

# Leitfaden für die Methodenentwicklung mit dem Agilent NanoDis System

## Autoren

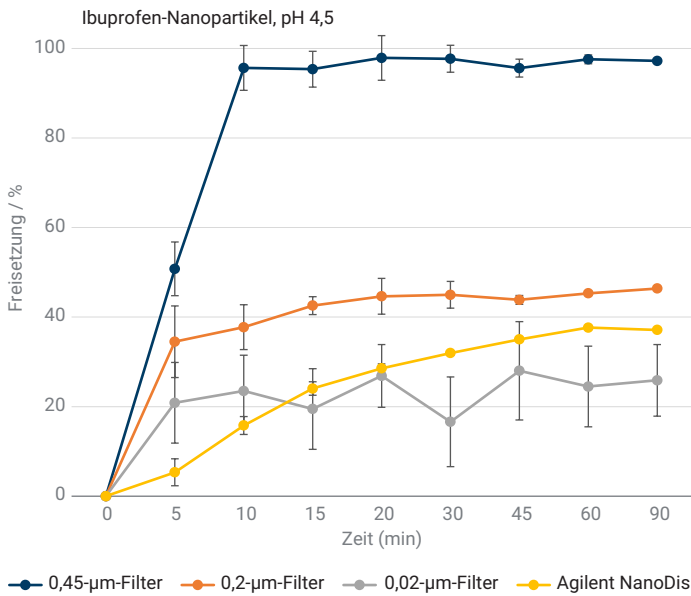
Dr. Emre Türelı  
MyBiotech

Dr. Karen Krauel-Göllner  
Agilent Technologies, Inc.

## Einleitung

Eine der größten Herausforderungen bei der modernen Arzneimittelentwicklung ist die unzureichende Wasserlöslichkeit vieler Wirkstoffkandidaten. Nanopartikel-Formulierungen stellen eine interessante Lösung dar, um die biologische Verfügbarkeit von Wirkstoffen mit einer geringen Wasserlöslichkeit zu erhöhen. Freisetzungsstudien gehören zu den wichtigsten Methoden zur Charakterisierung der zu erwartenden In-vivo-Bioverfügbarkeit unter In-vitro-Bedingungen. Es wird also eine effiziente Freisetzungsmethode benötigt, die während der Entwicklung von Nanopartikeln die Auswahl von Leitformulierungen erleichtert, die potenziell eine höhere biologische Verfügbarkeit bieten. Ebenfalls von Bedeutung ist diese Methode für die Qualitätskontrolle in späteren Phasen des Produktlebenszyklus. Die Trennung von freigesetztem und nicht freigesetztem Wirkstoff ist daher bei allen Freisetzungsstudien der wichtigste Faktor.

Beim Nanopartikel handelt es sich um eine ungelöste Substanz, die vom Freisetzungsmedium getrennt werden muss. Derzeitige Freisetzungsmethoden erlauben nur eine unzureichende Trennung der Nanopartikel vom Freisetzungsmedium, ganz gleich, welches System für die Freisetzungsstudien verwendet wird. Hinzu kommt, dass die Filtrationsmethoden, die standardmäßig für herkömmliche Formulierungen verwendet werden, sind unzureichend, um Nanopartikel während der Probennahme vom Freisetzungsmedium zu trennen. Die Filtration durch Membranfilter ist eine Methode, die häufig für die Trennung nicht freigesetzter Wirkstoffe verwendet wird. Dabei kommen Spritzenfilter mit einer Porengröße von 0,22 oder 0,45  $\mu\text{m}$  zum Einsatz, was jedoch ebenfalls mit Herausforderungen verbunden ist. Nachteilig wirkt sich aus, dass alle Partikel mit einer mittleren Partikelgröße von unter 500 nm den Filter entweder verstopfen und zerreißen oder den Filter direkt durchdringen, was zu überhöhten Freisetzungswerten führt. Es gibt Filter mit einer kleineren Porengröße wie z. B. 0,02  $\mu\text{m}$ . Diese neigen jedoch dazu, bei der Probennahme schnell zu verstopfen, insbesondere, wenn das Medium eine hohe Nanopartikelkonzentration enthält. Eine unzureichende Trennung der Nanopartikel führt dazu, dass sich nach der Trennung noch Nanopartikel im Freisetzungsmedium befinden. Daraus folgt wiederum, dass bei der Bestimmung des Freisetzungsprofils zu hohe Messwerte erhalten werden. Zusammenfassend ist festzustellen, dass die derzeit in Entwicklungslabors zum Einsatz kommenden Freisetzungsprozesse für die Vorhersage der In-vivo-Leistung von Nanoformulierungen infolge ineffizienter Filtrationsmethoden unzureichend sind.



