

Sprühgetrocknete Polylaktid, Poly(laktid-co-glykolid) Mikropartikel zur Steuerung der Freisetzung aus pulmonalen Arzneiformen

Dissertation zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften der  
Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Isabell Andrea Schöttle

Geboren in Pforzheim

Mainz, den 1.9.2006

Datum der mündlichen Prüfung: 1. September 2006,  
Institut für Pharmazie, Universität Mainz

Der Mensch hat 3 Wege, um zu lernen

Durch *Nachdenken*

- das ist der Edelste

Durch *Nachahmung*

- das ist der Leichteste

Durch *Erfahrung*

- das ist der Bitterste

(Konfuzius)

Für meine Eltern und meinen Bruder

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit vom September 2001 bis September 2005 am Institut für Pharmazie des Fachbereichs Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften der Johannes Gutenberg-Universität in Kooperation mit der Abteilung Drug Delivery der Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co KG in Ingelheim.

Bei allen, die zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben, möchte ich mich herzlich bedanken.

Ich möchte mich bei allen Kollegen der Firma Boehringer Ingelheim für die angenehme Zusammenarbeit, für fachspezifische Diskussionen und Unterstützung bei der Einführung in unterschiedliche analytische Messtechniken bedanken.

Der Firma Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co KG danke ich für die finanzielle Unterstützung durch Bereitstellung eines Stipendiums.

Der Core Facility der Uniklinik Mainz danke ich sehr für die Unterstützung bei der Durchführung der Zell- und Tierversuche.

Mein Dank gilt den Mitarbeitern unseres Arbeitskreises.

Meinen Eltern und meinem Bruder widme ich diese Arbeit. Ich danke Euch besonders herzlich dafür, dass ihr immer für mich da seid und mich stets mit viel Kraft unterstützt.

<b>1</b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b>	<b><u>15</u></b>
1.1	<b>PULMONALE APPLIKATION</b>	<b>15</b>
1.1.1	AEROSOLTHERAPIE	15
1.2	<b>MIKROPARTIKEL</b>	<b>16</b>
1.2.1	PLA-, PLGA-MIKROPARTIKEL	16
1.2.2	ARZNEISTOFFEINSCHLUSS IN MIKROPARTIKELN	19
1.2.3	HERSTELLUNG VON (POLYMER-) MIKROPARTIKELN	19
1.2.4	FREISETZUNGSMECHANISMEN VON ARZNEISTOFFEN AUS POLYMER- MIKROPARTIKELN	23
1.2.5	CHARAKTERISIERUNG VON MIKROPARTIKELN	24
1.3	<b>MIKROPARTIKEL-AEROSOLE</b>	<b>24</b>
1.3.1	TOXIZITÄT VON PLA, PLGA MIKROPARTIKEL AEROSOLEN	25
1.4	<b>PULMONALES TARGETING</b>	<b>26</b>
1.5	<b>THERAPEUTISCHE ANSÄTZE</b>	<b>26</b>
1.5.1	ERKRANKUNGEN DER ATEMWEGE UND THERAPIE DES ASTHMA BRONCHIALE	26
1.5.2	NEUE INDIKATIONEN FÜR DIE PULMONALE APPLIKATION	27
1.5.3	NEUE INDIKATIONEN VON IMPLANTEN AUF PLA, PLGA BASIS	28
1.6	<b>AUFBAU UND FUNKTION DER LUNGE</b>	<b>30</b>
1.7	<b>BIOPHARMAZIE PULMONALER ARZNEIFORMEN</b>	<b>31</b>
1.7.1	DEPOSITIONSVERHALTEN	33
1.7.2	ZUSAMMENHANG ZWISCHEN DEPOSITION UND ATEMMANÖVER	35
1.7.3	IN-VITRO CHARAKTERISIERUNG DER PULMONALEN DEPOSITION	36
1.7.4	IN-VIVO CHARAKTERISIERUNG DER PULMONALEN DEPOSITION	36
1.7.5	APPLIKATIONSFORMEN FÜR DIE PULMONALE THERAPIE	37
1.7.6	BIOÄQUIVALENZ PULMONALER ZUBEREITUNGEN	41
1.7.7	PULMONALE SYSTEMISCHE THERAPIE	42
1.7.8	DAS RICHTIGE DEVICE FÜR DEN JEWEILIGEN PATIENTEN UND DIE ZUGRUNDELIEGENDE KRANKHEIT	43
1.8	<b>METHODEN ZUR CHARAKTERISIERUNG VON MIKROPARTIKELN</b>	<b>44</b>
1.9	<b>CHARAKTERISIERUNG DER MIKROPARTIKELEIGENSCHAFTEN MITTELS ZELLVERSUCHEN</b>	<b>50</b>
1.10	<b>BEDEUTUNG DER T-HELPER-ZELLEN BEIM ASTHMA BRONCHIALE</b>	<b>52</b>
1.11	<b>BEDEUTUNG DER INTERLEUKINE BEIM ASTHMA BRONCHIALE</b>	<b>54</b>
1.12	<b>ATEMWEGSGEOMETRIE DER MÄUSE</b>	<b>56</b>
<b>2</b>	<b><u>ZIELSETZUNG</u></b>	<b><u>58</u></b>
<b>3</b>	<b><u>MATERIALIEN UND METHODEN</u></b>	<b><u>60</u></b>
3.1	<b>MATERIALIEN</b>	<b>60</b>
3.1.1	WIRKSTOFFE	60
3.1.2	HILFSSTOFFE	63
3.1.3	GERÄTE	65
3.2	<b>METHODEN</b>	<b>65</b>
3.2.1	PROBENVORBEREITUNG: HERSTELLUNG DER LÖSUNG, SUSPENSION UND DER EMULSION FÜR DIE SPRÜHTROCKNUNG	65
3.2.2	SPRÜHTROCKNUNG	67
3.2.3	PULVERCHARAKTERISIERUNG	67
3.3	<b>ZELLVERSUCH MIT DER MURINEN ZELLINIE RAW 264.7</b>	<b>72</b>
3.4	<b>TIERVERSUCHE</b>	<b>72</b>

---

<b>4</b>	<b><u>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</u></b>	<b><u>78</u></b>
<b>4.1</b>	<b>METHODENENTWICKLUNG FÜR DIE SPRÜHTROCKNUNG</b>	<b>78</b>
4.1.1	SPRÜHEINBETTUNG VON BUDESONID	78
4.1.2	SPRÜHEINBETTUNG VON SALBUTAMOL	86
4.1.3	SPRÜHEINBETTUNG VON SALBUTAMOLSULFAT	86
<b>4.2</b>	<b>CHARAKTERISIERUNG DER SPRÜHGETROCKNETEN MIKROPARTIKEL</b>	<b>87</b>
4.2.1	CHARAKTERISIERUNG (LASERDIFFRAKTOMETRIE) UND PULVERMORPHOLOGIE (REM)	87
4.2.2	BEURTEILUNG DER KRISTALLINITÄT	101
4.2.3	OBERFLÄCHENUNTERSUCHUNGEN MITTELS DER BET-METHODE	119
4.2.4	BESTIMMUNG DES ARZNEISTOFFGEHALTS IN DEN MIKROPARTIKELN	124
4.2.5	ENTWICKLUNG EINER FREISETZUNGSMETHODE FÜR BUDESONID AUS MIKROPARTIKELN	127
<b>4.3</b>	<b>ZELLVERSUCHE</b>	<b>144</b>
<b>4.4</b>	<b>TIERVERSUCHE</b>	<b>146</b>
4.4.1	ÜBERPRÜFUNG DER LUNGENFUNKTION	146
4.4.2	ENTNAHME VON CD4+ MILZZELLEN ZUR ÜBERPRÜFUNG DER ZELLENTWICKLUNG IN DEN VERSCHIEDENEN ZELLZYKLEN	151
<b>5</b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</u></b>	<b><u>152</u></b>
<b>6</b>	<b><u>ANHANG</u></b>	<b><u>157</u></b>
<b>7</b>	<b><u>LITERATURVERZEICHNIS</u></b>	<b><u>173</u></b>

---

 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
BET-Oberfläche	spezifische Bestimmung Oberfläche nach Brunauer, Emmet und Teller
CFC	Chlorfluorcarbon
CMC	kritische Mizellbildungskonzentration
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPI	Dry Powder Inhaler (Trockenpulverinhalator)
DSC	Dynamische Wärmestrom Differenz Kalorimetrie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FCKW	Fluorchlorkohlenwasserstoffe
g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
HFKW	Fluorkohlenwasserstoff
HFA	Hydrofluoralkane
i.n.	intranasale Verabreichung
i.p.	intraperitoneale Verabreichung
LPS	Lipopolysaccharid
Min	Minuten
PLA	Polylaktid
PLGA	Poly(laktid-co-glykolid) 50:50
PLGA II	Poly(laktid-co-glykolid) 75:25
pMDI	pressurized Metered Dose Inhaler (treibgasbetriebenes Dosieraerosol)
REM	Rasterelektronenmikroskop
R-PLGA	R-Konfiguration von PLGA
s.-d.	sprühgetrocknet
Std.	Stunden
Tab.	Tabelle
Tg	Glasübergangstemperatur
U/min	Umdrehungen pro Minute
w/o	Wasser in Öl Emulsion
X <sub>50</sub>	50 % des Partikelgesamtvolumens besteht aus Teilchen, deren Durchmesser kleiner oder gleich dem angegebenen Wert sind



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Schematischer Aufbau eines Büchi Sprühtrockners .....	22
Abbildung 1.2 In-vitro Freigabemechanismen aus Polymer-Mikropartikeln .....	24
Abbildung 1.3 Resorbierbare Lendenwirbelimplantate (HYDROSORB™ Telamon) .....	28
Abbildung 1.4 Resorbierbare Folien.....	29
Abbildung 1.5 Anatomischer Aufbau und Funktion der Lunge .....	30
Abbildung 1.6 Unterteilung der Lunge in zentrale, intermediäre und periphere Bereiche .....	32
Abbildung 1.7 Zusammenhang zwischen pulmonaler Deposition und Partikelgröße .....	35
Abbildung 1.8 Szintigraphische Aufnahmen der Lungendeposition von Dosieraerosol, Dosieraerosol mit Spacer und Trockenpulverinhalator.....	37
Abbildung 1.9 Respimat™ .....	38
Abbildung 1.10 Seruminsulinkonzentration bei verschiedenen Applikationswegen.....	42
Abbildung 1.11 Entscheidungshilfe für das geeignete Inhalationssystem.....	43
Abbildung 1.12 Schematischer Längsschnitt eines Laserdiffraktometers .....	45
Abbildung 1.13 DSC .....	46
Abbildung 1.14 Anwendung des Braggschen Gesetzes bei Strahlenreflexion an Kristalloberflächen .....	47
Abbildung 1.15 Prinzip des Röntgenstrahlverlaufs in einem Röntgenpulverdiffraktometer....	48
Abbildung 1.16 Übersicht über die Signalkaskade des TLR4 Rezeptors und anderen TLRs .....	51
Abbildung 1.17 Signalkaskade des TLR 4 Rezeptors .....	52
Abbildung 1.18 Immunopathogenese von Asthma bronchiale .....	53
Abbildung 1.19 Interleukin-6 Rezeptor .....	54
Abbildung 1.20 Auswirkung der Steroide auf die IL-6 Produktion .....	55
Abbildung 1.21 IL-6 produzierende Zellen in der Lunge .....	55
Abbildung 1.22 Vergleich der vorhergesagten Partikeldeposition von Balb/c-und B6C3F <sub>1</sub> - Mäusen der Atemwegsgenerationen 1 bis 6 .....	57
Abbildung 3.1 Strukturformel von Budesonid .....	60
Abbildung 3.2 Strukturformel von Salbutamol .....	62
Abbildung 3.3 Strukturformel von Salbutamolsulfat .....	63
Abbildung 3.4 Poly(D,L-laktid).....	63
Abbildung 3.5 Polyglykolid .....	64
Abbildung 3.6 Poly(D,L-laktid-co-glykolid).....	64
Abbildung 3.7 Schematische Übersicht der Verabreichung von OVA-Aerosol .....	74
Abbildung 4.1 Parametereinflüsse des Sprühtrockners für maximale Ausbeute (PLGA) .....	79
Abbildung 4.2 Parametereinflüsse des Sprühtrockners für maximalen Feinpartikelanteil (PLGA).....	80
Abbildung 4.3 Parametereinflüsse des Sprühtrockners für die Teilchengrößenverteilung (PLGA).....	81
Abbildung 4.4 Parametereinflüsse des Sprühtrockners für maximale Ausbeute (PLA) .....	82
Abbildung 4.5 Parametereinflüsse des Sprühtrockners für maximalen Feinpartikelanteil (PLA) .....	83
Abbildung 4.6 Parametereinflüsse für die Teilchengrößenverteilung (PLA).....	84
Abbildung 4.7 Volumenbezogene Partikelgröße $x_{50}$ der sprühgetrockneten Budesonid- Polymer Einbettungen .....	87
Abbildung 4.8 Feinpartikelanteil Q(5,8) der sprühgetrockneten Budesonid-Polymer Mischungen .....	88
Abbildung 4.9 A: Sprühgetrocknete Mikropartikel mit 4,8 % Budesonid in PLA B: Sprühgetrocknete Mikropartikel mit 4,8 % Budesonid in PLGA II C: Sprühgetrocknete	

Mikropartikel mit 4,8 % Budesonid in PLGA D: Querschnittsfläche eines sprühgetrockneten Partikels (4,8 % Budesonid in PLGA) .....	89
Abbildung 4.10 Solider PLA-Mikropartikel mit 20 % Budesonid .....	90
Abbildung 4.11 A: Sprühgetrocknete Mikropartikel mit 44,4 % Budesonid in PLA B: Sprühgetrocknete Mikropartikel mit 44,4 % Budesonid in PLGA II C: Sprühgetrocknete Mikropartikel mit 44,4 % Budesonid in PLGA .....	90
Abbildung 4.12 Sprühgetrocknetes Budesonid ohne Zusatz von Polymeren .....	91
Abbildung 4.13 A: Sprühgetrocknetes PLA ohne Arzneistoff B: Sprühgetrocknetes PLGA II ohne Arzneistoff C: Sprühgetrocknetes PLGA ohne Arzneistoff .....	92
Abbildung 4.14 Volumenbezogene Partikelgröße $x_{50}$ der sprühgetrockneten Salbutamol- und Salbutamolsulfat Polymer Mischungen .....	93
Abbildung 4.15 Feinpartikelanteil Q (5,8) [%] der sprühgetrockneten Salbutamol- und Salbutamolsulfat-Polymer Mischungen .....	94
Abbildung 4.16 A: Sprühgetrocknete Mikropartikel mit 4,8 % Salbutamol in PLA B: Sprühgetrocknete Mikropartikel mit 4,8 % Salbutamol in PLGA C: Sprühgetrocknete Mikropartikel mit 4,8 % Salbutamol in PLGA II .....	95
Abbildung 4.17 A: Sprühgetrocknete Mikropartikel mit 9,1 % Salbutamol in PLA B: Sprühgetrocknete Mikropartikel mit 9,1 % Salbutamol in PLGA C: Sprühgetrocknete Mikropartikel mit 9,1 % Salbutamol in PLGA II .....	96
Abbildung 4.18 A und B: Sprühgetrocknetes Salbutamol ohne Zusatz von Polymeren .....	96
Abbildung 4.19 A: Sprühgetrocknete Mikropartikel mit 4,8 % Salbutamolsulfat in PLA B: Sprühgetrocknete Mikropartikel mit 4,8 % Salbutamolsulfat in PLGA C: Sprühgetrocknete Mikropartikel mit 4,8 % Salbutamolsulfat in PLGA II .....	98
Abbildung 4.20 A: Sprühgetrocknete Mikropartikel mit 9,1 % Salbutamolsulfat in PLA B: Sprühgetrocknete Mikropartikel mit 9,1 % Salbutamolsulfat in PLGA C: Sprühgetrocknete Mikropartikel mit 9,1 % Salbutamolsulfat in PLGA II .....	99
Abbildung 4.21 Sprühgetrocknetes Salbutamolsulfat ohne Zusatz von Polymeren .....	100
Abbildung 4.22 A 9,1 % Salbutamol mit PLGA B 4,8 % Salbutamolsulfat mit PLGA .....	100
Abbildung 4.23 DSC-Scan von Budesonid vor und nach der Sprühtrocknung .....	101
Abbildung 4.24 DSC-Scan von PLA vor und nach der Sprühtrocknung .....	102
Abbildung 4.25 DSC-Scan nach 3-fachem Erhitzen der Glasstufe des sprühgetrockneten PLA .....	102
Abbildung 4.26 DSC-Scan von nicht sprühgetrocknetem und sprühgetrocknetem PLGA ...	103
Abbildung 4.27 DSC-Scan nach 3-fachem Erhitzen der Glasstufe des sprühgetrockneten PLGA .....	104
Abbildung 4.28 DSC-Scan von nicht sprühgetrocknetem und sprühgetrocknetem PLGA II	104
Abbildung 4.29 DSC-Scan nach 3-fachem Erhitzen der Glasstufe des sprühgetrockneten PLGA II .....	105
Abbildung 4.30 DSC-Scan von s.-d. Budesonid, s.-d. PLA und s.-d. Mischung von 44 % Budesonid mit PLA .....	106
Abbildung 4.31 DSC-Scans der Sprüheinbettungen von 4,8 %, 9,1 %, 20 %, 30 %, 44,4 % Budesonid mit PLA .....	107
Abbildung 4.32 DSC-Scan von s.-d. Budesonid, s.-d. PLGA und Sprüheinbettung von 44 % Budesonid mit PLGA .....	108
Abbildung 4.33 DSC-Scans der Sprüheinbettungen von 4,8 %, 9,1 %, 20 %, 30 %, 44 % Budesonid mit PLGA .....	108
Abbildung 4.34 DSC-Scan von s.-d. Budesonid, s.-d. PLGA II und Sprüheinbettung von 44 % Budesonid mit PLGA II .....	109
Abbildung 4.35 DSC-Scans der Sprüheinbettungen von 4,8 %, 9,1 %, 20 %, 30 %, 44 % Budesonid mit PLGA II .....	110
Abbildung 4.36 DSC-Scan von nicht sprühgetrocknetem und sprühgetrocknetem Salbutamol .....	111
Abbildung 4.37 DSC-Scan von nicht sprühgetrocknetem und sprühgetrocknetem Salbutamolsulfat .....	111
Abbildung 4.38 DSC-Scan der Sprüheinbettungen von 4,8 % und 9,1 % Salbutamol und Salbutamolsulfat mit PLA .....	112

Abbildung 4.39 DSC-Scan der Sprüheinbettungen von 4,8 % und 9,1 % Salbutamol und Salbutamolsulfat mit PLGA.....	113
Abbildung 4.40 DSC-Scan der Sprüheinbettungen von 4,8 % und 9,1 % Salbutamol und Salbutamolsulfat mit PLGA II.....	114
Abbildung 4.41 Röntgendiffraktometrischer Scan von sprühgetrocknetem Budesonid und sprüheingebettetem Budesonid (4,8 %) mit PLA, PLGA und PLGA II .....	115
Abbildung 4.42 Röntgendiffraktometrischer Scan von sprühgetrocknetem Budesonid und sprüheingebettetem Budesonid (44 %) mit PLA, PLGA und PLGA II .....	116
Abbildung 4.43 Zusammenstellung der röntgendiffraktometrischen Untersuchung von Salbutamol und Salbutamol mit PLA, PLGA und PLGA II. Die Konzentration von Salbutamol im jeweiligen Polymer betrug 4,8 % .....	117
Abbildung 4.44 Zusammenstellung der röntgendiffraktometrischen Untersuchung von Salbutamolsulfat und Salbutamolsulfat mit PLA, PLGA und PLGA II. Die Konzentration von Salbutamolsulfat im jeweiligen Polymer betrug 4,8 % .....	118
Abbildung 4.45 BET Oberfläche [m <sup>2</sup> /g] der sprühgetrockneten Budesonid-Polymer Mikropartikel .....	119
Abbildung 4.46 BET Oberflächen [m <sup>2</sup> /g] der sprühgetrockneten Einzelsubstanzen .....	121
Abbildung 4.47 Vergleich der BET Oberflächen [m <sup>2</sup> /g] von 4,8 % und 9,1 % Salbutamol mit PLA, PLGA und PLGA II.....	122
Abbildung 4.48 Vergleich der BET Oberflächen [m <sup>2</sup> /g] von 4,8 % und 9,1 % Salbutamolsulfat mit PLA, PLGA und PLGA II.....	123
Abbildung 4.49 Vergleich der Freisetzungskurven von PLGA Spüheinbettungen mit 20 % [A] und 30 % [B] Budesonid in Medium mit 1 % und 2 % Surfactantanteil .....	129
Abbildung 4.50 Vergleich der Freisetzungskurven von PLA Spüheinbettungen mit 20 % [A] und 30 % [B] Budesonid in Medium mit 0,5 %, 1 % und 2 % Surfactantanteil .....	130
Abbildung 4.51 Vergleich der Freisetzungskurven von PLGA II Spüheinbettungen mit 20 % [A] und 30 % [B] Budesonid in Medium mit 1 % und 2 % Surfactantanteil.....	132
Abbildung 4.52 Vergleich der Freisetzung von Mikropartikeln mit 9,1 % Budesonid mit PLA, PLGA und PLGA II .....	133
Abbildung 4.53 Freisetzungskurven von 4,8 %, 9,1 %, 20 %, 30 % und 44,4 % Budesonid mit PLGA in Medium .....	135
Abbildung 4.54 Freisetzungskurven von 4,8 %, 9,1 %, 20 %, 30 % und 44,4 % Budesonid mit PLA in Medium .....	137
Abbildung 4.55 Freisetzungskurven von 4,8 %, 9,1 %, 20 %, 30 % und 44,4 % Budesonid mit PLGA II in Medium .....	138
Abbildung 4.56 Vergleich der Freisetzung von PLA-, PLGA- und PLGA II-Mikropartikeln mit 4,8 % Salbutamol in Medium .....	139
Abbildung 4.57 Vergleich der Freisetzung von PLA-, PLGA- und PLGA II-Mikropartikeln mit 9,1 % Salbutamol in Medium .....	140
Abbildung 4.58 Vergleich der Freisetzung von PLA-, PLGA- und PLGA II-Mikropartikeln mit 4,8 % Salbutamolsulfat in Medium .....	142
Abbildung 4.59 Vergleich der Freisetzung von PLA-, PLGA- und PLGA II-Mikropartikeln mit 9,1 % Salbutamolsulfat in Medium .....	143
Abbildung 4.60 Mikroskopische Aufnahmen der PLGA-Mikropartikel mit und ohne 9,1 % Budesonid.....	144
Abbildung 4.61 Mikroskopische Aufnahme der im Medium suspendierten Mikropartikel ....	144
Abbildung 4.62 A Zellversuch der Konzentration 10 <sup>-6</sup> M B Zellversuch der Konzentration 10 <sup>-7</sup> M C Zellversuch der Konzentration 10 <sup>-8</sup> M D Zellversuch der Konzentration 10 <sup>-9</sup> M.....	145
Abbildung 4.63 Penh 24 h nach letzter intranasaler Verabreichung von Budesonid, PLGA und der sprühgetrockneten Mischung von Budesonid und PLGA, sowie dem Medium (RPMI). .....	146
Abbildung 4.64 Messung des Atemwiderstandes RI an Tag 5 nach letzter intranasaler Verabreichung von Budesonid, PLGA und der sprühgetrockneten Mischung von Budesonid und PLGA, sowie dem Medium (RPMI).....	147

---

Abbildung 4.65 Penh 24 h nach letzter intraperitonealer Verabreichung von Budesonid, PLGA und der sprühgetrockneten Mischung von Budesonid und PLGA, sowie dem Medium (RPMI) .....	148
Abbildung 4.66 Messung des Atemwiderstandes RI an Tag 5 nach letzter intraperitonealer Verabreichung von Budesonid, PLGA und der sprühgetrockneten Mischung von Budesonid und PLGA, sowie dem Medium (RPMI).....	149
Abbildung 4.67 IL-6 Produktion in der BALF, 24 h nach letzter Antigenexposition .....	150
Abbildung 4.68 Proliferation von CD4+ Zellen nach Behandlung mit Medium, Budesonid, Dexamethason und der PLGA-Sprüheinbettung mit 9,1 % Budesonid, dargestellt nach Zellzyklen.....	151

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 Stufenplan zur Behandlung des Asthma bronchiale.....	27
Tabelle 1.2 Beispiele von Arzneistoffen, die in pulmonalen Arzneiformen appliziert werden	33
Tabelle 1.3 Hilfsstoffe, die in Dosieraerosolen Verwendung finden und fanden .....	39
Tabelle 1.4 Vergleich der Lungendeposition von Budesonid mit verschiedenen Inhalationsgeräten .....	41
Tabelle 1.5 Typischer Weg der tracheobronchialen Geometrie der Generationen 1 bis 6 für Balb/c Mäuse .....	56
Tabelle 3.1 Häufig verwendete Chemikalien und Medien .....	64
Tabelle 3.2 Behandlungsprotokoll des in-vivo Versuchs mit Balb/c Mäusen zur Überprüfung der Lungenfunktion.....	73
Tabelle 3.3 Behandlungsprotokoll des in-vivo Versuchs an Balb/c Mäusen zur Untersuchung der Proliferation .....	77
Tabelle 4.1: Faktorial design Versuche .....	79
Tabelle 4.2 Versuchsplanung der Sprühtrocknungsversuche mit Budesonid .....	85
Tabelle 4.3 Reproduzierbarkeit der Sprühtrocknung.....	85
Tabelle 4.4 Versuchsplanung der Sprühtrocknungsversuche mit Salbutamol .....	86
Tabelle 4.5 Versuchsplanung der Sprühtrocknungsversuche mit Salbutamolsulfat .....	86
Tabelle 4.6 Vergleich der Partikelgrößen $x_{50}$ vom Auffangbecher und Zyklon des Sprühtrockners .....	88
Tabelle 4.7 Vergleich der gemessenen Glasübergangstemperaturen [C] der Polymere mit Literaturwerten.....	105
Tabelle 4.8 Vergleich der gemessenen Schmelzpunkte von Salbutamol und Salbutamolsulfat mit Literaturwerten.....	112
Tabelle 4.9 Ergebnisse der Röntgenpulverdiffraktometrie der Sprüheinbettungen von 4,8 % und 44,4 % Budesonid mit den Polymeren PLA, PLGA und PLGA II .....	116
Tabelle 4.10 Ergebnisse der röntgendiffraktometrischen Bestimmung von Salbutamol Reinsubstanz nach Sprühtrocknung aus wässriger Lösung sowie von Sprüheinbettungen von Salbutamol (4,8 %) in PLA, PLGA und PLGA II aus organischen Lösungen mit Dichlormethan.....	118
Tabelle 4.11 Ergebnisse der röntgendiffraktometrischen Bestimmung von Salbutamolsulfat Reinsubstanz nach Sprühtrocknung aus wässriger Lösung sowie von Sprüheinbettungen von Salbutamolsulfat (4,8 %) in PLA, PLGA und PLGA II aus einer w/o Emulsion .....	119
Tabelle 4.12 Mittlere Teilchengröße $x_{50}$ [ $\mu\text{m}$ ] von 4,8 % und 9,1 % Budesonid mit PLA, PLGA und PLGA II .....	120
Tabelle 4.13 Mittlere Teilchengröße $x_{50}$ [ $\mu\text{m}$ ] von 4,8 % und 9,1 % Budesonid mit PLA, PLGA und PLGA II im Vergleich zur gemessenen BET-Oberfläche.....	120
Tabelle 4.14 Mittlere Teilchengröße $x_{50}$ [ $\mu\text{m}$ ] von sprühgetrocknetem Budesonid, Salbutamol und Salbutamolsulfat sowie von PLA, PLGA und PLGA II und BET-Oberfläche .....	122
Tabelle 4.15 Mittlere Partikelgrößen $x_{50}$ [ $\mu\text{m}$ ] von 4,8 % und 9,1 % Salbutamol und Salbutamolsulfat mit PLA, PLGA und PLGA II .....	124
Tabelle 4.16 Ergebnisse der Gehaltsbestimmung von PLA-Mikropartikeln mit Budesonid .	125
Tabelle 4.17 Ergebnisse der Gehaltsbestimmung von PLGA II-Mikropartikeln mit Budesonid .....	125
Tabelle 4.18 Ergebnisse der Gehaltsbestimmung von PLGA-Mikropartikeln mit Budesonid .....	125

---

Tabelle 4.19 Gehaltsbestimmung von 9,1 % Salbutamol und Salbutamolsulfat mit PLGA, PLA und PLGA II .....	127
Tabelle 4.20 Partikelgrößen [ $\mu\text{m}$ ] der PLGA-Mikropartikel mit und ohne 9,1 % Budesonid .	144

# 1 Einleitung

## 1.1 Pulmonale Applikation

Inhalationen, die im Altertum bekannt waren und angewendet wurden, sind medizinische Behandlungen der Atemwege mittels Einatmen von Dämpfen und Gasen (12). Die pulmonale Applikation von Wirkstoffen hat vor allem in der zweiten Hälfte des vergangenen Jahrhunderts einen enormen Aufschwung erfahren. Standen zunächst Wirkstoffe nur gelöst über elektrische Vernebler für die Inhalationsbehandlung zur Verfügung, wurde die Therapie von Atemwegserkrankungen durch die Einführung von druckgasbetriebenen Dosieraerosolen in den 50er Jahren revolutioniert. Die Einzeldosen waren seit jener Zeit reproduzierbar abmessbar und erleichterten dadurch die Applikation (151). Bei der Entwicklung fester Arzneiformen für die pulmonale Pulverapplikation ist bislang nur unzureichend untersucht, ob sich mittels pharmazeutisch-technologischer Verfahren (z.B. der Mikroverkapselung) und unter Anwendung biokompatibler pharmazeutischer Hilfsstoffe eine Steuerung der Wirkstofffreisetzung erzielen lässt. So ließe sich beispielsweise eine Verzögerung der Wirkstofffreigabe zur Erzielung eines Retardeffekts nach pulmonaler Applikation therapeutisch ausnutzen, um damit die Applikationsfrequenz von Inhalationsarzneimitteln zu senken. Ein verbreitetes Problem betrifft mehrere Arzneistoffe, die für die Behandlung von Atemwegserkrankungen entwickelt wurden: Sie werden zu schnell über das Lungenepithel transportiert, was die Wahrscheinlichkeit reduziert, dass eine ausreichende Anzahl Moleküle mit den Zielrezeptoren interagieren kann. Um dies zu kompensieren, werden höhere Dosen appliziert, was wiederum zu einer erhöhten systemischen Belastung mit unerwünschten Nebeneffekten führt. So werden viele potente Arzneistoffe von der weiteren Forschung und Entwicklung ausgeschlossen. Ein wirkungsvollerer Ansatz wäre, die Arzneistoffe auf einem konstant niedrigen Level in der Lunge zu halten, was Blutspiegelspitzen vermeiden würde, der Blutspiegel würde lange Zeit im therapeutischen Bereich gehalten werden und gleichzeitig würden sich vielseitige Möglichkeiten der Therapie bieten (2). Hierbei zählen Mikropartikel aus Polymilchsäure (PLA) und Polylactid-co-glykolid (PLGA) zu den Aussichtsreichen, da sie einen rückstandsfreien pulmonalen Abbau gewährleisten, biokompatibel sind und sich mit ihnen die Freigabegeschwindigkeit steuern lässt.

### 1.1.1 Aerosoltherapie

Aerosole sind zweiphasige kolloid-disperse Systeme bestehend aus Partikeln und einem Gas. Man unterscheidet Nebelaerosole des Typs flüssig-gasförmig und Staubaerosole des Typs fest-gasförmig. In der Pharmazie werden Aerosole unterschieden in Inhalations-, Nasen-, Desinfektions-, Suspensions- und Lösungssprays. Voraussetzung, um eine effektive inhalative Therapie zu gewährleisten, ist die Lungengängigkeit der applizierten Partikel. Der pulmonale Applikationsweg ist aus pharmazeutischer Sicht vielversprechend (24). Die Verabreichung von Medikamenten per inhalationem hat entweder zum Ziel, die Organe des Respirationstraktes lokal zu therapieren, oder die Resorptionsfähigkeit der Lunge für die systemische Wirkstoffzufuhr zu nutzen. Mit vielen Darreichungsformen wird eine rein topische Wirkung im Respirationstrakt angestrebt. In diesem Falle kann, da Zielort und Wirkort identisch sind, die applizierte Arzneistoffmenge gesenkt und unerwünschte

systemische Nebenwirkungen vermindert werden. Im Gegensatz hierzu sollen Arzneistoffe, die nicht lokal im Respirationstrakt wirken, sondern für die die Lunge als parenterale Eintrittspforte in den Körper dient, schnell aus der Lunge in den systemischen Kreislauf übertreten (19). Die große Oberfläche der Lunge von etwa 70 m<sup>2</sup> und die weniger als 1 µm dicke alveokapilläre Membran (65, 161) gewährleisten insbesondere für lipophile Stoffe eine schnelle Diffusion in das die Lungekapillaren durchströmende Blut und damit eine rasche systemische Verfügbarkeit. Zusätzlich macht der fehlende First-pass-Effekt die Inhalationstherapie besonders interessant, da die Aktivität der metabolisierenden Enzyme vergleichsweise sehr gering ist (80, 95). Die Aufnahme von Arzneistoffen aus der Lunge ist deswegen meist schnell und effizient verglichen mit der nasalen und oralen Applikation (76, 160). Zu den Beschränkungen der Inhalationstherapie zählt die Voraussetzung, dass die eingesetzten Arzneistoffe eine hohe therapeutische Breite besitzen sollten. Nur ca. 10 – 15 % der Aerosoldosis gelangen in die Alveolen, bedingt durch Verluste am Inhalator und der Deposition im Mund- Rachenraum.

Aufgrund des FCKW Verbots gewinnen Pulverinhalatoren, neben den ozonfreundlichen, chlorfreien Aerosolen mehr an Bedeutung. Vorteile von Pulverinhalatoren sind die Umweltfreundlichkeit und die atemzuginduzierte Mobilisation der Wirkstoffe. Unterschiede bei den verschiedenen Pulverinhalationssystemen bestehen in der Formulierung, der Dosierungsart und der Gestaltung des Inhalators (Device). Im Spinhaler™ und im Handihaler™ werden einzelne Pulverdosen in Kapseln abgepackt appliziert, im Diskus™ und im Diskhaler™ erfolgt die Dosierung mittels abgeteilten Pulvern in Blistern. Diese Art der Dosierung wird als pre-metered-multiple-Dose bezeichnet. Der Easyhaler™ ist ein multiple-Dose Gerät. Pulvervorräte in Mehrdosenbehältnissen, wie sie im Turbohaler™ zu finden sind, werden als Bulk-Dose bezeichnet.

## 1.2 Mikropartikel

### 1.2.1 PLA-, PLGA-Mikropartikel

Mikropartikel sind partikuläre Wirkstoffträger von mikroskopisch grobdispenser Größenordnung. Der Begriff ist übergeordnet für Mikrokapseln und Mikrosphärulen mit einem Partikeldurchmesser von 1 bis 1000 µm. Der Wirkstoff ist in einem biokompatiblen Hilfsstoff umhüllt, wobei das Polymer als Wandmaterial dient, oder im Falle von Mikrosphärulen, der Arzneistoff im Polymer eingebettet ist. In den 60er Jahren des vergangenen Jahrhunderts erkannte man die Bedeutung der PLA-, PLGA-Mikropartikel als Modell für die hinhaltend verzögerte (sustained release) und zielorientierte (drug targeting) Wirkstofffreigabe. Kulkarni (102) war 1966 einer der Ersten, die sich mit dem Abbau und der Gewebereaktion von PLA, PLGA Polymeren befasste. Er untersuchte PLA auf die Verwendung als Nahtmaterial und als Anwendung in der Gewebeimplantation. PLA erwies sich als gut verträglich und bioabbaubar. Er begründete dies mit der Abwesenheit einer Peptidkette, so dass eine anschließende chirurgische Entfernung des Materials hinfällig wird. Catgut, auch Katgut, bezeichnet ein medizinisches Nahtmaterial, das meist aus getrockneten, gereinigten und gespaltenen Katzendärmen besteht und resorbierbar ist. Catgut darf allerdings nicht mehr als Nahtmaterial verwendet werden und ist mittlerweile verboten.

PLGA-Mikropartikel werden hinsichtlich ihrer Hydrophilie nach ihrer Zusammensetzung (je nach Lactid und Glykolidanteil) und ihrer Endgruppe unterschieden. Polymere von Boehringer Ingelheim, die an ihrem Handelsnamen zusätzlich ein H (wie RG 502H im Gegensatz zu RG 502) enthalten, stehen für die hydrophilere Variante desselben Polymers, sie sind „uncapped“, was heisst, dass sie am Kettenende eine freie Carboxylgruppe tragen. Dadurch sind sie hydrophiler und können schneller hydratisiert werden (s. Abbildung der Strukturformeln auf S. 63, 64). Im Gegensatz zu diesen existiert auch eine lipophilere Variante, ohne H im Handelsnamen, die als „capped“ bezeichnet werden und am Kettenende einen Milchsäureethylester tragen. Polymere werden weiterhin nach ihrem Kristallinitätsgrad unterschieden. Dieser kann bei Copolymeren unterschiedlich sein, abhängig vom Laktid- und Glykolidanteil. Durch den Glykolidanteil wird das Copolymer hydrophiler, Wasser kann schneller eindringen, der Abbau und die damit verbundene Freisetzung verlaufen schneller,



als bei reinem PLA. Die Freigabe kann somit auch über den Glykolidanteil am Copolymer gesteuert werden.

Andere Polymere zur Retardierung sind PLA in Kombination mit Caprolacton (52), das kristallin ist und bioabbaubar durch Hydrolyse. Silikon, das zwar biokompatibel ist, aber nicht bioabbaubar (133) und somit für die pulmonale Anwendung nicht in Frage kommt ist ein weiteres Polymer zur Retardierung, genauso wie Cellulosederivate (113, 156) und Methacrylsäurederivate (Eudragit™) (113). Kriterien bei der Auswahl der Hilfsstoffe für die pulmonale Applikation sind:

- sie sind physiologisch unbedenklich, (die parenterale Applikation wurde bereits zugelassen) (133, 171)
- bioabbaubar (133, 163, 175)
- Standardpolymere wurden gewählt, da eine dokumentierte Eignung zur Verzögerung der Wirkstofffreisetzung existiert (175)
- die Abbauprodukte sind nicht toxisch (85, 133) immunogen oder karzinogen

Milchsäure und PLA verfügen über Säure-Alkohol Funktionen. Es handelt sich um zusammengesetzte Verbindungen. Das einfachste Molekül ist die Glykolsäure. PLA ist ein Teil der Poly( $\alpha$ -hydroxysäuren), einer Klasse von Polyestern. In dieser Klasse befindet sich auch Polyglykolsäure (PGA). Die Gewinnung von PLA erfolgt durch Esterbildung und Polymerisation von Milchsäuremonomeren. PLA ist demnach ein Polymerisationsprodukt von Milchsäure, dem sog. Laktid, es wird in-vivo und in-vitro sehr langsam abgebaut (20, 133, 163). Es zerfällt wieder in Milchsäure, einem bei höheren Lebewesen natürlich vorkommenden Produkt. PLA ist ein synthetisches, chirales Polymer, das biokompatibel, resorbierbar und immunologisch inaktiv ist. Die kristalline Form, die hauptsächlich aus L-PLA besteht und ein hohes Molekulargewicht ( $> 100\ 000$ ) hat garantieren eine langsame Auflösung. Andere Formulierungen ermöglichen eine Modulierung dieser Auflösung und der damit verbundenen Freisetzung des Arzneistoffs. Je kleiner das Molekulargewicht, umso kleiner sind die sprühgetrockneten Partikel (163). D,L-PLA, das in dieser Arbeit verwendet wird, ist amorph (85, 133). Der Glasübergang liegt bei 51-54,6 °C (133). D,L-PLA ist überwiegend ataktisch aufgebaut. Da Wasser nur sehr schwer in kristalline Bereiche eindringen kann, in amorphe Bereiche hingegen leicht und auch die Möglichkeit einer Nachkristallisation kleiner Bruchstücke durch die sterische Unregelmässigkeit der Polymerkette nicht besteht, erfolgt der Polymerabbau wesentlich schneller als beim kristallinen L-PLA (142).

PLGA ist ein Co-Polymer aus Milch- und Glykolsäure und ist genau wie die Abbauprodukte nicht toxisch (85). Es besitzt einen unterschiedlichen Kristallinitätsgrad, je nach Laktid- und Glykolidanteil. PLGA mit L-PLA ist kristallin, mit D,L-PLA amorph (87). Jalil und Nixon (85) zitieren Gilding und Reed, die in „Biodegradable Polymers for Use in Surgery“ berichten, dass PLGA mit weniger als 70 % Glykolidanteil amorph ist. Je mehr Glykolidanteil enthalten ist, umso hydrophiler ist das Co-Polymer, was in einer vermehrten Wasseraufnahme resultiert (163). Mit steigender Wasseraufnahme nimmt die Glasübergangstemperatur ab. Dies wiederum veranlasst die Polymerketten in einen gummiartigen Zustand überzugehen (163), der Abbau erfolgt schneller und damit auch die Freisetzung (163).

Die Freisetzung aus Arzneiformen, die aus Makromolekülen, wie PLA und PLGA bestehen, ist eng verbunden mit dem Zerfall des Polymers. Dieser wiederum ist von der Co-Polymerzusammensetzung, wie dem Verhältnis Laktid- zu Glykolidanteil und der chemischen Struktur des Polymers abhängig. Der Zerfall des jeweiligen Polymers wird durch Erosion der Polymermatrix der Mikropartikel, hydrolytische Spaltung der Esterbindung und Diffusion des Arzneistoffs durch das Polymer verursacht. Weiterhin findet eine Hydratation mit Aufhebung der van der Waalschen Kräfte und der Wasserstoffbrücken statt, mit anschließendem Abbau zu physiologischen, wasserlöslichen Monomeren und der damit verbundenen Freigabe des Wirkstoffs aus dem Polymer. Dieses 50:50 Co-Polymer ist das am häufigsten eingesetzte Material zur kontrollierten Freigabe von Arzneistoffen, da bei dieser Zusammensetzung zwei Eigenschaften optimal kombiniert werden: Das Glykolid weist eine hydrophilere Struktur auf als das Laktid. D,L-PLA ist amorph und aufgrund seiner zusätzlich vorhandenen Methylgruppe deutlich hydrophober als das Glykolid. Diese zwei Eigenschaften führen zu

einem Polymer, das bei hoher Hydrophilie amorph ist und die Einstellung von Abbau-, und damit Freigabezeiten, in einem vernünftigen Zeitraum ermöglicht. Das 75:25 Co-Polymer wird als Alternative zum 50:50 Material eingesetzt, da es bei hoher Hydrophilie unproblematisch in seinem Lösungsverhalten ist. Generell nimmt die Freigabegeschwindigkeit bei Copolymeren mit steigendem Glykolsäureanteil zu, da dieses Monomer eine erhöhte Hydrophilie bewirkt, verbunden mit einer stärkeren Wasseraufnahme und einem rascheren Polymerabbau (142).

Wang beschreibt (177) den Zerfall des Polymers in drei Schritten:

1. Polymerkettenschnitt. Das Molekulargewicht nimmt ab. Zunächst erfolgt noch kein Massenverlust des Polymers und lösliche Produkte entstehen noch nicht.
2. Zusätzlich zur Molekulargewichtsabnahme erfolgt ein Massenverlust und einige wenige lösliche Monomere entstehen.
3. Die löslichen Monomere nehmen in ihrer Anzahl zu.

Es scheint kein enzymatischer Vorgang am Zerfall der Polymere beteiligt zu sein. Dies erklärt auch die milde Gewebereaktion, die sich lediglich auf eine Fremdkörperreaktion beschränkt. Tamber (158) und Göpferich (68) gehen von einem Zerfall der PLGA Mikropartikel in zwei Schritten aus, wobei der erste Schritt, die hydrolytische Spaltung der Esterbindung beinhaltet. Nachfolgend entstehen Oligomere und Monomere. Damit kommt es zu einer allgemeinen Abnahme des Molekulargewichts. Im zweiten Schritt, der Erosion, nehmen der Massenverlust und die Polymerkettenspaltung weiter zu, aufgrund einer vermuteten autokatalytischen Reaktion bedingt durch das Vorkommen saurer Zerfallsprodukte (60, 129). Herrero-Vanrell (75) geht auch von einem Zerfall in zwei Schritten aus, bei dem eine Abnahme des Molekulargewichts zuerst stattfindet, dem sich nachfolgend ein Masseverlust anschließt.

Die verwendeten Polymere PLA (R 202H) und PLGA (RG 502H) stehen jeweils in zwei Varianten zur Verfügung. Das „H“ steht für die hydrophilere, die „uncapped“ Variante, mit einer Carboxylgruppe am Kettenende. Die Bezeichnung ohne „H“ kennzeichnet die hydrophobere Variante „capped“, mit einem Alkylester am Kettenende. Walter et al. (175) verglichen PLGA in Form des RG 502 und des RG 502H und beobachteten, wie auch Tracy (165), einen früher einsetzenden Zerfall der hydrophileren Variante des PLGAs, der vermutlich durch eine schnellere Wasseraufnahme der hydrophilen Endgruppen zustande kam. Außerdem konnte mit dem hydrophileren PLGA eine höhere Beladung des Polymers erreicht werden. Lill (106) beobachtete trotz der ähnlichen physikochemischen Eigenschaften von PLGA des Typs Resomer RG 503 und RG 503H ein auffallend anderes Verhalten bezüglich der Hydrophilie und der Wechselwirkung des PLGA mit dem verwendeten Peptid Buserelin. Das hydrophilere RG 503H nahm in den ersten drei Wochen viel Wasser auf, während das hydrophobere RG 503 kaum Wasser aufnahm. Unterschiede waren auch in der Buserelin Freigabe zu sehen, da RG 503H Buserelin in den ersten 3 Wochen in größeren Mengen freisetzte, als das hydrophobere RG 503. Herrero-Vanrell (75) geht ebenfalls von einem schnelleren Zerfall von hydrophileren Polymeren, sowie von amorphen Polymeren aus. Blanco-Prieto (18) versprühte Vapreotide sowohl mit der hydrophileren, als auch mit der hydrophoberen Variante des PLGA, das auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wird, und stellte einen höheren Burst-Effekt des hydrophoberen PLGA, mit einer insgesamt langsameren Freisetzung des Arzneistoffs fest. Dies bestätigte vorherige Daten von ihr, sie führte einen 6,5 mal schnelleren Zerfall des hydrophileren PLGAs gegenüber dem PLGA mit einem Ester am Kettenende an. Schmitt (143) beobachtete einen Zerfall der Amaranth-PLGA Pellets über einen Zeitraum von mehr als 25 Tagen und stellte einen sigmoidalen Verlauf des Massenverlusts des „bulk“ erodierenden PLGAs fest. Tracy (165) untersuchte die Faktoren, die Einfluss auf den Zerfall von PLGA nehmen und stellte dabei eine hohe Abhängigkeit der Hydrophilie des Polymers fest, indem die hydrophilere Variante des PLGA schneller zerfiel, als die hydrophobere. Das Molekulargewicht zeigte nur einen geringen Einfluss auf den Zerfall. Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Freigabe des Arzneistoffs vom Zerfall des Polymers, der durch Erosion und Hydrolyse der Polymerketten zustande kommt, sowie von der Diffusion des Arzneistoffs abhängig ist. Die Hydrolyse ihrerseits ist abhängig von der Copolymerzusammensetzung, der Hydrophilie und zu einem gewissen Grad vom Molekulargewicht des Polymers.

Weitere bioabbaubare Polymere sind Poly- $\epsilon$ -caprolacton (PLA- co-  $\epsilon$ -caprolacton) und Poly-Valerlacton (PLA co-trimethylencarbonat). Sehr kontrovers wird der Aspekt des Zerfalls der Polymermatrix diskutiert, der durch autokatalytische Vorgänge im Inneren der Mikropartikel verursacht werden soll. Die eine Theorie lautet, dass es zu einem beschleunigten Zerfall der Mikropartikel durch eine Ansammlung saurer Abfallprodukte der Polymere im Inneren kommen kann, die den pH Wert in den Mikropartikeln und im Freisetzungsmedium absinken lassen. Dieser pH Wert-Abfall führt zu einem beschleunigten Zerfall im Inneren der Mikropartikel, verglichen mit ihrer Oberfläche. Die andere Theorie beruft sich auf die neutralisierende Wirkung von Hydroxidionen aus dem Puffer, deren Diffusionsweg vom Medium in das Innere der Mikropartikel relativ kurz ist, und deren Menge möglicherweise ausreichend ist, um die sauren Produkte zu neutralisieren, wie Siepmann (146) vermutet.

### 1.2.2 Arzneistoffeinschluss in Mikropartikeln

Der Arzneistoffeinschluss in Mikropartikeln ist sowohl von den physikochemischen Eigenschaften des Arzneistoffs, wie Hydrophilie, Lipophilie, Ladung, Diffusionseigenschaften als auch von den Eigenschaften des Polymers, wie Polymerzusammensetzung, Glasübergangstemperatur, Mikropartikelgröße, aber auch von der Art der Herstellung abhängig. Die eingeschlossenen Wirkstoffe werden durch Erosion des Polymers und Diffusion des Wirkstoffs bioverfügbar. Arzneistoffe lassen sich nicht in unendlich hoher Einschlussrate verkapseln oder einbetten. Unter anderen berichten Gido (67), Gander (62), Johansen (91) und O'Hara (120) von maximal 35 % Einschlussrate bei der Sprühtrocknung. Der Wirkstoffanteil, der nicht verkapselt oder umhüllt werden kann, ist an der Oberfläche der Mikropartikel adhärirt und wird als Burst freigesetzt, um rasch therapeutisch relevante Plasmaspiegel bzw. Gewebespiegel zu erreichen. Zur Charakterisierung der Arzneistoffeinschlussrate wird die eingesetzte Menge an Arzneistoff mit der nach Auflösung der wirkstoffhaltigen Mikropartikel in einem organischen Lösungsmittel z.B. mittels High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) oder UV-Spektroskopie ermittelten Arzneistoffmenge in Relation gesetzt.

### 1.2.3 Herstellung von (Polymer-) Mikropartikeln

Das Prinzip der Mikroverkapselung wurde erstmals technisch auf die Herstellung von kohlefreien Reaktivdurschreibpapieren übertragen. Eine auf der Rückseite des Oberblattes befindliche, einen Leukofarbstoff enthaltende Mikrokapselschicht wird in dem Bereich des jeweiligen Schreibmaschinenanschlags zerstört und reagiert unter Farbstoffausbildung mit der auf der Oberseite des Unterblattes befindlichen Farbreaktionskomponente (12). Folgende gebräuchliche Herstellungsverfahren für (Polymer-) Mikropartikel können unterschieden werden:

- a) Überzugsverfahren, z.B. in der Wirbelschicht
- b) Phasentrennverfahren- Koazervation
- c) Mechanisch-physikalische Verfahren, wie die Sprühtrocknung und - erstarrung

Das Überziehen fester Partikel in der Wirbelschicht erfolgt durch Einsprühen einer Polymerlösung, die Arzneistoffpartikel enthält. Das zu überziehende Gut wird durch den Zylinder der Wirbelschicht nach oben getragen und im Gleichstrom besprüht. Es werden Mikrokapseln erhalten. Beim Phasentrennverfahren wird die Löslichkeit des gelösten Polymers mittels geeigneter Maßnahmen reduziert und über die Bildung einer an Lösungsmittel reichen Polymerphase (Koazervationsschritt) auf den Wirkstoff ausgefällt. Die Koazervat-Bildung kann durch die Verwendung von Polymer-Nichtlösungsmitteln erreicht werden. Bei der einfachen Koazervation erfolgt die Phasentrennung durch Aussalzen mit Natrium- oder Ammoniumsulfat, Temperaturerhöhung, pH Änderung oder Alkoholzusatz. Bei der komplexen Koazervation wird die Abscheidung des Wandmaterials durch Zugabe eines entgegengesetzt geladenen gelösten Polymers erreicht (12). Eine andere häufig verwendete

Variante besteht in der Extraktion bzw. der Verdampfung des Polymer-Lösungsmittels. Nykamp (119) beschreibt mit dem „jet milling“, der Luftstrahlmahlung, eine Technik der Mikropartikelherstellung ohne den Einsatz von Lösungsmitteln, indem zunächst die Substanzen geschmolzen, grob vorgemahlen und anschließend mit einer Luftstrahlmühle mikronisiert werden. Auf diese Weise lässt sich Estrioltriacetat mit PLA verkapseln und Partikel der Größenordnung  $x_{50}$  4-6  $\mu\text{m}$  erhalten. In der vorliegenden Arbeit wird das Verfahren der Sprühtrocknung eingesetzt. Bei dieser Methode wird eine Arzneistoff-Polymer Lösung, - Suspension oder – w/o Emulsion versprüht. Der Arzneistoff wird hierbei in Form von Mikrosphärulen in das Polymer eingebettet (12). Die Sprühtrocknung wurde in den 80er Jahren des vergangenen Jahrhunderts als Alternative zur Herstellung von Mikropartikeln, die erstrebenswerte Fließeigenschaften und Verteilungscharakteristika aufweisen, ohne Verwendung von Grobpartikeln als Carrier, entdeckt (35). Beim Sprühtrocknen soll der Wirkstoff mit möglichst hoher Beladung verkapselt oder eingebettet werden. Durch Zerstäuben von Lösungen, Suspensionen oder Emulsionen wird mit Hilfe einer Zweistoffdüse in einem heißen Luftstrom ein Festprodukt erzeugt, indem das Lösungsmittel verdampft (110). Die Sprühtrockner arbeiten im Fließbetrieb, kontinuierlich, zerteilen das Gut in kleine Partikel von 1 bis 400  $\mu\text{m}$  Durchmesser, verbreiten die Teilchen in einem Luftstrom, trocknen den schwebenden Teilchenstrom mit der Wärme der erhitzten Luft und trennen ihn wieder ab. Hierbei wird die Oberfläche der Tröpfchen stark vergrößert. Mittlerweile ist die Sprühtrocknung nicht mehr nur auf wässrige Lösungen limitiert (35). Beim Atomisieren des Sprühguts müssen folgende Kräfte überwunden werden:

- i) Die Kraft, die den Zusammenhalt zwischen den Flüssigkeitsmolekülen bewirkt, und die bestrebt ist, dieser eine kleinstmögliche Oberfläche zu geben
- ii) Die Trägheitskräfte, die in der Flüssigkeit und in der sie berührenden Luft auftreten, wenn die schnell aneinander vorbeiströmenden Medien beschleunigt, abgetrennt oder abgelenkt werden. Diese Kräfte treten als Druck- oder Schiebekräfte in Erscheinung
- iii) Die Viskositätskräfte, die hemmend wirken, wenn benachbarte Flüssigkeits- und Luftschichten beim Versprühen gegeneinander verschoben werden.

Beim Atomisieren (griech.: „*atomos*“ - unteilbar) wird eine Lösung, Suspension oder Emulsion in unzählige kleine, im optimalen Fall gleich große Tropfen überführt, woraus eine Vergrößerung der Oberfläche resultiert. Der zweite, nahezu simultan zum Atomisieren ausgeführte Vorgang beim Sprühtrocknen beinhaltet das möglichst schnelle Verdampfen in einem heißen Gasstrom, dem Wärmeträger.

Die Effektivität des Verdampfens bzw. des Trocknens wird einerseits durch die Geschwindigkeit des Wärmetransports vom Wärmeträger zum Tropfen,  $J_W$ , und andererseits durch die Geschwindigkeit des Materietransports vom Tropfen zum Trägergasstrom,  $J_M$ , gesteuert. Gemäss dem ersten Fickschen Diffusionsgesetz werden diese beiden grundlegenden Prozesse mit zunehmendem Konzentrationsgradienten  $dN/dz$  (Gl. 1.1) bzw. zunehmendem Temperaturgradienten  $dT/dz$  (Gl. 1.2) entlang des Weges beschleunigt.

$$J_M = -\frac{dN}{dz} \quad (\text{Gl.1.1})$$

$$J_M = -\frac{dT}{dz} \quad (\text{Gl.1.2})$$

Der Tropfenradius entspricht dieser Wegstrecke. Tropfen sind im Idealfall Flüssigkeitskugeln, die im Gleichgewicht mit ihrem Dampf stehen. Entsprechend der Gleichung nach La Place (Gl. 1.3) muss der Druck auf der Tropfeninnenseite,  $p_i$ , mit der Oberflächenspannung  $\gamma$  und dem Radius  $r$  immer größer als der Druck auf der Tropfenaußenseite,  $p_a$ , sein.

$$p_i = p_a + \frac{2\gamma}{r} \quad (\text{Gl.1.3})$$

Die Druckdifferenz wird also umso kleiner, je größer der Radius des Tropfens ist. Eine Druckerhöhung auf der Innenseite einer gekrümmten Fläche hat thermodynamische Folgen

für die Flüssigkeit. Gemäß der Kelvinischen Gleichung (Gl. 1.4) steigt der Dampfdruck einer in kleine Tropfen versprühten Flüssigkeit mit Abnahme des Tropfenradius.

$$p_{\text{Tropfen}} = p_{\text{Flüssigkeit}} e^{2\gamma V_m / rRT} \quad (\text{Gl.1.4})$$

Der Dampfdruck der Flüssigkeit mit gekrümmter Oberfläche ist  $p_{\text{Tropfen}}$ , der Dampfdruck der ebenen Oberfläche ist  $p_{\text{Flüssigkeit}}$ . Dadurch sinkt der Siedepunkt der Flüssigkeit mit Abnahme der Tropfengröße.

Bei dem verwendeten Büchi B-191 erfolgt die Luftführung im Gleichstromverfahren, d.h. das Sprühgut wird in die gleiche Richtung wie die Trocknungsluft versprüht. Die Tropfen kommen somit mit der heißesten Trocknungsluft in Kontakt, wenn ihre Feuchtigkeit am höchsten ist. Es handelt sich dabei um eine besonders schonende Trocknung, da eine schnelle Verdampfung erfolgt.

Die Abtrennung der Agglomerate erfolgt im Zyklon. Verwirbelungen an der Wand führen zum Aufprall der Teilchen an der Wand und somit zur Abscheidung.

Das Produkt kann aus sphärischen Hohlkugeln oder soliden Partikeln bestehen. Hohlkugeln können entstehen, da Wasser zuerst von der Oberfläche des Tröpfchens verdampft und das eingeschlossene Lösungsmittel im Inneren zunächst eine Dampfblase bildet. Im weiteren Verlauf der Trocknung erhöht sich der Druck der eingeschlossenen Dampfblase so weit, bis das entstandene Tröpfchen aufplatzt und im trockenen Zustand gegebenenfalls mit einer Eruptionsöffnung vorliegt.

Vorteile der Herstellung von Mikropartikeln mittels Sprühtrocknung sind (29):

- man erhält in einem Arbeitsgang, ausgehend von einer Lösung, Suspension oder Emulsion ein (meist amorphes) Pulver
- wasserlösliche und wasserunlösliche Bestandteile können effizient verkapselt werden
- es ergeben sich für das Produkt kurze Trocknungszeiten

Das angewendete Saugverfahren produziert durch die Aspiratortätigkeit einen leichten Unterdruck (30-50 mbar) im Gerät. Damit wird eine Kontamination der Umgebung ausgeschlossen.

Die thermische Belastung des Endproduktes liegt im Höchstfall auf der Höhe der Sprühtemperatur am Auslass (150), da sich um das gesprühte Tröpfchen unmittelbar ein Dampfmantel bildet, der gegen thermische Einflüsse schützt. Ausserdem entzieht die Verdampfung des Lösungsmittels dem Produkt Wärme, wodurch es selbst weniger stark erhitzt wird. Pavanetto (123) verglich die Sprühtrocknung mit zwei anderen Verfahren zur Herstellung von Mikropartikeln, der Lösungsmittelverdampfung und der Lösungsmittelextraktion. Die Sprühtrocknung erzielte die beste Partikelgrößenverteilung, die höchste Verkapselungseffizienz und war die schnellste Methode.

Die Parametereinstellung des Sprühtrockners wurde in dieser Arbeit aufgrund eines 2<sup>3</sup> Factorial Designs variiert. Es werden drei Parameter bei zwei unterschiedlichen Einstellungen untersucht. Eine genaue Durchführung mit einem Versuchsplan wird im Abschnitt Ergebnisse und Diskussion beschrieben.

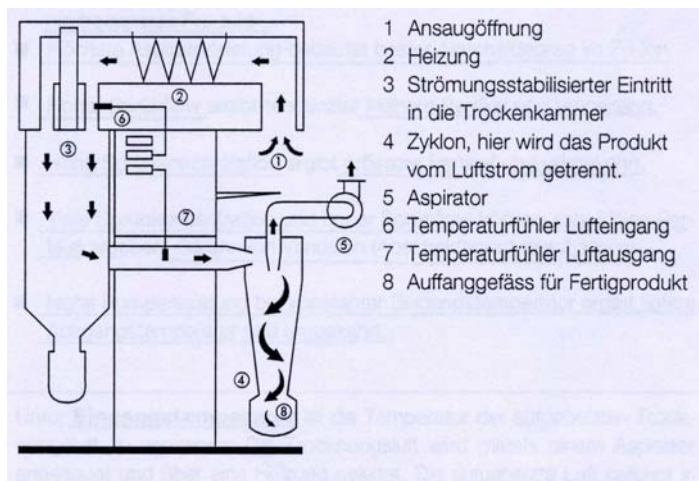


Abbildung 1.1 Schematischer Aufbau eines Büchi Sprühtrockners (29)

### *Der amorphe Zustand (12, 26)*

Ein amorpher Zustand entsteht immer dann, wenn eine sehr schnelle Reduzierung der Molekularbewegung eine Kristallisation des Feststoffs verhindert. Amorphe Formen haben keine eindeutig geordnete Struktur, im Gegensatz zu Kristallen, die einen hohen Ordnungsgrad besitzen. Amorphe Stoffe sind thermodynamisch instabil, da sie bevorzugt in den thermodynamisch stabileren kristallinen Zustand (mit niedrigem Energieniveau) übergehen. Sie besitzen meist höhere Löslichkeiten als die kristalline Form, da beim Auflösen keine Gitterenergie zu überwinden ist. Aus diesem Grund werden bisweilen gezielt amorphe Produkte hergestellt (81). Um Arzneistoffe in ihrem amorphen Zustand zu stabilisieren, bietet sich die Verwendung von Hilfsstoffen an, die inert und physiologisch unbedenklich sind (181). Verbesserte Löslichkeit und/ oder Lösungsgeschwindigkeit von sprühgetrockneten Produkten können häufig auf das Vorliegen eines amorphen Zustandes zurückgeführt werden. Amorphe Stoffe besitzen keinen definierten Schmelzpunkt, sondern einen Temperaturbereich, die sogenannte Glasübergangstemperatur, innerhalb dessen sich der Wechsel vom Festkörper (hochviskoser Glaszustand) zur Flüssigkeit (niedrigviskoser, gummiartiger Flüssigkeitszustand) und umgekehrt vollzieht. Es handelt sich um eine Kenngröße filmbildender Polymere für das Übergangsstadium zwischen kautschukelastischem und festem, glasartigem Zustand (149). Die Mindestfilmbildungstemperatur steht im Zusammenhang mit der Glasübergangstemperatur. Bei der Glasübergangstemperatur ist die molekulare Mobilität erleichtert, dadurch wird der Prozess der Kaltkristallisation beschleunigt. Unterhalb dieser Glasübergangstemperatur liegen amorphe Stoffe im glasartigen Zustand vor. Charakteristisch für den Glasübergang ist der Anstieg der Wärmekapazität  $C$  (166), das ist die Wärmemenge  $Q$  (in Joule), die einem Körper zugeführt werden muss, um einen Anstieg der Temperatur  $T$  (in Kelvin) zu erreichen. Die Glasübergangstemperatur, auch als glasartiger Zustand bezeichnet, ist eine variable Größe, die von den Faktoren Temperatur und Feuchtigkeit abhängt. Je größer die Differenz der Umgebungstemperatur und der Glasübergangstemperatur der Probe, umso länger bleibt der amorphe Zustand erhalten (geringe Umwandlungsgeschwindigkeit). Die Energiebarriere für die Rekristallisation lässt sich mindern, indem Weichmacher zugesetzt und so die Glasübergangstemperatur erniedrigt wird (30, 138). Als Weichmacher kann auch Wasser dienen, welches durch Adsorption aus feuchter Umgebungsluft angelagert werden kann. Eine Kaltkristallisation tritt umso schneller ein, je niedriger die Glasübergangstemperatur ist. Kaltkristallisation entsteht durch eine anfängliche Keimbildung und dessen anschließendes Wachstum. Die amorphe oder glasartige Variante ist in vielen Fällen thermodynamisch instabil und lagert sich unter Wärmeentwicklung (exotherm) in einen kristallinen Zustand um. Diese Umwandlung ist allerdings häufig kinetisch gehemmt, so dass der glasartige Zustand auch über einen längeren Zeitraum existieren kann (z.B. beim Fensterglas).

Amorphe Feststoffe, unterkühlte Schmelzen, Flüssigkeiten und Gase verhalten sich entsprechend der unregelmäßigen Teilchenanordnung isotrop, d.h. sie besitzen nach allen Richtungen gleiche physikalische Eigenschaften, die im Gegensatz zu Kristalleigenschaften richtungsunabhängig sind. Charakterisiert werden amorphe Strukturen mit Hilfe von Röntgenpulverdiffraktometrie, IR-Spektroskopie, DSC und Thermogravimetrie, sowie isothermer Mikrokolorimetrie und Lösungskolorimetrie. Die ersten drei genannten Methoden sind ausschließlich in der Lage die Feststoffproben als Ganzes zu erfassen und nicht nur deren Oberfläche, wie bei der isothermen Mikrokolorimetrie. Deswegen liegt die Detektionsgrenze bei diesen erstgenannten Methoden bei 10 % amorpher Anteile (bei der Röntgenpulverdiffraktometrie sogar bei etwa 4,5 %), unterhalb davon ist das Signal im Vergleich zur Gesamtprobe zu schwach.

Bei der Sprühtrocknung spielt der amorphe Zustand eine wichtige Rolle, da zumeist amorphe Pulver entstehen. Durch die extreme Oberflächenvergrößerung der Lösung bei der Sprühtrocknung wird eine sehr kurze Trocknungszeit der Tropfen erreicht. Durch die schlagartige Lösungsmittelverdampfung wird die Bildung eines kristallinen Ordnungszustandes verhindert, der getrocknete Feststoff liegt amorph vor. Die Verweildauer der Partikel im Sprühtrockner ist aber ausreichend lang, um diese zu trocknen (150). Durch die mechanische Einwirkung werden kristalline Strukturen zerstört und ungeordnete Regionen entstehen. Schon geringe Anteile amorpher Materialien können einen Einfluss auf die physikalische und chemische Stabilität ausüben, da amorphe Stoffe typischerweise hygroskopisch sind. Die adsorbierten Wassermoleküle können als Weichmacher, sogenannte Plasticizer wirken, die die Glasübergangstemperatur verändern können. So kann die Polymorphie eines Arzneistoffs auch die mechanischen Eigenschaften eines Partikels ändern (148). Dem Vorteil der besseren Löslichkeit steht damit der Nachteil der begrenzten Stabilität gegenüber.

#### *1.2.4 Freisetzungsmechanismen von Arzneistoffen aus Polymer-Mikropartikeln*

Mehrere verschiedene Vorgänge sind an der Freigabe von eingeschlossenen Arzneistoffen in Polymer-Mikropartikel beteiligt. Die Freigabe beruht vor allem auf Erosionsprozessen des Polymers und Diffusion des Arzneistoffs durch das Polymer. Auch Poren und winzige Kanäle können an der Freigabe beteiligt sein. Bei nicht pulmonaler Applikation tragen in-vivo zusätzlich Enzyme zur Arzneistofffreigabe bei. In Abbildung 1.2 sind die wichtigsten Freigabemechanismen dargestellt.

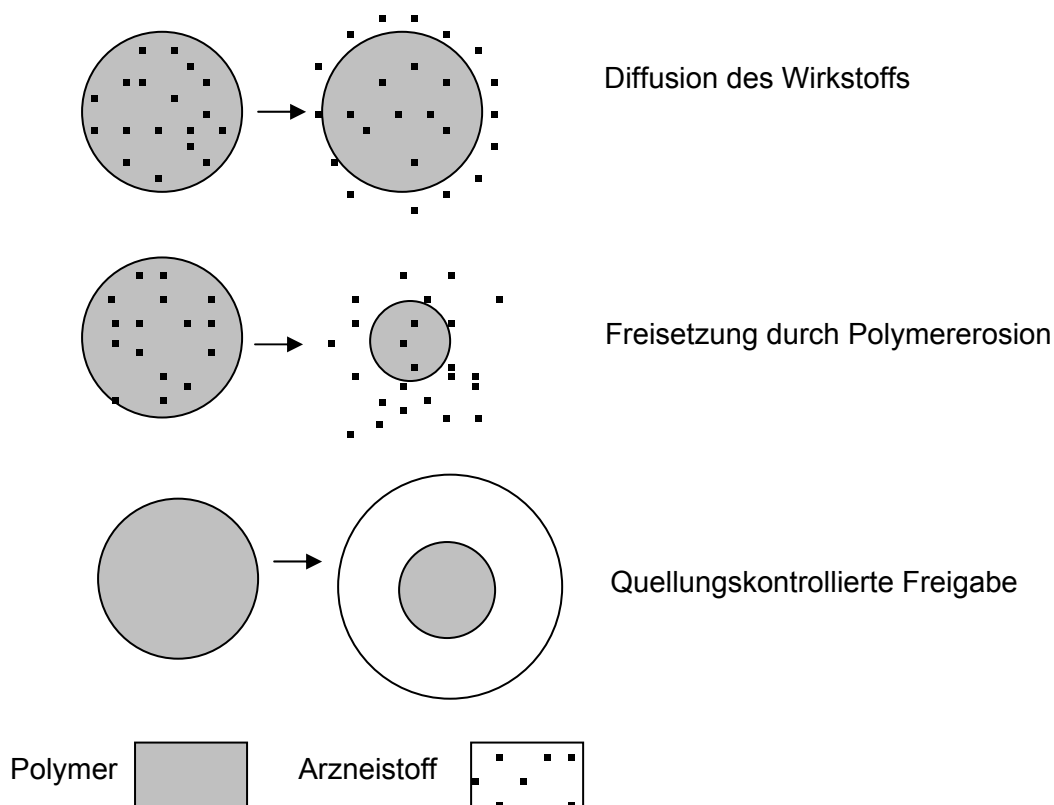


Abbildung 1.2 In-vitro Freigabemechanismen aus Polymer-Mikropartikeln

### 1.2.5 Charakterisierung von Mikropartikeln

Arzneistoffhaltige Mikropartikel werden üblicherweise nach technologischen und biopharmazeutischen Gesichtspunkten charakterisiert durch

- Glasübergangstemperatur mit Hilfe der DSC
- Arzneistoffgehalt mittels HPLC, UV-Spektroskopie
- Mikropartikelgröße unter Zuhilfenahme der Laserdiffraktometrie
- Aussehen der Oberfläche durch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen
- Größe der Oberfläche mittels der Stickstoff Tieftemperatur Adsorptionsmethode
- Kristallinität mit Hilfe von Röntgendiffraktometrie und DSC
- Molekulargewicht der Polymere mittels Gel-Permeations-Chromatographie (GPC)
- Restlösemittelgehalt mittels Dampfraum-Gas-Chromatographie-Analyse (Headspace GC)
- Freisetzungsprofil

## 1.3 Mikropartikel-Aerosole

Reine Arzneistoffe führen meist sehr schnell lokal oder systemisch zu therapeutischen Wirkstoffspiegeln. Da diese therapeutischen Konzentrationen oft nicht über ein angemessen langes Zeitfenster aufrecht erhalten bleiben, ist die Wirkdauer limitiert und das Medikament muss erneut inhaliert werden. Die Dosierungsabstände werden determiniert durch physikochemische und pharmakokinetische Charakteristika des Arzneistoffs, wie



Partikelgröße, Auflösungsgeschwindigkeit, Menge des applizierten Wirkstoffs, Geschwindigkeit der Clearance, minimale toxische Konzentration, sowie minimale therapeutische Konzentration. Durch häufige Applikation kann es zum Complianceverlust beim Patienten kommen. Pulmonal applizierte Mikropartikel, bei einer lokalen Erkrankung des Respirationstrakts, können helfen dies zu überwinden. Die Nebenwirkungsrate nimmt ab, da der Wirkstoff nur im Zielgewebe verteilt wird. Arzneistoffsysteme, wie Mikropartikel, die diese neue Strategie unterstützen, sollten folgende Voraussetzungen erfüllen:

- die respirable Größe von 5,8  $\mu\text{m}$  darf nicht überschritten werden
- die Bestandteile müssen toxikologisch unbedenklich sein und die Lungenfunktion nicht negativ beeinträchtigen
- die Bestandteile müssen bioabbaubar sein, d.h. sie müssen vom Körper selbst in einem vertretbaren Zeitraum zu unbedenklichen Produkten abgebaut werden, um eine Kumulation im Respirationstrakt zu verhindern
- die Freisetzung des Wirkstoffs im Respirationstrakt soll verzögert und durch technologische Maßnahmen steuerbar sein
- das Carriersystem soll für unterschiedliche Arzneistoffe geeignet sein, optimalerweise auch für solche mit unterschiedlicher Hydrophilie/ Lipophilie, Molekülform und -größe
- der Schutz des Wirkstoffs vor der physiologischen Umgebung und eine eventuelle Verbesserung seiner Stabilität in-vivo soll ermöglicht werden

Das Ziel vielfältiger Forschungsbemühungen sind Mikropartikel aus PLA/ PLGA, die eine kontrollierte Freisetzung des Wirkstoffs gewährleisten. Große Hoffnungen werden in die Verkapselung von hydrophilen Arzneistoffen gesetzt, die sich sonst schnell im pulmonalen Mukus oder im Surfactant auflösen und dann aus der Lunge abtransportiert werden. Toxizitäts- und Verträglichkeitsprüfungen bei pulmonaler Applikation werden in der vorliegenden Arbeit mittels in-vitro Zellmodellen und in-vivo Versuchen an Tierstudien zusätzlich untersucht.

### 1.3.1 Toxizität von PLA-, PLGA-Mikropartikel Aerosolen

Phospholipide, wie Survanta™, und Alveofact™ werden zur Behandlung des infantilen respiratorischen Distress-Syndroms (IRDS) ohne nennenswerte Nebenwirkungen eingesetzt. Hauptbestandteil des aus Rinderlungen gewonnenen Surfactant (Survanta™ und Alveofact™) ist das Dipalmitoylphosphatidylcholin. Für Untersuchungen zur Kurzzeittoxizität applizierten Suarez et al. (155) mit Rifampicin beladene PLGA-Mikropartikel in die Lunge von Meerschweinchen, wobei keine bemerkenswerten histopathologischen Effekte an den Lungen der Tiere festgestellt wurden. Sie kamen zu dem Schluss, dass die potentielle Anwendung dieser Mikropartikel für die inhalative Behandlung der Tuberkulose gefördert werden sollte.

Gezielte Forschungen an Alveolarmakrophagen zeigten, dass Toxizitäts und Verträglichkeitsprüfungen unbedingt notwendig sind und bei der Anwendung pulmonaler Carrier gewissenhaft untersucht werden müssen. PLA und PLGA sind zur parenteralen Anwendung zugelassen, bei der Anwendung in der Lunge besteht noch großer Forschungsbedarf. Suarez (155) machte Versuche an Meerschweinchen, denen sie mit Rifampicin beladene R-PLGA (75:25, R-Konfiguration von PLGA) Mikropartikel mittels Verneblung und Instillation verabreichte, um deren Phagozytose durch Alveolarmakrophagen zu beobachten. Die Verabreichung erfolgte 24 Stunden vor einer bakteriellen Infektion. Sie beobachtete eine dosisabhängige Überlebensrate der Mikroorganismen in der Lunge und der Menge an verabreichten Rifampicin R-PLGA Mikropartikeln. Erste histopathologische Studien zeigten einige tuberkuläre Granulome und Ödeme. Untersuchungen des Lungengewebes von Kontrolltieren, die R-PLGA per Insufflation erhalten hatten, zeigten weniger Veränderungen und waren histopathologisch unauffälliger. Sharma (145) untersuchte die Phagozytose von Isoniazid PLA- und Rifampicin PLA-Mikropartikeln an murinen Makrophagen-Zellkulturen und verabreichte Ratten in einer für diesen Versuch eigens entwickelten Inhalationskammer ebenfalls Isoniazid PLA- und Rifampicin PLA-

Mikropartikel zur Behandlung von Tuberkulose. Die Mikropartikel wurden phagozytiert und es resultierte eine hohe intrazelluläre Konzentration der Arzneistoffe. Dadurch konnte eine zielgerichtete Verabreichung der Arzneistoffe mit Hilfe der alveolaren Phagozytose erreicht werden.

#### 1.4 Pulmonales Targeting

Die Vorteile der lokalen Applikation im Respirationstrakt sind vielfältig und bereits beschrieben (vgl. 1.1.1, 1.3). Neben der Funktion des Atemtrakts als Target für Aerosole wird auch intensive Forschung betrieben, mittels PLA-, PLGA-Mikropartikeln gezielt Wirkstoffe in einzelne Lungenzellpopulationen zu transportieren, um möglichst effizient therapieren zu können. Hinsichtlich der Target Mechanismen unterscheidet man in der Lunge im Prinzip zwei Zellarten:

- nichtphagozytierende Zellen, wie die pulmonalen Epithelzellen
- phagozytierende Zellen, wie Alveolarmakrophagen, die die PLA-, PLGA-Mikropartikel als körperfremde Stoffe erkennen, diese phagozytieren und so den verkapselten Wirkstoff einlagern, wie oben am Beispiel der Behandlung der Tuberkulose gezeigt wurde

Eine erfolgreiche Aerosoltherapie ist das Ergebnis des komplexen Zusammenwirkens der galenischen Formulierung, von Geräteparametern und der Anwendbarkeit durch den Patienten. Der therapeutische Nutzen aus pulmonal deponierten PLA-, PLGA-Mikropartikeln ist abhängig vom Wirkstoff, der pulmonalen Absorptionsrate und der Freisetzung aus den Mikropartikeln. Die pulmonale Wirkstofffreigabe ist in-vitro schwierig zu simulieren. Aus diesem Grund sind Versuche am Tier als Kontrolle besonders wichtig. Pietzonka (127, 128) untersuchte die Aufnahme von markierten PLGA Nanopartikeln in Caco-2 Monolayer Modellen und stellte fest, dass weniger die PLGA Nanopartikel aufgenommen wurde, als vielmehr der lipophile Marker in die Zellschicht transferiert wurde, der dann die lipophilen Zellbestandteile im Zellinneren anfärbte.

#### 1.5 Therapeutische Ansätze

##### 1.5.1 *Erkrankungen der Atemwege und Therapie des Asthma bronchiale*

Die deutsche Atemwegsliga definiert Asthma bronchiale als entzündliche Atemwegserkrankung mit Hyperreagibilität des Bronchialsystems und variabler Atemwegsobstruktion (96, 182). Unterschieden wird in extrinsisches (allergisches) und intrinsisches (nicht allergisches) Asthma. Während das extrinsische Asthma bronchiale durch unterschiedliche Allergene, wie Pollen, Exkremate von Hausstaubmilben oder Tierhaarepithelien ausgelöst werden kann, sind die Auslösefaktoren beim intrinsischen Asthma bronchiale nicht bekannt. Hier stehen unspezifische Auslöser, wie kalte Luft, beruflich oder umweltbedingte Noxen und respiratorische Infekte im Vordergrund (100). Beim allergisch bedingten Asthma ist der immunologische Mechanismus in der Lunge durch vermehrtes Auftreten von T-Helfer Zellen (TH-2) charakterisiert (Kapitel 1.10). Die Zahl der chronisch-obstruktiven Erkrankungen (COPD) nimmt deutlich zu, so dass ein großer Therapiebedarf besteht. Die medikamentöse Behandlung, je nach Schweregrad, geht aus dem Stufenplan der Deutschen Atemwegsliga e.V. hervor, der ein Therapiekonzept zur Behandlung des Asthma bronchiale darstellt (Tab.1.1).

Die Einteilung erfolgt über eine Messung der Lungenfunktion, die über die Parameter Ein-Sekunden-Kapazität, die auch als FEV Forced-Expiratory-Volume bezeichnet wird, maximaler expiratorischer Fluss, der sogenannte PEF Peak-Expiratory-Flow und Häufigkeit der auftretenden Symptome definiert wird. Weitere Lungenfunktionsparameter sind die Vitalkapazität, kurz als VC bezeichnet, die ein Maß dafür ist, wie viel Luft die Lunge maximal aufnehmen kann und die funktionelle Residualkapazität, die FRC, d.h. die Luftmenge, die

nach normaler Ausatmung noch in der Lunge verbleibt. Die Residualkapazität ist die Summe aus dem expiratorischen Reservevolumen, d.h. dem Volumen, das am Ende der normalen Ausatmung noch ausatembar ist und dem Residualvolumen, das nach maximaler Ausatmung noch in der Lunge bleibt (179).

Tabelle 1.1 Stufenplan zur Behandlung des Asthma bronchiale

Stufe 1	Stufe 2	Stufe 3	Stufe 4
Kurzwirksame beta-2 Sympathomimetika	Kurzwirksame beta-2 Sympathomimetika + Glukokortikoide zum Inhalieren in kleineren Mengen	Kurzwirksame beta-2 Sympathomimetika + Glukokortikoide zum Inhalieren in großen Mengen + Langwirksame beta-2 Sympathomimetika oder Theopyllin oder Leukotrienrezeptor- antagonisten	Kurzwirksame beta-2 Sympathomimetika + Glukokortikoide zum Inhalieren in größeren Mengen + Langwirksame beta-2 Sympathomimetika oder Theopyllin oder Leukotrienrezeptor- antagonisten + Glukokortikoide oral

Eine antientzündliche Basistherapie (Dauermedikation) zur Suppression der entzündlichen Vorgänge bildet den Schwerpunkt der Asthmatherapie gemäss Stufenplan. Inhalative Kortikoide werden ab dem Schweregrad 2 eingesetzt. In zahlreichen Studien konnte belegt werden, dass die regelmäßige Anwendung inhalierbarer Glukokortikoide wesentlich zur Kontrollierbarkeit des Asthma bronchiale beiträgt. Dieser positive Nutzen spiegelt sich auch in den krankheitsbezogenen Leitlinien wider (9, 115, 182). Mit dem inhalativen Glukokortikoid Ciclesonid (Alvesco™) ist seit Februar 2005 ein Prodrug auf den Markt gekommen, das erst in der Lunge aktiviert wird. Die Substanz ist ein Isobutyryl-Ester, der in der Lunge durch Esterspaltung in den aktiven Wirkstoff Desisobutyryl-Ciclesonid umgewandelt wird und dessen Rezeptorbindungsaffinität 100- mal größer wie die des Prodrugs ist. Der Hauptmetabolit ähnelt in seiner Struktur stark dem Budesonid. Ciclesonid bildet intrapulmonal Lipidkonjugate, die als Depot fungieren. Zusätzlich weist es eine höhere Lipophilie als Budesonid auf, was die pulmonale Verweildauer zusätzlich erhöht. Es muss daher nur einmal pro Tag inhaliert werden (141).

### 1.5.2 Neue Indikationen für die pulmonale Applikation

Der pharmazeutische Interessenschwerpunkt der pulmonalen Applikation von Wirkstoffen liegt nicht nur in der Therapie von Atemwegserkrankungen. Man ist bemüht auch andere Erkrankungen topisch und systemisch über die Lunge zu behandeln. Relenza™ (Zanamivir, Glaxo Wellcome), ein Einzeldosenpulverinhalator, der als Rotadisk™ oder Diskhaler™ angeboten wird, ist zur Therapie der Virus Grippe zugelassen. In den USA wurde mit dem Nicorette™-Inhaler (Pharmacia&Upjohn) die Raucherentwöhnung inhalativ verwirklicht. Die nadelfreie Versorgung von Diabetikern mit Insulin stellt ein großes Ziel dar. Im März 2004 wurde eine inhalative Form des Insulins bei der europäischen Zulassungsbehörde eingereicht, 2006 wurde Exubera™ zugelassen und wird Mitte/Ende 2006 auf dem Markt sein. Eine Inhalation von Insulin könnte vielen Diabetes Patienten die Insulintherapie erleichtern. Phase III Studien zeigten, dass die pulmonale Applikation der subkutanen kurzwirksamen Insulinapplikation ebenbürtig ist. Es können gut reproduzierbare Insulinspiegel im Blut erreicht werden. Zudem setzt die Wirkung wie bei schnell wirksamen

Insulinanaloga rasch ein, so dass kein Spritz-Ess-Abstand notwendig ist, der Effekt bleibt jedoch länger bestehen (14). Die therapeutische Indikation von Exubera™ ist die Behandlung von erwachsenen Diabetes Typ-II-Patienten, die mit oralen Antidiabetika nicht adäquat behandelt werden können und Insulin benötigen, sowie von erwachsenen Diabetes Typ-I-Patienten, wo es als Zusatz zu mittellang oder lang wirkendem, subkutan verabreichtem Insulin inhaliert wird. Es wird vor jeder Mahlzeit tief in die Lungen inhaliert, um die postprandial auftretenden Glukosespitzen zu reduzieren. Exubera™ bietet einen enormen Vorteil in der Insulin Applikation und stellt mit einem von Nektar Therapeutics entwickelten Inhalator das erste nicht-injizierbare Insulin in Europa dar, seit der Entdeckung des Insulins in den 20er Jahren des vergangenen Jahrhunderts (140). Der Inhalator ist eine Kombination aus Trockenpulverinhalator und einem Spacer, wobei die ausgebrachte Dosis aus dem Inhalator zunächst in einen Spacer erfolgt, aus dem dann vom Patienten inhaliert wird. Die Food and Drug Administration (FDA) empfiehlt, vor der Anwendung von Exubera™ die Lungenfunktion der Patienten zu überprüfen, ebenso alle 6 bis 12 Monate während der Therapie. Exubera™ darf nicht bei Rauchern oder Personen, die vor 6 Monaten mit dem Rauchen aufgehört haben, sowie bei Asthmatikern und Patienten, die Bronchitis haben angewendet werden (134), da das beschädigte Lungenepithel eventuell Auswirkungen auf die resorbierte Menge an Insulin haben kann.

