

University of Groningen

Dry powder inhalation of biopharmaceuticals

Zijlstra, Gerrit

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2009

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Zijlstra, G. (2009). *Dry powder inhalation of biopharmaceuticals: from formulation to proof-of-concept*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

APPENDIX

Samenvatting

De snelle ontwikkelingen in de moleculaire biologie en biotechnologie van de afgelopen decennia hebben geleid tot de succesvolle introductie van een aantal biofarmaceutica, in het bijzonder therapeutische peptiden en eiwitten, op de geneesmiddelenmarkt. Biofarmaceutica zijn een speciale groep geneesmiddelen, omdat ze in het algemeen zowel chemisch als fysisch minder stabiel zijn dan de meeste kleine organisch gesynthetiseerde geneesmiddelmoleculen. Daarnaast zijn de meeste biofarmaceutica afhankelijk van een ruimtelijke structuur voor hun effectiviteit en veiligheid. Het behouden van die ruimtelijke structuur is daarom essentieel voor het ontwikkelen van effectieve en veilige producten. Zoals uitgelegd in de **algemene introductie** zijn een aantal biofarmaceutica (waaronder therapeutische eiwitten) uitstekend geschikt voor pulmonale toediening (inhalatie).

Het doel van de toediening per inhalatie kan het veroorzaken van een lokaal, lokaal en systemisch of alleen systemisch effect zijn. Er zijn verschillende typen inhalatoren beschikbaar om een aerosol te creëren. De aerosol kan worden gecreëerd vanuit een oplossing of een poeder. Wordt een aerosol gecreëerd vanuit een oplossing dan spreken we van verneveling. Verneveling is patiëntonvriendelijk, het kost veel tijd en vereist de beschikbaarheid van elektriciteit of perslucht. Daarnaast zijn de efficiëntie waarmee de aerosol wordt gecreëerd en de longdepositie slecht, waardoor relatief veel onnodig verlies optreedt. Een alternatief is de inhalatie van het geneesmiddel in poedervorm. Deze technologie kost minder dan een minuut voor volledige toediening. Daarnaast zijn de efficiëntie waarmee het aerosol wordt gecreëerd en de longdepositie in het algemeen hoger dan voor verneveling.

Omdat eiwitten vaak worden geproduceerd in waterige oplossingen vereist de toepassing in een droog poeder inhalator een droogstap. Die biofarmaceutica die afhankelijk zijn van hun tertiaire - lees: ruimtelijke - structuur voor hun activiteit, zoals eiwitten, moeten tijdens het droogproces worden gestabiliseerd. Hulpstoffen die aan de ene kant het eiwit fysiek fixeren en aan de andere kant de waterstofbruggen van het oplosmiddel kunnen vervangen zijn geschikt om biofarmaceutica te stabiliseren tijdens drogen en mogelijk ook tijdens opslag. Suikers zoals maltose, trehalose, sucrose en inuline, zijn voorbeelden van zulke hulpstoffen.

Verschillende droogmethoden zijn beschikbaar en enkele daarvan zijn in dit proefschrift beschreven: vriesdrogen, sproeidrogen en sproeivriesdrogen. Andere methoden, zoals bijvoorbeeld superkritische vloeistof extractie zouden ook in staat kunnen zijn om een poeder voor inhalatie in de juiste aerodynamische deeltjesgrootte te produceren.

Sproeivriesdrogen heeft als voordeel dat het eindproduct uit vaste deeltjes bestaat. Door gebruik te maken van de juiste procescondities kunnen deeltjes geproduceerd worden met de gewenste aerodynamische diameter tussen 1 en 5 μm . Sproeidrogen geeft ook de mogelijkheid een product met de gewenste aerodynamische grootte te produceren.

In dit proefschrift onderzochten wij in hoeverre biofarmaceutica verwerkt konden worden tot een droog poeder formulering. Daarnaast hebben we met een aantal producten een *proof-of-concept* studie uitgevoerd. Een aantal verschillende therapeutische peptiden en eiwitten hebben als modelstoffen gediend, die allen verschilden in mate van wateroplosbaarheid en molecuulgrootte. Daarnaast is een studie uitgevoerd met een stof die na inhalatie de lichaamseigen productie van een eiwit induceerde zodat de complexe formulering van een enzym kon worden vermeden.

