

## 4 Tarazepid

### 4.1 Herstellung von Tarazepid-Nanosuspensionen zur intravenösen Applikation

Ziel der Tarazepid-Studie war, eine geeignete Formulierung für Tarazepid als Nanosuspension zum Zwecke einer i.v. Toxizitäts-Studie zu finden. Diese Substanz wurde in klinischen und toxikologischen Testphasen untersucht. Aus regulatorischen Gründen mussten Toxizitätsstudien an Nagern vorgenommen werden, wobei die Substanz intravenös in die Schwanzvene appliziert werden sollte. Problematisch war die schlechte Löslichkeit von Tarazepid in Wasser (0,0008 mg/ml) und in anderen Lösungsmitteln, sowie die hohe Toxizität der Lösungsmittel. Daher waren bisherige Formulierungsversuche erfolglos. Für die Base Tarazepid konnten keine geeigneten Salze gefunden werden, die zu einer Löslichkeitsverbesserung führten. Daher wurde nach einer anderen Methode bzw. speziellen Drug Delivery Systemen gesucht, um eine applizierbare i.v. Formulierung zu entwickeln.

Mit der Herstellung von Tarazepid als Nanosuspension konnte ein Drug Delivery System gefunden werden, das den Anforderungen entsprach. Arzneistoffsysteme, die i.v. appliziert werden, sollten keine Partikel enthalten die einen größeren Radius als 5 µm besitzen, um die kleinsten Blutgefäße, deren Größe in diesem Bereich liegen, nicht zu blockieren. Dadurch könnten eventuell Embolien ausgelöst werden. Diese Partikelgrößen können mit Luftstrahlmahlung nicht erreicht werden, wohl aber mit der Hochdruckhomogenisation.

#### 4.1.1 Anforderungen an Arzneiformen zur intravenösen Applikation

Injektionslösungen sollten idealerweise einen pH-Wert von etwa 7,4 haben, da dieser Wert dem des Blutes entspricht. Dieser Wert ist nicht zwingend vorgeschrieben, manchmal kann er aus Gründen der Arzneistoffstabilität nicht eingehalten werden. Er sollte aber auf keinen Fall die Werte 3 unter- bzw. 9 überschreiten. Ober- bzw. unterhalb dieser Werte entstehen bei der Injektion starke Schmerzen und das Risiko einer Thrombophlebitis steigt. Oberhalb des pH-Wertes von 9 treten häufig nekrotische Gewebsschädigungen auf [DeLuca und Boylan, 1984].

Die Isotonie einer intravenös zu applizierenden Zubereitung ist nur bedingt wichtig. Wenn die Applikation so langsam erfolgen kann, dass eine ausreichende Verdünnung durch das Blut gewährleistet ist, muss die Zubereitung nicht blutisoton sein. Ist dieses jedoch nicht der Fall, kann es ebenfalls zu Gewebsschädigungen kommen. Die Osmolalität sollte bei 280 bis 320 mosmol/kg liegen.

## 4.1.2 Rezepturen

Da von Tarazepid nur eine sehr kleine Menge (12 g) zur Verfügung stand, konnte ein Rezepturscreening mit nur wenigen verschiedenen Formulierungen vorgenommen werden. Die Auswahl der Tenside und deren prozentualer Anteil richtete sich a) nach den Tensiden, die für eine intravenöse Applikation zugelassen sind [Gallardo et al., 2000; Marti-Mestres und Nielloud, 2000] und b) nach den Ergebnissen von bereits hergestellten Nanosuspensionen mit anderen Substanzen [Müller et al.a, 1995; Müller et al.b, 1995; Müller und Böhm, 1998; Böhm 1999]. Die Zusammensetzung dieser Rezepturen wird in Tabelle 1-1 angegeben.

Tabelle 1-1: Zusammensetzung der Screening-Rezepturen (Konzentration in % (m/m)).

Substanz	TZ01	TZ02	TZ03
Tarazepid	1,00 %	1,00 %	1,00 %
Lutrol®F68	1,00 %	1,00 %	1,00 %
Tween®80	0,50 %		
Natriumcholat		0,10 %	0,10 %
Phospholipon 90			1,00 %
Aqua ad inj.	ad 100,00 %	ad 100,00 %	ad 100,00 %

Über einen Lagerungszeitraum von 6 Wochen wurden die Partikelgrößen der hergestellten Nanosuspensionen beobachtet.

Das Ausgangsmaterial lag in Jetmill-Qualität vor. Die Partikelgrößenanalyse des Ausgangsmaterials ergab folgendes Ergebnis (Laserdiffraktometrieanalyse, Volumenverteilung):

D 50 % : 2,03 µm

D 90 % : 4,51 µm

D 99 % : 7,02 µm

Zur Herstellung der Nanosuspensionen wurde Tarazepid mit der jeweiligen Tensidlösung angerieben, danach mit dem Ultra Turrax mit Dispergieraufsatz T25 (Jahnke & Kunkel GmbH und Co KG, Staufen, Deutschland) für ca. 1 min. bei 9500 rpm dispergiert. Dieser Prämix wurde dann mit 2 x 150 bar und 2 x 500 bar vorhomogenisiert und anschließend mit 1500 bar 10 Zyklen lang mit dem Micron LAB 40 homogenisiert. Um den Effekt der Homogenisierung auf die Suspension einschätzen zu können, wurden nach jeweils 2 Zyklen Proben gezogen. Die Vermessung der Ausgangssuspension war mit der PCS nicht möglich (vgl. Detektionsbereich der PCS im Methodenteil).

### 4.1.3 Einfluss der Homogenisationszyklen auf die Partikelgröße

Der Einfluss der Homogenisationszyklen auf die Partikelgröße von Tarazepid wurde zunächst mit der Laserdiffraktometrie untersucht.

Betrachtet man die LD-Daten der Charge TZ01 (Abbildung 1-1), stellt man fest, dass schon nach 2 Homogenisationszyklen nur noch geringe Unterschiede in der Bulkpopulation zu erkennen sind; jedoch ist mit steigender Zyklenzahl noch eine Reduktion im Anteil der Mikropartikel ersichtlich. Der LD-Durchmesser 50 % verändert sich von Zyklus 2 (0,80  $\mu\text{m}$ ) zu 10 wenig (0,63  $\mu\text{m}$ ). Dennoch ist eine Verringerung in den LD-Durchmessern von 95 % bzw. 99 % von Zyklus 2 (2,33  $\mu\text{m}$  bzw. 2,83  $\mu\text{m}$ ) zu 4 (2,11  $\mu\text{m}$  bzw. 2,48  $\mu\text{m}$ ) erkennbar. Diese Durchmesser ändern sich auch nach 10 Homogenisationszyklen wenig; D 95 % beträgt 2,14  $\mu\text{m}$  und der D 99 % 2,51  $\mu\text{m}$ .

