
5 Budesonid

5.1 Anwendung von Budesonid

Die Substanz Budesonid wird seit mehreren Jahren in der Therapie von mittelschwerem bis schwerem Asthma eingesetzt [MSD Manual, 1993; Hickey, 1992]. Sie stellt, zusammen mit anderen Kortikosteroiden, eine der am häufigsten eingesetzten Substanzen in der prophylaktischen Therapie von Asthma dar. Budesonid wird rasch in unveränderter Form absorbiert.

Die Substanz findet weitere Anwendung bei der Behandlung von Morbus Crohn in Form von überzogenen Tabletten oder Kapseln [Rote Liste, 2000]. Die Tabletten bzw. Kapseln lösen sich erst im Dickdarm auf; dort soll Budesonid lokal wirken. In dieser Arbeit wird im wesentlichen auf die Formulierung einer Nanosuspension für die inhalative Applikation eingegangen.

5.2 Anatomie und Physiologie der Lunge

Die Lunge des Menschen liegt gut geschützt im knöchernen Brustkorb, der von den Rippen, dem Brustbein und der Wirbelsäule gebildet wird. Gegen die Bauchhöhle wird der Brustkorb durch das Zwerchfell abgeschlossen, eine kuppelförmige Muskelplatte, deren Zusammenziehen das Ansaugen von Luft, also das Einatmen bewirkt. Die Innenfläche des knöchernen Brustkorbes ist vom Rippenfell ausgekleidet, einer feinen, membranartigen Zellschicht. Eine ähnliche Zellschicht überzieht die Lungenoberfläche. Zwischen diesen beiden Membranen liegt ein feiner Flüssigkeitsfilm, der Lunge und Brustkorb verschieblich verbindet.

Die Lunge besteht aus zwei Lungenflügeln; jeder Lungenflügel wiederum ist in 2 bzw. 3 Lungenlappen mit weiteren Untersegmenten geteilt. Zwischen den beiden Lungenflügeln liegt das Mittelfell mit dem Herzbeutel, der Luft- und Speiseröhre, wichtigen Nerven, Lymphbahnen und den großen, herznahen Blutgefäßen. Die eingeatmete Luft gelangt zunächst in die Luftröhre. Diese gabelt sich in die beiden Hauptbronchien, die zum rechten bzw. linken Lungenflügel ziehen. Innerhalb des Lungengewebes verzweigen sich die Hauptbronchien weiter in immer kleinere Bronchialäste, ähnlich den Zweigen eines Baumes. Am Ende dieser Äste schließlich sitzen die Lungenbläschen, in denen der eigentliche Gasaustausch stattfindet: Der eingeatmete Luftsauerstoff wird von roten Blutkörperchen aufgenommen. Damit steht er den energieliefernden Prozessen, die in jeder Körperzelle ablaufen, zur Verfügung. Bei die-

sen Prozessen werden als Endprodukte Kohlendioxid und Wasser gebildet, die durch Ausatmung wiederum über die Lunge abgegeben werden. Die Bronchien als Röhrensystem des Atemlufttransportes sind mit einer Schleimhaut ausgekleidet. Diese besteht aus verschiedenen Zellen. In eine Plattenzellschicht, die mit einer Oberfläche aus feinen Flimmerhärchen bedeckt ist, sind Schleimdrüsen eingebettet. Die Flimmerhärchen sollen feine, mit der Atemluft aufgenommene Fremdkörper wie Staub- oder Rußteilchen in Richtung Rachen befördern. Die Schleimdrüsen befeuchten die Atemluft.

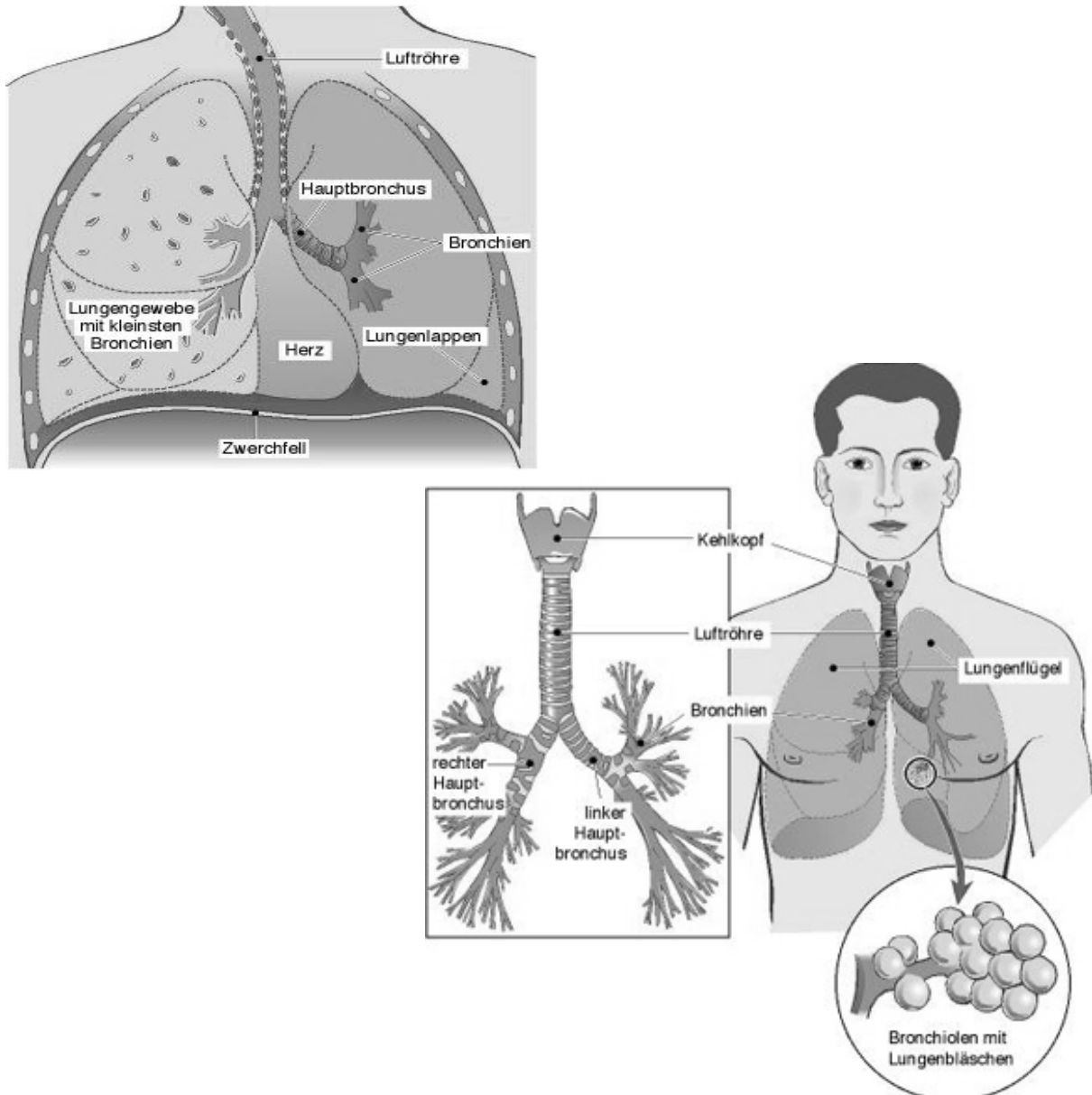


Abbildung 2-1: Aufbau der Lunge [BSMO, 2002].

5.2.1 Vorteile von Budesonid-Nanosuspensionen zur inhalativen Applikation

Kortikosteroide erreichen ihren Wirkort bzw. den Rezeptor durch Diffusion zum Rezeptor oder durch Phagozytose [Hickey, 1992].

Um eine optimale Wirkstoffabgabe in der Lunge zu erreichen, ist es wichtig, die Wirkstoffpartikel so zu formulieren, dass sie eine geeignete aerodynamische Größe, Form und Dichte besitzen.

Die aerodynamische Verteilung ist definiert als Art wie sich das Aerosol während der Inhalation absetzt. Gehorcht diese Partikelverteilung einer log-Normal-Verteilung kann der *mass median aerodynamic diameter* (MMAD) errechnet werden [Thiel, 1994 und 1996]. Dieser ist eine typische Kenngröße zur Charakterisierung sowohl von Dry Powder Inhaler (DPI) als auch von Metered Dose Inhaler (MDI) [Thiel, 1997; Stein et al. 2000]. Um diese Art der Partikel- und/oder Tröpfchengröße zu ermitteln, können nach USP-NF (601) verschiedene Geräte, sogenannte cascade impactors, eingesetzt werden. Sie sollen eine bessere Korrelation zum in-vivo-Verhalten zeigen als andere Partikelgrößenanalysen. Diese speziellen Testapparaturen standen für diese Arbeit nicht zur Verfügung. Deshalb wurde auf die Partikelgrößenanalytik mit Laserdiffraktometrie und Photonenkorrelationspektroskopie zurückgegriffen.

