

Abschlussbericht

Projekttitlel:

„Pharmazeutische Weiterentwicklung und präklinische Prüfung eines umweltfreundlichen Depot-Präparates zur Zyklusblockade bei Jungsauen“ - Depot-Zyklo II -

Aktenzeichen der Deutschen Bundesstiftung Umwelt: 33529/01-32

Verfasser:

Priv. Doz. Dr. Dr. habil. Wolfgang Zaremba (Projektleitung)
Veyx-Pharma GmbH
Söhreweg 6
34639 Schwarzenborn

Prof. Dr. Johannes Kauffold
Ambulatorische und Geburtshilfliche Tierklinik
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig
An den Tierkliniken 29
04103 Leipzig

Prof. Dr. Wolfgang Frieß
Zentrum für Pharmaforschung
Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie
Ludwig-Maximilians-Universität München
Butenandtstraße 5 -13
81377 München

Projektbeginn: 01.03.2017

vorzeitiger Abbruch des Projektes: 31.01.2019

Ort, Jahr: Schwarzenborn, 22.05.2019

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	3
2. Anlass und Zielsetzung des Projektes	4
3. Darstellung der Arbeitsschritte	5
4. Aktivitäten der Ludwig-Maximilians-Universität München, Prof. Dr. Frieß Material und Methoden, Ergebnisse und Schlussfolgerungen	6
4.1. Handhabbarkeit	6
4.2. Ausbeute	7
4.3. Modifizierung des Freisetzungsversuches	8
4.4. Tierversuchsansätze	9
4.5. Zusammenfassung	10
5. Aktivitäten der Universität Leipzig, Prof. Dr. Kauffold Material und Methoden, Ergebnisse und Schlussfolgerungen	11
5.1. Material und Methoden	11
5.2. Ergebnisse	12
5.3. Schlussfolgerungen	12
6. Aktivitäten der Veyx-Pharma GmbH, PD Dr. Dr. habil. Zarembo	14

1. Zusammenfassung

Gemeinsam mit der Veyx-Pharma GmbH (kurz Veyx), vertreten durch Herrn PD Dr. Dr. habil. Zaremba, erarbeitete die Universität Leipzig, vertreten durch Herrn Prof. Dr. Kauffold, den Tierschutzantrag und weitere im Rahmen des Tierversuchsvorhabens benötigte Formblätter. Die Beantwortung der zahlreichen Nachfragen der Landesdirektion Sachsen war mit einem sehr hohen Arbeitsaufwand verbunden. Insgesamt nahm der Prozess von der Einreichung bis zur Bewilligung des Tierschutzantrages circa sieben Monate in Anspruch. Die Genehmigung der Tierversuche durch die Landesdirektion Sachsen erfolgte erst am 27.02.2018.

Diese nicht vorhersehbare Verzögerung betraf im Wesentlichen Veyx und die Universität Leipzig. Die geplanten Arbeiten der Ludwig-Maximilians-Universität München (kurz LMU), vertreten durch Herrn Prof. Dr. Frieß, zur Formulierung formstabiler Depotsuspensionen (AP2) sowie zum Herstellungsprozess (AP2) konnten soweit wie möglich durchgeführt werden.

Die Projektleitung wurde von Veyx übernommen (AP0). Zudem unterstützte Veyx die Universität Leipzig bei der Erstellung der Studienprotokolle. Veyx erstellte darüber hinaus den Antrag auf Festsetzung einer vorläufigen Wartezeit beim Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit.

Durch die LMU wurden Verbesserungen bei der Formulierung formstabiler Depotsuspensionen erzielt (AP2). Die Agglomeratbildung während der Lagerung war somit vermeidbar. Es wurde festgestellt, dass die Schaumbildung nicht nur von der Tensidkonzentration, sondern auch von der Viskosität des Rekonstitutionsmediums abhängig ist. Mit einem Rekonstitutionsmedium, das 0,2 % Na-CMC und 0,02 % PS 20 enthielt, konnte eine gleichbleibende Partikelgrößenverteilung der resuspendierten Mikropartikel über die Zeit sichergestellt werden. Ein zusätzlicher Siebschritt nach der Kryovermahlung des Wirkstoffs verbesserte die Verkapselungseffizienz der Mikropartikel. Die Partikel, die im Sprühturm und dessen Auffangbehälter abgeschieden werden, stellen ein verwendbares Produkt dar – somit wird die Gesamtausbeute gesteigert. Das Freisetzungsprofil der Mikropartikel ist von der Wirkstoffbeladung und vom Ort der Abscheidung des Produkts im Sprühtrockner abhängig. Aus pharmazeutisch-technologischer und ökonomischer Sicht sollte das gesamte Produkt des Sprühprozesses (Produktbehälter, Sprühturm und dessen Behälter) als Depot-Arzneimittel verwendet werden.

Im Rahmen der klinischen Untersuchungen an Jungsauen wurden vier verschiedene Formulierungen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe getestet (5 Jungsauen pro Gruppe). Ziel war eine 15-tägige Zyklusblockade bei allen behandelten Jungsauen einer Gruppe.

Bei den Sauen der Gruppen 2, 3 und 4 wurde keine Zyklusblockade erzielt. Nur in Gruppe 1 wiesen 4 der 5 Jungsauen eine Zyklusblockade auf, die allerdings nur ca. 3 - 5 Tage anhielt. Die Qualität dieser Blockade, d. h. Anzahl der Tiere mit Blockade und Synchronität deren Dauer, entspricht den Ergebnissen des ersten Projektes mit ebendieser Formulierung. Das Ziel einer Blockade über exakt 15 Tage bei allen behandelten Jungsauen wurde verfehlt.