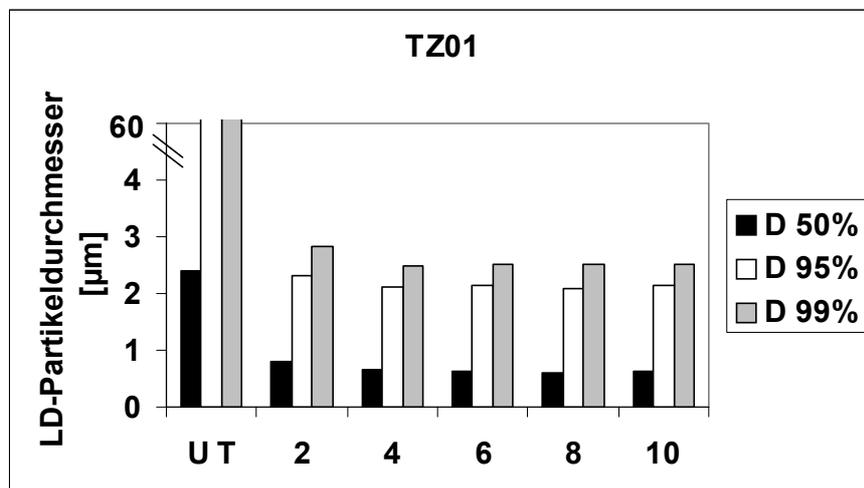


Abbildung 1-1: LD-Partikeldurchmesser D 50 %, D 95 % und D 99 % von Tarazepid-Nanosuspension TZ01 in Abhängigkeit von der Anzahl der Homogenisationszyklen

Der LD-Durchmesser 100 % beträgt für diese Formulierung 3,52  $\mu\text{m}$  und ist reproduzierbar. Damit ist die Forderung, einen Partikeldurchmesser < 5  $\mu\text{m}$  zu erreichen, erfüllt worden. Man könnte diese Suspension direkt infundieren, ohne sie z. B. vorher durch einen Filter (Porengröße 5  $\mu\text{m}$ ) zu filtrieren, um dabei eventuelle größere Partikel oder Aggregate zu entfernen.

Bei Ermittlung von Partikelgrößen mit der LD unterliegt der Wert LD 100 % oftmals großen Schwankungen, weil dieser Durchmesser sehr empfindlich auf Aggregate bzw. größere Partikel reagiert. Dennoch wurden hier keine Partikel größer als 3,52 µm detektiert, was auf eine extrem hohe Qualität in Bezug auf den Mikropartikelanteil hinweist.

Zur näheren Untersuchung der Hauptpopulation wurde die PCS-Untersuchung herangezogen, die Ergebnisse sind in Abbildung 1-2 dargestellt.

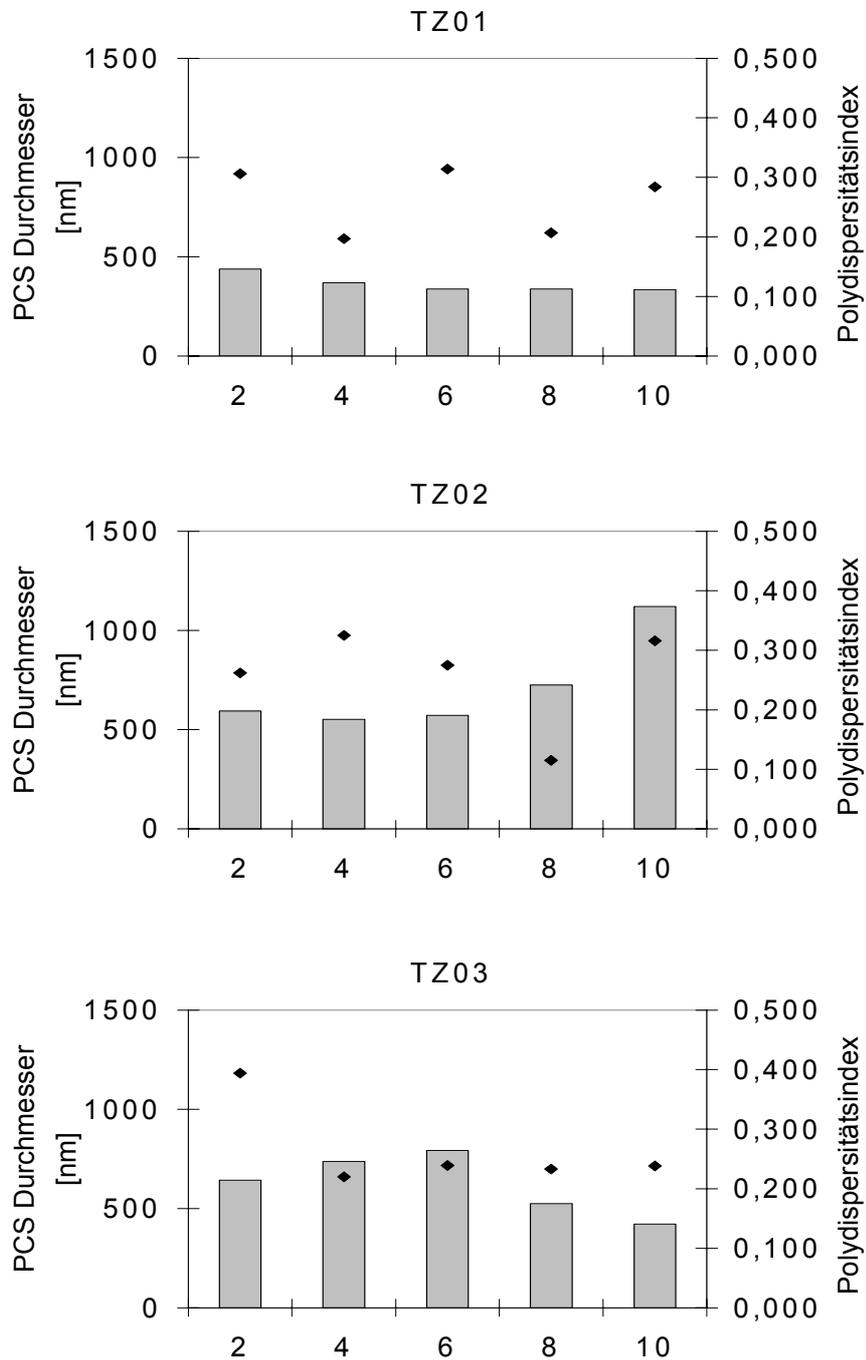


Abbildung 1-2: Mittlere PCS-Durchmesser in nm (■) und Polydispersitätsindex (◆) der Formulierungen TZ01, TZ02 und TZ03 als Funktion der Homogenisationszyklen

Nach sechs Homogenisationszyklen wird bei der Formulierung TZ01 bereits ein mittlerer Teilchendurchmesser von 338 nm erreicht, der auch durch weitere Homogenisationsschritte nicht verringert werden konnte (Abbildung 1-2 ). Der PI zeigt einige Schwankungen von Zyklus 2-10 zwischen 0,197 und 0,314. Diese können möglicherweise in Aggregations- und Deaggregationseffekten begründet sein.