Mit der Formulierung von Nanopartikeln können sowohl die oberen Atemwege, z. B. für die Behandlung von Krankheiten wie Asthma, als auch die tieferen Atemwege für systemische Applikationen oder lokale Effekte in der tieferen Lunge erreicht werden. Dieses ist insbesondere für Peptidarzneiformen interessant. Um die oberen Atemwege zu erreichen, sind Partikelgrößen von 3-5 μm ideal; für die tieferen Lungenbereiche sind es Partikelgrößen unter 3 μm [Thiel, 1997; Martonen und Katz, 1993]. Budesonid soll in dieser Studie den Charakter einer Modellsubstanz haben.

Budesonid wird zur Zeit mit Hilfe von Dosieraerosolen (z. B. Pulmicort Dosieraerosol, Budesonid Heumann Dosieraerosol) oder Pulverinhalatoren (z. B. Pulmicort Turbohaler, Easyhaler) appliziert. Bisher wird Budesonid in Jet-Mill Qualität in den Formulierungen eingesetzt. Mit Jet-Milling kann eine Partikelgröße von ca. 3-25 μm erreicht werden [Peters, 1999; Müller et al., a, 1995]. Um die Eigenschaften dieser Formulierungen zu verbessern, wurde Budesonid als Nanosuspension entwickelt.

Ein weiterer Vorteil von Nanosuspensionen gegenüber Mikrosuspensionen ist ihre Tendenz an Oberflächen zu haften, in diesem Falle an der Bronchialmucosa. Eine verlängerte Kontaktzeit ist für die Aufnahme von Kortikosteroiden vorteilhaft. Bei den jetzigen Formulierungen kommt es oftmals zu unerwünschten Wirkungen im Hals-Rachenraum aufgrund von sich dort niederschlagenden Mikropartikeln. Diese unerwünschten Wirkungen sind insbesondere Candida Infektionen. Nanosuspensionen hingegen haben im allgemeinen nur einen sehr geringen Anteil an Mikropartikeln, was die unerwünschten Wirkungen im Hals-Rachenraum reduzieren kann [Wiedmann et al., 1997]. Weiterhin konnte NanoSystems in vergleichenden Studien mit Beclomethasondipropionat (BDP) nachweisen, dass die Effizienz der Wirkstoffabgabe in die Lunge erhöht werden konnte [Wiedmann et al., 1997]. Dazu wurde eine Nanosuspension und eine wässrige Suspension mit mikronisiertem BDP vernebelt. Es

konnte gezeigt werden, dass der nicht einatembare Teil der mikronisierten Suspension bei 64 %, der nichteinatembare Anteil der NanoCrystal Formulierungen hingegen bei 16-21 %, lag.

Die pulmonale Applikation von Nanosuspensionen würde über eine Zerstäubung der wässrigen Nanosuspension erfolgen, wobei auch eine Applikation als sprühgetrocknete Formulierung denkbar bzw. möglich wäre (atemzugsinduzierte Applikation, wie z. B. beim Turbohaler).

Vergleicht man die gleiche Einzeldosis von Mikropartikeln und Nanopartikeln, ist die Anzahl der Nanopartikel erhöht. Statistisch gesehen wird man somit häufiger Nanopartikel anfinden als Mikropartikel (siehe Abbildung 5 -2). Geht man von einer 1%igen Suspension aus, in der die Partikelgröße bei 5 µm liegt und von aerosolisierten Tröpfchen gleicher Größe, würde nur in einem einzigen Tröpfchen ein Partikel sein, während die restlichen 99 Partikel ausschließlich aus Wasser und Hilfsstoffen bestünden. Anders ausgedrückt, wenn die Partikelgröße bei 500 nm liegt anstatt bei 5 µm, wird ein 10000-facher Anstieg an Arzneistoffpartikeln pro Dosis vorhanden sein:

$$\text{Anzahl der Partikel} = \text{Dosis} / (\text{Volumen der Partikel} * \text{Dichte des Partikels})$$

$$\text{Anzahl der } 5 \mu\text{m-Partikel} = \text{Dosis} / 4/3\pi (2,5 * 10^{-4} \text{ cm})^3 * \rho$$

$$\text{Anzahl der } 500 \text{ nm-Partikel} = \text{Dosis} / 4/3\pi (2,5 * 10^{-5} \text{ cm})^3 * \rho$$

$$\text{Anzahl der } 500 \text{ nm-Partikel} / \text{Anzahl der } 5 \mu\text{m-Partikel} =$$

$$(2,5 * 10^{-4} \text{ cm})^3 / (2,5 * 10^{-5} \text{ cm})^3 = 1000$$

Anstatt eines Arzneistoffpartikels pro 100 Tröpfchen, würde eine vernebelte Nanosuspension dann 100 Partikel pro Tröpfchen enthalten.

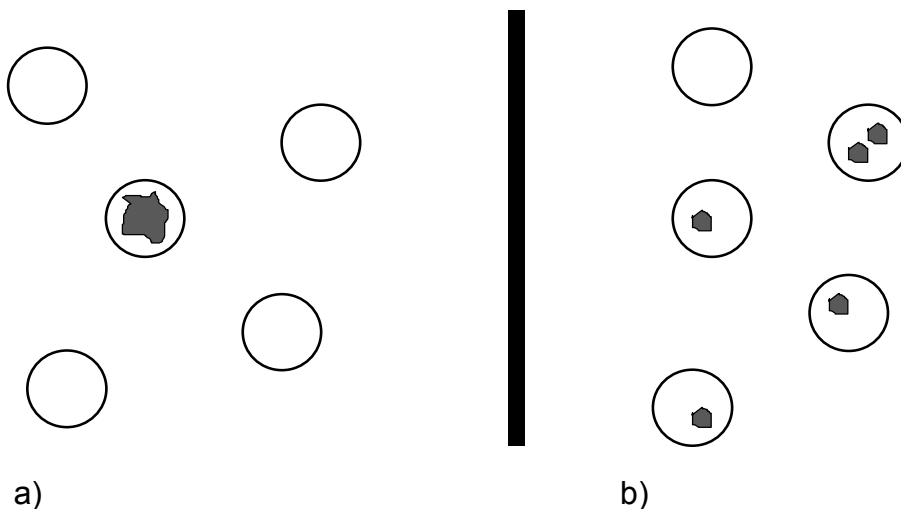


Abbildung 2-2: Schematische Darstellung der Partikelverteilung in einer mikronisierten Suspension (a) und einer Nanosuspension (b).

5.3 Herstellung und Charakterisierung von Budesonid-Nanosuspensionen

5.3.1 Rezepturscreening

Es wurden verschiedene Rezepturen auf ihre, Tauglichkeit Budesonid als Nanosuspension zu stabilisieren, untersucht. Ausgewählt wurden Tenside, die entweder schon auf dem Markt für inhalative Applikationen eingesetzt werden [Rote Liste, 2002], oder aber als geeignet nach GRAS (general regarded as safe) [FDA, Database] gelten. Die Zusammensetzung der Rezepturen ist in Tabelle 3-1 dargestellt.

Tabelle 3-1: Zusammensetzung der Rezepturen (Konzentration in (m/m)).

Substanz	BD1	BD2	BD3	BD4	BD5	BD6
Budesonid	0,5 %	0,5 %	1,0 %	1,0 %	1,0 %	1,0 %
Lecithin	0,1 %	0,5 %	0,1 %	0,5 %		
Span [®] 85	0,1 %	0,5 %			0,1 %	
Tyloxapol			0,2 %	0,2 %		0,2 %
Tween [®] 80					0,5 %	
Cetylalkohol						0,1 %
Aqua dem.	ad 100,0 %	ad 100,0 %	ad 100,0 %	ad 100,0 %	ad 100,0 %	ad 100,0 %

Alle Chargen wurden mit 10 Zyklen bei 1500 bar homogenisiert. Die Ergebnisse der Partikelgrößenbestimmung (LD) unmittelbar nach Herstellung sind in Abbildung 3-3 dargestellt. Die Partikelgröße der Ausgangssubstanz betrug für den D 50 % 1,93 μm ($\pm 0,1 \mu\text{m}$), D 90 % 5,87 μm ($\pm 0,1 \mu\text{m}$), D 95 % 1,49 μm ($\pm 0,1 \mu\text{m}$) und D 99 % 10,45 μm ($\pm 1,0 \mu\text{m}$).