Der Leadkandidat aus Depot-Zyklus konnte somit in Depot-Zyklus II nicht verbessert werden. Gemäß Antrag und Bewilligungsbescheid zu Depot-Zyklus II waren somit die Kriterien nicht erfüllt, um das Projekt fortzusetzen. Weiterhin wurden endokrinologische Untersuchungen mit dem Ziel des „Fine-tuning“ eines verbesserten Kandidaten und nachfolgender Testung an einer randomisierten Jungsauenpopulation als nicht erfolversprechend eingeschätzt. Daher musste das Projekt zum 31.01.2019 abgebrochen werden.

2. Anlass und Zielsetzung des Projektes

Das Anschlussprojekt „Pharmazeutische Weiterentwicklung und präklinische Prüfung eines umweltfreundlichen Depot-Präparates zur Zyklusblockade bei Jungsauen“ (Depot-Zyklus II) wurde durch das mittelständische Unternehmen Veyx-Pharma GmbH, Schwarzenborn, in Zusammenarbeit mit der Ludwig-Maximilians-Universität München, Department für Pharmazie, Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie sowie der Universität Leipzig, Veterinärmedizinische Fakultät, Ambulatorische und Geburtshilfliche Tierklinik, durchgeführt.

Ziel war es, ein alternatives Präparat für Altrenogest zu entwickeln, das bei Jungsauen seit langem zur Zyklusblockade im Rahmen der Zyklussteuerung eingesetzt wird. Im Vergleich zu den herkömmlichen Altrenogest-Präparaten sollte das zu entwickelnde Präparat deutlich umweltverträglicher und einfacher in der Handhabung sein (nur einmalige Applikation, bei Altrenogest-Präparaten 18-tägige Applikation).

Allein in Deutschland werden ca. 2,2 Millionen Zuchtsauen in Betrieben gehalten, die als ein Instrument der modernen Betriebsführung auf die seit über 30 Jahren gängige Zyklussteuerung setzen. Der hierfür traditionell eingesetzte Wirkstoff Altrenogest ist jedoch aus ökotoxikologischer Sicht bedenklich. Daher strebte das vorliegende Projekt an, dieses Verfahren der Zyklussteuerung auf eine „ökologisch unbedenkliche Basis“ zu stellen. Neuartiger Ansatz war die Entwicklung einer injizierbaren Depotformulierung unter Nutzung des Wirkstoffs Gonadorelin[6-D-Phe].

Das nur aus Aminosäuren bestehende GnRH-Analogon Gonadorelin[6-D-Phe] wird nach seiner Freisetzung im Tierkörper sehr rasch vollständig metabolisiert. Eine Ausscheidung toxischer oder physiologisch aktiver Stoffwechselprodukte erfolgt nicht, so dass das Ausbringen von Mist, Gülle und Jauche derart behandelter Tiere zu keiner Belastung des Grund- und Oberflächenwassers mit Arzneimittelrückständen führt. Dies unterscheidet das angestrebte Präparat grundlegend von den bisher zur Zyklusblockade bei Jungsauen eingesetzten Arzneimitteln, die auf dem Wirkstoff Altrenogest basieren und über Stoffwechselprodukte in erheblichen Konzentrationen in die Umwelt eingetragen werden.

Die durch das zu entwickelnde Arzneimittel angestrebte Zyklusblockade basiert auf folgendem Wirkprinzip: Die kontinuierliche Freisetzung von GnRH über das Depotpräparat bewirkt aufgrund einer Rezeptor-Down-Regulation eine Desensibilisierung der Hypophyse gegenüber GnRH. Die Gonadotropine LH und FSH, die für die Follikelentwicklung essenziell sind, werden infolgedessen nicht ausgeschüttet. Die Follikelentwicklung am Ovar wird gehemmt, die Brunst bleibt aus. Nach Aufhebung der Blockade durch Ende der Wirkstofffreisetzung setzt das Follikelwachstum wieder ein und ein neuer Östrus beginnt.

Angestrebt wurde eine Arzneimittelformulierung, bei der nach einmaliger Injektion eine auf 15 Tage beschränkte kontinuierliche Freisetzung des Wirkstoffs erfolgt. Nach diesem Zeitraum sollte die Wirkung abrupt enden.

In dem bereits abgeschlossenen, von der DBU bewilligten Projekt „Depot-Zyklus“ (Aktenzeichen 30815-32) wurden die Herstellungsprozesse für eine ölige und eine formstabile, mikropartikuläre Depotformulierung in Grundzügen erarbeitet. Mit den an Jungsauen getesteten öligen und formstabilen Depotformulierungen wurde eine Zyklusblockade erreicht. Die zyklusblockierende Wirkdauer war jedoch zu verlängern, ohne dass sich die Synchronität verschlechterte. Je Formulierungstyp wurde ein Leadkandidat ermittelt. Der formstabile Leadkandidat war sowohl in seiner Wirkdauer als auch in der Synchronität überlegen. Dieser sollte in dem vorliegenden Anschlussprojekt in seiner Wirkdauer optimiert und zu einem Arzneimittel weiterentwickelt werden.

3. Darstellung der Arbeitsschritte

In dem bereits abgeschlossenen Projekt erwies sich die formstabile Depotformulierung mit 375 µg/ml Gonadorelin[6-D-Phe] in Glyceroltrimyrinstat + 5 % Sorbitanmonopalmitat vor allem aufgrund ihrer biologischen Wirkung als die beste aller getesteten Formulierungen. Sie ist der Leadkandidat, welcher im vorliegenden Projekt zu einem Arzneimittel galenisch weiterentwickelt werden sollte. Anzustreben war eine gut verträgliche Depotformulierung, die eine Zyklusblockade über 15 Tage gewährleistet.

In diesen Untersuchungen sollte Folgendem Rechnung getragen werden:

- a. Die Dauer des zyklusblockierenden Effektes galt es zu verlängern. Die Synchronität des Endes der Blockade sollte dabei aufrechterhalten werden.
- b. Die Handhabbarkeit (Resuspendier- und Applizierbarkeit) sollte verbessert werden.
- c. Das Auftreten von Zyklusunregelmäßigkeiten galt es zu reduzieren.

