4 Flüssige Lipiddispersionen

Da in vorangegangenen Arbeiten zahlreicher Arbeitsgruppen die Eigenschaften flüssiger Lipiddispersionen im Nanometerbereich bereits ausgiebig charakterisiert wurden, soll an dieser Stelle hauptsächlich vergleichend auf die Langzeitstabilität, das Trocknungsverhalten, den Wirkstoffeinschluß und die Wirkstofffreisetzung von SLN und NLC eingegangen werden.
Es wurde zunächst untersucht, ob die polymorphe Transformation des verwendeten festen Lipids über einen längeren Zeitraum verhindert oder zumindest verzögert werden kann und ob dadurch eine schnellere Arzneistoffverdrängung vermieden wird. Es stellte sich außerdem die Frage, ob die von Jenning für Retinol-NLC beschriebene Erhöhung der Beladungskapazität [21] und der postulierte Zusammenhang zwischen Trocknungsverhalten und Arzneistofffreisetzung [13] auf das Cyclosporin-System und somit generell auf andere Systeme übertragen werden können.

4.1 SLN-Dispersionen: Verwendung nur einer Lipidkomponente

Als modellhafte SLN-Formulierung wurde im Rahmen dieser Arbeit auf die von Runge entwickelte Cyclosporin-Rezeptur zurückgegriffen [27]. Nach ausgiebigem Lipidscreening hatte sich Imwitor 900 als das am besten geeignete Lipid für eine hohe Cyclosporin-Beladung herausgestellt. Es gelang Runge, SLN mit einer Beladung von 25 % bezogen auf den Lipidanteil herzustellen. Die von ihm für eine orale Tierstudie verwendete Formulierung setzte sich folgendermaßen zusammen:

Cyclosporin	Imwitor 900	Tagat S	Natriumcholat	Wasser
2 %	8 %	2,5 %	0,5 %	ad 100 %

Ein großer Nachteil dieser Formulierung ist jedoch ihre mangelnde physikalische Langzeitstabilität. Innerhalb weniger Wochen kommt es zu Partikelaggregation, polymorphen Lipidtransformationen und Auskristallisieren von Arzneistoff am Boden des Vials.
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde anhand dieser und einer entsprechenden Rezeptur mit 20 % Lipidanteil (s. u.) sowie anhand der arzneistofffreien Systeme untersucht, ob durch Variation der Abfüll- und Lagerkonditionen eine Verzögerung der beschriebenen Prozesse erreicht werden kann.

4.1.1 Charakterisierung reiner Imwitor 900 Dispersionen

Die ausgiebige Charakterisierung der arzneistofffreien Formulierung mit 10 % Lipidanteil kann bei Runge nachgelesen werden [27]. Seine Ergebnisse in Bezug auf Partikelgröße und Kristallstruktur konnten reproduziert werden. Nach Herstellung liegen Imwitor-SLN hauptsächlich in einer α-Modifikation vor, der mittlere PCS-Durchmesser liegt bei ca. 140 nm.

4.1.2 Vergleich einer 10 und 20 %igen Dispersion

Da die Lipiddispersionen für die entsprechenden topischen Formulierungen einen möglichst hohen Cyclosporingehalt aufweisen sollten (mind. 2,5 %), wurde zusätzlich eine Dispersion mit 20 % Lipidgehalt entwickelt.
In einem ersten Formulierungsschritt wurde nur der Imwitorgehalt von 10 % auf 20 % erhöht, was jedoch zu einem vermehrten Auftreten von Mikropartikeln und schneller Gelbildung führte. Deshalb wurden auch die Tensidkonzentrationen entsprechend verdoppelt, wodurch eine fast identische Partikelgrößenverteilung erzielt werden konnte. Tabelle 4-1 zeigt die Partikelgrößen nach Herstellung im Vergleich.
Die Kristallstruktur beider Systeme wurde mit Hilfe von DSC und WAXS-Messungen vergleichend untersucht. Dabei fiel vor allem der starke Einfluß der Tensidkonzentration auf die short spacings, d. h. auf die Seitenkettenkristallinität der Fettsäuren, auf.
Abbildung 4-1 zeigt die große Ähnlichkeit der Streumuster der 10 %igen Formulierung mit denen der 20 %igen mit erhöhter Tensidkonzentration. Der für die α-Modifikation charakteristische Hauptreflex bei einem Netzebenenabstand von d = 0,413 ist deutlich zu erkennen. Die Reflexintensität ist jedoch durch Erhöhung der Lipidkonzentration nicht entsprechend gestiegen. Die Seitenkettenkristallinität scheint also durch den höheren Emulgatoreinsatz quantitativ eher abzunehmen.

Tabelle 4-1: Mittelwerte von PCS-Partikeldurchmesser und PI sowie Mittelwerte der LD-Größenbestimmungen mit den jeweiligen Standardabweichungen von 10 %igen (n = 3) und 20 %igen (n = 6) Imwitor 900-SLN an Tag 1

	PCS		Laserdiffraktometrie [µm ± S]		
	mittl. Ø [nm ± S]	PI ± S	LD 50	LD 90	LD 95
10 %	136,2 ± 18,24	0,24 ± 0,03	0,09 ± 0,001	0,15 ± 0,011	0,18 ± 0,025
20 %	123,5 ± 5,93	0,22 ± 0,01	0,09 ± 0,004	0,15 ± 0,009	0,18 ± 0,010

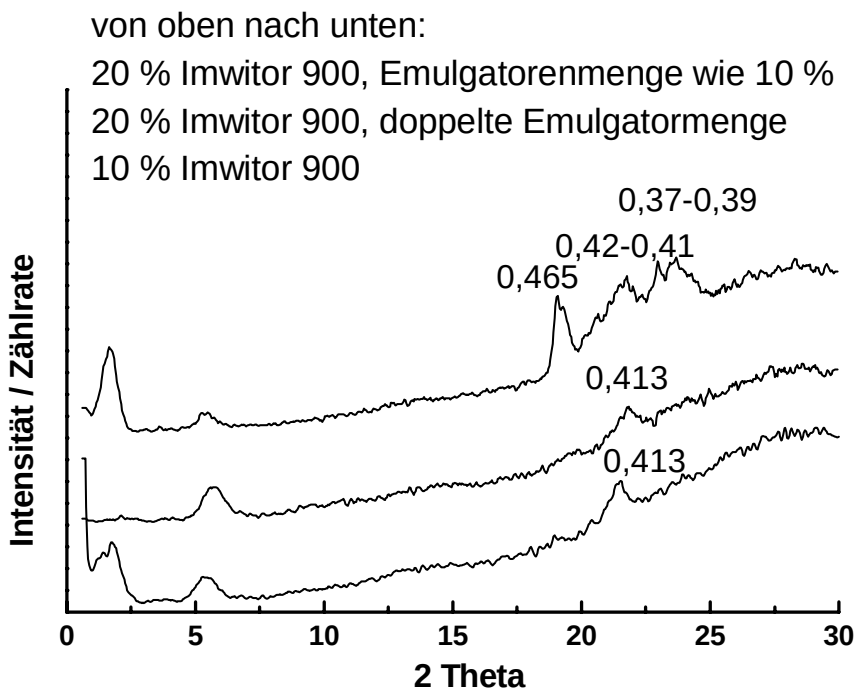


Abbildung 4-1: Vergleich der Streumuster von Imwitor-SLN mit unterschiedlicher Konzentration an Lipid und / oder Tensid, die Zahlen geben die Netzebenenabstände (d) der short spacings an

Die Detailmessungen im Bereich von 2 Theta = 15° bis 25° (Abbildung 4-2) zeigen für beide Formulierungen einen zusätzlichen schwachen Reflex bei d = 0,46 (Pfeil), was auf einen geringen Anteil der höher geordneten β_i-Modifikation hinweist.

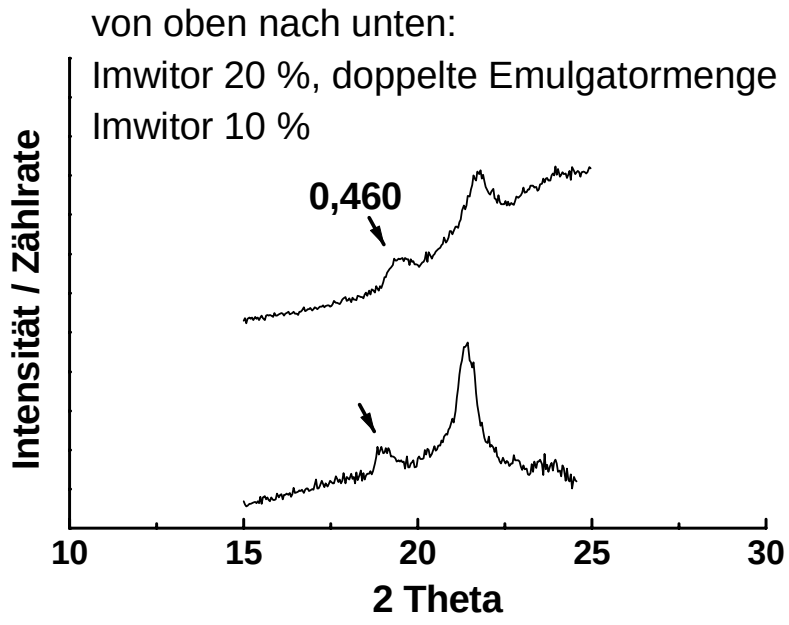


Abbildung 4-2 Detailmessungen der Weitwinkelreflexe einer 10- und 20 %igen SLN-Formulierung mit Kennzeichnung des Reflexes bei einem Netzebenenabstand von d = 0,46 nm

Vergleicht man die 10 %ige Formulierung mit der 20 %igen gleicher Tensidkonzentration kann man bei 20 % eine deutliche Zunahme der Reflexintensität im Weitwinkelbereich sowie das Auftreten von Reflexen typisch für die β_i-Modifikation von Mischglyceriden erkennen. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Ordnung der Fettsäureketten in hohem Maße durch die Emulgatorkonzentration beeinflußt ist. Hinzuweisen ist an dieser Stelle auch auf die starke chemische Ähnlichkeit des verwendeten Emulgators Tagat S, einem polyethoxylierten Glycerolmonostearat, mit dem eingesetzten Lipid. Eine Interaktion der Fettsäureseitenketten von Tensid und Lipid ist dementsprechend zu erwarten und erklärt eventuell die Abnahme der Seitenkettenkristallinität bei erhöhter Emulgatormenge. Tabelle 4-2 zeigt deutlich, daß das Peakmaximum der tensidärmeren Formulierung entsprechend ihrer geordneteren Modifikation höher liegt als bei der tensidreicheren, daß aber die Schmelzenthalpie nur in geringem Maß zunimmt. Eine Erhöhung der Tensidmenge führt hier also nur zu einer Veränderung der Kristallmodifikation mit größerer Beweglichkeit der Fettsäureseitenketten nicht aber zu einer Abnahme der Gesamtkristallinität. Der Kristallinitätsgrad wurde dabei berechnet auf die Schmelzenthalpie der 2. Aufheizkurve des Bulkmaterials, um den Einfluß des Schmelzprozesses während der Herstellung nicht zu vernachlässigen.
Festgehalten werden muß in diesem Zusammenhang, daß zum Einfluß der Emulgatorkonzentration auf die Kristallinität von SLN keine generellen Aussagen gemacht werden können, da u. a. die chemische Struktur des Emulgators sowie die Art des Lipids einen entscheidenden Einfluß haben [63]. Eine durch Tenside verursachte, verminderte Rekristallisation ist in der Literatur durchaus bekannt [41, 64] und konnte auch im Rahmen dieser Arbeit vor allem bei den hochkonzentrierten Formulierungen beobachtet werden.

Tabelle 4-2: Thermoanalytischer Vergleich der 1. und 2. Aufheizkurve von Imwitor 900-Bulkmaterial mit SLN unterschiedlicher Lipidkonzentration und / oder Tensidkonzentration

	Imwitor Bulk 1. Aufheizen	Imwitor Bulk 2. Aufheizen	Imwitor-SLN 10 %	Imwitor-SLN 20 % (Tensid wie 10%)	Imwitor-SLN 20 % (doppelte Tensidmenge)
Onset	57,2 °C	53,9 °C	53,8 °C	57,4 °C	53,5 °C
Peakmaximum	61,1 °C	59,1 °C	57,9 °C	59,7 °C	58,2 °C
Peakenthalpie (Kristallinitätsgrad)	161 J/g	121 J/g	12,2 J/g (101 %)	25,8 J/g (107 %)	24,9 J/g (103 %)

4.1.3 Inkorporation von Cyclosporin A

Runge postuliert in seiner Arbeit, daß die einzelnen Cyclosporin-Moleküle trotz ihrer Größe zwischen den Fettsäureketten im Innern der SLN-Partikel lokalisiert sind. Er stützt sich dabei auf die von ihm ermittelte Langperiode der Lipidkristalle von 54,6 Å und die Kristalldaten von Hassan und Al-Yahya [163], die für Cyclosporin A eine quaderförmige Molekülgröße von a = b ≅ 8,7 Å und c ≅ 26,1 Å errechnen konnten. Die Löslichkeit von Cyclosporin in der verwendeten Tensidmischung beträgt laut Runge lediglich 2,2 mg / mL, das entspricht ca. 10 % der eingearbeiteten Substanz berechnet auf die 10 %ige SLN-Formulierung. Die für Cyclosporin charakteristischen Streureflexe konnten nach Herstellung der SLN nicht mehr detektiert werden. Die Bildung einer anderen Cyclosporin-Modifikation während des Herstellungsprozesses schloß er aus, nachdem einstündiges Tempern der Substanz bei 85 °C keine Veränderung des Streumusters ergab.
Auch im Rahmen dieser Arbeit konnten Imwitor-SLN mit 20 % Cyclosporin bezogen auf das Lipid beladen werden. Der Lipidgehalt betrug hier sowohl 10 % analog oben zitierter Rezeptur von Runge, als auch 20 % mit doppelter Konzentration von Tensid und Co-Tensid.
Um abzusichern, daß nicht alleine durch den Energieeintrag während des Herstellungsprozesses mehr Substanz im verwendeten Tensidgemisch solubilisiert wird, wurden 2 % Arzneistoff in einer heißen Tensidlösung analog der SLN-Herstellung homogenisiert. Dies führte jedoch zu keiner Verbesserung der Löslichkeit. Die Arzneistoffkristalle konnten bereits makroskopisch eindeutig detektiert werden. Folglich wird der Arzneistoff maßgeblich von den Imwitor-Glyceriden am Auskristallisieren gehindert.
Dies ist dadurch erklärbar, daß die Löslichkeit von Cyclosporin A in Mono- und Diglyceriden besonders hoch ist [164]. Imwitor 900 besteht zu knapp 90 % aus Mono- und Diglyceriden der Palmitin- und Stearinsäure. Zwar übersteigt die Löslichkeit des Arzneistoffs in kürzerkettigen Monoglyceriden (C8 = 550 mg / mL) deutlich die in längerkettigen, sie liegt jedoch im verwendeten Imwitor-Glyceridgemisch bei über 200 mg / mL, d. h. über der gewählten Beladungskonzentration. Zur Bestimmung der Löslichkeit wurde der Arzneistoff zunächst im geschmolzenen Lipid gelöst und die erhaltene Lösung nach vollständigem Erkalten polarisationsmikroskopisch auf Arzneistoffkristalle untersucht (s. auch Kapitel 4.2).

Um weiter abzusichern, daß die Detektion von Cyclosporin-Kristallen in SLN-Formulierungen durch Röntgenmessungen mit dem vorhandenen Diffraktometer möglich ist, wurde eine 20 %ige Cyclosporin-Lösung in Octyldodecanol durch Erhitzen auf 85 °C hergestellt. Bei Abkühlung auf Raumtemperatur kristallisierte der Arzneistoff aufgrund von Übersättigung wieder aus.

Diese Suspension wurde röntgendiffraktometrisch vermessen. Abbildung 4-3 zeigt die Streumuster des Cyclosporin-Ausgangsmaterials und der auskristallisierten Suspension. Man erkennt deutliche Unterschiede, die darauf hinweisen, daß aus Octyldodecanol kristallisierendes Cyclosporin A eine andere Kristallstruktur aufweist als die ursprüngliche Substanz, so daß die zuvor zitierten Molekülgrößen des Arzneistoffes nicht ohne Weiteres herangezogen werden können. In der Literatur wurde die Existenz mehrerer Konformationen des Cyclosporin A-Moleküls jedoch bereits beschrieben [165].
Übereinstimmende Reflexe finden sich bei 2 Theta ≅ 15° und 17° (s. Pfeile). Da in diesem Bereich keine Lipidreflexe liegen, können sie zur Detektion herangezogen werden. Zu beachten ist allerdings die untere Detektionsgrenze des Röntgengerätes, die für kristalline Substanzen bei ca. 2 % liegt. Dies entspricht der Gesamtmenge an Cyclosporin in der 10 %igen Formulierung. Aus nicht vorhandenen Reflexen darf also nicht auf Abwesenheit von Cyclosporin-Kristallen geschlossen werden.

Zur Detektion von Kristallen erwies sich die Polarisationsmikroskopie als wesentlich geeigneter und wurde aus diesem Grund auch hauptsächlich genutzt. In den frisch hergestellten Formulierungen konnten keine Cyclosporin-Kristalle detektiert werden.

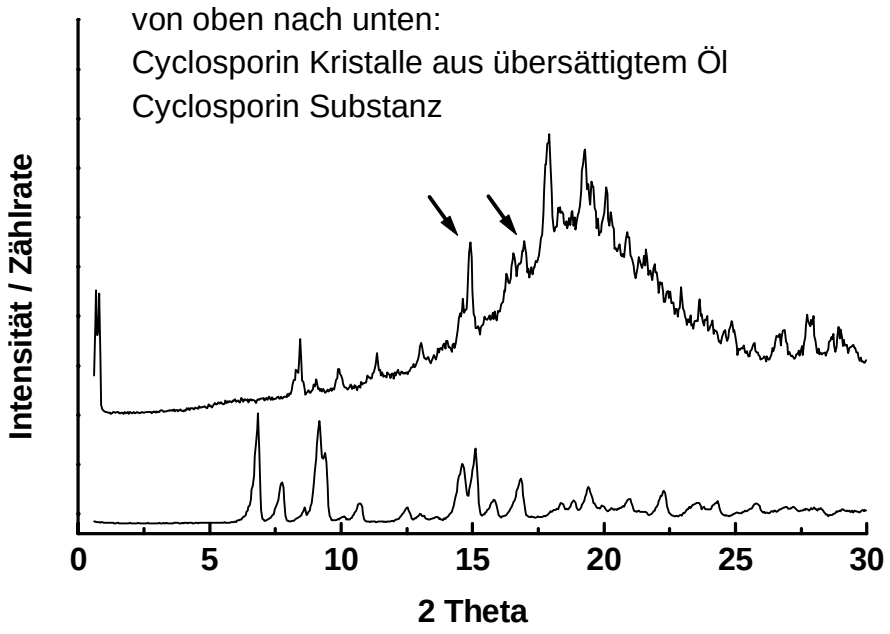


Abbildung 4-3: Röntgenstreumuster von Cyclosporin A-Kristallen aus übersättigter Octyldodecanol-Lösung (oben) im Vergleich zum Ausgangsmaterial

Tabelle 4-3: Mittelwerte von PCS-Partikeldurchmesser und PI sowie Mittelwerte der LD-Größenbestimmungen mit den jeweiligen Standardabweichungen von 10 %igen und 20 %igen Cycloporin-Imwitor 900-SLN gemessen an Tag 1

	PCS		Laserdiffraktometrie [µm ± S]		
	mittl. Ø [nm ± S]	PI ± S	LD 50	LD 90	LD 95
10 % (n = 3)	212,1 ± 17,51	0,31 ± 0,046	0,13 ± 0,019	0,32 ± 0,036	0,37 ± 0,040
20 % (n = 6)	224,3 ± 5,46	0,27 ± 0,027	0,18 ± 0,025	0,38 ± 0,014	0,42 ± 0,015

Der Gehalt der 20 %igen Charge wurde durch HPLC-Messungen mit 90,4 % ± 5,4 % bestimmt. Auch hier kann analog Runge der Verlust von 10 % durch den verwendeten Homogenisator (Micron LAB40) erklärt werden, dessen Proben-Auffangbehälter nicht beheizbar ist. Während des diskontinuierlichen Homogenisationsprozesses kann es so zu leichten Verlusten an Lipid mit darin gelöstem Arzneistoff kommen. Runge konnte dieses Problem durch Verwendung eines voll beheizbaren LAB 60 beim Scaling-up beheben.
Tabelle 4-3 zeigt die Ergebnisse der Partikelgrößenmessungen der 10 und 20 %igen Chargen. Durch Einarbeitung von Cyclosporin kommt es zu einer Vergrößerung um knapp 100 nm. Die Erhöhung der Lipidkonzentration führt zu keiner weiteren Größenänderung. Das Zetapotential der 10 % igen Charge betrug –20,1 mV (pH = 7,1), eine Erhöhung des Gehalts auf 20 % führte zu einer leichten Absenkung des Potentials auf –18,6 mV (pH = 7,3). Diese relativ niedrigen Werte müssen aber keine mangelnde Langzeitstabilität bedeuten, da es sich bei Tagat S um einen nicht-ionogenen, sterischen Stabilisator handelt, der Aggregation auch bei geringer Oberflächenladung der Partikel verhindern kann. Die Ergebnisse der Untersuchung des Schmelzverhaltens mittels DSC sind in Tabelle 4-4 zusammengefaßt und zeigen die typische Absenkung der Onset-Temperatur und des Peakmaximums durch den Arzneistoff.

Tabelle 4-4: DSC-Charakteristika von 10- und 20 %igen Cyclosporin A(CsA)-Imwitor-SLN mit einer Beladungskapazität von 20 % (bezogen auf den Lipidgehalt) an Tag 1 nach Herstellung im Vergleich zu den Werten der entsprechenden Placebo-Proben

	CsA-SLN 10 %	Placebo-SLN 10 %	CsA-SLN 20 %	Placebo-SLN 20 %
Onset	50,1 °C	53,8 °C	50,2°C	53,5 °C
Peakmaximum	56,5 °C	57,9 °C	55,4°C	58,2 °C
Peakenthalpie	9,6 J/g	12,2 J/g	20,5 J/g	24,9 J/g

Die Schmelzenthalpien entsprechen umgerechnet zu ca. 100 % denen der arzneistofffreien Chargen, d. h. durch den Arzneistoff wird der Kristallinitätsgrad des Lipids nicht herabgesetzt.

Eine weitere SLN-Formulierung mit Imwitor 900 als Lipidmatrix wurde hergestellt, um einen direkten Vergleich mit den später beschriebenen Compritol-SLN und Compritol-NLC zu ermöglichen (s. Kapitel 4.1.7 und 4.2). Der Lipidgehalt betrug 15 %, die Cyclosporinbeladung 1 % bezogen auf die Gesamtformulierung (6,7 % bezogen auf Imwitor 900). Diese Arzneistoffkonzentration wurde gewählt, weil sie annähernd die maximale Beladungskapazität in Compritol 888 darstellt. Stabilisiert wurde die Formulierung mit 2,5 % Poloxamer 188 und 0,125 % Natriumcholat. Die Partikel hatten einen PCS-Durchmesser von 169 nm und einen LD 100 Durchmesser von 0,86 µm. Da Poloxamer ebenfalls ein sterischer Stabilisator ist, lag das Zetapotential auch hier nur bei –20,0 mV.

In Abbildung 4-4 sind die Streumuster der drei Formulierungen im Vergleich abgebildet. Man erkennt deutlich den höheren Ordnungsgrad der Fettsäure-Seitenketten in der Poloxamer-stabilisierten Formulierung (β_i) gegenüber dem der hauptsächlich als α-Polymorph vorliegenden Tagat-haltigen Rezepturen. Mögliche Erklärungen hierfür sind zum Beispiel die geringere Natriumcholat-Konzentration sowie die chemische Struktur des Poloxamers, das im Unterschied zu Tagat S keine Fettsäureketten aufweist, die mit den Lipid-Fettsäureketten interagieren könnten. Es befindet sich daher primär als Adsorbat auf der Partikeloberfläche.

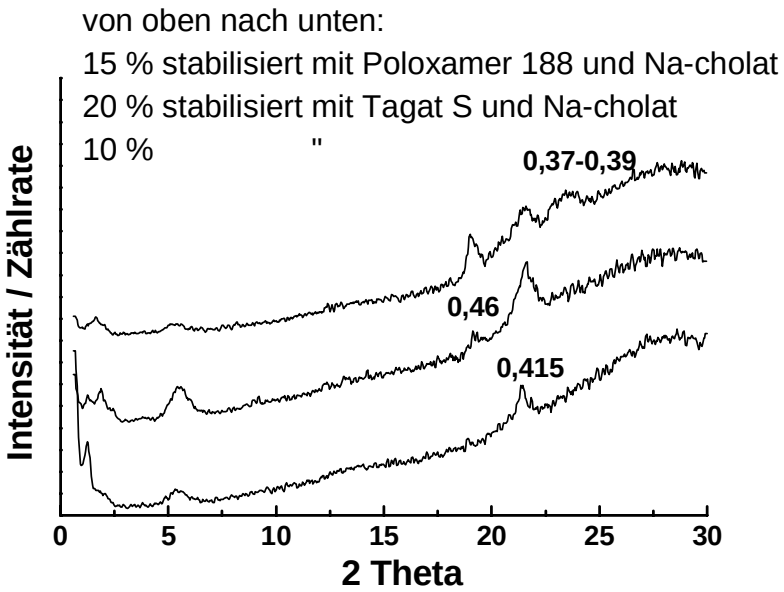


Abbildung 4-4: Vergleich der Röntgendiffraktogramme unterschiedlicher Cyclosporin-Imwitor-SLN mit den ermittelten Netzebenenabständen (d) für die Weitwinkelreflexe

Die höhere Ordnung schlägt sich in den DSC-Aufheizkurven in einem Anstieg des Peakmaximums auf 57,9 °C nieder. Die Schmelzenthalpie liegt dagegen – unter Berücksichtigung der Unterschiede im Lipidgehalt - mit 17,2 J / g im gleichen Bereich, so daß es sich wiederum nur um eine höhere kristalline Ordnung der Fettsäureseitenketten handelt.

4.1.4 Einfluß von Art der Abfüllung und Lagerung auf die Langzeitstabilität

Im Rahmen von Runges Arbeit ergaben sich erste Hinweise auf eine Verbesserung der Stabilität der 10 %igen Formulierung durch Verwendung eines modifizierten LAB 60-Homogenisators (Chargengröße 2 L). Auch die Art der Abfüllung schien einen Einfluß auf die Langzeitstabilität zu haben. In einer gesonderten Studie wurden deshalb arzneistofffreie und arzneistoffhaltige SLN in einer Chargengröße von 3 kg an einem LAB 60 hergestellt und unter variierenden Bedingungen in 20 mL Braunglas-Vials abgefüllt. Untersuchte Parameter waren die Abfüllmenge (5 g oder 15 g), die Abfülltemperatur (ca. 50 °C oder kalt) sowie die Temperatur bei Vialverschluß (ca. 50 °C oder kalt) (s. auch Tabelle 4-5, S. 57). Die Anzahl der befüllten Vials ermöglichte dabei den Anbruch eines neuen Gefäßes für jede Probenziehung. Die verbleibende Bulkware wurde in 250 mL Braunglasflaschen aufbewahrt und ebenfalls untersucht. Um zusätzliche Informationen über den Einfluß von Herstellungsmethode und Größe der Partikel zu erhalten, wurde jeweils ein 1 kg Ansatz ausschließlich mittels Ultra Turrax hergestellt. Diese Dispersion wurde ebenfalls unterschiedlich abgefüllt und untersucht. Die Herstellung und Charakterisierung der Partikel innerhalb der ersten 35 Tage wurde in Kooperation mit Frau Liedtke in unserem Arbeitskreis durchgeführt. Als Charakterisierungsmethoden dienten die Vermessung mittels PCS, LD, DSC, Röntgenbeugung und HPLC. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Kristallstruktur der Proben nach 9 Monaten und 2 Jahren Lagerung weiterführend untersucht, da sich diese innerhalb der ersten Wochen nur geringfügig verändert hatte. Die Ergebnisse dieser Langzeituntersuchungen sollen im folgenden Kapitel präsentiert werden.

Die unter 4.1.3 charakterisierten 20 %igen Formulierungen wurden ausschließlich im Labormaßstab hergestellt. Sie wurden unter Lichtausschluß bei 4 °C, Raumtemperatur und 40 °C gelagert und in Bezug auf Partikelgröße, Kristallstruktur, Gehalt und das Auftreten von Cyclosporin-Kristallen untersucht. Ein Teil der hergestellten Chargen wurde für die Herstellung der SLN-haltigen O/W-Cremes verwendet. Hauptaspekt bei dieser Langzeituntersuchung der Kristallstruktur war daher der Vergleich der flüssigen Dispersion mit den in der Cremegrundlage eingeschlossenen SLN (s. Kapitel 5.2.5).

4.1.4.1 Partikelgröße und Wirkstoffeinschluß

Im Rahmen der von Liedtke durchgeführten Studie konnte wie auch bei Runge eine bessere Größenstabilität der arzneistofffreien Proben bei 40 °C-Lagerung festgestellt werden. Diese erhöhte Stabilität erklärt Runge durch den temperaturabhängigen Anstieg des stabilisierenden Effektes von Tagat S, dessen HLB-Wert in Richtung Phaseninversionstemperatur (55 °C) abnimmt. Im Gegensatz dazu zeigten nach Einarbeitung von Cyclosporin A die gekühlten Proben die beste Stabilität.
Dennoch kann man in Bezug auf die Partikelgröße bei allen Abfüllvarianten und Lagerungstemperaturen nicht von Langzeitstabilität sprechen, da nach 35 Tagen fast alle Proben Aggregation und / oder Gelierung aufwiesen und im größeren Mikrometerbereich lagen. Ein Großteil aggregierte innerhalb der ersten 7 Tage. Als beste Abfüllvariante erwies sich eine heiße Abfüllung der Cyclosporin-Charge nach Herstellung (bei etwa 50 °C) mit 15 mL Abfüllvolumen und sofortigem Verschluß des Vials. Hier konnte auch an Tag 35 noch ein LD 95 von 0,89 µm gemessen werden. Eine Erklärung hierfür könnte das sich bei dieser Abfüllvariante bildende leichte Vakuum sein. Bei Verschluß des Vials ist der Gasraum noch teilweise mit Wasserdampf gefüllt, der bei weiterer Abkühlung kondensiert. Bei einer geringeren Abfüllmenge (5 mL) und ansonsten gleichen Abfüllbedingungen konnte die Charge nur über 21 Tage stabil gehalten werden, was mit einem größeren Gasvolumen erklärt werden könnte.
Auf die gleiche Weise abgefüllte cyclosporinfreie Chargen konnten auf diese Weise nicht stabilisiert werden. Hier führte wie bereits erwähnt nur eine Lagerung bei 40 °C zu besseren Ergebnissen.
Nach 9 Monaten waren alle Proben stark aggregiert oder geliert und wiesen größtenteils Partikelaggregate im Millimeterbereich auf.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Dispersionen mit 20 % Lipidgehalt zeigten ein analoges Verhalten. Die bei 40 °C gelagerte arzneistofffreie Charge wies nach 4 Wochen noch eine Verteilung ausschließlich im Nanometerbereich auf, selbst nach 3 Monaten war dies noch der Fall. Nach 6 Monaten Lagerung ist jedoch auch hier eine deutliche Verschiebung in den Mikrometerbereich zu erkennen (Abbildung 4-5 a+b).
Bei den cyclosporinhaltigen Proben führte dagegen Lagerung bei 4 °C zu den stabilsten Partikeln. Nach vier Wochen ist die Population noch deutlich im Nanometerbereich angesiedelt, erst nach 3 Monaten sind die Partikel aggregiert (Abbildung 4-5 c+d).

