

6 Buparvaquon

6.1 Anwendungsgebiet von Buparvaquon

Buparvaquon gehört der Gruppe der Naphtochinonderivate an und hat eine abtötende Wirkung gegen die Erreger *Cryptosporidium parvum* und *Pneumocystis carinii* [Kayser, 2000; Kayser et al., 2001; Kaneshiro et al., 2001]. Der Effekt gegen den Malariaerreger *Plasmodium falciparum* erwies sich hingegen als mäßig [Hudson, 1985].

Bei *C. parvum* handelt es sich um einen Parasiten aus dem Reich der Protozoen, der in öffentlichen Wassersystemen vornehmlich in den USA vorkommen kann [Current und Garcia, 1991; Dubey et al., 1993]. Bei gesunden Menschen äußert sich ein Infekt mit diesem Erreger in Diarrhöen, Übelkeit und Erbrechen. Die Beschwerden werden symptomatisch behandelt und klingen nach einigen Tagen ab. Bei Patienten mit geschwächtem Immunsystem hingegen, insbesondere HIV erkrankten Menschen, sind die Symptome schlimmer, denn HIV und AIDS beeinträchtigen das Immunsystem und opportunistische Infektionen sowie andere Krankheiten können leicht auftreten. Dazu gehören auch Infektionen die durch Protozoen (*Pneumocystis carinii*, *Cryptosporidium sp.* etc.) ausgelöst werden [Nature Biotechnology, 2000; Blohm, 1999]. Ein Infekt mit Cryptosporidien kann sich über Monate, sogar Jahre hinweg manifestieren. Es gibt zum jetzigen Zeitpunkt noch keine gut geeignete Therapie gegen Kryptosporidiose.

Das Ziel dieser Studie war es, eine verbesserte Formulierung für die orale Applikation des schlecht lösliche Buparvaquon (< 1 mg / 100 ml) zu entwickeln. Die Formulierung als mucoadhäsive Nanosuspension wurde gewählt, um den Wirkstoff im GIT möglichst zielorientiert in der Nähe des Erregers und mit einer verlängerten Wirkzeit am pharmakologischen Fenster zu lokalisieren.

6.1.1 Behandlung von *Cryptosporidium parvum* mit Buparvaquon

Bei dem Parasiten *Cryptosporidium parvum* handelt es sich um ubiquitär vorkommende Protozoen, Größe 4-6 µm. Der Parasit nistet sich im gesamten Intestinaltrakt ein. Bei mikroskopischen Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass er sich in die Mikrovilli des Darms "verkapselt".

Die Magen-Darm-Passage bei Patienten, die von diesem Erreger befallen sind, ist deutlich beschleunigt. Deshalb sollte ein System gefunden werden, das die Kontaktzeit des Arzneistoffes mit dem Erreger verlängert.

6.1.1.1 Einfluss von physikochemischen Parametern auf die Löslichkeit von Wirkstoffen im Gastrointestinaltrakt (GIT)

Die Verfügbarkeit eines peroral zu applizierenden Wirkstoffs hängt oftmals von seiner Löslichkeit im GIT ab. Wenn die Zeit, die ein Stoff benötigt, um in Lösung zu gehen, länger andauert als seine Magen-Darm-Passage, ist er praktisch nicht verfügbar. Die Bioverfügbarkeit ist damit nur sehr gering. Wie eine Löslichkeitsverbesserung erzielt werden kann, ist in der Einleitung beschrieben. Auf die Besonderheiten im Gastrointestinaltrakt (GIT) soll hier nur kurz eingegangen werden. Die Arzneiform bzw. der Wirkstoff wird komplexen Veränderungen an pH-Werten unterworfen. Je nach Nahrungsaufnahme treten hier große Unterschiede auf. Im allgemeinen kann man davon ausgehen, dass pH-Werte von 1,3 (leerer Magen) bis 7,5 (Ileum nach Nahrungsaufnahme) im GIT vorherrschen [Hörter und Dressman, 1997]. Je nach Arzneistoff kann hier eine Lösungsverbesserung eintreten. Die Lösungseigenschaften des Buparvaquons sind jedoch pH-Wert unabhängig, so dass das Durchlaufen von verschiedenen pH-Werten keinen Einfluss hat. Einfluss werden jedoch die Gallensäuren nehmen, die im Zwölffingerdarm sezerniert werden. Diese setzen die Grenzflächenspannung herab und erhöhen so die Benetzbarkeit des Wirkstoffs (Grenzflächenspannungen von Magen-Darmsäften liegen bei 35-45 mN/m). Somit wird eine Verbesserung der Löslichkeit eines lipophilen Wirkstoffs auf natürlichem Wege erreicht [Miyazaki et al., 1979; Bakatselou et al., 1991]. Einen weiteren Einfluss auf die Löslichkeit und Lösungsgeschwindigkeit im GIT hat die Magenfüllung, die das Lösungsvolumen bestimmt und die Viskosität des Mageninhalts. Ist die Viskosität des Mageninhalts groß, verringert sich nach Stokes-Einstein der Diffusionskoeffizient und somit auch die Lösungsgeschwindigkeit [Braun und Parrott, 1972].

6.2 Rezepturscreening für Buparvaquon-Nanosuspension

Für das Rezepturscreening wurden Tenside ausgewählt, die für die orale Applikation geeignet sind. Als geeignet wurde solche Tenside eingestuft, die bereits in Arzneiformen eingesetzt werden, die auf dem heutigen Arzneimittelmarkt zu finden sind [Rote Liste, 2002]. Es wurden verschiedene Rezepturen auf ihre Tauglichkeit, Buparvaquon als Nanosuspension zu stabilisieren, untersucht. Zunächst wurden 3 Formulierungen ausgewählt, Tabelle 2-1 zeigt die Zusammensetzung.

Tabelle 2-1: Zusammensetzung der Screening Rezepturen (Konzentration in m/m).

Substanz	BP1	BP2	BP3
Buparvaquon	1,0 %	1,0 %	2,5 %
Lipoid S75	0,5 %		
Pluronic F68	1,0 %	2,0 %	0,5 %
PVA		1,0 %	
Aqua dem.	ad 100,0 %	ad 100,0 %	ad 100,0 %

Diese 3 Rezepturen wurden mit 15 Zyklen bei 1500 bar homogenisiert. Um den Effekt der Homogenisationszyklen beurteilen zu können, wurden alle 5 Zyklen Proben gezogen und sowohl mit der PCS zur Ermittlung der Hauptpopulation, als auch per Laserdiffraktometrie zur Ermittlung eventuell vorhandener Mikropartikel bzw. Aggregate, vermessen. Die Ergebnisse der LD-Analyse sind in Abbildung 2-1 dargestellt. Die Partikelgrößen Untersuchung wurde einen Tag nach der Herstellung der Nanosuspensionen durchgeführt.

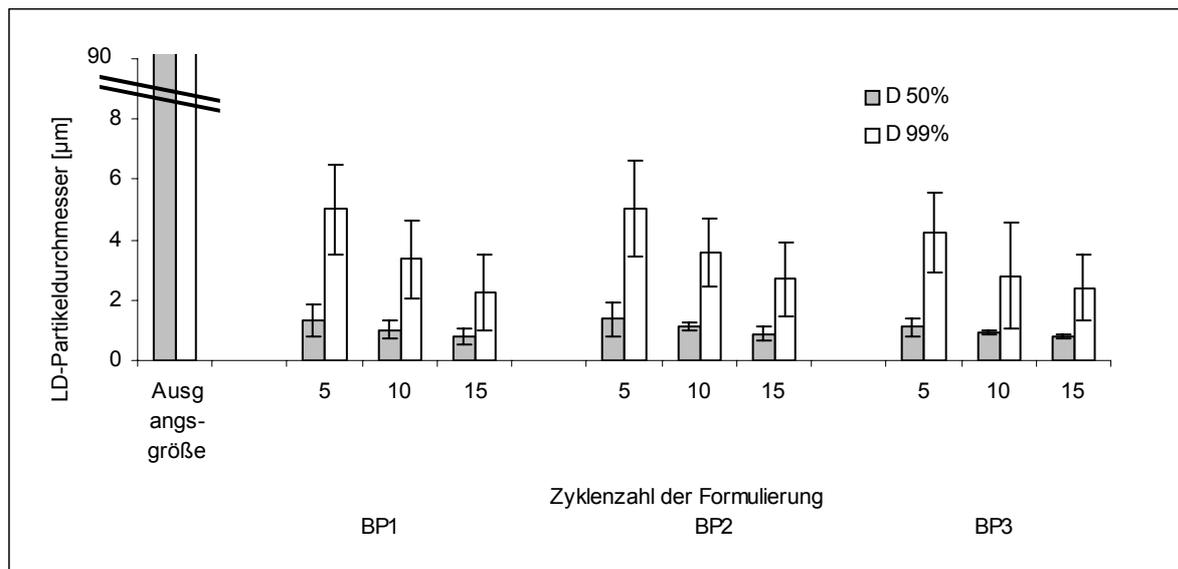


Abbildung 2-1: LD-Partikeldurchmesser D 50 % und D 99 % der Ausgangssubstanz und der Rezepturen aus Tabelle 2-1, nach 15 Homogenisationszyklen (n=3), Tag eins nach der Herstellung.

Die Ausgangssubstanz hatte einen LD 50 % von ca. 85 µm und einen LD 99 % von über 500 µm. Die 3 Formulierungen zeigen sehr ähnliche Ergebnisse. Nach 15 Homogenisationszyklen konnte mit der Rezeptur BP1 ein D 50 % von $0,78 \pm 0,25$ µm und ein D 99 % von

2,23 ± 1,25 µm, für mit Rezeptur BP 2 ein D 50 % 0,87 ± 0,23 µm und D 99 % 2,69 ± 1,23 µm und mit BP3 werden ein D 50 % 0,79 ± 0,09 und D 99 % ± 0,09 µm, erreicht. Die PCS-Analyse (siehe Abbildung 2-2) zeigt, dass nach 15 Zyklen mit zwei der drei Rezepturen Partikelgrößen kleiner als 600 nm erreicht werden konnten (BP1: 558 ± 18 nm, PI 0,347 ± 0,018; BP2 589 ± 30 nm, PI 0,280 ± 0,064). BP3 erzielte mit 663 ± 22 nm eine durchaus mit den anderen vergleichbare Partikelgröße, weil bei dieser Rezeptur ein für Nanosuspensionen relativ kleiner PI von 0,240 ermittelt wurde. Bei Rezeptur BP2 wird relativ rasch eine kleine Partikelgröße erreicht, was bei den anderen beiden Rezepturen erst nach 15 Zyklen erreicht wird.