### 1.5.3 Neue Indikationen von Implanten auf PLA, PLGA Basis

Auf dem Markt erhältliche Implantate auf Milchsäurebasis finden Anwendung in den verschiedensten Bereichen der Medizin. Biologisch abbaubare Implantate auf der Basis von Milchsäure müssen nach der Operation nicht mehr chirurgisch entfernt werden, sondern lösen sich im Körper selbst auf. Eingesetzt wird z.B. Polypin™ bei Brüchen des Gelenkknorpels, um Arthrose vorzubeugen. Bei Knochenbrüchen gilt immer mehr die Devise: „schrauben, statt eingipsen“. Zoladex™ ist ein Implantationspräparat, das Goserelinacetat, einen LHRH Agonisten enthält und subkutan beim Mammakarzinom und bei fortgeschrittenem Prostatakarzinom eingesetzt wird. Bei dem Implantat handelt es sich um einen kleinen Zylinder aus PLGA (50:50). Decapeptyl™ (auf der Basis von PLGA (50:50)), Enantone™ und Enantone gyn™ (PLGA (75:25)) sind ebenfalls Präparate auf der Basis bioabbaubarer Polymere, die LHRH Agonisten verzögert freigeben.

Die Implantate für Hartgewebe (Knochen) und Weichgewebe, die von der Firma MacroPore Biosurgery entwickelt wurden, bestehen aus Polylaktid, einem Copolymer aus 70:30 Poly(L-Laktid-co-D,L-Laktid).

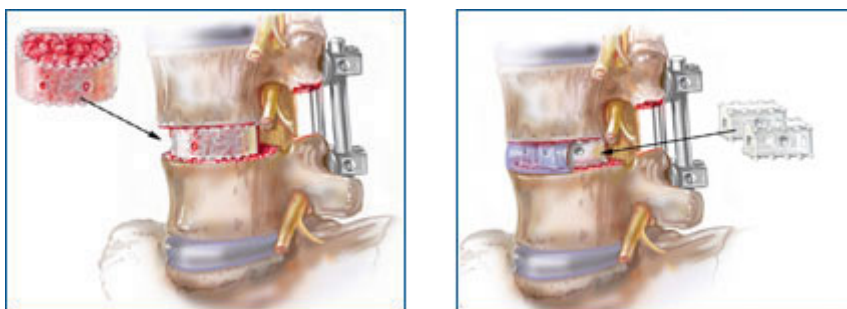


Abbildung 1.3 Resorbierbare Lendenwirbelimplantate (HYDROSORB™ Telamon)

Im Januar 2003 erhielt die Firma MacroPore Biosurgery die Zulassung für die europaweite Vermarktung der resorbierbaren Lendenwirbelsäulen-Implantate HYDROSORB™ Telamon (Abbildung 1.3). Diese Implantate werden bei Schädigungen der Bandscheiben durch Trauma, Krankheit oder altersbedingtem Verschleiß sowie für die Durchführung von Wirbelkörper-Fusionen verwendet.



Abbildung 1.4 Resorbierbare Folien

Zu den Erweiterungen der Plattformtechnologie für Biomaterialien zählen auch bioresorbierbare (dünne) Folien (Abbildung 1.4) zur Stützung und Heilung von Weichgewebe sowie zur Steuerung der Narbenbildungen nach einem chirurgischen Eingriff. Die bioresorbierbaren Folien finden in zahlreichen Bereichen klinische Anwendung. HYDROSORB™ Shield hat die Zulassung als temporäre Wundauflage erhalten und dient zur Unterstützung von Reoperationen, da durch sie eine chirurgische Schnittfläche geschaffen werden kann und eine Kontrolle von Narbenentstehungen bei bestimmten Wirbelsäulen-Anwendungen gelingt.

In der Literatur sind viele weitere Wirkstoffgruppen beschrieben, wie Kontrazeptiva (13, 170), Opiatantagonisten (162, 170), Zytostatika (61, 114), Lokalanästhetika (170, 172, 173, 174), Anti-Malaria Wirkstoffe (163), Anti Tuberkulose Stoffe (10, 11, 120, 145, 155), auch die ophthalmologische Anwendung wird beschrieben (75, 169), sowie Enzyme (162, 170), Hormone (17, 53, 157) und Impfstoffe (7, 21, 88, 89, 90, 92), die mit PLA oder PLGA mikroverkapselt worden sind, so dass von einem vielseitigen Anwendungsfeld der Polymere ausgegangen werden kann. Auch das breite Feld des „Tissue engineering“ bietet Möglichkeiten der Anwendung der Polymere, indem diese in Zellkulturen benötigte Wachstumsfaktoren gezielt über eine bestimmte Zeit und in einem festgelegten Umfang freigeben oder zur Verbesserung der Geweberegeneration nützlich sind (33).

## 1.6 Aufbau und Funktion der Lunge

Um die inhalative Applikation besser verstehen zu können, soll zunächst die Anatomie der Lunge sowie deren Funktion kurz erläutert werden.

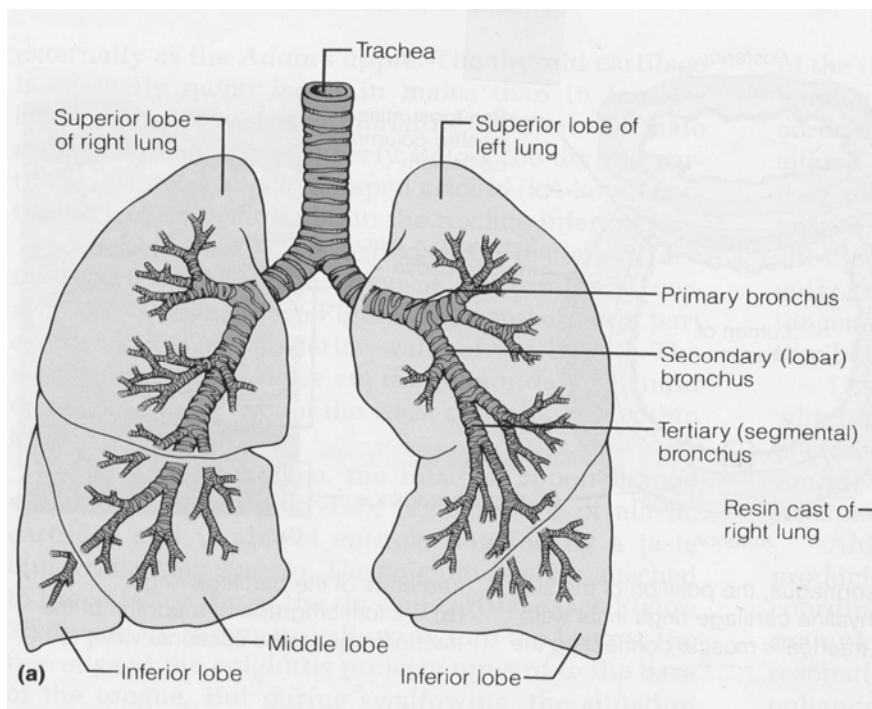


Abbildung 1.5 Anatomischer Aufbau und Funktion der Lunge

Der anatomische Aufbau der Lunge mit der Respirationsmembran ist in Abbildung 1.5 dargestellt (109). Die Atemluft gelangt vom Mund-Rachenraum in den Kehlkopf und durch dessen engste Stelle, die Stimmritze (Glottis), in die Luftröhre (Trachea). Am 5. Brustwirbel verzweigt sich die Luftröhre in die zwei Hauptbronchien, die zu den beiden Lungenflügeln führen. Die Hauptbronchien verzweigen sich in mehrere Untereinheiten (Bronchioli segmentales) und münden in die beiden Lungenflügel. Der rechte Lungenflügel ist durch tiefe Einschnitte in drei Lungenlappen aufgeteilt, der linke in zwei. Ein Lungenläppchen (Lobulus pulmonis) bildet die morphologisch-funktionelle Einheit der Lunge. Der Gasaustausch findet in den Alveolen statt, in denen die Lungenkapillaren liegen und die Blut-Luft-Schranke lokalisiert ist. Das Epithel der Alveolen ist mit Typ 1 und Typ 2 Pneumozyten ausgekleidet, die auf der alveolären Basalmembran liegen. Daneben findet man Alveolarmakrophagen, die ein Teil des unspezifischen Abwehrsystems darstellen. Die Blutversorgung der Lunge wird durch die Vasa publica, Blutgefäße, die sauerstoffarmes Blut zur Lunge hinführen und sauerstoffreiches Blut von der Lunge weg zum Herzen führen, sichergestellt. Die Lungendurchblutung in Ruhe beträgt 5-6 l/min und entspricht damit dem Herzminutenvolumen. Die Luft wird durch die Nase eingeatmet, wo sie erwärmt, befeuchtet und gereinigt wird und bei forcierter Atmung mit geöffnetem Mund durch die Mundhöhle in den Schlund (Pharynx) gelangt, der bis zum Kehlkopf (Larynx) einen gemeinsamen Weg für Luft und Speisebrei bildet. Am Larynx trennen sich diese Wege dann, die Luft strömt durch die 10-12 cm lange Luftröhre (Trachea) und die Stammbronchien in den sich verästelnden Bronchialbaum. Geschützt wird der Eingang in die Trachea bei Nahrungsaufnahme durch den Verschluss der Epiglottis, die sich über den Larynx legt. Durch Inspiration und Expiration werden die ca. 300 Millionen Alveolen belüftet. Bei der Expiration gelangt sauerstoffarme, mit Kohlendioxid angereicherte Luft in die Umgebung. Die Inspiration ist ein aktiver Vorgang, bei dem sauerstoffreiches Blut in den Alveolarraum gelangt. Durch Kontraktion der Muskulatur wird das intrathorakale Volumen vergrößert, der intrapulmonale

Druck sinkt gegenüber dem Atmosphärendruck mit Ausdehnung der Lunge ab. Durch dieses Gefälle kann Luft einströmen. Die Expiration ist passiv. Infolge ihrer Elastizität kehrt die Lunge wieder in ihre Ausgangsstellung zurück.

Die Atemmuskulatur unterstützt den Ein- und Ausatmungsvorgang. Die notwendigen Thoraxbewegungen zur Be- und Entlüftung der Lunge werden von der quergestreiften Atemmuskulatur bewirkt. Die alveolo-kapilläre Membran, in der der Gasaustausch stattfindet, besteht aus 2 Epithelzellarten, den Pneumozyten Typ I und II, die die Oberfläche der Alveolen komplett auskleiden (109).

Die Blut-Luft-Schranke besteht aus Endothelzellwand, Surfactant, Basallamina und Pneumozyten und ist durchschnittlich nur 2,2  $\mu\text{m}$  dick. Typ II Zellen synthetisieren Surfactant, das zu 90 % aus Lipiden (vorwiegend gesättigte Phospholipide, wie Phosphatidylcholin und Phosphatidylglycerol) und zu 10 % aus Surfactant-assoziierten Proteinen besteht und das die Oberflächenspannung an der Grenzfläche Gewebe-Luft vermindert. Die feinen Fasergeflechte um die Alveolen reichen zur Stützung des Lungengewebes nicht aus, die Lunge würde ohne Surfactant nach Beendigung der Ausatmung kollabieren. Der Sauerstoff-Partialdruck in den Lungenalveolen beträgt 0,133 bar, das venöse Blut in den Kapillaren der Lunge weist nur einen Sauerstoffpartialdruck von 0,0532 bar auf. Die Differenz beträgt somit 0,0798 bar. Der Kohlenstoffdioxid-Partialdruck ist dagegen mit 0,0611 bar anfangs der Lungenkapillaren um 0,0079 bar höher als in den Alveolen. Aufgrund dieser Partialdruckdifferenzen zwischen Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid findet der Gasaustausch statt. Zusätzlich hat die Lunge mit 70  $\text{m}^2$  eine außerordentlich große Oberfläche, dazu sind die Diffusionswege gering, so dass ein effektiver Austausch durch Diffusion stattfinden kann.

Die Lunge verfügt über ein Abwehrsystem, mit spezifischen und unspezifischen Abwehrmechanismen, welches das Eindringen von Fremdstoffpartikeln verhindert. Inhalierter Partikel, die auf der Luftwegsoberfläche deponiert werden, treffen als erstes auf einen Surfactant-Film. Surfactant kann als initialer Schritt in einer komplexen Kaskade von Abwehrvorgängen in der Lunge angesehen werden (65). Zu den unspezifischen Abwehrmechanismen zählt die mukoziliäre Clearance, bei der es durch Einhüllung von Fremdkörpern mit Schleim aus Becherzellen und Bronchialdrüsen und den Zilienschlag zum rachenwärts gerichteten Transport kommt, um die Fremdkörper anschließend abzuhusten oder zu verschlucken. Die oberen Atemwege filtern bereits viele Aerosolpartikel und verhindern deren Vordringen in tiefe Lungenabschnitte. Von den Terminalbronchien bis zum Kehlkopf existieren zilienträgende Zellen, die die ca. 7  $\mu\text{m}$  dicke Mukusschicht kontinuierlich in Richtung Larynx mit einer Geschwindigkeit von 10-21 mm pro Minute bewegen. Unlösliche Partikel werden ferner von den Alveolarmakrophagen phagozytiert und von diesen abgebaut (19). Entscheidend ist die Clearance während der ersten 24 Stunden nach der Applikation. Partikel mit einem Durchmesser von  $\leq 1 \mu\text{m}$  werden innerhalb dieses Zeitraums nur zu etwa 10 % aus der Lunge hinaustransportiert, während es bei Partikeln von etwa 6-8  $\mu\text{m}$  90% sind. Von noch größeren Partikeln sind nach 24 Stunden keine mehr in der Lunge zu finden. Aus den tiefen Lungenabschnitten scheinen Partikel nur noch mittels Phagozytose und Abtransport durch Atemwegsmakrophagen heraus zu gelangen (65). Es ist auch vorstellbar, dass Partikel oder Teile von Partikeln von dendritischen Zellen aufgenommen werden, die ihrerseits Antigene präsentieren. Die von den dendritischen Zellen aufgenommenen Partikel werden in das Gewebe hineintransportiert, wo sie via Lymphdrainage in die Lymphknoten gelangen (65).

## 1.7 Biopharmazie pulmonaler Arzneiformen

Die pulmonale Applikation von Arzneimitteln ermöglicht eine gezielte organspezifische Therapie ohne den restlichen Organismus zu belasten (131). Die technologischen Maßnahmen zur Erzielung einer optimalen Verfügbarkeit des Wirkstoffs am Wirkort sind bei inhalativer Applikation meist aufwändiger als bei topischer oder peroraler Applikation. Dies hängt damit zusammen, dass wesentliche Anteile der freigesetzten Dosis im Mund- und

Rachenraum sowie in den oberen Atemwegen deponiert werden oder im Device verbleiben. Somit sind sie therapeutisch nutzlos und können sogar zu unerwünschten Nebenwirkungen führen. Beispielhaft sei das Auftreten von Candidasmykosen, Mundtrockenheit und Heiserkeit bei der inhalativen Therapie mit Glukokortikoiden erwähnt. Daneben können auch Anwendungsfehler des Patienten die Verluste erhöhen. Mit dem Erreichen der tiefen Atemwege tritt der erwünschte Effekt auch rascher ein. Es wird eine geringere Dosis als bei systemischer Applikation benötigt, da weder ein hepatischer First-pass-Effekt noch eine vorausgehende Substanzverteilung im Organismus stattfinden. Die Zielgewebe bei pulmonaler Applikation lassen sich in 3 Zonen einteilen (78): die zentrale innere, die intermediäre und die periphere Zone (Abbildung 1.6).

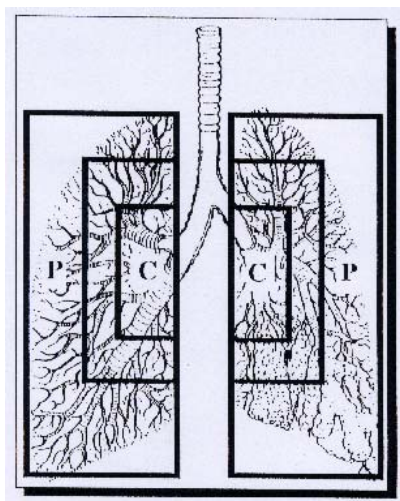


Abbildung 1.6 Unterteilung der Lunge in zentrale, intermediäre und periphere Bereiche

Weiterhin kann der Respirationstrakt in Teilungsgeneration 0 bis 23 eingeteilt werden. Die Leitungszone umfasst die Generationen 0 bis 16 (Luftröhre, zwei Hauptbronchien, zwei Lungenflügel mit den entsprechenden Lappen), daran schließt sich die Übergangszone an (Bronchioli respiratori mit einem Durchmesser von ca.  $0,4 \mu\text{m}$ ), die bei Generation 19 endet und dann in die Respirationszone (Alveolargänge (Ductuli alveolares) mit einem Durchmesser von ca.  $0,2 \mu\text{m}$  und Sacculi alveolares) übergeht (19). Zu den größten Herausforderungen der pulmonalen Therapie zählt damit die Optimierung des pulmonal deponierten Wirkstoffanteils, der das Ergebnis des Zusammenwirkens von Geräteparametern, der Handhabung durch den Patienten und der galenischen Formulierung ist (153). Folgende Erkrankungen werden unter anderem heute inhalativ therapiert: Asthma bronchiale, chronische obstruktive pulmonale Atemwegserkrankung (COPD), Mukoviszidose, Bronchiektasen, Pilzinfektionen der Lunge und die Pneumocystis carinii-Pneumonie als Folge einer HIV-Infektion. Tabelle 1.2 listet Beispiele von Arzneistoffen auf, die derzeit als pulmonale Arzneiform angewendet werden (Auszug aus (97)).



Tabelle 1.2 Beispiele von Arzneistoffen, die in pulmonalen Arzneiformen appliziert werden

---

 *$\beta$ -Sympathomimetika:*Fenoterol, Terbutalin, Salbutamol, Clenbuterol, Pirbuterol, Reproterol, Salmeterol, Formoterol

---

*Anticholinergika:*Ipratropiumbromid, Oxitropiumbromid, Tiotropium

---

*Antiphlogistika:*Chromoglycinsäure, Nedocromil, Dexamethason, Triamcinolon, Budesonid, Beclomethasondipropionat, Flunisolid

---

*Sekretolytika, Mukolytika:*Ambroxol, Acetylcystein, Bromhexin, Emser Salz, Tyloxapol, Dornase-alfa, Amilorid

---

*Antibiotika:*Gentamicin, Tobramycin, Pentamidin

---

*Antimykotika:*Amphotericin B, Nystatin, Natamycin

---

*Antiprotozoenmittel:*Pentamidin

---

*Immunsuppressiva, Immunmodulatoren:*Ciclosporin

---

### 1.7.1 Depositionsverhalten

Die Deposition ist die Verteilung von Arzneistoffpartikeln in der Lunge. Die wichtigsten depositionssteuernden Faktoren sind im Folgenden zusammengefasst (modifiziert nach (97)).

- *Biologie und Anwendung*
  - Atemfrequenz
  - Atemfluss
  - Atemvolumen und Atemtiefe
  - Anatomie des Respirationstraktes, die die interindividuellen Unterschiede der Atemwegsgeometrie, die relative Feuchtigkeit und Erkrankungen des Respirationstraktes berücksichtigt
  - Art der Anwendung, z.B die Koordination zwischen Sprühstoßauslösung und Inspiration

- *Formulierung*  
 Mikronisierbarkeit, die bei Pulverformulierungen entscheidend ist  
 Löslichkeit des Wirkstoffs in Treibgasen  
 Hygroskopie und damit die Beeinflussung des Partikelwachstums  
 Partikelgrößenverteilung  
 Art des Treibgases
- *Applikator*  
 Art des Applikators, z.B mit/ohne Spacer  
 Erzeugtes Teilchengrößenspektrum

Die Vorgänge Impaktion, Sedimentation und Diffusion, die alle von der Partikelgröße abhängen, sind die wichtigsten depositionsbestimmenden Faktoren. Die Impaktion ist ein wichtiger Depositionsparameter bei Partikeln mit Teilchengrößen  $> 3-5 \mu\text{m}$ . Sie tritt infolge der Massenträgheit (Impuls) von Partikeln auf, die im Atemstrom bewegt werden und die dem Luftstrom nicht mehr folgen können. Die Partikel werden häufig am Oropharynx abgeschieden, wobei die individuelle Anatomie der Glottisregion eine besondere Rolle spielt. Das Ausmaß der Deposition ist proportional zur Geschwindigkeit der Partikel im Luftstrom und zum Quadrat des Partikeldurchmessers (97). Die Sedimentation der Partikel ist auch abhängig von ihrer Größe und wird zudem von der Schwerkraft beeinflusst. Sie ist relevant für Partikel mit einem Durchmesser von  $0,5$  bis  $1 \mu\text{m}$  in den kleinen und mittleren Bronchien, sowie in der Alveolarregion. Noch kleinere Partikel sind aus therapeutischer Sicht eher vernachlässigbar, da sie nur eine geringe Masse besitzen und meist wieder ausgeatmet werden (24, 31). Partikel aus Pulverinhalatoren oder Dosieraerosolen können bei der Applikation auf das 4- bis 5-fache ihres ursprünglichen Durchmessers anwachsen, indem sie Wasser aus der feuchten Luft in den Bronchien (die relative Luftfeuchtigkeit beträgt dort nahezu 100 %) adsorbieren. Dadurch werden sie schwerer und werden schneller deponiert. Größere Partikel werden bereits vorher durch Impaktion am Oropharynx abgeschieden. Auch dieses Wachstum ist abhängig von der Partikelgröße. Kleinere Partikel besitzen eine größere relative Oberfläche und wachsen durch Wasseradsorption rascher. Neben Impaktion und Sedimentation spielt auch die Diffusion, Interzeption und elektrostatische Deposition eine Rolle. Partikel, deren Durchmesser weniger als  $1 \mu\text{m}$  beträgt, können durch die Brownsche Molekularbewegung und die dadurch hervorgerufene Bewegung abgeschieden werden. Die individuelle Geometrie des Respirationstrakts und die Inhalationstechnik der Patienten sind wichtige physiologische Faktoren der Aerosolabscheidung. Partikel von weniger als  $2 \mu\text{m}$  Durchmesser, die aufgrund der Brownschen Molekularbewegung Diffusionsvorgängen unterliegen, werden in ihrem Depositionsverhalten von der Art der Luftströmung (turbulente versus laminare Strömung) beeinflusst. Beim Gesunden herrscht während der Einatmungsphase unterhalb der Glottis eine laminare Luftströmung. Bei einer obstruktiven Atemwegserkrankung hingegen herrscht meist eine turbulente Strömung, bei der es zu häufigerem Kontakt des partikeltragenden Luftstroms mit der Bronchialwand und so zu einer vermehrten Partikelabscheidung kommt. Bei länglichen Partikeln kann der Weitertransport in der Lunge durch einen „Sperrereffekt“ (Interzeption) behindert werden, der sich dann einstellt, wenn sich die Partikel quer zur Strömungsrichtung stellen. Interzeption tritt bei Teilchen auf, die aufgrund ihrer physikalischen Größe in den Randbereichen des Aerosolstromes mit den Atemwegen in Kontakt treten und dort deponiert werden. Die elektrostatische Deposition spielt in der Praxis auch nur eine Nebenrolle. Sie kann bei kleinen, gleichsinnig geladenen Partikeln auftreten. Diese werden durch die gegenseitige Abstoßung an die Oberfläche der Atemwege befördert und damit deponiert.

Der optimale Durchmesser von Partikeln für die pulmonale Anwendung liegt bei  $2-3 \mu\text{m}$ , da in diesem Fall die Impaktion fast keine Rolle mehr spielt, die Partikel hingegen noch eine hinreichende Größe besitzen, um Wirkstoff in ausreichender Menge zu tragen. Die oropharyngeale Deposition steigt mit zunehmendem Partikeldurchmesser, bedingt durch die Filterfunktion der Glottisregion, an. Sehr kleine Partikel mit einer Größe  $\leq 0,5 \mu\text{m}$  werden, bedingt durch ihre geringe Sedimentationsgeschwindigkeit, wieder ausgeatmet. Der ausgeatmete Anteil lässt sich bei langsamer Ausatmung oder längerem Anhalten der Luft nach dem Einatmen reduzieren. Edwards (53) stellte Insulin PLGA-Mikropartikel zur

pulmonalen Applikation mittels Lösungsmittelverdampfung her, deren Dichte sehr gering war, der mittlere Durchmesser aber  $5\ \mu\text{m}$  überschritt (large porous particles). Die Mikropartikel konnten den Clearance Mechanismen der Lunge entkommen, bis sie Insulin in therapeutischen Dosen freigegeben hatten. Der Blutglukosespiegel konnte über 96 Stunden gesenkt werden, während Mikropartikel mit einem Durchmesser  $< 5\ \mu\text{m}$  diesen Effekt für nur 4 Stunden aufrechterhalten konnten. Die Penetration in die tiefen Lungenbereiche wies er mittels einer Lavage nach. In Abbildung 1.7 ist der Zusammenhang zwischen Partikelgröße und (pulmonaler) Deposition gezeigt.

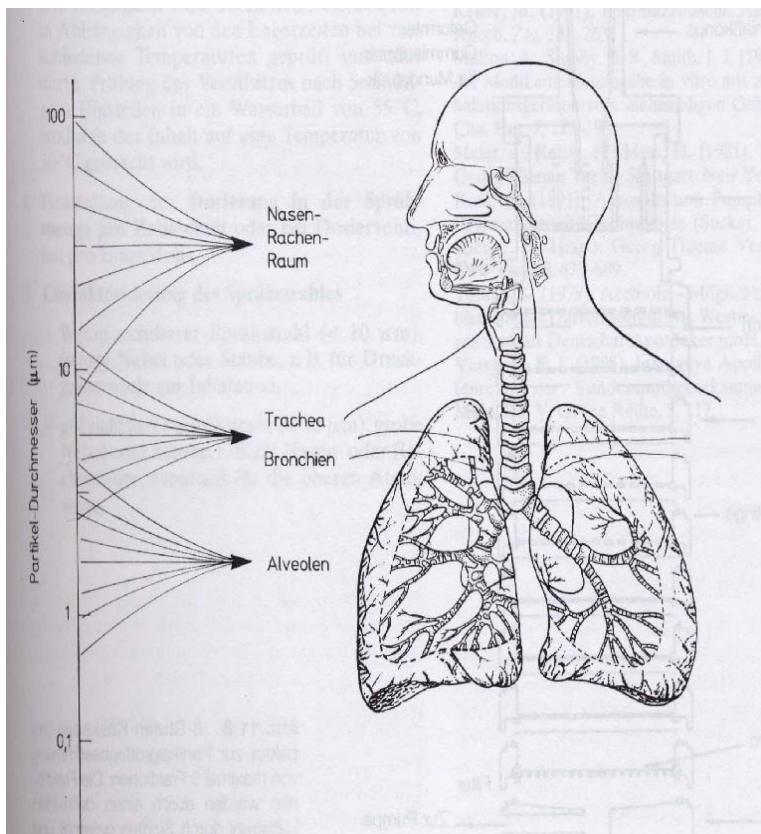


Abbildung 1.7 Zusammenhang zwischen pulmonaler Deposition und Partikelgröße (12)

Die pulmonale Deposition von Dosieraerosolen lässt sich durch großvolumige Spacer-Systeme um bis zu 30 % erhöhen, obwohl mit einem gewissen Aerosolverlust durch Impaktion und Sedimentation im Spacer zu rechnen ist. Gleichzeitig lässt sich aber durch den Einsatz eines Spacers die oropharyngeale Deposition um das 7- bis 20-fache erniedrigen (97). Dieser Effekt ist auf eine Reduktion der Geschwindigkeit der Aerosolwolke zurückzuführen, bei der sich größere Partikel bereits an der Wandung des Spacers niederschlagen und nicht in den Mund-Rachenraum befördert werden. Zusätzlich kommt es durch die Evaporation der tröpfchenbildenden Treibgase zur Formation kleinerer Partikel mit verbesserter Deposition in den Bronchien (97). Mit dem Spacer-Prinzip wird die Anwendungssicherheit bei Dosieraerosolen erhöht, da eine direkte Koordination zwischen Sprühstoßauslösung und Einatmung nicht erforderlich ist.

### 1.7.2 Zusammenhang zwischen Deposition und Atemmanöver

Die unterschiedlichen Atemwegsgeometrien üben differenzierte Effekte auf die Deposition von Partikeln aus. Für Partikeldurchmesser, die größer als  $3\text{-}5\ \mu\text{m}$  sind, nimmt die Deposition mit steigendem Atemminutenvolumen zu, da der Inspirationsfluss steigt. Dieser ist der entscheidende Parameter für die Impaktion und die turbulente Diffusion. Mit dem

endinspiratorischen Anhalten des Atems nimmt die Sedimentation zu und somit auch die Aerosoldeposition. Unterschieden werden kann bezüglich der Deposition zwischen flacher und tiefer Atmung, vor allem bei Partikeln, die kleiner als  $3\ \mu\text{m}$  sind. Bei flacher Atmung kann der Anteil des Totraums der Lunge bis zu 50 % betragen, bei tiefer Atmung hingegen fällt er auf unter 5 %. Der Totraum wird als der Anteil der Atemwege bezeichnet, der nicht am Gasaustausch beteiligt ist, wie Mund-, Nasenraum, Larynx, Trachea und Bronchien. Kleinere Partikel, die bei flacher Atmung im Totraum nicht sedimentieren, werden ausgeatmet.

### 1.7.3 *In-vitro Charakterisierung der pulmonalen Deposition*

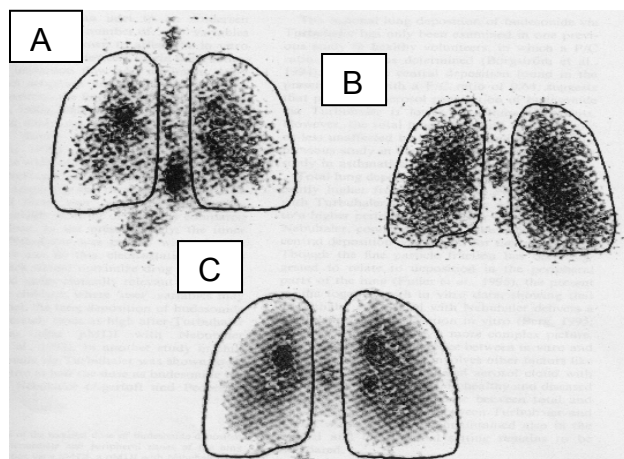
Neben den Prüfungen der Arzneibücher (Ph. Eur, USP, JP) auf Gleichförmigkeit der abgegebenen Dosis, Anzahl der Dosen bei Mehrdosenbehältnissen und Feinanteil der Dosis (d.h. der Anteil der Partikel an der Dosis, der  $\leq 5,8\ \mu\text{m}$  beträgt) sowie Endotoxin- und Pyrogenfreiheit ist eine aerodynamische Beurteilung der Partikelgröße pulmonaler Zubereitungen erforderlich. Diese kann mittels Impaktoren (z.B. Andersen Kaskaden Impaktor oder Marple-Miller Impaktor) oder Impinger (z.B. Erweka Multi Stage Liquid Impinger Astra Typ oder Twin Impinger) bestimmt werden.

Hierdurch können im Prinzip inhalierfähige ( $\leq 5,8\ \mu\text{m}$ , die die tieferen Atemwege erreichen) und nicht inhalierfähige ( $> 5,8\ \mu\text{m}$ ) Anteile eines Aerosols bestimmt werden. Jedoch handelt es sich dabei um eine reine physikalische Charakterisierung, die keine Rückschlüsse auf die Interaktion zwischen Patient und Produkt zulässt. Die Prüfung dient allein der Produktcharakterisierung.

Alternativ lässt sich zur aerodynamischen Teilchengrößenanalyse, die das Strömungsverhalten beurteilt, die Analyse mittels Laserdiffraktometrie auf der Grundlage von Lichtbeugungsphänomenen durchführen. Die Ergebnisse aus beiden Verfahren sind nicht notwendigerweise identisch, da die Methoden auf unterschiedlichen physikalischen Phänomenen beruhen.

### 1.7.4 *In-vivo Charakterisierung der pulmonalen Deposition*

Die Charakterisierung der pulmonalen Deposition wird in der Regel mittels Gamma-Szintigraphie durchgeführt, mit der zwei- und dreidimensionale Aufnahmen der Deposition des Wirkstoffs in der Lunge, dem Oropharynx und anderen Geweben möglich sind. Anwendungen finden sich z.B. in der Entwicklungsphase eines Arzneimittels, um beispielsweise den Einfluss der Partikelgröße auf die Deposition, die Optimierung der pulmonalen Deposition mit Spacern oder den Zusammenhang zwischen Inhalationstechnik und Deposition zu testen. Auch in der Bioäquivalenzprüfung wird die Gamma-Szintigraphie eingesetzt, um die Verteilung von Arzneimitteln in den Organen zu bestimmen. Eindeutige Äquivalenzkriterien für solche Untersuchungen sind allerdings bislang noch nicht definiert worden. Bei der Gamma-Szintigraphie wird eine geringe Menge an schwach radioaktivem, kurzlebigen Radionuklid verabreicht ( $^{116}$ ) (z.B.  $^{99\text{m}}$ -Technetium-Pertheneat,  $^{99\text{m}}$  Technetium-Phosphat), das sich in dem Zielorgan (= Respirationstrakt) anreichert und Gamma-Strahlung (Röntgenstrahlung) aussendet. Die Verteilungsdichte der aus dem Körper austretenden Gamma-Strahlung wird als Szintigramm, ein Strichrasterbild bei dem die Dichte der Striche die Aktivitätsverteilung der Gamma-Strahlung wiedergibt, dargestellt. Die Registrierung der Gamma-Strahlung erfolgt entweder durch einen Scanner mit einem Detektor, der die gemessene Strahlung in elektrische Impulse umwandelt, verstärkt und weiterverarbeitet oder mit einer Gamma-Kamera, bei der mehrere Detektoren gleichzeitig zur Anwendung kommen und die demzufolge schneller eine Reihe von Szintigrammen erstellen kann. Eine szintigraphische Aufnahme nach Applikation eines Dosieraerosols bei korrekter Koordination zwischen Einatmung und Auslösung des Sprühstoßes nach einer Pause von 2 Sekunden zeigt Abbildung 1.8 (164). Der in den Lungen deponierte Anteil des Aerosols ist bei korrekter Handhabung etwa doppelt so groß.



- A Dosieraerosol (99m Tc markiertes Budesonid)
- B Dosieraerosol mit Spacer (99m Tc markiertes Budesonid)
- C Turbuhaler (99m Tc markiertes Budesonid)

Abbildung 1.8 Szintigraphische Aufnahmen der Lungendeposition von Dosieraerosol, Dosieraerosol mit Spacer und Trockenpulverinhalator

Eine andere bildgebende Darstellung der Lunge, wie auch anderer Organe, erhält man über PET (Positronen Emissions Tomographie) unter Verwendung von  $^{11}\text{C}$ - oder  $^{18}\text{F}$ - markierten Verbindungen.

Mittels Transmissionsszintigraphie, z.B. Inhalationsszintigraphie, werden die belüfteten, ventilierten Anteile der Lunge dargestellt. Die lokal irreguläre Deposition eines Aerosols ist mit sogenannten „Hot spots“ gezeichnet (97). Eine Mainzer Forschergruppe entwickelt und optimiert zurzeit eine bahnbrechende Methode zur Untersuchung der Lunge. Helium-3 ( $^{3}\text{He}$ ) dient als Kontrastmittel und liefert nach dem Einatmen detailgetreue Bilder. Herkömmliche Verfahren, wie das Röntgen, bilden nur das Lungengewebe ab, mit Helium kann erstmals die Verteilung des Atemgases in der Lunge betrachtet werden: Der Bildschirm zeigt, wie das Gas durch die Luftröhre in die Lunge strömt und bis in die kleinsten Verästelungen der Bronchien gelangt. Die neue radiologische Methode gilt als vielversprechend und soll zu einem Routineverfahren für Lungenuntersuchungen weiterentwickelt werden.

#### 1.7.5 Applikationsformen für die pulmonale Therapie

##### Vernebler

Vernebler benötigen eine externe Quelle (Kompressor, Ultraschall), um inhalierfähige Aerosole zu erzeugen. Druckluftbetriebene Vernebler bestehen aus einem Kompressor zur Erzeugung von Druckluft, einem Druckluftschlauch und einem Verneblerkopf mit dem Arzneimittelreservoir, Verneblerdüse und Mundstück. Mittels Druckluft werden Tröpfchen aus dem Reservoir mitgerissen, die an der Prallplatte zu einem Nebelaerosol zerteilt werden. Der Gasfluss und die Abmessungen der Prallplatte beeinflussen die Partikelgröße. Ultraschallbetriebene Vernebler beruhen auf einem piezoelektrischen Effekt. Durch Anlegen einer Wechsellspannung wird bei piezoelektrischen Kristallen eine hochfrequente Eigenschwingung erzeugt. Durch entsprechend hohe Frequenzen und Übertragung der Ultraschallwellen auf die Arzneistofflösung, entsteht an der Lösungsoberfläche ein Nebelaerosol mit einem mittleren Partikeldurchmesser um  $5\ \mu\text{m}$  (97). Die Ultraschallfrequenz (mindestens 1 MHz) bestimmt die Teilchengröße und Menge des Aerosols. Die Anwendung erfolgt durch langsame, tiefe Inspiration mit kurzer endinspiratorischer Atemanhaltezeit und anschließender Expiration. Mit Verneblern kann man aufgrund der Größe des vernebelten Flüssigkeitsvolumens und der Therapiedauer von 5-15 Minuten größere Mengen an Wirkstoff pulmonal zuführen. Allerdings erreichen meist nur 10 % der vernebelten Dosis die Lunge. Ferner variiert die zugeführte Dosisrate, die ausgebrachte Dosis und die Partikelgröße für die gleiche Formulierung in verschiedenen Verneblern. Die meisten Vernebler sind nicht portabel. Ein weiterer Nachteil der Vernebler ist, neben der Problematik der Verneblung von Suspensionen und viskosen Flüssigkeiten (97), bei denen Scherkräfte auftreten können, die hohe Energie, die sich auf große Moleküle wie Peptide und Proteine negativ auswirkt. Der

Respimat™ ist ein neuartiger Vernebler („Soft-Mist Inhaler, SMI“), der ähnlich portabel wie Dosieraerosole und Trockenpulverinhalatoren ist, andererseits aber kein Treibgas erfordert. Auch Druckluft und Ultraschallenergie werden nicht benötigt. Als Lösungsmittel dienen Wasser oder Wasser/Ethanol-Mischungen. Im Vergleich zu Suspensionen in Dosieraerosolen entfällt das Schütteln der Zubereitung vor der Auslösung. Eine Flüssigkeit wird mit einem Druck von mehr als 200 bar durch zwei Siliziumglasdüsen gepresst, die in Chip-Technologie hergestellt werden und ca. 6 µm Durchmesser haben (117). Um eine Verstopfung der Düsen zu verhindern, wird ein Filter vorgeschaltet, der ebenfalls in Chip-Technologie hergestellt wird. Am Austritt der Düse erfolgt eine rasche Volumenexpansion und der Flüssigkeitsfilm zerreißt in kleine Tröpfchen. Nach der Auslösung des Gerätes wird eine für mehr als eine Sekunde (63) stabile Aerosolwolke erzeugt („Soft Mist“), die nur sehr langsam freigesetzt wird und damit eine geringe oropharyngeale Deposition und eine erhöhte Lungendeposition bewirkt (124). Wässrige Lösungen erzeugen Partikel, deren Durchmesser etwas kleiner als 6 µm ist. Ferner ist bei der langsamen Freisetzungsdauer eine Koordination zwischen Inspiration und Aktivierung des Devices unkritischer, als bei Dosieraerosolen. Der Feinpartikelanteil liegt bei wässrigen Formulierungen bei 66 %, ethanolische Lösungen besitzen mit 81 % einen deutlich höheren Feinpartikelanteil als Dosieraerosole mit unter 40 % (22, 188). Abbildung 1.9 zeigt den Aufbau des Respimat™ (97).

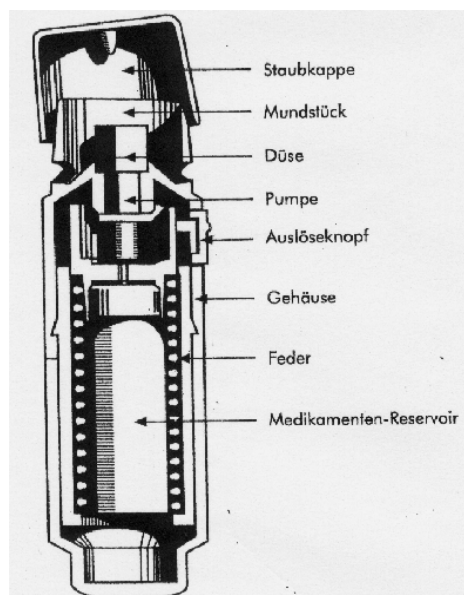


Abbildung 1.9 Respimat™

Der AERx™, der noch nicht auf dem Markt ist, ist ebenfalls ein neuer Vernebler, handlich und portabel, der auswechselbare, vorgefertigte Dosen als Blister in einer Kartusche enthält. Er wurde mit der Zielsetzung entwickelt, Insulin und Morphin als Lösung inhalativ applizierbar zu machen.

Weitere Vernebler sind der pressluftgetriebene Pari Vernebler™ und der mittels Ultraschall getriebene und mit einer perforierten Membran versehene Omron U1™.

#### *Treibgasbetriebene Dosieraerosole (pMDI)*

Dosieraerosole sind disperse Systeme mit einer flüssigen oder festen dispergierten Phase und einem Treibmittel als Dispersionsanteil. In der flüssigen Treibgasphase befinden sich die gelösten oder suspendierten Wirkstoffe und mögliche Hilfsstoffe. Nach dem Öffnen des Ventils drückt die Gasphase die flüssige Phase durch das Steigrohr nach außen, wo es zum Verdampfen des Treibgases kommt, welches sich dabei um das 300-fache seines Volumens expandiert. Es erfolgt so eine feine Zerstäubung des dispergierten Arzneistoffs. Präparate, die als Dosieraerosole angeboten werden und Salbutamol enthalten sind Sultanol™, Epaq™

und Salbulair™, Budesonid ist im Dosieraerosol Pulmicort™ enthalten. Systembedingter Nachteil bei Dosieraerosolen ist die notwendige Koordination zwischen der Auslösung des Sprühstoßes und der Einatmung (44, 152). Ein weiterer Nachteil ist die erhöhte oropharyngeale Deposition, die durch Impaktion aufgrund der hohen Geschwindigkeit der Aerosolwolke zustande kommt, sowie manchmal eine Reflexbronchokonstriktion, bedingt durch den Kältereiz des Treibgases. Bei den Dosieraerosolen hat die langsame Inhalation den Vorteil, dass es zu einer homogeneren intrabronchialen Aerosolverteilung kommt. Speziell für Kinder wurden Gesichtsmasken entwickelt, um deren Compliance zu verbessern (40, 45).

Die Deposition hängt bei treibgasbetriebenen Dosieraerosolen nicht vom Atemfluss ab, da eine aktive Freisetzung durch das Treibgas erfolgt. Die inhalierte Dosis beträgt ca. 25 % (94). Aufgrund des FCKW-Verbots wurden alternativ Hydrofluoralkane (HFA), Tetrafluorethan und Heptafluorpropan zur Anwendung zugelassen. Bei Tetrafluorethan werden aufgrund dessen hohen Dampfdrucks zusätzlich Alkohole zur Druckminderung zugesetzt.

Insbesondere HFKW 134a und HFKW 227 haben sich durchgesetzt. Sie sind chlorfrei und für den Menschen, wie die FCKWs auch, nicht toxisch. FCKWs wurden verboten, da sie wegen ihrer Reaktionsträgheit eine hohe Verweildauer in der Atmosphäre haben. Sie steigen bis in die Stratosphäre auf und reagieren dort mit den UV-Strahlen, wobei Chlor freigesetzt wird, welches die Ozonschicht schädigt.

Tabelle 1.3 zeigt eine Zusammenstellung der Treibgase für Dosieraerosole (144).

Tabelle 1.3 Hilfsstoffe, die in Dosieraerosolen Verwendung finden und fanden

Chemische Bezeichnung	Typ deutsch	Typ englisch	Code	Lebensdauer in Atmosphäre
Trichlorfluormethan	FCKW	CFC	11	42
Dichlordifluormethan	FCKW	CFC	12	102
Dichlortetrafluorethan	FCKW	CFC	114	300
Tetrafluorethan	HFKW	HFA	134a	14
Heptafluorpropan	HFKW	HFA	227	41

FCKW Fluorchlorkohlenwasserstoff  
HFKW Fluorkohlenwasserstoff

CFC Chlorfluorcarbon  
HFA Hydrofluoroalkane

Für HFKW 134a, das einen hohen Dampfdruck besitzt, wird zusätzlich Ethanol verwendet, da er zu verbesserten Lösungseigenschaften und einer erhöhten Stabilität von vor allem lipophilen, gelösten Wirkstoffen führt und somit die geringe Dichte von HFKW 134a im Vergleich zu FCKW kompensieren kann. Eine solche Lösung hat eine kleinere Partikelgröße im Vergleich zu FCKW als Treibmittel. Die kleineren Partikel (ca. 1,1 µm) deponieren weiter in der Lungenperipherie. Aufgrund der geringen bronchialen Impaktion erhöht sich die in die tieferen Lungenabschnitte eingebrachte Dosis.

HFKW-haltige Dosieraerosole, die Suspensionen enthalten, haben die gleichen Eigenschaften wie FCKW-haltige Dosieraerosole in Bezug auf das Freisetzungverhalten und das Partikelspektrum. Die alternativen Treibgase haben einen sehr geringen Siedepunkt. Deswegen sind Drücke von ca. 6 bar notwendig, um es im Kanister flüssig zu halten. Durch den Ethanolzusatz kann der Druck auf 4 bar reduziert werden. Dieser gegenüber FCKW erhöhte Druck führte dazu, dass bisher inerte Dichtungsmaterialien aus Silikonmischungen nicht mehr stabil waren und neue Dichtungen entwickelt werden mussten. HFKW hat in Dosieraerosolen eine Haltbarkeit von 3 Jahren. Ein Vorteil der chlorfreien Treibgase ist ihre Kälteunempfindlichkeit. Sie sind auch bei -10°C immer noch funktionstüchtig (97).

### *Pulverinhalatoren (DPI)*

Pulverinhalatoren enthalten den mikronisierten Wirkstoff üblicherweise mit Hilfsstoffen, meist Laktose·1H<sub>2</sub>O oder Glukose ( $x_{50}$  50-100 µm) in Blistern, Hartgelatinekapseln oder Containersystemen. Der Arzneistoff adhärirt an der Oberfläche der Carrier oder bildet mit diesen zusammen labile Agglomerate. Diese zerfallen dann bei genügend hoher Atemstromstärke (optimal 30-60 l/min). Die lungengängigen Wirkstoffpartikel werden inhaliert und die größeren Carrier im Mund- und Rachenraum deponiert. Letzteres Phänomen ist vom Patienten spürbar und dient als Kontrolle der Inhalation. Es erfolgt die Desagglomeration vom Trägerstoff. Die Inhalation sollte langsam und konstant erfolgen. Das Pulver wird durch die nachfolgende Luft in die Peripherie des Bronchialbaumes gespült und deponiert. Trockenpulverinhalatoren benötigen kein Treibgas, das einen Kältereiz auslösen kann. Die Mobilisation der Teilchen erfolgt durch den Atemzug des Patienten, so dass eine Koordination mit der Inspiration entfällt (atemzuggesteuert). Die individuelle Atemstromstärke ist vom Widerstand des Gerätes und vom Patienten abhängig.

Der ideale Pulverinhalator sollte über folgende Eigenschaften verfügen (151):

- hohe Deposition in der Lunge
- hohe Reproduzierbarkeit der Dosis
- unabhängig vom Atemmanöver (Einatemgeschwindigkeit)
- guter Schutz gegen Feuchtigkeit
- Zählwerk der abgegebenen Dosen
- keine Gefahr einer Überdosierung
- Lagerstabilität
- einfache Handhabbarkeit und Reinigung
- wiederverwendbar
- preisgünstig

Kaum ein Inhalator erfüllt all diese Anforderungen gleichzeitig. In einer Cross-over Studie von Budesonid mit dem Turbohaler wurde an 10 Probanden bei einem mittleren Inspirationsfluss von 35 l/min eine Deposition von 14,8 % erreicht, bei 62 l/min waren es 27,7 %. Patienten mit akuter, schwerer Atemnot erreichen noch Inspirationsflüsse von 30 l/min, so dass auch im Notfall, bei Mehrfachinhalation, eine ausreichende Verbesserung der Lungenfunktion erreicht werden kann (105). Es besteht die Zielsetzung, die Geräteparameter und Formulierung derart zu optimieren, dass die Deposition möglichst unabhängig von der Atemzugstärke erfolgt. Studien mit Budesonid und dem Novolizer™ haben gezeigt, dass die inhalierte Dosis im Bereich 35-60 l/min praktisch unabhängig von der Atemflussstärke und der Inspirationsdauer sein soll (107). Die Wirbelkammer des Novolizer™ ist so konstruiert, dass ein Zyklon für die Verwirbelung des Pulvers sorgt und der Wirkstoff dabei gleichzeitig von der Laktose getrennt wird. Die Laktose verbleibt im Mund.

Trockenpulverinhalatoren können in Unit Dose Inhalatoren (Spinhaler™, HandyHaler™, Rotahaler™), Unit Multi Dose (Diskus™, Inhalator M™) und Multiple Powder Dose Inhalatoren (Novolizer™, Turbohaler™, Easyhaler™, MAGhaler™ Mechanischer Aerosol-Generator, Ultrahaler™) eingeteilt werden. Der Turbohaler™ und der Easyhaler™ sind nicht wieder verwendbar. Beim MAGhaler™ ist eine neuartige Formulierungsidee umgesetzt worden: Der Wirkstoff ist mit Laktose als Hilfsstoff zu einer Ringtablette verpresst, die fest in das Mundstück integriert ist und auf eine Antriebseinheit aufgesteckt ist. Durch Drehen der Basis der Antriebseinheit wird das Mahlwerk aufgezogen, das durch Knopfdruck aktiviert wird. Eine genau definierte Menge Pulver in der benötigten Partikelgröße wird von der Ringtablette abgeschabt. Nach einem ähnlichen Prinzip wie der MAGhaler arbeitet der Ultrahaler™, bei dem eine definierte Pulvermenge von einem Pressling abgeschabt wird (151). Bei den Unit Dose Inhalatoren werden die Dosen einzeln verpackt und bleiben vor Umwelteinflüssen (z.B. Feuchtigkeit) geschützt, die Dosierungsgenauigkeit ist bei diesen in der Regel etwas besser als bei Multiple Powder Dose Inhalatoren. Letztere enthalten einen Behälter mit mechanischer Dosiervorrichtung, aus dem die freigesetzte Dosis mittels Atemzug inhaliert wird. Der Spinhaler™, der auch zu den wiederaufladbaren Single Dose Units gehört, beinhaltet eine Hartgelatine kapsel, die eingestochen wird und den Wirkstoff



dadurch freigibt, dass die Kapsel durch den Luftstrom des Atemzugs im Device eine Drehung (Spin) ausführt.

In den vergangenen Jahren wurden zusätzlich neue Einzeldosen enthaltende Geräte zugelassen, wie der HandiHaler™ von Boehringer-Ingelheim (39) und der Aerolizer™ von Novartis (118), sowie Mehrdosen Geräte wie der Clickhaler™ von Innovata Biomed (178).

Die Qualität einer Atemwegstherapie ist abhängig von der Stärke der Inspiration, dem Gerät und von der Formulierung (8, 15, 64, 167). Hinsichtlich der Formulierung benötigt man für eine interaktive Mischung gröbere Trägerpartikel, an die der mikronisierte Wirkstoff adhärert ist. Damit werden eine spezifizierte Dosierung und geeignete Fließeigenschaften erhalten. Lediglich Partikel mit einer Teilchengröße  $\leq 5,8 \mu\text{m}$  gelangen in die tiefen Lungenbereiche (15, 64, 167). Der Laktosekristall ist nahezu gesättigt mit dem Wirkstoff. Bei einer höheren Wirkstoffmenge und gleichbleibender Menge und Größe an Laktose adsorbiert nicht mehr Wirkstoff an der Laktose, als zu den vorherigen Bedingungen und es werden Wirkstoffagglomerate gebildet (153).

Als Hilfsstoffe bei Trockenpulverinhalatoren werden Laktose und Glukose verwendet. Ferner ist eine gute Verteilung des Pulvers in der Lunge abhängig von der Partikelgröße (59) und der Partikelform (184). Die Art der Mikronisation (77), wie z.B. mittels Luftstrahlmahlung oder Sprühtrocknung, hat einen eher geringeren Effekt, da sie theoretisch mittels Elektrostatik die Fließeigenschaften, die interpartikulären kohesiven Kräfte und die Adhäsion der Substanz auf der Kapseloberfläche oder an der Wand des Devices beeinflussen könnte, dies aber durch Bindung des Arzneistoffs an einen Träger vermieden wird. Ein Vergleich der Deposition zwischen Dosieraerosolen und Trockenpulverinhalatoren wurde in einer offenen, randomisierten Cross-over Studie mit acht Asthmapatienten durchgeführt (164). Die Studie wurde mit Budesonid mit einem Dosieraerosol bei einem Inspirationsfluss von 30 l/min, einem Dosieraerosol mit Spacer (Nebuhaler™) bei 15 l/min und dem Turbohaler bei 60 l/min. durchgeführt. Nach der Inspiration wurde für 10 s der Atem angehalten und durch einen Filter exhalieret. Gamma-szintigraphische Aufnahmen des Brustkorbes, des Magens und des Oropharynx, sowie des Mundstücks, des Exhalationsfilters und dem Spacer wurden gemacht ausgewertet (164). Die Ergebnisse sind in Tabelle 1.4 dargestellt.

Tabelle 1.4 Vergleich der Lungendeposition von Budesonid mit verschiedenen Inhalationsgeräten  
(164)

Zu bestimmender Faktor	Dosieraerosol	Dosieraerosol mit Spacer	Trockenpulverinhalator
Deposition in gesamter Lunge [%]	11,9 ± 5	38,4 ± 10,2	26,1 ± 10,5
Feinpartikelanteil [%]	27,9	keine Angabe	31,0
Oropharyngeale Deposition [%]	80,6	23,1	56,6

Es zeigte sich, dass durch den Gebrauch eines Spacers die oropharyngeale Deposition vermindert wurde, wahrscheinlich eine Konsequenz aus der hohen Rückhaltung im Spacer und dem geringeren Inspirationsfluss. Gleichzeitig konnte die Deposition in der Lunge mit Spacer erhöht werden. Der Trockenpulverinhalator ergab, wie in Tab.1.4 dargestellt, eine etwa doppelte Lungendeposition im Vergleich zu einem Dosieraerosol ohne Spacer.

### 1.7.6 Bioäquivalenz pulmonaler Zubereitungen

Die Bioäquivalenzprüfung bei pulmonalen Arzneiformen ist komplexer als bei anderen Arzneiformen zur systemischen Therapie, da der therapeutische Effekt bei Zubereitungen zur Inhalation vor allem aus lokaler Aktivität in der Lunge und weniger aus systemischer Arzneistoffkonzentration resultiert. Aus diesem Grund korrelieren gemessene Plasmaspiegel in der Regel nicht mit der Wirkung. Zusätzlich setzen sich bei Zubereitungen zur Inhalation die systemisch erhaltenen Blutspiegel aus der Absorption der deponierten Substanz in der Lunge und dem verschluckten Anteil, der über den Gastrointestinaltrakt aufgenommen wurde

zusammen. Übliche Prüfungen zur Bioäquivalenz umfassen in-vitro Depositionsuntersuchungen,  $\gamma$ -Szintigraphie sowie Effektmessungen, z.B. bei  $\beta_2$ -Sympathomimetika. Dabei erfolgt die Messung des maximalen Ausatemstroms (Peak Flow) des Patienten mittels Peak-Flow-Meter und erfasst den Schweregrad der Atemwegsobstruktion und die Beeinflussung durch Arzneimittel. Ein anderer Test ist die Messung der Sekundenkapazität, d.h. dem Luftvolumen, das nach maximaler Inspiration innerhalb einer Sekunde ausgeatmet werden kann. Die letztgenannten Tests sind Lungenfunktionsprüfungen, die zur Diagnose und Beobachtung des Verlaufs von Asthma bronchiale durchgeführt werden.

### 1.7.7 Pulmonale systemische Therapie

Für viele, peroral schlecht bioverfügbare Wirkstoffe, darunter vor allem Peptide und Proteine, werden Alternativen zur peroralen Applikation gesucht. Prinzipiell bietet die Lunge als Applikationsort dazu günstige Voraussetzungen. Vor allem die große Oberfläche der Alveolen, die gute Permeabilität des pulmonalen Epithels und die Abwesenheit eines hepatischen First-pass-Effekts bieten für systemische Effekte gute Voraussetzungen. In der Lunge findet jedoch auch Biotransformation statt. Prinzipiell zeigen sich die gleichen Enzymsysteme wie in der Leber, allerdings in wesentlich geringerer Konzentration. Dennoch ist deren Aktivität ausreichend, Wirkstoffe in gewissem Ausmaß zu metabolisieren (pulmonaler First-pass-Effekt). In präklinischen Untersuchungen unter Anwendung des Modells der isoliert-perfundierten Lunge der Ratte wurde die Eignung der Lunge (101) als Absorptionsorgan prinzipiell gezeigt. Auch für Insulin haben klinische Untersuchungen gezeigt, dass eine Senkung des Blutzuckerspiegels durch pulmonal inhaliertes Insulin möglich ist. Der Vorteil, Insulin inhalativ zu verabreichen, liegt in einer schnelleren Absorption, verglichen mit einer subkutanen (s.c.) Applikation und einer langsameren Elimination verglichen mit intravenöser (i.v.) und nasaler Applikation (147). Normalinsulin wurde mit Hilfe von Spacern als Aerosol inhaliert.

Abbildung 1.10 zeigt die Seruminsulinkonzentrationen als Funktion der Zeit bei verschiedenen Applikationswegen (147).

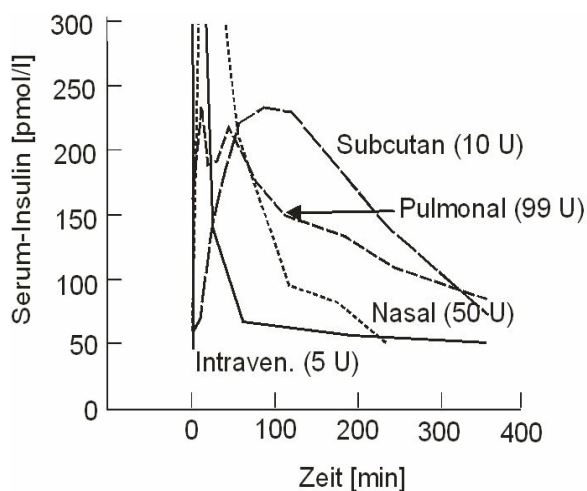


Abbildung 1.10 Seruminsulinkonzentration bei verschiedenen Applikationswegen

Aus der raschen Bioverfügbarkeit des pulmonal applizierten Insulins ergeben sich interessante klinische Vorteile dieser Applikationsart, wie ein kürzerer Spritz-Ess Abstand des insulinpflichtigen Diabetikers vor den Mahlzeiten. Die Gesamteffizienz nach Abzug aller Verlustparameter, die sich aus der nominal im Applikator vorhandenen Dosis abzüglich der Verluste durch den Rückstand im Gerät, Ausatmen und oropharyngealer Deposition, mangelhafter Absorption sowie Lungenmetabolisierung ergibt, beträgt nur 1-8 % (147). Hingegen war die interindividuelle Reproduzierbarkeit bezogen auf die pharmakokinetischen Parameter  $C_{max}$ ,  $t_{max}$  und AUC vergleichbar mit anderen Applikationsformen. Begründet wurden die relativ höheren Schwankungen bei der s.c. Applikation mit unterschiedlichen

Fettmengen, Bindegewebsanteilen und der kapillären Durchblutung. Auch hier zeigt sich, dass eine Optimierung der pulmonalen systemischen Absorption die Faktoren Applikator, Deposition und Absorption zum Ziel haben muss. Die Inhalation ist eine sinnvolle Alternative zur Injektion, aufgrund der großen Oberfläche der Lunge mit etwa 70 m<sup>2</sup> und der hohen Permeabilität des Alveolarepithels für Proteine. Damit lassen sich therapeutische Plasmakonzentrationen erzeugen, ohne dass eine Injektion notwendig ist.

### 1.7.8 Das richtige Device für den jeweiligen Patienten und die zugrundeliegende Krankheit

Die Einflüsse des Atemmanövers auf die Aerosoldeposition geben Antworten auf die häufig gestellte Frage nach einem geeigneten Inhalationssystem für bestimmte Patienten. Anhaltspunkte können Fragen nach der Höhe des Inspirationsflusses (Messung mittels Peak Flow Meter), und ob der Patient zwischen der Inhalation und der Auslösung des Sprühstoßes koordinieren kann. Eine Entscheidungshilfe für das geeignete Inhalationssystem ist in Abbildung 1.11 gegeben (144).

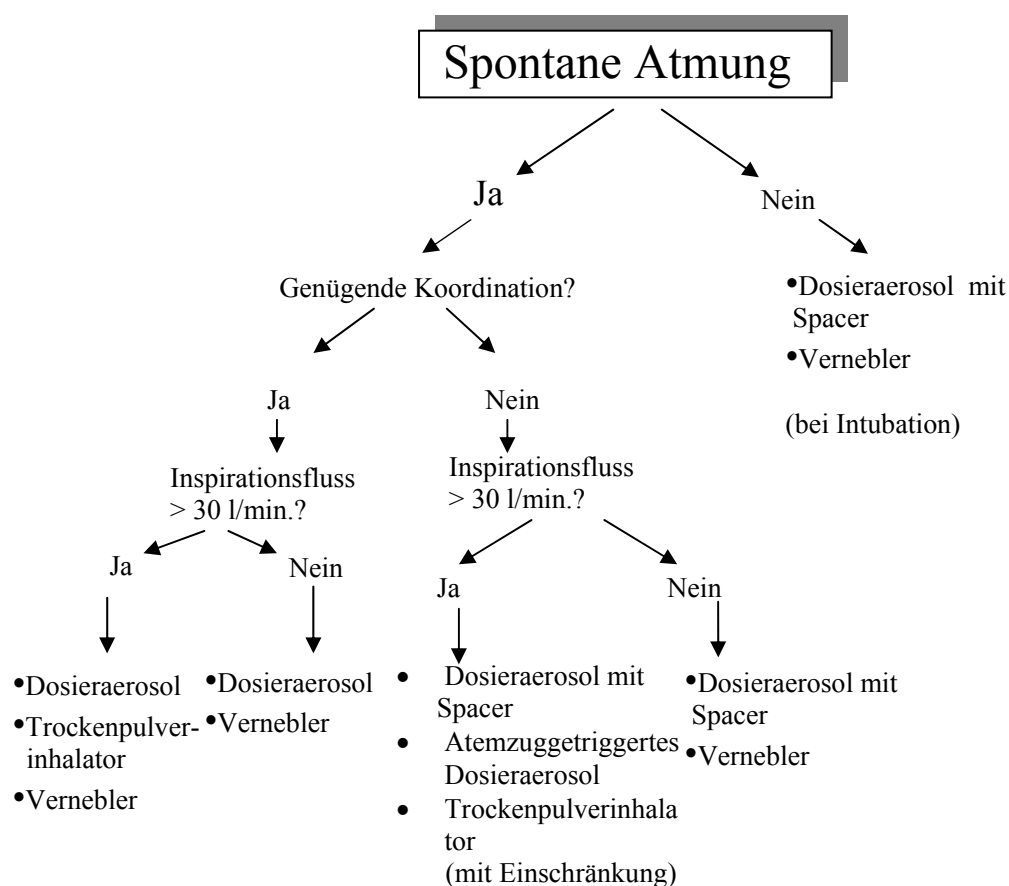


Abbildung 1.11 Entscheidungshilfe für das geeignete Inhalationssystem

Mittels Placebomuster sollte die Koordinationsfähigkeit des Patienten in Bezug auf das Inhalationssystem überprüft werden. Bei Trockenpulverinhalatoren sollte darauf geachtet werden, dass der Patient maximal ausatmet bevor er inhaliert, damit eine ausreichende Desagglomeration durch einen sofortigen hohen Flussanstieg gewährleistet ist. Die Inhalationsmanöver bei Verneblern, Dosieraerosolen und Trockenpulverinhalatoren sollten dem Patienten klar sein, denn ein unzureichendes Therapieergebnis ist oft Folge unsachgemäßer Anwendung. Nach der Inhalation sollte der Patient darauf hingewiesen werden, nicht in das Gerät auszuhatmen, da die dadurch entstehende Feuchtigkeit zur Agglomeration des Pulvers führen kann.

Dosieraerosole erfordern eine gute Koordination zwischen Inspiration und der Auslösung des Sprühstoßes. Bei Verwendung von großlumigen Spacern und atemzuggetriggerten Geräten entfällt diese. Vor der Inspiration sollte maximal ausgeatmet werden und mit Beginn der Inspiration sollte der Sprühstoß ausgelöst werden, um eine bestmögliche Deposition zu erreichen. Ein endinspiratorisches Anhalten des Atems ist empfehlenswert.

Bei Verneblern ist das Atemmanöver am einfachsten: Initial langsame, tiefe Inspiration mit anschließender normaler oder schneller Expiration.

Patienten mit chronischer Obstruktion der Atemwege wird oft empfohlen zuerst das  $\beta_2$ -Sympatomimetikum zu inhalieren, um die anschließende Deposition eines Steroids zu verbessern. Meist ist der Inspirationsfluss bei chronisch obstruktiven Atemwegen weniger beeinträchtigt als der Expirationsfluss.

## 1.8 Methoden zur Charakterisierung von Mikropartikeln

### *Rasterelektronenmikroskopie*

Die Charakterisierung von Partikeln hinsichtlich ihrer Größe, Form und Beschaffenheit der Oberfläche ist ein wichtiges Kriterium in der Pulvertechnologie. Mischungsphänomene und die Eignung von Partikeln als Träger für Inhalationspulver werden dadurch beeinflusst (26, 135).

Bei Elektronenmikroskopen liegt die Auflösungsgrenze im unteren Nanometerbereich und arbeitet mit Elektronen- anstelle von Lichtstrahlen. Das Rasterelektronenmikroskop (REM) ist eine Technik zur Untersuchung von Oberflächen fester Substanzen. Die Oberfläche der Probe wird von einem Elektronenstrahl abgerastert, meist erzeugt durch eine Wolframdrahtquelle. Der Elektronenstrahl wird mittels Kondensorlinsen zu einem feinen Punkt auf der Oberfläche der Probe mit 50-100 Å fokussiert. Die Bildgebung erfolgt durch rückgestreute oder Sekundärelektronen, deren Signal auf den Leuchtschirm einer Kathodenstrahlröhre abgebildet wird. Es gibt elastische und unelastische Wechselwirkungen. Bleibt die kinetische Energie der Elektronen unbeeinflusst und die Richtungskomponente ändert sich, so spricht man von einer elastischen Wechselwirkung. Die Elektronen treten als rückgestreute Elektronen aus der Oberfläche heraus. Unelastische Wechselwirkungen führen zum Transfer der Elektronenenergie auf die Festkörper. Die Sekundärelektronen verlassen die Oberfläche mit niedrigerer Energie, da eine Wechselwirkung zwischen den energiereichen Elektronen des Strahls und den schwach gebundenen Elektronen im Leitungsband des Festkörpers stattfindet (Elektronen können in die obersten Schichten eindringen und dort Elektronen ausschlagen, sog. Sekundärelektronen). Meist werden Sekundärelektronen zur Messung verwendet. Die Probe muss eine leitende Oberfläche haben, damit die Elektronen ungehindert abfließen können. Ein homogener dünner Überzug aus einer Metallschicht mittels Kathodenzerstäubung (Sputtering) sollte gegeben sein, um die Einzelheiten der Oberfläche zu erhalten. Durch die Leitfähigkeit können Artefakte, die beim Ladungsaufbau entstehen, vernachlässigt werden.

Das Rasterelektronenmikroskop arbeitet im Hochvakuum. Die Auswertung erfolgt vollautomatisch, das mikroskopische Bild wird über eine Fernsehkamera elektronisch abgerastert oder unmittelbar das elektronische Signal eines REM ausgewertet. Rasterelektronenmikroskope liefern „indirekte Bilder“, da kein Strahlengang zwischen der Probe und dem REM-Bild existiert, weil das erzeugende und das verarbeitende Signal getrennt sind. Die Detektoren, meist Szintillationsdetektoren, sind die Verbindung zwischen den beiden Signalen. Sie wandeln das erzeugte Signal, das durch Wechselwirkung vom primären Elektronenstrahl und der Materie zustande kommt, in ein elektrisches Signal um.

### *Lichtmikroskopie*

Kenntnis und Kontrolle der Teilchengröße ist von großer Bedeutung bei pulmonal zu applizierenden Formulierungen. Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Teilchengröße/Oberfläche von Arzneistoffen und ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften (Lösungsgeschwindigkeit, Stabilität, relative Bioverfügbarkeit). So kann z.B.

eine Veränderung der Teilchengröße ein Indiz für eine physikalische Instabilität der Zubereitung sein.

Es existieren zahlreiche Messmethoden der Partikelgröße, die auf der Messung von individuellen Partikeln oder der Partikelkollektivmessung basieren. Die Messung von individuellen Partikeln kann z.B. mit mikroskopischen Verfahren, Coulter-Counter und aerodynamischer Flugzeitbestimmung erfolgen. Partikelkollektive werden mittels Laserdiffraktometrie, Siebanalyse, Photonenkorrelations-Spektroskopie und Impaktorbestimmungen erfasst, wobei die Laserdiffraktometrie und die Impaktion zu den routinemäßig durchgeführten Bestimmungen gehört. Besonders hervorzuheben bei der Laserdiffraktometrie sind die kurzen Analysenzeiten, der große Messbereich (0,1 bis 8750  $\mu\text{m}$ , je nach verwendeter Messoptik) und die Reproduzierbarkeit der Messung. Das Prinzip der Messung beruht auf Lichtbeugungsphänomenen. Die unterschiedlichen Beugungsbilder entstehen in Abhängigkeit von Form und Größe der zu messenden Teilchen. Ein Laser durchstrahlt die Suspension, ein Teil des Lichts trifft direkt auf einen Partikel. Dies führt dazu, dass sich Licht nicht weiter ausbreiten kann. Streift ein Lichtstrahl das Teilchen lediglich, kommt es zur Lichtbeugung. Dabei kommt es hinter dem Partikel nachgeschaltet zu Interferenzen. Bei kleinen Teilchen kommt es zu anderen Interferenzmustern als bei größeren Teilchen. Aus dem Beugungsmuster kann auf die Größenverteilung der Teilchen geschlossen werden. Eine Fourier-Transformationslinse bewirkt, dass das Licht, welches von Teilchen gleicher Größe gebeugt wurde, unabhängig von der Position des Teilchens immer auf denselben Ring in der Brennebene fokussiert wird. In der Brennebene befindet sich der Detektor. Die Sensoren des Detektors sind als Ringe angeordnet. Die mathematischen Algorithmen zur Berechnung der Teilchengröße gehen von ideal-runden Partikeln aus. Weichen die realen Partikel von dieser idealen Form ab, treten Messfehler in der Teilchengröße auf. Die Methode ist für Partikel der Größe 0,1-2000  $\mu\text{m}$  geeignet. Die Intensität der Ringe am Detektor ist umgekehrt proportional zu ihrem Radius. Die gemessene Streulichtintensität erlaubt Rückschlüsse auf die Teilchengröße. Große Partikel streuen das Licht mit hoher Intensität (innere Ringe), kleine Partikel hingegen mit geringer Lichtintensität (äußere Ringe).

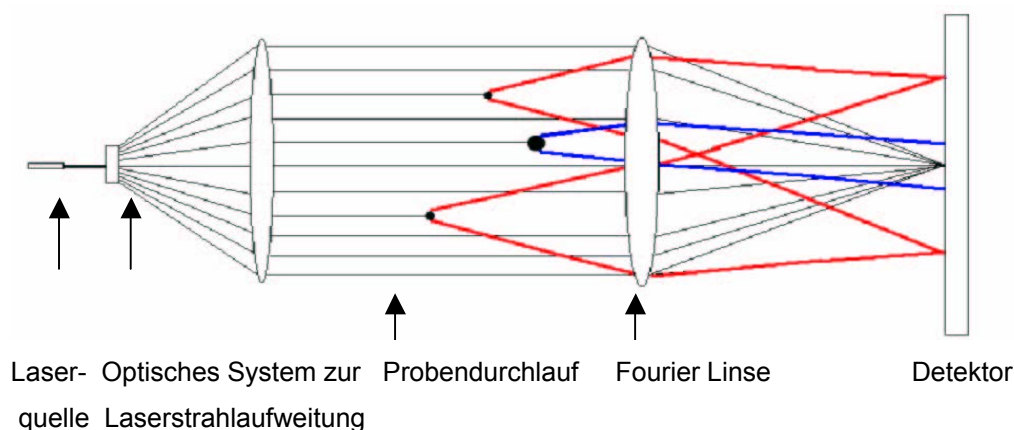


Abbildung 1.12 Schematischer Längsschnitt eines Laserdiffraktometers

Kleine Teilchen erzeugen äußere Ringe am Detektor (rot), große Teilchen erzeugen innere Ringe (blau).

Das Ergebnis ist als Volumenverteilung in Form einer Gausschen Verteilung grafisch dargestellt (28), d.h. über den Volumenanteil einer einzelnen Partikelgrößenklasse am Gesamtvolumen (Dichteverteilung der volumenspezifischen Oberfläche). Nachteilig ist, dass große Partikel, auch wenn sie nur isoliert vorkommen, besonders auffallen. Der  $x_{50}$  Wert sagt aus, dass 50 % des Partikelgesamtvolumens aus Teilchen bestehen, deren Durchmesser kleiner oder gleich dem angegebenen Wert sind.

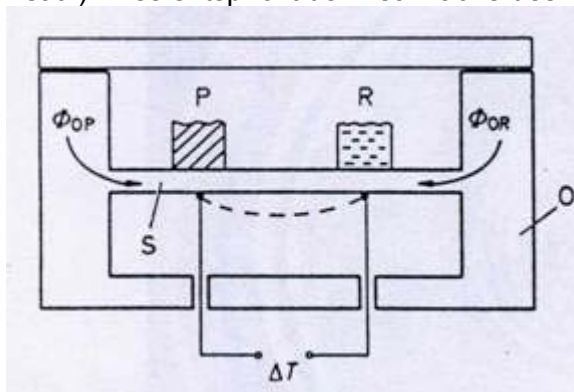
Voraussetzung für die Erfassung der Partikelgröße ist die Individualität der Teilchen. Agglomerate verfälschen die Messung. Es muss ein geeignetes Dispersionsstadium erreicht werden, das mit Hilfe der Trocken- und Naßdispersion erfolgt. Die Trockendispersion wurde für die Partikelgrößenmessung gewählt. Hier werden die Partikel in einem turbulenten Strahl beschleunigt und durch Partikel-Partikel und Partikel-Wand Kollisionen, sowie durch auftretende Scherkräfte vereinzelt. Nach der Dispersion strömt das Einzelpartikel in die Messzone des Laserbeugungsspektrometers. Nachteil bei der Trockendispersion ist, dass das einzelne Korn zerstört werden kann oder die Desagglomeration nicht vollständig erfolgt, da die Dispersionskräfte der Luft nicht ausreichen. Bei der Nassdispersion kann es zu Wechselwirkungen zwischen der Dispersionsflüssigkeit oder dem Benetzungsmittel und der zu untersuchenden Substanz kommen (durch Auflösung der Partikel an der Oberfläche oder Bildung von Pulvernestern).

#### *Dynamische Wärmestrom-Differenz-Kalorimetrie*

Zur Aufklärung von Polymorphie und Pseudopolymorphie, aber auch bei Stabilitätsprüfungen, Bestimmung der Glasübergangstemperatur amorpher Stoffe und der Erstellung von Phasendiagrammen werden Methoden der Thermoanalyse eingesetzt, da die meisten Festkörper thermisch aktiv sind. Unter Thermoanalyse werden analytische Methoden verstanden, die die Untersuchung von physikalischen und chemischen Eigenschaftsänderungen in Abhängigkeit von Temperatur und Zeit zum Ziel haben (24, 73, 74). Die Temperaturänderung einer Probe wird als Funktion der Temperatur und der Zeit aufgezeichnet, wobei die Substanzen einem definierten Temperatur-Zeit-Programm unterworfen werden, das sich aus konstanter Temperaturerhöhung oder einer Aufeinanderfolge von Heiz- und Kühlraten zusammensetzen kann.

Die thermische Analyse der eingesetzten Stoffe erfolgt mittels Dynamischer Wärmestrom-Differenz-Kalorimetrie (Differential-Scanning-Calorimetry, DSC). Die DSC ist die am häufigsten verwendete thermische Methode. Mit Hilfe der DSC können Substanzen hinsichtlich ihres Schmelzpunktes oder -bereichs sowie ihres thermischen Umwandlungsverhaltens wie kristallisieren oder fest-fest Modifikationsänderungen charakterisiert werden (24).

Hierbei gilt folgendes Prinzip: Aus der Temperaturdifferenz zwischen Probe und Referenz werden die Wärmestromänderungen berechnet. Die Temperaturdifferenz ist der Wärmestromdifferenz proportional. Es wird der Unterschied der Wärmeströme vom Ofen zu einem Probeniegel und vom Ofen zu einem leeren Referenziegel gemessen, die beide gleichzeitig einem definierten Temperaturprogramm unterworfen werden. Ein Wärmestrom entspricht einer übertragenen Leistung und wird deshalb in Wattsekunde (Ws) oder mWs gemessen. Integriert man die Leistung über die Zeit, erhält man eine Energiemenge in mWs=mJ ( $\Delta H$ , Wärmeumsatz). Dies entspricht der Peakfläche des DSC-Scans.



P Probe    R Vergleichsprobe (Referenz)    O Ofen    S Scheibe (Metall, Keramik)  
 $\Phi_{OP}$  Wärmestrom vom Ofen zur Probe     $\Phi_{OR}$  Wärmestrom vom Ofen zur Vergleichsprobe  
 $\Delta T$  Temperaturdifferenz

Abbildung 1.13 DSC

Diese Enthalpiedifferenz zwischen Proben- und Referenztiegel wird in Abhängigkeit von Zeit oder Temperatur aufgezeichnet. Bei einer endothermen Enthalpieänderung wird Wärme von der Probe aufgenommen, wie z.B. bei Schmelzvorgängen. Bei Energieabgabe einer Probe spricht man von exothermer Enthalpieänderung.

Die genau abgewogene Menge der zu untersuchenden Substanz wird in einen Aluminiumtiegel eingewogen, der Deckel wird gelocht (Stickstoffatmosphäre) und die Probe in den Ofen gestellt, direkt auf den Messfühler. Die Heizrate ist einem definierten Temperaturprogramm unterworfen, die Temperatur steigt zeitlinear an, mit einer Temperaturanstiegskurve von 10 °C/min, wie in der vorliegenden Arbeit.

Es ist darauf zu achten, dass inerte Tiegel verwendet werden (keine Verfälschung der Messkurve durch Reaktion mit Tiegelmateriale), sowie auf guten thermischen Kontakt zwischen Probe und Tiegel. Stickstoff als Spülgas schafft eine definierte Ofenatmosphäre durch Wegspülen der Luft vor der Messung und der eventuell flüchtigen Produkte.

### Röntgenpulverdiffraktometrie

Um die Kristallstruktur von Festkörpern zu untersuchen, eignet sich besonders die Röntgenstrukturanalyse. Die Beugung von Röntgenstrahlen wird zur schnellen, sicheren und zerstörungsfreien Identifikation von Festkörpern verwendet und ist für jeden kristallinen Feststoff charakteristisch. Sie kann wie ein Fingerabdruck zur Identifizierung benutzt werden. Das Prinzip beruht darauf, dass eine Probe mit Röntgenstrahlung bestrahlt wird und Beugungsmaxima entstehen, die Rückschlüsse auf die kristalline Struktur zulassen. Röntgenstrahlung ist eine kurzwellige, elektromagnetische Strahlung im Wellenlängenbereich von ca. 1 Å. Sie entsteht durch Abbremsen hochenergetischer Elektronen oder mittels Elektronenübergängen in den inneren Orbitalen der Atome. Meist wird monochromatische Strahlung verwendet, bei der ein beschleunigter Elektronenstrahl auf die Probe gerichtet ist. Der Strahl trifft auf das Kristallgitter, es kommt zur Beugung an den einzelnen Kristallgitterebenen. Die reflektierten Strahlen überlagern sich.

Ist eine Substanz kristallin, so liefert das Diffraktogramm scharfe, definierte Peaks. Eine amorphe Substanz liefert keine Beugungsreflexe, d.h. im Diffraktogramm sind keine Peaks sichtbar. Das Phänomen der Reflexion der Strahlung an der Oberfläche von Kristallen wurde von William Lawrence Bragg mit folgender Darstellung beschrieben (26):

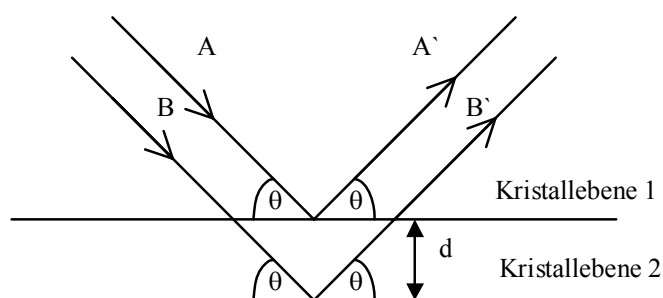


Abbildung 1.14 Anwendung des Bragg'schen Gesetzes bei Strahlenreflexion an Kristalloberflächen

Damit Röntgenstrahlen von einer Kristalloberfläche reflektiert werden, muss folgende Voraussetzung für den Einfallswinkel  $\theta$  gelten:

$$\sin \theta = \frac{n \cdot \lambda}{2 \cdot d} \quad (\text{Gl. 1.5})$$

$n$  entspricht der Beugungsordnung (ganze Zahl),  $\lambda$  der Wellenlänge und  $d$  dem Abstand der Netzebenen. Die reflektierten Strahlen sind in Phase und verstärken sich (kumulativer Effekt), wenn das Bragg'sche Gesetz erfüllt ist. Ein Strahl kann in einer fein pulverisierten Probe Kristalle im Bragg'schen Winkel treffen. Die gebeugten Strahlen werden beim

Diffraktometer durch bewegliche Zählrohre detektiert, diese wiederum liefern Peaks mit einer charakteristischen Lage und Intensität. Das Zählrohr scannt einen  $2\theta$  Bereich mit einer konstanten Geschwindigkeit. Man spricht von einem  $2\theta$  Winkel, da die Messung auf einen Winkel zwischen Primärstrahl und gebeugtem Strahl zu beziehen ist (26).

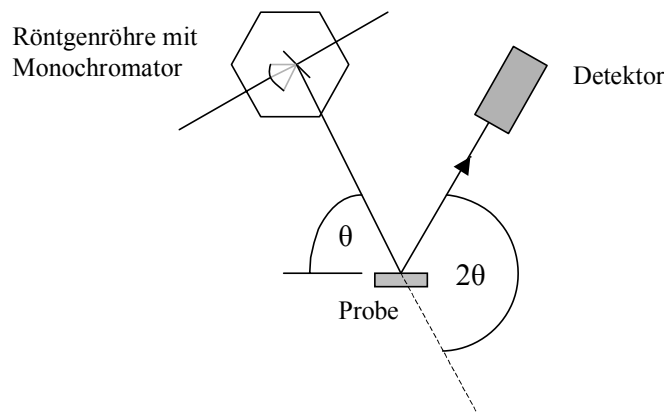


Abbildung 1.15 Prinzip des Röntgenstrahlverlaufs in einem Röntgenpulverdiffraktometer

Resultat der Untersuchungen ist ein Beugungsdiagramm. Der Abstand der Netzebenen (Ringabstände) ist umgekehrt proportional zum Beugungswinkel.

Anwendungsfelder sind die klassische Material-Strukturanalyse von Pulvern und kompakten Materialien, sowie die Charakterisierung von Phasenumwandlungen. Weiterhin können Mischungen von Materialien gleicher chemischer Zusammensetzung und unterschiedlicher Kristallstruktur analysiert werden. Der Phasenbestand (teil-)kristalliner Materialien kann auf die Identifizierung kristalliner Phasen in Feststoffen und die quantitative Bestimmung kristalliner Phasen und amorpher Anteile untersucht werden.