Um diese Punkte zu adressieren, wurde angestrebt, allein durch Verbesserungen der Resuspendier- und Applizierbarkeit der formstabilen Depotformulierung ein bei allen Jungsauen einheitlicheres Depot an der Injektionsstelle zu erzeugen. Es ist anzunehmen, dass Gonadorelin[6-D-Phe] dann bei allen behandelten Tieren uniformer als bisher geschehen aus dem Depot entlassen wird. Zudem sollte die Wirkstoffbeladung erhöht werden, um einerseits die Dauer der Zyklusblockade zu verlängern und um andererseits zusätzlich die Handhabung durch eine geringere zu applizierende Partikelmenge zu verbessern.

Im Rahmen der präklinischen Untersuchungen wurden zunächst Gruppen von Jungsauen herangezogen, die zum Zeitpunkt der Applikation der Testsubstanz einen einheitlichen Zyklusstand aufwiesen (nicht-randomisiert). Dadurch waren ein sicheres Monitoring und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse sowohl innerhalb der einzelnen Gruppen als auch zwischen diesen gewährleistet. Der Effekt der Behandlung wurde durch tägliche sonographische Untersuchungen kontrolliert. Dabei wurden die ovariellen Funktionskörper beurteilt. Der Erfolg der Behandlung wurde wie folgt definiert:

Bei unbehandelten Kontrolltieren sind die Gelbkörper ca. am Tag 17 des Sexualzyklus zurückgebildet. Ein neues Follikelwachstum beginnt. Ungefähr am Tag 21 werden diese Tiere große präovulatorische (sprungreife) Follikel von 8 - 10 mm Durchmesser aufweisen und Verhaltensbrunst (Akzeptanz des männlichen Partners) ausgeprägt haben. Beides sollte bei erfolgreich behandelten Tieren fehlen. Bei den Testtieren sind die Gelbkörper ca. am Tag 17 des Sexualzyklus zurückgebildet. Anders als bei den Kontrolltieren erfolgt jedoch kein Wachstum der Follikel bis zu sprungreifer Größe. Dieses setzt erst ca. 15 Tage nach Applikation der Testsubstanz ein.

In der ersten präklinischen Studie wurden vier galenisch verbesserte Varianten des Leadkandidaten an nicht-randomisierten, sexuell synchronisierten Jungsauen sonographisch (d. h. mittels Ultraschall der Ovarien) und klinisch untersucht. Die zwei am besten geeigneten Depotformulierungen sollten anschließend in einem weiteren Versuch an ebenfalls nicht-randomisierten, sexuell synchronisierten Jungsauen im Vergleich zu unbehandelten Jungsauen in ihrer Wirksamkeit sowohl sonographisch als auch endokrinologisch überprüft werden. In einem letzten Versuch sollte dann die am besten geeignete Depotformulierung an einer größeren Gruppe Jungsauen mit unterschiedlichem Zyklusstadium im Vergleich zu unbehandelten Jungsauen hinsichtlich Wirksamkeit sonographisch und klinisch überprüft werden.

4. **Aktivitäten der Ludwig-Maximilians-Universität München, Prof. Dr. Frieß Material und Methoden, Ergebnisse und Schlussfolgerungen**

Die Gonadorelin[6-D-Phe] enthaltenden Lipid-Mikropartikel wurden durch Sprüherstarrung hergestellt. Im Vorgängerprojekt erwies sich die formstabile Depotformulierung mit 375 µg/mL Gonadorelin[6-D-Phe] in Glyceroltrimyrat + 5 % Sorbitanmonopalmitat als gut geeignet. Durch galenische Weiterentwicklung dieses Leadkandidaten sollte eine gut reproduzierbare 15-tägige Zyklusblockade erreicht werden. Es galt, die Handhabbarkeit hinsichtlich Resuspendier- und Applizierbarkeit zu verbessern und den Herstellungsprozess hinsichtlich der Ausbeute zu optimieren.

4.1. **Handhabbarkeit**

Dispergierung von Partikeln

Während der Lagerung der Lipid-Mikropartikel kam es zur Bildung von Agglomeraten. Durch Sieben konnten die Mikropartikel nach Herstellung gut desagglomeriert werden. Zusätzlich wurden die Mikropartikel mit gemahlener und gesiebter Saccharose gemischt. Die Saccharose dient als Platzhalter zwischen den Lipidpartikeln und stellt gleichzeitig das isotonisierende Agens dar. Als vorteilhaft erwies es sich, die gesamte zur Isotonisierung erforderliche Saccharosemenge für die Mischung einzusetzen.

Schaumbildung des Rekonstitutionsmediums

Durch Einsatz von Tensid- und Viskositätserhöhern im Rekonstitutionsmedium müssen Benetzung und Dispergierbarkeit der Partikel sichergestellt und die Sedimentation der Partikel für die Applikation verringert werden. Nachteilig ist die mit den Hilfsstoffen einhergehende Schaumentwicklung und Mikropartikelflotation während des Schüttelns zur Rekonstitution. Die Zusammensetzung des Mediums wurde systematisch hinsichtlich Art und Konzentration des Viskositätserhöhers (Natrium-Carboxymethylcellulose, Na-CMC; Polyvinylpyrrolidon, PVP) und des Tensides (Polysorbat 20, PS 20; Polysorbat 80, PS 80) variiert und die Schaumbildung nach intensivem reproduzierbarem Schütteln makroskopisch beurteilt. Die Dispergierbarkeit war mit allen Medien gut bis sehr gut.

Die Tendenz zur Schaumbildung stieg mit der Tensidkonzentration, während höhere Konzentrationen an Viskositätserhöhern zu einer verringerten Schaumbildung führten (Tabelle 4-1). Als Kompromiss zwischen all den Parametern, einschließlich schwerer Injizierbarkeit und Einschluss von Luftbläschen bei hoher Viskosität, erwies sich die Rezeptur 3 mit 0,2 % Na-CMC und 0,02 % PS20. Diese wurde für den Tierversuch verwendet.