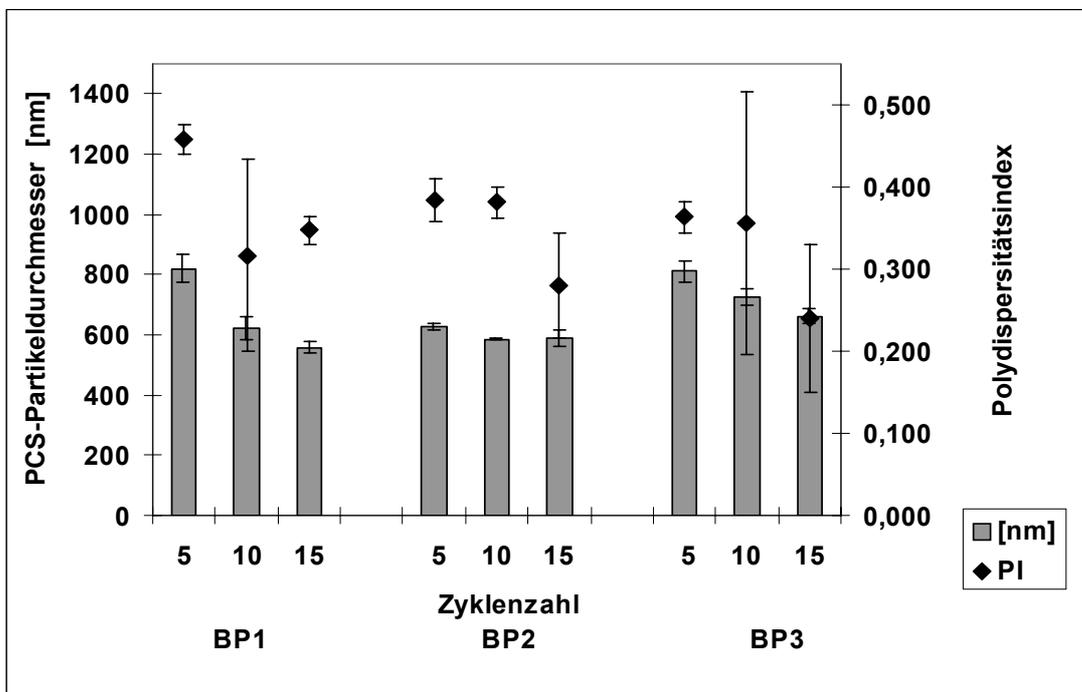


Abbildung 2-2: PCS-Partikeldurchmesser und Polydispersitätsindices der 3 Rezepturen aus Tabelle 2-1 (n=3) am Tag 1 nach der Herstellung.

Während des Homogenisationprozesses können sich Aggregate bilden. Das kommt dann zustande, wenn die neu geschaffenen Oberflächen nicht schnell genug oder nur unzureichend von den Tensidmolekülen besetzt werden, z. B. wenn die neu gebildete Schicht von sterisch stabilisierenden Tensiden zu dünn ist (<< 10 nm). Die Belegung der neu geschaffenen Fläche durch Tenside wird durch deren Diffusion erreicht. Diese Diffusion benötigt eine bestimmte Zeitdauer, die von Tensid zu Tensid variiert. Die Diffusionsgeschwindigkeit ist abhängig vom molekularem Gewicht, von der Hydratation, der Viskosität des Diffusionsmediums etc. Ob die Produktion von Nanopartikeln erfolgreich war, also die Hauptpopulation im Nanometerbereich liegt und die Mikropartikelfraktion gering ist, hängt von den Eigen-

schaften, wie Diffusionsgeschwindigkeit und Affinität der eingesetzten Tenside zu der Partikeloberfläche ab. Das Ausmaß der Affinität wird unter anderem durch hydrophile/hydrophobe Wechselwirkung von Tensid und Wirkstoff bestimmt. Entweder haften die Tensidmoleküle fester oder weniger fest auf den Nanopartikeln. Diese Eigenschaft der Tenside ist sehr wichtig für die Langzeitstabilität, je besser die Tenside am Nanopartikel haften, desto beständiger wird auch die Suspension sein. Zunächst scheinen alle drei Formulierungen gleich gut für die Formulierung von Buparvaquon geeignet zu sein. Ob alle drei Rezepturen die Nanosuspension gleichermaßen über einen längeren Zeitraum stabilisieren können, musste sich dann herausstellen.

6.2.1 pH-Wert der Nanosuspension

Der pH-Wert der untersuchten Nanosuspensionen schwankte über den gesamten Untersuchungszeitraum (bis zu 2 Jahre) zwischen 6,6 und 7,3. Die pH-Werte der Nanosuspensionen wurden untersucht, da sie Einfluss auf die Langzeitstabilität der Nanosuspensionen haben, denn mit Veränderung des pH-Wertes wird das Zetapotenzial beeinflusst das im direkten Zusammenhang mit der physikalischen Langzeitstabilität. Außerdem sollen die Nanosuspensionen in Hydrogele des Carbopol-Typs inkorporiert werden, deren Viskosität pH abhängig ist.

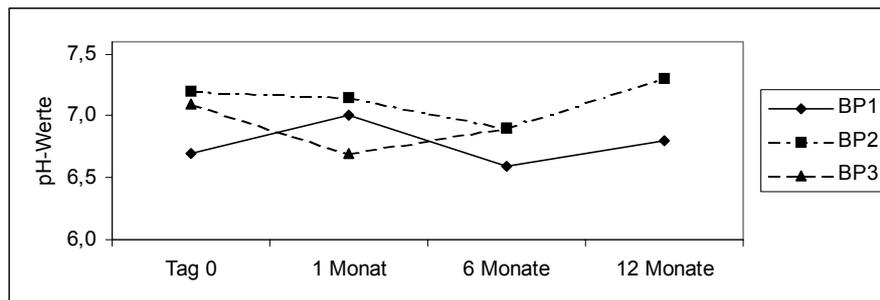


Abbildung 2-3: pH-Werte der Formulierungen BP1-BP3 betrachtet über ein Jahr (M=Monat).

Diese Schwankung um pH 7 sind sehr gering; man kann sagen, dass keine wesentlichen Unterschiede im Verlauf eines Jahres und auch keine wesentlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Formulierungen erkennbar sind.

6.2.2 Zetapotenzial-Untersuchungen

Um die Oberflächenladung und damit auch Stabilität der Nanosuspensionen zu untersuchen, wurde das Zetapotenzial der drei Formulierungen bestimmt.

Das Zetapotenzial hängt von der Art und Konzentration der eingesetzten Stabilisatoren ab. Die zwei Haupteffekte bei der Stabilisierung sind: elektrostatische Abstoßung, welche durch den Einsatz von geladenen Tensiden oder Salzen erreicht werden kann, und sterische Stabilisierung, die durch nichtionische Stabilisatoren hervorgerufen wird. Beispielsweise wird eine Suspension, die ausschließlich durch ungeladene, also nicht ionische Tenside stabili-

siert wird, ein sehr viel niedrigeres Zetapotenzial aufweisen (z. B. $< \pm 20$ mV) als eine Suspension, die mit geladenen Tensiden stabilisiert wird. Emulsionen und Suspensionen die mit Lecithin stabilisiert werden, haben meist ein Zetapotenzial von -30 mV bis -50 mV [Schumann, 1995]. Die Langzeitstabilität hängt demzufolge nicht ausschließlich von der Höhe des Zetapotenzials alleine ab. Eine Suspension mit geringem Zetapotenzial ($\sim \pm 30$ mV) kann dann genau solange physikalisch stabil sein wie eine Suspension mit hohem Zetapotenzial ($< \pm 50$ mV), wenn die sterisch schützende Schicht dick genug ist. Suspensionen können aber auch durch eine Kombination von sterischen und geladenen Tensiden stabilisiert werden. Das Potenzial dieser Suspension wird dann zwischen denen der rein sterischen und der auf elektrostatische Abstoßung beruhender Stabilisierung liegen. Nach Literaturangaben sollten die Potenziale für eine erfolgreiche Stabilisierung zwischen ± 20 mV (sterisch) und mindestens ± 30 mV (elektrostatische Abstoßung), liegen [Müller, 1996; Riddick, 1968].

Das Zetapotenzial wurde in drei verschiedenen Medien untersucht.

- in demineralisiertem Wasser mit eingestellter Leitfähigkeit $50 \mu\text{S}/\text{cm}$
- in Dispersionsmedium (Tensidlösung)
- in Dispersionsmedium mit eingestellter Leitfähigkeit auf $50 \mu\text{S}/\text{cm}$

Die Ergebnisse sind in der Abbildung 2-4 dargestellt.

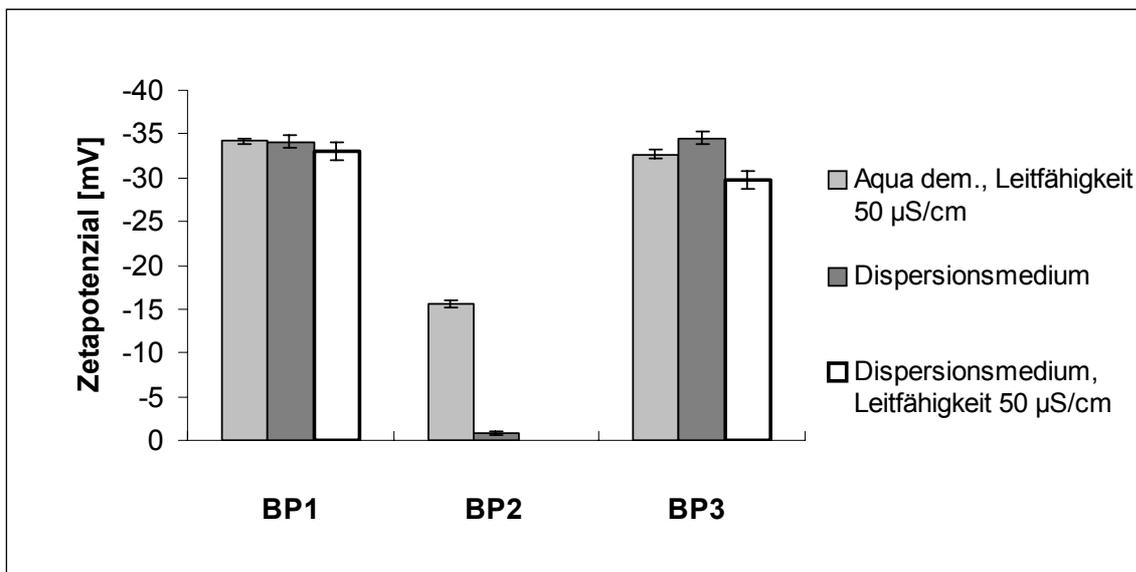


Abbildung 2-4: Zetapotenzial der Formulierung BP1, BP2 und BP3, in verschiedenen Medien (n=3).

Die Oberflächenladung (Nernst-Potenzial) der Arzneistoffpartikel in der Formulierung BP1 und BP3 liegen mit -34,2 mV und -32,7 mV sehr nahe beieinander, während das Zetapotenzial von BP2 mit -15,0 mV einen geringeren Wert aufwies. Da BP2 mit nichtionogenen Tensiden stabilisiert ist, war das nicht unbedingt anders zu erwarten. BP3 wurde zwar auch aus-

schließlich mit Pluronic (auch nichtionogen) stabilisiert, jedoch ist hier das Mengen Verhältnis Feststoffanteil zu Tensid anders, durch eine nicht vollkommene Beladung spielt die Eigenladung des Partikel eventuell eine größere Rolle.

Um eine Abschätzung zur Langzeitstabilität machen zu können, wurden die Nanosuspensionen in ihren Originaldispersionsmedien vermessen. Das Originaldispersionsmedium ist eine Tensidlösung die die gleichen Tenside in der gleichen Konzentration der Formulierung der Nanosuspension besitzt. Diese wird zur Verdünnung für die Messung eingesetzt (für BP1 also Lecithin 0,5 % und Poloxamer 188 1,0 %, Aqua bidest. ad 100,0 %). Bei diesen Messbedingungen ist das Zetapotenzial eine indirekte Messung der diffusen Schicht, deshalb kann der Wert als Vorraussage für die Langzeitstabilität genutzt werden. Damit eine Suspension lange physikalisch stabil ist, sollte sie, je nach Stabilisierungsart (vgl. oben), ein Zetapotenzial von ca. ± 30 mV haben [Müller, 1996].