Die Kombination aus Tyloxapol und Cetylalkohol ist ungeeignet Budesonid zu stabilisieren. Unzweckmäßig sind ebenso Lecithin und Span[®]85, zumindest in den untersuchten Konzentrationen. Eine Kombination von Lecithin und Tyloxapol scheint für die Stabilisierung am geeignetsten zu sein. Die Formulierungen BD3 und BD4 enthalten verschiedene Konzentrationen an Lecithin. Betrachtet man zusätzlich die PCS-Daten, sind beide in etwa gleich, bei 600 nm und einem PI von 0,308. Weil es sich bei anderen Rezepturen für Nanosuspensionen als vorteilhaft erwiesen hatte eine höhere Tensidkonzentration einzusetzen (vgl. Kapitel 4 über Tarazepid) und mit BD4 akzeptable Ergebnisse erreicht werden konnten (relativ kleiner Anteil an Mikropartikeln und eine mit Hilfe der PCS ermittelte Hauptpopulation im Nanometerbereich), wurde mit dieser Rezeptur und nicht mit BD3 weitergearbeitet.

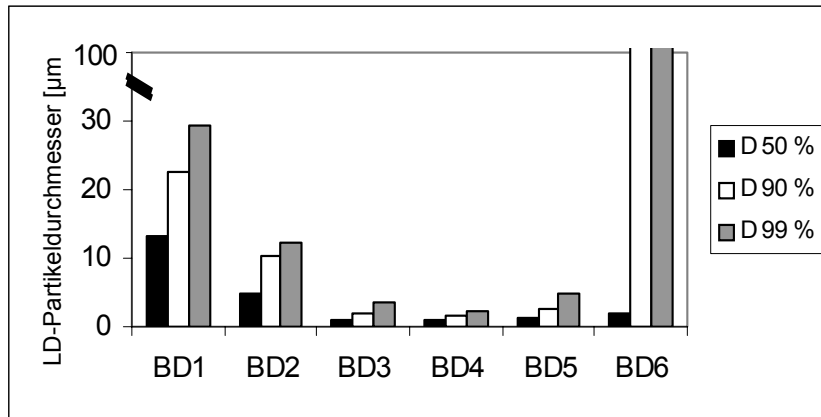


Abbildung 3-3: LD-Partikeldurchmesser D 50 %, D 90 % und D 99 % der Rezepturen aus Tabelle 3-1 , nach 10 Homogenisationszyklen.

Um abzuschätzen, ob eventuell noch eine weitere Partikelzerkleinerung erreicht werden kann, oder ob die Suspension schon „überhomogenisiert“ ist oder in wieweit die Grenzdispersion erreicht wurde, wurde die Formulierung BD4 mit 20 Zyklen bei 1500 bar homogenisiert. Nach jeweils 2 Zyklen sind Proben gezogen worden. Es konnte dabei noch eine weitere Reduzierung der Hauptpopulation und eine Minimierung des mikropartikulären Anteils erreicht werden (Abbildung 3-4).

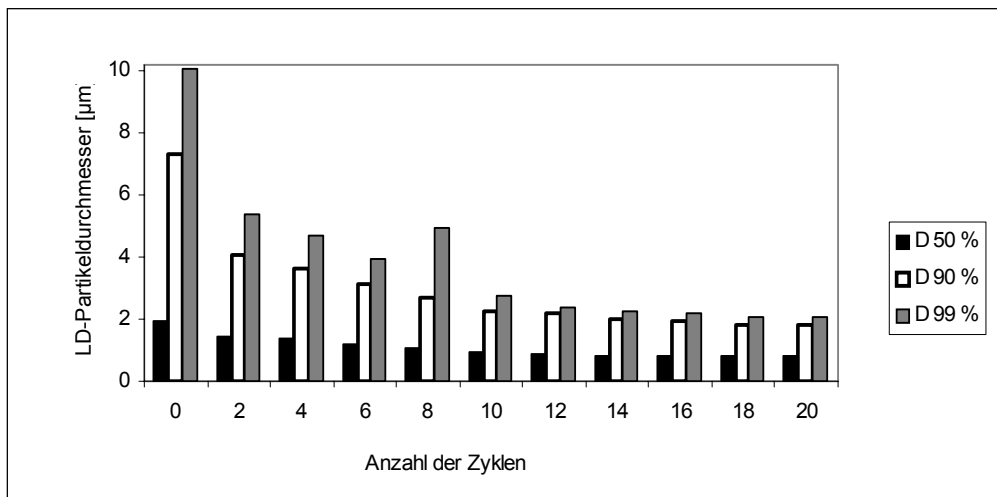


Abbildung 3-4: LD-Durchmesser D 50 %, D 95 % und D 99 % der Rezeptur BD4 in Abhängigkeit von den Zyklenzahlen.

Nach 10 Zyklen wurde ein D 50 % von $0,96 \mu\text{m}$ ($\pm 0,04 \mu\text{m}$) erreicht. Nach 10 weiteren Homogenisationszyklen konnte eine Reduzierung des D 50 % auf $0,81 \mu\text{m}$ ($\pm 0,01 \mu\text{m}$) realisiert werden. Die Durchmesser D 95 % und 99 % konnten um $0,34 \mu\text{m}$ verkleinert werden. Die PCS-Analytik zeigte, dass eine Reduktion von 600 nm auf ca. 500 nm erreicht werden konnte. Im weiteren wurden deshalb alle Chargen von Budesonid durch Homogenisation mit 20 Zyklen bei 1500 bar hergestellt, um das Erreichen der Grenzdispersität zu gewährleisten.

5.3.2 Erhöhung der Konzentration

Um flexibel in der Feststoffkonzentration einer Formulierung zu sein (üblich für Dosieraerosole sind 4 mg/ml ($200 \mu\text{g}/70 \text{ mg}$ bzw. $0,05 \text{ ml}$ pro Sprühstoß)), wurde anhand Formulierung BD4 untersucht, ob die gleiche Tensidkonzentration auch eine höhere Arzneistoffkonzentration stabilisieren kann. Je nach Anforderungen an die Darreichungsform sollte eine Formulierung mit verschiedenen Konzentrationen möglich sein. In Abbildung 3-5 ist der Vergleich einer 1%igen und einer 10%igen Charge zu sehen, bei denen sowohl die LD-Durchmesser D 50 %, D 95 % und D 99 %, als auch die PCS-Durchmesser dargestellt sind.

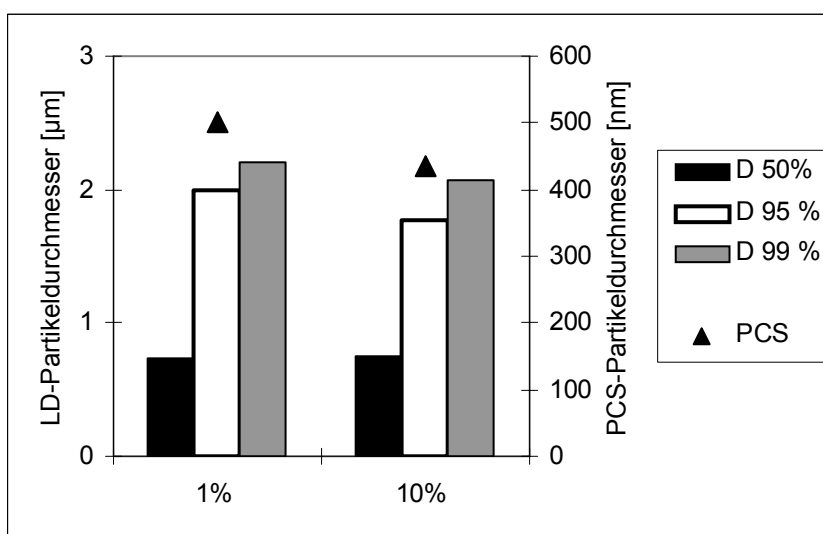


Abbildung 3-5: Vergleich der LD-Durchmesser D 50 %, D 95 % und D 99 % und der PCS-Durchmesser von einer 1%igen und einer 10%igen Budesonid-Nanosuspension.

Der PCS-Durchmesser der 10%igen Charge liegt bei 435 nm (PI $0,220$), im Vergleich zu 500 nm (PI $0,397$) bei der 1%igen. Die Partikeldurchmesser, die mit der Laserdiffraktometrie ermittelt worden sind, liegen für die 10%ige Charge ebenfalls unter denen der 1%igen. Der LD 99 % bei der 10%igen Charge erreicht $2,07 \mu\text{m}$ und beträgt $2,20 \mu\text{m}$ bei der Charge mit geringerer Konzentration. Dass die Daten der höher konzentrierten Charge etwas besser ausfallen, ist auf die höhere Reibung und die höhere Kollisionsrate im Spalt zurückzuführen (Tabelle 1-1). Diese Faktoren bewirken, dass eine leicht bessere Dispersität erreicht werden kann.

