



**OPTIMIERTE BIOVERFÜGBARKEIT VON NANOBESCHICHTETEN
KOLLOIDARZNEIFORMEN ALS BEITRAG ZUR REDUZIERUNG VON
UMWELTEINTRÄGEN PHARMAZEUTISCHER PRODUKTE**

(DBU-Projekt AZ 32725/01-31)

Koordination:

Prof. Dr. Matthias G. Wacker (Projektleitung)
Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie
Abteilung für Pharmazeutische Technologie und Nanowissenschaften
Max-von-Laue-Straße 9, 60438 Frankfurt am Main

Beteiligte Unternehmen:

MJR Pharmjet GmbH
Industriestraße 1B, D-66802 Überherrn

Frankfurt, Freitag, 17. Januar 2020

06/02

Projektkennblatt
der
Deutschen Bundesstiftung Umwelt



Az	32725/01	Referat	31	Fördersumme	308.804,00 €
----	-----------------	---------	-----------	-------------	---------------------

Antragstitel	Förderinitiative Nachhaltige Pharmazie 3: Optimierte Bioverfügbarkeit von nanobeschichteten Kolloidarzneiformen als Beitrag zur Reduzierung von Umwelteinträgen pharmazeutischer Produkte
---------------------	--

Stichworte	Biotechnologie FI – Nachhaltige Pharmazie
-------------------	--

Laufzeit	Projektbeginn	Projektende	Projektphase(n)
3 Jahre	6.07.2015	30.06.2019	1
(mit Verlängerung)			

Zwischenberichte	1
------------------	---

Bewilligungsempfänger	Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie IME	Tel
	Projektgruppe Translationale Medizin & Pharmakologie	Fax
	60438 Frankfurt	Projektleitung Prof. Dr. Matthias Wacker
		Bearbeiter

Kooperationspartner	MJR Pharmjet GmbH Industriestraße 1b 66802 Überherrn
----------------------------	--

Zielsetzung und Anlaß des Vorhabens

Das Vorhaben diene der Entwicklung neuer Nanoarzneiformen zur Optimierung der Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen unter gleichzeitiger Reduktion der Umwelttoxizität. Durch eine spezielle Auswahl von Hilfsstoffen sollten Arzneistoff-Nanopartikel entwickelt werden, welche eine geringe Umweltemission, gleichzeitig jedoch eine hohe Wirksamkeit im Menschen bewirken. So sollten Gesamtemission und Umwelttoxizität gemindert werden.

Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden

Durch Herstellung spezieller Nanoarzneiformen wurde eine verbesserte Bioverfügbarkeit der neu entwickelten Arzneimittel im Menschen und somit eine Dosisreduktion erreicht. Hierfür wurde die *Microjet reactor technology* eingesetzt, welche die Fertigung im skalierbaren Maßstab ermöglichte. Die Bioverfügbarkeit wurde mithilfe biorelevanter Freisetzungsmodelle in Kombination mit einem Physiologiebasierten Pharmakokinetik-Modell nachgewiesen. Dieses dient neben der Bestimmung der Bioverfügbarkeit auch einer Quantifizierung der möglichen Emissionsmenge und ist ein geeignetes *Screening tool* für die Identifizierung vielversprechender Formulierungen. Die Umwelttoxizität der Emissionen wurde im Zebrafisch-Embryo-Toxizitätstest untersucht. Diese Information floss anschließend in die Umweltbewertung der Arzneiform, jedoch auch in der Selektion geeigneter Hilfsstoffe ein, wodurch bessere und umweltverträglichere Arzneimittel entwickelt werden konnten.

Ergebnisse und Diskussion

Im Rahmen des Projektes wurden sowohl in der Entwicklung neuer, nachhaltiger Formulierungen als auch in der frühzeitigen Bewertung des ökotoxikologischen Potentials großartige Ergebnisse erzielt. Für alle selektierten Arzneistoffe wurden Formulierungen bereitgestellt und anschließend in die Testung übergeben. Eine Vorhersage der Bioverfügbarkeit wurde mithilfe eines verifizierten *in silico*-Modells des humanen Gastrointestinaltraktes erzielt, wobei für zwei der Arzneistoffe und immerhin fünf verschiedene Formulierungen eine gute Übereinstimmung zwischen der *in silico*-Simulation und der Humanpharmakokinetik gezeigt wurde. Weiterhin wurden verschiedene Größenmessverfahren angewandt, um Aussagen über die exakte Emissionsmenge von Wirkstoffen in die Umwelt treffen zu können.

Hinsichtlich der Untersuchung ökotoxikologischer Wirkungen wurden gezielt auch die Hilfsstoffe der Nanoarzneiformen analysiert, wodurch eine verbesserte Auswahl von Polymermaterialien mit geringerer toxiologischer Wirkung auf aquatische Organismen wie den Zebrafischeembryo erzielt wurde. Die Ergebnisse werden im Detail im Abschlussbericht beschrieben und diskutiert.

Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation

- Hering I, Weiler M, Jung F, Günday-Türelı N, Schäfers C, Fenske M, Parnham MJ, Wacker MG, Eilbrecht E (2019); Evaluation of toxic effects on the aquatic environment caused by surfactants used in nanomedicine, Helsinki, Finland.
- Jung F, Thurn M, Krollik K, Gao FG, Hering I, Eilbrecht E, Weiler M, Günday-Türelı N, Türelı E, Parnham MJ, Wacker MG (2019); Simulation of the environmental exposure to fenofibrate nanomaterials based on *in vitro*- and *in silico* methods, PAGE Conference, Stockholm (Sweden)
- Jung F, Nothnagel L, Gao F, Wacker MG (2018); Evaluation of release techniques for nanocarriers on the basis of IVIVC-PBPK modeling, Population Approach Group Europe Conference, Montreux (Switzerland)
- Hering I, Jung F, Reiner L, Weiler M, Günday-Türelı N, Wacker M, Parnham M, Fenske M (2017); Environmental toxicity of pharmaceuticals in polymeric nano-formulations. 2nd German Pharm-Tox Summit - Annual Meeting of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology (DGPT) & Annual Meeting of Association of Clinical Pharmacology (VKliPha), Heidelberg, Germany.
- Nothnagel L and Jung F, Rossmann T, Thurn M, Ashtikar M, Geisslinger G, Parnham MJ, Wacker MG; Predictive PBPK modeling as a tool in the formulation of the drug candidate TMP-001, Eur. J. Pharm. Biopharm. (10.1016/j.ejpb.2018.11.012)
- Jung F and Nothnagel L, Gao F, Thurn M, Vogel V, Wacker MG; A comparison of two bio-relevant *in vitro* drug release methods for nanotherapeutics based on advanced physiologically-based pharmacokinetic modelling, Eur. J. Pharm. Biopharm. 127: 462-470 (10.1016/j.ejpb.2018.03.010)
- Jablonka L, Ashtikar M, Gao G, Jung F, Thurn M, Preuß A, Scheglmann D, Albrecht V, Röder B, Wacker MG; Advanced *in silico* modeling explains pharmacokinetics and biodistribution of temoporfin nanocrystals in humans, J. Control. Rel. (10.1016/j.jconrel.2019.06.029)
- Jung F, Thurn M, Krollik K, Gao GF, Hering I, Eilbrecht E, Weiler M, Günday-Türelı N, Türelı E, Parnham MJ, Wacker MG (2019); Simulation of the environmental exposure to fenof-

fibrate nanomaterials based on in vitro- and in silico methods. (Submitted manuscript)

- Hering I, Eilebrecht E, Parnham MJ, Günday-Türelı N, Schäfers C, Fenske M, Wacker MG (2019); Fenofibrate and its nanoformulation cause severe effects in the zebrafish embryo *Danio rerio* (Submitted manuscript)

Fazit

Das Projekt hat einen erfolgreichen Beitrag zur gezielten Selektion nachhaltiger Formulierungen geliefert. Es zeigte sich, dass durch Vermeidung bestimmter Hilfsstoffe eine deutlich verbesserte Umweltbilanz für Nanoarzneiformen erzielt werden kann. Hierbei führten geringfügige Variationen des Herstellungsprozesses, zumindest für den Wirkstoffkanidaten Fenofibrat, zu einer deutlichen Verringerung der Umwelteffekte, bei gleichzeitiger Materialeinsparung in der Wirkstoffsynthese. Diese Einsparung lag im Vergleich zum mikronisierten Produkt bei etwa 50%, wobei die Emission von Nanopartikeln vernachlässigbar gering ist.

1. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: UV-HPLC Gehaltsbestimmungsmethoden für die Ermittlung von Beladungsrate und Wirkstoffkonzentration in Arzneiformen	9
Tabelle 2: Analytische Methoden aus dem Projekt EcoNanoCaps.....	10
Tabelle 3: Formulierungen und Dosierungen.....	13
Tabelle 4: Charakteristika von unbeladenen im MJR hergestellten Polymer-Nanopartikel. ...	19
Tabelle 5: Charakteristika von unbeladenen Lipidnanopartikeln unter Verwendung verschiedener Stabilisatoren.	21
Tabelle 6: Zusammensetzung der kritischen Qualitätsattribute wirkstoffbeladener Formulierungen	22
Tabelle 7: Nachweisgrenzen (LOD und LOQ) der für das Projekt entwickelten analytischen Methoden.	24
Tabelle 8: Sättigungsvolumen und Recovery an Filtermembranen.	25
Tabelle 9: Löslichkeiten der untersuchten Wirkstoffe in verschiedenen Medien. * = Löslichkeit nach 1h	27
Tabelle 10: EC ₅₀ - und LC ₅₀ -Werte von Eudragit® E100, PLGA und HPMC in mg/ml von 24 hpf bis 96 hpf. In Klammern. Oberes und unteres Konfidenzintervall bei 95 %.	37
Tabelle 11: EC ₅₀ - und LC ₅₀ -Werte von Embryonen, die Fenofibrat in DMF, Fenofibrat angesetzt in ISO 20%, dem Fenofibrat-HPMC-Granulat und den Hilfsstoffen bis 96 hpf und Fenofibrinsäure bis 72 hpf ausgesetzt waren. In Klammern: Oberes und unteres Konfidenzintervalle bei 95 %. Werte in mg/L.	39

2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Freisetzung verschiedener wirkstoffbeladener Formulierungen (A) von Fenofibrat (B) von Ciprofloxacin (C) Carbamazepine.....	23
Abbildung 2: Filteradsorptionsstudie von Fenofibrat mit Untersuchung verschiedener Vorlaufvolumina.....	24
Abbildung 3: Retention von TMP-001-beladenen Eudragit®-Nanopartikeln mittels eines 100 nm Filters sowie Angaben zur Partikelgröße und Größenverteilung.....	26
Abbildung 4: Löslichkeitsuntersuchung von Fenofibrat in FaSSIF v2 nach 6, 24 und 48 h (Mittelwert ± Standardabweichung, n=3).	26
Abbildung 5: Freisetzung verschiedener Fenofibratformulierungen in künstlicher Magen- (A) und Darmflüssigkeit (B).	28
Abbildung 6: Freisetzung von TMP-001 (A) und Ciprofloxacin (B) in künstlicher Magen- (rot) und Darmflüssigkeit (blau).....	28

Abbildung 7: Simuliertes Plasmakonzentration-Zeit-Profil (blau) und Plasmakonzentration-Zeit-Profil (Dreiecke) aus der jeweiligen klinischen Untersuchung (A und B) sowie Prädiktion der Performance der neu entwickelten Ecocaps im Vergleich zu A und B.	30
Abbildung 8: Wirkstoffemission in Form von Nano - oder Mikropartikeln vom kommerziellen Standardprodukt (A), Nanoprodukt (b) und den Ecocaps (C).....	31
Abbildung 9: Simulation der Pharmakokinetik für TMP-001 Nanopartikel basierend auf <i>Sample-and-Separat</i> (rot) und <i>Dispersion releaser</i> (blau).....	31
Abbildung 10: Simulation der Pharmakokinetik für Ciprofloxacin (blau) und Vergleich mit <i>in vivo</i> Daten (schwarzer Kreis).....	32
Abbildung 11: Sub-letale und letale Effekte sowie die EC50- und LC50-Kurven nach 72 hpf Exposition der getesteten Tenside Cremophor® RH 40 (A, B), Cremophor® A 25 (C, D), Pluronic® F 127 (E, F) und Pluronic® F 68 (G,H). Große Balken zeigen die Gesamtzahl der Effekte, die kleinen Balken Mortalität (rot), Ödeme (blau) und verlangsamten Blutfluss (gelb). Kurvendiagramme zeigen die Gesamtzahl der Effekte in Abhängigkeit von der Konzentration (rot) und die Mortalität (schwarz).	34
Abbildung 12: Verformungen des Chorions von Embryonen nach 24 hpf und 72 hpf, die 4,5% (A, B) und 6 % Pluronic® F 68 (C, D) sowie 5% Pluronic® F 127 (E, F) ausgesetzt waren. Die blauen Pfeile geben Deformationen des Schwanzes, des Kopfes, der Somiten sowie Ödeme an.....	35
Abbildung 13: Sub-letale und letale Effekte der Nanomaterialien Eudragit® E100 (A, B), PLGA (C, D), und HPMC (E, F) nach 72 hpf Exposition. Große Balken zeigen die Gesamtzahl der Effekte, die kleinen Balken Mortalität (rot), Ödeme (blau) und verlangsamten Blutfluss (gelb). Kurvendiagramme zeigen die Gesamtzahl der Effekte in Abhängigkeit von der Konzentration (rot) und die Mortalität (schwarz).	36
Abbildung 14: Sub-letale und letale Effekte (Säulendiagramme) der getesteten Hilfsstoffe des Fenofibrat-HPMC-Granulats (A, B), des Fenofibrat-HPMC-Granulats (C, D), Fenofibrat angesetzt in DMF(E,F) bzw. ISO 20% (G, H), nach 96 hpf Exposition. Kurvendiagramme der EC (rot)- und LC-Werte (schwarz) der getesteten Substanzen in Abhängigkeit der Konzentration [mg/L] nach 96 hpf Exposition.....	38
Abbildung 15: (A) Sub-letale und letale Effekte von Fenofibrinsäure nach 72 hpf Exposition. (B) Kurvendiagramme der Gesamteffekte (EC, rot) und Mortalität (LC, schwarz) in Abhängigkeit von der Konzentration [mg/L].	40
Abbildung 16: Gesamteffekte der Embryonen, die TMP-001 und der PCL-TMP-001-Formulierung sowie der dazugehörigen Blank-Formulierung ausgesetzt waren (A, C, E), sowie die EC- und LC-Kurven (B, D, F) nach 96 hpf Exposition der Zebrafischembryonen in Schmollenberg.	41

Abbildung 17: Gesamteffekte der Embryonen hervorgerufen durch die Nanoformulierung von Ciprofloxacin-PLGA mit 10% Mannitol, der entsprechenden Blank-Formulierung sowie durch die Substanz Ciprofloxacin-Hydrochlorid (Ciprofloxacin-HCl) (A, C, E) und die jeweiligen EC- und LC- Kurven nach 96 hpf Exposition (B, D).	43
Abbildung 18: Apoptose-Färbung nach 48 hpf von Zebrafischembryonen, die Ciprofloxacin-HCl (A, n=5), der Nanoformulierung Ciprofloxacin-PLGA (B, n=3) sowie Fenofibrat in ISO 20% (C, n=3), Fenofibrat in DMF (D, n=3), dem Fenofibrat-HPMC-Granulat (E, n=3), Fenofibrat-HPMC-Granulat getestet in höheren Konzentrationen (F, n=3 für Fenofibrat-HPMC, n=2 für die Blank-Formulierung) sowie Diclofenac (G, n=1) ausgesetzt waren. Die roten Punkte stellen die Einzelwerte der behandelten Tiere, die schwarzen Punkte die Einzelwerte der ISO 20%-Kontrolle dar. Die Linien geben die Mittelwerte für die jeweilige Behandlung an. Blaue Punkte und Linien zeigen die Werte der jeweiligen Blank-Formulierung an. „n“ entspricht biologischem Replikat.	46
Abbildung 19: qPCR-Ergebnisse nach 96 hpf Exposition der Zebrafischembryonen in Fenofibrat angesetzt in ISO 20% (A), Fenofibrat angesetzt in DMF (B), dem Fenofibrat-HPMC-Granulat (C) und den Hilfsstoffen des Fenofibrat-HPMC-Granulats (D). Getestet wurden die Gene <i>mbp</i> , <i>hmgcr</i> , <i>il-8</i> , <i>vit-1</i> und <i>vit-3</i>	49

3. Einführung und Motivation

Etwa 30 % der neu entwickelten sowie eine Vielzahl bereits zugelassener Arzneistoffe weisen eine äußerst geringe Löslichkeit in Wasser und daher auch eine verringerte Bioverfügbarkeit auf (Cumming, Davis et al. 2013). Sie werden daher meist in hohen Dosen verabreicht, um diesen Mangel zu kompensieren und ein erheblicher Anteil wird anschließend unverändert ausgeschieden. Diese nicht resorbierbaren Wirkstoffe können sich in der Umwelt anreichern und so eine Belastung für die darin lebenden Organismen darstellen. Eine geringe Bioverfügbarkeit von Arzneimitteln bedingt ferner einen erhöhten Produktionsbedarf, was zu einer zusätzlichen Erhöhung der Umweltbelastung führt und gleichzeitig eine Verschwendung wertvoller Ressourcen darstellt.

Das übergeordnete Ziel des Projektes war daher eine nachhaltigere Verwendung von bereits zugelassenen Arzneistoffen, die zweifach zu einer Verminderung der Umweltbelastung beitragen kann. Durch Verarbeitung in Nanonisierungsprozessen wird die Oberfläche von Wirkstoffen drastisch erhöht, was auch eine verbesserte Resorption im Menschen nach sich zieht. So kann eine deutliche Reduzierung der notwendigen Dosis (bei gleichbleibender Wirksamkeit) indirekt den Umwelteintrag über den Konsumenten verringern.

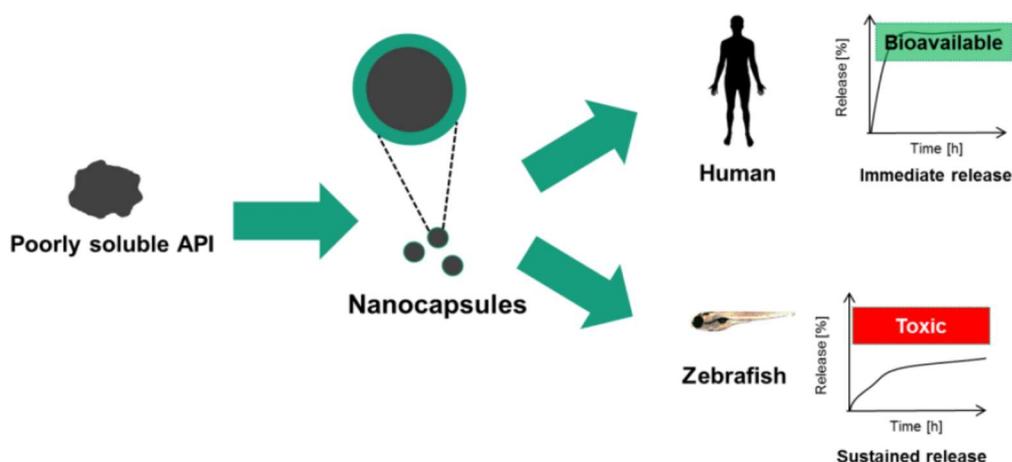


Abbildung 1: Übersicht der Projektziele im Projekt EcoNanoCaps.

Zum anderen führt eine Dosisreduktion zu einer Abnahme des Bedarfs und infolgedessen zu einer gesenkten Produktionsnachfrage. Auch so wird die Umweltbelastung nachhaltig verringert. Eine solche Strategie wurde bereits für den Wirkstoff Fenofibrat verwirklicht. So wurde die Dosis des Lipidsenkers infolge der Nanonisierung im Präparat Lipidil 145 One® um etwa 50 % (300 mg täglich auf 145 mg täglich) gesenkt.

Solche Arzneiformen mit deutlich erhöhter Bioverfügbarkeit wurden auch im Rahmen des Forschungsprojektes EcoNanoCaps entwickelt, diesmal jedoch unter Berücksichtigung weiterer Umweltwirkungen. Nanoarzneiformen führen nämlich nicht nur im Menschen zu einer

erhöhten Wirkstoffaktivität. In aquatischen Organismen kann es durch die feinen Partikel ebenfalls zu einer verbesserten Aufnahme kommen, wodurch sich auch ihre Umwelttoxizität erhöht. Zudem sind auch die zur Nanonisierung eingesetzten Prozesse und Hilfsstoffe mögliche Quellen einer erhöhten Umweltbelastung.

Ein wichtiges Projektziel war es daher eine Plattform bereitzustellen, welche diese Effekte vorhersagen und bereits während der frühen Entwicklung die Umweltbilanz des Arzneimittels berücksichtigen kann. So sollten Nanoarzneiformen entstehen, die eine vergleichbare Wirksamkeit im Menschen besitzen, dabei jedoch eine geringere Umwelttoxizität aufweisen.

Im Folgenden werden die Schritte und Methoden des Projektes näher erläutert.

4. Methodik/Vorgehensweise/Projekttablauf

4.1 Organisatorische Aspekte

Das Projekt **EcoNanoCaps** hat offiziell am 1.10.2015 begonnen und endete zum 30.06.2019. In Absprache mit allen Partnern wurden über den gesamten Projektzeitraum regelmäßige Projekttreffen abgehalten, um den Informationsaustausch zu verbessern und die Arbeiten zu koordinieren. Weitere Abstimmung war für das Einbringen des Projektes als Fallstudie im DBU-Projekt SERUM erforderlich, welches die externe Umweltbewertung durchführte.

4.2 Projektstruktur

Im Rahmen des Projektes wurden drei wesentliche Kernelemente arbeitsteilig behandelt. Der Projektpartner **MJR Pharmjet GmbH** entwickelte über die Projektlaufzeit Nanoarzneiformen für die zuvor identifizierten Modellwirkstoffe. Hierbei wurden verschiedene pharmazeutische Hilfsstoffe und Technologien eingesetzt.

Anschließend wurden die entwickelten pharmazeutischen Produkte am **Standort Frankfurt des Fraunhofer IME** auf ihre Bioverfügbarkeit im Humansystem untersucht. Dies geschah mithilfe biorelevanter Freisetzungstests durch Simulation der Pharmakokinetik. So wurde eine Berechnung der erwarteten Emissionsmengen von Wirkstoffen sowie ihrer Metabolite ermöglicht.

Anschließend erfolgte eine vergleichende Testung der Arzneiformen, der Wirkstoffe und der eingesetzten Hilfsstoffe im Zebrafischembryo-Toxizitätstest. Dies geschah zunächst am **Standort Aachen und anschließend am Standort Schmallenberg des Fraunhofer IME** und diente einer Einschätzung der unterschiedlichen Toxizitäten von Wirk- und Hilfsstoffen vor und nach erfolgtem Verdauungsprozess bzw. Metabolismus im Menschen.