Um einen besseren Vergleich zwischen den verschiedenen Formulierungen zu erhalten wurde in der dritten Messung die Leitfähigkeit des Dispersionsmediums auf 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$ angeglichen. Dadurch werden Ionen-Effekte minimiert, die einen Einfluss auf das Zetapotenzial ausüben (die Leitfähigkeit von BP2 war schon auf 118 $\mu\text{S}/\text{cm}$, diese konnte nicht reduziert werden)[Müller, 1996].

BP1 und BP3 wiesen ein Zetapotenzial zwischen -30 mV und -35 mV in allen Medien auf. Nur Formulierung BP2 zeigte im original Dispersionsmedium ein Potenzial von -0,9 mV, das heißt, die Partikel sind nahezu ungeladen. Es ist ein Zeichen dafür, dass diese Nanosuspension vermutlich keine physikalische Langzeitstabilität aufweisen wird, wenn die sterisch stabilisierende Poloxamerschicht zu dünn ist.

BP1 und BP2 sind theoretisch ausreichend stabilisiert, um physikalisch langzeit stabil zu sein. Jedoch bildete sich nach längerer Lagerung (siehe 3.6) ein festes Sediment, welches schwer aufschüttelbar war, bzw. nur durch Ultraschallbehandlung (160 Watt, 3 min.) vollkommen redispergiert werden konnte.

6.2.3 Optimierung der oralen Darreichungsform von Buparvaquon

In Experimenten mit Mäusen (siehe Abschnitt 2.4) konnte gezeigt werden, dass bereits mit der Formulierung von Buparvaquon als Nanosuspension eine Erhöhung der Effektivität im Vergleich zu einer „Mikrosuspension“ erzielt werden konnte [Kayser, 2000]. Abbildung 2-5 zeigt die LD-Verteilung der Buparvaquon Mikrosuspension im Vergleich zur Nanosuspension BP1.

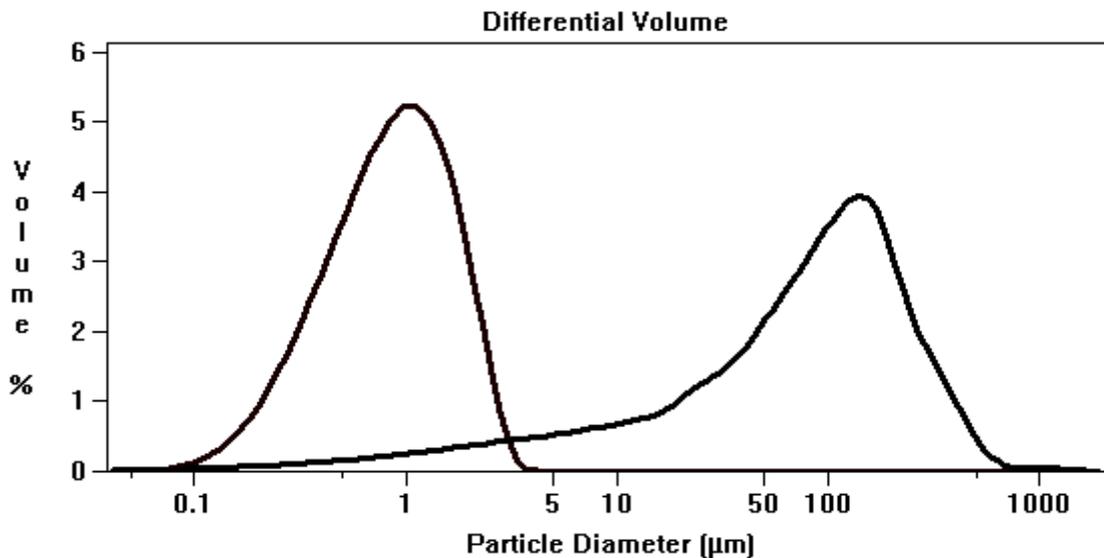


Abbildung 2-5: LD-Verteilungskurven von Buparvaquon-Nanosuspension und Mikrosuspension.

Beide Suspensionen wurden mit den gleichen Tensiden stabilisiert (Poloxamer 188 1,0 % und Lecithin 0,5 %).

Die positiven Ergebnisse der Tier-Experimente (vgl. 2.4) können auf die generellen Vorteile von Nanosuspensionen im Gegensatz zu mikropartikulären Systemen zurückgeführt werden, zu denen auch erhöhtes Haftvermögen zählt.

Um die Kontaktzeit Buparvaquon - *Cryptosporidium parvum* zu verlängern, wurde die Nanosuspension mit verschiedenen Polymeren, deren Mucoadhäsivität bereits untersucht wurde [Gu et al., 1988; Junginger, 1990 und 1991; Jiminez et al.1993], neu formuliert. Als Polymere wurden ausgewählt:

Carbopol 934	Noveon AA-1	Chitosan
Carbopol 971		Chitosanchlorid
Carbopol 974		
Carbopol 980		

6.2.4 Produktion von Buparvaquon als mucoadhäsive Nanosuspension

Um eine mucoadhäsive Nanosuspension zu formulieren, wurden Nanosuspension und Hydrogele getrennt hergestellt. Die Polymere aus der Carbopol-Reihe und vom Noveon Typ wurden zunächst über 24 h in Aqua ad inj. zur vollständigen Hydratation im Kühlschrank (2-8°C) aufbewahrt, und danach mit Triethanolamin neutralisiert (pH 6,5 - 7,1). Chitosanchlorid wurde in Aqua ad inj. und Chitosan wurde in verdünnter Essigsäure unter Rühren gelöst (pH 4). Je nach erforderlicher Konzentration wurde Hydrogel zur Nanosuspension hinzugegeben und mit Hilfe einer Fantaschale und Pistill per Hand oder Ultra-Turrax (Miniaufsatz) dispergiert. Aus vorherigen Untersuchungen mit Buparvaquon ergab sich, dass für die Mäusestudie eine Konzentration von 6,7 mg Buparvaquon pro ml benötigt wird.

6.3 Charakterisierung der neuen Systeme

6.3.1 Partikelgrößenanalyse der Nanosuspension-Hydrogelsysteme

Aufgrund der guten Ergebnisse hinsichtlich mittlere Partikelgröße (PCS-Analyse), Partikelgrößenverteilung (LD-Ergebnisse) und Zetapotenzial, die mit der Nanosuspensionsformulierung BP1 erzielt werden konnten, wurde diese für weitere Untersuchungen ausgewählt. Die folgenden Abbildungen zeigt die Nanosuspension (mit der Formulierung 10,0 % Buparvaquon, 0,5 % Lipoid S75 und 1,0 % Pluronic F 68) in Hydrogele eingearbeitet nach einem Tag Lagerung. Als Referenz wurde Nanosuspension/Wasser (Nanosus./Aqua) gewählt; hier ist die Nanosuspension in der gleichen Konzentration in Wasser verdünnt wie in den Hydrogelen . Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-6 dargestellt.

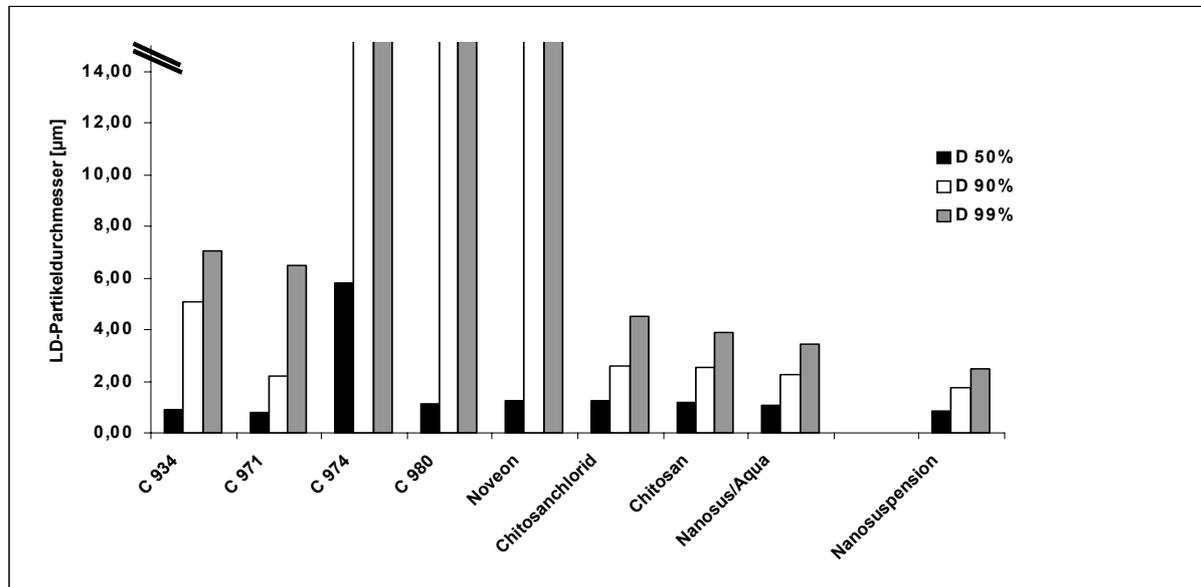


Abbildung 3-6: LD-Partikeldurchmesser D 50 %, D 90 % und D 99 % der Nanosuspension eingearbeitet in die verschiedenen Hydrogele (C steht für Carbopol).

Die Partikel waren so groß, dass es nicht möglich war eine Größenmessung mit der PCS durchzuführen. Auffällig ist, dass die Hauptpopulation (hier D 50%) der Nanosuspension/Gel Systeme (bis auf C974) nicht sehr viel größer ist, als die der Nanosuspension oder der Nanosus/Aqua Probe, die als Referenz dienen. Da die Verdünnung der Probe mit Fanta-schale und Pistill vorgenommen wurde, könnte das Auftreten relativ größerer Aggregate darin begründet sein, dass der Verdünnungsschritt nicht optimal erfolgt ist und eventuell vorhandene Aggregate nicht zerteilt worden sind. Die Durchmesser D 90 % und D 99 % von den Carbopol und Noveon Hydrogelen erreichen teilweise Werte bis zu 30 µm, während die Nanopartikel, die in Chitosan oder Chitosanchlorid eingearbeitet wurden, nur wenig größere Partikeldurchmesser zeigten als die Ausgangsnanosuspension.

6.3.2 Lichtmikroskopische Aufnahmen

Nach den Ergebnissen, die mit der Laserdiffraktometrie erhalten wurden, stellte sich die Frage, ob es sich um Aggregate oder Kristallwachstum handelt. Um dieses festzustellen, wurden die Proben unter dem Lichtmikroskop betrachtet mit einer Vergrößerung von 63x10. Im Gel/Nanosuspensionssystem zeigten sich keine Aggregate. Deshalb wurden die Proben genauso verdünnt, wie es für eine Messung im Laserdiffraktometer erforderlich ist. In der Abbildung 3-7 sind exemplarisch für die Carbopol Reihe Carbopl 934 mit Nanosuspension, Chitosan und reine Nanosuspension abgebildet.