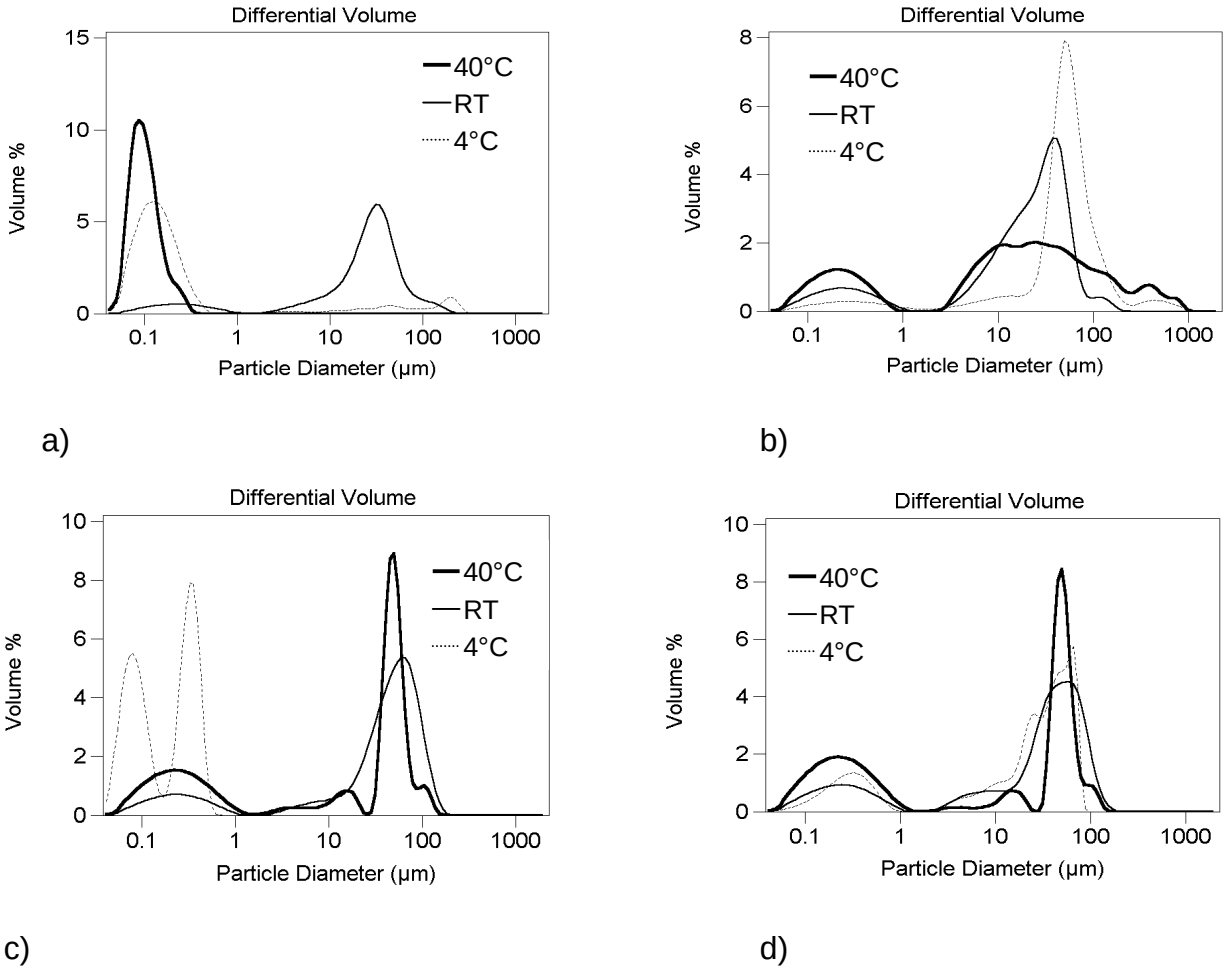
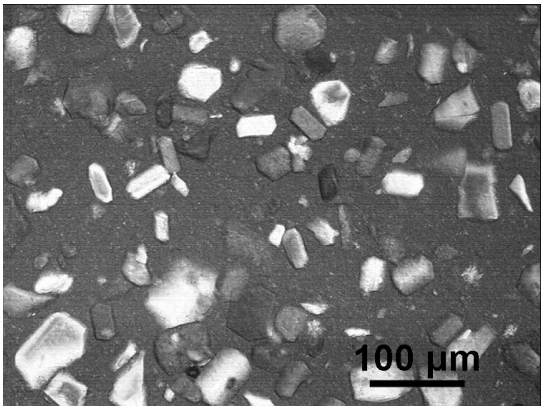


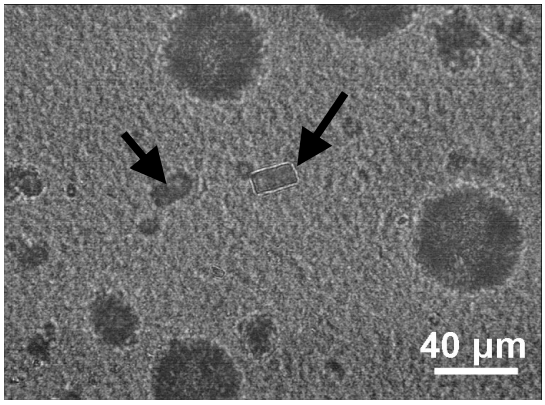
Abbildung 4-5 a-d: LD-Partikelgrößenverteilung von arzneistofffreien (a, b) und Cyclosporin A-haltigen (c, d) SLN-Dispersionen mit 20 % Feststoffanteil nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen
a) nach 4 Wochen, b) nach 6 Monaten
c) nach 4 Wochen, d) nach 100 Tagen

Um eine eventuelle Arzneistoffauscheidung zu erfassen, wurden die Chargen mittels HPLC und Polarisationsmikroskopie untersucht. Nach 35 Tagen wurden den Vials ohne vorheriges Schütteln Proben aus dem oberen und unteren Bereich entnommen und getrennt analysiert. Nach anschließendem Durchmischen wurde der Gesamtgehalt bestimmt. Der so ermittelte Gesamtgehalt blieb über den angegebenen Zeitraum bei allen drei Lagerungstemperaturen mit ~ 95 % annähernd konstant. Während jedoch bei 4 °C-Lagerung die Konzentration an Cyclosporin in beiden Teilbereichen des Vials identisch war, konnte bei Raumtemperatur bereits ein Gehalt von 91,6 % im oberen Teil und von 106 % im unteren Teil ermittelt werden, d. h. es bildete sich ein arzneistoffreiches Sediment aus. Bei 40 °C-Lagerung wurde die Differenz noch größer. Der Gehalt betrug oben 80,4 % und unten 112 % (n = 2). Man erkennt deutlich eine steigende Inhomogenität der Arzneistoffverteilung bei steigender Lagertemperatur.

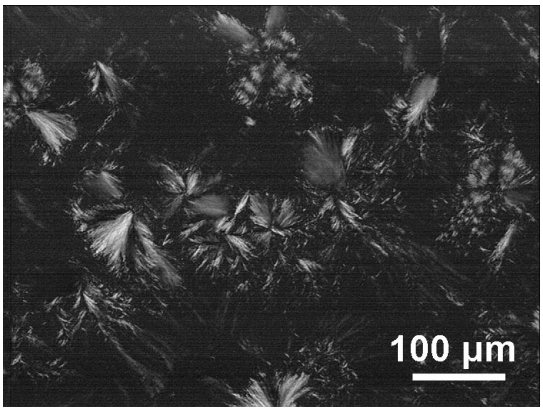
Die Frage, ob sich das Lipid einschließlich inkorporiertem Arzneistoff am Boden des Vials absetzt oder der Arzneistoff auskristallisiert, konnte durch Mikroskopie der Proben beantwortet werden. Abbildung 4-6 a zeigt eine Aufnahme der aus übersättigtem Octyldodecanol ausgefallenen Cyclosporin A-Kristalle in ihrer charakteristischen Form. In Abbildung 4-6 b erkennt man in der bei 40 °C gelagerten Cyclosporin-Charge an Tag 28 ebenfalls Cyclosporin-Kristalle (s.Pfeile).
Die kreisförmigen Strukturen sind in Abbildung 4-6 c in polarisiertem Licht und mit größerer Auflösung abgebildet. Es handelt sich hierbei um für Imwitor 900 charakteristische Lipidkristalle, die auch in arzneistofffreien Formulierungen zu finden sind. Daneben ist die bei 4 °C gelagerte Probe abgebildet, die weder Kristalle noch Lipidaggregate aufweist (Abbildung 4-6 d).



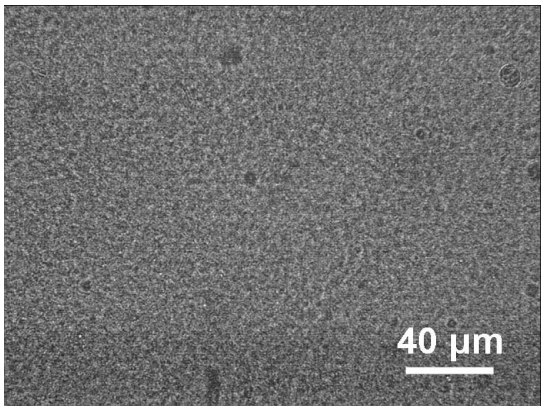
a)



b)



b)



d)

Abbildung 4-6: Lichtmikroskopische Untersuchung von a) Cyclosporin A-Kristallen aus übersättigter Octyldodecanol-Lösung, b) SLN bei 40 °C-Lagerung an Tag 28 mit Cyclosporin-Kristallen (Pfeile) und kreisförmigen Lipidbereichen, c) Lipidaggregaten in stärkerer Vergrößerung und Polarisation und d) SLN bei 4 °C-Lagerung an Tag 28

Die Tatsache, daß Lagerung der Formulierungen bei 40 °C das Kristallwachstum von Cyclosporin fördert, konnte im Rahmen dieser Arbeit an vielen Stellen bestätigt werden (s. auch Kapitel 5.2.3). Dies könnte auch die wesentlich schlechtere Größenstabilität der cyclosporinhaltigen Charge bei 40 °C gegenüber der arzneistoff-freien erklären: Auskristallisierender Arzneistoff dient als Kristallisationskeim und fördert so die Aggregation der Nanopartikel. Ob zusätzlich auch eine Veränderung der Imwitor-Kristallstruktur von Bedeutung für die unterschiedliche Stabilität ist, sollten DSC- und Röntgenbeugungsmessungen zeigen.

4.1.4.2 Thermoanalyse und Untersuchung der Kristallstruktur

Einleitend kann festgestellt werden, daß sich Veränderungen der Lipid-Kristallstruktur wesentlich langsamer vollziehen als die beobachtete Partikelaggregation, so daß sie nur teilweise zu ihrer Erklärung herangezogen werden können. Für den Ausschluß von Arzneistoff und die Bildung von Arzneistoffkristallen könnten sie jedoch von wesentlich größerer Bedeutung sein.

Tabelle 4-5: Langzeituntersuchung der DSC-Schmelzenthalpien [J / g] unterschiedlich hergestellter und abgefüllter Imwitor-SLN (10 % Gehalt)
(UT = Herstellung mittels Ultra-Turrax, Homo = Hochdruckhomogenisation, Af = Abfüllung, Vs = Verschluß, B = Bulkgefäß, Probenname mit P beginnend = arzneistofffrei, mit C beginnend = mit Cyclosporin)

Probenname	Abfüllart	d1	9 Monate	2 Jahre
CUT-B	Cyclo / UT / Bulk	9,33	12,41	12,53
PUT-B	Placebo / UT / Bulk	11,51	15,64	15,98
C1e-B	Cyclo / Homo / Bulk	9,22	11,58	11,40
P1e-B	Placebo / Homo / Bulk	11,17	14,32	14,60
P1a	15g / heiße Af + Vs / RT	12,18	14,26	14,88
P1b	5g / heiße Af + Vs / RT	11,95	14,42	14,98
P1c	5g / heiße Af, kalter Vs / RT	11,58	14,34	14,51
PUTa	UT / 15g / heiße Af + Vs / RT	13,63	16,38	16,83
CUTa	UT / 15g / heiße Af + Vs / RT	9,99	11,87	11,67
C1a	**15g / heiße Af + Vs / RT**	**9,61**	**9,68**	**10,85**
C1b	5g / heiße Af + Vs / RT	9,68	9,65	10,54
C1c	5g / heiße Af, kalter Vs / RT	9,36	10,27	11,65
P1f	5g / heiße Af + Vs / 1.Woche 40° dann 4°	11,88	12,65	12,70
CUTd	UT / 15g / heiße Af + Vs / 40°	9,45	10,97	12,18
PUTd	UT / 15g / heiße Af + Vs / 40°	13,32	13,68	16,19
C1d	15g / heiße Af + Vs / 40°C	9,62	10,96	11,13
P1d	5g / heiße Af + Vs / 40°C	11,41	13,21	16,89

Tabelle 4-5 enthält die mittels DSC ermittelten Schmelzenthalpien der verschiedenen 10 %igen Proben an Tag 1, nach 9 Monaten und 2 Jahren, Tabelle 4-6 die dazugehörigen Peakmaxima an Tag 1 und nach 2 Jahren.
Die Ergebnisse unterstützen die bereits aus der Partikelgrößenuntersuchung gewonnenen Erkenntnisse, daß eine möglichst heiße Abfüllung mit direkt anschließendem Verschluß des Vials die cyclosporinhaltigen Chargen am besten zu stabilisieren vermag. Die Enthalpie ist hier nach 9 Monaten noch nahezu unverändert und auch nach zwei Jahren Lagerung ist sie noch geringer als die der anderen Abfüllvarianten (Tabelle 4-5, Probe C1a).
Als besonders ungünstig erwies sich die Herstellung mittels Ultra-Turrax sowie eine Lagerung im Bulkgefäß, das für die Probenentnahme wiederholt geöffnet und geschüttelt wurde und somit den höchsten Energieeintrag erfahren hat (Proben CUT-B / PUT-B).

Tabelle 4-6: Langzeituntersuchung der DSC-Peakmaxima [°C] unterschiedlich hergestellter und abgefüllter Imwitor-SLN (10 % Feststoffgehalt) (UT = Herstellung mittels Ultra-Turrax, Homo = Hochdruckhomogenisation, Af = Abfüllung, Vs = Verschluß, B = Bulkgefäß, Probenname mit P beginnend = arzneistofffrei, mit C beginnend = mit Cyclosporin, Werte in Klammern = Sekundärmaxima)

Probenname	Abfüllart	d1	2 Jahre
CUT-B	**Cyclo / UT / Bulk**	**57,43**	**58,41 (59.63)**
PUT-B	**Placebo / UT / Bulk**	**59,20**	**57,08 (61,70 / 62,86)**
C1e-B	Cyclo / Homo / Bulk	56,30	58,38 (61,83)
P1e-B	Placebo / Homo / Bulk	57,64	(53,32) 57,92 (60,88)
P1a	15g / heiße Af + Vs / RT	57,92	59,24
P1b	5g / heiße Af + Vs / RT	57,83	59,07
P1c	5g / heiße Af, kalter Vs / RT	57,61	58,36
PUTa	UT / 15g / heiße Af + Vs / RT	59,41	57,33 (59,34 / 62,72)
CUTa	UT / 15g / heiße Af + Vs / RT	57,23	58,64 (60,68)
C1a	15g / heiße Af + Vs / RT	56,60	(58,22) 59,63
C1b	5g / heiße Af + Vs / RT	56,60	(58,06) 59,71
C1c	5g / heiße Af, kalter Vs / RT	56,31	57,72 (59,56)
P1f	**5g / heiße Af + Vs / 1.Woche 40° dann 4°**	**57,60**	**57,79**
CUTd	UT / 15g / heiße Af + Vs / 40°	57,60	61,06
PUTd	UT / 15g / heiße Af + Vs / 40°	59,64	61,36
C1d	15g / heiße Af + Vs / 40°C	56,45	60,76 (64,13)
P1d	5g / heiße Af + Vs / 40°C	57,70	63,06

Die Form der Schmelzpeaks sowie die Peakmaxima veränderten sich bei allen Proben während der Lagerung mehr oder weniger stark. Generell kann nach 2 Jahren ein Anstieg des Peakmaximums beobachtet werden. Die geringste Erhöhung des Peakmaximums findet sich bei der Placeboprobe, die hauptsächlich bei 4 °C gelagert worden ist (Probe P1f in Tabelle 4-6). Auch die Enthalpie ist hier im Verhältnis zu den anderen arzneistofffreien Chargen relativ konstant geblieben. Dies ist leicht erklärbar durch die verzögerte Modifikationsumwandlung von Fetten bei geringen Temperaturen, die aus der Literatur schon lange bekannt ist [152].

Das teilweise sehr komplexe Schmelzverhalten, das durch Auftreten von mehreren Peaks und Schultern gekennzeichnet ist, kann einerseits mit der Bildung der stabileren, höherschmelzenden Modifikationen (β_i, β) erklärt werden. Es ist jedoch zu beachten, daß auch die Partikelgröße einen wesentlichen Einfluß auf das Schmelzverhalten einer Lipidpartikel-Dispersion hat. Westesen et al. konnten durch detaillierte DSC- und Röntgenmessungen die einzelnen Peaks einer Schmelzkurve von Trimyristin-SLN definierten Partikelgrößen mit zum Teil nur um eine Elementarzelle differierenden Dicken zuordnen [158, 166]. Zur Beurteilung der Kristallmodifikation ist deshalb bei den vorliegenden aggregierten SLN die Einbeziehung des Röntgenspektrums unerläßlich.
Die Abbildungen 4.7 und 4.8 zeigen die Spektren ausgewählter Proben. Auch hier bestätigt sich die große Stabilität der cyclosporinhaltigen Chargen, die heiß abgefüllt und verschlossen wurden. Nach 9 Monaten kann noch keine Veränderung des Spektrums festgestellt werden. Nach zwei Jahren ist der α-Reflex bei d = 0,415-0,42 noch immer der mit Abstand intensitätsstärkste. Bei der mittels Ultra-Turrax hergestellten Charge hat die Intensität des Reflexes bereits leicht abgenommen. Eine ausgeprägte β-Modifikation wäre jedoch durch ein Fehlen dieses Reflexes gekennzeichnet, so daß zumindest ein Teil des Lipids noch in den weniger geordneten Modifikationen vorliegt.
Die Placebo-Chargen zeigen dagegen wesentlich stärkere Umwandlungen (Abbildung 4-8). Nach 2 Jahren ist die Intensität des Reflexes bei d = 0,415-0,42 bereits schwächer als die der Reflexe mit Netzebenenabständen von 0,46 und 0,39 (Pfeile), weitere Reflexe treten bei 0,44 und 0,38 auf. Dies demonstriert, daß Cyclosporin die polymorphen Umwandlungen des Lipids zumindest verzögern kann. Dies steht im Widerspruch zu der von Bunjes für Q10-SLN beschriebenen Beschleunigung der Modifikationsumwandlung durch den Arzneistoff [63]. Der Einfluß von eingearbeiteten Arzneistoffen auf die Kristallstruktur und deren Umwandlung muß demzufolge für jedes System getrennt untersucht werden, generelle Aussagen sind hier nicht möglich.

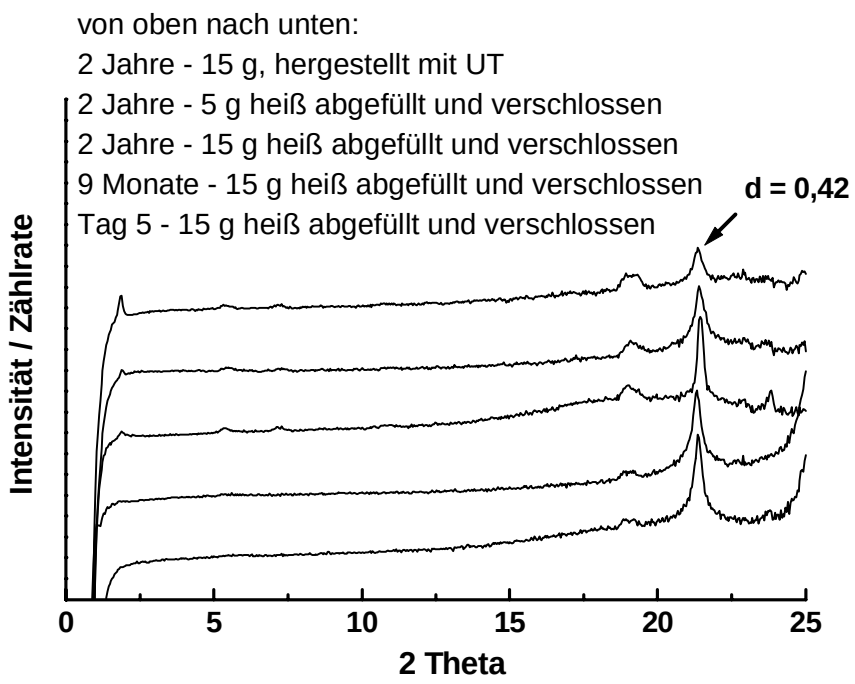


Abbildung 4-7: Veränderung der WAXS-Reflexe unterschiedlich hergestellter und abgefüllter Cyclosporin A-haltiger Imwitor-SLN (Meßmethode b). Der Pfeil deutet auf den α / β'-Reflex bei d = 0,42

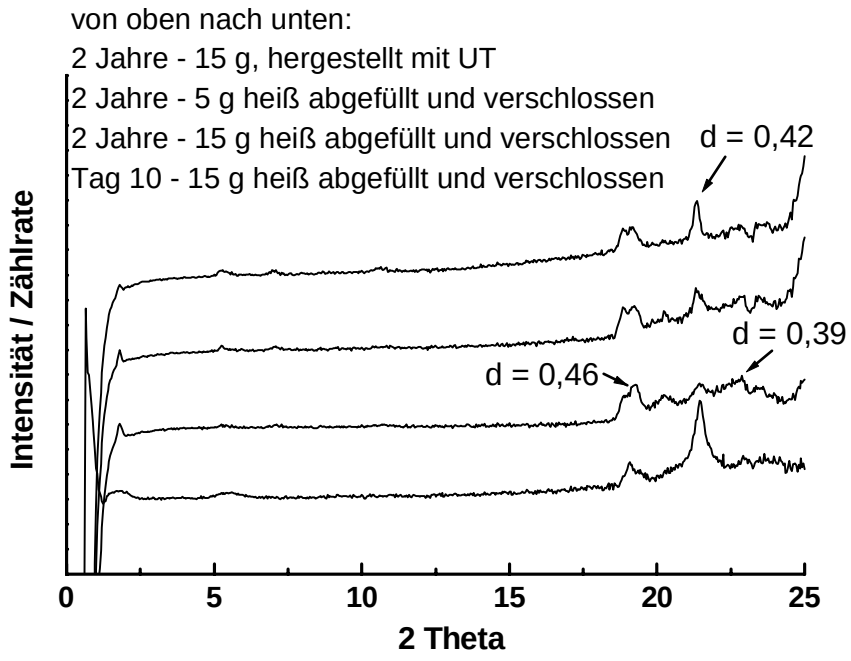


Abbildung 4-8: Veränderung der WAXS-Reflexe unterschiedlich hergestellter und abgefüllter arzneistofffreier Imwitor-SLN (Meßmethode b). Die unteren Pfeile deuten auf β_i / β-Reflexe bei d = 0,46 und 0,39

Tabelle 4-7: Vergleich der Nahwinkelreflexe einer arzneistofffreien und –haltigen SLN-Formulierung nach 9 Monaten Lagerung bei RT

	2 Theta	s [nm-1]	d [nm]
Placebo 9 Monate	1,80	0,204 (= s1)	4,908
	5,34	0,602 (~ s1 * 3)	1,661
	7,04	0,796 (~ s1 * 4)	1,256
Cyclosporin 9 Monate	1,84	0,208 (= s1)	4,801
	5,44	0,616 (~ s1 * 3)	1,624
	7,24	0,819 (~ s1 * 4)	1,221

Die bei 40 °C gelagerten Cyclosporin-Proben zeigen alle die für Cyclosporin A charakteristischen Streureflexe, was die Ergebnisse der HPLC- und mikroskopischen Untersuchungen untermauert. Besonders früh treten die Reflexe in den mittels Ultra-Turrax hergestellten Proben im Bulkgefäß auf. Eine kleine und monodisperse Partikelpopulation scheint also das Auskristallisieren von Arzneistoff zu verzögern.

Runge hatte in seiner Arbeit eine Langperiode der Cyclosporin-SLN von ungefähr 55 Å ermittelt. Die Auswertung der Nahwinkelreflexe nach 9 Monaten ergab einen geringeren Wert von knapp unter 50 Å, was durch die Bildung der höher geordneten Modifikationen mit stärker gegenüber der (001) Kristallebene gewinkelten Fettsäureketten erklärt werden kann (Tabelle 4-7). Die Periodizität der Streuvektoren (s), die eine lamellare Anordnung wiederspiegeln, ist deutlich erkennbar. Die Ausbildung des Reflexes 1. und 3. Ordnung ist für Diglyceride charakteristisch [167].

Die Langzeitanalyse der 20 %igen Formulierungen nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen ergab insgesamt ähnliche Resultate. Die Umwandlung erfolgte hier jedoch schneller, was zum Teil dadurch erklärt werden kann, daß nicht für jede Messung ein eigenes Probengefäß zur Verfügung stand (stärkerer Energieeintrag, Luftaustausch). Abbildung 4-9 zeigt die Weitwinkeldetailmessungen der cyclosporinhaltigen Charge nach vier Wochen Lagerung gegen das Streumuster des Arzneistoffes.

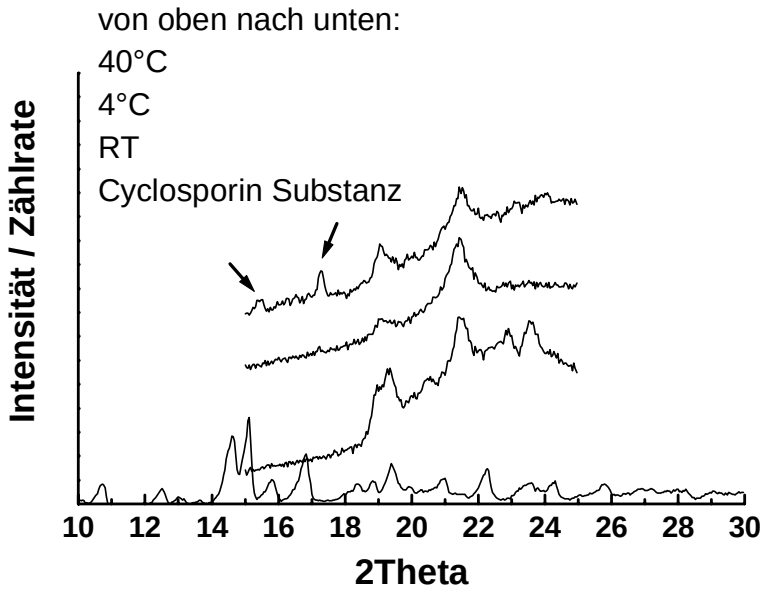


Abbildung 4-9: Detailmessungen der Weitwinkelreflexe der bei verschiedenen Temperaturen gelagerten 20 %-igen SLN-Formulierung nach 4 Wochen Lagerung. Die Pfeile zeigen auf Cyclosporin-Reflexe.

Während die bei 4 °C gelagerte Probe noch keine nennenswerten Transformationen aufweist, sind die Reflexe bei d = 0,46, 0,39 und 0,38 nach Raumtemperatur-Lagerung bereits intensiv ausgeprägt. Die bei 40 °C gelagerte Charge weist deutliche Cyclosporin-Reflexe auf (s. Pfeile), diese waren auch mikroskopisch detektierbar. Nach 60 Tagen Lagerung zeigt auch die unter Kühlung gelagerte Charge erste Umwandlungen.

Tabelle 4-8 enthält die Resultate der DSC-Messungen nach einem Jahr im Vergleich zu den an Tag 1 gewonnenen. Sie zeigt die erwartete Zunahme von Onset und Peakmaximum im Verlauf der Lagerung, die beim Übergang zu höheren Lagertemperaturen eine immer stärkere Ausprägung erfährt.

Tabelle 4-8: Gegenüberstellung der DSC-Charakteristika von arzneistofffreien und -haltigen Imwitor-SLN (20 %) an Tag 1 mit denen nach 1 Jahr Lagerung bei 4 °C, RT und 40 °C. (Werte in Klammern = Sekundärmaxima)

		Tag 1	**1 Jahr**		
	Lagerung		**4°C**	**RT**	**40°C**
Placebo	Enthalpie [J/g]	24,9	33,1	36,5	35,2
	Peakmax. [°C]	58,2	(56,0) 57,9	59,2	64,0
	Onset [°C]	53,5	48,2	54,2	59,6
Cyclosporin	Enthalpie [J/g]	20,5	26,1	31,2	25,4
	Peakmax. [°C]	55,4	(54,7) 57,3	57,7	(58,9) 62,6
	Onset [°C]	50,2	50,1	52,3	60,1

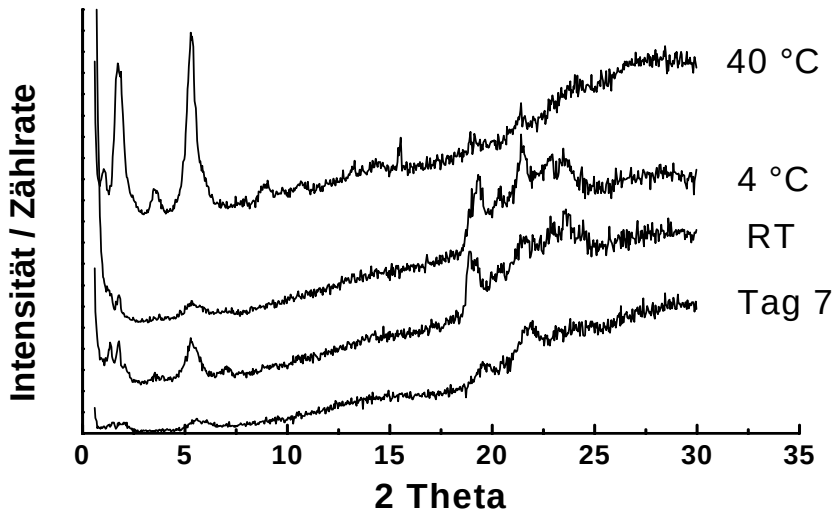


Abbildung 4-10: Streureflexe der bei verschiedenen Temperaturen gelagerten 20 %-igen Imwitor-Formulierung ohne Arzneistoff nach 1 Jahr Lagerung im Vergleich zu Tag 7 nach Herstellung.

Unerwartet war jedoch die Tatsache, daß die Enthalpie bei 40 °C-Lagerung geringer ausfällt als die der bei Raumtemperatur gelagerten Proben. Eine Betrachtung der Röntgenspektren der Placebo-Proben nach einem Jahr erklärt diese geringe Schmelzenthalpie (Abbildung 4-10).

Die bei 40 °C gelagerte Probe zeigt im Weitwinkelbereich kaum noch Reflexe. Dafür sind im Nahwinkelbereich sehr intensive Peaks entstanden. Die zu diesen Reflexen gehörigen Streuvektoren konnten mit s = 0,195; 0,394; 0,597; 0,796; 1,022, 1,203 ermittelt werden, wobei die stärksten Reflexe s = 0,195 und s = 0,597 darstellen. Die Lipide weisen also eine wesentlich ausgeprägtere lamellare Anordnung mit einem Wiederholungsmuster von s ~ 0,2 entsprechend einem Netzebenabstand von ungefähr 50 Å auf, während die Fettsäure-Seitenketten kaum noch Kristallinität zeigen, das heißt relativ frei beweglich sind. Eine mögliche Erklärung für dieses röntgendiffraktometrische Verhalten ist die Bildung von flüssigkristallinen Strukturen während des Temperns bei 40 °C. Die Proben bilden makroskopisch ein opaleszierendes Gel. Eventuell können aufgrund der höheren Beweglichkeit der Moleküle und der stark aggregierten Partikel bei dieser Temperatur größere lamellenartig angeordnete Strukturen mit hoher Beweglichkeit der Seitenketten entstehen.

In den letzten Jahren ist die Verwendung flüssigkristalliner Lipidpartikel als Arzneistoffträger immer häufiger beschrieben worden. Flüssigkristalline Strukturen unterscheiden sich von kristallinen Feststoffen vor allem dadurch, daß sie nicht in alle drei Raumrichtungen eine Periodizität besitzen sondern in maximal zwei Dimensionen [107].