4.3 Herstellung von Nanoarzneiformen

Die Herstellung der Nanoarzneiformen wurden vom Projektpartner MJR Pharmjet GmbH durchgeführt. Die hierfür eingesetzten Methoden werden im Folgenden beschrieben.

4.3.1 *Ciprofloxacin beladene PLGA Nanopartikel*

Mittels Nanopräzipitation wurden unter Verwendung der MJR-Technologie Ciprofloxacin-beladene PLGA-Nanopartikel hergestellt. Der Wirkstoff Ciprofloxacin liegt hierbei verkapselt in einer Matrix aus dem Polymer Polylaktid-ko-Glycolid (PLGA) oder dem Block-Kopolymer Polyethylenglykol-Polylaktid-ko-Glykolid (PEG-PLGA) vor. Eine Lösung von Ciprofloxacin, Natriumdodekylsulfat sowie PLGA bzw. PEG-PLGA in Dimethylsulfoxid (DMSO) (Solvent-System) und eine Lösung von Pluronic F68® in Wasser (Nonsolvent-System) wurden in den

MJR gefördert und bei einem Flussratenverhältnis von 1:10 und einem Winkel von 180° in Kontakt gebracht. Die Präzipitation wurde bei 32,5°C durchgeführt.

4.3.2 Ciprofloxacin beladene Palmitinsäure-Solid Lipid Nanoparticles

Bei der Herstellung von Ciprofloxacin beladenen Palmitinsäure-Partikeln im Labormaßstab wurde Palmitinsäure zusammen mit Tween 80 auf 80°C erhitzt und Ciprofloxacin in der Lipidphase fein dispergiert. Destilliertes Wasser wurde ebenfalls auf 80°C erhitzt und zur Lipidschmelze gegeben und dabei mit einem WiseTis HG-15 A-Homogenisator (witeg Labortechnik GmbH, Wertheim, Deutschland) bei einer Umdrehungsfrequenz von 27000 rpm homogenisiert. Die Dispersion wurde für 5 min unter den beschriebenen Bedingungen durchmischt und die Temperatur konstant auf 80 °C gehalten. Anschließend wurde die O/W-Emulsion in destilliertes Wasser (2-3 °C) überführt und für eine Stunde gerührt um Ciprofloxacin-beladene Palmitinsäure Solid Lipid Nanoparticles (SLN) zu erhalten.

4.3.3 Fenofibrat Partikel

Zur Herstellung von Fenofibratformulierungen mittels Hydroxypropyl-Methylcellulose (HPMC) unter Verwendung der MJR-Technologie wurde Fenofibrat in Tetrahydrofuran (THF) (Solvent-System) und HPMC in Wasser (Nonsolvent-System) bei einem Flussratenverhältnis von 1:1 und einem Kollisionswinkel von 180° bei Raumtemperatur eingesetzt.

Zur Herstellung von Fenofibrat-beladenen HPMCP-Chitosan Partikeln mittels MJR wurden Fenofibrat und Pluronic F127® sowie Hypromellose-Phthalate (HPMCP) in 85%iger Ethanol-Lösung (Solvent-System) gegen eine Chitosan-Lösung in Salzsäure saurem Wasser pH 3,5 (Nonsolvent-System) bei einem Flussratenverhältnis von 1:5 und einem Winkel von 180° in den MJR gefördert.

4.3.4 Carbamazepin-beladene Stearinsäure-Solid Lipid Nanoparticles

Für die Herstellung von Carbamazepin-SLN wurde als Verkapselungsmatrix Stearinsäure eingesetzt. Für die Suspension wurde Stearinsäure etwa 10 °C über den Schmelzpunkt erhitzt und darin anschließend Carbamazepin fein dispergiert. Des Weiteren wurde der Lipidphase Lecithin als Stabilisator zugesetzt und ebenfalls geschmolzen. Destilliertes Wasser gleicher Temperatur wurde zum Wirkstoff-Lipid-Gemisch gegeben. Alternativ wurde statt Lecithin Polysorbat 80 (Tween 80) als Stabilisator eingesetzt. Dazu wurde statt destilliertem Wasser eine Tween 80 Lösung verwendet. Die Dispergierung des flüssigen Wirkstoff-Lipid-Gemischs in der wässrigen Phase geschah unter Zuhilfenahme eines WiseTis HG-15 A-Homogenisators (witeg Labortechnik GmbH, Wertheim, Deutschland) bei einer Umdrehungsfrequenz von 27000 rpm für 10 min, während die Temperatur konstant 10°C über dem Schmelzpunkt des Lipids gehalten wurde. Die bei der Homogenisierung gewonnene O/W-Emulsion wurde in einem Eiswasserbad abgekühlt wobei Carbamazepin-beladene SLN entstanden.

4.3.5 *TMP001-beladene Nanopartikel*

Sowohl PLGA als auch Polycaprolakton (PCL)-Nanopartikel wurden unter kontinuierlichem Fluss mithilfe der MJR-Technologie hergestellt. Die wässrige Phase enthielt als Stabilisator 1% [m/V] Pluronic® F-68, die organische Phase bestand aus 2,35% [m / V] des Polymers und 0,1% [m / V] TMP-001, gelöst in Aceton. Über den dritten Einlass wurden die Partikel mit einem Stickstoffstrom aus der Kammer gespült. Verbliebenes Lösemittel wurde unter konstantem Rühren bei 500 UpM evaporiert. Jede Lösung wurde vor der Injektion filtriert.

4.4 Charakterisierung der Nanoarzneiformen

4.4.1 *Bestimmung Partikelgröße, Polydispersitätsindex und Zetapotential*

Partikelgröße, Polydispersitätsindex (PDI) und Zetapotential wurden mithilfe eines Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, Vereinigtes Königreich) bestimmt. Vor der Analyse wurden die Proben mit destilliertem Wasser verdünnt. Die Messung erfolgte bei 25 °C in einer Kunststoffküvette.

4.4.2 *UV-HPLC Gehalts-, Einschlusseffizienz- und Ausbeutebestimmungsmethodik*

Für die Wirkstoffe Fenofibrat, Ciprofloxacin, Carbamazepin und Diclofenac-Natrium wurden analytische Methoden auf Basis von Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) zur Bestimmung der Wirkstoffkonzentration entwickelt und nach ICH Richtlinien validiert. Tabelle 1 zeigt hierzu eine Übersicht der verwendeten HPLC-Methoden. Die Probenaufbereitung ist nach Wirkstoff bzw. Formulierung den jeweiligen Anforderungen angepasst worden.

Tabelle 1: UV-HPLC Gehaltsbestimmungsmethoden für die Ermittlung von Beladungsrate und Wirkstoffkonzentration in Arzneiformen

Wirkstoff	Fließmittel	Flussrate	Retentionszeit	Säule	Detektion
Fenofibrat	Phosphorsäure	1 ml/min	2,9 min	RP	UV
Carbamazepin	H ₂ O/ACN	1 ml/min	5,5 min	RP	UV
Diclofenac	ACN/H ₂ O	1 ml/min	9,0 min	RP	UV
Ciprofloxacin	25mM H ₃ PO ₄ pH 3,0 mit TEA/ACN	1,5 ml/min	2,4 min	RP 18	UV

4.5 *In vitro*-Freisetzungsanalytik und Erstellung von Physiologie-basierten Pharmakokinetik-Modellen

4.5.1 *Entwicklung der Wirkstoffanalytik*

Um die Freisetzung von Nanopartikeln *in vivo* zu simulieren, wurde im Projekt auf spezielle biorelevante Medien zurückgegriffen, welche die physiologischen Bedingungen im menschlichen Körper abbilden. Diese zeichnen sich u.a. dadurch aus, dass sie die wichtigsten, bioidentischen Salze und Amphiphile in Physiologie-ähnlicher Zusammensetzung enthalten. Um aus diesen analytisch anspruchsvollen Medien die Wirkstoffe zu quantifizieren, wurden HPLC-Methoden entwickelt sowie die entsprechenden Schritte der Probenaufarbeitung für das jeweilige Medium optimiert. Zusammenfassend sind die Methoden in Tabelle 2 dargestellt. In allen Fällen konnte mit einer sehr typischen *Reversed phase column* gearbeitet werden.

Tabelle 2: Analytische Methoden aus dem Projekt EcoNanoCaps.

Wirkstoff	Fließmittel	Flussrate	Retentionszeit	Säule	Detektion
Fenofibrat	ACN/H ₂ O	1 ml/min	3,7 min	RP 18	UV
TMP-001	ACN/H ₂ O	1 ml/min	7,1min	RP 18	UV
Diclofenac	ACN/H ₂ O	1 ml/min	6,8	RP 18	UV
Ciprofloxacin	MeOH/ Phosphatpuffer pH 3	0,6 ml/min	7,5min	RP 18	Fluoreszenz
Carbamazepin	ACN/H ₂ O	1 ml/min	6,3 min	RP 18	UV
mTHPC	ACN/H ₂ O	1 ml/min	2,6 min	RP 18	Fluoreszenz

Insbesondere die Analytik von Fenofibrat erforderte hierbei jedoch ein spezielles Säulenmaterial (Partikelgröße, *Carbon load*, *Capping*) um die entsprechenden Nachweisgrenzen zu erzielen. Die Abweichungen von den oben genannten Methoden kommt u.a. durch die erforderliche Trennleistung zustande. In biorelevanten Medien müssen auch geringe Konzentrationen des Analyten zuverlässig von der äußerst komplexen Matrix getrennt werden.

4.5.2 *Wirkstoffcharakterisierung*

Bei der physikochemischen Charakterisierung der Wirkstoffe standen insbesondere die für die Analytik relevanten Parameter der Löslichkeit sowie das Adsorptionsverhalten im Vordergrund. Während das Filtermaterial zur Abtrennung des freien Wirkstoffs von Nanopartikeln benötigt wird, ist die Löslichkeit ein wichtiger Wirkstoffparameter, welcher die Aufnahme nachhaltig beeinflusst und auch in das PBPK-Modell einfließt.

a) Adsorptionsverhalten

Ein kritischer Parameter in der Analytik von Nanoarzneiformen ist die Adsorption an Filtermembranen. Da die Nanotechnologie oftmals für Wirkstoffe mit ausgeprägter Lipophilie eingesetzt wird, müssen für eingesetzte Materialien Adsorptionsstudien durchgeführt werden um das Material während des eigentlichen Freisetzungstests mit Wirkstoff abzusättigen. Dieser Effekt tritt typischerweise bei der *Sample and separate*-Methode auf, bei der unter Verwendung von Spritzenfiltern der freie Wirkstoff von der nanopartikulären Form separiert wird. Es wurden daher Filtrationsexperimente unter Verwendung von Wirkstofflösungen durchgeführt und die Adsorptionsrate bzw. die *Recovery* des Wirkstoffs nach diesem Aufarbeitungsschritt bestimmt. Die *Recovery* steigt üblicherweise mit zunehmendem Filtrationsvolumen an, da die Filteroberfläche mit Wirkstoff abgesättigt wird. Optimal ist ein Zustand in welchem kein weiterer Wirkstoff mehr an die Filteroberfläche bindet. Es wurden insgesamt 50 ml der gesättigten Wirkstofflösungen hergestellt und der Bodenkörper mit einem 0,45 µm Filter abgetrennt. Die resultierende Lösung dient als Referenzwert für das Filtrat. Die untersuchten Filter bestanden aus Aluminiumoxid mit einer Porengröße von entweder 100 nm oder 20 nm und einem Vorfiltersystem aus Fiberglas (Whatman Anotop 25 Plus). Aus der Referenzlösung wurden jeweils Volumina von 1 mL entnommen und anschließend filtriert. Insgesamt wurde ein Gesamtvolumen von 10 mL pro Filter eingesetzt. Nach jeder Filtration wurde die Wirkstoffkonzentration im Filtrat mittels HPLC bestimmt.

b) Cut-off von Filtermembranen

Eine charakteristische Eigenschaft von Nanopartikeln ist die Bildung kolloidaler Dispersionen. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass sie trotz des zweiphasigen Zustandes thermodynamische Stabilität besitzen und demzufolge geringe oder keine Sedimentation aufweisen. Dieses bemerkenswerte Charakteristikum stellt die Analytik jedoch vor besondere Herausforderungen, da die Unterscheidung von tatsächlich monomolekular aufgelöstem Wirkstoff, der dann dem menschlichen Körper auch zur Aufnahme zur Verfügung steht, und kolloidal gelöstem Arzneistoff, welcher nicht aufgenommen werden kann, äußerst anspruchsvoll ist. Die Separation von monomolekularem und kolloidalem Wirkstoff muss bereits vor der eigentlichen chemischen Analyse der Wirkstoffkonzentration stattfinden, da zu einem späteren Zeitpunkt keine Unterscheidung mehr möglich ist. Insbesondere bei Experimenten, welche die Kinetik betreffen ist zudem eine schnelle Probenaufarbeitung erforderlich.

Die biorelevanten Medien *fasted state simulated gastric fluid* (FaSSGF) und *fasted state simulated intestinal fluid* (FaSSIF) enthalten einen hohen Anteil an Mizellen, welche den Filtrationsdruck des Systems dabei deutlich erhöhen. Gleichzeitig musste jedoch auch der *Cut-*

off, d.h. die Trennleistung eines bestimmten Filters für die Nanopartikel bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurden filtrierte Fraktionen mithilfe von *Nanoparticle tracking analysis* (NTA) auf die enthaltenen Partikelkonzentrationen hin untersucht. Die Optimierung des Messverfahrens für Wirkstoffpartikel wurde auch in einem anderen Projekt eingesetzt und diese Daten publiziert (Jablonka, Ashtikar et al. 2019). Hierbei wird die Partikelkonzentration mittels eines lichtstreuungsbasierten *Imaging*-Verfahrens durch Partikelzählung im Durchfluss bestimmt. Es können daher auch Partikelkonzentrationen und nicht ausschließlich Intensitäten bestimmt werden, welche für die Auswertung des Experiments von größerem Interesse sind.

c) Löslichkeit

Eine wichtige Grundvoraussetzung für die Aufnahme von Arzneistoffen in den menschlichen Organismus ist die Auflösung und der Übergang in den monomolekularen Zustand. Umfangreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass die Aufnahme der partikulären Form aus dem menschlichen Verdauungstrakt nur geringe Auswirkungen auf die Bioverfügbarkeit besitzt und in der Arzneimitteltherapie nahezu keine Rolle spielt. Die thermodynamische Löslichkeit, die den gesättigten Zustand einer Lösung beschreibt, ist daher ein subsidiärer Parameter, welcher im Rahmen der Vorbereitung von Freisetzungstests bestimmt werden muss. Zwar zeigen *Nanocarrier*-Systeme oftmals eine Übersättigung der Lösung aufgrund des verringerten Energiebedarfs zur Auflösung des Kristallgitters, hierbei handelt es sich jedoch um einen thermokinetischen Prozess. Daraus ergibt sich, dass innerhalb einer endlichen Messperiode zwischen dem thermokinetischen, übersättigten Zustand und dem thermodynamischen, gesättigten Zustand unterschieden werden kann. Voraussetzung für die Verwertbarkeit des Freisetzungstests ist also, dass die erreichte Endkonzentration maximal der Löslichkeit entspricht. Liegt hingegen die Endkonzentration über der Löslichkeit, so ist von einer temporären Übersättigung oder von einem analytischen Fehler bei der Probenseparation (siehe auch Sektion b)) auszugehen. Die Löslichkeit wurde mithilfe der *Shake-flask method* bestimmt. Hierbei wird das Medium in ein Glasgefäß gefüllt und ein Überschuss an Wirkstoff zugegeben. Die Probe wird anschließend bei 37°C auf eine Schüttelplatte gestellt. Nach 6 h, 24 h und 48 h wurde jeweils eine Probe entnommen, der Feststoffanteil abgetrennt und die gelöste Konzentration mittels HPLC bestimmt. Liegt zwischen der vorangegangenen und aktuell gemessenen Konzentration kein signifikanter Unterschied, so ist der Auflösungsprozess abgeschlossen und zwischen dem Bodenkörper und der Lösung hat sich ein Gleichgewicht eingestellt.

4.5.3 Entwicklung von Freisetzungsmethoden

Es wurden zwei unterschiedliche Methoden zur Untersuchung der Freisetzung des Wirkstoffs aus Nanoformulierungen evaluiert, namentlich *sample and separate* und der *Dispersion*

releaser. Die Methoden basieren auf unterschiedlichen Trennprinzipien (Nanofiltration und forcierte Dialyse) wodurch methodenbedingte Verzerrungen aufgedeckt werden können. Der Dispersion releaser eignet sich hierbei jedoch lediglich für Pulver und flüssige Dispersionen, nicht jedoch für Tabletten, weshalb die Methodik nur für ausgewählte Formulierungen zur Verfügung stand. Als Freisetzungsmedien wurden FaSSGF zur Simulation des Magensaftes (pH 1,6) und FaSSIF-v2 zur Simulation des Dünndarmsaftes (pH 6,5) verwendet. Als Freisetzungsapparatur für den traditionellen Dissolution-Test wurde die im Europäischen Arzneibuch beschriebene Blattrührer-Apparatur verwendet.

Tabelle 3: Formulierungen und Dosierungen

Formulierung	Dauer (FaSSGF/FaSSIF-V2)	Dosis
Lipidil 146 ONE® (Referenz)	3h/10h	145mg
Lipidil 200® (Referenz)	3h/10h	200mg
Fenofibrat-Nanopartikel	3h/10h	145mg
TMP-001 Nanopartikel (2)	60min / 24h	4,3 mg
TMP-001 Nanopartikel (2)	4h	50 mg
Ciprofloxacin	24h	153 mg

Für die Freisetzung im Dispersion releaser wurden 140 mL des jeweiligen Mediums eingesetzt, während in der Blattrührerapparatur ein Volumen von 500 mL des Medium zur Verfügung stand. Beide Versuche wurden bei Körpertemperatur (37°C) und einer Rührgeschwindigkeit von 75 rpm durchgeführt. Um sicher zu stellen, dass die Freisetzung des Wirkstoffs aus der Formulierung abgeschlossen ist wurde jede Formulierung wenigstens solange getestet, bis sich ein Plateau im Freisetzungsprofil abzeichnete. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die jeweilige Testdauer.

4.5.4 Entwicklung eines *in silico*-Modells

Es wurde ein Multikompartiment-Modell in Stella Architekt (isee systems, Libanon, USA) erstellt. Basierend auf gängigen Literaturwerten wurde angenommen, dass die Magenentleerung von Flüssigkeit und ungelösten Partikeln gleichzeitig und mit einer Rate von 2,8 [h⁻¹] erfolgt (Nicolaidis, Symillides et al. 2001, Juenemann, Jantratid et al. 2011). Die *in vitro* Freisetzungsprofile wurden unter Verwendung des *Reciprocal powered time model* (RPT) parametrisiert und in die Simulation implementiert. Die nachfolgende Absorption im menschlichen Darm wurde als zweistufiger Prozess modelliert, bestehend aus der Diffusion durch eine unbewegte Flüssigkeitsschicht auf der Oberfläche der Schleimhaut und der Permeation durch die Epithelmembran. Die Membranpermeation wurde unter Verwendung

veröffentlichter Permeabilitätsdaten berechnet (Avdeef 2012, Fei, Kostewicz et al. 2013). Für die ungelösten Partikel wurde eine Eliminierung durch Nichtabsorption und Ausscheidung mit dem Stuhl ins Abwasser angenommen. Die Verteilungs- und Eliminationskonstanten im Menschen wurden mittels spezieller Software (Phoenix 64 WinNonlin®, Certara, Princeton, United States) aus der Humanpharmakokinetik berechnet. Nach einer ersten Validierung des Modells für den Wirkstoff TMP-001 wurde dieses Modell publiziert (Jung, Nothnagel et al. 2018). Dafür wurden *in silico*-Simulationen auf Basis der durchgeführten Freisetzungsversuche mit den bekannten *in vivo*-Profilen verglichen. Das Modell wurde im Projektverlauf insgesamt mit fünf Formulierungen validiert, welche den Partikelgrößenbereich Makro-, Mikro- und Nanopartikel abdeckten. Die hierfür verwendeten Wirkstoffe (TMP-001, Fenofibrat oder Ciprofloxacin) ermöglichen eine breite Anwendung und konnten auch die Grenzen der Simulation aufzeigen. Jeder der drei Wirkstoffe repräsentiert eine von drei Wirkstoffgruppen, welche in der Modellierung getrennt voneinander betrachtet werden müssen: TMP-001 ist eine schwach Säure, Fenofibrat ein neutraler und äußerst lipophiler Wirkstoff und Ciprofloxacin stellt eine schwache Base dar.

Bei der Untersuchung von einer Wirkstoffsuspension der schwachen Säure TMP-001 fiel auf, dass die Magenentleerung einer Suspension einen großen Einfluss auf das pharmakokinetische Profil besitzt und die Pharmakokinetik daher nur schlecht abgebildet werden kann. Es wurde daher ein neuer Algorithmus zur Beschreibung der Magenentleerung entwickelt und validiert. Dieser Algorithmus war Teil einer weiteren Publikation (Nothnagel, Jung et al. 2018) und wurde in das Modell für alle weiteren Simulationen übernommen.

Bei Lipidil One® handelt es sich um ein kommerzielles Arzneimittel des amerikanischen Herstellers Abbott, welches Nanopartikel des Wirkstoffs Fenofibrat enthält. Anders als TMP-001 reagiert dieser Wirkstoff sehr sensitiv auf das verwendete Freisetzungsvolumen (standardmäßig 500ml in Arzneibuchapparaturen) im *in vitro*-Testsystem. Es wurde daher eine neue Methode der *in vitro-in vivo* Skalierung entwickelt, welche die *in vitro*-basierten Freisetzungparameter des RPT Modells auf den *in vivo*-Wert normalisiert.

4.1 Testung der Umwelttoxizität in Zebrafischembryos

Um die Toxizität der im Zuge dieses Projektes hergestellten Nanoarzneiformen im Vergleich zu den bisherigen Darreichungsformen festzustellen, muss zunächst die Toxizität der herkömmlichen Pharmazeutika ermittelt werden. Der Zebrafischembryo-Toxizitätstest (FET) (OECD 236 und DIN EN ISO 15088) ist eine etablierte Methode, um Substanzen auf akute Toxizität zu prüfen und stellt weiterhin eine Alternative zu Tierversuchen dar (TierSchVersV vom 01.08.2013 und Europäischen Richtlinie 2010/63/EU). Neben der akuten Toxizität kann

auch die subakute Toxizität ermittelt werden, indem neben letalen auch sub-letale Effekte wie Ödeme oder Deformationen bestimmt und Schwellenkonzentrationen festgelegt werden. Hierfür werden Konzentrations-Wirkungsbeziehungen anhand veränderter morphologischer Entwicklung aufgestellt und mittels Probit-Analyse Effektkonzentrationen (EC_x) und letale Konzentrationen (LC_x) abgeleitet, wobei das „x“ für die Prozentzahl der betroffenen Organismen aufgeführt ist.