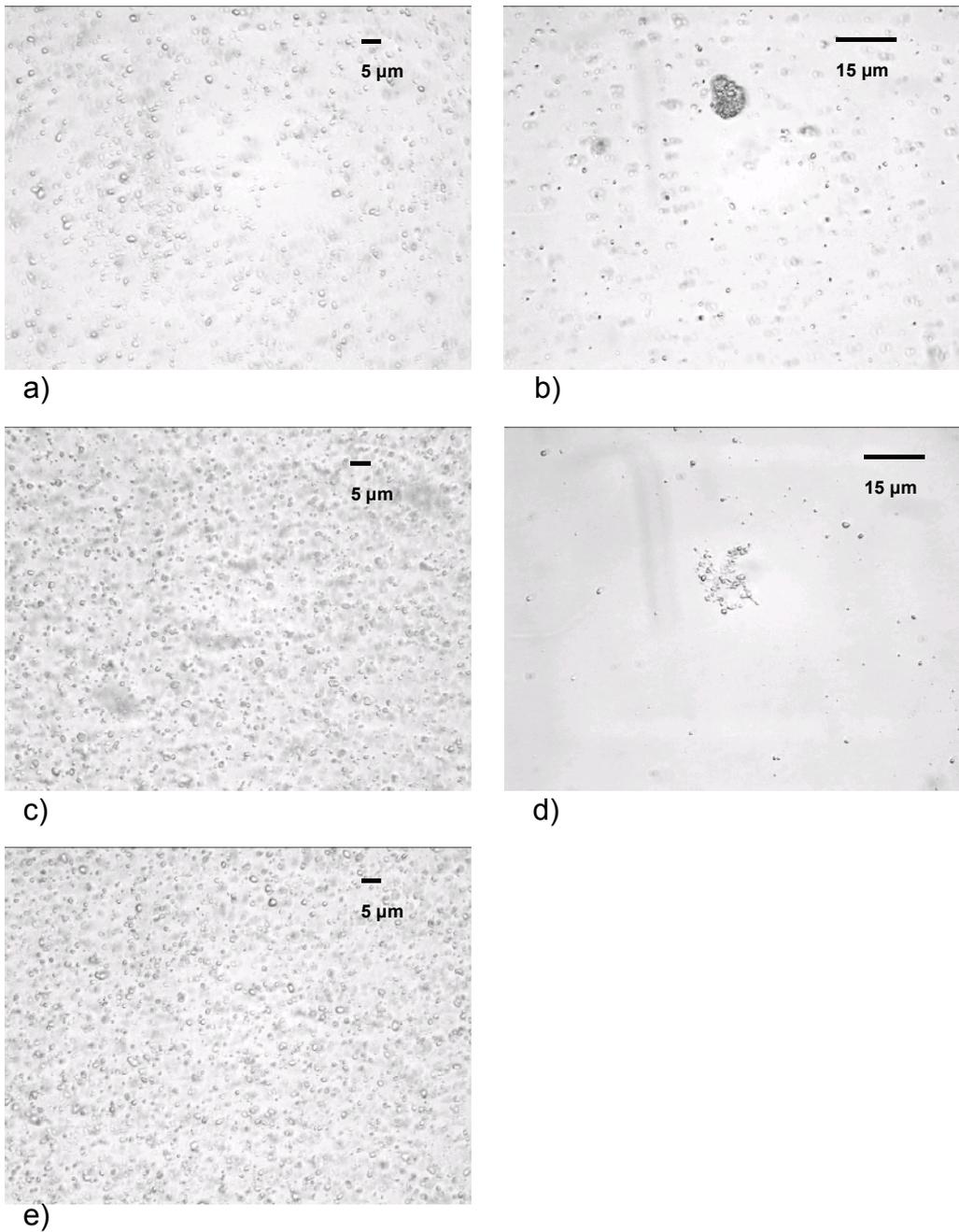


Abbildung 3-7: Mikroskopische Aufnahmen von Nanosuspension-Hydrogel Systemen. Exemplarisch für alle Carbopole wurde Nanosuspension-Carbopol 934 ausgewählt. a) unverdünnt, b) mit Aqua dem. verdünnt, c) Nanosuspension-Chitosan unverdünnt, d) Nanosuspension-Chitosan verdünnt mit Aqua dem. und e) Buparvaquon-Nanosuspension mit Aqua dem. verdünnt als Referenz.

Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen bei den unverdünnten HYdrogelen keine Aggregate, also eine gleichmäßige Verteilung der Nanosuspension im Hydrogel. Aggregate wurden aber mit Hilfe der Laserdiffraktometrie detektiert (Abbildung 3-6). Der Grund für das Auftreten dieser Aggregate schien im Verdünnungsschritt, der für eine LD-Messung notwendig war, zu liegen. Obwohl sehr sorgfältig verdünnt und dispergiert wurde, blieben einige Gelklümpchen mit Nanopartikeln bestehen. Es wird während des Verdünnungsschrittes zum „bridging“ der Polymere gekommen sein. Interessanterweise halten die negativ geladenen Carbopol Polymere die ebenfalls negativ geladenen Buparvaquon Nanopartikel besser fest als die positiv geladenen Chitosan Partikel.

Da die Auswertung der LD-Partikelgröße volumenbasiert ist, fallen einige wenige größere Partikel sofort sehr stark ins Gewicht. Würde man die Messung als Anzahl-Verteilung auswerten, würden die größeren Partikelaggregate kaum bemerkt werden. Um sicher zu gehen, dass es sich bei den Partikelaggregaten um wirkliche Aggregate und nicht doch um gewachsene Kristalle handelt, wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen gemacht.

6.3.3 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen

Buparvaquon liegt als kristalline Substanz vor. Den Unterschied zwischen grobkristalliner und homogenisierter Substanz zeigen die beiden folgenden rasterelektronenmikroskopischen (REM) Aufnahmen (Abbildung 3-8 und 3-9) sehr deutlich.

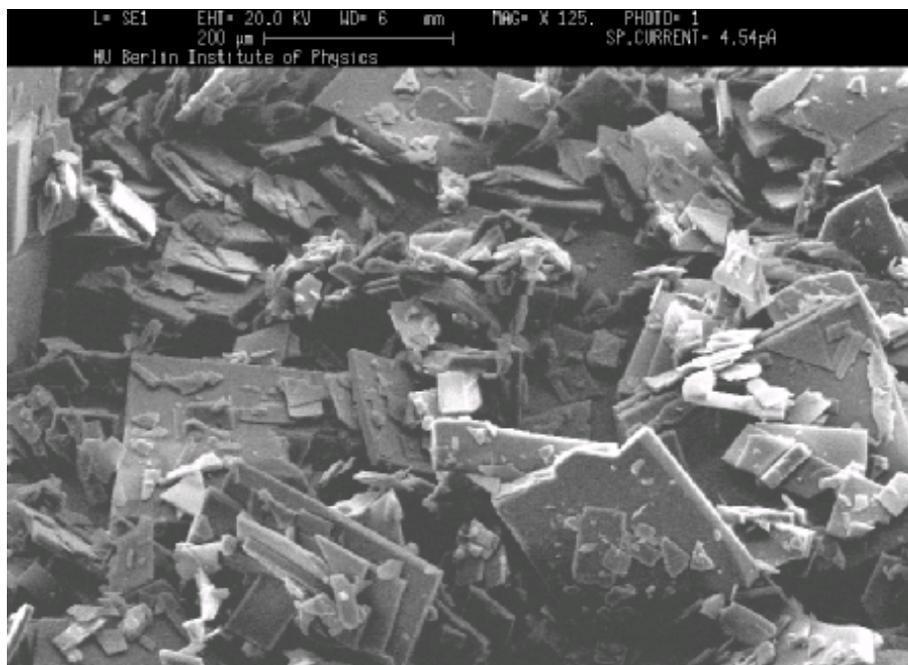


Abbildung 3-8: Buparvaquon Reinsubstanz.

Abbildung 3-8 zeigt Buparvaquon als Ausgangssubstanz (Reinsubstanz). Es sind große, scharfkantige, plattenartige Kristalle zu erkennen. Nach Hochdruckhomogenisation (Abbildung 3-9) sind die Wirkstoffpartikel nicht nur sehr viel kleiner, wie an der Skalierung im schwarzen Bereich über dem Bild zu erkennen ist, sondern haben auch eine abgerundete Form erhalten.

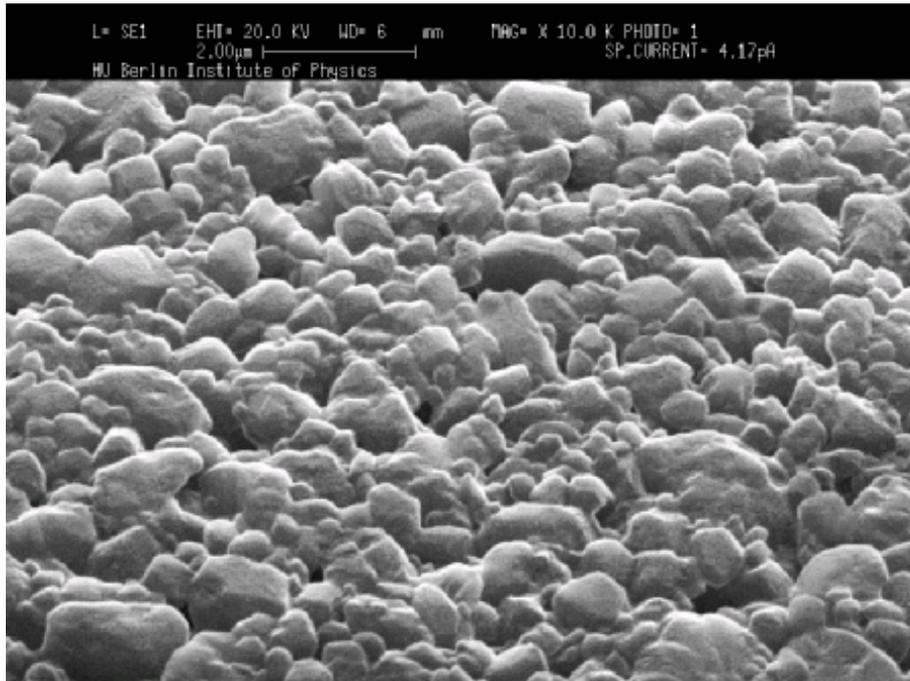


Abbildung 3-9: Buparvaquon als Nanosuspension (10,0 % Buparvaquon, 2,0 % Poloxamer 188 und 1,0 % PVA).

Dieses Phänomen konnte auch schon bei anderen Nanosuspensionen beobachtet werden [Böhm, 1999; Müller et al., 1996]. Durch Hochdruckhomogenisation wurde also nicht nur eine Verkleinerung, sondern auch eine Veränderung der Kristallform hervorgerufen.

Die folgende Abbildung (3-10) zeigt REM-Aufnahmen einer Buparvaquon-Nanosuspension eingearbeitet in Carbopol 934 und Chitosan.