#### *Bestimmung der spezifischen Oberfläche*

Die BET-Methode, nach Brunauer, Emmet und Teller genannt, ist ein Verfahren zur Ermittlung der spezifischen Oberfläche und der damit zusammenhängenden Größen, wie Gesamtporenvolumen und Porenverteilung mit Hilfe des Stickstoff-Tieftemperatur-Adsorptionsverfahrens (121). Als spezifische innere Oberfläche wird die Summe der Flächen der Pulverkörnchen bezeichnet, die in Kontakt zum Porenraum stehen und zum Austausch von Ionen fähig sind (Adsorption und Desorption). Die spezifische Oberfläche variiert mit der Korngröße und der Porosität der Partikel. Feinkörnige Formulierungen haben eine größere spezifische Oberfläche als grob- bis mittelkörnige. Daraus ist der Zusammenhang zwischen Teilchengröße und Adsorptionsvermögen zu ersehen. Das Porenvolumen beeinflusst die spezifische Oberfläche auch und charakterisiert die Größe des Porenraumes eines von Teilchen begrenzten Raumes. Hoch poröse Stoffe besitzen eine größere spezifische Oberfläche, als wenig oder nicht poröse Stoffe. Adsorption ist die Anlagerung von Stoffen an die Oberfläche, verursacht durch van der Waalsche Kräfte. Bei der Adsorption eines Gases an einer Festkörperoberfläche besteht bei konstanter Temperatur infolge des Gleichgewichts Adsorption und Desorption ein charakteristischer Zusammenhang zwischen dem Partialdruck  $p$  des Gases und der adsorbierten Gasmasse  $m$ . Diese Adsorptionsisotherme verläuft zunächst linear, nähert sich dann aber einem bestimmten Sättigungswert  $m_{[\text{infinity}]}$ , bei dem die gesamte Oberfläche der Probe mit einer monomolekularen Schicht von Gasmolekülen bedeckt ist.



Nach Langmuir gilt:

$$m = m_{[\text{infinity}]} \frac{p}{b + p}, \quad m_{[\text{infinity}]} \quad (\text{Gl.1.6})$$

( $b$  = stoffspezifisch,  $m_{[\text{infinity}]}$  = Sättigungswert,  $p$  = Partialdruck des Gases).

Das Prinzip des BET-Verfahrens ist, dass Feststoffe Ionen aus dem Gas anziehen (Adsorption), um ihre eigenen Ladungen auszugleichen. Diese Adsorption wird bei einer Temperatur nahe dem Siedepunkt des Gases durchgeführt. Verwendet wird üblicherweise Stickstoff, es können aber auch andere, nicht korrosive Gase, wie Helium, Argon, Krypton, Kohlendioxid, Ethan und Butan verwendet werden. In der Probenvorbereitungsstation des Geräts werden Wasserdampf und andere Gase, die sich aus der Umgebungsluft abgelagert haben, von der Probe entfernt. Nach Zufuhr einer bestimmten Menge eines definierten Gases und stattfindender Adsorption werden die nicht adsorbierten Gasmoleküle aus dem Probenraum entfernt. Die Differenz zwischen dem zugegebenen Gasvolumen und dem entzogenen Gasvolumen entspricht der adsorbierten monomolekularen Schicht. Aus dieser lässt sich die spezifische innere Oberfläche berechnen. Um die Parameter zu finden, bei der eine monomolekulare Schicht aufgebaut wird, bestimmt man das adsorbierte Gasvolumen als Funktion des Partialdrucks.

#### *Bestimmung des Arzneistoffgehalts in den Poymer-Mikropartikeln*

Der Gehalt an Budesonid in den Mikropartikeln wird mittels einer HPLC-Methode bestimmt. Dabei handelt es sich um Trenn(analysen)verfahren, die durch Verteilung des zu trennenden Stoffgemisches zwischen zwei nicht oder nur beschränkt mischbaren Phasen ermöglicht werden. Dabei bewegt sich eine mobile gegen eine stationäre Phase. Bei der reversed-phase Chromatographie ist die stationäre Phase apolar. Die mobile Phase ist relativ polar. Die eluierten Substanzen werden von der mobilen Phase in den Detektor transportiert und vom Integrator registriert. Die Signale werden nach Peaks getrennt. Die Auswertung erfolgt quantitativ und qualitativ. Zur Identifikation eines Peaks wird die Retentionszeit, d.h., die Zeit vom Einspritzen bis zum Erscheinen des Signalmaximums im Detektor herangezogen. Die Fläche des Peaks ist der eingespritzten Stoffmenge proportional. Wenn zu genau bekannten Konzentrationen die zugehörigen Flächen bestimmt werden und eine Kalibriergerade erstellt wird, kann aus dem Signal einer unbekannt Probe deren Konzentration bestimmt werden (112).

#### *In-vitro Untersuchung der Freigabe aus Mikropartikeln*

Bei pulmonal zu applizierenden Formulierungen mit retardierter Freisetzung existiert keine allgemein gültige Vorschrift zur Durchführung der Freisetzung (46). Dabei ist die Freisetzung von pulmonal zu applizierenden Arzneistoffen von großer Wichtigkeit, da sie der limitierende Schritt bei der Aufnahme von schlecht wasserlöslichen Stoffen sein kann (32). In Anlehnung an die Literatur wird in dieser Arbeit eine Methode hierfür entwickelt. Die initiale Freigabe (burst) ist abhängig von der Beschaffenheit der Oberfläche und wird durch Diffusion des Wirkstoffs von der Oberfläche der Mikropartikel eingeleitet. Im Anschluss erfolgt eine schrittweise Hydrolyse der Polymerketten, die mit einer Abnahme der Freigabegeschwindigkeit des Arzneistoffs einhergeht, auf den ein nachfolgender Anstieg der Freigabe mit Solubilisierung der mittlerweile kurzen Polymerketten erfolgt. Die auch häufig beschriebenen biphasischen Freigabeprofile zeigen entweder keinen Burst-Effekt oder die schrittweise Hydrolyse der Polymerketten geht mit einer Freigabe des Arzneistoffs einher.

Der Auflösung fester Arzneistoffe, bei denen der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Lösungsvorgangs die Diffusion der gelösten Substanz von der Oberfläche in das Innere des Lösungsmittels ist, liegt das Gesetz von Noyes-Whitney in der Modifikation durch Nernst und Brunner zugrunde (104):

$$\frac{dm}{dt} = \frac{DA}{h} (C_s - C_t) \quad (\text{Gl.1.7})$$

$dm/dt$  ist die aufgelöste Wirkstoffmenge pro Zeiteinheit,  $D$  der Diffusionskoeffizient des Arzneistoffs in der Diffusionsgrenzschicht,  $A$  die Oberfläche des zu lösenden Stoffs,  $h$  die Dicke der Diffusionsschicht,  $C_s$  und  $C_t$  sind die Sättigungslöslichkeit sowie die Konzentration des Arzneistoffs in Lösung zu einer gegebenen Zeit. Anhand dieser Gleichung lassen sich die wichtigsten Faktoren ableiten, die die Auflösungsgeschwindigkeit von Arzneistoffen beeinflussen. So begünstigen eine große Oberfläche und ein großer Unterschied zwischen Sättigungslöslichkeit und erreichter Wirkstoffkonzentration im Lösungsmittel die Auflösungsgeschwindigkeit. Einheitlich festgelegte Grenzwerte für Sink-Bedingungen existieren nicht. Meist wird davon ausgegangen, dass  $C_t < 0,3 \cdot C_s$ . Die Testbedingungen werden so eingerichtet, dass in-vitro Sink-Bedingungen herrschen. Der Einsatz von oberflächenaktiven Substanzen wie Natriumlaurylsulfat zum Freigabemedium, dient bei Konzentrationen unterhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) einer verbesserten Benetzbarkeit der Mikropartikel. Die CMC für Natriumlaurylsulfat in Wasser bei 20° C liegt bei 0,23 %.

Ein weiteres, die Auflösung fester Stoffe beschreibende Gesetz, ist das Kubikwurzelgesetz nach Hixon und Crowell. Hier geht man von sphärischen Partikeln aus, die durch den Auflösungsprozess ihre Masse (Volumen) und damit ihre Oberfläche vermindern:

$$M_0^{1/3} - M^{1/3} = k \cdot t \quad (\text{Gl.1.8})$$

$M_0$  ist die Anfangsmasse,  $M$  die zum Zeitpunkt  $t$  übrig gebliebene Masse und  $k$  ist die Geschwindigkeitskonstante des Kubikwurzelgesetzes. Cowsar (43) untersuchte die Freisetzung von Steroidhormonen, die in PLGA in Form einer festen Lösung vorlagen: bei i.m oder s.c Injektion wird der Arzneistoff in das Gewebe durch Diffusion freigegeben. Er kam zu dem Schluss, dass die Diffusion der kontrollierende Faktor der Freisetzung ist. Würde das PLGA während der Freisetzung nicht zerfallen, so würde die Freisetzung mit fortschreitender Zeit aufgrund des zunehmenden Diffusionsweges langsam abnehmen. Dies kann umgangen werden, indem Polymere ausgewählt werden, die in einem angemessenen Ausmaß während der Freisetzung zerfallen.

## 1.9 Charakterisierung der Mikropartikeleigenschaften mittels Zellversuchen

Eine Makrophagen Zelllinie eignet sich zur Charakterisierung der Mikropartikeleigenschaften. Makrophagen sind Fresszellen, gehören zu den Leukozyten und sind ein Teil der angeborenen Immunantwort. Sie entwickeln sich im Knochenmark aus einer pluripotenten Stammzelle. In den Geweben haben die Makrophagen verschiedene Namen, so heißen sie in der Lunge Alveolarmakrophagen. Neben Funktionen, wie der Phagozytose sind Makrophagen auch an der Antigenpräsentation beteiligt.

Toll-ähnliche Rezeptoren (TLRs) spielen eine entscheidende Rolle bei der Immunantwort. Sie erkennen Motive, die von mikrobiellen Pathogenen stammen, den sog. Pathogen-assoziierten-mikrobiellen-Mustern (PAMPs). Zu den PAMPs gehören verschiedene Bakterien-Zellwand-Komponenten, wie LPS. TLRs werden durch PAMPs aktiviert und setzen eine Signalkaskade in Gang, die zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie NFκB, führt, die wiederum die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen mittels MYD88 veranlassen (1) (Abbildungen 1.16 und 1.17 (1)).

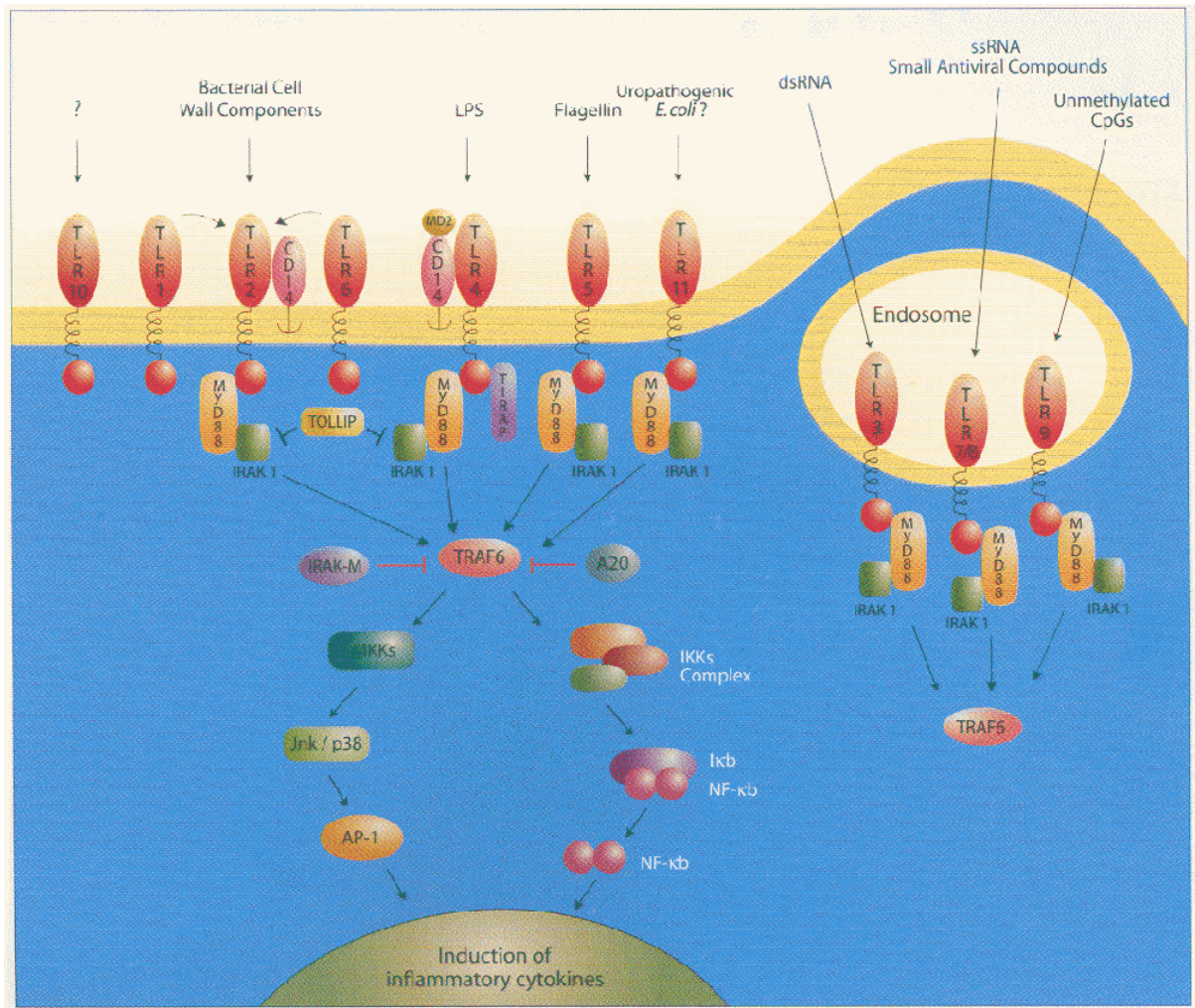


Abbildung 1.16 Übersicht über die Signalkaskade des TLR4 Rezeptors und anderen TLRs (1)

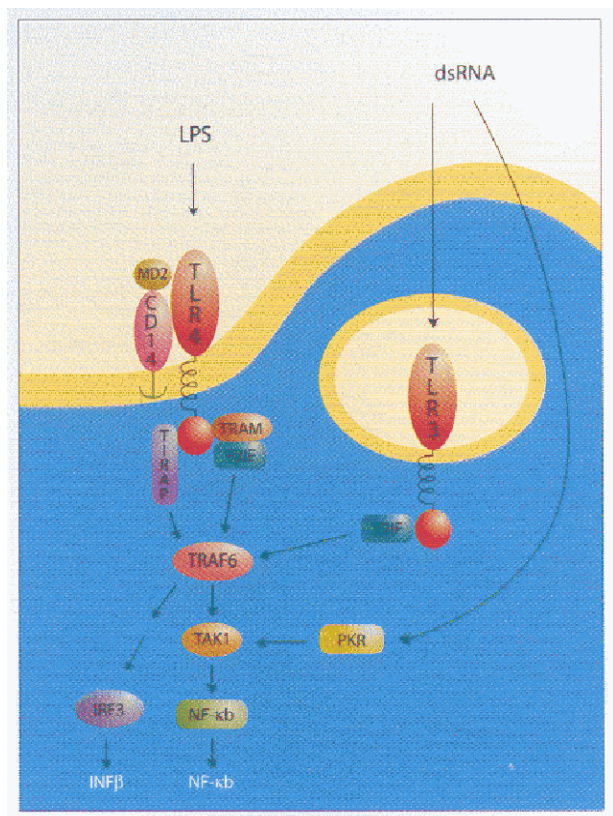


Abbildung 1.17 Signalkaskade des TLR 4 Rezeptors (1)

TLRs vom Typ I (es gibt 10 humane und 12 murine) sind transmembranäre Proteine und sind u.a. auch in der Milz, dem Gastrointestinaltrakt und in der Lunge zu finden (1). LPS aktiviert vorwiegend TLR 4 (1). An der Immunantwort sind auch CD4 Rezeptoren (cluster of differentiation) beteiligt, die an der Oberfläche (Zellmembran) von T-Zellen verankert sind (1). Der CD4 Rezeptor erkennt gemeinsam mit dem T-Zellrezeptor den MHC II Komplex (Haupthistokompatibilitäts-Komplex) mit dem Antigen auf anderen Körperzellen, den Antigen präsentierenden Zellen (APCs). Zu den APCs gehören auch Makrophagen. Die Antigenpräsentation erfolgt, indem körperfremde Proteine auf der Oberfläche von Viren oder Bakterien von den Makrophagen phagozytiert und intrazellulär zerkleinert werden und als Antigene auf der eigenen Zelloberfläche mit Hilfe des MHC II Komplexes den T-Helfer-Zellen (TH-Zellen) präsentiert werden. Die Antigene werden durch CD4-TH-Zellen erkannt. Durch Wechselwirkungen kommt es zum Umbau von B-Lymphozyten in Antigen-produzierende Plasmazellen. T-Zellen können fremde Antigene nur in Verbindung mit MHC Proteinen erkennen. Es kommt auch zur Umwandlung von aktivierten B-Lymphozyten in Gedächtniszellen, die bei erneuter Exposition mit dem Antigen Immunglobuline (IGs) bilden.

#### 1.10 Bedeutung der T-Helfer-Zellen beim Asthma bronchiale

Die Bakterien- und Virenexposition zu Beginn des Lebens wird mit einem Schutz vor der Erkrankung an Asthma bronchiale in Verbindung gebracht (108). Normalerweise werden Säuglinge mit einem TH-2 favorisierten Phänotyp geboren, der sich in TH-1 entwickelt, wenn sie nicht atopisch sind und TH-2, wenn sie atopisch sind, was zu einem asthmatischen Phänotyp führt (108). Eine Möglichkeit, Asthma zu vermeiden, wäre eine Modifikation des TH-1/TH-2 Gleichgewichts zugunsten von TH-1. TH-1 und TH-2 stammen von einer gemeinsamen naiven CD4 T-Zelle ab und differenzieren unter dem Einfluss von verschiedenen Signalen. Sind dendritische Zellen, Interleukin (IL) -12 und IL-18 Antikörper vorhanden, so differenzieren naive CD4 T-Zellen zu TH-1 (5, 6, 49, 108). Zusätzlich wird der protektive Effekt gegen allergische Erkrankungen durch T regulatorische

Zellen vermittelt (108). Dies sind Abkömmlinge der CD4 T-Lymphozyten, die die Immunantwort von Entzündungsreaktionen kontrollieren.

Bei der Immunopathogenese von Asthma ist GATA-3 der Schlüsselfaktor für die TH-2 Entwicklung und Differenzierung. Beim Asthma bronchiale findet eine erhöhte Expression von GATA-3 statt.

Durch die TH-2-Zell Differenzierung wird die B-Zellen-Mastzellen Interaktion in Gang gesetzt: Dendritische Zellen, die nahe des Bronchialepithels lokalisiert sind, initiieren eine Reihe von Immunantworten, die mit der Aktivierung der TH-2 Zellen-Antwort, einschließlich der IL-4, IL-5 und der IL-13 Freigabe, abschließen. Eines der wichtigsten Zytokine, das von APCs freigesetzt wird, ist das IL-6. Nach Bindung von IL-6 an seinen T-Zell Rezeptor aktiviert es die Differenzierung von T-Zellen und B-Zellen der Atemwege, was zu einem erhöhten Shift der IgG Produktion in den IgE Phänotyp führt. In Abbildung 1.18 ist folgendes dargestellt: MHC-II auf dendritischen Zellen (APCs), internalisieren das Antigen. MHC-II präsentiert das Antigen den T-Zellen, diese proliferieren. Es kommt zur T-Zell Differenzierung. Zur TH-2 Zell-Differenzierung ist CD28, ein Oberflächenmolekül der naiven T-Zellen, und IL-4 notwendig. Auf der Oberfläche der APC befinden sich die Moleküle B2-7 und B7-1, die zur Co-Stimulation der T-Zellen beitragen. TH-2 Zellen ihrerseits bewirken eine Überexpression von GATA und c-Maf, den sogenannten TH-2 Faktoren. C-Maf ist ein Transaktivator der IL-4 Gene (108). Die B-Zell Antwort findet statt, wenn IL-4 vorhanden ist. Die B-Zelle wird zur Plasmazelle, die IgE ausschüttet. Bei erneutem Antigenkontakt überbrückt das Allergen (=Antigen) zwei Antigenbindungsstellen an IgE, es kommt zur „cross-linking“ Reaktion. Dies führt zur Mastzelldegranulation mit Ausschüttung von Mediatoren, wie Histamin, Zytokinen und Leukotrienen, die eine Bronchoobstruktion, eine Entzündung und eine Erhöhung der Permeabilitätssteigerung der Kapillarwände bewirken.

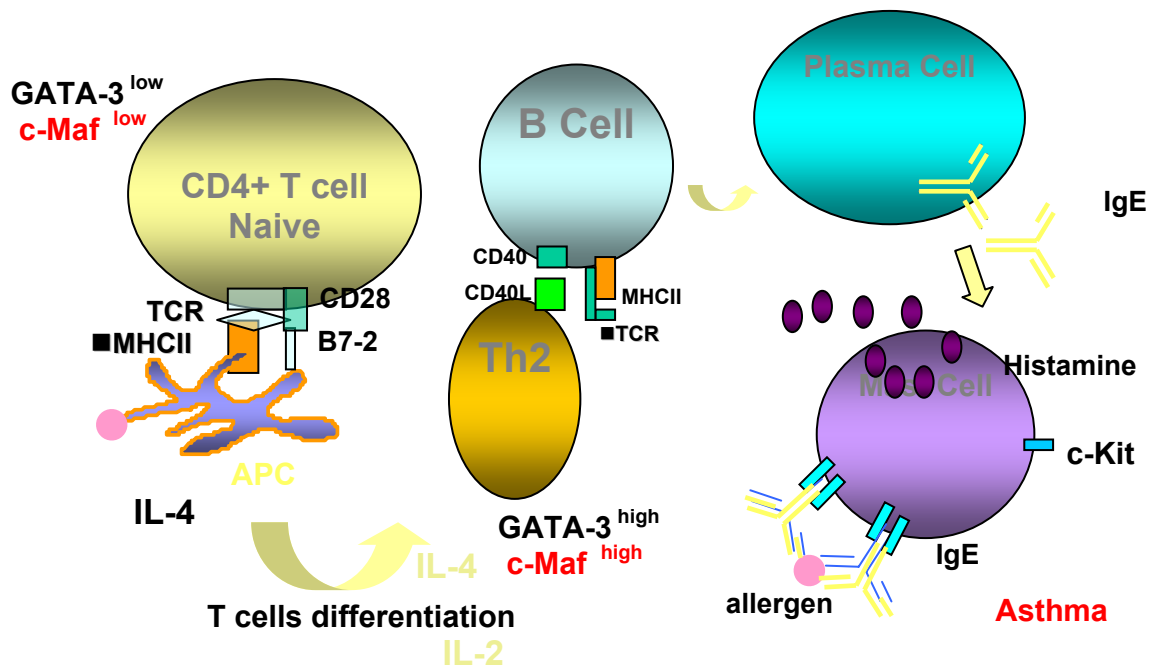


Abbildung 1.18 Immunopathogenese von Asthma bronchiale

### 1.11 Bedeutung der Interleukine beim Asthma bronchiale

Humanes Asthma ist verbunden mit einer reversiblen Atemwegsobstruktion, einer Entzündung der Atemwege mit erhöhter Eosinophilie, vermehrtem Auftreten von CD4+ Zellen Typ 2 und einem erhöhten Atemwegswiderstand (79, 136, 137, 159). Murine Asthma-Modelle sind in der Lage, viele Eigenschaften des menschlichen Krankheitsbildes nachzuahmen. In diesen Modellen konnte bereits die Produktion von verschiedenen Zytokinen, wie Interleukin-4, -5 und -13, die von CD4+ Zellen produziert werden und mit der Entwicklung eines Asthma ähnlichen Phänotypen assoziiert werden (56). IL-6 wird von Antigen präsentierenden Zellen, wie Makrophagen produziert, deren Rezeptor auf CD4+ T-Zellen exprimiert wird. Diese Zytokine werden auch beim Asthmatiker in höheren Dosen in der Lunge gefunden. Der IL-6 Rezeptor besteht aus einer  $\alpha$ -Kette und gp-130 Molekülen (50).

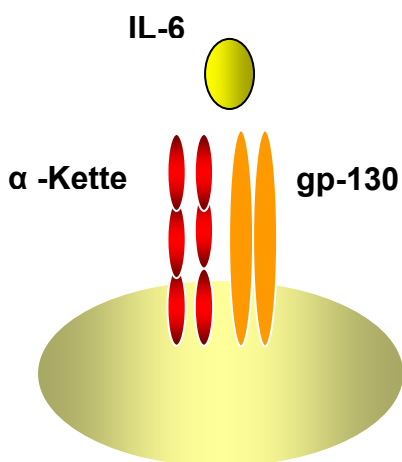


Abbildung 1.19 Interleukin-6 Rezeptor

Zwei Moleküle von gp-130, eine  $\alpha$ -Kette und das IL-6 bilden zusammen ein Tetramer. Die Bindung von IL-6 an seinen Rezeptor initiiert eine Signaltransduktion sowohl in T-Effektor Zellen als auch in T regulatorischen Zellen (Tregs). Diese T regulatorischen Zellen sind interessant für die Asthmatherapie, da sie T-Helfer Zellen Typ II inhibieren. Die Konzentration an IL-6 ist bei Asthma bronchiale erhöht. IL-6 inhibiert die T regulatorischen Zellen. Dadurch kann eine Blockade oder Hemmung von IL-6 mittels nasaler Verabreichung von Steroiden zu einer Up-Regulierung von T regulatorischen Zellen und damit zur Verbesserung von Asthma führen. T regulatorische Zellen können die Entwicklung von T-Helfer Zellen Typ II hemmen. Die  $\alpha$ -Kette des IL-6 Rezeptors kontrolliert in der Lunge die Entwicklung und Funktion (während einer allergischen Atemwegsentzündung) in-vivo von CD4+ und CD25+ T regulatorischen Zellen. Dies ist wichtig für das Überleben und die Entwicklung der CD4+ Zellen Typ 2 in der Lunge. Zudem führt eine Blockade des membrangebundenen IL-6 Rezeptors zu einer Expansion der CD4+ CD25+ Foxp3+ T regulatorischen Zellen in der Lunge. Da die CD4+ CD25+ Foxp3+ Zellen eine Suppression der CD4+ Typ 2 Zellen bewirken, ist eine Blockade von IL-6 in der Lunge von großer Bedeutung für die Therapie des Asthmas (51). In Abbildung 1.20 ist der Einfluss der Steroide auf die IL-6 Sekretion dargestellt. IL-6 wird von Antigen präsentierenden Zellen, wie Makrophagen produziert und sein Rezeptor ist auf CD4+ T-Zellen exprimiert. Bei Gabe eines Steroids findet eine sehr stark verminderte IL-6 Freigabe statt, was zu einem verminderten Auftreten von

TH-2 führt, bei gleichzeitiger Zunahme der T regulatorischen Zellen.

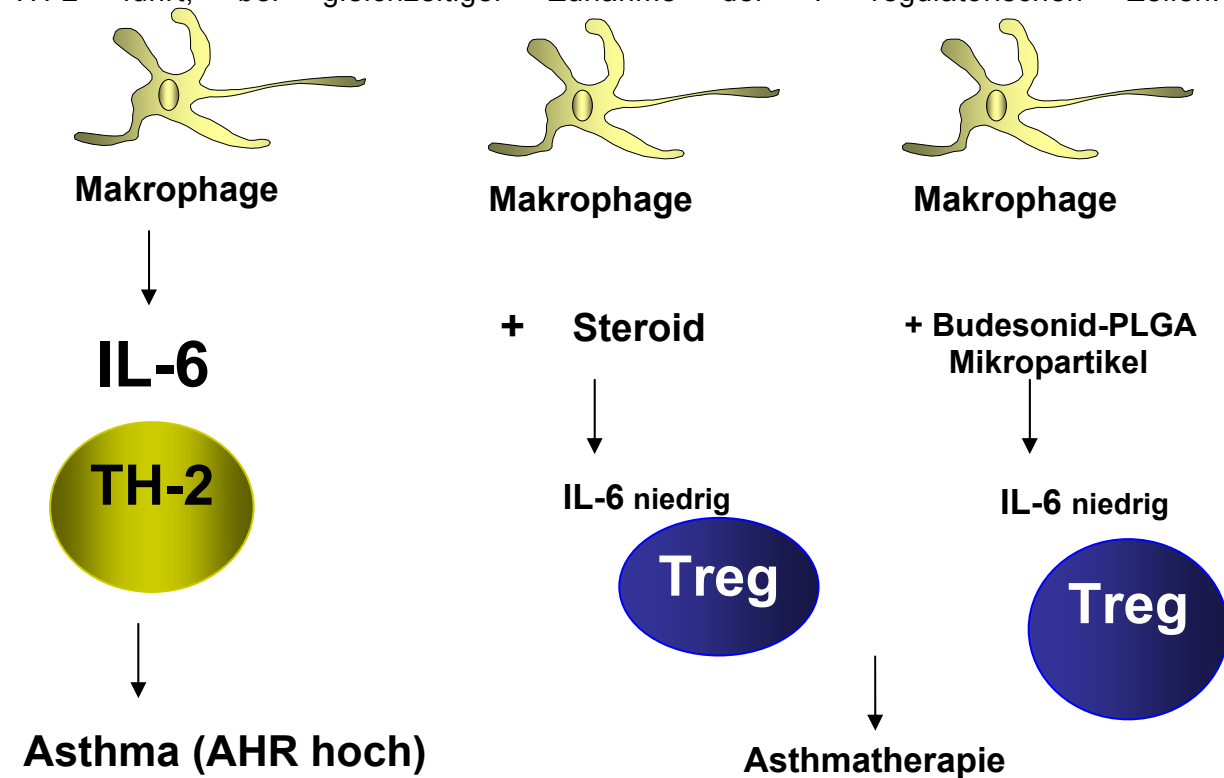


Abbildung 1.20 Auswirkung der Steroide auf die IL-6 Produktion

Abbildung 1.21 zeigt die IL-6 produzierenden Zellen in der Lunge.

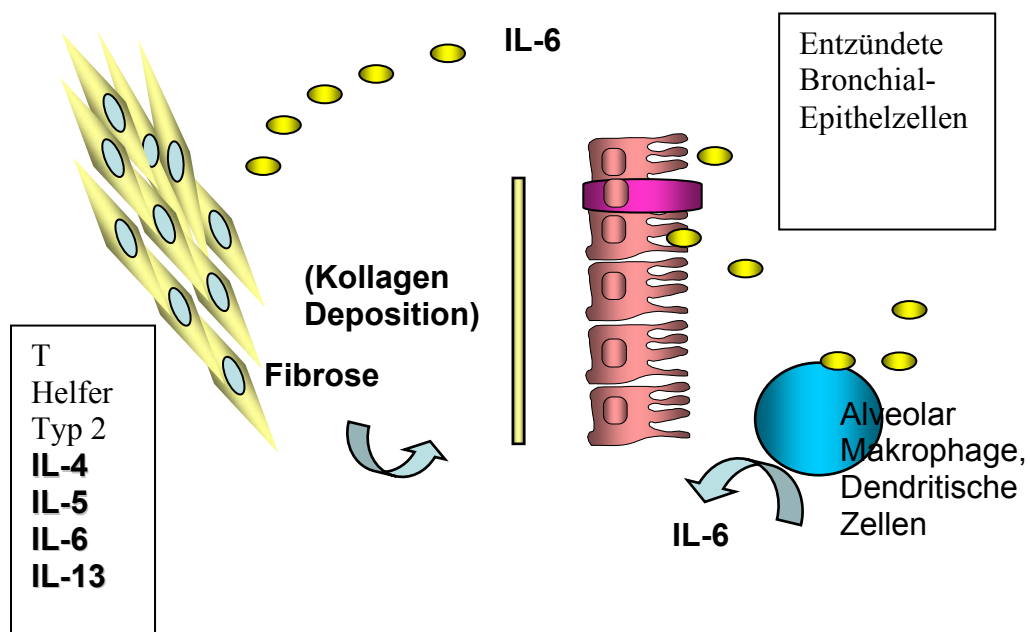


Abbildung 1.21 IL-6 produzierende Zellen in der Lunge

Nicht hämatopoetische Zellen, wie Fibroblasten, Alveolarmakrophagen und bronchiale Epithelzellen, sowie dendritische Zellen setzen IL-6 frei. IL-6 führt zu einer erhöhten Proliferation von CD4+ Zellen Typ 2 in der Lunge. CD4+ Zellen und T-Helferzellen Typ 2 produzieren wiederum IL-6 und andere proinflammatorische Zytokine, wie IL-5, IL-4 und IL-13. Dies resultiert in einer Fibrose in der Lunge mit Kollagen Deposition und Mukus-Überproduktion.

## 1.12 Atemwegsgeometrie der Mäuse

Die Deposition von inhalierten Partikeln wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst, wie die Atemwegsgeometrie, die Belüftung der Lunge (Atmung) und Partikelcharakteristika, wie in den Kapiteln 1.7.1 und 1.7.2 dargestellt. Es ist wichtig, diese Einflüsse auf die respirative Dosis zu verstehen. Die tracheobronchiale Atemwegsgeometrie der Atemwegsgenerationen 1-6 der Balb/c Mäuse, als auch der Black 6 Mäuse wurde generiert unter Zuhilfenahme von replizierten „Lungen casts“, die in-situ hergestellt wurden (122). Es wurden Messungen an zwei Gruppen vorgenommen: Einer Kontrollgruppe und einer mit Ovalbumin behandelten männlichen Balb/c Mäusegruppe. Von beiden Spezies wurden Vorhersagen bezüglich der Partikeldeposition für sphärische Partikel von 0,1 bis 10 µm Partikeldurchmesser bei zwei verschiedenen Ventilationsraten gemacht. Hierfür wurde ein bereits veröffentlichtes Aerosol-Dosimeter-Computerprogramm verwendet. Die Partikeldeposition im proximalen bronchialen Baum war bei Balb/c Mäusen mit 2 µm Durchmesser bei einer hohen Ventilierung um das bis zu 3-fache größer (122).

Tabelle 1.5 Typischer Weg der tracheobronchialen Geometrie der Generationen 1 bis 6 für Balb/c Mäuse (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) (122)

Generationsnummer (trachea = 1)	Nummer der Atemwege	Atemwegslänge (L) (mm)	Atemwegsdurchmesser (D) (mm)	Branch angle ( $\theta$ ) ( $^{\circ}$ )	Gravity angle ( $\phi$ ) ( $^{\circ}$ )
1	1	10.2 $\pm$ 0.6	1.36 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	90 $\pm$ 0
2	2	5 $\pm$ 0.33	1.14 $\pm$ 0.03	15 $\pm$ 1	105 $\pm$ 3
3	4	1.88 $\pm$ 0.05	0.98 $\pm$ 0.03	24 $\pm$ 2	98 $\pm$ 4
4	8	0.67 $\pm$ 0.04	0.7 $\pm$ 0.01	28 $\pm$ 2	91 $\pm$ 1
5	16	0.68 $\pm$ 0.05	0.5 $\pm$ 0.01	31 $\pm$ 1	78 $\pm$ 3
6	32	0.47 $\pm$ 0.02	0.35 $\pm$ 0.01	39 $\pm$ 1	76 $\pm$ 3

Abbildung 1.22 zeigt am Beispiel der Balb/c- und der B6C3F<sub>1</sub>-Mäuse einen Vergleich der vorhergesagten Partikeldeposition für die Atemwegsgenerationen 1 bis 6.



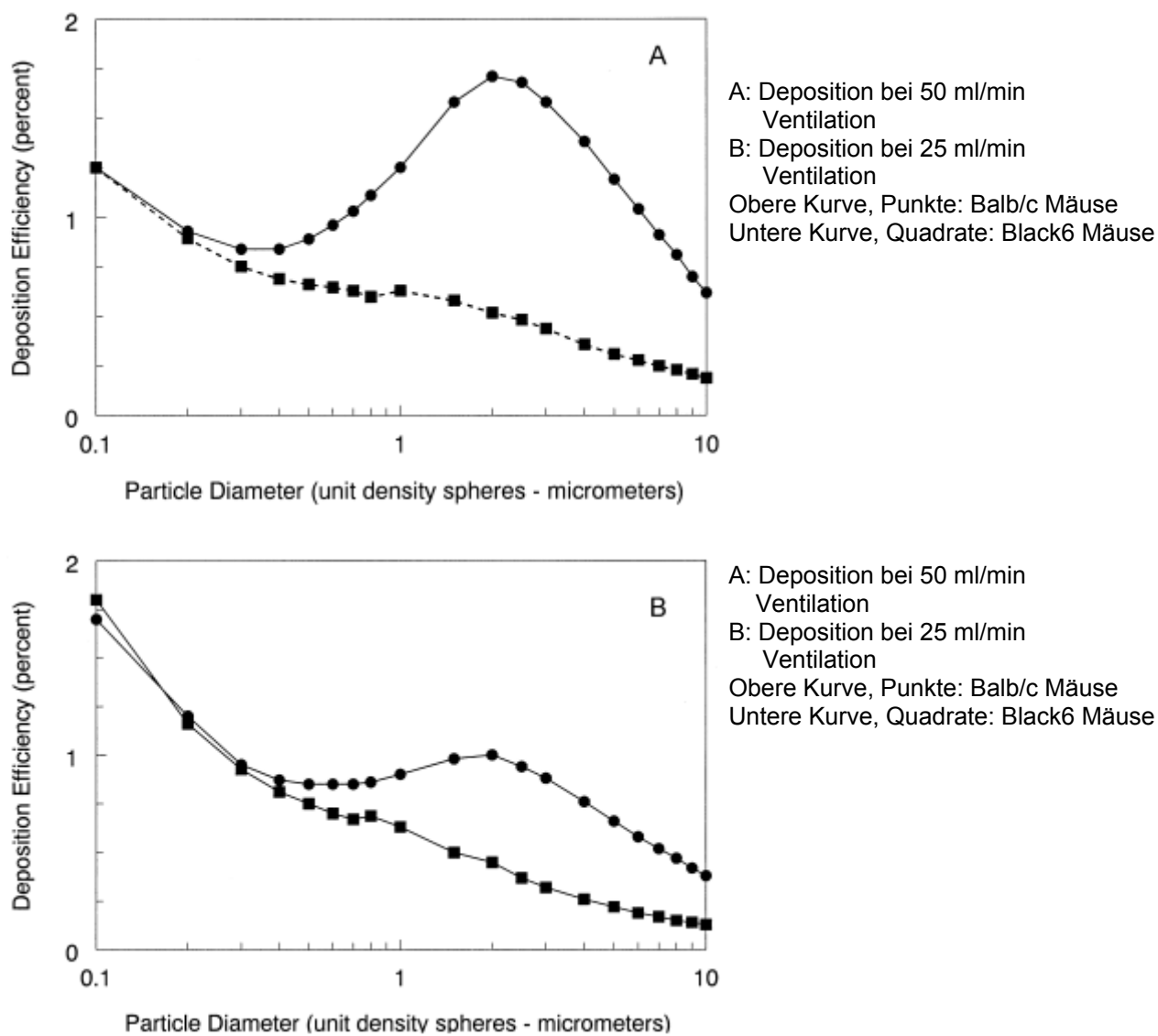


Abbildung 1.22 Vergleich der vorhergesagten Partikeldeposition von Balb/c- und B6C3F<sub>1</sub>-Mäusen der Atemwegsgenerationen 1 bis 6 (122)

## 2 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, pharmazeutisch-technologische Möglichkeiten der Retardierung bei ausgewählten Antiasthmatica zur pulmonalen Applikation anzuwenden. Dafür sollten Mikropartikel hergestellt und pharmazeutisch sowie biopharmazeutisch charakterisiert werden. Als Modellsubstanzen werden das Glukokortikoid Budesonid und das  $\beta_2$ -Sympathomimetikum Salbutamol in Form seiner Base und seines Salzes verwendet. Die Auswahl erfolgt nach physikochemischen (Lipophilie, Molekulargewicht) und therapeutischen (Halbwertszeit der Wirkung, Applikationsfrequenz) Gesichtspunkten. Budesonid gehört zur Gruppe der Glukokortikoide, die häufig zur Behandlung verschiedener entzündlicher Erkrankungen eingesetzt werden (55). Die Wahl fiel auf diesen Modellarzneistoff, da das Glukokortikoid bereits in der Asthmatherapie etabliert und aufgrund seiner geringen Toxizität (24) unproblematisch zu verarbeiten ist. Weiterhin wird der hydrophile Arzneistoff Salbutamol in Form der Base und des Sulfatsalzes gewählt. Salbutamolsulfat ist wasserlöslich und hat eine kurze Halbwertszeit von nur 3-8 Stunden. Es eignet sich deswegen für eine kontrollierte Freigabe (34). Als Bronchospasmolytikum wird die Substanz bereits seit längerem zur Behandlung akuter und chronisch obstruktiver Atemwegserkrankungen inhalativ in Form von Dosieraerosolen und Pulverinhalatoren eingesetzt (27).

Pulmonale Retardsysteme, wie Mikropartikel oder Mikrosphärulen, könnten eine Senkung der Applikationsfrequenz ermöglichen. Mikropartikel auf Polymerbasis ermöglichen eine kontrollierte Freigabe der Arzneistoffe über einen vorausbestimmten Zeitraum. Es erfolgt die Auswahl physiologisch unbedenklicher Hilfsstoffe (Polylaktide/ Poly(laktid-co-glykolide) mit unterschiedlichen Anteilen an Coglykolid sowie unterschiedlichen Molekulargewichten, die sich prinzipiell zur Verzögerung der Freisetzung eignen und sich bei der parenteralen Applikation bereits bewährt haben.

Die Sprühtrocknung wird als geeignetes pharmazeutisch-technologisches Verfahren zur Präparation von Mikropartikeln im Teilchengrößenbereich von 1-10 Mikrometern beschrieben, welche den Wirkstoff mit möglichst hoher Beladung verkapselt. Dabei spielen sowohl verfahrenstechnische Parameter, wie auch die Hilfsstoffauswahl eine wichtige Rolle. So ist beispielsweise als relevanter verfahrenstechnischer Parameter zu klären, ob die Vorlage des Arzneistoffs als Suspension mikronisierter Teilchen erfolgen soll oder zusammen mit dem Polymer in organischer Lösung günstiger ist. Im einen Fall erhält man kristallinen Arzneistoff, der von einer Polymerschicht umhüllt ist, während man im anderen Fall eine molekular-disperse Verteilung des Arzneistoffs im Polymer erwartet.

Die sprühgetrockneten Pulver sollen pharmazeutisch physikochemisch mittels Rasterelektronenmikroskopie (Morphologie), Laserdiffraktometrie (Teilchengrößenverteilung), DSC und Röntgenpulverdiffraktometrie (thermisches Verhalten) und mittels Stickstoff-Tief-Temperatur Adsorptionsverfahren (spezifische Oberfläche) charakterisiert werden. Zusätzlich wird die Wirkstoffbeladung der sprühgetrockneten Polymer-Mikropartikel mittels HPLC ermittelt. Weitere Parameter, wie z.B. die Handhabbarkeit der Produkte (z.B. durch elektrostatische Aufladung) haben sich im Laufe der Untersuchungen zusätzlich als relevant erwiesen.

---

Die biopharmazeutische Charakterisierung der sprühgetrockneten Pulver erfolgt über die in-vitro Freigabekinetik (Burst-Effekt versus Anteil verzögert freigegebener Substanz, sowie Vollständigkeit der Freigabe) und die Stabilität der Mikropartikel. Es wird die Suche nach einem geeigneten Freisetzungsmilieu beschrieben, sowie eine Methode für die Prüfung der in-vitro Freisetzung aus den Mikropartikeln. Dieses Milieu soll das Milieu im Alveolarraum simulieren. Neben der Diffusion durch Poren der Polymermatrix kann es zu einem hydrolytischen Abbau des Polymers und damit zur beschleunigten Wirkstofffreisetzung kommen. Zusätzlich werden Versuche an Zellkulturen und in-vivo Versuche an Mäusen durchgeführt, um die Effekte der sprühgetrockneten Mikropartikel und des Hilfsstoffs hinsichtlich der Freisetzungsetardierung und der Verträglichkeit bei der pulmonalen Applikation zu testen. Bei den in-vivo Versuchen werden der Atemwegwiderstand und die Verlängerung der expiratorischen Phase als Parameter für einen antiasthmatischen Effekt gewählt. Durch Analyse von Lungenlavage Flüssigkeit kann zusätzlich überprüft werden, ob die sprühgetrockneten Mikropartikel bis in die Lungenbereiche gelangt sind.

### 3 Materialien und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Wirkstoffe

###### *Budesonid*

###### *Physikochemische Eigenschaften*

Das weiße Pulver ist kristallin, geruchlos, leicht löslich in Dichlormethan, wenig löslich in Ethanol und praktisch unlöslich in Wasser. Das Molekulargewicht beträgt 430,5 g/mol. Die Partikelgröße der gelieferten Substanz liegt zwischen 20 und 500 µm. Boehringer Ingelheim Pharma KG stellte die Substanz zur Verfügung (Ch.Bez. 5424 und Z 0360/M1), die den Anforderungen der Ph.Eur. entspricht.

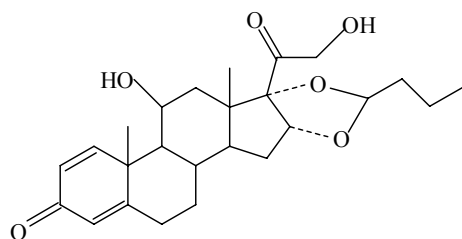


Abbildung 3.1 Strukturformel von Budesonid

Budesonid schmilzt bei 221 - 232 °C unter Zersetzung. Es ist leicht löslich in Dichlormethan praktisch unlöslich in Wasser und wenig löslich in Ethanol (98). Die Substanz ist nicht hygroskopisch aber lichtempfindlich. Die Stabilität in wässriger Lösung ist stark pH-abhängig. Das Stabilitätsmaximum liegt bei pH 2-5 (50 °C). In ethanolischer Lösung (99,5 %) ist die Substanz bei 5 °C für 6 Monate stabil (98).

###### *Pharmakologie*

Budesonid ist ein stark wirksames Glukokortikoid mit antiphlogistischer, antiallergischer, antiödematös und antiexsudativer Wirkung, das bei Asthma bronchiale, Heuschnupfen, Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa eingesetzt wird.

In den Bronchien hemmt Budesonid die Bildung, Speicherung und Freisetzung von Mediatoren aus Basophilen und Makrophagen. Gleichzeitig wird die Hyperreagibilität des Bronchialsystems gedämpft, wodurch weniger Sekret produziert wird.

Zudem bewirkt Budesonid eine Steigerung der Wirkung von  $\beta_2$ - Sympathomimetika.

Nach der Diffusion durch die Zellmembran bindet es an ein zytoplasmatisches Rezeptorprotein. Der Rezeptor-Substanz Komplex gelangt in den Zellkern, wo er die Synthese von Proteinen, wie Macrocortin, induziert. Die dadurch erzeugten hormonartigen Effekte treten somit erst nach 30-60 Minuten verzögert ein. Macrocortin hemmt die

Phospholipase A2 und somit die Bildung von Entzündungsmediatoren (Leukotrienen). Eine Atrophie der Bronchialschleimhaut wird auch bei Anwendung über einen längeren Zeitraum nicht beobachtet. Nach inhalativer Applikation erfolgt der Wirkungseintritt nach 3-4 Stunden, das Wirkungsmaximum wird nach 6-8 Stunden erreicht.

#### *Pharmakokinetik*

Die Eliminationshalbwertszeit des Wirkstoffes erfolgt bei intranasaler Applikation nach 2,8 Stunden und bei oraler Applikation nach 4 Stunden. Der Abbau erfolgt enzymatisch über Cytochrom P450 (CYP) 3A4. Es wird in der Leber sehr rasch zu 6  $\beta$ -Hydroxybudesonid und 16  $\alpha$ -Hydroxyprednisolon metabolisiert (42, 139), die 50-100 mal schwächer wirksam sind, als die Muttersubstanz. Während der ersten Leberpassage werden mehr als 90 % des Budesonids metabolisiert. Eine Metabolisierung in der Lunge findet nicht statt (103, 139, 164). Nach der Inhalation findet eine schnelle und umfangreiche Aufnahme in die Lunge statt.

Beim Verschlucken kommt es durch den sauren pH Wert im Magen zu einer Acetalspaltung (3). Nach der Inhalation von Budesonid ist die Konzentration im Lungengewebe 8 mal höher als im Plasma (98).

Budesonid wird überwiegend renal in Form seiner Metaboliten eliminiert. Davon ca. 1/3 in konjugierter Form, während nur Spuren von unverändertem Budesonid erscheinen. Daneben konnte noch 23-Hydroxybudesonid nachgewiesen werden. Die biliär/ intestinale Ausscheidung beträgt 15-30 %.

Die Vorteile von Budesonid, einem „soft steroid“ (48), gegenüber anderen Corticosteroiden sind seine hohe lokale, d.h. pulmonale, Wirksamkeit und die geringe systemische Belastung (139). „Soft steroid“ bedeutet, dass das Glukokortikoid eine schlechte orale Bioverfügbarkeit besitzt, wodurch eine systemische Wirkung durch verschlucktes Steroid weitgehend ausgeschaltet ist. Das nichthalogenierte Glukokortikoid Budesonid besitzt eine 100-mal höhere Affinität zum Glukokortikoidrezeptor als Hydrocortison (98). Die hohe topische Aktivität ist auf die asymmetrische 16 $\alpha$ , 17 $\alpha$  Acetalgruppe zurückzuführen (139). Budesonid besitzt die Fähigkeit, ein reversibles intrazelluläres Depot in Form von inaktiven Estern zu bilden. Aufgrund nichtlinearer Prozesse ist zu Beginn der Umfang des Esterdepots dosisabhängig (86). Budesonid besteht aus einem Gemisch zweier Epimere (Epimer A: C 22S und Epimer B: C 22R) von 16 $\alpha$ ,17-[(RS)-Butylidendioxy]-11 $\beta$ ,21-dihydroxypregna-1,4-dien-3,20 dion), wobei das Epimer B im Gemisch überwiegt.

#### *Dosierung und Applikationsfrequenz*

Die Standarddosierung von inhalativ verabreichtem Budesonid ist 0,2 mg bid inhalativ (0,4 mg /d). Die Maximaldosierung bei inhalativer Applikation beträgt 0,4 mg bid (0,8 mg /d).

## Salbutamol

### Physikochemische Eigenschaften

Das weiße, kristalline, geruchlose Pulver löst sich in 70 Teilen Wasser oder 30 Teilen Ethanol. Das Molekulargewicht beträgt 239,3 g/mol. Die Partikelgröße liegt zwischen 1,8 und 58 µm, je nach Vermahlungsgrad. Boehringer-Ingelheim Pharma KG stellte die Substanz zur Verfügung (Salbutamol Ch.Bez. 5), die den Anforderungen der Ph.Eur. entspricht.

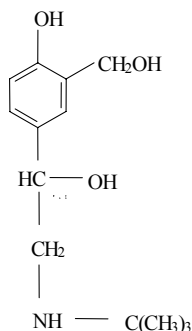


Abbildung 3.2 Strukturformel von Salbutamol

Salbutamol schmilzt bei 155 °C unter Zersetzung. Die Substanz ist in Ethanol löslich und wenig löslich in Wasser. Salbutamol wird pharmazeutisch als Racemat verwendet. Es ist als sekundäres aliphatisches Amin eine Base ( $pK_a = 9,07$ ) und als Phenol zugleich eine schwache Säure ( $pK_a = 10,37$ ). Bei physiologischem pH Wert liegt hauptsächlich das Kation vor. Gebräuchlicher als die Base ist die Sulfatform.

### Pharmakologie

Salbutamol ist ein direkt wirksames  $\beta$ -Sympathomimetikum mit vorwiegender  $\beta_2$ -Aktivität. Eine Stimulation der  $\beta_1$ -Rezeptoren (kardiale Wirkung) erfolgt erst bei höheren Dosen. Es erfolgt eine Erschlaffung der glatten Muskulatur der Bronchien, der Gefäßmuskulatur, sowie eine Relaxation der Uterusschleimhaut.  $\beta_2$ -Sympathomimetika werden zur bronchospasmolytischen Therapie obstruktiver Atemwegserkrankungen, sowie prophylaktisch bei Asthma bronchiale (vor körperlicher Anstrengung oder bei vorhersehbarem Allergenkontakt) eingesetzt. Bei einer Dauerbehandlung sollte parallel immer eine antiinflammatorische Therapie erfolgen. Salbutamol hemmt die Freisetzung von bronchokonstriktischen und proinflammatorischen Mediatoren aus Mastzellen. Weiterhin erfolgt eine Steigerung der mukoziliären Clearance, wobei der Wirkungs-Mechanismus nicht eindeutig geklärt ist.

Durch die Stimulation der  $\beta$ -Rezeptoren kommt es zur Adenylatzyklase-Aktivierung (G-Protein vermittelt) und infolge dessen zu einem erhöhten cAMP-Spiegel. Hierdurch werden die kontraktile Elemente der glatten Muskulatur durch verminderte Bereitstellung von freien intrazellulären Calciumionen gehemmt.

Die Wirkung auf das Herz ist bei nicht pulmonaler Applikation durch Reflexstimulation durch die periphere Vasodilatation zu erklären (positiv inotrop und chronotrop durch erhöhte Calciumionenkonzentration). Durch reflektorische Aktivierung des Herzens infolge der Vasodilatation kann es zu einer Steigerung des Herzzeitvolumens kommen. Der Wirkungseintritt nach einer Inhalation tritt innerhalb von 5 Minuten ein und hält etwa 4-6 Stunden an. Durch Retardierung kann die Wirkungsdauer auf etwa 12 Stunden verlängert werden (99). Das Wirkungsmaximum tritt nach inhalativer Applikation innerhalb von wenigen Minuten auf, die Wirkungsdauer beträgt etwa 4-6 Stunden.

### Pharmakokinetik

Die Eliminationshalbwertszeit von Salbutamol beträgt 1,5-5 Stunden (3). Der Abbau erfolgt enzymatisch über Cytochrom P450 (CYP)3A4, Salbutamol unterliegt einem ausgeprägten First-pass Metabolismus. Hauptmetabolit ist der 4-O-Schwefelsäure-Ester. Dieser wirkt nur

noch sehr gering sympathomimetisch (99). Etwa 64-98 % einer Dosis werden innerhalb von 72 Stunden über die Nieren ausgeschieden, davon ca. 28 % unverändert, 10-12 % werden über die Faeces ausgeschieden (99).

#### *Dosierung und Applikationsfrequenz*

Die Dosierung von Salbutamol ist 0,1-0,2 mg bei einem akuten Anfall. Zur Anfallsprophylaxe beträgt die Dosierung 2-4 mal 0,1-0,2 mg pro Tag.

#### *Salbutamolsulfat*

##### *Physikochemische Eigenschaften*

Es handelt sich hierbei um ein weißes, kristallines, geruchloses Pulver, das in Methanol oder in 4 Teilen Wasser (250 g/l) löslich ist. Das Molekulargewicht beträgt 576,7 g/mol. Die Partikelgröße liegt in Abhängigkeit von der Vorbehandlung zwischen 1,8 und 60 µm.

Boehringer Ingelheim Pharma KG stellte die Substanz zur Verfügung (Salbutamolsulfat Ch.Bez. 200713), die den Anforderungen der Ph.Eur. entspricht.

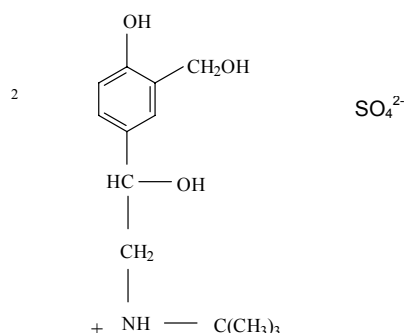


Abbildung 3.3 Strukturformel von Salbutamolsulfat

Der Schmelzpunkt von Salbutamolsulfat beträgt 157 °C. Die Substanz ist leicht löslich in Wasser, schwer löslich in Ethanol und Ether und sehr schwer löslich in Dichlormethan. Lösungen von Salbutamolsulfat sind schwach sauer (BP 1988 fordert pH 3,4 bis 5,0), ihre Stabilität nimmt mit steigendem pH ab (99).

#### *3.1.2 Hilfsstoffe*

##### *Polymilchsäure*

Als Synonym wird der Begriff Polylaktid (D,L-PLA) verwendet. Auf dem Markt ist das verwendete Polymer unter dem Namen Resomer™ R 202H mit einem MW von 14 000 g/mol erhältlich. Es ist ein weißes, amorphes, geruchloses Pulver von neutralem Geschmack, sehr leicht löslich in Dichlormethan, löslich in Chloroform, Acetonitril, Aceton, Ethylacetat und Toluol. Die Substanz wurde von Boehringer-Ingelheim Pharma KG zur Verfügung gestellt (Ch.Bez. 200479 und 1011981).

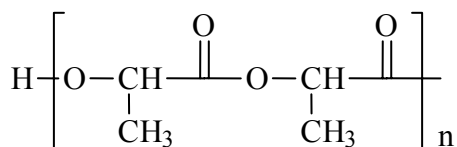


Abbildung 3.4 Poly(D,L-laktid)

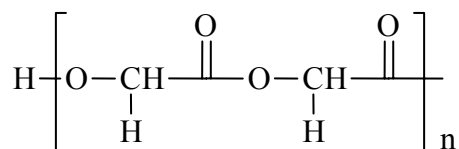


Abbildung 3.5 Polyglykolid

*Poly(lactid-co-glykolid)*

Als Synonym wird der Begriff PLGA verwendet. Auf dem Markt ist das verwendete 50:50 Polymer unter dem Namen Resomer™ RG 502H mit einem MW von 14 000 g/mol erhältlich. Das zweite verwendete Copolymer ist das PLGA II 75:25. Es wird unter dem Namen Resomer™ RG 752-S vertrieben und hat ein MW von 17 000 g/mol. Das neutral schmeckende, geruchlose, weiße Pulver ist amorph und löst sich sehr leicht in Dichlormethan. Es ist leicht löslich in Chloroform, Acetonitril, Aceton und Ethylacetat. Die Substanzen wurden von Boehringer-Ingelheim Pharma KG zur Verfügung gestellt (Ch.Bez. 1001974 von PLGA und 60640660 von PLGA II).

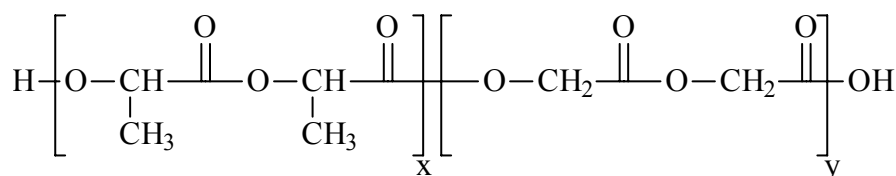


Abbildung 3.6 Poly(D,L-laktid-co-glykolid)

Von den Polymeren PLA und PLGA wird die jeweils hydrophilere Variante R 202H für PLA und RG 502H für PLGA gewählt. Diese tragen am Kettenende eine Carboxylgruppe und sind dadurch hydrophiler, als die Resomere ohne H. Diese sind durch den Alkylester hydrophober. Bei den Resomeren mit H erfolgt die Wasseraufnahme schneller, wodurch diese schneller zerfallen und den Wirkstoff auch schneller freigegeben.

In Tabelle 3.1 sind häufig verwendete Chemikalien und Medien zusammengefasst.

Tabelle 3.1 Häufig verwendete Chemikalien und Medien

Material	Bezugsquelle
Dichlormethan (Analytical Reagent Grade)	Fisher Scientific, Loughborough, UK
Acetonitril (HPLC Grade)	Fisher Scientific, Loughborough, UK
Methanol (HPLC Grade)	Fisher Scientific, Loughborough, UK
Na-dihydrogenphosphat Monohydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Na- Heptansulfonsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Caelo, Hilden, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
HEPES Puffer	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco Medium	Biochrome, Berlin, Deutschland
Fetal Calf Serum (FCS)	Biochrome, Berlin, Deutschland
Trypsin	Biochrome, Berlin, Deutschland
EDTA	Biochrome, Berlin, Deutschland
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland



### 3.1.3 Geräte

#### Sprühtrocknung

Die Sprühtrocknungsversuche werden an einem Sprühtrockner Typ Büchi B-191, Fabrikationsnr. 22 00 6501 000 1 der Firma Büchi (Flawil, Schweiz) durchgeführt.

Als Peripheriegerät wurde ein Kompressor Typ SO-45-E2-ASY, Kompr.-Nr. 37635 der Firma Haug Kompressoren (Linsengericht, Deutschland) verwendet.

#### Lichtmikroskopie

Vor der Sprühtrocknung wurden Teilchengrößenmessungen am Mikroskop Typ Hund Wetzlar HAT 50 Wilovert S, Seriennr.100 7666, INV-Nr. 20 23 72 000 (Wetzlar-Nauborn, Deutschland) durchgeführt, als Peripheriegeräte werden ein Processor Typ Siemens Xpert Pentium III 500 MHz, Seriennr. YAHN 069163, INV-Nr. 99 92 51 000 und eine Digitalkamera Typ Kodak DC 120 Zoom Digital Camera Seriennr. EKB 90 30 1326 (New York, USA) verwendet. Untersuchungen für die Vorbereitung der Zell- und Tierversuche wurden an einem Mikroskop Typ Olympus IX70 (Olympus America, Inc., Melville, New York, USA) durchgeführt.

#### Rasterelektronenmikroskopie

Mit dem Rasterelektronenmikroskop LEO Gemini Supra 55 VP (Leo, Oberkochen, Deutschland) werden die Proben untersucht.

#### Laserdiffraktometrie

Laserbeugungsmessungen erfolgen mit einem HELOS-SYSTEM-Laserdiffraktometer der Firma Sympatec (Clausthal-Zellerfeld, Deutschland). Die Trockendispergierungen erfolgen mit dem RODOS-Dispergierer mit Falltrichter.

#### Thermische Analyse

Die DSC-Kurven werden mit einem Gerät der Firma Mettler Toledo, Typ DSC 820 (Giessen, Deutschland) aufgenommen.

#### Bestimmung der Oberflächenspannung

Die Oberflächenspannung der Freisetzungsmitteln wird an einem Ringtensiometer der Firma Krüss (Hamburg, Deutschland) des Typs K10 gemessen.

#### Zellversuche

Für die Zellversuche werden Zellkulturflaschen und 24 well-plates der Firma Greiner (Frickhausen, Deutschland) verwendet.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 *Probenvorbereitung: Herstellung der Lösung, Suspension und der Emulsion für die Sprühtrocknung*

Als wichtiger verfahrenstechnischer Parameter war zu klären, ob die Vorlage des Arzneistoffs als Suspension oder zusammen mit dem Polymer in organischer Lösung günstiger ist. Im einen Fall erhält man kristallinen Arzneistoff, der von einer Polymerschicht umhüllt ist, während man im anderen Fall eine molekulardisperse Verteilung des Arzneistoffs im Polymer erwarten sollte (solid dispersion). Dabei spielen allerdings noch weitere Faktoren, wie z.B. die Löslichkeit des Arzneistoffs im Polymer eine Rolle.

Budesonid kann zusammen mit den jeweils einzelnen Polymeren als Lösung in Dichlormethan versprüht werden. Salbutamolsulfat wird in Wasser und das jeweilige Polymer

in Dichlormethan gelöst. Beide werden zusammen mit Hilfe von Lecithin emulgiert und als w/o Emulsion versprüht. Salbutamol-Base wird wie Budesonid behandelt und anschließend als Suspension versprüht.

#### *Untersuchungen zur Explosionsgefahr*

Eine der vom Hersteller des Sprühtrockners geforderte Sicherheitsbestimmung war der unbedingte Verzicht auf den Umgang mit Lösungsmitteln oder brennbaren explosionsfördernden Stoffen. Da jedoch bei Verwendung der Polymere PLA, PLGA und PLGA II Dichlormethan als Lösungsmittel eingesetzt wird, das zwar selbst nicht brennbar ist, jedoch mit Luft explosive Gemische bildet, war zu prüfen, wie die Sprührate und der Luftdurchsatz entsprechend angeglichen werden müssen. Die einzige Möglichkeit bestand darin, die Explosionsgrenzen zu umgehen, die für Dichlormethan  $450 \text{ g/m}^3$  bis  $780 \text{ g/m}^3$  betragen. Als regulierende Größe stand bei konstanten Basisparametern (Luftdurchsatz, Temperatur) folglich allein die Fördergeschwindigkeit, bzw. Leistung der Peristaltikpumpe zur Verfügung. Daraufhin wird das geförderte Volumen pro Zeiteinheit bei definierter Leistung der Pumpe gemessen. Dies ergab, dass bei einer Förderrate der Peristaltikpumpe von 40 % (11 ml/min) keine Gefahr besteht, da der Volumenstrom  $V_{\text{Dichlorm.}} = 11 \text{ ml/min}$ , der Luftdurchsatz  $m = \rho \times V$ , wobei  $m =$  Masse,  $\rho =$  Dichte und  $V =$  Volumen ist, mit

$$m = 1,325 \text{ g/ml} \times 11 \text{ ml/min}$$

$$= 14,575 \text{ g/min}$$

$$= 874,5 \text{ g/h}$$

$$\text{Volumenstrom}_{\text{Luftdurchsatz}} = 45 \text{ m}^3/\text{h}$$

$$= 874,5 \text{ g/h} / 45 \text{ m}^3/\text{h}$$

$$= 19,43 \text{ g/m}^3 \times \text{Sicherheitsfaktor } 3 = 58,29 \text{ g/m}^3$$

Luft besteht aus 21 % Sauerstoff:  $45 \text{ m}^3/\text{h} \times 0,21 = 9,45 \text{ m}^3/\text{h}$

$$874,5 \text{ g/h} / 9,45 \text{ m}^3/\text{h} = 92,54 \text{ g/m}^3 \times \text{Sicherheitsfaktor } 3 = 277,62 \text{ g/m}^3$$

Selbst bei reinem Sauerstoff wäre man bei einer Pumpeneinstellung von 11 ml/min ausserhalb der Explosionsgrenzen des Dichlormethans.

#### *Budesonid*

Für die Sprühtrocknung von 4,8 % Budesonid im Polymer wird die Mischung mit folgender Zusammensetzung hergestellt:

25 g Polymer

250 ml Dichlormethan

1,25 g Budesonid

Für die Mischungen mit 9,1 %, 20 %, 30 % und 44,4 % Budesonidanteil werden entsprechend 2,5 g, 5 g, 10 g und 20 g eingewogen. Die einzelnen Komponenten werden genau gewogen (Mettler-Toledo AG285, Giessen, Deutschland und für die Polymere Sartorius, Göttingen, Deutschland) und in einen Erlenmeyerkolben gegeben. Anschließend wird die Mischung für 10 Minuten ins Ultraschallbad gestellt, um alle Bestandteile zu lösen. Die Lösung wird danach sprühgetrocknet.

#### *Salbutamol*

Für die Sprühtrocknung von 4,8 % Salbutamol im Polymer wird die Mischung mit folgender Zusammensetzung hergestellt:

25 g Polymer

250 ml Dichlormethan

1,25 g Salbutamol

Für die Mischung mit 9,1 % Salbutamolanteil wird entsprechend 2,5 g Salbutamol eingewogen. Die einzelnen Komponenten werden genau gewogen und in einen Erlenmeyerkolben gegeben. Anschließend wird die Mischung für 10 Minuten ins Ultraschallbad gestellt. Die visuell stabile Suspension wird danach sprühgetrocknet.

### *Salbutamolsulfat*

Für die Sprühtrocknung von 4,8 % Salbutamolsulfat im Polymer wird eine w/o Emulsion mit folgender Zusammensetzung hergestellt:

25	g	Polymer
175	ml	Dichlormethan (Fisher Scientific, Loughborough, UK)
75	ml	Aq. purificata
1	g	Sojalecithin (Caelo, Hilden, Deutschland)
1,25	g	Salbutamolsulfat

Für die Mischung mit 9,1 % Salbutamolsulfatanteil wird entsprechend 2,5 g Salbutamolsulfat eingewogen. Das Sojalecithin wird unter leichtem Erwärmen in 75 ml Aq. purificata gelöst, das verdunstete Wasser wird ergänzt. Salbutamolsulfat wird darin gelöst und zu der Lösung, bestehend aus Polymer und Dichlormethan, gegeben. Anschließend wird für eine Min. im Ultraturax T25 (IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland) homogenisiert und die w/o Emulsion danach sprühgetrocknet. Die Emulsion war während der ganzen Sprühtrocknung stabil. Sojalecithin wurde ausgewählt, da dies ein physiologisch verträglicher Emulgator ist und in Combivent™, einem Dosieraerosol, mit Salbutamolsulfat in Kombination mit Ipratropiumbromid, enthalten ist. Diese Formulierung enthält 0,2 % Sojalecithin. Die Auswahl für eine 1 %ige Sojaformulierung beruhte auf Vorversuchen mit 0,1 %, 1 % und 5 % Sojazusatz. Hierbei erwies sich die 1 % ige Formulierung als die besser geeignete, da mit 0,1 % kaum ein Effekt hinsichtlich der Stabilität der Emulsion über den Zeitraum der Sprühtrocknung zu sehen war und sich der 5 % ige Sojalecithinzusatz als zu hoch erwies und schlecht zu verarbeiten war. Mit der 1 % igen Lecithinformulierung konnte eine Stabilisierung der Emulsion, bei gleichzeitig guter Verarbeitung des Lecithins erzielt werden.

### *3.2.2 Sprühtrocknung*

#### *Budesonid*

Die Einlasstemperatur wird auf 60 °C eingestellt, der Aspirator auf 100 % und die Pumpenleistung auf 40 %, was einer Förderrate von 11 ml/min entspricht. Der Sprühflow liegt bei 800 Normlitern/h. Diese Parameter werden stets konstant gehalten.

#### *Salbutamol und Salbutamolsulfat*

Die Einlasstemperatur wird auf 55 °C bzw. 60 °C eingestellt, der Aspirator auf 100 %, die Pumpenleistung auf 35 % bzw. auf 40 %, was einer Förderrate von 9 ml/min bzw. 11 ml/min entspricht. Der Sprühflow liegt bei 800 Normlitern/h.

### *3.2.3 Pulvercharakterisierung*

#### *3.2.3.1 Untersuchung der Partikel- und Pulvermorphologie mittels Mikroskop*

##### *Lichtmikroskopie*

Vor der Sprühtrocknung wurden die Wirkstoffe mikroskopisch auf ihre Teilchengröße untersucht. Die vermessenen Teilchen waren alle kleiner als 0,7 mm. Dies war wichtig zu klären, da die Düse des Sprühtrockners einen Durchmesser von 0,7 mm hat und so eine Verstopfung der Düse mit Ausgangsmaterial, das sich eventuell nicht vollständig gelöst hat oder das als Suspension versprüht wird, ausgeschlossen werden kann.

##### *Rasterelektronenmikroskopie*

Eine Spatelspitze Pulver wird auf einen Probenträger mit Hilfe von Leit-Tabs (Plano, Wetzlar Deutschland) aufgeklebt. Die nicht anhaftenden Partikel werden durch Abklopfen von der Oberfläche entfernt. Mit dem Rasterelektronenmikroskop werden die Proben bei folgender Geräteeinstellung untersucht:

### *Rasterelektronenmikroskopie bei Budesonid, Salbutamol und Salbutamolsulfat*

Detektor:	SE2-Detektor
Kathodenspannung (Primärelektronenenergie) $E_0$ :	1 kV
Kammerdruck:	Hochvakuum
Arbeitsabstand:	7 mm

Alle Aufnahmen sind mit Sekundärelektronen erzeugt worden.

Von charakteristischen Probenlokalisationen werden Aufnahmen angefertigt.

### *3.2.3.2 Bestimmung der Partikelgrößenverteilung mittels Laserdiffraktometrie*

#### *Budesonid, Salbutamol und Salbutamolsulfat*

Laserbeugungsmessungen erfolgten mit dem Laserdiffraktometer. Es wurde eine R2 Linse ausgewählt, da die angenommene Partikelgröße im Bereich zwischen 0,45  $\mu\text{m}$  bis 7,5  $\mu\text{m}$  lag. Die Produktzufuhr war gleichmäßig. Aufgrund der starken statischen Aufladbarkeit der Mikropartikel kam nur die Probenzufuhr mittels Schwingrinne mit Falltrichter in Frage. Vorteil des Falltrichters ist die vollständige Vermessung und Absaugung der Prüfsubstanz. Die Mikropartikel wurden auf der vorderen Hälfte der Schwingrinne fein verteilt aufgestreut. Nach dem Start der Messung wurde die Frequenz der Schwingrinne von 40 % auf 100 % erhöht. Die Zeit der Probenzufuhr betrug 10 s. Um repräsentative Ergebnisse zu erhalten, wurden Probenmengen von 1,0 bis 2,0 g vermessen. Die Teilchengrößenverteilung ist prinzipiell unabhängig von der genauen Einwaage der zu untersuchenden Substanz. Entscheidend ist die kontinuierliche Probenzufuhr, die durch die Schwingrinne gegeben ist. Die optische Konzentration gibt die Konzentration der Wirkstoffpartikel im Messraum an und ist durch die Zuführgeschwindigkeit steuerbar. Bei zu hoher optischer Konzentration kommt es zur Mehrfachmessung von Partikeln.

Messparameter:

Linse:	R2 (0,45 bis 87,5 $\mu\text{m}$ )
Brennweite	50 mm
Messdauer:	ca. 2 Sek.
Zykluszeit:	100 ms
Start/ Stop bei:	1 % bei Kanal 25 und 29
Druck:	3 bar
Unterdruck:	maximal
Auswertemodus:	HRLD High Resolution Laser Diffraction (Fraunhofer)

### *3.2.3.3 Beurteilung des thermischen Verhaltens von sprühgetrockneten Mikropartikeln mittels Thermoanalyse und Untersuchung der Kristallstruktur*

#### *Dynamische Wärmestrom-Differenz-Kalorimetrie (DSC)*

Die Messungen der DSC-Kurven wurden mit folgenden Parametern durchgeführt:

#### *Budesonid*

- Temperaturbereich: 10 °C bis 300 °C
- Heizrate: 10 °C/min
- Einwaage der einzelnen Proben: ca. 2-7 mg

Als Spülgas wird Stickstoff verwendet (Atmosphärendruck, 80 ml/min). Die Proben werden in einem Aluminiumtiegel (150  $\mu\text{l}$ ) mit gelochtem Deckel vermessen („open pan“ Modus, d.h der Tiegeldeckel ist mit einem Loch versehen, um den Gasaustausch zu ermöglichen). Die Einstellung erfolgt so, dass exotherme Veränderungen nach oben in Bezug auf die Basislinie angezeigt werden. Das Gerät wurde mit Indium kalibriert. Als Referenz diente ein leerer Aluminiumtiegel.

**Salbutamol und Salbutamolsulfat**

Die Analyse erfolgt in der gleichen Weise mit folgenden Abweichungen: der Temperaturbereich beträgt 10 °C bis 280 °C und es werden 40 µl Aluminiumtiegel verwendet.

**Röntgenpulverdiffraktometrie****Budesonid, Salbutamol und Salbutamolsulfat**

Das Pulvermaterial wird zwischen zwei Acetatfolien mittels des Probenträgers fixiert.

Gerät: STOE STADI mit ortsempfindlichem Detektor (OED)  
 Strahlung: monochromatische CuK $\alpha$ - Strahlung:  $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$ , 40 kV, 40 mA  
 Parameter: Messbereich: 3°- 40° 2 $\theta$   
 Messgeometrie: Transmission  
 Messbedingungen: Auflösung = 0,02° 2 $\theta$   
 OED- Schrittwelle: 0,5 (20 s pro Schritt)

**3.2.3.4 Beurteilung der Oberfläche von sprühgetrockneten Mikropartikeln mit Hilfe der BET-Methode****Budesonid, Salbutamol und Salbutamolsulfat**

Die Bestimmung der spezifischen Oberfläche erfolgt, indem das genau abgewogene Pulver in spezielle Röhrchen gefüllt und anschließend ein Vakuum an der sogenannten Ausheizstation (Vac Prep 061) für ca. 24 h bei 25 °C gezogen wird. Die Messung erfolgt an einem Tri Star Multi Point BET der Firma Micromeritics (Mönchengladbach, Deutschland).

Folgende Analysenparameter wurden eingestellt:

Probengefäß: ½ inch Probengefäße mit filler rod zur Reduzierung des Totvolumens  
 Analysenbedingung: 8 point BET surface 0,1 to 0,20 p/p<sub>0</sub>  
 Absolute Druck Toleranz: 0,0067 bar  
 Relative Druck Toleranz: 5,0 %  
 Evakuierungsrate: 0,0665 bar/sec  
 Evakuierungszeit: 0,1 Stunde  
 Equilibrierungsintervall: 15 - 20 min  
 Adsorptionsgas: Stickstoff  
 Einwaage der Proben: 0,4- 0,9 g

**3.2.3.5 Bestimmung des Gehalts an Budesonid, Salbutamol und Salbutamolsulfat in den Mikropartikeln**

Die HPLC-Analytik wird mit einem Gerät der Firma Hewlett Packard (Böblingen, Deutschland), Typ 1050 durchgeführt. Die Auswertung der Kalibrationskurven erfolgt mit Excel.

**Chromatographische Bedingungen für Budesonid:**

Säule: LiChrospher® 60, RP-select (5 µm) der Firma Merck KG (Darmstadt, Deutschland)  
 Mobile Phase: 275 ml Acetonitril mit 225 ml Pufferlösung pH 2,8, 25 mM (Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat, pH Einstellung mit 85 % Phosphorsäure)  
 Detektion: UV Absorption bei 254 nm  
 Flussrate: 1,0 ml/min  
 Injektionsvolumen: 20 µl

**Chromatographische Bedingungen für Salbutamol und Salbutamolsulfat:**

Säule:	LiChrospher® 60, RP-select (5 µm) der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland)
Mobile Phase:	270 ml Acetonitril mit 290 ml Methanol und 1440 ml Pufferlösung pH 2,6, (1,62 g Na-Heptansulfonsäure und 13,62 g Kaliumdihydrogenphosphat in 1440 ml Aq. bidest gelöst, pH Einstellung mit 85 % Phosphorsäure)
Detektion:	UV Absorption bei 276 nm
Flussrate:	1,0 ml/min
Injektionsvolumen:	20 µl

Beide Verfahren sind validiert, indem zunächst der jeweilige Wirkstoff an drei aufeinanderfolgenden Tagen in die HPLC Anlage in aufsteigender, absteigender und wieder aufsteigender Konzentration eingespritzt wird, um eventuell auftretende Verschleppungen zu erfassen. Anschließend werden PLA, PLGA und PLGA II (nicht sprühgetrocknet) in der Konzentration von 1µg/ml in AcN gelöst und mittels HPLC analysiert. Der Peak des jeweiligen Polymers stört die Analytik der Wirkstoffe hinsichtlich der Retentionszeit nicht. Dann erfolgt obiges Vorgehen mit Budesonid und den drei Polymeren, sowie mit Salbutamol als Base und als Salz mit den drei Polymeren. Die Auswertung erfolgt über die Bestimmung der Richtigkeit und der Präzision.

In der entnommenen Menge der sprühgetrockneten Mischung sind immer 0,3 mg Budesonid, Salbutamol bzw. Salbutamolsulfat enthalten. Bei der Gehaltsbestimmung von Budesonid wird diese Menge in einen 100 ml Messkolben aus Braunglas eingewogen und mit Acetonitril auf 100,0 ml aufgefüllt. Anschließend wird die Probe mittels HPLC vermessen. Die Polymer-Mikropartikel, die Salbutamol enthalten werden zunächst mit 1 ml Dichlormethan versetzt, um das Polymer aufzulösen. Anschließend werden 8 ml Ethanol dazugegeben, um das Salbutamol aufzulösen. Die Messung der Probe erfolgt mittels HPLC. Bei der Gehaltsbestimmung von Salbutamolsulfat wird zunächst ebenfalls das Polymer mittels Zugabe von 1 ml Dichlormethan aufgelöst. Die Auflösung des Salbutamolsulfats erfolgt mit 8 ml einer Wasser:Ethanol (90:10) Mischung. Die Probe wird mittels HPLC vermessen.

**3.2.3.6 In-vitro Untersuchung der Freisetzung aus Mikropartikeln****Budesonid**

Die entnommene Menge der sprühgetrockneten Mischung enthält immer 0,3 mg Budesonid und wird in ein braunes Schnappdeckelglas (Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland, 30 ml) abgewogen. 8 ml des Mediums werden zu der Pulvermischung gegeben. Zunächst wird die Löslichkeit von Budesonid im Freisetzungsmedium bestimmt, um bei den Freisetzungsversuchen Sink-Bedingungen gewährleisten zu können. 2 mg sprühgetrocknetes Budesonid werden in 8 ml Medium für den Zeitraum von 48 Std. bei 37 °C und 178 U/min in einem Schüttler GFL 3032 (Labotec, Wiesbaden, Deutschland) mit zweidimensionaler orbitaler Bewegung inkubiert, danach für 10 min bei 8000 U/min zentrifugiert (= 42931 g). Die Analyse des Überstandes erfolgt mittels HPLC und die Ermittlung der Löslichkeit anhand der Kalibriergeraden von Budesonid. Es ergibt sich eine Löslichkeit von Budesonid im Medium von 0,1305 mg/ml. Die Einhaltung von Sink-Bedingungen ist somit während der Freigabe sichergestellt.

Das Medium 1 setzt sich wie folgt zusammen:

0,1 g	SDS
0,11915 g	HEPES (2-[4- (2- Hydroxyethyl) -1-piperaziny] - ethansulfonsäure) Puffer 5 mM
0,9 g	Natriumchlorid
1,0 g	Rinderlungensurfactant (Alveofact™ Trockenampulle, Boehringer- Ingelheim, Ingelheim, Deutschland)

Die Einstellung auf pH 7,4 erfolgt mit 0,1M NaOH.

Eine Durchmischung findet für 5 Sek. auf dem Vortex-Mischer statt, anschließend werden die Schnappdeckelgläser samt Inhalt für 30 Sek. in das Ultraschallbad gestellt, um die Probe zu entgasen. Es wird eine 300 µl Probe gezogen, die für 10 min bei 8000 U/min zentrifugiert wird (= 42931 g). Die Formulierung im Schnappdeckelglas wird mit 300 µl reinem Medium auf ihr ursprüngliches Volumen ergänzt.

Die Schnappdeckelgläser werden in einem Schüttler mit zweidimensionaler orbitaler Bewegung inkubiert, der auf 37 °C temperiert ist und 178 U/min durchführt. In bestimmten Zeitabständen (0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 30, 48 h) werden Proben (0,3 ml) gezogen. Es wird pro Mischung ein dreifacher Ansatz untersucht. Die freigesetzte Menge an Arzneistoff [%], das ist die gelöste Menge an Arzneistoff im Freisetzungsgefäß zuzüglich der bei der Probennahme entnommenen Arzneistoffmenge, wird bestimmt (4). Die prozentuale Freisetzung bezieht sich bei den Freisetzungsversuchen auf die nominale Beladung. Die gezogenen Proben werden mittels HPLC analysiert. Die Methode erfolgt in Anlehnung an die Literatur (120, 126, 175, 183). Die Anwesenheit von SDS oder Surfactant interferierte nicht mit der Analytik für Budesonid. Das Surfactant verbleibt nach dem Zentrifugieren wahrscheinlich im Sediment. Die Zugabe von dem physiologisch vorkommenden Surfactant bewirkt eine erhöhte Löslichkeit von Budesonid im Freisetzungsmedium, wie Pham et al. (126) zeigte. Er vernebelte Budesonidpartikel mittels Ultraschall und untersuchte deren Freigabe in dem Rinderlungensurfactant Survanta™, um zu testen, ob Lungensurfactant die Freigabe von schlecht wasserlöslichen Arzneistoffen erhöht. Hierzu verwendete er auch zusätzlich SDS in einer Konzentration von 0,1 %. Survanta™ erhöhte die Löslichkeit von Budesonid signifikant.

#### *Salbutamol und Salbutamolsulfat*

Das Medium 2 besteht aus folgenden Komponenten:

0,11915 g	HEPES Puffer
0,9 g	Natriumchlorid
1,0 g	Rinderlungensurfactant (Alveofact™ Trockenampulle, Boehringer-Ingelheim, Ingelheim, Deutschland)

Die weitere Vorgehensweise ist analog dem von Budesonid. Vor der Durchführung der Freisetzungsversuche wird die Löslichkeit von Salbutamol im Medium bestimmt. Hierfür werden 4,1 mg Salbutamol in 8 ml Medium gegeben, für 24 Stunden bei 37 °C und 178 U/min geschüttelt und anschließend für 10 min bei 8 000 U/min (= 42931 g) zentrifugiert. Die Analyse (des Überstandes) erfolgt mittels HPLC und die Ermittlung der Löslichkeit erfolgt anhand der Kalibriergeraden von Salbutamol. Die Löslichkeit von Salbutamol im Medium beträgt  $\geq 0,513$  mg/ml. Während der Freisetzung ist die Einhaltung von Sink-Bedingungen somit sichergestellt. Die Bestimmung der Löslichkeit für Salbutamolsulfat erfolgt mit 1 mg Salbutamolsulfat, welches in 8 ml Medium gegeben wird und für 48 Stunden bei 37 °C und 178 U/min geschüttelt und anschließend für 10 min bei 8 000 U/min (= 42931 g) zentrifugiert wird. Die Analyse des Überstandes erfolgt mittels HPLC und die Ermittlung der Löslichkeit wird anhand der Kalibriergeraden von Salbutamolsulfat bestimmt. Salbutamolsulfat besitzt eine Löslichkeit von 0,832 mg/ml im Medium. Auch bei Salbutamolsulfat ist die Einhaltung von Sink-Bedingungen während der Freisetzung somit sichergestellt.