Besonders den sogenannten Cubosomen aus Monoolein mit kubisch-flüssigkristalliner Struktur wird Potential beigemessen [168, 169] aber auch eine orale und buccale Anwendung in Form von Kapseln oder Zylindern, sowie topische Anwendungen wurden beschrieben [170, 171]. Ein Vorteil dieser Strukturen ist die mögliche Inkorporation von hydrophilen und hydrophoben Arzneistoffen in Verbindung mit kontrollierter Freisetzung und mucoadhäsivem Verhalten. Die Art der flüssigkristallinen Struktur wird dabei als abhängig vom Wassergehalt beschrieben, wobei mit dessen Anstieg zunächst lamellare (L_α bis 20 %) und dann kubische Strukturen gebildet werden [172].

Aufgrund des hohen Gehaltes an Mono- und Diglyceriden in Imwitor 900 ist die Bildung von vergleichbaren Strukturen durchaus wahrscheinlich. Die lamellare Anordnung wird dabei wegen der beobachteten, periodisch wiederkehrenden Nahwinkelreflexe und der Anisotropie, die zu einem opaleszierenden Gel führt, als dominierend angenommen. Die höhere Temperatur ermöglicht eventuell eine Trennung des Glyceridgemisches in entsprechend flüssigkristalline Mono- und / oder Diglyceridfraktionen im wasserhaltigen Randbereich der Fettaggregate einerseits und in eine Triglyceridfraktion (etwa 10 % in Imwitor 900) andererseits. Eine in diesem Anteil eventuell noch vorhandene Kristallinität wäre aufgrund der relativ hohen Detektionsgrenze des verwendeten Röntgendiffraktometers jedoch nicht mehr erkennbar. Im Rahmen der Thermoanalyse könnte der Triglyceridanteil jedoch neben der Partikelgröße für das gestiegene Peakmaximum verantwortlich sein. Dies ist vor allem wahrscheinlich, da dieses sogar das Peakmaximum der ersten Aufheizkurve des Bulkmaterials übersteigt (61,1 °C (Bulk) gegen 64,0 °C).

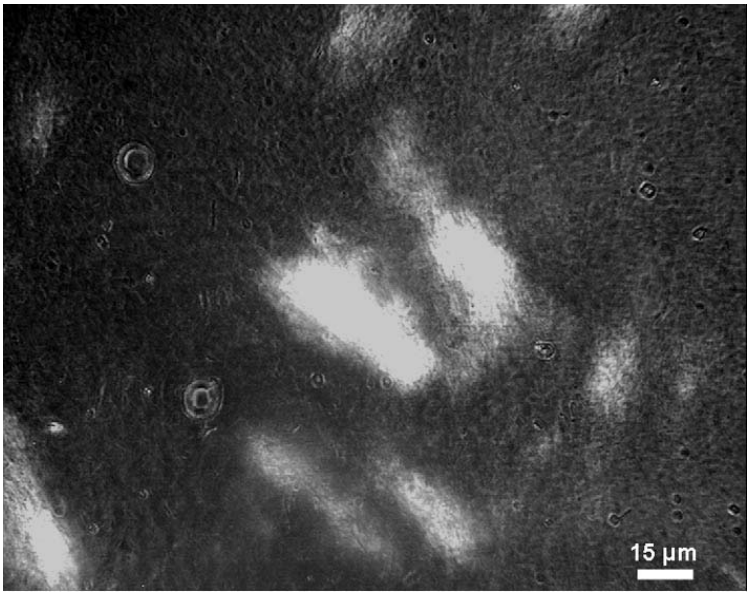


Abbildung 4-11:
Mittels Polarisationsmikroskopie untersuchte arzneistofffreie SLN-Charge (20 % Lipidgehalt) nach 1 Jahr Lagerung bei 40 °C

Um das Vorhandensein von flüssigkristallinen Strukturen in der Probe nachzuweisen, wurde diese unter dem Polarisationsmikroskop betrachtet. Aufgrund der Anisotropie lamellarer, flüssigkristalliner Strukturen kommt es bei ausreichender Größe zu Doppelbrechung. In der Literatur werden diese Strukturen unter anderem als „nebelartig“ beschrieben [173].
Abbildung 4-11 zeigt ein mikroskopisches Bild der bei 40 °C gelagerten Placebo-Charge. Die hellen „Nebel“ sind deutlich zu erkennen. Bei Erwärmung der Probe auf dem Objektträger auf >65 °C verschwinden diese, so daß hier von einem Übergang in eine isotrope Schmelze ausgegangen werden kann.

Die cyclosporinhaltige Probe verhält sich nach längerer Lagerung bei erhöhter Temperatur ähnlich, wobei der Gehalt an Arzneistoff in den Partikeln durch den beobachteten Ausstoß zumindest reduziert ist. Auch hier zeigt das Röntgenspektrum keine Reflexe im Weitwinkelbereich und fast identische starke, periodische Reflexe im Nahwinkel. Der Netzebenenabstand ist dem der arzneistofffreien Charge analog.
Die Thermoanalyse ergibt hier sehr deutlich die Aufspaltung in zwei unterschiedliche Schmelzvorgänge, wobei die Maxima fast vier Grad auseinanderliegen (Tabelle 4-8). Hier könnte ebenfalls die Trennung des Glyceridgemisches als Erklärung dienen.

Auch wenn eine nähere Charakterisierung und Einordnung der beschriebenen Strukturen im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgte, ist auf Basis der vorliegenden Daten von der Entstehung lamellarer, flüssigkristalliner Strukturen bei erhöhter Temperatur auszugehen. Inwieweit dieses Phänomen Einfluß auf die Arzneistofffreisetzung bei Körpertemperatur hat, sollte im Folgenden geklärt werden (Kapitel 4.1.5 und 4.1.6).

4.1.5 Untersuchung des Trocknungsverhaltens

Der von Jenning postulierte Zusammenhang zwischen Trocknungsverhalten einer Lipid-Nanopartikeldispersion und deren Freisetzungsverhalten [13] ist vor allem für die topische Anwendung von SLN oder NLC von Bedeutung. Bei Applikation auf die Haut konnte die Bildung eines Films verbunden mit okklusiven Eigenschaften der Formulierungen nachgewiesen werden [174]. Jenning untersuchte die während seiner Freisetzungsexperimente mit Franzzellen gebildeten Filme mit Hilfe der Röntgendiffraktometrie, und konnte dabei eine polymorphe Umwandlung der Lipide nachweisen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die für die Freisetzungen verwendeten Formulierungen standardmäßig in dünner Schicht bei 32 °C über 24 Stunden getrocknet und mittels DSC und Röntgendiffraktometrie untersucht.

Um mögliche Störungen durch vorhandene Hilfsstoffe auszuschließen, wurden im Voraus die verwendeten Tenside röntgendiffraktometrisch vermessen. Abbildung 4-12 zeigt deren Streumuster mit den errechneten Netzebenenabständen der erhaltenen Reflexe. Vor allem das Blockpolymer Poloxamer 188 zeigt starke Kristallinität bei Netzebenenabständen, die denen der β_i Modifikationen von Glyceriden teilweise gleichen (d = 0,46 und 0,38-0,39). Tagat S weist an diesen Stellen ebenfalls schwache Reflexe auf. Natriumcholat zeigt nur einen HALO und liegt somit amorph vor.

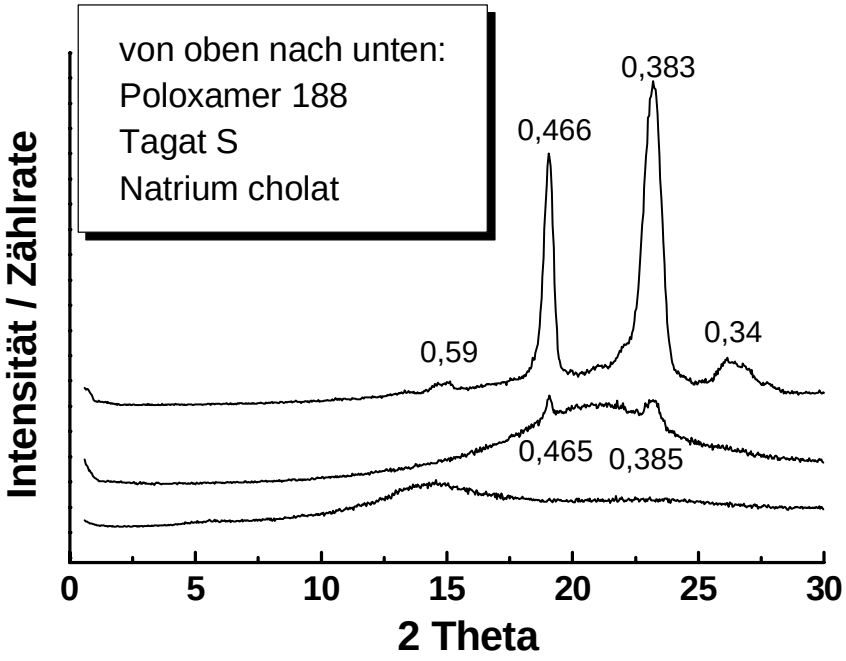


Abbildung 4-12: Röntgenstreumuster der verwendeten Tenside (Festsubstanzen) mit den ermittelten Netzebenenabständen

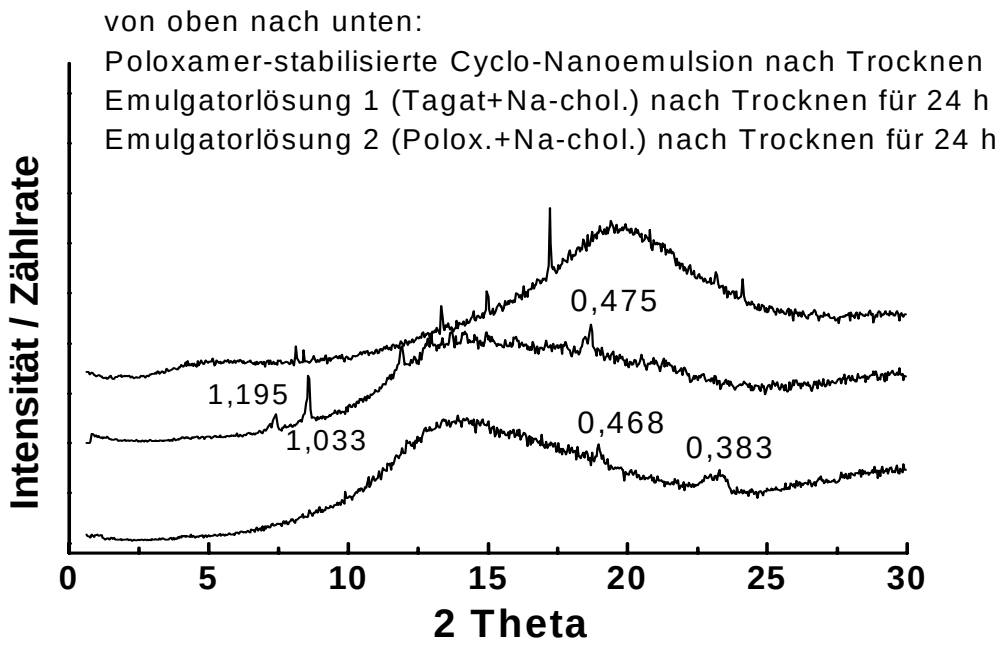


Abbildung 4-13: Röntgenstreumuster der verwendeten Tensidlösungen sowie einer Cyclosporin A-haltigen Nanoemulsion mit den ermittelten Netzebenenabständen

In einem weiteren Schritt wurden die Tenside in den verwendeten Kombinationen und Konzentrationen als wäßrige Lösungen bei 32 °C getrocknet. Die für die beschriebenen 20 %igen Imwitor-SLN verwendete Kombination von Tagat S 5 % und Natriumcholat 1 % (Emulgatorlösung 1) zeigte noch einen schwachen Reflex bei d = 0,475, eine Kombination von Poloxamer 188 (2,5 %) und Natriumcholat (0,125 %) (Emulgatorlösung 2), die hauptsächlich zur Stabilisierung der NLC herangezogen wurde, weist ebenfalls nur noch schwache Reflexe in den entscheidenden Bereichen auf (Abbildung 4-13).

Als letzter Vergleich wurde eine cyclosporinhaltige Octyldodecanol-Nanoemulsion mit Hilfe des Poloxamer-haltigen Tensidgemisches hergestellt und analog den SLN getrocknet. Man erkennt zwar deutlich einige scharfe Reflexe des auskristallisierenden Arzneistoffes (u. a. 2 Theta ≈ 17 °), dagegen sind die störenden Reflexe im für die Lipidmodifikation entscheidenden Bereich zwischen 2 Theta = 18-25 ° nicht mehr zu detektieren.

DSC-Messungen der entsprechenden Proben sind Abbildung 4-14 a-d dargestellt. Das Peakmaximum von Poloxamer 188 als Festsubstanz liegt bei 54,0 °C und bleibt nach Trocknung der wäßrigen Emulgatorlösung 2 nahezu konstant (53,6 °C). Dient Poloxamer jedoch zur Stabilisierung von Octyldodecanol in Form der Nanoemulsion, wird das Peakmaximum nach Trocknung auf 43,7 °C abgesenkt.

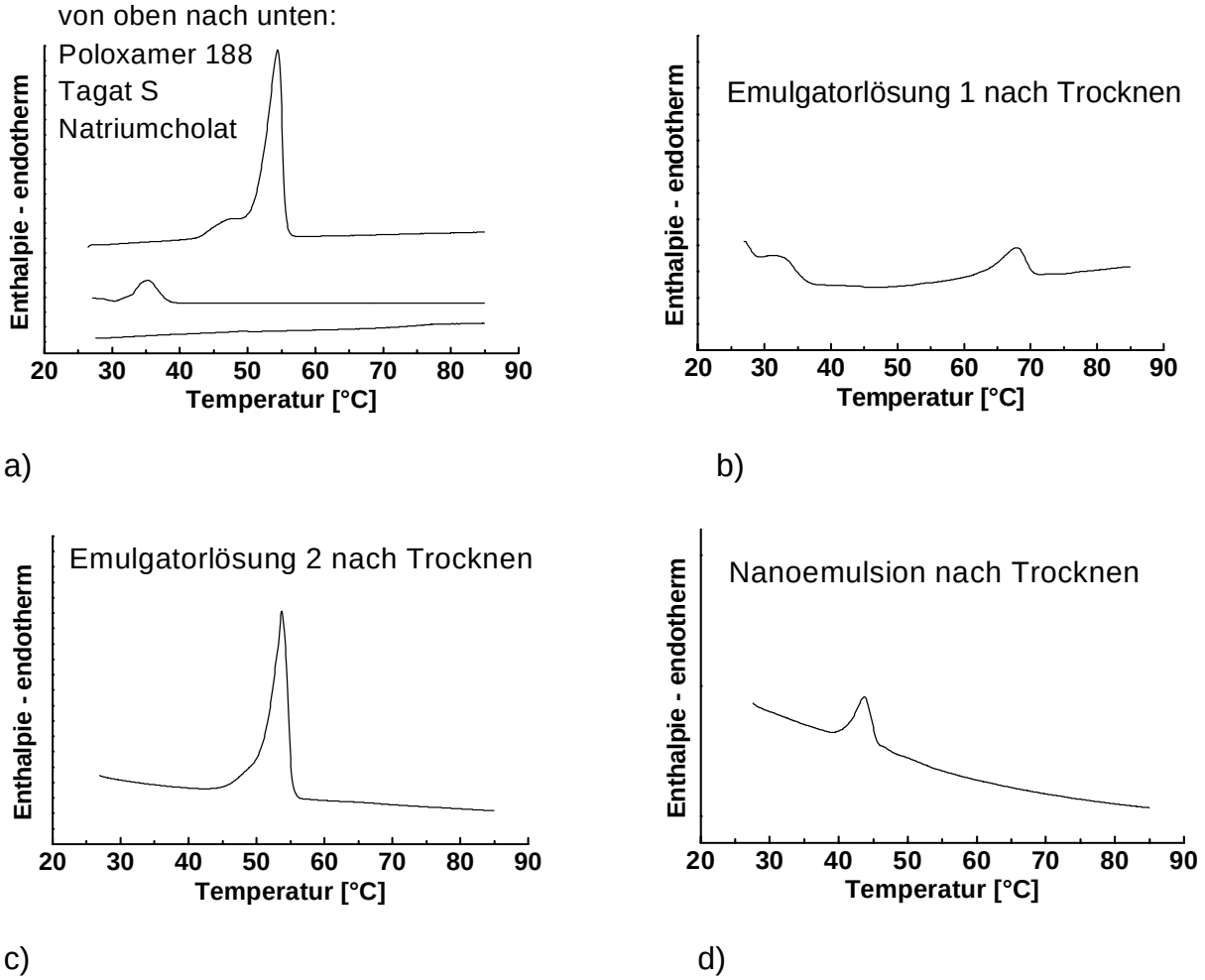
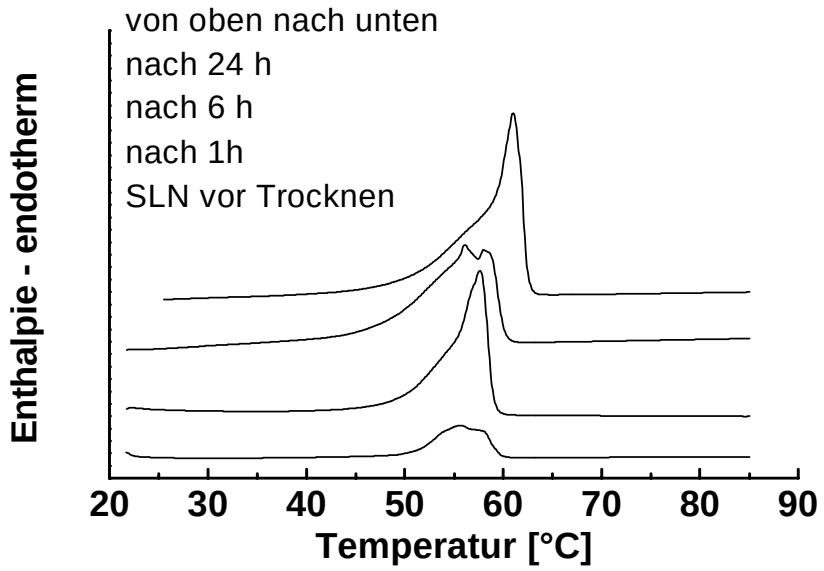


Abbildung 4-14 a-d: DSC-Schmelzkurven der verwendeten Tenside als Festsubstanzen (a) und als wäßrige Lösungen nach Trocknungsprozeß (b, c), sowie einer mit Emulgatorlösung 2 stabilisierten arzneistoffhaltigen Octyldodecanol-Nanoemulsion nach Trocknungsprozeß (d)

Der Schmelzvorgang des auskristallisierten Poloxamers sollte vom Schmelzverhalten der SLN-Glyceride abgrenzbar sein. Tagat S schmilzt bereits unter 40 °C, in getrockneter wäßriger Lösung tritt ein weiterer diffuser Schmelzpeak bei knapp 70 °C auf, der auf entstandene Strukturen hoher Ordnung hinweist. Da Tagat S einen Monoglycerid-Teil besitzt, könnte es sich hier auch um flüssigkristalline Strukturen handeln, wobei der Schmelzpeak bei ca. 33 °C den Übergang vom kristallinen in den flüssigkristallinen Zustand darstellen würde und der Peak bei ca. 70 °C den Übergang zur isotropen Schmelze. Im Rahmen der weiteren Trocknungsversuche mit SLN trat dieser Peak nicht wieder auf, da die Tensidmoleküle hier eher in der Grenzfläche Lipid / Wasser zu finden sind. Die Diskussion des beobachteten Schmelzverhaltens bleibt hier jedoch hypothetisch. Die Ergebnisse der Trocknungsexperimente mit Imwitor-SLN - mit oder ohne Cyclosporin und unterschiedlichen Tensidlösungen - werden im Folgenden beschrieben und diskutiert.



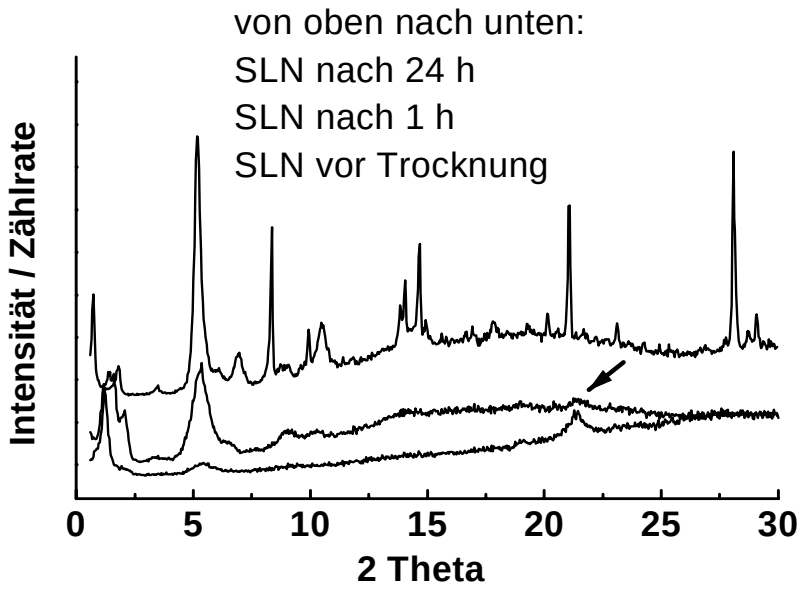


Abbildung 4-15: DSC-Schmelzkurven (oben) und Röntgenstreumuster (unten) des Trocknungsprozesses von Cyclosporin A-haltigen Imwitor-SLN (20 %) stabilisiert mit Tensidlösung 1

Abbildung 4-15 zeigt die Schmelzkurven und Röntgenspektren der cyclosporinhaltigen Imwitor-SLN (20 %) stabilisiert mit 5 % Tagat S und 1 % Natriumcholat (Tensidlösung 1) vor, während und nach dem Trocknungsprozeß. Betrachtet man zunächst nur die Schmelzkurven (oben), könnte man von einer polymorphen Verschiebung in Richtung der triklinen β-Modifikation ausgehen.

Der zuvor breite Peak mit einem Maximum bei 55,9 °C wird schmaler und verlagert sich nach anfänglicher Aufspaltung hin zu höheren Temperaturen (Max. 60,7 °C). Auch die Onset-Temperatur weist eine deutliche Zunahme von 50,7 °C auf 57,7 °C auf.

Die Werte der Thermoanalyse der untersuchten Proben finden sich in Tabelle 4-9. Die sichtbare Erhöhung der Schmelzenthalpie (Fläche unter der Kurve) beruht hier vorrangig auf der Erhöhung des Lipidanteils in der Formulierung durch den starken Wasserverlust während der Trocknung bei 32 °C auf einem offenen Träger. Nach 24 h waren durchgängig feste Filme entstanden.

Die Analyse der gemessenen Röntgenspektren (Abbildung 4-15 unten) konnte die Annahme einer Modifikationsumwandlung dagegen nicht untermauern. Der Trocknungsprozeß führte hier - wie die oben beschriebene Langzeit-Lagerung bei 40 °C – eher zu einer Abnahme der Seitenkettenkristallinität als zur Ausbildung der höherkristallinen Modifikationen. Bereits nach einer Stunde ist der Reflex bei d = 0,415 (Pfeil) kaum noch zu erkennen, während im Nahwinkelbereich stärkere, periodische Reflexe auftreten, die eine Zunahme der lamellaren Anordnung der Glyceride belegen. Dies war zu erwarten, da die zuvor durch die geringe Partikelgröße von etwa 200 nm begrenzte Anzahl und Größe der Lamellen bei Aggregation der Partikel und Filmbildung zunehmen sollte. Die scharfen Reflexe im Bereich über 2 Theta = 7 ° nach 24 Stunden sind dem auskristallisierten Cyclosporin zuzuordnen.

Der scheinbare Widerspruch in den Ergebnissen der beiden Untersuchungsmethoden läßt sich auch hier durch die Folgerung auflösen, daß es zur Bildung größerer, lamellarer Strukturen mit flüssigkristallinem Charakter kommt. Der Netzebenenabstand dieser Strukturen konnte mit d = 52,4 Å ermittelt werden. Bei der vorliegenden dünnen Schicht von etwa 50 mg Dispersion / cm² und gegebener Möglichkeit der Wasserverdunstung setzt dieser Prozeß bereits nach einer Stunde ein.

Die Größe dieser lamellaren Strukturen und eventuell unter der Detektionsgrenze des Röntgengerätes liegende Anteile an höherkristallinen Bereichen (Triglyceride!), könnten auch hier für die Erhöhung des Peakmaximums verantwortlich sein.

Tabelle 4-9: Veränderung der thermoanalytischen Parameter Onset und Peakmaximum der Schmelzkurven ausgewählter Proben während einer 24stündigen Trocknungsperiode bei 32 °C in dünner Schicht (ca. 100 µL / 2 cm²) (NE = Nanoemulsion, alle Zeilen mit Imwitor = SLN)

		vor Trocknung	nach 1 h	nach 6 h	nach 24 h
Tagat S 5 % + Na.-cholat 1 % (Tensidlsg. 1)	Onset [°C]	kein Peak			29,21 62,36
	Peakmax. [°C]				32,82 67,90
Poloxamer 2,5 % + Na.-cholat 0,125 % (Tensidlsg. 2)	Onset [°C]	kein Peak			51,09
	Peakmax. [°C]				53,65
Cyclo-NE (Tensidlsg. 2)	Onset [°C]	kein Peak			40,79
	Peakmax. [°C]				43,73
Imwitor (Tensidlsg. 1)	Onset [°C]	57,42	56,46	57,38	60,09
	Peakmax. [°C]	59,67	58,46	59,73	61,56
Imwitor/Cyclo (Tensidlsg. 1)	Onset [°C]	50,74	53,46	53,21	57,70
	Peakmax. [°C]	55,93	57,25	55,85 (58,0)	60,74
Imwitor/Cyclo angedickt	Onset [°C]	52,34	50,20	48,40	59,13
	Peakmax. [°C]	56,58	56,76 (59,48)	56,88	60,99
Imwitor/Cyclo (Tensidlsg. 2)	Onset [°C]	54,62	53,49	58,66	38,43 58,47
	Peakmax. [°C]	57,86	59,72	46,52 59,59	43,79 60,68

Im Folgenden sollte geklärt werden, welche Faktoren die Bildung dieser Strukturen mit hoher Beweglichkeit der Fettsäureseitenketten begünstigt. In einem ersten Experiment wurde deshalb der Formulierung ein Gelbildner zugesetzt, um den Einfluß der Wasserkonzentration während des Trocknungsprozesses zu testen. Verwendet wurde Johannisbrotkernmehl, das auch für die Andickung der Proben bei der Röntgendiffraktometrie zum Einsatz kam.

Die Ergebnisse der Trocknung sind in Abbildung 4-16 abgebildet. Der Unterschied der Röntgenspektren gegenüber denen der nicht angedickten Probe ist gravierend. Zunächst erkennt man im Weitwinkelbereich deutlich, daß die Seitenkettenkristallinität während der Trocknung sogar zunimmt und eine polymorphe Transformation stattfindet.

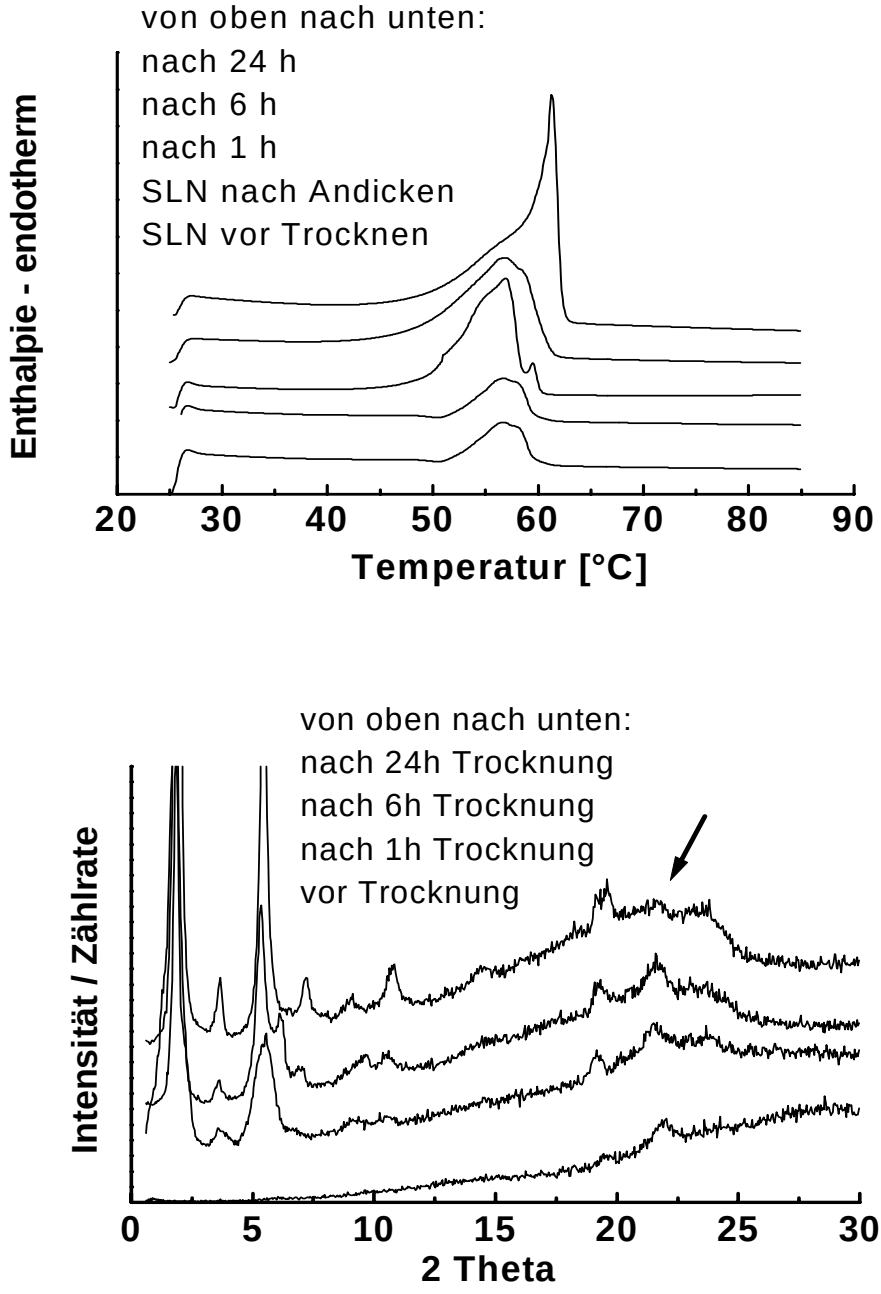
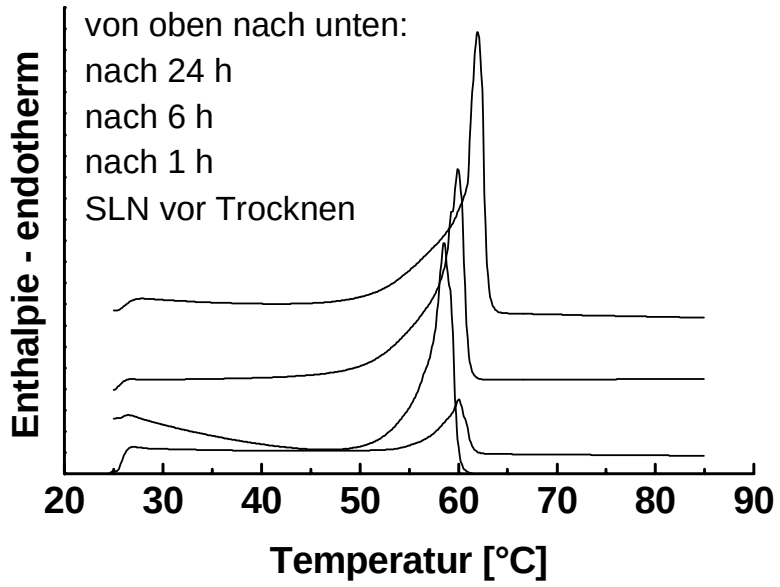


Abbildung 4-16: DSC-Schmelzkurven (oben) und Röntgenstreumuster (unten) des Trocknungsprozesses von Cyclosporin A-haltigen Imwitor-SLN (20 %) stabilisiert mit Tensidmischung 1 nach Andickung mit Johannisbrotkernmehl

Die ursprünglich vorliegende hexagonale α-Modifikation (d = 0,415) geht im Verlauf der Trocknung über β_i (d = 0,46 und 0,42) in eine überwiegende β-Modifikation mit trikliner Elementarzelle über. Der Reflex bei d = 0,42 ist nach 24 Stunden nur noch sehr schwach ausgeprägt (siehe Pfeil). Cyclosporin-Kristalle konnten hier nicht detektiert werden. Dies steht im direkten Widerspruch zu der Annahme, daß eine höhere Seitenkettenkristallinität einen Arzneistoffausstoß fördert. Eventuell erklärt die höhere Viskosität im System dieses Phänomen. Freigesetzte Arzneistoffmoleküle werden verstärkt in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt wodurch die Kristallbildung erschwert wird. Es besteht aber auch die Möglichkeit, daß der Arzneistoff in den Lipidpartikeln im Randbereich lokalisiert ist. Die Wahrscheinlichkeit, daß dort die Konzentration an Monoglyceriden am höchsten ist und es zu Wechselwirkungen mit dem Emulgator Tagat S kommt, wurden bereits erörtert (s. Kapitel 4.13).
Gestützt wird diese Annahme auch durch die Arbeiten von Zimmermann [3], die durch ESR-Messungen nachweisen konnte, daß die verwendete Spinsonde bei Imwitor-SLN in den Randbereichen des Lipids lokalisiert ist. Eine Zunahme der Kristallinität in anderen Bereichen des Lipids müßte folglich nicht unbedingt zu einem Arzneistoffausstoß führen.
Untersucht man den Nahwinkelbereich der Messungen, fällt wiederum die starke Zunahme der periodischen Reflexe auf, unterhalb 2 Theta = 5° sind sie sogar wesentlich intensiver als bei den nicht angedickten Proben. Die Zunahme der lamellaren Ordnung wird durch den Gelbildner folglich nicht aufgehoben. Die Erhöhung kann auch darauf zurückgeführt werden, daß die gebildeten Strukturen in diesem Fall nicht durch entstandene Cyclosporin-Kristalle gestört werden. Wasserentzug durch den Gelbildner scheint lediglich die freie Beweglichkeit der Fettsäureseitenketten einzuschränken, d. h. die Entstehung flüssigkristalliner Strukturen ist an einen bestimmten Wassergehalt gekoppelt sei er gebunden oder frei. Die Schmelzkurven unterschieden sich nur geringfügig allerdings hatte die Peakbreite der angedickten Probe nach 24 Stunden stärker abgenommen, die Onset-Temperatur stieg auf 59,1 °C.