5.3.3 Zetapotenzial

Zetapotenzial-Untersuchungen wurden durchgeführt, um Informationen über die Oberflächenladung der Partikel zu erhalten. Mit Hilfe des Zetapotenzials kann eine Einschätzung bezüglich der Langzeitstabilität gemacht werden. Um eine physikalisch stabile Suspension bei elektrostatischer Stabilisierung zu erhalten, geht man nach Literaturangaben davon aus, dass schon ± 35 mV hierfür ausreichend sind, wobei ± 50 mV optimal wären [Müller, 1996]. Im Falle einer Kombination aus elektrostatischer und sterischer Stabilisierung würde schon ein Zetapotenzial von ± 20 mV ausreichen. Die hier untersuchten Nanosuspensionen BD3 und BD6 enthielten Lecithin (elektrostatische Stabilisierung), Tyloxapol und Cetylalkohol (nur BD6) (durch beide erfolgt eine sterische Stabilisierung). Zunächst wurde das Zetapotenzial der beiden Chargen in Aqua dem. gemessen, dabei die Leitfähigkeit auf $50 \mu\text{S}/\text{cm}$ eingestellt, um Ioneneinflüsse auf das Zetapotenzial in der Verdünnung zu minimieren. Der pH-Wert lag bei allen Verdünnungen zwischen 6-7. Die Charge BD6 erreichte ein Potenzial von -12 mV ($\pm 2,3$ mV), während BD3 ein Zetapotenzial von $-41,1$ mV ($\pm 4,9$ mV) aufweist. Als zweiter Schritt wurde das Zetapotenzial im Dispersionsmedium vermessen, um die Langzeitstabilität einschätzen zu können. Dabei hatte BD3 ein Zetapotenzial von -49 mV ($\pm 3,0$ mV). Dieser Wert kennzeichnet eine gute physikalische Stabilität der Nanosuspension. Das Dispersionsmedium alleine wies ein Zetapotenzial von $-51,8$ mV ($\pm 0,6$ mV) auf. Das ist damit zu erklären, dass hier Lecithin enthalten ist und dieses in der Lage ist, spontan Liposomen zu bilden, was bei der Herstellung mit großer Wahrscheinlichkeit geschehen ist. Das Zetapotenzial dieser Formulierung erwies sich als unabhängig vom Herstellungsweg (kontinuierlich oder diskontinuierlich). Sowohl bei der Herstellung der 40 ml Chargen (diskontinuierliche Herstellung), als auch bei der Herstellung der 300 ml Charge (siehe 3.4 Scale up, kontinuierlicher Herstellungsmodus) wurden annähernd gleiche Werte erreicht. Für die 40 ml Chargen waren es $-49,8$ mV $\pm 3,0$ mV und für die kontinuierlich hergestellten Chargen $-51,2 \pm 2,8$ mV. Das Zetapotenzial wurden jeweils in Aqua dem. [Leitfähigkeit $50 \mu\text{S}/\text{cm}$] bestimmt. Die Zetapotenziale sind zur Übersicht in Tabelle 5-2 zusammengefasst.

Tabelle 3-1: Zetapotenzialwerte der Formulierungen B3, B6, einer 40 ml und einer 300 ml Charge.

	BD3	BD6	40 ml Charge	300 ml Charge
Aqua. dem $50 \mu\text{S}$	$-41,1$ mV ($\pm 4,9$ mV)	-12 mV ($\pm 2,3$ mV)	$-49,8$ mV ($\pm 3,0$ mV)	$51,2$ mV ($\pm 2,8$ mV)
Dispersionsmedium	-49 mV ($\pm 3,0$ mV)	keine Messwerte ermittelt	keine Messwerte ermittelt	keine Messwerte ermittelt

5.3.4 Scale up

Weiterhin wurde die Formulierung BD4 zu Untersuchungen zum Scaling up genutzt. Die Formulierung wurde vorher auf einem LAB 40 produziert, auf dem bis zu 40 ml prozessiert werden können. Anschließend wurde mit einem modifiziertem LAB 40 produziert, mit dem bis zu 500 ml homogenisiert werden können. Bei diesem LAB 40 handelt es sich um einen von der Firma APV so umgebauten LAB 40, dass im kontinuierlichen Verfahren homogenisiert werden kann.

Es wurden Chargen von 300 ml produziert und mit den Ergebnissen der 40 ml-Chargen verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-6 dargestellt.

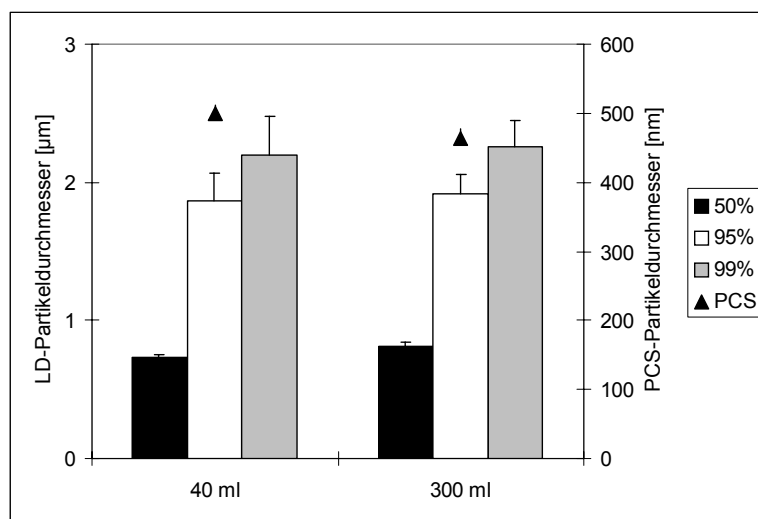


Abbildung 3-6: LD-Durchmesser 50 %, 95 % und 99 % und der PCS-Durchmesser der Budesonid-Nanosuspension, hergestellt mit der diskontinuierlichen Methode (40 ml) und mit der kontinuierlichen Methode (300 ml) (jeweils n=3).

Das Scale up für diese Formulierung war problemlos. Eine vergleichbare Partikelgröße, wie bei der Produktion auf dem LAB 40, konnte auch mit der kontinuierlichen Methode erreicht werden. Die Hauptpopulation, charakterisiert durch den D 50 %, lag bei den 40 ml-Chargen bei $0,73 \mu\text{m} \pm 0,01 \mu\text{m}$ und bei den 300 ml-Chargen bei $0,81 \mu\text{m} \pm 0,04 \mu\text{m}$. Der PCS-Durchmesser, ebenfalls zur Charakterisierung der Hauptpopulation geeignet, betrug für die 40 ml-Charge $500 \text{ nm} \pm 12 \text{ nm}$ mit einem PI von 0,373. Für die 300 ml-Chargen wurden Werte von $463 \text{ nm} \pm 14 \text{ nm}$ und ein PI von 0,377 ermittelt. Die Zetapotenzialbestimmung ergab, dass auch bei der kontinuierlichen Produktion dieser Formulierung keine anderen Adsorptions- bzw. Desorptionsvorgänge stattfanden als bei der diskontinuierlichen Produktion. Die Zetapotenziale (in Dispersionsmedium vermessen) betragen für 40 ml-Chargen $-43 \text{ mV} (\pm 2,7 \text{ mV})$ und für 300 ml-Chargen $-45 \text{ mV} (\pm 1,5 \text{ mV})$ und waren damit vergleichbar.

5.3.5 Vernebelung der Budesonid-Nanosuspension

Im Folgenden wurde untersucht, ob sich Nanosuspensionen vernebeln lassen.

Der technische Apparatenaufwand für die Herstellung von Dosieraerosolen ist sehr groß und konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden. Deshalb wurde die Vernebelbarkeit der Budesonid-Nanosuspension mit einem PariBoy der Firma Pari (Starnberg, Deutschland) untersucht. Die Suspension wurde mit Luftdruck durch ein Ventil gepresst und feinst vernebelt. Es wurden sowohl Nanosuspensionen mit einem Arzneistoffanteil von 1 %, als auch mit einem Anteil von 10 % vernebelt (Rezeptur BD4, Tensidgehalte unverändert, Arzneistoffkonzentration 1 % und 10%). Die Tröpfchen der jeweils vernebelten Suspension

wurden mit einem Becherglas aufgefangen und die Partikelgrößen des Feststoffanteils vermessen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zur Vernebelung sind in Abbildung 3-7 gezeigt..