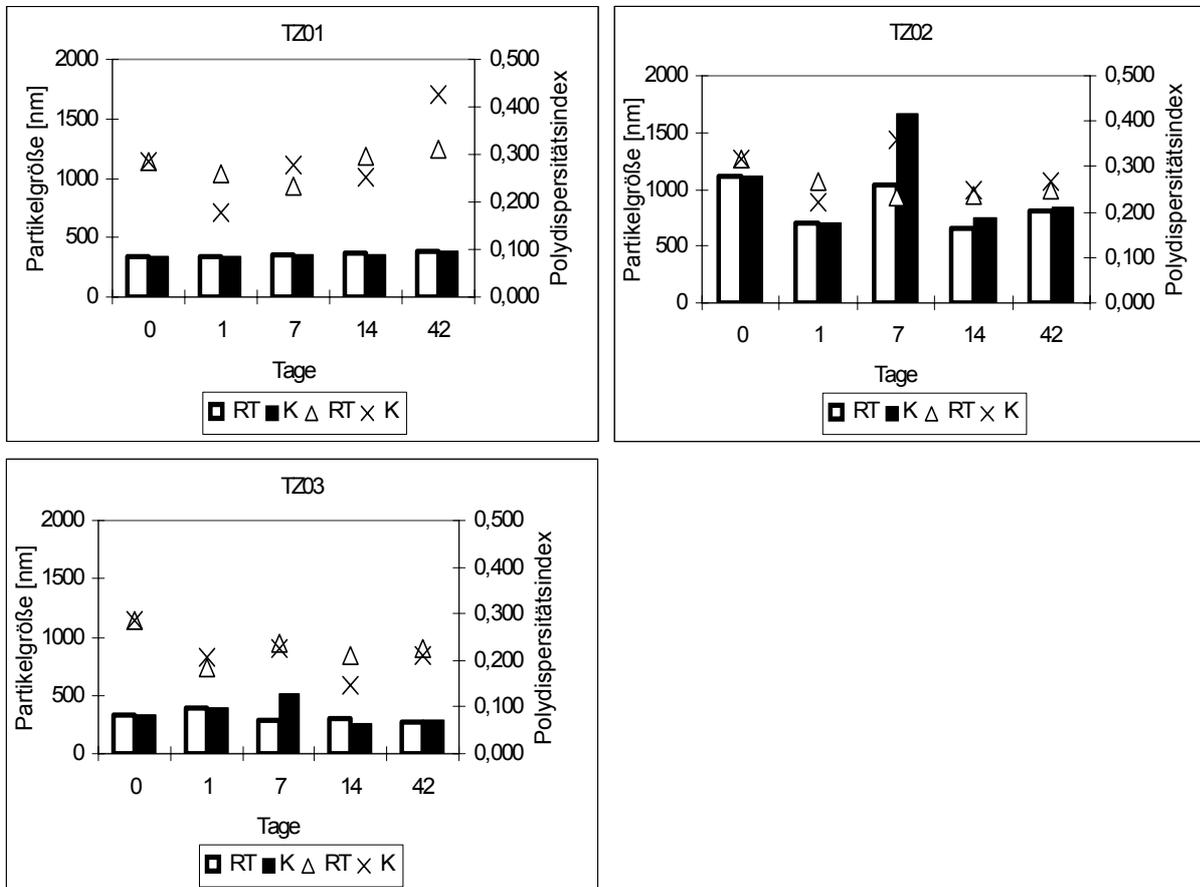
Anhand dieser PCS-Daten kann festgestellt werden, dass das optimale Produkt mit der Formulierung TZ01 schon nach 4 Homogenisationszyklen mit einer mittleren Partikelgröße von 369 nm und einem PI von 0,197 erreicht ist.

Mit der Formulierung TZ02 können nicht die Partikelgrößen wie bei TZ01 erreicht werden. Nach 4 Homogenisationszyklen wird eine Partikelgröße von 552 nm und einem PI von 0,325 erreicht, nach weiterer Homogenisation jedoch steigt der mittlere Partikeldurchmesser wieder auf über 1100 nm an, die Suspension wurde "überhomogenisiert", die zuvor zerkleinerten Partikel lagern sich wieder zu Aggregaten zusammen. Der Erfolg der Herstellung einer Nanosuspension hängt von mehreren Faktoren ab. Ein entscheidender Punkt ist die vollständige und ausreichende Beladung der Partikel mit Tensid. In dieser Formulierung hat Lutrol®F68 mit 1,00 % im Verhältnis zu Na-Cholat 0,10 % den größeren Anteil am Stabilisierungseffekt. Somit liegt vermutlich die Gewichtung der Stabilisierung eher sterisch. Bei der sterischen Stabilisierung ist zu beachten, dass die stabilisierende Schicht  $\gg 10$  nm sein sollte. Zudem muss die Affinität zum Partikel ausreichend groß sein, um Desorbitionsvorgänge zu vermeiden. Ein anderer Punkt der zu Aggregationsvorgängen führt, ist der hohe Energieeintrag bei der Hochdruckhomogenisation. So kann es vorkommen, dass sich Aggregate bilden. Diese Aggregate sind teilweise nur locker, und zerfallen nach einiger Zeit wieder. Ob die Tenside, die für die Formulierung TZ02 eingesetzt wurden ungeeignet waren, oder ob die Aggregate wieder zerfallen, wird sich bei der Betrachtung über einen längeren Zeitraum zeigen.

Mit der Formulierung TZ03 konnte nach 10 Zyklen eine mittlere Partikelgröße von 422 nm und einem PI von 0,238 erreicht werden. Damit ist die Partikelgröße etwas höher als bei Formulierung TZ01, jedoch ist auch dieses Ergebnis für eine Nanosuspension akzeptabel.

#### **4.1.4 Physikalische Stabilität von sechs Wochen**

Die physikalische Stabilität der in Abbildung 1-2 gezeigten drei Chargen wurden über einen Zeitraum von sechs Wochen beobachtet. Danach sollte entschieden werden, welche der Formulierungen am geeignetsten für die intravenöse Studie ist. Die Ergebnisse über den Beobachtungszeitraum sind in Abbildung 1-3 dargestellt. Eingelagert wurde die Suspension sowohl bei Raumtemperatur als auch im Kühlschrank bei 2-8°C.