4.1.1 **Haltung der Fische und Gewinnung der Zebrafisch-Eier**

Zebrafische (*Danio rerio*) wurden in aktivkohlegefiltertem und UV-sterilisiertem Leitungswasser bei 27 °C ± 1 °C und einem 10h/14 h Dunkel-Licht-Zyklus in großen (~50-350 Fische/Aquarium) Laichgruppen gehalten. Sie werden morgens mit TetraMin-Flocken (Tetra GmbH, Melle, Deutschland) und nachmittags mit frisch geschlüpften Naupliien von *Artemia salinas* gefüttert. Für die Eigewinnung wurden spezielle Ablaihfäße in die Aquarien gestellt, in denen die Eier aufgefangen werden. Nach etwa 60-80 min. wurden die Ablaihfäße wieder entnommen und die darin gesammelten Fischeier in einem feinen Sieb gesammelt, mit frischem Aquarium-Wasser gewaschen und in eine größere Glasschale mit Aquarium-Wasser überführt.

4.1.2 **Fischembryo-Toxizitätstest (FET)**

Die FET wurden in Anlehnung an die Testrichtlinien OECD 236 und DIN EN ISO 15088 unter standardisierten Bedingungen durchgeführt. Die Exposition der Embryonen dauerte maximal bis 120 *hours post-fertilisation* (hpf).

Die Fischeier wurden nach dem Absammeln in Petrischalen mit den zu testenden Wirkstoffen bzw. in ISO-Wasser (gemäß DIN EN ISO 7346-3, fünffach verdünnt) als Kontrolle überführt. Die Eier, die entweder nicht befruchtet sind, ein beschädigtes Chorion haben eine asymmetrische Zellteilung aufweisen oder noch nicht das Vierzell-Stadium erreicht haben, wurden unter einem Stereomikroskop innerhalb der ersten zwei Stunden nach der Fertilisation aussortiert. Die unbeschädigten Eier wurden einzeln in einem Well mit 200 µl der entsprechenden Testlösung (Wirkstoff oder ISO-Wasser) inkubiert (bei 27 °C ± 1 °C; in 10 h/14 h Dunkel-Hell-Zyklus).

Für das Ansetzen der Testlösungen wurde 1:5 verdünntes ISO-Wasser als Medium verwendet. Bei unzureichender Wasserlöslichkeit der Testsubstanz wurden die im Ergebnisteil beschriebenen Lösungs- oder Dispersionsmittel verwendet. Die finale Konzentration des Lösungsmittels im Test wurde dabei so gering wie möglich gehalten. Die empfohlene maximale Lösungsmittelkonzentration für aquatische Toxizitätstest von 0,01% gemäß der OECD Richtlinie 23 konnte bei einigen der Substanzen im Projekt leider nicht eingehalten werden. Für die Testsubstanzen wurden die Tests jeweils dreimal wiederholt. Bei jedem Durchgang wurden unterschiedliche Konzentrationen/Verdünnungen einer Testsubstanz

parallel zu den entsprechenden Kontrollen (ISO-Wasser oder ISO-Wasser mit Lösungs- bzw. Dispergiermittel) getestet. Für jede Behandlung wurden 2x 24 Eiern auf getrennten Testplatten als Replikate verwendet. Auf jeder Platte wurden 12 Eier als ISO-Kontrolle mitgeführt. Die Embryonen wurden 72 h bzw. 96 h inkubiert und alle 24 Stunden mikroskopisch auf morphologische Defekte untersucht. Dabei wurden die wichtigsten Stadien der Embryonalentwicklung, wie die Ausbildung der Somiten und der *Chorda cordalis*, des Kopfes, der Ohranlagen und der Augen, das Ablösen des Schwanzes oder Einsetzen des Herzschlags, berücksichtigt. Während der Tests wurden der pH-Wert sowie der Sauerstoffgehalt überwacht. Bei einer Testdauer von 96 h wurden nach 48 hpf alle Lösungen erneuert, um eine Aufrechterhaltung der Expositionsbedingungen zu gewährleisten.

Am Ende eines jeden Tests wurden alle Effekte zu jedem Zeitpunkt elektronisch erfasst und die Daten mithilfe von MS Excel (Microsoft, Redmond, USA), ToxRat™ (Version 2.10; ToxRat Solutions GmbH, Alsdorf, Deutschland) und Origin 2018b (OriginLab Corporation, Northampton, USA) ausgewertet. Regressionskurven (Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen) und Effektschwellen-Konzentrationen EC₅₀- und LC₅₀-Werte wurden, sofern möglich, mittels Probit-Analyse bestimmt.

4.1.3 Wirkungsorientierte Analysen

a) Acridin-Orange Apoptose-Färbung

Für die Untersuchung der Toxizität auf zellulärer Ebene, wurde die Acridin Orange Apoptose Färbung durchgeführt. Acridin-Orange ist ein fluoreszierender, für Nukleinsäuren spezifischer Farbstoff, der an die DNA bindet (Kusuzaki, Murata et al. 2007). Auf diese Weise können durch Anregung mit blauem Fluoreszenzlicht apoptotische Zellen erfasst werden (*life imaging*) (Abrams, White et al. 1993, Kusuzaki, Murata et al. 2007, Kralik and Ricchi 2017).

Nach 48 h Exposition wurden die Zebrafischembryonen entchorioniert, in 24-well Mikroplatten überführt und für 30 min in 2 µg/ml Acridin Orange Lösung inkubiert. Nach drei Waschschritten mit ISO-Wasser von je 10 min wurden die Embryonen mit 0,2 mg/mL Benzocain betäubt und auf Objektträgern in 3% Methylcellulose platziert. Es wurden Fluoreszenz- und Hellfeld-Bildstapel aufgenommen und anschließend mit der Software Image J (NIH, Bethesda, USA) zu einem Vollfokusbild (*Extended depth of field*) zusammengefügt. Anhand dieser Bilder wird die Anzahl der apoptotischen Zellen innerhalb der *region of interest* („ROI“, hier der gesamte Rumpf und Schwanz eines Embryos, ohne Kopf) ermittelt.

b) DASPEI-Färbung

Neben der transgenen Reporterlinie Tg(*clnb:lynGFP*) kann die DASPEI-Färbung genutzt werden, um Neuromasten zu visualisieren. Hierfür werden Embryonen nach 72 hpf

entchorionisiert, in 24-well Platten überführt und in 0,1 mg/ml DASPEI in ISO 20% (Stammlösung: 1 mg/ml in 100% DMSO) für 20 min inkubiert. Danach werden die Embryonen dreimal für 5 min in ISO 20% gewaschen und mit Benzocain betäubt. Die betäubten Embryonen werden auf Objektträger mit 3%-Methylcellulose positioniert und mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Auswertung erfolgt wie oben anhand der Reporterlinie Tg(*clnb:lynGFP*) beschrieben.

c) *Screening der Toxizität mit Hilfe von transgenen Reporterlinien*

Um die Toxizität der Testsubstanzen neben der morphologischen auch auf neuronaler und vaskulärer Ebene zu testen, sind die Reporterlinien Tg(*fli1:EGFP*)_{y1} und Tg(*clnb:lynGFP*) untersucht worden. Die transgene Zebrafischlinie Tg(*fli1:EGFP*)_{y1} ermöglicht es, die Entwicklung des Blutgefäßsystems zu verfolgen. In der Reporterlinie Tg(*clnb:lynGFP*) werden die Neuromastzellen des Seitenliniensystems der Fische durch grüne Fluoreszenz des Proteins GFP sichtbar gemacht, wodurch die Entwicklung des Seitenliniensystems untersucht werden kann. In der Reporterlinie Tg(*gfap:GFP*) exprimieren Gliazellen das grün fluoreszierende Protein, sodass das zentrale Nervensystem der Fische beobachtet werden kann. Die Fischembryonen sind analog des oben beschriebenen FETs eingesetzt worden. Nach 72 hpf wurden die Embryonen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Auswertung erfolgte mittels ImageJ (NIH, Bethesda, USA). Als Messparameter für die Auswertung der Effekte auf die transgene Linie und Tg(*clnb:lynGFP*) diente die Migrationsstrecke des distalen Neuromasten, die auf die gesamte Schwanzlänge (ab Beginn der Dottersackverlängerung bis Schwanzspitze) normalisiert wird. Um mögliche vaskulären Effekte der Testsubstanzen in Fischen der Reporterlinie Tg(*fli1:EGFP*)_{y1} zu untersuchen, wurden acht intersegmentalen Venen oberhalb der Dottersackverlängerung mit Hilfe des ImageJ Plugins „NeuronJ“ in jedem einzelnen Fisch vermessen. An der Stelle der gemessenen Venen wurde mittels ImageJ die Körperbreite des Embryos bestimmt und die Länge der Venen auf die Körperbreite an den Punkten der gemessenen Venen bezogen. Für die Auswertung der Fische der Reporterlinie Tg(*gfap:GFP*) wird nach 72 hpf die Fluoreszenz hinter dem Kopf des Embryos innerhalb einer bestimmten, festgelegten Region (region of interest, ROI) bestimmt. Um die Hintergrundfluoreszenz zu ermitteln, wird in einer Region des Fisches, in der kein GFP exprimiert wird, mit der gleichen ROI die Fluoreszenz gemessen. Die Autofluoreszenz wurde von der Fluoreszenz der Gliazellen abgezogen.

4.1.4 **Bestimmung der Toxizität auf genetischer Ebene: qPCR**

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wird eingesetzt, um DNA zu amplifizieren. Für dieses Verfahren werden das DNA-Template, das Enzym DNA-Polymerase, Nukleotide und die Primer der Gene, die vervielfältigt werden sollen, benötigt. Bei der quantitativen PCR ist

zusätzlich ein Fluoreszenzstoff (in diesem Fall SybrGreen) vorhanden, der in doppelsträngige Nukleinsäurefragmente interkaliert (Arya, Shergill et al. 2005, Kralik and Ricchi 2017). Durch diesen Fluoreszenzstoff kann somit die Menge an DNA quantitativ bestimmt werden. Dies ermöglicht es, die Expression von spezifischen Genen in Relation zu sogenannten Haushaltsgenen zu vergleichen, die in allen Geweben in etwa gleichmäßig exprimiert und durch die Substanzen nicht reguliert werden (Kralik and Ricchi 2017).

In dieser Studie wird die Expression spezifischer Gene zwischen Kontrollembryonen und Embryonen, die den Testsubstanzen ausgesetzt waren, verglichen. Auf diese Weise kann eine Aussage darüber getroffen werden, ob die Testsubstanzen eine Änderung im Genexpressionsmuster hervorrufen.

Bei den Genen, die in dieser Arbeit untersucht werden, handelt es sich einmal um Gene, die für die Immunabwehr eine wichtige Rolle spielen. In diesem Zusammenhang wurde die Expression des Gens, welches für das Zytokin Interleukin-8 (*il-8*) codiert, untersucht. Weiterhin wird die Expression von Genen untersucht, welche die Myelinisierung des zentralen Nervensystems des Embryos steuern. ZU diesen gehören das Enzym 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase (*hmgcr*) und das basische Myelinprotein (*mbp*). Zusätzlich wird die Expression des Dottervorläufer-Proteins Vitellogenin (Vitellogenin-1 und Vitellogenin-3, *vit-1*, *vit-3*) untersucht, um eine potentiell östrogene Wirkung der Substanzen zu erfassen.

Nach 96 h werden pro Testkonzentration und Kontrolle 10 Embryonen homogenisiert und deren mRNA isoliert (RNeasy® PowerLyzer® Tissue&Cells Kit, QIAGEN, Hilden). Daraufhin wird die mRNA in cDNA umgeschrieben (SensiFast™ cDNA, Biotin, Luckenwalde) und die qPCR-Analyse durchgeführt (SensiFast™ SyBR No RoxKit, Biotin, Luckenwalde). Die Auswertung erfolgt nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode nach Livak und Schmittgen (Livak and Schmittgen 2001).

4.1.5 Untersuchungen zur Aufnahme und Verteilung von Nanocapsules

Um zu überprüfen, ob wirkstoffbeladenen Nanopartikeln von den Embryonen aufgenommen werden, wurden wirkstofffreie mit dem Fluorophor Lumogen® F Red markierte PLGA-Nanopartikel getestet. (7,5 mg/L). Die Verteilung der markierten Partikel in den Embryonen wurde von 24-96 hpf alle 24 h fluoreszenzmikroskopisch beobachtet. Weiterhin wurde kommerziell erhältliches Fluoresceinisothiocyanat (FITC)- markiertes PLGA (Mn 20 -40 kDa; PolySciTech, USA) untersucht. Die Aufnahme in die Embryonen wurde täglich bis 120 hpf kontrolliert. In einem weiteren Schritt sind Zebrafischembryonen Rhodamin markierte PLGA-Partikel ausgesetzt worden und die Aufnahme fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

5. Projektergebnisse

Das Projekt zeigte sich in allen drei Teilbereichen außerordentlich erfolgreich und auch die Erstellung einer Umweltbilanz führte zu guten Ergebnissen.

5.1 Herstellung von Nanoarzneiformen

5.1.1 Herstellung von Blank-Formulierungen

Zuerst, in einer Machbarkeitsversuchsreihe wurden lediglich mit Verkapselungsmaterialien wirkstofffreie bzw. fluoreszierende Farbstoff beladene Nanosuspensionen hergestellt (sogenannte Blank-Formulierungen). Diese wurden u.a. als Referenzen in Toxizitätsuntersuchungen eingesetzt. Als Herstellungsmethoden dient die Nanopräzipitationsmethode mittels MJR (Polymer-Nanopartikelsystemen) und die High shear homogenisation-Methode (feste Lipidnanopartikel).

5.1.2 Polymer-Nanopartikelsysteme

Die Ergebnisse der Machbarkeitsversuche zeigen, dass mit allen vorausgewählten Verkapselungsmaterialien mit Hilfe der MJR-Nanopräzipitation, abhängig vom gewählten Lösungsmittel des Solvent-Systems als auch des angewendeten Solvent:Nonsolvent-Volumenverhältnisses, Nanopartikel von geringer Größe und enger Partikelgrößenverteilung hergestellt werden konnte. Des Weiteren konnten für alle Verkapselungsmaterialien einige Formulierungen mit ausreichender physikalischer Stabilität (über wenigstens eine Woche bei Raumtemperatur) identifiziert werden. Alle aus pharmazeutischen einsetzbaren Polymeren hergestellten Partikelsysteme werden in Tabelle 4 benannt, ebenso wie die wichtigsten physikochemischen Eigenschaften.

Tabelle 4: Charakteristika von unbeladenen im MJR hergestellten Polymer-Nanopartikel.

Material	Solvent	Solvent : Nonsolvent	t= 0			t= 7 Tage		
			PG [nm]	PDI	ZP [mV]	PG [nm]	PDI	ZP [mV]
HPMCP	85% Ethanol	1:1	281,6	0,111	-6,0	220,2	0,046	-21,9
		1:2	208,0	0,140	-11,7	112,9	0,093	-16,4
		1:5	204,3	0,246	-20,3	135,5	0,348	-17,8
PLGA	Ester- terminiert in Aceton	1:1	141,0	0,076	-27,1	158,7	0,012	-38,5
		1:2	109,8	0,033	-38,4	115,4	0,09	-35,9
		1:5	98,8	0,247	-29,6	77,3	0,236	-29,2
	Carboxyl- terminiert in Aceton	1:1	131,8	0,276	-21,4	102,3	0,221	-39,7
		1:2	146,9	0,437	-38,8	126,3	0,505	-45,4
		1:5	97,6	0,413	-39,5	68,04	0,411	-35,3

Abschlussbericht 2019

Eudragit RL PO	Aceton	1:1	86,9	0,374	54,5	52,42	0,324	89,1
		1:2	77,6	0,420	68,1	43,06	0,666	88,8
		1:5	136,5	0,444	54,2	98,2	0,489	68,0
	Ethanol	1:1	449,3	0,228	22,3	508,2	0,248	35,6
		1:2	247,9	0,554	16,0	149,4	0,543	28,3
		1:5	194,5	0,543	21,1	144,9	0,583	36,1
Eudragit RS PO	Aceton	1:1	86,7	0,260	48,8	67,11	0,28	85,4
		1:2	92,7	0,495	60,3	70,5	0,425	88,6
		1:5	279,0	0,706	65,2	145,1	0,585	35,2
Eudragit S100	Methanol	1:1	98,1	0,154	-41,1	89,47	0,169	-32,6
		1:2	112,6	0,207	-35,3	98,74	0,192	-25,0
		1:5	179,6	0,590	-32,6	119,5	0,396	-22,0
	Ethanol	1:1	687,7	0,961	-10,9	93,54	0,231	-13,4
		1:2	119,7	0,151	-27,7	75,64	0,113	-36,1
		1:5	121,1	0,309	-19,3	97,41	0,247	-15,5
Eudragit L100	Methanol	1:1	260,4	0,195	-52,5	278,2	0,07	-40,0
		1:2	217,9	0,566	-31,2	187,8	0,537	-25,0
		1:5	923,1	1,000	-29,7	375,2	0,818	-22,5
	Ethanol	1:1	768,4	0,955	-7,7	n/a	n/a	n/a
		1:2	455,8	0,421	-23,5	250,5	0,362	-25,8
		1:5	69,01	0,445	-38,5	39,62	0,543	-36,8
Eudragit E100	Methanol	1:1	193,3	0,137	52,4	214,4	0,165	41,0
		1:2	141,7	0,297	45,7	119,9	0,26	42,3
		1:5	273,1	0,655	35,2	105,8	0,479	46,2
	Ethanol	1:1	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
		1:2	417,3	0,079	39,7	465,5	0,153	32,4
		1:5	163,1	0,201	34,0	124,7	0,172	31,7
Ethyl- cellulose	70% Ethanol	1:1	282,6	0,394	-16,3	215,9	0,459	-22,9
		1:2	197,3	0,387	-13,2	165,3	0,337	-19,4
		1:5	181,5	0,263	-24,2	154,2	0,338	-24,8

5.1.3 Solid Lipid Nanoparticles

Alternativ wurden zusätzlich zu den unbeladenen Polymer-Nanopartikelsystemen feste Lipidnanopartikel hergestellt. Im Gegensatz zur Fertigung von Polymernanopartikeln wird statt der MJR-Technologie die *High shear homogenisation*-Methode angewendet. Die SLN-Suspensionen sind mit verschiedenen nicht-ionischen Tensiden stabilisiert. Des Weiteren konnten für alle Verkapselungsmaterialien einige Formulierungen mit ausreichender physikalischer Stabilität (über wenigstens eine Woche bei Raumtemperatur) identifiziert werden (Fett ausgedruckt).

Tabelle 5: Charakteristika von unbeladenen Lipidnanopartikeln unter Verwendung verschiedener Stabilisatoren.

	Verkapselungsmaterial			
	Stearinsäure		Palmitinsäure	
Stabilisator	PG [nm]	PDI	PG [nm]	PDI
Cremophor A6	1073	0,961	407,5	0,243
Cremophor A25	389,1	0,019	369,9	0,220
Plasdone K-25	326,0	0,249	426,4	0,047
Pluronic F-68	309,5	0,165	382,7	0,135
Tween 20	305,9	0,163	364,5	0,042
Tween 60	381,5	0,260	352,8	0,195
Tween 80	300,1	0,203	372,0	0,182

Die Ergebnisse der Machbarkeitsversuche zeigen, dass unter Zuhilfenahme der Lipide Stearinsäure sowie Palmitinsäure feste unbeladene Nanopartikel mit der *High shear homogenisation*-Methode herstellbar sind, abhängig vom eingesetzten Stabilisator.

5.1.4 Herstellung wirkstoffbeladener Formulierungen

Weiterhin wurden die Herstellung und Optimierung wirkstoffhaltiger Nanoformulierungen (inklusive Bestimmung der kritischen Qualitätsattribute) durchgeführt. Dies beinhaltet sowohl die Charakterisierung der Nanoformulierungen als auch intrinsische Stabilitätsuntersuchungen (inklusive SOP Erstellungen).

Die Charakterisierung der entwickelten Nanopartikel ist elementarer Bestandteil zur Bewertung der Qualität und zur Optimierung der bestmöglichen Zielgrößen. Zur Bewertung der Formulierungen wurden Messungen der Partikelgröße, der Partikelgrößenverteilung, sowie bei wirkstoffbeladenen Formulierungen die Gehaltsbestimmungen des Wirkstoffes in den Partikeln angestellt.

Tabelle 6: Zusammensetzung der kritischen Qualitätsattribute wirkstoffbeladener Formulierungen

Wirkstoff	Verkapselungsmaterialien	PG nm	PDI	ZP m	EE %	Gehalt mg/mL
Fenofibrat	HPMC	70,37	0,111	-	70,37	250,000
	HPMCP-Chitosan	496,6	0,762	36,9	81,94	0,354
Carbamazepin	Stearinsäure	338,6	0,152	-	89,70	1,064
Ciprofloxacin	PLGA	138,0	0,212	-	55,13	0,263
	Palmitinsäure	1331	0,969	0,09	95,94	3,903

Die Fenofibrat-HPMC Formulierung wurde mittels Granulierung in ein trockenes Pulver Form gebracht um die Stabilität der Systeme wegen sehr hoher Konzentration zu verlängern. Die Granulate wurden hergestellt in dem die ausgewählten Nanosuspensionen (Granulierflüssigkeit) auf eine Pulvermischung bestehend aus mikrokristalliner Cellulose, Laktose und Crospovidon gegeben wurden.

Um die Stabilität der Ciprofloxacin-PLGA Systeme zu erhöhen wurde ein Gefriertrocknungsprozess entwickelt. Mit Hilfe verschiedener Kryoprotektiva (Mannitol, Laktose, Trehalose und Sorbitol) wurde ein Verfahren entwickelt, mit dem es möglich ist Nanopartikelsuspensionen in ein trockenes Pulver zu transferieren, welches durch Resuspension erneut in eine Nanopartikelform überführbar ist. Das Kryoprotektivum Mannitol erwies sich hierfür als effektiv.