**Abbildung 1.** Freisetzungsprofile von Ibuprofen-Nanopartikeln 200 mg/900 ml in Acetatpuffer, pH 4,5 unter Verwendung verschiedener Spritzenfilter (0,45 µm, 0,2 µm und 0,02 µm) und des Agilent NanoDis Systems.

## Agilent NanoDis System für Freisetzungsstudien

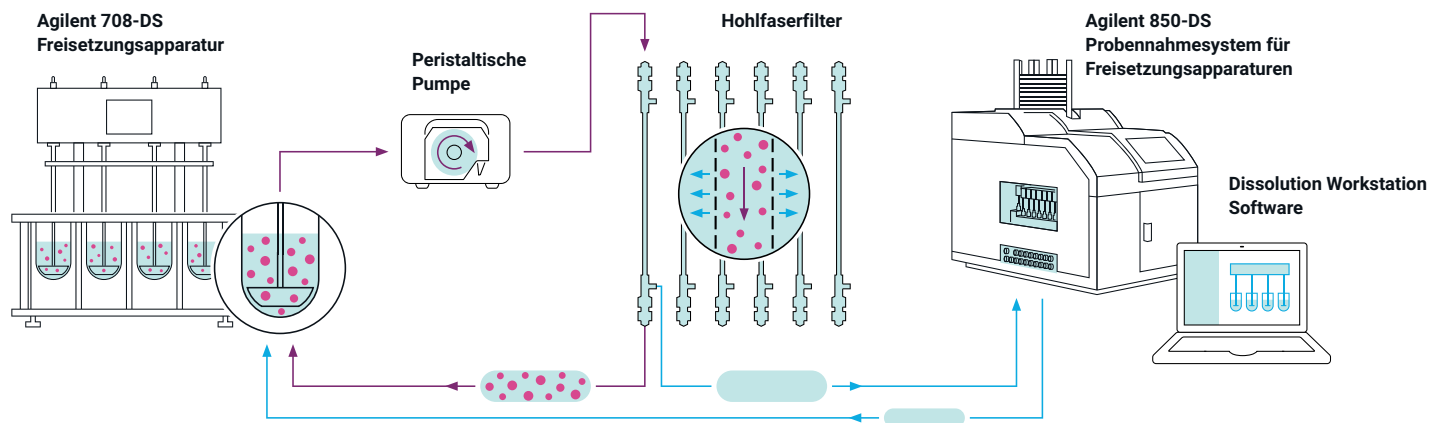
Die im Agilent NanoDis System implementierte Filtrationsmethode, die zur Automatisierung des Filtrationsprozesses ausgelegt ist, beruht auf einer Kombination aus Querstromfiltration (CFF, Cross-Flow Filtration) und einer herkömmlichen Freisetzungsapparatur. Dabei nutzt das NanoDis System die Vorteile der Querstromfiltration, um die Nanopartikel vom Freisetzungsmedium zu trennen. Da es sich bei der Querstromfiltration um ein offenes Filtrationssystem handelt, wird die Bildung eines Filterkuchens verhindert. Nanopartikel werden zudem nicht in den Filter gepresst, was häufig zu einer Verstopfung der Filter in einer Dead-End-Filtration führt. Außerdem kann die Membrangröße von