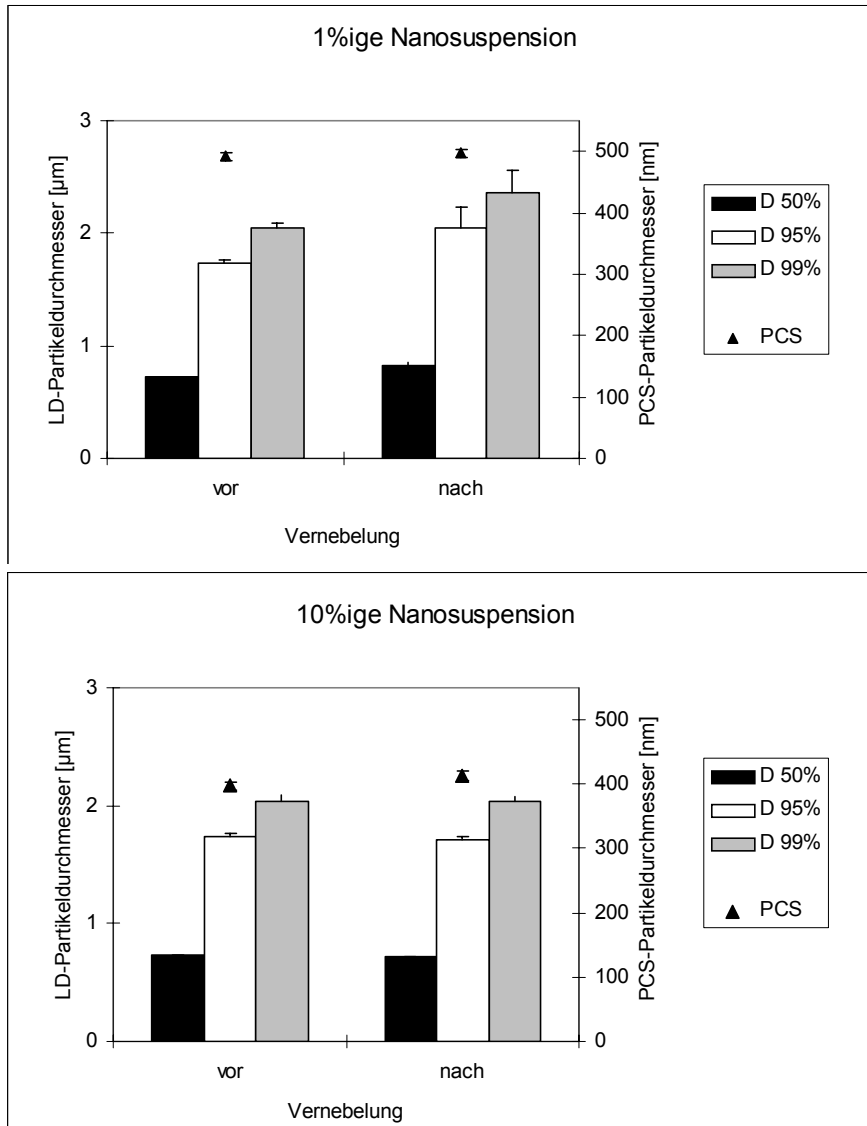


Abbildung 3-7: LD-Durchmesser D 50 %, D 95 % und D 99 % sowie die PCS-Durchmesser einer 1%igen Nanosuspension (oben) und einer 10%igen Suspension (unten) vor und nach Vernebelung (dazugehörige PI-Werte der 1%igen 0,384 und 0,310, der 10%igen 0,287 und 0,283).

Ein leichter Anstieg der Partikelgrößen nach der Vernebelung kann damit erklärt werden, dass das Wasser des Dispersionsmediums während der Vernebelung verdampft und feste Partikel zurücklässt, die dann agglomerieren. Wie aus den beiden Graphiken zu erkennen ist, kann dieser Effekt jedoch hier weitgehend vernachlässigt werden. Die LD-Werte stiegen

bei der 1%igen um ca. 0,3 µm bei der 10%igen gar nicht an. Die PCS- und PI-Werte der 1%igen Nanosuspension blieben gleich, die der 10%igen Nanosuspension stiegen leicht von 398 nm (PI 0,287) auf 413 nm (PI 0,283) an.

Dieser relativ einfache Versuchsaufbau zeigt besonders gut, dass sich Nanosuspensionen vernebeln lassen, und dass es während und nach der Vernebelung nicht zu Aggregationen kommt. Bei dieser Versuchsanordnung passiert die Nanosuspension zwischen PariBoy und Becherglas Raumluft. Die Raumluft besitzt eine sehr viel geringere Feuchte als Atemluft und kann im Vergleich mit dieser mehr Wasser von der feinstverteilten Suspension aufnehmen, die die Nanosuspension sonst durchströmen würde. Außerdem handelt es sich bei diesem Versuchsaufbau um ein nahezu offenes System. Der Luftraum, der Dispersionsmedium aufnehmen kann, ist im Gegensatz zum „menschlichen Modell“ nicht begrenzt. Es ist also davon auszugehen, dass dieser Test noch schwierigere Bedingungen für die Nanosuspension aufweist, als bei der Applikation am Menschen bestehen würden.

5.3.5.1 Gleichförmigkeit des Gehaltes und der Masse nach Vernebelung

Um auszuschließen, dass nur kleine Partikel vernebelt wurden und größere zurückblieben und eventuell Aggregate gebildet haben, wurde die Gleichförmigkeit des Gehaltes und der Masse nach Vernebelung der Nanosuspension untersucht.

Eine 1%ige Nanosuspension (stabilisiert mit 0,5% Tween[®]80) wurde, wie bereits in 3.5 beschrieben, mit Hilfe eines PariBoys vernebelt und in einem Becherglas aufgefangen. Die Nanosuspension wurde jeweils exakt 5,0 min vernebelt. Danach wurde die aufgefangene Menge gewogen. Der Mittelwert betrug **0,091 g ± 0,0047 g** (n=3). Dieses Ergebnis zeigt, dass die aufgefangene Menge, ermittelt in Gramm, sehr einheitlich ist. Um auszuschließen, dass nur „Dispersionsmedium“ mit einem relativ kleinen Anteil an Substanz aufgefangen wurde, sind diese Proben auf ihren Wirkstoffgehalt überprüft worden. Die Proben wurden in Methanol aufgenommen und der Gehalt durch UV-Spektroskopie ermittelt. :

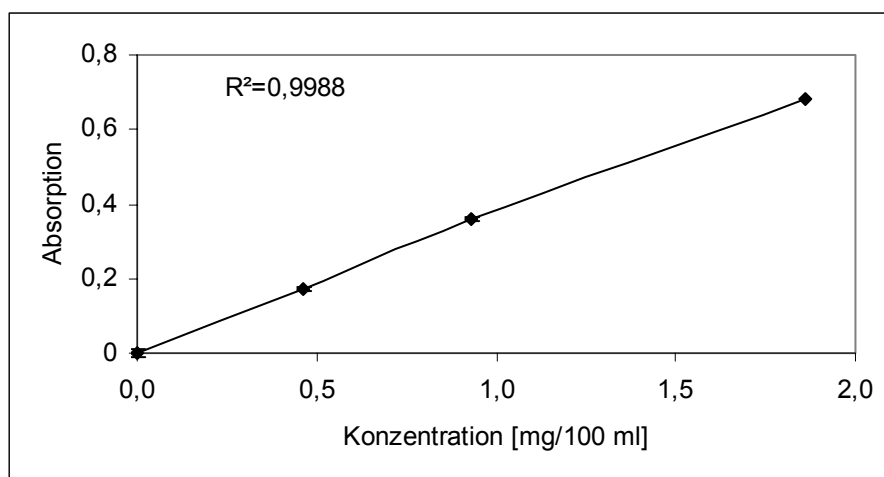


Abbildung 3-8: Eichgerade von Budesonid in Methanol, Absorptionsmaximum 242 nm, R²=Bestimmtheitsmaß.

Methanol wurde als Lösungsmittel gewählt, weil sich in diesem Medium sowohl Budesonid als auch Tween[®]80 lösen und es mit Wasser, dem Dispersionsmedium der Nanosuspension, mischbar ist. So konnte der Budesonid-Gehalt nach Verdünnung (1:10) direkt ermittelt werden. Den Untersuchungen liegt die Eichgerade von Abbildung 3-8 zugrunde.

Die gleiche Nanosuspension wurde 3 x vernebelt (Probe 1-3) und die Budesonidkonzentration sofort im Anschluss vermessen. Im Vergleich dazu wurden die original Nanosuspension und die im PariBoy nach der Vernebelung der Proben zurückgebliebenen Nanosuspension vermessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-9 dargestellt..