Das Variieren der Verkapselungsmaterialien in den Formulierungen führt zu unterschiedlichen Freisetzungprofilen. Zur Bestimmung der Freisetzungprofile wurden die getrockneten Granulate bzw. Lyophilizate in Leerkapseln aus Gelatine gefüllt (Zerfallszeit Gelatine kapseln < 3 Minute, daher kein signifikanter Einfluss auf Freisetzungprofile). Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

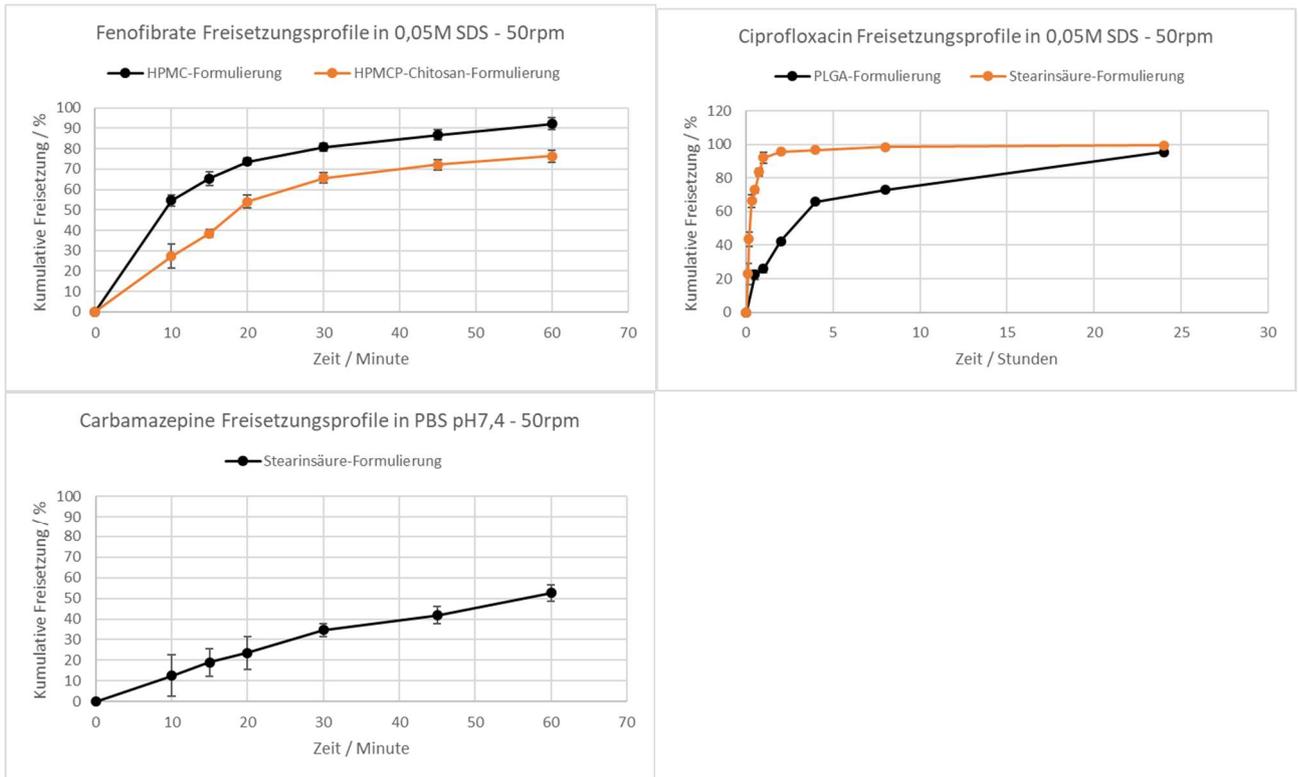


Abbildung 2: Freisetzung verschiedener wirkstoffbeladener Formulierungen (A) von Fenofibrate (B) von Ciprofloxacin (C) Carbamazepine

5.2 *In vitro*-Freisetzungsanalytik und Erstellung von PBPK-Modellen

Am Standort Frankfurt des Fraunhofer IME wurden im Rahmen des Projektes biorelevante Freisetzungstudien durchgeführt und ein Modell zur Vorhersage der Bioverfügbarkeit aufgebaut. Durch Simulation der physiologischen Prozesse können so auch Exkretionsmengen der verschiedenen Formen des Wirkstoffs bestimmt werden.

5.2.1 Entwicklung der Wirkstoff-Analytik

Im Projektverlauf konnten für alle 6 Wirkstoffe HPLC Methoden mit hoher Genauigkeit und Präzision entwickelt werden. Die Nachweisgrenzen liegen alle im für den Freisetzungstest erforderlichen Bereich und ermöglichen auch sensitive Detektion sehr früher Testzeitpunkte (bei niedriger Analytkonzentration). Da insbesondere die genaue Bestimmung der initialen Freisetzung aus Nanopartikeln für die Simulation der Bioverfügbarkeit wertvolle Anhaltspunkte liefert, war dies eine Grundvoraussetzung für die Erreichung der entsprechenden Datentiefe. Während der Methodenoptimierung wurde die Linearität über einen sehr weiten Bereich nachgewiesen, wodurch unnötige Verdünnungsschritte vermieden werden können. Die Parameter der Analytik sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 7: Nachweisgrenzen (LOD und LOQ) der für das Projekt entwickelten analytischen Methoden.

Wirkstoff	LoD [ng/mL]	LoQ [ng/mL]	Genauigkeit der Freisetzungsbestimmung [%]
Fenofibrat	3	9	0,003
TMP-001	6	20	0,02
Diclofenac	10	32	0,032
mTHPC	0,3	1	0,0004
Ciprofloxacin	4	13,4	0,0009
Carbamazepin	8	27,8	0,007

5.2.1 Wirkstoffcharakterisierung

Wie bereits dargelegt stellt die Wirkstoffcharakterisierung eine notwendige analytische Vorbereitung der Freisetzungsexperimente dar. Dies ist insbesondere deshalb erforderlich, da die Wirkstoffe aufgrund ihrer Lipophilie oftmals zahlreiche Wechselwirkungen mit Oberflächen eingehen und die Probenseparation aufgrund der geringen Größenunterschiede zwischen Nanopartikelformulierung und Medienbestandteilen erschwert werden. Daher wurden das Adsorptionsverhalten, der *Cut-off* von Filtermembranen für verschiedene Arzneiformen sowie die Löslichkeit bestimmt.

d) Adsorptionsverhalten

Viele der von uns eingesetzten Wirkstoffe zeigen eine starke Adsorption an verschiedene Materialien, was mit der ausgeprägten Lipophilie zusammenhängt. Die folgende Abbildung zeigt exemplarisch die Ergebnisse einer Filteradsorptionsstudie einer Fenofibratlösung in FaSSIF-v2 an einem 100 nm-Filter. Deutlich zu sehen ist der Anstieg der *Recovery* bei Vergrößerung des zur Filtersättigung eingesetzten Volumens.

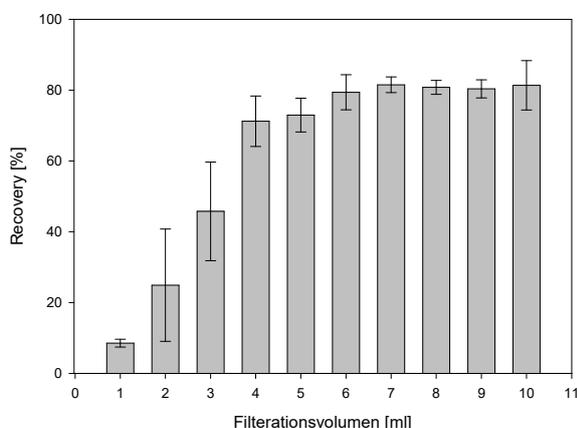


Abbildung 3: Filteradsorptionsstudie von Fenofibrat mit Untersuchung verschiedener Vorlaufvolumina

Als Konsequenz dieser Untersuchungen wurde das zur Absättigung des Filters einzusetzende Volumen für die Freisetzungstests bestimmt. Vergleichbare Untersuchungen wurden auch für die anderen Wirkstoffe durchgeführt. So wird sichergestellt, dass über den kompletten Zeitraum des Freisetzungstests keine systematische Verzerrung der Daten stattfindet. Ähnliche Untersuchungen wurden ebenfalls für TMP-001, Diclofenac und Ciprofloxacin durchgeführt. Das zur Sättigung des Filters benötigte Volumen ist in Tabelle 8 dargestellt.

Wirkstoff	Sättigungsvolumen	Recovery im Äquilibrium
Fenofibrat	5ml	80%
TMP-001	3ml	97%
Diclofenac	2ml	99%
Ciprofloxacin	2ml	100%

Tabelle 8: Sättigungsvolumen und Recovery an Filtermembranen.

e) Selektion von Filtermembranen

Insbesondere bei kleinen Partikelgrößen und enger Größenverteilung zeigte sich, dass Filtermembranen mit einem *Cut-off* von 20 nm deutlich besser für die Abtrennung geeignet waren als Filter mit größerem Porendurchmesser. Andererseits steigt somit auch der Filtrationsdruck drastisch an, was in der Analytik zu einigen Risiken führt. Ein großes Risiko ist z.B. die (Mikro-)ruption des Filters und eine Veränderung des Probenmaterials durch den enormen Druck. Daher muss stets eine Abwägung zwischen der Minderung der Partikelretention bei sinkender Partikelgröße und der möglichen Veränderung des Freisetzungsergebnisses durch die Probenaufarbeitung stattfinden.

Abbildung 4 zeigt den Einfluss der Partikelgröße auf die Retentionsleistung eines 100 nm Filters. Die mit TMP-001 beladenen Partikel, welche auf aus Eudragit® (einem Polymethakrylat-Derivat) hergestellt wurden, zeigen die größte Abhängigkeit von der eingesetzten Trennmethode.

Für Nanokristalle des Fenofibrats wurden hingegen mit einem Filter der Porenweite 20 nm eine Partikelretention von 99,97% und für Fenofibrat mit einem Filter der Porenweite 100 nm eine Partikelretention von 99,7% erreicht. Diese Retentionsrate erlaubt eine hinreichend genaue Bestimmung der monomolekularen Wirkstoffkonzentration.

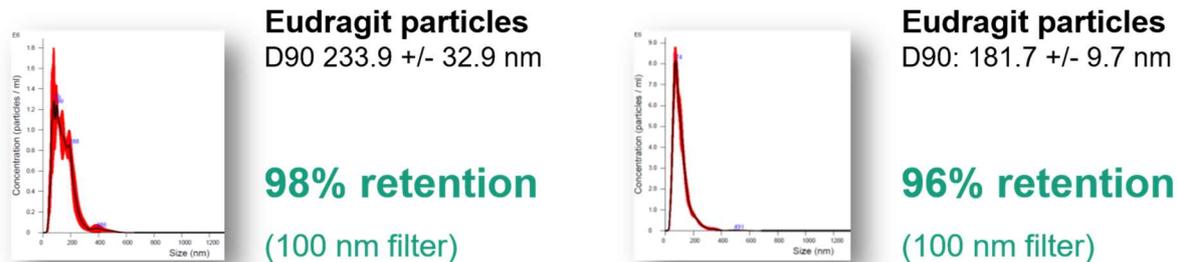


Abbildung 4: Retention von TMP-001-beladenen Eudragit®-Nanopartikeln mittels eines 100 nm Filters sowie Angaben zur Partikelgröße und Größenverteilung.

NTA war in diesen Untersuchung den anderen von uns untersuchten Größenmessverfahren deutlich überlegen, da Partikelkonzentrationen mithilfe eines bildbasierten Zählverfahrens und keine Streulichtintensitäten bestimmt werden.

f) Löslichkeit

Bei Untersuchung der Löslichkeit zeigte sich für TMP-001 und Ciprofloxacin kein signifikanter Unterschied nach 6 h, 24 h und 48 h. Der Auflösungsprozess findet bei diesen Wirkstoffen relativ schnell statt, sodass bereits zum ersten Zeitpunkt (6 h) die maximale Löslichkeit erreicht werden konnte. Im Gegensatz dazu zeigte Fenofibrat eine weitere Zunahme der Löslichkeit auch nach 24 h, nicht jedoch nach 48h.

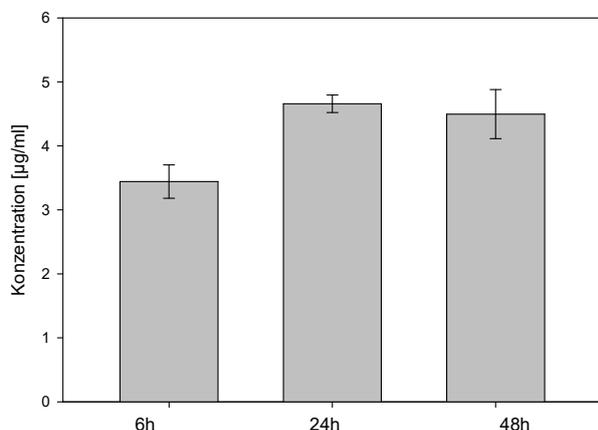


Abbildung 5: Löslichkeitsuntersuchung von Fenofibrat in FaSSIF v2 nach 6, 24 und 48 h (Mittelwert ± Standardabweichung, n=3).

Für Diclofenac wurde insbesondere bei längerer Inkubation mit künstlichem Magensaft eine Abnahme der Löslichkeit detektiert, was auf eine Instabilität in diesen Medium hindeutet. Aus diesem Grund wurde hier die Löslichkeit in FaSSGF

ebenfalls nach 1 h bestimmt. Abbildung 3 zeigt exemplarisch die Löslichkeitsuntersuchung von Fenofibrat in FaSSIF-v2. Keiner der übrigen Wirkstoffe zeigte in biorelevanten Medien eine signifikante Zunahme oder Abnahme der Wirkstoffkonzentration im Zeitintervall zwischen 24 und 48 h, so dass die Löslichkeiten über 24 h zur Beurteilung der Sättigung ausgewählt werden konnte (siehe Tabelle 9).

Wirkstoff ↓	Medium →	FaSSGF	FaSSIF-v2
Fenofibrat [µg/ml]		0,4	20,4
TMP-001 [µg/ml]		20,4	1511,7
Diclofenac [µg/ml]		1,8*	-
Ciprofloxacin [µg/ml]		22,1	-

Tabelle 9: Löslichkeiten der untersuchten Wirkstoffe in verschiedenen Medien. * = Löslichkeit nach 1h

5.2.1 Entwicklung von Freisetzungsmethoden

In der ersten Studie erfolgte ein Vergleich der *Sample-and-Separate*-Methode mit dem *Dispersion releaser* anhand einer Nanoformulierung von TMP-001. Das starre Porengerüst der Nanopartikel aus PCL reagiert bekanntermaßen äußerst sensitiv auf Umgebungseinflüsse während der Probenaufbereitung und eignete sich daher am besten für diese Untersuchung. Die Freisetzungskarakteristika waren in der Tendenz ähnlich, jedoch zeigte sich insbesondere während der frühen Zeitpunkte die deutlich höhere Sensitivität des Dialyse-Verfahrens gegenüber der Separation mithilfe von Filter-Membranen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung wurden in einer Publikation zusammengeführt (Jung, Nothnagel et al. 2018). Das hierbei eingesetzte PBPK-Modell simuliert bereits die wichtigsten Grundzüge der humanen Physiologie und bildet äußerst flexibel die Verweilzeiten des Wirkstoffs in verschiedenen Kompartimenten (z.B. Magen und Darm) ab. Es ist eine wichtige Voraussetzung für die späteren Arbeiten, welche diese fortgeschrittene Methodik zur Bewertung der Exkretionsmengen einsetzt. Eine Studie welche zudem die Auswirkung patientenspezifischer Einflüsse (wie z.B. das behandelte Krankheitsbild) untersucht, wurde ebenfalls publiziert (Nothnagel, Jung et al. 2019). Die Modellentwicklung wird im Detail in Abschnitt 4.5.4 behandelt.

Um möglichst genaue Aussagen über die Wirkstoffabsorption treffen zu können wurde weiterhin wurde eine Methode zur Berechnung des Einflusses der Wirkstoffresorption *in vivo* auf das Auflösungsverhalten *in vitro* entwickelt. Diese *in-vitro-in-vivo*-Skalierung (IVIVS) führt zu einer präziseren Vorhersage der Humanpharmakokinetik.

Dies ermöglicht eine frühe Entscheidung, ob Nanotechnologie für den betreffenden Wirkstoff einen substanziellen Beitrag zur Bioverfügbarkeit im Menschen liefert und ob folgerichtig durch den Einsatz der Technologie auch die Gesamtdosis gesenkt werden kann. Dies ist für eine umfassende Einschätzung der Exkretionsmengen, auch unter Berücksichtigung der Vorteile von Nanoarzneiformen erforderlich.

Um dieses Verfahren zu validieren wurden von der Modellsubstanz Fenofibrat drei verschiedene Formulierungen – die konventionelle Formulierung Lipidil® 200, sowie die Nanoformulierungen Lipidil 145 One ® und die von MJR Pharmjet GmbH entwickelten Ecocaps - getestet. Die resultierenden Freisetzungsergebnisse wurden in das PBPK-Modell eingespeist und im Fall der kommerziellen Formulierungen Lipidil® 200 und Lipidil 145 One® mit *in vivo* Studien verglichen. Eine Publikation welche diese Modellsimulationen zusammenhängend darstellt befindet sich derzeit im Revisionsprozess (Jung, Thurn et al. 2019 (Submitted manuscript)). Weiterhin ermöglichen wir einer breiten Öffentlichkeit durch Publikation als [Weblink](#) Zugriff auf das Modell, welches sich bei Verwendung der im Manuskript vorgeschlagenen Methodik auch auf andere Wirkstoffe anwenden lässt.

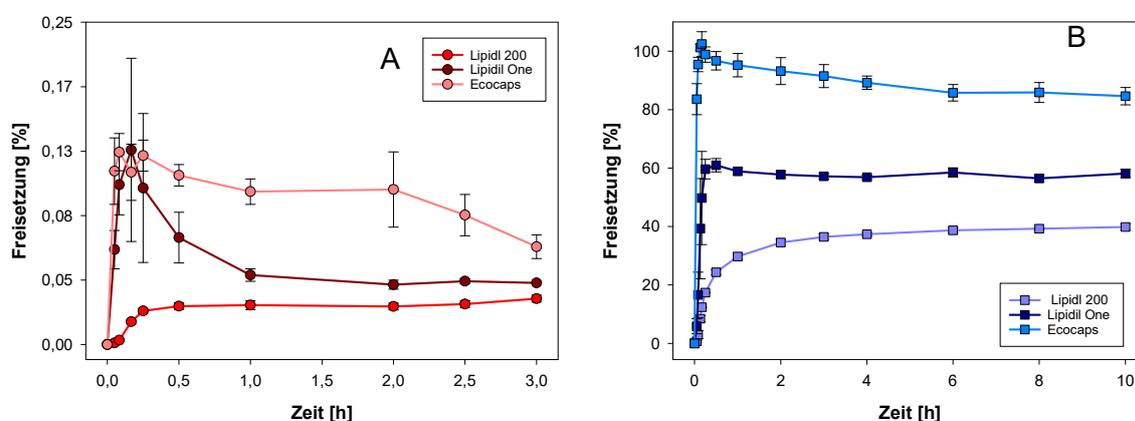


Abbildung 6: Freisetzung verschiedener Fenofibratformulierungen in künstlicher Magen- (A) und Darmflüssigkeit (B).

Die der Simulation zugrunde liegenden Freisetzungskinetiken des Wirkstoffs Fenofibrat sind in Abbildung 6 dargestellt. Die Freisetzungskinetiken anderer Wirkstoffe sind in Abbildung 7 zusammengetragen.

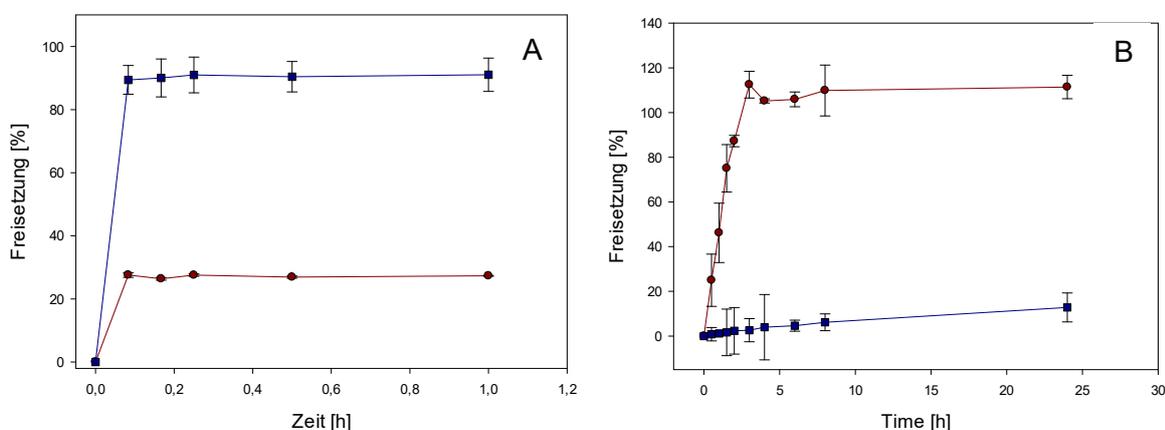


Abbildung 7: Freisetzung von TMP-001 (A) und Ciprofloxacin (B) in künstlicher Magen- (rot) und Darmflüssigkeit (blau)

5.2.2 *In silico-Modellentwicklung*

Basierend auf den generierten *in vitro*-Daten wurde ein PBPK-Modell entwickelt, welches die unterschiedlichsten Szenarien bei Passage der Arzneiformen durch den Magen-Darm-Trakt realistisch widerspiegeln kann.

Die getesteten Arzneiformen umfassten für die Validierung der generierten Modelle traditionelle Arzneiformen und im Markt verfügbare Nanoarzneiformen sowie auch im Projekt hergestellte Nanoarzneiformen. Es wurden Wirkstoffe mit unterschiedlichsten physikochemischen Eigenschaften eingeschlossen, um so ein umfassendes Bild der möglichen Einsatzgebiete zu erhalten. Das Modell wurde während des Projekts laufen optimiert und an neue Fragestellungen angepasst, wobei für alle älteren Simulationen eine Neuberechnung durchgeführt wurde. Es wurden nur neue Programmteile übernommen, wenn die Prädiktionsstärke der Simulationen für alle Wirkstoffe gleichwertig oder besser als in der vorangegangene Versionen war. Das finale Modell bietet ebenfalls eine Entscheidungshilfe, ob für den betreffenden Wirkstoff eine deutliche Verbesserung mit Nanotechnologie wahrscheinlich ist.

In Abbildung 8 sind Simulationen der verschiedenen Fenofibratformulierungen und (sofern vorhanden) zum Vergleich die Plasmaprofile aus den klinischen Studien inklusive der in der klinischen Testung erzielten Standardabweichungen (grauer Bereich) dargestellt.

Sowohl für die traditionelle Arzneiform als auch für die kommerzielle Nanoformulierung konnte eine gute Übereinstimmung zwischen der Simulation und der Humanpharmakokinetik erzielt werden. Die verbesserte Bioverfügbarkeit der Nanoformulierung wurde hinsichtlich der zwei essenziellen pharmakokinetischen Parameter c_{max} AUC exakt vorhergesagt.

Das Modell wurde somit validiert und konnte auch zur Vorhersage der Pharmakokinetik der *in-house* Formulierung Ecocaps eingesetzt werden. Basierend auf diesen Simulationen könnte mit den optimierten Ecocaps eine Wirkstoffeinsparung von über 42% gegenüber der traditionellen Arzneiform und etwa 20% gegenüber dem etablierten Nanoprodukt von Fenofibrat erzielt werden. Diese Dosisreduktion kann in der Umweltbewertung nun auch quantitativ berücksichtigt werden.

