

## 10 Zusammenfassung der Arbeit

Die Aufgabe, eine verbesserte in vitro Formulierung für Ciclosporin zu entwickeln, wurde in vier Abschnitten realisiert:

### **Abschnitt 1: Evaluierung und Validierung der Partikelgrößenanalytik**

Die Laserdiffraktometrie (LD) ist eine Methode, welche sehr häufig zur Partikelgrößencharakterisierung von Suspensionen im Nanometerbereich herangezogen wird. Im Gegensatz zu Partikeln im Mikrometerbereich muss für eine korrekte LD-Analyse der Partikelgröße die Mie-Theorie angewendet werden. Diese verlangt die Eingabe des realen und imaginären Brechungsindex in die Software des Laserdiffraktometers.

Da diese Parameter jedoch für die meisten festen Arzneistoffe nicht zur Verfügung stehen wird in der Praxis häufig mit der vereinfachten Fraunhofer-Näherung oder aber mit geschätzten Werten für die optischen Parameter gearbeitet.

Fraunhofer-Näherung ist streng genommen nur gültig für Partikel, die wesentlich größer als die Wellenlänge des eingestrahnten Laserlichtes sind (mind.  $5-6\lambda$ ). Bei einer Wellenlänge von 750 nm, wie sie z. B. im LS 230 verwendet wird, müssen demzufolge alle Partikel kleiner als  $4\ \mu\text{m}$  mittels Mie-Theorie analysiert werden. In der Praxis wird dies jedoch oft ignoriert. Wenn die Mie-Theorie zur Kalkulation herangezogen wird und die optischen Parameter nicht bekannt sind, wird häufig auf Standardwerte zurück gegriffen, welche in der Software gespeichert sind. Im Falle der Arbeitsgruppe von Prof. Müller ist dies der Standardwert 1,456 für den realen Brechungsindex und 0,01 für den imaginären Brechungsindex, welcher mittlerweile auch weltweit als allgemeiner und valider Parameter für Nanopartikel jeglicher Art zitiert wird. Jedoch handelt es sich bei diesem Parameter um die optischen Parameter einer spezifischen Fetteulsion, was häufig übersehen wird.

In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit die Resultate solcher Messungen der realen Beschaffenheit der analysierten Systeme entsprechen. Zahlreiche Simulationen von Messergebnissen, bei denen die optischen Parameter variiert wurden, wurden dafür durchgeführt. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Wahl des optischen Modells (Fraunhofer oder Mie) und der optischen Parameter (realer und imaginärer Brechungsindex) einen entscheidenden Einfluss auf das kalkulierte Ergebnis haben. Eine inkorrekte Anwendung der Fraunhofer-Näherung oder die inkorrekte Eingabe der optischen Parameter führt in den meisten Fällen zu völlig falschen und unsinnigen Analyseergebnissen.

Das LS 230, welches in dieser Arbeit verwendet wurde, besitzt eine zusätzliche Technik (PIDS) zur Erweiterung des Messbereichs und für eine hoch sensitive Auflösung von Partikelgrößen im Submicronbereich (40-400nm). Diese zusätzliche Technik wird in Kombination mit der Laserbeugungsanalyse verwendet, wenn Partikel im Nanometerbereich charakterisiert werden sollen. Da es sich jedoch um zwei verschiedene Messtechniken handelt, kann das erhaltene Ergebnis nicht als reines Lichtbeugungsergebnis betrachtet werden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die kombinierte Messung von Lichtbeugung und PIDS zur Überbewertung von Submikronpartikeln führt, was in der Praxis bedeutet, dass Partikelpopulationen  $>5\mu\text{m}$  sehr häufig nicht vom Messgerät detektiert werden, wenn gleichzeitig eine kleine Hauptpopulation vorhanden ist. Dieser Fakt ist von großer Bedeutung, da die Laserdiffraktometrie insbesondere für die Detektion von größeren Partikeln, die neben einer kleinen Hauptpopulation auftreten können (z. B. koaleszierte Öltröpfen oder Arzneistoffkristalle), eingesetzt wird. Die Laserdiffraktometrie wird genutzt um Instabilitäten, die z. B. durch eine ungeeignete Wahl des Stabilisators im Fall von Nanosuspensionen oder eines ungeeigneten Lipids im Fall von Lipidpartikeln auftreten können, aufzudecken. Das Ergebnis dieser Arbeit war, dass dies nicht möglich ist, wenn die zusätzliche PIDS-Technologie von Beckman-Coulter mit in die Lichtbeugungsmessung einbezogen wird. Um sicherzustellen, dass große Partikel detektiert werden können, müssen Messungen ohne PIDS durchgeführt werden.