Querstromfiltern an die Partikelgröße der Nanopartikel in der Formulierung angepasst werden. Im NanoDis System wird das Freisetzungsmedium mit den Nanopartikeln durch die Querstromfilter gepumpt. Das partikelfreie Filtrat wird dann mit dem Agilent 850-DS Probennahmesystem für Freisetzungsapparaturen gesammelt. Die Filtrationseffizienz und die zur Sammlung des Filtrats benötigte Zeit hängen von der Formulierung und der Konzentration der Nanopartikel im Medium ab. Selbst die niedrigste Filtrationsrate für besonders schwierige Formulierungen liegt mit dem NanoDis System über 10 ml/min, sodass ein ausreichendes Probenvolumen für die quantitative Analyse der Freisetzungsproben erhalten wird und sehr kurze Zeitintervalle verwendet werden können.

## Auswahl von Größe und Typ der Filtermembran

Die Auswahl der Filtertypen und Porengrößen der für Freisetzungsstudien verwendeten Querstromfilter erfolgt auf der Grundlage der Größe und des Typs der Nanopartikel, sodass eine vollständige Trennung gewährleistet wird. Auf diese Weise ist gewährleistet, dass der freigesetzte Wirkstoff ohne Verfälschung durch ungelöste Nanopartikel bestimmt werden kann.

Es sind viele verschiedene Querstrom-Filtermembranen mit unterschiedlichen chemischen Eigenschaften erhältlich. Es muss ein Filtervalidierungstest durchgeführt werden, um die optimalen chemischen Eigenschaften der Membran auszuwählen, denn eine Adsorption der Nanopartikel und des Wirkstoffs am Filter muss vermieden werden. Die Filtervalidierung kann mit Standard-Spritzenfiltern durchgeführt werden, sofern diese über dieselben chemischen Eigenschaften wie die Querstrom-Filtermembranen verfügen. Bei der Validierung eines Wirkstofffilters wird der Wirkstoff dagegen in einer bekannten Konzentration im Freisetzungsmedium aufgelöst und analysiert, nachdem er durch die Spritzenfilter mit einer Porengröße von beispielsweise 0,45 µm filtriert wurde. Beachten Sie, dass für die Filtervalidierung von Nanopartikel-Formulierungen unter Umständen eine höhere Porengröße der Spritzenfilter benötigt wird.



**Abbildung 2.** Schematische Abbildung des NanoDis Systems zur Darstellung der Flussrichtung und der Trennung des freigesetzten Wirkstoffes und der dispergierten Nanopartikel mit der USP-konformen Agilent 708-DS Freisetzungsapparatur und dem Agilent 850-DS Probennahmesystem für Freisetzungsapparaturen; Betrieb und elektronische Dokumentation unter Verwendung der Dissolution Workstation Software (DWS).

Die Nanopartikel-Formulierungen werden in einer bekannten Konzentration im Freisetzungsmedium fein verteilt und durch einen Spritzenfilter geeigneter Porengröße geführt, um zu gewährleisten, dass die Nanopartikel den Filter passieren. Dann wird der Wirkstoff vor und nach der Filtration gemessen, um die mögliche Adsorption der Nanopartikel am Filter zu berechnen.

Obwohl die mittlere Partikelgröße der Arzneimittelformulierung klar im Vordergrund steht, stellen die Partikelgrößenverteilung und die Partikelgrößenverteilung im Freisetzungsmedium jedoch ebenfalls wichtige Parameter dar, die berücksichtigt werden müssen. In heterogenen Partikelformulierungen kann die Partikelgröße der kleinsten in der Probe vorhandenen Partikel weit unter der mittleren Partikelgröße liegen. Gleiches gilt für die größten in der Probe vorhandenen Partikel, denn auch die Partikelgröße dieser Partikel kann deutlich über der mittleren Partikelgröße liegen. Insbesondere bei der Dispersion der Partikel in Medien wie FeSSIF und FaSSIF im Rahmen von In-vivo-Studien kann sich an der Partikeloberfläche eine Korona bilden, wodurch sich die mittlere Partikelgröße erhöht.