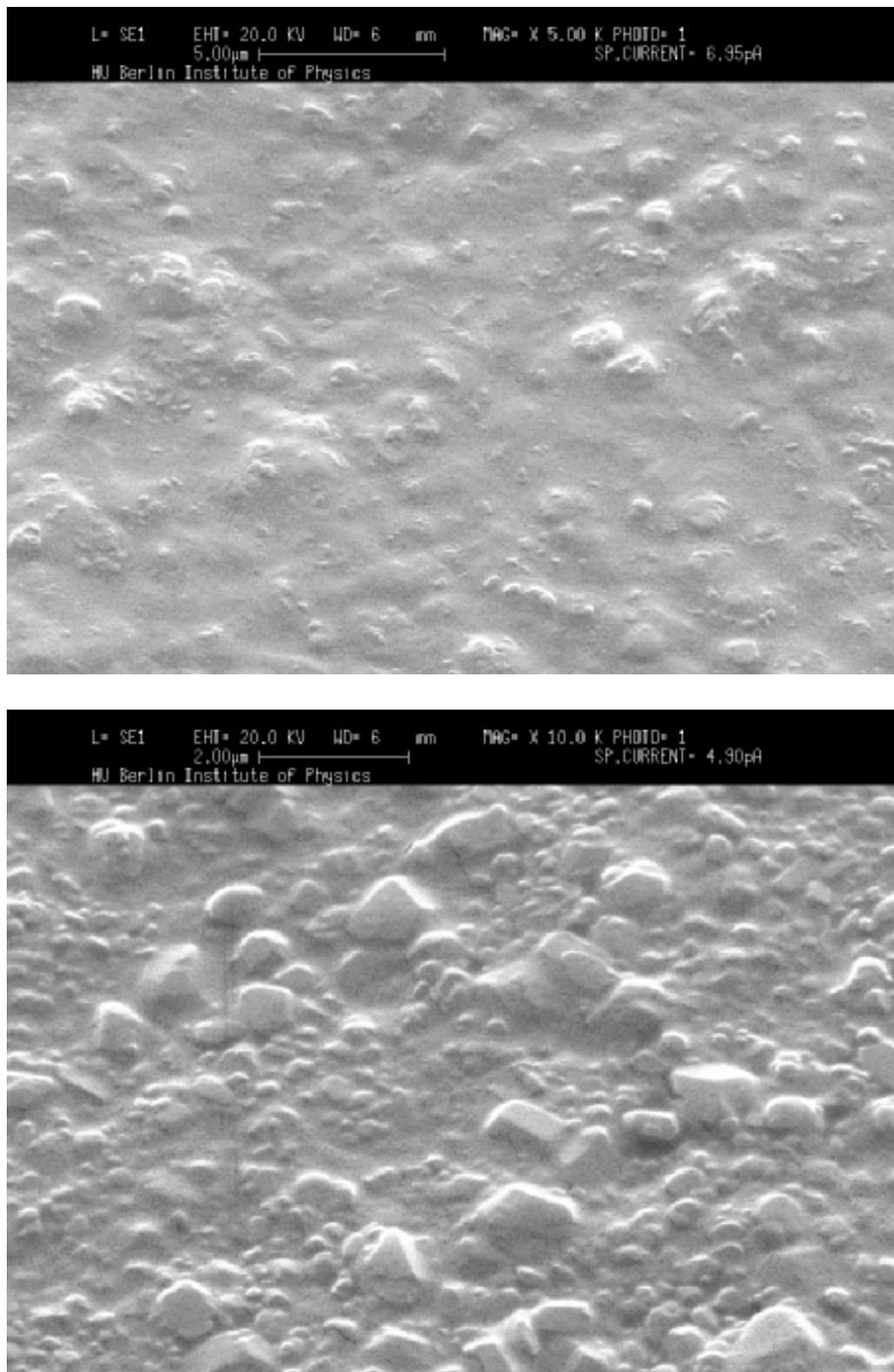


Abbildung 3-10: Buparvaquon als Nanosuspension in Carbopol 934 (obere Aufnahme) und in Chitosan (untere Aufnahme) eingearbeitet.

Das obere Bild zeigt Buparvaquonpartikel inkorporiert in Carbopol 934, das untere in Chitosan. Betrachtet man Abbildung 3-10 genauer, so scheinen die Nanopartikel in eine Matrix eingebettet zu sein. Die Polymere bilden vermutlich einen Film und betten die Nanopartikel darin ein. Anhand dieser Bilder kann nun eindeutig belegt werden, dass die Partikel ihre Individualität bewahrt haben und nur von der Gelmatrix fixiert wurden. Daher kamen die relativ hohen LD-Partikelgrößen D 90% und D 99% zustande.

6.3.4 Sterilisierbarkeit von Nanosuspension und Gelformulierung

Entsprechend mikrobiologischer Überlegungen sollte untersucht werden, ob die Möglichkeit besteht, sowohl die Nanosuspension, als auch die Nanosuspension/Gel Systeme zu sterilisieren, denn aufgrund des hohen Wassergehalts könnte es hier zur Verkeimung kommen. Konservierungsmittel sollten nicht zugesetzt werden, um die Versuchsparmeter für die Zellkulturversuche und Tierversuche möglichst gering zu halten.

Abbildung 3-11 zeigt die Partikelgrößen vor und nach Sterilisation bei 121°C, 2 bar, 15 min.

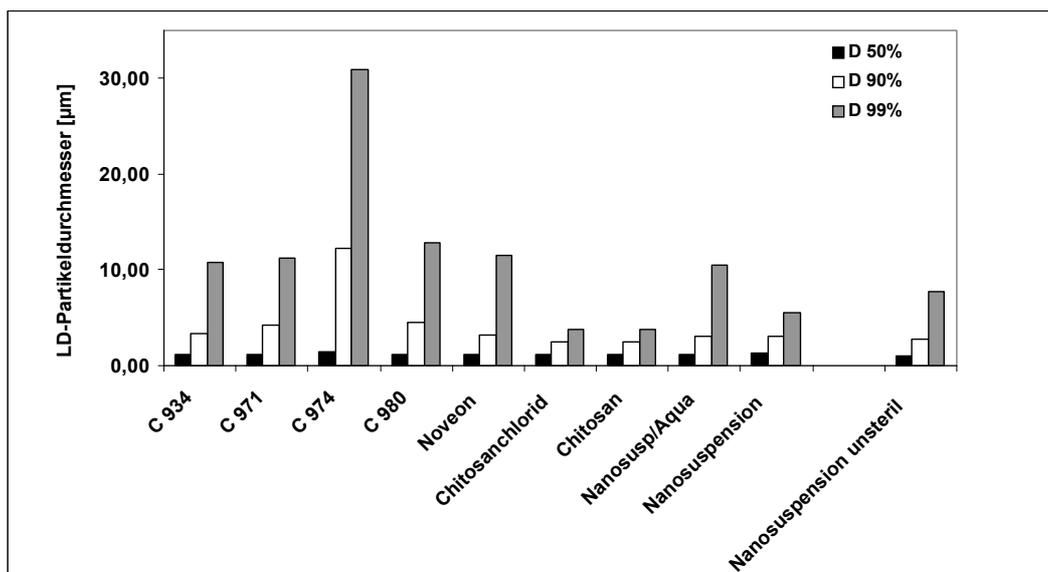


Abbildung 3-11: LD-Partikeldurchmesser D 50 %, D 90 % und D 99 % einer Buparvaquon-Nanosuspension eingearbeitet in verschiedenen Hydrogele (C steht für Carbopol) nach der Sterilisation. Als Referenz ist ganz rechts die Buparvaquon-Nanosuspension unsterilisiert dargestellt.

Die Partikelgrößen verändern sich durch Sterilisation nur unwesentlich. Die Hauptpopulation hat sich weder von den Nanosuspensions-Hydrogelsystemen noch von der Nanosuspension verändert. Es ist somit möglich sowohl die Buparvaquon-Nanosuspension in dieser Formulierung, als auch die Nanosuspension-Hydrogele zu sterilisieren.

6.3.5 Untersuchungen des Zetapotenzials der Nanosuspension-Hydrogelsysteme

Die Buparvaquon-Nanopartikel wurden in Aqua dem. dispergiert (mit Fantaschale und Pistill) und gegebenenfalls die Leitfähigkeit auf 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$ eingestellt. Im Dispersionsmedium konnte nicht vermessen werden, da die Viskosität der Hydrogele zu hoch war. Die pH-Werte der fertig verdünnten Messdispersion betrug 6,3 bis 7,7. Die Chitosan-Verdünnung machte mit 5,3 eine Ausnahme, die Originaldispersion hat einen pH-Wert von 4,0. Dieses hatte auf die Messung nur geringen Einfluss, die Messparameter wurden nicht verändert.

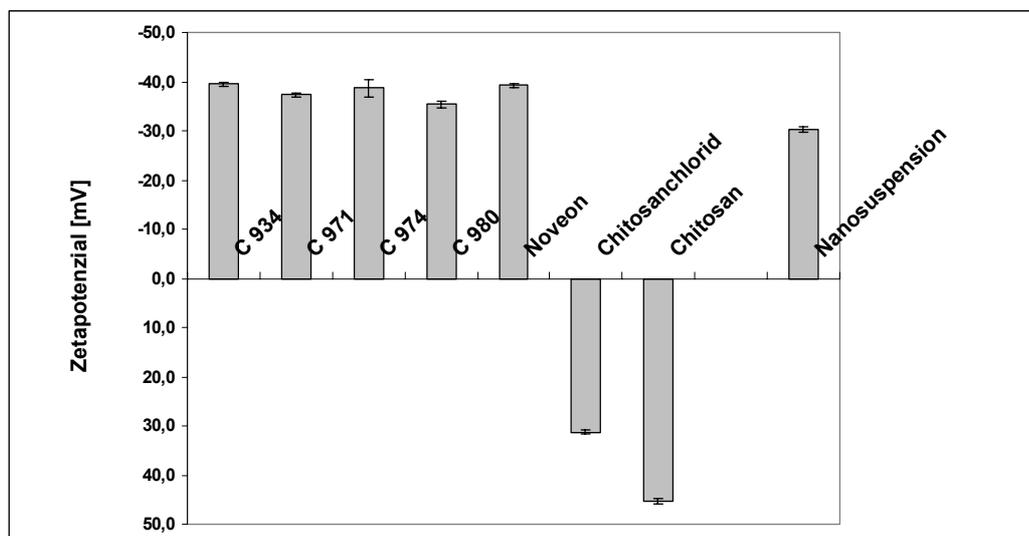


Abbildung 3-12: Zetapotenzial der Buparvaquon Nanopartikel nach Einarbeitung in die Hydrogele (C für Carbopol).

Die Oberflächenladungen der Partikel in der reinen Nanosuspension unterscheiden sich deutlich zu den Oberflächenladungen, die die Partikel nach der Einarbeitung in die verschiedenen Hydrogele haben. Das Zetapotenzial der Nanosuspension ist -30 mV, während die Potentiale der Nanosuspension inkorporiert in die verschiedenen Carbopol-Hydrogele inklusive Noveon zwischen -35 mV und -40 mV liegen. Es lagern sich also weitere Polymere, nämlich die der Hydrogelbildner, auf die Partikeln auf und bleiben dort auch nach Verdünnung mit Wasser haften. Ebenfalls trifft das für Chitosan und Chitosanchlorid zu. Diese beiden Polymere sind positiv geladen und vermögen die negativ geladenen Nanopartikel umzuladen, so dass jetzt positive Werte, +31 mV mit Chitosanchlorid und +45 mV mit Chitosan, für die Buparvaquon-Nanopartikel resultieren.

6.3.6 Langzeitstabilität von Buparvaquon Nanosuspension und Gelformulierung

Direkt nach der Produktion zeigten alle drei Formulierungen eine sehr ähnlich enge Partikelgrößenverteilung. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-13 dargestellt.