Eine simple aber aussagekräftige Methode zur Detektion von großen Partikeln neben einer kleinen Hauptpopulation ist die Lichtmikroskopie. Diese wird in der Praxis häufig „vergessen“. Der Trend geht eindeutig hin zu hoch anspruchsvollen und teuren Messmethoden, da wahrscheinlich angenommen wird, dass die Aussagekraft des Ergebnisses je besser ist, je teurer und komplizierter die Messmethode ist. Jedoch ist es so, dass gerade weil die Methode so komplex ist, Fehler oft nicht erkannt werden, d. h. die meisten Benutzer vertrauen blind auf ein Messergebnis, welches vom Gerät berechnet wurde, weil sie es zwar bedienen können aber die Methode an sich nicht verstehen.

Daher ist die Lichtmikroskopie optimal als zusätzliche Methode zur Charakterisierung von Systemen geeignet, da man das Ergebnis sozusagen mit eigenen Augen sieht und bewerten kann. Agglomerate oder größere Arzneistoffkristalle können mit dieser Methode leicht detektiert und somit die Sinnhaftigkeit der LD-Analytik überprüft werden.

Im Weiteren wurde gezeigt, dass der reale Brechungsindex von Nanosuspensionen und Lipidpartikeln mittels der Bestimmung des Brechungsinkrementes ( $dn/dc$ ) kalkuliert werden kann. Da sehr geringe Unterschiede gemessen werden, ist es notwendig, ein hoch auflösendes

Gerät zu verwenden (z. B. auf 6 Kommastellen genau). Ein normales manuelles Abbè-Refraktometer mit einer Genauigkeit von  $\pm 0,0002$  ist daher für diese Methode nicht geeignet. Eine weitere, jedoch sehr aufwendige Möglichkeit zur Bestimmung des realen Brechungsindex ist die Beobachtung der Becke-Linie. Diese Methode liefert aber nur sehr ungenaue Ergebnisse.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass im ersten Teil dieser Arbeit die Partikelgrößencharakterisierung mittels Laserdiffraktometrie optimiert wurde. Um akkurate und richtige Ergebnisse zu gewährleisten, wurde eine Methode zur Bestimmung des realen Brechungsindex etabliert.

Diese Arbeiten waren die Voraussetzung für die Entwicklung einer in vitro verbesserten Ciclosporin-Nanosuspension.

Darüber hinaus stellt die hier etablierte optimierte Partikelgrößencharakterisierung einen wichtigen Schritt in eine akkuratere und aussagekräftigere Lichtbeugungsanalyse dar, nicht nur für unseren Arbeitskreis, sondern auch für andere Arbeitsgruppen weltweit.

### **Abschnitt 2:**

#### **Evaluierung der herkömmlichen und derzeit etablierten Screening-Methode zur Identifizierung geeigneter Stabilisatoren für Nanosuspensionen**

Die derzeit Anwendung findende Methode zur Identifizierung eines optimalen Stabilisatorgemisches für eine spezifische Arzneistoffnanosuspension wird durchgeführt indem verschiedene konzentrierte Stabilisatorlösungen zu einer im voraus hergestellten Stamm-Nanosuspension hinzugegeben werden. Die Stamm-Nanosuspension wird aufgeteilt und jeder erhaltene Teil mit Stabilisatorlösung verdünnt (z. B. 2 ml Stammsuspension und 2 ml Stabilisatorlösung). Diese Methode scheint sehr rationell, da aus nur einer Nanosuspension bis zu 20 Suspensionen mit unterschiedlichen Stabilisatormischungen erhalten werden, die dann weiteren Charakterisierungen unterzogen werden können (z.B. Zetapotentialmessungen, Stabilitätsuntersuchungen, etc.).