In einem zweiten Experiment sollte eine Beeinflussung durch den Arzneistoff ausgeschlossen und die Bedeutung der Tensidkonzentration untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde eine 20 %ige Placebo-Charge mit nur 2,5 % Tagat S und 0,125 % Natriumcholat hergestellt und getrocknet. Der im Verhältnis stärker reduzierte Natriumcholat-Anteil wurde u. a. deswegen gewählt, weil die Bildung flüssigkristalliner Strukturen durch Gallensalze - alleine oder in Kombination mit anderen amphiphilen Molekülen - durchaus bekannt ist [108].

In Abbildung 4-17 unten beweist das nach 24 Stunden aufgenommene Streumuster, daß der Arzneistoff keinen Einfluß auf die gebildete Struktur hat und die verringerte Tensidkonzentration zu keiner Zunahme der Seitenkettenkristallinität führt. Es sind keine Reflexe im Weitwinkelbereich zu erkennen.



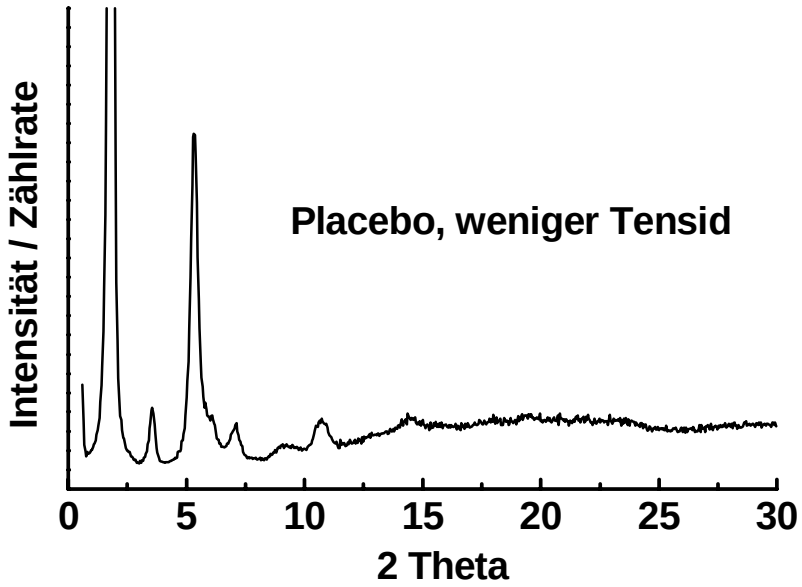


Abbildung 4-17: DSC-Schmelzkurven (oben) und Röntgenstreumuster (unten) des Trocknungsprozesses von arzneistofffreien Imwitor-SLN (20 %) stabilisiert mit Tagat S 2,5 % und Natriumcholat 0,125 %. Das Röntgenstreumuster wurde nach 24 h Trocknung aufgenommen.

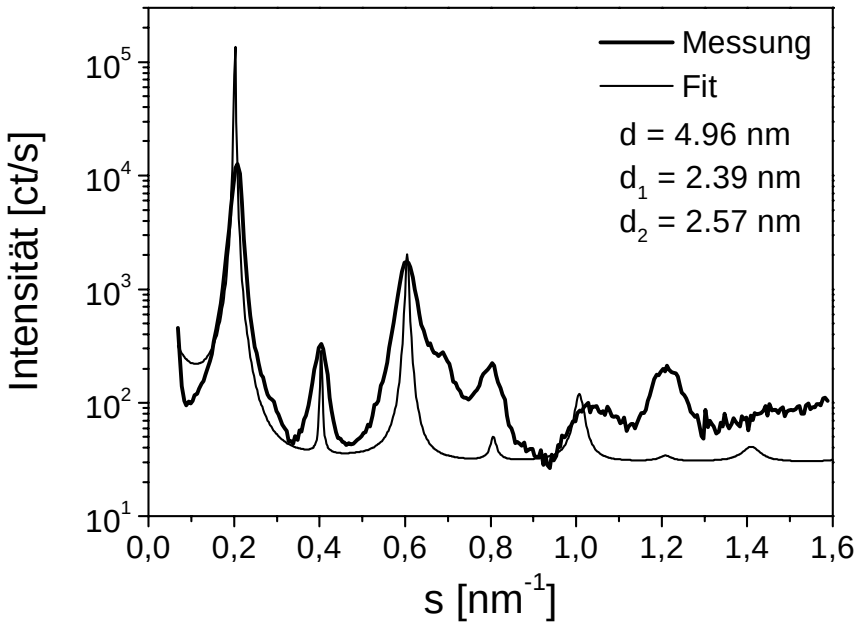


Abbildung 4-18: Kleinwinkelbereich der Streukurve der arzneistofffreien Imwitor-SLN (20 % Lipid) nach 24 Stunden Trocknung, sowie die nach Wolff et al. gefittete Funktion mit den berechneten Parametern, d, d_1 und d_2 [175]

Der Kleinwinkelbereich der nach 24 Stunden Trocknung erhaltenen Streukurve dieser Probe wurde analog Wolff et al. unter Verwendung des Stapelmodells ausgewertet, um detailliertere Informationen über die entstandene Grundstruktur zu erhalten (Gleichung 3 in [175]).

Als Hauptkomponente konnte auf diese Weise eine lamellare Grundstruktur mit einer Langperiode von d = 49,6 Å ermittelt werden (Abbildung 4-18). Die jeweiligen Schichtdicken d_1 und d_2 werden von den polaren Kopfgruppen (d_1) und den Alkylketten (d_2) gebildet und sind sich auffallend ähnlich. Ein Teil des Fettes bildet eine weitere Struktur, da nicht alle Reflexe zuzuordnen sind. Polymorphie liegt vor, die beschriebene Hauptkomponente macht jedoch vermutlich >90 % des Volumenanteils aus.

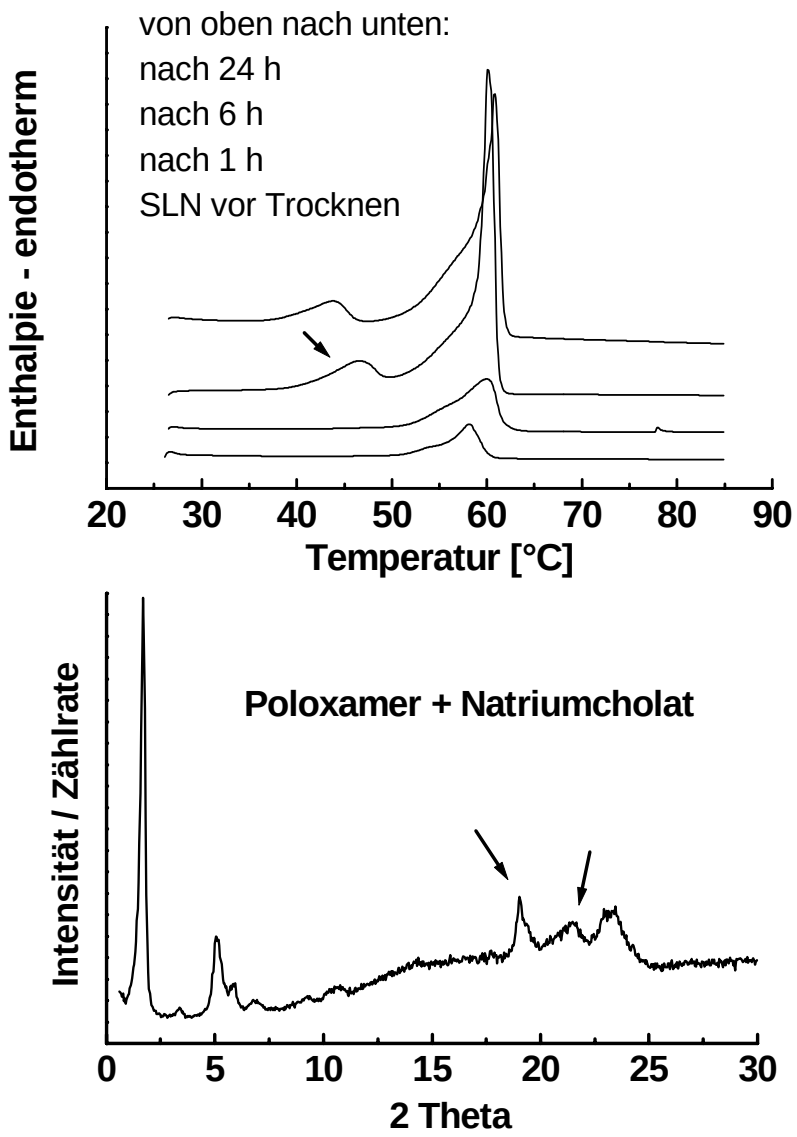


Abbildung 4-19: DSC-Schmelzkurven (oben) und Röntgenstreumuster (unten) des Trocknungsprozesses von Cyclosporin A-haltigen Imwitor-SLN stabilisiert mit Poloxamer 188 2,5 % und Natriumcholat 0,125 %. Das Röntgenstreumuster wurde nach 24 h Trocknung aufgenommen.

Im letzten Experiment dieser Reihe wurde der Emulgator Tagat S durch Poloxamer 188 ersetzt. Beide nicht-ionogenen Tenside besitzen Polyethoxy-Teilstrukturen, der Glycerolmonostearat-Anteil des Tagat wird aber mit größerer Wahrscheinlichkeit mit dem Lipid interagieren als die Polyoxypropylen-Blöcke des Poloxamer. Tatsächlich hat der Emulgator Tagat S einen erheblichen Einfluß auf die Struktur der Fettsäureseitenketten. Abbildung 4-19 unten zeigt eine nach 24 Stunden Trocknung der Poloxamer-Charge stark ausgeprägte und hochkristalline β_i / β-Modifikation. Tabelle 4-10 charakterisiert die Nahwinkelreflexe vor und nach Trocknung.

Tabelle 4-10: Kleinwinkelreflexe der Poloxamer-stabilisierten Cyclosporin-SLN vor und nach Trocknung bei 32 °C über 24 h, sowie die berechneten Streuvektoren (s) und Netzebenenabstände (d)

Vor Trocknen		Nach 24 h Trocknen		
2 Theta	d [nm]	2 Theta	s [1 / nm]	d [nm]
1,6 - 1,72	5,52 - 5,14	1,68	0,190 (= s1)	5,26
		3,36	0,380 (= 2*s1)	2,63
5,4 – 5,6	1,64 – 1,58	5,08	0,575 (= 3*s1)	1,74
		5,88	0,665	1,503
		6,74	0,765 (= 4*s1)	1,311

Während man bei der ursprünglichen SLN-Dispersion noch keine klar definierten Peaks erkennen kann, ist die anhand der Streuvektoren s sehr gut sichtbare Periodizität nach 24 Stunden auch hier gegeben (Abbildung 4-19 unten, Tabelle 4-10). Der Netzebenenabstand der Lamellen liegt bei ca. 53 Å.
Die abgebildeten Aufheizkurven (Abbildung 4-19 oben) belegen darüber hinaus, daß zumindest ein Teil des Poloxamer während der Trocknungsphase auskristallisiert. Der Schmelzpeak ist bereits nach 6 Stunden deutlich bei ca. 45 °C auszumachen (Werte in Tabelle 4-9). Während alle anderen untersuchten Chargen in den ersten Stunden zunächst keine Zunahme oder sogar eine Abnahme des Peakmaximums aufweisen, ist dieses bei der Poloxamer-stabilisierten Probe bereits nach einer Stunde um 2 °C erhöht, d. h. die Umwandlung erfolgt besonders rasch.
Im folgenden Abschnitt sollte durch Freisetzungsuntersuchungen geklärt werden, ob sich die beobachteten Unterschiede im Trocknungsverhalten auf die Arzneistoff-Freisetzung in Franz-Diffusionszellen auswirken.

4.1.6 Arzneistofffreisetzung

Zur Beurteilung der Freisetzung des Arzneistoffes aus den partikulären Formulierungen wurde im Rahmen dieser Arbeit als Vergleich jeweils eine entsprechende Nanoemulsion gewählt. Diese wurde auf gleiche Weise durch Hochdruckhomogenisation heiß hergestellt, die feste Lipidkomponente wurde aber durch eine flüssige ersetzt. Die Wahl fiel hier auf Octyldodecanol, da Cyclosporin A in diesem wesentlich besser löslich ist als in dem von Jenning verwendeten Miglyol 812 (s. Kapitel 4.2).

Es wurden zwei Nanoemulsionen (NE) folgender Zusammensetzung hergestellt:

	Cyclosporin	Octyldodecanol	Tagat S	Polox. 188	Natriumcholat	Wasser
NE 1	4 %	16 %	5 %		1 %	ad 100 %
NE 2	1 %	14 %		2,5 %	0,125 %	ad 100 %

Tabelle 4-11 zeigt die Ergebnisse der Partikelgrößenanalytik mittels PCS und LD. Die Größen liegen im Bereich der untersuchten SLN bzw. der im folgenden Kapitel beschriebenen NLC. Die Messung der Zetapotentiale ergab ebenfalls analoge Werte für die Nanoemulsionen. Sie lagen für die 4 %ige bei –18,7 mV (pH = 7) und für die 1 %ige bei –21,6 mV. Daß die Werte trotz stark differierender Konzentration an ionogenem Emulgator in der gleichen Größenordnung liegen, kann u.a. dadurch erklärt werden, daß Cyclosporin-Kristalle alleine in auf 50 µS eingestelltem Wasser von pH 6,7 ein positives Zetapotential von 14,9 mV aufweisen und dadurch in der höherkonzentrierten Charge ein größerer Anteil des Natriumcholats zur Kompensation aufgewendet werden muß.

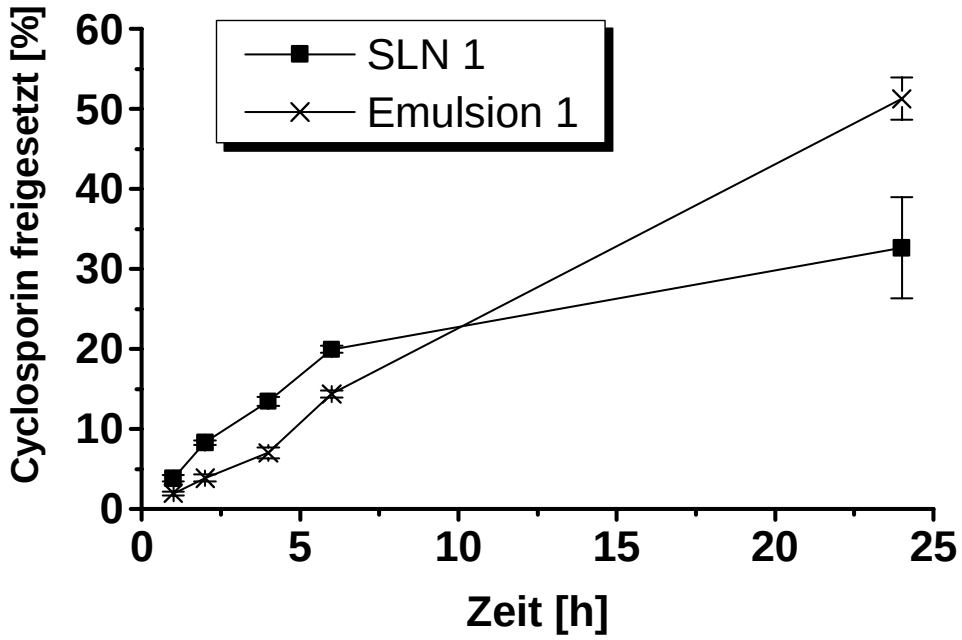
Der durch HPLC ermittelte Gehalt der Emulsionen lag bei 93,7 ± 2,8 % (4 %) und bei 100,8 ± 1,9 % (1 %). Der höhere Verlust der 4 %igen Charge ist darauf zurückzuführen, daß dieser Gehalt schon im Bereich der Sättigungskonzentration liegt und die Lösung des gesamtes Arzneistoffes in dem heißen Öl einen längeren Zeitraum in Anspruch nimmt. Auch können hier bereits nach wenigen Wochen Arzneistoffkristalle am Boden des Vial detektiert werden, während dies bei der 1 %igen Probe über mehrere Monate nicht der Fall ist.

Die Freisetzungsuntersuchungen erfolgten stets an Tag 1 nach Herstellung in Franz-Diffusionszellen mit n = 3 für beide Formulierungen über 24 Stunden. Die freigesetzte Menge an Arzneistoff in Prozent wurde auf den am selben Tag bestimmten Gehalt der Formulierungen bezogen.

Tabelle 4-11: Partikelgrößencharakterisierung der beiden Nanoemulsionen im Vergleich

	PCS		**Laserdiffraktometrie [µm ± S]**		
	mittl. Ø [nm ± S]	**PI ± S**	**LD 50**	**LD 90**	**LD 95**
4 %	160,7 ± 6,55	0,17 ± 0,027	0,160 ± 0,009	0,413 ± 0,026	0,504 ± 0,031
1 %	196,3 ± 3,66	0,13 ± 0,018	0,180 ± 0,011	0,404 ± 0,013	0,481 ± 0,011

In Abbildung 4-20 ist die Cyclosporinfreisetzung der Formulierungen mit 4 % (oben) und 1 % (unten) Gehalt an Arzneistoff gegen die Zeit aufgetragen.



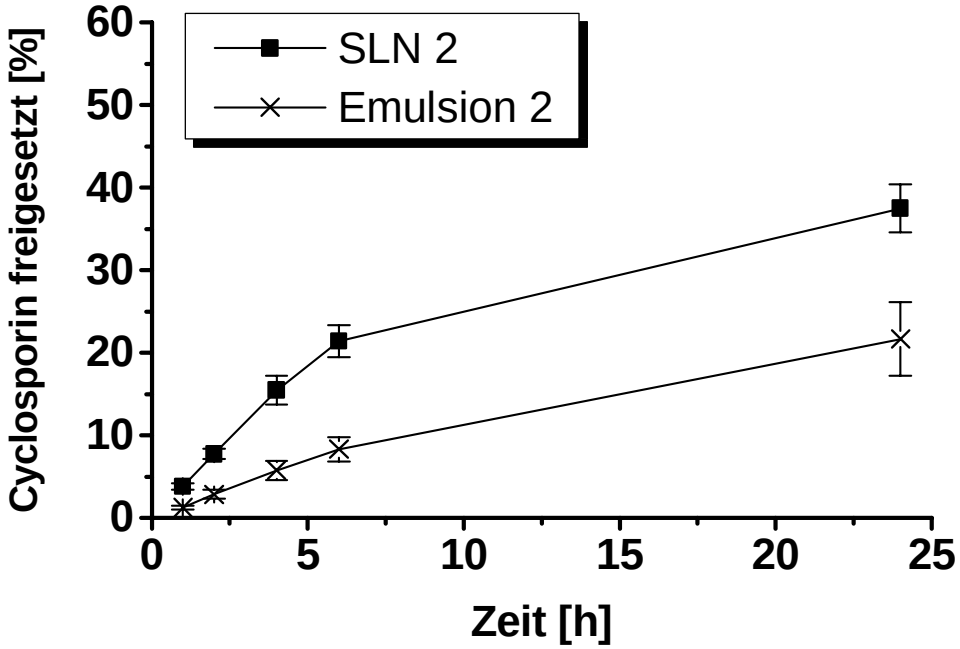


Abbildung 4-20: Cyclosporin A-Freisetzung aus 4 %igen (oben) und 1 %igen (unten) SLN bzw. Nanoemulsionen über 24 Stunden

Sowohl die höher konzentrierte SLN-Charge mit 20 % Lipidgehalt und der Tagat S / Natriumcholat Stabilisierung (= SLN 1), als auch die 15 %ige, hauptsächlich Poloxamer-stabilisierte Charge (= SLN 2) zeigten in den ersten Stunden eine stärkere Freisetzung als die entsprechenden Nanoemulsionen. Beide SLN-Formulierungen weisen dabei einen über den gesamten Zeitraum abnehmenden Flux auf. Für die SLN 1 konnten die entsprechenden Werte nach 2 Stunden mit J = 375 µg / cm² / 2h und nach 24 Stunden mit 45 µg / cm² / 2h ermittelt werden, bei den SLN 2 sank der Flux von anfänglich 97 µg / cm² / 2h auf 20 µg / cm² / 2h. Nach 6 Stunden haben beide etwa 20 % der enthaltenen Arzneistoffmenge freigesetzt. Die Abnahme des Flux kann auf eine zunehmende Behinderung der Arzneistoffdiffusion durch das feste Lipid bei Wasserverdunstung und Filmbildung zurückgeführt werden. Die SLN-Proben ließen sich im Anschluß an das Experiment als feste, zusammenhängende Filme von den Membranen abheben.
Die Unterschiede im Trocknungsverhalten der beiden Imwitor-Chargen sowie die differierende Arzneistoffbeladung des Lipids führten nicht zu signifikanten Unterschieden im Freisetzungsverhalten. Auch die mit Johannisbrotkernmehl angedickten SLN 1 zeigten ein zu den nicht angedickten SLN fast identisches Freisetzungsprofil, obwohl die Unterschiede im Trocknungsmuster deutlich ausgeprägt waren. Prinzipiell gibt es dafür zwei Erklärungsansätze:
1. Eine polymorphe Transformation des festen Lipids beeinflußt die Freisetzung des darin eingeschlossenen Arzneistoffes nicht.
2. Der Arzneistoff befindet sich zum Zeitpunkt der Freisetzung nicht in dem Teil des Lipids, der die Transformation erfährt.
Gegen den ersten Erklärungsansatz spricht die Tatsache, daß Cyclosporin A als zyklisches Undecapeptid nur sehr schwer Raum in einem hochkristallinen Lipidgitter (β_i oder β-Modifikation) finden würde. Es ist also eher davon auszugehen, daß sich die Arzneistoffmoleküle hauptsächlich in Lipidbereichen mit geringer oder fehlender Kristallinität befinden und diese ihre Struktur während der Freisetzung nicht wesentlich verändern.
Schote et al. konnten mittels ^{2}H-NMR, isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) und CD-Spektroskopie belegen, daß Cyclosporin A aufgrund hydrophober Wechselwirkungen im Inneren der Lipiddoppelschichten von Liposomen lokalisiert ist [176]. Wie bereits diskutiert könnte sich der Arzneistoff im Fall des SLN-Systems folglich in den monoglyceridreichen Arealen des komplexen Imwitorgemisches befinden, deren Fettsäureketten ebenfalls eine höhere Mobilität besitzen. Der initiale Arzneistoff-Burst wird so erklärbar. In welcher Weise sich andere Bereiche des Lipids verändern (u. a. Bildung hochkristalliner Domänen) wäre in diesem Fall für die Freisetzung von untergeordneter Bedeutung. Abbildung 4-21 zeigt vereinfacht den möglichen Aufbau der Partikel.

Im Kern befinden sich hauptsächlich die lipophileren Di- und Triglyceride, zur Grenzfläche hin nimmt die Konzentration an amphiphilen Monoglyceriden zu. Der Arzneistoff ist aufgrund seiner hohen Löslichkeit in dieser Randschicht lokalisiert. Modifikationsänderungen während der Trocknung finden hauptsächlich im Lipidkern statt und haben somit keinen Einfluß auf die Freisetzung.

Die Nanoemulsionen zeigen je nach Konzentration dagegen ein unterschiedliches Freisetzungsverhalten. Nanoemulsion 1 (Abbildung 4-20, oben) weist einen konstanten Flux über den gesamten Zeitraum auf (nach 2 Stunden 185 µg / cm² / 2h und nach 24 Stunden 191 µg / cm² / 2h) und hat folglich am Ende der Freisetzung mit 51,3 % etwa 20 % mehr Cyclosporin freigesetzt als die SLN.

Diese Freisetzungskinetik annähernd 0. Ordnung wird jedoch nur bei der hochbeladenen Nanoemulsion erzielt. Unter diesen Bedingungen ist der Arzneistoff auf der Donatorseite in so großem Überschuß vorhanden, daß die Konzentration über den Versuchszeitraum praktisch nicht abnimmt (infinite dose technique) und somit stets das gleiche Konzentrationsgefälle zwischen beiden Kompartimenten aufrecht erhalten wird. Nach dem 1. Fick'schen Diffusionsgesetz resultiert daraus ein konstanter Flux. Die Nanoemulsion 2 (in Abbildung 4-20, unten), mit 6,7 % Cyclosporin bezogen auf das Öl, zeigt dagegen eine Abnahme der Freisetzungsrate. Der Flux sinkt von 44 auf 12 µg / cm² / 2h und bleibt damit über den gesamten Zeitraum unter dem der entsprechenden Imwitor-SLN.

Es kann also zusammenfassend festgestellt werden, daß - zumindest für die Cyclosporin A-haltigen Systeme - bei Verwendung komplex zusammengesetzter Lipide eine Korrelation des Trocknungsverhaltens mit der Freisetzung nicht möglich ist. Die in den Röntgenspektren beobachteten Unterschiede führten nicht zu variierenden Freisetzungsprofilen bei den SLN.

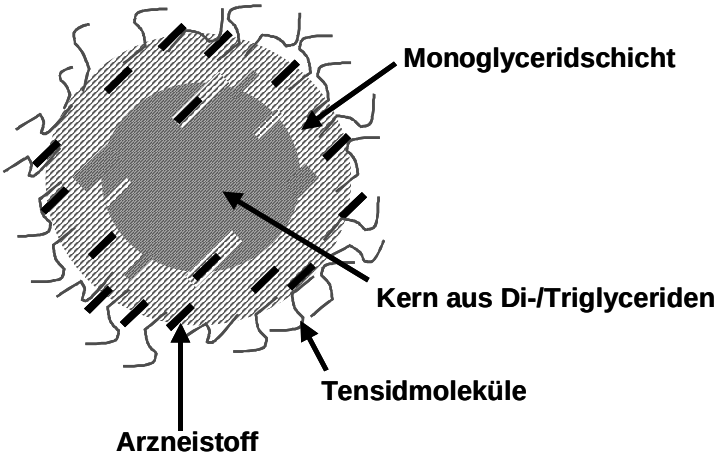


Abbildung 4-21: Vereinfachte Darstellung eines Cyclosporin A-haltigen Nanopartikels auf Imwitor-Basis

Durch Austausch des Lipids sollte dessen Einfluß auf die Freisetzung beleuchtet werden. Statt Imwitor 900 wurde das bereits von Jenning verwendete Compritol 888 ATO eingesetzt.

4.1.7 Vergleich mit einer reinen Compritol-SLN Formulierung

Eine Beladung mit 20 % Cyclosporin analog der hochkonzentrierten Imwitor-Charge war aufgrund der schlechteren Löslichkeit des Arzneistoffes in Compritol 888 ATO nicht möglich. Runge ermittelte die Löslichkeit mit <10 %. Es wurde daher lediglich eine Charge mit 6,7 % Beladung (1 % in der Formulierung) verwendet.
Die Rezeptur setzte sich wie folgt zusammen: Cyclosporin 1 %, Compritol 14 %, Poloxamer 188 2,5 %, Natriumcholat 0,125 %, Wasser ad 100 %. Die Rezeptur diente damit auch als direkter Vergleich zu den in Kapitel 4.2 beschriebenen NLC-Formulierungen.

4.1.7.1 Charakterisierung

In Bezug auf Größe und Ladung lagen die Compritol-SLN im Bereich der Imwitor-Partikel. Der PCS-Durchmesser betrug an Tag 1 214 nm, der LD 95 wurde mit 0,47 µm bestimmt, das Zetapotential lag bei –19,5 mV (pH 6,3). Die Rezeptur war jedoch von mangelhafter Stabilität. Innerhalb von einer Woche trat bei allen Lagertemperaturen Gelbildung und Aggregation auf. Abbildung 4-22 zeigt die Umwandlung von der zu Beginn vorliegenden orthorhombischen β' zur triklinen β_i / β-Modifikation innerhalb der ersten 100 Tage bei Raumtemperatur. Zu diesem Zeitpunkt waren unter polarisiertem Licht in allen Proben Cyclosporin-Kristalle erkennbar.

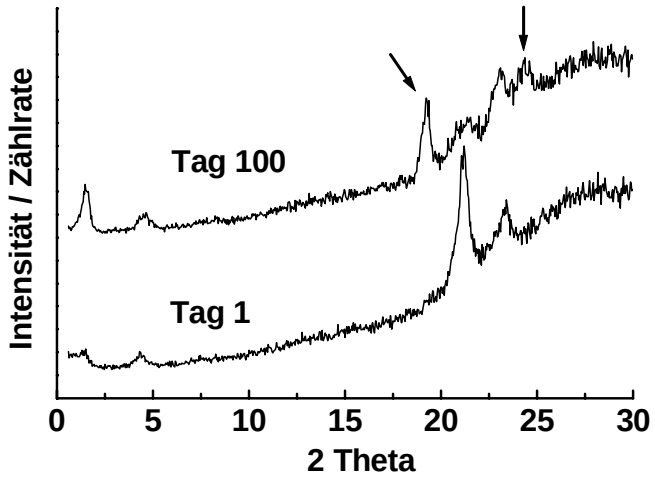


Abbildung 4-22: Röntgenstreukurven der 15 %-igen Compritol-Formulierung mit 1 % Arzneistoff an Tag 1 und nach 100 Tagen Lagerung bei RT, die Pfeile deuten auf die β_i / β-Reflexe bei d = 0,465 und 0,375

4.1.7.2 Untersuchung des Trocknungsverhaltens

Abbildung 4-23 zeigt die thermoanalytische und röntgendiffraktometrische Auswertung des Trocknungsprozesses dieser Charge. Bereits nach einer Stunde hat das Peakmaximum in der Aufheizkurve seinen höchsten Wert von 71,3 °C erreicht. Der Schmelzpeak des Poloxamer erscheint hier nach 6 Stunden (s. Pfeil, oben).
Die Untersuchung der Röntgenstreumuster (unten) zeigt auch für Compritol die starke Zunahme der Reflexe im Nahwinkelbereich mit ausgeprägt lamellarer Anordnung der Lipide. Die Fettsäureseitenketten zeigen nach 24 Stunden noch Kristallinität und Umwandlung zu höher geordneten Strukturen (Abnahme des Reflexes bei d = 0,42 und Zunahme des Reflexes bei 0,465 (Pfeil)). Die Reflexintensität ist hier jedoch generell schwach.