Die Stabilität von Salbutamol im Medium wird bei einer Konzentration von 2 µg/ml Salbutamol gemessen und erstreckt sich über einen Untersuchungszeitraum von 72 Stunden. Salbutamol wird zunächst über 12 Std. bei 37 °C im Medium inkubiert. Die Analyse der Proben erfolgt mittels HPLC. Nach drei Tagen erfolgt eine erneute Analyse. Die Salbutamolkonzentrationen waren gleich, d.h. die Lösung ist über mindestens drei Tage stabil. Die Oberflächenspannung des Mediums wird am Ringtensiometer bestimmt und beträgt 29,4 mN/m und nach 48 Stunden 31,2 mN/m. Der pH Wert des Mediums mit und ohne Arzneistoff beträgt vor und nach 48 Stunden pH 7,4.

Die Stabilität von Salbutamolsulfat im Medium wird bei einer Konzentration von 2 µg/ml Salbutamolsulfat geprüft und erfolgt während eines Zeitraumes von 48 Stunden. Salbutamolsulfat wird zunächst für 12 Std. im Medium inkubiert. Die Analyse erfolgt mittels HPLC. 48 Stunden nach Versuchsbeginn erfolgt eine erneute Analyse. Die

Salbutamolsulfatkonzentrationen waren gleich, d.h. die Lösung ist während des Freisetzungszeitraumes von 48 Stunden stabil.

### 3.3 Zellversuch mit der murinen Zelllinie RAW 264.7

Für den Zellversuch werden Zellen einer murinen Zelllinie RAW 264.7 verwendet. Ziel dieser Versuche ist der Nachweis, dass verkapseltes Budesonid in PLGA die Entzündung effektiver und über einen längeren Zeitraum unterdrücken kann, als unverkapseltes Budesonid. Als Referenz dient das unverkapselte Budesonid. Zur Stimulation der Zellen wird Lipopolysaccharid (LPS) eingesetzt, die Zellen bilden dadurch pro inflammatorische Zytokine wie Interleukin-6 (IL-6). Die Überprüfung der Unterdrückung der Entzündung findet durch Messung der IL-6 [pg/ml] Konzentrationen mittels ELISA statt.

Versuchsdurchführung:

Die RAW 264.7 Zelllinie wird in D-MEM (Dulbeccos modified Eagles Medium mit L- Glutamin und Glukose 4500 mg/l) mit 1 % Penicillin/ Streptomycin (in Kochsalzlösung) und 10 % FCS (Fetal Calf Serum) aus Kryokonservierung hochgezogen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Nachdem konfluentes Wachstum erreicht ist, werden die Zellen trypsinisiert. 2 ml Trypsin/ EDTA (Trypsin 0,05 %/ EDTA 0,02 %) je 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche werden zugegeben und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Zum Neutralisieren des Trypsins werden 20 ml D-MEM mit 10 % FCS zugegeben. Die Zellen werden bei 1500 Umdrehungen pro min (= 3647 g) bei 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellett in 10 ml D-MEM aufgenommen. Die Zellzahl wird mit Trypanblau (Trypan Blue Stain 0,4 %) in einer Neubauerkammer bestimmt.

Es wird eine 10<sup>6</sup> Zellen/ml Kultur hergestellt. Um eine eventuelle Schädigung der Zellen durch Trypsin auszugleichen, wird ein Ansatz in D-MEM mit 10 % FCS ausplattiert. Verwendet werden 24 well-plates mit 1 ml Zellkultursuspension je well.

Es erfolgt eine Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> über Nacht. Danach wird der Überstand abgesaugt, verworfen und die Zellen mit PBS gespült, um überschüssiges FCS zu entfernen. Folgende Ansätze werden jeweils in Duplikaten auf die Zellen gegeben:

1. Medium + 0,4 % FCS
2. + LPS (Lipopolysaccharid)
3. + LPS + Budesonid
4. + LPS + PLGA
5. + LPS + sprühgetrocknete Mikropartikel (9,1 % Budesonid in PLGA)
6. + LPS + physikalische Mischung (9,1 % Budesonid + PLGA)

Die Endkonzentration des LPS (E. coli Serotyp 055:B5) beträgt 100 ng/ml. Das Steroid wird jeweils in einer Molarität von 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-8</sup> und 10<sup>-9</sup> M eingesetzt. Es wird eine 10<sup>-3</sup> M Steroid-Suspension in D-MEM in den jeweiligen Endmolaritäten eingestellt. Die Kultur erfolgt über 24 h.

### 3.4 Tierversuche

In-vivo Versuche mit Mäusen zur Induktion von allergischem Asthma

Ziel dieser Versuche ist die Überprüfung der Verlängerung der expiratorischen Phase (penh) und des Atemwegwiderstandes (AHR, RI) bei steigenden Metacholindosen, sowie die Zytokinabgabe (IL-6) in der Lungenlavage, die mittels ELISA bestimmt wurde.

a) Sensibilisierung und Provokation mit Antigen

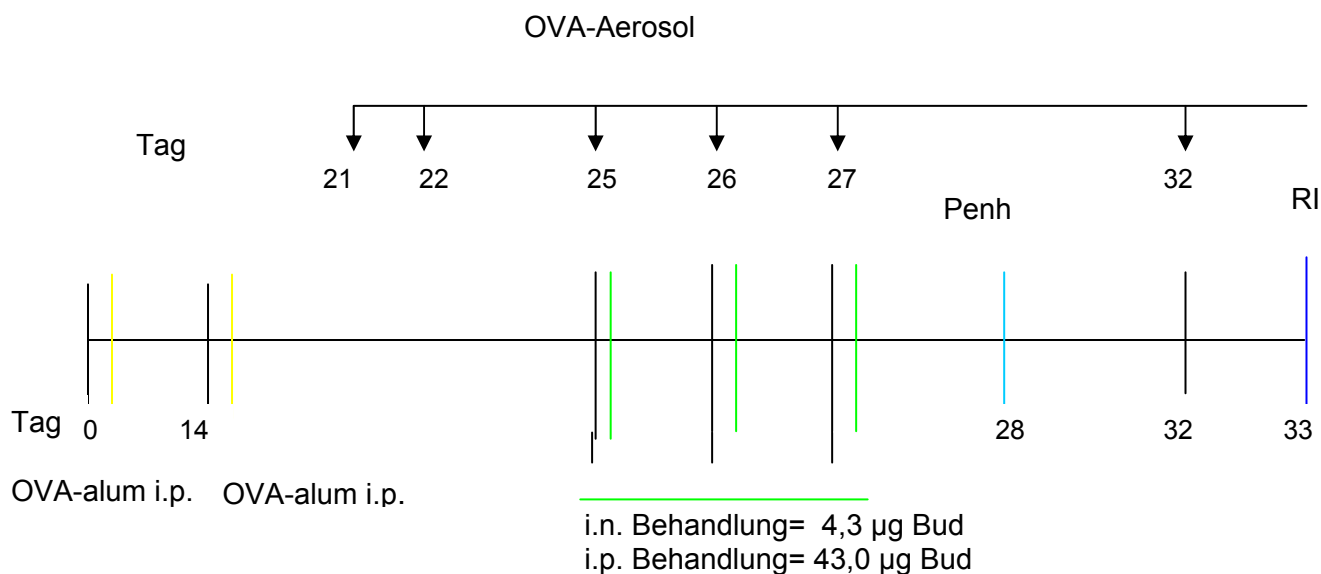
Weibliche Balb/c-Mäuse, gehalten in pathogen freier Umgebung, werden intraperitoneal mit einem Komplex aus 100 µg OVA (Calbiochem) als Antigen und alum (Sigma-Aldrich) als Adjuvanz an Tag 0 und 14 sensibilisiert, um Asthma auszulösen. Dabei wird das Aerosol durch ein Ultraschallbad erzeugt. Dieses wird mit einem kontinuierlichen, durch eine Pumpe betriebenen Luftstrom gleichmäßig in einer Aerosolexpositionskammer (Aerosol Expositionskammer, FMI; Deutschland) verteilt. An den Tagen 25, 26 und 27 erfolgt



ebenfalls eine Provokation der Tiere mit einem einprozentigen OVA-Aerosol. Zuerst werden die Tiere mit dem Steroid Budesonid oder dem Trägermaterial, dem Polymer PLGA, intraperitoneal (n=7, n=8) bzw. intranasal (n=3) behandelt, nach 2 Stunden werden sie mit einem einprozentigen OVA-Lösung aerosolisiert (vgl. Impfung). Die Teilchengröße des Aerosols ist für die Atemwege der Mäuse geeignet (s. Kapitel 1.12 und Tab. 1.5), wie von Finotto et al. (57) bereits untersucht wurde. Zur intranasalen Verabreichung werden die Mäuse zunächst mit Avertin (1 mg Tribromethanol/ml t-Amylalkohol in 2,5 % PBS) betäubt. Die Behandlung wird in Gruppen zu jeweils 4 Mäusen, wie nachfolgend dargestellt, durchgeführt:

Tabelle 3.2 Behandlungsprotokoll des in-vivo Versuchs mit Balb/c Mäusen zur Überprüfung der Lungenfunktion

Tag	Tiere	Behandlung	Aerosol
Tag 0 06.07.05	16 BALB/c	1. i.p. OVA	
Tag 14 22.07.05	16 BALB/c	2. i.p. OVA	
Tag 21 28.07.05	16 BALB/c		1% OVA-Aerosol
Tag 22 29.07.05	16 BALB/c		1% OVA-Aerosol
Tag 25 01.08.05	2 BALB/c 2 BALB/c 2 BALB/c 2 BALB/c 2 BALB/c 2 BALB/c 2 BALB/c 2 BALB/c	50 µl RPMI i.n. 100 µl RPMI i.p. 10 µl RPMI mit 4,3 µg/50 ml Budesonid i.n. 100µl RPMI mit 43 µg/200 µl Budesonid i.p. 10 µl Ansatz mit 43 µg/50 µl Polymer i.n. 100µl RPMI mit 430 µg/200 µl Polymer i.p. 10 µl Ansatz mit 47,3 µg/50 µl Komplex i.n. 100µl RPMI mit 473 µg/200 µl Komplex i.p. (Komplex= Sprüheinbettung mit Budesonid)	1% OVA Aerosol 1% OVA Aerosol 1% OVA Aerosol 1% OVA Aerosol 1% OVA Aerosol 1% OVA Aerosol 1% OVA Aerosol 1% OVA Aerosol
Tag 26 02.08.05	wie Tag 25	wie Tag 25 nur 30 µl Volumen bei gleicher Konzentration bei i.n.	Wie Tag 25
Tag 27 03.08.05	Wie Tag 25	wie Tag 25 nur 30 µl Volumen bei gleicher Konzentration bei i.n.	Wie Tag 25
Tag 28 04.08.05		Buxco nicht invasiv	
Tag 32 08.08.05	16 BALB/c		1% OVA-Aerosol
Tag 33 09.08.05	16 BALB/c	invasiv	



OVA-alum: Aluminium-Kaliumsulfat

Penh: Verlängerung der expiratorischen Phase, nicht invasiv

RI: Atemwegswiderstand, invasiv

Abbildung 3.7 Schematische Übersicht der Verabreichung von OVA-Aerosol

An Tag 28 wird die Lungenfunktion mit einem nicht-invasiven „whole body plethysmograph“ (Modell PLY 3211; Buxco Electronics, Sharon, CT, USA) bestimmt. Um den Retard-Effekt der Partikel zu überprüfen, werden die Tiere an Tag 32 nochmals einem einprozentigen OVA-Aerosol ausgesetzt. Nach 24 Stunden erfolgt die Messung des Atemwegswiderstandes anhand einer invasiven Methode. Anschließend wird eine bronchoalveoläre Lavage zur Bestimmung der Zytokinproduktion mittels ELISA vorgenommen. Die Tiere waren 5 Tage unbehandelt, dadurch wird ein verlängerter Effekt der Entzündung simuliert.

b) Lungenfunktionstest mit „whole body Plethysmographie“

Zur Auslösung der Bronchokonstriktion werden die Tiere über einen Zeitraum von drei Minuten einem Methacholinaerosol in den Konzentrationen 0, 12,5, 25 und 50 mg/ml ausgesetzt. Das Aerosol wird von einem Ultraschallbad erzeugt, das mit den Tierkammern durch Schläuche verbunden ist. Die „enhanced pause“, angegeben als Penh, wird über 5 min alle 10 sec erhoben, so dass insgesamt 30 Einzelwerte zur Bestimmung der mittleren Penh-Werte als  $MW \pm SEM$  zur Verfügung stehen.

c) Bestimmung der Airwayhyperresponsiveness (Atemwegswiderstand, AHR) anhand der transpulmonalen Resistenz

Zur Ermittlung der transpulmonalen Resistenz wird an Tag 33 ein invasives Messsystem verwendet. Dabei werden mit Pentobarbital betäubte Mäuse mit einem Oesophagusschlauch versehen, der mit einer Ventilationseinheit (Mouse Ventilator, Ugo Basile) zur mechanischen Beatmung gekoppelt ist. Die Druckdifferenz zwischen Oesophagus und Trachea wird mit Hilfe von „pressure transducers“ im Vergleich zu einer Wassersäule bestimmt. Dafür ist der Oesophagusschlauch mit einer Wassersäule und dem Transducer verbunden. Als mechanische Parameter wird die Resistance (RI) gemessen.

Das vorliegende System misst die Parameter mit einem isovolumetrischen Analysator (Buxco Electronics, Inc) unter Verwendung der entsprechenden Software (BioSystem XA). Dieser Analysator zeichnet Druck- und Flow-Input, Beatmungsparameter und mechanische Parameter jedes Atemzuges auf. Die isovolumetrische Methode zur Bestimmung der Atemwegsresistenz berechnet die Veränderung des Ein- und Ausatemdrucks bezogen auf ein Volumen. Der „Flow“ wird analog bestimmt. Der Airflow wird mit der Int-Zero-Methode kalibriert durch Injektion von 1 ml Luft in die Messkammer. Der Druck wird anhand einer „two point reading“ Methode mittels eines Wassermanometers bestimmt. Beide Kalibrierungsmethoden werden gemäß den Herstellerangaben vorgenommen. Unterschiedliche Methacholindosen werden mit Hilfe eines Verneblers, der mit der Tracheakanüle verbunden ist, verabreicht. Jeweils 10 µl einer Dosis (0,3, 1, 3, 10, 30 mg/ml) werden pro Tier appliziert. Die über ein T-Stück mit der Tracheakanüle verbundene Ventilationseinheit sorgt für den gleichmäßigen Luftstrom, der das vernebelte Methacholin in die Lunge befördert. Der Atemwegswiderstand, angegeben als Resistance (RI), wird innerhalb einer 5-minütigen Messung bestimmt. Die Daten werden angegeben als MW ± SEM.

d) Bronchoalveoläre Lavage (BAL) zur Bestimmung der Zytokinabgabe

Die Lavage wird 24 h nach der letzten Antigenexposition vorgenommen. Für die Lungenspülung werden fünf mal 600 µl einer isotonischen Salzlösung in die Lunge gegeben. Die aus der Lungenspülung erhaltene Menge an Flüssigkeit wird gesammelt und der Anteil an lebenden Zellen nach Färbung mit Trypanblau ermittelt. Die Proben werden bei 22,86 g für 5 Minuten zentrifugiert. Die Eosinophilen werden bestimmt durch eine Haematoxylin/Eosinfärbung der Cytospins unter Benutzung eines Olympus Mikroskops mit 40-fachem Objektiv. Die Überstände werden zur Analyse der Zytokinproduktion bei -20 °C eingefroren.

#### *Bestimmung der Zytokinproduktion (IL-6) mittels ELISA*

Für IL-6 wird folgendes Set benutzt: OptEIA-Kit (Pharmingen: Cat. No. 555 236). Die Reagenzien, die verwendet werden sind:

Coating buffer: 0,1 M Carbonatpuffer pH 9,5 bestehend aus 8,4 g NaHCO<sub>3</sub> und 3,56 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ad 1 Liter H<sub>2</sub>O, Assay Diluent (Pharmingen: Cat. No. 264 11E); bei 4 °C lagern, sowie einem Wasch-Puffer (Topf C des ELISA-Washers), der aus PBS + 0,05 % Tween, d.h. 1000 ml PBS + 500 µl Tween zusammengesetzt ist und einer Substratlösung, die aus 19 ml Substratpuffer pH 4,11 und 1 ml TMB-Lösung (reicht für 2 Platten) besteht. Der Substratpuffer besteht aus 6,3 g Citronensäure-Monohydrat, das in 800 ml Aq. demin. gelöst und mit KOH-Plätzchen auf pH 4,1 eingestellt wird (ca. 11– 12 Stück), mit Aq. demin. ad 1000 ml, die Lagerung erfolgt bei 4 °C. Die TMB-Lösung wird frisch in einer 50 ml Glasflasche angesetzt und vor Licht geschützt aufbewahrt. Sie besteht aus 120 mg Tetramethylbenzidin (bei 4 °C gelagert), das in 2,5 ml Aceton gelöst wird, 22,5 ml Ethanol und 150 µl 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (bei 4 °C gelagert) werden kurz vor dem Gebrauch dazugeben. Alle Reagenzien auf Zimmertemperatur erwärmen.

#### Versuchsdurchführung

Das Coating erfolgt, indem eine Nunc-Immuno-Platte (Flat bottom) mit 100 µl/well verdünntem Capture-Antikörper (AK) bestückt wird. Die 1. AK-Verdünnung ist 1 : 250, d.h. 40 µl 1. AK (bei 4 °C) + 10 ml Coating Puffer. Dies reicht für eine Platte. Diese Platte wird mit Parafilm verschlossen und über Nacht bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend erfolgt das Waschen. Dabei wird 3 mal mit PBS + 0,05 % Tween (Topf C) im Wascher Programm gewaschen, die Platte ausgeklopft und dann erfolgt das Blocken mit Assay Diluent (bei 4 °C) wobei 200 µl/well für 1 Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert werden. Es wird wieder 3 mal mit PBS + 0,05 % Tween (Topf C) im Wascher Programm gewaschen und die Platte ausgeklopft. Die Plattenbelegung erfolgt nach dem Pipettierschema 100 µl Standard bzw. Probe/well für 2 Stunden bei Zimmertemperatur inkubieren. Die Standardverdünnung (Std. x ng/vial, bei -80 °C 6 Monate haltbar) erfolgt in Assay Diluent, wobei y µl Assay Diluent + x µl Standard (entspricht einer Endkonzentration von 1000 pg/ml) in einem Röhrchen mit einem Volumen von 1000 µl angesetzt (je nach Kit unterschiedlich) und gevortext werden.

Die Verdünnungsreihe erfolgt in den folgenden 6 Röhrchen:

je Röhrchen 300 µl Assay Diluent vorlegen und 300 µl aus den Verdünnungen überpipettieren, die Verdünnungsansätze jeweils vor nächstem Verdünnungsschritt vortexen.

Standardreihe

Blank:	Assay Diluent
I	15,6 pg/ml
II	31,3 pg/ml
III	62,5 pg/ml
IV	125,0 pg/ml
V	250,0 pg/ml
VI	500,0 pg/ml
VII	1000,0 pg/ml

Das Waschen erfolgt 5 mal mit PBS + 0,05 % Tween (Topf C) im Wascher Programm, anschließend wird die Platte ausgeklopft.

Detektion:

Hierfür werden 100 µl/well Detektionlösung (bei 4 °C Einzelbestandteile der Lösung) mit einer Verdünnung von 1 : 250, d.h. 48 µl Detection-2.Ak + 48 µl Avidin HRP + 11,9 ml Assay Diluent auf eine Platte gegeben. Es wird eine Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert. Das Waschen erfolgt 7 mal mit PBS + 0,05 % Tween (Topf C) im Wascher Programm, anschließend wird die Platte ausgeklopft. Das Substrat besteht aus 100 µl Substrat Lösung/well. Die Substratlösung ist aus 19 ml Substrat Stammlösung + 1 ml TMB-Lösung (frisch ansetzen) zusammengesetzt. Dies reicht für 2 Platten. Für 30 min im Dunkeln bei Zimmertemperatur inkubieren. Der Reaktionsstopp erfolgt durch Zugabe von 50 µl/well Stopp Lösung (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,8 M). Innerhalb von 30 min bei 450 nm im ELISA-Reader lesen.

Proliferationsversuche mit isolierten Milzzellen

Es wurden in-vivo Versuche zur Untersuchung der Proliferation von Zellen durchgeführt, die mit Medium, Budesonid, Dexamethason und der PLGA-Sprüheinbettung mit 9,1 % Budesonid behandelt wurden.

CD4<sup>+</sup> Isolierung von Milzen (16 Balbc Mäuse: OVA/OVA behandelt, d.h. die Mäuse wurden zuerst mit OVA sensibilisiert und dann noch mal mit OVA behandelt, um einen Antigen „boost“ zu bewirken).

Für die Proliferation werden A20 Zellen mit Mytomycin behandelt (6x10<sup>6</sup> Zellen in 500 µl Medium aufgenommen und 30 µl Mytomycin zugegeben) und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird 5 x mit Medium (Medium: RPMI1640 + 5 % FCS + Penicillin/Streptomycin) gewaschen. A 20 Zellen sind Antigen präsentierende Zellen in Kultur, die üblicherweise für Proliferationsversuche verwendet werden. Es ist eine murine B-Zelllinie. Es folgt die Einstellung auf die Konzentration 1x10<sup>4</sup> in 50 µl. Im Medium enthalten sind: OVA in einer Konzentration von 62,5 µg/ml (d.h.: 5 mg OVA in 10 ml PBS lösen und von dieser Lsg. 500 µl in 3,5 ml Medium geben). Die 5-Carboxy-fluorescein-diacetat-succinimylester (CFSE) Markierung der CD4<sup>+</sup> Zellen erfolgt, indem 2x10<sup>7</sup> Zellen in 2 ml Medium aufgenommen werden. Die CFSE Stammlösung wird 1:10 in PBS verdünnt, von dieser Verdünnung wird 1 µl in 2 ml PBS gegeben. Die 2 ml Zellsuspension und die 2 ml CFSE Lösung werden für 4 min bei 37 °C inkubiert. Danach wird mit 4 ml Medium abgestoppt, abzentrifugiert und noch 2x mit Medium gewaschen. Die CFSE markierten Zellen werden in Medium mit anti CD3, einem Stimulans für die T-Zell Proliferation (Konzentration 2,5 µg/ml), aufgenommen (Konzentration der Zellen: 1x10<sup>5</sup> in 200 µl). In eine 96 well Platte werden 200 µl CFSE markierte Zellen und 50 µl mit Mytomycin markierte A20 Zellen ausgesät. Von den unten beschriebenen Wirkstoffen werden die Konzentrationen 10<sup>-4</sup> M 2,5 µl pro well in 250 µl Medium (Endkonzentration dann 10<sup>-6</sup>) und 10<sup>-6</sup> M 2,5 µl pro well (Endkonzentration dann 10<sup>-8</sup>) gegeben. Dexamethason, Budesonid, Polymer und die PLGA Sprüheinbettung mit 9,1 % Budesonid werden jeweils in einer Konzentration von 10<sup>-3</sup> mol/ml angesetzt (Dexamethason: 5,886 mg in 15 ml, Budesonid 4,3 mg/10 ml, Polymer 12,9 mg/3 ml, Sprüheinbettung 14,19 mg/3 ml). Aus diesen Konzentrationen wird eine

$10^{-4}$  und  $10^{-6}$  mol/ml Lösung angesetzt. Es wird die Fluoreszenzabnahme der CFSE markierten Zellen detektiert.

“Fluorescent activated cell sorter” (FACS), (CD25+CD4+)

An Tag 4 werden CD4+ Zellen, die in einer Konzentration von 600.000 Zellen/ml (24 well Platte, zuvor mit anti CD3 beschichtet, 1ml Zellsuspension pro well) ausgesät wurden und ebenfalls mit den entsprechenden Substanzen behandelt wurden, geerntet und genauso behandelt wie die frisch isolierten CD4+ Zellen 4 Tage zuvor. Die Behandlung wird in Gruppen zu jeweils 4 Mäusen (n=3), wie nachfolgend dargestellt, durchgeführt:

Tabelle 3.3 Behandlungsprotokoll des in-vivo Versuchs an Balb/c Mäusen zur Untersuchung der Proliferation

Tag	Tiere	Behandlung	Aerosol
Tag 0 07.03.06	10 BALB/c	1.i.p. OVA (16 Tiere)	
Tag 14 21.03.06	10 BALB/c	2.i.p. OVA (16 Tiere)	
Tag 27 03.04.06	10 BALB/c		1% OVA-Aerosol
Tag 28 04.04.06	10 BALB/c		1% OVA-Aerosol
Tag 29 05.04.06	10 Balb/c	.	1% OVA Aerosol
Tag 30 06.04.06		Milz entnehmen, CD4 Isolierung Ausplattieren in 24well Platten (300.000Zellen/well) Behandlung: -RPMI -Dexamethason: $10^{-6}$ und $10^{-8}$ -Budesonid -Polymer -Komplex	
Tag 34 10.04.06		-Überstände für Cytokine Messung (IL-10 und TGF $\beta$ ) -Proliferation -FACS (CD25+CD4+) -Foxp3+ (RT-PCR) -Apoptose ?	

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Methodenentwicklung für die Sprühtrocknung

#### 4.1.1 Sprüheinbettung von Budesonid

Die Methodenentwicklung für die Sprühtrocknung auf dem Sprühtrockner Büchi B-191 erfolgt mit den Polymeren PLA der Charge 200479 und PLGA der Charge 1001974. Die Festlegung der optimalen Parametereinstellung erfolgt in Anlehnung an ein  $2^3$  faktorielles Versuchsdesign.

##### *Versuche in Anlehnung an ein $2^3$ faktorielles Versuchsdesign (23)*

In einem faktoriellen Versuchsdesign werden Experimente durchgeführt bei denen verschiedene Parameter variiert werden und die Auswirkungen der jeweiligen Parametereinstellungen auf die Zielgrößen untersucht werden. Als Faktoren werden die Pumprate der Schlauchquetschpumpe, die Einlasstemperatur und die Konzentration der zu versprühenden Lösung gewählt. Der Level eines Faktors sind die Werte, die diesem zugeteilt werden. Bei PLGA wurden die Level bei der Pumprate 3 und 11 ml/min festgelegt. Bei der Einlasstemperatur wurden die Level 50 °C und 60 °C und bezüglich der Konzentration an PLGA Polymer 0,5 % und 10 % gewählt. Bei PLA betragen die Level bei der Pumprate wie bei PLGA 3 und 11 ml/min, die Einlasstemperaturen sind mit 60 °C und 65 °C aufgrund der ausreichenden Trocknung der Partikel und der Glasübergangstemperatur des Polymers eng gewählt. Die Konzentrationen an Polymer betragen 1 % und 10 %. Bei einer Konzentration von 0,5 % war die Ausbeute im Auffangbecher zu gering, um weitere Charakterisierungen des Pulvers vorzunehmen. Die einzelnen Durchläufe eines faktoriellen Versuchsdesigns berücksichtigen alle Kombinationen von allen Levels aller Faktoren.

Folgende Experimente werden durchgeführt:

Tabelle 4.1: Faktorial design Versuche

Experiment	Faktor A	Faktor B	Faktor C
	Pumprate	Einlasstemperatur	Konzentration des Polymers in Sprühlösung
1	-	-	-
a	+	-	-
b	-	+	-
ab	+	+	-
c	-	-	+
ac	+	-	+
bc	-	+	+
abc	+	+	+

Faktor A: Pumprate, R 202H und RG 502H: + 11 ml/min, - 3 ml/min

Faktor B: Einlasstemperatur, R 202H: + 65 °C, - 60 °C, für RG 502H + 60 °C, - 50 °C

Faktor C: Konzentration der Sprühlösung R 202H: + 10 %, - 1 %, RG 502H + 10 %, - 0,5 %

Die Veränderungen der Zielgrößen werden in Abhängigkeit von den Faktoren untersucht. Zielgrößen sind die Partikelausbeute in Bezug zur eingesetzten Menge, die Partikelgröße  $x_{50}$  und der Feinpartikelanteil, der als derjenige Partikelanteil am Gesamtvolumen definiert ist, der  $\leq 5,8 \mu\text{m}$  liegt und somit für die inhalative Applikation nutzbar ist. In den folgenden Abbildungen ist auf der y-Achse der jeweils zu untersuchende Effekt (Ausbeute, Feinpartikelanteil, Partikelgröße) aufgetragen, auf der x-Achse befinden sich die Faktoren, die Einfluss auf diesen Effekt ausüben. Sind sie im positiven Bereich, so verhalten sie sich proportional zum Effekt, sind sie im negativen Bereich, sind sie umgekehrt proportional zum untersuchten Effekt. Sind auf der x-Achse zwei Faktoren verbunden, so interagieren sie miteinander.

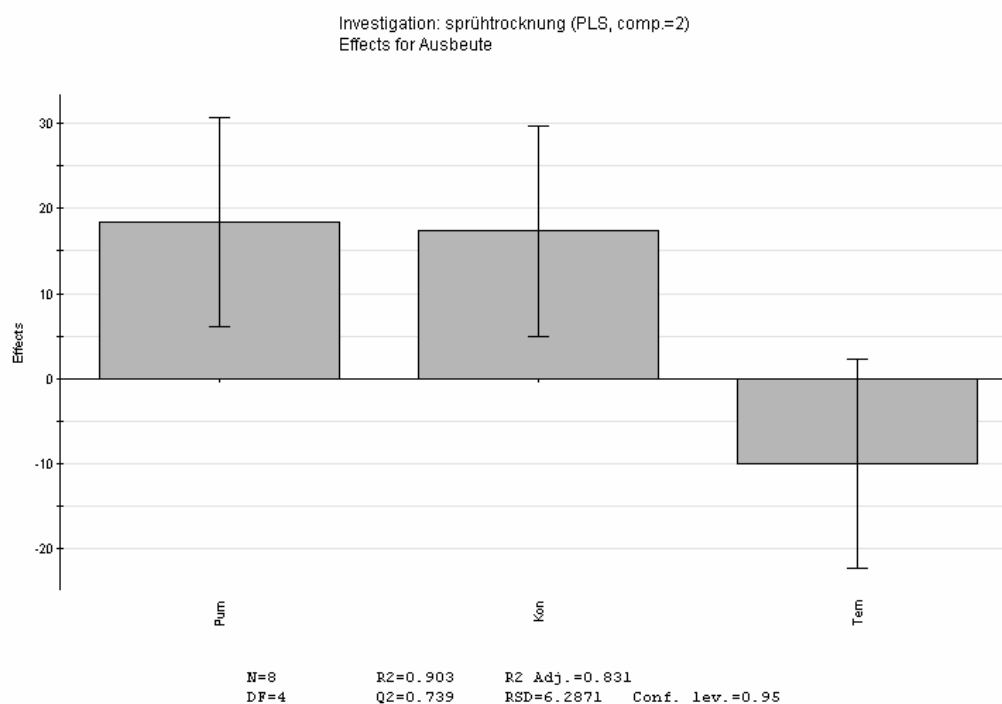


Abbildung 4.1 Parametereinflüsse des Sprühtrockners für maximale Ausbeute (PLGA)

In Abbildung 4.1 ergeben sich für PLGA hinsichtlich der optimalen Parametereinstellung des Sprühtrockners folgende Ansatzpunkte: Die Ausbeute ist proportional der Pumprate und der Konzentration des Polymers in der Sprühlösung und umgekehrt proportional der Temperatur. Das heißt, je konzentrierter die Ausgangslösung ist und je höher die Pumprate, umso höhere Ausbeuten werden erzielt, da mehr Teilchen pro Zeiteinheit durchgepumpt werden.

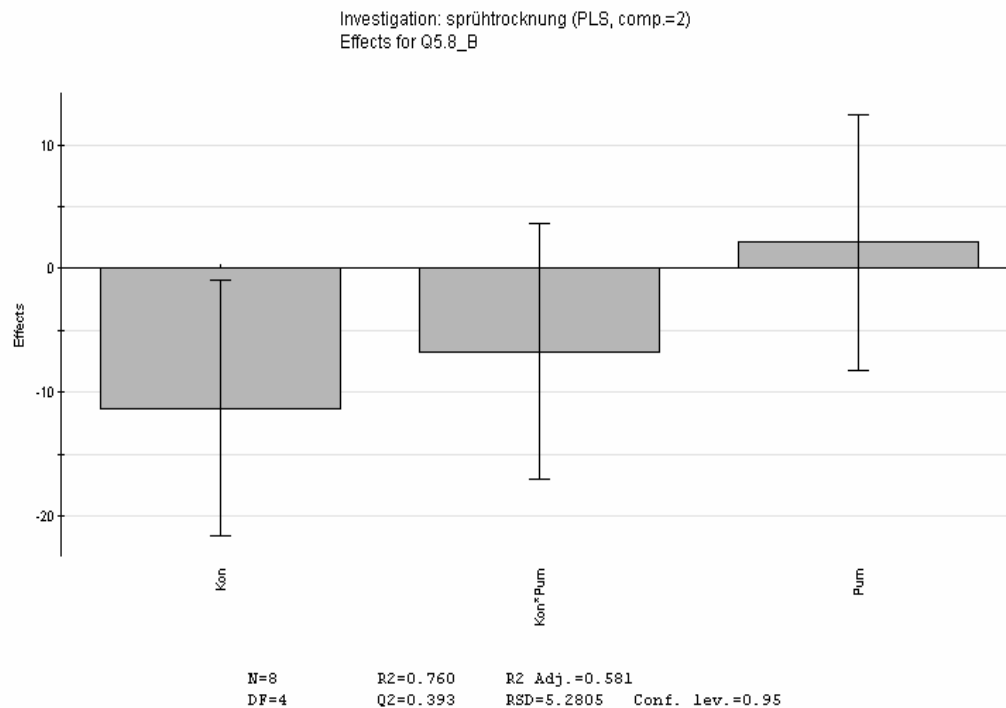


Abbildung 4.2 Parametereinflüsse des Sprühtrockners für maximalen Feinpartikelanteil (PLGA)

Die Experimente zeigen, dass der Feinpartikelanteil nur wenig abhängig von der Pumprate ist. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da der Feinpartikelanteil vom Sprühdruk abhängig ist. Eventuell wird der Einfluss der Pumprate erst bei höheren Differenzen der untersuchten Pumpraten ersichtlich. Bei Erhöhung der Polymerkonzentration in der Ausgangslösung nimmt dagegen der Feinpartikelanteil ab, da die Lösung viskoser ist und sich größere Teilchen bilden. Q 5,8 wurde mittels Laserbeugung ermittelt und gibt an, wie viel Prozent des Volumens der Teilchen  $\leq 5,8 \mu\text{m}$  sind. Die Größe ergibt sich aus dem Andersen Kaskadenimpaktor als Grenzgröße der Prallplatten (Prallplatte 2 bis  $5,8 \mu\text{m}$ ), wenn ein Luftdurchsatz, der den Atemzug des Patienten simulieren soll, von  $28,3 \pm 1,5 \text{ l/min}$  angelegt wird.



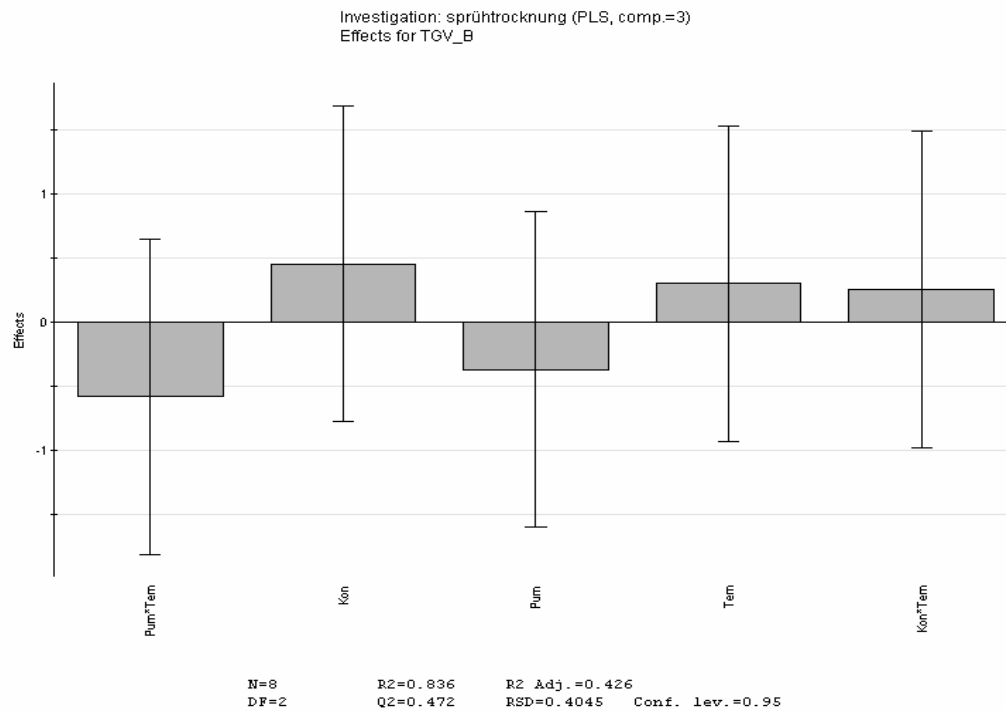


Abbildung 4.3 Parametereinflüsse des Sprühtrockners für die Teilchengrößenverteilung (PLGA)

Die Konzentrations- und Pumpraten-Effekte sind umgekehrt, wie in Abbildung 4.2. Dies war nicht zu erwarten, da die Effekte der Teilchengrößenverteilung und des Feinpartikelanteils gleichsinnig verlaufen sollten. Wie in Abbildung 4.3 zu sehen ist, ist die Partikelgrößenverteilung  $x_{50}$  für PLGA abhängig von der Konzentration der Ausgangslösung und geringfügig von der Temperatur. Je viskoser die Ausgangslösung, umso größere Teilchen werden erzeugt. Bei Erhöhung der Pumprate ergibt sich für dieses Polymer eine Abnahme der Partikelgrößenverteilung  $x_{50}$ , d.h. die Partikel werden mit erhöhter Sprühgeschwindigkeit kleiner. Dies war nicht unbedingt zu erwarten, da die Partikelgröße hauptsächlich vom Sprühdruk abhängt.

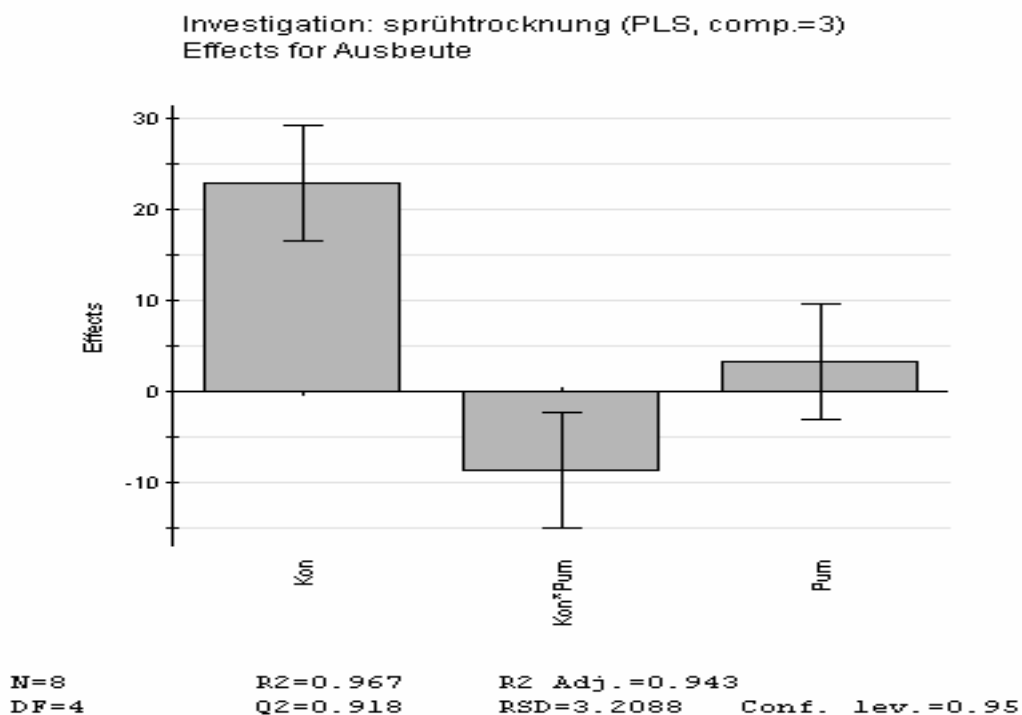


Abbildung 4.4 Parametereinflüsse des Sprühtrockners für maximale Ausbeute (PLA)

Für PLA ergeben sich folgende Ansatzpunkte: Die Ausbeute ist proportional zur eingesetzten Konzentration der Ausgangslösung und geringfügig abhängig von der Pumprate. Das heißt, je konzentrierter die Ausgangslösung und je höher die Pumprate ist, umso höhere Ausbeuten werden erzielt.

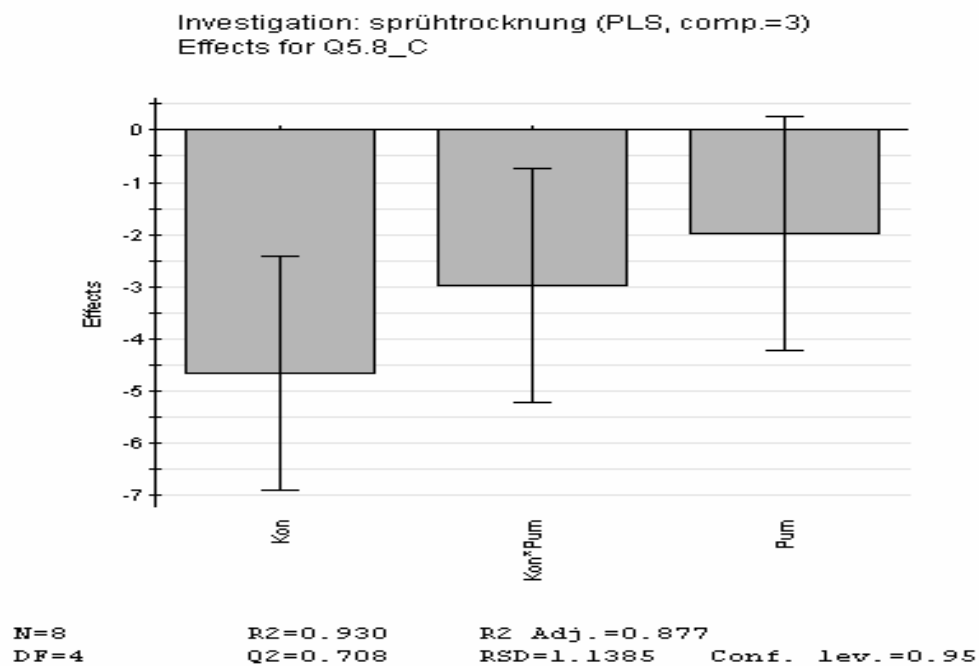


Abbildung 4.5 Parametereinflüsse des Sprühtrockners für maximalen Feinpartikelanteil (PLA)

Der Feinpartikelanteil nimmt ab, je höher die Konzentration der Ausgangslösung und je höher die Pumprate ist. Bei Erhöhung der Konzentration der Ausgangslösung folgt die Abnahme des Feinpartikelanteils, da die Lösung viskoser ist und sich größere Tropfen bilden. Die Effekte der Pumprate waren nicht zu erwarten, da der Feinpartikelanteil hauptsächlich vom Sprühdruk und weniger von der Pumprate abhängig ist.

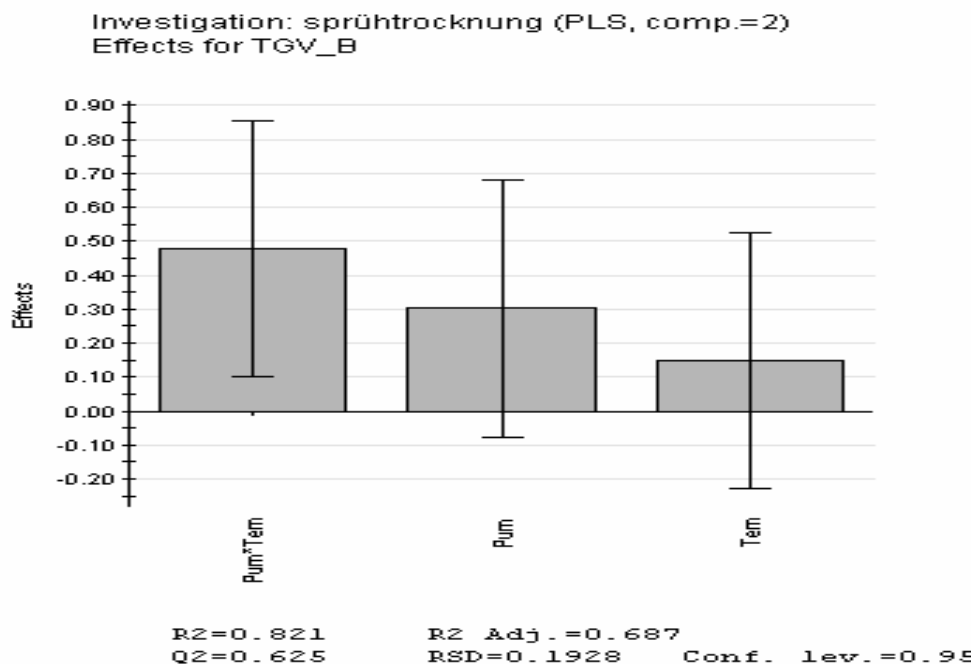


Abbildung 4.6 Parametereinflüsse für die Teilchengrößenverteilung (PLA)

Die Partikelgröße  $x_{50}$  ist abhängig von der Pumprate und geringfügig von der Temperatur. Aus einer Erhöhung der Pumprate folgt eine höhere Zerstäubung der Sprühlösung, es entstehen kleinere Tropfen und daraus folgt die Abnahme der Partikelgröße der sprühtrockneten Mikropartikel.

Als Ergebnis des faktoriellen Versuchsdesigns mit PLGA haben sich folgende Parametereinstellungen als optimal ergeben:

Konzentration der Lösung 10 %, Pumprate 11 ml/min und die Einlasstemperatur 50 °C. Mit dieser Parametereinstellung liegt die Ausbeute bei 74,51 %, die Partikelgröße  $x_{50}$  bei 2,43  $\mu\text{m}$  und der Feinpartikelanteil bei 77,85 %.

Für PLA hat sich die Einstellung 10 % der Lösung, Pumprate 11 ml/min und 60 °C Einlasstemperatur als bestmögliche Parameterkombination ergeben. Die Ausbeute beträgt 70,9 %, die Partikelgröße  $x_{50}=1,43 \mu\text{m}$  und der Feinpartikelanteil beträgt 98,31 %.

Für die weiteren Budesonid Versuche mit dem Sprühtrockner wird die Konzentration des Polymers stets beibehalten, der Anteil des Wirkstoffs wird in der Größenordnung 4,8 % bis 44,4 %, bezogen auf den Polymeranteil, variiert. Die Pumprate ist stets auf 11 ml/min festgelegt, die Einlasstemperatur wird aufgrund des geringen Einflusses auf die Zielgrößen und der besseren Trocknung des Endproduktes in Abstimmung mit den Glasübergängen der Polymere auf 60 °C erhöht. Diese Abstimmung ist deshalb notwendig, da das zu versprühende Gut maximal der Ausgangstemperatur des Sprühtrockners ausgesetzt ist, die kleiner als die Glasübergangstemperatur der Polymere sein muss, da diese sonst durch ihren kautschukähnlichen Zustand die Düse verkleben würden. Der Sprühdruk ist stets 800 NI/h und der Aspirator, der die angewärmte Luft durch den Sprühtrockner zieht und dadurch einen leichten Unterdruck erzeugt wird immer auf 45  $\text{m}^3/\text{h}$  eingestellt. Als Lösungsmittel wird Dichlormethan verwendet, da es ausgezeichnete Lösungseigenschaften für alle verwendeten Polymere, sowie für Budesonid besitzt. Zudem liegt der Siedepunkt bei 40 °C, was mit den Glasübergangstemperaturen der Polymere hinsichtlich der Sprühtrocknung sehr gut vereinbar ist. Gander (62) hat sich ausführlich mit der Auswahl des

Lösungsmittels für die Sprühtrocknung befasst und kam zu dem Schluss, dass Dichlormethan die qualitativ hochwertigsten Mikropartikel erzeugt, hinsichtlich initialer Freigabe (burst), Aussehen, Verträglichkeit mit dem Polymer, moderater Toxizität, bestmögliche Entfernung des Restlösemittels und Verkapselungseffizienz. Auch Johansen (93) beschreibt eine höhere Verkapselungseffizienz im Vergleich zu Ethylformiat.

Dichlormethan gehört der Lösungsmittel Klasse 2 an (125). Dies sind Substanzen, die im Tierversuch zu Krebs oder irreversiblen Schäden führen können, wie neurotoxische oder teratogene Substanzen und Substanzen, die im Verdacht stehen, andere schwere, aber reversible Schäden zu verursachen. Der limitierende Parameter für die Verwendung von Dichlormethan bei der Sprühtrocknung ist, der Siedepunkt, da die Polymere eine Glasübergangstemperatur von max. 58 °C besitzen, die Auslasstemperatur demnach also etwa 50 °C nicht überschreiten darf.

### *Versuchsplanung*

Der Arzneistoff und das jeweilige Polymer müssen miteinander kompatibel sein, um effizient und quantitativ verkapselt zu werden. Diese Löslichkeit findet sich in homogenen Arzneistoff-Polymer Mikropartikeln wieder. Die Löslichkeit wird mittels Filmversuchen getestet, bei denen Budesonid-Polymer Lösungen in Petrischalen ausgegossen werden (20). Budesonid bildet hierbei mit PLA, PLGA und PLGA II milchige, aber homogen aussehende Filme. Die Versuchsplanung sieht Sprühtrocknungsversuche von Budesonid mit jeweils 3 unterschiedlichen Polymeren vor:

Tabelle 4.2 Versuchsplanung der Sprühtrocknungsversuche mit Budesonid

Anteil Budesonid in Mischung [%]	4,8	9,1	20,0	30,0	44,4
Polymer	PLA	PLA	PLA	PLA	PLA
	PLGA	PLGA	PLGA	PLGA	PLGA
	PLGA II	PLGA II	PLGA II	PLGA II	PLGA II

Jede Charge wird hinsichtlich Partikelgröße (einschließlich Feinpartikelanteil), Aussehen und Form, Kristallinität, Oberfläche, Gehalt an Wirkstoff und Freisetzung analysiert.

### *Reproduzierbarkeit der Sprühtrocknung hinsichtlich Ausbeute, Partikelgröße und Feinpartikelanteil*

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit werden folgende Versuche mit PLGA wiederholt und hinsichtlich Gesamtausbeute (Becher + Zyklon), Partikelgröße und Feinpartikelanteil Q (5,8) [%] verglichen.

Tabelle 4.3 Reproduzierbarkeit der Sprühtrocknung

Budesonidgehalt [%]	30,00	30,00	20,00	20,00	9,80	9,80	4,80	4,80
Gesamtausbeute [%]	39,60	35,50	58,10	58,00	41,10	64,70	41,40	70,20
Partikelgröße [µm]	3,01	2,84	2,47	3,08	3,46	3,30	3,84	2,87
Q 5,8 [%]	87,50	85,10	88,90	80,60	76,00	74,40	69,30	84,20

Wie aus Tabelle 4.3 ersichtlich, ist die Reproduzierbarkeit der Sprühtrocknungsversuche gegeben. Sowohl die Gesamtausbeute, als auch die Partikelgröße und der Feinpartikelanteil sind in dem Wiederholungsversuch mit dem eigentlichen Versuch vergleichbar.

#### 4.1.2 Sprüheinbettung von Salbutamol

Auch für Salbutamol wird von den Polymeren PLA und PLGA die jeweils hydrophilere Variante R 202H für PLA und RG 502H für PLGA eingesetzt. Die Löslichkeit wird mittels Filmversuchen getestet. Die Filme sehen klar aus, teilweise ist Salbutamol an den vereinzelt auftretenden weißen Stellen sichtbar, da der Film als Suspension ausgegossen wird. Salbutamol, das in einer Polymerlösung mit Dichlormethan als Lösungsmittel dispergiert wird, wird als stabile Suspension versprüht.

##### Versuchsplanung

Die in Tabelle 4.4 dargestellten Mischungen werden sprühgetrocknet.

Tabelle 4.4 Versuchsplanung der Sprühtrocknungsversuche mit Salbutamol

Anteil Salbutamol in Mischung [%]	4,8	9,1
Polymer	PLA	PLA
	PLGA	PLGA
	PLGA II	PLGA II

Die Einstellung der Sprühbedingungen des Sprühtrockners ist in Kapitel 3.2.1 beschrieben. Eine höhere Beladung der Polymere mit Salbutamol konnte aufgrund von Verstopfungsproblemen der Sprühdüse nicht sprühgetrocknet werden. Die Verstopfung war durch die Versprühung der Suspension bedingt.

#### 4.1.3 Sprüheinbettung von Salbutamolsulfat

Die Herstellung einer für die Sprühtrocknung geeigneten Zubereitung erweist sich mit Salbutamolsulfat als schwieriger, da der Wirkstoff nicht in Dichlormethan löslich ist, die Polymere hingegen sehr gut. Eine w/o Emulsion bestehend aus Wirkstoff, den jeweiligen Polymeren PLA, PLGA und PLGA II, Dichlormethan, Aq. purificata und Lecithin als Emulgator erweist sich nach kurzer Ultraturax Behandlung als stabil und versprühbar. Die Ergebnisse der Filmversuche, die eine Aussage bezüglich der Löslichkeit von Salbutamolsulfat mit den Polymeren zulassen, sind nicht vielversprechend. Das Ausgießen der Formulierung in Petrischalen ergibt nach dem Trocknen viele weiße Stellen, im ansonsten durchsichtigen Film. Diese weißen Stellen können vom Salbutamolsulfat kommen, da letzteres normal in Wasser leicht löslich ist, bei den Filmversuchen aber nicht vorher in Wasser gelöst wurde, sondern direkt in die Emulsion aus Dichlormethan und Wasser mit Lecithin gegeben wurde. Auch kann, aufgrund des Behältnisses, die vollständige Homogenisation dieser Emulsion in der Petrischale nicht vollständig gewährleistet werden.

##### Versuchsplanung

Tabelle 4.5 zeigt die Mischungen, die mit Salbutamolsulfat und den Polymeren als w/o Emulsion versprüht werden:

Tabelle 4.5 Versuchsplanung der Sprühtrocknungsversuche mit Salbutamolsulfat

Anteil Salbutamolsulfat in Mischung [%]	4,8	9,1
Polymer	PLA	PLA
	PLGA	PLGA
	PLGA II	PLGA II

Die Einstellung des Sprühtrockners ist in Kapitel 3.2.1 beschrieben. Eine höhere Beladung als 9,1 % Salbutamolsulfat in PLA, PLGA und PLGA II konnte nicht produziert werden, da die Viskosität der w/o Emulsion dann so hoch war, dass eine Herstellung der Mikropartikel mittels Sprühtrocknung nicht möglich war.

## 4.2 Charakterisierung der sprühgetrockneten Mikropartikel

### 4.2.1 Charakterisierung (Laserdiffraktometrie) und Pulvermorphologie (REM)

#### *Budesonid*

Durch Einsatz der Laserdiffraktometrie mit der Trockendispergiertechnik lässt sich feststellen, dass der  $x_{50}$  Wert für alle weiter verwendeten sprühgetrockneten Produkte  $\leq 5,8 \mu\text{m}$  und somit alveolengängig ist. Abbildung 4.7 zeigt die Partikelgröße der verschiedenen Mischungen in Abhängigkeit von der Budesonid Konzentration im jeweiligen Polymer.

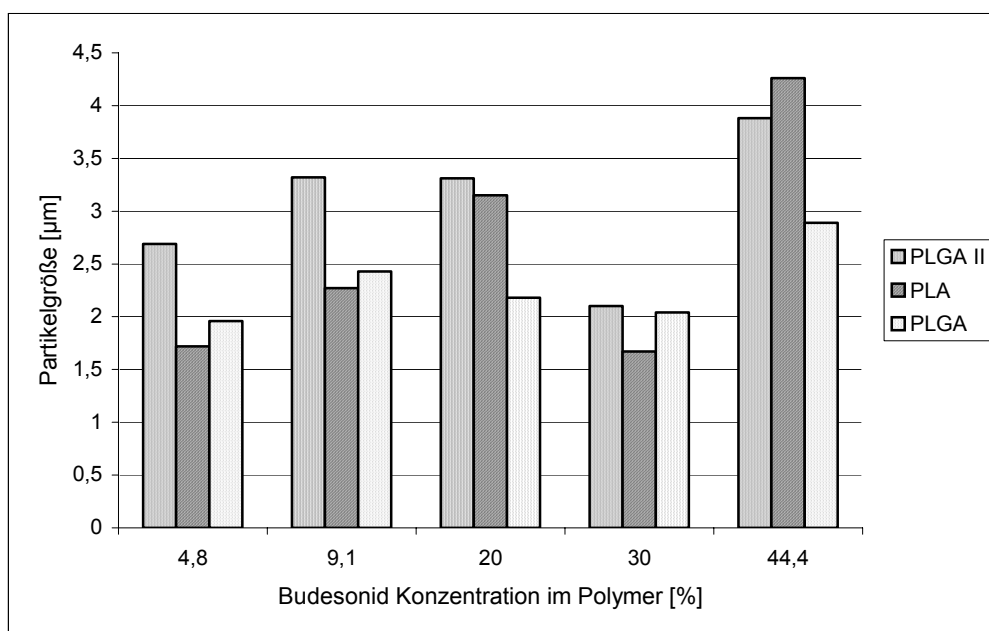


Abbildung 4.7 Volumenbezogene Partikelgröße  $x_{50}$  der sprühgetrockneten Budesonid-Polymer Einbettungen

Die größten Partikel liegen für  $x_{50}$  im Bereich bis ca.  $4,2 \mu\text{m}$ . Die Partikelgrößenverteilung ist bei allen zu untersuchenden Proben homogen. Abbildung 4.7 zeigt die Tendenz, die auch Jalil und Nixon (84), sowie Wichert (183) beobachteten, dass die Partikelgröße mit zunehmender Beladung an Budesonid steigt. Der Anteil des Polymers wird stets konstant gehalten, es ändert sich lediglich die Menge des inkorporierten Wirkstoffs. Bei hoher Wirkstoffbeladung wird die Sprühlösung viskoser. Aus einer solchen Lösung entstehen bei unveränderter Parametereinstellung des Sprühtrockners größere Tröpfchen, die zu Mikropartikeln trocknen. Bei den unterschiedlichen Beladungen zeigt das Polymer PLGA II meist die größte Partikelgröße. Tab. 4.3 zeigt, dass die Sprühtrocknung und die Partikelgrößenmessung reproduzierbar ist. Es wird im weiteren Verlauf dieser Bestimmungen darauf verzichtet Mehrfachmessungen der Partikelgrößen durchzuführen. In Abbildung 4.7 sind die Partikelgrößen des sprühgetrockneten Pulvers vom Auffangbecher des Sprühtrockners dargestellt. Laserdiffraktometrische Messungen der Partikel des Zyklons

ergeben keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Partikelgröße, wie in Tabelle 4.6 dargestellt ist.

Tabelle 4.6 Vergleich der Partikelgrößen  $x_{50}$  vom Auffangbecher und Zyklon des Sprühtrockners

Polymer	Budesonid [%]	Partikelgröße [ $\mu\text{m}$ ] Becher	Partikelgröße [ $\mu\text{m}$ ] Zyklon
PLA	9,01	2,27	2,31
PLGA	9,01	2,43	2,66
PLGA II	9,01	3,32	3,41
PLA	20,00	3,13	2,33
PLGA	20,00	2,18	2,18
PLGA II	20,00	3,31	3,24
	100,00	2,30	2,36

Abbildung 4.8 zeigt den Feinpartikelanteil der Polymer Sprüheinbettungen mit Budesonid, d.h. den Anteil der Teilchen, die  $\leq 5,8 \mu\text{m}$  im Durchmesser betragen und somit alveolengängig sind.

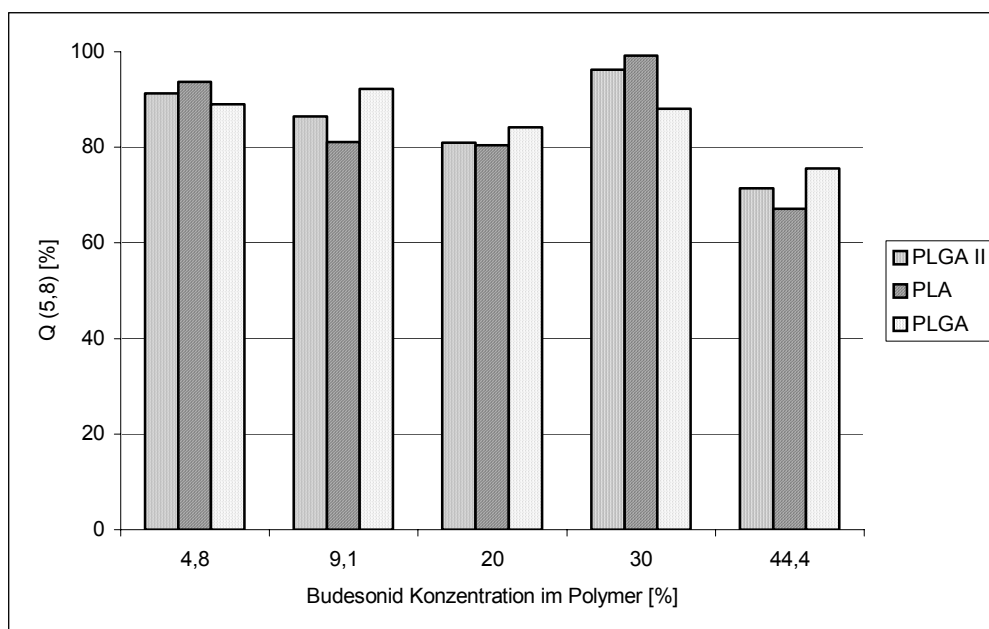


Abbildung 4.8 Feinpartikelanteil Q(5,8) der sprühtrockneten Budesonid-Polymer Mischungen

Außer im Fall der 44,4% Konzentration von Budesonid in PLA, PLGA und PLGA II erreichen alle Sprüheinbettungen mit  $\geq 80\%$  einen hohen Feinpartikelanteil. Die einzelnen Polymere unterscheiden sich maximal um 10% bei dem respirablen Anteil bezogen auf die Beladung, so dass von einem Feinpartikelanteil ausgegangen werden kann, der unabhängig von der Art des Polymers und der Beladung mit Budesonid stets genügend hoch ist.

Lichtmikroskopische Untersuchungen zeigen, dass durch die Sprühtrocknung unabhängig vom Mischungsverhältnis der Komponenten runde Partikel erzeugt werden. Agglomerate sind häufig sowohl mikroskopisch, als auch makroskopisch zu erkennen.

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (REM) bestätigen diese Ergebnisse und liefern zusätzliche Information.

Untersucht werden die beiden „Extreme“ der Beladungsgrade, d.h. 4,8% und 44,4% Budesonid mit PLA, PLGA und PLGA II. Die einzelnen Chargen des gleichen Polymers unterscheiden sich in ihrem Erscheinungsbild je nach Beladung (Abb. 4.9 und 4.11).



Bei einer Beladung von 4,8 % ist bei allen drei Polymeren die Oberfläche glatt und weist keinerlei rauhe Stellen auf (Abb. 4.9). Sind die Partikel hingegen mit 44,4 % Budesonid beladen, weisen sie durchgängig bei allen drei Polymeren eine strukturierte Oberfläche auf (Abb. 4.11). Die Partikel sind alle sphärisch und lagern sich häufig zu Agglomeraten zusammen. Die mittels Laserdiffraktometrie ermittelten Partikelgrößen werden durch REM Aufnahmen bestätigt.

Die Adsorption der kleinen Teilchen an der Oberfläche ist ein Zeichen für die hohe Oberflächenenergie des amorphen (Kapitel 4.2.2) sprühtrockneten Materials.

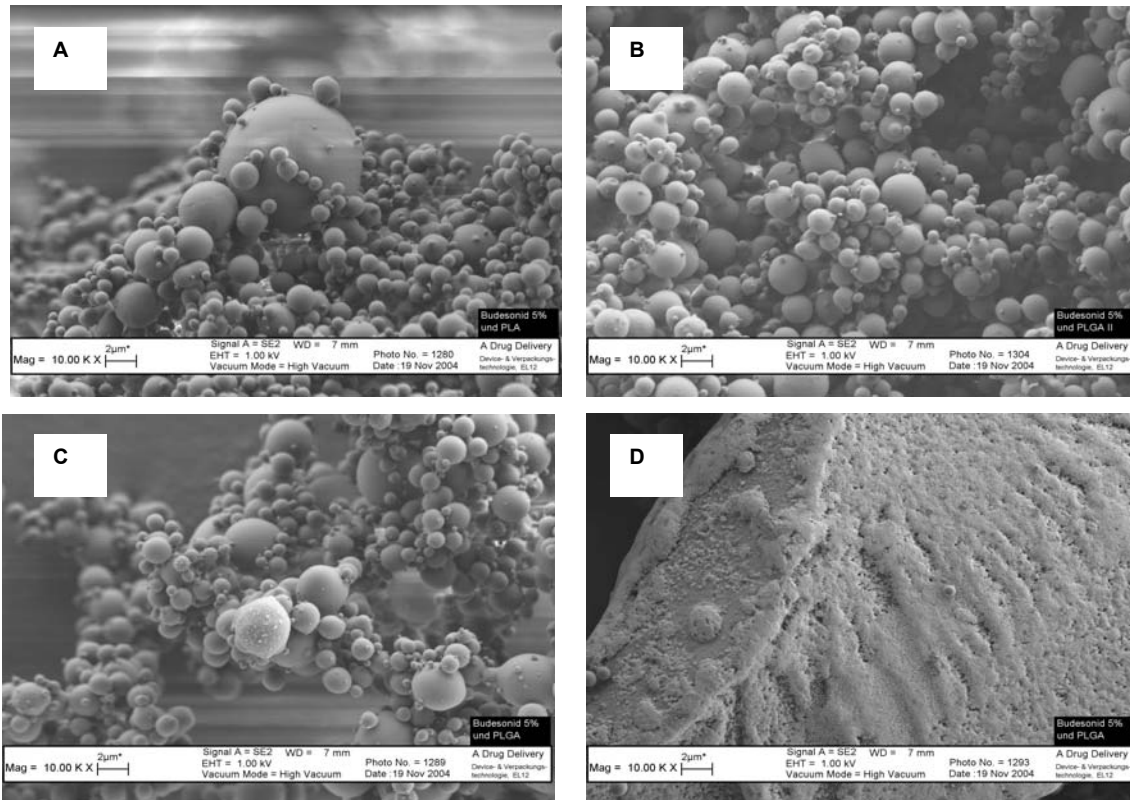


Abbildung 4.9 A: Sprühtrocknete Mikropartikel mit 4,8 % Budesonid in PLA

B: Sprühtrocknete Mikropartikel mit 4,8 % Budesonid in PLGA II

C: Sprühtrocknete Mikropartikel mit 4,8 % Budesonid in PLGA

D: Querschnittsfläche eines sprühtrockneten Partikels (4,8 % Budesonid in PLGA)

Die Teilchengrößenverteilung ist, wie in der Abbildung 4.9 deutlich erkennbar, weitgehend homogen. Vereinzelt treten allerdings größere Partikel auf. Die Oberfläche der sprühtrockneten Partikel ist rund und glatt mit vereinzelt kleineren Ausbuchtungen, die möglicherweise durch die Verdampfung des Lösungsmittels verursacht werden. Der Querschnitt durch ein Teilchen, bestehend aus 4,8 % Budesonid in PLGA (Abbildung 4.9 D), ähnelt einer schwammartigen Struktur mit kleinen Hohlräumen. Um zu untersuchen, ob es sich um Hohlkugeln handelt, wurden die Mikropartikel in einen Mörser gegeben und mittels Stickstoff schockgefroren und anschließend aufgebrochen. Erstaunlicherweise lösten sich die Mikropartikel augenblicklich bei Kontakt mit dem Flüssigstickstoff. Es entstand eine milchig weiße Flüssigkeit, die nach dem Verdampfen des Stickstoffs eintrocknete und einen weißen Film im Mörser bildete. Um genauere Aussagen über Stickstoff als potentielles Lösungsmittel für die Polymere machen zu können, sind zusätzliche Lösungsversuche mit unterschiedlichen Polymer- und Stickstoffmengen notwendig. Alternativ wird das sprühtrocknete Pulver in Falcons gefüllt, verschlossen und an einem Metalldraht in Stickstoff getaucht, so dass die Partikel selbst nicht mit Stickstoff in Berührung kommen aber

trotzdem sehr schnell gefroren werden. Das sofortige anschließende Mahlen im Mörser soll ein Zerschneiden der Kugeln bewirken. Es waren keine zerbrochenen Schalen und kollabierte Budesonid-Polymer Partikel im REM sichtbar. Auch bei allen anderen Aufnahmen mit Budesonid waren nur sehr selten zerbrochene Kugeln zu sehen, die allerdings nicht hohl waren. Daraus kann man schließen, dass es sich bei den Partikeln aus Budesonid und PLA, PLGA und PLGA II um solide Mikropartikel handelt. Der beste Beweis für Hohlräume wären beim Trocknen aufgeplatzte Teilchen. In Abbildung 4.10 ist ein Querschnitt eines PLA-Mikropartikels mit 20 % Budesonid zu sehen. Es ist kein Hohlraum im Inneren der Partikels oder kleine Löcher an der Bruchkante sichtbar.

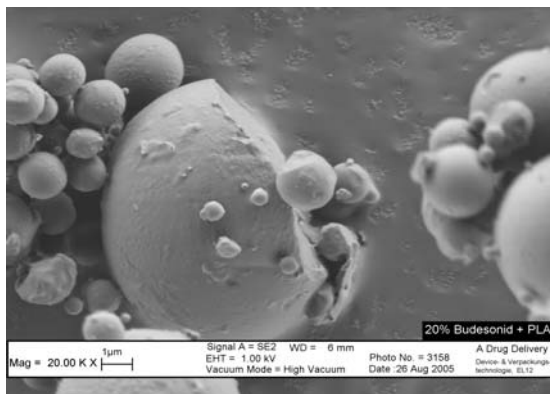


Abbildung 4.10 Solider PLA-Mikropartikel mit 20 % Budesonid

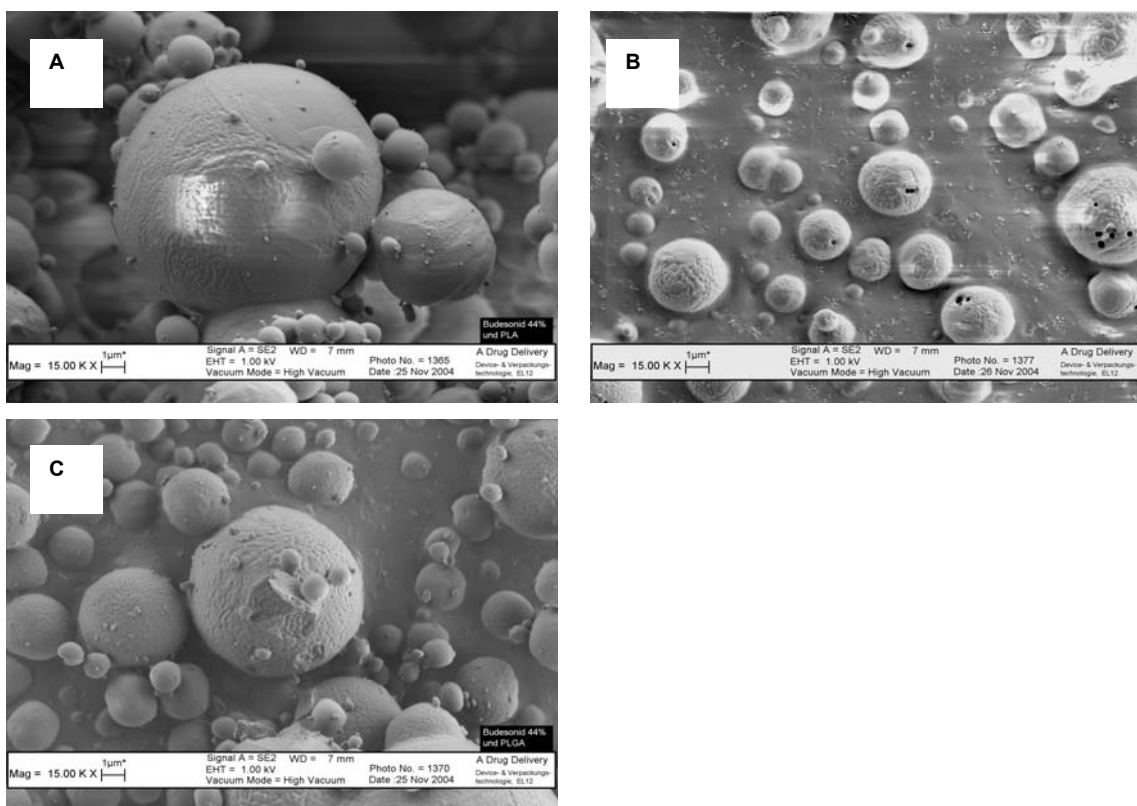


Abbildung 4.11 A: Sprühgetrocknete Mikropartikel mit 44,4 % Budesonid in PLA

B: Sprühgetrocknete Mikropartikel mit 44,4 % Budesonid in PLGA II

C: Sprühgetrocknete Mikropartikel mit 44,4 % Budesonid in PLGA

In Abbildung 4.11 ist bei A die PLA-Sprüheinbettung von 44,4 % Budesonid zu sehen. Hier wird bewusst ein größeres Teilchen dargestellt, um die strukturierte Oberfläche, die Ähnlichkeit mit einer Kalkschale eines Eis hat, klar erkennbar zu machen. Die Adhäsion von winzigen Teilchen ist auch hier gut sichtbar. Interessanterweise sind bei Abbildung 4.11 B (44,4 % Budesonid in PLGA II) kleine Löcher zu erkennen, die wahrscheinlich durch eine explosionsartige Verdampfung des Lösungsmittels, eine sogenannte Minieruption, am Ende des Trocknungsprozesses entstanden sind. Auch hier ist die strukturierte Oberfläche der einzelnen Mikropartikel deutlich erkennbar. Bei der PLGA-Sprüheinbettung von 44,4 % Budesonid (Abbildung 4.11 C), ist ebenfalls die Adhäsion winziger Partikel an die sprühgetrockneten Mikropartikel zu beobachten. Die Oberfläche ist auch von feinen Rillen durchzogen.

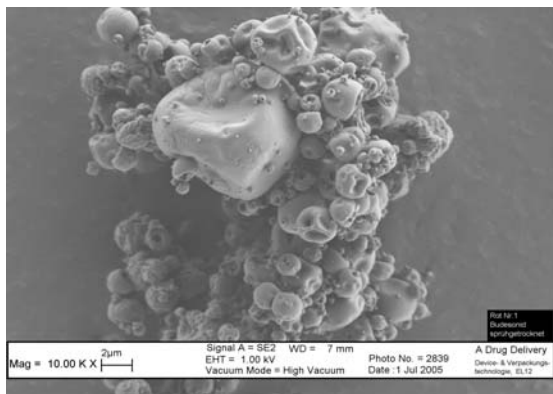


Abbildung 4.12 Sprühgetrocknetes Budesonid ohne Zusatz von Polymeren

Budesonid wird, wie alle Budesonid-Polymer Sprüheinbettungen, mit Dichlormethan als Lösung versprüht. Die sprühgetrockneten Teilchen weisen, wie in Abbildung 4.12 sichtbar, alle große Einbuchtungen auf, d.h. sie sind, im Gegensatz zu den Budesonid-Polymer Einbettungen, kollabiert. Die allermeisten Partikel sind im Größenbereich, der den Alveolen zugänglich ist. Es scheint, als hätten die verwendeten Polymere positive Effekte hinsichtlich der Form, Struktur und Oberflächenbeschaffenheit der sprühgetrockneten Partikel. Abbildung 4.13 zeigt die Polymere PLA, PLGA und PLGA II nach der Sprühtrocknung. Alle Polymere wurden als Lösung in Dichlormethan versprüht.

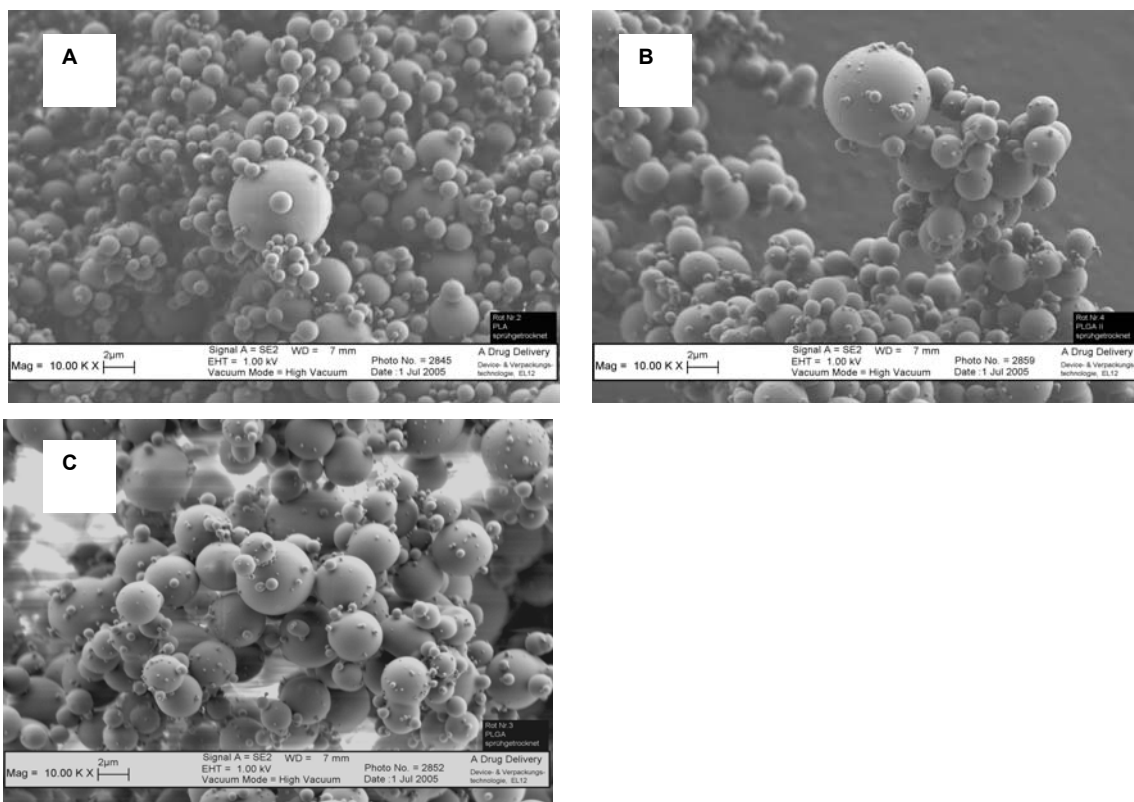


Abbildung 4.13 A: Sprühgetrocknetes PLA ohne Arzneistoff  
 B: Sprühgetrocknetes PLGA II ohne Arzneistoff  
 C: Sprühgetrocknetes PLGA ohne Arzneistoff

Die sprühgetrockneten Polymer-Mikropartikel in Abbildung 4.13 sind rund, weisen allesamt eine glatte, geschlossene Oberfläche auf und neigen zu Agglomeration. Die abgebildeten Partikel sind alle  $\leq 5,8 \mu\text{m}$ .

#### *Salbutamol und Salbutamolsulfat*

Die Laserdiffraktometrie mit Trockendispersiertechnik dient auch bei Sprüheinbettungen von Salbutamol und Salbutamolsulfat zur Bestimmung der Partikelgröße. Die  $x_{50}$  Werte für alle sprühgetrockneten Salbutamol und Salbutamolsulfat Einbettungen sind  $\leq 5,8 \mu\text{m}$  und die Mikropartikel damit alveolengängig. Abbildung 4.14 zeigt die Größe der sprühgetrockneten Mischungen mit je 4,8 % und 9,1 % Salbutamol und Salbutamolsulfat mit den drei untersuchten Polymeren PLA, PLGA und PLGA II.

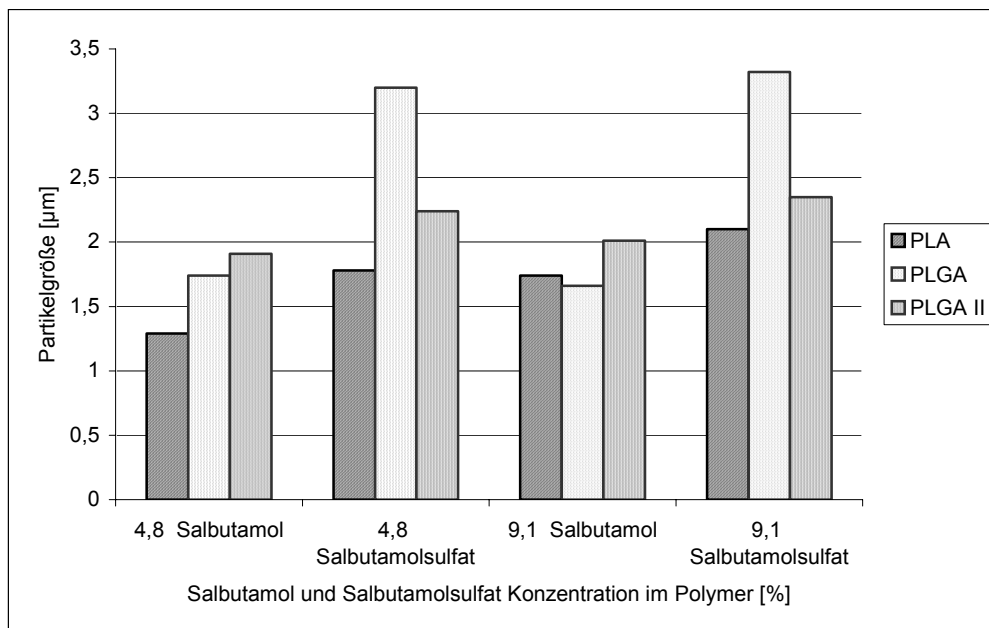


Abbildung 4.14 Volumenbezogene Partikelgröße  $x_{50}$  der sprühgetrockneten Salbutamol- und Salbutamolsulfat Polymer Mischungen

Die Partikelgröße  $x_{50}$  für Salbutamol befindet sich im Bereich von 1,29 µm bis 2,01 µm, diejenige von Salbutamolsulfat von 1,78 µm bis 3,32 µm. Zanen (185) untersuchte die optimale Partikelgröße für Salbutamol zur Anwendung bei Asthma und fand heraus, dass die effektivste Partikelgröße bei 2,8 µm Durchmesser lag. Dies weicht nur geringfügig von dem gemessenen Partikeldurchmesser der sprühgetrockneten Salbutamol-Polymer Mikropartikel ab. Die Partikelgrößen Verteilung ist bei allen untersuchten Proben homogen, wie laserdiffraktometrische Untersuchungen ergeben haben. Abbildung 4.14 zeigt, wie auch bei den sprühgetrockneten Budesonid Mischungen, dass die Partikelgröße mit steigendem Salbutamol- bzw. Salbutamolsulfatgehalt zunimmt. Der Grund hierfür ist in der Viskosität der Sprühlösung zu suchen, die auch bei den Sprüheinbettungen von Salbutamol und Salbutamolsulfat durch den Wirkstoffgehalt verändert wird. Salbutamolsulfat Mikropartikel besitzen bei beiden Konzentrationen die größeren Partikeldurchmesser, da Lecithin als Emulgator zusätzlich die Viskosität der zu versprühenden Lösung, bzw. Emulsion, erhöht. Meist wird mit PLA die kleinste Partikelgröße erreicht. Die entnommenen Salbutamol- und Salbutamolsulfatpartikel entstammen dem Auffangbecher des Sprühtrockners.

Abbildung 4.15 zeigt den Feinpartikelanteil Q (5,8) der sprühgetrockneten Salbutamol- und Salbutamolsulfat-Polymer Einbettungen, d.h. den Anteil der Teilchen, deren Partikeldurchmesser  $\leq 5,8$  µm beträgt und die somit alveolengängig sind.

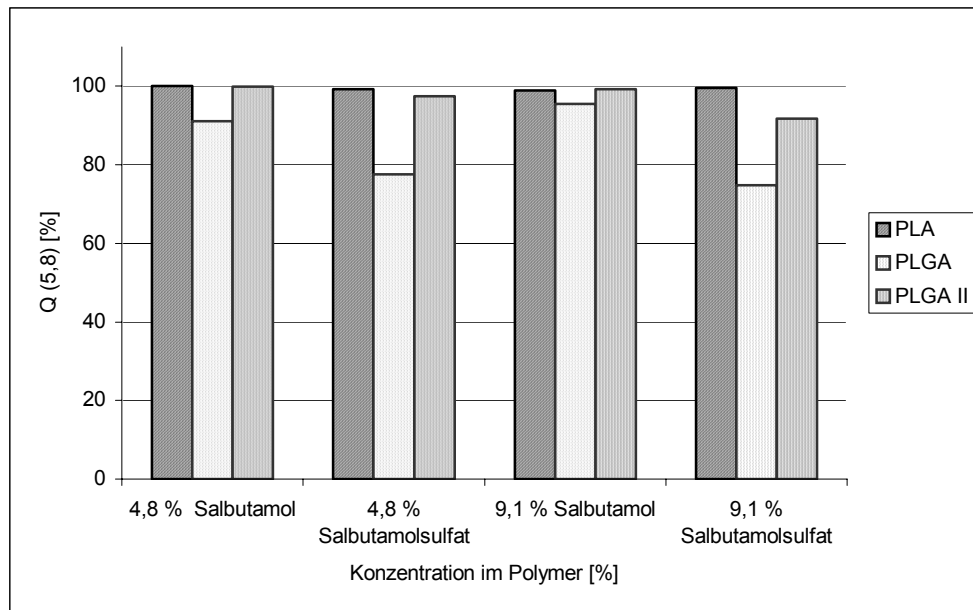


Abbildung 4.15 Feinpartikelanteil Q (5,8) [%] der sprühgetrockneten Salbutamol- und Salbutamolsulfat-Polymer Mischungen

Nahezu alle sprühgetrockneten Mischungen erreichen mit mehr als 90 % alveolengängigen Teilchen einen sehr hohen Feinpartikelanteil, was für eine gute Einstellung der Sprühtrocknungsparameter spricht. Die verwendeten Polymere unterscheiden sich nur wenig im Ausmaß der alveolengängigen Teilchen. Lediglich die PLGA Sprüheinbettungen mit 4,8 % und 9,1 % Salbutamolsulfat liegen bei nur knapp 80 % Feinpartikelanteil (Abbildung 4.15). Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigen diese Ergebnisse der laserdiffraktometrischen Partikelgrößenmessung und liefern genauere Erkenntnisse über Aussehen, Oberflächenbeschaffenheit und Form der Partikel. Abbildung 4.16 zeigt rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von 4,8 % Salbutamol mit PLA, PLGA und PLGA II.