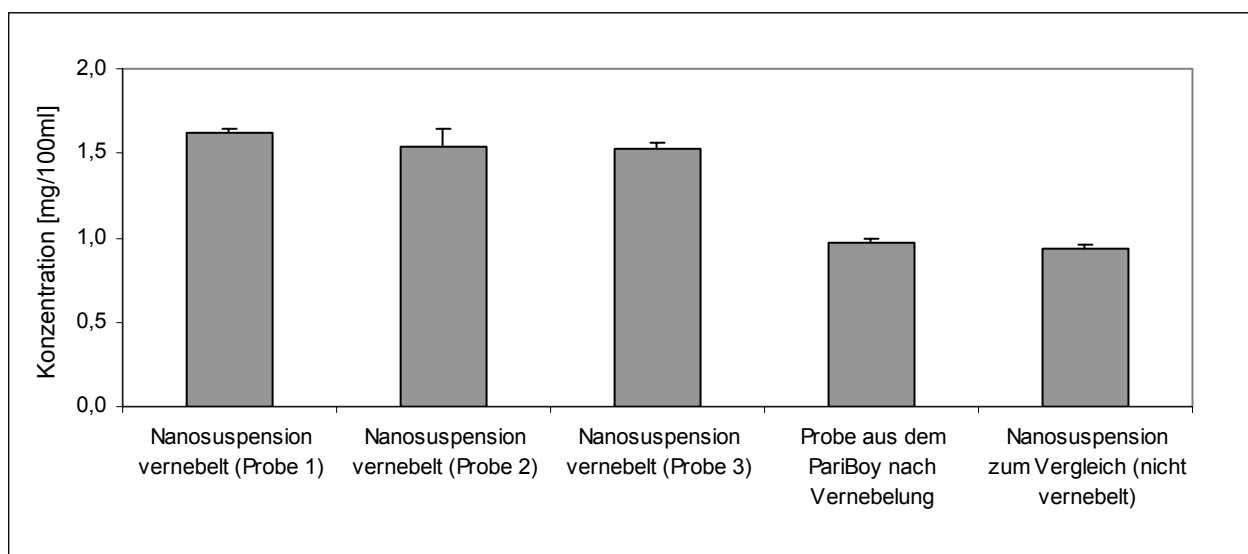


Abbildung 3-9: Konzentration an Budesonid nach Vernebelung im Vergleich zur Nanosuspension (nicht vernebelt) sowie zur im PariBoy verbliebenen Suspension.

Die Ergebnisse bestätigen das Vorausgesagte. Für die vernebelten Proben konnten im Vergleich zu der nicht vernebelten Nanosuspension ein viel höhere Gehalt Arzneistoff nachgewiesen werden. Es ist darauf zurückzuführen ist, dass während der Vernebelung das Dispersionsmedium, in diesem Falle Wasser/Tween[®]80, verdunstet und sich damit der Feststoffanteil erhöht. Das Ausmaß der Verdunstung ist in allen Fällen (Probe 1, Probe 2 und Probe 3) sehr ähnlich gewesen. Die gefundene Menge an Budesonid der vernebelten und wieder aufgefangenen Nanosuspension lag zwischen 164 % und 174 %, bezogen auf 100% Wirkstoff, der in der original Budesonid-Nanosuspension vorlag.

5.3.6 Langzeitstabilität

Die physikalische Stabilität der Budesonid-Chargen mit der Rezeptur BD4 wurden über einen Zeitraum von einem Jahr untersucht. Wie schon durch die Zetapotenzial Untersuchungen angedeutet, war die Formulierung über ein Jahr bei Raumtemperatur gelagert physikalisch stabil (Zetapotenzial ca. -44 mV, kombinierte Stabilisierung: sterisch und elektrostatisch). In Abbildung 3-10 ist beispielhaft für alle eingelagerten Chargen mit der Rezeptur BD4 die LD-Kurve am Tag der Herstellung und ein Jahr später dargestellt.

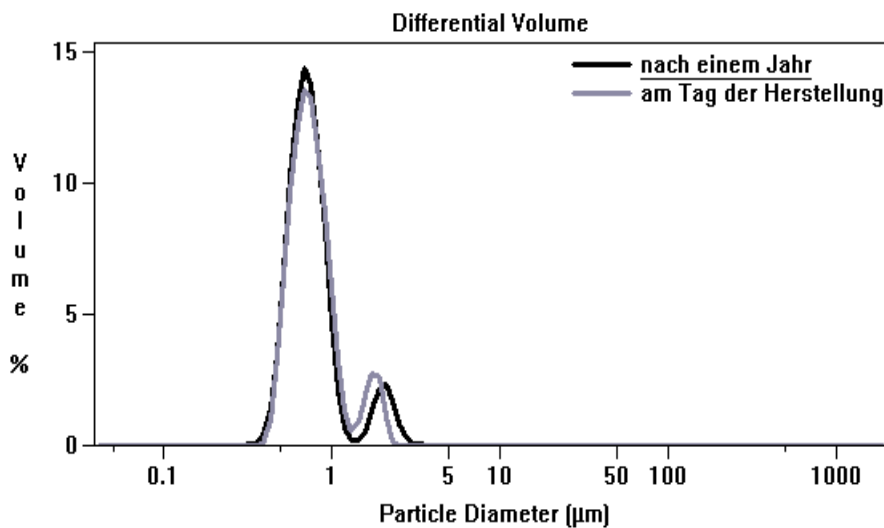


Abbildung 3-10: Partikelgrößenverteilung (LD) der Formulierung BD4 (40 ml-Charge) am Tag der Herstellung und nach Lagerung bei RT über 1 Jahr.

Die beiden Verteilungskurven sind weitestgehend kongruent. Der Partikeldurchmesser D 50 % am Tag der Produktion betrug 0,84 µm und ein Jahr später 0,85 µm. Dass kein Partikelwachstum aufgrund von OSTWALD-Reifung stattgefunden hat, zeigt der D 99 %. Dieser hatte am Tag der Produktion einen Wert von 2,04 µm und nach einem Jahr Lagerung einen von 2,12 µm.

Abbildung 3-11 zeigt die LD-Durchmesser D 50 %, D 95 % und D 99 % sowie die dazugehörigen PCS-Daten der 1%igen Nanosuspension (Formulierung BD4, 40 ml und 300 ml, von denen jeweils 3 Chargen hergestellt worden sind) in Abhängigkeit von der Lagerzeit bei Raumtemperatur.

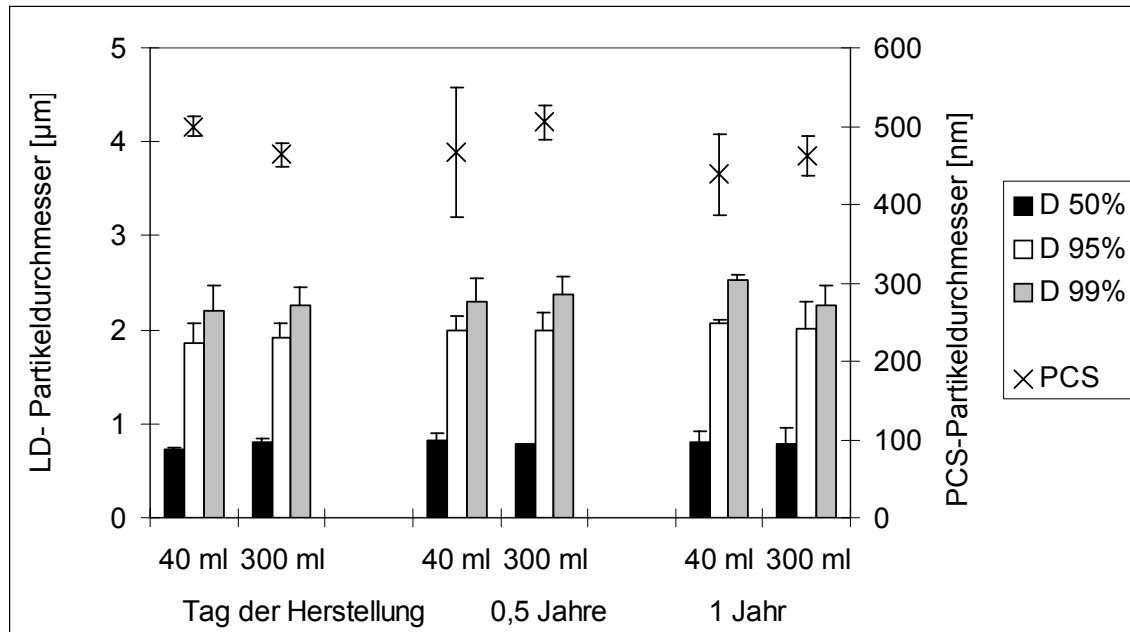


Abbildung 3-11: LD-Partikeldurchmesser D 50 %, D 95 % und D 99 % sowie der PCS-Durchmesser der Budesonid-Nanosuspensionen (Formulierung BD4), produziert als 40 ml (3 Ansätze) und 300 ml-Chargen (ebenfalls 3 Ansätze) in Abhängigkeit von der Lagerzeit (gelagert bei Raumtemperatur).