Tabelle 4-1: Makroskopische Beurteilung der Schaumbildung nach Schütteln

Nr.	Rekonstitutionsmedium	moderate Schaumbildung	stärkere Schaumbildung
1	1,0 % Na-CMC + 0,02 % PS 20	x	
2	0,5 % Na-CMC + 0,02 % PS 20		x
3	0,2 % Na-CMC + 0,02 % PS 20		x
4	0,2 % Na-CMC + 0,01 % PS 20	x	
5	3 % PVP + 0,05 % PS 80		x
6	3 % PVP + 0,02 % PS 80		x
7	4 % PVP + 0,02 % PS 80	x	
8	5 % PVP + 0,02 % PS 80	x	

Sedimentationsstabilität der Depotsuspension

Die physikalische Stabilität der Depotsuspension über die Zeit ist entscheidend für die Dosiergenauigkeit im Falle eines Mehrdosenbehältnisses. 100 mg Lipid-Mikropartikel (Placebo) wurden in 10 ml dispergiert. Mittels einer Repetierspritze wurden nach 0, 5 und 10 min Injektionen simuliert und die Partikelgrößenverteilung analysiert.

Es zeigte sich der Trend zu kleineren Partikelgrößen über die Zeit (Abbildung 4-1). Größere Partikel florierten rascher und gingen dadurch verloren. PVP-haltige Rekonstitutionsmedien zeigten eine deutlichere Abnahme der Partikelgröße über die Zeit als CMC-haltige. In 0,1%iger Na-CMC-Lösung zeigte sich die geringste Abnahme der Partikelgröße über die Zeit. Allerdings lag in diesem Rekonstitutionsmedium bereits zu Beginn die höchste Partikelgröße vor, was auf unzureichende Dispergierung der Partikel im Medium hinweist. Die Suspension in Na-CMC mit einer Konzentration von 0,2 % und 0,02 % PS 20 wies in den ersten 5 Minuten eine geringe Veränderung auf.

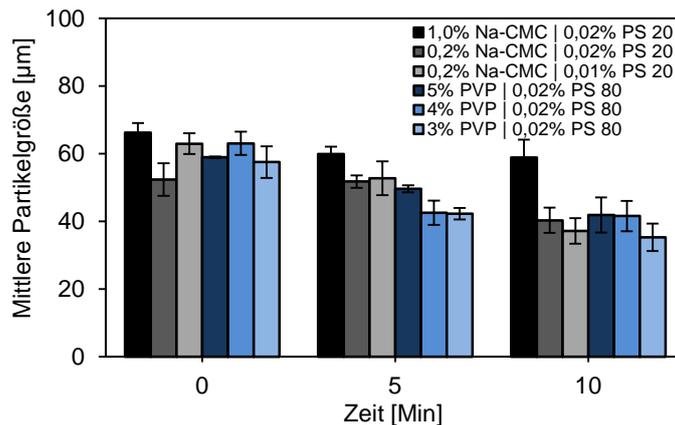


Abbildung 4-1: Partikelgröße der Lipid-Mikropartikel in unterschiedlichen Rekonstitutionsmedien bei Mehrfachinjektion

4.2. Ausbeute

Für die Verbesserung der Gesamtausbeute des eingesetzten Wirkstoffes sollte zum einen versucht werden, die Verkapselungseffizienz der Partikel bei gleichbleibender Partikel ausbeute zu erhöhen. Zum anderen wurden Tests durchgeführt, um die Partikel ausbeute des Sprühprozesses zu steigern. Zudem wurde die Wirkstoffbeladung der Partikel erhöht, um die erforderliche Gesamtpartikelmenge pro Injektion zu reduzieren.

Verkapselungseffizienz

In früheren Sprühversuchen wurde der Wirkstoff nach Kryovermahlung direkt mittels eines Ultraturax® in der Lipidschmelze dispergiert. Dies barg die Gefahr in sich, dass der Wirkstoff nicht vollständig homogen dispergiert war. Dadurch konnte einerseits während des Sprühprozesses die Düse verstopfen, andererseits konnte sich der Wirkstoff absetzen und nicht vollständig verkapselt werden. Zur Desagglomeration und besseren Verteilung wurde der Wirkstoff nach Kryovermahlung durch ein 40 µm Sieb geschlagen und Lipid-Mikropartikel mit 1,8 % und 4,8 % Wirkstoffbeladung hergestellt. Das zusätzliche Sieben führte zu einer Verbesserung der Verkapselungseffizienz von ca. 50 % auf ca. 66 % im Falle von 1,8 % nominaler Wirkstoffbeladung bzw. auf 76,3 % im Falle von 4,8 % Wirkstoffbeladung.

Sprühprozess

Durch Veränderungen der Sprühparameter konnte keine Erhöhung der Ausbeute erzielt werden. Es sollte daher bewertet werden, ob auch im Sprühturm und dessen Auffangbehältnis befindliche Partikel als Produkt genutzt werden können. Im Sprühturm als auch in dessen Auffangbehältnis abgeschiedene Partikel waren analog zu Partikeln im Produktbehältnis sphärisch. Ihre Partikelgröße betrug, unabhängig von der Wirkstoffbeladung, ca. 100 µm. Die mittlere Partikelgröße aus dem Produktbehältnis betrug 28,9 µm im Falle von 1,8 % Wirkstoffbeladung und 61,3 µm im Falle von 4,8 % Wirkstoffbeladung. Aus pharmazeutischer Sicht waren

alle Partikel injizierbar. Unter Verwendung aller Lipid-Mikropartikelfractionen ergibt sich eine Ausbeute von ca. 50 % (nur Produktbehältnis: ca. 25 %).