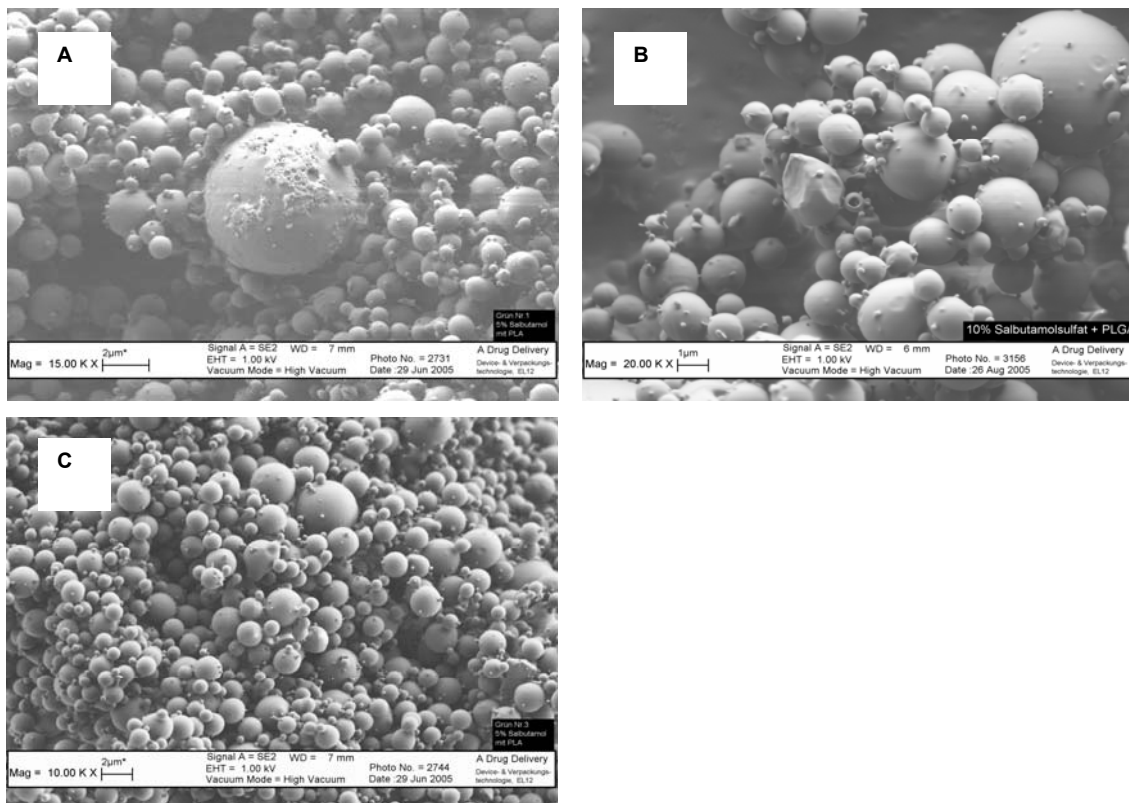


Abbildung 4.16 A: Sprühgetrocknete Mikropartikel mit 4,8 % Salbutamol in PLA

B: Sprühgetrocknete Mikropartikel mit 4,8 % Salbutamol in PLGA

C: Sprühgetrocknete Mikropartikel mit 4,8 % Salbutamol in PLGA II

Die sprühgetrockneten Partikel aus Abbildung 4.16 A (4,8 % Salbutamol in PLA) sind alle rund und weisen eine recht glatte Oberfläche auf. Kleine Partikel sind aufgrund der elektrostatischen Aufladbarkeit an der Oberfläche adhärirt. Bei Abbildung 4.16 B handelt es sich um die sprühgetrocknete Einbettung von 4,8 % Salbutamol mit PLGA (und nicht um die im REM Bild irrtümlicherweise beschriftete PLGA Sprüheinbettung mit 10 % Salbutamolsulfat). Diese Aufnahme zeigt eine homogene Partikelgrößenverteilung, die mittels Sprühtrocknung erreicht werden kann. Nahezu alle abgebildeten Teilchen erreichen aufgrund ihrer Größe die Alveolen. Mit dieser Sprüheinbettung entstehen ebenfalls runde Partikel, deren Oberfläche nicht strukturiert ist.

Bei Abbildung 4.16 C handelt es sich um die sprühgetrocknete Einbettung von 4,8 % Salbutamol in PLGA II (und nicht um die im REM Bild irrtümlicherweise beschriftete Einbettung aus 4,8 % Salbutamol in PLA). Wie in Abbildung 4.16 C erkennbar ist, sind alle abgebildeten Teilchen der PLGA II Sprüheinbettung mit 4,8 % Salbutamol rund, mit glatter Oberflächenbeschaffenheit und erreichen aufgrund ihrer Größe die untersten Abschnitte der Lunge.

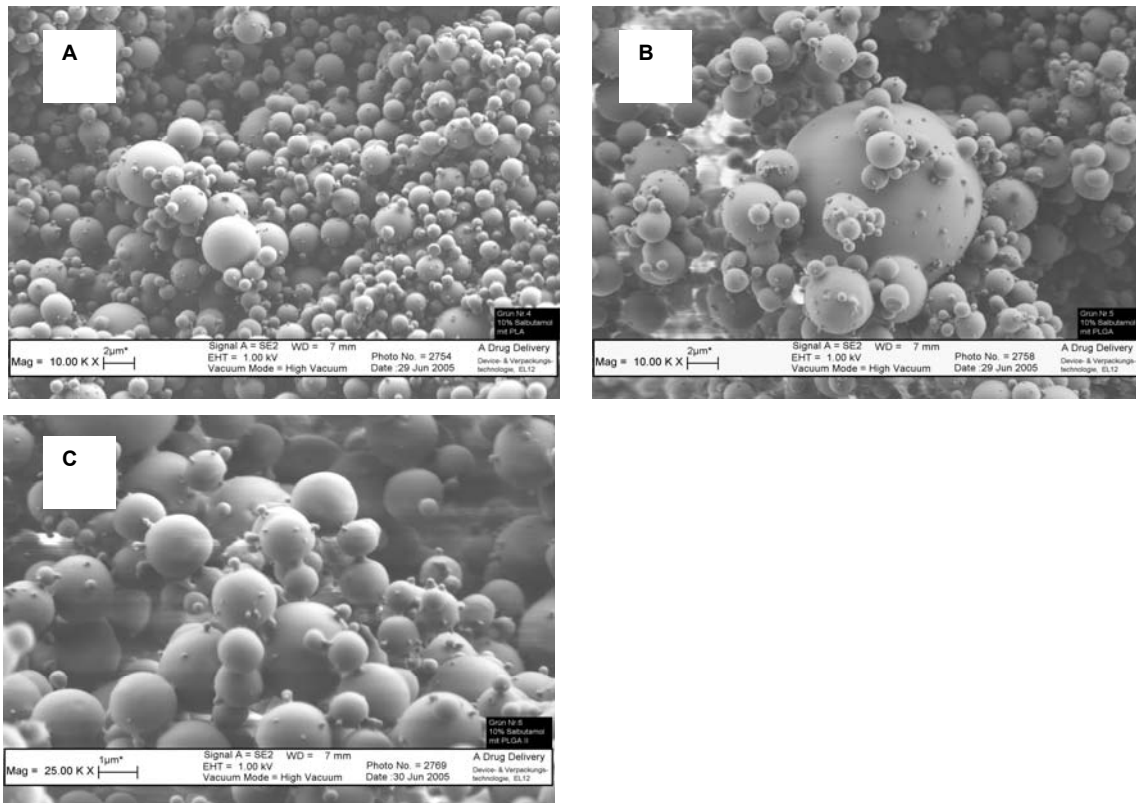


Abbildung 4.17 A: Sprühtrocknete Mikropartikel mit 9,1 % Salbutamol in PLA

B: Sprühtrocknete Mikropartikel mit 9,1 % Salbutamol in PLGA

C: Sprühtrocknete Mikropartikel mit 9,1 % Salbutamol in PLGA II

Die höhere Beladung mit Salbutamol (9,1 %) ähnelt sehr in Aussehen, Form und Oberflächenbeschaffenheit den entsprechenden Mischungen mit 4,8 % Salbutamol. Die sprühtrockneten Teilchen sind rund, mit glatter Oberfläche und weisen alle eine Größe auf, mit denen sie die unteren Lungenbereiche erreichen können. Die Höhe der Beladung scheint auf die Teilchengröße keinen signifikanten Einfluss zu haben.

Es sind oft Ausbuchtungen zu sehen, die mit der Lösungsmittelverdampfung während des Sprühtrocknungsvorganges erklärt werden können.

Um einen Einblick zu bekommen, wie sprühtrocknetes Salbutamol ohne Zusatz von Polymeren aussieht, ist in Abbildung 4.18 sprühtrocknetes Salbutamol dargestellt.

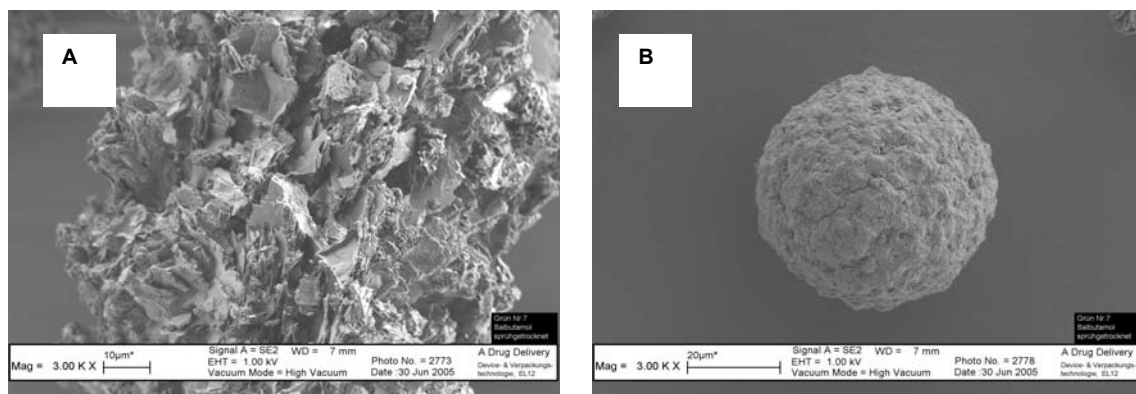


Abbildung 4.18 A und B: Sprühtrocknetes Salbutamol ohne Zusatz von Polymeren



Wie in Abbildung 4.18 dargestellt, weist sprühgetrocknetes Salbutamol eine sehr unterschiedliche Form und Struktur auf. Es erscheint in kristalliner Form, wie sich in späteren DSC-Scans und röntgenpulverdiffraktometrischen Untersuchungen zeigt, mit scharf abgegrenzten Flächen, die sich zackentartig nach außen spreizen und in ihrem schichtartigen Aufbau an Schieferstein erinnern. Aufgrund der Vielzahl ähnlicher REM Bilder, die im Rahmen dieser Arbeit von sprühgetrocknetem Salbutamol gefertigt wurden, kann davon ausgegangen werden, dass Salbutamol nach der Sprühtrocknung vermehrt in dieser Form existiert. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen und DSC-Scans werden zur genaueren Differenzierung angefertigt, wie im folgenden Abschnitt zu sehen ist. Eine Erklärung des kristallinen Vorkommens kann die Herstellungsweise geben. Salbutamol wurde nicht mit Dichlormethan, sondern mit Wasser als Lösungsmittel sprühgetrocknet. Salbutamol wurde in Wasser suspendiert und mit einer Pumprate von 11 ml/min bei einer Eingangstemperatur von 180 °C gesprüht. Die Ausgangstemperatur, die entscheidend ist, da der gesprühte Tropfen durch einen Dampfmantel des Lösungsmittels geschützt ist und somit nur der Ausgangstemperatur ausgesetzt ist, lag bei 101 °C. Der Wirkstoff wurde als Suspension versprüht, d.h. er lag bereits in der Sprühlösung kristallin vor und ist während der Verdampfung des Lösungsmittels im Tropfen kristallin geblieben, um anschließend zu einem kristallinen Mikropartikel zu trocknen. Mit Dichlormethan als Lösungsmittel würde wahrscheinlich der gleiche Effekt erzielt werden, da initial zwar weniger Kristallisationskeime vorliegen würden, da Salbutamol von Dichlormethan angelöst wird, die getrockneten Mikropartikel würden dennoch kristallin sein. Das Lösungsmittel hat anscheinend einen enormen Einfluss auf die Beschaffenheit des Produktes. Blanco-Prieto (17) stellten bei der Sprühtrocknung von Vapreotide mit PLGA in Dichlormethan, Ethylformiat oder Essigsäure Unterschiede in der Morphologie der Mikropartikel fest und führten dies unter anderem auch auf den Einfluss der Lösungsmittel zurück. Vereinzelt kommen aber auch runde Partikel vor, wie in Abbildung 4.18 B zu sehen ist. Diese haben einen großen Durchmesser von annähernd 40 µm und besitzen eine stark strukturierte Oberfläche, die von Rissen durchzogen ist. Die Größe kann durch die Versprühung als Suspension kommen. Nicht sprühgetrocknetes Salbutamol hat eine Teilchengröße von 1,8 µm bis 58 µm. In Abbildung 4.18 B ist ein Partikel abgebildet, bei dem aufgrund seiner Größe nach der Sprühtrocknung davon auszugehen ist, dass er bereits in der Suspensions-Sprühlösung eine größere Teilchengröße aufwies. Das Aussehen von Salbutamolsulfat in den verschiedenen Polymereinbettungen wird ebenfalls mit dem Rasterelektronenmikroskop untersucht.

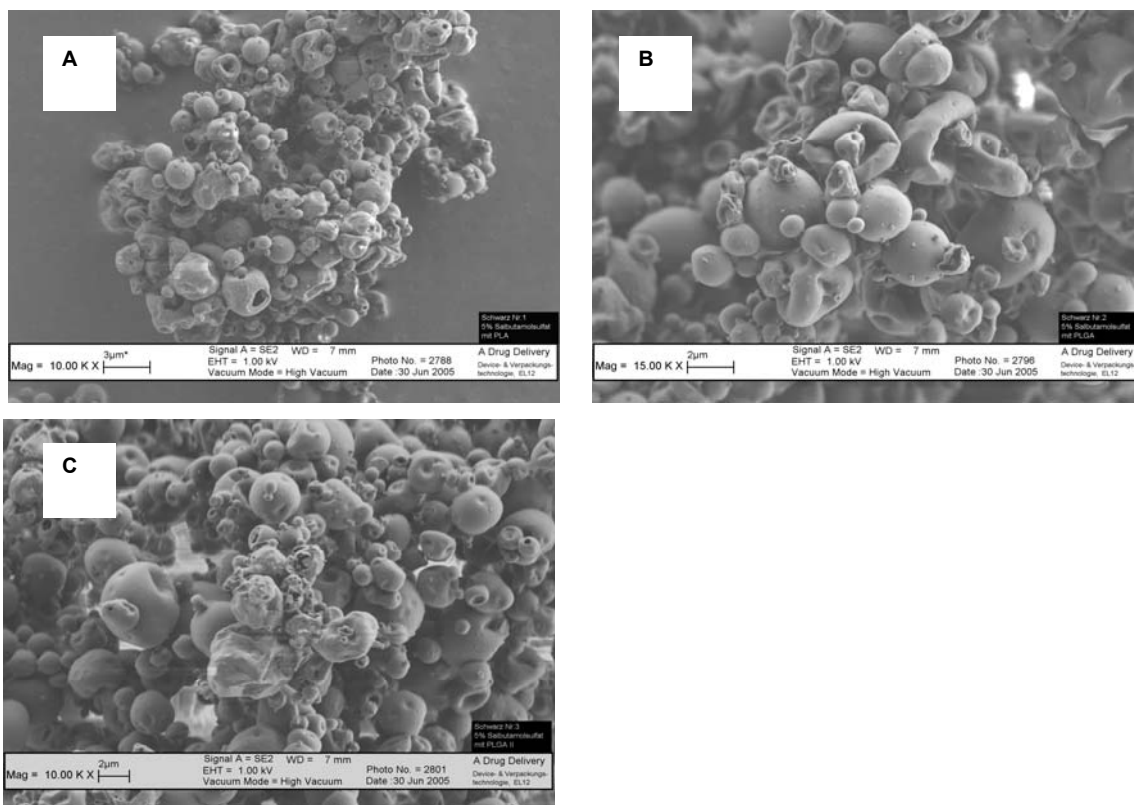


Abbildung 4.19 A: Sprühgetrocknete Mikropartikel mit 4,8 % Salbutamolsulfat in PLA

B: Sprühgetrocknete Mikropartikel mit 4,8 % Salbutamolsulfat in PLGA

C: Sprühgetrocknete Mikropartikel mit 4,8 % Salbutamolsulfat in PLGA II

Wie in Abbildung 4.19 dargestellt ist, weichen die Sprüheinbettungsprodukte von Salbutamolsulfat in ihrem Aussehen und ihrer Form stark von denen von Budesonid und Salbutamol ab. Die Salbutamolsulfat-Polymer Mikropartikel sind kollabiert und weisen teilweise Löcher auf. Eine mögliche Erklärung kann die Versprühung als w/o Emulsion mit Lecithin als Emulgator sein. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen bestätigen die laserdiffraktometrischen Größenmessungen. Auch die deformierten Partikel sind  $\leq 5,8 \mu\text{m}$  im Durchmesser. Bei der Verwendung von PLA, Abbildung 4.19 A, sind die Mikropartikel meist mit Löchern versehen, die Oberfläche ist strukturiert und die Form oft deformiert. Es scheint als ob alle Partikel ursprünglich rund waren. Die Partikel „explodieren“ durch den Dampfdruck des verdampfenden, inneren Lösungsmittels. Danach fallen sie rein mechanisch in sich zusammen und sehen kollabiert aus. Eine Möglichkeit, wie kollabierte Mikropartikel entstehen können ist, dass sich während der Trocknung im Sprühturm im Tropfeninneren eine Dampfphase befindet. Von aussen trocknet der Tropfen und wird dann für den Dampf im Inneren des Tropfens undurchlässig. Die äussere Hülle scheint flexibel sein, der Tropfen kühlt ab und dadurch reduziert sich das innere Volumen, wodurch der Partikel die kollabierte Form annimmt. Lecithin scheint die Hülle flexibel und schwer dampfdurchlässig zu machen, da bei den Versuchen ohne Lecithin, ob als Lösung oder Suspension versprüht, stets runde Mikropartikel entstanden sind. Ein ähnliche Begründung könnte sein, dass das Lösungsmittel, das einen höheren Siedepunkt hat, wie hier Wasser, wahrscheinlich nicht quantitativ verdampft und eine Art Film im Inneren der Mikropartikel bildet, der zu dieser Form der Mikropartikel beiträgt, wie Zhang (186) vermutete.

Vereinzelt sind auch runde Partikel mit glatter Oberfläche zu sehen, wie sie bei den Budesonid- und Salbutamolmischungen auftraten. Auch bei 4,8 % Salbutamolsulfat mit PLGA (Abbildung 4.19 B) ist dieser Effekt sichtbar. Die Teilchen sind vereinzelt noch stärker kollabiert und an der Oberfläche runder, glatter Partikel adhärirt oder, wie in der oberen Bildhälfte zu sehen, aneinander haftend. Eine Durchlöcherung wie bei der Verwendung von

PLA ist jedoch nicht erkennbar. Bei der Sprüheinbettung von 4,8 % Salbutamolsulfat mit PLGA II (Abbildung 4.19 C) zeigen alle abgebildeten Teilchen mehr oder weniger große Einbuchtungen. Die Partikel weisen vereinzelt Löcher auf. Die Oberfläche innerhalb dieser Mischung differiert stark. Von wenigen glatten Oberflächen abgesehen, sind meist strukturierte Oberflächen bei kollabierten Mikropartikeln zu erkennen.

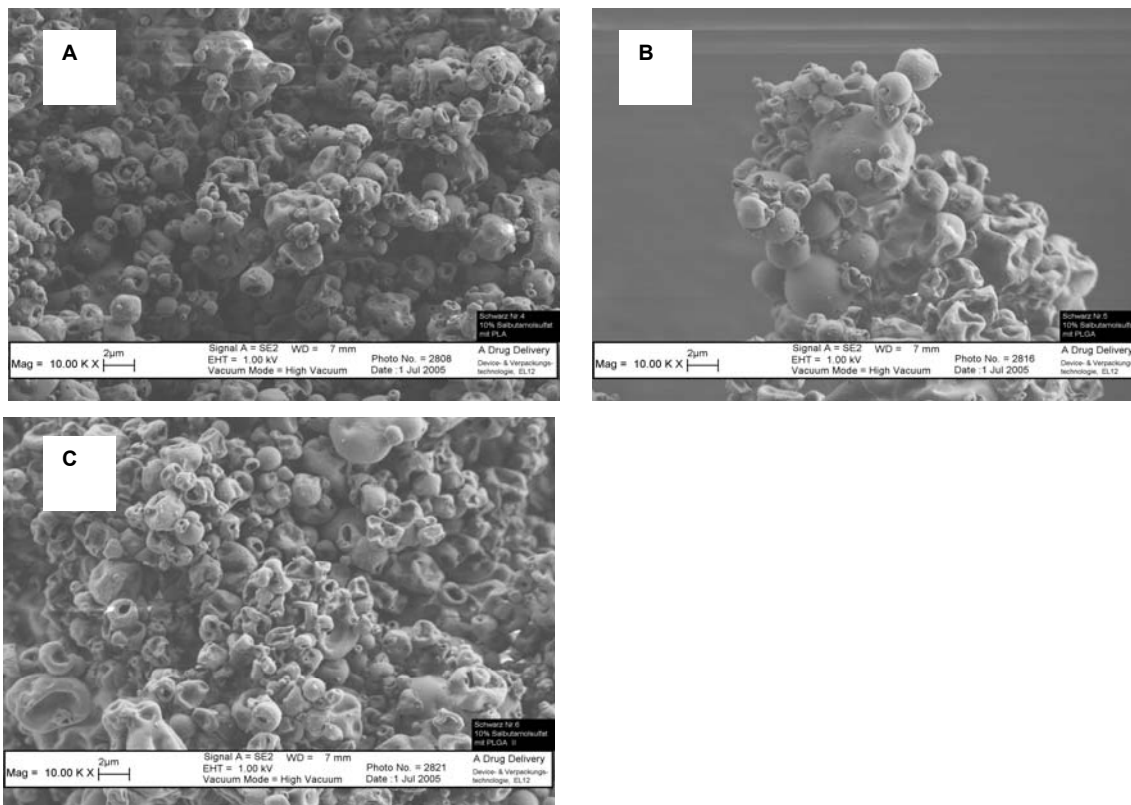


Abbildung 4.20 A: Sprühgetrocknete Mikropartikel mit 9,1 % Salbutamolsulfat in PLA

B: Sprühgetrocknete Mikropartikel mit 9,1 % Salbutamolsulfat in PLGA

C: Sprühgetrocknete Mikropartikel mit 9,1 % Salbutamolsulfat in PLGA II

Die sprühgetrockneten Partikel mit 9,1 % Salbutamolsulfatanteil in den Polymeren zeigen größere Löcher und viele Einbuchtungen. Die hier abgebildeten Mischungen weisen nur wenige intakte und runde Teilchen auf. Bei allen drei Abbildungen ist auffällig, wie die Mikropartikel teilweise fast ineinander verkeilt vorliegen. Bei der Verwendung von PLGA (Abbildung 4.20 B) sind Partikel mit Löchern in diesen Bildausschnitten allerdings nicht zu sehen. Trotz des deformierten Aussehens sind prinzipiell alle Mikropartikel aufgrund ihres Durchmessers fähig, die unteren Abschnitte der Lunge zu erreichen. In der Literatur (38) finden sich Beispiele, die einen Einfluss der Oberflächenmorphologie auf die Feinverteilung der Mikropartikel feststellten: Nicht poröse Albumin Mikropartikel mit deformierter Oberfläche wiesen einen signifikant höheren Feinpartikelanteil auf, als nicht deformierte. Sie führten dies auf eine verminderte Kohäsion zurück, die durch den losen Kontakt zwischen den Partikeln zustande kam. Die Firma Nektar Therapeutics produzierte mit den sogenannten Pulmospheres™ gezielt stark durchlöchernde Mikropartikel, die in ihrem Aussehen Honigwaben ähneln. Diese haben einen Durchmesser von 3-5 µm und einen ausgezeichneten Feinpartikelanteil. Mit Hilfe dieser Partikel wurden bereits Versuche unternommen, Immunglobulin dem Atemwegstrakt zuzuführen (25). Weiterhin wurden mit dieser Technologie Mikropartikel mit Gentamycin, Budesonid und Salbutamol(-sulfat) hergestellt (47, 180).

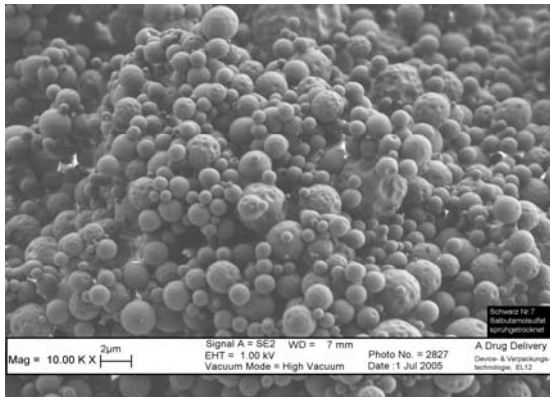


Abbildung 4.21 Sprühgetrocknetes Salbutamolsulfat ohne Zusatz von Polymeren

Abbildung 4.21 zeigt sprühgetrocknetes Salbutamolsulfat, das in Form und Struktur an einen Golfball erinnert. Wie Salbutamol wird auch Salbutamolsulfat mit Wasser als Lösungsmittel versprüht. Salbutamolsulfat wird in Wasser gelöst und mit einer Pumprate von 9 ml/min bei einer Eingangstemperatur von 180 °C versprüht. Die Ausgangstemperatur liegt bei 101 °C. Die Teilchen zeigen alle eine homogene Größenverteilung, die im alveolengängigen Bereich liegt. Die runde Form der Salbutamolsulfat Mikropartikel ist in Übereinstimmung mit der von Chawla (37) gefundenen Form, der als Lösungsmittel ebenfalls Wasser benutzte. Um die sprühgetrockneten Salbutamol und Salbutamolsulfat Polymer-Mikropartikel genauer charakterisieren zu können, werden sie ebenfalls in Falcons verpackt und in Stickstoff getaucht. Nach dem Zermörsern werden die Mikropartikel rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Es gibt für das Salz Hinweise, dass die Mikropartikel hohl sein könnten, da vereinzelt Löcher in der Wandung zu sehen sind, wie in Abbildung 4.22 B zu sehen ist. Die sprühgetrockneten PLGA-Mikropartikel der Base scheinen zumeist solide zu sein, da nur vereinzelt winzige Löcher zu sehen sind, wie in Abbildung 4.22 A dargestellt ist (4.22 A zeigt die Base und nicht das Salz, die Beschriftung wurde bei der Erstellung der REM Bilder vertauscht).

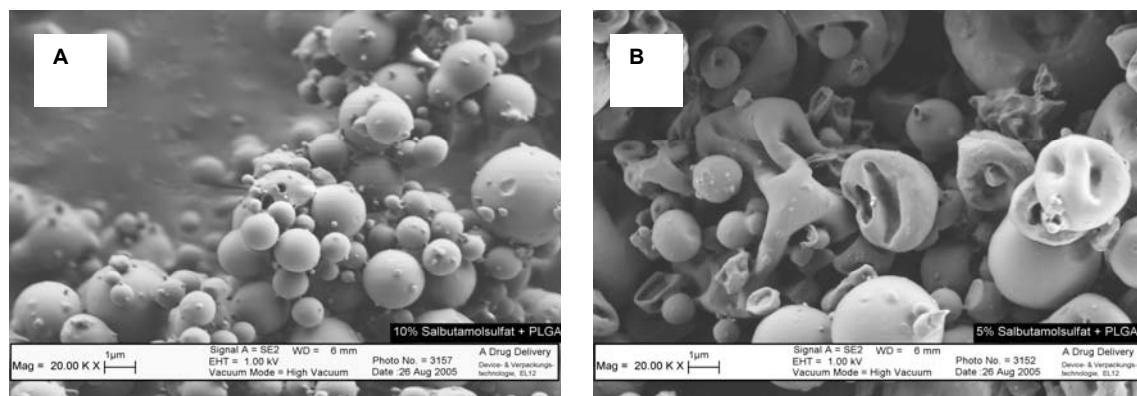


Abbildung 4.22 A 9,1 % Salbutamol mit PLGA B 4,8 % Salbutamolsulfat mit PLGA

#### 4.2.2 Beurteilung der Kristallinität

##### Thermische Analyse: Dynamische Differenz- Kalorimetrie

##### Budesonid

Als Referenz werden zunächst DSC-Scans der Einzelsubstanzen nicht sprühgetrocknet und sprühgetrocknet gefertigt (Abb. 4.23) und anschließend mit den verschiedenen Sprüheinbettungen von Budesonid mit den Polymeren PLA, PLGA und PLGA II verglichen. Bei allen nachfolgenden DSC-Scans wird die Wärmeänderung in mW gegen die Temperatur in °C und die Zeit in Min aufgetragen. Die Zeitspanne, die zwischen der Sprühtrocknung und der Durchführung der DSC-Scans liegt, betrug bis zu 6 Monaten. Die sprühgetrockneten Mikropartikel wurden im Kühlschrank bei einer Temperatur von ca. 4 °C gelagert, um den amorphen Zustand möglichst stabil zu konservieren.

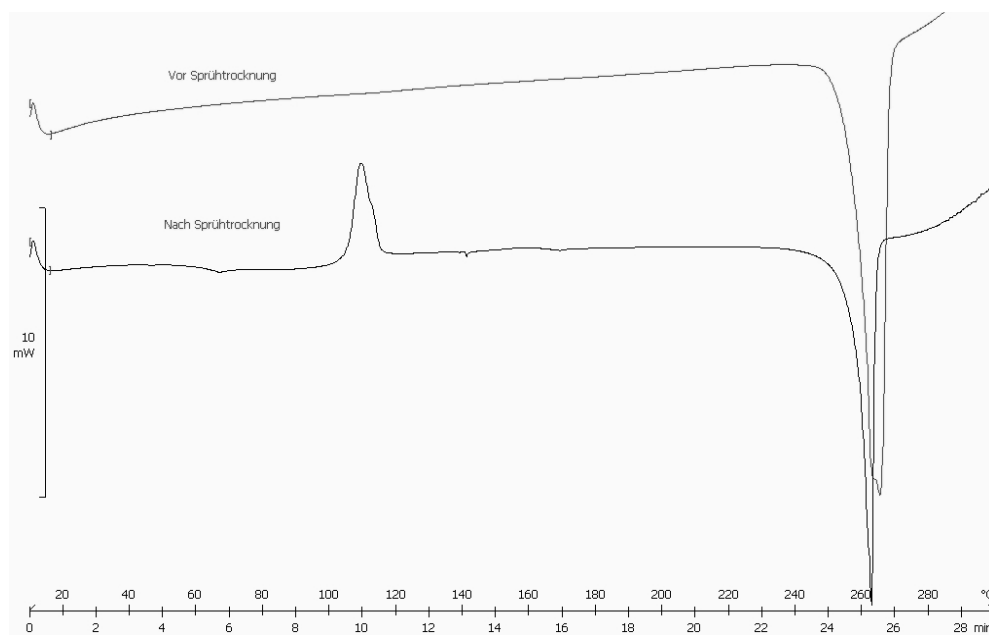


Abbildung 4.23 DSC-Scan von Budesonid vor und nach der Sprühtrocknung

Beim sprühgetrockneten Produkt erscheint zunächst ein Glasübergang bei 65,2 °C. Anschließend erfolgt eine Kaltkristallisation und bei weiterem Aufheizen schmilzt das sprühgetrocknete Budesonid bei 262,3 °C. Der Schmelzpeak erscheint bei geringfügig niedrigerer Temperatur, als beim nicht sprühgetrockneten Budesonid. Aufgrund des ausgeprägten Schmelzpeaks kann davon ausgegangen werden, dass auch nach der Sprühtrocknung teilweise kristallines Material vorliegt.

Beim nicht sprühgetrockneten Budesonid ist ein einzelner, scharfer Peak bei 264,7 °C zu sehen und kein Glasübergang, was auf kristallines Ausgangsmaterial deutet. Im Kommentar Ph. Eur. 1997 (98) ist ein Schmelzbereich für Budesonid mit 221°- 232 °C angegeben. Abweichungen hiervon können methodenbedingt sein.

Im Folgenden werden die Polymere PLA, PLGA und PLGA II hinsichtlich ihrer Kristallinität charakterisiert.

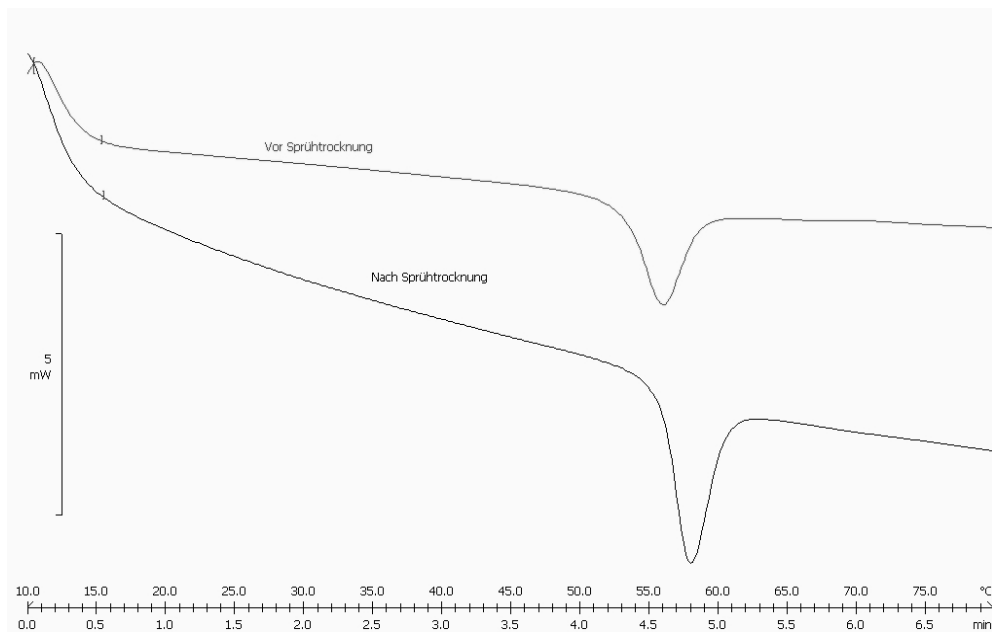


Abbildung 4.24 DSC-Scan von PLA vor und nach der Sprühtrocknung

Im DSC-Scan der Abbildung 4.24 ist zu erkennen, dass das nicht sprühgetrocknete PLA eine Glasübergangstemperatur von 52,3 °C aufweist, das sprühgetrocknete Produkt hat einen geringfügig höheren Glasübergang von 55,4 °C. Dies ist damit erklärbar, dass im nicht sprühgetrockneten PLA anscheinend noch Restlösemittel von der Herstellung vorhanden ist, welches als Weichmacher die Glasübergangstemperatur senkt.

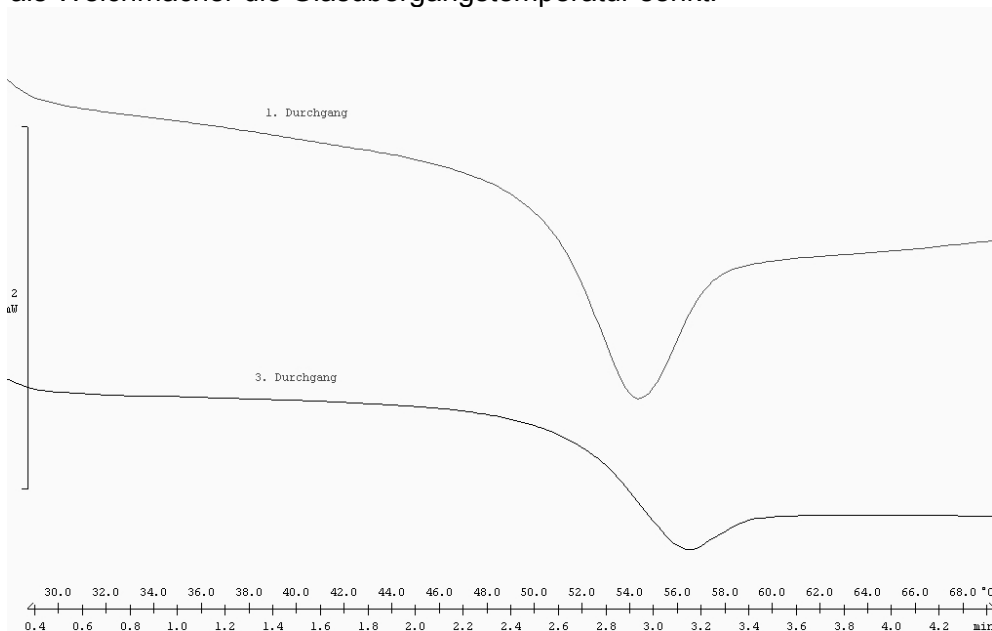


Abbildung 4.25 DSC-Scan nach 3-fachem Erhitzen der Glasstufe des sprühgetrockneten PLA

PLA wird zur genaueren Untersuchung des Glasübergangs einem DSC-Zyklus unterworfen, der aus dreimaligem Durchlaufen der Glasübergangstemperatur besteht und die Reversibilität der Stufe untersucht. Der durchlaufene Temperaturbereich liegt zwischen +25 °C und +70 °C. Abbildung 4.25 zeigt den ersten und den dritten Durchlauf. Die Glasübergangstemperatur zeichnet sich dadurch aus, dass sie in einem Wiederholungszyklus von Aufheiz- und Abkühlphasen umkehrbar ist. Der Glasübergang ist

auch nach dem dritten Durchlauf der Glasübergangstemperatur noch sichtbar. Dies ist der Beweis dafür, dass PLA amorph vorliegt. Die Glasübergangstemperatur beträgt beim ersten Aufheizlauf 50,3 °C. Je höher die Anzahl der durchlaufenen Zyklen, desto höher liegt auch die Temperatur der Glasumwandlung, wie im obigen DSC-Scan des dritten Wiederholungszyklus mit einer Glasübergangstemperatur von 52,5 °C zu sehen ist. Dies folgt aus der Tatsache, dass durch das Erwärmen der Probe immer mehr Restlösungsmittel verdunstet und die molekulare Mobilität der Polymerketten zunehmend erschwert wird. Die Relaxation, die im Polymer stattfindet, ist in Form der abnehmenden Kurventiefe nach dem dritten Durchlauf zu sehen. Hancock et al. (70) beschrieben das Auftreten von Relaxation bei amorphem Material nach Lagerung unterhalb der Glasübergangstemperatur. Durch die Lagerung der Mikropartikel findet eine Annäherung des metastabilen Zustandes an den thermodynamisch stabileren Gleichgewichtszustand statt (= Relaxation). Beim nochmaligen Erhitzen wird diese Veränderung in Form eines Relaxationspeaks in der Nähe der Glasübergangsstufe detektiert.

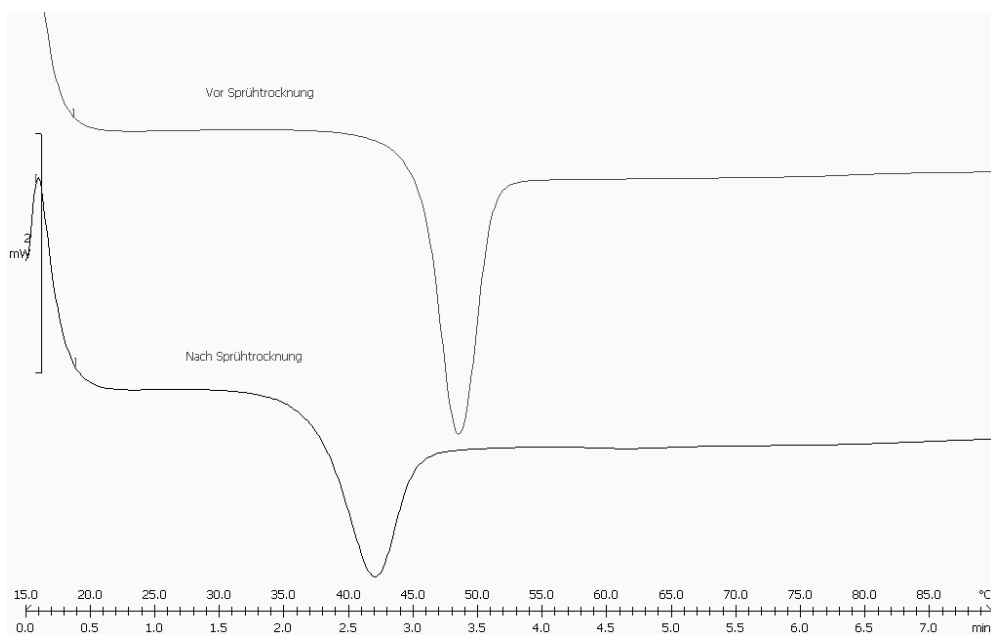


Abbildung 4.26 DSC-Scan von nicht sprühtrocknetem und sprühtrocknetem PLGA

Das Polymer PLGA zeigt sowohl in nicht sprühtrocknetem, wie auch in sprühtrocknetem Zustand eine Glasübergangsstufe, deren Temperatur durch die Sprühtrocknung und die damit verursachte höhere Mobilität der Polymerketten von 44,1 °C auf 37,2 °C absinkt. Jalil et al. (83) untersuchten PLA und stellten bei diesem Polymer eine geringere Glasübergangstemperatur nach der Sprühtrocknung fest und vermuteten die Ursache in dem Vorhandensein von Restlösungsmittel.

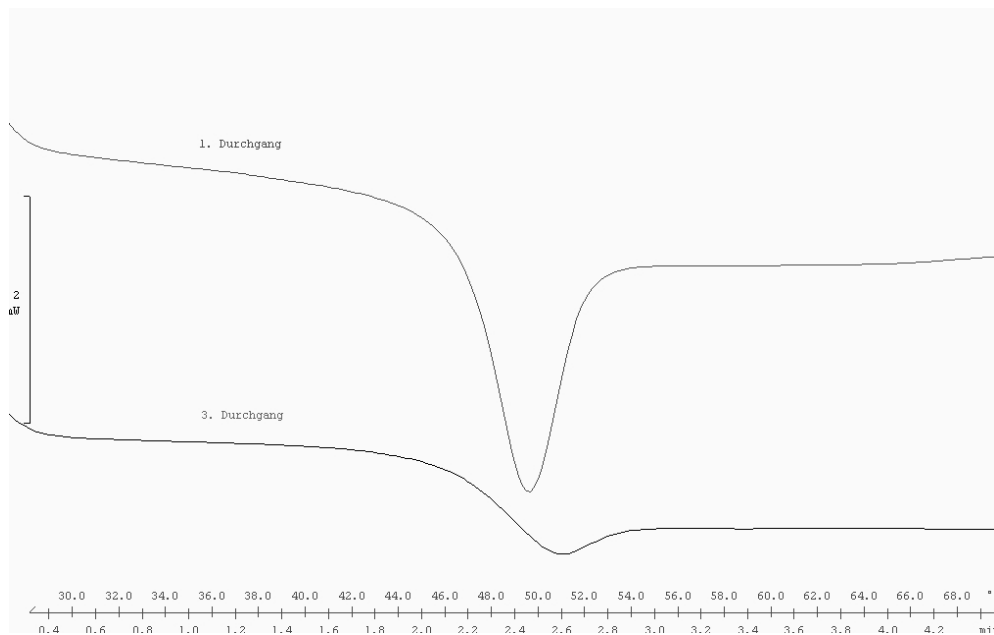


Abbildung 4.27 DSC-Scan nach 3-fachem Erhitzen der Glasstufe des sprühtrockneten PLGA

PLGA wird ebenfalls einem DSC-Zyklus unterworfen, der aus mehrmaligen Aufheiz- und Abkühlphasen besteht und sich über einen Temperaturbereich von 25 °C bis 70 °C erstreckt. Beim ersten Durchlauf beträgt die Glasübergangstemperatur 45,6 °C, nach dem 3. Durchlauf beträgt diese 47,5 °C. Diese Tatsache kann wiederum auf die erschwerte Mobilität der Polymerketten durch vermehrte Restlösungsmittelverdunstung während der wiederholten Aufheizphasen zurückgeführt werden. Die Stufe des Glasübergangs liegt auch nach dem dritten Durchlauf noch vor, was auf das amorphe Vorliegen von PLGA zurückzuführen ist. Auch bei PLGA ist eine Relaxation sichtbar (Abbildung 4.27).

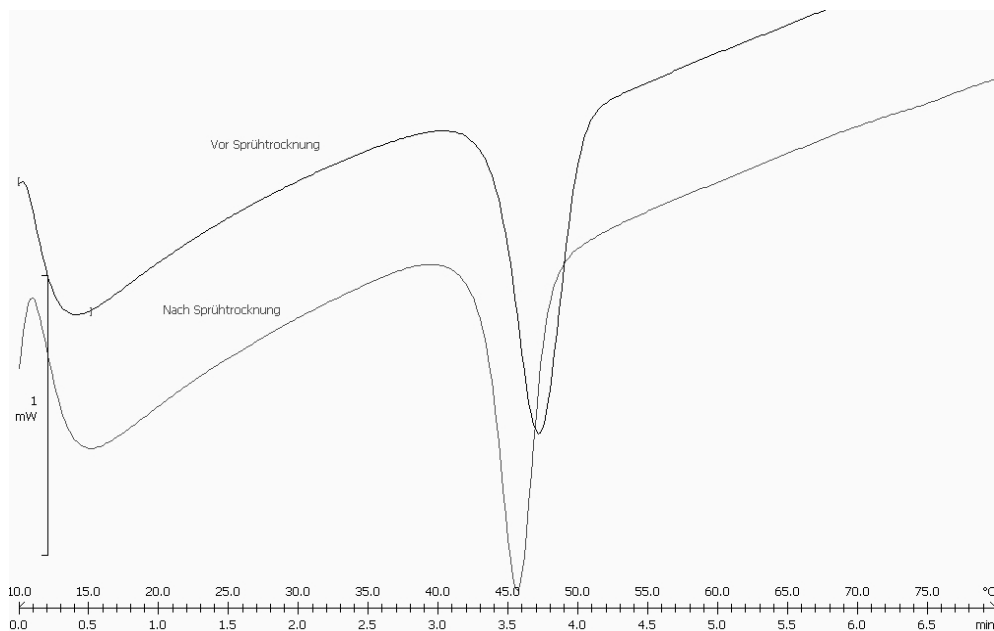


Abbildung 4.28 DSC-Scan von nicht sprühtrocknetem und sprühtrocknetem PLGA II



Das Polymer PLGA II zeigt in beiden DSC-Scans einen Glasübergang, der jedoch aufgrund der Sprühtrocknung von 47,1 °C auf 45,6 °C absinkt.

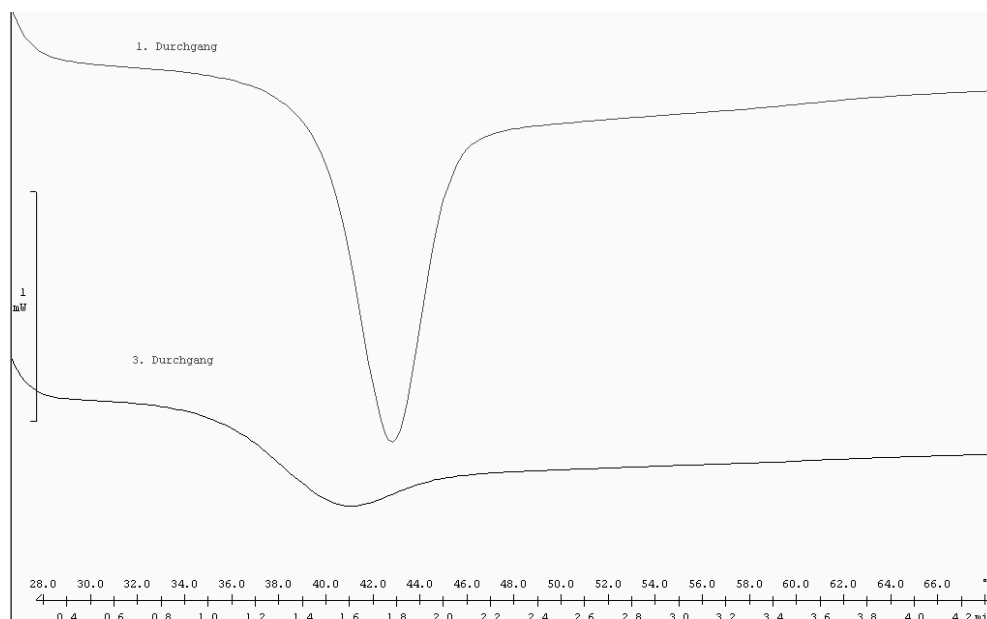


Abbildung 4.29 DSC-Scan nach 3-fachem Erhitzen der Glasstufe des sprühtrockneten PLGA II

PLGA II wird in mehreren Aufheiz- und Abkühlphasen im Temperaturbereich von 25 °C bis 70 °C einem DSC-Zyklus unterworfen. Die Glasübergangstemperatur beträgt nach dem ersten Durchlauf 38,6 °C und 37,2 °C nach dem dritten Durchlauf. Die Glasübergangsstufe tritt nach dem dritten Durchlauf immer noch auf, was der Beweis des amorphen Vorliegens des PLGA II ist. Die Relaxation ist bei PLGA II sehr schön zu sehen, d.h. es findet eine Annäherung des metastabilen Zustandes an den thermodynamisch stabileren Gleichgewichtszustand statt. Diese Veränderung wird bei erneutem Erhitzen in Form eines Relaxationspeaks in der Nähe des Glasübergangs detektiert. Die Stufe in der Basislinie ist reversibel, was ein Charakteristikum einer Glasübergangsstufe ist.

Für die eingesetzten Polymere scheinen rein kristalline Formen nicht zugänglich zu sein, da die Ausrichtung der Makromoleküle eine Fernordnung, vergleichbar einem Kristall, nicht zulässt (181). Bei den untersuchten Polymeren konnte ein Schmelz- oder Kristallisationspeak weder im Ausgangsmaterial, noch nach der Sprühtrocknung detektiert werden. Ist kein energetisch günstigerer kristalliner Zustand zugänglich, wie bei diesen Polymeren, ist das Bestreben zu einer strukturellen Umwandlung aus dem amorphen in den kristallinen Zustand nicht vorhanden (181).

Tabelle 4.7 Vergleich der gemessenen Glasübergangstemperaturen der Polymere mit Literaturwerten

Substanz	Gemessene Tg [°C]	Theoretische Tg [°C]	Literaturangabe
PLA (s.-d)	52,30 (50,3- 55,36)	50,0- 60,0	(133)
PLGA (s.-d)	44,19 (37,0- 47,50)	46,4- 49,2	(143)
PLGA II (s.-d.)	37,99 (37,2- 47,90)	34,5	(187)

In Tabelle 4.7 sind die Literaturangaben der Glasübergangstemperaturen in Klammern hinter den tatsächlich gemessenen Werten aufgeführt. Zhou et al. (187) vermuteten, dass die Abnahme der Glasübergangstemperatur durch den steigenden Glykolidanteil im Polymer verursacht wird. Die gemessenen Glasübergangstemperaturen stimmen mit Literaturwerten überein, wie Tabelle 4.7 zeigt. Geringe Abweichungen können methodenbedingt, wie z.B.

Differenzen in der Heizrate, erklärt werden. Zunächst wird in Abbildung 4.30 s.-d. Budesonid, s.-d. PLA und eine Sprüheinbettung mit 44,4 % Budesonid in PLA mittels DSC untersucht.

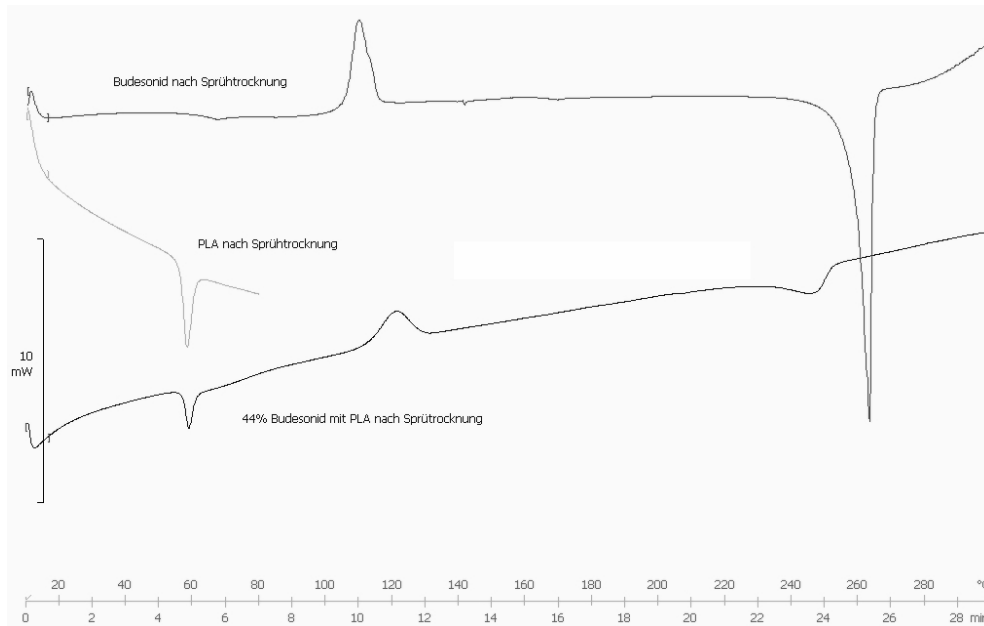


Abbildung 4.30 DSC-Scan von s.-d. Budesonid, s.-d. PLA und s.-d. Mischung von 44 % Budesonid mit PLA

Bei der Sprüheinbettung tritt ein Glasübergang bei einer Temperatur von 57,75 °C auf, der dem PLA (als Reinsubstanz bei 55,1 °C) zuzuordnen ist, anschließend erfolgt eine Kaltkristallisation. Der Schmelzpeak des Budesonids bei 262,3 °C erscheint in der Sprüheinbettung nicht mehr. Eine leichte endotherme Veränderung ist bei 246,9 °C zu sehen, die von der Schmelze der vorhergehenden Kaltkristallisation kommt. Es kann davon ausgegangen werden, dass Budesonid in der Sprüheinbettung amorph vorliegt. Auch Forbes (58) geht von amorphen Produkten nach der Sprühtrocknung aus. Wichert (183) der das Steroid Beclomethason mit Hilfe der Lösungsmittelverdampfungs- und Extraktionsmethode in PLA einbettete, konnte mittels DSC ebenfalls nachweisen, dass Beclomethason gelöst in PLA vorliegt.

Abbildung 4.31 gibt Aufschluss darüber, wie sich die anderen Sprüheinbettungen von Budesonid und PLA thermodynamisch verhalten.

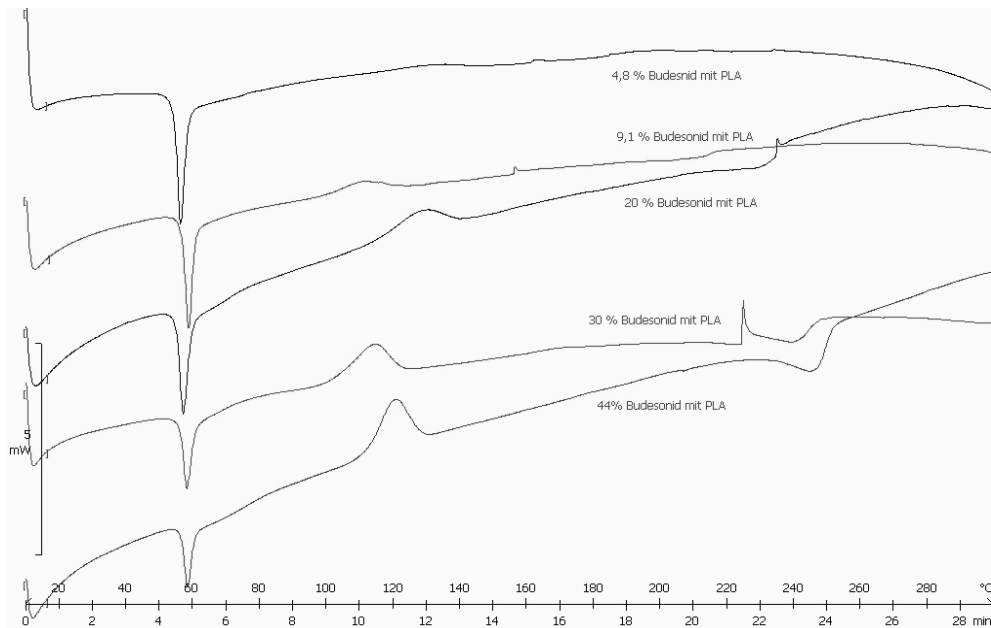


Abbildung 4.31 DSC-Scans der Sprüheinbettungen von 4,8 %, 9,1 %, 20 %, 30 %, 44,4 % Budesonid mit PLA

Die Beladungen von 4,8 %, 9,1 %, 20 %, 30 % und 44,4 % Budesonid mit PLA zeigen alle im Temperaturbereich von 54 °C bis etwa 60 °C eine Glasübergangsstufe. Aus vorherigen Einzelmessungen des Polymers PLA ergibt sich, dass dies der Glasübergangstemperatur von PLA entspricht. Anschließend erfolgt, außer bei 4,8 % Budesonidanteil, eine leichte exotherme Veränderung, eine Kaltkristallisation, und anschließender Übergang in die Schmelze oder in Zersetzungseffekte, die vor allem ab 20 % Budesonidanteil im DSC zu erkennen sind. Bei Beladungen ab 20 % treten zusätzliche Effekte auf, wie eine leichte exotherme Verschiebung der Basislinie im Temperaturbereich ab 75 °C. Der klar definierte Schmelzpeak des Budesonids erscheint in den sprühgetrockneten Mischungen mit PLA nicht mehr. Budesonid scheint demnach in PLA als feste Lösung vorzuliegen. Eine Überprüfung dieser DSC Ergebnisse wird im folgenden Abschnitt mittels röntgenpulverdiffraktometrischen Messungen vorgenommen.

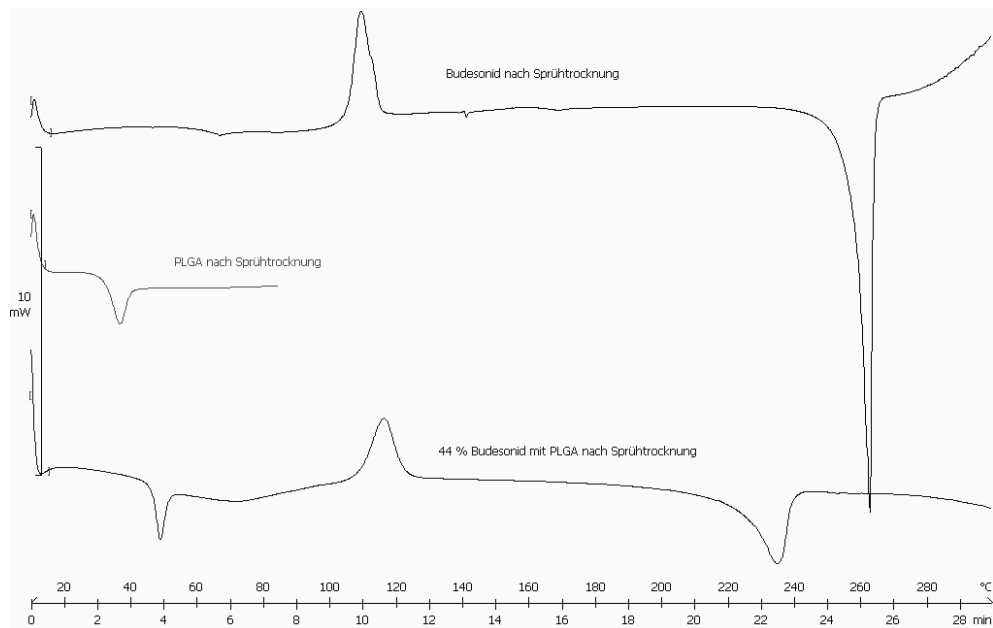


Abbildung 4.32 DSC-Scan von s.-d. Budesonid, s.-d. PLGA und Sprüheinbettung von 44 % Budesonid mit PLGA

Bevor alle Sprüheinbettungen von Budesonid mit PLGA thermodynamisch untersucht werden, erfolgt zuerst ein Vergleich der 44,4 % Sprüheinbettung mit den beiden Einzelsubstanzen Budesonid und PLGA. Es treten die gleichen Effekte auf, z.B. ein Glasübergang, der mit einer Temperatur von 44,9 °C dem PLGA zuzuordnen ist und dem sich eine Kaltkristallisation anschließt. Der Schmelzpeak des Budesonids bei 262,3 °C ist nicht zu sehen, die endotherme Veränderung bei 234,6 °C ist der Schmelze der vorhergehenden Kaltkristallisation zuzuschreiben. Budesonid scheint nach der Sprühtrocknung mit PLGA in diesem gelöst vorzuliegen. In Abbildung 4.33 sind die Ergebnisse der anderen Budesonid-PLGA Sprüheinbettungen zusammengefasst.

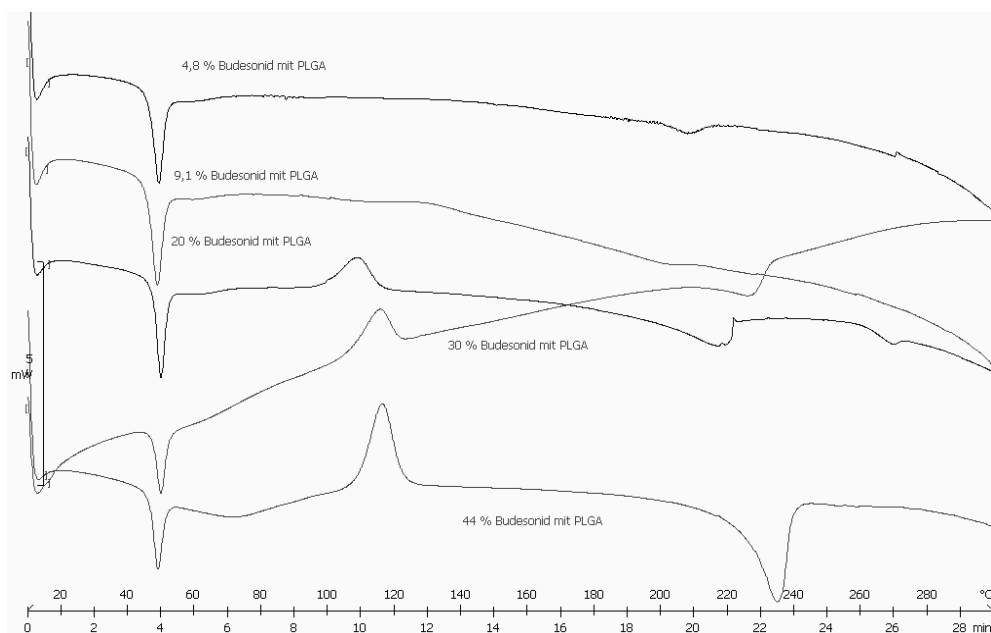


Abbildung 4.33 DSC-Scans der Sprüheinbettungen von 4,8 %, 9,1 %, 20 %, 30 %, 44 % Budesonid mit PLGA

Auch bei den Budesonid-PLGA Sprüheinbettungen sind bei allen Beladungen Glasübergänge im Temperaturbereich von 45,1 °C bis 46,1 °C deutlich erkennbar, die aufgrund vorheriger Einzelmessungen des Polymeres PLGA auf dessen Glasübergang schließen lassen. Auch hier erfolgt, außer bei 4,8 % und 9,1 % Beladung, eine leichte exotherme Veränderung, eine Kaltkristallisation, die im Temperaturbereich von 108,7 °C bis 116,4 °C auftritt. Dieser folgt eine endotherme Veränderung im Bereich von 217,2 °C bis 234,6 °C ab 20 % Budesonidanteil, der von der Schmelze der Kaltkristallisation stammt. Bei 30 % Beladung tritt ab 80 °C eine exotherme Verschiebung der Basislinie auf. Budesonid scheint, wie in PLA, auch in PLGA amorph, d.h. als feste Lösung, vorzuliegen. Eine Überprüfung dieser Ergebnisse erfolgt mittels Röntgenpulverdiffraktometrie, deren Resultate im nächsten Abschnitt beschrieben sind.

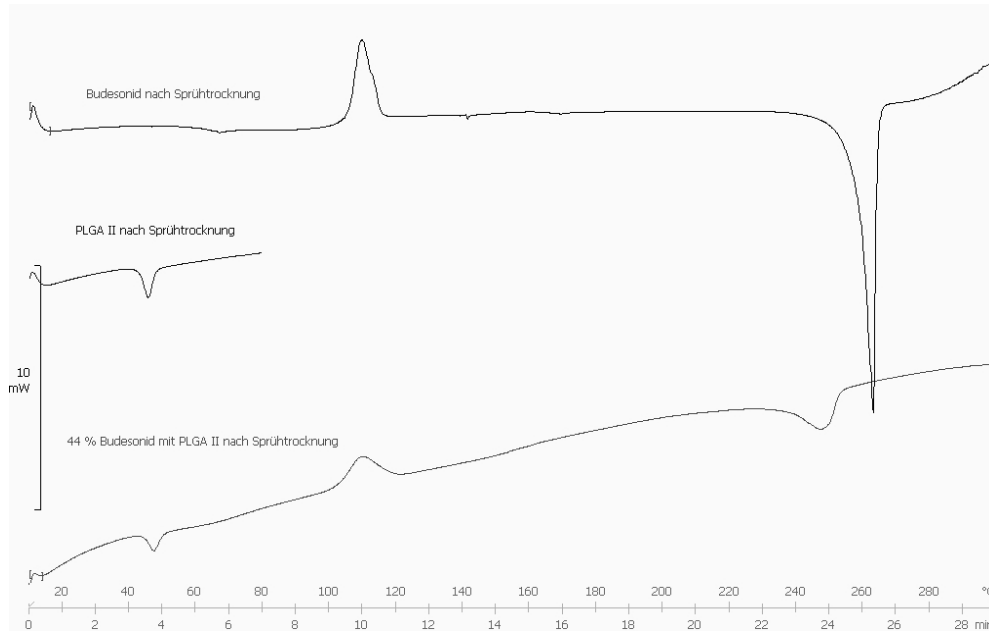


Abbildung 4.34 DSC-Scan von s.-d. Budesonid, s.-d. PLGA II und Sprüheinbettung von 44 % Budesonid mit PLGA II

Mit PLGA II wird analog verfahren wie mit den beiden anderen Polymeren PLA und PLGA. Die Sprüheinbettung mit 44,4 % Budesonid wird zunächst mit den beiden Einzelsubstanzen verglichen. Die Mischung zeigt einen Glasübergang bei 48,1 °C, der dem des reinen PLGA II mit 47,9 °C zuzuordnen ist. Anschließend erfolgt eine Kaltkristallisation, der sich eine leichte endotherme Veränderung bei 247,8 °C anschließt, die von der Schmelze der Kaltkristallisation stammt. Auch bei PLGA II erscheint der klar abgegrenzte Schmelzpeak des Budesonids bei 262,3 °C nicht mehr, so dass auch hier von einer festen Lösung von Budesonid in PLGA II ausgegangen werden kann.

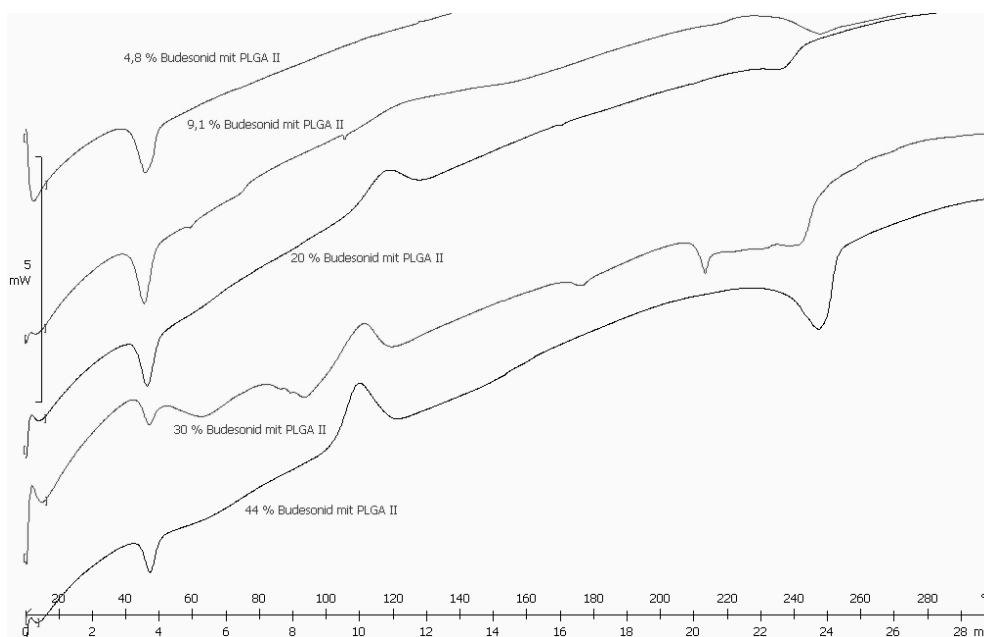


Abbildung 4.35 DSC-Scans der Sprüheinbettungen von 4,8 %, 9,1 %, 20 %, 30 %, 44 % Budesonid mit PLGA II

DSC-Scans des Polymers PLGA II mit den hergestellten Budesonid Sprüheinbettungen zeigen deutlich Glasübergänge im Temperaturbereich von 38,8 °C bis etwa 47 °C, die durch das PLGA II verursacht werden, wie in separaten Messungen des Polymers als Monosubstanzen untersucht wurde. Nach der anschließenden exothermen Kaltkristallisation ab 20 % Budesonidanteil in PLGA II im Bereich von 109,8 °C bis 117,5 °C sind die Peaks der Schmelzen sichtbar. Hier tritt die exotherme Verschiebung der Basislinie (Drift) auch bereits bei geringen Beladungen ab 55 °C auf. Dies wird nur deutlich, da es aufgrund der kleinen thermischen Effekte zu einer geringeren Spreizung der y- Achse (in mW) kommt. Bei großen mW Bereichen, z.B. bei einem Schmelzpeak, relativiert sich die Basislinie wieder und der Drift ist nicht sichtbar.

Bei Verwendung der sprühgetrockneten Budesonid-Polymer Mikropartikel erhält man eine molekulardisperse Verteilung des Arzneistoffs in allen drei Polymeren, d.h. eine feste Lösung mit amorphem Aufbau. Das polymere Trägermaterial übernimmt die Rolle des Lösungsmittels und kann eine bestimmte Menge der zu lösenden Substanz molekulardispers aufnehmen. Es gibt nur einen amorphen Zustand, im Gegensatz zu kristallinen festen Lösungen, die aus niedermolekularen und makromolekularen Substanzen gebildet werden (12). Abschließende röntgendiffraktometrische Untersuchungen der Sprüheinbettungen folgen im nächsten Abschnitt.

#### *Salbutamol und Salbutamolsulfat*

Salbutamol und Salbutamolsulfat werden zunächst als sprühgetrocknete und nicht sprühgetrocknete Einzelsubstanzen thermodynamisch mittels DSC-Scans vermessen, um anschließend Vergleiche mit den Sprüheinbettungen anstellen zu können. Bei allen nachfolgenden DSC-Scans wird die Wärmeänderung in mW gegen die Temperatur in °C und die Zeit in Min aufgetragen. Die DSC-Scans werden bis zu einem Monat nach Herstellung der Mikropartikel mittels Sprühtrocknung angefertigt. Die Mikropartikel sind bis zur DSC Untersuchung dicht verschlossen und vor Licht geschützt bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt worden.

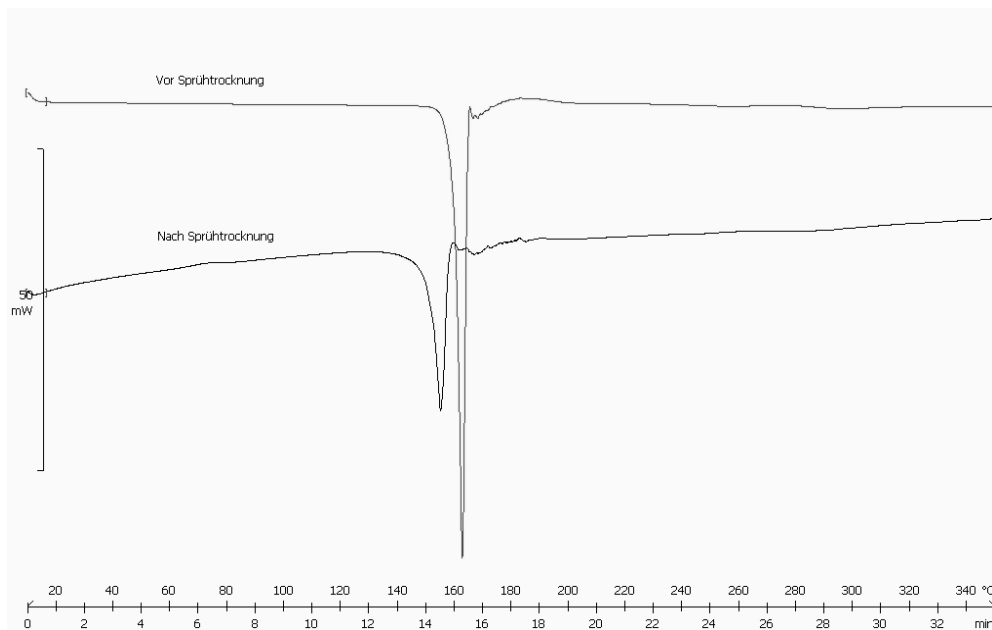


Abbildung 4.36 DSC-Scan von nicht sprühgetrocknetem und sprühgetrocknetem Salbutamol

Wie aus dem DSC-Scan ersichtlich ist, besitzt auch das sprühgetrocknete Salbutamol einen definierten Schmelzpunkt, der sich mit 154,5 °C unwesentlich vom nicht sprühgetrockneten Salbutamol mit 159,5 °C unterscheidet. Es liegt somit auch nach der Sprühtrocknung kristallin vor. Auch die Vergrößerung des Temperaturbereichs von 25 °C bis 120 °C ergab keinen Hinweis auf das Vorliegen eines Glasübergangs. Dies kann möglicherweise mit der Herstellungsweise erklärt werden, da Salbutamol nicht mit Dichlormethan, sondern mit Wasser versprüht wurde und das Lösungsmittel einen Einfluss auf die Kristallinität zu haben scheint, wie bereits im Abschnitt 4.2.1 Partikelgrößenanalyse und Pulvermorphologie für Salbutamol erklärt wurde. Eventuell fand aber auch schon eine Umkristallisation im Zeitraum zwischen Herstellung und Messung statt.

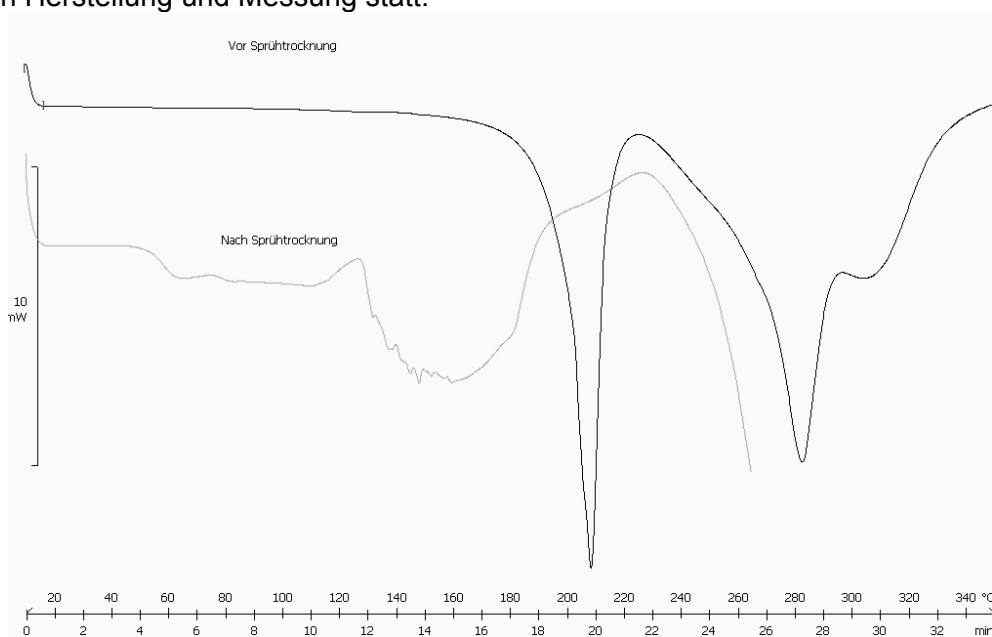


Abbildung 4.37 DSC-Scan von nicht sprühgetrocknetem und sprühgetrocknetem Salbutamolsulfat

Der DSC-Scan in Abbildung 4.37 zeigt bei nicht sprühgetrocknetem Salbutamolsulfat einen scharfen Peak bei 207,8 °C. Celebi (34) untersuchte den physikalischen Status von Salbutamolsulfat in PLGA (85:15) mittels DSC und fand ebenfalls einen Salbutamolsulfat Schmelzpeak bei 202 °C vor der Sprühtrocknung. Im Gegensatz zum sprühgetrockneten Salbutamol ist das sprühgetrocknete Salbutamolsulfat amorph. Dies ist in Übereinstimmung mit der von Chawla (37) beschriebenen Beobachtung, dass Salbutamolsulfat nach der Sprühtrocknung amorph vorliegt. Der Glasübergang liegt bei 72,5 °C. Oberhalb der Glasstufe und teilweise deutlich über 120 °C erfolgt die Zersetzung.

Tabelle 4.8 Vergleich der gemessenen Schmelzpunkte von Salbutamol und Salbutamolsulfat mit Literaturwerten

Substanz	Gemessener Smp. [°C]	Theoretischer Smp. [°C]	Literaturangabe
Salbutamol (s.-d.)	159,6 (154,45)	155	(99)
Salbutamolsulfat (s.-d.)	207,8 (73,00)	202	(34)

Die Literaturangaben in Tabelle 4.8 sind in Klammern hinter den tatsächlich gemessenen Werten geschrieben.

Die gemessenen Schmelzpunkte von Salbutamol und Salbutamolsulfat sind mit den Werten in der Literatur vergleichbar. Geringe Unterschiede ergeben sich aus geräte- und versuchsspezifischen Parametern.

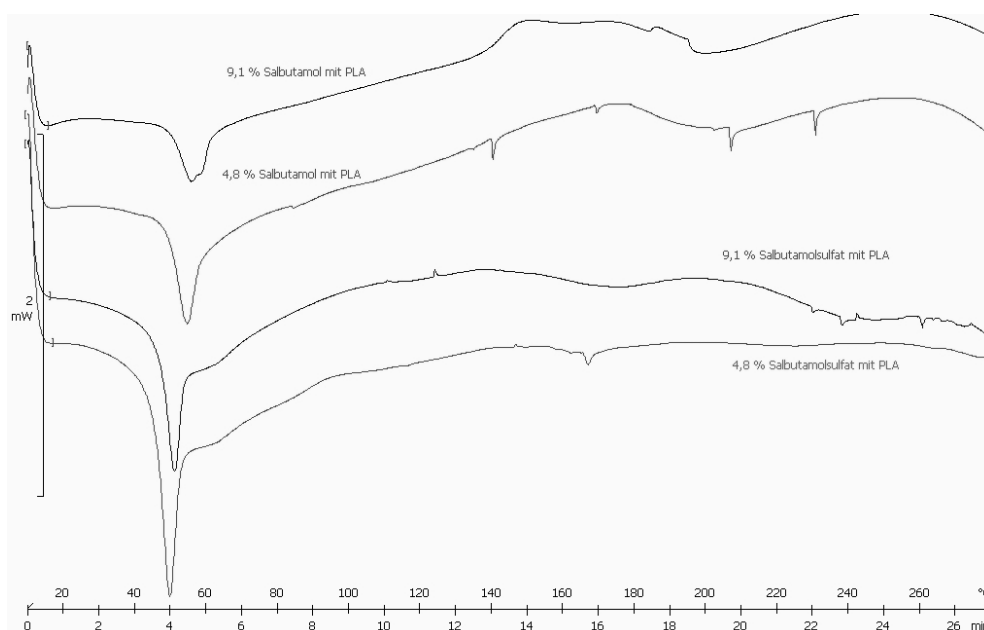


Abbildung 4.38 DSC-Scan der Sprüheinbettungen von 4,8 % und 9,1 % Salbutamol und Salbutamolsulfat mit PLA

Sowohl die 4,8 % igen Sprüheinbettungen, als auch die 9,1 % igen Sprüheinbettungen mit PLA zeigen Glasübergangsstufen im Temperaturbereich von 44,2 °C bis 51,06 °C, die dem PLA mit 55,1 °C zuzuordnen sind. In den Sprüheinbettungen werden weder von Salbutamol noch von Salbutamolsulfat Schmelzpeaks detektiert. Die beiden Substanzen scheinen nach der Sprühtrocknung amorph vorzuliegen, d.h. in PLA gelöst. Der Grund kann im Vorhandensein des Polymers zu suchen sein, da Salbutamol als Reinsubstanz nach Versprühung als Suspension in Wasser kristallin vorliegt und die ebenfalls als Suspension,



aber mit Dichlormethan, sprühgetrockneten Salbutamol-Polymer Mischungen amorph vorliegen. Das Polymer scheint das amorphe Vorliegen der Sprüheinbettungsprodukte zu fördern. Es werden anschließend röntgenpulverdiffraktometrische Untersuchungen von allen Sprüheinbettungen gemacht, da dieses Verfahren kristalline oder amorphe Arzneistoffanteile ab etwa 4,5 % erkennt. Die Ergebnisse sind im nächsten Abschnitt beschrieben.

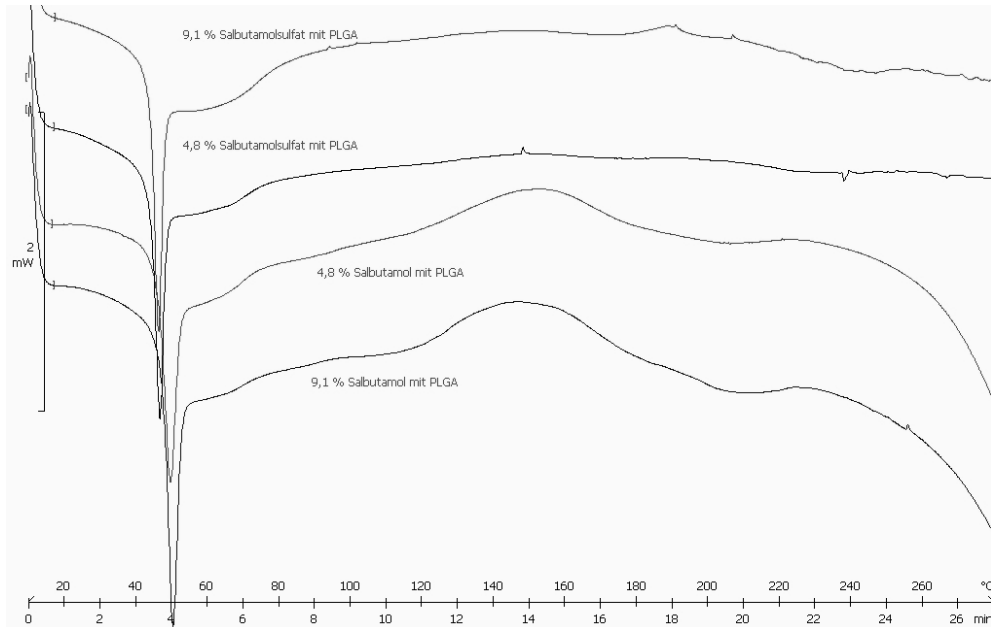


Abbildung 4.39 DSC-Scan der Sprüheinbettungen von 4,8 % und 9,1 % Salbutamol und Salbutamolsulfat mit PLGA

Sprühgetrocknete Mischungen von Salbutamol und Salbutamolsulfat mit 4,8 % und 9,1 % Arzneistoffanteil in PLGA zeigen die gleichen Effekte wie mit PLA. Alle untersuchten Sprüheinbettungen zeigen Glasübergänge im Bereich von 42,8 °C bis 45,9 °C, die vom PLGA stammen. Die Schmelzpeaks der Arzneistoffe treten nicht auf, so dass auch bei diesem Polymer von einer festen Lösung ausgegangen werden kann, in der Salbutamol und Salbutamolsulfat gelöst in PLGA vorliegen. Dies ist in Übereinstimmung mit den von Celebi (34) durchgeführten Untersuchungen von Salbutamolsulfat in PLGA (85:15), bei denen der Schmelzpeak von Salbutamolsulfat nicht mehr auftrat und nur noch der Glasübergang des Polymers detektiert wurde. Sie schloss daraus, dass Salbutamolsulfat in amorpher Form in den Mikropartikeln vorliegt. Die Röntgenpulverdiffraktometrie gibt zusätzlich Aufschluss über das thermodynamische Vorliegen von Salbutamol und Salbutamolsulfat in PLGA.