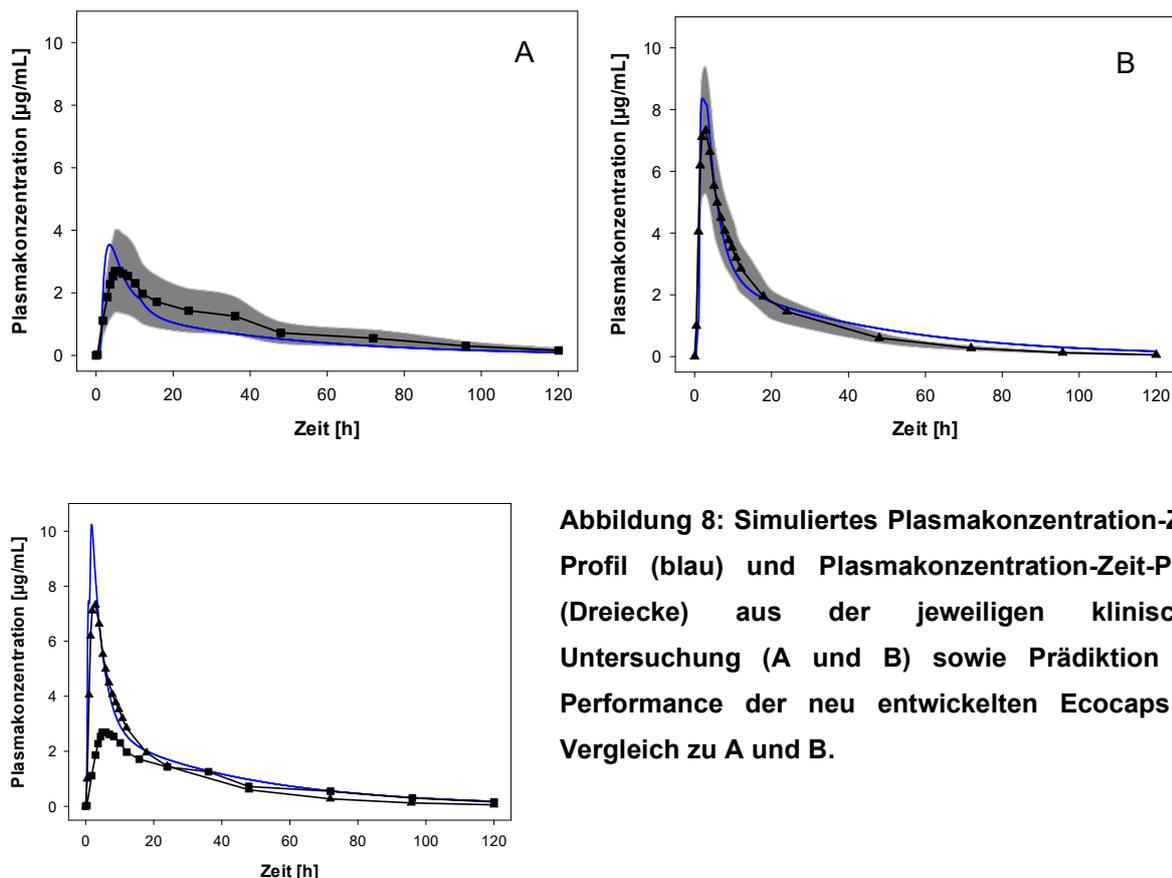


Abbildung 8: Simuliertes Plasmakonzentration-Zeit-Profil (blau) und Plasmakonzentration-Zeit-Profil (Dreiecke) aus der jeweiligen klinischen Untersuchung (A und B) sowie Prädiktion der Performance der neu entwickelten Ecocaps im Vergleich zu A und B.

Um auch die Emission physikalischer Formen des Fenofibrats genauer zu beleuchten, wurde ein *in vitro* Stabilitätstest durchgeführt. Dieser simuliert den Transit durch den menschlichen Gastrointestinaltrakt. Im künstlichen Dickdarmmedium kam es zu einer signifikanten Aggregation der Nanopartikel. Dies deutet darauf hin, dass nur ein geringer Anteil der ursprünglichen Nanopartikel auch als solche in das Abwasser gelangt.

Basierend auf diesen Ergebnissen und mithilfe des Modells konnten verschiedene Emissionsmengen bestimmt werden (Abbildung 9). Das traditionelle Produkt enthielt ebenfalls Spuren von Nanopartikeln, welche als Nebeneffekt des pharmazeutischen Produktionsprozesses eingestuft wurden. Es zeigte daher nur minimale Emission der nanopartikulären Form (Abbildung 9). Bei der kommerziellen Nanoarzneiform waren hingegen über 99,99% der Wirkstoffpartikel kleiner als 1000nm und etwa 17% kleiner als 100 nm. Unter Berücksichtigung der besseren Auflösung und der Stabilität im Gastrointestinaltrakt ergab sich aber auch hier nur eine Emission von etwa 0,4% als Nanopartikel, jedoch bei Berücksichtigung von Mikropartikeln eine Emission von immerhin 5,5% der Dosis. Die Ecocaps wiederum zeigten eine nahezu vollständige Auflösung der Wirkstoffpartikel mit anschließender Resorption, wodurch die Ausscheidung nicht-resorbierten Wirkstoffs vernachlässigbar gering ausfällt.

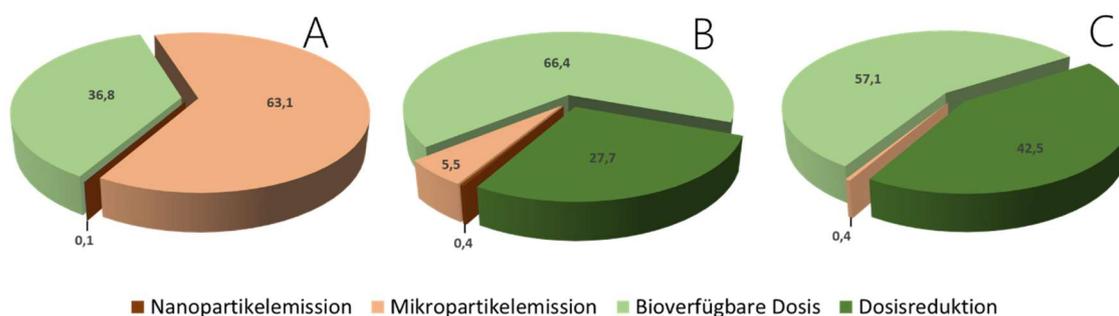


Abbildung 9: Wirkstoffemission in Form von Nano - oder Mikropartikeln vom kommerziellen Standardprodukt (A), Nanoprodukt (b) und den Ecocaps (C)

Dies wird in der gezeigten Dosisreduktion deutlich. Gegenüber dem traditionellen Produkt wird für Ecocaps eine Dosisreduktion von 42,5% vorhergesagt, während für das kommerziell erhältliche Produkt bereits eine Dosisreduktion von 27,7% erreicht wurde.

Abbildung 10 zeigt eine Simulation der Pharmakokinetik nach oraler Gabe von Nanopartikeln des Wirkstoffs TMP-001 basierend auf der *Sample-and-Separate* bzw. der *Dispersion releaser* Methode. Beide Methoden ergeben einen ähnlichen Profilverlauf mit nur geringen Unterschieden hinsichtlich c_{max} und t_{max} .

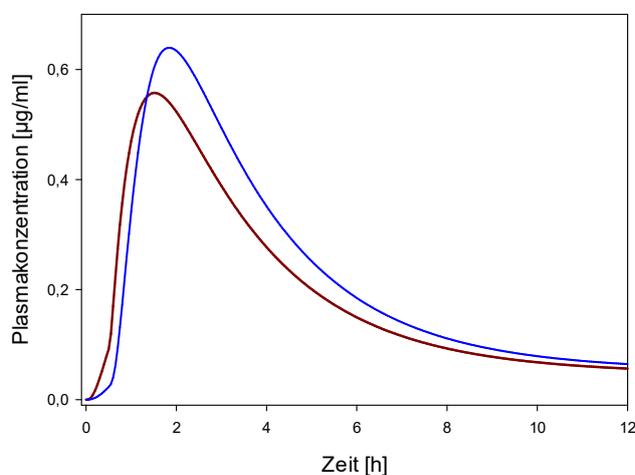


Abbildung 10: Simulation der Pharmakokinetik für TMP-001 Nanopartikel basierend auf *Sample-and-Separat* (rot) und *Dispersion releaser* (blau)

Obwohl hier ein gewisser Unterschied in der Sensitivität feststellbar war, bewegen sich diese Unterschiede innerhalb der in klinischen Studien zu erwartenden Schwankungen. Folglich können beide Methodiken verwendet werden.

Eine Übereinstimmung mit den klinischen Daten wurde für den Wirkstoff TMP-001 nachgewiesen (Nothnagel, Jung et al. 2019), das Modell konnte also ebenfalls erfolgreich validiert werden. Für TMP-001 wurde eine fast vollständige Resorption vorhergesagt, weshalb

für diesen Wirkstoff keine Berechnung der Emissionsmengen durchgeführt wurde. Eine vollständige Emission in Form des Metaboliten ist wahrscheinlich. Basierend auf diesen Ergebnissen sollte die Anwendung von Nanotechnologie für TMP-001 nicht oberste Priorität haben da die zu erwartende Steigerung der Bioverfügbarkeit gering ist.

Problematisch erwies sich das entwickelte Modell für die schwache Base Ciprofloxacin, für die ebenfalls ein PBPK-Modell erstellt wurde. Eine gute Übereinstimmung konnte hinsichtlich c_{\max} und t_{\max} erreicht werden, nicht jedoch für die AUC (Abbildung 11).

Diese wird vom Modell noch deutlich unterschätzt, weshalb auch keine verlässliche Vorhersage der Bioverfügbarkeit und des Metabolitenanteils möglich ist.

Vermutlich kommt es im Menschen zur Bildung einer übersättigten Lösung, wodurch sich die Dauer der Resorption, nicht jedoch ihr Maximum, verschiebt. Die Simulation der Pharmakokinetik schwacher Basen ist ein literaturbekanntes Problem für das bislang noch keine universelle Lösung gefunden wurde.

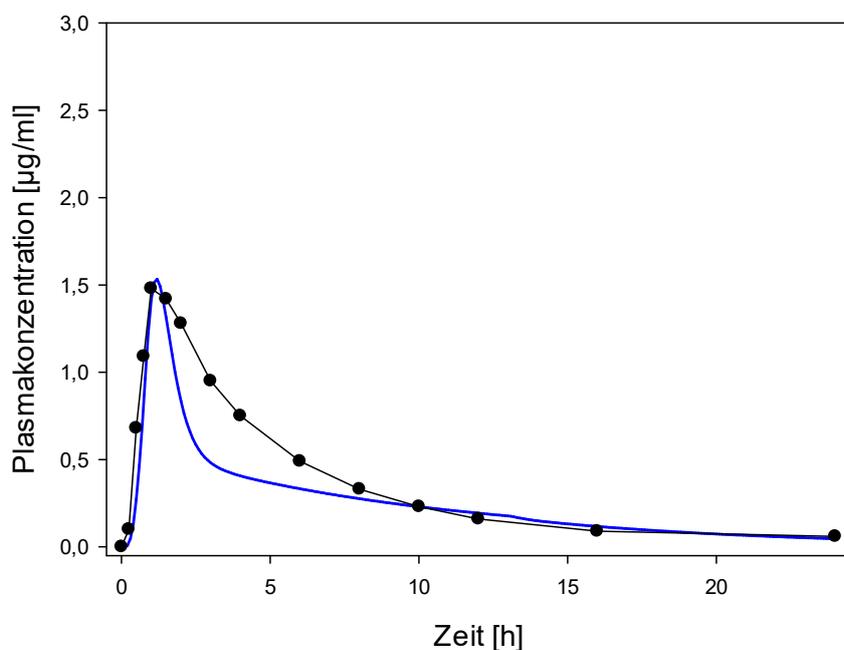


Abbildung 11: Simulation der Pharmakokinetik für Ciprofloxacin (blau) und Vergleich mit *in vivo* Daten (schwarzer Kreis)

5.3 Testung der Umwelttoxizität in Zebrafischembryos

Die Simulation der Verdauungsprozesse im Menschen ermöglicht eine Abschätzung der Emissionsmengen unterschiedlicher Formen des pharmazeutischen Wirkstoffs. Hierbei wurde z.B. zwischen dem Wirkstoff Fenofibrat, seinen Metaboliten sowie zwischen der makropartikulären und der nanopartikulären Form unterschieden.

Die Toxizität dieser verschiedenen Formen des Wirkstoffs sowie der eingesetzten Hilfsstoffe im Zebrafischembryo-Toxizitätstest (FET) sollte eine Einschätzung der Auswirkungen dieser Emissionen auf aquatische Organismen ermöglichen.

5.3.1 **Bestimmung toxikologischer Effektschwellen (LC₅₀/EC₅₀ oder NOEC-Werte)**

Zebrafischembryonen wurden verschiedenen Konzentrationen der Arzneimittel des Antibiotikums Ciprofloxacin, des Fettstoffwechselregulators Fenofibrat, und der Schmerzmittel Diclofenac und TMP-001 für 96 h ausgesetzt. Alle lichtmikroskopisch erkennbaren subletalen Effekte wie Ödeme, Deformationen und reduzierter Blutfluss als auch letalen Effekte wie Koagulation und Herzstillstand wurden täglich erfasst. Anschließend wurde der prozentuale Anteil der Embryonen mit diesen Effekten für jede Konzentration ermittelt sowie EC₅₀- und LC₅₀-Werte ermittelt.

5.3.2 **Hilfsstoffe und Nanosuspensionen**

Um die einzelnen Bestandteile der Nanoformulierungen auf potentielle Umwelttoxizität zu überprüfen, wurden die Hilfsstoffe PLGA, Eudragit E® 100 und Hydroxypropyl-methylcellulosephthalat (HPMCP) im FET getestet. In der Herstellung der Nanoarzneiformen werden zusätzlich Tenside eingesetzt, welche die Oberflächeneigenschaften beeinflussen oder das kolloidale System stabilisieren. Um einen Einfluss der Hilfsstoffe zu untersuchen, wurden die Tenside Pluronic® F127 und Pluronic® F 68, Cremophor® RH40 und Cremophor® A25 untersucht. Die Exposition der Embryonen in den Testkonzentrationen der Tenside erfolgte bis 72 hpf. Cremophor® A25 und Cremophor® RH40 wurden in Konzentrationen von 0,0005% bis 0,5 % (w/v %) getestet. Pluronic® F127 und Pluronic® F 68 wurden in Konzentrationen 1,25 % bis 10% und 1,5 % bis 6 % (w/v %) untersucht. Die Konzentrationen wurden durch vorhergegangenen *Range-Finding*-Tests festgelegt.

Bei einer Konzentration von 0,5 % der Tenside Cremophor® A25 und Cremophor® RH40 trat 100% Mortalität auf. Embryonen, die einer Konzentration von 0,005 % Cremophor® A 25 ausgesetzt waren, wiesen über 50 % an sub-letalen und letalen Effekten auf (Abbildung 10C). Bei der Behandlung mit Cremophor® RH40 zeigten Embryonen bei einer Konzentration von 0,05 % über 50 % letale und sub-letale Effekte (Abbildung 12A). Nach 72 hpf konnten für Cremophor® RH40 ein EC₅₀-Wert von 0,37 % und ein LC₅₀-Wert von 0,081 % ermittelt werden. Für Cremophor® A 25 wurden nach einer Exposition von 72 h ein EC₅₀-Wert von 0,003 % und ein LC₅₀-Wert von 0,006 % bestimmt.

Abschlussbericht 2019

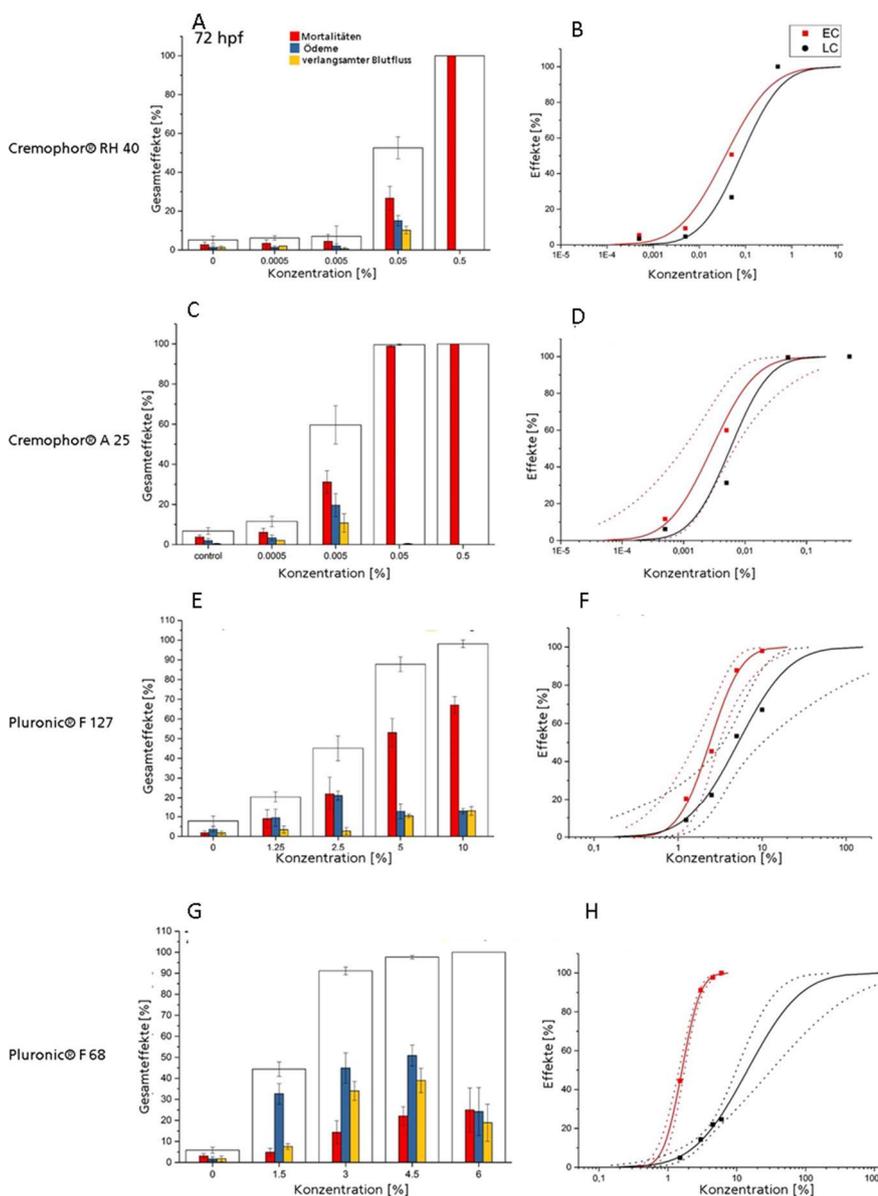


Abbildung 12: Sub-letale und letale Effekte sowie die EC50- und LC50-Kurven nach 72 hpf Exposition der getesteten Tenside Cremophor® RH 40 (A, B), Cremophor® A 25 (C, D), Pluronic® F 127 (E, F) und Pluronic® F 68 (G, H). Große Balken zeigen die Gesamtzahl der Effekte, die kleinen Balken Mortalität (rot), Ödeme (blau) und verlangsamten Blutfluss (gelb). Kurvendiagramme zeigen die Gesamtzahl der Effekte in Abhängigkeit von der Konzentration (rot) und die Mortalität (schwarz).

Embryonen, die Pluronic® F127 ausgesetzt waren, zeigten einen Anstieg an sub-letalen und letalen Effekten mit steigender Konzentration. Bei der höchsten Testkonzentration von 10% trat Mortalität von über 60% auf (Abbildung 12E). Pluronic® F 68 rief bei der geringsten Testkonzentration von 1,5 % über 40 % an letalen und sub-letalen Effekten nach 72 hpf auf (Abbildung 12G). Bei einer Exposition in 6% Pluronic® F 68 traten 100% Effekte auf. Im Gegensatz zu den übrigen getesteten Tensiden wies Pluronic® F 68 weniger letale Effekte

auf. Für Pluronic® F 68 konnte ein EC_{50} -Werte von 1,6 % ermittelt werden. Ein LC_{50} -Wert konnte nach 72 hpf nicht bestimmt werden. Für Pluronic® F 127 wurden EC_{50} -Wert und LC_{50} -Wert 2,4 % und 5,2 % berechnet.

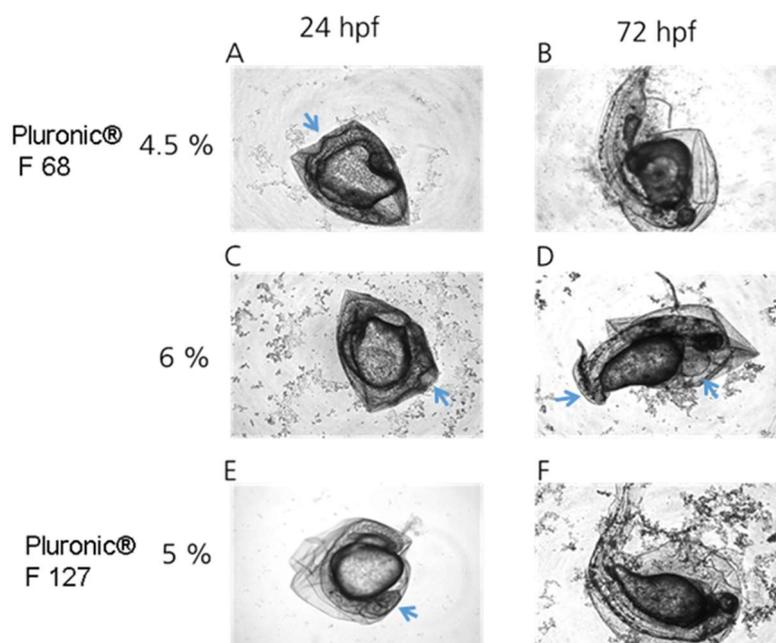


Abbildung 13: Verformungen des Chorions von Embryonen nach 24 hpf und 72 hpf, die 4,5% (A, B) und 6 % Pluronic® F 68 (C, D) sowie 5% Pluronic® F 127 (E, F) ausgesetzt waren. Die blauen Pfeile geben Deformationen des Schwanzes, des Kopfes, der Somiten sowie Ödeme an.

Weiterhin wurde beobachtet, dass das Chorion der Embryonen wenige Minuten nach dem Start der Exposition in Pluronic® F 68 verformt war. Dieser Effekt war nach 24 hpf Exposition auch in Pluronic® F 127 sichtbar (Abbildung 13). Die Embryonen zeigen außerdem Ödeme sowie Verformungen des Schwanzes und des Kopfes (Abbildung 13A, C, D, E). Für Pluronic® F 127 wurde der höchsten EC_{50} -Wert von den getesteten Tensiden ermittelt. Pluronic® F 127 ist daher die Substanz mit dem geringsten ökotoxischen Potential.

Um eine Toxizität der verwendeten Nanomaterialien auszuschließen, wurden PLGA, HPMC und Eudragit® E 100 auf Toxizität überprüft.

Die Materialien wurden als Nanosuspensionen zur Verfügung gestellt um mögliche Effekte der Verarbeitungstechnik mit in die Betrachtung einzuschließen.