In-vitro-Freisetzung von Gonadorelin[6-D-Phe] aus Lipid-Mikropartikeln mit erhöhter Verkapselungseffizienz und verbesserter Ausbeute

Die Charakterisierung der Wirkstofffreisetzung der unter den geänderten Bedingungen erhaltenen Lipid-Mikropartikeln ist essentiell. Entsprechend wurde die In-vitro-Freisetzung von Gonadorelin[6-D-Phe] aus Lipid-Mikropartikeln mit einer Dosis von 750 µg in PBS-Puffer bei 39 °C, der physiologischen Körpertemperatur des Schweines, untersucht. Die Mikropartikel wurden in ein Dialysesystem eingeschlossen, in ein Akzeptormedium gegeben und die freigesetzte Menge Gonadorelin[6-D-Phe] wurde mittels HPLC analysiert. Es wurden Partikel unterschiedlicher Wirkstoffbeladung aus den verschiedenen Bereichen des Sprühtrockners getestet. Die Fraktion „Mixed“ stellte eine Mischung von Partikeln aus Produktbehältnis, Sprühturm und dessen Behälter dar (Verhältnis entsprechend der Ausbeute der Fraktionen).

Die Freisetzung war von der Wirkstoffbeladung und der Partikelfraktion abhängig (Abbildung 4-2a). Partikel mit einer nominalen Wirkstoffbeladung von 4,8 % setzten den Wirkstoff schneller frei als Partikel mit niedrigerem Wirkstoffgehalt. Partikel aus dem Produktbehältnis zeigten initial das geringste Ausmaß an Wirkstofffreisetzung.

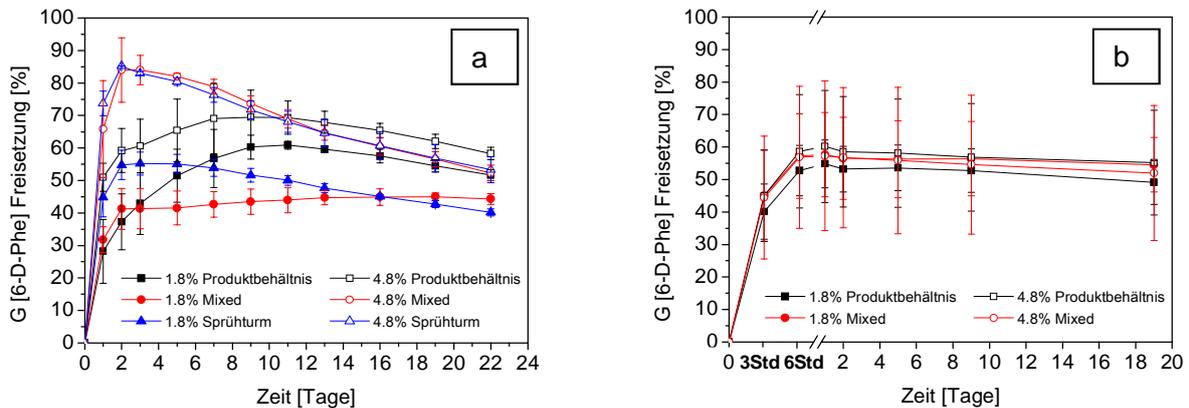


Abbildung 4-2: Freisetzung von Gonadorelin[6-D-Phe] aus Lipid-Mikropartikeln, gesammelt in unterschiedlichen Bereichen des Sprühtrockners mit 1,8 % und 4,8 % Wirkstoffgehalt (a) und unter modifizierten Freisetzungsbedingungen (b)

4.3. Modifizierung des Freisetzungsversuches

Die Charakterisierung der Wirkstofffreisetzung der Lipid-Mikropartikel ist von essentieller Bedeutung. Im Rahmen der Freisetzungsuntersuchungen nach der aus dem Vorgängerprojekt übernommenen Methode zeigte sich eine Verklumpung der Partikel, welche möglicherweise das Ergebnis verfälscht. Um eine bessere Prognose für den In-vivo-Versuch am Schwein zu gewährleisten, wurde der Freisetzungsversuch wie folgt modifiziert:

Statt einer direkt in den Dialyseschlauch eingewogenen Menge an Lipid-Mikropartikeln, welche einer Einzeldosis entspricht, wurde eine Mehrfachdosis für 5 Applikationen als Mischung mit Saccharose nach Zugabe des Rekonstitutionsmediums getestet. Dadurch wurde die praktische Anwendung simuliert und die Verklumpung blieb aus. Im direkten Vergleich zeigte sich eine schnellere Wirkstofffreisetzung in der neuen Freisetzungsmethode (Abbildung 4-2b). Die Freisetzung war bereits nach 6 Stunden abgeschlossen. Es ließen sich zudem kaum Unterschiede zwischen den verschiedenen untersuchten Partikeln feststellen.

Die Freisetzungskurven zeigten im modifizierten Freisetzungsversuch eine höhere Standardabweichung im Vergleich zur vormalig durchgeführten Methode. Daraufhin wurden die einzelnen Freisetzungskurven der simulierten Mehrfachinjektionen analysiert (Abbildung 4-3). „Injektion 1“ stellte stets diejenige Injektion dar, die zuerst vorbereitet wurde, während

„Injektion 3“ die letzte darstellte. Die Zeit für das Befüllen und Verschließen des Dialyseschlauchs nahm jeweils ca. 3 min in Anspruch. Es lässt sich feststellen, dass die freigesetzte Menge Gonadorelin[6-D-Phe] vom Zeitpunkt der Probenentnahme aus dem Mehrdosenbehältnis abhängig ist. „Injektion 3“ zeigte für alle getesteten Partikelfractionen die größte Menge an freigesetztem Wirkstoff. Dies ließ auf eine sehr schnelle Freisetzung nach Aufschütteln des Präparates schließen. Die Ungleichmäßigkeit der applizierten Dosis führte zu einer Dosierungsungenauigkeit aus dem Mehrdosenbehältnis.