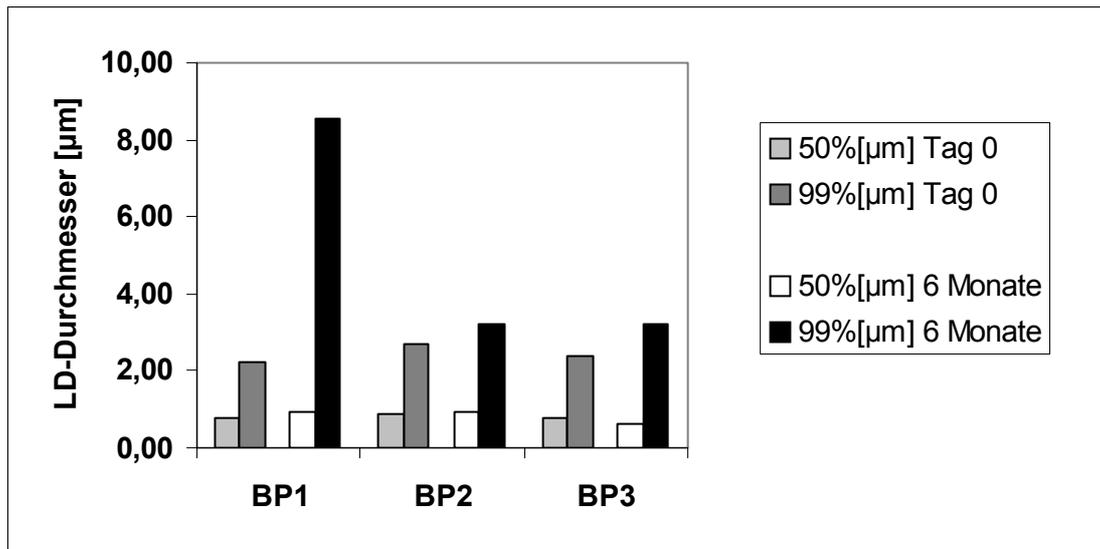


Abbildung 3-13: Langzeitstabilität der reinen Nanosuspensionen BP1, BP2 und BP3, gezeigt anhand der LD-Partikeldurchmesser [µm].

Die Partikelgrößen D 50 % und D 99 % Formulierungen BP2 und BP3 sind nach einem halben Jahr Lagerung im Vergleich zum Produktionstag kaum verändert. Der LD 99 % von BP1 zeigt sich mit $> 8 \mu\text{m}$ erhöht, am Tag der Produktion lag er noch bei $2,32 \mu\text{m}$.

Bei der Betrachtung von Nanosuspensionen sind nicht ausschliesslich die mittleren Partikelgrößen oder der mikropartikuläre Anteil wichtig, sondern auch eine enge Partikelgrößenverteilung. Langzeitstabilität in Hinblick auf die Partikelgrößen, kann nur dann gewährleistet werden wenn eine enge Partikelgrößenverteilung vorliegt, die Partikelwachstum aufgrund von OSTWALD-Reifung verhindert. OSTWALD-Reifung tritt eben dann auf, wenn die Partikel in einer Suspension Fraktionen mit verschiedene Partikelgrößen haben. Aus den verschiedenen Partikelgrößen resultieren verschiedene Sättigungslöslichkeiten in der unmittelbaren Umgebung der Partikel. Dieses ist besonders dann gegeben, wenn eine Partikelfraktion über $10 \mu\text{m}$ vorhanden ist, ab dieser Partikelgröße ist die intrinsische Löslichkeit viel geringer als bei Partikeln $\ll 10 \mu\text{m}$ [Nyström, 1998]. Wie die Partikelgrößenverteilung sich über ein Jahr verhält ist anhand der Formulierung BP2 in Abbildung 3-14 gezeigt.

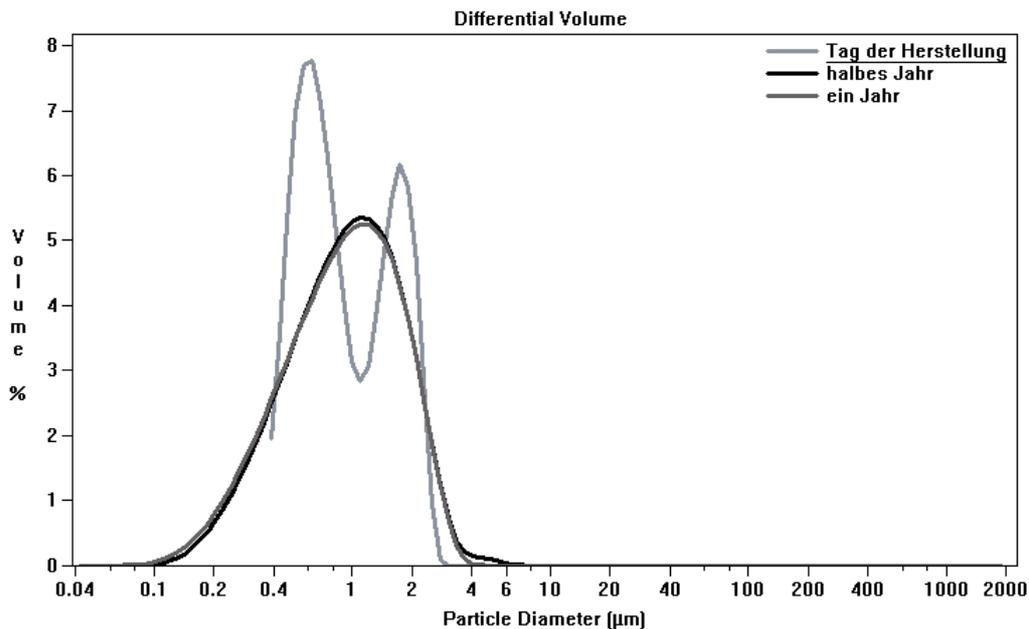


Abbildung 3-14: LD-Verteilungskurve von BP2 am Tag der Herstellung, nach einem halben Jahr und einem Jahr.

Die Partikelgrößenverteilung verändert sich über den Untersuchungszeitraum hinweg nicht. Die bimodale Verteilung der Nanosuspension am Tag der Herstellung ist darauf zurückzuführen, dass einige Aggregate direkt nach der Homogenisation vorhanden sind, die jedoch wieder zerfallen (vgl. 1.3 und 1.4). Bimodale Verteilungen ergeben sich typischer Weise dann, wenn Aggregate vorhanden sind.

Den drei Nanosuspensionen war gemeinsam, dass sie sich nach einem halben Jahr nur sehr schlecht wieder aufschütteln ließen. Insbesondere dann, wenn der Feststoffanteil auf 10 % erhöht wurde. Das Sediment der 10%igen Nanosuspension (Formulierung BP1) konnte nur mit Hilfe von Ultraschall vollständig redispergiert werden.

Dieses Problem tauchte bei den Nanosuspension-Hydrogelsystemen nicht mehr auf.

Die Nanosuspension-Hydrogelsysteme wurden bei Raumtemperatur gelagert. Abbildung 3-15 zeigt die LD-Durchmesser nach einem Tag, einem Monat und einem halben Jahr Lagerzeit.

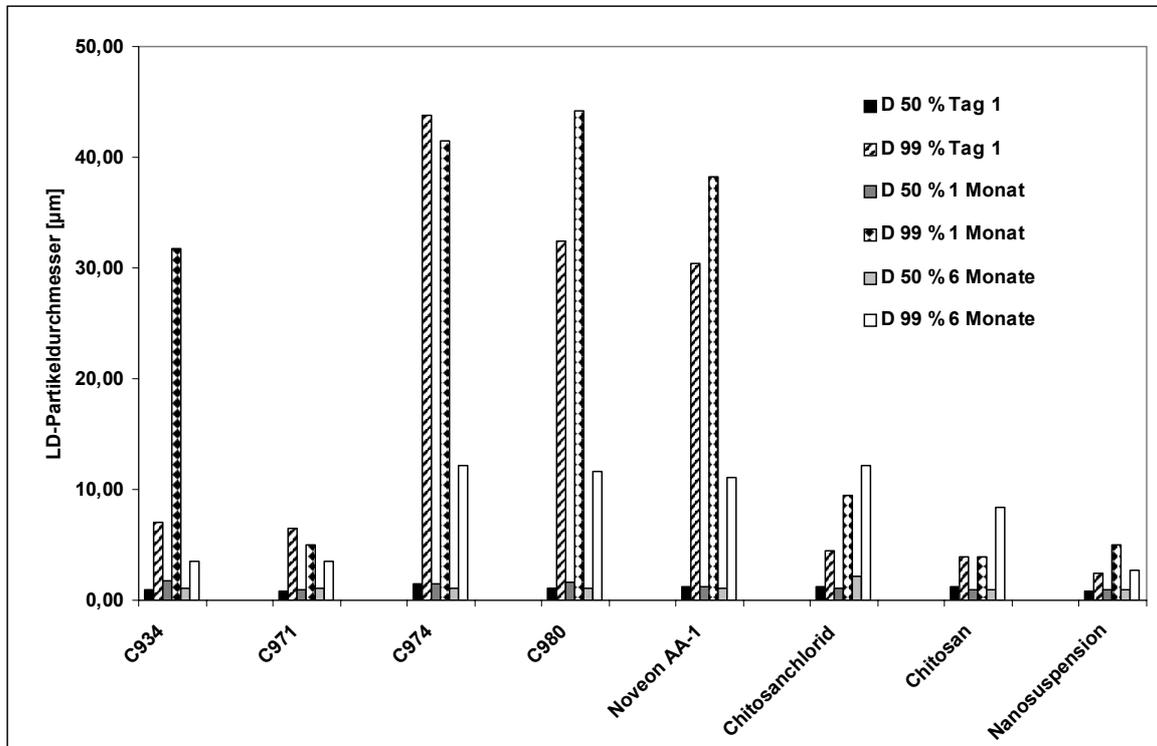


Abbildung 3-15: Partikelgrößen der untersuchten Nanosuspension-Hydrogelsysteme nach einem Tag einem Monat und einem halben Jahr Lagerung.

Wie schon in dem Abschnitt 3.1 diskutiert wurde, treten auch hier wieder große Partikeldurchmesser auf, jedoch bleibt die Hauptpopulation bei allen Proben auf dem gleichen Niveau von 0,82 bis maximal 2,10 µm.

Um die Hauptpopulation genauer zu betrachten, wurden die Proben nochmal in besonders kleinen Verdünnungsschritten verdünnt, so dass schließlich doch noch eine PCS-Messung möglich war.