Für die Auswahl der optimalen Porengröße der Membran kann Tabelle 1 herangezogen werden.

**Tabelle 1.** Auswahl der Porengröße der Membran.

Mittlere Partikelgröße (nm)	Porengröße der Membran (kDa)
< 10	10
10 bis 25	50
25 bis 50	100
50 bis 150	300
> 150	500

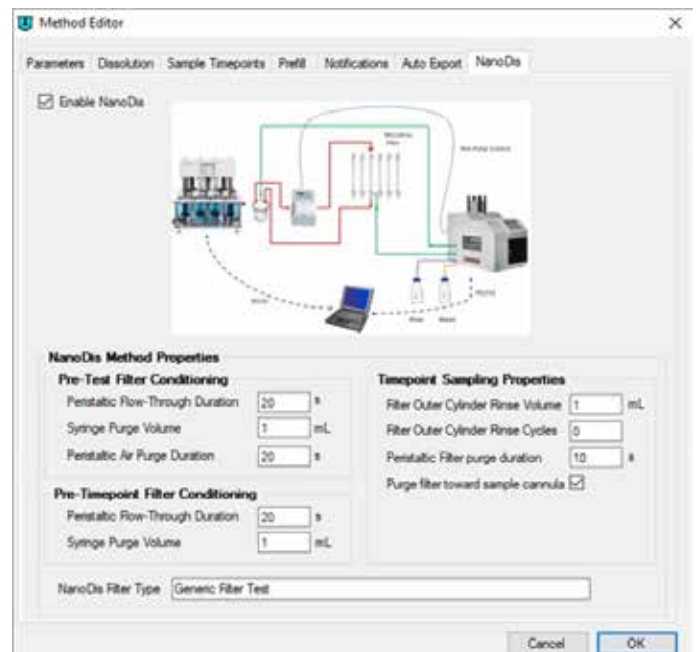
Wenn die Partikelgrößenverteilung breit ist oder es sich um eine bimodale Verteilung handelt, bei der die Probe auch kleinere Partikel enthält, muss die Größe der Querstrom-Filtermembran entsprechend angepasst werden. Außerdem muss in diesem Fall die Partikelfraktion mit der kleinsten Partikelgröße berücksichtigt werden. Ein weiterer wichtiger Parameter ist die Partikelgröße der Mizellen, die sich bilden, wenn das Freisetzungsmedium oberflächenaktive Substanzen enthält. Die Mizellen von freigesetztem Wirkstoff können ebenfalls von der Querstrom-Filtermembran zurückgehalten werden. Daher muss die Membrangröße an die Größe der Mizellen angepasst werden. Weitere Informationen zur Filtervalidierung finden Sie in den Literaturverweisen<sup>1</sup> und auf der Repligen-Website.<sup>2</sup>



**Abbildung 3.** Agilent NanoDis System mit Querstromfiltern.

## Geräte- und Softwareparameter

Die Optimierung der Geräte- und Softwareparameter ist Bestandteil des Entwicklungsprozesses der Freisetzungsmethode, denn durch sie soll sichergestellt werden, dass eine effiziente Trennung der Nanopartikel vom Freisetzungsmedium erhalten wird.



**Abbildung 4.** Screenshot der Registerkarte NanoDis der Dissolution Workstation Software.

Die Steuerung des NanoDis Systems erfolgt über die Dissolution Workstation Software (DWS). Um Sie bei der Methodenentwicklung zu unterstützen, sind die Einstellungen der wichtigsten Parameter im Folgenden zusammengefasst.