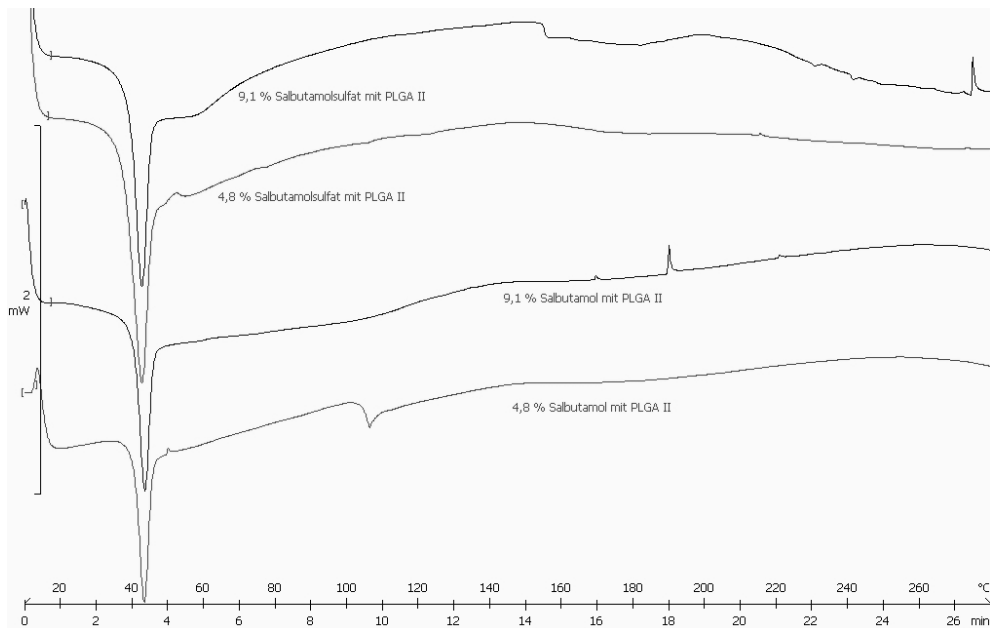


Abbildung 4.40 DSC-Scan der Sprüheinbettungen von 4,8 % und 9,1 % Salbutamol und Salbutamolsulfat mit PLGA II

Die Sprüheinbettungen von 4,8 % und 9,1 % Salbutamol und Salbutamolsulfat in PLGA II werden ebenfalls mittels DSC auf ihre Kristallinität untersucht. Bei allen Sprüheinbettungen treten Glasübergänge des PLGA II im Bereich von 36,7 °C bis 38,4 °C auf. Da die Schmelzpeaks der Arzneistoffe nicht zu sehen sind, wird davon ausgegangen, dass Salbutamol und Salbutamolsulfat nach der Sprühtrocknung mit PLGA II amorph vorliegen. Wie bei den anderen Polymeren auch, werden röntgenpulverdiffraktometrische Analysen durchgeführt.

Die Untersuchung der Kristallinität der sprühgetrockneten Salbutamol und Salbutamolsulfat-Polymer Mikropartikel mittels DSC ergibt eine molekulardispere Verteilung des Arzneistoffs in allen drei Polymeren, d.h. eine feste Lösung mit amorphem Aufbau. Das polymere Trägermaterial übernimmt die Rolle des Lösungsmittels und kann eine bestimmte Menge der zu lösenden Substanz molekulardispers aufnehmen, wie mit den Filmversuchen in Petrischalen vorhergesagt wurde.

## Röntgenpulverdiffraktometrie

### Budesonid

Um die Ergebnisse der DSC Untersuchungen zu bestätigen, werden auszugswise die Beladungen 4,8 % und 44,4 % Budesonid mit den drei verschiedenen Polymeren PLA, PLGA und PLGA II röntgendiffraktometrisch auf das Vorliegen einer amorphen Form überprüft.

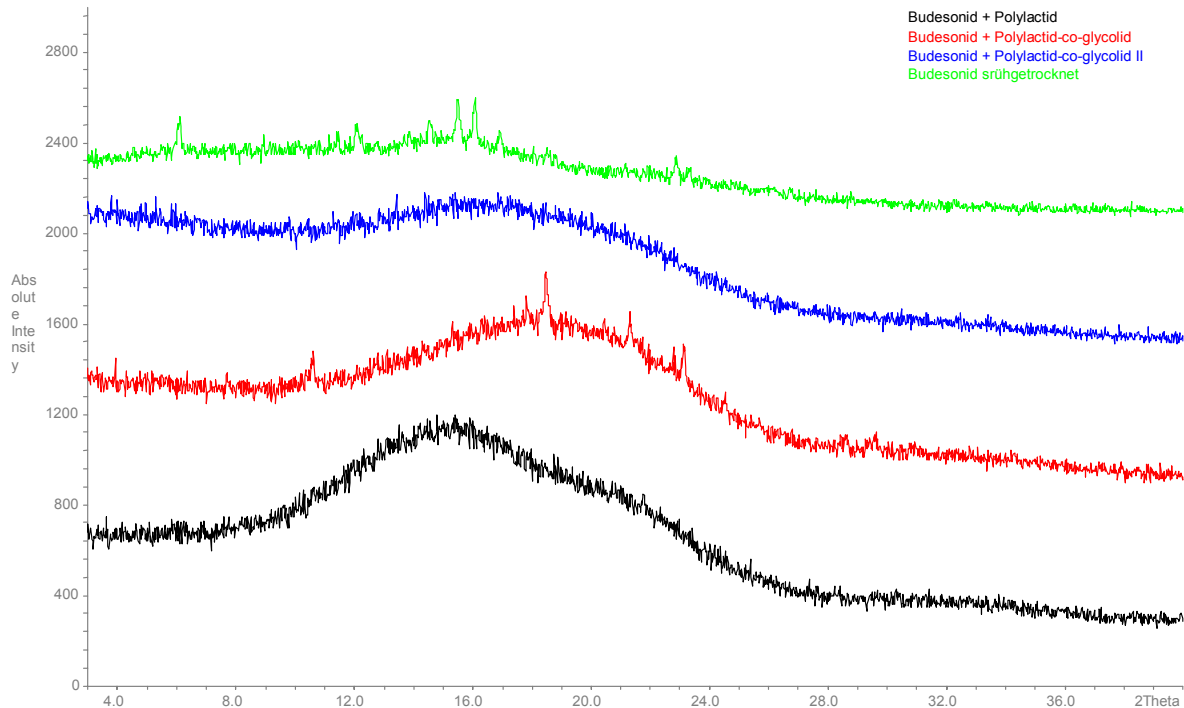


Abbildung 4.41 Röntgendiffraktometrischer Scan von sprühtrocknetem Budesonid und sprüheingebettetem Budesonid (4,8 %) mit PLA, PLGA und PLGA II

Die Diagramme der amorphen Mischungen zeigen ein breites diffuses Maximum ohne Auflösung der Peaks (Abb. 4.41). Mittels Röntgendiffraktometrie können somit die Ergebnisse der DSC Untersuchungen bestätigt werden, dass durch Sprüheinbettung ein komplett amorpher Wirkstoff erhalten wird.

Sowohl bei sprüheingebettetem Budesonid, als auch bei der 4,8 % Sprüheinbettung mit PLA, PLGA und PLGA II ist jeweils ein breites diffuses Maximum ohne Auflösung der einzelnen Peaks sichtbar, was charakteristisch für amorphes Material ist.

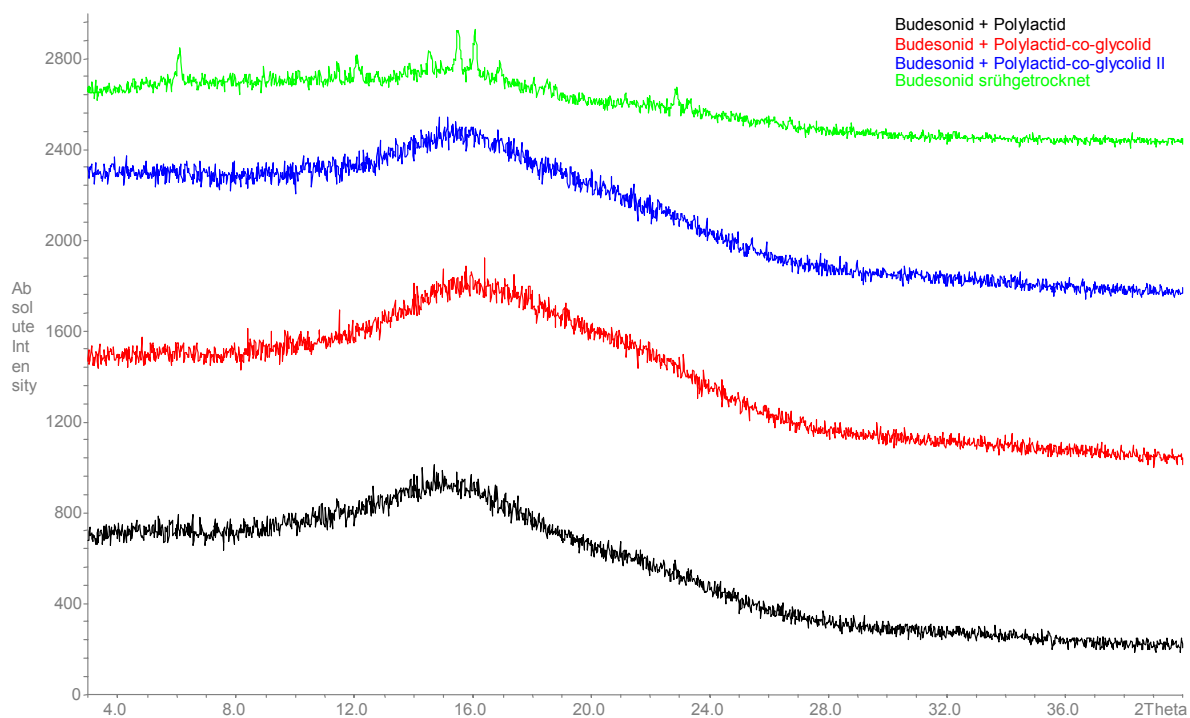


Abbildung 4.42 Röntgendiffraktometrischer Scan von sprühtrocknetem Budesonid und sprüheingebettetem Budesonid (44,4 %) mit PLA, PLGA und PLGA II

Auch 44,4 % Budesonid in PLA, PLGA und PLGA II zeigen im röntgendiffraktometrischen Scan jeweils breite diffuse Maxima. Die Ergebnisse der röntgendiffraktometrischen Untersuchungen sind in Tabelle 4.9 zusammengestellt. Alle untersuchten Proben sind röntgendiffraktometrisch amorph.

Tabelle 4.9 Ergebnisse der Röntgenpulverdiffraktometrie der Sprüheinbettungen von 4,8 % und 44,4 % Budesonid mit den Polymeren PLA, PLGA und PLGA II

Probe	Ergebnis
100 % Budesonid	(röntgen-) amorph
4,8 % Budesonid mit PLA	(röntgen-) amorph
4,8 % Budesonid mit PLGA	(röntgen-) amorph
4,8 % Budesonid mit PLGA II	(röntgen-) amorph
44,4 % Budesonid mit PLA	(röntgen-) amorph
44,4 % Budesonid mit PLGA	(röntgen-) amorph
44,4 % Budesonid mit PLGA II	(röntgen-) amorph

Im Rahmen der Beurteilung der Kristallinität ergibt sich eine interessante Aussage bezüglich der Stabilität der sprühtrockneten Mikropartikel, da die röntgendiffraktometrische Untersuchung der Mikropartikel bis zu 12 Monate nach der Sprühtrocknung erfolgt. Die Lagerung der Pulver erfolgte in Plastikbeuteln, die feuchtigkeits- und lichtgeschützt im

Kühlschrank bei einer Temperatur von ca. 4 °C aufbewahrt wurden. Der amorphe Zustand ist bei dieser Lagerung über einen Zeitraum von mindestens einem Jahr stabil.

### Salbutamol

Salbutamol einer Konzentration von 4,8 % in PLA, PLGA und PLGA II wird röntgendiffraktometrisch auf dessen Kristallinität untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.43 zusammengestellt.

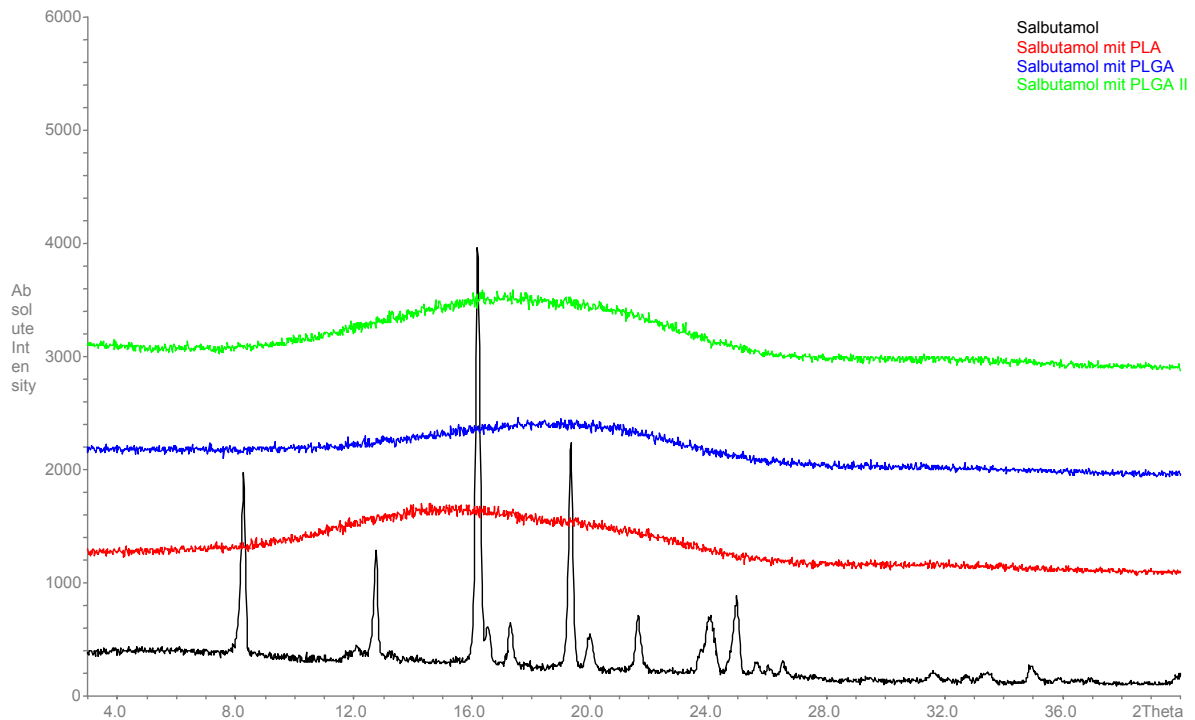


Abbildung 4.43 Zusammenstellung der röntgendiffraktometrischen Untersuchung von Salbutamol und Salbutamol mit PLA, PLGA und PLGA II. Die Konzentration von Salbutamol im jeweiligen Polymer betrug 4,8 %

Jedes Mischungsverhältnis zeigt ein breites, diffuses Maximum, Kennzeichen für das Vorliegen einer amorphen Form. Reines sprühgetrocknetes Salbutamol liegt dagegen kristallin vor, was an den scharf abgegrenzten Peaks deutlich wird. Dies war auch bereits im DSC-Scan zu sehen und kann wie erwähnt mit der Art der Herstellung, nämlich der Versprühung mit Wasser als Lösungsmittel, zusammenhängen. Salbutamol wurde als Suspension versprüht, d.h. es waren bereits vor der Sprühtrocknung Kristalle vorhanden und der Arzneistoff ist während der Verdampfung des Lösungsmittels im Tropfen kristallin geblieben, um anschließend zu einem kristallinen Mikropartikel zu trocknen. Tabelle 4.10 zeigt eine Zusammenfassung aller untersuchten Mischungen.

Tabelle 4.10 Ergebnisse der röntgendiffraktometrischen Bestimmung von Salbutamol Reinsubstanz nach Sprühtrocknung aus wässriger Lösung sowie von Sprüheinbettungen von Salbutamol (4,8 %) in PLA, PLGA und PLGA II aus organischen Lösungen mit Dichlormethan

Probe	Ergebnis
100 % Salbutamol	kristallin
4,8 % Salbutamol mit PLGA	(röntgen-) amorph
4,8 % Salbutamol mit PLGA II	(röntgen-) amorph
4,8 % Salbutamol mit PLA	(röntgen-) amorph

### Salbutamolsulfat

Sprüheinbettungen mit Salbutamolsulfat (4,8 %) in den Polymeren PLA, PLGA und PLGA II werden röntgendiffraktometrisch untersucht, um ihre Kristallinität zu überprüfen. Abbildung 4.44 zeigt die Ergebnisse.

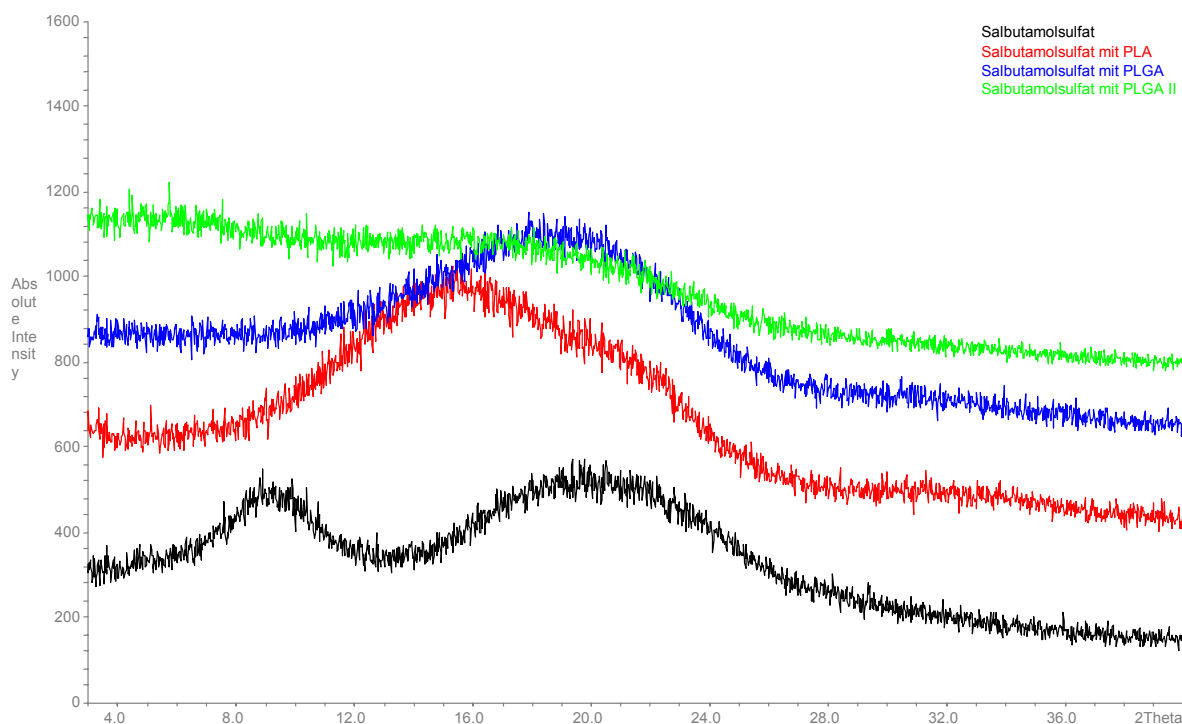


Abbildung 4.44 Zusammenstellung der röntgendiffraktometrischen Untersuchung von Salbutamolsulfat und Salbutamolsulfat mit PLA, PLGA und PLGA II. Die Konzentration von Salbutamolsulfat im jeweiligen Polymer betrug 4,8 %

Wie Abbildung 4.44 zeigt, liegen sowohl die Sprüheinbettungen, als auch das reine sprühtrocknete Salbutamolsulfat amorph vor, was die Ergebnisse der DSC Analyse bestätigt. Salbutamolsulfat wurde als Lösung in Wasser versprüht und ist deswegen nach der Sprühtrocknung amorph. Aufgrund des Vorliegens als Lösung waren keine Kristallisationskeime vorhanden (oder vielmehr in nicht ausreichender Menge) und zudem

war die Trocknung während der Versprühung so schnell, dass nicht ausreichend Zeit war, damit sich innerhalb des Tropfens Kristalle bilden könnten.

Tabelle 4.11 Ergebnisse der röntgendiffraktometrischen Bestimmung von Salbutamolsulfat

Reinsubstanz nach Sprühtrocknung aus wässriger Lösung sowie von Sprüheinbettungen von Salbutamolsulfat (4,8 %) in PLA, PLGA und PLGA II aus einer w/o Emulsion

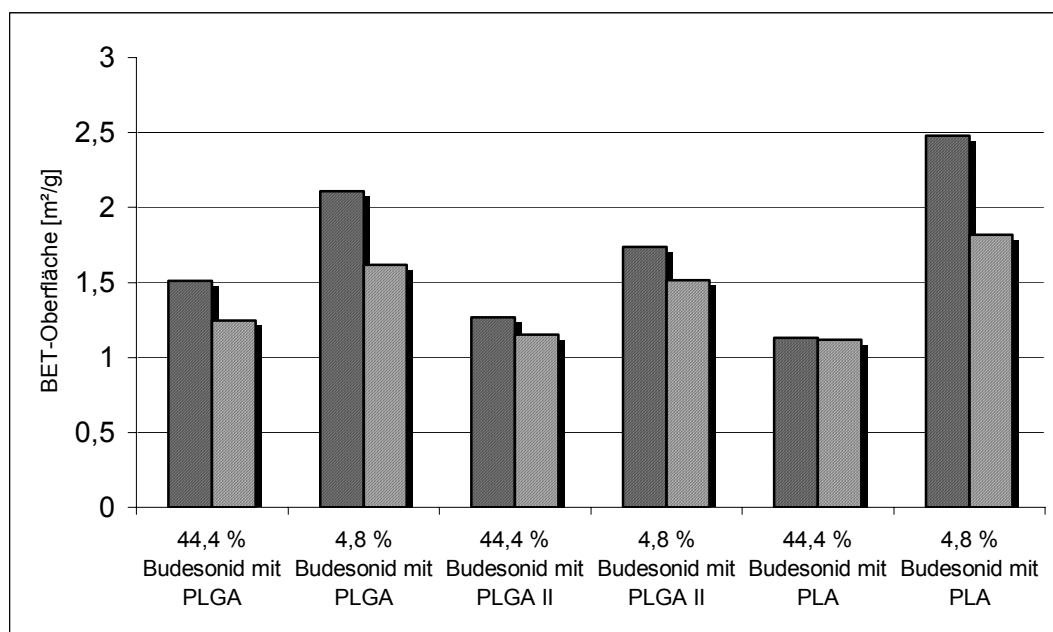
Probe	Ergebnis
100 % Salbutamolsulfat	(röntgen-) amorph
4,8 % Salbutamolsulfat mit PLGA	(röntgen-) amorph
4,8 % Salbutamolsulfat mit PLGA II	(röntgen-) amorph
4,8 % Salbutamolsulfat mit PLA	(röntgen-) amorph

Die Beurteilung der Kristallinität der sprühgetrockneten Salbutamol und Salbutamolsulfat Mikropartikel sagt gleichzeitig etwas über ihre Stabilität aus: die röntgendiffraktometrische Untersuchung erfolgte bis zu 2 Monaten nach der Sprühtrocknung. Die Lagerung erfolgte analog Budesonid in verschlossenen Plastikbeuteln, die vor Feuchtigkeit und Licht geschützt im Kühlschrank bei einer Temperatur von ca. 4 °C aufbewahrt wurden. Der amorphe Zustand scheint über mindestens 2 Monate stabil zu sein.

#### 4.2.3 Oberflächenuntersuchungen mittels der BET-Methode

##### *Budesonid*

Sprühgetrocknete Mikropartikel mit den Beladungen 4,8 % und 44,4 % Budesonid mit PLA, PLGA und PLGA II werden hinsichtlich ihrer spezifischen Oberfläche charakterisiert. Abbildung 4.45 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchungen.



Jede Charge wurde zwei mal bestimmt. Dargestellt sind die Einzelwerte.

Abbildung 4.45 BET-Oberfläche [m<sup>2</sup>/g] der sprühgetrockneten Budesonid Polymer-Mikropartikel

Die Wirkstoffpartikel mit 4,8 % Budesonidanteil weisen eine größere spezifische Oberfläche auf, als Mikropartikel der Beladung 44,4 % Budesonid in den jeweiligen Polymeren (Abb.

4.45). PLA, das lipophilste der verwendeten Polymere und beladen mit 44,4 % Budesonid, besitzt die kleinste spezifische Oberfläche mit 1,1 m<sup>2</sup>/g. Die Sprüheinbettung von 44,4 % Budesonid mit PLGA II, das von der Lipophilie zwischen PLA und PLGA liegt, weist die nächst kleinere spezifische Oberfläche von 1,3 m<sup>2</sup>/g auf. Mikropartikel mit einer Beladung von 44,4 % Budesonid mit PLGA, dem hydrophilsten Polymer, besitzen eine spezifische Oberfläche von 1,5 m<sup>2</sup>/g. Die Beladung 4,8 % mit PLGA weist mit 2,1 m<sup>2</sup>/g eine höhere spezifische Oberfläche auf. Die höchste spezifische Oberfläche von 2,5 m<sup>2</sup>/g besitzen PLA-Mikropartikel mit einer Beladung von 4,8 % Budesonid. Diese Beobachtungen korrelieren mit der gemessenen Teilchengröße der beladenen Mikropartikel. Partikel mit einer höheren Wirkstoffbeladung weisen größere Partikeldurchmesser auf, als diejenigen mit weniger Budesonidanteil.

Tabelle 4.12 Mittlere Teilchengröße  $x_{50}$  [ $\mu\text{m}$ ] von 4,8 % und 9,1 % Budesonid mit PLA, PLGA und PLGA II

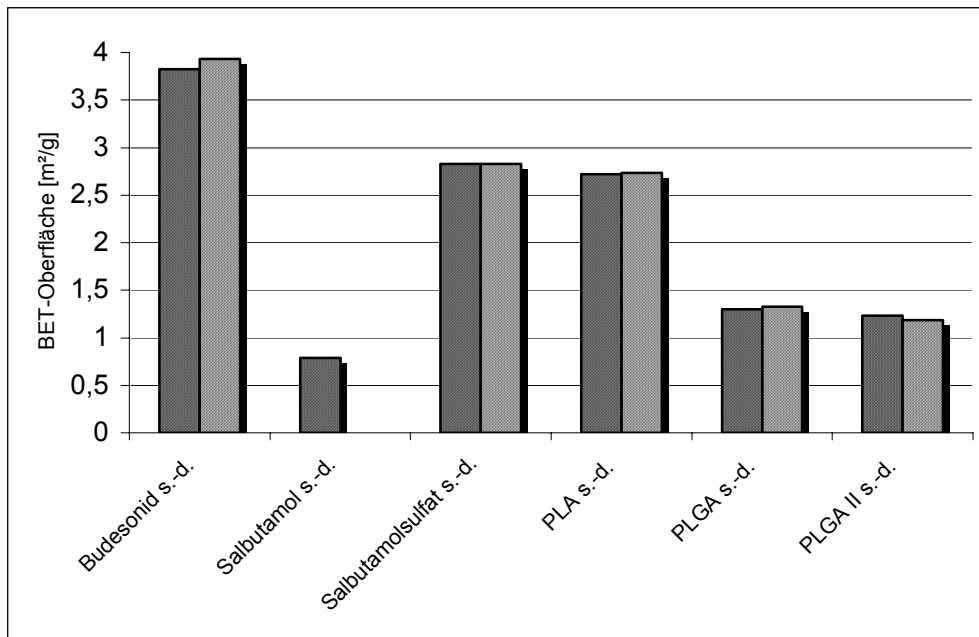
Budesonidanteil im Polymer [%]	$x_{50}$ [ $\mu\text{m}$ ] PLGA II	$x_{50}$ [ $\mu\text{m}$ ] PLA	$x_{50}$ [ $\mu\text{m}$ ] PLGA
4,8	2,69	1,72	1,96
44,4	3,88	4,26	2,89

Tabelle 4.13 Mittlere Teilchengröße  $x_{50}$  [ $\mu\text{m}$ ] von 4,8 % und 9,1 % Budesonid mit PLA, PLGA und PLGA II im Vergleich zur gemessenen BET-Oberfläche

Budesonidanteil im Polymer [%]	$x_{50}$ [ $\mu\text{m}$ ]	BET-Oberfläche [m <sup>2</sup> /g]
4,8 % mit PLA	1,72	2,4808 1,8170
44,4 % mit PLA	4,26	1,1322 1,1181
4,8 % mit PLGA	1,96	2,1099 1,6192
44,4 % mit PLGA	2,89	1,5116 1,2464
4,8 % mit PLGA II	2,69	1,7382 1,5140
44,4 % mit PLGA II	3,88	1,2674 1,1523

PLA-Mikropartikel mit 44,4 % Budesonidanteil weisen mit einem Partikeldurchmesser von 4,26  $\mu\text{m}$  die größte Teilchengröße bei kleinster Oberflächengröße von 1,1 m<sup>2</sup>/g auf. PLA-Mikropartikel mit einem Budesonidanteil von 4,8 % besitzen mit einem Partikeldurchmesser von nur 1,72  $\mu\text{m}$  die größte Oberfläche mit 2,5 m<sup>2</sup>/g. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen einen weiteren, auf die BET-Oberfläche einflussnehmenden Faktor auf. Die sprühgetrockneten Mikropartikel sind zwar alle rund, jedoch weisen diejenigen mit hoher Beladung eine raue und strukturierte Oberfläche auf, wohingegen die Mikropartikel mit einem Anteil von 4,8 % Budesonid durchweg glatt erscheinen. Die Unterschiede in der Oberflächenstruktur wiederum können in der Viskosität der Sprühlösung zu suchen sein. Die Diffusionsprozesse, die das Lösungsmittel aus dem Tropfen herausleiten, können bei höheren Budesonidbeladungen, d.h. bei höher viskosen Sprühlösungen behindert sein und dem Partikel eine andere Oberfläche geben. Die Menge des Polymers sowie die Art und Menge des Lösungsmittels wurden stets konstant gehalten, so dass die Viskosität der Sprühlösung einzig von der eingesetzten Wirkstoffmenge abhängig ist. Bei hohem Wirkstoffanteil nimmt die Viskosität zu, es ist daher mehr Energie nötig, diese Lösung in kleine Tröpfchen zu zerreißen, die anschließend augenblicklicher trocknen, als bei einer niedrig viskosen Lösung, bestehend aus weniger Wirkstoffanteil. Bei höher viskosen Sprühlösungen entstehen somit größere Partikel, als bei niedrig viskosen Lösungen.





Jede Charge wurde zwei mal bestimmt. Dargestellt sind die Einzelwerte.

Abbildung 4.46 BET-Oberflächen [m<sup>2</sup>/g] der sprühgetrockneten Einzelsubstanzen

In Abbildung 4.46 sind die spezifischen Oberflächen [m<sup>2</sup>/g] der sprühgetrockneten Wirkstoffe Budesonid, Salbutamol und Salbutamolsulfat, sowie der Polymere PLA, PLGA und PLGA II dargestellt. Budesonid besitzt mit 3,88 m<sup>2</sup>/g die größte Oberfläche, Salbutamol mit 0,79 m<sup>2</sup>/g die kleinste. Von den Polymeren weist PLA mit 2,73 m<sup>2</sup>/g die mit Abstand größte Oberfläche auf. Diejenigen von PLGA und PLGA II unterscheiden sich mit 1,32 m<sup>2</sup>/g und 1,19 m<sup>2</sup>/g nur geringfügig. Hausberger (72) untersuchte die Oberfläche von nicht sprühgetrocknetem 50:50 PLGA mittels der BET-Methode und fand eine spezifische Oberfläche des PLGAs von 0,2 m<sup>2</sup>/g. Dies zeigt, im Vergleich zu der mittels Sprühtrocknung erhaltener spezifischer Oberfläche des PLGAs von 1,32 m<sup>2</sup>/g, dass durch Sprühtrocknung die Oberfläche wesentlich vergrößert wird, was auch einen Einfluss auf das Freigabeverhalten haben dürfte. Salbutamolsulfat weist mit 2,83 m<sup>2</sup>/g eine ähnliche spezifische Oberfläche wie PLA auf. Die Oberfläche der sprühgetrockneten Einzelsubstanzen korreliert in den meisten Fällen mit der vermessenen Teilchengröße. Salbutamol hat die kleinste spezifische Oberfläche bei größter Teilchengröße mit 18,02 µm. Salbutamolsulfat und PLA besitzen annähernd die gleiche spezifische Oberfläche bei ähnlicher Teilchengröße. PLGA und PLGA II weisen mit 2,1 µm und 2,45 µm ähnlich große Partikel, bei ähnlich kleiner Oberfläche auf.

Pavanetto (123) verglich die Oberfläche von PLA-Mikropartikeln nach der Sprühtrocknung mit der Oberfläche von PLA-Mikropartikeln, die mittels Lösungsmittelverdampfung und -extraktion hergestellt wurden. Die sprühgetrockneten Mikropartikel hatten mit 6,33 m<sup>2</sup>/g die mittlere Oberfläche verglichen mit den beiden anderen Herstellungsmethoden. Die Lösungsmittelverdampfung erzeugte PLA-Mikropartikel mit einer Oberfläche von 5,44 m<sup>2</sup>/g und die Lösungsmittlextraktion lieferte die größten Oberflächen mit 9,85 m<sup>2</sup>/g. Harjunen (71) untersuchte die spezifische Oberfläche von sprühgetrockneter Laktose und fand bei 15 % Laktoseanteil in der Sprühlösung eine Abhängigkeit der spezifischen Oberfläche von der Zusammensetzung der Lösung bestehend aus Ethanol und Wasser. In reinem Wasser gelöst und dann sprühgetrocknet ergab sich eine spezifische Oberfläche von 1,61 m<sup>2</sup>/g, während bei Verwendung von Ethanol sich eine spezifische Oberfläche von 0,34 m<sup>2</sup>/g ergab. Diese änderte sich im Bereich von 0,24 bis 1,61 m<sup>2</sup>/g, je nach Wasser bzw. Ethanolanteil in der Sprühlösung.

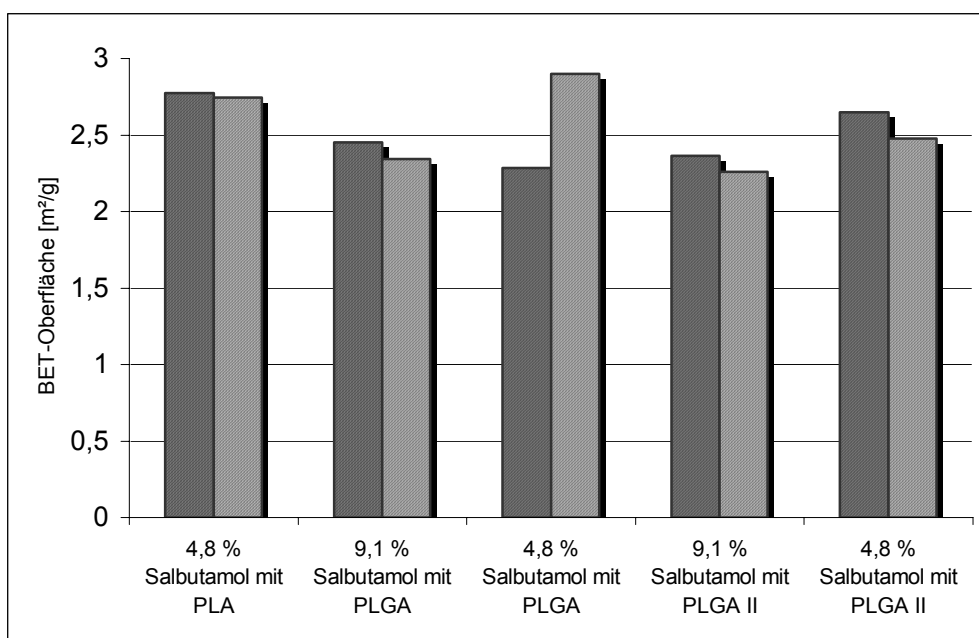
Tabelle 4.14 Mittlere Teilchengröße  $x_{50}$  [ $\mu\text{m}$ ] von sprühgetrocknetem Budesonid, Salbutamol und Salbutamolsulfat sowie von PLA, PLGA und PLGA II und BET-Oberfläche

Substanzbezeichnung	$x_{50}$ [ $\mu\text{m}$ ]	BET-Oberfläche [ $\text{m}^2/\text{g}$ ]
Budesonid	2,30	3,8279 3,9356
Salbutamol	18,02	0,7886 n.b.
Salbutamolsulfat	1,63	2,8284 2,8284
PLA	1,43	2,7226 2,7346
PLGA	2,10	1,3018 1,3288
PLGA II	2,45	1,2356 1,1869

Aus Abbildung 4.46 folgt, dass die Wahl des Polymers einen Einfluss auf die spezifische Oberfläche der Mikropartikel nimmt. Dies kann in der Viskosität der Ausgangslösung zu suchen sein, die organoleptisch beurteilt wurde. Bei PLA war diese eventuell geringer, als bei PLGA und PLGA II. Es entstanden feinere Tröpfchen, die zu feineren Mikropartikeln trockneten mit größeren Oberflächen. In der Abbildung 4.46 ist zu sehen, dass mit PLA größere Oberflächen erzielt werden, als mit PLGA und PLGA II, die sich in ihrer Größe der Oberflächen kaum unterscheiden. Diese Ergebnisse der reinen Polymere sind auch in den Mischungen mit Budesonid, Salbutamol und Salbutamolsulfat zu finden. Die Mikropartikel, die PLA enthalten, besitzen meist den kleinsten Teilchendurchmesser.

#### *Salbutamol und Salbutamolsulfat*

Die Untersuchung der spezifischen Oberfläche der sprühgetrockneten Mikropartikel erfolgt mit der gleichen Methode wie im Fall von Budesonid. Es wurden die unterschiedlichen Beladungen (4,8 % und 9,1 % Salbutamol und Salbutamolsulfat) mit PLA, PLGA und PLGA II untersucht.

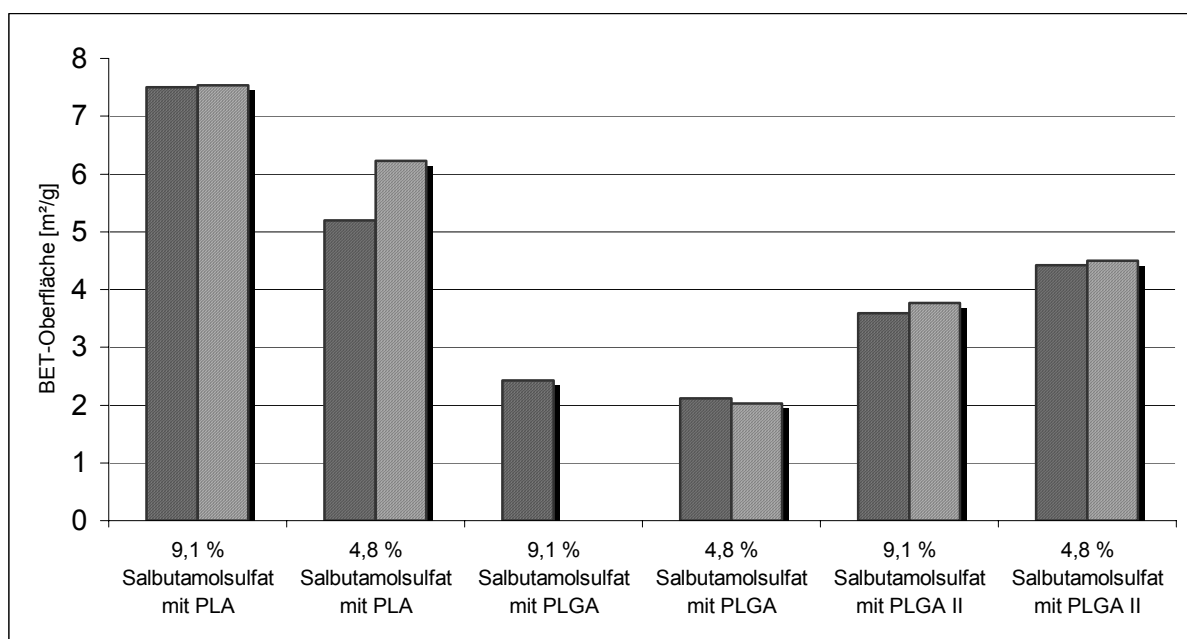


Jede Charge wurde zwei mal bestimmt. Dargestellt sind die Einzelwerte.

Abbildung 4.47 Vergleich der BET-Oberflächen [ $\text{m}^2/\text{g}$ ] von 4,8 % und 9,1 % Salbutamol mit PLA, PLGA und PLGA II

Die Mikropartikel mit den unterschiedlichen Beladungen von Salbutamol und den unterschiedlichen Polymeren unterscheiden sich hinsichtlich ihrer spezifischen Oberfläche kaum. Diese erstreckt sich von 2,3 m<sup>2</sup>/g bis 2,8 m<sup>2</sup>/g. Wie in Tabelle 4.14 zu sehen, unterscheiden sich die Partikelgrößen ebenfalls kaum voneinander. Abbildung 4.47 zeigt, dass die verschiedenen Polymere bei Verwendung der Salbutamolbase keinen Einfluss auf die Oberfläche ausüben, so dass bei Salbutamol ein Oberflächenunterschied in erster Linie von der Beladung abhängt. Die höheren Beladungen besitzen kleinere Oberflächen, bei meist größerer Teilchengröße.

Bei der Verwendung von Salbutamolsulfat ergeben sich anstelle der Base dagegen große Unterschiede bezüglich der spezifischen Oberfläche in Abhängigkeit vom verwendeten Polymer (Abbildung 4.48).



Die Chargen, außer 9,1 % Salbutamolsulfat mit PLGA, wurden zwei mal bestimmt. Dargestellt sind die Einzelwerte.

Abbildung 4.48 Vergleich der BET-Oberflächen [m<sup>2</sup>/g] von 4,8 % und 9,1 % Salbutamolsulfat mit PLA, PLGA und PLGA II

Die kleinste spezifische Oberfläche von 2,1 m<sup>2</sup>/g besitzen PLGA-Mikropartikel mit 4,8 % Salbutamolsulfatanteil, was in Übereinstimmung mit den verhältnismäßig großen Partikeln ist. Die größte spezifische Oberfläche von ca. 7,5 m<sup>2</sup>/g besitzen PLA-Mikropartikel mit einer Beladung von 9,1 % Salbutamolsulfat. Die unterschiedlichen Beladungen eines Polymers zeigen nur geringe Unterschiede bezüglich der spezifischen Oberfläche. Bei Salbutamolsulfat Mikropartikeln ist die Oberfläche von der Art des verwendeten Polymers abhängig. Mit dem lipophilen PLA werden die größten Oberflächen erzielt. Das eher hydrophile PLGA ergibt die kleinsten Oberflächen und PLGA II, in seiner Lipophilie zwischen den beiden anderen anzuordnen, besitzt auch mittlere spezifische Oberflächen. Dies ist in Übereinstimmung mit der gemessenen Teilchengröße, wie Tab. 4.15 zeigt. PLGA besitzt die kleinsten Oberflächen bei größter Teilchengröße und PLA die größten Oberflächen bei kleinsten Teilchengrößen.

Tabelle 4.15 Mittlere Partikelgrößen  $x_{50}$  [ $\mu\text{m}$ ] von 4,8 % und 9,1 % Salbutamol und Salbutamolsulfat mit PLA, PLGA und PLGA II

Arzneistoff und Beladungsgrad [%]	Teilchengröße [ $\mu\text{m}$ ] mit PLA	BET-Oberfläche [ $\text{m}^2/\text{g}$ ]
Salbutamol 4,8	1,29	2,7742 2,7435
Salbutamolsulfat 4,8	1,78	5,1966 6,2220
Salbutamol 9,1	1,74	n.b.
Salbutamolsulfat 9,1	2,10	7,4959 7,5311

Arzneistoff und Beladungsgrad [%]	Teilchengröße [ $\mu\text{m}$ ] mit PLGA	BET-Oberfläche [ $\text{m}^2/\text{g}$ ]
Salbutamol 4,8	1,74	2,2859 2,9014
Salbutamolsulfat 4,8	3,20	2,1200 2,0299
Salbutamol 9,1	1,66	2,4520 2,3449
Salbutamolsulfat 9,1	3,32	2,4254

Arzneistoff und Beladungsgrad [%]	Teilchengröße [ $\mu\text{m}$ ] mit PLGA II	BET-Oberfläche [ $\text{m}^2/\text{g}$ ]
Salbutamol 4,8	1,91	2,6500 2,4752
Salbutamolsulfat 4,8	2,24	4,4171 4,5000
Salbutamol 9,1	2,01	2,3620 2,2615
Salbutamolsulfat 9,1	2,35	3,5853 3,7654

#### 4.2.4 Bestimmung des Arzneistoffgehalts in den Mikropartikeln

##### *Budesonid*

Ziel der Gehaltsbestimmung von Budesonid ist die Überprüfung der Homogenität der Wirkstoffverteilung in den sprühgetrockneten Einbettungen von Budesonid mit den verschiedenen Polymeren, sowie die Evaluation des Verhältnisses Wirkstoff zu Polymer vor und nach der Sprühtrocknung. Die Bindung des Wirkstoffs an den Träger spielt keine entscheidende Rolle, weil die Probe bei der Untersuchung in gelöster Form vorliegt. Nachdem der Nachweis erbracht wurde, dass die Polymere die HPLC Analytik nicht stören, ergibt sich, wie in Tabellen 4.16-4.17 dargestellt, eine nahezu komplette Wiederfindung der eingesetzten Menge an Budesonid in den sprühgetrockneten Mikropartikeln. Für Budesonid PLA-Mikropartikel befindet sich diese im Bereich von 90 % bis 99 %. Die sprühgetrockneten PLGA II-Mikropartikel weisen einen Budesonidgehalt von mehr als 94 % auf. Werte über 100 % können einwaagebedingt entstehen. Weitere Gründe können in der Zufuhr zur Sprühdüse zu suchen sein, da trotz Reinigung eine Verschleppung des Arzneistoffs vom vorherigen Versuch aufgetreten sein kann. Auch kann eine Verschleppung in der HPLC Anlage ein Grund für die z.T. höhere Wiederfindung des Arzneistoffs sein. Für PLGA werden stichprobenartige Kontrollen des Gehalts vorgenommen. Diese betragen für die nominalen 4,8 %, 9,1 % und 44 % Budesonidanteile 90 %, 100 % und 106 %. Dies belegt die gute Wiederfindung von Budesonid in Bezug zur eingesetzten Menge in allen drei verwendeten Polymeren, unabhängig vom Wirkstoffanteil und der Lipophilie des Polymers. Während der Sprühtrocknung ändert sich das Verhältnis Budesonid zu den Polymeren nicht, so dass von einer homogenen Verteilung des Budesonids in den Mikropartikeln ausgegangen werden kann. Die Daten sind sowohl vom Gehalt, als auch von der Homogenität als gut anzusehen. Die rasterelektronenmikroskopischen Bilder der verschiedenen Budesonid-Polymer Mischungen (vgl. Abb. 4.9 und Abb. 4.11) lassen diese Annahme ebenfalls zu, da keine unterschiedlichen Partikelformen,- größen oder - oberflächen auf das Vorliegen zweier getrennter Stoffe hinweisen. Diese Tatsache wird durch zahlreiche DSC-Scans der untersuchten Budesonid-Polymer Mischungen unterstützt, die keinen Schmelzpeak für Budesonid in den Mischungen aufweisen.

Tabelle 4.16 Ergebnisse der Gehaltsbestimmung von PLA-Mikropartikeln mit Budesonid

Theoretischer Gehalt Budesonid in PLA [%]	Gemessener Gehalt [%], Mittelwert	Standardabw.
4,8	4,3	0,04
9,1	9,0	0,04
20,0	19,1	0,01
30,0	28,5	0,01
44,4	40,4	0,04

Tabelle 4.17 Ergebnisse der Gehaltsbestimmung von PLGA II-Mikropartikeln mit Budesonid

Theoretischer Gehalt Budesonid in PLGA II [%]	Gemessener Gehalt [%], Mittelwert	Standardabw.
4,8	5,2	0,28
9,1	10,9	0,02
30,0	28,3	0,02

Tabelle 4.18 Ergebnisse der Gehaltsbestimmung von PLGA-Mikropartikeln mit Budesonid

Theoretischer Gehalt Budesonid in PLGA [%]	Gemessener Gehalt [%], Mittelwert	Standardabw.
4,8	4,3	0,30
9,1	9,1	0,01
44,4	44,4	0,01

Chaw (36) versprühte eine Lösung von Physostigmin in PLA oder PLGA in Ethylacetat und erzielte Verkapselungseffizienzen von 93 % bis 102 %. Er beobachtete keinen signifikanten Unterschied in der Einschlusseffizienz der verschiedenen Polymere. Pavanetto (123) stellte PLA-Mikropartikel mit Vitamin D<sub>3</sub> mittels Sprühtrocknung aus einer Lösung, die aus einer 1:1 Mischung von Dichlormethan und Chloroform bestand, her. Die Verkapselung war maximal 58 %. Sie verglich dieses Ergebnis mit dem von PLA-Mikropartikeln mit Vitamin D<sub>3</sub>, die mittels Lösungsmittelverdampfung und -extraktion hergestellt wurden. Die beiden anderen Methoden konnten nicht mehr als 20 % des Vitamin D<sub>3</sub> verkapseln. Blanco-Prieto (18) versprühte PLA- und PLGA-Mikropartikel mit Vapreotide als Lösung in Essigsäure. Maximal 87 % des Arzneistoffs konnten mit einer Mischung von zwei PLGA Polymeren verkapselt werden. Mittels Koazervation konnten höchstens 75 % Vapreotide eingeschlossen werden.

#### *Salbutamol und Salbutamolsulfat*

Ziel der Gehaltsbestimmung von Salbutamol ist die Überprüfung der Homogenität der Wirkstoffverteilung in den Mikropartikeln mit einem Arzneistoffgehalt von 9,1 % Salbutamol mit den verschiedenen Polymeren, sowie die Evaluation des Verhältnisses Wirkstoff zu Polymer vor und nach der Sprühtrocknung. Die Polymere stören die Analytik nicht. Die untersuchten Mischungen sind in Tabelle 4.19 dargestellt. Die Wiederfindung von Salbutamol nach der Sprühtrocknung in PLGA, PLA und PLGA II beträgt 112 %, 100 % und 73 %. Die Versprühung als Suspension erwies sich als schwierig. Während der Sprühtrocknung der Suspension verstopfte die Düse fortwährend, der Prozess musste angehalten werden, die Düse gereinigt und anschließend die Versprühung wieder fortgesetzt werden. Eine mögliche Erklärung sowohl für den geringen Salbutamolgehalt in den PLGA II-Mikrokapseln könnte sein, dass Salbutamol in der Düse verblieb und dieses durch die Düsenreinigung verworfen wurde und/oder der Wirkstoff an der Wandung des Sprühturmes durch elektrostatische Anziehung festgehalten wurde und somit für die Verkapselung nicht

mehr zur Verfügung stand. Eine weitere Erklärung bietet die visuell nicht wahrnehmbare Adhäsion von Salbutamol an den Silikonschlauch des Sprühtrockners. Der etwas zu hohe Salbutamolgehalt in den PLGA-Mikropartikeln kann durch Ungenauigkeiten bei der Einwaage verursacht sein. Wahrscheinlich ist, dass die selben Gründe, die für den zu geringen Salbutamolgehalt in PLGA II auch für die zu hohe Wiederfindung in PLGA verantwortlich sind, da die beiden Suspensionen hintereinander gesprüht wurden und der Anteil, der in den PLGA II-Mikropartikeln fehlte, bei der Analyse der PLGA-Mikropartikel zusätzlich auftauchte. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen lassen aufgrund der abgebildeten Struktur, Form oder Größe keine Rückschlüsse auf die Beladung der Mikropartikel zu, da weder große Löcher, noch wesentlich adhärierte Substanz an der Oberfläche der Mikropartikel zu sehen ist. Salbutamol, als Reinsubstanz, versprüht ergibt große Partikel mit ausgesprochen grober, strukturierter Oberfläche, die Risse aufweist. Die vorliegenden und abgebildeten Sprüheinbettungen sind aber alle rund, im Teilchengrößenbereich bis maximal 5,8  $\mu\text{m}$  und von glatter, ebenmäßiger Struktur.

Die Wiederfindung in Bezug zur eingesetzten Menge an Salbutamolsulfat in den sprühetrockneten Mikropartikeln beträgt bei PLA 73 %, bei PLGA und PLGA II 28 % und 16 %. PLGA II ist mit 75 % Laktidanteil ein eher lipohiles Polymer, Salbutamolsulfat dagegen sehr hydrophil, so dass die Affinität der beiden Substanzen zueinander auch durch die Sprühtrocknung nicht verbessert werden kann. Gründe für diese geringen Verkapselungseffizienzen könnte eine Adhäsion im Pumpenschlauch des Sprühtrockners sein. Alternativ war die eingesetzte Menge des Salbutamolsulfats zu hoch gewählt, so dass der gut wasserlösliche Arzneistoff im recht großen Wasseranteil der Emulsion nur zu einem geringen Anteil eingeschlossen werden konnte und der unverkapselte Arzneistoff aufgrund seiner hohen elektrostatischen Aufladung an der Wandung des Sprühtrockners adhärierte. Eine weitere mögliche Erklärung bietet die Annahme, dass bereits die hergestellte w/o Emulsion nicht ausreichend lange stabil war und sich eine visuell nicht wahrnehmbare Trennung der beiden Stoffe schon vor der Sprühtrocknung ergab. Hinsichtlich der Verkapselungseffizienz scheint Salbutamol die bessere Alternative zu sein, da mit den Polymeren PLA und PLGA sehr hohe Einschlüsse erzielt werden können. Die Effizienz der Verkapselung ist neben der Parametereinstellung des Sprühtrockners sowohl von den Wirkstoffeigenschaften, als auch von dem verwendeten Polymer, dessen Konzentration in der Sprühlösung und der zu versprühenden Formulierung abhängig. Wie bei Budesonid gezeigt werden konnte, erweist sich die Versprühung einer Lösung als ideale Ausgangsbasis. Mit einer Suspension, wie mit Salbutamol durchgeführt, werden ebenfalls gute Ergebnisse hinsichtlich der Wiederfindung des Wirkstoffs in den Mikropartikeln erzielt. Bei der Versprühung einer w/o Emulsion mit Salbutamolsulfat sind die niedrigen Verkapselungen des Wirkstoffs in den verschiedenen Polymeren ein Grund, die diese Art der Versprühung eher ungeeignet für die Herstellung von Mikropartikeln mit höherem Wirkstoffanteil erscheinen lassen.

Ob sich die Wiederfindungen in den Freigaben der einzelnen Wirkstoffe widerspiegeln und welchen Einfluss die Partikelgröße und die Oberflächenbeschaffenheit, sowie die Größe der Oberfläche darauf nehmen, wird im folgenden Abschnitt beschrieben.

Tabelle 4.19 Gehaltsbestimmung von 9,1 % Salbutamol und Salbutamolsulfat mit PLGA, PLA und PLGA II

	Theoretischer Gehalt [%]	Gemessener Gehalt [%], Mittelwert	Standardabweichung
Salbutamol mit PLGA	9,1	10,2	1,61
Salbutamol mit PLA	9,1	9,1	0,06
Salbutamol mit PLGA II	9,1	6,6	1,16

	Theoretischer Gehalt [%]	Gemessener Gehalt [%], Mittelwert	Standardabweichung
Salbutamolsulfat mit PLGA	9,1	2,6	0,18
Salbutamolsulfat mit PLA	9,1	6,6	1,75
Salbutamolsulfat mit PLGA II	9,1	1,5	0,89

Johansen (93) versprühte ebenfalls eine w/o Emulsion mit den Polymeren R 202, RG 502 und RG 752. Als Wirkstoffe setzte er Diphtherie und Tetanus Toxoide ein. Mit dem Polymer R 202 erzielte er Verkapselungseffizienzen von bis zu 32 %, mit RG 502 von max. 75 % und mit RG 752 konnte er die hydrophilen Stoffe mit bis zu 55 % der eingesetzten Menge verkapseln. Die niedrigen Verkapselungseffizienzen mit den Polymeren RG 752 und R 202 konnte er mit dem beobachteten Präzipitieren der Wirkstoffe während der Emulsionsherstellung begründen, die dann für die Verkapselung mittels Sprühtrocknung nicht mehr zur Verfügung standen. Er beobachtete ferner einen Einfluss des Polymer-Lösungsmittels auf die Verkapselung, indem er Ethylformiat gegen Dichlormethan austauschte und höhere Verkapselungen fand, die für R 202 max. 84 % und für RG 752 max. 40 % betragen. Johansen (91) versprühte auch w/o Emulsionen von Proteinen mit dem Polymer RG 502H und erreichte Verkapselungen des Proteins in PLGA von max. 67 %. Walter (175) erreichte durch Sprühtrocknung einer w/o Emulsion bestehend aus DNA in 0,1M-NaHCO<sub>3</sub> Lösung und RG 502 H, RG 502, RG 503 H, RG 503, RG 752, R 202 und R 202H in Dichlormethan oder Ethylformiat Verkapselungen von bis zu 80 %, wobei hydrophilere Polymere mit einem höheren Glykolidanteil und nicht „gecappten“ Endgruppen höhere Einschlüsse erzielten. Blanco-Prieto (16) versprühte PLGA-Mikropartikel, die ein Somatostatin Analog enthielten, als Suspension in Ethylformiat. Sie erreichte Verkapselungseffizienzen von bis zu 90 %.

#### 4.2.5 Entwicklung einer Freisetzungsmethode für Budesonid aus Mikropartikeln

##### *Budesonid*

Die Anwendung klassischer Hypothesentests zur Beurteilung von Unterschieden in der Wirkstofffreisetzung zweier oder mehrerer Präparate hat häufig dazu geführt, dass signifikante Unterschiede in der Freisetzung von Wirkstoffen gefunden wurden, obwohl diese aus pharmazeutischer Sicht nicht relevant waren oder die verglichenen Zubereitungen Bioäquivalenz zeigten. Eine neuere, von den Zulassungsbehörden akzeptierte, unabhängige Kenngröße des Vergleichs von Freisetzungskurven ist der Ähnlichkeitsfaktor  $f_2$  (104). Der Ähnlichkeitsfaktor  $f_2$  ist definiert wie folgt:

$$f_2 = 50 \cdot \log \left[ \frac{1}{1 + \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (R_i - T_i)^2} \cdot 100 \right] \quad (\text{Gl.4.1})$$

Hierbei entspricht  $n$  der Zahl der Probensammelpunkte beim in-vitro Freisetzungsversuch und  $R_t$  sowie  $T_t$  sind die kumulativ zu einem jeweiligen Zeitpunkt freigesetzten Anteile (in Prozent der Dosis) der Referenz  $R_t$  bzw. der Testzubereitung  $T_t$ . Für den Fall, dass zwei Freisetzungprofile sich exakt entsprechen, ergibt der  $f_2$  Faktor einen Wert von 100. Nach SUPAC (Scale-Up and Post Approval Changes) gelten Freisetzungskurven als ähnlich, wenn die  $f_2$  Faktoren den Wert 50 übersteigen (104). Zunächst wird die Löslichkeit von Budesonid im Freisetzungsmedium bestimmt, um bei den Freisetzungsversuchen Sink-Bedingungen gewährleisten zu können. Es ergibt sich eine Löslichkeit von Budesonid im Medium von 0,1305 mg/ml Medium, das sich aus HEPES Puffer, Natriumchlorid, SDS und Rinderlungensurfactant zusammensetzt.

Die Stabilität von Budesonid im Medium wird ebenfalls im Rahmen der Freisetzungsuntersuchung bestimmt. Dafür wird sprühgetrocknetes Budesonid für 12 Std. bei 37 °C im Medium inkubiert. Die Analyse des Überstandes erfolgt mittels HPLC. Nach 3 Tagen erfolgt eine erneute Analyse. Die Werte waren identisch, d.h. die Lösung ist über mindestens 3 Tage stabil und Budesonid ist während der Zeitspanne von 48 Stunden, der Dauer der Freisetzung, im Medium stabil. Die Messung des pH Werts des Mediums ergab nach 48 Stunden immer noch einen pH Wert von 7,4, sowohl im reinen Medium, als auch im Budesonid enthaltenden Medium.

Die Oberflächenspannung des Mediums wird mit Hilfe eines Ringtensiometers bestimmt. Sie beträgt 32,3 mN/m und nach 3 Tagen 33,2 mN/m. Aqua purificata hat im Vergleich eine gemessene Oberflächenspannung von 68 mN/m, d.h., durch das Surfactant und das SDS wird eine deutliche Reduzierung der Oberflächenspannung in dem verwendeten Medium hervorgerufen. Mukus und andere biologische Polymere in wässriger kolloidaler Lösung besitzen im Vergleich dazu eine Oberflächenspannung von 40 bis 50 mN/m (65, 66, 82).

Pham (126) zeigte, dass Surfactant auf das Ausmaß, als auch auf die Geschwindigkeit der Freisetzung von Budesonid einen Einfluss hat. Die verstärkte Löslichkeit scheint im hohen Phospholipidgehalt (ca. 90 %) des Surfactants begründet zu sein während die Freisetzungsrates durch die hohe Oberflächenaktivität des Surfactants bedingt ist.

Um den Einfluss des Surfactants auf die Freigabe von Budesonid aus PLA, PLGA und PLGA II Mikropartikeln zu untersuchen, wird dessen Konzentration von 1 % auf 2 % erhöht, die Konzentrationen von NaCl, SDS und HEPES Puffer werden nicht variiert. Die Oberflächenspannung einer 2 % Surfactant-Lösung beträgt 29,2 mN/m. Der Vergleich mit obigem 1 % Surfactant-Medium zeigt, dass die Oberflächenspannung bei Verdopplung des Surfactantgehalts um 2,4 mN/m gesenkt wird. Die Löslichkeit von Budesonid in einem Medium, das 0,5 % und 2 % Surfactant enthält, ist bei beiden Konzentrationen > 0,09 mg/ml. Es werden verschiedene Budesonid Sprüheinbettungen mit allen drei Polymeren freigesetzt und mit der entsprechenden Freisetzung im Medium mit 1 % Surfactant verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.49 dargestellt. Die Konzentrationen von NaCl, SDS und HEPES Puffer werden bei allen Versuchen nicht verändert. Die Fehlerbalken geben bei allen Versuchen die Standardabweichung an. Die prozentuale Freisetzung bezieht sich bei allen folgenden Freisetzungsversuchen auf die nominale Beladung.



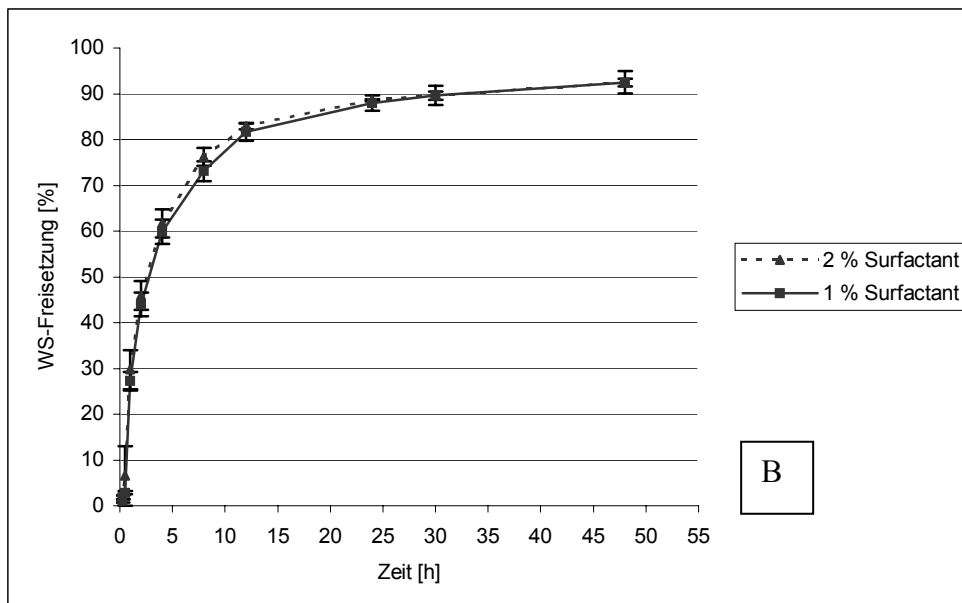
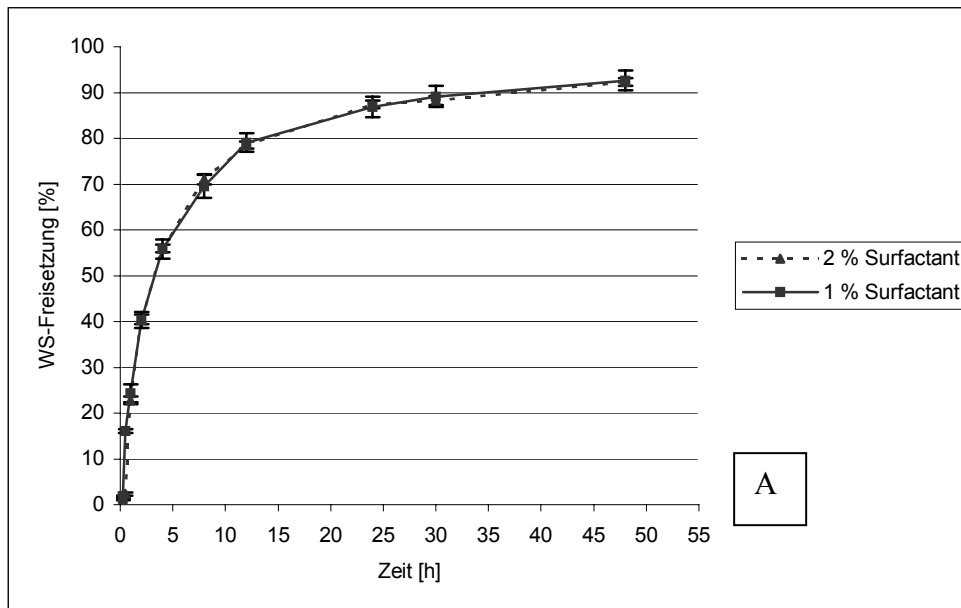


Abbildung 4.49 Vergleich der Freisetzungskurven von PLGA Sprüheinbettungen mit 20 % [A] und 30 % [B] Budesonid in Medium mit 1 % und 2 % Surfactantanteil (n=3)

PLGA-Mikropartikel (A) mit 20 % Budesonid werden in einem Medium mit 1 % Surfactantanteil und in einem Medium mit 2 % Surfactantanteil über einen Zeitraum von 48 Std. freigesetzt. Die Kurven verhalten sich bezüglich ihrer Freisetzung ähnlich ( $f_2= 67$ ). Nach 48 Std. werden bei einer 2 % Surfactantkonzentration zwischen 91,7 % und 93,3 % Budesonid freigesetzt, während dieser Wert bei einer 1 % igen Konzentration zwischen 88,3 % und 94,2 % Budesonid liegt. Abbildung 4.49 B zeigt die Freisetzung von PLGA-Mikropartikeln mit 30 % Budesonid in den Medien, die 1 % bzw. 2 % Surfactant enthalten. Wie auch bei der Freisetzung der PLGA Sprüheinbettung, die 20 % Budesonid enthält, verläuft die Freisetzung innerhalb von 48 Std. nahezu quantitativ und sie unterscheiden sich nicht voneinander ( $f_2= 83$ ). In Abb. 4.50 sind die entsprechenden in-vitro Freisetzungskurven von PLA Sprüheinbettungen, die 20 % und 30 % Budesonid enthalten in den Medien mit 0,5 %, 1 % und 2 % Surfactantanteil dargestellt. Die Oberflächenspannung des Mediums mit 0,5 % Surfactant beträgt 35,3 mN/m.

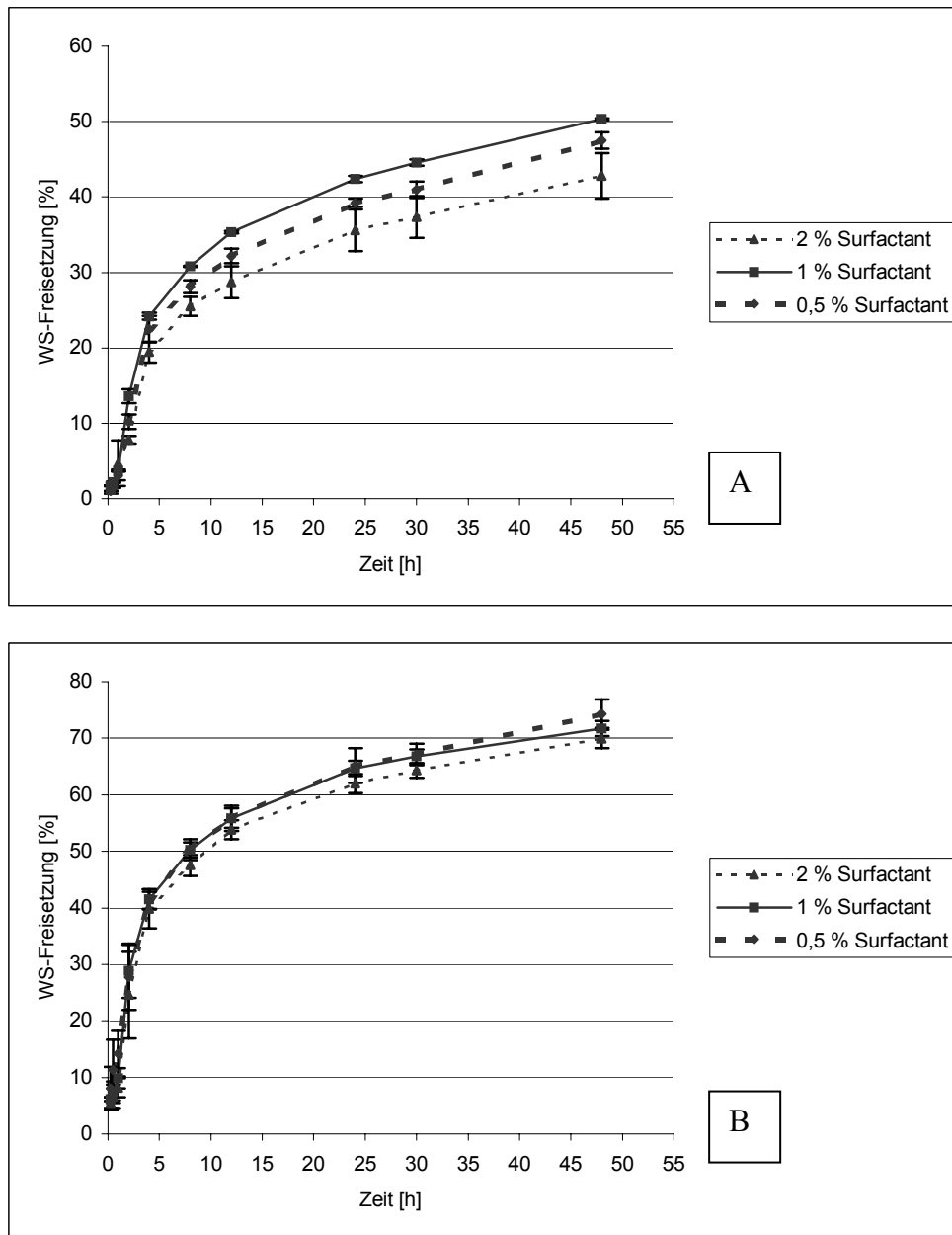


Abbildung 4.50 Vergleich der Freisetzungskurven von PLA Spüheinbettungen mit 20 % [A] und 30 % [B] Budesonid in Medium mit 0,5 %, 1 % und 2 % Surfactantanteil (n=3)

Bei der Freisetzung aus PLA Sprüheinbettungen mit 20 % Budesonid, Abb. 4.50 A, zeichnen sich Unterschiede bezüglich der Freigaben bei variierendem Surfactantanteil ab. Diese Unterschiede ergeben sich aus dem Lipidgehalt in den Medien, der im 0,5 % igen Medium geringer ist, als beim 1 % igen, was in einer höheren Budesonidfreigabe nach 48 Std. im Medium mit höherem Surfactantanteil resultiert. Die Freigaben im 2 % igen Surfactantmedium folgen dem nicht und es werden die geringsten Mengen freigesetzt. Dies war nicht zu erwarten, da Sink-Bedingungen gegeben waren. Bei der Berechnung des Ähnlichkeitsfaktors  $f_2$  ergibt sich, dass alle Kurven von Abbildung 4.50 A einander ähnlich sind. Die Mischung mit 2 % Surfactant im Medium zeigt mit 43 % freigesetztem Budesonid nach 48 Std. etwas geringere Freisetzungen verglichen mit 0,5 % (48 % freigesetztes Budesonid) und 1 % Surfactantanteil (50 % freigesetztes Budesonid). Mit 1 % Surfactant werden nach 48 Std. maximal 50,4 % Budesonid freigesetzt. Bei niedrigerem Surfactantanteil (0,5 %) beträgt die maximal freigesetzte Menge nach 48 Std. 48,6 % und bei 2 % Surfactantanteil im Medium maximal 44,6 %. Mit allen Medien ist ein zweiphasiger

Kurvenverlauf erkennbar, der 4 Stunden nach Freisetzungsbeginn mit maximal 24,6 % (1 %) bzw. 24,4 % (0,5 %) und 20,5 % (2 %) freigesetztem Budesonid vom steilen Anstieg in eine flachere Kurve übergeht. Die Berechnung des Ähnlichkeitsfaktors der beiden Freisetzungskurven mit 1 % und 0,5 % Surfactant ergibt einen Wert  $f_2 = 78$ . Gleiches gilt auch für die Kurven mit 2 % und 0,5 %, die einen Ähnlichkeitsfaktor  $f_2 = 76$  besitzen, sowie für die Kurven mit 1 % und 2 % Surfactantanteil, die mit  $f_2 = 63$  einander auch ähnlich sind. Mit 30 % Budesonidanteil in PLA (Abb. 4.50 B), unterscheiden sich die untersuchten Freisetzungsbedingungen hinsichtlich der Menge an freigesetztem Budesonid kaum voneinander. Mit 1 % Surfactant werden nach 48 Std. etwas höhere Freigaben von 73 % erzielt, im Vergleich zu 71 % freigesetztem Budesonid des 2 % igen Mediums. Mit 1 % Surfactantanteil im Medium wird nach 48 Stunden eine Freigabe von 77 % Budesonid erreicht. Der zweiphasige Kurvenverlauf ist auch hier zu sehen. 4 Stunden nach Beginn der Freisetzung erfolgt ein Übergang von schneller Freigabe mit bis zu 43,6 % in den Medien mit 1 % und 2 % Surfactant, bei 0,5 % wird eine geringfügig niedrigere Freisetzung von 42 % erreicht und einem anschließenden flacheren Kurvenverlauf, bei dem pro Zeiteinheit weniger Budesonid aus den sprühetrockneten Mikropartikeln freigesetzt wird. Die Entscheidung 1 % Surfactant in das Medium zu geben erweist sich bei PLA als vorteilhaft, da geringfügig höhere Freigaben erzielt werden können. Die Kurven mit 2 % und 0,5 % Surfactantanteil sind mit einem Ähnlichkeitsfaktor von  $f_2 = 72$  ähnlich, ebenso wie die Kurven mit 1 % und 0,5 % Surfactant mit  $f_2 = 81$  und die Freisetzungskurven mit 1 % und 2 % Surfactant im Medium mit  $f_2 = 80$ .

Mit dem Polymer PLGA II wird mit den Beladungen 20 % und 30 % Budesonid ebenfalls eine Freisetzung mit 1 % und 2 % Surfactant im Medium durchgeführt.

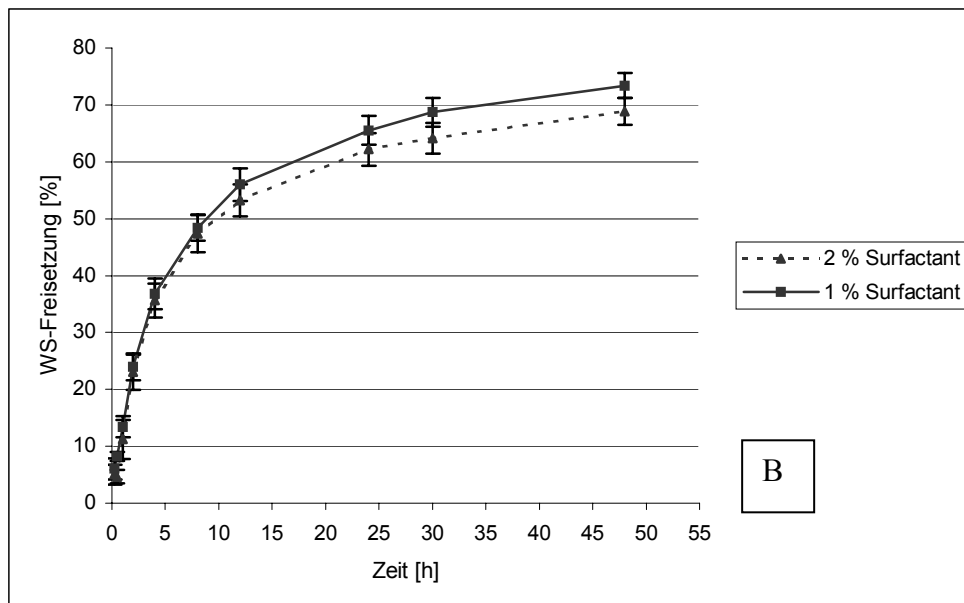
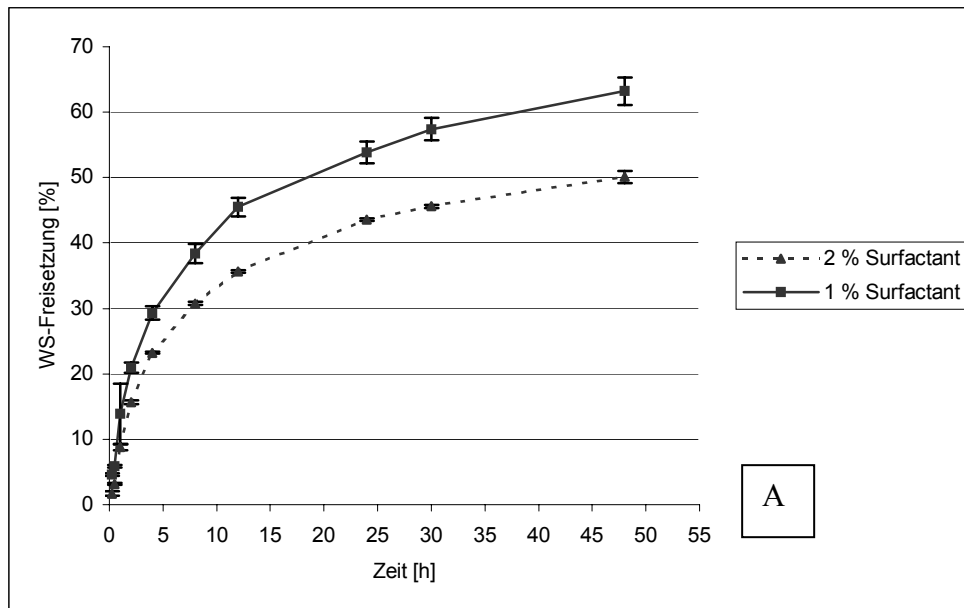


Abbildung 4.51 Vergleich der Freisetzungskurven von PLGA II Spüheinbettungen mit 20 % [A] und 30 % [B] Budesonid in Medium mit 1 % und 2 % Surfactantanteil (n=3)

In Abb. 4.51 A ist der Verlauf der Freisetzung von PLGA II-Mikropartikeln mit 20 % Budesonid im Medium mit 1 % und 2 % Surfactant dargestellt. Deutliche Unterschiede hinsichtlich der freigesetzten Menge Budesonid an den Entnahmezeitpunkten sind zu sehen. Mit 2 % Surfactant im Medium werden wesentlich geringere Mengen freigesetzt, als im Medium, das 1 % Surfactant enthält. Dies war nicht zu erwarten, da Sink-Bedingungen gegeben waren. Ein möglicher Grund kann ein Einwaagefehler sein, indem eine zu hohe Menge an Budesonid eingewogen wurde und dadurch die Sink-Bedingungen beim Freisetzungsvorversuch im 2 % Medium nicht gegeben war. Die Lösung wäre dann übersättigt gewesen. Bereits nach 0,5 Std. ist die Freisetzung im 1 % igen Medium mit 5,9 % doppelt so hoch, als im Medium, das 2 % Surfactant enthält, in dem in diesem Zeitraum maximal 3,1 % Budesonid freigesetzt wird. Nach 48 Std. beträgt die Differenz des freigesetzten Budesonids aus PLGA II in den beiden untersuchten Medien 13 % (50 % im 2 % Medium versus 63 % im 1 % Medium). Die Berechnung des Ähnlichkeitsfaktors ergibt einen ähnlichen Verlauf der beiden Freisetzungskurven mit  $f_2 = 54$ . Abbildung 4.51 B zeigt die Freigaben von 30 %

Budesonid mit 1 % und 2 % Surfactant im FreisetzungsmEDIUM. Die Kurvenverläufe der beiden Medien ähneln sich, wie die Berechnung des Ähnlichkeitsfaktors mit  $f_2 = 76$  zeigt. Wie bei den anderen Freisetzungsexperimenten ist die Kurve in zwei Abschnitte gegliedert. Nach 12 Std. folgt auf eine zunächst schnellere Abgabe des Arzneistoffs eine Freigabe mit geringerer Abgaberate. Nach 48 Std. wird im Medium mit 1 % Surfactant eine Budesonidfreigabe von maximal 73 % erreicht, im 2 % igen Medium werden in diesem Zeitraum maximal 69 % Budesonid freigesetzt. Ein möglicher Grund kann auch hier in einem Einwaagefehler zu suchen sein, da die beiden Freisetzungsexperimente parallel zueinander durchgeführt wurden und somit ein systematischer Einwaagefehler möglich wäre. Die Lösung wäre dann übersättigt gewesen.

Auch bei PLGA II erweist sich die Wahl des Mediums mit 1 % Surfactantanteil als vorteilhaft, da nach 48 Stunden mehr Budesonid freigesetzt wird, als in einem Medium, das die doppelte Surfactantkonzentration enthält.

Um einen Überblick über die retardierenden Eigenschaften der Polymere PLA, PLGA und PLGA II für Budesonid zu bekommen, wird 9,1 % Budesonid mit PLA, PLGA und PLGA II sprühgetrocknet und anschließend freigesetzt. Die Methode erfolgt wie oben (S. 71) erwähnt in Anlehnung an die Literatur (120, 126, 175, 183). Abbildung 4.52 zeigt die unterschiedlich retardierenden Eigenschaften der Polymere. Bei allen Freisetzungsversuchen wird die Freisetzung des Wirkstoffs kumulativ gegen die Zeit aufgetragen.

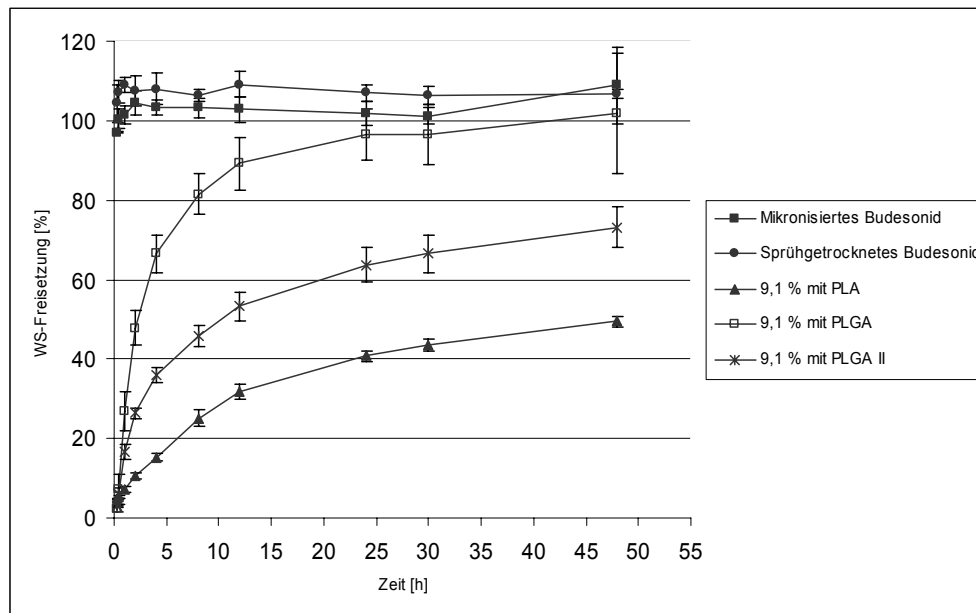


Abbildung 4.52 Vergleich der Freisetzung von Mikropartikeln mit 9,1 % Budesonid mit PLA, PLGA und PLGA II (n=3)

Wie aus den Freisetzungskurven ersichtlich, wird eine deutliche Retardierung mit allen drei Polymeren im Vergleich zu sprühgetrocknetem und nicht sprühgetrocknetem, mikronisiertem Budesonid erreicht. Freisetzung von etwas mehr als 100 % für das sprühgetrocknete wie auch für das mikronisierte Budesonid können sich durch etwaige Ungenauigkeiten bei der Einwaage ergeben. Die Retardierung ist umso stärker, je lipophiler das eingesetzte Polymer ist. Johansen et al. (93) vertreten die These, dass Wasserstoffbrückenbindungen und polare Wechselwirkungen eine ausschlaggebende Rolle bei der Verkapselung mit PLA und PLGA Polymeren spielen. Mit abnehmender Hydrophilie kann von weniger Wasserstoffbrückenbindungen und polaren Wechselwirkungen ausgegangen werden. Diese These wird mit den Freigaben der verschiedenen Polymere bei gleicher Beladung in Abbildung 4.52 untermauert. Mit steigendem Glykolidgehalt wird das Polymer hydrophiler, dadurch kann Wasser schneller in die Polymermatrix eindringen. Mit steigendem

Wassergehalt in der Matrix nimmt die Glasübergangstemperatur ab, dies wiederum veranlasst die Polymerketten in einen gummiartigen Zustand überzugehen (163), der Abbau erfolgt schneller und damit auch die Freisetzung (163).