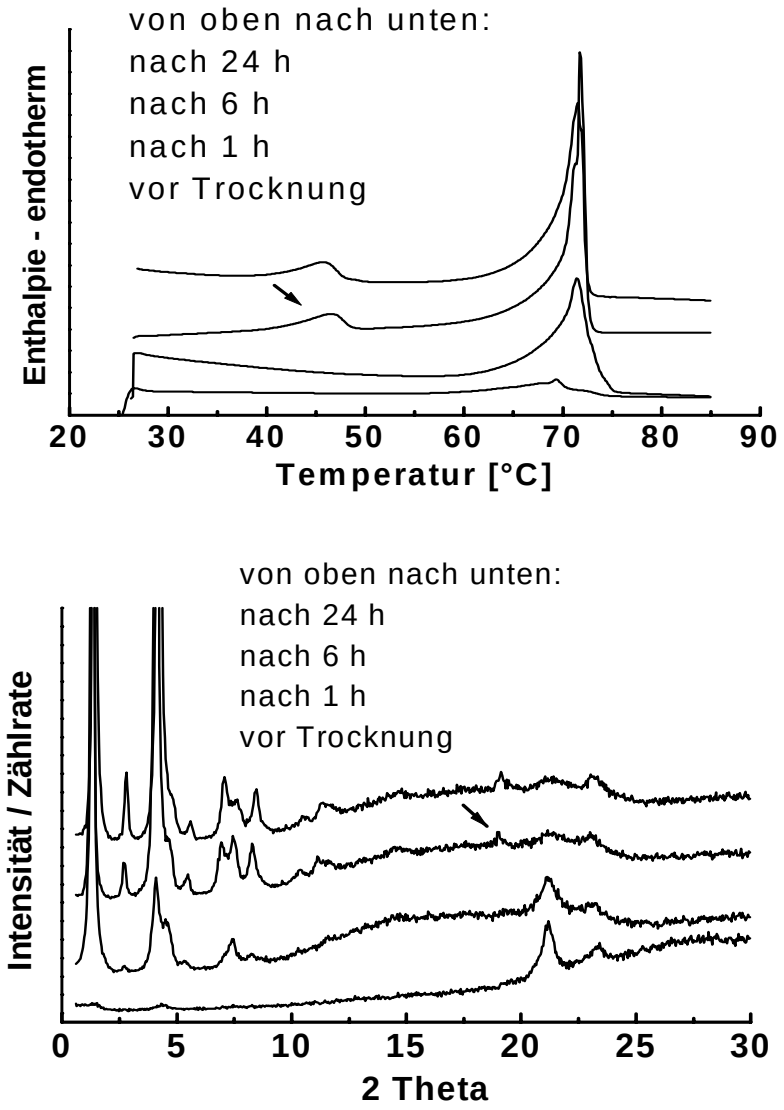


Abbildung 4-23: DSC-Schmelzkurven (oben) und Röntgenstreukurven (unten) des Trocknungsprozesses von Cyclosporin A-haltigen Compritol-SLN (Erklärung s. Text)

Auch bei Compritol handelt es sich um ein Glyceridgemisch, jedoch liegt der Gehalt an Monoglyceriden bei < 18 % und die langkettige Behensäure macht > 80 % der Fettsäurefraktion aus.
Selbst wenn es hier ebenfalls zur Bildung monoglycerid- und cyclosporinreicher Lipidanteile käme, sollte sich die polymorphe Transformation der übrigen Lipidfraktionen stärker auf die Freisetzung auswirken, da nicht der gesamte Arzneistoff im Monoglyceridanteil gelöst sein kann.
Eine Auswertung des Kleinwinkelbereiches analog Wolff et al. ergab einen Netzebenenabstand der Lamellen von d = 62,3 Å. Im Vergleich zu der entsprechenden getrockneten Imwitor-Charge entspricht das einer Zunahme um ca. 10 Å. Dies kann u. a. mit der Länge der Fettsäureketten erklärt werden, da Compritol hauptsächlich Behensäure (C_{22}) enthält, während die maximale Kettenlänge in Imwitor 900 18 C-Atome beträgt.

4.1.7.3 Arzneistofffreisetzung

Die Cyclosporinfreisetzung der Compritol-SLN ist im Vergleich zu den bereits beschriebenen Imwitor- und Octyldodecanol-Chargen in Abbildung 4-24 dargestellt. Innerhalb der ersten vier Stunden erfolgt die Freisetzung des Wirkstoffs bei beiden SLN-Formulierungen nahezu identisch. Anschließend nimmt jedoch der Flux aus der Compritol-Charge nicht im gleichen Ausmaß ab. Die nach Abschluß des Experimentes freigesetzte Gesamtmenge liegt daher um mehr als 10 % höher (bezogen auf den jeweils ermittelten Gehalt).
Daß die Freisetzung der Compritol-Charge erst im Verlauf des Experimentes von der Imwitor-Charge abzuweichen beginnt, deutet auf eine zunehmende Verschlechterung der Löslichkeit während des Versuches hin. Ein Einfluß der polymorphen Transformation des Lipids mit Verdrängung des Arzneistoffes analog Jenning ist hier folglich anzunehmen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß sich der Arzneistoff bei den untersuchten Imwitor- und Compritol-SLN hauptsächlich in den Randbereichen der Partikel befindet. Während die Cyclosporin-Freisetzung aus Imwitor-SLN nicht durch das Trocknungsverhalten beeinflußt wurde, konnte im Vergleich für Compritol-SLN eine leichte Steigerung verzeichnet werden, die erst nach mehr als vier Stunden auftrat und somit auf Veränderungen der Lipidmatrix zurückgeführt werden kann.

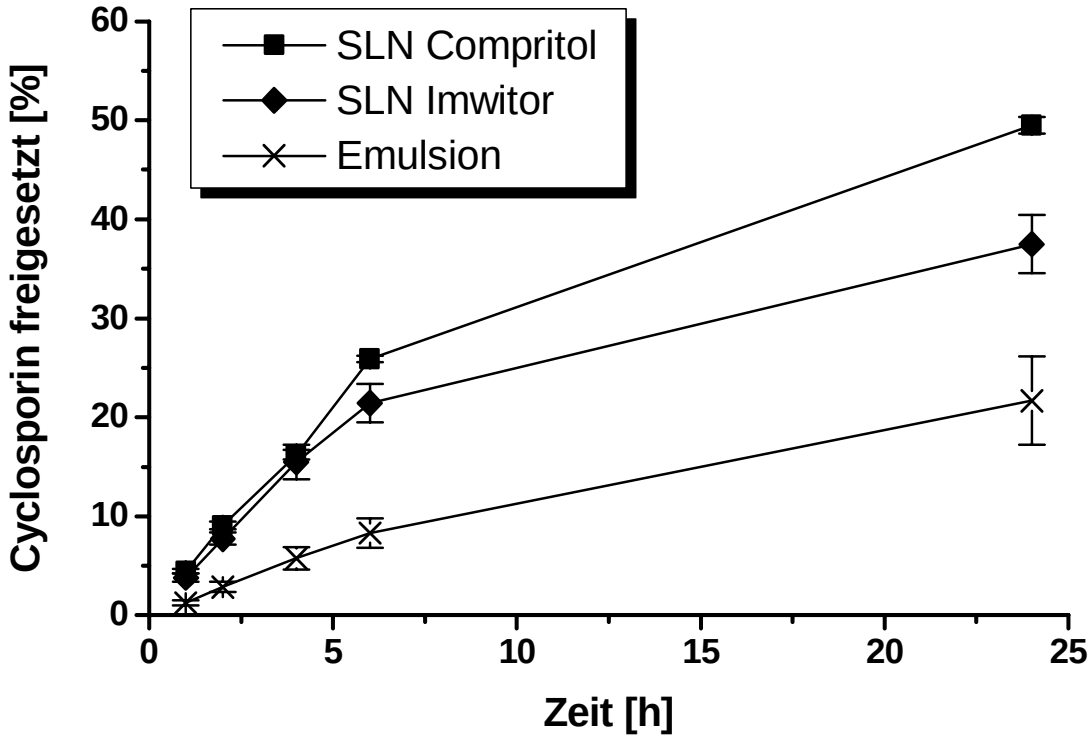


Abbildung 4-24: Cyclosporin A-Freisetzung aus Compritol-SLN im Vergleich zu Imwitor-SLN und einer Nanoemulsion über 24 Stunden (allgemeine Zusammensetzung: Lipid 14 %, Cyclosporin A 1 %, Poloxamer 188 2,5 %, Natriumcholat 0,125 %, Wasser ad 100 %)

4.1.8 Zusammenfassende Diskussion

Anhand der von Runge entwickelten Cyclosporin-Imwitor-Formulierung wurden weitere Erkenntnisse über die Möglichkeit der Stabilisierung flüssiger SLN-Dispersionen gewonnen. Eine umfangreiche Studie zum Einfluß der Abfüllparameter ergab in dem Fall eine gesteigerte Stabilität, wenn die Dispersionen direkt nach Herstellung heiß abgefüllt und verschlossen und die Vials vollständig befüllt wurden. Die ausschließlich mittels Ultra-Turrax hergestellten Chargen, sowie die im Bulkgefäß gelagerten, wiesen dagegen eine deutlich schlechtere Stabilität auf.

Runges Beobachtung, daß sich Lagerung der Chargen bei 40 °C in Bezug auf die Partikelgröße positiv auswirkt, konnte nur in Teilen bestätigt werden. Dieser Effekt trat nur bei reinen Imwitorpartikeln auf. Während Runge dagegen nach 30 Tagen mit Hilfe der von ihm entwickelten Zentrifugationsmethode noch eine fast vollständige Arzneistoffinkorporierung bei 40 °C-Lagerung unterstellte, konnte durch Bestimmung der Arzneistoffkonzentrationen im unteren und oberen Drittel der Gefäße eine deutliche, temperaturabhängige Separation mit Aufkonzentrierung des Arzneistoffes am Gefäßboden festgestellt werden. Diese durch Erhöhung der Temperatur beschleunigte Arzneistoffkristallisation konnte durch Polarisationsmikroskopie bestätigt werden.
Es stellt sich folglich die Frage, ob die durch Runge etablierte Bestimmung der Inkorporationsrate nach Abzentrifugieren der SLN zur Untersuchung der Langzeitstabilität geeignet ist. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Kombination von Mikroskopie und modifizierter Probenziehung für die HPLC erwies sich zur Detektion des Arzneistoffausstoßes als vorteilhafter.

Es war darüber hinaus möglich, diese Arzneistoffverdrängung mit Veränderungen der Kristallstruktur zu korrelieren. Während jedoch eine Modifikationsumwandlung in der Regel nur in Verbindung mit Wirkstoffkristallisation anzutreffen war, konnten Kristalle auch in Formulierungen mit unverändertem kristallographischem Muster und sogar bei abnehmender Seitenkettenkristallinität gefunden werden.
Dies war vor allem bei 40 °C-Lagerung der Fall, da eine leicht erhöhte Temperatur die Kristallisation von Cyclosporin A unabhängig von den Eigenschaften der Matrix begünstigt. Um eine optimale Lagerstabilität von arzneistoffhaltigen SLN zu erreichen, ist es demnach nicht ausreichend, die polymorphe Umwandlung von Lipiden zu verzögern oder im besten Fall zu verhindern. Die Kristallisationseigenschaften des Arzneistoffs müssen bei Wahl der Lagerungsbedingungen ebenfalls berücksichtigt werden.
Im Fall der beschriebenen Formulierungen bedeutet dies konkret, daß arzneistofffreie Chargen bei leicht erhöhten Temperaturen, cyclosporinhaltige dagegen unter Kühlung gelagert werden sollten, um die Stabilität der an sich aggregationsgefährdeten Imwitor-Formulierungen zu verbessern.
Tempern bei erhöhten Temperaturen führte bei einigen SLN-Formulierungen auf Imwitor-Basis zur Ausbildung lamellarer Strukturen mit flüssigkristallinem Charakter. Während dieser Prozeß in verschlossenen Injektionsflaschen erst nach über sechs Monaten beobachtet wurde, trat er unter Trocknungsbedingungen auf einem offenen Träger innerhalb weniger Stunden auf.

Untersuchungen der Arbeitsgruppe Siekmann/Westesen unter Verwendung von Monoolein und einer Kombination von Ultraschalldispergierung und Homogenisation deuten zusätzlich darauf hin, daß die Herstellung flüssigkristalliner Lipidnanopartikel auf Basis der in Imwitor enthaltenen Monostearate und Monopalmitate möglich ist [168].

Die Frage, ob das Trocknungsverhalten einer Formulierung als geeigneter Parameter zur Voraussage des Freisetzungsprofils herangezogen werden kann, mußte in Bezug auf die beschriebenen Imwitor-Formulierungen verneint werden. Die durchaus erheblichen Unterschiede der kristallographischen Veränderungen während der Trocknung konnten nicht mit entsprechenden Differenzen im Freisetzungsverhalten korreliert werden. Erklärt wurde dies durch einen mehrschichtigen Partikelaufbau mit Lokalisation der Arzneistoffmoleküle in der monoglyceridreichen Grenzfläche.
Bei Verwendung von Compritol mit erniedrigtem Monoglyceridanteil konnte dagegen ein Einfluß der Modifikationsumwandlung im Verlauf der Freisetzung beobachtet werden. Polymorphe Transformationen waren hier auch während der Lagerung ausgeprägter und führten selbst bei Kühlung zu Arzneistoffausstoß und -kristallisation innerhalb kurzer Zeit.
Die Möglichkeit einer zutreffenden Voraussage nimmt folglich mit steigender Homogenität der Lipidmatrix zu. Im Fall eines heterogenen Gemisches können beobachtete Veränderungen der Kristallstruktur unter Umständen nur in den Teilbereichen der Partikel erfolgen, die nicht an der Inkorporation des Arzneistoffs beteiligt sind.

4.2 NLC-Dispersionen: Zumischung einer flüssigen Lipidkomponente

Wie bereits in Kapitel 2.2 beschrieben und diskutiert, wurden von Jenning, Lippacher und Zimmermann bisher unterschiedliche NLC-Systeme hergestellt [3, 12, 16]. Jenning postuliert für sein Compritol / Miglyol / Retinol-System das Vorliegen von Öl-Clustern im Inneren der Partikel und erklärt dadurch die verzögerte Freisetzung des Wirkstoffs. Lippacher unterstützt dieses Modell mit seinen ESR-Messungen an Wachs-NLC aus Cetylpalmitat und Cetiol A (Laurylsäurehexylester). Die Spinsonde TEMPO wurde hier langsamer durch Natriumascorbat abgebaut als nach Einarbeitung in eine Nanoemulsion. Zimmermann konnte dies für ihr Imwitor / Miglyol / Spinsonden-System jedoch nicht bestätigen. Es existierte hier kein Unterschied zwischen dem Abbau der Spinsonde in NLC oder einer Nanoemulsion. Sie postulierte deshalb das Vorliegen von stark ölhaltigen Randbereichen der Partikel. Das verwendete feste Lipid scheint also einen erheblichen Einfluß auf die Struktur der gebildeten Partikel zu haben. Imwitor 900 als Matrixmaterial zeigte dabei erneut die Tendenz, Fremdmoleküle – in diesem Fall die flüssige Lipidkomponente – in den Partikelrandbereichen einzulagern.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die von Jenning und Lippacher beobachtete Erhöhung der Beladbarkeit auch für Cyclosporin zu realisieren ist, ein Auskristallisieren des Arzneistoffs während der Lagerung verhindert werden kann und die Freisetzung durch Veränderung der Lipidmatrix bei Applikation gefördert wird.

Da Cyclosporin in Imwitor 900 bereits besser löslich ist als in den meisten Ölen und aus genannten Gründen ein Einfluß des festen Lipids auf die Freisetzung hier nicht zu erwarten war, wurde analog Jenning Compritol 888 ATO verwendet. Ein weiterer Vorteil dieses Lipids ist der relativ hohe Schmelzpunkt von ca. 70 °C, der auch bei höherer Ölbeladung die Ausbildung fester Partikel ermöglicht. Um die geeignete flüssige Lipidkomponente zu ermitteln, wurden zunächst Lösungsversuche durchgeführt. Dazu wurden Mischungen von 0,1 g Cyclosporin und 0,9 g Öl in 20 mL Glasvials eingewogen und eine Stunde lang bei 85 °C geschüttelt. Nach 15, 30, und 60 Minuten erfolgte eine visuelle Kontrolle auf Kristalle, nach Erkalten wurden die zuvor gelösten Proben erneut auf Kristallisation untersucht. Den Ölen, die 10 % Arzneistoff gut lösen konnten, wurden in weiteren Experimenten steigende Mengen Arzneistoff zugesetzt und so die ungefähre Löslichkeit ermittelt. Tabelle 4-12 zeigt ausgewählte Resultate dieser Untersuchung. Ungesättigte Fettsäuren hatten mit Abstand das höchste Lösungsvermögen für Cyclosporin. Parikh et al. bestimmten die Löslichkeit von Cyclosporin in reiner Linolsäure mit 575 mg / mL und konnten durch

Zusatz von 10 % Linolsäure zu Miglyol 818 die Löslichkeit mehr als verdoppeln [177]. Da reine Linolsäure sehr kostspielig ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit mit einem Gemisch gearbeitet, das einen Gehalt von 60 % Linolsäure aufwies. Die Löslichkeit von Cyclosporin lag hier, wie auch in Ölsäure, zwischen 40 und 50 %. Ein weiterer Vorteil vor allem der mehrfach ungesättigten ω-6 -Fettsäuren ist ihre Wirksamkeit bei Psoriasis und atopischer Dermatitis [178, 179]. Eine Unterstützung des Cyclosporin-Effektes wäre bei topischer Applikation zu erwarten.

Als nachteilig erweist sich – neben dem teilweise sehr hohen Preis - die Oxidationsempfindlichkeit der ungesättigten Fettsäuren. Verwendung des Linolsäure-Gemisches macht eine exakte Charakterisierung der Partikel darüber hinaus schwer, da sich die Frage stellt, ob es in den Partikeln zu einer Entmischung der flüssigen Komponenten kommt.

Der unempfindliche, verzweigtkettige Alkohol Octyldodecanol zeigte ebenfalls eine gute Löslichkeit für Cyclosporin von knapp 20 %. Durch zusätzlichen Einsatz von Tensiden konnten Nanoemulsionen mit 20 % Beladung hergestellt werden, in denen über einige Tage keine Kristallisation des Arzneistoffes auftrat (s. Kapitel 4.16). Zur Herstellung der 15 %igen NLC-Dispersionen wurde deshalb hauptsächlich auf Octyldodecanol zurückgegriffen. Darüber hinaus wurden die ungesättigten Fettsäuren versuchsweise zur Herstellung halbfester NLC-Dispersionen eingesetzt (s. Kapitel 6.2).

Tabelle 4-12: Löslichkeit von Cyclosporin A (10 %) in verschiedenen flüssigen Lipiden bei 85 °C und nach Abkühlen (+ = keine Kristalle sichtbar, / = einige Restkristalle sichtbar, - = nicht gelöst)

Lipid	15 min	30 min	60 min	Nach Abkühlen
Olivenöl	-	-	/	-
Rizinusöl	-	-	+	-
Isopropylmyristat	/	/	/	-
PEG 600	/	/	/	-
PEG 400	+	+	+	+
Miglyol 812	/	/	/	-
Octyldodecanol	+	+	+	+
Octyldodecanol (15 % Cyclo.)	+	+	+	+
Octyldodecanol (20 % Cyclo.)	/	/	+	/
Octyldodecanol (25 % Cyclo.)	/	/	/	-
Linolsäure 60%	+	+	+	+
Linolsäure 60% (20 % Cyclo.)	+	+	+	+
Linolsäure 60% (50 % Cyclo.)	/	/	/	-
Ölsäure (20 % Cyclo.)	+	+	+	+
Ölsäure (50 % Cyclo.)	/	/	/	-

4.2.1 Verhalten der Bulkmischungen

In einem ersten Experiment wurde die Mischbarkeit der beiden Lipidkomponenten getestet. Dazu wurden 20 mL Vials mit einer Gesamtlipidmenge von 2 g in unterschiedlichen, physikalischen Mischungsverhältnissen befüllt und bei 85 °C eine Stunde unter Schütteln inkubiert. Der Ölanteil lag zwischen 13 und 87 % Octyldodecanol. Nach Entfernen aus dem Inkubationsschrank erstarrten alle Proben in der Reihenfolge steigender Ölbeladung. Nach vollständigem Abkühlen über Nacht hatten alle Mischungen ein homogenes Aussehen. Anschließend wurden sie thermoanalytisch vermessen. Tabelle 4-13 enthält die ermittelten Werte für Peakmaximum, Onset und Schmelzenthalpie der Aufheizkurven. Betrachtet man den Wert bei 50 % Ölbeladung als Ausreißer ergibt sich eine lineare Abnahme der Temperatur des Peakmaximums mit R = 0,995. Auch Onset (R = 0,983) und Enthalpie (R = 0,993) zeigen eine durchgängige Abnahme. Ein analoges Verhalten zeigen die Abkühlkurven, die Werte finden sich in Tabelle 4-14. Die Ergebnisse zeigen, daß von einer unbegrenzten Mischbarkeit der Komponenten auszugehen ist.

Tabelle 4-13: Peakmaximum, Integral und Onset der DSC-Aufheizkurven von Compritol / Octyldodecanol-Bulkmischungen mit steigendem Ölanteil

Anteil Octyldodecanol	**0 %**	**13,3 %**	**23,3 %**	**33,3 %**	**40 %**
Peakmaximum [°C]	73,42	70,44	67,29	64,23	63,3
Integral [J/g]	135,59	110,26	100,38	90,67	86,65
Onset [°C]	69,48	66,26	63,47	61,57	57,49

Anteil Octyldodecanol	**50 %**	**60 %**	**67 %**	**77 %**	**87 %**
Peakmaximum [°C]	64,89	60,14	57,35	56,34	52,71
Integral [J/g]	41,92	67,74	50,48	36,61	23,6
Onset [°C]	56,6	57,09	54,14	51,31	45,41

Tabelle 4-14: Peakmaximum, Integral und Onset der DSC-Kristallisationskurven von Compritol / Octyldodecanol-Bulkmischungen mit steigendem Ölanteil

Anteil Octyldodecanol	**0 %**	**13,3 %**	**23,3 %**	**33,3 %**	**40 %**
Peakmaximum [°C]	65,97	61,49	60,75	59,35	57,77
Integral [J/g]	-134,08	-111,04	-98,03	-83,27	-77,09
Onset [°C]	70,24	67,25	64,75	61,88	60,06

Anteil Octyldodecanol	**50 %**	**60 %**	**67 %**	**77 %**	**87 %**
Peakmaximum [°C]	53,03	52,88	51,25	47,93	44,47
Integral [J/g]	-47,39	-53,78	-42,64	-30,23	-18,53
Onset [°C]	56,2	54,85	53,45	49,75	46,83

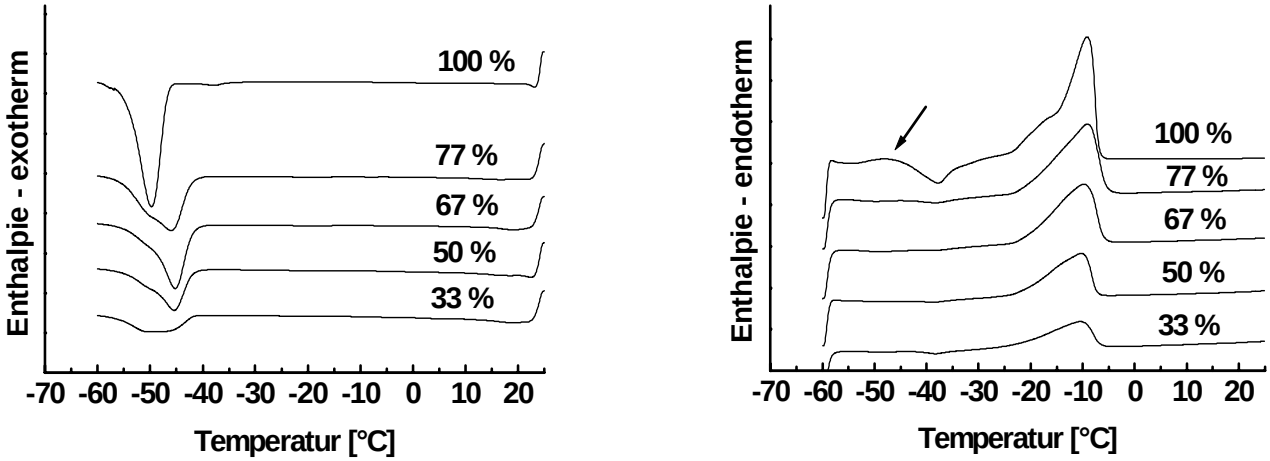


Abbildung 4-25: DSC-Kühlkurven (links) und anschließendes Aufheizen (rechts) von Octyldodecanol / Compritol-Mischungen mit variierendem Ölanteil in %. 100 % entspricht dem reinen Öl. Der Pfeil deutet auf den Schmelzpeak der energiereicheren Modifikation des Octyldodecanol.

Um die Struktur des Ölanteils näher zu untersuchen, wurden die Proben zusätzlich auf –60 °C abgekühlt. Abbildung 4-25 zeigt die Abkühlkurven (links) und Aufheizkurven (rechts) der höherkonzentrierten Mischungen. Das Maximum des Haupt-Kristallisationspeaks von reinem Octyldodecanol konnte mit –49,5°C ermittelt werden. Eine schwach ausgeprägte Polymorphie ist nur bei reinem Öl zu erkennen. Während des Aufheizens ist ein erster Schmelzprozeß bei –48 °C zu beobachten (Pfeil), nach Auskristallisieren dieser Fraktion in einer geordneteren Modifikation, kommt es zum erneuten Schmelzen des gesamten Öls bei –9,4 °C. Bereits nach Zumischen von 23 % Compritol tritt nur noch die höherkristalline Modifikation auf. Auf eine Zuordnung der Modifikationen des verzweigtkettigen Alkohols wurde im Rahmen dieser Arbeit verzichtet. Mit abnehmender Ölbeladung wird der Kristallisationspeak deutlich breiter, was auf eine abnehmende Größe der ölhaltigen Bereiche hinweist. Da jedoch noch ein Kristallisationsprozeß zu verzeichnen ist (= Freisetzung von Gitterenergie), müssen die Ölmoleküle auch bei niedriger Konzentration zumindest noch in kleineren Clustern vorliegen.

Auch das Kristallisationsverhalten der beschriebenen 60 %igen Linolsäure in Mischung mit Compritol wurde untersucht. Trotz der komplexeren Zusammensetzung trat ein definierter Kristallisationspeak mit einem Maximum von -18,4 °C auf, der Schmelzprozeß hatte sein Maximum bei –11,5 °C. Die Betrachtung der Aufheizkurven der physikalischen Mischungen in Abbildung 4-26 macht jedoch deutlich, daß Compritol und Linolsäure 60 % keine unbegrenzte Mischbarkeit zeigen. Ab 50 % Ölbeladung kommt es zur Aufspaltung des Schmelzpeaks (Pfeil), und damit zur Ausbildung unterschiedlich zusammengesetzter Bereiche in der Fettmischung.

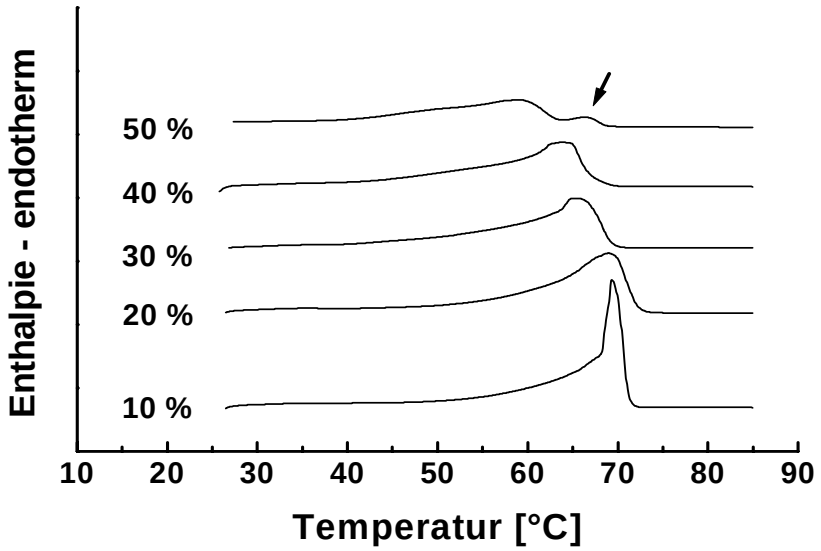


Abbildung 4-26: DSC-Aufheizkurven von Linolsäure (60 %) / Compritol-Mischungen mit variierendem Ölanteil in %.

Es wurden darüber hinaus Bulkmischungen unter Verwendung von Imwitor 900 als festem Lipid untersucht. Mit Octyldodecanol ergab sich wiederum eine unbegrenzte Mischbarkeit, die Werte der DSC-Messungen finden sich in Tabelle 4-15 und zeigen eine lineare Abnahme von Peakmaximum (R = 0,990), Onset (R = 0,974), und Schmelzenthalpie (R = 0,997) bis zu 70 % Ölbeladung. Mit Linolsäure konnten homogene Mischungen bis zu einer Beladung von 40 % hergestellt werden.
Zusammenfassend ließ die Untersuchung der Bulkmischungen Octyldodecanol als vielversprechenden Mischungspartner zur Herstellung von NLC erscheinen, obwohl aufgrund der chemischen Struktur des verzweigtkettigen Alkohols durchaus keine ausgezeichnete Mischbarkeit mit den festen Glyceriden vorauszusetzen war.

Tabelle 4-15: Peakmaximum, Integral und Onset der DSC-Schmelzkurven von Imwitor 900 / Octyldodecanol-Bulkmischungen mit steigendem Ölanteil

Anteil Octyldodecanol	0 %	10 %	20 %	30 %	40 %
Peakmaximum [°C]	60,21	59,58	58,72	57,22	55,86
Integral [J/g]	138,2	123,45	113,35	103,03	90,93
Onset [°C]	56,71	55,82	54,78	52,13	47,82

Anteil Octyldodecanol	50 %	60 %	70 %
Peakmaximum [°C]	53,63	52,83	50,80
Integral [J/g]	77,07	72,41	59,17
Onset [°C]	46,44	45,32	44,95

4.2.2 Charakterisierung von fest-flüssigen Dispersionen

Im nächsten Schritt wurden 15 %ige NLC-Formulierungen mit variierendem Ölgehalt hergestellt. Die gute Mischbarkeit der reinen Komponenten ist zwar eine wichtige Voraussetzung für die Herstellung komplex zusammengesetzter, homogener Lipidnanopartikel, allerdings ist die Übertragung des Bulk-Verhaltens auf den Nanometermaßstab nur begrenzt möglich. Imwitor 900 ist in Form der Bulkware eine komplex zusammengesetzte aber homogene Mischung verschiedener Glyceride. Wie in Kapitel 4.1 jedoch dargelegt, kommt es im Prozeß der SLN-Herstellung und Lagerung zumindest zur teilweisen Entmischung der Komponenten. Als Tenside kamen zunächst Tagat S (2,5 %) und Natriumcholat (0,5 %) zum Einsatz. Die Partikelgrößenanalytik ergab für alle Chargen ähnliche Werte. Sie finden sich in Abbildung 4-27. Lediglich die Nanoemulsion lag im PCS-Durchmesser etwa 20 nm unter den hergestellten festen Partikeln.

Im Rahmen der Thermoanalyse konnte für den Schmelzvorgang - wie auch bei den Bulkmischungen - ein linearer Zusammenhang zwischen zunehmender Ölbeladung und Abnahme von Peakmaximum (R = 0,995) und Enthalpie (R = 0,991) hergestellt werden (Abbildung 4-28 links und Abbildung 4-29).