Die Suspensionen wurden mit ISO 20% auf die Testkonzentrationen 0,0125 mg/ml, 0,125 mg/ml und 1,25 mg/ml für Eudragit® E 100 und PLGA verdünnt. HPMCP wurde in den Konzentrationen 0,01875 mg/ml, 0,1875 mg/ml und 1,875 mg/ml untersucht. Embryonen, die 0,0125 mg/ml Eudragit® E 100 ausgesetzt waren, wiesen nach 72 hpf 100% sub-letale und letale Effekte auf (Abbildung 14A). Bei der höchsten Testkonzentration von 1,25 mg/ml trat 100 % Mortalität auf. PLGA und HPMCP wiesen hauptsächlich sub-letale Effekte auf. Nach 72 hpf, waren über 50% der Embryonen, die 0,125 mg/ml PLGA ausgesetzt waren, nicht

geschlüpft (Abbildung 14C). In der höchsten Konzentration schlüpfen nahezu 90% der Embryonen nicht.

HPMCP rief nach 72 hpf 93% Effekte in der höchsten Testkonzentration hervor. Dabei überwogen vor allem die sub-letalen Effekte wie Ödeme (66 %)(Abbildung 14E).

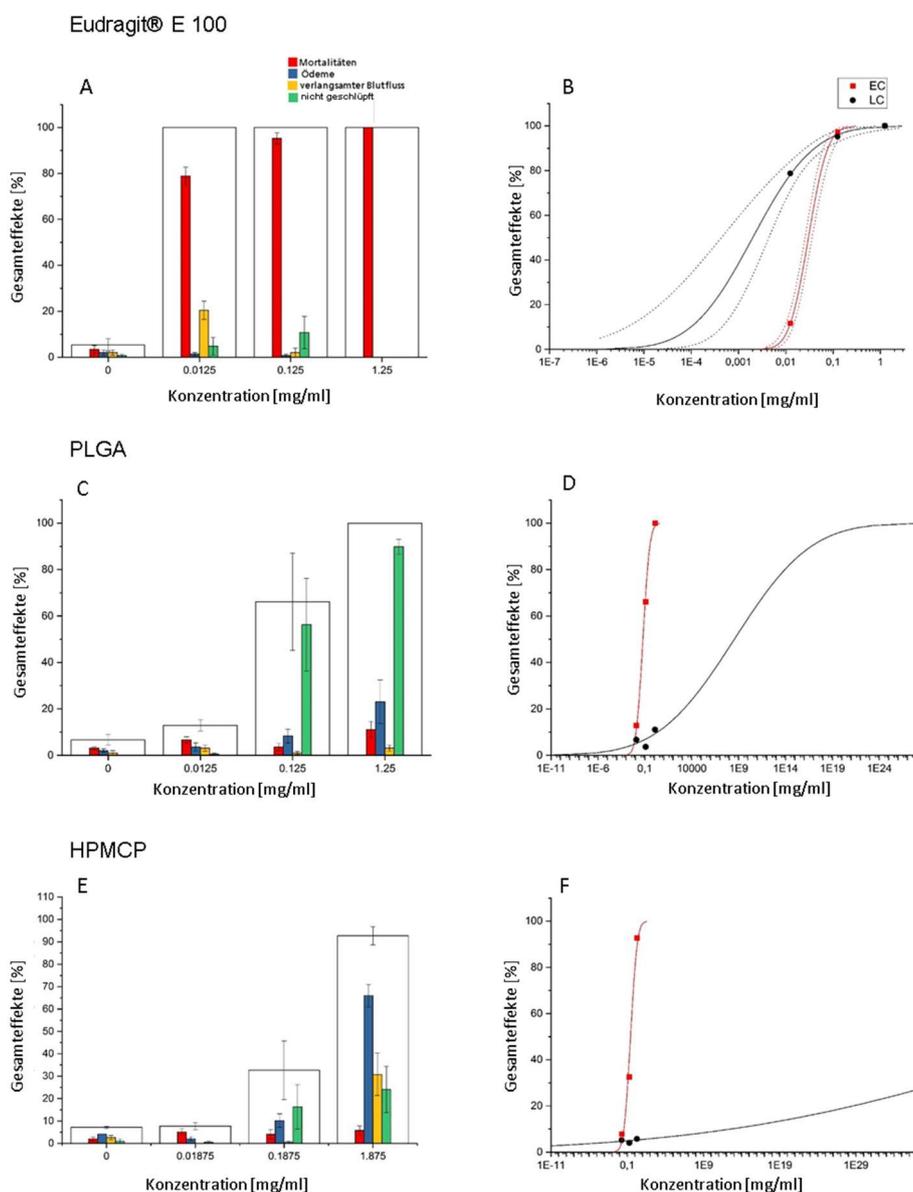


Abbildung 14: Sub-letale und letale Effekte der Nanomaterialien Eudragit® E100 (A, B), PLGA (C, D), und HPMC (E, F) nach 72 hpf Exposition. Große Balken zeigen die Gesamtzahl der Effekte, die kleinen Balken Mortalität (rot), Ödeme (blau) und verlangsamten Blutfluss (gelb). Kurvendiagramme zeigen die Gesamtzahl der Effekte in Abhängigkeit von der Konzentration (rot) und die Mortalität (schwarz).

Für Eudragit® E 100 konnte kein EC₅₀-Wert ermittelt werden. Der LC₅₀-Wert von Eudragit® E 100 beträgt 0,002 mg/ml. Ein LC₅₀-Wert konnte weder für PLGA noch für HPMC am Ende

des Tests berechnet werden. Der EC₅₀-Wert von PLGA beträgt 0,063 mg/ml und für HPMCP 0,269 mg/ml (Tabelle 7).

Tabelle 10: EC₅₀- und LC₅₀-Werte von Eudragit® E100, PLGA und HPMC in mg/ml von 24 hpf bis 96 hpf. In Klammern. Oberes und unteres Konfidenzintervall bei 95 %.

	EC 50 [mg/ml]			LC 50 [mg/ml]		
	24 hpf	48 hpf	72 hpf	24 hpf	48 hpf	72 hpf
Eudragit® E100	0,047 (0,039/0,056)	0,030 (0,026/0,036)	n.d. (n.d.)	0,049 (0,041/0,058)	0,038 (0,032/0,045)	0,002 (0,000/0,004)
PLGA	n.d. (n.d.)	n.d. (n.d.)	0,063 (n.d.)	n.d. (n.d.)	n.d. (n.d.)	n.d. (n.d.)
HPMCP	n.d. (n.d.)	2,629 (n.d.)	0,269 (n.d.)	n.d. (n.d.)	n.d. (n.d.)	n.d. (n.d.)

Aufgrund des im Vergleich zu den anderen getesteten Materialien niedrigen EC₅₀-Wertes besitzt Eudragit® E 100 das höchste umwelttoxische Potential. Die vergleichsweise geringste Umwelttoxizität weist mit dem höchsten EC₅₀-Wert das HPMCP auf.

a) Fenofibrat

Fenofibrat ist ein stark hydrophober Wirkstoff, weshalb ein Lösungsvermittler für die Inkubationen eingesetzt wurde. Eine Stammlösung in Dimethylformamid (DMF) wurde auf die entsprechenden Testkonzentrationen (1 mg/L – 30 mg/L) verdünnt.

Als Referenz wurden die gleichen Testkonzentrationen in ISO-Wasser ohne Zusatz von DMF hergestellt. Die vom Projektpartner MJR Pharmjet generierte Fenofibrat-HPMC Formulierung wurde im selben Konzentrationsbereich untersucht. Sie entspricht in der Zusammensetzung weitgehend der Ecocaps-Formulierung, jedoch nach Durchführung eines Trocknungsprozesses.

Um eine mögliche Toxizität des Granulats auszuschließen, wurden auch die einzelnen Bestandteile ohne Fenofibrat getestet (Hilfsstoffe). Die Masseanteile der Hilfsstoffe wurden basierend auf deren Anteil im Fenofibrat-HPMC-Granulat berechnet, sodass die Konzentration der einzeln getesteten Hilfsstoffe der Konzentration der Hilfsstoffe im Fenofibrat-HPMC-Granulat entsprach.

Für Embryonen, die den Hilfsstoffen ausgesetzt waren, konnten keine morphologischen Effekte oberhalb von 20% beobachtet werden. Dementsprechend konnten weder EC₅₀- noch LC₅₀-Werte ermittelt werden. Embryonen, die dem Fenofibrat-HPMC-Granulat ausgesetzt worden waren, wiesen zu über 50% Effekte wie Ödeme und verlangsamten Blutfluss (ab einer Konzentration von 3,89 mg/L) auf (Abbildung 15C). Bei der höchsten getesteten Konzentration von 30 mg/L zeigten 80% der Embryonen Mortalität. Nach 96 hpf konnte ein EC₅₀-Wert von 3,44 mg/L und ein LC₅₀-Wert von 14, 24 mg/L berechnet werden (Tabelle 11). Embryonen, die Fenofibrat (in DMF) ausgesetzt waren, zeigten bereits bei einer Konzentration von 1 mg/L 40% sub-letale Effekte. Bei 30 mg/L stieg die Mortalität auf 90% (Abbildung 15E). Der EC₅₀-Wert

nach 96 hpf betrug 1,24 mg/L und ist somit 2,77-fach geringer als der EC₅₀-Wert des Fenofibrat-Granulats. Der LC₅₀-Wert von Fenofibrat in DMF ist mit 7,26 mg/L um 51% geringer als der LC₅₀-Wert des Fenofibrat-Granulats (Tabelle 11).

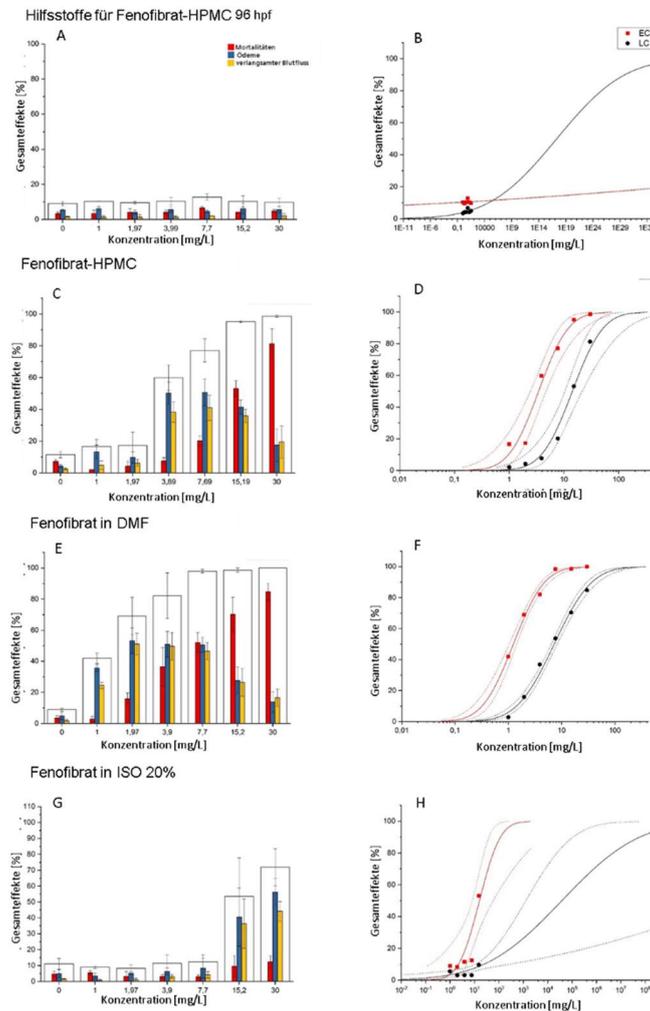


Abbildung 15: Sub-letale und letale Effekte (Säulendiagramme) der getesteten Hilfsstoffe des Fenofibrat-HPMC-Granulats (A, B), des Fenofibrat-HPMC-Granulats (C, D), Fenofibrat angesetzt in DMF (E, F) bzw. ISO 20% (G, H), nach 96 hpf Exposition. Kurvendiagramme der EC (rot)- und LC-Werte (schwarz) der getesteten Substanzen in Abhängigkeit der Konzentration [mg/L] nach 96 hpf Exposition.

Embryonen, die Fenofibrat angesetzt in ISO 20% ausgesetzt waren, zeigten ab 15,2 mg/L sub-letale Effekte von 50% (Abbildung 15G). Der EC₅₀-Wert beträgt 16,1 mg/L und ist der höchste EC-Wert der getesteten Fenofibrat-Ansätze (Tabelle 11). Ein LC₅₀-Wert konnte nicht bestimmt werden. Der niedrigste EC₅₀-Wert wurde für Fenofibrat in DMF ermittelt (Tabelle 11). Für die DMF-Kontrolle konnten keine Effekte über 20% festgestellt werden. Dies schließt Toxizität durch den Lösungsvermittler aus. Sowohl bei Inkubation mit der Formulierung Fenofibrat-

HPMC-Granulat als auch bei Verwendung von Fenofibrat (in DMF) traten morphologische Effekte auf. Es ist daher wahrscheinlich, dass sowohl die Nanoformulierung als auch DMF die Bioverfügbarkeit von Fenofibrat im Zebrafischembryo erhöhen.

Tabelle 11: EC₅₀- und LC₅₀-Werte von Embryonen, die Fenofibrat in DMF, Fenofibrat angesetzt in ISO 20%, dem Fenofibrat-HPMC-Granulat und den Hilfsstoffen bis 96 hpf und Fenofibrinsäure bis 72 hpf ausgesetzt waren. In Klammern: Oberes und unteres Konfidenzintervalle bei 95 %. Werte in mg/L.

	EC 50 [mg/L]				LC 50 [mg/L]			
	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf
Hilfsstoffe	n.d. (n.d.)	n.d. (n.d.)	n.d. (n.d.)	n.d. (nd.)	n.d. (n.d.)	n.d. (n.d.)	n.d. (n.d.)	n.d. (n.d.)
Fenofibrat- HPMC	n.d. (n.d.)	n.d. (n.d.)	10,24 (6,90/16, 95)	3,44 (2,44/4, 69)	n.d. (n.d.)	n.d. (n.d.)	n.d. (n.d.)	14,24 (10,41/2 1,56)
Fenofibrat in DMF	n.d. (n.d.)	11,03 (6,80- 22,59)	2,66 (1,92/3,5 0)	1,24 (1,04/1, 44)	n.d. (n.d.)	n.d. (n.d.)	29,58 (23,58/3 9,66)	7,26 (6,41/8,2 7)
Fenofibrat in ISO 20%	n.d. (n.d.)	n.d. (n.d.)	n.d. (n.d.)	16,10 (8,23/58 ,80)	n.d. (n.d.)	n.d. (n.d.)	n.d. (n.d.)	n.d. (n.d.)
Fenofibrinsäure	n.d. (n.d.)	n.d. (n.d.)	25,31 (n.d.)	/	n.d. (n.d.)	n.d. (n.d.)	53,32 (n.d.)	/

Auch die Fenofibrinsäure, der hauptsächliche Metabolit von Fenofibrat, wurde getestet. Für Fenofibrinsäure wurde eine Stammlösung in Dimethylsulfoxid (DMSO) hergestellt und mittels ISO 20% auf die nominalen Testkonzentrationen von 5 mg/L; 10 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L und 40 mg/L verdünnt. Bei der höchsten getesteten Konzentration von 40 mg/L wiesen die Zebrafischembryonen eine Mortalität von über 70% auf (Abbildung 16A). Der LC₅₀-Wert von Fenofibrinsäure ist mit 53,32 mg/L nach 72 hpf Exposition höher als der LC₅₀-Wert von Fenofibrat (in DMF) nach 72 hpf Exposition mit 29,58 mg/L (Tabelle 11). Der LC₅₀-Wert von Fenofibrat (in DMF) ist höher als der von Fenofibrinsäure. Er weist daher ein höheres ökotoxisches Potential auf. Da der berechnete LC₅₀-Wert von Fenofibrinsäure höher ist als die höchste Testkonzentration, ist dieser LC-Wert eine Schätzung. Allerdings weist dieser Wert darauf hin, ab wann Fenofibrinsäure für die Umwelt toxisch wirkt.

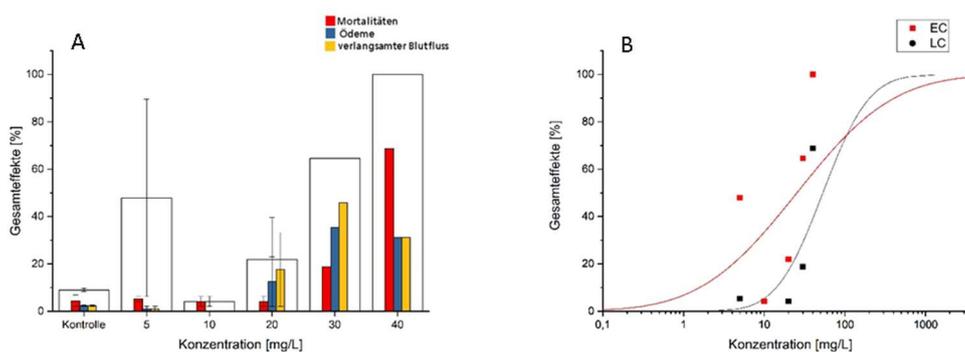


Abbildung 16: (A) Sub-letale und letale Effekte von Fenofibrinsäure nach 72 hpf Exposition. (B) Kurvendiagramme der Gesamteffekte (EC, rot) und Mortalität (LC, schwarz) in Abhängigkeit von der Konzentration [mg/L].

b) TMP-001

Das am Standort Frankfurt des Fraunhofer IME entwickelte TMP-001 und dessen Formulierungen wurden in Konzentrationen von 0,5 mg/L, 1,09 mg/L, 2,39 mg/L, 5,23 mg/L, 11,43 mg/L und 25 mg/L getestet. Die Nanosuspension wurde mit ISO-Wasser 20% zu den entsprechenden Testkonzentrationen verdünnt. Als Trägerpolymere kamen hierbei PCL und PLGA zum Einsatz. Die PCL-basierte Formulierung wurde auch in den Freisetzungsexperimenten eingesetzt (Jung, Nothnagel et al. 2018).

Für die Testung der Substanz TMP-001 wurde eine Stammlösung in 100% Ethanol hergestellt und die Testkonzentrationen in ISO 20% angesetzt. Es wurde nach 96 hpf ein geringer Anstieg der im Embryo hervorgerufenen morphologischen Effekte mit steigender Konzentrationen beobachtet. Allerdings liegt die Gesamtzahl der Effekte bei 25 mg/L unterhalb 50 %. Für TMP-001 konnten daher weder ein EC_{50} -Wert noch ein LC_{50} -Wert bestimmt werden.

Die PCL-Suspension ohne TMP-001 („Blank-Formulierung“) wurde über 96 h getestet. Die Anzahl der exponierten Embryonen, die Effekte aufwiesen, lag unterhalb 30% (Abbildung 17). Für die Referenz (PCL-Formulierung ohne Wirkstoffbeladung) konnten weder EC_{50} -Wert noch LC_{50} -Wert ermittelt werden. Die Embryonen, welche der PCL-TMP-001-Formulierung ausgesetzt waren, wiesen ab einer TMP-001-Konzentration von 5,23 mg/L (Abbildung 17E) sub-letale und letale Effekte über 20% auf. Bei der höchsten Testkonzentration von 25 mg/L lag die Mortalität bei 70 %. Für die TMP-001-PCL-Formulierung konnten ein EC_{50} -Wert von 9,44 mg/L und ein LC_{50} -Wert von 18,90 mg/L nach 96 hpf ermittelt werden. Dies zeigt, dass die Nanoformulierung mit TMP-001 umwelttoxischer ist als die Wirksubstanz. Die Effekte in Embryonen, die der Nanosuspension mit TMP-001 ausgesetzt waren, können durch eine bessere Bioverfügbarkeit des Arzneistoffes hervorgerufen worden sein.

Zusätzlich zu der PCL-Formulierung wurde eine PLGA-Formulierung der Substanz TMP-001 in Form einer Nanosuspension getestet. Die Testung dieser Nanosuspensionen erfolgte in Aachen mit dem dort lokalisierten Fischstamm.

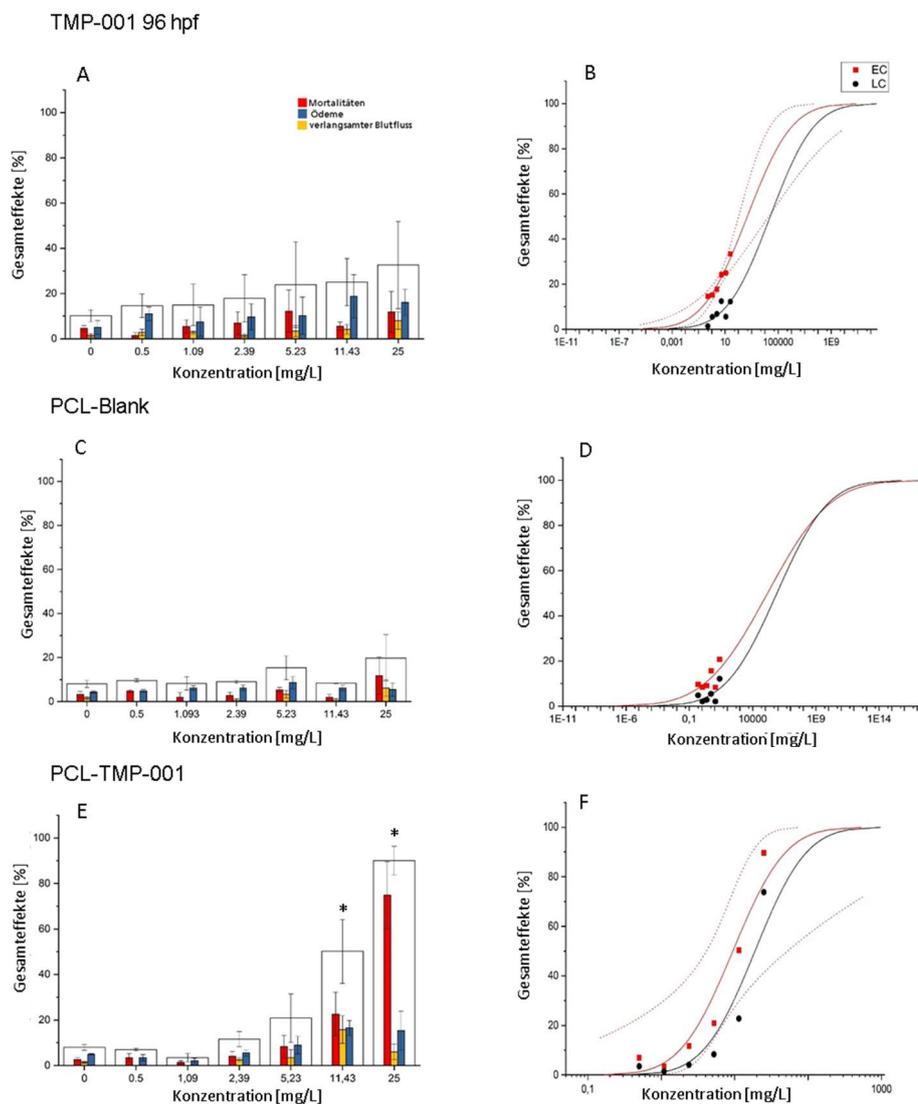


Abbildung 17: Gesamteffekte der Embryonen, die TMP-001 und der PCL-TMP-001-Formulierung sowie der dazugehörigen Blank-Formulierung ausgesetzt waren (A, C, E), sowie die EC- und LC-Kurven (B, D, F) nach 96 hpf Exposition der Zebrafischembryonen in Schmallenberg.