In **Hoofdstuk 2** zijn drie verschillende productiemethoden vergeleken om een droog poeder formulering voor inhalatie te maken van cetorelix. Cetorelix is een hydrofiel peptide dat bestaat uit 10 aminozuren. Poeder met de gewenste deeltjesgrootte werd gemaakt via malen, sproeidrogen en sproeivriesdrogen. Alle methoden resulteerden in inhaleerbare deeltjes, maar de morfologie van de deeltjes verschilde per methode. Na verwerking van de poeders in adhesieve mengsels met lactose bleek dat het gesproeivriesdroogd poeder te fragiel was om de kinetische energie van de veel zwaardere lactosedeeltjes te weerstaan. De mengsels met gemalen en gesproeidroogd cetorelix werden in twee verschillende inhalatoren getest: een capsule-inhalator en de Novolizer. Deagglomeratie in de capsule-inhalator vindt plaats door de bewegende capsule, terwijl in de Novolizer een cycloon voor deagglomeratie zorgt middels botsingskrachten. *In vitro* testen toonden aan dat voor zowel de formulering met gemalen cetorelix en de formulering met gesproeidroogd cetorelix de Novolizer leidde tot efficiëntere deagglomeratie. Ook bleek dat naast het type inhalator, de morfologie van de deeltjes en daarmee de productiemethode van belang was:

gesproeidroogd cetorelix leidde in beide inhalatoren tot een hoger percentage deeltjes die geschikt zijn voor inhalatie. Dit onderzoek leerde ons dat het adequaat ontwikkelen van inhalatiesystemen vraagt om een duale aanpak, waarin de specifieke combinatie van de inhaler met de poederformulering geoptimaliseerd worden.

De **hoofdstukken 3 en 4** beschrijven een studie met een hydrofoob peptide, ciclosporine A (CsA). CsA is een slecht wateroplosbaar cyclisch peptide van 11 aminozuren. Per inhalatie toegediend CsA zou toegepast kunnen worden bij chronische afstoting van getransplanteerde longen, een aandoening waarvoor tot op heden geen goede therapeutische behandel mogelijkheden zijn. In **Hoofdstuk 3** verkenden wij het gebruik van de *solid dispersion* technologie om een inhalatie poeder van CsA te ontwikkelen. *Solid dispersions* werden bereid door CsA op te lossen in tertiair butyl alcohol (TBA) en te mengen met een oplossing van water en een wateroplosbare hulpstof, inuline. Door middel van sproeivriesdrogen konden we een homogeen poeder van CsA en inuline produceren. Van dit poeder werd de oplosnelheid, de dispersie van CsA door de inuline matrix en het aerosolisatie gedrag onderzocht.

De *solid dispersions* losten sneller op dan het fysieke mengsel van CsA met inuline. Met Fourier Transformatie Infrarood Spectroscopie (FTIR) werd onderzocht hoe CsA ingebed zat in de hydrofiele matrix door gebruik te maken van het feit dat de conformatie van CsA in de hydrofiele matrix anders is dan in een hydrofobe matrix. Aangetoond werd dat de gemiddelde conformatie van alle CsA moleculen afhankelijk was van het gehalte, waarbij lage gehalten een hoofdzakelijk hydrofiele conformatie kenden en hogere gehalten een meer en meer hydrofobe conformatie bezaten. Blijkbaar worden bij hogere gehalten meer en meer CsA moleculen geclusterd, mogelijk tot kleine deeltjes. Dit zou kunnen verklaren waarom de oplosnelheid afhankelijk was van het CsA gehalte in de *solid dispersion*.

Sproeivriesdrogen leidde tot deeltjes met een erg lage dichtheid en een erg hoog specifiek oppervlak van meer dan $100 \text{ m}^2/\text{gr}$. De deeltjes hadden een grote geometrische diameter, maar gecombineerd met de hoge porositeit resulteerde dit in een mediane aerodynamische diameter op gewichtsbasis (MMAD) van $3.39 \mu\text{m}$. Vanwege de goede oplosnelheid en de uitstekende aerosoliseringseigenschappen concludeerden wij dat de

CsA solid dispersion met een gehalte van 50% de juiste parameters bezat voor gebruik bij longtransplantatiepatiënten.