In dieser Arbeit wurden Ciclosporin-Nanosuspensionen nach der etablierten Methode - wie oben beschrieben - hergestellt und charakterisiert. Um zu prüfen, ob das Verdünnen der Originalsuspension mit einer Stabilisatorlösung einen Einfluss auf das gesamte System hat, wurden im Vergleich dazu dieselben Formulierungen nochmals hergestellt. Bei diesen Suspensionen erfolgte die Zugabe der Stabilisatorlösung nicht nach, sondern vor der Homogenisation, die Suspensionen wurden also nicht nachträglich verdünnt.

Die vergleichenden Stabilitätsuntersuchungen der Nanosuspensionen zeigten, dass die nicht verdünnten und separat hergestellten Suspensionen eindeutig eine bessere Stabilität aufwiesen

als die Suspensionen, die nach dem Homogenisieren verdünnt worden waren. Im Allgemeinen waren die Partikelgrößen der separat homogenisierten Nanosuspensionen kleiner, und im Vergleich zu den verdünnten Suspensionen zeigte sich wesentlich weniger Kristallwachstum über den Zeitraum der Beobachtung.

Es konnte somit gezeigt werden, dass ein Stabilisator-Screening, wie es bisher durchgeführt wurde, nicht optimal geeignet ist, um einen optimalen Stabilisator für den jeweiligen Arzneistoff zu identifizieren. Es wurde bisher ignoriert, dass jegliche Verdünnung von Nanosuspensionen zum Auflösen der Nanokristalle führt, wobei sich die kleinsten Partikel im System aufgrund ihrer höheren Sättigungslöslichkeit und Lösungsgeschwindigkeit zuerst auflösen. Zurück bleibt ein System mit weniger aber größeren Partikeln. Es konnte gezeigt werden, dass in solchen verdünnten Suspensionen das Entstehen von sehr großen Arzneistoffpartikeln begünstigt ist, da die Menge an gelöstem Arzneistoff (ehemals Nanokristalle mit hoher Sättigungslöslichkeit) für die verbliebenen größeren Kristalle mit geringerer Sättigungslöslichkeit zu hoch ist. In der Folge kommt es zum Ausfällen des gelösten Arzneistoffes und zum Entstehen der großen Kristalle.

Diese Effekte sind auf das Verändern des Gleichgewichtes in der Nanosuspension zwischen gelöstem und ungelöstem Arzneistoff zurückzuführen. Es ist daher möglich das Gleichgewicht wieder herzustellen, indem eine verdünnte Suspension erneut homogenisiert wird, wobei mindestens 10 erneute Zyklen bei 1500 bar durchgeführt werden müssen. Es ist also keine Arbeits- und Zeitersparnis zuerst eine Stamm-Nanosuspension herzustellen, diese dann aufzuteilen, mit Stabilisatorlösung zu verdünnen und dann jede erhaltene Suspension erneut für 10 Zyklen bei 1500 bar zu homogenisieren.

Das Ergebnis dieser Studie ist daher, dass die bisher im Arbeitskreis etablierte Methode zur Identifizierung eines optimalen Stabilisators ungeeignet war. Die existierende „Standard Operation Procedure“ (SOP) wurde daher umgeschrieben.

### **Abschnitt 3: Einführung eines neuen Konzepts für eine verbesserte Ciclosporin-Nanosuspension zur oralen Applikation**

Die Ciclosporin Nanosuspension, welche bereits 1996 von Runge entwickelt wurde, zeigte in in vivo Studien eine extrem schlechte Bioverfügbarkeit. In dieser Zeit war die Bedeutung der Efflux-Transporter, wie z. B. P-Glykoprotein noch fast unbeachtet. Da Ciclosporin ein Substrat für P-Glykoprotein ist, wurde ein neues Konzept entwickelt, welches anstrebte, geeignete Stabilisatoren für Ciclosporin zu identifizieren, die gleichzeitig auch in der Lage

sind, P-Glykoprotein zu inhibieren und somit die orale Bioverfügbarkeit für Ciclosporin erhöhen könnten.