Im Vergleich zu den Nanosuspensionen wurde in Aachen die Substanz TMP-001 in Konzentrationen von 0,5 mg/L bis 25 mg/L getestet. Die Embryonen zeigten sub-letale und letale Effekte bis zu 100%. Bei der höchsten Konzentration von 25 mg/L trat Mortalität von 100% auf, wohingegen die Embryonen in Schmallenberg unter 40% Effekte nach 96 hpf aufwiesen (Abbildung 17A). Der EC₅₀-Wert von TMP-001 ermittelt in Aachen beträgt 2,3 mg/L nach 96 hpf. Für die Fische in Schmallenberg konnte nach 96 hpf kein EC-Wert bestimmt

werden. Eine solche Abhängigkeit der Messung vom Standort wirft generell die Frage nach einer besseren Standardisierung der Experimente auf.

Embryonen, die der PCL-Kontrolle ausgesetzt waren, zeigten keine Effekte über 20%. Bei der TMP-001-Nanosuspension traten bereits bei 3,75 mg/L über 80 % Effekte auf. In den beiden höheren Konzentrationen waren 100% der Embryonen betroffen. Bei 15 mg/L lag eine Mortalität von 98% vor. Für die PCL-Kontrolle konnten weder ein EC₅₀-Wert noch ein LC₅₀-Wert bestimmt werden.

c) Ciprofloxacin

Für Ciprofloxacin wurde das Salz Ciprofloxacin-Hydrochlorid (Ciprofloxacin-HCl) getestet, da dies eine bessere Löslichkeit aufweist als die freie Base. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Aufnahme der Testsubstanz durch den Zebrafischembryo im wässrigen Medium begünstigt wird.

Neben Ciprofloxacin wurden die Nanoformulierung Ciprofloxacin-PLGA mit 10% Mannitol-Gehalt getestet, um das ökotoxische Potential der beiden Substanzen zu vergleichen. Zusätzlich wurde eine wirkstofffreie Kontrolle untersucht, die kein Ciprofloxacin enthielt. Die Testkonzentrationen waren 3 mg/L; 4,15 mg/L, 5,74 mg/L, 7,95 mg/L und 11 mg/L. Ciprofloxacin-HCl wurde zusätzlich in höheren Konzentrationen von 50 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L und 200 mg/L getestet.

Abschlussbericht 2019

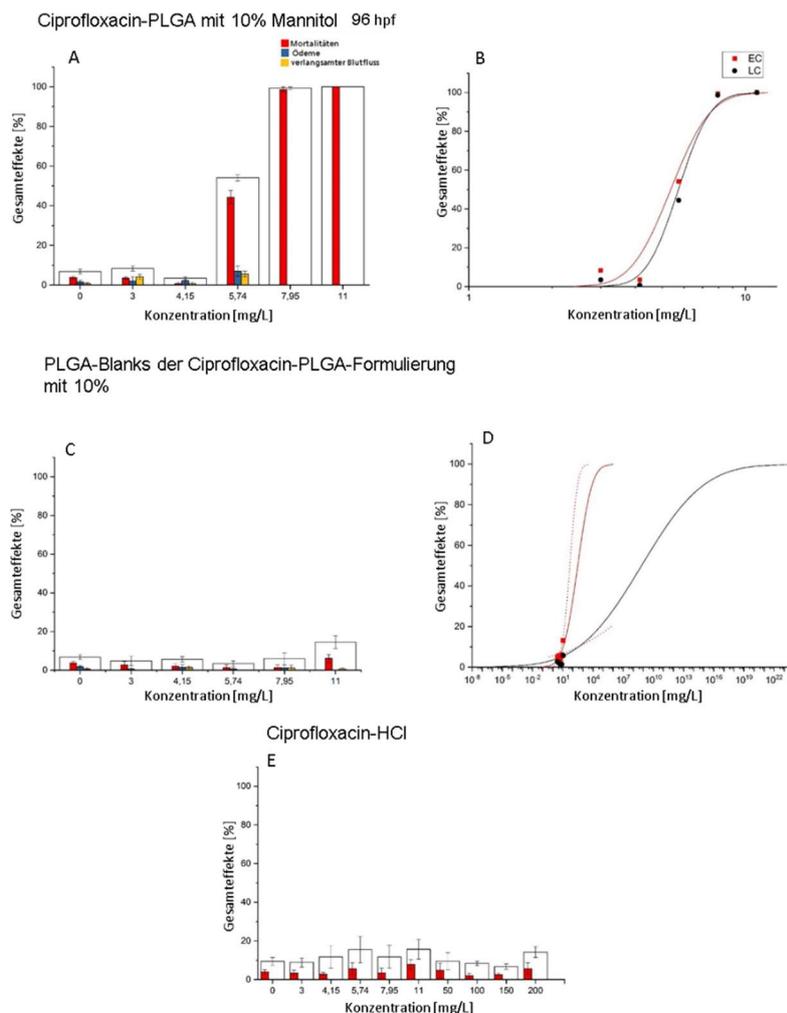


Abbildung 18: Gesamteffekte der Embryonen hervorgerufen durch die Nanoformulierung von Ciprofloxacin-PLGA mit 10% Mannitol, der entsprechenden Blank-Formulierung sowie durch die Substanz Ciprofloxacin-Hydrochlorid (Ciprofloxacin-HCl) (A, C, E) und die jeweiligen EC- und LC- Kurven nach 96 hpf Exposition (B, D).

Für die Kontrollformulierung wurden keine sub-letalen oder letalen Effekte oberhalb von 20% beobachtet, sodass keine EC- und LC-Werte bestimmt werden konnten (Abbildung 17C). Embryonen, die Ciprofloxacin-HCl ausgesetzt waren, wiesen keine Effekte oberhalb von 20% im Konzentrationsbereich von 3 mg/L bis 200 mg/L auf (Abbildung 17E). Für Ciprofloxacin-HCl war daher weder EC-Wert noch LC-Wert bestimmbar.

Ciprofloxacin-PLGA führte zu sub-letalen und letalen Effekten von 50% bei einer Konzentration von 5,74 mg/L. Bei einer Konzentration von 11 mg/L Ciprofloxacin lag eine Mortalitätsrate von 100% bei 96 hpf vor. Der EC_{50} -Wert der Nanoformulierung mit Ciprofloxacin betrug 5,37 mg/L und der LC_{50} -Wert 5,73 mg/L bei 96 hpf. Die erhöhte Toxizität der Nanoformulierung im Vergleich zu dem getesteten Pharmazeutika Ciprofloxacin-HCl wurden entweder durch eine

Verstopfung der Chorionporen durch die Nanopartikel und einen damit verbundenen Sauerstoffmangel hervorgerufen oder durch eine erhöhte Bioverfügbarkeit des Arzneistoffes.

d) *Diclofenac*

Der Arzneistoff Diclofenac wurde in den Konzentrationen von 0,2 mg/L; 0,44 mg/L, 0,96 mg/L, 2,1 mg/L, 4,6 mg/L und 10 mg/L getestet. Die Substanz wurde in ISO 20% angesetzt und die Exposition der Zebrafischembryonen umfasste 96 hpf. Bereits bei einer nominalen Konzentration von 0,44 mg/L waren 40% Effekte in den Embryonen zu beobachten. Bei der zweithöchsten Testkonzentration von 4,57 mg/L trat nach 96 hpf Mortalität von 100% auf. Nach 96 hpf, konnte ein EC₅₀-Wert von 0,43 mg/L bestimmt werden. Der LC₅₀-Wert betrug 1,1 mg/L. Ein NOEC von $\leq 0,2$ mg/L nach 96 hpf konnte bestimmt werden.

e) *Carbamazepin*

Carbamazepin wurde in Konzentrationen von 50 mg/L, 66,87 mg/L, 89,44 mg/L, 119,62 mg/L und 160 mg/L. Bei 89,44 mg/L wiesen die Embryonen Effekte von 70% auf, welche bei der höchsten Testkonzentration auf 100% anstiegen. Die Effekte waren größtenteils sub-letal wie Ödeme oder verlangsamter Blutfluss. Ein EC₅₀-Wert von 77,6 mg/L konnte nach 96 hpf bestimmt werden. Ein LC₅₀-Wert konnte nach einer Exposition von 96 hpf nicht ermittelt werden. Ein NOEC von ≤ 50 mg/L wurde nach 96 hpf bestimmt.

5.3.3 *Wirkungsorientierte Analysen*

a) *Acridin-Orange Apoptose-Färbung*

Um auf zellulärer Ebene potentielle toxische Effekte zu untersuchen, wurde die Acridin Orange Färbung durchgeführt. Durch diese kann die Anzahl an apoptotischen Zellen bestimmt und mit Kontrolltieren verglichen werden. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass während der Entwicklung generell apoptotische Zellen aufgrund des Umbaus des Gewebes auftreten und so auch Kontrolltiere Apoptose zeigen. Daher wird die Abweichung in der Gesamtzahl apoptotischer Zellen der behandelten Tiere auf Kontrolltiere normiert. Für Ciprofloxacin-HCL wurden Konzentrationen von 3 mg/L bis 11 mg/L, für Diclofenac 0,1 mg/L bis 0,4 mg/L und für Fenofibrat Konzentrationen von 1 mg/L, 1,97 mg/L und 3,9 mg/L getestet. Zusätzlich wurde Ciprofloxacin-PLGA und das Fenofibrat-HPMC-Granulat (Trocknungsprodukt der Ecocaps) in den jeweiligen Testkonzentrationen mit den entsprechenden Blank-Formulierungen untersucht.

Für die Embryonen, die Ciprofloxacin-HCl ausgesetzt waren, konnte kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der apoptotischen Zellen ermittelt werden (Abbildung 19A). Eine Behandlung mit der Kontroll-Formulierung zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen der

Abschlussbericht 2019

ISO 20%- Kontrolle und der höchsten Konzentration der Kontroll-Formulierung ($p=0,03$). Eine signifikante Abnahme in der Anzahl apoptotischer Partikel zeigte sich in der Konzentration von 5,74 mg/L Ciprofloxacin-PLGA im Vergleich zur entsprechenden Konzentration der Blank-Formulierung ($p=0,035$). Weder für Fenofibrat angesetzt in ISO 20% noch für Fenofibrat angesetzt in DMF zeigten sich eine signifikante Änderung der Anzahl apoptotischer Zellen. Ein signifikanter Unterschied ($p=0,015$) wurde zwischen den Konzentrationen 1,97 mg/L Fenofibrat-HPMC und der geringsten Blank-Konzentration festgestellt (Abbildung 19E).

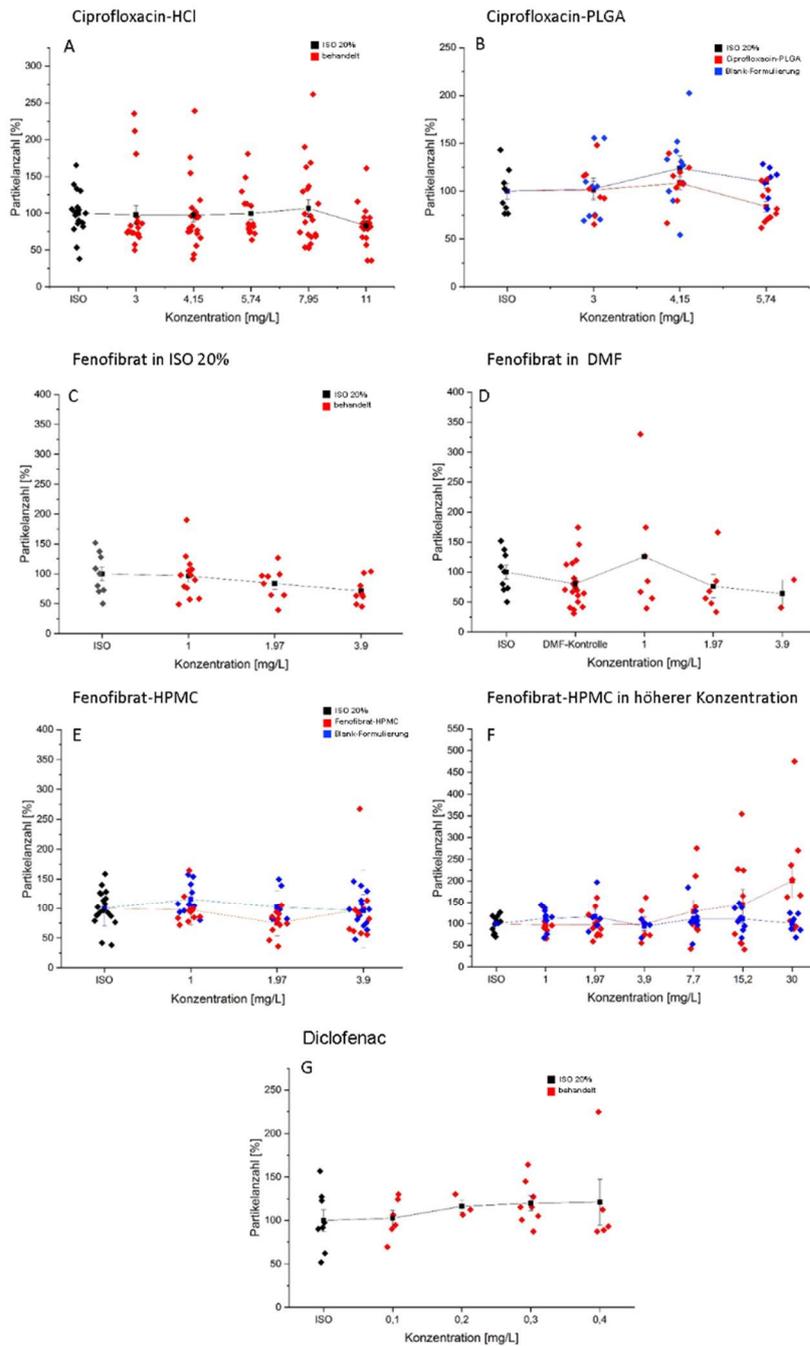


Abbildung 19: Apoptose-Färbung nach 48 hpf von Zebrafischembryonen, die Ciprofloxacin-HCl (A, n=5), der Nanoformulierung Ciprofloxacin-PLGA (B, n=3) sowie Fenofibrat in ISO 20% (C, n=3), Fenofibrat in DMF (D, n=3), dem Fenofibrat-HPMC-Granulat (E, n=3), Fenofibrat-HPMC-Granulat getestet in höheren Konzentrationen (F, n=3 für Fenofibrat-HPMC, n=2 für die Blank-Formulierung) sowie Diclofenac (G, n=1) ausgesetzt waren. Die roten Punkte stellen die Einzelwerte der behandelten Tiere, die schwarzen Punkte die Einzelwerte der ISO 20%-Kontrolle dar. Die Linien geben die Mittelwerte für die jeweilige Behandlung an. Blaue Punkte und Linien zeigen die Werte der jeweiligen Blank-Formulierung an. „n“ entspricht biologischem Replikat.

In geringeren Konzentrationen der Fenofibrat-HPMC-Formulierung und in der Blank-Formulierung konnte keine Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle bestimmt werden. In den höheren Konzentrationen der Fenofibrat-HPMC-Formulierung und der Blank-Formulierung konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Allerdings ist eine Tendenz zum Anstieg der apoptotischen Partikel in höheren Konzentrationen von Fenofibrat-HPMC zu erkennen (Abbildung 19F).

b) DASPEI-Färbung

Die DASPEI-Färbung wurde für Ciprofloxacin-HCl und Ciprofloxacin-PLGA durchgeführt. Mit Hilfe dieser Färbung können die Neuromasten des Seitenliniensystems sichtbar gemacht werden. Im Gegensatz zu der transgenen Linie Tg(*clnb:lynGFP*), welche green fluorescence protein (GFP) in den Stützzellen der Neuromasten exprimiert, werden bei der DASPEI-Färbung direkt die Haarzellen der Neuromasten angefärbt.

Die Testkonzentrationen für Ciprofloxacin-HCl betragen 3 mg/L bis 11 mg/L. Für Ciprofloxacin-PLGA mit 10% Mannitol wurden die Konzentrationen 3 mg/L, 4,15 mg/L und 5,74 mg/L zusammen mit den entsprechenden Konzentrationen der Blank-Formulierung untersucht. Weiterhin wurden die Effekte von Fenofibrat in den Konzentrationen 1,09 mg/L und 2 mg/L sowie der Acetonkontrolle analysiert. Für Embryonen, die Ciprofloxacin-HCl ausgesetzt waren, konnte keine signifikante Änderung in der Distanz des distalen Neuromasten festgestellt werden. Bei der Exposition mit Ciprofloxacin-PLGA-Formulierung wurde eine signifikante Änderung bei einer Ciprofloxacin-Konzentration von 5,74 mg/L ermittelt ($p=0,044$). Bei Fenofibrat wurde eine signifikante Änderung zwischen ISO 20% und einer Fenofibratkonzentration von 1,09 mg/L festgestellt ($p=0,018$). Da die Differenz zwischen Körperlänge und zurückgelegte Distanz des distalen Neuromasten zwischen Kontrolltieren und behandelten Tieren signifikant unterschiedlich ist, sind die distalen Neuromasten folglich weniger weit gewandert.

c) Screening auf Toxizitätsmechanismen mit transgenen Fischlinien und Genexpression

Transgene Reporterlinien wie Tg(*fli1:EGFP*)_{y1} und Tg(*clnb:lynGFP*) wurden genutzt, um auf vaskulärer und neuronaler Ebene mögliche Toxizität durch die Testsubstanzen und Nanoformulierungen zu untersuchen. Durch die Reporterlinie Tg(*fli1:EGFP*)_{y1} wird das Blutgefäßsystem durch die Expression des grünfluoreszierenden Proteins GFP visualisiert. Die transgene Linie Tg(*clnb:lynGFP*) ermöglicht es, die Neuromasten des lateralen Seitenlinienorgans sichtbar zu machen. Durch Fluoreszenzmikroskopie mit einer Anregungswellenlänge von 480 nm können mögliche vaskuläre und neuronale Effekte, die durch die Verabreichung der Arzneistoffe und der Nanoformulierung hervorgerufen wurden, beobachtet und analysiert werden.

Embryonen der transgenen Linie Tg(*fli:1EGFP*)_{y1} waren den Substanzen Ciprofloxacin-HCl, Carbamazepin, TMP-001 und Diclofenac ausgesetzt. Die Konzentrationen für Ciprofloxacin-HCl betragen 11 mg/L und 56 mg/L. Carbamazepin wurde in den Konzentrationen 56 mg/L und 89,44 mg/L untersucht. Für die Testung von TMP-001 und Diclofenac wurden die Embryonen den entsprechenden Konzentrationen von 2,3 mg/L und 5,23 mg/L bzw. 0,4 mg/L und 1 mg/L ausgesetzt. Als Kontrolle dienten die entsprechenden Lösemittel der Substanzen. Für Ciprofloxacin-HCl konnte kein Unterschied in der Länge der ISVs oberhalb des Dottersackes zwischen der Kontrolle und den Behandlungen festgestellt werden. Für Diclofenac konnte für die höchste getestete Konzentration (1 mg/L) eine signifikante Reduktion der Länge der Venen festgestellt werden ($p=0,045$). Embryonen, die TMP-001 als auch Carbamazepin ausgesetzt waren, zeigten keine signifikanten Veränderungen des Blutgefäßsystems.

Die transgene Reporterlinie Tg(*clnb:lynGFP*) wurde genutzt, um eventuelle Effekte der Testsubstanzen auf die Neuromasten des Seitenlinienorgans zu analysieren. TMP-001 und Ciprofloxacin-HCl wurde in den gleichen Konzentrationen getestet wie oben beschrieben. Diclofenac wurde in einer Konzentration von 0,4 mg/L und Carbamazepin in den Konzentrationen 77,6 mg/L und 89,44 mg/L. Für Carbamazepin, Ciprofloxacin-HCl und Diclofenac konnte kein signifikanter Unterschied in der Distanz des distalen Neuromasten zwischen Kontrolle und Behandlung festgestellt werden. Für TMP-001 wurde ein signifikanter Anstieg der Differenz zwischen Körperlänge und Entfernung des distalen Neuromasten zwischen den Embryonen der ISO 20%-Kontrolle und den Embryonen, die 5,23 mg/L TMP-001 ausgesetzt waren, festgestellt ($p=0,0002$). Die distalen Neuromasten der behandelten Embryonen waren im Vergleich weniger weit gewandert.

Für Ciprofloxacin-HCl wurde zusätzlich die transgene Reporterlinie Tg(*gfap:GFP*) untersucht. Es wurden die Konzentrationen 5 mg/L; 9,09 mg/L, 16,5 mg/L und 30 mg/L getestet. Nach 72 hpf Exposition wurden die Embryonen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Das Fluoreszenzsignal sowie die Autofluoreszenz wurden erfasst und die relative Fluoreszenz bestimmt. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen behandelten und nicht behandelten Embryonen in der Fluoreszenz der Gliazellen festgestellt.

5.3.4 **Bestimmung der Toxizität auf genetischer Ebene: qPCR**

Da in Schmallenberg keine transgenen Reporterlinie zur Verfügung standen, wurde für weitere Untersuchungen qPCR durchgeführt, um die potentielle Änderung des Expressionsmusters von ausgewählten Reporter genen zu analysieren. Embryonen wurden dem Arzneistoff Fenofibrat angesetzt in DMF und ISO 20% sowie dessen Nanoformulierung Fenofibrat-HPMC-Granulat in den Konzentrationen von 1 mg/L, 1,97 mg/L und 3,9 mg/L ausgesetzt. Die Konzentrationen der getesteten Hilfsstoffen entsprechen den jeweiligen Konzentrationen der

Hilfsstoffe der getesteten HPMC-Formulierung. Die Exposition erfolgte bis 96 hpf. Daraufhin wurden die RNA isoliert und qPCR durchgeführt. Die analysierten Gene umfassen die Myelinisierung des zentralen Nervensystems (*hmgcr*, *mbp*), das Immunsystem (*il-8*) sowie das endokrine System (*vit-1* und *vit-3*).

