikrosphären charakterisiert und der Einfluss verschiedener Prozess- und Formulierungsparameter wurde untersucht.

Kapitel I gibt einen Überblick über den aktuellen Stand der Technik bei Verfahren zur Mikroverkapselung mittels Lösungsmittlextraktion/-evaporation, die am häufigsten angewendete Methode zur Mikroverkapselung. Erste Laborversuche mit dieser Methode werden gewöhnlich in einem einfachen Rührgefäss durchgeführt. Dieses Verfahren ist jedoch ungeeignet, um grössere Mengen an Mikrosphären in einer für klinische Studien oder eine Vermarktung ausreichenden Qualität zu produzieren. Hier sind wirtschaftliche, robuste und verlässlich steuerbare Prozesse erforderlich. Die Mikroverkapselung mittels Lösungsmittlextraktion/-evaporation lässt sich in vier Teilprozesse unterteilen: (1) Einarbeiten der Wirksubstanz, (2) Bilden der Mikrotropfen, (3) Entfernen des Lösungsmittels und (4) Separieren und Trocknen der ausgehärteten Mikrosphären. Mikrotropfen können durch Rühren, statisches Mischen, Extrusion via Hohnadeln, Mikrokanalsysteme oder Membranen, sowie durch Zertropfung mittels elektrostatischer Kräfte oder Ultraschallanregung eines Flüssigkeitsstrahls erzeugt werden. Das Lösungsmittel, in dem das Matrixmaterial zusammen mit der Wirksubstanz gelöst ist, kann durch Verdampfung – gegebenen-

falls unterstützt durch Wärmezufuhr oder Unterdruck – oder per Extraktion mittels wässriger oder organischer Lösungen aus den zuvor gebildeten Mikrotropfen entfernt werden.

Der erste Verfahrensschritt bei der Herstellung wirkstoffbeladener Mikrosphären besteht gewöhnlich in der Dispergierung der Wirksubstanz in einer Lösung des matrixbildenden Materials. Bei der Verkapselung von Proteinen wird diese Dispersion häufig durch Emulgierung einer wässrigen Protein- in einer organischen Matrixlösung mittels Ultraschall erhalten. Dabei wird häufig eine Ultraschallsonde in ein kleines, die beiden Lösungen enthaltendes Gefäss getaucht und aktiviert. Eine Alternative zu diesem Vorgehen wird in **Kapitel II** vorgestellt. Die dort beschriebene Durchfluss-Ultraschallzelle besteht aus einem Glassrohr, das mittig in einem Stahlmantel installiert ist, welcher von einer Sonotrode in Ultraschallschwingungen versetzt wird. Eine Übertragung der Schallwellen erfolgt durch unter Druck gesetztes Wasser, das den Zwischenraum zwischen Glassrohr und Stahlmantel durchströmt. Durch dieses Verfahren wird eine Kontamination des beschallten Gutes mit Metallpartikeln, welche von der Sonotrode erodiert werden könnten, verhindert. Durch die kontinuierliche Verfahrensweise und die vollständige Abtrennung des beschallten Gutes von der Umgebung wird eine mikrobielle Kontamination verhindert. Die Ultraschall-Durchflusszelle wurde anhand der Emulgierung von pflanzlichen Ölen in Wasser - einem Standardsystem zur Charakterisierung von Emulgierverfahren - untersucht. Dabei wurden Öl und Wasser der Ultraschallzelle als grobe Voremulsion zugeführt. Während der Passage durch die Zelle wurde die Emulsionstropfengrösse um zwei Grössenordnungen verringert, so dass am Ausgang Emulsionen mit einem Sauter-Durchmesser von $0,5 \mu\text{m}$ erhalten wurden. Die Ergebnisse waren dabei hervorragend reproduzierbar. Eine Erhöhung der Schalleistung und eine Verlängerung der Verweilzeit im Schallfeld resultierten in kleineren, eine disperse Phase höherer Viskosität und eine erhöhte Grenzflächen-spannung in grösseren Emulsionströpfchen. Die Effizienz der Energieübertragung betrug nur rund 10%, was dem verhältnismässig komplexen Übertragungsmechanismus zugeschrieben wurde.