**Abbildung 1-3:** Mittlere PCS-Durchmesser in nm (■□) und Polydispersitätsindex (Δ, x) der Formulierungen TZ01, TZ02 und TZ03 als Funktion der Lagerzeit in Tagen, gelagert bei Raumtemperatur (RT) und im Kühlschrank (K, bei 2-8°C)

Es fällt auf, dass die Partikel der Charge TZ02 einen Tag nach der Herstellung kleiner waren als unmittelbar nach Herstellung, danach aber wieder anwachsen. Dies wird auf folgenden Effekt zurückgeführt: Direkt nach der Homogenisation, durch den hohen Energieeintrag in das System, bilden sich zunächst lockere Aggregate, die jedoch im Laufe der nächsten Tage wieder zerfallen. Ein Anwachsen der Partikel ist wegen der extrem kleinen Partikeldurchmesser aus energetischen Gründen nicht auszuschließen. Es tritt allerdings bei diesen Nanosuspensionen kein Partikelwachstum aufgrund der OSTWALD-Reifung auf, denn dafür sind die Partikel, die im Mikrometer Bereich liegen, wahrscheinlich zu klein ( $< 4 \mu\text{m}$ ). Ein Unterschied in der wahren Löslichkeit wird erst ab einer Partikelgröße  $\gg 10 \mu\text{m}$  beobachtet [Nyström 1996]. Die Partikelgrößen der Formulierung TZ01 veränderte sich innerhalb des Untersuchungszeitraumes nicht, lediglich der PI von stieg gegen Ende der 6 Wochen leicht an. TZ03 zeigt sich nach 6 Wochen Lagerung als vergleichbar mit TZ01 jedoch braucht diese Formulierung 14 Tage um sich zu stabilisieren, wie in Abbildung 1-3 zu sehen ist. Zwischen dem Tag der Herstellung und nach 14 tägiger Lagerung treten Aggregations- und

Deaggregationserscheinungen auf. Die Gründe dafür sind in obiger Diskussion um TZ02 genannt. Zudem enthält TZ03 Lecithin, das Tendenzen zu Zersetzung, insbesondere bei Temperaturen > 50°C zeigt. Hierbei entsteht das hämolytisch wirkende Lysolecithin. Als am besten geeignete der drei Chargen stellte sich also TZ01 heraus.

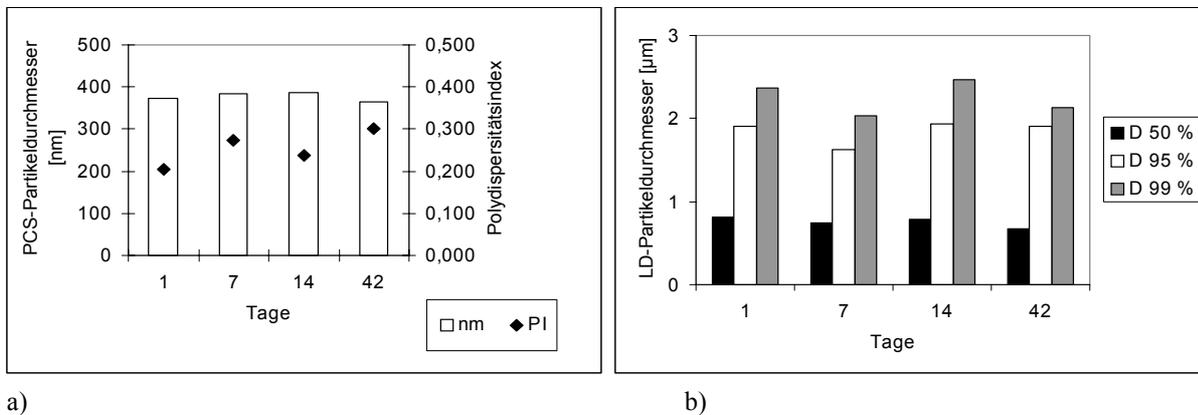
Für die durchzuführende intravenöse Studie zur akuten Toxizität an Nagern war eine höhere Konzentration an Tarazepid erforderlich. Deshalb wurde eine Charge mit einem Gehalt von 10,0 % (m/m) Tarazepid hergestellt (TZ04).

**Tabelle 1-1: Zusammensetzung der Charge TZ04 (Konzentration in % (m/m)).**

<b>Substanz</b>	<b>TZ04</b>
Tarazepid	10,00 %
Lutrol®F68	1,00 %
Tween®80	0,50 %
Aqua ad inj.	ad 100,00 %

Es wurde eine Erhöhung des Arzneistoffanteils vorgenommen, der prozentuale Gehalt der Tenside wurde aus Rezeptur TZ01 beibehalten, denn es hat sich gezeigt, dass bei einer Erhöhung des Feststoffanteils von bis zu 20 %, und trotz der damit einhergehenden Vergrößerung der zu beladenen Oberfläche (ein vielfaches als 20 % mehr), die Tensidkonzentration beibehalten werden kann [Dissertation Krause, in Vorbereitung].

Trotz Erhöhung des Arzneistoffanteils auf 10,0 % konnte die gleiche bzw. leicht bessere Dispersität im Vergleich zu den Nanosuspensionen mit 1 % Tarazepid erreicht werden. Auch konnte mit dem 10-fach erhöhten Gehalt an Arzneistoff eine über 6 Wochen bei Raumtemperatur (Untersuchungszeitraum im Rahmen der Studie) stabile Nanosuspension erzielt werden, wie aus Abbildung 1-4 ersichtlich ist.



**Abbildung 1-4:** a) PCS-Partikelgrößen in nm (□) und Polydispersitätsindices (◆), b) LD-Partikelgrößen D 50 %, D 95 % und D 99 %, bei beiden Darstellungen in Abhängigkeit von der Einlagerungszeit in Tagen der Formulierung TZ04 (10 % Arzneistoffanteil, siehe Tabelle 1-1).

### 4.1.5 Sterilisation von Nanosuspensionen

Weil die Zubereitung für die toxikologischen Untersuchungen an Mäusen i.v. infundiert werden sollte, musste die Nanosuspension möglichst steril, zumindest aber keimarm sein. Es gibt verschiedene Möglichkeiten sterile bzw. keimarme Produkte zu erhalten. Das angewandte Mittel der Wahl ist die Wasserdampf-Sterilisation bei 121°C, 2 bar, 15 min. nach Ph.Eur. Man kann außerdem eine Entkeimung durch Filter, die eine Porengröße von maximal 0,2 µm aufweisen, vornehmen. Als weitere Methode kann eine Sterilisation mit Hilfe von  $\gamma$ -Strahlen erfolgen. In den meisten Fällen wird hierfür eine Kobalt-Quelle zum Erzeugen der Strahlung genutzt. Die angewandte Dosis nach Ph.Eur. beträgt 25 kGy (kann aber je nach Verfahren variieren).

Die Sterilisation von Nanosuspensionen ist sowohl durch Autoklavieren [Müller et al., 1995] als auch mit Hilfe der Entkeimungsfiltration möglich [Böhm, 1999]. Auch  $\gamma$ -Strahlensterilisation konnte bereits erfolgreich angewandt werden [Peters, 1999].

Zusammenfassend ist festzustellen, dass auf 3 Arten Nanosuspensionen sterilisiert werden können und zwar: 1. Autoklavieren, 2. Entkeimungsfiltration und 3. Strahlensterilisation.