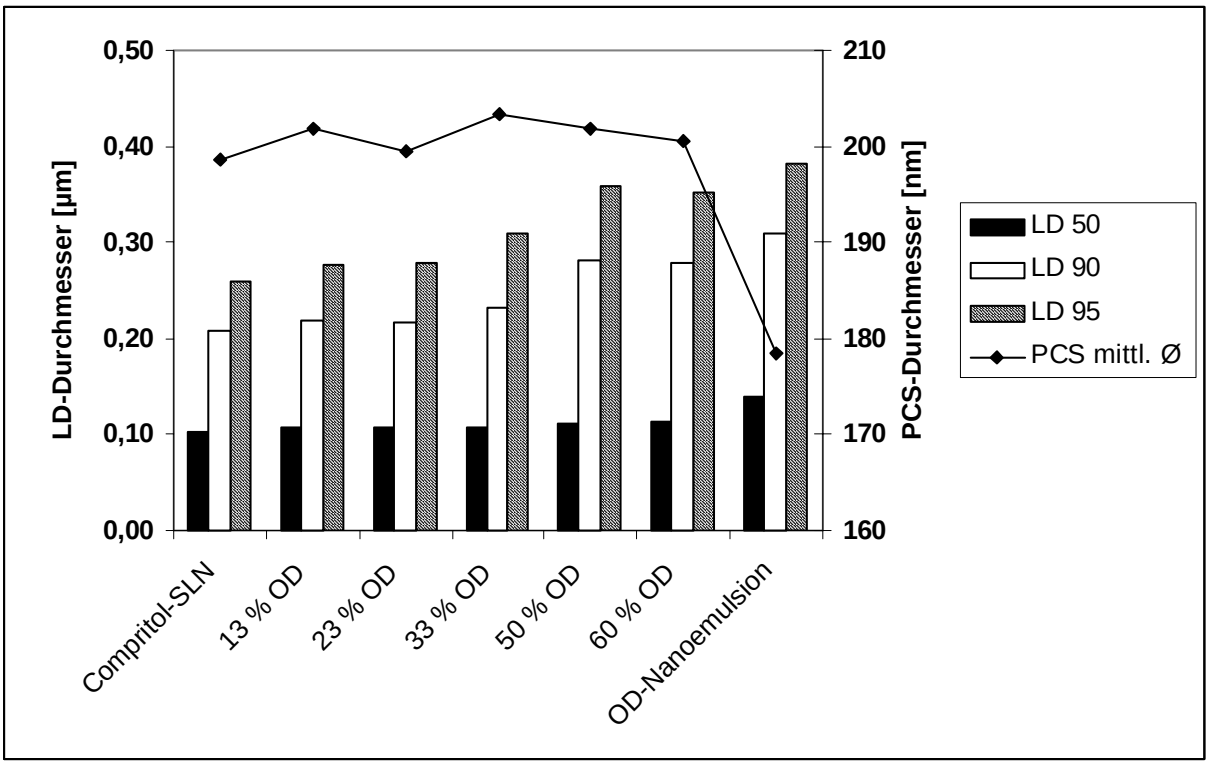


Abbildung 4-27: Ergebnisse der Partikelgrößenanalytik (LD und PCS) von Compritol-SLN im Vergleich zu Compritol / Octyldodecanol-NLC verschiedener Ölbeladung und einer Octyldodecanol-Nanoemulsion, gemessen an Tag 1 nach Herstellung

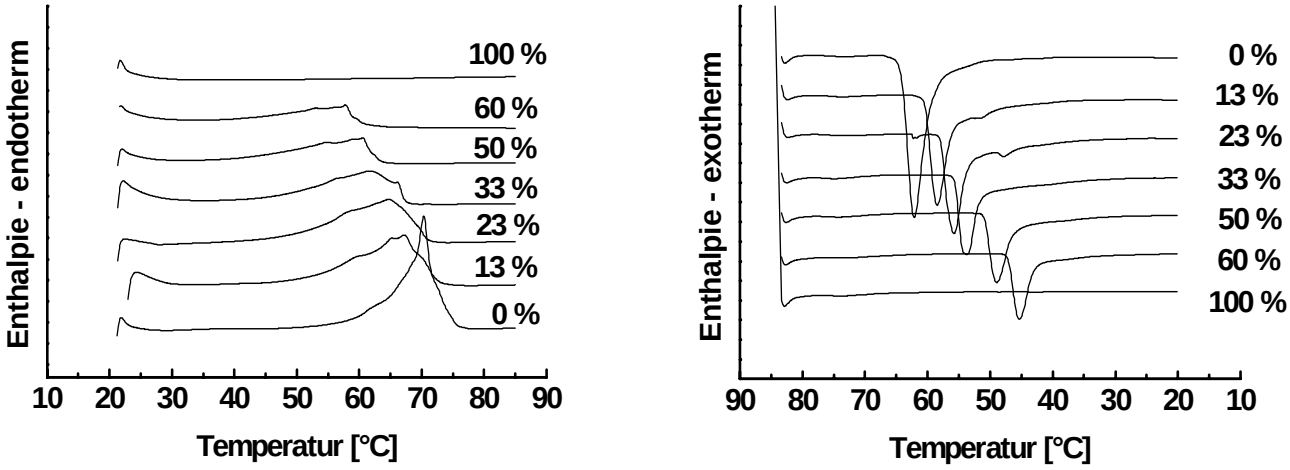


Abbildung 4-28: DSC-Aufheizkurven (links) und Kristallisationskurven (rechts) von Compritol-SLN (0 %), Compritol / Octyldodecanol-NLC mit variierendem Ölanteil und einer Octyldodecanol-Nanoemulsion (100 %)

Die Onsettemperatur sank bis zu einer Ölbeladung von 33,3 % ebenfalls linear (R = 0,999), blieb dann jedoch relativ konstant bei ca. 50 °C. Wie auch Jenning bereits bezüglich seiner Miglyol / Compritol-Mischungen beobachten konnte, sinkt der Onset mit einer Steigung der Regressionsgeraden von –0,54 °C/% wesentlich stärker ab als das Peakmaximum (-0,225 °C/%). Folglich kann auch hier auf eine zunehmende Heterogenität der kristallographischen Zusammensetzung der Partikel geschlossen werden. Es kommt zur Bildung von ölreichen und ölarmen Lipidfraktionen. Der Kristallisationsgrad berechnet auf den Compritolgehalt der Partikel veränderte sich durch einen Ölzusatz bis 50 % nicht. Werden SLN gleich 100 % Kristallinität gesetzt, ergaben sich für die NLC Werte von 106 %, 104 %, 102 % und 101 % (Daten geordnet nach steigender Ölbeladung von 13 % bis 50 %). Für 60 % Ölbeladung konnte dagegen ein Wert von lediglich 80 % ermittelt werden, d. h. die Glyceride des Compritol wurden hier am vollständigen Auskristallisieren gehindert.

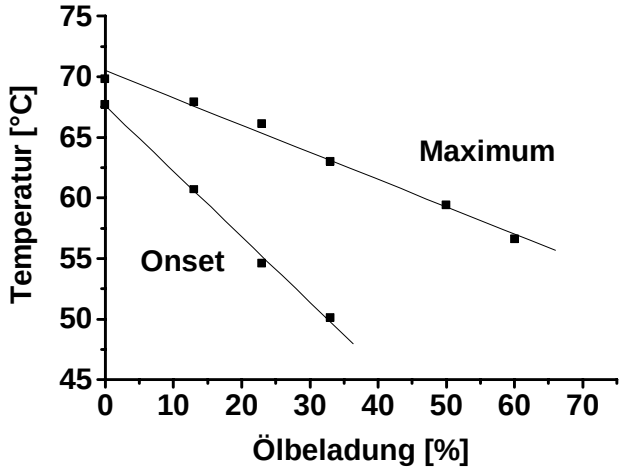


Abbildung 4-29:
Lage von Peakmaximum und Onsettemperatur der NLC (in° C) in Abhängigkeit von der Ölbeladung (in %)

Der Kristallisationsprozeß (Abbildung 4-28 rechts) verlief ebenfalls mit linearer Abnahme des Peakmaximums (R = 0,998), der Enthalpie (R = 0,996) und des Onsets (R = 0,999) bei zunehmender Ölbeladung. Onset und Maximum nahmen hier jedoch gleichmäßig ab (Steigung der Regressionsgeraden bei beiden = –0,29 °C/%).
Bei der Arbeit mit ölhaltigen Lipidnanopartikeln stellt sich – vor allem bei hoher Beladung – immer wieder die Frage, ob das flüssige Lipid tatsächlich in die Lipidpartikel integriert wird, oder ob neben den festen Partikeln eventuell eine Nanoemulsion gebildet wird. Bisher existieren, wie bereits diskutiert, widersprüchliche Aussagen zu diesem Thema. Zur Zeit werden von Jores et al. mit Hilfe von ESR und NMR nähere Untersuchungen durchgeführt, die eine weitere Aufklärung dieser Frage erwarten lassen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher auf analoge Messungen verzichtet. Die Tatsache, daß es bei steigender Ölbeladung während des Aufheizprozesses zu einer linearen Abnahme von Peakmaximum und Onset kommt, deutet jedoch auf eine entsprechend gestiegene Assoziation des Öls mit dem festen Lipid hin. Um auszuschließen, daß es während des Aufheizens der Probe in der DSC-Kammer zu einer Artefaktbildung und Verfälschung der Probe kommt, wurde eine 50 %ige NLC-Formulierung hergestellt und deren thermoanalytisches Verhalten mit dem einer 50 %igen Mischung der Nanoemulsion und der reinen Compritol-SLN verglichen. Zusammensetzung und Gehalt beider DSC-Proben waren somit identisch, so daß Unterschiede nur auf einen variierenden Aufbau der Dispersion zurückgeführt werden konnten. Abbildung 4-30 zeigt die Ergebnisse der beiden Messungen sowie als weiteren Vergleich die Kurve der reinen Compritol-SLN.

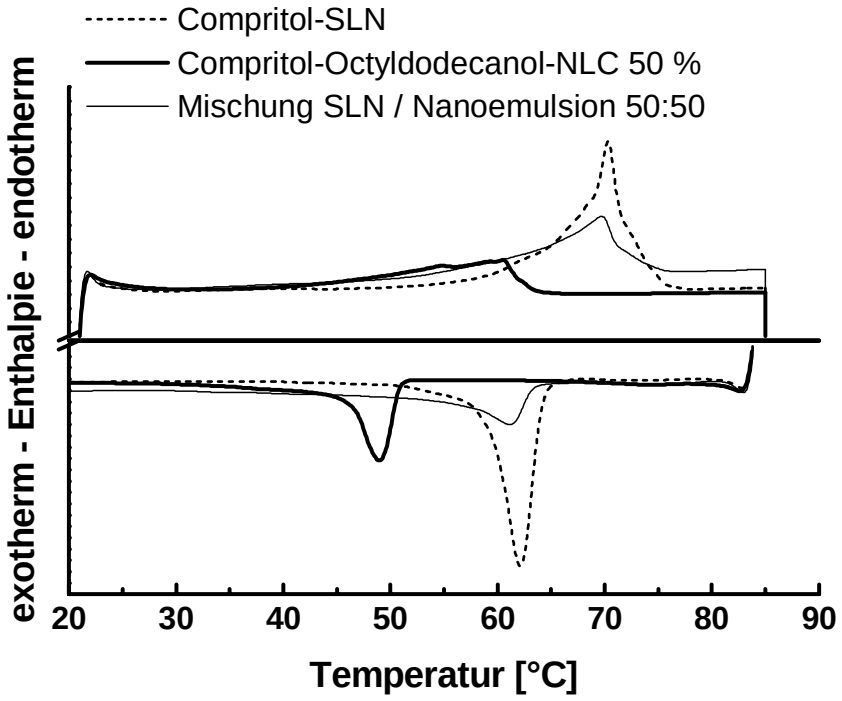


Abbildung 4-30: Gegenüberstellung der DSC-Kurven von SLN, NLC mit 50 %iger Beladung und einer 50:50 Mischung von SLN und Nanoemulsion

Es ist deutlich zu erkennen, daß bei Vorliegen einer Nanoemulsion neben ölfreien SLN-Partikeln das Peakmaximum im Vergleich zu den reinen Compritol-SLN kaum beeinflußt wird (69,4 °C gegen 69,9 °C), und nur die NLC-Formulierung eine starke Abnahme zeigt (60,3 °C). Zwar nimmt die Onsettemperatur der Compritol-SLN (67,4 °C) durch Zumischen der Nanoemulsion erheblich ab (62,2 °C), jedoch ist diese Abnahme längst nicht so ausgeprägt wie bei Vermessen der NLC-Formulierung (49,0 °C).
Auch die Struktur des Octyldodecanols als flüssige Komponente wurde verglichen. In Abbildung 4-31 sind die Kristallisationskurven von NLC, 50 %iger Mischung und Nanoemulsion abgebildet. Während in diesem Fall das Peakmaximum der Kristallisation weniger variiert, kann eine deutliche Verringerung der Kristallisationsenthalpie des Öls in NLC gegenüber der Nanoemulsion und der physikalischen 50:50 Mischung beobachtet werden. Demzufolge liegen die Moleküle des Öls zwar innerhalb der NLC in Verbänden vor, so daß eine Gitterbildung möglich ist, diese Verbände müssen aber deutlich kleiner sein als innerhalb der Nanoemulsionstropfen, da die freiwerdende Gitterenergie wesentlich geringer ist.
Die Ergebnisse zeigen eindeutig, daß zumindest ein Großteil des Öls in die Partikel integriert sein muß. Ob in diesem Fall eher das Modell nach Zimmermann (Öl im Randbereich) oder Jenning (Öl im Inneren) zutreffend ist, wird in Kapitel 4.26 anhand der Arzneistofffreisetzung diskutiert.

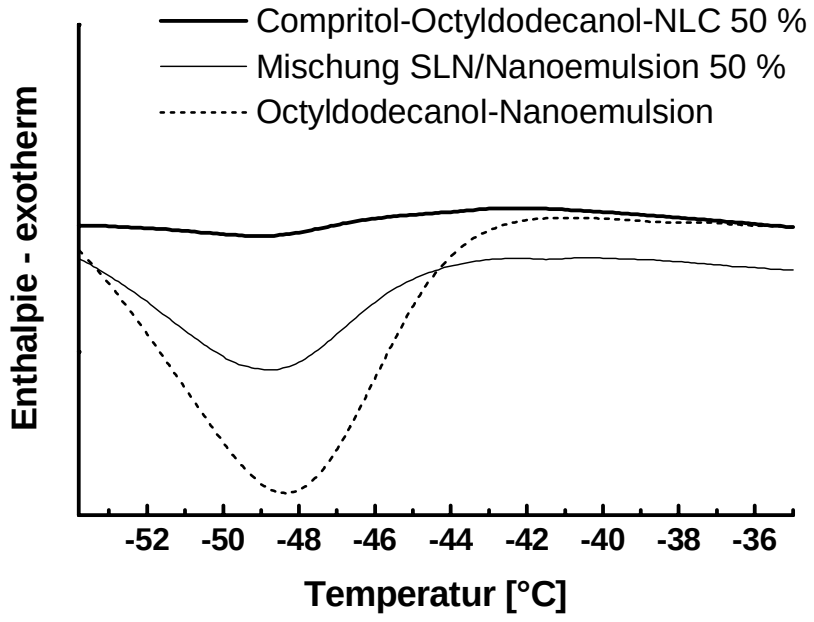


Abbildung 4-31: Gegenüberstellung der DSC-Abkühlkurven von einer Octyldodecanol-Nanoemulsion, NLC mit 50 %iger Beladung und einer 50:50 Mischung von SLN und Nanoemulsion

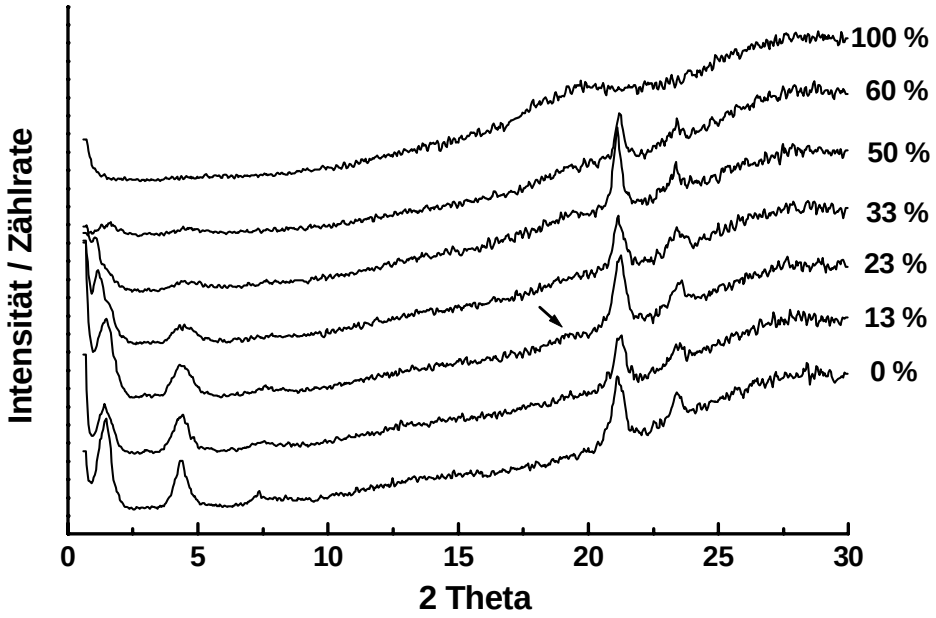


Abbildung 4-32: An Tag 1 nach Herstellung aufgenommene Röntgendiffraktogramme von Compritol-SLN (0 %), Compritol / Octyldodecanol-NLC mit variierendem Ölanteil und einer Octyldodecanol-Nanoemulsion (100 %) (Pfeil = leichter β_i-Reflex bei d = 0,46)

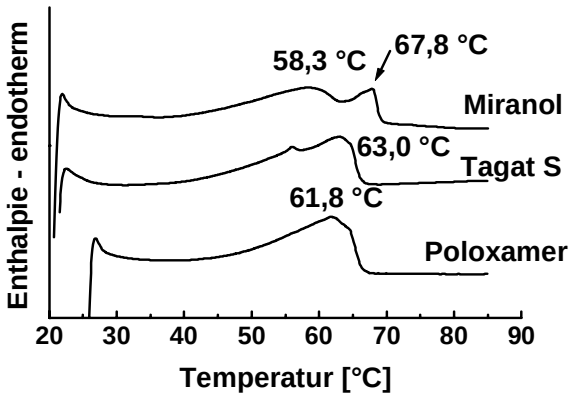
Durch Röntgendiffraktometrie sollte der Einfluß der Ölbeladung auf die Kristallmodifikation des Compritols untersucht werden. Wie in Abbildung 4-32 deutlich erkennbar, ist dieser Einfluß sehr gering. Alle Spektren der Nanopartikel-Dispersionen zeigen die für die β'-Modifikation charakteristischen Reflexe bei d = 0,38 und 0,42, die Nanoemulsion als Vergleich zeigt keine Kristallinität. Die von Jenning beobachtete verstärkte Bildung des β_i-Polymorphs ist hier wenn überhaupt nur sehr schwach ausgeprägt (s. Pfeil). Die Intensitätsabnahme der Reflexe im Nahwinkelbereich sowie ihre Verbreiterung deutet darauf hin, daß die Schichtenanordnung der Glyceride innerhalb der Partikel durch die zunehmende Ölbeladung gestört wird.

Da die Wahl des eingesetzten Tensids einen großen Einfluß auf die Kristallstruktur der SLN hatte, sollte dieser Parameter auch für die NLC-Partikel untersucht werden. Dazu wurden zwei weitere Formulierungen mit jeweils 15 % Gehalt an Gesamtlipid und 33,3 % Ölbeladung hergestellt. Diese Konzentration an Octyldodecanol wurde gewählt, da hier das Öl bereits in ausreichender Konzentration vorliegt, um größere Cluster zu bilden (NLC Typ III) und eine Erhöhung der Beladungskapazität mit Arzneistoff zu ermöglichen. Eine höhere Konzentration an Öl wurde vermieden, da nur bei überwiegendem Anteil an festem Lipid mit einem Einfluß von Modifikationsumwandlungen auf die Freisetzung gerechnet werden kann.

Tabelle 4-16: Ergebnisse der Partikelgrößenanalytik (PCS und LD) sowie Zetapotentiale unterschiedlich stabilisierter Compritol / Octyldodecanol-NLC (33 %) an Tag 1 nach Herstellung (Gesamtlipidgehalt: 15 %)

	PCS		Laserdiffraktometrie [µm]			ZP [mV]
	mittl. Ø [nm]	PI	LD 50	LD 90	LD 95	
Miranol Ultra 1,5 %	222,3	0,22	0,115	0,332	0,384	-46,3
Tagat S 2,5 % + Natriumcholat 0,5 %	210,0	0,25	0,108	0,218	0,276	-46,6
Poloxamer 188 2,5 % + Natriumcholat 0,125 %	265,7	0,20	0,178	0,429	0,503	-28,0

Tabelle 4-16 enthält die verwendeten Stabilisatoren, die Ergebnisse der Partikelgrößenanalytik sowie die Zetapotentialwerte bei pH 6,4. Während die Miranol- und Tagat S-stabilisierten Chargen ähnliche Größe und Oberflächenladung aufweisen, besitzt die Poloxamer-stabilisierte Charge einen höheren mittleren Durchmesser und aufgrund der niedrigen Konzentration an ionogenem Tensid ein geringeres, wenn auch zur Stabilisierung ausreichendes Zetapotential.
Abbildung 4-33 enthält die DSC-Aufheizkurven (links) und Röntgenspektren (rechts) der drei Formulierungen. Während alle drei Proben laut Röntgendiffraktometrie in der gleichen Modifikation vorliegen, erkennt man in den Aufheizkurven deutliche Unterschiede. Die Miranol-stabilisierte Charge zeigt eine Aufspaltung des Schmelzpeaks, was auf eine starke Entmischung der Lipide hinweist. Poloxamer- und Tagat-stabilisierte Proben zeigen ähnliche, homogene Kurven, jedoch ist die Reflexintensität der Tagat / Natriumcholat-Probe im Röntgendiffraktogramm durch geringere Seitenkettenkristallinität deutlich erniedrigt. Diese Tensidmischung scheint also auch die Kristallstruktur des monoglyceridärmeren Compritol zu beeinflussen.



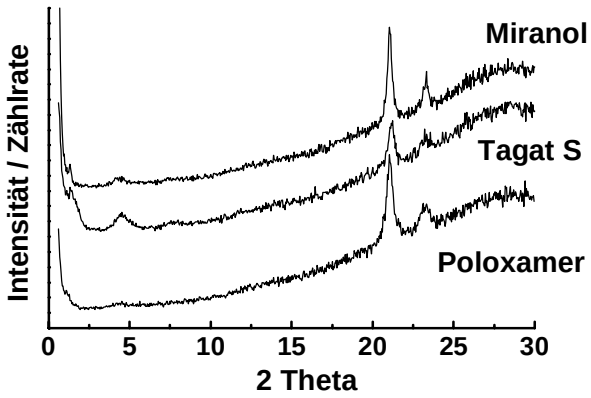


Abbildung 4-33: DSC-Aufheizkurven (links) und Röntgenstreukurven (rechts) unterschiedlich stabilisierter Compritol / Octyldodecanol-NLC an Tag 1 nach Herstellung

4.2.3 Charakterisierung nach Arzneistoffinkorporation

In die drei beschriebenen Rezepturen wurde jeweils 1 % Cyclosporin A eingearbeitet, wobei der Anteil an Octyldodecanol entsprechend gesenkt wurde. Die Formulierungen enthielten folglich 10 % Compritol und 4 % Octyldodecanol bezogen auf den Gesamtansatz. Die Arzneistoffbeladung entsprach mit 6,7 % bezogen auf die Lipidphase genau derjenigen, die auch für die 15 %igen Compritol-SLN in Kapitel 4.1.7 gewählt wurde. Die Poloxamer / Natriumcholat-Charge ist darüber hinaus identisch stabilisiert, so daß ein direkter Vergleich von SLN und NLC möglich wird (Poloxamer 188 2,5 %, Natriumcholat 0,125 %).

Abbildung 4-34 enthält die ermittelten Größen der drei NLC-Formulierungen im Vergleich. Sowohl untereinander als auch zu den entsprechenden arzneistofffreien Chargen sind keine wesentlichen Unterschiede zu erkennen, die Tagat-Formulierung hat auch hier den geringsten Durchmesser. Die Bestimmung der Oberflächenladung mittels Zetapotential ergab dagegen für alle Proben eine deutliche Absenkung gegenüber den arzneistofffreien Chargen. Der pH aller NLC-Formulierungen lag zwischen 6 und 7, gemessen wurde daher bei pH 6,5. Die Werte wurden mit -35,7 mV (Miranol), -25,9 mV (Tagat) und –18,6 mV (Poloxamer 188) ermittelt, so daß die Abnahme bei allen mindestens 10 mV betrug. Cyclosporin A scheint somit die Anlagerung der ionischen Tenside (Miranol, Natriumcholat) an die Partikeloberfläche zu verringern oder deren negative Ladung zu kompensieren. Besonders ausgeprägt ist die Abnahme bei der Tagat / Natriumcholat-Rezeptur (>20 mV), welche das negativ geladene Natriumcholat in höherer Konzentration enthielt. Dennoch kann aufgrund dieser Werte nicht auf eine mangelnde Stabilität geschlossen werden, da die Stabilisierung der geringer geladenen Formulierungen hauptsächlich auf sterischem Weg erfolgt.

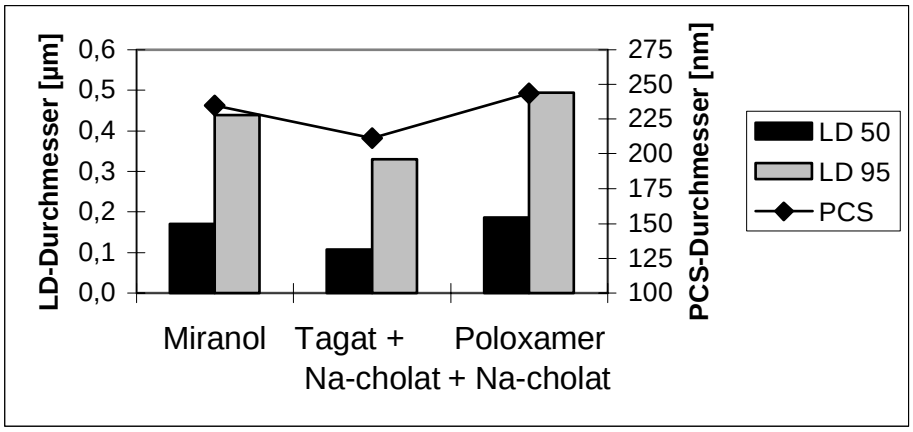


Abbildung 4-34: Partikelgrößen (LD und PCS) von unterschiedlich stabilisierten, Cyclosporin A-haltigen NLC-Formulierungen an Tag 1 nach Herstellung

Einarbeitung von Cyclosporin in NLC-Partikel führte zu keiner wesentlichen Veränderung der Kristallstruktur (Abbildung 4-35, rechts). Auch hier war die Seitenkettenkristallinität der Lipide in der Tagat-Formulierung herabgesetzt.
Wie in Abbildung 4-35 (links, 2. Kurve von unten) dargestellt, ließ eine weitere Erhöhung der Tensidkonzentrationen auf 5 % Tagat und 1 % Natriumcholat die Kristallinität noch weiter sinken, die Schmelzenthalpie nahm hier von 10,7 J / g auf 9,0 J / g ab. Das Schmelzverhalten war - wie auch bei Miranol-Stabilisierung - besonders heterogen und geprägt durch das Auftreten von Schultern.
Die Tensidmischung Poloxamer 188 2,5 % und Natriumcholat 0,125 % erwies sich aufgrund ihres homogenen Schmelzverhaltens und ausgeprägter Reflexintensität im Röntgendiffraktogramm als besonders geeignet (jeweils untere Kurven in Abbildung 4-35). Die Partikel sind von fester Struktur, die Glyceride zeigen ausgeprägte Seitenkettenkristallinität. Ein Schutz inkorporierter Fremdmoleküle wäre folglich zu erwarten. Darüber hinaus scheint die Ölfraktion hier im Vergleich zu den anders stabilisierten Partikeln in einer homogeneren Mischung mit den festen Lipiden vorzuliegen. Eine vollständige Phasentrennung kann anhand der Datenlage ausgeschlossen werden, eine Inkorporation der Ölphase ist in diesem Fall am wahrscheinlichsten.

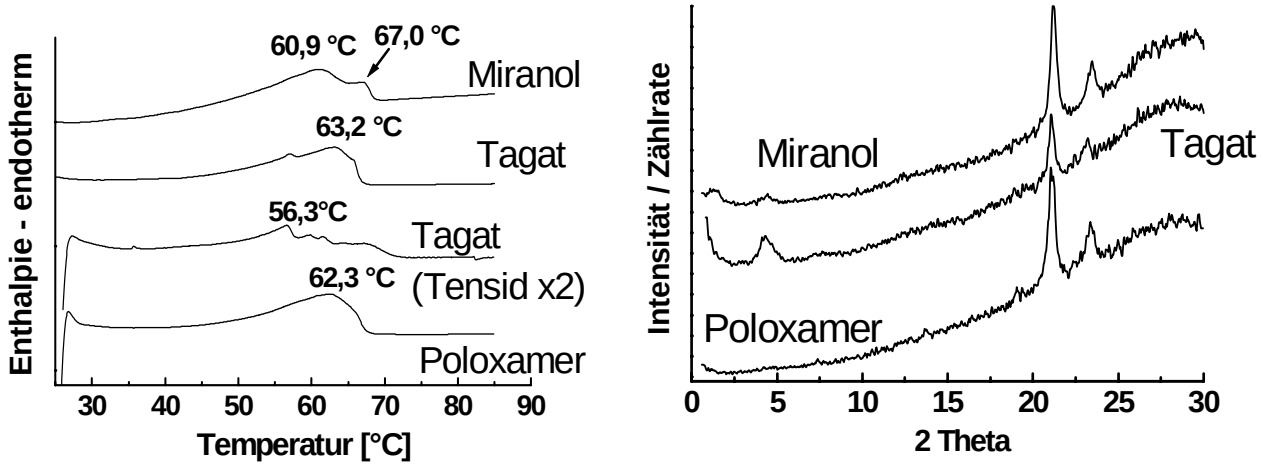


Abbildung 4-35: DSC-Aufheizkurven (links) und Röntgenstreukurven (rechts) unterschiedlich stabilisierter Cyclosporin / Compritol / Octyldodecanol-NLC an Tag 1 nach Herstellung (Gesamtlipidgehalt jeweils 15 %, eingesetzte Tenside: Miranol Ultra 1,5 % (Miranol), Tagat S 2,5 % + Natriumchol. 0,5 % (Tagat), Tagat S 5 % + Natriumcholat 1 % (Tagat x 2), Poloxamer 188 2,5 % + Natriumcholat 0,125 % (Poloxamer))

Der Gehalt der Formulierung betrug 104 ± 2,2 % (n = 3). Dieser Wert von über 100 % kann auf die höhere Produktionstemperatur der Compritol-Chargen von 90 °C im diskontinuierlichen Betrieb zurückgeführt werden.
Zwischen den drei Produktionszyklen muß die Charge dabei erneut auf diese Temperatur gebracht werden, da es in den nur unvollständig beheizbaren Teilen des Micron LAB40 zur Abkühlung der Formulierung kommt. Trotz Abdecken des Becherglases ist hier ein höherer Wasserverlust nicht zu vermeiden. Eine Abscheidung des Lipid / Arzneistoff-Gemisches an Homogenisatorteilen scheint dagegen bei dieser Temperatur und nach Ölzusatz nicht aufzutreten.

Direkt nach Herstellung konnten bei allen Chargen unter dem Polarisationsmikroskop keine Cyclosporin-Kristalle detektiert werden.

4.2.4 Untersuchung der Langzeitstabilität

Drei Fragestellungen sollten durch Untersuchung der Langzeitstabilität beantwortet werden:

1.) Verändert der Zusatz einen flüssigen Lipids die Größenstabilität?

