

5. SUMMARY
ZUSAMMENFASSUNG

5.1 Summary

The pulmonary route of administration is currently in use to deliver drugs not only directly to the lung, as is specifically desired in the case of respiratory or lung diseases, but also for the treatment of systemic diseases, such as diabetes mellitus. However, the lung is one of the organs with one of the best self-protection mechanisms in order to get rid of “foreign particles”, challenging the development of inhalation therapies. In the case of a local therapeutic response, it is still poorly understood which factors determine the absorption and clearance of particles targeting the peripheral airways and the importance of the local circulation in the distribution of the inhaled therapy. Nevertheless, to deliver high drug concentrations of drug directly to the lung and to minimize the risk of systemic side effects and avoiding first pass metabolism in the liver, are attractive advantages that make for inhalation therapies an important market. In this thesis, the use of nanocrystals in the pulmonary delivery of poorly soluble drugs was investigated *in vivo* and *in vitro* using the model drug buparvaquone (BPQ). BPQ is a naphthoquinone that has previously shown *in vitro* effectiveness against *Pneumocystis pneumonia* (Kaneshiro, Sul et al. 2001).

***In vitro* experiments with aqueous nanosuspensions**

During the present work, suitable aqueous nanosuspension formulations were developed using emulsifying agents with an acceptable toxicological status to be administered to the lung. The nanosuspension formulations were tested for stability in terms of particle size distribution of the formulation and chemical stability of the active substance. Suitable emulsifying agents stabilizing the BPQ nanocrystals were tyloxapol, phosphatidylcholine (Phospholipon 90G), poloxamer 188 and combinations of them in different concentrations. Stable formulations could be prepared containing up to 70 mg/mL drug content. Typically, nanocrystals with an average diameter of approximately 400 nm were obtained, with a diameter $d_{99\%}$ of the crystals below 2 μm . This nanocrystal particle size has shown high efficiency when being nebulized by systems like the Pari LC Star nebulizer, which is one of the devices in the market designed for droplet deposition in peripheral airways. Wet aerosols produced from the buparvaquone nanosuspensions prepared here, have shown average particle

diameters (MMD) between 1.7 and 2 μm , which is a particle size $\sim 1 \mu\text{m}$ smaller than the droplet size obtained using surfactant-free water or saline solution in the nebulization process.

Two physically and chemically stable nanosuspensions were tested using four commercially available nebulizer systems, which used three different nebulization technologies. It was determined that both, the formulation composition and the nebulization technology influence the size of the droplets produced and the aggregation of the nanocrystals contained in the aerosol produced. It was experimentally determined that using nebulization of nanosuspensions high amounts of drug (up to 220 mg) can be delivered to the lung by mean of aerosol droplets with an appropriate droplet size ($< 3 \mu\text{m}$) in a relatively short time ($\sim 7\text{min}$).

***In vivo* experiments with aqueous nanosuspensions**

In an attempt to improve understanding of the mechanism of action and distribution of BPQ nanocrystals, *Pneumocystis murina* infected immunosuppressed mice were used as a test model. Inhalation and oral administration of BPQ nanocrystals were compared. Positive and negative control therapies were included in the study using a placebo formulation (administered via inhalation) and oral atovaquone microsuspension (GlaxoSmithKline formulation), respectively. These experiments demonstrated that both groups treated with BPQ nanosuspensions (inhalation and oral) had an improvement of the infection status, being this effect slightly faster in the group receiving inhalation therapy. The formulation was well tolerated by the animals (both routes). No statistically significant improvement could be demonstrated when comparing atovaquone microsuspension and BPQ nanocrystals via the oral route. A reason for that could be the relative small particle size of the microcrystals contained in the commercial product ($d_{50\%} \sim 1 \mu\text{m}$), as well as the high variation observed within the group.

Development of solid dispersions containing nanocrystals

Furthermore, part of the work described in this thesis has been dedicated to the development of powders containing drug nanocrystals with potential use for inhalation therapy. Solid dispersions containing BPQ nanocrystals were prepared by using techniques such as spray-drying (SD) and spray-freeze drying (SFD) (also known as spray-drying into liquid). Different kinds of spherical particles using inulin and PVP as matrix materials were prepared and showed different porosity and surface morphology. It was proven that the increased rate of dissolution of the nanocrystals remains in the solid state formulations produced with these technologies and therefore, can be considered as a suitable formulation.

5.2 Zusammenfassung

Pulmonare Applikationen werden heutzutage nicht nur angewandt um Medikamente in die Lunge zu bringen, wie im Falle von Atemwegs- und Lungenerkrankungen, sondern auch zur Behandlung systemischer Krankheiten, wie Diabetes Mellitus. Da die Lunge eines der Organe mit dem besten Selbstverteidigungsmechanismus um eingedrungene Fremdpartikel auszuschleusen ist, stellt die Entwicklung von Inhalationstherapien eine wirkliche Herausforderung dar. Für den Fall von lokaler therapeutischer Wirkung sind die Faktoren, die über Aufnahme oder Ausscheidung von Partikeln in den peripheren Atemwegen entscheiden immer noch wenig verstanden, genauso wie die Rolle der lokalen Verteilung im Atemwegssystem in der Inhalationstherapie. Inhalationstherapien sind trotzdem kommerziell sehr interessant, da es gelingen kann hohe Konzentrationen an Wirkstoffen direkt in die Lunge zu bringen, wodurch das Risiko von systemischen Nebenwirkungen reduziert wird und die direkte Metabolisierung über die Leber vermieden wird. In dieser Arbeit wurden die Anwendung von Nanokristallen zur pulmonalen Applikation sehr schlecht löslicher Wirkstoffe *in vivo* und *in vitro* anhand der Modellschubstanz Buparvaquone (BPQ) untersucht. BPQ ist ein Naphtoquinone das *in vivo* Wirksamkeit gegen *Pneumocystis pneumonia* (Kaneshiro, Sul et al. 2001) gezeigt hat.