Kapitel III beschreibt die Verwendung eines statischen Mikromischers zur Verkapselung von BSA in PLGA-Mikrosphären mittels Lösungsmittelextrak-

tion. Die Tröpfchenbildung innerhalb des Mischers findet in einem gitterförmigen System aus Mikrokanälen statt. Seine simple Konstruktion, geringe Grösse, einfache Handhabung sowie seine Eignung zu kontinuierlicher Produktion lassen den Mikromischer ideal für eine aseptische Produktion von Mikrosphären erscheinen. Eine Aufstufung des Prozesses ist sehr einfach durch Parallelschalten hinreichend vieler Mischer möglich („number-up“). Der mittlere Durchmesser der erzeugten Mikrosphären konnte durch einfache Variation der Flussraten, mit denen die Flüssigkeiten den Mischer passieren, in einem Bereich von 9 bis 30 μm eingestellt werden. Die Partikelgrössenverteilung der Mikrosphären war problemlos reproduzierbar und weitgehend unbeeinflusst von der Konzentration der Polymerlösung, dem Typ des Polymers, sowie der Beladung mit BSA. Im Gegensatz dazu zeigte das zum Lösen des Polymers verwendete Lösungsmittel deutlichen Einfluss auf die Partikelgrösse der erzeugten Mikrosphären. Die Effizienz der BSA-Verkapselung lag generell im Bereich von 75 – 85%.

Kapitel IV beschreibt die Kombination von Ultraschall-Durchflusszelle und statischem Mikromischer zur Produktion von BSA-beladenen Mikrosphären. Die Ultraschallzelle erzeugt dabei in einem ersten Schritt eine Emulsion aus einer BSA- und einer PLGA-Lösung. Diese wird nachfolgend im Mikromischer zu im Extraktionsmedium dispergierten Mikrosphären weiterverarbeitet. Die mittlere Tröpfchengrösse der mittels Ultraschallzelle produzierten BSA/PLGA-Emulsionen lag stets unterhalb 700 nm. Die daraus erzeugten Mikrosphären wiesen einen mittleren Durchmesser von 15 – 40 μm und eine Verkapselungseffizienz von ca. 70% des eingesetzten BSAs auf. Die Reproduzierbarkeit der Versuchsergebnisse war gut. Unter aseptischen Bedingungen mit diesem Verfahren hergestellte Mikrosphären wiesen in einem vereinfachten Sterilitätstest keinerlei mikrobielle Kontamination auf.

Im **Kapitel V** wird schliesslich ein Sprühtrocknungsverfahren beschrieben, welches für eine aseptische Produktion von Mikrosphären gut geeignet erscheint. Eine die Wirksubstanz und Polymer enthaltende Lösung wird dabei mittels Ultraschallsprühkopf in einen unter verringertem Druck stehenden Glasbehälter zerstäubt und dabei getrocknet. Die entstehenden Partikel sedimentieren in ein Auffangbad, mit dem sie aus dem Behälter entnommen werden können. Die Verwendung von Unterdruck anstelle warmer Luft, wie in herkömmli-

cher Sprühtrocknung verwendet, und die einfache Gewinnung der in der Auffanglösung dispergierten Partikel vereinfachen eine aseptische Verfahrensweise ganz erheblich. Wie schon in den vorhergehenden Kapiteln wurde das Verfahren anhand der Verkapselung von BSA in PLGA-Mikrosphären charakterisiert. Produktausbeuten von über 80% übersteigen die in konventionellen Laborsprühtrocknern erzielten bei weitem. Die Effizienz der BSA-Einkapselung lag mit rund 60% eher niedrig. Die Ursache liegt vermutlich in der Diffusion von BSA aus den dispergierten Mikrosphären in das wässrige Auffangbad. Je nach verwendetem Polymertyp und -lösungsmittel lag die mittlere Partikelgrösse zwischen 13 und 24 μm . Die Partikelgrössenverteilung liess sich gut reproduzieren. Die Mikrosphären waren sehr porös und zeigten vermutlich deshalb eine ausgeprägte Startfreisetzung von über 50% der Gesamtdosis innerhalb der ersten 24h. Mit der Verwendung einer konzentrierteren Polymerlösung konnte die anfängliche Freisetzung jedoch deutlich auf ca. 16% reduziert werden.