Es sind keine wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden Herstellungsarten (kontinuierlich, diskontinuierlich) während des einjährigen Untersuchungszeitraumes zu erkennen. Die Hauptpopulation der 40 ml-Chargen wuchs von 0,73 µm auf 0,80 µm, während die Hauptpopulation der 300 ml-Chargen unverändert blieben, ebenso der D 99 %, der besonders sensibel auf Aggregate oder größere Partikel reagiert. Auch dieser Wert veränderte sich nicht, blieb also über den gesamten Beobachtungszeitraum unter 2,5 µm. Die PCS-Ergebnisse unterstreichen die LD-Daten. Die PCS-Werte sowohl der 40 ml-Chargen als auch der 300 ml-Chargen waren um 460 nm und veränderten sich auch während der Lagerzeit nicht (die PI-Werte der PCS-Analyse lagen zwischen 0,285-0,397, wobei keine zeitliche Abhängigkeit zu geringeren oder höheren Werten gegeben war). Jede dieser Chargen war leicht durch Schütteln vollständig redispergierbar. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass es möglich ist, Nanosuspensionen mit Budesonid sowohl kontinuierlich als auch diskontinuierlich herzustellen, die lagerstabil sind.

5.3.7 Untersuchungen zur Kristallinität

In der Literatur wurde beschrieben, dass Substanzen z. B. durch Einwirken von Pressdruck Modifikationsänderungen erfahren haben [Kala et al., 1987]. Da die Hochdruckhomogenisation mit hohen Drücken arbeitet, sollen an dieser Stelle die Ergebnisse zur Untersuchung der Kristallinität von Budesonid dargelegt werden.

Untersuchungen der Kristallinität der Budesonid-Nanosuspension wurden mit Hilfe der Röntgendiffraktometrie durchgeführt. Da eine Messung in Kapillaren nicht möglich war, mussten die zu untersuchenden Nanosuspensionen auf dem offenem Probenhalter eingetrocknet oder eingedickt werden, z. B. mit Xanthan Gum. Beim Eintrocknen der Probe könnte es zu Rekristallisationserscheinungen kommen. Somit würden vorher (also im Suspensionszustand) vorhandene amorphe Strukturen nicht mehr detektierbar sein. Die Nanosuspension wurde deshalb nach beiden Methoden untersucht, um eventuelle Unterschiede deutlich zu machen. Es wurden Nanosuspensionen mit einem Feststoffgehalt von 10,0 % und mit Tyloxapol 0,5 % als Stabilisator gewählt (Bezeichnung der Formulierung: BD8).

Tabelle 3-1: Partikelgrößen der untersuchten Charge mit Formulierung BD8

	LD 50 %	LD 90%	LD 99%	PCS	PI
	0,825 µm (± 0,01)	1,99 µm (±0,01)	2,31µm (±0,02)	477 nm (± 3)	0,250 (± 0,067)

Die Röntgendiffraktometrie ermöglicht zum einen die Bestimmung von Kristallmodifikationen, zum anderen kann aus der Breite der Reflexe auf die kristalline Ordnung geschlossen werden. Hochkristalline Feststoffe ergeben scharfe Peaks, während ungeordnetere Strukturen zu einer Verbreiterung des Reflexes führen [Greiff und Precht, 1979]. Abbildung 3-11 zeigt das Röntgendiffraktogramm von Budesonid in Jet-Mill-Qualität, dem Ausgangsmaterial der Nanosuspensionen.

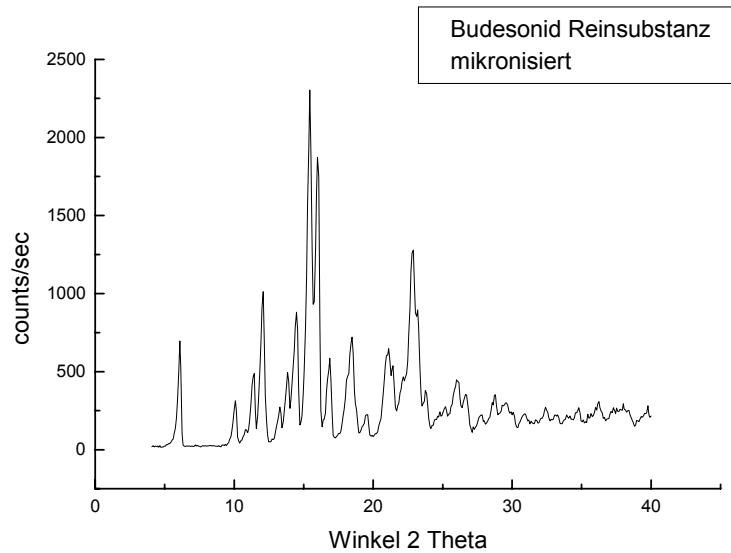


Abbildung 3-12: Röntgendiffraktogramm von Budesonid als Pulver Jet-mill Qualität.

Die ausgeprägten Reflexe zeigen deutlich, dass Budesonid als mikronisierte Reinsubstanz eine hohe Kristallinität aufweist.

Wenn die Nanosuspension mit Xanthan Gum eindickt wird, wird ein Teil des Röntgendiffraktogrammes von einem Halo, der auf das in der Nanosuspension enthaltene Wasser zurückzuführen ist, überlagert.

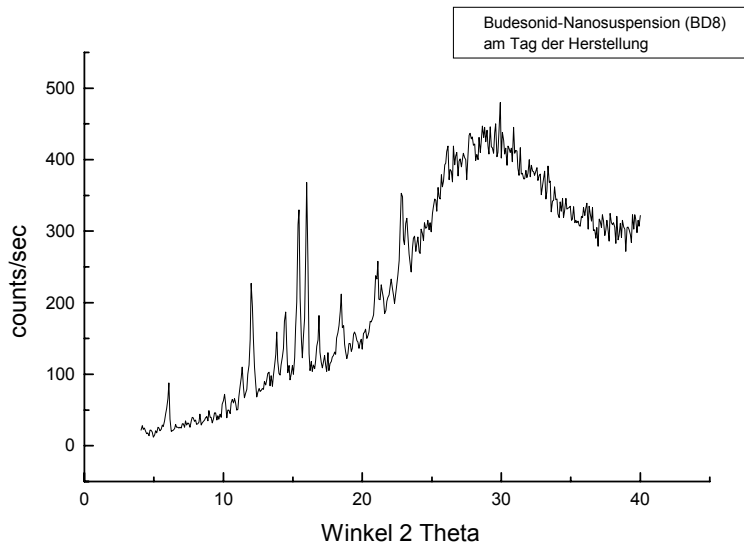


Abbildung 3-13: Budesonid-Nanosuspension BD8 vermessen am Tag der Herstellung nach Eindicken mit Xanthan Gum.

Auch diese Nanosuspension zeigt noch deutliche Reflexe und scheint damit genauso kristallin zu sein wie das Ausgangsmaterial. Es wurde untersucht, ob eventuell kristalline Strukturen von den Tensiden herrühren könnten. Zu diesem Zweck wurde die reine Tensidlösung vermessen. In Abbildung 3-14 sind die drei Röntgendiffraktogramme übereinandergelegt. Man kann allerdings die Intensität (Counts/sec) nicht direkt untereinander vergleichen, da die Budesonid-Konzentration in der untersuchten Probe nicht berücksichtigt werden konnte. Die Konzentration der Reinsubstanz z. B. liegt bei 100 %, während die eingedickten Proben aufgrund ihres geringeren Gehalts an Budesonid (10 %) und des zusätzlichen Gehalts an Xanthan Gum weniger Substanz enthalten.

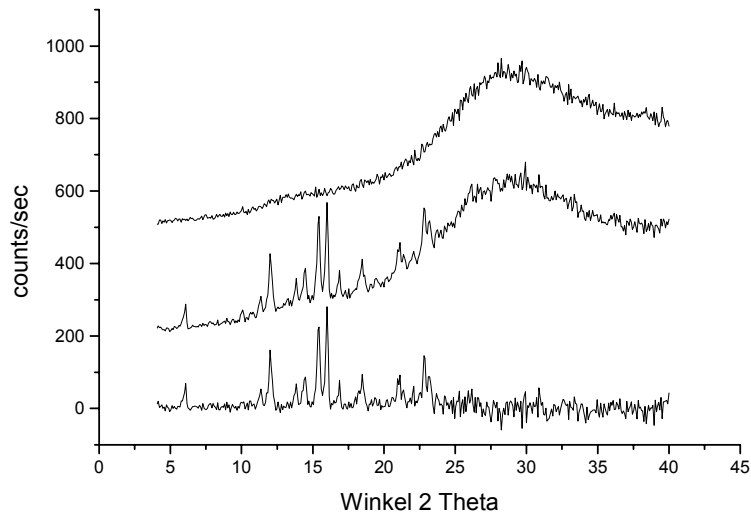


Abbildung 3-14: Tensidlösung (obere), Nanosuspension (mittlere) Resultierende aus Tensidlösung und Nanosuspension (untere).

Die obere Kurve zeigt die Tensidlösung. Es sind keine kristallinen Bereiche zu erkennen. Die mittlere die Nanosuspension aus Abbildung 3-13. Die untere Kurve zeigt das Röntgendiffraktogramm, das entsteht, wenn man die Differenz zwischen oberen und mittleren Wert bildet. Es bleiben deutlich die für die Budesonid Kristallstruktur typischen Reflexe erhalten, die auch in Abbildung 3-12 zu erkennen sind.