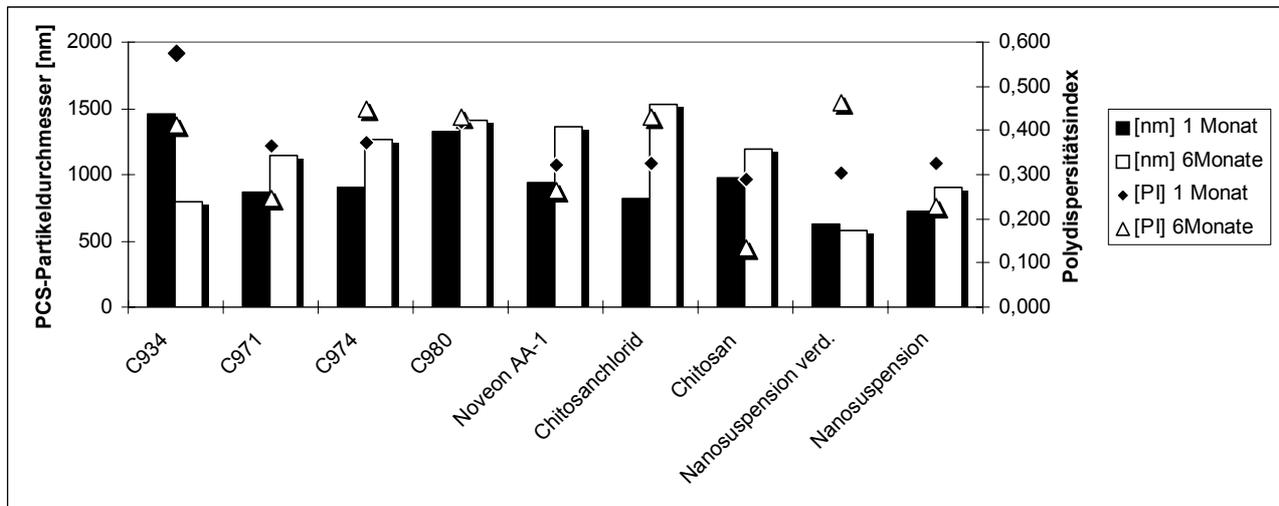


Abbildung 3-16: PCS-Daten der Nanosuspension-Hydrogelsysteme. Gezeigt werden die mittleren Partikeldurchmesser in nm, und Polydispersitätsindices nach einem und nach 6 Monaten Lagerung bei Raumtemperatur.

Anhand der stark schwankenden Werte und sehr großen Polydispersitätsindices ist erkennbar, dass noch einige Aggregate vorhanden gewesen sein müssen. Die Partikelgrößen der Nanosuspension nach Inkorporation in Hydrogele und der verdünnten Nanosuspension liegen sehr eng beisammen, wie auch die Polydispersitätsindices.

Ein Vorteil dieser Art der Formulierung (mit Hydrogelen) liegt darin, Sedimentbildung (caking) zu vermeiden. Bei den Carbopol und Noveon Formulierungen liegt es hauptsächlich an der relativ hohen Viskosität, die nach der Stokes-Gleichung kaum eine Sedimentation zulässt [siehe Tabelle 3-1].

Tabelle 3-1: Viskositäten der Hydrogele.

Polymer 0,5%ig	Viskosität [mPa*s]	Methode, Parameter
Carbopol 934	30,500-39,400*	Brookfield-Viskosimeter, bei 20 rpm, pH 7,5
Carbopol 971	4,000-11,000*	Brookfield-Viskosimeter, bei 20 rpm, pH 7,5
Carbopol 974	29,400-39,400*	Brookfield-Viskosimeter, bei 20 rpm, pH 7,5
Carbopol 980	40,000-60,000*	Brookfield-Viskosimeter, bei 20 rpm, pH 7,5
Noveon	k.A.	
Chitosanchlorid	12**	k. A.
Chitosan	465***	pH 4,0, k. A.

Produktspezifikation *BF Goodrich, ** Pronova, *** Primex

Die Viskosität von Chitosanchlorid und Chitosan ist sehr viel geringer, als die der übrigen Gele. Die gute Langzeitstabilität kann mit dem hohen Zetapotenzial erklärt werden. Die Nanopartikel in diesen beiden Dispersionsmedien lag bei über +30 mV und + 45 mV (vgl. 3.5).

Abgesehen von der schlechten Redispersierbarkeit der Nanosuspensionen sind sowohl Nanosuspension als auch Nanosuspension-Hydrogel physikalisch langzeitstabil. Da während des Untersuchungszeitraumes auch keine pH-Wert Veränderungen auftraten kann man feststellen, dass die gefundenen Formulierungen physikalisch stabil sind.

6.3.7 Lyophilisation der Formulierung BP2

Das Überführen der Nanosuspension in ein Lyophilisat hatte folgende Gründe: Zum einen bildete sich nach mehreren Monaten Lagerung ein sehr schwer aufschüttelbares Sediment bei allen drei Formulierungen. Durch die Einarbeitung in Hydrogele wurde dieses umgangen. Jedoch ist zu beachten, dass diese Formulierung nicht für alle Applikationswege geeignet ist. Eine i.v. Applikation wird zum einen aufgrund der hohen Viskosität nicht vertragen, zum anderen sind Hydrogelbilder als Hilfstoffe zur i.v. Applikation nicht zugelassen. Kann die Nanosuspension lyophilisiert werden, vermeidet man zum einen die Sedimentbildung und hat als weiteren Vorteil eine wasserfreie Formulierung gefunden, die von mikrobiellen Verfall weitestgehend geschützt ist, da in wasserfreien Umgebungen die Vermehrung eventuell vorhandener Keime unmöglich ist. Ein weiterer Grund für die Lyophilisierung war, dass für eine in-vivo-Studie verschiedene Wirkstoffkonzentrationen benötigt wurden. Wenn die Nanosuspension als Lyophilisat vorliegt, kann auf jede Konzentration verdünnt werden. Mit dem LAB 40 Homogenisator wurden bis jetzt nur Nanosuspensionen mit einem Feststoffgehalt bis 40 % erfolgreich hergestellt. Die erhaltenden Partikelgrößen und Verteilung der 40%igen

Nanosuspensionen sind mit denen der 1-10%igen Nanosuspensionen vergleichbar [Krause und Müller, 2000]. Will man höhere Konzentrationen erreichen, muss ein anderer Weg gegangen werden.

Zu dem zu lyophilisierenden Produkt werden sogenannte Kryoprotektoren gegeben. Sie werden als Strukturgeber zugesetzt, um ein Kollabieren des porösen "Lyophilisationskuchens" zu verhindern. Es sind Substanzen wie z. B. Zucker und Zuckeralkohole, wie Mannit, Sorbit, Trehalose etc. Aber auch Polyvinylalkohol (PVA) und Polyvinylpyrrolidon (PVP) können eingesetzt werden. Da die Formulierung BP2 bereits PVA als Stabilisator enthält, wurde diese ausgewählt und direkt lyophilisiert. PVA und Poloxamer 188 sind i.v. applizierbare Tenside [Marti-Mestres und Nielloud, 2000]. Somit könnte man Lyophilisate erhalten die zu i.v. applizierbaren Nanosuspensionen redispersiert werden könnten.

In sogenannten Frier-Tau Versuchen, wurde festgestellt, ob es überhaupt möglich ist, die Nanosuspension einzufrieren und wieder bei Raumtemperatur aufzutauen ohne anschließend Aggregatbildung zu erhalten. Zu Aggregatbildung könnte es dadurch kommen, dass sich die Tenside von der Partikeloberfläche während des Einfriervorgangs gelöst haben und diese später nicht wieder belegen. Im Versuch wurden die Nanosuspensionen für 6 Tage bei -70°C eingefroren und bei Raumtemperatur wieder aufgetaut. Die Partikelgröße vor und nach dem Einfrieren zeigt Abbildung 3-17 .

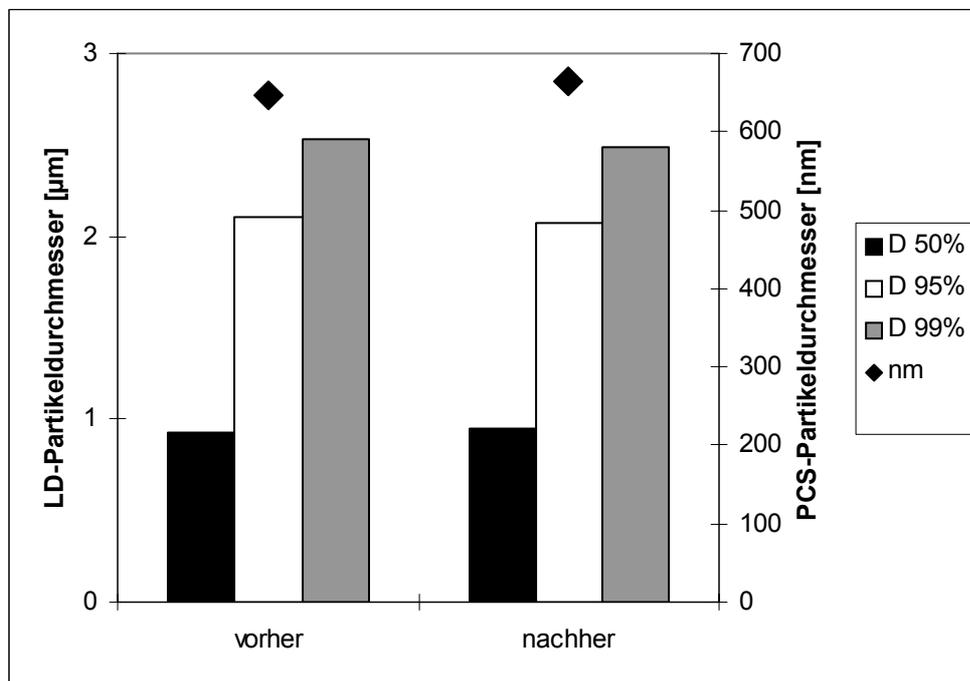


Abbildung 3-17: LD-Partikeldurchmesser D 50 %, D 95 % und D 99 % und PCS-Partikeldurchmesser vor dem Einfrieren (vorher) und nach 6 Tagen bei -70°C (nachher).

Der Einfrierprozess hatte keinen Einfluss auf die Partikelgröße, es fand keine Aggregatbildung statt, die vorher-nachher Daten von LD und PCS sind identisch. Aufgrund dieser positiv verlaufenden Vorversuche wurde die Nanosuspension in Vials mit speziellen Lyophilisationsstopfen abgefüllt und lyophilisiert.

Der Lyophilisationsprozess kann in drei Abschnitte unterteilt werden:

- Einfrieren
- Haupttrocknung
- Nachtrocknung

Es wurde ein Verfahren angewandt, das sich bereits bei anderen Nanosuspensionen bewährte [Böhm, 1999]. Die Nanosuspension wurde zunächst in einer Kühltruhe bei -70°C eingefroren und danach in die Lyophilisationsanlage gestellt. Die Haupttrocknung wurde bei -20°C 34 h lang durchgeführt, die Nachtrocknung 10 h, wobei langsam auf 20°C hochgeheizt wurde. Während des ganzen Vorganges herrschte ein Vakuum von 0,001 mbar. Die Vials wurden in der Anlage geschlossen.

Das Lyophilisat wurde anschließend zwei Tage im geschlossenen Vial bei Raumtemperatur gelagert und danach mit demineralisiertem Wasser redispersiert. Dazu wurde das Lyophilisat mit Aqua dem. in kleinen Schritten im Vial verdünnt. Zwischen den Verdünnungsschritten wurde das Vial geschüttelt. Auch nach der Lyophilisation und Redispersierung wurde keine Partikelgrößenveränderung beobachtet. Abbildung 3-18 zeigt die Ergebnisse der LD- und PCS-Analysen.