Hoofdstuk 4 beschrijft de *in vivo* eigenschappen in de rat van het in hoofdstuk 3 beschreven CsA poeder voor inhalatie (iCsA). **Hoofdstuk 4A** richt zich op de farmacokinetiek en effectiviteit in het voorkomen van afstoting in een experimenteel longtransplantatiemodel in ratten. De farmacokinetiek van 10 mg/kg iCsA in ratten, gegeven middels insufflatie werd vergeleken met 10 mg/kg Neoral, oraal toegediend. Neoral is het huidige, commercieel beschikbare product. Hoewel iCsA en Neoral tot een vergelijkbare systemische beschikbaarheid leidden, resulteerde iCsA in een 109 keer hogere spiegel in de long vergeleken met Neoral.

Om de effectiviteit van iCsA te bestuderen werd in een transplantatiemodel de mate van afstoting vergeleken met Neoral. Het gebruikte longtransplantatiemodel resulteerde in volledige afstoting binnen 8 dagen na transplantatie als gevolg van de incompatibiliteit van de donor en ontvanger. iCsA bleek bij lagere dosis dan Neoral al effectief. Echter, in de bestudeerde dosering (5 mg/kg) werden microscopische reacties in de long waargenomen. Daarom werd in **Hoofdstuk 4B** onderzocht of lagere doses, de hulpstof inuline of insufflatie zelf ook tot vergelijkbare reacties zouden leiden. Bij een dosering van 0,8 mg/kg iCsA, week het aantal abnormaliteiten niet af ten opzichte van placebo.

Hoewel in hoofdstuk 4A werd aangetoond dat in het proefdier iCsA doses lager dan 5 mg/kg niet effectief waren in het remmen van de afstoting, is de veiligheidsstudie met een dosering van 0,8 mg/kg wel degelijk relevant, omdat deze dosering boven de dosering ligt waarvan in mensen al is aangetoond dat zij na inhalatie effectief kan zijn.

Voor een persoon van 60 kg zou een dosis van ongeveer 0,1 mg/kg al een effect geven. Zelfs in een zo lage dosering zou de CsA spiegel in de long vele malen hoger worden dan wanneer alleen Neoral oraal zou worden toegediend. Tegelijkertijd zou de plasmaspiegel van CsA, welke is gerelateerd aan het optreden van bijwerkingen zoals nierschade, niet noemenswaardig hoeven te stijgen. Daarom zijn wij van mening dat de behandeling van longtransplantatiepatiënten met chronische afstoting sterk verbeterd zou kunnen worden door iCsA.

Hoofdstuk 5 beschrijft de mogelijkheden om recombinant humaan deoxyribonuclease I (rhDNase), een eiwit van 37 kDa, te formuleren als een poeder voor inhalatie. In **Hoofdstuk 6** worden de farmaco-economische aspecten van een dergelijk product beschreven en wordt een vergelijking gemaakt met de thans commercieel beschikbare verneveling (Pulmozyme, 1 mg/ml rhDNase, 2,5 ml).

Verschillende processtappen om een poeder voor inhalatie van rhDNase te ontwikkelen werden bestudeerd. Naast de keuze van de stabiliserende hulpstof werden ook de effecten van procescondities op de inhaleerbaarheid onderzocht. Daarnaast hebben we met de meest geschikte formulering een *ex vivo* test uitgevoerd om de geschiktheid van het concept aan te tonen.

Van de onderzochte hulpstoffen sucrose, trehalose en inuline bleek sucrose niet geschikt als hulpstof. Chemisch gezien bleek trehalose de beste stabilisator, omdat het aantal dimere aggregaten niet toenam tijdens de stabiliteitstudie. Vervolgens hebben we inuline en trehalose formuleringen gesproeidroogd en gesproeivriesdroogd bij verschillende procescondities. Sproeidrogen bleek het beste proces te zijn omdat deeltjes met een MMAD van 2,3 μm geproduceerd konden worden. Ook bleek dat de formulering met inuline als hulpstof bij kamertemperatuur bewaard kon worden, in tegenstelling tot trehalose. Dit was waarschijnlijk gerelateerd aan de hoge glastransitietemperatuur van 157°C van inuline. De inhalatie eigenschappen van de inuline formulering waren ook goed met een fijne deeltjesfractie (<5 μm) van ongeveer 40%. Daarom hebben we de effectiviteit van de inuline formulering getest met behulp van sputum van patiënten met cystische fibrose. Het bleek dat het poeder voor inhalatie significant zowel de viscositeit als de elasticiteit verlaagde. De conclusie was dat het goed mogelijk is om ook van grotere eiwitten als rhDNase een poeder voor inhalatie te ontwikkelen.