Mit PLA, dem lipophilsten aller verwendeten Polymere, lässt sich die stärkste Retardierung erreichen, hierbei wird nach 48 Std. auch nur ca. 50 % des verkapselten Budesonids freigesetzt. Nach 12 Std. werden 31,6 % Budesonid aus den Mikropartikeln frei. Mit dem etwas hydrophileren Polymer PLGA II werden in diesem Zeitraum 53,3 % Budesonid freigesetzt, insgesamt werden Freisetzung von Budesonid mit PLGA II nach 48 Std. von 73,2 % erreicht. Das hydrophilste der eingesetzten Polymere PLGA erreicht nach 48 Std. 100 % der eingesetzten Budesonid Menge. Im Zeitraum von 12 Std. werden fast 90 % des Arzneistoffs freigesetzt. Diese Abhängigkeit der Hydrophobizität von der Fähigkeit zur Retardierung stellte auch Walter (175) bei der Mikroverkapselung von DNA fest. Wichert und Rohdewald (183) machten das unterschiedliche Molekulargewicht der von ihnen verwendeten Polymere PLA (2 000) und PLGA (15 000) für die bessere Freigabe aus Beclomethason PLA-Mikropartikeln bei gleicher Beladung verantwortlich, da ein geringeres Molekulargewicht die Freisetzung der Arzneistoffe weniger retardiert und der Zerfall der Polymere schneller stattfindet. Jalil und Nixon (83) untersuchten den Einfluss des Molekulargewichts auf die Eigenschaften von PLA-Mikrokapseln und kamen zu dem gleichen Ergebnis wie Wichert und Rohdewald, da die polaren Endgruppen in jeder Kette mit abnehmendem Molekulargewicht zunehmen und das Polymer bei Kontakt mit einem wässrigen Medium besser quellen kann.

Bei allen drei Polymeren ist ein zweiphasiger Kurvenverlauf zu beobachten. Bis ca. 12 Std. Freisetzung verläuft diese Kurve steiler, dann erfolgt ein flacher Verlauf. Die Freisetzung von sprühgetrocknetem und nicht sprühgetrocknetem Budesonid unterscheidet sich nicht signifikant. Wie bereits ausführlich in Kapitel 1.2.1 beschrieben, ist die Freisetzung aus Makromolekülen wie PLA und PLGA eng verbunden mit dem Zerfall des Polymers. Die Erosion der Polymermatrix ist hauptsächlich für die Freisetzung der eingebetteten Arzneistoffe verantwortlich. Diese erfolgt an der Oberfläche der Mikropartikel, wobei davon ausgegangen wird, dass die Geschwindigkeit der Wasseraufnahme in die amorphen Mikropartikel höher ist, als die Zerfallsrate der Polymere. Die Erosionszone fungiert als Diffusionsbarriere (69). Eine eindeutige Aussage zur Ordnung der Freisetzung kann nicht gemacht werden.

Im Folgenden werden die ermittelten Freisetzung von sprühgetrockneten Einbettungen von 4,8 %, 9,1 %, 20 %, 30 % und 44,4 % Budesonid mit PLGA im Medium über einen Zeitraum von 48 Stunden dargestellt und mit sprühgetrocknetem, reinem Budesonid verglichen (Abbildung 4.53).

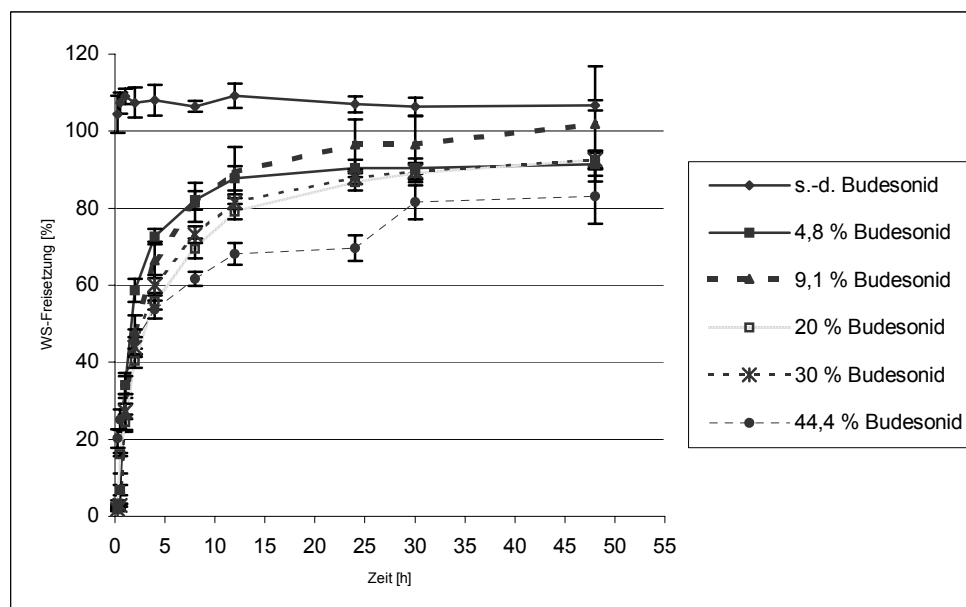


Abbildung 4.53 Freisetzungskurven von 4,8 %, 9,1 %, 20 %, 30 % und 44,4 % Budesonid mit PLGA in Medium (n=8)

Bei allen Beladungen ist ein zweiphasiger Kurvenverlauf zu beobachten. Es erfolgt zunächst ein steiler Anstieg der bis 12 Std. nach Freisetzungsbeginn anhält und danach in einen flacheren Kurvenverlauf übergeht. Diese Beobachtungen stehen in Übereinstimmung mit Walter (175), die neben anderen Polymeren auch PLGA einsetzte und bei der Freisetzung von DNA ebenfalls einen zweiphasigen Kurvenverlauf beobachtete, den sie in einen Burst und zweite Freisetzungsphase einteilte. Die zweite Phase kam ihren Beobachtungen zufolge durch den Zerfall der Polymermatrix zustande, wie Walter (176) und Thomasin (163) bereits in anderen Versuchen beobachteten. Auch Chaw (36) verwendete die Polymere PLA, PLGA und PLGA II und beobachtete eine Physostigmin Freisetzung aus diesen Mikropartikeln, die in zwei Phasen ablief und durch einen Burst mit nachfolgender gleichmäßig hinhaltender Freigabe charakterisiert war. Er führte die Physostigmin Freigabe aus PLGA auf Diffusion und den Zerfall des Polymers zurück. Diese Versuche liefen alle über mehrere Wochen ab. Bei Freisetzungsversuchen innerhalb von 48 Stunden, wie sie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, hat der Zerfall der Polymere mittels Hydrolyse erst angefangen. In Versuchen, die über mehrere Wochen ablaufen, ist wahrscheinlich, dass die Freigabe bereits beendet ist während das Polymer zu diesem Zeitpunkt noch nicht komplett abgebaut ist. Aus diesem Grund sind Verträglichkeitsversuche in-vivo, wie sie hier durchgeführt wurden, zwingend notwendig, um zu untersuchen, ob der Verbleib des Polymers auf dem Lungenepithel (wenn es nicht phagozytiert wurde) Auswirkungen auf die Lungenfunktion hat. Um den Zerfall der Polymere zu charakterisieren, wäre ein Zeitraum von etwa 4 bis 6 Wochen notwendig, um diesen mittels Gel-Permeations-Chromatographie und REM Aufnahmen zu verfolgen.

Wie aus der Berechnung des Ähnlichkeitsfaktors  $f_2$  hervorgeht, unterscheiden sich die Kurven kaum. Die Berechnung ergibt, dass fast alle Kurven einander ähnlich sind, ausser die Beladungen 4,8 % mit 20 %, sowie die 44 % Budesonidbeladung mit 4,8 %, 9,1 %, 20 % und 30 % Budesonidanteil. Im Anhang (S. 160-167) ist eine Tabelle der Ähnlichkeitsfaktoren zu finden. Lediglich die PLGA-Mikropartikel, die 44,4 % Budesonid enthalten, unterscheiden sich hinsichtlich der Freigabe etwas von den anderen Beladungen. Bei diesen Mikropartikeln werden bereits nach 15 Min 20 % des Wirkstoffs freigesetzt. Dieser ist wahrscheinlich an der Oberfläche der Mikropartikel adhärirt. In diesem Zeitraum werden bei den anderen Beladungen nur etwa 2 % freigesetzt. Nach 12 Std. wird mit 68,2 % freigesetztem Budesonid aus den Mikropartikeln mit 44 % Beladung eine vergleichsweise niedrigere Freisetzung erreicht (die anderen Beladungen geben 80 % bis 90 % des eingebetteten

Budesonids frei) und nach 48 Std. sind 83,1 % des Wirkstoffs freigesetzt. Die Bedeutung dieser Beladung liegt an der höheren Initialdosis, die den anderen Beladungen wahrscheinlich aufgrund des besser eingebetteten Budesonids fehlt. Bei einer hohen Beladung mit Arzneistoff kann im Prinzip der Wirkstoff nicht vollständig in PLGA eingebettet werden, so dass, auch aufgrund der elektrostatischen Aufladung der Mikropartikel ein kleiner Anteil des Arzneistoffs an die Oberfläche adhärirt wird und bei Kontakt mit dem Freisetzungsmedium sofort als freier Wirkstoff zur Verfügung steht (Burst-Effekt). Die Tatsache, dass die Beladung des PLGA mit unterschiedlichen Anteilen an Budesonid (4,8 % bis 44,4 %) allerdings kaum einen Effekt auf die Freisetzungsgeschwindigkeit hat und die Kurven einander fast alle ähneln ( $f_2$ ), lässt eine starke Wechselwirkung des Budesonids mit dem PLGA innerhalb der getesteten Beladungen vermuten. Wie erwähnt, vertreten Johansen et al. (93) die These, dass bei der Verkapselung mit PLA und PLGA Polymeren Wasserstoffbrückenbindungen und polare Wechselwirkungen eine ausschlaggebende Rolle spielen, so dass mit steigendem Glykolidgehalt das Polymer hydrophiler wird, wodurch Wasser schneller in die Polymermatrix eindringen kann. Mit steigendem Wassergehalt in der Matrix nimmt die Glasübergangstemperatur ab, dies wiederum veranlasst die Polymerketten in einen gummiartigen Zustand überzugehen. Dies ist bei den Freisetzungsversuchen mit PLGA, das das hydrophilste der verwendeten Polymere ist und damit den höchsten Glykolidgehalt besitzt, gut zu erkennen. Innerhalb des untersuchten Zeitfensters von 48 Std. ist bei diesem Polymer aufgrund dieser beschriebenen Vorgänge eine hohe Freigabe des eingebetteten Budesonids zu sehen. Diese beträgt bei einer Beladung von 9,1 % Budesonid innerhalb von 48 Stunden 100 %, bei einer Beladung von 4,8 % werden 92 % freigesetzt und bei einer Beladung der PLGA-Mikropartikel mit 20 % und 30 % Budesonid werden 93 % frei. Die ermittelten Freigaben stimmen mit den Messungen der Partikelgröße und der Oberfläche überein: PLGA-Mikropartikel mit 44,4 % Budesonid besitzen mit  $1,5 \text{ m}^2/\text{g}$  eine relativ kleine Oberfläche und gehören mit einem Partikeldurchmesser von  $2,89 \text{ }\mu\text{m}$  noch zu den größeren der vermessenen Partikelgrößen. Dem Medium steht also eine relativ geringere Oberfläche zur Verfügung, was die geringe Freigabe nach 48 Std. erklären kann. Gido und Langguth (67) stellten dies bei der Freisetzung von 6,6 % und 9,8 % Doxepin Mikropartikeln in der Durchflusszelle mit und ohne Membran in reinem Puffer oder humanem Plasma in Puffer als Freisetzungsmedien ebenfalls fest. Die Mikropartikel mit dem geringeren Arzneistoffgehalt zeigten eine Partikelgröße von  $5,2 \text{ }\mu\text{m}$ , diejenigen mit dem höheren Doxepinanteil besaßen einen Partikeldurchmesser im Mittel von  $29,6 \text{ }\mu\text{m}$ . Die unterschiedlichen Freisetzungsprofile erklärten sie unter anderem damit, dass die kleinere Oberfläche von größeren Partikeln für eine langsamere Freisetzung verantwortlich ist, solange die Freisetzung gemäß dem Noyes-Whitney Gesetz verläuft. Eine optimale Beladung des Polymers PLGA scheint im vorliegenden Fall eine Beladung mit 9,1 % Budesonid zu sein, da hier innerhalb von 12 Std. fast 90 % der eingesetzten Wirkstoffmenge freigegeben werden und dann eine gleichmäßige Freigabe bis 48 Std. mit einer Freisetzung von insgesamt 100 % erfolgt. Die Freisetzungsuntersuchungen mit PLA als Hilfsstoff zur Mikroverkapselung wurden unter identischen Bedingungen wie mit PLGA-Mikropartikeln durchgeführt. Die entsprechenden Freisetzungskurven, die sich beim Einsatz dieses Polymers ergeben haben, sind in Abbildung 4.54 dargestellt.



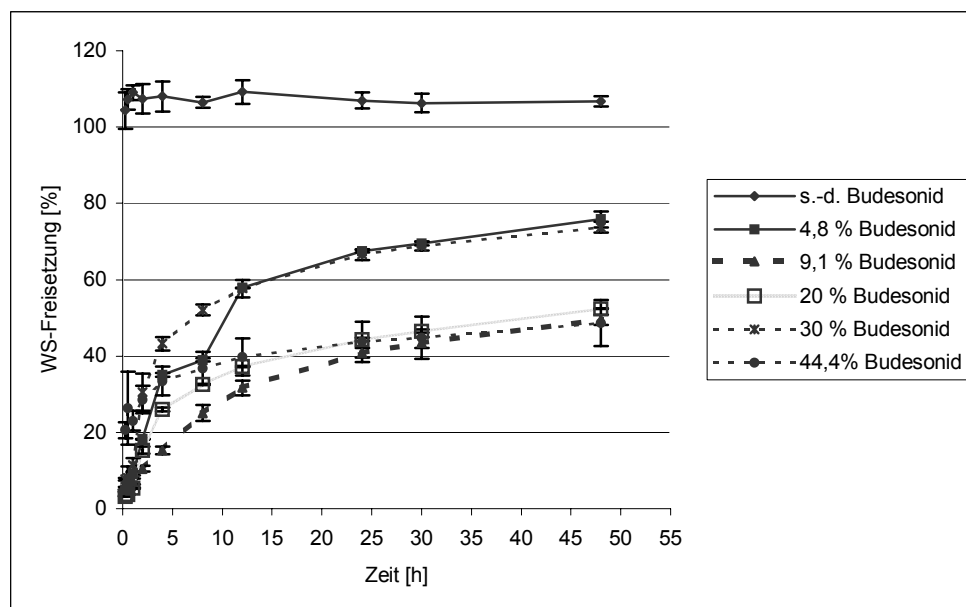


Abbildung 4.54 Freisetzungskurven von 4,8 %, 9,1 %, 20 %, 30 % und 44,4 % Budesonid mit PLA in Medium (n=3)

Bei dem lipophilsten aller eingesetzten Polymere, dem PLA, werden nach 48 Std. Freisetzung von maximal 75,8 % erreicht. PLA scheint das ebenso lipophile Budesonid gut einzuschließen. Ferner kann das umgebende Medium aufgrund der hohen Lipophilie der Polymermatrix nicht so schnell in diese eindringen und die Polymerketten werden weniger schnell in einen gummiartigen Zustand versetzt, der die Freigabe des Arzneistoffs erleichtern würde. Eine Möglichkeit, die Freigabe des eingebetteten Budesonids aus den PLA-Mikropartikeln zu erhöhen wäre die Zugabe von Porenbildnern wie Polyethylenglykol. Diese werden bei Kontakt mit dem wässrigen Freisetzungsmittel aus der Polymermatrix herausgelöst und bilden dadurch Poren und winzige Kanäle. Das Freisetzungsmittel kann somit besser und schneller eindringen und die Freigabe kann erhöht werden. Eine weitere Möglichkeit besteht im Zusatz von sehr niedrig molekularen Poly(laktid-co-glykolid) mit einem Molekulargewicht von 800 g/mol, die schneller hydrolysiert werden, so dass eine schnellere Freigabe des Arzneistoffs erzielt werden kann. Die Berechnung des Ähnlichkeitsfaktors  $f_2$  ergibt für den Verlauf der Kurven: die Beladungen 4,8 % und 30 % ( $f_2= 59$ ), sowie 9,1 % und 20 % ( $f_2= 64$ ) sind ähnlich. Auch bei PLA zeichnet sich ein zweiphasiger Kurvenverlauf ab, der durch einen initial steileren Anstieg und einen anschließenden flacheren Verlauf der Kurve gekennzeichnet ist. Wiederum werden mit einer Beladung von 44,4 % Budesonid im Polymer initiale Dosen (20 bis 27 % des eingesetzten Budesonids) bereits nach 15 und 30 Min. freigegeben, die auch hier eine teilweise Adhäsion des hohen Budesonidanteils an die Oberfläche der Mikropartikel vermuten lassen. Der Kontakt mit dem umgebenden Medium führt zu einem Aufquellen des Polymers an der Mikropartikeloberfläche und dadurch zu einer erleichterten Freigabe von Budesonid nahe der Oberfläche (175). Mit dieser Beladung werden mit 48,6 % die niedrigsten Freigaben nach 48 Std. erreicht, wobei sich die Freisetzung von 9,1 % zu diesem Zeitpunkt mit 49,5 % kaum unterscheidet und der Kurvenverlauf von 9,1 % Budesonid mit PLA nach 12 Std. nur bei 32 % freigesetztem Budesonid liegt. Die Beladung, die beim PLGA als die beste der untersuchten zu sein scheint, ist für PLA weniger geeignet. Mit 4,8 % und 30 % Budesonid werden die höchsten Freigaben bei Verwendung des Polymers PLA erreicht, die nur etwa 76 % nach 48 Stunden betragen. Die Mikropartikel mit 4,8 % Budesonid weisen mit  $2,5 \text{ m}^2/\text{g}$  die größte gemessene Oberfläche auf, rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen eine glatte Oberfläche der nur  $1,72 \text{ }\mu\text{m}$  großen Partikel.

Um das Freigabeverhalten der PLGA II-Mikropartikel mit 4,8 %, 9,1 %, 20 %, 30 % und 44,4 % Budesonid zu untersuchen, werden auch diese Mischungen in ein FreisetzungsmEDIUM gegeben und die freigesetzten Mengen [%] von Budesonid über einen Zeitraum von 48 Stunden bestimmt. Abbildung 4.55 zeigt die Freisetzung mit PLGA II.

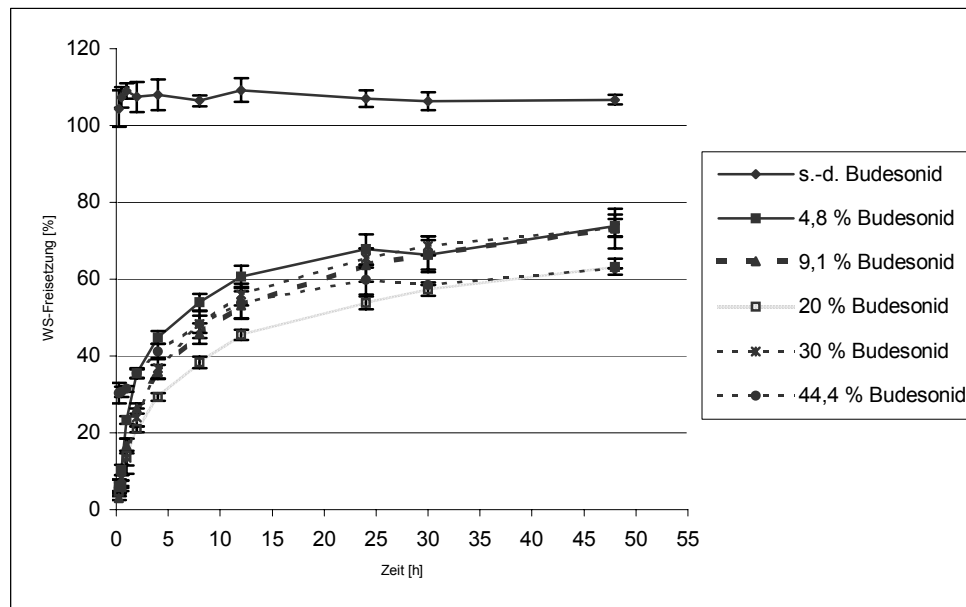


Abbildung 4.55 Freisetzungskurven von 4,8 %, 9,1 %, 20 %, 30 % und 44,4 % Budesonid mit PLGA II in Medium (n=3)

Zunächst erscheinen alle Kurvenverläufe ähnlich. Bei genauerem Betrachten wird jedoch deutlich, dass PLGA II-Mikropartikel mit einer Beladung von 44,4 % Budesonid auch hier nach 15 und 30 Min Freisetzung im Medium 30 % bzw. 31 % Budesonid als Initialdosis freigeben. Dies kommt durch an der Oberfläche adhärenzte Partikel oder durch oberflächlich eingebettete Partikel zustande, die vom umgebenden Medium von der Polymermatrix gelöst und freigesetzt werden. Auch bei diesem Polymer werden mit 44,4 % Budesonid die niedrigsten Freigaben zum Zeitpunkt 48 Std. mit nur 63 % erreicht, wobei sich die freigesetzte Menge Budesonid bei 20 % Beladung der Mikropartikel zu diesem Zeitpunkt kaum unterscheidet. Die Beladungen 4,8 % und 20 % unterscheiden sich in ihrer Freisetzung, was durch die Berechnung des Ähnlichkeitsfaktors  $f_2$  auch bestätigt wird, der 46 beträgt. Ebenso unähnlich ist die Kurve mit 44 % Budesonid mit allen anderen Budesonidbeladungen. Bei 20 % Budesonid in PLGA II werden nach 12 Std. Freisetzung im Medium nur 46 % Budesonid freigesetzt und der weitere Kurvenverlauf zeigt die niedrigsten Freigaben. Die Freisetzung bei den anderen Beladungen sind ähnlich. Bei allen Freisetzung von Budesonid aus Mikropartikeln unter Verwendung des Polymers PLGA II ist ein zweiphasiger Kurvenverlauf erkennbar, der mit einem steileren Anstieg beginnt und dann in einen flacheren Verlauf übergeht. O'Hara (120) sprühtrocknete Rifampicin mit PLGA II und beobachtete ebenfalls einen zweiphasigen Kurvenverlauf mit einem Burst innerhalb der ersten 24 Stunden, den er den oberflächlich adhärenzten oder oberflächlich eingebetteten Arzneistoffpartikeln zuschrieb. Die zweite Freigabephase führte er auf die Diffusion des Arzneistoffs durch kleine Poren oder Kanäle in der Polymermatrix zurück. Er beobachtete auch eine höhere Freigabe bei geringeren Beladungen innerhalb der ersten 24 Stunden und stellte die Überlegung an, dass es ein Limit für die Rifampicinmenge geben könnte, die an die Oberfläche der Mikropartikel gelangt und somit für eine initiale Freigabe zur Verfügung steht. Die Tendenz der Arzneistoffe, sich an der Oberfläche der Mikropartikel anzureichern, entsteht aus der Lösungsmittelverdampfung während der Sprühtrocknung. Das Lösungsmittel diffundiert während der Sprühtrocknung vom Kern des Tropfens nach

außen an die Oberfläche und nimmt dabei winzige Arzneistoffpartikel mit. Das Polymer ist in seiner Bewegungsfähigkeit aufgrund der langen Polymerketten eingeschränkt, so dass es überwiegend zu einer Bewegung der Arzneistoffpartikel kommt.

Die Ergebnisse der spezifischen Oberflächenuntersuchungen korrelieren mit denen der Freigabeuntersuchungen. Die Freisetzung von Budesonid aus den sprühgetrockneten Mikropartikeln bestätigen diese Ergebnisse, da die kleinste spezifische Oberfläche mit 44,4 % Budesonidanteil in PLA (mit 1,1 m<sup>2</sup>/g) die geringsten Freigabemengen mit 48,6 % nach 48 Std. erzielt. Da kleine Partikel eine große Oberfläche besitzen (Kapitel 4.2.3) bieten sie dem umgebenden Freisetzungsmedium eine große Angriffsfläche und erzielen somit auch die höchsten Freigaben. Beispielhaft für diesen Fall ist die Beladung von 9,1 % Budesonid in PLGA-Mikropartikeln zu sehen, bei der Budesonid in diesem Zeitraum quantitativ freigesetzt wird.

### Salbutamol

Die Bestimmung der Löslichkeit von Salbutamol im Medium, das sich aus Natriumchlorid, HEPES Puffer und Rinderlungensurfactant zusammensetzt, ergibt eine Löslichkeit von  $\geq 0,513$  mg/ml Medium. Mit einer eingewogenen Dosis von 0,3 mg Salbutamol in 8 ml Freisetzungsmedium ist die Einhaltung von Sink-Bedingungen während der Freisetzung sichergestellt. Das Medium enthält bei allen Versuchen 1 % Surfactant. Die Stabilität von Salbutamol im Medium wurde ebenfalls getestet, die Base ist über 48 Std. im Medium stabil. Die einzelnen Polymere werden im Folgenden mit den Beladungen 4,8 % und 9,1 % Salbutamol hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Retardierung untersucht. Die Fehlerbalken geben bei allen Freigabeversuchen die Standardabweichung an. Die prozentuale Freisetzung bezieht sich bei allen folgenden Freisetzungsversuchen auf die nominale Beladung.

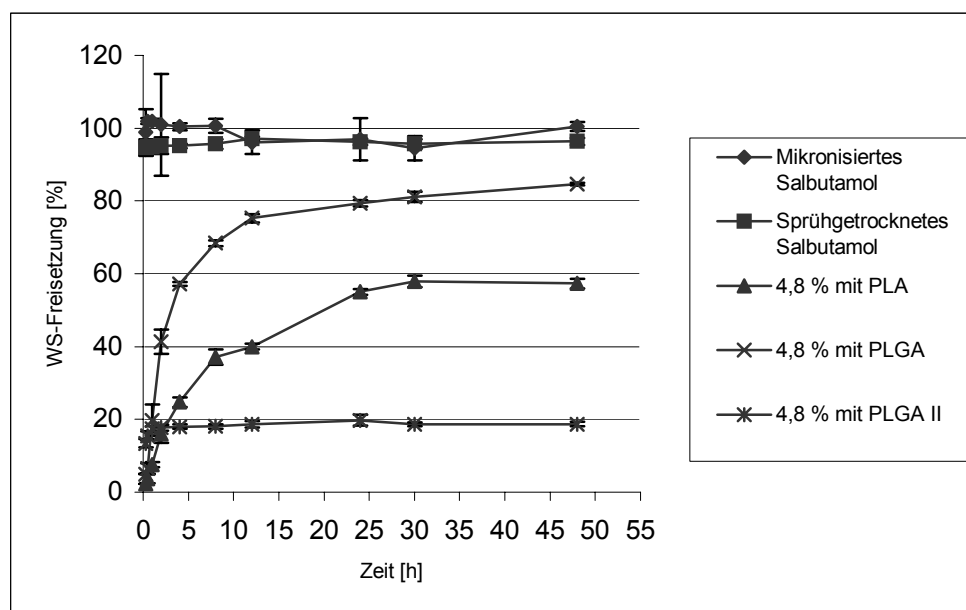


Abbildung 4.56 Vergleich der Freisetzung von PLA-, PLGA- und PLGA II-Mikropartikeln mit 4,8 % Salbutamol in Medium (n=3)

PLGA-Mikropartikel setzen nach 48 Std. 85 % Salbutamol frei. Ein zweiphasiger Kurvenverlauf ist sichtbar, der nach 12 Std. Freisetzung in einen flacheren Verlauf übergeht. Die Freisetzung wurde nach 48 Std. abgebrochen. Es ist zu vermuten, dass die Freisetzungsuntersuchung in einem größeren Zeitfenster nahezu quantitativ verläuft, da auch nach 40 Std. noch ein leichter Anstieg der Freigabe zu sehen ist. Diese Theorie wird durch Thomasin (163) unterstützt, der eine beschleunigte Freigabe der Arzneistoffe in der

Endphase der Freisetzung beobachtet und die Ursache für den beschleunigten Abbau des Polymers in dem Auftreten von größeren Mengen von sauren Abbauprodukten oder Natriumionen aus dem Puffer vermutete: Es könnte eine Autokatalyse durch die sauren Oligomere stattfinden, die sich im Polymer aufgrund ihrer verminderten Diffusion und Freisetzungseigenschaft bei niedrigem pH Wert angesammelt haben. Maulding (111) vermutete eine anschließende schnellere Freisetzung durch den Zerfall der Polymere, der durch basische Arzneistoffe bedingt wäre, die protoniert würden.

Die sprühgetrockneten PLGA-Mikropartikel haben mittlere Partikelgrößen von 1,74  $\mu\text{m}$  und bieten mit einer gemessenen Oberfläche von 2,28  $\text{m}^2/\text{g}$  dem umgebenden Medium viel Angriffsfläche. Durch das Rasterelektronenmikroskop betrachtet sind die Mikropartikel rund und glatt. PLA-Mikropartikel mit 4,8 % Salbutamol setzen 48 Stunden nach Beginn der Freisetzung 57,3 % frei. Die Mikropartikel mit PLA sind mit 1,29  $\mu\text{m}$  sehr klein und weisen daher eine große Oberfläche von 2,77  $\text{m}^2/\text{g}$  auf, die dem umgebenden Medium ausgesetzt ist. Aufgrund dieser Messungen würde man eine höhere Freigabe des Salbutamols erwarten. Die Mikropartikel sind auf ihr Aussehen rasterelektronenmikroskopisch untersucht worden: Sie sind rund mit einer glatten Oberfläche. Daraus lässt sich keine Erklärung für das beobachtete Freigabeverhalten ziehen. Eine Erklärung kann der lipophile Charakter des Polymers sein, welches im beobachteten Zeitraum nicht stark genug aufquillt und dadurch eine Diffusion des eingeschlossenen Salbutamols erschwert. Die Freigabe aus PLGA II-Mikropartikeln ist nach ca. 4 Std. mit einer Freisetzung von etwa 18 % abgeschlossen. Alle Salbutamol Polymer-Mikropartikel sind als Suspension mit Dichlormethan versprüht worden. Ein Grund der unvollständigen Freigabe der Salbutamol Polymer-Mikropartikel kann in der Herstellung liegen. Durch die beschriebenen Schwierigkeiten bei der Sprühtrocknung, wie Verstopfen der Düse, etc. kann es initial zu Verlusten des Wirkstoffs gekommen sein, so dass in den sprühgetrockneten Mikropartikeln bereits weniger eingeschlossen ist. Der Ähnlichkeitsfaktor  $f_2$  bestätigt, was auch anhand der Graphik erkennbar ist, dass die drei Kurvenverläufe einander nicht ähnlich sind. Er beträgt für die Einbettungen mit PLA und PLGA 31, für PLA und PLGA II 32 und für PLGA und PLGA II 18.

Die Freisetzung von Salbutamol aus PLA-, PLGA- und PLGA II-Mikropartikeln mit einer Beladung von 9,1 % Salbutamol sind in Abbildung 4.57 dargestellt.

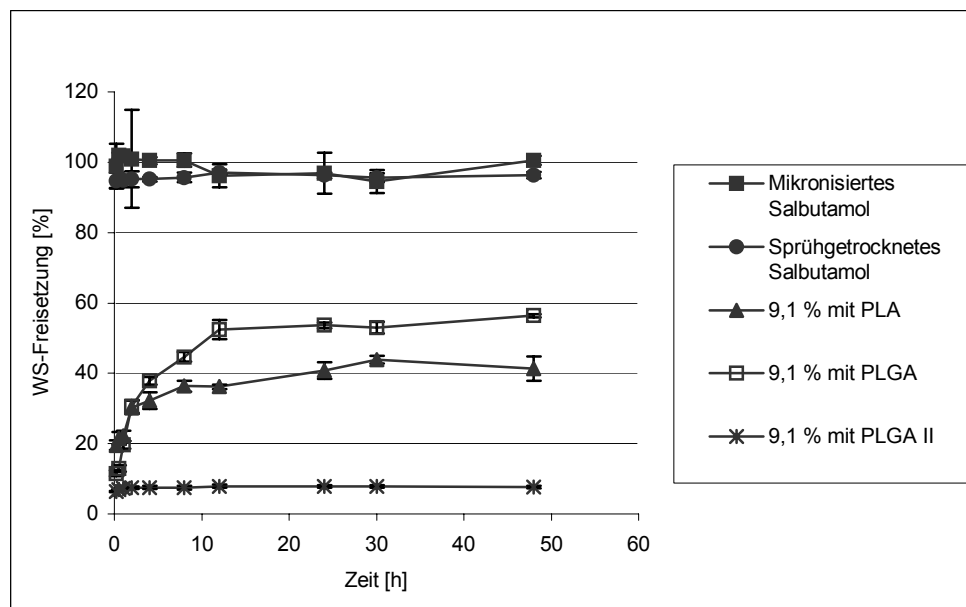


Abbildung 4.57 Vergleich der Freisetzung von PLA-, PLGA- und PLGA II-Mikropartikeln mit 9,1 % Salbutamol in Medium (n=3)

Mit allen drei Polymeren kann im Vergleich zu sprühgetrocknetem und nicht sprühgetrocknetem, mikronisiertem Salbutamol eine Retardierung erreicht werden. Mit PLGA-Mikropartikeln werden Freigaben von 56,4 % nach 48 Stunden erreicht. Aufgrund des nach 40 Std. Freisetzung immer noch leicht ansteigenden Kurvenverlaufs kann auch bei dieser Beladung vermutet werden, wie schon bei 4,8 %, dass die Freisetzung höher wäre, wenn man diese zu einem späteren Zeitpunkt bestimmen würde. Eine Erklärung für die geringe Freisetzung bietet die Bestimmung des Gehalts nicht, der 112 % Salbutamol nachweist. Die PLGA-Mikropartikel mit 9,1 % Salbutamol sind mit einer gemessenen Partikelgröße von 1,66  $\mu\text{m}$  sehr klein und besitzen mit 2,45  $\text{m}^2/\text{g}$  eine große Oberfläche, die dem umgebenden Freisetzungsmedium viel Fläche bietet. Die Freisetzung aus PLGA II-Mikropartikeln ist unvollständig, da diese bereits nach 1 Std. mit nur ca. 7 % freigesetztem Salbutamol beendet ist. Die Bestimmung des Gehalts an Salbutamol weist 73 % Salbutamol in den Mikropartikeln auf und kann die unvollständige Freigabe nicht erklären. Mit 41,3 % freigegebenem Salbutamol nach 48 Std. Freisetzung reihen sich die PLA-Mikropartikel zwischen den Freigaben aus den beiden anderen Polymeren ein. Die Wiederfindung des Arzneistoffs in diesen Mikropartikeln beträgt 100 % und liegt, wie die Freisetzung, in der Mitte der beiden anderen Wiederfindungen. Es ist anzunehmen, dass auch bei diesen Mikropartikeln die Art der Sprühtrocknung ein Grund für die geringen Freisetzungen innerhalb von 48 Std. ist. Die Berechnung des Ähnlichkeitsfaktors  $f_2$  bestätigt, was in Abbildung 4.58 dargestellt ist. Die Kurvenverläufe der Einbettungen mit PLA und PLGA sind einander ähnlich ( $f_2= 51$ ), hingegen sind diejenigen mit PLA und PLGA II ( $f_2= 29$ ), sowie PLGA und PLGA II ( $f_2= 23$ ) einander nicht ähnlich.

#### *Salbutamolsulfat*

Die Bestimmung der Löslichkeit des Salzes im Medium, das sich aus Natriumchlorid, HEPES Puffer und Rinderlungensurfactant zusammensetzt, ist auch für die Freisetzung von Salbutamolsulfat aus den Polymer-Mikropartikeln unbedingt notwendig. Salbutamolsulfat besitzt eine Löslichkeit von 0,832 mg/ml im Medium. In 8 ml Freisetzungsmedium werden 0,3 mg Salbutamolsulfat gegeben. Die Einhaltung von Sink-Bedingungen während der Freisetzung ist somit sichergestellt. Das Medium enthält bei allen Versuchen 1 % Surfactant. Die Stabilität des Salzes im Medium wurde ebenfalls überprüft und ist für den Zeitraum von 48 Std. gewährleistet. Das Retardiervermögen von PLA-, PLGA- und PLGA II-Mikropartikeln für Salbutamolsulfat wird bei einer Beladung mit 4,8 % Salbutamolsulfat untersucht. Die Fehlerbalken geben bei allen Versuchen die Standardabweichung an. Die prozentuale Freisetzung bezieht sich bei allen folgenden Freisetzungsversuchen auf die nominale Beladung. Abbildung 4.58 zeigt die unterschiedlichen Freigabecharakteristika der drei Polymere.

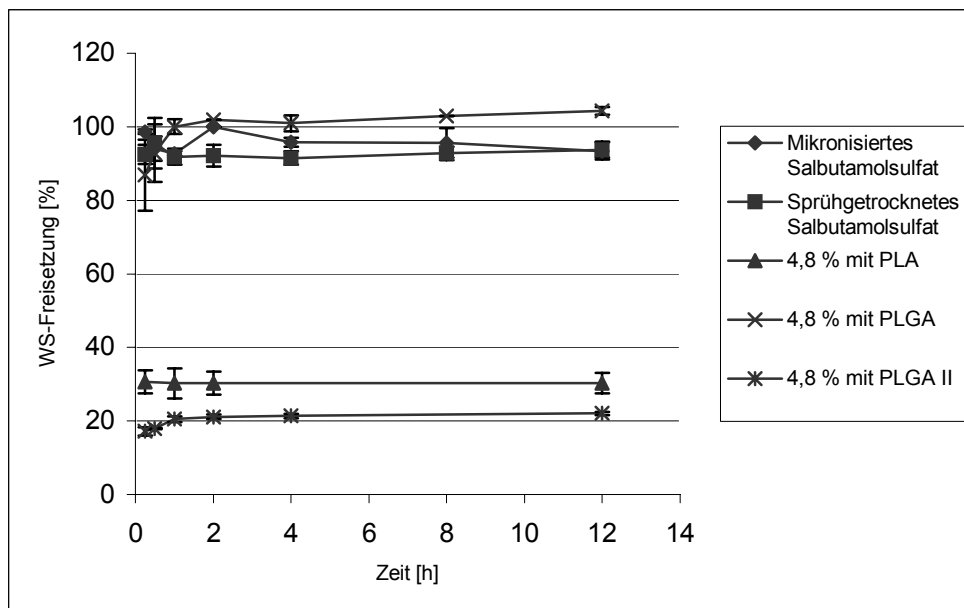


Abbildung 4.58 Vergleich der Freisetzung von PLA-, PLGA- und PLGA II-Mikropartikeln mit 4,8 % Salbutamolsulfat in Medium (n=3)

Die Freisetzungskurven der Mikropartikel mit den Polymeren PLA, PLGA und PLGA II sind in Abbildung 4.58 nur bis 12 Std. dargestellt, da die Polymer-Mikropartikel zu Beginn den Arzneistoff freigeben und keine Retardierung möglich war. Eine Erklärung für die sofortige Freigabe des Arzneistoffs kann dessen Lösung in Wasser sein und die anschließende Sprühtrocknung als w/o Emulsion mit Lecithin als Emulgator. Wie rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, sind die Mikropartikel kollabiert und weisen zum Teil Löcher auf, die bei Kontakt mit dem wässrigen Medium als Poren fungieren können und dadurch den leicht wasserlöslichen Arzneistoff gleich freisetzen könnten. Auch die Bestimmung der spezifischen Oberfläche, die mit 5,2 und 6,2 m<sup>2</sup>/g bei PLA und mit 4,5 m<sup>2</sup>/g bei PLGA II sehr groß ist, können Hinweise für die nicht retardierte Freigabe des Salbutamolsulfats sein, da dem FreisetzungsmEDIUM damit eine große Fläche angeboten wird. Wie zu erwarten verlaufen die Kurven von sprühgetrocknetem und nicht sprühgetrocknetem, mikronisiertem Salbutamolsulfat ähnlich zu einander und geben zu Beginn der Freisetzung 100 % frei. Eine ähnliche Freisetzungskurve zeigen PLGA-Mikropartikel, es werden gleich bei Kontakt des Mediums mit den sprühgetrockneten Mikropartikeln 100 % Salbutamolsulfat freigesetzt. Eventuell war der Arzneistoff nicht eingeschlossen, sondern lag neben dem Polymer vor. Werte über 100 % können einwaagebedingt sein. Auch Verschleppungen während der Behandlung der Probe könnten dies verursachen, oder auch Fehler beim Zentrifugieren der gezogenen Probe, die nicht lange genug zentrifugiert wurde. Alternativ könnte mit der Spitze der Eppendorf Pipette versehentlich etwas vom Zentrifugat gezogen worden sein. Mikropartikel mit PLA setzen zu Beginn der Freisetzung etwa 30 % Salbutamolsulfat frei, danach ist die Freigabe beendet. Die Freisetzung von Salbutamolsulfat aus PLGA II-Mikropartikeln ergibt eine anfängliche Freigabe von etwa 17 %, danach wird ebenfalls fast kein Wirkstoff mehr freigegeben. Die Kurve endet nach 12 Std. mit etwa 22 % freigegebenem Salbutamolsulfat. Die Ähnlichkeitsfaktoren bestätigen, was aus Abbildung 4.58 zu erkennen ist, die Kurvenverläufe sind einander nicht ähnlich. Sie betragen für die Freigabekurven der Polymere PLA und PLGA 8, für PLA und PLGA II 49 und für PLGA und PLGA II 5. Eine mögliche Erklärung für das nicht retardierende Freigabeverhalten von 4,8 % Salbutamolsulfat aus den Polymer-Mikropartikeln wäre, dass Wasser in die amorphen Mikropartikel gut eindringt, das Salbutamolsulfat löst und es im Inneren der Mikropartikel zu einer Erhöhung des osmotischen Drucks kommt, der zur Folge hat, dass Salbutamolsulfat sofort freigegeben wird. Eine Erklärung für dieses Freigabeverhalten könnte durch eine Bestimmung des

Gehalts gegeben werden. Auch die Formulierung der w/o Emulsion kann ein möglicher Grund sein, da mit einem großen Wasseranteil gearbeitet wurde (175 ml Dichlormethan und 75 ml Wasser). Vorteilhafter könnte ein sehr geringer Wasseranteil sein verbunden mit einer Erhöhung der Viskosität der Sprühlösung.

Abbildung 4.59 zeigt die Freigabe von PLA-, PLGA- und PLGA II-Mikropartikeln mit 9,1 % Salbutamolsulfat.

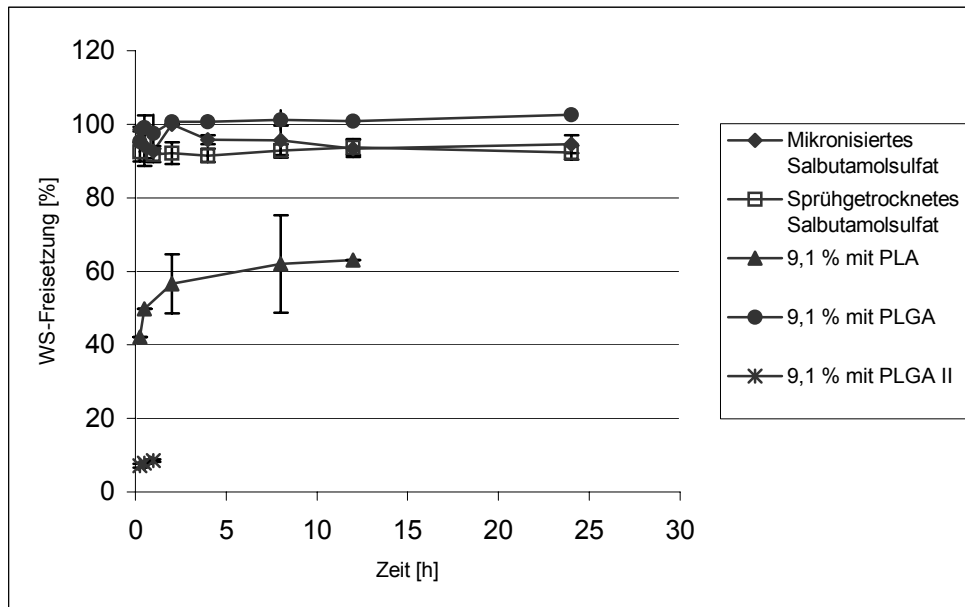


Abbildung 4.59 Vergleich der Freisetzung von PLA-, PLGA- und PLGA II-Mikropartikeln mit 9,1 % Salbutamolsulfat in Medium (n=3)

Auch bei Beladung der Mikropartikel mit 9,1 % Salbutamolsulfat kann keine Retardierung erreicht werden. Es ergibt sich eine ähnliche Darstellung der Freigabekurven, die bis 24 Std. nach Beginn dargestellt sind. PLA-Mikropartikel deuten einen zweiphasigen Kurvenverlauf an, der bereits nach 2 Std. in einen flacheren Verlauf übergeht und nach 12 Std. mit etwa 63 % freigegebenem Salbutamolsulfat beendet ist. Die Bestimmung des Gehalts ergibt bei PLA-Mikropartikeln eine Wiederfindung von etwa 73 % der eingesetzten Arzneistoffmenge, damit verläuft die Freisetzung von Salbutamolsulfat aus PLA-Mikropartikeln nahezu quantitativ. Mikropartikel mit PLGA setzen auch hier gleich zu Beginn 100 % des Arzneistoffs frei, danach ist die Freigabe beendet. Werte über 100 % können wie bei der Beladung mit 4,8 % auch mit Ungenauigkeiten während des Einwiegens oder in der Behandlung der Probe zu suchen sein. Die Wiederfindung von Salbutamolsulfat in den PLGA-Mikropartikeln beträgt 28 % und sollte aufgrund der erhaltenen Freigaben von Salbutamolsulfat kritisch betrachtet werden. PLGA II-Mikropartikel setzen nur etwa 8 % Salbutamolsulfat frei, die Freigabe ist nach 1 Std. beendet. Die Bestimmung des Gehalts, die für eine Beladung mit 9,1 % Salbutamolsulfat in den PLGA II-Mikropartikeln einen Arzneistoffgehalt von nur 16 % findet, liefert einen Anhaltspunkt für die Erklärung der Freigabe. Die oben erwähnte Sprühtrocknung als Emulsion, die in stark kollabierten und mit Löchern versehenen Mikropartikeln resultiert kann ein weiterer Grund dieser Freigaben sein, sowie die relativ große Oberfläche der PLGA II-Mikropartikel mit 3,6 und 3,7 m<sup>2</sup>/g. Aus der Berechnung des Ähnlichkeitsfaktors geht hervor, dass die Kurven nicht ähnlich sind.  $f_2$  beträgt für die Einbettungen mit den Polymeren PLA und PLGA 17, für PLA und PLGA II 21 und für PLGA und PLGA II 2. Gido und Langguth (67) fanden bei Freisetzungsversuchen von Doxepin-Retardzubereitungen in einer Membranzelle mit reinem Puffer als FreisetzungsmEDIUM eine schnelle und unvollständige Freigabe. Sie nahmen als eine mögliche Begründung an, dass die Membranzelle nicht die geeignete Apparatur ist, da unter anderem eine starke Gasentwicklung beiderseits der Membran beobachtet werden konnte. Die Freigabe der Arzneistoffe aus den verschiedenen

Polymere wird durch Diffusion aus Poren, wie bei Salbutamolsulfat, Diffusion durch eine intakte Matrix, wie bei Salbutamol, sowie durch Diffusion des gequollenen Polymers und einer anfänglichen Polymererosion verursacht. Zusätzlich finden Hydratation mit Bruch der van der Waalschen Kräfte und der Wasserstoffbrücken statt und, bei mehreren Wochen dauerndem Kontakt der Polymer-Mikropartikel mit dem Freisetzungsmedium, anschließender Abbau zu physiologischen, wasserlöslichen Monomeren. Interessant zu beobachten wäre, wie die Freisetzung von Salbutamolsulfat bei geringerem Arzneistoffanteil in der Polymermatrix und/oder anderer Zusammensetzung des Mediums verlaufen würde, oder bei Einsatz anderer physiologisch verträglicher Emulgatoren bei der Herstellung. Weiterhin könnte mit dem Zusatz von lipophilen Säuren, wie Embonsäure, zur Sprühlösung eine Retardierung erreicht werden. Auch eine Mischung der verwendeten Polymere in einer zu versprühenden Lösung wäre interessant für weitere Freigabeuntersuchungen. Denkbar wäre auch, Salbutamolsulfat Polymer-Mikropartikel mit einem anderen Verfahren als der Sprühtrocknung herzustellen, wie dem Erhitzen der Polymere bis zur Glasübergangsstufe und dem anschließenden Zugeben des Arzneistoffs, der gegebenenfalls zuvor gelöst wurde. Die Formulierung könnte zunächst grob vorgemahlen werden und die anschließende Mikronisierung der Formulierung könnte mit einer Luftstrahlmühle erfolgen. Nykamp (119) stellte mit diesem Verfahren Estrioltriacetat Polymer-Mikropartikel her.

Am Beispiel von Budesonid soll bewiesen werden, dass die Retardierung der Arzneistofffreisetzung eine provozierte Entzündung effektiver und langanhaltender unterdrückt, als das nicht eingebettete Budesonid. Zu diesem Zweck werden zunächst Versuche mit Zellen gemacht.

#### 4.3 Zellversuche

Vor der Gabe der PLGA-Mikropartikel und PLGA-Mikropartikel mit 9,1 % Budesonid auf die Zellen werden die Mikropartikel im Zellkulturmedium suspendiert und am inversen Mikroskop nochmal auf ihre Partikelgröße untersucht.

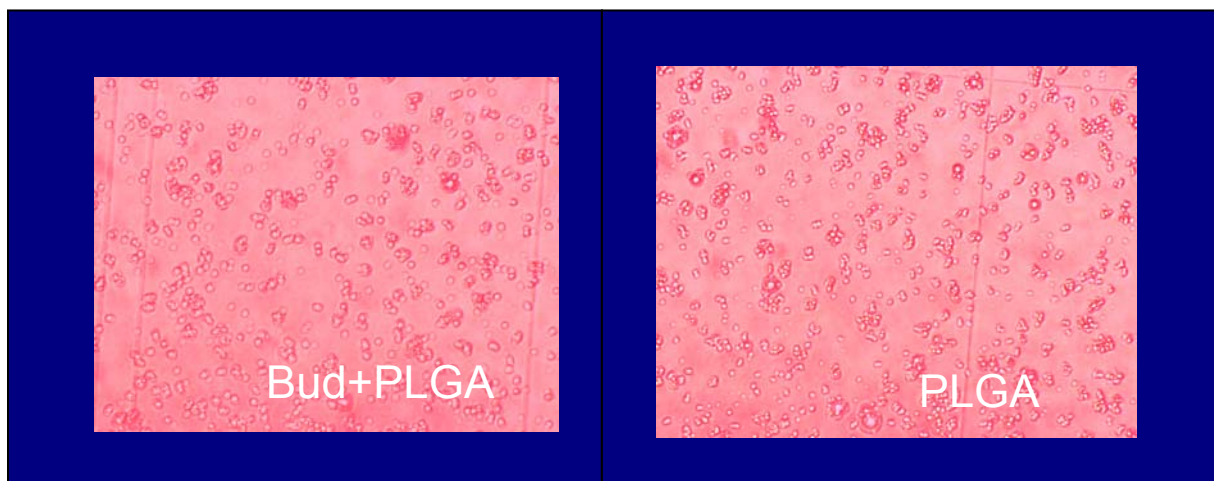


Abbildung 4.61 Mikroskopische Aufnahme der im Medium suspendierten Mikropartikel

Tabelle 4.20 Partikelgrößen [ $\mu\text{m}$ ] der PLGA-Mikropartikel mit und ohne 9,1 % Budesonid

Partikelgröße PLGA-Mikropartikel ohne Budesonid [ $\mu\text{m}$ ] Becher	Partikelgröße PLGA-Mikropartikel mit 9,1 % Budesonid [ $\mu\text{m}$ ] Becher
2,1	2,43



Die Mikropartikel besitzen einen Durchmesser von etwa 2,4  $\mu\text{m}$ . Dieser Durchmesser liegt im optimalen Bereich, um eine gute Verteilung in der Lunge zu erreichen, wie in Tabelle 1.5 und Abbildung 1.22 dargestellt ist.

Die sprühgetrockneten PLGA-Mikropartikel mit 9,1 % Budesonid werden im Zellversuch eingesetzt. Hierfür werden Zellen der murinen Zelllinie RAW 264.7 eingesetzt. Dies ist eine Makrophagen Zelllinie. Vor der BAL sind 90 % davon Makrophagen. Wenn eine Entzündung induziert wird, steigt die Konzentration der eosinophilen Granulozyten bis zu 70 % an, zusätzlich sind Lymphozyten vorhanden und die Makrophagenkonzentration sinkt auf etwa 30 %. Die Methode von Ek (55) diente als Vorlage für die Zellversuche. Ziel dieser Zellversuche ist der Nachweis, dass verkapseltes Budesonid in PLGA die Entzündung effektiver und über einen längeren Zeitraum unterdrücken kann, als unverkapseltes Budesonid. Als Referenz dient das unverkapselte Budesonid. Zur Stimulation der Zellen wird Lipopolysaccharid (LPS) eingesetzt, die Zellen bilden dadurch pro-inflammatorische Zytokine wie Interleukin-6 (IL-6).

Die Überprüfung der Unterdrückung der Entzündung findet durch Messung der IL-6 [pg/ml] Konzentrationen statt, die nach 24 Stunden gemessen wird. Es wird stets Medium, LPS und die jeweilige Behandlung mit unverkapseltem Budesonid, dem Polymer PLGA, der PLGA-Sprüheinbettung mit Budesonid (Komplex) und der physikalischen Mischung appliziert. Aus Gründen der Übersicht ist in Abbildung 4.62 nur die Behandlung auf der x-Achse dargestellt.

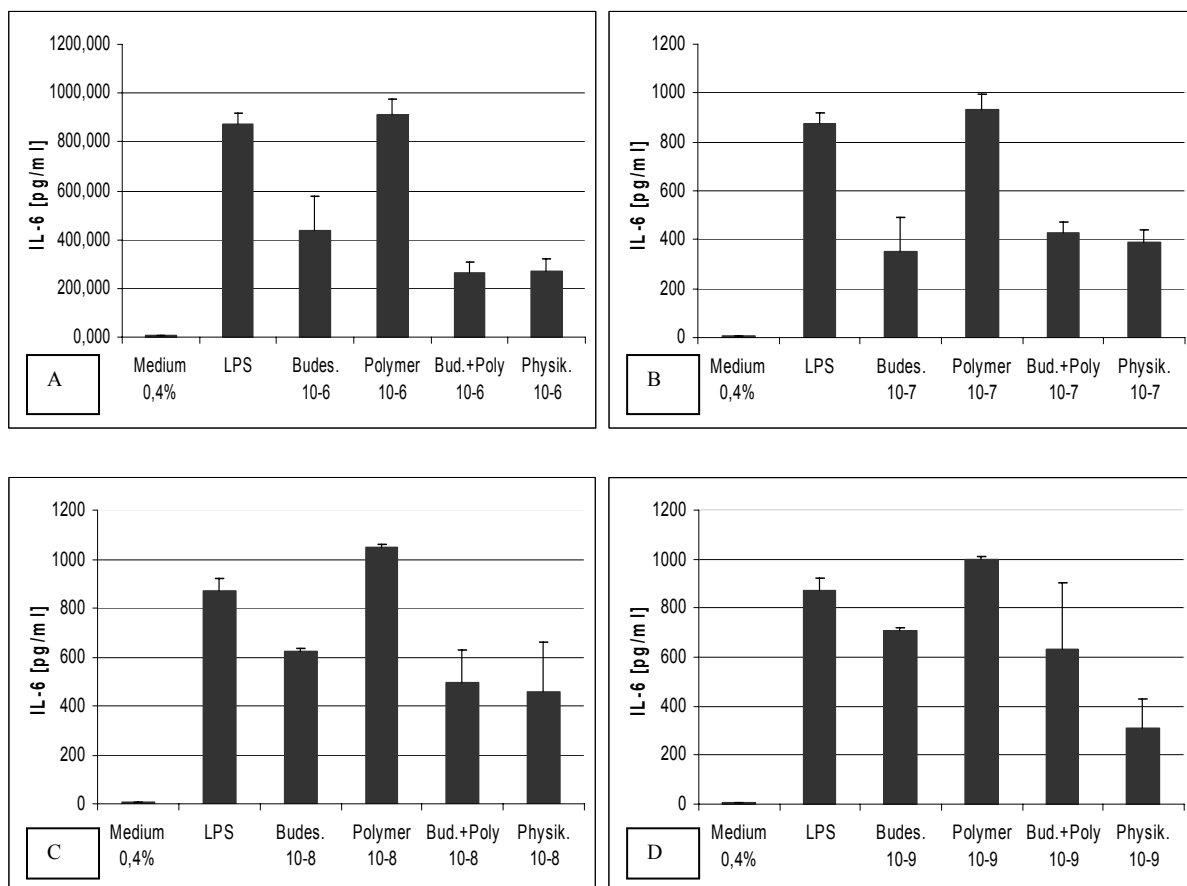


Abbildung 4.62 A Zellversuch der Konzentration  $10^{-6}$  M B Zellversuch der Konzentration  $10^{-7}$  M  
C Zellversuch der Konzentration  $10^{-8}$  M D Zellversuch der Konzentration  $10^{-9}$  M  
(n=3, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an)

Abbildung 4.62 zeigt die IL-6 Konzentration [pg/ml] und die Substanzen bzw. die Sprüheinbettung und die physikalische Mischung in den Konzentrationen  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M und  $10^{-9}$  M, die zur Unterdrückung von IL-6 eingesetzt werden. Das Polymer alleine

scheint bei allen eingesetzten Konzentrationen eine Entzündung nicht zu unterdrücken. Die physikalische Mischung hingegen hat einen Effekt auf die Entzündung. Dies ist interessant, sollte aber nicht überbewertet werden, da eine homogene Mischung nicht komplett gewährleistet ist. In der Abbildung 4.62 gibt es Hinweise darauf (Abb. 4.62 A und C), dass bei Konzentrationen von  $10^{-6}$  M und  $10^{-8}$  M, die Downregulierung der IL-6 Konzentration durch die Sprüheinbettung von 9,1 % Budesonid mit PLGA in stärkerem Ausmaß erfolgt, als bei reinem Budesonid. Diese dosisabhängigen Effekte sind so interessant, dass ein Tierversuch mit Mäusen durchgeführt wird, um die im Zellversuch gewonnenen Erkenntnisse näher zu untersuchen.

#### 4.4 Tierversuche

##### 4.4.1 Überprüfung der Lungenfunktion

Die Versuche an Mäusen werden mit dem Wirkstoff Budesonid der Beladung 9,1 % in PLGA durchgeführt. Die Verabreichung erfolgt intranasal und intraperitoneal, da keine Geräte zur Anwendung an Mäusen zur Verfügung standen, die eine inhalative Gabe ermöglichen. Es erfolgt die Sensibilisierung und Provokation mit Antigen von weiblichen Balb/c-Mäusen, die intraperitoneal mit 100  $\mu$ g OVA als Antigen sensibilisiert werden. An Tag 28 erfolgt die Überprüfung der Lungenfunktion, die nicht invasiv und mittels einem Metacholinaerosol erfolgt. Es wird die Verlängerung der expiratorischen Phase bei steigenden Metacholindosen untersucht.

Um die inhalative Verabreichung besser nachahmen zu können, werden die Untersuchungen hinsichtlich der Verlängerung der expiratorischen Phase (penh) und des Atemwegwiderstandes (AHR, RI) nach nasaler Verabreichung durchgeführt. Hierfür werden die Tiere betäubt, um den Schluckreflex möglichst weitgehend zu umgehen. Zunächst erfolgt die Messung des penh bei steigenden Metacholindosen. In allen nachfolgenden Experimenten geben die Fehlerbalken die Standardabweichung an.

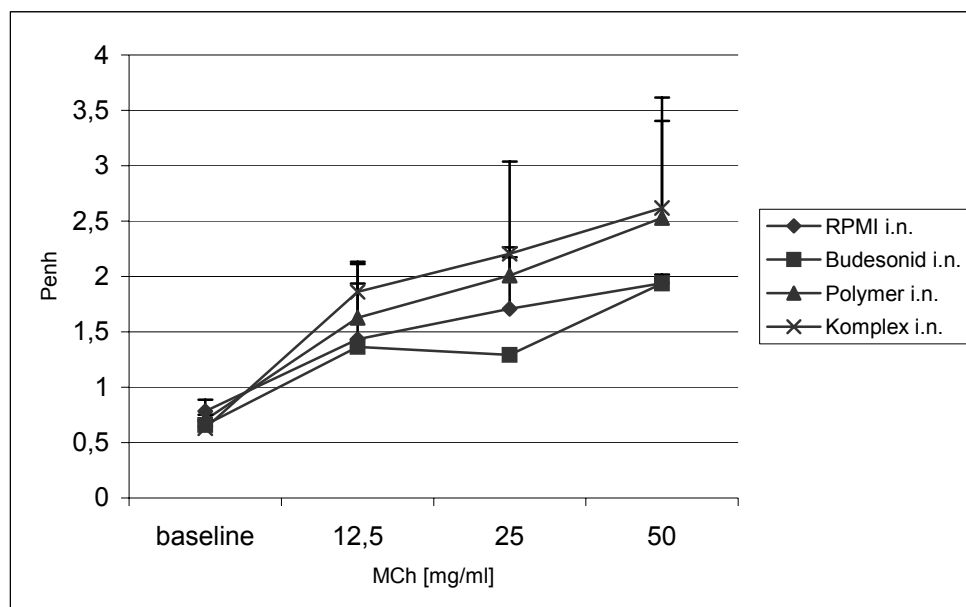


Abbildung 4.63 Penh 24 h nach letzter intranasaler Verabreichung von Budesonid, PLGA und der sprühgetrockneten Mischung von Budesonid und PLGA, sowie dem Medium (RPMI), (n=3).

Dargestellt ist die enhanced pause als penh gegen die Metacholinkonzentration. Die enhanced pause spiegelt die verlängerte expiratorische Phase wider und gibt den Zustand der oberen Atemwege wieder. Erstaunlicherweise verlaufen hier die Kurven von Medium und unverkapseltem Budesonid bis zu 12,5 mg/ml Metacholindosis ähnlich, wobei das unverkapselte Budesonid einen minimal besseren Effekt auf die Unterdrückung des penh hat, als das Medium. Erst ab Metacholindosen > 12,5 mg/ml zeigt das unverkapselte Budesonid eine stärkere Unterdrückung des penh. Die Sprüheinbettung von Budesonid mit PLGA sowie das reine PLGA haben keine positiven Effekte hinsichtlich der expiratorischen Phase. Diese Ergebnisse sind jedoch nicht sehr aussagekräftig, da teils große Standardabweichungen zu sehen sind. Ausserdem wurden die Tiere betäubt, was wiederum einen Einfluss auf die Atmung ausüben kann. Ein Teil der verabreichten Menge kann verschluckt worden sein. Diese Abbildung zeigt einen ungewöhnlichen Effekt bei alleiniger Verbreichung des Polymers auf den Widerstand. In ähnlicher Form war dieser Effekt auf die IL-6 Produktion bei Makrophagen zu sehen.

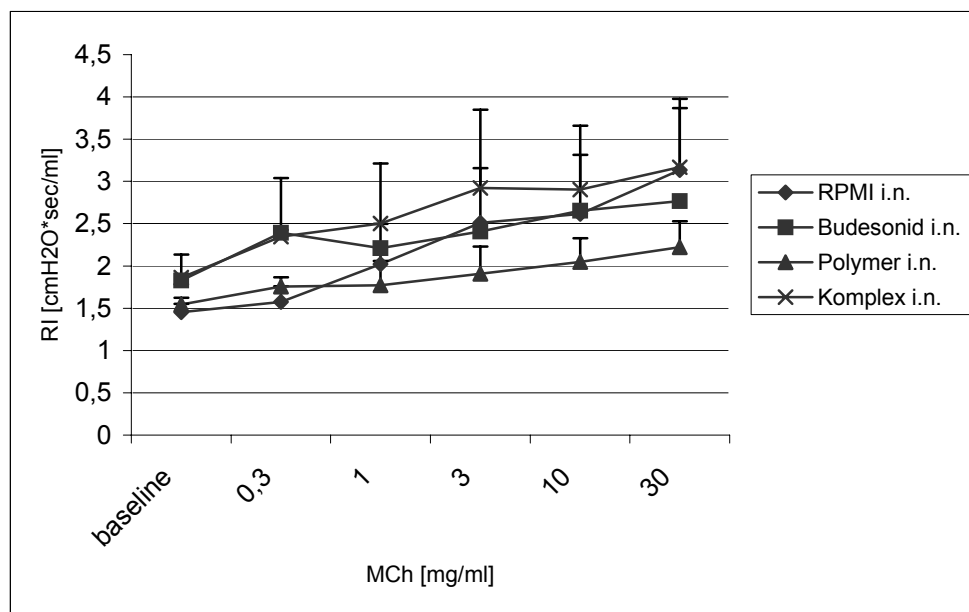


Abbildung 4.64 Messung des Atemwiderstandes RI an Tag 5 nach letzter intranasaler Verabreichung von Budesonid, PLGA und der sprühgetrockneten Mischung von Budesonid und PLGA, sowie dem Medium (RPMI), (n=3).

In Abbildung 4.64 ist der Atemwiderstand RI gegen die Metacholinkonzentration dargestellt. Die Messung des Atemwegswiderstandes RI ist die gemessene Druckdifferenz von Oesophagus und Trachea. Als mechanischer Parameter wird der Atemwegswiderstand gemessen, der die Reaktion der oberen Luftwege wiedergibt, aufgetragen gegen die Metacholinkonzentration, die mittels Vernebler verabreicht wird.

Je höher der Atemwegswiderstand ist, umso schlechter ist der Krankheitsverlauf. Interessanterweise ist bei intranasaler Verabreichung zu sehen, dass bei steigenden Metacholinkonzentrationen das Polymer PLGA den RI am besten und deutlich effektiver als das unverkapselte Budesonid unterdrückt. Da die Untersuchungen nach den nicht-invasiven Messungen des penh einen eher negativen Effekt des Polymers PLGA aufzeigen, sollte der positive Effekt des PLGAs bei der Messung des Atemwiderstandes vorsichtig bewertet werden. Die sprühgetrockneten PLGA-Mikropartikel mit Budesonid haben bei intranasaler Verabreichung keinen positiven Effekt auf den Atemwegswiderstand. Dies kann auf die Betäubung der Mäuse zurückgeführt werden, deren Atmung dadurch beeinflusst werden

kann. Eine andere Möglichkeit wäre, dass der Effekt des Budesonids nach intranasaler Verabreichung nicht so lange anhält. Auch sind große Standardabweichungen bei der Sprüheinbettung und dem unverkapselten Budesonid zwischen den Tieren zu sehen. Auch könnte es im Medium zu einer Aufquellung des Polymers kommen, die Größe der Mikropartikel hätte sich dann verändert, so dass diese dann einen zu großen Durchmesser gehabt hätten und aufgrund dieses Effektes gar nicht pulmonal deponiert werden konnten und zudem die Atemwege blockiert haben könnten.

Die beste Simulation der physiologischen Gegebenheiten würde durch eine inhalative Verabreichung erreicht werden. Ein Mikrospray, das die Partikel dispergieren würde, wäre als Applikationsgerät gut geeignet. Zusätzlich könnte man dann den möglichen Effekt des Aufquellens der Polymermatrix verhindern und möglicherweise bei intranasaler Gabe einen positiven Einfluss der PLGA-Sprüheinbettung verzeichnen. Die Untersuchungen bezüglich der Verlängerung der expiratorischen Phase und des Atemwegswiderstandes werden bei intraperitonealer Verabreichung wiederholt.

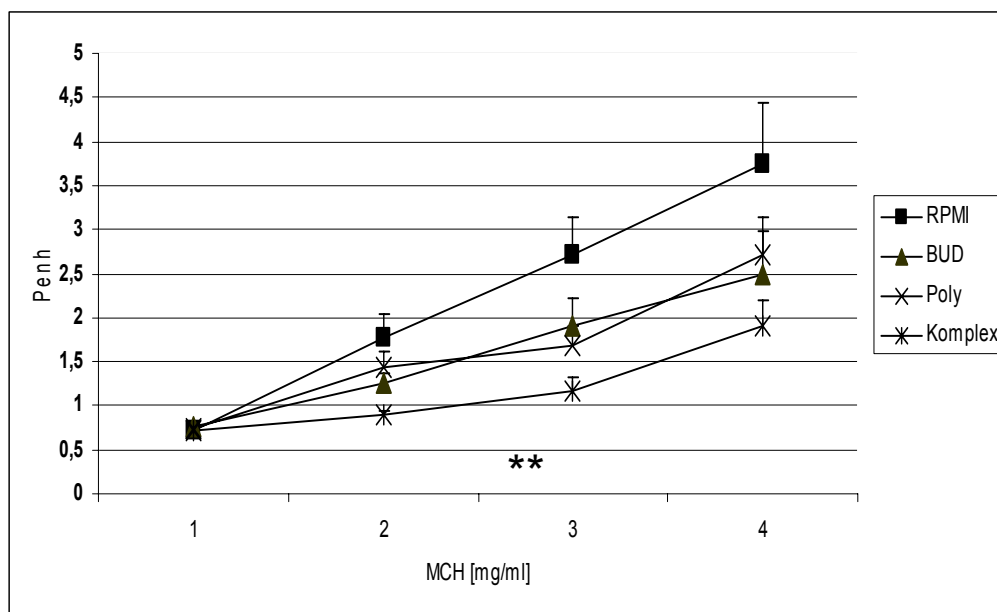


Abbildung 4.65 Penh 24 h nach letzter intraperitonealer Verabreichung von Budesonid, PLGA und der sprühgetrockneten Mischung von Budesonid und PLGA, sowie dem Medium (RPMI), (n=8).

Dargestellt ist die enhanced pause als penh gegen die Metacholinkonzentration. Diese spiegelt die verlängerte expiratorische Phase wider und gibt den Zustand der oberen Atemwege wieder. Die Ergebnisse bei intranasaler Verabreichung sind denen bei intraperitonealer Gabe nicht ähnlich. Die Positivkontrolle hat hier gut reagiert, das Medium kann die Krankheitsverschlechterung bei steigender Metacholinkonzentration nicht aufhalten. Auch das Polymer PLGA alleine hat keine protektiven Effekte hinsichtlich des penh. Budesonid als Reinsubstanz verbessert diese. Die Sprüheinbettung mit Budesonid (Komplex) hat die besten Effekte hinsichtlich der Unterdrückung des penh auch bei steigenden Metacholinkonzentrationen. Die Wirkung der sprühgetrockneten PLGA-Mikropartikel mit Budesonid ist signifikant besser, als die des unverkapselten Budesonids.

An Tag 32 werden die Mäuse nochmals einem 1 % OVA Aerosol ausgesetzt, um den Retard-Effekt zu überprüfen. Nach 24 Stunden erfolgt die Messung des Atemwegswiderstandes RI (invasiv). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.66 dargestellt.

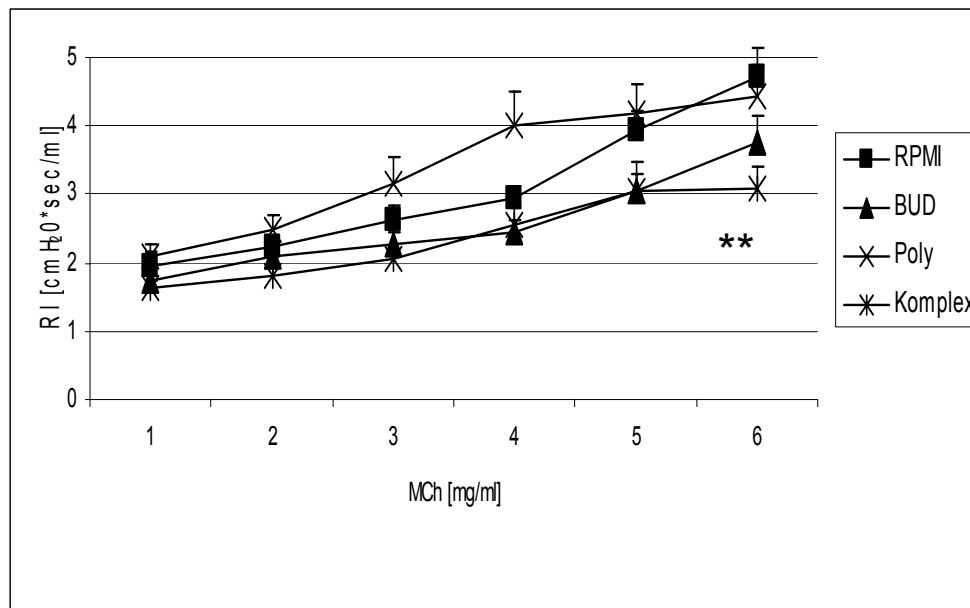


Abbildung 4.66 Messung des Atemwiderstandes RI an Tag 5 nach letzter intraperitonealer Verabreichung von Budesonid, PLGA und der sprühgetrockneten Mischung von Budesonid und PLGA, sowie dem Medium (RPMI), (n=7).

Dargestellt ist die Messung des Atemwegswiderstandes RI, der als mechanischer Parameter die Reaktion der oberen Luftwege wiedergibt, aufgetragen gegen die Metacholinkonzentration, die mittels Vernebler verabreicht wird.

Je höher der Atemwegswiderstand ist, umso schlechter ist der Krankheitsverlauf. Das PLGA alleine scheint auch hier keinen Einfluss auf die Unterdrückung des Atemwegswiderstandes auszuüben. Ebenso das Medium, das als Positivkontrolle dient. Das reine Budesonid kann den RI unterdrücken. Die Sprüheinbettung mit Budesonid hingegen unterdrückt den Atemwegswiderstand signifikant auch bei hohen Metacholindosen und scheint einen positiven Einfluss auf diesen auszuüben. D.h. mit OVA sensibilisierte Mäuse wären vor einem Anstieg oder der Entwicklung eines erhöhten Atemwegswiderstandes bei Verwendung der Sprüheinbettung besser geschützt. Doganci, Finotto et al. (50) führten ein ähnliches Experiment durch: Sie untersuchten, ob eine Blockade des löslichen IL-6 Rezeptors einen Effekt auf den allergisch bedingten RI haben würde und verglichen diese Effekte mit den Beobachtungen, die aus der Blockade (mittels anti IL-6 Rezeptor Antikörpern) von beiden (membranständigem und löslichem) Rezeptoren hervorging. OVA sensibilisierte Mäuse reagierten mit einem Anstieg des RI verglichen mit den Kontrolltieren (Kochsalzlösung). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine anti IL-6 Rezeptor Behandlung den RI mehr reduzierte, als mit Glykoprotein 130 Fc behandelten Mäusen. Die Autoren schlossen auf einen positiven Effekt der anti IL-6 Antikörper Behandlung in Bezug auf den RI.

Die Ergebnisse bei intraperitonealer Gabe, die ohne Betäubung der Mäuse durchgeführt wurden sind vielversprechend, was die untersuchten Effekte der sprühgetrockneten Budesonid PLGA-Mikropartikel hinsichtlich des Atemwiderstandes und der expiratorischen Phase betrifft. Bei beiden Parametern hat die Sprüheinbettung deutliche Vorteile gegenüber dem unverkapselten Budesonid gezeigt, bei sehr geringen Abweichungen zwischen den einzelnen Tieren. Diese Ergebnisse stellen eine interessante und aussichtsreiche Grundlage dar, die weitere intensivere und größer angelegte Studien rechtfertigen.

Die Bestimmung der Zytokinabgabe erfolgt durch eine bronchoalveolare Lavage (BAL) 24 Stunden nach der letzten Antigenexposition. Die aus der Lungenspülung erhaltene

Menge an Flüssigkeit wird gesammelt und der Anteil an lebenden Zellen nach Färbung mit Trypanblau ermittelt. Nach Zentrifugation werden die Eosinophilen durch eine Haematoxylin/Eosinfärbung der Cytospins mikroskopisch bestimmt.

In Abbildung 4.67 ist die IL-6 Konzentration in der bronchoalveolaren Lavage Flüssigkeit (BALF) nach Verabreichung von isotonischer Kochsalzlösung (Saline), dem als Referenz fungierenden Medium, dem unverkapseltem Budesonid, dem Polymer PLGA und der Sprüheinbettung mit 9,1 % Budesonid (Komplex) zu sehen.

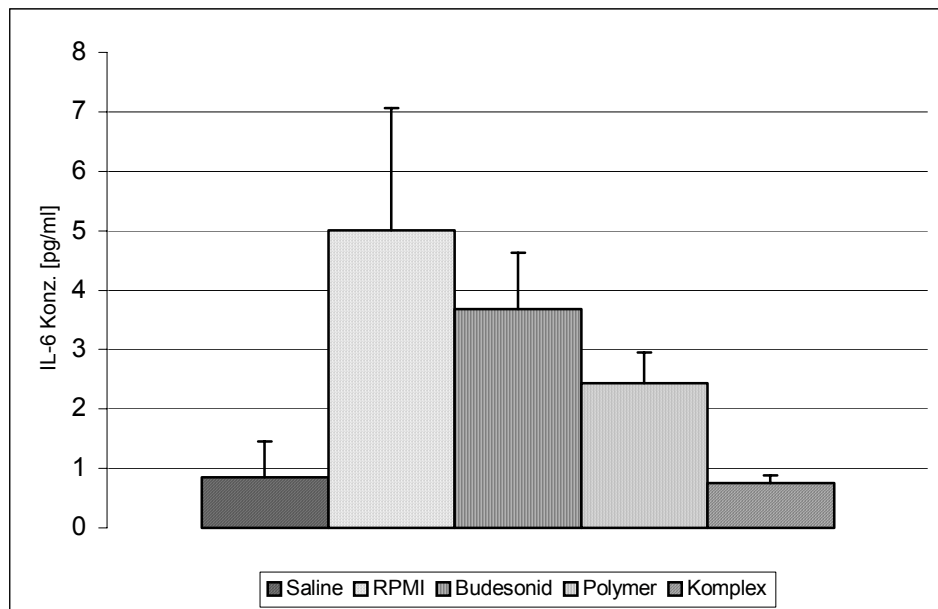


Abbildung 4.67 IL-6 Produktion in der BALF, 24 h nach letzter Antigenexposition, (n=3).

Wie in Abbildung 4.67 zu sehen ist, hat die Positivkontrolle des Mediums gut reagiert. Die Abbildung zeigt sehr deutlich die Downregulation der IL-6 Konzentration in der Lunge durch die Sprüheinbettung mit Budesonid (Komplex). Auch hier kann mit dem Polymer PLGA eine deutliche Reduktion der IL-6 Konzentration erreicht werden, die etwa 1/3 geringer ist, als die des unverkapselten Budesonids. Die Lavage wurde nach i.p. Verabreichung einer PLGA Sprüheinbettung mit Budesonid gemacht. Daraus ist ersichtlich, dass auch bei dieser Art der Applikation ein Effekt, nämlich eine Downregulation der Entzündungsparameter, im Lungengewebe nachweisbar ist. Asthma ist charakterisiert durch eine vermehrte Infiltration von CD4+ TH-2 in die Atemwege, die Signalzytokine produzieren (50). Nach der Verabreichung von Steroiden kommt es zu einer Proliferation von T-Zellen. Doganci, Finotto et al. (50) zeigten, dass eine selektive Blockade des sIL-6 Rezeptors in der Lunge zu einer signifikanten Downregulation von Interleukinen (IL-4, -5, -13) in BALF von OVA sensibilisierten Mäusen führt. Sie analysierten die Zytokine in BALF und fanden heraus, dass eine Behandlung mit anti IL-6 Rezeptor Antikörpern mit einer signifikanten Induktion von u.a. IL-10 assoziiert war (in BALF von OVA sensibilisierten Mäusen).

Diese Ergebnisse aus den Zell- und Tierversuchen bieten eine hochinteressante Grundlage für weitere Forschungen. Es wäre interessant zu wissen, was die anderen Polymere, PLA und PLGA II, für Effekte in der Lunge oder im murinen Zellmodell auslösen und ob diese den positiven Eindruck des PLGAs ebenfalls aufweisen können. Weiterhin würden sich Versuche mit anderen Budesonidanteilen (4,8 %, 20%, 30 % und 44,4 %) anbieten. Für die Applikation wäre es von Vorteil, ein Gerät zur inhalativen Verabreichung der sprühgetrockneten Mikropartikel bei Mäusen zu haben. Zur Zeit werden Vorbereitungen in Zusammenarbeit mit der Uniklinik Mainz getroffen, ein Gerät zu testen, das in der Lage ist, ein Mikrospray zu generieren, so dass eine intratracheale Verabreichung möglich wäre. Somit könnte man den möglichen Effekt der Aufquellung des Polymers im Medium umgehen.

#### 4.4.2 Entnahme von CD4+ Milzzellen zur Überprüfung der Zellentwicklung in den verschiedenen Zellzyklen

Die Milz der Mäuse wurde post mortem entnommen, um die Proliferation von CD4+ Zellen zu überprüfen, die mit Medium, Budesonid, PLGA, der Sprüheinbettung von 9,1 % Budesonid in PLGA und Dexamethason behandelt wurden. Die Milz ist ein peripheres Organ, das T-Zellen bildet und diese demzufolge in hoher Anzahl enthält. CD4+ ist ein Oberflächenmarker, der charakteristisch für T-Zellen ist. M1 bis M5 sind die verschiedenen Zellzyklen.