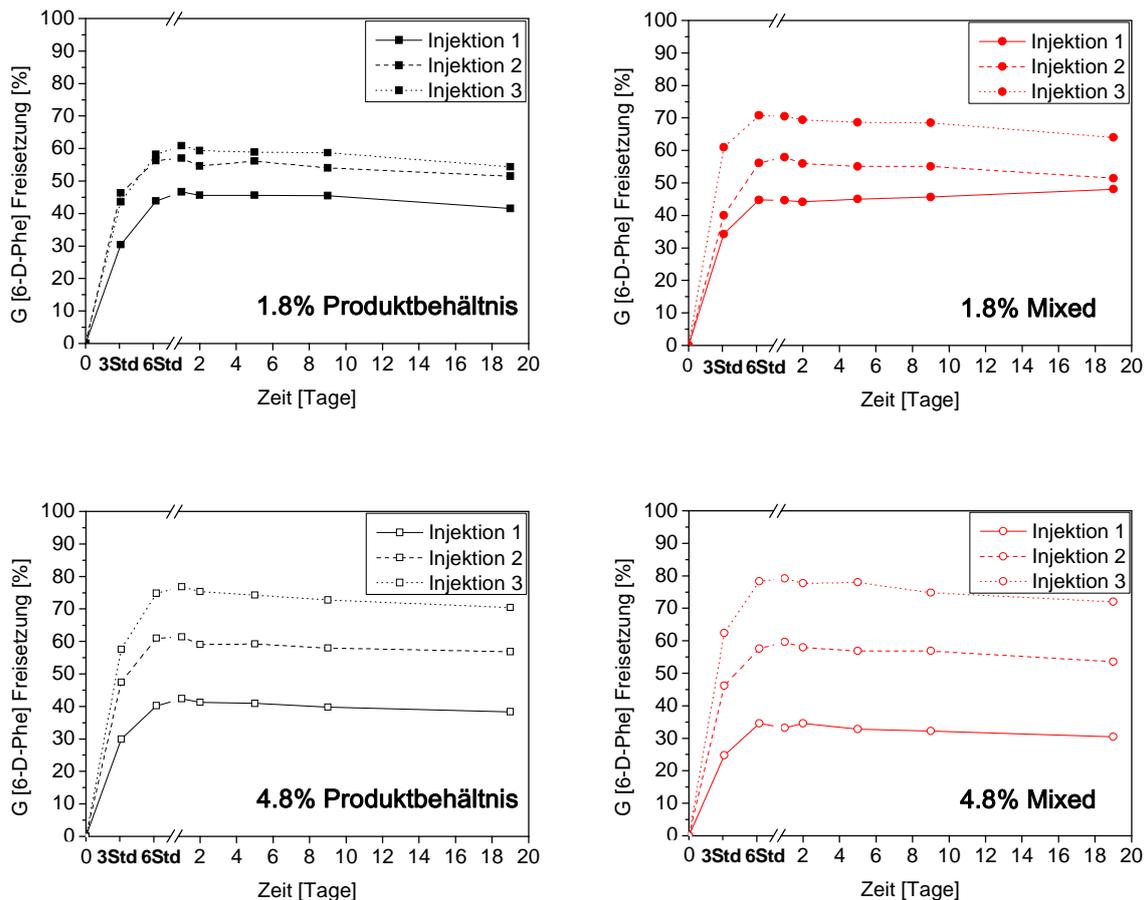


Abbildung 4-3: Freisetzung von Gonadorelin[6-D-Phe] aus Lipid-Mikropartikeln gemäß drei Applikationen einer simulierten Mehrfachinjektion

4.4. Tierversuchsansätze

Im Vorgängerprojekt hat die Lipid-Mikropartikelsuspension einen Effekt gezeigt, dessen Dauer und Synchronität unter Verwendung eines Mehrdosenbehältnisses verbessert werden sollte. Aufgrund der Ergebnisse des modifizierten In-vitro-Freisetzungsvorgangs, welche auf eine sehr rasche Freigabe eines Teils des Wirkstoffs unmittelbar nach der Rekonstitution hinwiesen, wurde für die kommende Tierstudie ein Einzeldosissystem gewählt. Dadurch sollten einheitlichere Ergebnisse innerhalb einer Studiengruppe erreicht werden.

Um die essentielle Steigerung der Produktausbeute abzubilden, wurden Partikel mit einer Wirkstoffbeladung von 4,8 % der Fraktion „Mixed“ gewählt. Die Dosis wurde in drei Stufen

variiert; mit 375, 750 und 3750 µg je Injektion. Im Vorgängerprojekt wurde kein signifikanter Effekt der erhöhten Dosis von 3750 µg auf eine Zystenbildung festgestellt.

Als Referenz zum Vorgängerprojekt wurden Lipid-Mikropartikel mit 1,8 % Wirkstoffbeladung aus dem Produktbehältnis und einer Dosis von 750 µg gewählt. Die Produkte für den Tierversuch wurden wie folgt hergestellt.

- Der Wirkstoff Gonadorelin[6-D-Phe] wurde kryovermahlen und das Mahlprodukt anschließend durch ein 40 µm Sieb geschlagen.
- Dynasan 114 (Glyceroltrimyristat) und Span 40 (95:5) wurden bei 90 °C geschmolzen, der Wirkstoff wurde zugegeben und mit einem Ultraturax® homogenisiert.
- Die geschmolzene Lipiddispersion wurde sprüherstartet.
- Die Mikropartikel wurden aus dem Produktbehältnis, Sprühturm und Auffangbehältnis des Sprühturms entnommen, ggf. vereinigt und durch ein 180 µm Sieb geschlagen. Der Wirkstoffgehalt wurde per HPLC ermittelt.
- Die Mikropartikel wurden mit gemahlener und gesiebter Saccharose gemischt, so dass nach Rekonstitution eine isotone Suspension entstand (10 % Saccharose).
- Die unterschiedlichen Formulierungen wurden mit 50 % Überschuss für Rekonstitution mit 3 mL 0,2 % Na-Carboxymethylcellulose + 0,02 % Polysorbat 20 in 10R Vials als Einzeldosen abgefüllt. Die Applikationsmenge je Tier betrug 2 mL.