2.) Wird durch Ölzusatz die Modifikationsumwandlung des Lipids während der Lagerung beeinflußt?

3.) Kann durch Ölzusatz die Verdrängung des Arzneistoffes Cyclosporin A aus den Partikeln verhindert werden?

Zu diesem Zweck wurden die Proben über eine Zeitraum von bis zu 3 Jahren bei Raumtemperatur unter Lichtausschluß in 20 mL Glasvials gelagert und in regelmäßigen Abständen mittels LD, PCS, DSC, Röntgendiffraktometrie und Polarisationsmikroskopie untersucht.
Die aufgrund ihrer kristallographischen Eigenschaften bevorzugte Poloxamer-stabilisierte Charge wurde zusätzlich bei 4 °C und 40 °C gelagert.

4.2.4.1 Partikelgröße

Sowohl die arzneistofffreien als auch die arzneistoffhaltigen Chargen zeigten bei Raumtemperatur eine ausgezeichnete Lagerstabilität. Viele wiesen nach drei Jahren bei Raumtemperatur nur ein minimales Größenwachstum und keine Aggregationstendenzen auf.

Abbildung 4-36 enthält zunächst die LD 95 Werte der arzneistofffreien, Tagat / Natriumcholat-stabilisierten Chargen mit unterschiedlicher Ölbeladung im Vergleich, Tabelle 4-17 die dazugehörigen PCS-Werte.

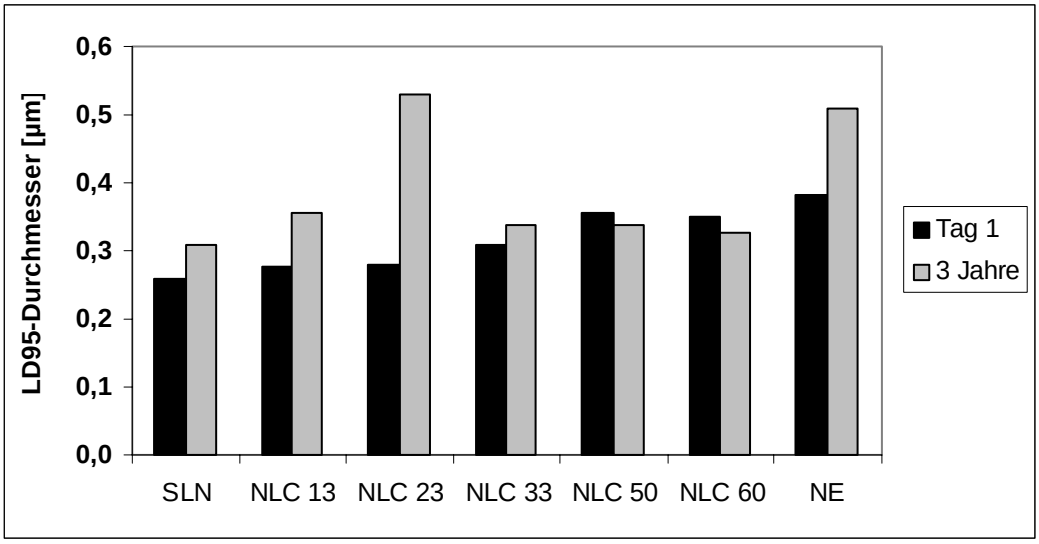


Abbildung 4-36: Größenstabilität der Tagat / Natriumcholat-stabilisierten Nanopartikel anhand der LD 95-Durchmesser an Tag 1 und nach 3 Jahren Lagerung (Zahl in Probennamen = Octyldodecanol-Anteil in %, NE = Nanoemulsion)

Tabelle 4-17: PCS-Werte (mittlerer Durchmesser und PI) Tagat / Natriumcholat-stabilisierter Nanopartikel an Tag 1 und nach 3 Jahren Lagerung (NE = Nanoemulsion)

		SLN	NLC 13 %	NLC 23 %	NLC 33 %
Tag 1	PCS mittl. Ø [nm]	198,7	201,9	199,5	203,3
	PI	0,225	0,270	0,239	0,257
3 Jahre	PCS mittl. Ø [nm]	213,3	217,7	198,2	212,0
	PI	0,325	0,274	0,307	0,172

		NLC 50 %	NLC 60 %	NE
Tag 1	PCS mittl. Ø [nm]	201,9	200,5	178,5
	PI	0,238	0,229	0,132
3 Jahre	PCS mittl. Ø [nm]	224,5	221,5	202,6
	PI	0,151	0,144	0,152

Die Zunahme der PCS-Durchmesser liegt bei allen Chargen unter 25 nm, der gegen Aggregation empfindliche LD 95 Wert ist bei keiner Probe in den Mikrometerbereich verschoben. Diese hohe Stabilität findet sich auch bei Miranol-Stabilisierung, der LD 95 betrug nach 3 Jahren 0,44 µm. Die Poloxamer / Natriumcholat-Charge zeigt auch eine ausreichende Stabilität von mehr als einem Jahr (LD 95 = 0,83 µm), ist jedoch anfällig gegen Aggregation und Gelbildung. Dies läßt sich durch den verminderten Gehalt an Natriumcholat als ionischem Emulgator erklären. Detaillierte Studien von Freitas et al. an Poloxamer-stabilisierten Compritol-SLN beschreiben den Einfluß von Licht, Sauerstoff, Elektrolyten und Lagertemperatur auf die Langzeitstabilität [7, 70, 180, 181]. Diese war u. a. davon abhängig, daß die durch Veränderung der Kristallstruktur und -form entstehenden neuen Oberflächen schnell von Tensidmolekülen besetzt werden, da es sonst zu Aggregation und Gelbildung kommt. Natriumcholat spielt bei diesem Prozeß eine wesentliche Rolle.
Da die hier untersuchten Proben zwar in silanisierten Glasvials unter Lichtausschluß, nicht aber unter Stickstoff gelagert wurden und außerdem bei Probenziehung wiederholt Scherkräften ausgesetzt waren, könnte die Stabilität bei optimierter Lagerung voraussichtlich weiter gesteigert werden.
Auch die arzneistoffhaltigen Chargen zeigten eine gute Langzeitstabilität, wobei sich Miranol-Stabilisierung als besonders geeignet erwies. Tabelle 4-18 enthält die Werte der Größenmessungen im Vergleich. Verwendung von Poloxamer ergab bei Raumtemperatur eine Stabilität von mindestens 6 Monaten, Lagerung bei 40 °C und 4 °C führte jedoch zu Gelbildung innerhalb der ersten Woche. Zu betonen ist jedoch, daß die analog zusammengesetzte Cyclosporin-SLN-Formulierung auch bei Raumtemperatur bereits nach einer Woche ein Gel bildete, so daß der Ersatz eines Teils des Compritols durch Octyldodecanol hier zur Verbesserung der Größenstabilität führte.

Tabelle 4-18: Ergebnisse der Partikelgrößenanalytik (PCS und LD) unterschiedlich stabilisierter, Cyclosporin A-haltiger NLC (Lipidgehalt 15 %) im Vergleich

	PCS		Laserdiffraktometrie [µm]		
	mittl. Ø [nm]	PI	LD 50	LD 90	LD 95
Miranol ultra 1,5 % Tag 1	235,2	0,20	0,170	0,392	0,438
3 Jahre	272,3	0,29	0,294	0,480	0,534
Tagat S 2,5 %+ Na-cholat 0,5 % Tag 1	265,7	0,20	0,108	0,248	0,330
3 Jahre	423,1	0,28	0,260	1,624	1,913
Polox. 188 2,5 % + Na-cholat 0,125 % Tag 1	243,7	0,24	0,186	0,424	0,495
6 Monate	241,4	0,21	0,145	0,372	0,461

4.2.4.2 Thermoanalyse und Untersuchung der Kristallstruktur

Betrachtet man zuerst die arzneistofffreien Chargen nach 3 Jahren wird deutlich, daß bei Ölzusatz größere Veränderungen auftreten als in der reinen SLN-Formulierung. Abbildung 4-37 enthält die Streumuster der Tagat / Natriumcholat-stabilisierten Chargen nach 3 Jahren, Abbildung 4-32 die entsprechenden Muster an Tag 1. Vor allem bei niedrigerem Ölzusatz kann man die Entstehung des für die β_i-Modifikation charakteristischen Reflexes erkennen (s. Pfeil). Die SLN-Charge zeigt sich dagegen nahezu unverändert (unteres Streumuster). Die in Tabelle 4-19 enthaltenen Werte der Thermoanalyse an Tag 1 und nach 3 Jahren belegen ebenfalls, daß es in den ölhaltigen Partikeln zu Veränderungen kommt, die durch Aufspaltung der Schmelzpeaks gekennzeichnet sind. Bis 50 % Ölbeladung liegt das erste Maximum bei Temperaturen von 60 - 63 °C, das zweite zwischen 67 und 69 °C. Dies könnte darauf hinweisen, daß es während der Lagerung innerhalb der Partikel zu Entmischungen kommt und sich ölreiche Areale von ölarmen, höher kristallinen (β_i-Reflex im Röntgenspektrum) abgrenzen. Die höhere Beweglichkeit der Glyceride des Compritol in den ölhaltigen Partikeln scheint dabei deren Umwandlung in eine Modifikation höherer Ordnung zu fördern, ein Phänomen, das u. a. auch schon von Jenning beschrieben wurde.

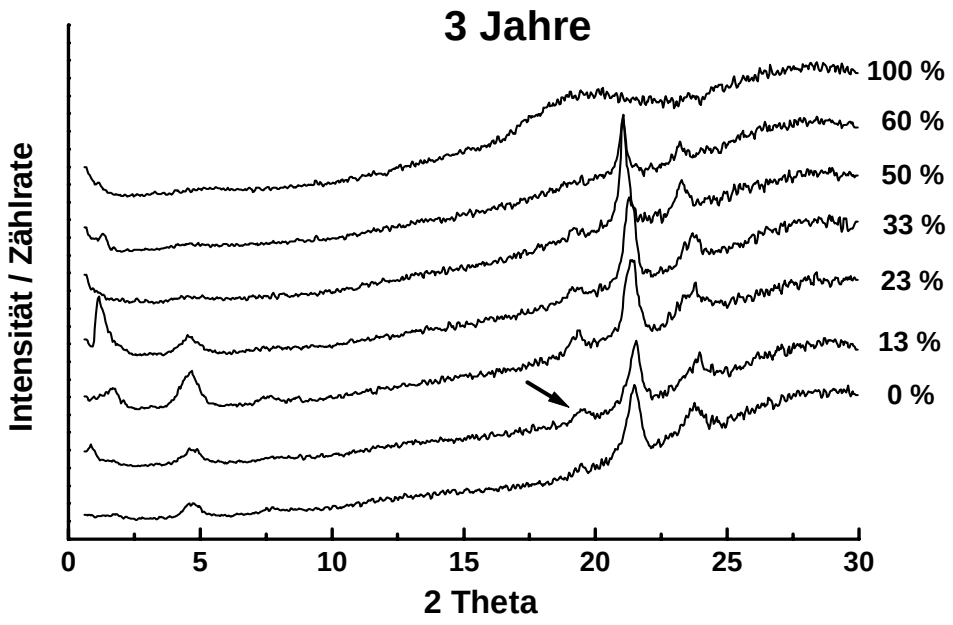


Abbildung 4-37: Nach drei Jahren Lagerung aufgenommene Röntgendiffraktogramme von Tagat / Natriumcholat-stabilisierten Compritol-SLN (0 %), NLC mit variierendem Ölanteil und einer Octyldodecanol-Nanoemulsion (100 %) (Pfeil = β_i-Reflex bei d = 0,46), die generelle Abnahme der Reflexintensität mit steigendem Ölgehalt ist auf die quantitative Abnahme der festen Lipidfraktion zurückzuführen

Tabelle 4-19: Vergleichende Ergebnisse der DSC-Thermoanalyse von Tagat / Natriumcholat-stabilisierten Compritol-SLN und NLC mit variierendem Octyldodecanol-Anteil, Werte in Klammern stellen Sekundärmaxima dar

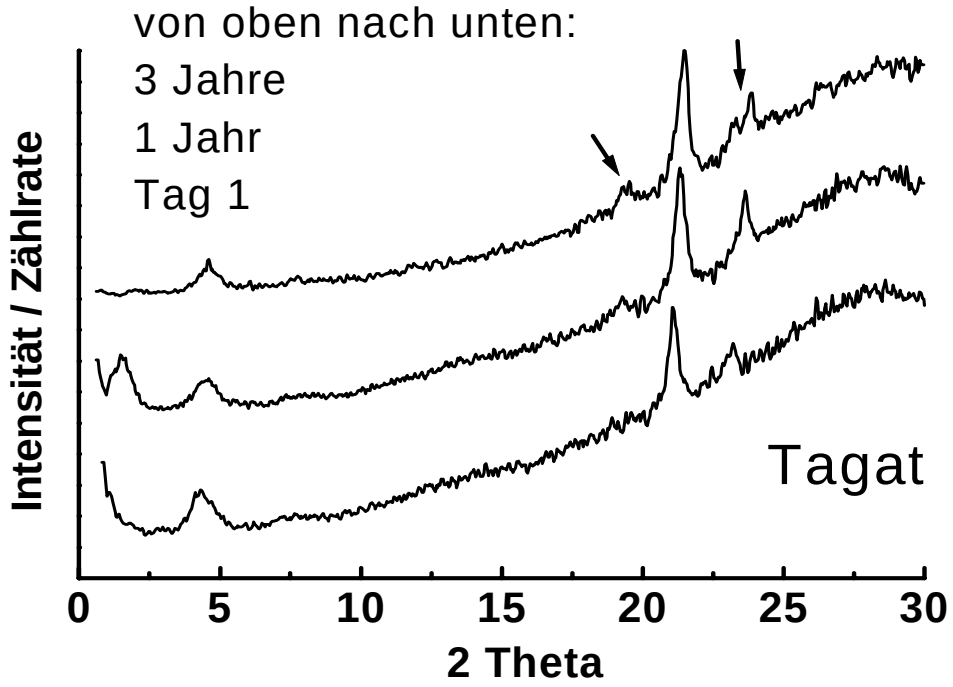
	SLN		NLC 13 %		NLC 23 %	
	Tag 1	3 Jahre	Tag 1	3 Jahre	Tag 1	3 Jahre
Peakmaximum [°C]	69,79	70,69	67,92	(63,32) 68,20	66,11	(62,08) 67,47
Integral [J/g]	19,14	21,74	17,59	19,14	15,34	16,80
Onset [°C]	67,67	64,17	60,72	61,12	54,64	53,40

	NLC 33 %		NLC 50 %		NLC 60 %	
	Tag 1	3 Jahre	Tag 1	3 Jahre	Tag 1	3 Jahre
Peakmaximum [°C]	63,04	61,0 (68,9)	59,54	60,19 (67,1)	56,64	56,49 (64,41)
Integral [J/g]	13,07	14,79	9,63	8,37	6,12	5,86
Onset [°C]	50,14	53,49	49,26	52,07	50,48	51,15

Die höhere Ordnung drückt sich auch durch die gestiegene Schmelzenthalpie, sowie die intensiveren Reflexe im Nahwinkelbereich aus. Die für eine lamellare Anordnung der Lipide charakteristische Periodizität ist bei den SLN wesentlich schwächer ausgeprägt.

Während Miranol-Stabilisierung zu einem ähnlichen Spektrum mit schwachem Reflex bei 0,46 bereits nach 4 Wochen führt, zeigt die Poloxamer-stabilisierte Charge die geringste Veränderung (s. auch Abbildung 4-40 Mitte). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß das Blockpolymer am wenigsten mit den Partikel-Lipiden der Oberfläche interagiert. Dies stimmt mit den Beobachtungen von Bunjes überein, die eine schnelle Umwandlung bei Verwendung solche Tenside annimmt, die mit den Glyceriden aufgrund ähnlicher Struktur interagieren und so von der Grenzfläche her einen ordnenden Effekt als Kristallisationskeim ausüben. Daß der Einfluß der verwendeten Tenside auf die Modifikationsumwandlung dermaßen ausgeprägt ist, begründet sie u.a. damit, daß die Glyceride in der Grenzfläche die höchste Energie besitzen und leichter beweglich sind. So kann von ihnen die benötigte Konformationsänderung leichter vollzogen werden [63].

Die Annahme, daß durch den Zusatz eines flüssigen Lipids die Modifikationsumwandlung der kristallinen Glyceride verhindert werden kann, hat sich für die arzneistofffreien Proben also nicht bestätigt. Es kommt vielmehr während der Lagerung zu einer Phasenseparation verbunden mit stärkerer polymorpher Transformation des festen Anteils aufgrund der höheren Beweglichkeit der Moleküle.



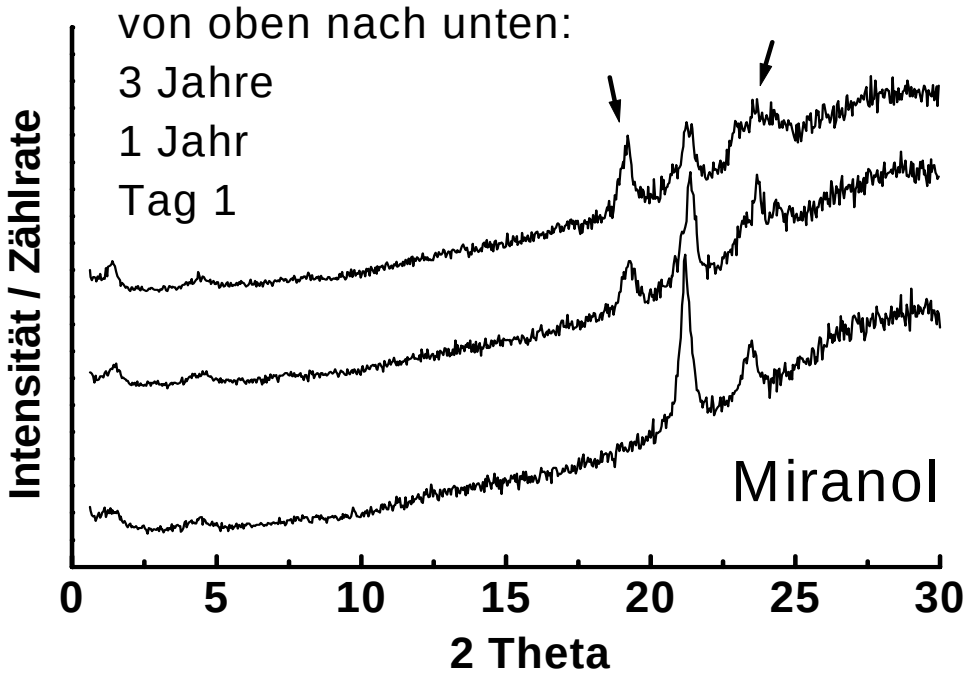
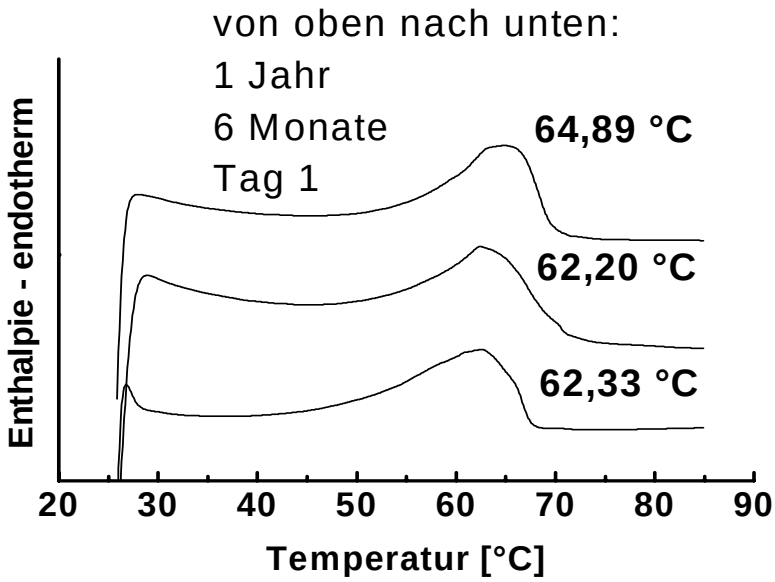


Abbildung 4-38: Veränderung der Röntgenstreumuster von Cyclosporin A-haltigen NLC unterschiedlicher Stabilisierung über 3 Jahre Lagerung bei Raumtemperatur, die Pfeile deuten auf die zusätzlichen Reflexe des β_I-Polymorphs

Nach Einarbeitung von Cyclosporin A sind die Unterschiede im Kristallaufbau der Partikel noch wesentlich ausgeprägter. Abbildung 4-38 zeigt die Streumuster der mit Tagat (oben) und Miranol (unten) stabilisierten Systeme an Tag 1 im Vergleich zu denen nach einem und drei Jahren Lagerung.
Man erkennt deutlich die stärkere Umwandlung bei Verwendung von Miranol. Das Peakmaximum der DSC-Aufheizkurve dieser Charge hat sich entsprechend von 60,9 °C auf 67,5 °C verschoben. In der Probe mit Tagat S und Natriumcholat überlagern sich dagegen - wie auch bei der arzneistofffreien – zwei Schmelzprozesse mit einem Peakmaximum bei 61,5 und einem bei 70,6 °C, was wiederum auf eine Separation der Lipide im Partikel hindeutet.
Untersuchung der beiden Chargen mittels Polarisationsmikroskopie zeigte bereits nach 3 Monaten erste Cyclosporin-Kristalle. Dies überraschte insofern, als zu diesem Zeitpunkt zumindest bei Tagat S-Stabilisierung noch keine Modifikationsumwandlung im Röntgenspektrum erkennbar war. Aufklärung bringt jedoch eine Analyse der DSC-Messungen. An Tag 84 ist bereits eine Verschiebung des Maximums von 63,0 °C auf 67,4 °C aufgetreten (Miranol: 67,2 °C).
Die Umlagerung innerhalb der Partikel scheint also zunächst nicht zu einer Modifikationsumwandlung aber dennoch zur Ausscheidung des Arzneistoffs zu führen. Eventuell wird in einem ersten Schritt das arzneistoffreiche Octyldodecanol in die Randbereiche der Partikel ausgelagert, wo es im Kontakt mit der Wasserphase leichter zum Auskristallisieren des Wirkstoffs kommen kann. Dieser Prozeß vollzieht sich wesentlich schneller als die polymorphe Transformation der Glycerolbehenate des Compritol.

Untermauert wird diese These durch Betrachtung der Aufheizkurven der Poloxamer-stabilisierten Probe. Deren Schmelzverhalten erfährt innerhalb der ersten 6 Monate überhaupt keine Veränderung (Abbildung 4-39, oben), und auch nach einem Jahr ist das Peakmaximum lediglich um 2,5 °C angestiegen, Schulterbildung oder Peakaufspaltung sind nicht zu erkennen, die Enthalpie des Schmelzvorganges ist konstant geblieben (11,8 bzw. 11,6 J/g).

Analyse des Streumusters (unten) führt zu ähnlichen Ergebnissen wir die der anderen Chargen mit leichter Bildung der β_i-Modifikation (s. Pfeil). Sollte in erster Linie die Umlagerung der Lipidfraktionen im Partikel für den Arzneistoffausstoß verantwortlich sein, dürften sich hier keine Cyclosporin-Kristalle finden lassen.



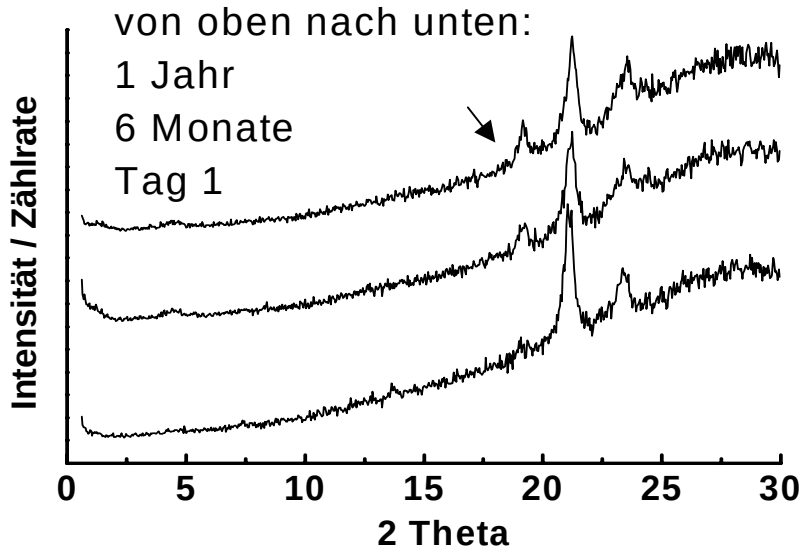


Abbildung 4-39: DSC-Aufheizkurven mit Peakmaxima (oben) und Röntgenstreukurven (unten) von Poloxamer / Natriumcholat-stabilisierten, Cyclosporin A-haltigen NLC über einen Lagerzeitraum von 1 Jahr (Pfeil = β_i-Reflex bei d = 0,46)

Dies konnte auch bestätigt werden. Nach 6 Monaten waren weder in den flüssigen, bei Raumtemperatur gelagerten, noch in den im Kühlschrank gelierten Proben NLC Kristalle zu entdecken (n = 3). Nach einem Jahr führte auch Lagerung bei Raumtemperatur zur Gelbildung, Kristalle waren dennoch nicht zu erkennen. Es kann also gefolgert werden, daß eine möglichst geringe Wechselwirkung der Tenside mit den äußeren Schichten der Partikel zur Stabilisierung des Aufbaus beiträgt.
Besonders interessant war in diesem Zusammenhang der Vergleich der ölfreien, identisch stabilisierten Cyclosporin A-SLN-Charge aus Kapitel 4.1.6 mit der soeben charakterisierten, analogen NLC-Probe. Die SLN-Formulierung zeigte wie bereits beschrieben nach kurzer Lagerzeit Veränderungen der Kristallstruktur und Ausscheidung des Wirkstoffs, so daß nicht nur die Stabilität der Partikelgröße durch Octyldodecanol verbessert wurde sondern auch die der Kristallstruktur.
Gleichzeitig konnte eine erhöhte Inkorporierungsrate erreicht und ein Arzneistoffausschluß verzögert werden. Die Streumuster der Partikel sind im Vergleich in Abbildung 4-40 abgebildet. Man erkennt deutlich, daß die ausschließliche Einarbeitung des Fremdmoleküls Cyclosporin A in die reine Compritolmatrix zu starken und schnell einsetzenden polymorphen Transformationen in Richtung trikliner β-Modifikation führt (untere Streukurve).

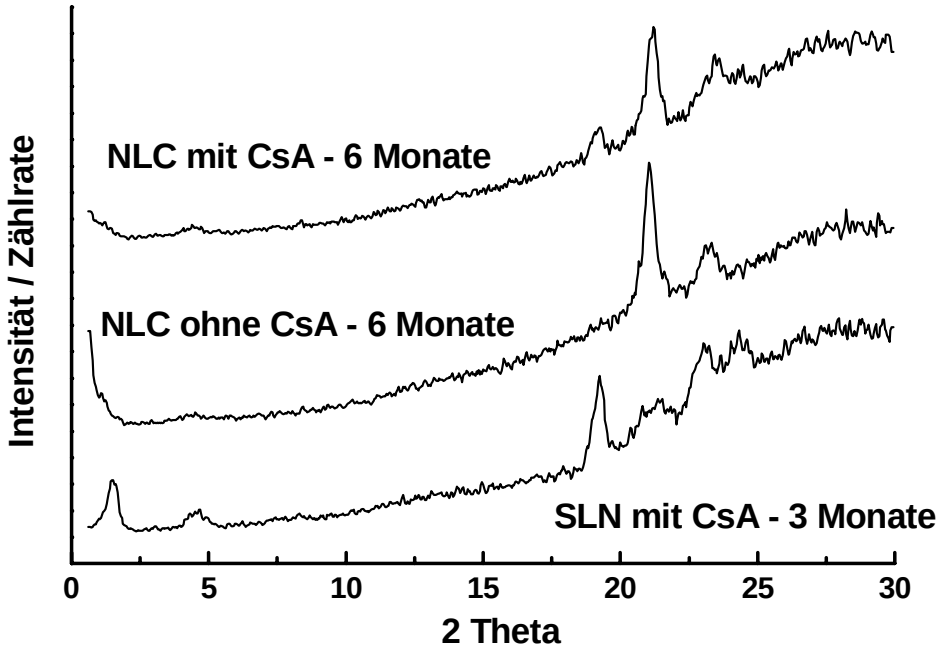


Abbildung 4-40: Vergleich der Röntgendiffraktogramme unterschiedlich zusammengesetzter 15 %iger Lipidnanopartikel auf Basis von Compritol mit identischer Stabilisierung durch Poloxamer 188 2,5 % und Natriumcholat 0,125 %

Die Löslichkeit von Cyclosporin in Compritol ist bei der hier vorliegenden 6,7 %igen Beladung bereits überschritten. Auskristallisierender Arzneistoff scheint dann als Keim für das Lipid zu dienen. Ausschließliche Einarbeitung von Octyldodecanol führt über 6 Monate zu keiner Veränderung (Mitte) gegenüber Tag 1.
Wird die Löslichkeit des Arzneistoffes in der Matrix durch Zusatz von Octyldodecanol erhöht, kommt es wie beschrieben - im Gegensatz zu reinen Cyclosporin A-SLN - nur zu geringfügigen Veränderungen während der Lagerung (oben).

Durch Wahl der geeigneten Tensidkombination und Zusatz von flüssigem Lipid war es folglich möglich, die Arzneistoffbeladung zu erhöhen und den Ausstoß von Cyclosporin A zu verhindern. Es stellte sich nun die Frage, ob bei der beschriebenen NLC-Dispersion durch Trocknung in dünner Schicht eine Modifikationsumwandlung herbeigeführt werden kann, da dies bei postulierter Mischung von flüssiger und fester Komponente im Partikel für eine verstärkte Freisetzung des Arzneistoffs von Vorteil sein müßte.

4.2.5 Trocknungsverhalten

Die mit Poloxamer / Natriumcholat stabilisierten Cyclosporin-NLC wurden analog den SLN in dünner Schicht bei 32 °C getrocknet.
Abbildung 4-41 zeigt oben die erhaltenen DSC-Aufheizkurven, die zugehörigen Meßwerte finden sich in Tabelle 4-20.
Im Gegensatz zur ölfreien Charge steigt das Peakmaximum der trocknenden NLC nur geringfügig an (62,3 auf 64,7 °C). Man erkennt jedoch deutlich, daß es zur Ausbildung unterschiedlich zusammengesetzter Strukturen kommt, deren Schmelzprozesse sich überlagern. Während für den ersten Schmelzpeak bei 45-50 °C das auskristallisierende Poloxamer 188 verantwortlich ist, und der zweite und größte Schmelzprozeß durch die Compritol / Octyldodecanol-Mischung hervorgerufen wird, kann nach 24 Stunden ein weiteres Maximum bei 71,1 °C ausgemacht werden (Pfeil). Dieses kann auf höherkristalline Bereiche des Compritols zurückgeführt werden vergleichbar denen der reinen SLN mit Peakmaximum bei 71,3 °C nach 24 Stunden Trocknung.