Der Erfolg des jeweiligen Sterilisationsverfahrens hängt sowohl von den Eigenschaften der eingesetzten Hilfsstoffe als auch von denen der Arzneistoffe ab. Bei Sterilisation mit gespanntem Wasserdampf ist insbesondere die Löslichkeit des Arzneistoffes in Abhängigkeit von der Temperatur von Bedeutung. Ist der Arzneistoff bei höherer Temperatur wesentlich besser löslich als bei Raumtemperatur, wird er sich innerhalb von 15 min bei 121°C teilweise oder ganz lösen und er wird beim Abkühlen in Kristallen ausfallen, die nicht mehr im Nanometerbereich liegen müssen. Bei sehr schwer löslichen Stoffen ist ein vollständiges Auflösen weniger wahrscheinlich. Jedoch besteht durchaus die Möglichkeit, dass sich der Arzneistoff teilweise auflösen könnte. Meistens entstehen dann bei solchen Prozessen, egal ob sich der Arzneistoff nur teilweise oder vollständig auflöst, beim Auskristallisieren größere Kristalle, da beim langsamen Abkühlen genügend Zeit vorhanden ist, um große Kristalle zu bilden.

den. Das heisst selbst wenn sich nur ein Teil anlösen sollte, wird ein Partikelwachstum zu erkennen sein. Dieses Verfahren ist also nur für Arzneistoffe anzuwenden, deren Lösungseigenschaften sich selbst bei erhöhter Temperatur im Dispersionsmedium nicht wesentlich verbessern.

Ein weiterer kritischer Punkt bei dieser Sterilisationsmethode ist die hohe Prozesstemperatur, bei der den Partikeln hohe kinetische Energie zugeführt wird, die nach der DLVO-Theorie Agglomerationstendenzen verstärken kann. Dadurch wird möglicherweise die physikalische Stabilität der Nanosuspension verschlechtert.

Ähnliches gilt auch für die eingesetzten Hilfsstoffe. Insbesondere sind die stabilisierenden Tenside zu beachten. Entscheidend ist hier der Trübungspunkt der verwendeten Tenside. Lösungen von nichtionischen Tensiden in Wasser werden bei Überschreiten einer bestimmten Temperatur, die für das jeweilige Tensid charakteristisch ist, trüb [Hoffman und Ulbricht, 1993]. Oberhalb dieser Temperatur werden Bereiche des Tensids dehydratisiert, z. B. der Polyethylen- und Ethylenoxidgruppen bei Tween<sup>®</sup>80 und Poloxamer 188. Als Folge der verminderten Hydratation verlieren die Moleküle an Hydrophilie und verändern damit auch ihre stabilisierenden Eigenschaften. Es kann zu Aggregationen der Partikel kommen.

Bei der sogenannten Entkeimungsfiltration ist der kritische Punkt, das Adsorptionsverhalten des Filtermaterials auf die Nanosuspension, das betrifft sowohl Arzneistoff als auch Hilfsstoffe, die in unterschiedlichem Ausmaß adsorbiert werden könnten.

Bei der Sterilisation mit  $\gamma$ -Strahlen muss beachtet werden, dass insbesondere Sauerstoff-Verbindungen in Gegenwart von Wasser sehr leicht aufgespalten werden können.

#### **4.1.5.1 Sterilisation mit gespanntem Wasserdampf**

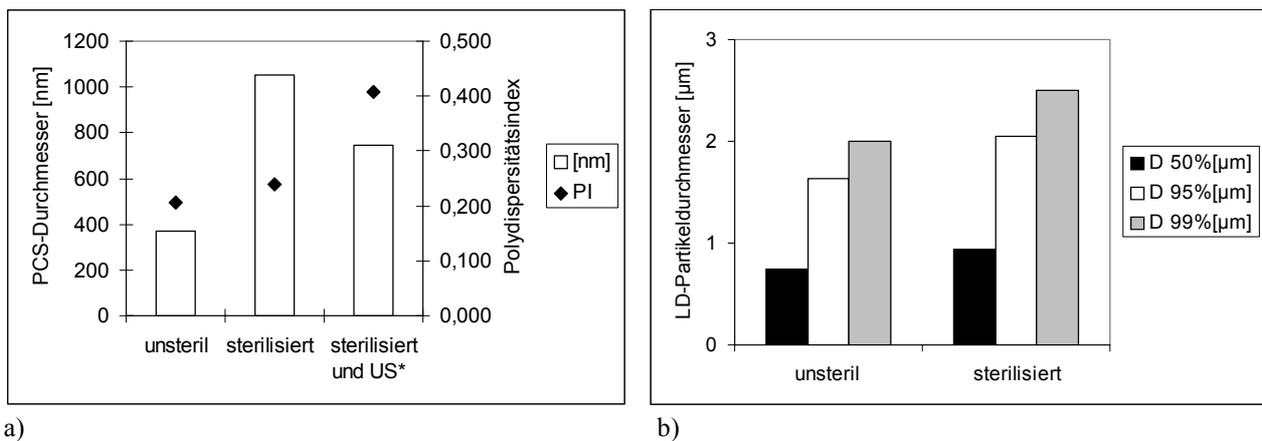
Die Charge TZ01 wurde mit gespanntem Wasserdampf bei 110°C für 30 min. sterilisiert (als gleichwertige Bedingung zu 121°C, 15 min). Da diese Formulierung Tween<sup>®</sup>80 und Lutrol<sup>®</sup>F68 enthält, war es schon von Anfang an fraglich, ob der Versuch erfolgreich sein würde. Die vorher optisch homogene Suspension zeigt nach der Autoklavierung mit bloßem Auge erkennbare Aggregate. Der PCS-Durchmesser stieg von 400 nm auf über 2  $\mu$ m an. Die LD 99 % Werte stiegen von 2,50  $\mu$ m auf über 50  $\mu$ m und konnten auch mit Ultraschallbehandlung nicht redispersiert werden. Die Aggregation der Partikel kann folgendermaßen erklärt werden: die Erhöhung der Temperatur führt zur Dehydratisierung der Polyethylengruppen des Tweens<sup>®</sup> und der Ethylenoxidgruppen des Lutrols<sup>®</sup>F68, somit wird die Schicht der sterisch stabilisierenden Schicht dünner und die Stabilisierung ist nicht mehr ausreichend.

#### **4.1.5.2 $\gamma$ -Strahlensterilisation**

Ein Teil der Charge TZ04 wurde mit 25 kGy in einer Cobalt-60-Bestrahlungsanlage bestrahlt (Sollwert 25 kGy, reale Strahlendosis laut Bestrahlungszertifikat 28.9 kGy). Abbildung 1-5 zeigt die PCS- und LD-Analyse des unsterilisierten und des sterilisierten Teils der Charge direkt nach der  $\gamma$ -Bestrahlung. Die Strahlensterilisation fand 3 Tage nach Herstellung der Probe statt. Nach drei weiteren Tagen, also nach insgesamt 6 Tagen, wurde die Probe erneut vermessen. Der PCS-Partikeldurchmesser der unbehandelten Charge betrug am Tag

der Herstellung 373 nm (PI 0,205). Im Vergleich zu dem Wert am Tag 6 (383 nm, PI 0,275) bestand demnach kein wesentlicher Unterschied. Die mittlere Partikelgröße der unbehandelten Referenzprobe blieb nahezu gleich, der PI stieg nur leicht an.