Auch in diesem Teil der Arbeit lag das Hauptwesensmerkmal in der kritischen Betrachtung der bisher etablierten Methoden und der Anwendbarkeit dieser für die hier untersuchten Ciclosporin-Nanosuspensionen. Die Herstellung von Nanosuspensionen mittels Hochdruckhomogenisation wird normalerweise ohne Temperaturkontrolle durchgeführt, so dass es während der Homogenisation zu einem erheblichen Temperaturanstieg kommt, wobei leicht Werte über 60°C erreicht werden. In dieser Arbeit wurden Ciclosporin Nanosuspensionen mit und ohne Temperaturkontrolle hergestellt. Die Ergebnisse belegen eindeutig, dass es bei Produktionstemperaturen >30°C zu Agglomeratbildung und Rekristallisationseffekten innerhalb der Suspension kommt. Der beobachtete Effekt wird mit einer abnehmenden Löslichkeit erklärt, wie sie für Ciclosporin beschrieben ist. Die beobachteten Effekte konnten nur mit der optimierten Partikelgrößencharakterisierung erkannt werden. Es kann daher festgestellt werden, dass die Produktionsmethode für die von Runge hergestellten Ciclosporin-Nanosuspensionen nicht geeignet war und dass die damals schlechte Bioverfügbarkeit eventuell durch Agglomerate (die mit der konventionellen Partikelanalytik nicht nachweisbar waren) und einer damit drastisch verschlechterten Lösungsgeschwindigkeit erklärt werden kann.

Im Folgenden wurden Ciclosporin-Nanosuspensionen untersucht, die mittels der optimierten Produktionsparameter hergestellt wurden (keine Verdünnung, Produktionstemperatur unter 30°C) und nur Stabilisatoren enthielten, die gleichzeitig P-Glykoprotein inhibieren,.

Als bester Stabilisator wurde TPGS, ein potenter P-Glykoproteininhibitor identifiziert. Ciclosporin-Nanosuspensionen, stabilisiert mit TPGS, sind physikalisch stabil und haben die Fähigkeit, P-Glykoprotein zu hemmen. Sie stellen daher eine vielversprechende Formulierung zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit von oral appliziertem Ciclosporin dar.

Auch die Ergebnisse dieser Studie konnten nur mit der optimierten Partikelanalytik erzielt werden. Die Messungen und Auswertungen mittels der alten Partikelmessmethode gaben ein völlig anderes und falsches Ergebnis. In der Studie wurden insgesamt 80 Ciclosporin-Nanosuspensionen untersucht. Mit der neuen Messmethodik konnten nur 5 stabile Nanosuspensionen identifiziert werden. Mit der alten Messmethode wurden 80 von 80 Nanosuspensionen als stabil analysiert. Dieses Ergebnis beweist das Ausmaß und die Fehlinterpretationen, die durch falsche Lichtstreuungsmessungen auftreten und aufgetreten sind.

**Abschnitt 4:**  
**Alternative Formulierungen für Ciclosporin**

Auch wenn die Kernforschungsgebiete der Arbeitsgruppe Nanosuspensionen, Solid Lipid Nanopartikel (SLN) und Nanostrukturierte Lipid Carrier (NLC) sind, darf nicht vergessen werden, dass Delivery-Systeme verschieden von den oben genannten unter Umständen für spezifische Arzneistoffe besser geeignet sind.

Für Ciclosporin wird berichtet, dass für eine gute Bioverfügbarkeit eine lipophile Komponente parallel zum Arzneistoff am Ort der Resorption vorhanden sein muss, welche offensichtlich in Nanosuspensionen nicht vorhanden ist.