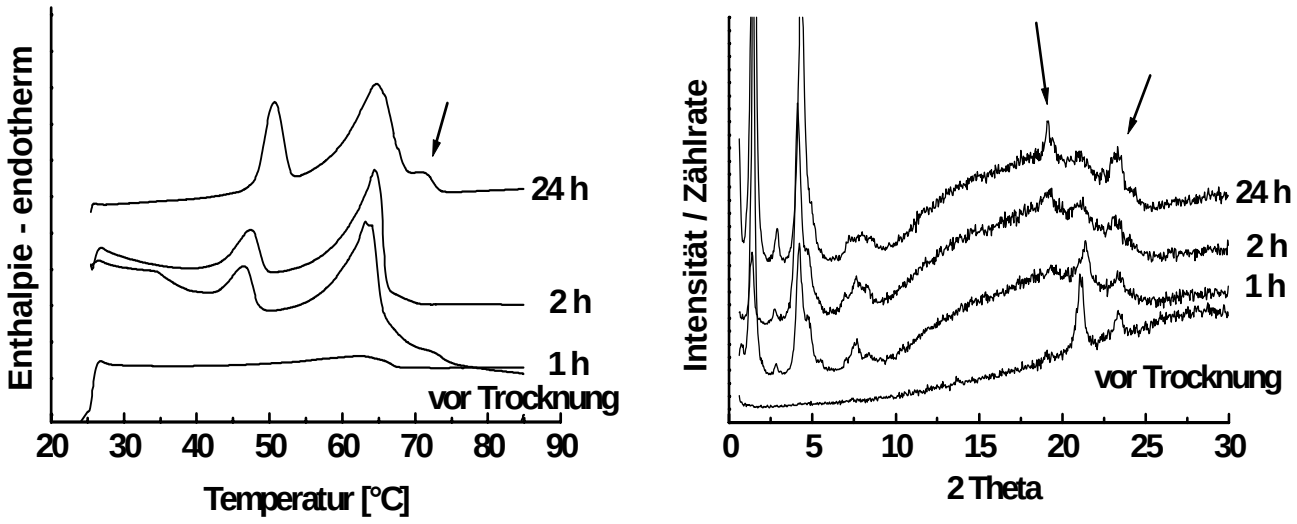


Abbildung 4-41: DSC-Schmelzkurven (links) und Röntgenstreumuster (rechts) des Trocknungsprozesses von Cyclosporin A-haltigen NLC (Erklärung der Pfeile s. Text)

Die Röntgendiffraktogramme in Abbildung 4-41 (unten) belegen die Umwandlung zumindest von Fraktionen der Compritolglyceride von der vorher bestehenden orthorhombischen β'-Modifikation hin zur β_i-Modifikation bereits nach 2 Stunden Trocknung. Nach 24 Stunden ist der Reflex bei d = 0,415-0,42 schon wesentlich schwächer ausgeprägt als die Reflexe bei 0,465 und 0,38-0,39 (Pfeile), so daß auf einen zunehmenden Anteil an trikliner β-Modifikation geschlossen werden kann. Die erhaltenen Reflexe sind im Weitwinkelbereich intensiver als die der SLN, Octyldodecanol ermöglicht also auch während des Trocknungsprozesses eine bessere Anordnung der Fettsäureseitenketten.

Tabelle 4-20: Vor, während und nach der Trocknung erhaltene Werte für Peakmaximum und Onset des Schmelzvorganges Cyclosporin A-haltiger NLC

		vor Trocknung	nach 1 h	nach 2 h	nach 24 h
Cyclosporin-NLC (Poloxamer / Natriumchol.)	Onset [°C]	47,95	42,66 58,09	43,15 58,50	48,11 57,96
	Peakmax. [°C]	62,33	46,59 63,16	47,41 64,37	50,61 64,68 71,08

Im Nahwinkelbereich ist die starke Zunahme der periodischen Reflexe erneut offensichtlich, die erhaltenen Streuvektoren unterscheiden sich nicht wesentlich von denen der SLN-Charge. Der Netzebenenabstand beträgt nach der Trocknung d = 61,2 Å gegenüber 62,8 Å bei den SLN. Die Werte für d_1 (Dicke polarer Kopf) und d_2 (Dicke Alkylketten) weichen jeweils nur um 2 Å voneinander ab.
Die lamellare Anordnung der Lipide nimmt demzufolge auch hier während des Trocknungsprozesses zu, was zum großen Teil durch die bei Wasserverdunstung auftretende Aggregation und Filmbildung erklärt werden kann. Die Anzahl der lamellaren Schichten ist anschließend wesentlich größer als in einem 200 nm großen Einzelpartikel. Begünstigt wird die Filmbildung wahrscheinlich noch durch die Abnahme der zur Verfügung stehenden Tensidmoleküle, da auskristallisierendes Poloxamer 188 nicht mehr für eine sterische Stabilisierung zur Verfügung steht.

Die Kristallinität der Fettsäureseitenketten nimmt analog Jenning während der Trocknung stark zu. Dieser Prozeß beginnt bereits nach einer Stunde. Eine Lokalisation von Octyldodecanol und /oder Arzneistoffmolekülen zwischen den Behensäure-Seitenketten wird somit immer unwahrscheinlicher, so daß von der Ausbildung cyclosporinreicher Ölcluster und / oder der Kristallisation von Cyclosporin A auszugehen ist.
Aus den erhaltenen DSC-Kurven läßt sich zusätzlich schlußfolgern, daß zumindest eine Assoziation des Glycerolbehenats mit der Octyldodecanolfraktion über den gesamten Trocknungsprozeß bestehen bleibt, da das Peakmaximum nicht wesentlich ansteigt. Beginnende Separation einer hochkristallinen, reinen Compritolfraktion ist erst nach 24 Stunden zu erkennen.

Im vorangegangenen Kapitel konnte für die beschriebene Formulierung die höchste Langzeitstabilität in Bezug auf das thermoanalytische Verhalten ermittelt werden. Dies wurde auf eine homogenere Verteilung von Octyldodecanol / Arzneistoff in der festen Compritolmatrix zurückgeführt.
Um nun den Einfluß der Tenside auf das Trocknungsverhalten zu untersuchen, wurde eine analoge Formulierung mit einem hohen Tensidgehalt einer Mischung von Tagat S 5 % und Natriumcholat 1 % hergestellt und getrocknet.

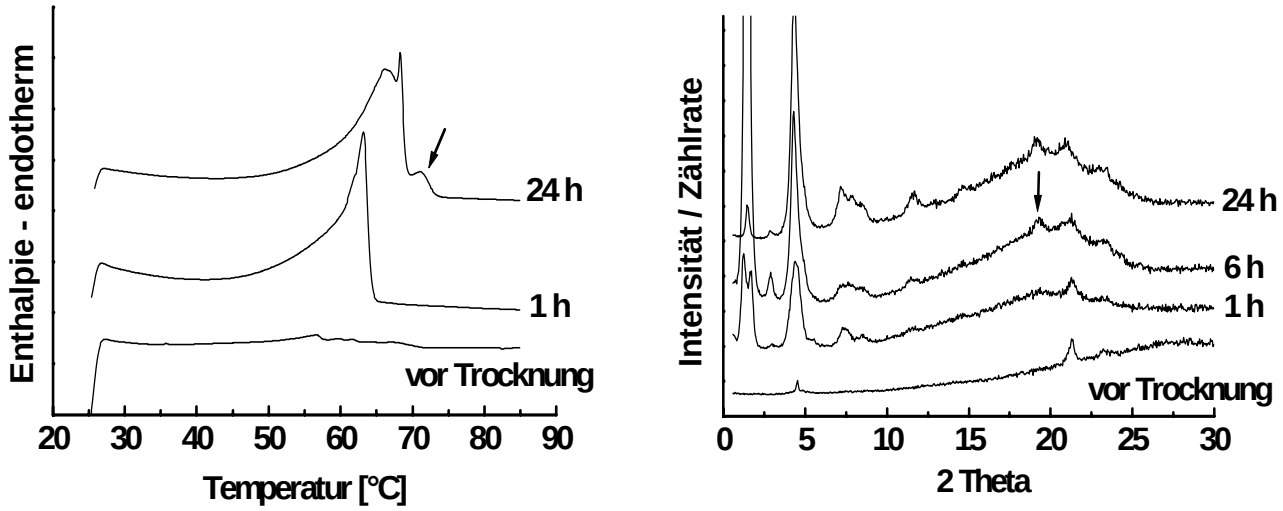


Abbildung 4-42: DSC-Schmelzkurven (links) und Röntgenstreumuster (rechts) des Trocknungsprozesses von Cyclosporin A-haltigen NLC stabilisiert mit Tagat 5 % und Natriumcholat 1 %. Der Pfeil links deutet auf das zusätzlich entstehende Schmelzpeakmaximum bei 71,1 °C, der Pfeil rechts auf den entstehenden β_i-Reflex bei d = 0,46

Der hohe Tensidgehalt und chemische Aufbau des Tagat S führte zu weniger kristallinen Partikeln mit um ca. 20 % verringerter Schmelzenthalpie, komplexem Schmelzverhalten und geringer Reflexintensität der Röntgenstreukurven. Abbildung 4-42 enthält die Ergebnisse des Trocknungsexperimentes. Deutlich fällt auf, daß der Schmelzpeak nach einer Stunde Trocknung wesentlich schärfer ausgebildet ist. Nach 24 Stunden hat sich das Peakmaximum auf 68,0 °C (statt 64,7 °C bei Poloxamer-Stabilisierung) erhöht, ein weiteres Maximum ist bei 71,1 °C zu erkennen. Die stärkere Verschiebung sowie die schmalere Form des Peaks deuten auf eine erhöhte Entmischung von flüssigem und festem Lipid hin. Die Röntgendiffraktogramme zeigen auch hier die polymorphe Transformation mit Zunahme der Seitenkettenkristallinität, jedoch sind die Reflexe schwächer und die Umwandlung erfolgt langsamer. Eine mögliche Erklärung wäre, daß die Umlagerungen aufgrund eines geringeren Anteils des Octyldodecanols innerhalb der Glyceridphase nur verzögert ablaufen können, da die Beweglichkeit der Moleküle abnimmt.

Sollte es in Abhängigkeit von der Formulierung tatsächlich zu unterschiedlich starker Trennung von flüssigem und festem Lipid kommen, müßte sich dies im Freisetzungsverhalten der Chargen widerspiegeln.

Liegt trotz gegenteiliger DSC-Ergebnisse immer ein fester Lipidkern vor, der flüssiges Octyldodecanol mit gelöstem Arzneistoff an seiner Oberfläche trägt, sollte das Trocknungsverhalten keinen Einfluß auf die Freisetzung haben und ein gleichbleibender „Burst“ zu beobachten sein.

4.2.6 Arzneistofffreisetzung

Jenning machte die Beobachtung, daß Lipide, die eine geringe Mischbarkeit mit Miglyol und geringes Lösungsvermögen für Retinol zeigten, die höchste Freisetzungsrate aufwiesen (Hartparaffin, Dynasan 116). Er begründete dies mit einer Phasentrennung und entsprechend höherer Beladung des Öls mit Retinol.

Wie bereits einleitend diskutiert wurde, führt Übersättigung eines Systems mit Arzneistoff zu einer erhöhten Freisetzungsrate. Geht man davon aus, daß sämtliches Cyclosporin A durch Trocknung in die Octyldodecanol-Fraktion übergeht oder bereits zu Beginn in ihr gelöst vorliegt, beträgt die Cyclosporin-Konzentration im flüssigen Lipid 20 %, was ohne weitere Löslichkeitserhöhung durch Tenside im Bereich der Übersättigung liegt. Dies sollte zu einer im Vergleich zur Nanoemulsion erhöhten Freisetzungsrate führen, da hier die Konzentration an Arzneistoff nur 6,7 % beträgt. Für die Freisetzung sollte dabei auch von Bedeutung sein, wo die arzneistoffreichen Ölfraktionen lokalisiert sind. Abbildung 4-43 enthält die Freisetzungskurven aus den beschriebenen NLC-Formulierungen im Vergleich zur Nanoemulsion. Beide NLC-Formulierungen setzen in den ersten Stunden deutlich mehr Arzneistoff frei als die Nanoemulsion, jedoch nimmt der Flux aus der Poloxamer-stabilisierten Charge im Verlauf der Freisetzung stark ab, während er bei Tagat-Stabilisierung über 6 Stunden konstant bleibt und dann langsam abnimmt. Die Nanoemulsion zeigt auf niedrigerem Niveau eine annähernd gleichbleibende Freisetzung.

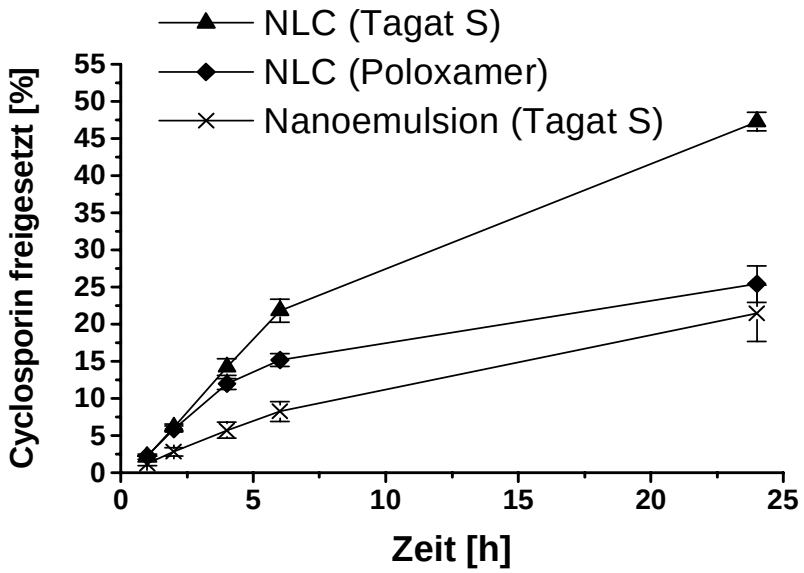


Abbildung 4-43: Cyclosporin A-Freisetzung aus unterschiedlich stabilisierten NLC im Vergleich zur Nanoemulsion (Arzneistoffgehalt jeweils 1 %) (Poloxamer = Poloxamer 188 2,5 % + Natriumcholat 0,125 %, Tagat S = Tagat S 5 % + Natriumcholat 1 %)

Die beobachteten Freisetzungen belegen gut die bereits diskutierten Unterschiede der Chargen in Bezug auf Phasentrennung der Lipide und Sättigungsgrad des Arzneistoffes.
Die Löslichkeit von Cyclosporin A in Octyldodecanol ist im Vergleich zu derjenigen in Compritol mehr als doppelt so hoch. Im Verhältnis wird also ein größerer Anteil Arzneistoff im Öl gelöst vorliegen als in der festen Lipidmatrix. Die Burstphase zu Beginn der Freisetzung ist auf die Ölfraktion zurückzuführen, die in direktem Kontakt mit der Wasserphase der Formulierung steht und nicht im festen Lipid eingeschlossen ist. Die thermodynamische Aktivität des Arzneistoffes in der Octyldodecanolfraktion ist dabei höher als in der Nanoemulsion, was die gesteigerte Freisetzungsrate erklärt. So hat nach 4 Stunden die Poloxamer-stabilisierte NLC-Formulierung bereits 12,0 % der enthaltenen Arzneistoffmenge freigesetzt, die Nanoemulsion dagegen nur 5,7 %.
Beide NLC-Formulierungen müssen folglich in den Randbereichen der Partikel einen relativ hohen Ölgehalt inklusive darin gelöstem Cyclosporin aufweisen. Aus der Freisetzung wird aber auch deutlich, daß bei Poloxamer-Stabilisierung nach 4 Stunden eine zusätzliche Freisetzungsverzögerung auftritt. Prinzipiell ist es denkbar, daß die Verzögerung lediglich auf Differenzen in der Filmbildung beruht, die zur Ausbildung unterschiedlich starker Diffusionsbarrieren für den Arzneistoff führen. Sie kann aber auch durch den Einschluß einer Ölfraktion in die feste Compritolmatrix erklärt werden, eine These die durch die breiten Schmelzpeaks und niedrigen Peakmaxima dieser Charge selbst nach 24 Stunden Trocknung gestützt wird.
Die durch die Röntgenspektren belegte polymorphe Transformation kann hier dagegen nicht mit einer Erhöhung des Arzneistoffflux analog Jenning korreliert werden. Für eine Voraussage der Arzneistofffreisetzung ist folglich die Beobachtung des Schmelzverhaltens der trocknenden Formulierungen eher geeignet, da sie Erkenntnisse über den Mischungszustand von flüssiger und fester Phase liefert. Betrachtet man im Vergleich die Verschiebung des Peakmaximums während der Trocknung, betrug die Differenz hier ca. 2,5 °C. Bei Jenning hatte sich das Maximum dagegen nach 24 Stunden auf der Franzzelle um 7 ° auf 71 °C verschoben, eine auftretende Trennung von flüssiger und fester Phase erscheint in diesem Fall wesentlich wahrscheinlicher.
Die beobachtete Freisetzungsverzögerung trat bei der Tagat-stabilisierten Charge nicht auf. Am Ende des Experiments war die aus den Partikeln freigesetzte Arzneistoffmenge fast doppelt so groß (47 % zu 25 %). Es muß also ein wesentlich größerer Anteil der hochgesättigten Ölfraktion nicht in der festen Matrix eingeschlossen sein.

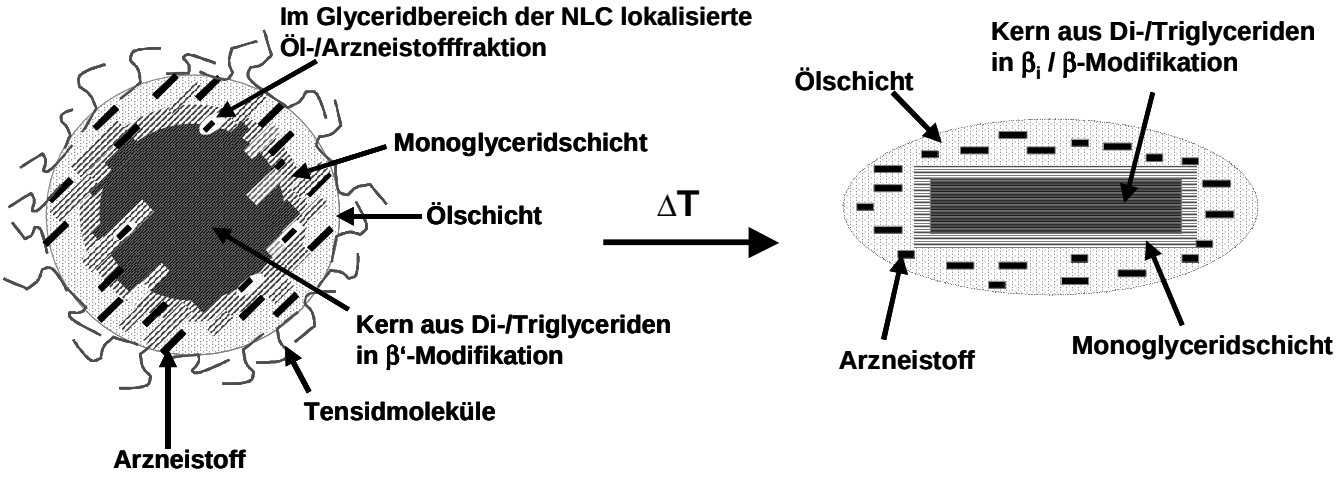


Abbildung 4-44: Vereinfachte Darstellung eines cyclosporinhaltigen NLC-Partikels auf Basis eines komplexen Glycerids (zum Beispiel Compritol) vor (links) und nach Trocknung / Freisetzung (rechts)

Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, daß die freigesetzte Gesamtmenge aus der in Kapitel 4.16 verwendeten, hochgesättigten Octyldodecanol-Nanoemulsion mit 51 % im gleichen Bereich liegt. Die Beladung mit Cyclosporin betrug hier 20 %, was der zuvor diskutierten Maximalbeladung der Ölfraktion innerhalb der NLC (sämtlicher Arzneistoff in der flüssigen Phase) entspricht.

Abbildung 4-44 zeigt den postulierten Aufbau eines NLC-Partikel vor und nach Trocknung in vereinfachter Form. Der Gehalt der Cyclosporin A-reichen Ölphase steigt im Partikel zur Grenzfläche hin an. Während das Partikelinnere analog den SLN hauptsächlich aus den lipophileren Lipidfraktionen besteht, sind die hydrophileren Monoglyceride stärker im Randbereich lokalisiert. Eine Einlagerung von Fremdmolekülen (Octyldodecanol, Cyclosporin A) kann hauptsächlich in diese Grenzschicht erfolgen. Lokalisation von Ölclustern oder Arzneistoff im Partikelinneren ist dagegen auf Grund der höheren Ordnung und Kristallinität in diesem Bereich unwahrscheinlich.
Während Lagerung und Trocknung des Systems kommt es in Abhängigkeit von der verwendeten Tensidmischung und deren Interaktion mit der Partikeloberfläche zu einer mehr oder weniger ausgeprägten Entmischung der verschiedenen Phasen. Dies wird durch die morphologische Veränderung des festen Lipidkerns bei eintretender Modifikationsumwandlung gefördert (Abbildung 4-44, rechts). Der Grad dieser Entmischung, sowie der Aufbau des bei der Trocknung entstehenden Lipidfilms bestimmen dabei zunehmend das Freisetzungsverhalten der Formulierung.

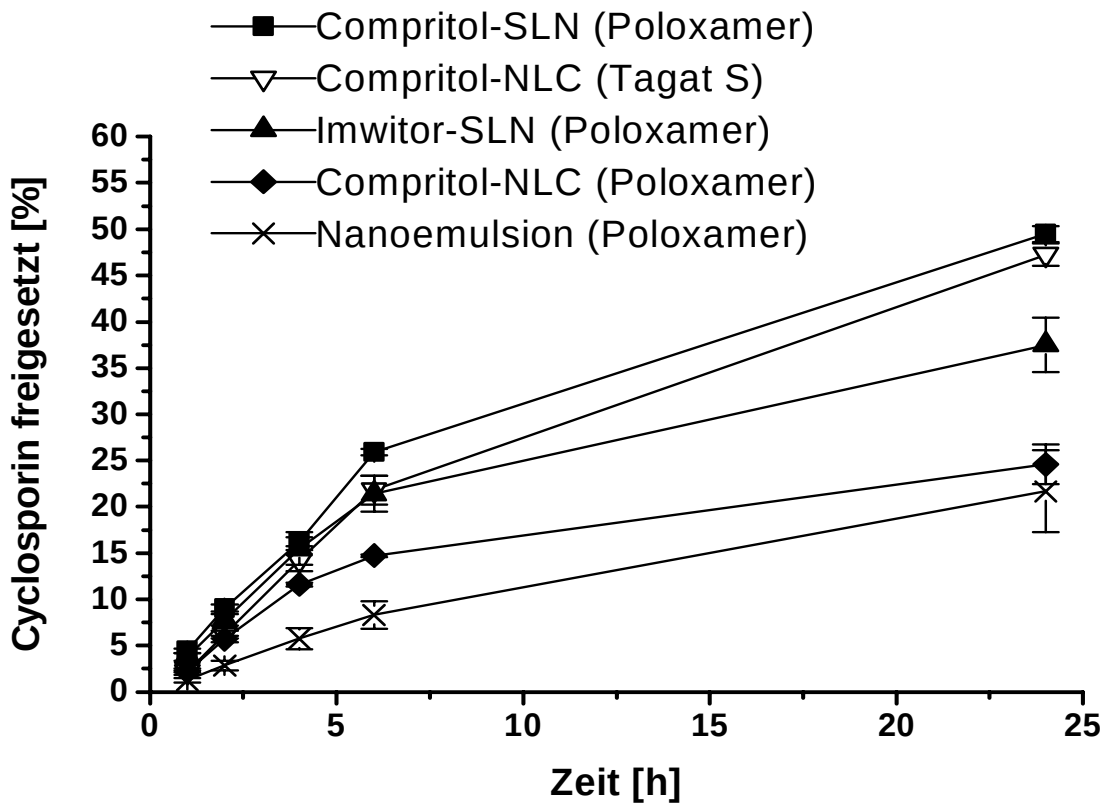


Abbildung 4-45: Vergleich der Cyclosporin A-Freisetzung (in % des Gesamtgehaltes) aus identisch stabilisierten SLN, NLC und der Nanoemulsion sowie aus unterschiedlich stabilisierten NLC (Arzneistoffgehalt jeweils 1 %) (Poloxamer = Poloxamer 188 2,5 % + Natriumcholat 0,125 %, Tagat = Tagat S 5 % + Natriumcholat 1 %)

Als weiterer Vergleich sind in Abbildung 4-45 zusätzlich die Freisetzungen aus den Poloxamer-stabilisierten SLN aufgetragen. Wie bereits diskutiert, wird für diese eine Lokalisation des Arzneistoffs in den Randbereichen der Partikel angenommen, so daß es auch hier – wie bei den Tagat S-stabilisierten Compritol-NLC - zu einer hohen Freisetzungsrate kommt.

Die freigesetzte Menge verhält sich dabei umgekehrt proportional der Beladungskapazität der entsprechenden Matrix. Diese ist bei Compritol am geringsten, die thermodynamische Aktivität des Arzneistoffs sowie dessen Freisetzungsrate folglich am höchsten. Der hohe Sättigungsgrad der NLC-Octyldodecanolphase ist für die stark erhöhte Freisetzung gegenüber der weniger gesättigten Nanoemulsion verantwortlich.

4.2.7 Zusammenfassende Diskussion

Durch erste Lösungsversuche und thermoanalytische Untersuchung der Bulkware-Mischungen konnte der verzweigtkettige Alkohol Octyldodecanol als geeigneter Kandidat für die Herstellung von NLC mit einem Gehalt von 1 % Cyclosporin A ermittelt werden.

Selbst bei sehr hohem Ölgehalt von 60 % wiesen die arzneistofffreien NLC eine ausgezeichnete Langzeitstabilität von bis zu drei Jahren auf. Der Zusatz einer flüssigen Lipidfraktion beschleunigte hier jedoch die schwachen polymorphen Transformationen, was auf die höhere Beweglichkeit der Moleküle im Partikel zurückgeführt wurde. Eine Umkehrung dieser Tendenz war dagegen nach Inkorporierung des Wirkstoffs zu verzeichnen: während die Einarbeitung von Cyclosporin A in die reine Compritolmatrix (SLN) zu einer rapiden polymorphen Transformation führte (Arzneistoff als Kristallisationskeim), wurde diese bei Beladung von NLC kaum beschleunigt. Folglich läßt sich die Frage, ob durch Mischung flüssiger und fester Lipidkomponenten Modifikationsänderungen verzögert oder aufgehalten werden können, nicht generell beantworten und muß für beladene und unbeladene Systeme getrennt untersucht werden.

Die Wahl der eingesetzten Tenside hatte – wie auch schon für SLN beschrieben - insbesondere bei Arzneistoffbeladung einen erheblichen Einfluß auf die Partikelstruktur und Stabilität. Während es bei Verwendung von Miranol Ultra oder einem Gemisch von Tagat S und Natriumcholat zu Entmischungstendenzen und Arzneistoffkristallisation innerhalb der ersten Monate kam, konnte durch Kombination des Blockpolymers Poloxamer 188 mit Natriumcholat eine langzeitstabile Formulierung erhalten werden. Größe, Schmelzverhalten und Röntgenstreuung veränderten sich kaum, Cyclosporin A-Kristalle bildeten sich nicht aus. Analog Bunjes et al. [63] wurde dies auf Differenzen im Grad der Tensid/Lipid-Interaktionen in der Partikelgrenzfläche zurückgeführt.

Auf diese Weise konnte durch NLC eine langfristige Inkorporierung von 6,7 % Cyclosporin A bezogen auf die Lipidphase erzielt werden. Ohne den Ölzusatz (SLN) war dies dagegen nicht möglich.

Unterschiede im Trocknungsverhalten der verschiedenen NLC-Chargen wurden mit der beobachteten Arzneistofffreisetzung korreliert. Im Unterschied zu Jennings Untersuchungen an Retinol-/Miglyol-haltigen Systemen, kam es jedoch bei den hier beschriebenen Formulierungen nicht zu einer Zunahme des Flux während der Freisetzung, sondern vielmehr zu einer mehr oder weniger starken Abnahme. Hinsichtlich der Struktur der Partikel ließ sich daraus schließen, daß ein relativ großer Prozentsatz von hochbeladenem Octyldodecanol an der Oberfläche der Partikel lokalisiert sein muß.

Die thermodynamische Aktivität des Arzneistoffs ist aufgrund der höheren Konzentration in der Ölfraktion der NLC-Formulierung größer als in der als Vergleich verwendeten Nanoemulsion, was die zu Beginn überlegene Freisetzungsrate erklärt.
In Abhängigkeit von den Wechselwirkungen der verwendeten Tenside mit den Lipiden der Grenzfläche kommt es bei Trocknung und Filmbildung zu mehr oder weniger starken Entmischungserscheinungen von flüssigem und festem Lipid. Je stärker die im Rahmen der Thermoanalyse beobachtete Entmischung, desto geringer die Abnahme des Arzneistoffflux und desto größer die freigesetzte Gesamtmenge. Besonders stark war die Reduzierung des Flux bei der lagerstabilen, Poloxamer-stabilisierten Formulierung. Dies wurde darauf zurückgeführt, daß ein Teil des Cyclosporin A-beladenen Öls auch nach längerer Trocknung in der Franz-Zelle in einer Weise mit den Glycerolbehenat-Molekülen des Compritol assoziiert ist, die eine Freisetzung des Wirkstoffes im Vergleich zu anders stabilisierten NLC oder den entsprechenden SLN-Formulierungen verzögert.
Wie bereits festgestellt, führte die durch den Trocknungsprozeß ausgelöste Modifikationsänderung der festen Lipidfraktion bei den beobachteten Chargen zu keiner Steigerung des Flux analog Jenning. Die von ihm gemessene Freisetzung erfolgte innerhalb der ersten sechs Stunden verzögert im Vergleich zur Nanoemulsion, was eine Anreicherung von beladenem Miglyol an der Oberfläche unwahrscheinlich macht. Eventuell ist eine Verteilung des flüssigen Triglycerids in der Matrix aufgrund seiner größeren chemischen Ähnlichkeit mit den Compritol-Lipiden besser möglich, obwohl neuere Untersuchungsergebnisse durch Jores et al. dagegen sprechen [75].
Der verzweigtkettige Alkohol Octyldodecanol wird sich in jedem Fall eher in von den Triglyceriden getrennten Kompartimenten organisieren, so daß Veränderungen in der Kristallinität der Fettsäureketten geringere Auswirkungen haben. Das Ausmaß der oben beschriebenen Entmischungserscheinungen ist im Fall der hier untersuchten Formulierungen nicht anhand der beobachteten polymorphen Transformationen erklärbar, da diese bei beiden Formulierungen vergleichbar ablaufen.
Auch in Bezug auf die hergestellten NLC-Formulierungen konnte demnach festgestellt werden, daß die während der Trocknung beobachteten polymorphen Transformationen nicht direkt mit dem Freisetzungsverhalten gekoppelt werden können. Analog den zuvor beschriebenen SLN konnte auch für die NLC eine Anreicherung des Arzneistoffs im Randbereich der Partikel beobachtet werden. Wie die Monoglyceridfraktion ist auch die mit Arzneistoff angereicherte Ölfraktion nur bedingt von Veränderungen der Di- und Triglyceride betroffen. Bei Stabilisierung der Partikel mit Tensiden, die eine Umlagerung und Entmischung der Lipide aufgrund ihrer Struktur nicht fördern, wird der Arzneistoff jedoch im Verlauf der Freisetzung gegenüber den SLN verzögert freigesetzt.

Die Ergebnisse legen nahe, daß der Vorteil von NLC-Formulierungen hauptsächlich in der Erhöhung der Beladbarkeit mit Arzneistoff und einer gesteigerten Langzeitstabilität zu finden sind. Das Freisetzungsverhalten von ölbeladenen Lipidnanopartikeln kann dagegen erheblich differieren. Im Rahmen dieser Arbeit konnte das Modell nach Jenning mit im festen Lipid eingeschlossenen Ölclustern für Octyldodecanol und Cyclosporin A nicht bestätigt werden. Die Anreicherung eines großen Teils der flüssigen Fraktion in der Phasengrenze erscheint anhand der Freisetzungsdaten für das Cyclosporin A-System wesentlich wahrscheinlicher.
Betrachtet man jedoch das einleitend beschriebene Konzept der übersättigten SLN- bzw.- NLC-Cremes, ist eine starke Freisetzung aus den Partikeln innerhalb der ersten Stunden durchaus wünschenswert, da nur auf diese Weise eine Übersättigung der Cremegrundlage erzielt werden kann, die von therapeutischer Relevanz wäre. Freisetzungen über einen Zeitraum von mehreren Tagen, wie Jenning sie in seiner Arbeit beschrieben hat, sind für die topische Applikation von untergeordnetem Interesse. Von entscheidender Bedeutung ist dagegen die Frage, ob die Nanopartikel nach Einarbeitung in die Cremegrundlage den Arzneistoff auch weiterhin inkorporieren können, oder ob es während der Lagerung zur Kristallisation im System kommt. Im folgenden Kapitel sollen die nanopartikelhaltigen Systeme in Bezug auf Lagerstabilität und Freisetzungsverhalten eingehend untersucht und verglichen werden.