De in **Hoofdstuk 6** beschreven voordelen van droog poeder inhalatie ten opzichte van verneveling zijn *i)* een verbeterde therapietrouw, *ii)* een verbeterde longdepositie, *iii)* elektriciteit of perslucht zijn niet nodig, *iv)* een veel kortere toedieningstijd en *v)* de formulering hoeft niet gekoeld te worden. Deze voordelen zouden mogelijk kunnen leiden tot minder exacerbaties en ziekenhuisopnames. Daarmee zouden wellicht de kosten voor behandeling van cystische fibrose af kunnen nemen. De farmaco-economische analyse liet zien dat de kosten per gewonnen

levensjaar €19.110 zijn voor de verneveling, terwijl deze door de genoemde voordelen geschat worden op €12.100 voor de poederinhalatie. Dit betekent dat met droog poeder inhalatie ongeveer 40% lagere kosten gemaakt worden om eenzelfde effectiviteit te bereiken. Voor dure therapieën die een centrale rol spelen bij een therapie, zoals rhDNase bij cystische fibrose, kan het daarom nuttig zijn om in een vroegtijdig stadium te onderzoeken wat de farmaco-economische implicaties zijn van een bepaalde formuleringsstrategie.

In **Hoofdstuk 7** werd een alternatieve wijze onderzocht om een biofarmaceutische interventie tot stand te brengen: in plaats van een eiwit (enzym) te formuleren tot poeder voor inhalatie hebben we een natuurlijk substraat, een organisch molecuul, geformuleerd tot poeder voor inhalatie. Door het substraat toe te dienen in de longen wordt de lichaamseigen productie van het enzym geïnduceerd. Als modelsysteem hebben we heme oxygenase I (HO-1) als eiwit en als substraat hemine gebruikt, mede omdat in patiënten met chronisch obstructieve pulmonaire aandoening (COPD) was aangetoond dat dit enzymstelsel verlaagd is ten opzichte van gezonde vrijwilligers.

Vanwege de slechte oplosbaarheid van hemine bij pH 7 werd hemine opgelost in een alkalische oplossing die juist voor het sproeidrogen geneutraliseerd werd. Naast het formuleringsonderzoek werd ook een toedieningsmethode voor aerosolen aan kleine proefdieren onderzocht, waarbij de dieren door de natuurlijke ademhaling het aerosol inhaleren. Met het ontwikkelde hemine poeder hebben werd aangetoond dat het enzymstelsel op een dosisafhankelijke wijze kon worden geïnduceerd.

In dit hoofdstuk is aangetoond dat het ook mogelijk is om relatief simpele organische moleculen aan te bieden om een effect te bewerkstelligen wat gebaseerd is op een biofarmaceutische interventie. Het voordeel hiervan is dat er geen ingewikkelde formuleringen nodig zijn voor het betreffende eiwit. Daarnaast is een nieuwe toedieningsmethode van aerosolen geïntroduceerd. Deze methode is uniek omdat enerzijds iedere droogpoeder inhalator aangesloten zou kunnen worden, en anderzijds omdat de methode het mogelijk maakt vergelijkend onderzoek te doen met een aantal formuleringen in een vroegtijdig stadium van de ontwikkeling. Daarnaast maakt de methode gebruik van de natuurlijke ademhaling van de proefdieren om het poeder te inhaleren.

Tot slot, alle in dit proefschrift onderzochte geneesmiddelen konden worden geformuleerd als een poeder voor inhalatie. Afhankelijk van de eigenschappen van het specifieke molecuul konden we specifieke formuleringstechnologieën aanwenden om de ruimtelijke structuur te bewaren tijdens het droogproces, opslag en reconstitutie. In bepaalde gevallen zou men kunnen volstaan met aanbieden van een organisch molecuul zonder dat het biofarmaceutisch molecuul zelf geformuleerd hoeft te worden. Omdat de effectiviteit van de toediening per inhalatie afhankelijk is van de aerodynamische eigenschappen van de aerosol (en daarmee van het poeder), is er een noodzaak om deze eigenschappen in proefdieren te testen via de pulmonaire route. In dit proefschrift zijn insufflatie en blootstelling via de neus getest. Insufflatie is vooral geschikt voor studies waarin een kwantitatieve relatie met de dosering onderzocht wordt, zoals farmacokinetische studies, terwijl blootstelling via de neus gebruikt kan worden voor het vaststellen van een *proof-of-concept* en het vergelijken van aerodynamische eigenschappen van verschillende formuleringen.