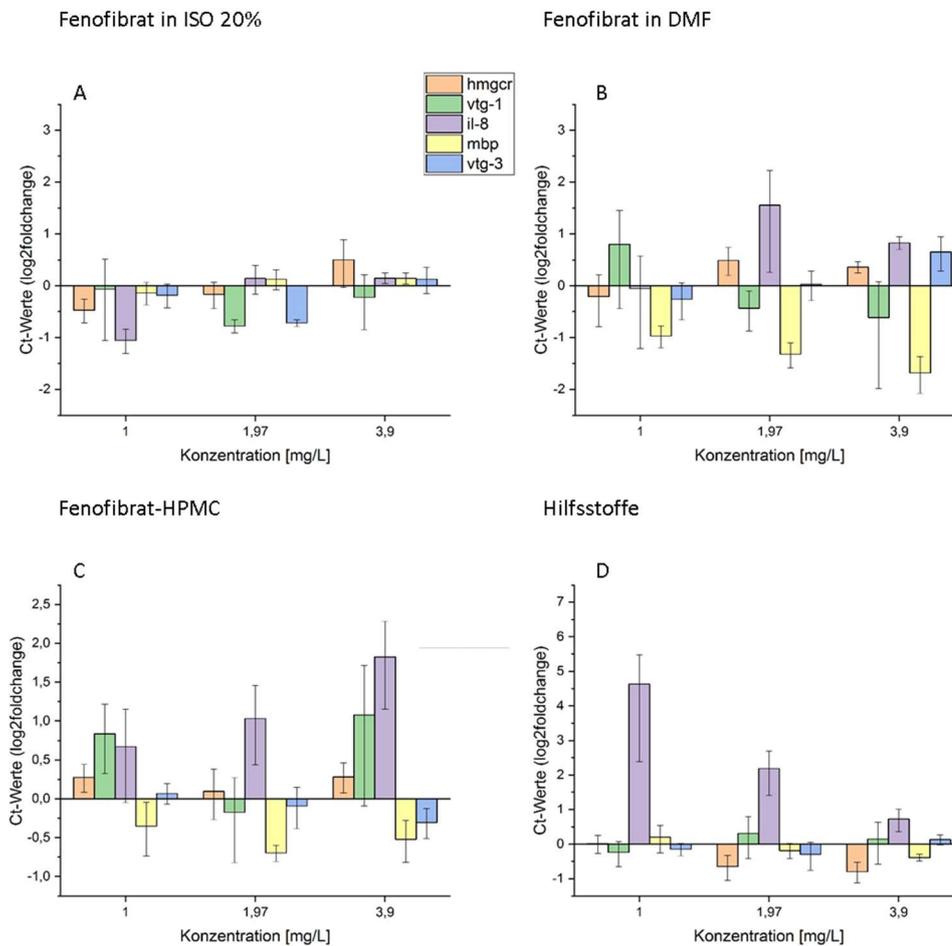


Abbildung 20: qPCR-Ergebnisse nach 96 hpf Exposition der Zebrafischembryonen in Fenofibrat angesetzt in ISO 20% (A), Fenofibrat angesetzt in DMF (B), dem Fenofibrat-HPMC-Granulat (C) und den Hilfsstoffen des Fenofibrat-HPMC-Granulats (D). Getestet wurden die Gene *mbp*, *hmgcr*, *il-8*, *vit-1* und *vit-3*.

Embryonen, die einer Konzentration von 3,9 mg/L Fenofibrat angesetzt in DMF ausgesetzt waren, zeigten eine signifikante Reduktion in der Expression des myelin basic protein (*mbp*) ($p=0,011$ für 3,9 mg/L) (Abbildung 20B). Für Fenofibrat angesetzt in ISO 20% wurde eine signifikante Verringerung der Expression des immunrelevanten Gens *il-8* bei einer Konzentration von 1 mg/L festgestellt verglichen zur ISO 20% Kontrolle ($p=0,02$) (Abbildung 20). Bei höheren Konzentrationen stieg der Ct-Wert und zeigt keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle. Die Hilfsstoffe der Fenofibrat-HPMC-Formulierung riefen bei 1mg/L einen, wenn auch nicht signifikanten, Anstieg der *il-8* Expression hervor. (Abbildung 20D). Für Embryonen,

die der Nanoformulierung Fenofibrat-HPMC ausgesetzt waren, wurde eine Tendenz zur Verringerung der Expression von *mbp* (Abbildung 20C). Weiterhin besteht eine Tendenz zum Anstieg der Expression von *il-8*. Hauptsächlich ist die Expression von Genen betroffen, die für die Myelinisierung des Nervensystems verantwortlich sind.

5.3.5 Untersuchungen zur Aufnahme und Verteilung von Nanocapsules

Die Aufnahme markierter Nanopartikel wurde nach Einbettung von Lumogen® F Red bzw. nach Inkubation mit Nanopartikeln aus Fluoresceinisothiocyanat-gekoppelten Polymer untersucht.

Die Verteilung wurde 24 hpf in Wildtyp-Zebrafischembryonen untersucht. Es wurden 7,5 mg/L der PLGA-Nanokapseln (markiert mit Lumogen® F Red) eingesetzt und die Verteilung nach 48 h und 72 h kontrolliert. Mit und ohne Chorion war keine Fluoreszenz innerhalb des Embryos zu erkennen. Die Partikel agglomerierten insbesondere am Chorion. Bei Embryonen ohne Chorion akkumulierte Lumogen® Red am Dotter oder Kopf.

Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-gekoppeltes PLGA wurde in Konzentrationen von 14,62 mg/L und 25 mg/L über 120h getestet. Sie wurden 96 hpf und 120 hpf wurde im Darmtrakt der Embryonen detektiert.

6. Umweltbewertung

Im Rahmen des Projektes wurden eine Reihe neuer Arzneiformen entwickelt und sowohl auf ihre Freisetzung unter biorelevanten Bedingungen, als auch auf ihre Toxizität hin getestet. Ein wichtiger Kernaspekt für den Einsatz der Nanotechnologie in pharmazeutischen Produkten, besteht heute in der Verbesserung der Bioverfügbarkeit. So kann die wirksame Dosis nachhaltig reduziert werden. Gleichzeitig führt jedoch die erhöhte Bioverfügbarkeit und ggf. auch der Einsatz bestimmter Hilfsstoffe in der Formulierung zu einer erhöhten Toxizität. Daher flossen beide Parameter in die Umweltbilanz ein. Traditionelle Methoden zur Herstellung von Nanopartikeln sind im Allgemeinen zeitaufwändig. MJR Pharmjet GmbH setzt hierfür ein spezielles Mikrojetreaktor-Verfahren ein, welches effiziente und kosteneffektive Herstellung im großen Maßstab ermöglicht. Das MJR-Herstellungsverfahren erfordert neben den zur Herstellung notwendigen Ausgangsstoffen wie Lösemittel, Stickstoffgas, Wirkstoffen, Stabilisatoren und Verkapselungsmaterialien keinen zusätzlichen Energieinput. Aufgrund des relativ geringen Energieverbrauchs der Pumpensysteme kann dieser am Standort Überherrn über Solarenergie gedeckt werden. Für die Umweltbewertung des Projektes fand eine Zusammenarbeit mit dem SERUM-Projekt (DBU AZ 33011/01) statt. Mithilfe der Ökobilanzsoftware GaBi wurde berechnet, dass die Wirkstoffeinsparung, insbesondere auch aufgrund des hohen Energie- und Chemikalienaufwandes der Wirkstoffsynthese, die zusätzlichen Materialströme im Bereich der Hilfsstoffe und der Formulierungstechnik überwiegt. Hierbei wurde das marktgängige Produkt als Vergleich gewählt. Die Einsparungen lagen im Bereich des *Global Warming Potential* (kg CO₂-Eq) bei 18%, im Bereich der Ökotoxizität bei 61% (CTUe) und im Bereich der Humantoxizität bei 15% (CTUh).

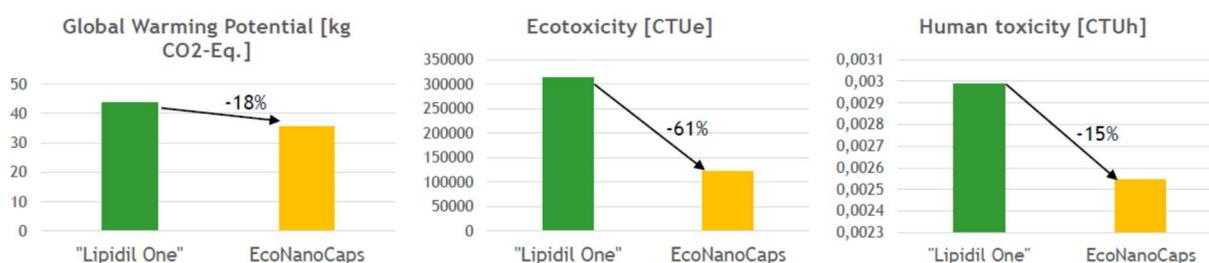


Abbildung 21: Gegenüberstellung des Global Warming Potential, der Ecotoxizität und der Humantoxizität der im Projekt entwickelten EcoNanoCaps in Gegenüberstellung mit dem derzeitigen mikronisierten Marktprodukt (Lipidil One). Die Daten wurden im Rahmen des SERUM-Projektes durch die TU Berlin erhoben.

Eine detailliertere Auswertung liegt uns bislang leider nicht vor, sie wird jedoch an der TU Berlin in einer Fallstudie zusammengefasst und zeitnah veröffentlicht. Die Ecotoxizität beider Produkte ist zum Teil auf die verwendeten Stabilisatoren zurückzuführen, welche im Rahmen

Abschlussbericht 2019

des Formulierungsprozesses ausgewählt werden. Zukünftige Produkte von MJR Pharmjet werden das Wissen um bestehende Toxizitäten in den Formulierungsprozess einfließen lassen. Dies bedeutet zwar keine sofortige Reduktion auf Basis bestehender Produkte, da diese durch den Zulassungsprozess auf eine bestimmte Hilfsstoffzusammensetzung festgelegt sind, neue Produkte können jedoch in ihrer Zusammensetzung beeinflusst und somit umweltverträglicher gestaltet werden. Das Fallbeispiel der EcoCaps soll darüber hinaus pharmazeutischen Herstellern zur Übernahme angeboten und der Zusatznutzen einer optimierten Ökobilanz entsprechend verwertet werden.

7. Öffentlichkeitsarbeit/Veröffentlichungen/Vorträge

7.1 Poster

- Hering I, Weiler M, Jung F, Günday-Türelı N, Schäfers C, Fenske M, Parnham MJ, Wacker MG, Eilbrecht E (2019); *Evaluation of toxic effects on the aquatic environment caused by surfactants used in nanomedicine*, Helsinki, Finland.
- Jung F, Thurn M, Krollik K, Gao FG, Hering I, Eilbrecht E, Weiler M, Günday-Türelı N, Türelı E, Parnham MJ, Wacker MG (2019); *Simulation of the environmental exposure to fenofibrate nanomaterials based on in vitro- and in silico methods*, PAGE Conference, Stockholm (Sweden)
- Jung F, Nothnagel L, Gao F, Wacker MG (2018); *Evaluation of release techniques for nanocarriers on the basis of IVIVC-PBPK modeling*, Population Approach Group Europe Conference, Montreux (Switzerland)
- Hering I, Jung F, Reiner L, Weiler M, Günday-Türelı N, Wacker M, Parnham M, Fenske M (2017); *Environmental toxicity of pharmaceuticals in polymeric nano-formulations*. 2nd German Pharm-Tox Summit - Annual Meeting of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology (DGPT) & Annual Meeting of Association of Clinical Pharmacology (VKliPha), Heidelberg, Germany.

7.2 Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

- Nothnagel L and Jung F, Rossmannith T, Thurn M, Ashtikar M, Geisslinger G, Parnham MJ, Wacker MG; Predictive PBPK modeling as a tool in the formulation of the drug candidate TMP-001, Eur. J. Pharm. Biopharm. (10.1016/j.ejpb.2018.11.012)
- Jung F and Nothnagel L, Gao F, Thurn M, Vogel V, Wacker MG; A comparison of two biorelevant in vitro drug release methods for nanotherapeutics based on advanced physiologically-based pharmacokinetic modelling, Eur. J. Pharm. Biopharm. 127: 462-470 (10.1016/j.ejpb.2018.03.010)
- Jablonka L, Ashtikar M, Gao G, Jung F, Thurn M, Preuß A, Scheglmann D, Albrecht V, Röder B, Wacker MG; *Advanced in silico modeling explains pharmacokinetics and biodistribution of temoporfin nanocrystals in humans*, J. Control. Rel. (10.1016/j.jconrel.2019.06.029)
- Jung F, Thurn M, Krollik K, Gao GF, Hering I, Eilbrecht E, Weiler M, Günday-Türelı N, Türelı E, Parnham MJ, Wacker MG (2019); *Simulation of the environmental exposure to fenofibrate nanomaterials based on in vitro- and in silico methods*. (Submitted manuscript)

Abschlussbericht 2019

- Hering I, Eilebrecht E, Parnham MJ, Günday-Türelı N, Schäfers C, Fenske M, Wacker MG (2019); *Fenofibrate and its nanoformulation cause severe effects in the zebrafish embryo *Danio rerio** (Submitted manuscript)

8. Fazit/Ausblick

Das Projekt ist aus unserer Sicht in seiner Durchführung wie auch im Ergebnis als großer Erfolg zu bewerten. Die Zusammenarbeit führte zu einem intensiven Austausch aller beteiligten Disziplinen, was sich im Arbeitsergebnis niederschlug.

Initial wurden Nanopartikel-Formulierungen durch den Partner MJR Pharmjet GmbH entwickelt und bereitgestellt, wobei für alle Modellwirkstoffe die wesentlichen Spezifikationen eingehalten werden konnten und in die Testung überführt wurden. Auch die Entwicklung einer geeigneten Freisetzungsanalytik war erfolgreich, wobei für einige der genannten Formulierungen erhebliche Dosisersparungen gezeigt wurden. Für die Modellierung waren nicht alle Wirkstoffe gleich gut geeignet, es konnte jedoch für zwei Wirkstoffklassen eine gute Übereinstimmung des Modells mit der Humanpharmakokinetik gezeigt werden. Für die schwache Base Ciprofloxacin kam es zu einer Überschätzung der Absorption, welche auch gewissen Einfluss auf die Genauigkeit der Umweltbilanz haben wird. Für die schwache Säure TMP-001 (Jung, Nothnagel et al. 2018, Nothnagel, Jung et al. 2019) sowie für den nicht-ionisierbaren Wirkstoff Fenofibrat (Jung, Thurn et al. 2019 (Submitted manuscript)) führte die Simulation zu einer guten Übereinstimmung mit den existierenden klinischen Daten. Während die schwache Säure vollständige Absorption vorhergesagt wurde, konnte für Fenofibrat Umweltemissionen in unveränderter Form nachgewiesen und quantifiziert werden (Jung, Thurn et al. 2019 (Submitted manuscript)). In den Toxizitätsstudien (durchgeführt mithilfe des FET) wurden weiterhin Unterschiede zwischen dem freien Wirkstoff Fenofibrat und seinem Metaboliten Fenofibrinsäure festgestellt. Fenofibrat ist vermutlich aufgrund seiner besseren Permeabilität deutlich toxischer als der Metabolit. Die höhere Absorption führte daher nicht nur, wie geplant, zu einer Dosisreduktion, es konnte gezeigt werden, dass auch der darauffolgende Metabolismus zu einer Reduktion der Umwelttoxizität führt. Ähnliche Effekte konnten für andere Wirkstoffe leider nicht beobachtet werden.

Die nanopartikuläre Fraktion führte erwartungsgemäß auch in aquatischen Organismen zu einer erhöhten Toxizität, es ist jedoch anzumerken, dass diese insgesamt sehr gering ausfiel. Der größte Teil der nanopartikulären Fraktion übersteht die Passage durch den humanen Gastrointestinaltrakt nicht und wird in Form großer Aggregate und Agglomerate ausgeschieden. Diese können auch in den anschließenden Filtrationsprozessen der Wasseraufbereitung hinreichend gesammelt werden. **Eine wichtige Kernaussage des Projektes ist sicher, dass der Einsatz von Nanomaterialien nicht per se zu einer schlechteren Umweltbilanz führt. Der direkte Vergleich der Toxizität muss vor dem Hintergrund der geplanten Einsatzmengen bewertet werden und diese sind, zumindest**

im Bereich der Nanomedizin, an die Bioverfügbarkeit im Menschen gekoppelt. Die Toxizität des Nanomaterials bzw. die Verarbeitungstechnik haben dabei oftmals geringeren Einfluss auf die Ökobilanz als die exakte Hilfsstoffzusammensetzung, welche zu einem großen Teil aus oberflächenaktiven Stabilisatoren besteht.

Für das Unternehmen MJR Pharmjet GmbH ergibt sich hier eine unmittelbare Einsatzmöglichkeit der gewonnenen Erkenntnisse. Bestimmte Stabilisatoren sind im Falle technischer Machbarkeit aufgrund ihrer Auswirkung auf die Umweltbilanz zu bevorzugen. Während des EcoNanoCaps-Projekts hatte das Unternehmen Zugang zu Risikocharakterisierungs-, Toxikologie- und Expositionsdaten, die kombiniert wurden, um einen qualitativen oder quantitativen Ausdruck des Umweltrisikos und der Nachhaltigkeit ihrer Formulierungstechnologie zu erhalten.

MJR wird dieses Know-How gewonnen auch für die Schulung und den Schutz der vor Ort tätigen Mitarbeiter einsetzen. Ist der Einsatz eines bestimmten Materials für die Entwicklung von Nanopartikeln unerlässlich, so ist eine wirksame Strategie für das Recycling der Formulierung notwendig. So kann z.B. ein optimierter Versuchsplan die absoluten Verbrauchsmengen reduzieren. Um dieses Wissen jedoch auch in anderen Teilbereichen anzuwenden ist eine Kopplung der existierenden Software-Lösungen im Bereich der Ökobilanzentwicklung und der Arzneiformenentwicklung wünschenswert. Es werden mit Certara PhoenixTM oder GastroplusTM bereits kommerzielle Programme für die Kalkulation der Bioverfügbarkeit unbekannter Arzneistoffe angeboten. Gleichzeitig ähnliche Softwaredatenbanken auch für die Umweltbilanzierung. Eine Zusammenführung in einer Software, welche neben der Erhöhung der Bioverfügbarkeit auch eine direkte Rückmeldung über die Umweltbilanz ermöglicht, ist eine wichtige Marktlücke, die im Anschluss an das Projekt entwickelt und validiert werden sollte. MJR PharmJet sieht hier die Lebenszyklusanalyse als ein nützliches Instrument zur Bewertung der tatsächlichen Umweltauswirkungen. Generell verbrauchen MJR-Herstellungsanlage im Vergleich zu anderen kommerziellen Geräten weniger Energie. Materialabfälle werden reduziert und eine Überwachung des Produktionsprozesses gewährleistet wodurch sich auch die Toxizität verringert. Als Folge der Kooperation nimmt MJR auch langfristige Forschungs Herausforderungen an, darunter Umweltverträglichkeitsprüfungen, Recyclingfähigkeit, Wiederverwendung und Fertigung nachhaltiger Nanomaterialien.

9. Abkürzungen

ACN	Acetonitril
AUC	Area under the curve“
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECx	Effektkonzentration
FaSSGF	<i>fasted state simulated gastric fluid</i>
FaSSIF	<i>fasted state simulated intestinal fluid</i>
FET	Zebrafischembryo-Toxizitätstest
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GFP	Green fluorescence protein
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPMCP	Hypromellose-Phthalate
HPMC	Hydroxypropyl-Methylcellulose
ICH	International Conference of Harmonization
IVIVS	<i>in-vitro-in-vivo</i> -Skalierung
LCx	Lethale Konzentration
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification
NTA	<i>Nanoparticle tracking analysis</i>
PBPK	Physiologie-basiertes Pharmakokinetik-Modell
PCL	Polycaprolacton
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDI	Polydispersitätsindex
PLGA	Polylaktid-ko-Glycolid
PEG-PLGA	Polyethylenglykol-Polylaktid-ko-Glykolid
RPT	<i>Reciprocal powered time model</i>
THF	Tetrahydrofuran

10. Literatur

- Abrams, J. M., K. White, L. I. Fessler and H. Steller (1993). "Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis." Development **117**(1): 29-43.
- Arya, M., I. S. Shergill, M. Williamson, L. Gommersall, N. Arya and H. R. Patel (2005). "Basic principles of real-time quantitative PCR." Expert Rev Mol Diagn **5**(2): 209-219.
- Avdeef, A. (2012). Permeability—PAMPA. Absorption and Drug Development: Solubility, Permeability, and Charge State. Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons, Inc.: 319–484.

- Cumming, J. G., A. M. Davis, S. Muresan, M. Haeberlein and H. Chen (2013). "Chemical predictive modelling to improve compound quality." Nat Rev Drug Discov **12**(12): 948-962.
- Fei, Y., E. S. Kostewicz, M. T. Sheu and J. B. Dressman (2013). "Analysis of the enhanced oral bioavailability of fenofibrate lipid formulations in fasted humans using an in vitro-in silico-in vivo approach." Eur J Pharm Biopharm **85**(3 Pt B): 1274-1284.
- Jablonka, L., M. Ashtikar, G. Gao, F. Jung, M. Thurn, A. Preuss, D. Scheglmann, V. Albrecht, B. Roder and M. G. Wacker (2019). "Advanced in silico modeling explains pharmacokinetics and biodistribution of temoporfin nanocrystals in humans." J Control Release **308**: 57-70.
- Juenemann, D., E. Jantratid, C. Wagner, C. Reppas, M. Vertzoni and J. B. Dressman (2011). "Biorelevant in vitro dissolution testing of products containing micronized or nanosized fenofibrate with a view to predicting plasma profiles." Eur J Pharm Biopharm **77**(2): 257-264.
- Jung, F., L. Nothnagel, F. Gao, M. Thurn, V. Vogel and M. G. Wacker (2018). "A comparison of two biorelevant in vitro drug release methods for nanotherapeutics based on advanced physiologically-based pharmacokinetic modelling." Eur J Pharm Biopharm **127**: 462-470.
- Jung, F., M. Thurn, K. Krollik, G. F. Gao, I. Hering, E. Eilbrecht, M. Weiler, N. Günday-Türelı, E. Türelı, M. J. Parnham and M. G. Wacker (2019 (Submitted manuscript)). "Simulation of the environmental exposure to fenofibrate nanomaterials based on in vitro- and in silico methods."
- Kralik, P. and M. Ricchi (2017). "A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything." Front Microbiol **8**: 108.
- Kusuzaki, K., H. Murata, T. Matsubara, H. Satonaka, T. Wakabayashi, A. Matsumine and A. Uchida (2007). "Review. Acridine orange could be an innovative anticancer agent under photon energy." In Vivo **21**(2): 205-214.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.
- Nicolaides, E., M. Symillides, J. B. Dressman and C. Reppas (2001). "Biorelevant Dissolution Testing to Predict the Plasma Profile of Lipophilic Drugs After Oral Administration." Pharmaceutical Research **18**(3): 380-388.
- Nothnagel, L., F. Jung, T. Rossmannith, M. Thurn, M. Ashtikar, G. Geisslinger, M. J. Parnham and M. G. Wacker (2018). "Predictive PBPK modeling as a tool in the formulation of the drug candidate TMP-001." Eur J Pharm Biopharm.
- Nothnagel, L., F. Jung, T. Rossmannith, M. Thurn, M. Ashtikar, G. Geisslinger, M. J. Parnham and M. G. Wacker (2019). "Predictive PBPK modeling as a tool in the formulation of the drug candidate TMP-001." Eur J Pharm Biopharm **134**: 144-152.