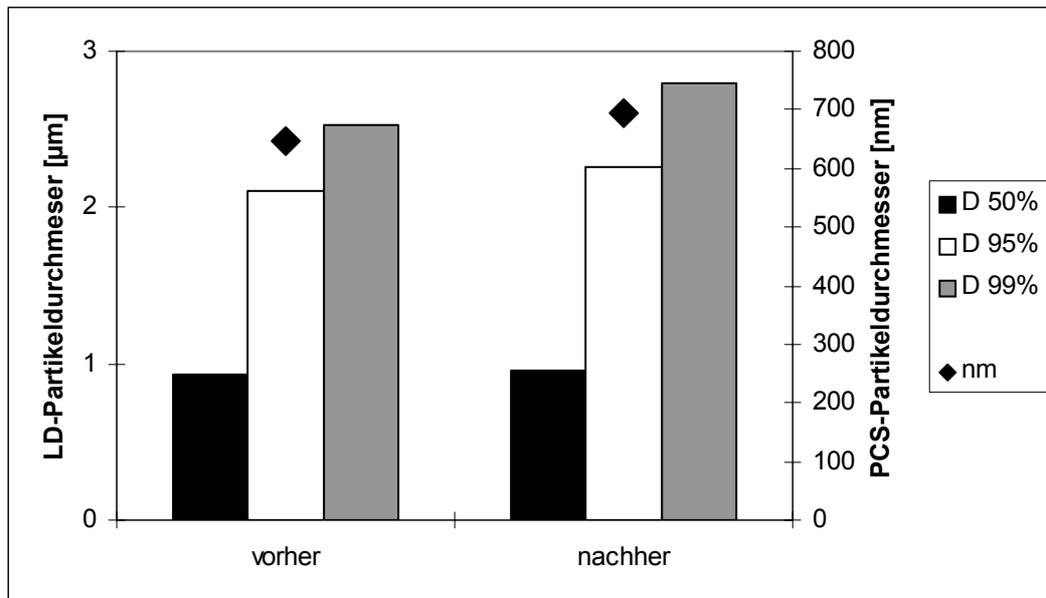


Abbildung 3-18: LD-Partikeldurchmesser D 50 %, D 95 % und D 99 % vor der Lyophilisation (vorher) und danach (nachher), dazu die PCS-Partikeldurchmesser.

Die Partikelgrößen haben sich nach dem Redispergieren mit Aqua dem. nicht wesentlich verändert.

Um festzustellen, ob die Tenside während des Lyophilisieren eventuell desorbieren und somit eine Veränderung der physikalischen Stabilität hervorgerufen wird, wurde das Zetapotenzial der Nanosuspension vor und nach dem Einfrieren und Lyophilisieren ermittelt. In Tabelle 3-1 sind die Ergebnisse dargestellt:

Tabelle 3-1: Zetapotenzial-Werte vor und nach dem Einfrieren und Lyophilisieren in verschiedenen Messmedien.

Messmedium	unbehandelt	nach dem Einfrieren	nach der Lyophilisation
Aqua dem., Leitfähigkeit 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$	$-11,7 \pm 1,0 \text{ mV}$	$-10,3 \pm 0,2 \text{ mV}$	$-9,5 \pm 0,2 \text{ mV}$
Tensidlösung Leitfähigkeit 120 $\mu\text{S}/\text{cm}$	$-1,1 \pm 0,1 \text{ mV}$	$-1,0 \pm 0 \text{ mV}$	$-1,0 \pm 0,1 \text{ mV}$

Das Zetapotenzial dieser Nanosuspensionsformulierung ist sowohl in Aqua dem. als auch in Tensidlösung sehr niedrig. Sie wird in dieser Formulierung als wässriges System nicht physikalisch langzeitstabil sein. Positiv ist, dass sich das Zetapotenzial der Suspension weder durch einfrieren bei -70°C noch durch lyophilisieren und wieder redispergieren kaum ändert. Da die Formulierung nur PVA und Pluronic F 68 als Stabilisatoren besitzt war auch kein hohes Zetapotenzial zu erwarten.

Somit ist diese Formulierung geeignet um Buparvaquon-Nanosuspension als Lyophilisat herzustellen, denn die Partikelgrößen ändern sich nicht. Um die Suspension über einen kurzen Zeitraum physikalisch stabil zu bewahren eignet sich eine Stabilisierung mit PVA.

6.3.8 Röntgenuntersuchung der Buparvaquon-Nanosuspension

Anhand der Substanzen RMBB98, RMKP22 und Azodicarbonamid konnte gezeigt werden, dass durch Hochdruckhomogenisation kristalline Stoffe amorph bzw. teilamorph werden [Böhm, 1999; Peters, 1999; Grau, 2000]. Amorphe Strukturen lösen sich sehr viel schneller auf als geordnete, also kristalline Strukturen, weil keine Gitterenergie überwunden werden. Das ist einer der Gründe warum sich Nanosuspensionen im Vergleich zu Mikrosuspensionen schneller lösen und somit eine erhöhte Bioverfügbarkeit zeigen. Ob dieses auch der Fall bei Buparvaquon sein könnte, soll anhand der Röntgendiffraktometrie untersucht werden. Die folgenden Abbildungen (3-19 und 3-20) zeigen die Röntgendiffraktogramme von Buparvaquon als Reinsubstanz und Nanosuspension.

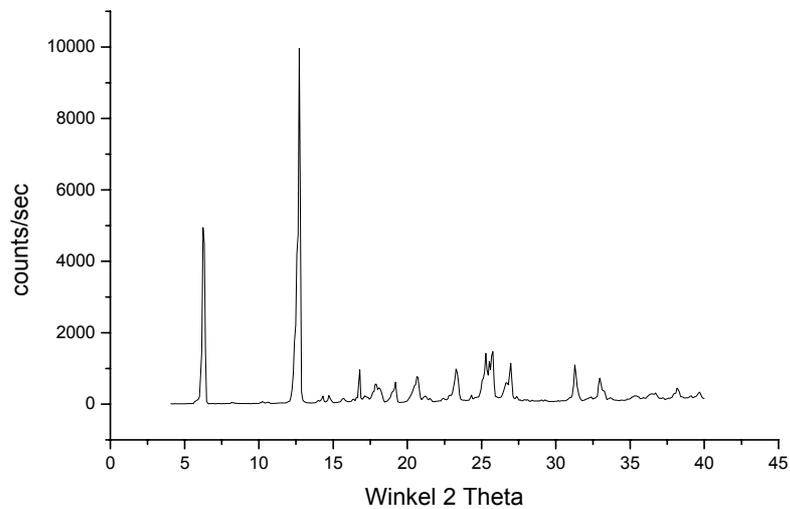


Abbildung 3-19: Röntgendiffraktogramm von Buparvaquon Substanz.

Die Untersuchungen wurden analog Abschnitt 3.7 durchgeführt. Auch hier wurde wieder die Buparvaquon-Nanosuspension eingedickt als auch eingetrocknet analysiert. Der Vergleich der beiden Röntgendiffraktogramm ist in Abbildung 3-20 dargestellt.

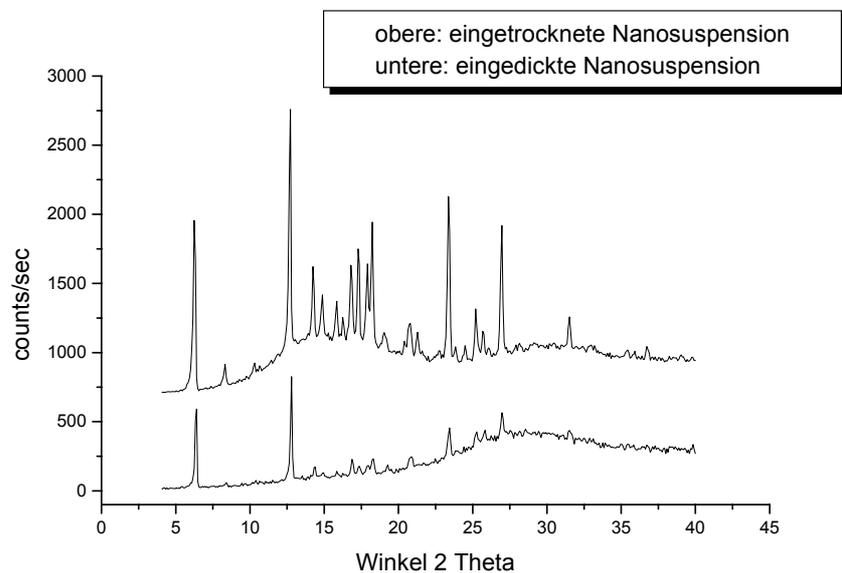


Abbildung 3-20: Röntgendiffraktogramm einer Buparvaquon-Nanosuspension, 10%ig, stabilisiert mit 0,5 % Poloxamer 188, nach 4 monatiger Lagerung. Das obere Röntgendiffraktogramm zeigt die eingetrocknete Nanosuspension, das untere die eingedickte.

In Abbildung 3-20 sind die Röntgendiffraktogramme einer eingedickten (untere) und einer eingetrockneten (obere) Buparvaquon-Nanosuspension dargestellt. (Für die obere wurden die ursprünglichen Daten mit 750 addiert, um beide Kurven übereinanderlegen zu können). Beide Kurven zeigen noch deutlich die typischen Reflexe von Buparvaquon (Abbildung 3-19). Es fällt auf, dass die Reflexe unterschiedlich stark ausgeprägt sind. Das ist auf die unterschiedliche Konzentration zurückzuführen. Die eingetrocknete Nanosuspension hat eine Konzentration von Buparvaquon nahe 100 %, die der eingedickten beträgt ca. 10 %. Das Ansteigen der unteren Kurve ab einem Winkel von 20° kann mit dem relativ hohen Wassergehalt der Probe erklärt werden. Auch bei der eingetrockneten Nanosuspension könnte das leichte Halo auf eventuell vorhandene Restfeuchte zurückgeführt werden. Bei der eingedickten Nanosuspension treten Reflexe auf, die bei der Reinsubstanz nicht erkennbar sind; diese könnten vom stabilisierenden Poloxamer stammen.

Es bleibt festzuhalten, dass die Kristallinität von Buparvaquon trotz Hochdruckhomogenisation nahezu erhalten bleibt, wie die Röntgenuntersuchungen zeigen. Es sind kaum Unterschiede in Röntgendiffraktogramm der Reinsubstanz und der Nanosuspension zu erkennen.

6.4 Zusammenfassung

Diese Studie hat gezeigt, dass es möglich ist, Buparvaquon als Nanosuspension herzustellen. Die Stabilisierung dieser Suspension kann durch verschiedene Mechanismen erreicht werden. Es ist sowohl möglich, diesen Wirkstoff sterisch als auch durch elektrostatische Abstoßung oder durch eine Kombination beider zu erhalten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich Buparvaquon auch mit sehr geringen Mengen Tensid stabilisieren lässt. Dieses Wissen ist sehr nützlich, wenn Buparvaquon für andere Applikationswege eingesetzt werden soll, z. B. als ein Inhalativum gegen *Pneumocysti carinii*.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit eine neue Formulierung mit Nanosuspensionen und Hydrogelen anhand verschiedener Parameter untersucht. Die als Hydrogel formulierten Nanosuspensionen zeigten eine bessere physikalische Langzeitstabilität als die reinen Nanosuspensionen. Mit dieser neuen Art der Formulierung von Nanosuspensionen könnte eine größere Effizienz bei der Behandlung des Protozoen-Erregers *Cryptosporidium parvum* erreicht werden, weil die Verweilzeit des Wirkstoffes am Wirkort, bzw. beim Erreger, erhöht ist.