Nach der  $\gamma$ -Bestrahlung der Proben sind im Mikrometerbereich sind nur geringfügige Änderungen zu beobachten, der LD 99 % stieg von knapp 2  $\mu\text{m}$  auf ca. 2,5  $\mu\text{m}$  an. Die Veränderungen im Submikronbereich, die durch die PCS-Analyse deutlich werden, sind jedoch stärker ausgeprägt. Die Ergebnisse der Partikelgrößenanalyse sowohl der  $\gamma$ -Strahlenbehandlungen und der Referenzprobe sind in Abbildung 1-5 nebeneinander dargestellt.



**Abbildung 1-5:** a) PCS-Durchmesser und Polydispersitätsindices der nicht sterilisierten und sterilisierten Proben, US: Ultra-Schallbehandlung (160 Watt; 3 min.), b) LD-Analyse der gleichen Proben.

Die  $\gamma$ -strahlensterilisierte Probe zeigte ein Anwachsen des PCS -Durchmessers von 380 nm auf ca. 1000 nm und eine leichte Erhöhung der Polydispersitätsindices von 0,205 auf 0,239. Nach Behandlung im Ultraschallbad (160 Watt; 3 min.) konnte eine Partikelgröße von 740 nm und ein PI von 0,407 erzielt werden. Die Ausgangsgröße wurde jedoch nicht erreicht; eine Aggregation hat im Submikronbereich stattgefunden.

Sowohl vor als auch nach der  $\gamma$ -Strahlensterilisation wurde das Zetapotenzial der Tarazepid Nanosuspension vermessen. Die Messungen erfolgten in Aqua dem., welches auf eine Leitfähigkeit von 50  $\mu\text{S}/\text{cm}$  mit Natriumchlorid eingestellt wurde. Nach Zugabe der Nanosuspension veränderte sich die Leitfähigkeit unwesentlich. Vor der  $\gamma$ -Strahlensterilisation wurde ein Zetapotenzial von -30 mV ermittelt, welches danach auf -20 mV und nach 6 Wochen Lagerung sogar auf -14 mV abfiel. Hinzu kommt, dass die Nanosuspension nach der Sterilisation nur noch einen pH-Wert von ca. 3,5 aufwies, der zuvor bei pH 6 lag. Da der Gehalt an Tarazepid sich laut HPLC-Analytik, die von extern durchgeführt wurde, nicht verändert hatte, sind die Veränderung auf die Hilfsstoffe Tween<sup>®</sup>80 und Lutrol<sup>®</sup>F68 zurückzuführen. Beide enthalten Ethoxybrücken, die sich insbesondere im wässriger Umgebung bei  $\gamma$ -Strahlenbehandlung zersetzen [Pschyrembel, 1998].

Für die Toxizitäts-Studie wurde die Nanosuspension aseptisch hergestellt. Das heisst sämtliche produktberührenden Teile des Homogenisators und andere Hilfsmittel (Spatel etc.) wurden vorher autoklaviert und gegebenenfalls während des Herstellungsprozesses mit Isopropanol gereinigt/desinfiziert. Vor der Homogenisation der eigentlichen Nanosuspension erfolgten zwei Homogenisationszyklen bei 500 bar mit Isopropanol. Es wurde beim gesamten Herstellungsprozess Aqua ad injectabilia eingesetzt. Während des Homogenisationsprozesses werden zehn Zyklen mit 1500 bar angewandt. Die Wahrscheinlichkeit, dass Bakterien oder Viren überlebt haben könnten, ist gering, weil durch das Verfahren der Hochdruckhomogenisation viele Organismen abgetötet werden. Die Applikation der Nanosuspension an Nagern war erfolgreich, alle Tiere überlebten die nach OECD-Guidelines erforderlichen Zeitraum.

## 4.1.6 Langzeitstabilität

Die Langzeitstabilitätsuntersuchungen für die Tarazepid-Nanosuspension wurden mit drei Formulierungen ausgeführt. Diese Nanosuspensionen sollten präferenziell als wässrige Dispersionen lagerfähig sein, das heisst sie müssen technologisch so optimiert stabilisiert sein, dass ein Partikelwachstum ausbleibt. Dabei haben sich die Kombinationen von Tween<sup>®</sup>80 und Lutrol<sup>®</sup>F68 über den Zeitraum von 6 Wochen schon als günstig für die Stabilisierung für Tarazepid herausgestellt. Es wurden folgende drei Ansätze produziert:

**Tabelle 1-1: Zusammensetzung der Chargen zur Langzeituntersuchung, Konzentration in (m/m), alle Ansätze wurden bei Raumtemperatur gelagert.**

Substanz	TZ05	TZ06	TZ07
Tarazepid	10,00 %	10,00 %	10,00 %
Lutrol <sup>®</sup> F68	0,50 %	1,00 %	1,00 %
Tween <sup>®</sup> 80	0,25 %	0,50 %	0,50 %
Glycerol		0,61 %	
Aqua ad inj.	ad 100,00 %	ad 100,00 %	ad 100,00 %

TZ05 enthält nur die Hälfte Tensidmenge der anderen beiden Ansätze (TZ06 und TZ07). Es sollte ermittelt werden, ob diese Formulierung hinsichtlich der Partikelgröße stabil ist oder ob sich mangels ausreichender Stabilisierung Aggregate bilden würden (Partikelwachstum aufgrund von OSTWALD-Reifung konnte bislang bei Nanosuspension noch nicht beobachtet werden, dieser Effekt wird deshalb ausgeschlossen). Dem Ansatz TZ06 wurde Glycerol zugefügt, um eine blutisotone Nanosuspension zu erhalten. Erforderlicher Bereich liegt zwischen 280 und 320 mosmol/kg, die Nanosuspension mit Glycerol hatte eine Osmolarität von 285 mosmol/kg. Der pH-Wert der Nanosuspensionen lag bei 6-7, und war somit direkt infundierbar.

Die Abbildung 1-6 zeigt die drei Formulierungen in direktem Vergleich nach unterschiedlicher Lagerungszeit.