***In vitro* Experiment mit wässrigen Nanosuspensionen**

Es wurden geeignete wässrige Nanosuspensionen für die Inhalationstherapie entwickelt, wobei nur Emulgatoren mit akzeptabler Toxizität geprüft wurden. Die Stabilität der Nanosuspensionsformulierungen wurde hinsichtlich Teilchengrößenverteilung und chemischer Veränderung des Wirkstoffes geprüft. Als geeignete Emulgatoren zur Stabilisierung von BPQ-Nanokristallen erwiesen sich Tyloxapol, DPPC (Phospholipon 90G), Poloxamer 188 und Kombinationen von diesen in verschiedenen Zusammensetzungen. Es gelang stabile Formulierungen mit bis zu 70 mg/mL Wirkstoffgehalt herzustellen. Der durchschnittliche Durchmesser der Nanokristalle in diesen Formulierungen beträgt etwa 400 nm und der Durchmesser d_{99%} der Kristalle liegt unter 2 µm. Diese Teilchengrößenverteilung hat eine hohe Effizienz beim Einsatz in Verneblern wie dem Pari LC Star gezeigt, welcher heutzutage im Markt eingesetzt wird um Tröpfchen in die peripheren

Atemwege zu transportieren. Die mit den Buparvaquone Nanosuspensionen hergestellten feuchten Aerosole wiesen einen durchschnittlichen Durchmesser (MMD) zwischen 1.7 and 2 μm auf. Die Tröpfchen dieser Suspensionen sind nach Vernebelung $\sim 1 \mu\text{m}$ kleiner als die Tropfen, die man mit reinem Wasser oder Kochsalzlösung erhält.

Zwei physikalisch und chemisch stabile Nanosuspensionen wurden mittels vier marktüblicher Verneblermodelle, die drei verschiedene Vernebelungs-technologien repräsentieren untersucht. Es zeigte sich hierbei, dass sowohl die Formulierungszusammensetzung, als auch die Vernebelungstechnologie einen Einfluss sowohl auf die Tröpfchengröße, als auch auf die Aggregation der Nanokristalle innerhalb des Aerosols hat. Zusammenfassend hat sich weder eine der Nanosuspensionen, noch eine Vernebelungstechnologie als eindeutig überlegen herausgestellt. Es gelang in Experimenten zu zeigen, dass es möglich ist mittels der Vernebelung von Nanosuspensionen große Mengen (bis zu 220 mg) nanokristallinen Wirkstoffes in Tröpfchen geeigneter Größe ($< 3 \mu\text{m}$) in relative kurzer Zeit ($\sim 7\text{min}$) in die Lunge zu bringen.

***In vivo* Experimente mit wässrigen Nanosuspensionen**

Um den Wirkmechanismus und die Verteilung in den Organen von BPQ-Nanokristallen besser zu verstehen wurden *Pneumocystis murina* infizierte immundefekte Mäuse als pharmakologisches Modell gewählt. In den Versuchen wurde der Effekt von Inhalation und oraler Gabe von BPQ Nanokristallen miteinander verglichen. Zusätzlich wurden Kontrollgruppen mit einer Placeboformulierung (Inhalation) und Atovaquone Mikrosuspension (oral, kommerzielles Produkt von GlaxoSmithKline) therapiert. In diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass beide mit BPQ-Nanosuspension therapierten Mäusegruppen (Inhalation und orale Gabe) eine deutliche Verbesserung des Infektionsstatus erzielten, wobei die mittels der Inhalationstherapie behandelten Tiere sich schneller erholten. Die Formulierung wurde von den Tieren beider Therapiegruppen gut toleriert. Gegenüber Atovaquone Mikrosuspension konnte kein statistisch signifikanter Unterschied gezeigt werden. Ursache dafür könnte die relativ kleine Teilchengröße des kommerziellen Produktes sein ($d_{50\%} \sim 1 \mu\text{m}$).

Entwicklung fester Nanokristall Dispersionen

Zusätzlich hat sich ein Teil der Arbeit der Entwicklung von festen Dispersionen gewidmet, die Wirkstoffnanokristalle enthalten und ebenfalls potentiell für den Einsatz in der Inhalationstherapie in Frage kommen. Es wurde versucht geeignete feste Dispersionen mit BPQ-Nanokristallen mittels Sprühtrocknung, Sprühgefriertrocknung herzustellen. Auf diese Weise wurden bezüglich Porösität und Oberflächenstruktur unterschiedliche sphärische Partikel in Inulin und PVP als Matrixmaterialien hergestellt. Es konnte gezeigt werden, dass alle auf diese Art hergestellten Pulver die verbesserte Freisetzung des Wirkstoffs der Nanokristalle beibehalten haben und somit prinzipiell als Formulierung in Betracht kommen.

(INTENTIONALLY BLANK)