Aus diesem Grunde wurden Möglichkeiten erwogen, Ciclosporin in einer alternativen Formulierung mit einer lipophilen Phase zu entwickeln. Auch hier wurde Augenmerk auf den Zusatz von P-Glykoproteinhemmern gelegt. Als Alternative kamen selbstemulgierende Systeme in Betracht (Self-emulsifying drug delivery systems = SEDDS). Solche Systeme sind in der Literatur bereits beschrieben, jedoch wurde in den Systemen, die hier entwickelt wurden, Pfefferminzöl als lipophile Phase verwendet. SEDDS mit Pfefferminzöl, welches ebenfalls P-Glykoprotein hemmen kann, sind in der Literatur noch nicht beschrieben worden. Die Entwicklung pfefferminzöhlhaltiger SEDDS ohne Ciclosporin war erfolgreich, jedoch konnten keine befriedigenden Ergebnisse erzielt werden, wenn Ciclosporin in der Formulierung enthalten war. Die SEDDS mit Ciclosporin weisen eine nicht akzeptable Tropfengröße von über 500 nm auf und sind daher wahrscheinlich zu groß, um die Bioverfügbarkeit von Ciclosporin zu erhöhen.

Ein weiterer Ansatzpunkt für die Formulierung von Ciclosporin war die Entwicklung einer emulgatorfreien Formulierung, da in der Literatur berichtet wird, dass Emulgatoren, die in Konzentrationen oberhalb ihrer kritischen Mizellbildungskonzentration eingesetzt werden, die Resorption von Arzneistoffen verhindern können.

Entwickelt wurde eine physikalisch stabile Formulierung basierend auf Ciclosporin gelöst in Pfefferminzöl: Diese Lösung wurde in Aeroperls 300 absorbiert und ergibt ein frei fließendes Pulver (Cycloperls), welches leicht weiterverarbeitet werden kann (z. B. Tablettierung, Kapseln).

Obwohl Cycloperls keinen Emulgator besitzen, wird die Ciclosporin/Pfefferminzöllösung schnell und in sehr feinen Tröpfchen aus den Aeroperls freigesetzt, wenn diese in Wasser dispergiert werden. Aus diesem Grund werden die entwickelten Cycloperls als eine interessante Formulierung zur Testung in in vivo Studien bewertet.

### **Zusammenfassend kann somit festgestellt werden:**

In dieser Arbeit wurde die Partikelgrößencharakterisierung mittels Laserdiffraktometrie optimiert. Mit dieser optimierten Methodik ist es möglich, Partikelgrößen und Partikelgrößenverteilungen von Nanosuspensionen genauer und vor allem korrekt zu bestimmen. Nur mit Anwendung dieser hier etablierten Methode kann ein aussagekräftiges Ergebnis bei der Charakterisierung von Nanosuspensionen erzielt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die herkömmliche Screening-Methode zur Identifizierung optimaler Stabilisatoren für Nanosuspensionen einige bisher nicht beachtete Fehlerquellen beinhaltet, die zu Artefakten führen können. Die Screening-Methode wurde dahingehend verbessert.

Eine neue Generation von Nanokristallen wurde am Beispiel von Ciclosporin entwickelt, die SmartCrystal<sup>®</sup> Technologie. Diese Technologie beinhaltet die Vorteile einer Nanosuspension sowie die Fähigkeit, P-Glykoprotein zu hemmen.

Eine weitere Formulierung mit Ciclosporin und zusätzlichen inhibitorischen Eigenschaften wurde mit den Cycloperls realisiert. Cycloperls bestehen nur aus Ciclosporin gelöst in Pfefferminzöl, absorbiert in Aeroperls. Sie enthalten keinen Emulgator.

In dieser Arbeit konnten somit zwei alternative Ciclosporin-Formulierungen entwickelt werden – SmartCrystals<sup>®</sup> und Cycloperls –: zwei stabile Formulierungen, die theoretisch eine erhöhte orale Bioverfügbarkeit aufweisen, was nun in in vivo Studien getestet werden sollte.