4.5. Zusammenfassung

Zusammenfassend konnten folgende Ergebnisse erreicht werden:

- Durch Sieben und Mischen der Lipid-Mikropartikel mit Saccharose ließ sich eine Agglomeratbildung, die während der Lagerung eintritt, vermeiden und die Rekonstitution verbessern.
- Hinsichtlich Redispersierung, Schaumbildung, Viskosität und Partikelgröße in Mehrdosensystemen erwies sich ein Rekonstitutionsmedium mit 0,02 % PS20 als am besten geeignet.
- Durch Einführen eines zusätzlichen Siebschrittes nach Kryovermahlung des Wirkstoffs konnte die Verkapselungseffizienz der Mikropartikel erhöht werden.
- Partikel, die während des Sprühprozesses nicht im Produktbehältnis, sondern im Sprühturm und dessen Auffangbehälter abgeschieden wurden, stellten ein verwendbares Produkt dar. Dadurch konnte die Gesamtausbeute weiter gesteigert werden.
- Die Freisetzungsversuche zeigten ein unterschiedliches Freisetzungsprofil der Mikropartikel in Abhängigkeit von der Wirkstoffbeladung und vom Abscheidungs-ort im Sprühtrockner.
- Die neue Freisetzungsmethode ließ auf eine sehr schnelle Freisetzung schließen und legte die Verwendung von Einzeldosisbehältnissen nahe.

5. Aktivitäten der Universität Leipzig, Prof. Dr. Kauffold Material und Methoden, Ergebnisse und Schlussfolgerungen

5.1. Material und Methoden

Die klinische Testung erfolgte im universitätseigenen Lehr- und Versuchsgut Oberholz. Insgesamt standen 30 Jungsauen zur Verfügung, von denen letztendlich 25 in die Studie einbezogen wurden. Tabelle 5-1 fasst Behandlungs- bzw. Arbeitsschritte zusammen.

Tabelle 5-1: Behandlungs- bzw. Arbeitsschritte im Rahmen der klinischen Testung

Lfd. Nr.	Zeitraum (2019)	Behandlungs- bzw. Arbeitsschritt
1	24. August und 3. September	Ultrasonographische Kontrollen Pubertät; gegebenenfalls Pubertätsinduktion und Nachkontrolle des Behandlungserfolges
2	5. - 22. September	Behandlung mit Altrenogest zur Zyklusblockade
3	24. September	Behandlung mit PMSG zur Stimulation des Follikelwachstums
4	27. September	Behandlung mit GnRH zur Ovulationsauslösung
5	28. September - 1. Oktober	Ultrasonographische Kontrollen Ovulationsverlauf
6	10. Oktober	Applikation der Testsubstanzen
7	11. Oktober - 1. November	Ultrasonographische Untersuchungen des Ovars zur Testung der Effekte der Testsubstanzen

Es wurden insgesamt 4 verschiedene Formulierungen (Gruppen 1 - 4) im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (Gruppe 5) getestet. Je Gruppe wurden 5 Jungsauen einbezogen, die am 28. September (12 Tage vor Applikation der Testsubstanz) 252 Tage alt waren und $160,6 \pm 9,1$ kg wogen.

Die verwendeten Testsubstanzen waren:

Gruppe 1: Leadkandidat aus dem Erstprojekt Depot-Zyklus (750 µg Gonadorelin[6-D-Phe] eingeschlossen in 54,43 mg Glyceroltrimyristat + 5 % Sorbitanmonopalmitat-Mikropartikeln) mit verbesserter Resuspendierbarkeit

Gruppe 2: Modifizierter Leadkandidat aus Depot-Zyklus (375 µg Gonadorelin[6-D-Phe] in 8,77 mg Glyceroltrimyristat + 5 % Sorbitanmonopalmitat) mit verbesserter Resuspendierbarkeit, erhöhter Partikelbeladung und gesteigerter Ausbeute

Gruppe 3: Modifizierter Leadkandidat aus Depot-Zyklus (750 µg Gonadorelin[6-D-Phe] in 17,54 mg Glyceroltrimyristat + 5 % Sorbitanmonopalmitat) mit verbesserter Resuspendierbarkeit, erhöhter Partikelbeladung und gesteigerter Ausbeute

Gruppe 4: Modifizierter Leadkandidat aus Depot-Zyklus (3750 µg Gonadorelin[6-D-Phe] in 87,71 mg Glyceroltrimyristat + 5 % Sorbitanmonopalmitat) mit verbesserter Resuspendierbarkeit, erhöhter Partikelbeladung und gesteigerter Ausbeute

Kontrollgruppe: wirkstofffreier Leadkandidat aus Depot-Zyklus (Glyceroltrimyristat + 5 % Sorbitanmonopalmitat) mit verbesserter Resuspendierbarkeit

Die Applikation der Formulierungen erfolgte am Tag 12 des vorab hormonell synchronisierten Sexualzyklus (siehe Tabelle 5-1). Mit Beginn der Applikation der Substanzen wurden täglich ultrasonographische Untersuchungen der Ovarien über insgesamt 20 Tage durchgeführt, um

den Zeitpunkt der Gelbkörperrückbildung und den Beginn neuen Follikelwachstums zu erfassen (Kriterium für das Ende einer etwaigen Zyklusblockade). Zudem wurde die nachfolgende Ovulation dokumentiert, sofern diese im Untersuchungszeitraum stattfand.

Ziel war eine 15-tägige Zyklusblockade bei allen jeweils per Gruppe behandelten Jungsauen. Es sollte die Formulierung identifiziert werden, die dieses Ziel erfüllte bzw. dem Ziel am nächsten kam.

5.2. Ergebnisse

Sauen der Kontrollgruppe (Gruppe 5; nicht farblich unterlegt in Tabelle 5-2) wiesen zwischen den Tagen 5 und 8 nach Applikation der wirkstofffreien Formulierung erneutes Follikelwachstum auf (physiologisch). Ähnlich verhielten sich die Sauen der Gruppe 2 (grün unterlegt). Bei diesen Sauen wurde keine Zyklusblockade erreicht.