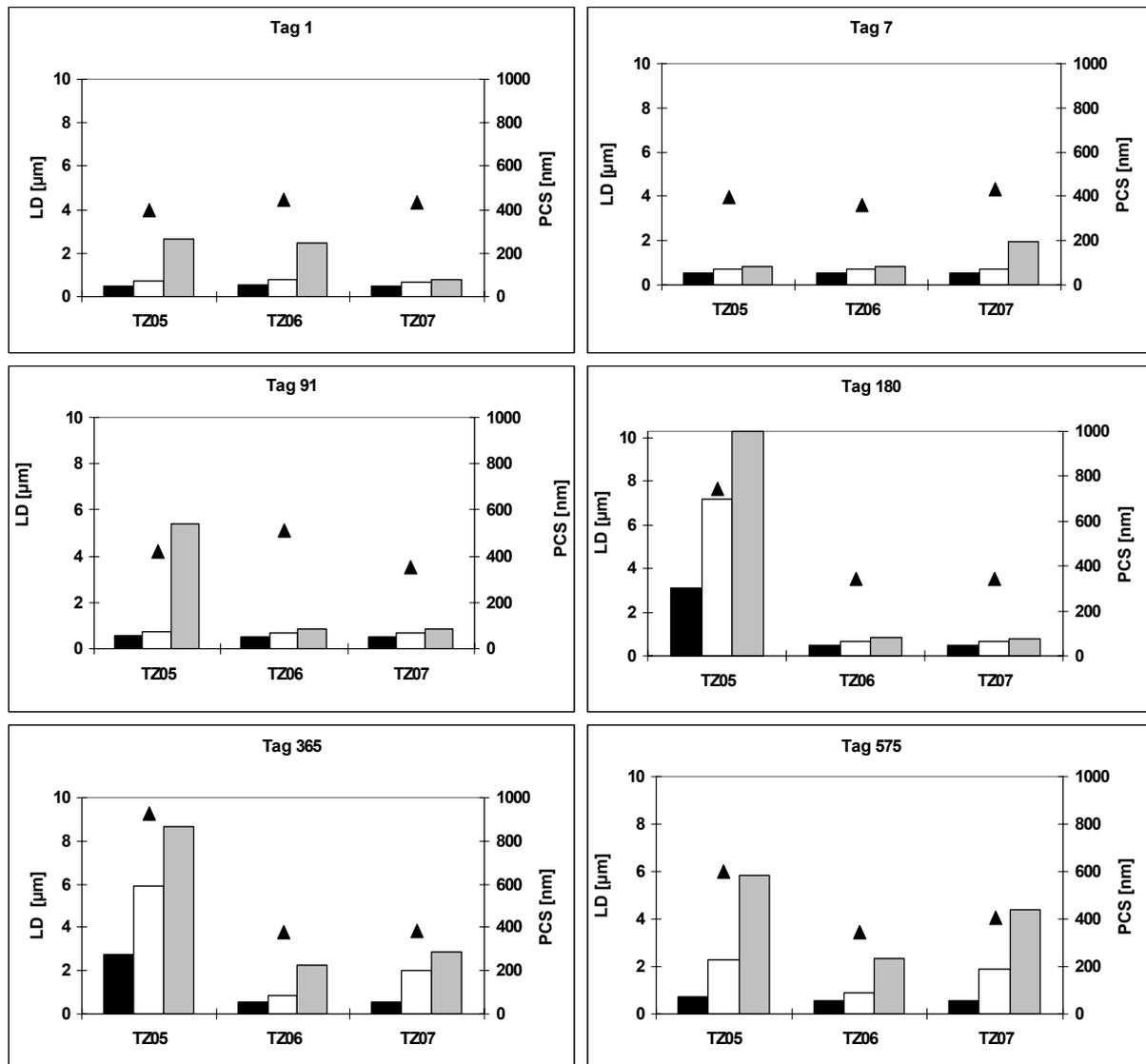
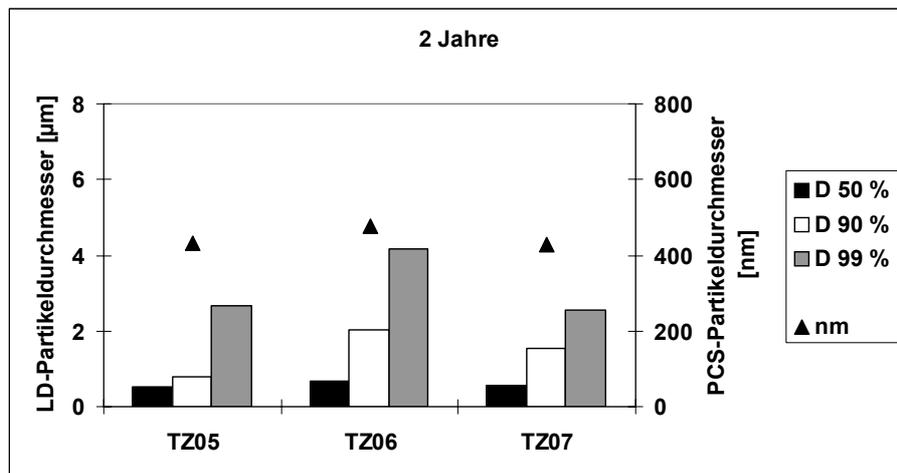


Abbildung 1-6: Lagerstabilität der Tarazepid-Nanosuspensionen TZ05 - TZ07, Partikelgrößen nach LD- und PCS-Analyse (D 50 %: ■, D 95 %: □, D 99 %: ■ und PCS: ▲).

In Abbildung 1-6 ist zu erkennen, dass die Tarazepid-Nanosuspensionen TZ06 und TZ07 über einen Zeitraum von 1,5 Jahren hinsichtlich Partikelgrößen und Partikelgrößenverteilung stabil sind. Bei der Formulierung TZ05 zeigte sich eine deutliche Zunahme in der gemessenen Partikelgröße, die entweder auf Partikelwachstum oder auf Bildung von Aggregaten zurückgeführt werden kann, die auch den kontinuierlichen Rührprozessen (ca. 5 min), die während der LD Messung stattfinden, standhielten und sich nicht wieder auflösten.

Nach 2-jähriger Lagerung war keine der Nanosuspensionen mehr per Hand aufschüttelbar. Selbst nach minutenlangem intensiven Schütteln blieb stets ein Bodensatz, der lediglich mit Ultra-Schall Behandlung redispersiert werden konnte (5 min, 1600 Watt). Die LD- und PCS-Analytik zeigt das in Abbildung 1-7 dargestellte Ergebnis: .



**Abbildung 1-7:** Ergebnis der LD- und PCS-Analyse der Tarazepid-Nanosuspension TZ05, TZ06 und TZ07 nach 2-jähriger Lagerung. Vor der Messung wurden die Nanosuspensionen mit Ultraschall behandelt.

Die Partikelgrößen von aller drei Formulierungen, die nach 2 Jahren (nach Ultraschallbehandlung), ermittelt wurden sind etwas kleiner als die nach 575 Tagen (~1,5 Jahre), sowohl LD- als auch PCS-Analyse. Das deutet darauf hin, dass auch schon nach 1,5 leichte Aggregatbildung stattgefunden hat.

Durch die Ultraschallbehandlung konnten wieder sehr kleine Partikel erhalten werden. Das bedeutet, dass sich nach längerer Lagerzeit ein zwar nicht wieder aufschüttelbares Sediment bildet, aber die Partikel selbst nicht wachsen, also keine Ostwaldreifung stattfand.