Die Methode des NanoDis Systems wird in zwei Phasen ausgeführt. Vor dem Start des Freisetzungslaufs findet die Phase der Filtervorkonditionierung statt; erst danach wird der eigentliche Freisetzungslauf gestartet. Jedem Zeitpunkt während des Freisetzungslaufs geht ein zusätzlicher Schritt der Filtervorkonditionierung voraus. Eine typische Sequenz würde daher wie folgt aussehen:

### Phase 1: Filtervorkonditionierung

**Pumprate:** Die Pumprate wird manuell an der peristaltischen Pumpe eingestellt. Der Transmembrandruck der Querstrom-Filtermembranen nimmt mit steigender Flussrate zu, sodass sich die Permeation des Filtrats erhöht. Die Menge der gesammelten Filtratprobe kann somit durch eine Steigerung der Flussrate erhöht werden.

**Filterkonditionierung vor dem Test:** Die Filterkonditionierung vor dem Test dient dazu, die Filter mit dem aktuellen Freisetzungsmittel zu benetzen. Sie beginnt vor dem Start des Freisetzungslaufs und vor der Zugabe des Produkts zum Freisetzungsgefäß. Das Freisetzungsmittel, das die Querstrom-Filtermembranen passiert, wird in das Freisetzungsgefäß zurückgeführt. Daher kommt es bei der Filterkonditionierung vor dem Test zu keinem Verlust von Freisetzungsmittel. Zum Abschluss der Filterkonditionierung vor dem Test werden die Filtermembranen mit Luft gespült, sodass das gesamte Freisetzungsmittel in das Gefäß zurückgeführt wird.

Die Filterkonditionierung vor dem Test ist deshalb so wichtig, weil die Querstrom-Filtermembranen dadurch für den ersten Zeitpunkt vorbereitet werden. Findet die Filterkonditionierung vor dem Test nicht in ausreichendem Maß statt, wird die Probenmenge für die ersten Zeitpunkte reduziert. Dass ein korrektes Probenvolumen erhalten wird, ist eine Grundvoraussetzung für die genaue Berechnung der Freisetzungsrate.

Für die Filterkonditionierung vor dem Test können die folgenden Ausgangsparameter verwendet werden:

Parameter	Empfohlene Einstellung
<b>Durchflussdauer mit der peristaltischen Pumpe</b> Zeit in Sekunden, die zum Pumpen des Mediums durch den Filter benötigt wird	240 s
<b>Volumen der Spritzenspülung</b> Volumen in ml, das aus dem Außenzylinder des Querstromfilters zurück in das Gefäß gepumpt wird	4 ml
<b>Dauer der Luftspülung mit der peristaltischen Pumpe</b> Die Flussrichtung der peristaltischen Pumpe wird umgedreht, um den Inhalt der mittleren Kammer des Filters wieder in das Gefäß zurückzuführen	50 s

### Phase 2: Freisetzung

Die Freisetzungsläufe werden gestartet, indem die Darreichungsform in die Vessel gefüllt wird. Bei Verwendung des NanoDis Systems ist die Sequenz des Freisetzungstests geringfügig modifiziert. Der Filter muss vor jedem Zeitpunkt erneut konditioniert werden. Dies findet unmittelbar vor dem jeweiligen Zeitpunkt statt.

### Variablen der Filterkonditionierung vor den Zeitpunkten

Parameter	Empfohlene Einstellung
<b>Durchflussdauer mit der peristaltischen Pumpe</b> Zeit in Sekunden, die zum Pumpen des Mediums durch den Filter benötigt wird	100 s
<b>Volumen der Spritzenspülung</b> Volumen in ml, das aus dem Außenzylinder des Querstromfilters zurück in das Gefäß gepumpt wird	2 ml