Sauen der Gruppe 3 und 4 (grau und orange unterlegt) wiesen vermehrt irreguläre Zyklen mit oder ohne ovarielle Zysten oder kein Follikelwachstum auf. Es ist davon auszugehen, dass diese Phänomene das Resultat der Wirkung der verabreichten Formulierungen sind. Eine Zyklusblockade wurde nicht erzielt.

Nur Sauen der Gruppe 1 (gelb unterlegt) wiesen eine Zyklusblockade auf, die ca. 3 - 5 Tage anhielt. Eine Sau hatte einen irregulären Zyklus mit Zysten.

Es ist zusammenzufassen, dass nur mit der Formulierung 1 eine Zyklusblockade erreicht wurde. Die Qualität dieser Blockade, d. h. Anzahl der Tiere mit Blockade und Synchronität deren Dauer, entspricht den Ergebnissen des ersten Projektes mit ebendieser Formulierung. Das Ziel einer Blockade über exakt 15 Tage bei allen behandelten Jungsauen wurde verfehlt.

5.3. Schlussfolgerungen

Der Leadkandidat aus Depot-Zyklus konnte somit in Depot-Zyklus II nicht verbessert werden. Gemäß Antrag und Bewilligungsbescheid zu Depot-Zyklus II waren folglich die Kriterien nicht erfüllt, um das Projekt fortzusetzen, sondern das Vorhaben musste abgebrochen werden. Endokrinologische Untersuchungen mit dem Ziel des „Fine-tuning“ eines verbesserten Kandidaten und nachfolgender Testung an einer randomisierten Jungsauenpopulation sind nicht erfolversprechend.

Tabelle 5-2: Ergebnisse des Effektes unterschiedlicher GnRH-Depotformulierungen auf den Beginn von Follikelwachstum (Foll-Wachstum) und Ovulation bei Jungsauen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe

Nr. in Gruppe	Formulierung	Sau-Nr.	Beginn Foll-Wachstum (d nach Behandlung)	Ovulation (d nach Behandlung)	Bemerkung
1	1	46	10	15	
2	1	47	13	19	
3	1	39	11	16	
4	1	28	Irregulär mit Zysten/keine Ovulation		
5	1	46	9	14	
1	2	23	15	19	irregulär
2	2	48	6	13	
3	2	29	7	11	
4	2	16	7	12	
5	2	36	6	11	
1	3	50	9	12	
2	3	37	11(?)	16	Irregulär
3	3	31	Kein Follikelwachstum		
4	3	17	8(?)	12(?)	Irregulär
5	3	19	?	17	Irregulär
1	4	19	Kein Follikelwachstum		
2	4	20	8	12	
3	4	38	Irregulär mit Zysten/keine Ovulation		
4	4	26	Irregulär mit Zysten/keine Ovulation		
5	4	45	7	12	
1	K	18	6	10	
2	K	33	8	12	
3	K	30	5	8	
4	K	44	6	9	
5	K	24	6	10	

**6. Aktivitäten der Veyx-Pharma GmbH,
PD Dr. Dr. habil. Zaremba**

- Arbeitspaket AP0: Projektmanagement

Um eine reibungslose und zeitnahe Abstimmung und Kommunikation mit den Partnern und dem eingebundenen Unterauftragnehmer zu gewährleisten, hatte Veyx-Pharma die Projektleitung übernommen. Darüber hinaus wurden von der Projektleitung alle anfallenden administrativen Aufgaben erledigt. In regelmäßigen Zeitabständen wurden Telefonkonferenzen und Treffen mit den 3 Partnern organisiert und durchgeführt.

In dem Berichtszeitraum wurden neben den oben aufgeführten Tätigkeiten vom Projektleiter folgende zum Teil sehr arbeitsaufwendige Aufgaben bewältigt:

- Patentanmeldung

Die bereits im vorherigen Projekt erfolgte, jedoch noch nicht abgeschlossene internationale Patentanmeldung machte die Beantwortung eingehender Fragen und Einwände erforderlich. Gemeinsam mit den Patentanwälten der Kanzlei Maikowski & Linnemann mussten umfangreiche Recherchen durchgeführt werden.

- Arbeitspaket AP1: Erstellung Studienprotokolle, Anzeige Tierversuche

„Begleitung und Beratung bei der Erstellung der Studienprotokolle für die präklinischen Tests einschließlich Genehmigungsverfahren“

Im Schwerpunkt sind die folgenden Aktivitäten erfolgt:

Unterstützung bei der Erstellung der Studienprotokolle für die präklinischen Untersuchungen mit den formstabilen Depotsuspensionen gemäß VICH-Richtlinie zur Guten klinischen Praxis für Tierarzneimittel. In den Studienprotokollen sind die Ziele der Studien festgesetzt und die Bedingungen, nach denen die Studien durchgeführt und geleitet werden, definiert. Die Studienprotokolle enthalten u. a. folgende Punkte: Ziele der Studien, Abfolge der Ereignisse, Studienaufbau, Tierausswahl und -identifikation, Tiermanagement und -haltung, Tierfutter, Behandlungen, Bestimmung der Wirksamkeit, Statistik, Handhabung der Aufzeichnungen, unvorhergesehene Ereignisse.

Unterstützung bei der Erstellung des Antrages auf Genehmigung eines Tierversuchsvorhabens nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes. Unterstützung bei der Beantwortung der im Genehmigungsverfahren aufgetretenen Fragen (Details siehe Universität Leipzig).

Erstellung des Antrages auf Festsetzung einer vorläufigen Wartezeit nach § 59 AMG (Wartezeiten bei Lebensmittel liefernden Tieren aus klinischen Studien) beim Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit für die in den präklinischen Versuchen zu verwendenden formstabilen Depotformulierungen.