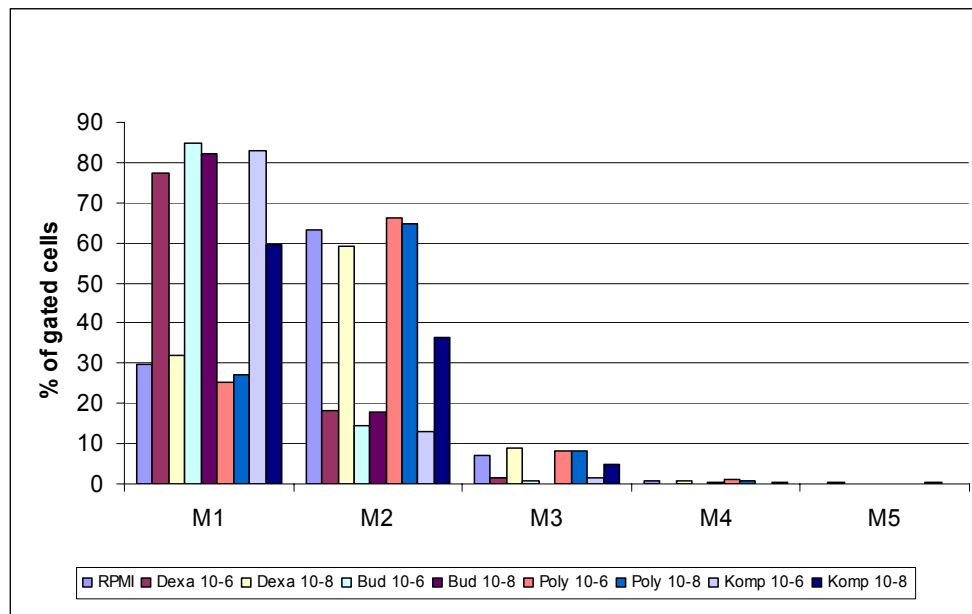


Abbildung 4.68 Proliferation von CD4+ Zellen nach Behandlung mit Medium, Budesonid, Dexamethason und der PLGA-Sprüheinbettung mit 9,1 % Budesonid, dargestellt nach Zellzyklen

Wie in Abbildung 4.68 zu sehen ist, proliferieren CD4+ Zellen, die mit reinem Medium behandelt wurden und sind auch noch in M2 und M3 erkennbar. Das Polymer alleine (Poly) hat keinen Einfluss auf die Proliferation, da Zellen, die mit Polymer behandelt wurden, auch in der Mitosephase 3 noch auftreten. Dexamethason hat einen Einfluss auf die Proliferation der CD4+ Zellen, wie auch Budesonid, da eine prozentuelle Abnahme der Zellanzahl zu erkennen ist. Zellen, die mit der Sprüheinbettung (Komplex) behandelt wurden zeigen bereits eine deutliche Abnahme der Zellzahl in M2. Die Sprüheinbettung, vor allem die der Konzentration  $10^{-6}$  M, scheint die Zellprogression zu inhibieren, d.h. sie inhibiert CD4+ Zellen. Bei dieser Konzentration ist die Inhibition stärker, als bei Gabe des unverkapselten Budesonids. Es werden mehr T regulatorische Zellen gebildet, die die Effektor CD4+ Zellen unterdrücken. Diese Versuche bieten eine Grundlage zur intensiveren Untersuchung der T regulatorischen Zellen, die die Proliferation von TH-2 Zellen unterdrücken.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Ergebnisse der Pulvercharakterisierung, angefangen von der Einstellung des Sprühtrockners, den Bildern der Rasterelektronenmikroskopie und der laserdiffraktometrischen Partikelgrößenmessung, sowie die Untersuchungen zur Kristallinität und der spezifischen Oberfläche der sprühgetrockneten Mikropartikel ergeben, dass es mit Hilfe der Sprühtrocknung möglich ist, Polymer-Mikropartikel herzustellen, die aufgrund ihrer Partikelgröße von  $d_{50} \leq 5,8 \mu\text{m}$  fähig sind, die unteren Abschnitte der Lunge zu erreichen. Diese sprühgetrockneten Mikropartikel sind mit Budesonid und Salbutamol kugelförmig und je nach Beladung mit Arzneistoff mit einer glatten, ebenmäßigen Oberfläche oder mit strukturierter Oberfläche, wie bei 44,4 % Budesonidbeladung, versehen. Salbutamolsulfat Mikropartikel sind kollabiert und weisen z.T. Löcher auf. Die Morphologie der Mikropartikel ist abhängig vom zu versprühenden Produkt. Im Fall einer Lösung, wie bei Budesonid und einer Suspension, wie bei Salbutamol, entstehen runde, nicht kollabierte Mikropartikel, bei Sprühtrocknung einer w/o Emulsion mit Lecithin als Emulgator erhält man kollabierte Mikropartikel. Ein möglicher Grund hierfür kann sein, dass sich während der Trocknung im Sprühturm im Tropfeninneren eine Dampfphase befindet. Von aussen trocknet der Tropfen und wird dann für den Dampf im Inneren des Tropfens undurchlässig. Die äussere Hülle scheint flexibel zu sein, der Tropfen kühlt ab und dadurch reduziert sich das innere Volumen, wodurch der Partikel die kollabierte Form annimmt. Lecithin scheint die Hülle flexibel und schwer dampfdurchlässig zu machen, da bei den Versuchen ohne Lecithin, ob als Lösung oder Suspension versprüht, stets runde Mikropartikel entstanden sind. Eine ähnliche Begründung könnte sein, dass das Lösungsmittel, hier Wasser, das einen höheren Siedepunkt hat, wahrscheinlich nicht quantitativ verdampft und eine Art Film im Inneren der Mikropartikel bildet, der zu dieser Form der Mikropartikel beiträgt, wie Zhang (186) vermutete. Eine Untersuchung der Mikropartikel mittels Dampfraum-Gas-Chromatographie-Analyse (Headspace GC) könnte eine zusätzliche Option zur Charakterisierung der sprühgetrockneten Produkte bezüglich des Restlösemittelgehaltes darstellen.

Thermodynamisch und röntgenpulverdiffraktometrisch betrachtet handelt es sich um amorphe Produkte, die aber über lange Zeit in diesem Zustand stabil sind. Der teilweise lange Zeitraum von bis zu 1 Jahr, der zwischen der Sprühtrocknung und der Bestimmung der Kristallinität mittels DSC und Röntgenpulverdiffraktometrie liegt, untermauert dies. Die spezifischen Oberflächen korrelieren mit den gemessenen Teilchengrößen. Sprühgetrocknete Arzneistoffe, die amorph sind, weisen kleinere und homogenere Partikelgrößen mit einem höheren Feinpartikelanteil auf, als mechanisch mikronisierte Arzneistoffe (37, 154, 168). Der amorphe Zustand des sprühgetrockneten Produktes ist umso ausgeprägter, je höher der Sprühflow, da die Verdampfung des Lösungsmittels rascher vonstatten geht, aufgrund der nicht ausreichenden Zeit, die für die Kristallisation notwendig wäre (35).

Die Bestimmung des Arzneistoffgehalts, d.h. die Wiederfindung der eingesetzten Arzneistoffmenge in den sprühgetrockneten Polymer-Mikropartikeln und die Freigaberversuche zur Charakterisierung der Retardierungseigenschaften der verwendeten Polymere R 202 (PLA), RG 502H (PLGA) und RG 752 (PLGA II) ergeben, dass es mit Hilfe der Sprühtrocknung von Budesonid und Salbutamol mit den Polymeren möglich ist, retardierende Mikropartikel herzustellen. Die Wiederfindung von Budesonid und Salbutamol in den sprühgetrockneten Polymer-Mikropartikeln entspricht nahezu der eingesetzten Menge. Bei Salbutamolsulfat ist dies nicht der Fall. Die Versprühung als w/o Emulsion erweist sich bei diesen höheren Mengen eines wasserlöslichen Arzneistoffs hinsichtlich der



Verkapselungseffizienz als ungeeignet. Eine mögliche Erklärung für den geringen Salbutamolsulfatgehalt in den Polymer-Mikropartikeln könnte sein, dass Salbutamolsulfat in zu hoher Menge eingesetzt wurde und nicht vollständig eingeschlossen werden konnte und der Wirkstoff an der Wandung des Sprühturmes durch elektrostatische Anziehung festgehalten wurde und somit für die Einbettung in die verschiedenen Polymermatrices nicht mehr zur Verfügung stand. Eine weitere Erklärung bietet die visuell nicht wahrnehmbare Adhäsion von Salbutamolsulfat an den Silikonschlauch des Sprühtrockners. Die Affinität des hydrophilen Salbutamolsulfats mit den zumeist hydrophoben Polymeren konnte durch die Sprühtrocknung nicht verbessert werden.

Das FreisetzungsmEDIUM in der vorliegenden Arbeit ist den physiologischen Bedingungen soweit als möglich angepasst. Stichprobenartige Versuche bei Freisetzungen von Budesonid aus Polymer-Mikropartikeln mit 0,5 %, 1 % und 2 % Surfactant im Medium ergaben, dass eine Medienzusammensetzung mit 1 % Surfactant vorteilhaft ist. Die Unterschiede waren gering, es ergaben sich jedoch etwas höhere Freigaben mit einem 1 % igen Medium. Die in-vitro Freisetzungen machen deutlich, dass eine Retardierung von Budesonid und Salbutamol möglich ist, aber von verschiedenen Faktoren abhängt. Der wichtigste Faktor ist die Auswahl des Polymers. Aus den untersuchten Freigaben erweist sich das Polymer PLGA mit einem Laktid- und Glykolidanteil von je 50 % als sogenanntes Allroundpolymer. Es vereint lipophile und hydrophile Eigenschaften. Die Wahl des Polymers mit einer endständigen freien Carboxylgruppe betont den eher hydrophilen Charakter dieses Polymers. PLGA erzielt von den eingesetzten Polymeren die besten Freigaben. Durch Kenntnis und gezielte Auswahl der Zusammensetzung der Polymere können Retardierungen von unterschiedlichem Ausmaß erreicht werden. Auch das Molekulargewicht kann die Freisetzung beeinflussen, da höher molekulare Polymere langsamer erodiert werden. Ein weiterer Faktor ist die Beladung des Polymers mit Arzneistoff, die auch einen Einfluss auf dessen freigegebene Menge zu haben scheint. So wurde meist mit weniger Beladung eine höhere Freigabe erreicht. Der Grund ist in der Teilchengröße und der damit zusammenhängenden Oberfläche zu suchen: Der Anteil des Polymers war immer der gleiche, es variierte die Menge an Arzneistoff, die gleichzeitig die Viskosität der Sprühlösung bestimmte. Eine höher viskose Lösung bildet größere Tröpfchen, die zu größeren Mikropartikeln trocknen. Sprühgetrocknete Mikropartikel mit einem kleineren Durchmesser besitzen eine größere Oberfläche, die sie dem umgebenden Medium anbieten können. Dieses hat somit eine große Angriffsfläche. Die Freigabe des Arzneistoffs findet durch den Zerfall des Polymers und Erosion statt, die bei in-vitro Versuchen hydrolytisch bedingt sind, verbunden mit Diffusionsvorgängen (41). Bei dem hier betrachteten Zeitraum von 48 Std. kann allerdings wahrscheinlich nur von einer anfänglichen Hydrolyse gesprochen werden. Das Polymer quillt zunächst auf und eine Erosion findet erst nach mehreren Tagen bis Wochen statt. Die Freigabe beruht eher auf Diffusionsvorgängen. Hinweise auf das Freigabeverhalten der Polymere könnten, nach 100 % iger Freigabe der Arzneistoffe, REM Aufnahmen geben. Eine Option bei nicht vollständiger Freigabe wäre, die Gesamtprobe am Ende der Freisetzung mit einem Überschuss an organischem Lösungsmittel zu versetzen, um damit den Restgehalt der Arzneistoffe in der Probe zu detektieren.

Freigaberversuche mit Salbutamolsulfat ergaben, dass der Arzneistoff bei Kontakt mit dem umgebenden Medium freigesetzt wird und keine Retardierung erreicht werden kann. Eine Erklärung für die sofortige Freigabe kann die Lösung des Arzneistoffs in Wasser sein und die anschließende Sprühtrocknung als w/o Emulsion mit Lecithin als Emulgator. Die Mikropartikel sind kollabiert und weisen zum Teil Löcher auf, die bei Kontakt mit dem wässrigen Medium als Poren fungieren können und dadurch den leicht wasserlöslichen Arzneistoff sofort freisetzen könnten. Eine weitere mögliche Erklärung für das nicht retardierende Freigabeverhalten von Salbutamolsulfat aus den Polymer-Mikropartikeln wäre, dass Wasser in die amorphen Mikropartikel gut eindringt, das Salbutamolsulfat löst und es im Inneren der Mikropartikel zu einer Erhöhung des osmotischen Drucks kommt, der zur Folge hat, dass Salbutamolsulfat sofort freigegeben wird.

Eine zusätzliche Retardierung könnte mit dem Zusatz von lipophilen Säuren, wie Embonsäure zur Sprühlösung erzielt werden. Auch die Retardierungscharakteristika einer Kombination zweier oder mehrerer Polymere in einer zu versprühenden Lösung wären

interessant für weitere Untersuchungen. Bei Sprühtrocknung von w/o Emulsionen könnten verschiedene andere Emulgatoren getestet werden und deren Auswirkung auf die Morphologie, Oberflächenbeschaffenheit und Freigaben der Mikropartikel untersucht werden. Des Weiteren wäre der Einsatz von Porenbildnern, wie PEG, in Konzentrationen von 0,1-10 % denkbar, sowie der Einsatz von niedrig molekularen Polymeren mit Molekulargewichten von etwa 800 g/mol, die die teilweise niedrigen Freigaben von Budesonid in den Polymeren PLA und PLGA II durch Bildung von winzigen Kanälen und Poren durch deren Herausschwemmen, bzw. schnellerem Erodieren, bei Kontakt mit dem wässrigen Medium erhöhen könnte. Eine interessante Variation wäre auch, die Versuche mit einem anderen Lösungsmittel, wie z.B. Ethylacetat, durchzuführen oder verschiedene Mischungen von Dichlormethan und Ethylacetat einzusetzen und die Auswirkungen hinsichtlich der untersuchten Parameter zu untersuchen.

Bezüglich der alveolaren Clearance könnten zwei Wege in Betracht gezogen werden: Die Alveolarmakrophagen mittels Freigabe einer Initialdosis beschäftigen, damit die eigentliche Formulierung nicht phagozytiert wird und um damit die Clearance in der Lunge weitgehend zu umgehen oder die Alveolarmakrophagen gezielt behandeln. Man könnte die Mikropartikel mit wasserlöslichen Makromolekülen überziehen, um diese beispielsweise für Alveolarmakrophagen uninteressant zu machen, wie Tabata (156) dies bei ihren in-vitro Versuchen an murinen peritonealen Makrophagen-Zellkulturen zur Untersuchungen der Phagozytose von PLA-, PGA- (Polyglykolsäure) und PLGA-Mikropartikeln tat. Die Mikropartikel waren alle  $< 2 \mu\text{m}$ . Es konnte kein Zusammenhang zwischen dem verwendeten Polymer und dem Ausmaß der Phagozytose beobachtet werden. Die Überzüge hatten dagegen einen Einfluss auf die Phagozytose: Mit bovinem Serum Albumin (BSA) oder nicht proteinären Makromolekülen überzogene Mikropartikel reduzierten die Phagozytose, während diese bei z.B. mit Gelatine überzogenen Mikropartikeln zunahm. Sharma (145) und Suarez (155) führten gezielte Transporte von Rifampicin und Rifampicin plus Isoniazid beladenen PLGA-Mikropartikeln zu den Alveolarmakrophagen durch, um Tuberkulose an Meerschweinchen und Ratten zu behandeln. Edwards (54) geht von einer Reduktion der Phagozytose durch Alveolarmakrophagen aus, wenn die Partikel einen Durchmesser von mehr als  $3 \mu\text{m}$  besitzen. Prior (132) untersuchte in-vitro die Phagozytose und die Makrophagen Aktivierung durch PLA-, PLGA- und PLGA II- Mikropartikel. Er verabreichte Placebo und Polymer mit Gentamycinsulfat. Die Phagozytose war ausgeprägter bei hydrophoberen Polymeren.

PLGA-Mikropartikel mit 9,1 % Budesonid wurden im Zellversuch hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur retardierten Freigabe und damit zur Unterdrückung einer provozierten Entzündung getestet. Zur Stimulation der Zellen wurde Lipopolysaccharid (LPS) eingesetzt, die Zellen bildeten dadurch pro inflammatorische Zytokine wie Interleukin-6 (IL-6). Die Überprüfung der Unterdrückung der Entzündung fand durch Messung der IL-6 [pg/ml] Konzentrationen statt, die nach 24 Stunden gemessen wurde. Es wurde stets Medium, LPS und die jeweilige Behandlung mit unverkapseltem Budesonid, dem Polymer PLGA, der PLGA-Sprüheinbettung mit Budesonid (Komplex) und der physikalischen Mischung appliziert. Es ergaben sich Hinweise darauf, dass bei Konzentrationen von  $10^{-6}$  M und  $10^{-8}$  M, die Downregulation der IL-6 Konzentration durch die Sprüheinbettung von 9,1 % Budesonid mit PLGA in stärkerem Ausmaß erfolgte, als bei unverkapseltem Budesonid (die physikalische Mischung zeigt ähnliche Effekte, die aber nicht überbewertet werden sollten, da eine Homogenität der Mischung nicht gewährleistet werden konnte).

Diese dosisabhängigen Effekte waren so interessant, dass ein Tierversuch mit Mäusen durchgeführt wurde, um die im Zellversuch gewonnen Erkenntnisse näher zu untersuchen. Die Versuche an Mäusen wurden ebenfalls mit PLGA-Mikropartikeln und dem Wirkstoff Budesonid der Beladung 9,1 % durchgeführt. Die Verabreichung erfolgte intranasal und intraperitoneal, da keine Geräte zur Anwendung an Mäusen zur Verfügung standen, die eine inhalative Gabe ermöglichten. Es erfolgte die Sensibilisierung und Provokation mit OVA Antigen von weiblichen Balb/c-Mäusen, die intraperitoneal sensibilisiert wurden. Am Tag 28 erfolgte die Überprüfung der Lungenfunktion, die nicht invasiv und mittels einem Metacholinaerosol durchgeführt wurde. Es wurde der penh, die Verlängerung der expiratorischen Phase, bei steigenden Metacholindosen untersucht. Um die inhalative

Verabreichung besser nachahmen zu können, wurden diese Untersuchungen auch nach nasaler Verabreichung durchgeführt. Hierfür wurden die Tiere betäubt, um den Schluckreflex möglichst weitgehend zu umgehen. Bei intranasaler Applikation haben die Sprüheinbettung von Budesonid mit PLGA sowie das reine PLGA keine positiven Effekte hinsichtlich der expiratorischen Phase. Diese Ergebnisse sind jedoch nicht sehr aussagekräftig, da teils große Standardabweichungen zu sehen sind, außerdem wurden die Tiere betäubt, was wiederum einen Einfluss auf die Atmung ausüben kann. Ein Teil der verabreichten Menge kann verschluckt worden sein. Die darauf folgende Messung des Atemwegswiderstandes RI ist die gemessene Druckdifferenz von Oesophagus und Trachea. Als mechanischer Parameter wird der Atemwegswiderstand gemessen, der die Reaktion der oberen Luftwege wiedergibt, bei steigenden Metacholinkonzentrationen, die mittels Vernebler verabreicht werden. Je höher der Atemwegswiderstand ist, umso schlechter ist der Krankheitsverlauf. Interessanterweise war bei intranasaler Verabreichung zu sehen, dass bei steigenden Metacholinkonzentrationen das Polymer PLGA den RI am besten und deutlich effektiver als das unverkapselte Budesonid unterdrückt. Die sprühgetrockneten PLGA-Mikropartikel mit Budesonid hatten bei intranasaler Verabreichung keinen positiven Effekt auf den Atemwegswiderstand. Dies kann wiederum auf die Betäubung der Mäuse zurückgeführt werden, deren Atmung dadurch beeinflusst werden kann. Auch waren große Standardabweichungen zwischen den Tieren bei der Sprüheinbettung und dem unverkapselten Budesonid zu sehen. Die beste Simulation der physiologischen Gegebenheiten würde durch eine inhalative Verabreichung erreicht werden. Die Untersuchungen bezüglich der Verlängerung der expiratorischen Phase und des Atemwegswiderstandes wurden bei intraperitonealer Verabreichung wiederholt. Die Ergebnisse bei intranasaler Verabreichung sind denen bei intraperitonealer Gabe nicht ähnlich. Die Positivkontrolle hatte hier gut reagiert, d.h. das Medium konnte die Krankheitsverschlechterung bei steigender Metacholinkonzentration nicht aufhalten. Budesonid als Reinsubstanz verbesserte diese. Die Sprüheinbettung mit Budesonid hatte die besten Effekte hinsichtlich der Unterdrückung des penh auch bei steigenden Metacholinkonzentrationen. Die Wirkung der sprühgetrockneten PLGA-Mikropartikel mit Budesonid war signifikant besser, als die des unverkapselten Budesonids. Die Mäuse wurden nochmals einem 1 % OVA Aerosol ausgesetzt, um den Retard-Effekt zu überprüfen. Nach 24 Stunden erfolgte die Messung des Atemwegswiderstandes RI (invasiv). Das PLGA alleine schien auch hier weniger Einfluss auf die Unterdrückung des Atemwegswiderstandes auszuüben. Das reine Budesonid konnte den RI unterdrücken. Die Sprüheinbettung mit Budesonid hingegen unterdrückte den Atemwegswiderstand signifikant auch bei hohen Metacholindosen. Die Ergebnisse bei intraperitonealer Gabe, die ohne Betäubung der Mäuse durchgeführt wurden sind vielversprechend, was die untersuchten Effekte der sprühgetrockneten Budesonid PLGA-Mikropartikel hinsichtlich des Atemwiderstandes und der expiratorischen Phase betrifft. Bei beiden Parametern hat die Sprüheinbettung sehr deutliche Vorteile gegenüber dem unverkapselten Budesonid gezeigt, bei sehr geringen Abweichungen zwischen den einzelnen Tieren.

Einige Variationen dieser Zell- und Tierversuche ergeben sich aus den beschriebenen möglichen Veränderungen im technologischen Teil. So wäre beispielsweise die Durchführung der Zell- und Tierversuche mit anderen Polymeren, anderen Budesonidbeladungen oder anderen Arzneistoffen überlegenswerte Ansätze. Idealerweise sollte die Verabreichung inhalativ erfolgen, dafür müsste aber, wie erwähnt, ein Gerät zur Verwendung bei Mäusen entwickelt werden. Zur Zeit werden Vorbereitungen in Zusammenarbeit mit der Uniklinik Mainz getroffen, ein Gerät zu testen, das in der Lage ist, ein Mikrospray zu generieren, so dass eine intratracheale Verabreichung möglich wäre. Auch die Markierung der Mikropartikel mit einem Fluoreszenzmarker wäre ein weiterführender Schritt. Hiermit könnten interessante Hinweise auf die Verteilung der Mikropartikel nach inhalativer oder intraperitonealer Gabe untersucht werden.

Die Auswertung der Lungenlavage Flüssigkeit zeigt sehr deutlich die Downregulation der IL-6 Konzentration in der Lunge durch die Sprüheinbettung mit Budesonid. Die Lavage wurde nach i.p. Verabreichung einer PLGA Sprüheinbettung mit Budesonid gemacht. Daraus

ist ersichtlich, dass auch bei dieser Art der Applikation ein Effekt, nämlich eine Downregulation der Entzündungsparameter, im Lungengewebe nachweisbar ist.

Um die Proliferation von Zellen, die mit Medium, Budesonid, Dexamethason und der PLGA-Sprüheinbettung mit 9,1 % Budesonid behandelt wurden zu untersuchen, wurde die Milz von Mäusen entfernt. Die Milz ist ein peripheres Organ, das T-Zellen bildet und diese demzufolge in hoher Anzahl enthält. Die Auswertung ergab, dass die Sprüheinbettung in einer Konzentration von  $10^{-6}$  M die Zellprogression zu inhibieren scheint, d.h. sie inhibiert CD4+ Zellen. Bei dieser Konzentration ist die Inhibition stärker, als bei Gabe des unverkapselten Budesonids. Diese Ergebnisse, sowie diejenigen aus dem technologischen Teil stellen eine interessante und aussichtsreiche Grundlage dar, die weitere intensivere und größer angelegte Studien rechtfertigen.

## 6 Anhang

### Teilchengröße der Budesonid Sprüheinbettungen

Budesonidanteil im Polymer [%]	mit PLGA II [ $\mu\text{m}$ ]	mit PLA [ $\mu\text{m}$ ]	mit PLGA [ $\mu\text{m}$ ]
4,8	2,69	1,72	1,96
9,1	3,32	2,27	2,43
20,0	3,31	3,15	2,18
30,0	2,10	1,67	2,04
44,4	3,88	4,26	2,89

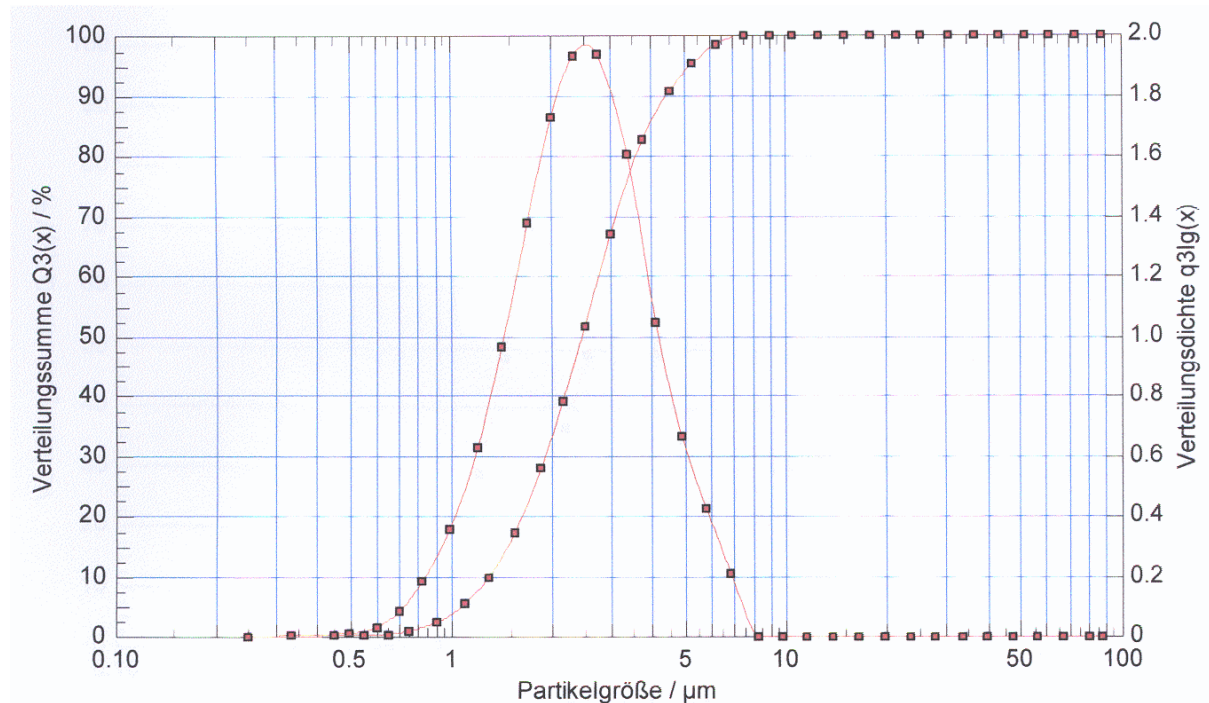
### Teilchengröße der Salbutamol(-sulfat) Sprüheinbettungen

Salbutamolanteil im Polymer	mit PLA [ $\mu\text{m}$ ]	mit PLGA [ $\mu\text{m}$ ]	mit PLGA II [ $\mu\text{m}$ ]
4,8	1,29	1,74	1,91
9,1	1,74	1,66	2,01

Salbutamolsulfatanteil im Polymer [%]	mit PLA [ $\mu\text{m}$ ]	mit PLGA [ $\mu\text{m}$ ]	mit PLGA II [ $\mu\text{m}$ ]
4,8	1,78	3,20	2,24
9,1	2,10	3,32	2,35

Partikelgrößen-Scan des Laserdiffraktometers am Beispiel von sprühgetrocknetem

PLGA II



BET-Oberfläche 4,8 %, 44,4 % Budesonid mit PLA, PLGA, PLGA II

	Oberfläche [m <sup>2</sup> / g]	Oberfläche [m <sup>2</sup> / g]	Standardabw.
44 % Budesonid mit PLGA	1,5116	1,2464	0,19
4,8 % Budesonid mit PLGA	2,1099	1,6192	0,35
44 % Budesonid mit PLGA II	1,2674	1,1523	0,08
4,8 % Budesonid mit PLGA II	1,7382	1,5140	0,16
44 % Budesonid mit PLA	1,1322	1,1181	0,01
4,8 % Budesonid mit PLA	2,4808	1,8170	0,45

BET-Oberfläche der Einzelsubstanzen

	Oberfläche [m <sup>2</sup> /g]	Oberfläche [m <sup>2</sup> /g]	Standardabw.
Budesonid s.-d.	3,8279	3,9356	0,07
Salbutamol s.-d.	0,7886	n.b.	0,00
Salbutamolsulfat s.-d.	2,8284	2,8284	0,00
PLA s.-d.	2,7226	2,7346	0,01
PLGA s.-d.	1,3018	1,3288	0,02
PLGA II s.-d.	1,2356	1,1869	0,03

## BET-Oberfläche 4,8 %, 9,1 % Salbutamol mit PLA- PLGA-, PLGA II-Mikropartikeln

	Oberfläche [m <sup>2</sup> /g]	Oberfläche [m <sup>2</sup> /g]	MW	Standardabw.
4,8 % Salbutamol mit PLA	2,7742	2,7435	2,759	0,02
9,1 % Salbutamol mit PLGA	2,4520	2,3449	2,399	0,08
4,8 % Salbutamol mit PLGA	2,2859	2,9014	2,594	0,44
9,1 % Salbutamol mit PLGA II	2,3620	2,2615	2,314	0,07
4,8 % Salbutamol mit PLGA II	2,6500	2,4752	2,563	0,12

## BET-Oberfläche 4,8 %, 9,1 % Salbutamolsulfat mit PLA-, PLGA-, PLGA II-Mikropartikeln

	Oberfläche [m <sup>2</sup> /g]	Oberfläche [m <sup>2</sup> /g]	MW	Standardabw.
9,1 % Salbutamolsulfat mit PLA	7,4959	7,5311	7,514	0,030
4,8 % Salbutamolsulfat mit PLA	5,1966	6,222	5,709	0,730
9,1 % Salbutamolsulfat mit PLGA	2,4254	n.b.	2,425	0,000
4,8 % Salbutamolsulfat mit PLGA	2,1200	2,0299	2,075	0,064
9,1 % Salbutamolsulfat mit PLGA II	3,5853	3,7654	3,675	0,130
4,8 % Salbutamolsulfat mit PLGA II	4,4171	4,5	4,459	0,060

2 mg sprühgetrocknetes Budesonid werden in 8 ml Medium für den Zeitraum von 48 Std. inkubiert, dann zentrifugiert. Die Analyse (des Überstandes) erfolgt mittels HPLC und die Ermittlung der Löslichkeit anhand der Kalibriergeraden von Budesonid. Es ergibt sich eine Löslichkeit von Budesonid im Medium von 1,044 mg/ 8ml Medium.

## Löslichkeit von Budesonid/ ml im Medium

Fläche [mAU*sec]	Konzentration [µg/ml]
3349,03369	131,0335
3322,45068	129,9928
3337,92554	130,5286
	130,5183 Mittelwert

Im Vorversuch wurde durch Vergleich der HPLC Ergebnisse ermittelt, dass beim Zentrifugieren derselbe Wert erhalten wird, wie beim Filtrieren und bei der Kombination filtrieren und zentrifugieren. Aufgrund der Zeit- und Kostenersparnis wird deswegen zentrifugiert (10 min, 8000 rpm).

## Vergleich Zentrifugieren, Filtrieren und beides kombiniert

1 mg Budesonid in 100 ml 0,9% NaCl Lösung + 1 % Surfactant + Puffer 5 mM + 0,1 % SDS, 48 Std.

	1	mg/ 8ml	2	mg/ 8ml	3	mg/ 8ml
1: Zentrifuge	2567,1491	0,79336	2915,37964	0,9008	3277,49194	1,0128
2: Filter	2903,97705	0,89750	2720,26855	0,8408	3027,02563	0,9352
3: Zentrifuge + Filter	2704,91333	0,83592	3101,21533	0,9584	3055,83691	0,9448

Freisetzung PLA-Mikropartikel mit 20 % Budesonid, Medium mit 0,5 %, 1 %, 2 %

Surfactantanteil

	20% mit PLA (2*S.)	Standardabw.	1% S.	Standardabw.	0,5 % S.	Standardabw.
0,25	1,17	0,51	1,72	0,04	1,00	0,02
0,5	1,76	0,32	2,15	0,08	1,47	0,01
1	4,69	3,03	3,72	0,14	3,04	0,61
2	7,80	0,48	13,57	0,92	10,19	1,00
4	19,45	1,37	24,19	0,46	22,49	1,73
8	25,52	1,29	30,78	0,06	28,11	0,85
12	28,73	2,09	35,33	0,17	32,16	0,95
24	35,58	2,78	42,38	0,42	39,22	0,57
30	37,35	2,76	44,56	0,42	40,93	1,08
48	42,78	3,01	50,32	0,10	47,53	1,09

Freisetzung PLA-Mikropartikel mit 30 % Budesonid, Medium mit 0,5 %, 1 %, 2 %

Surfactantanteil

	30% mit PLA (2*S.)	Standardabw.	1 % S.	Standardabw.	0,5 % S.	Standardabw.
0,25	5,52	0,95	6,14	0,34	8,06	3,77
0,5	6,64	2,07	7,40	1,88	11,26	5,37
1	8,15	1,69	9,86	1,75	14,20	4,03
2	24,58	7,64	28,88	4,80	27,72	5,79
4	39,8	3,45	41,54	1,72	41,25	1,55
8	47,52	1,82	50,28	1,35	50,33	1,85
12	53,80	1,66	55,83	2,19	55,88	1,78
24	61,99	1,71	64,68	1,36	65,17	3,10
30	64,31	1,31	66,82	1,20	67,15	1,89
48	69,92	1,62	71,70	1,33	74,34	2,52

Ähnlichkeitsfaktor PLA-Mikropartikel mit 20 % Budesonid, Medium mit 0,5 %, 1 %, 2 %

Surfactantanteil

20 % PLA

2 % mit 0,5 %

	20% mit PLA (2*S.)	0,5 % S.	f2
0,25	1,17	1,00	75,5694
0,5	1,76	1,47	
1	4,69	3,04	
2	7,80	10,19	
4	19,45	22,49	
8	25,52	28,11	
12	28,73	32,16	
24	35,58	39,22	
30	37,35	40,93	
48	42,78	47,53	



1 % mit 0,5 %

	1% S.	0,5 % S.	f2
0,25	1,72	1,00	78,2867
0,5	2,15	1,47	
1	3,72	3,04	
2	13,57	10,19	
4	24,19	22,49	
8	30,78	28,11	
12	35,33	32,16	
24	42,38	39,22	
30	44,56	40,93	
48	50,32	47,53	

1 % mit 2 %

	1% S.	2 % S.	f2
0,25	1,72	1,17	63,3113
0,5	2,15	1,76	
1	3,72	4,69	
2	13,57	7,80	
4	24,19	19,45	
8	30,78	25,52	
12	35,33	28,73	
24	42,38	35,58	
30	44,56	37,35	
48	50,32	42,78	

Ähnlichkeitsfaktor PLA-Mikropartikel mit 30 % Budesonid, Medium mit 0,5 %, 1 %, 2 %

Surfactananteil

30 % PLA

2 % mit 0,5 %

	2 % S.	0,5 % S.	f2
0,25	5,52	8,06	71,6231
0,5	6,64	11,26	
1	8,15	14,20	
2	24,58	27,72	
4	39,80	41,25	
8	47,52	50,33	
12	53,80	55,88	
24	61,99	65,17	
30	64,31	67,15	
48	69,92	74,34	

1 % mit 0,5 %

	1 % S.	0,5 % S.	f2
0,25	6,14	8,06	81,2592
0,5	7,40	11,26	
1	9,86	14,20	
2	28,88	27,72	
4	41,54	41,25	
8	50,28	50,33	
12	55,83	55,88	
24	64,68	65,17	
30	66,82	67,15	
48	71,70	74,34	

1 % mit 2 %

	1 % S.	30% mit PLA (2*S.)	f2
0,25	6,14	5,52	79,8715
0,5	7,40	6,64	
1	9,86	8,15	
2	28,88	24,58	
4	41,54	39,80	
8	50,28	47,52	
12	55,83	53,80	
24	64,68	61,99	
30	66,82	64,31	
48	71,70	69,92	

Freisetzung PLGA-Mikropartikel mit 20 % Budesonid, Medium mit 1 %, 2 %

Surfactantanteil

20% (2% S.)			1% S.	
Zeit [Std.]	M [%]	Standardabw.	20%	Standardabw.
0,25	1,20	0,21	1,88	0,14
0,5	2,313	0,30	16,10	0,40
1	22,73	0,84	24,39	1,96
2	40,45	1,05	40,32	1,77
4	55,95	0,87	55,84	2,13
8	71,07	1,15	69,53	2,52
12	78,52	0,75	79,08	2,01
24	87,44	0,81	86,84	2,20
30	88,28	1,02	89,13	2,30
48	92,33	0,87	92,63	2,20

Freisetzung PLGA-Mikropartikel mit 30 % Budesonid, Medium mit 1 %, 2 %

Surfactantanteil

30% (2% S.)

1% S.

Zeit [Std.]	M [%]	Standardabw.	30%	Standardabw.
0,25	1,05	0,36	1,80	0,40
0,5	6,52	6,47	2,86	0,35
1	29,73	4,30	27,23	1,99
2	45,91	3,18	43,93	2,59
4	61,68	3,14	59,92	2,66
8	76,22	2,00	73,11	2,16
12	82,90	0,64	81,68	1,95
24	88,67	0,19	87,94	1,68
30	89,60	0,86	89,62	2,13
48	92,45	0,85	92,51	2,42

Ähnlichkeitsfaktor PLGA-Mikropartikel mit 20 %, 30 % Budesonid, Medium mit 1 %, 2 %

Surfactananteil

20 % PLGA

30 % PLGA

2 % mit 1 %

Zeit [Std.]	2 % S. M [%]	1% S. 20%	f2
0,25	1,20	1,88	67,091
0,5	2,313	16,10	
1	22,73	24,39	
2	40,45	40,32	
4	55,95	55,84	
8	71,07	69,53	
12	78,52	79,08	
24	87,44	86,84	
30	88,28	89,13	
48	92,33	92,63	

Zeit [Std.]	2% M [%]	1% S. 30%	f2
0,25	1,05	1,80	82,7621
0,5	6,52	2,86	
1	29,73	27,23	
2	45,91	43,93	
4	61,68	59,92	
8	76,22	73,11	
12	82,90	81,68	
24	88,67	87,94	
30	89,60	89,62	
48	92,45	92,51	

Freisetzung PLGA II-Mikropartikel mit 20 % Budesonid, Medium mit 1 %, 2 %

Surfactantanteil

Zeit [Std.]	20% (2% S.)		1% S.	
	M [%]	Standardabw.	20%	Standardabw.
0,25	1,71	0,35	4,62	0,17
0,5	3,14	0,15	5,89	0,20
1	8,77	0,46	13,93	4,60
2	15,65	0,29	20,94	0,77
4	23,25	0,12	29,30	1,01
8	30,78	0,21	38,36	1,46
12	35,64	0,19	45,49	1,39
24	43,57	0,21	53,87	1,66
30	45,58	0,22	57,40	1,72
48	50,09	0,93	63,23	2,10

Freisetzung PLGA II-Mikropartikel mit 30 % Budesonid, Medium mit 1 %, 2 %

Surfactantanteil

Zeit [Std.]	30% (2% S.)		1% S.	
	M [%]	Standardabw.	30%	Standardabw.
0,25	5,01	1,79	6,03	1,87
0,5	4,64	1,19	8,22	0,74
1	11,22	3,46	13,44	1,90
2	23,02	3,10	24,00	2,37
4	35,62	3,00	36,82	2,69
8	47,42	3,29	48,33	2,25
12	53,22	2,80	56,00	2,87
24	62,17	2,89	65,54	2,53
30	64,14	2,74	68,72	2,51
48	68,90	2,35	73,40	2,23

Ähnlichkeitsfaktor PLGA II-Mikropartikel mit 20 % Budesonid, Medium mit 1 %, 2 %

Surfactant

20 % PLGA  
II

30 % PLGA  
II

Zeit [Std.]	20% (2% S.)		1% S.	f2
	M [%]	20%	20%	
0,25	1,71	4,62	4,62	54,1255
0,5	3,14	5,89	5,89	
1	8,77	13,93	13,93	
2	15,65	20,94	20,94	
4	23,25	29,30	29,30	
8	30,78	38,36	38,36	
12	35,64	45,49	45,49	
24	43,57	53,87	53,87	
30	45,58	57,40	57,40	
48	50,09	63,23	63,23	

Zeit [Std.]	30% (2% S.)		1% S.	f2
	M [%]	30%	30%	
0,25	5,01	6,03	6,03	75,867
0,5	4,64	8,22	8,22	
1	11,22	13,44	13,44	
2	23,02	24,00	24,00	
4	35,62	36,82	36,82	
8	47,42	48,33	48,33	
12	53,22	56,00	56,00	
24	62,17	65,54	65,54	
30	64,14	68,72	68,72	
48	68,90	73,40	73,40	

## Freisetzung PLGA-Mikropartikel mit 4,8 %, 9,1 %, 20 %, 30 %, 44,4 % Budesonid

	Budesonid s.-d.	Standardabw.	5%	Standardabw.	10%	Standardabw.
0,25	104,36	4,76	3,39	0,84	2,37	0,69
0,5	107,30	2,71	6,79	1,34	7,19	3,90
1	109,03	1,96	34,02	3,23	26,85	4,86
2	107,44	3,88	58,68	2,99	47,80	4,31
4	108,01	3,93	72,66	1,95	66,51	4,73
8	106,44	1,43	82,03	2,39	81,50	5,03
12	109,20	3,11	87,75	3,09	89,24	6,58
24	106,99	2,10	90,36	2,25	96,56	6,44
30	106,31	2,38	90,38	2,56	96,49	7,52
48	106,74	1,31	91,38	2,95	101,86	15,00

20%	Standardabw.	30%	Standardabw.	44,44%	Standardabw.
1,88	0,14	1,80	0,40	20,20	2,44
16,10	0,40	2,86	0,35	25,11	2,70
24,39	1,96	27,23	1,99	34,09	2,35
40,32	1,77	43,93	2,59	45,35	3,23
55,84	2,13	59,92	2,66	53,68	2,25
69,53	2,52	73,11	2,16	61,67	1,88
79,08	2,01	81,68	1,95	68,17	2,85
86,84	2,20	87,94	1,68	69,64	3,27
89,13	2,30	89,62	2,13	81,56	4,38
92,63	2,02	92,51	2,42	83,09	7,12

Ähnlichkeitsfaktor der Freisetzung von 4,8 %, 9,1 %, 20 %, 30 %, 44,4 % Budesonid  
aus PLGA-Mikropartikeln

f2 PLGA-Mikropartikel

	4,8%	9,1%	20%	30%
mit 9,1%	59,7625			
mit 20%	49,3800	53,1840		
mit 30%	55,9500	59,3100	65,3100	
mit 44%	40,1350	41,51200	48,2400	44,0945

## Freisetzung PLA-Mikropartikel mit 4,8 %, 9,1 %, 20 %, 30 %, 44,4 % Budesonid

	Budesonid s.-d.	Standardabw.	5%	Standardabw.	10%	Standardabw.
0,25	104,36	4,76	5,05	0,65	4,85	0,24
0,5	107,30	2,71	5,57	0,02	5,32	0,33
1	109,03	1,96	9,06	0,36	7,11	0,80
2	107,44	3,88	18,23	0,07	10,47	0,81
4	108,01	3,93	35,06	0,45	15,3	1,04
8	106,44	1,43	38,96	0,42	25,03	2,10
12	109,20	3,11	57,82	0,13	31,66	1,93
24	106,99	2,10	67,48	0,38	40,86	1,33
30	106,31	2,38	69,53	0,48	43,52	1,45
48	106,74	1,31	75,8	2,06	49,46	1,33

20%	Standardabw.	30%	Standardabw.	44,44%	Standardabw.
3,27	0,04	7,69	0,34	20,56	2,10
3,75	0,08	8,11	3,02	26,36	9,52
5,38	0,14	11,49	1,79	23,05	2,62
15,29	0,91	30,57	4,84	28,58	3,58
26,04	0,56	43,29	1,76	33,46	3,80
32,63	0,07	52,09	1,40	36,74	4,42
37,23	0,17	57,68	2,23	39,82	4,89
44,33	0,42	66,60	1,41	43,78	5,30
46,57	0,42	68,81	1,23	44,88	5,53
52,39	0,10	73,75	1,38	48,64	6,08

Ähnlichkeitsfaktor der Freisetzung von 4,8 %, 9,1 %, 20 %, 30 %, 44,4 % Budesonid  
aus PLA-Mikropartikeln

f2 PLA-Mikropartikel

	4,8%	9,1%	20%	30%
mit 9,1%	36,6433			
mit 20%	41,4634	64,0069		
mit 30%	59,2330	33,5882	38,5885	
mit 44%	37,2897	43,4619	46,3089	37,9947

## Freisetzung PLGA II-Mikropartikel mit 4,8 %, 9,1 %, 20 %, 30 %, 44,4 % Budesonid

	Budesonid s.-d.	Standardabw.	5%	Standardabw.	10%	Standardabw.
0,25	104,36	4,76	6,16	1,63	3,06	0,48
0,5	107,30	2,71	10,29	1,30	6,24	1,37
1	109,03	1,96	23,31	0,98	16,59	1,99
2	107,44	3,88	35,48	1,29	26,33	1,26
4	108,01	3,93	44,87	1,69	35,87	1,84
8	106,44	1,43	53,97	2,26	45,88	2,63
12	109,20	3,11	60,73	2,69	53,25	3,54
24	106,99	2,10	67,80	3,89	63,64	4,31
30	106,31	2,38	66,35	3,79	66,50	4,65
48	106,74	1,31	73,90	2,88	73,20	5,15

20%	Standardabw.	30%	Standardabw.	44%	Standardabw.
4,62	0,17	6,03	1,87	30,32	2,67
5,89	0,20	8,22	0,74	30,67	1,39
13,93	4,60	13,44	1,90	31,44	0,70
20,94	0,77	24,00	2,37	35,44	1,14
29,3	1,01	36,82	2,69	41,16	2,03
38,36	1,46	48,33	2,25	48,27	3,57
45,49	1,39	56,00	2,87	53,77	3,97
53,87	1,66	65,54	2,53	59,83	3,91
57,4	1,72	68,72	2,51	58,56	0
63,23	2,10	73,40	2,23	62,77	0

Ähnlichkeitsfaktor der Freisetzung von 4,8 %, 9,1 %, 20 %, 30 %, 44,4 % Budesonid  
aus PLGA II-Mikropartikeln

## f2 PLGA II-Mikropartikel

	4,8%	9,1%	20%	30%
mit 9,1%	59,6028			
mit 20%	46,0595	54,8060		
mit 30%	60,6950	75,5730	54,4885	
mit 44%	46,2050	42,2755	41,7050	43,4255

## Freisetzung sprühgetrocknetes, mikronisiertes Salbutamol

Salb. mikr.	Salb. s.-d.		
Mittelwert	Standardabw.	M [%]	Standardabw.
98,935	6,30	94,72	2,26
101,91	0,78	95,05	0,33
101,82	0,79	94,82	0,93
100,92	13,97	95,16	2,30
100,44	0,97	95,15	0,58
100,58	1,93	95,65	1,35
96,12	3,28	97,12	0,59
96,89	5,83	96,24	0,82
94,51	3,29	95,65	1,28
100,49	1,24	96,35	0,90

## Freisetzung 4,8 % Salbutamol aus PLA-, PLGA-, PLGA II-Mikropartikeln

## 4,8 % Salbutamol mit PLA

Zeit [Std.]	PLA		PLGA		PLGA II	
	M [%]	Standardabw.	M [%]	Standardabw.	M [%]	Standardabw.
0,25	2,35	0,00	5,00	0,15	13,43	1,17
0,5	3,72	1,25	6,48	1,45	15,51	1,12
1	7,56	0,65	19,74	4,33	17,45	0,74
2	15,99	2,44	41,40	3,34	17,75	0,80
4	24,76	1,36	57,18	0,57	18,00	0,61
8	37,15	2,06	68,42	0,77	18,10	0,61
12	40,02	0,80	75,25	1,20	18,63	0,94
24	55,03	0,82	79,36	0,91	19,76	1,52
30	57,90	1,61	81,05	1,43	18,67	0,56
48	57,30	1,32	84,64	0,28	18,68	0,64

## Ähnlichkeitsfaktor 4,8 % Salbutamol mit PLA, PLGA, PLGA II

Salbutamol  
4,8%

PLA mit PLGA				PLA mit PLGA II			
Zeit [Std.]	PLA M [%]	PLGA M [%]	f2	Zeit [Std.]	PLA M [%]	PLGA II M [%]	f2
			30,61153				31,4647
0,25	2,35	5,00		0,25	2,35	13,43	
0,5	3,72	6,48		0,5	3,72	15,51	
1	7,56	19,74		1	7,56	17,45	
2	15,99	41,40		2	15,99	17,75	
4	24,76	57,18		4	24,76	18,00	
8	37,15	68,42		8	37,15	18,10	
12	40,02	75,25		12	40,02	18,63	
24	55,03	79,36		24	55,03	19,76	
30	57,90	81,05		30	57,90	18,67	
48	57,30	84,64		48	57,30	18,68	

PLGA mit  
PLGA II

Zeit [Std.]	PLGA M [%]	PLGA II M [%]	f2
			17,5864
0,25	5,00	13,43	
0,5	6,48	15,51	
1	19,74	17,45	
2	41,40	17,75	
4	57,18	18,00	
8	68,42	18,10	
12	75,25	18,63	
24	79,36	19,76	
30	81,05	18,67	
48	84,64	18,68	



## Freisetzung 9,1 % Salbutamol aus PLA-, PLGA-, PLGA II-Mikropartikeln

Zeit [Std.]	PLA		PLGA		PLGA II	
	M [%]	Standardabw.	M [%]	Standardabw.	M [%]	Standardabw.
0,25	19,56	1,32	11,54	0,84	6,42	0,18
0,5	21,50	1,82	12,97	0,94	6,85	0,25
1	22,17	1,43	19,69	1,09	7,32	0,39
2	30,31	1,90	30,64	1,79	7,47	0,43
4	32,26	2,41	37,87	1,05	7,53	0,44
8	36,33	1,51	44,64	1,39	7,47	0,53
12	36,17	0,64	52,43	2,69	7,89	0,45
24	40,81	2,32	53,68	0,80	7,82	0,40
30	43,83	1,11	53,01	1,69	7,78	0,38
48	41,33	3,43	56,42	0,44	7,68	0,33

## Ähnlichkeitsfaktor 9,1 % Salbutamol mit PLA, PLGA, PLGA II

Salbutamol 9,1 %

PLA mit PLGA				PLA mit PLGA II			
Zeit [Std.]	PLA M [%]	PLGA M [%]	f2	Zeit [Std.]	PLA M [%]	PLGA II M [%]	f2
			50,8572				29,02253
0,25	19,56	11,54		0,25	19,56	6,42	
0,5	21,50	12,97		0,5	21,50	6,85	
1	22,17	19,69		1	22,17	7,32	
2	30,31	30,64		2	30,31	7,47	
4	32,26	37,87		4	32,26	7,53	
8	36,33	44,64		8	36,33	7,47	
12	36,17	52,43		12	36,17	7,89	
24	40,81	53,68		24	40,81	7,82	
30	43,83	53,01		30	43,83	7,78	
48	41,33	56,42		48	41,33	7,68	

PLGA mit PLGA II

Zeit [Std.]	PLGA M [%]	PLGA II M [%]	f2
			23,4129
0,25	11,54	6,42	
0,5	12,97	6,85	
1	19,69	7,32	
2	30,64	7,47	
4	37,87	7,53	
8	44,64	7,47	
12	52,43	7,89	
24	53,68	7,82	
30	53,01	7,78	
48	56,42	7,68	

## Sprühgetrocknetes, mikronisiertes Salbutamolsulfat

## s.-d. Salbutamolsulfat

Zeit [Std.]	M [%]	Standardabw.
0,25	92,43	2,60
0,5	95,53	6,90
1	91,87	2,23
2	92,09	2,93
4	91,47	1,84
8	92,81	1,81
12	93,78	2,18
24	92,33	1,88
30	92,57	2,26
48	93,24	2,55

## mikronisiertes Salbutamolsulfat

Zeit [Std.]	M [%]	Standardabweich.
0,25	98,65	0,67
0,5	94,05	3,29
1	92,71	0,63
2	99,98	0,00
4	95,82	1,27
8	95,54	4,00
12	93,41	2,33
24	94,58	2,49
30	95,77	2,38
48	96,14	2,10

## Freisetzung 4,8 % Salbutamolsulfat aus PLA-, PLGA-, PLGA II-Mikropartikeln

PLA			PLGA		
Zeit [Std.]	M [%]	Standardabw.	Zeit [Std.]	M [%]	Standardabw.
0,25	30,66	3,09	0,25	86,84	9,67
1	30,25	4,09	0,5	92,79	7,80
2	30,26	3,10	1	100,03	1,98
12	30,30	2,82	2	101,90	0,00
30	30,66	2,38	4	101,00	2,18
			8	102,94	0,00
			12	104,34	0,99

## PLGA II

Zeit [Std.]	Mittelwert	Standardabw.
0,25	17,16	1,17
0,5	17,90	0,20
1	20,50	0,76
2	21,10	0,60
4	21,40	0,60
12	22,08	0,43

## Ähnlichkeitsfaktor 4,8 % Salbutamolsulfat mit PLA, PLGA, PLGA II

## PLA mit PLGA

Zeit [Std.]	PLA	PLGA	f2
	M [%]	M [%]	
0,25	30,66	86,84	8,2874
1	30,25	100,03	
2	30,26	101,90	
12	30,30	104,34	

## PLA mit PLGA II

Zeit [Std.]	PLA	PLGA II	f2
	M [%]	M [%]	
0,25	30,66	17,16	49,1446
1	30,25	20,50	
2	30,26	21,10	
12	30,30	22,08	

## PLGA mit PLGA II

Zeit [Std.]	PLGA	PLGA II	f2
	M [%]	M [%]	
0,5	86,84	17,16	5,4226
	92,79	17,90	
	100,03	20,50	
	101,90	21,10	
	101,00	21,40	
12	104,34	22,08	

## Freisetzung 9,1 % Salbutamolsulfat aus PLA-, PLGA-, PLGA II-Mikropartikeln

PLA			PLGA		
Zeit [Std.]	M [%]	Standardabw.	Zeit [Std.]	M [%]	Standardabw.
0,25	42,19	0,00	0,25	95,26	1,22
0,5	49,85	0,00	0,5	99,02	1,52
2	56,65	7,99	1	97,58	4,98
8	61,98	13,29	2	100,75	0,89
12	63,12	0,00	4	100,71	1,68
			8	101,13	2,73
			12	100,80	1,31
			24	102,59	1,26

PLGA II		
Zeit [Std.]	M [%]	Standardabw.
0,25	7,13	0,53
0,5	7,81	0,20
1	8,56	0,33

Ähnlichkeitsfaktor 9,1 % Salbutamolsulfat mit PLA, PLGA, PLGA II

PLA mit PLGA

	PLA	PLGA	f2
Zeit [Std.]	M [%]	M [%]	
0,25	42,19	95,26	17,3271
0,5	49,85	99,02	
2	56,65	100,75	
8	61,98	101,13	
12	63,12	100,80	

PLA mit PLGA II

	PLA	PLGA II	f2
Zeit [Std.]	M [%]	M [%]	
0,25	42,19	7,13	20,6029
0,5	49,85	7,81	

PLGA mit PLGA II

	PLGA	PLGA II	f2
Zeit [Std.]	M [%]	M [%]	
0,25	95,26	7,13	2,4162
0,5	99,02	7,81	
1	97,58	8,56	

## 7 Literaturverzeichnis

1. Invivogen Gene Delivery Katalog 2005. S.33
2. 3M. 2000. 3M's Novel OLAs as Sustained Drug Release Agents *3M Delivery, An Update from 3M Delivery Systems* 16: 1-4
3. ABDA Datenbank. 2004.
4. Abt.für Pharmazie EZ. 2004. Praktikumsskript der Abteilung für Pharmazie, ETH Zürich, Wirkstofffreigabe, S.7-10.
5. Agarwal SRA, 1998. Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression durin t cell differentiation *Immunity* 9:765-75
6. Akira S, 2000. The role of IL-18 in innate immunity *Curr. Opin. Immunol.* 12:59-63
7. Alonso MJ, Gupta RK, Min C, Siber GR, Langer R. 1994. Biodegradable microspheres as controlled-release tetanus toxoid delivery systems *Vaccine* 12:299-306

8. Anderson PJ. 2001. Delivery options and devices for aerosolized therapeutics *Chest* 120:89S-93S
9. Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft. 2001. Empfehlung zur Therapie des Asthma bronchiale im Erwachsenenalter *Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft*
10. Bain D, 1996. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 4, Supplement 1:131
11. Bain D, 2002. Biodegradable Microspheres for Controlled Intra- Pulmonal Delivery of Rifampicin to Treat Tuberculosis *Respiratory Drug Delivery* VIII:561-563
12. Bauer Frömming Führer, 2005. Pharmazeutische Technologie, 6. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart
13. Beck LR, Cowsar DR, Lewis DH, Gibson JW, Flowers CE, Jr. 1979. New long-acting injectable microcapsule contraceptive system *Am. J. Obstet. Gynecol.* 135:419-26
14. Becker C, 2005. Inhalatives Insulin bald verfügbar *Pharmazeutische Zeitung* 150 Jahrgang: 24-5
15. Bell J, 2005. Dry Powder Inhalation Technology, Pharmaceutical Manufacturing International.
16. Blanco-Prieto MJ. 1997. In-vitro and in-vivo release kinetics of a somatostatin analogue from PLGA microparticles *Controlled Release Society, Debio Pharm Sheet*, 1-2, reprinted with permission of Controlled Release Society

- 
17. Blanco-Prieto MJ, Besseghir K, Zerbe O, Andris D, Orsolini P et al. 2000. In vitro and in vivo evaluation of a somatostatin analogue released from PLGA microspheres *J Control Release* 67:19-28
  18. Blanco-Prieto MJ, Campanero MA, Besseghir K, Heimgatner F, Gander B. 2004. Importance of single or blended polymer types for controlled in vitro release and plasma levels of a somatostatin analogue entrapped in PLA/PLGA microspheres *J Control Release* 96:437-48
  19. Böck G, 1997. *Wässrige Liposomendispersionen für die Inhalationstherapie*. Dissertation
  20. Bodmeier R, Chen HG. 1988. Preparation of biodegradable poly(+/-)lactide microparticles using a spray-drying technique *J Pharm Pharmacol* 40:754-7
  21. Boehm G, Peyre M, Sesardic D, Huskisson RJ, Mawas F et al. 2002. *Pharm. Res.* 19(9):1330-1336
  22. Boehringer-Ingelheim. 2001. Respimat. Boehringer-Ingelheim Prospekt
  23. Bolton S, 1990. *Pharmaceutical Statistics*. Marcel Dekker Verlag, New York
  24. Bolzen N, 2001. *Pulver zur Inhalation: Physikochemische Charakterisierung, Herstellung und Optimierung*. Dissertation

- 
25. Bot AI, Tarara TE, Smith DJ, Bot SR, Woods CM, Weers JG. 2000. Novel lipid-based hollow-porous microparticles as a platform for immunoglobulin delivery to the respiratory tract *Pharm Res* 17:275-83
  26. Brodka-Pfeiffer K, 2003. Einfluss von Mikronisierungsprozessen auf die physikochemische Stabilität von Pulvern für Inhalationszwecke. Kriterien für die Auswahl von Konditionierungsverfahren. Dissertation
  27. Brodka-Pfeiffer K, Langguth P, Grass P, Hausler H. 2003. Influence of mechanical activation on the physical stability of salbutamol sulphate *Eur J Pharm Biopharm* 56:393-400
  28. Brown L, 2002. Pulmonary Delivery of Novel Insulin Microspheres *Respiratory Drug Delivery* 8: 431-433
  29. Büchi. 2000. Büchi Schulungsunterlagen
  30. Burnett DJ, Thielmann F, Booth J. 2004. Determining the critical relative humidity for moisture-induced phase transitions *Int J Pharm* 287:123-33
  31. Byron P, 1990. Boca Raton *CRC Press*
  32. Byron P, 1990. Absorption, clearance and dissolution in the lung *Respiratory Drug Delivery* I: 107-142



- 
33. Cao X, Schoichet MS. 1999. Delivering neuroactive molecules from biodegradable microspheres for application in central nervous system disorders *Biomaterials* 20:329-39
  34. Celebi N, Erden N, Turkyilmaz A. 1996. The preparation and evaluation of salbutamol sulphate containing poly(lactic acid-co-glycolic acid) microspheres with factorial design-based studies *International Journal of Pharmaceutics* 136:89-100
  35. Chan HK, Chew NY. 2003. Novel alternative methods for the delivery of drugs for the treatment of asthma *Adv Drug Deliv Rev* 55:793-805
  36. Chaw CS, Tan CW, Yang YY, Wang L, Moochhala S. 2003. Design of physostigmine-loaded polymeric microparticles for pretreatment against exposure to organophosphate agents *Biomaterials* 24:1271-7
  37. Chawla A, Taylor KMG, Newton JM, Johnson MCR. 1994. Production of Spray-Dried Salbutamol Sulfate for Use in Dry Powder Aerosol Formulation *International Journal of Pharmaceutics* 108:233-40
  38. Chew NY, Chan HK. 2001. Use of solid corrugated particles to enhance powder aerosol performance *Pharm. Res.* 18:1570-7
  39. Chodosh S, Flanders JS, Kesten S, Serby CW, Hochrainer D, Witek TJ, Jr. 2001. Effective delivery of particles with the HandiHaler dry powder inhalation system over a range of chronic obstructive pulmonary disease severity *J. Aerosol Med.* 14:309-15

- 
40. Clarke JR, Aston H, Silverman M. 1993. Delivery of salbutamol by metered dose inhaler and valved spacer to wheezy infants: effect on bronchial responsiveness *Arch. Dis. Child* 69:125-9
  41. Conti B, 1999. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 4 (Supplement 1):136
  42. Cortijo J, Urbieto E, Bort R, Castell JV, Ruiz-Bravo C et al. 2001. Biotransformation in vitro of the 22R and 22S epimers of budesonide by human liver, bronchus, colonic mucosa and skin *Fundam Clin Pharmacol* 15:47-54
  43. Cowsar DR, Tice TR, Gilley RM, English JP. 1985. Poly(lactide-co-glycolide) microcapsules for controlled release of steroids *Methods Enzymol* 112:101-16
  44. Crompton GK, 1982. Problems patients have using pressurized aerosol inhalers *Eur. J. Respir. Dis. Suppl* 119:101-4
  45. Dalby R, Suman J. 2003. Inhalation therapy: technological milestones in asthma treatment *Adv Drug Deliv Rev* 55:779-91
  46. Davies NM, Feddah MR. 2003. A novel method for assessing dissolution of aerosol inhaler products *Int J Pharm* 255:175-87
  47. Dellamary LA, Tarara TE, Smith DJ, Woelk CH, Adractas A et al. 2000. Hollow porous particles in metered dose inhalers *Pharm. Res.* 17:168-74

- 
48. Derendorf H, Hochhaus G, Meibohm B, Mollmann H, Barth J. 1998. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of inhaled corticosteroids *J Allergy Clin Immunol* 101:440-6
  49. Dinarello CA, 1999. IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family *J. Allergy Clin. Immunol.* 103:11-24
  50. Doganci A, Eigenbrod T, Krug N, De Sanctis GT, Hausding M et al. 2005. The IL-6R alpha chain controls lung CD4+CD25+ Treg development and function during allergic airway inflammation in vivo *J. Clin. Invest* 115:313-25
  51. Doganci A, Sauer K, Karwot R, Finotto S. 2005. Pathological role of IL-6 in the experimental allergic bronchial asthma in mice *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 28:257-70
  52. Dunn R, 1998. Non-Polymeric Sustained Release Delivery Systems. *Patent*
  53. Edwards D, 1997. Large Porous Particles for Pulmonary Drug Delivery *Science*, 276: (5320): 1868-71
  54. Edwards D, 1998. Preparation of Particles for Inhalation. *Patent*
  55. Ek A, Larsson K, Siljerud S, Palmberg L. 1999. Fluticasone and budesonide inhibit cytokine release in human lung epithelial cells and alveolar macrophages *Allergy* 54:691-9

- 
56. Finotto S, 2002. Development of Spontaneous Airway Changes Consistent with Human Asthma in Mice Lacking T-bet *Science* 295: (5553): 253
  
  57. Finotto S, Hausding M, Doganci A, Maxeiner JH, Lehr HA et al. 2005. Asthmatic changes in mice lacking T-bet are mediated by IL-13 *Int. Immunol.* 17:993-1007
  
  58. Forbes RT, Davis KG, Hindle M, Clarke JG, Maas J. 1998. Water vapor sorption studies on the physical stability of a series of spray-dried protein/sugar powders for inhalation *J Pharm Sci* 87:1316-21
  
  59. French D, 1996. The Influence of Formulation on Emission, Deaggregation and Deposition of Dry Powders for Inhalation. *Journal of Aerosol Science* 27[5], 769-783.
  
  60. Fu K, Pack DW, Klibanov AM, Langer R. 2000. Visual evidence of acidic environment within degrading poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres *Pharm. Res.* 17:100-6
  
  61. Fu YJ, Mi FL, Wong TB, Shyu SS. 2001. *J Microencapsul.* 18(6):733-47
  
  62. Gander B, Wehrli E, Alder R, Merkle HP. 1995. Quality improvement of spray-dried, protein-loaded D,L-PLA microspheres by appropriate polymer solvent selection *J Microencapsul* 12:83-97
  
  63. Ganderton D, 1999. Targeted Delivery of Inhaled Drugs: Current Challenges and Future Goals *Journal of Aerosol Medicine* 12, Supplement 1:3-8

- 
64. Ganderton D, 1992. The Generation of Respirable Clouds from Coarse Powder Aggregates. *Journal of Biopharmaceutical Sciences* 3, 101-105
  65. Gehr P, 2000. Der mukoziliäre Apparat der Lunge- die Rolle des Surfactant, *Schweiz. Med. Wochenschrift*, 130:691-698
  66. Geiser SIHG, 2000. Retention of Particles: structural and interfacial aspects. In Gehr, Heyder Particle-Lung Interaction. In Lenfant Lung Biology in Health and Disease.291-321. Marcel Dekker Verlag, New York
  67. Gido C, Langguth P, Kreuter J, Winter G, Woog H, Mutschler E. 1993. Conventional versus novel conditions for the in vitro dissolution testing of parenteral slow release formulations: application to doxepin parenteral dosage forms *Pharmazie* 48:764-9
  68. Gopferich A, 1996. Mechanisms of polymer degradation and erosion *Biomaterials* 17:103-14
  69. Gopferich A, Tessmar J. 2002. Polyanhydride degradation and erosion *Adv Drug Deliv Rev* 54:911-31
  70. Hancock BC, Shamblin SL, Zografi G. 1995. Molecular mobility of amorphous pharmaceutical solids below their glass transition temperatures *Pharm. Res.* 12:799-806

- 
71. Harjunen P, Lehto VP, Valisaari J, Lankinen T, Paronen P, Jarvinen K. 2002. Effects of ethanol to water ratio in feed solution on the crystallinity of spray-dried lactose  
*Drug Dev. Ind. Pharm.* 28:949-55
  72. Hausberger AG, DeLuca PP. 1995. Characterization of biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide) polymers and microspheres *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13:747-60
  73. Hemminger W, Cammenga. 1989. Methoden der thermischen Analyse Springer Verlag Berlin
  74. Hemminger H, 1979. Grundlagen der Kalorimetrie Verlag Chemie, Basel
  75. Herrero-Vanrell R, Refojo MF. 2001. Biodegradable microspheres for vitreoretinal drug delivery *Adv Drug Deliv Rev* 52:5-16
  76. Hickey A-J, 1996. Bioavailability and Pharmacokinetics of Inhaled Drugs. *Inhalation Aerosols*. Marcel Dekker Verlag, New York
  77. Hickey A-J, 1994. Factors Influencing the Dispersion of Dry Powders as Aerosols. *Pharmaceutical Technology* , 58-64
  78. Hochrainer D, 1999. APV Seminar Analytik inhalativer Arzneiformen Kurs Nr. 381
  79. Holgate ST, 1999. The epidemic of allergy and asthma *Nature* 402:B2-B4
  80. Hoover JL, Rush BD, Wilkinson KF, Day JS, Burton PS et al. 1992. Peptides are better absorbed from the lung than the gut in the rat *Pharm. Res.* 9:1103-6

- 
81. Hüttenrauch R, 1978. Molekulargalenik als Grundlage moderner Arzneiformung *Acta Pharmaceutica Technologica* Supplement 6:55-127
  
  82. Im H, V, Gehr P, Gerber V, Lee MM, Schurch S. 1997. In vivo determination of surface tension in the horse trachea and in vitro model studies *Respir. Physiol* 109:81-93
  
  83. Jalil R, Nixon JR. 1990. Microencapsulation using poly(DL-lactic acid). II: Effect of polymer molecular weight on the microcapsule properties *J Microencapsul* 7:245-54
  
  84. Jalil R, Nixon JR. 1990. Microencapsulation using poly (L-lactic acid) III: Effect of polymer molecular weight on the microcapsule properties *J Microencapsul* 7:41-52
  
  85. Jalil R, Nixon JR. 1990. Biodegradable poly(lactic acid) and poly(lactide-co-glycolide) microcapsules: problems associated with preparative techniques and release properties *J Microencapsul* 7:297-325
  
  86. Jendbro M, Johansson CJ, Strandberg P, Falk-Nilsson H, Edsbacker S. 2001. Pharmacokinetics of budesonide and its major ester metabolite after inhalation and intravenous administration of budesonide in the rat *Drug Metab Dispos* 29:769-76
  
  87. Jiang W, Gupta RK, Deshpande MC, Schwendeman SP. 2005. Biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles for injectable delivery of vaccine antigens *Adv Drug Deliv Rev* 57:391-410

- 
88. Johansen P, Estevez F, Zurbriggen R, Merkle HP, Gluck R et al. 2000. Towards clinical testing of a single-administration tetanus vaccine based on PLA/PLGA microspheres *Vaccine* 19:1047-54
  89. Johansen P, Men Y, Audran R, Corradin G, Merkle HP, Gander B. 1998. Improving stability and release kinetics of microencapsulated tetanus toxoid by co-encapsulation of additives *Pharm. Res.* 15(7):1103-1110
  90. Johansen P, Men Y, Merkle HP, Gander B. 2000. Revisiting PLA/PLGA microspheres: an analysis of their potential in parenteral vaccination *Eur J Pharm Biopharm* 50:129-46
  91. Johansen P, Merkle HP, Gander B. 2000. Technological considerations related to the up-scaling of protein microencapsulation by spray-drying *Eur J Pharm Biopharm* 50:413-7
  92. Johansen P, Moon L, Tamber H, Merkle HP, Gander B, Sesardic D. 1999. Immunogenicity of single-dose diphtheria vaccines based on PLA/PLGA microspheres in guinea pigs *Vaccine* 18:209-15
  93. Johansen P, Tamber H, Merkle HP, Gander B. 1999. Diphtheria and tetanus toxoid microencapsulation into conventional and end-group alkylated PLA/PLGAs *Eur J Pharm Biopharm* 47:193-201
  94. Johnson KA, 1997. Preparation of peptide and protein powders for inhalation *Advanced drug delivery reviews* 26:3-15



- 
95. Kawashima Y, Yamamoto H, Takeuchi H, Fujioka S, Hino T. 1999. Pulmonary delivery of insulin with nebulized DL-lactide/glycolide copolymer (PLGA) nanospheres to prolong hypoglycemic effect *J Control Release* 62:279-87
  96. Keiner N, 2005. Inhalierbare Glucocorticoide und inhalierbare Beta<sub>2</sub>-Sympathomimetika zur Behandlung des Asthma bronchiale *Arzneimitteltherapie* 23. Jahrgang:11-7
  97. Köhler D, 2000. Theorie und Praxis der Inhalationstherapie Arcis Verlag, München
  98. Kommentar Ph.Eur. 1997. Budesonid
  99. Kommentar Ph.Eur.1997. Salbutamol
  100. Kroegel C, 2002. Asthma bronchiale. Pathogenetische Grundlagen, Diagnostik, Therapie *Georg Thieme Verlag*
  101. Krondahl E, Tronde A, Eirefelt S, Forsmo-Bruce H, Ekstrom G et al. 2002. Regional differences in bioavailability of an opioid tetrapeptide in vivo in rats after administration to the respiratory tract *Peptides* 23:479-88
  102. Kulkarni R, 1966. Poly(lactid acid) for surgical implants. *Archives of Surgery*. 93(5):839-843
  103. Lähelmä S, 2004. Equivalent lung deposition of budesonide in vivo: a comparison of dry powder inhalers using a pharmacokinetic method *British Journal of Clinical Pharmacology* 59:167-73

- 
104. Langguth P, 2004. Biopharmazie, Wiley-VCH, Weinheim
  105. Lares A, 2000. Turbohaler Auszug aus *DAZ* 140, Nr.45
  106. Lill N, 1996. Two Poly(D,L-Lactide-co-Glycolide) 50:50 Types: Same Polymer but Different Properties? *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater*, 23  
*Controlled Release Society, Inc.*:329-330
  107. Lubliner A, 2001. Novolizer: Ein Pulverinhalator mit revolutionierender Technologie  
Auszug aus *DAZ* 141, Nr. 4
  108. Luft C, Hausding M, Finotto S. 2004. Regulation of T cells in asthma: implications for genetic manipulation *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 4:69-74
  109. Marieb E, 1998. Human Anatomy and Physiology. 716-718
  110. Masters. 2005. Spray Drying Handbook Halsted Press, New York
  111. Maulding HV, 1986. Biodegradable microcapsules: acceleration of polymeric excipient hydrolytic rate by incorporation of a basic medicament *Journal of Controlled release* 3:103-17
  112. Meyer V, 2004. Praxis der Hochleistungs Flüssigkeitschromatographie. Wiley-VCH, Weinheim
  113. Morella A, 1991. Microcapsule Composition and Process, Application for Canadian Patent: 1-29

- 
114. Mu L, Feng SS. 2001. *J. Control Release*. 76(3):239-254
  
  115. National Institutes of Health (NIH). 2004. Global Initiative for Asthma (GINA).  
Global strategy for asthma management and prevention. NHLBI/ WHO report.  
National Heart Lung and Blood Institute *Publication No. 95-3659*
  
  116. Newman SP, 1999. Use of Gamma Scintigraphy to Evaluate the Performance of New  
Inhalers *J Aerosol Medicine* 12, Supplement 1:25-31
  
  117. Newman SP, Steed KP, Reader SJ, Hooper G, Zierenberg B. 1996. Efficient delivery  
to the lungs of flunisolide aerosol from a new portable hand-held multidose nebulizer  
*J. Pharm. Sci.* 85:960-4
  
  118. Nielsen K, 1997. Flow-dependent effect of dry-powder inhaled from the aerolizer.  
*Eur. Respir. J.* 10: 2105-2109
  
  119. Nykamp G, Carstensen U, Muller BW. 2002. Jet milling--a new technique for  
microparticle preparation *Int J Pharm* 242:79-86
  
  120. O'Hara P, Hickey AJ. 2000. Respirable PLGA microspheres containing rifampicin for  
the treatment of tuberculosis: manufacture and characterization *Pharm Res* 17:955-61
  
  121. Ohne Quelle. 2005. Publikation aus dem Internet [www2.student-online.net/Publikationen/247](http://www2.student-online.net/Publikationen/247)
  
  122. Oldham MJ, Phalen RF. 2002. Dosimetry implications of upper tracheobronchial  
airway anatomy in two mouse varieties *Anat. Rec.* 268:59-65

- 
123. Pavanetto F, 1991. Solvent evaporation, solvent extraction and spray-drying for polylactide microsphere preparation *International Journal of Pharmaceutics* 84: 151-159
  124. Pavia D, Moonen, 1999. Preliminary Data from Phase II Studies with Respimat, a Propellant-free Soft Mist Inhaler *J Aerosol Medicine* 12, Supplement 1:33-9
  125. Ph.Eur. 2002. Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, Govi Verlag- Pharmazeutischer Verlag GmbH Eschborn
  126. Pham S, Wiedmann TS. 2001. Note: dissolution of aerosol particles of budesonide in Survanta, a model lung surfactant *J Pharm Sci* 90:98-104
  127. Pietzonka P, Rothen-Rutishauser B, Langguth P, Wunderli-Allenspach H, Walter E, Merkle HP. 2002. Transfer of lipophilic markers from PLGA and polystyrene nanoparticles to caco-2 monolayers mimics particle uptake *Pharm Res* 19:595-601
  128. Pietzonka P, Walter E, Duda-Johner S, Langguth P, Merkle HP. 2002. Compromised integrity of excised porcine intestinal epithelium obtained from the abattoir affects the outcome of in vitro particle uptake studies *Eur J Pharm Sci* 15:39-47
  129. Pitt CG, Gratzl MM, Kimmel GL, Surles J, Schindler A. 1981. Aliphatic polyesters II. The degradation of poly (DL-lactide), poly (epsilon-caprolactone), and their copolymers in vivo *Biomaterials* 2:215-20
  130. Pressestelle Uni-Mainz. 2001. Helium- 3 als Kontrastmittel

- 
131. Prime D, Atkins PJ, Slater A, Sumby B. 1997. Review of dry powder inhalers  
*Advanced drug delivery reviews* 26:51-8
132. Prior S, Gander B, Blarer N, Merkle HP, Subira ML et al. 2002. In vitro phagocytosis and monocyte-macrophage activation with poly(lactide) and poly(lactide-co-glycolide) microspheres *Eur J Pharm Sci* 15:197-207
133. Rak J, Ford JL, Rostron C, Walters V. 1985. The preparation and characterization of poly(D,L-lactic acid) for use as a biodegradable drug carrier *Pharm Acta Helv* 60:162-9
134. Ray T, 2006. *The Pink Sheet*
135. Reimer L, 1977. Rasterelektronenmikroskopie. Diplomarbeit
136. Robinson D.S, 1992. Predominant Th2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma *N. Engl. J. Med.* 326:298-304
137. Robinson D.S, 1993. Activation of CD4+ T cells, increased Th2-type mRNA expression, and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in patients with atopic asthma *J. Allergy Clin. Immunol.* 92:313-24
138. Roos S, 1995. *Academic Press New York*

- 
139. Ryrfeldt A, Andersson P, Edsbacker S, Tonnesson M, Davies D, Pauwels R. 1982. Pharmacokinetics and metabolism of budesonide, a selective glucocorticoid *Eur J Respir Dis Suppl* 122:86-95
140. Sanofi-Aventis Press Release. 2005. Exubera receives positive opinion from CHMP for treatment of type I and type II diabetes. *Sanofi-Aventis Press Release*: 1-2
141. Schlenger R. 2003. Ciclesonid wird gezielt in der Lunge aktiv *DAZ* 143. Jahrgang:39-40
142. Schmidt C, 1996. *Parenterale Depotarzneiformen auf der Basis bioabbaubarer Polyester: in vitro/ in vivo Liberation, Abbauverhalten und Biokompatibilität kontrolliert freisetzender Polymilchsäure/ Polyglykolsäure Formulierungen.* Dissertation
143. Schmitt EA, Flanagan DR, Linhardt RJ. 1993. Degradation and release properties of pellets fabricated from three commercial poly(D,L-lactide-co-glycolide) biodegradable polymers *J Pharm Sci* 82:326-9
144. Schöttle I, 2004. Ausgewählte Beispiele Arzneiformen bezogener Pharmakokinetik Auszug aus Buch Biopharmazie. S 36-39, Wiley-VCH, Weinheim
145. Sharma R, Saxena D, Dwivedi AK, Misra A. 2001. Inhalable microparticles containing drug combinations to target alveolar macrophages for treatment of pulmonary tuberculosis *Pharm Res* 18:1405-10

- 
146. Siepmann J, Gopferich A. 2001. Mathematical modeling of bioerodible, polymeric drug delivery systems *Adv Drug Deliv Rev* 48:229-47
  147. Simon M, Kissel T. 2001. [Away with the needle. Noninvasive administration routes for insulin: improved quality of life for diabetics?] *Pharm. Unserer Zeit* 30:136-41
  148. Singhal D, Curatolo W. 2004. Drug polymorphism and dosage form design: a practical perspective *Adv Drug Deliv Rev* 56:335-47
  149. Sperling L, 1986. Introduction to Physical Polymer Science, Wiley-VCH, Weinheim
  150. Stahl K, 2002. Spray-Drying and Characterization of Particles for Inhalation *Respiratory Drug Delivery* 8: 565-567
  151. Steckel H, 2003. Inhalationspulver- Neuere Entwicklungen bei Pulverinhalatoren *PZ Prisma*, 10: 145-157
  152. Steckel H, Brandes HG. 2004. A novel spray-drying technique to produce low density particles for pulmonary delivery *Int J Pharm* 278:187-95
  153. Steckel H, Muller BW. 1997. In vitro evaluation of dry powder inhalers .2. Influence of carrier particle size and concentration on in vitro deposition *International Journal of Pharmaceutics* 154:31-7
  154. Steckel H, Pichert L, Muller BW. 2004. Influence of process parameters in the ASES process on particle properties of budesonide for pulmonary delivery *Eur J Pharm Biopharm* 57:507-12

- 
155. Suarez S, O'Hara P, Kazantseva M, Newcomer CE, Hopfer R et al. 2001. Respirable PLGA microspheres containing rifampicin for the treatment of tuberculosis: screening in an infectious disease model *Pharm Res* 18:1315-9
  
  156. Tabata Y, Ikada Y. 1988. Macrophage phagocytosis of biodegradable microspheres composed of L-lactic acid/glycolic acid homo- and copolymers *J Biomed Mater Res* 22:837-58
  
  157. Takada S, Uda Y, Toguchi H, Ogawa Y. 1995. *PDA. J. Pharm. Sci. Technol.* 49(4):180-184
  
  158. Tamber H, Johansen P, Merkle HP, Gander B. 2005. Formulation aspects of biodegradable polymeric microspheres for antigen delivery *Adv Drug Deliv Rev* 57:357-76
  
  159. Tang C, 1997. Il-5 production by bronchoalveolar lavage and peripheral blood mononuclear cells in asthma and atopy *Eur. Respir. J.* 10:624-32
  
  160. Taylor M, 2002. In Vitro Dissolution Screening Method for Evaluation of Drug Release Properties of Engineered, Sustained Release Inhalation Particles *Respiratory Drug Delivery* 8: 447-449
  
  161. Thews G, 1999. Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart
  
  162. Thies C, 1978. Development of injectable microcapsules for use in the treatment of narcotic addiction *Natl. Inst. Drug Abuse Res. Monogr. , Ser.* 419-20



- 
163. Thomasin C, 1996. Tetanus toxoid and synthetic malaria antigen containing poly(lactide)/ poly(lactide-co-glycolide) microspheres: importance of polymer degradation and antigen release for immune response *Journal of Controlled release*
164. Thorsson L, Kenyon C, Newman SP, Borgstrom L. 1998. Lung deposition of budesonide in asthmatics: a comparison of different formulations *International Journal of Pharmaceutics* 168:119-27
165. Tracy MA, Ward KL, Firouzabadian L, Wang Y, Dong N et al. 1999. Factors affecting the degradation rate of poly(lactide-co-glycolide) microspheres in vivo and in vitro *Biomaterials* 20:1057-62
166. User Com. 1998. Informationen für Anwender von Mettler Toledo Thermoanalysen. User Com
167. van der KH, Zanen P, Tushuizen E, Gusdorf CF. 1991. The effect of inhalation flow on the performance of a dry powder inhalation system *Eur. J. Drug Metab Pharmacokinet. Spec No 3*:415-8
168. Vidgren M, 1987. Comparison of physical and inhalation properties of spray-dried and mechanically micronized disodium cromoglycate. *International Journal of Pharmaceutics*. 35:139-144
169. Vidmar V, Pepeljnjak S, Jalsenjajak I. 1985. The in vivo evaluation of poly(lactic acid) microcapsules of pilocarpine hydrochloride *J Microencapsul* 2:289-92

- 
170. Visscher GE, Robison RL, Maulding HV, Fong JW, Pearson JE, Argentieri GJ. 1986. Biodegradation of and tissue reaction to poly(DL-lactide) microcapsules *J Biomed Mater Res* 20:667-76
171. Waeckerle-Men Y, Groettrup M. 2005. PLGA microspheres for improved antigen delivery to dendritic cells as cellular vaccines *Adv Drug Deliv Rev* 57:475-82
172. Wakiyama N, Juni K, Nakano M. 1981. Preparation and evaluation in vitro of polylactic acid microspheres containing local anesthetics *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 29:3363-8
173. Wakiyama N, Juni K, Nakano M. 1982. Influence of physicochemical properties of polylactic acid on the characteristics and in vitro release patterns of polylactic acid microspheres containing local anesthetics *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 30:2621-8
174. Wakiyama N, Juni K, Nakano M. 1982. Preparation and evaluation in vitro and in vivo of polylactic acid microspheres containing dibucaine *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 30:3719-27
175. Walter E, 2001. Hydrophilic poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres for the delivery of DNA to human-derived macrophages and dendritic cells *Journal of Controlled release*, 75: 149-168
176. Walter E, Moelling K, Pavlovic J, Merkle HP. 1999. Microencapsulation of DNA using poly(DL-lactide-co-glycolide): stability issues and release characteristics *J. Control Release* 61:361-74

- 
177. Wang HT, Palmer H, Linhardt RJ, Flanagan DR, Schmitt E. 1990. Degradation of poly(ester) microspheres *Biomaterials* 11:679-85
178. Warren S, Taylor G, Smith J, Buck H, Parry-Billings M. 2002. Gamma scintigraphic evaluation of a novel budesonide dry powder inhaler using a validated radiolabeling technique *J. Aerosol Med.* 15:15-25
179. Wasielewski S, 2005. ACC bei COPD unwirksam *DAZ* 145 Jahrgang: 69-70
180. Weers W, 1998. *USA Patent No. 6309623*
181. Weiler C, 2004. Untersuchungen zur physikochemischen Stabilität von Hilfsstoffen zum Einsatz in Herstellverfahren basierend auf der Sprühtrocknung. Diplomarbeit
182. Wettengel R, 1998. Empfehlungen zur Asthmatherapie bei Kindern und Erwachsenen *Pneumologie* 52:591-601
183. Wichert B, Rohdewald P. 1993. Low molecular weight PLA: a suitable polymer for pulmonary administered microparticles? *J Microencapsul* 10:195-207
184. Wong LW, Pilpel N. 1990. Effect of particle shape on the mixing of powders *J. Pharm. Pharmacol.* 42:1-6
185. Zanen P, Go LT, Lammers JWJ. 1994. The Optimal Particle-Size for Beta-Adrenergic Aerosols in Mild Asthmatics *International Journal of Pharmaceutics* 107:211-7

- 
186. Zhang Z-Y, 2000. Microencapsulation and Characterization of tramadol-resin complexes *Journal of Controlled release* 66:107-13
  
  187. Zhou SB, Deng XM, Li XH, Jia WX, Liu L. 2004. Synthesis and characterization of biodegradable low molecular weight aliphatic polyesters and their use in protein-delivery systems *Journal of Applied Polymer Science* 91:1848-56
  
  188. Zierenberg B, 1999. Optimizing the in Vitro Performance of Respimat *Journal of Aerosol Medicine* 12, Supplement 1:19-24