### Eigenschaften Probennahme/Timepoint

Parameter	Empfohlene Einstellung
<b>Volumen des Einspülverlustes</b> Schlauchvolumen von der Spitze der Probennahmekanüle bis zur Nadel (850-DS), das für die zeitkorrigierte Probennahme benötigt wird	3,5 ml
<b>Probenvolumen</b> In Probensteller abgefülltes Volumen	1,0 bis 5 ml (je nach Analyse)
<b>Volumen für die Spülung des Filteraußenzylinders</b> Volumen an Spülmedium, das in den Außenzylinder des Filters gepumpt wird Gesamtspülvolumen = Spülvolumen + Volumen für die Spülung des Filteraußenzylinders	4 ml
<b>Dauer der Filterspülung mit der peristaltischen Pumpe</b> Nach der Probennahme wird das Probenmedium aus der mittleren Kammer des Filters wieder in das Gefäß zurückgespült. Mit diesem Parameter wird festgelegt, wie lange die mittlere Kammer mit der peristaltischen Pumpe gespült werden soll. Die Richtung wird über das Kontrollkästchen „Purge filter toward sample cannula“ gesteuert.	30 s
<b>Spritzenspülung</b> Bei der Spritzenspülung werden der Außenzylinder des Filters und der gesamte Schlauch im Flussweg der Spritze zwischen dem Filter und dem Gefäß entleert. Volumen der Spritzenspülung = Volumen für die Spülung des Filteraußenzylinders + Spülvolumen	4 ml
<b>Zyklen für die Spülung des Filteraußenzylinders</b> Bei Abschluss eines Zeitpunkts kann der Außenzylinder des Filters mit Spülmedium gespült werden. Wenn der Spülzyklus nicht durchgeführt werden soll, kann der Wert auf null eingestellt werden.	1 – 3-mal mit 4 ml

## Tipps und Hinweise

### Erster Gebrauch, Reinigung und Lagerung der Membran

Die Querstrom-Filtermembranen sind bei der Auslieferung mit Glycerol gefüllt, um die Porenstruktur zu schützen. Es wird empfohlen, die Membranen vor dem ersten Gebrauch mit mindestens 500 ml hochreinem Wasser zu waschen. Zum Waschen der Membranen kann als Alternative auch Freisetzungsmedium verwendet werden. Je nach Ihrer Nanopartikel-Formulierung kann für die Reinigung der Membranen zwischen den Freisetzungsläufen hochreines Wasser, eine Alkohollösung (20 % Ethanol oder 20 % Isopropanol) oder 0,1 N NaOH verwendet werden. Die Membranen werden am besten bei Raumtemperatur in einem geeigneten Lagerungsmedium aufbewahrt, z. B. in 0,1 N NaOH. Auf diese Weise werden mikrobiologisches Wachstum und das Austrocknen der Fasern verhindert.

### Integritätsprüfung der Membranen

Die Integritätsprüfung der Querstrom-Filtermembranen wird mit Standard-Nanopartikeln der gewünschten mittleren Partikelgröße durchgeführt. Die Prüfung ist dabei an die gewünschte Porengröße der Querstrom-Filtermembran anzupassen. PLGA-Lumogen Nanopartikel ermöglichen es, die Membranintegrität durch die Anwesenheit oder Abwesenheit von Farbe in den Proben visuell darzustellen.

### Prüfung der Membranen auf Verstopfung

Ob die Querstrom-Filtermembran verstopft ist, kann mit einem Freisetzungsversuch mit Wasser und anhand der Menge an filtrierter Probe festgestellt werden.

## Literatur

1. Protokoll zur Filtervalidierung: Agilent 850-DS Dissolution Sampling Station. *Agilent Technologies Technische Übersicht*, Publikationsnummer 5991-3341EN, **2013**.
2. Repligen 'Find a Spectrum Hollow Fiber Filter' selection tool (<https://www.repligen.com/resources/configurators/selection-tools/find-hollow-fiber-filter>).

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

DE.1479976852

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc. 2020  
Gedruckt in den USA, 26. Oktober 2020  
5994-2347DEE