Nach 1,5 Jahren Lagerzeit der Charge TZ06 zeigt die rasterelektronische Aufnahme (Abbildung 1-8) eine unveränderte Individualität der Partikel.

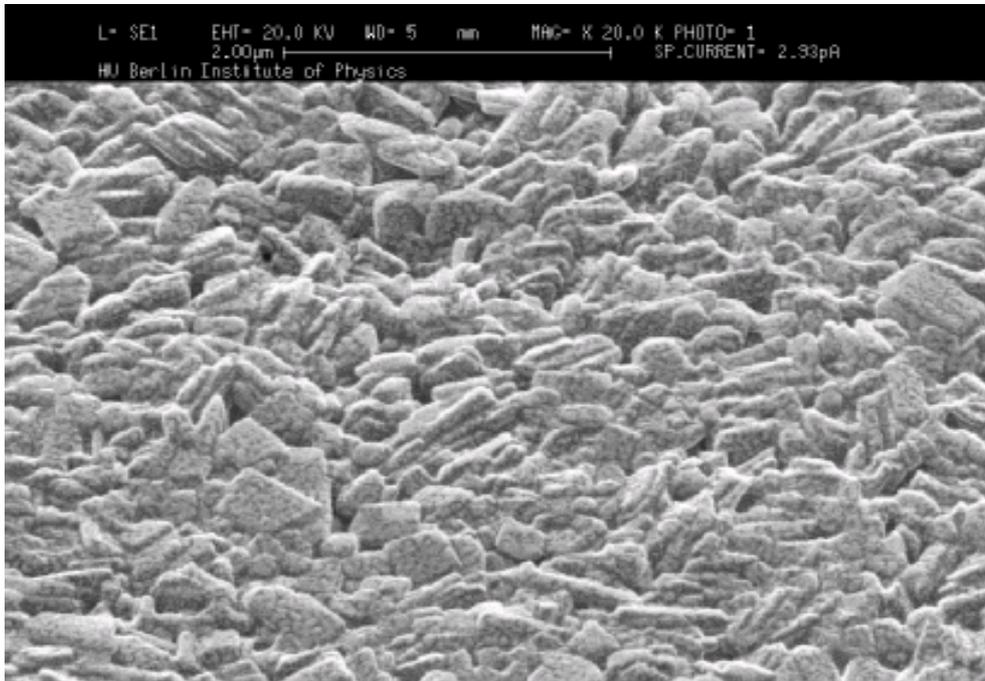


Abbildung 1-8: REM-Aufnahme der Charge TZ06 nach ca. 1,5 Jahren Lagerung bei Raumtemperatur.

In Abbildung 1-9 ist die Partikelgrößenverteilung derselben Charge als LD-Verteilungskurve zu sehen. Sie hat sich über ein 1,5 Jahre hinweg nur geringfügig verändert. Die beiden LD-Verteilungskurven sind nahezu kongruent. Lediglich an Tag 1 sind Partikel  $>1 \mu\text{m}$  zu erkennen.

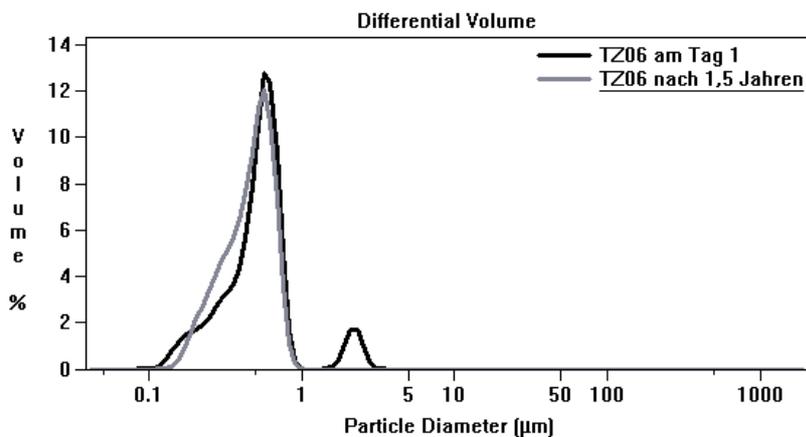


Abbildung 1-9: LD-Partikelgrößenverteilung von TZ06 einen Tag nach der Produktion und nach 1,5 Jahren.

Das Phänomen wurde bereits im obigen Abschnitt erläutert. Es handelt sich um lose Aggregate nach der Hochdruckhomogenisation, die nach kurzer Zeit wieder zerfallen.

Bei der Beurteilung der Langzeitstabilität von den Nanosuspensionen muss stets bedacht werden, dass jeweils nur ein Vial pro Formulierung eingelagert werden konnte und somit die Probenahme immer aus demselben Vial erfolgte. Eine mikrobielle Kontamination während der Probenentnahme ist somit nicht auszuschließen. Mikrobieller Befall führt zu einer Verschlechterung der Qualität der Nanosuspension. Weil die Nanosuspensionen für Toxizitätsstudien an Nagern vorgenommen wurden, sind die Formulierungen ohne Konservierungsmittel zusammengesetzt.

---

## 4.2 Zusammenfassung

Zusammenfassend wird festgestellt, dass sich Tarazepid zur Formulierung als Nanosuspension eignet. Es konnten Suspensionen mit sehr kleiner Partikelgröße und sehr hoher Dispersität hergestellt werden, wobei sich ein erhöhter Feststoffanteil auf den Zerkleinerungsprozess positiv auswirkte. Der pH-Wert dieser Nanosuspension lag im geforderten Bereich zwischen 6-7, musste also nicht eingestellt werden. Die Isotonie konnte mit Glycerol auf einen Wert von 285 mosmol/kg eingestellt werden. Der Zusatz von Glycerol erwies sich nicht als nachteilig auf die Langzeitstabilität. Für eine sterilisierbare Nanosuspension ist die Stabilisierung mit anderen Hilfsstoffen zweckmäßiger. Die  $\gamma$ -Strahlensterilisation hat sich zwar nicht nachteilig auf die Partikelgröße ausgewirkt, hat allerdings eine Zersetzung der Hilfsstoffe hervorgerufen. Der Arzneistoff hat sich chemisch nicht verändert.

Es wurden Chargen hergestellt, die über einen Zeitraum von 1,5 Jahren Partikeldurchmesser von  $< 3 \mu\text{m}$  aufwiesen. Nach 2 Jahren bildeten sich, auch bei höheren Tensidkonzentrationen, schwer zu redispergierende Aggregate. Für eine längere Einlagerung müsste also eine andere Form (eventuell ein trockenes Produkt, durch Sprühtrocknung oder Lyophilisation) entwickelt werden.

Die Applikation an Nagern war erfolgreich. Alle Tiere überlebten den Untersuchungszeitraum von 7 Tagen. Damit konnten die Studien zur Toxizität von Tarazepid an Nagern erfolgreich abgeschlossen werden.