Um die störenden Reflexe der wässrigen Phase zu eliminieren, wurde die Nanosuspension BD8 eingetrocknet vermessen (Lagerung eine Woche im Exsikkator bei Raumtemperatur). Das Röntgendiffraktogramm ist bis auf den „Wasserbauch“ (Halo) der eingedickten Suspension identisch. Die für die Kristallstruktur von Budesonid charakteristischen Reflexe sind ebenfalls erhalten geblieben.

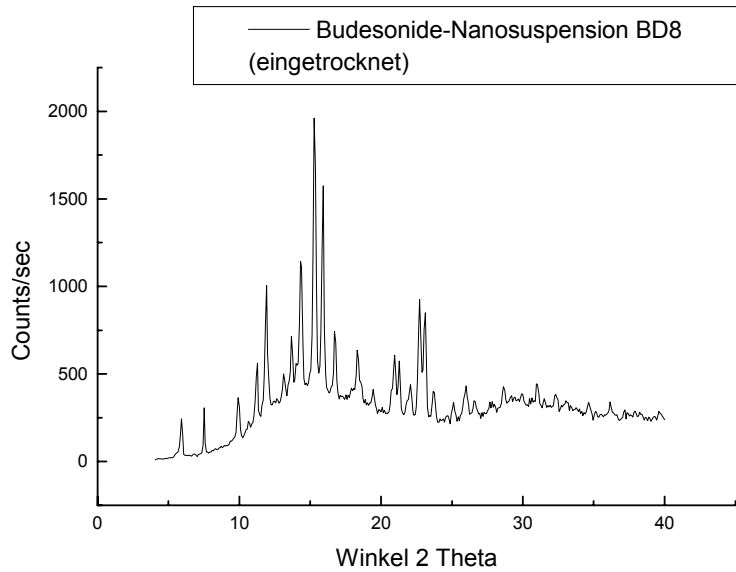


Abbildung 3-15: Budesonid-Nanosuspension BD8 eingetrocknet

Um festzustellen, ob die Lagerungszeit Einfluss auf die Kristallinität haben könnte, wurde die Budesonid-Nanosuspension nach einem Monat und nach 9 Monaten Lagerzeit vermessen. Das Ergebnis zeigt die Abbildung 3-16 .

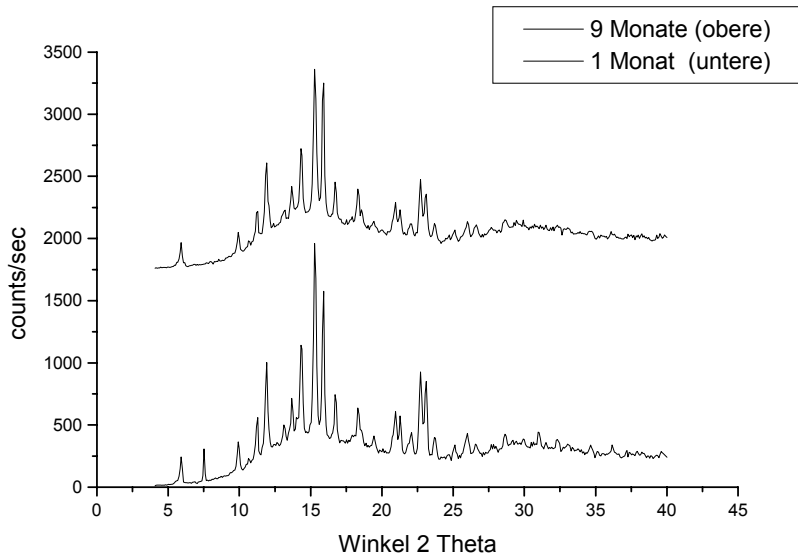


Abbildung 3-16: Budesonid-Nanosuspension Formulierung BD4 (untere) nach einem Monat und nach 9 Monaten Lagerzeit bei Raumtemperatur (obere).

Es finden sich nur unwesentliche Veränderungen wieder. Die Kristallformation des Arzneistoffes bleibt über den gesamten Zeitraum hin erhalten. Da auch keine weiteren Reflexe hinzugekommen sind, werden sich auch keine Zersetzungsprodukte gebildet haben (bei einer Konzentration > 5 % erkennbar). Die Kristallmodifikation der Nanosuspension ist demzufolge über den Untersuchungszeitraum unverändert und auch chemisch stabil geblieben.

5.4 Bestimmung des Lösungsverhaltens

5.4.1 Bestimmung der Sättigungslöslichkeit

Die Löslichkeit von Budesonid beträgt laut Literatur < 1 mg/100 ml [Stoffliste, 2000], und ist somit in Wasser schwer löslich [Ph.Eur. und USP Einteilung]. In Methanol sollen sich hingegen 1,5 mg Budesonid/100 ml lösen.

Für diese Untersuchung wurde eine Budesonid-Nanosuspension mit 0,5 % Tween[®]80 stabilisiert (Rezeptur: 1,0 % Budesonid, 0,5 % Tween[®]80 und Aqua dem. ad 100,0 %).

Das Absorptionsmaximum von Budesonid in wässrigem Medium liegt bei $\lambda=250$ nm. Als Referenz zur Nanosuspension wurde Budesonid in mikronisierter Form eingesetzt, das als Ausgangsmaterial für die Herstellung der Nanosuspension herangezogen wird, sowie Budesonid in auskristallisierter Form. Um das auskristallisierte Pulver zu erhalten, wurde Budesonid in Aceton gelöst und über 2 Wochen im Eksikkator bei Raumtemperatur wieder auskristallisiert. Es wurde die Sättigungslöslichkeit von zwei eingelagerten und einer frisch produzierten Nanosuspension untersucht. Die LD-Partikelgrößenverteilungen der untersuchten Proben sind in Abbildung 4-17 dargestellt. Die Partikelgrößen (LD und PCS) sind der Tabelle 4-1 zu entnehmen.

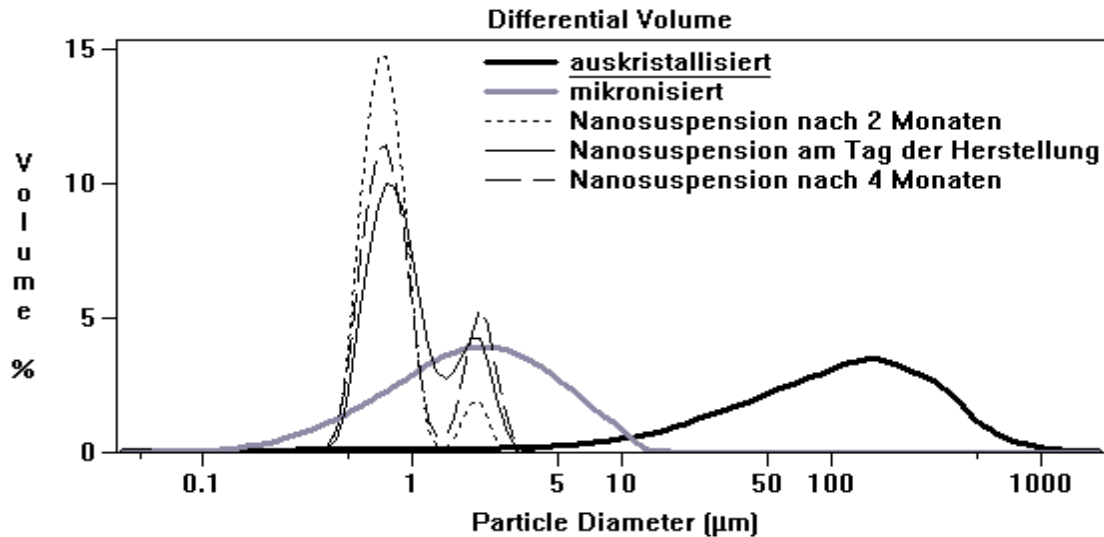


Abbildung 4-17: Partikelgrößenverteilung (LD) von Budesonid als Nanosuspension, mikronisiert und auskristallisiert.

Tabelle 4-1: Partikelgrößen der Nanosuspensionen und Ausgangssubstanz.

LD Volumen % [µm]	Budesonid-Nano-suspension Tag1	Budesonid-Nano-suspension 2 Monate	Budesonid-Nano-suspension 4 Monate	Budesonid, mikronisiert	Budesonid, auskristallisiert
D 50 %	0,90 ± 0,00	0,70 ± 0,04	0,81 ± 0,01	2,03 ± 0,06	108,30 ± 1,57
D 90 %	2,09 ± 0,04	0,98 ± 0,10	1,66 ± 0,06	6,02 ± 0,06	364,50 ± 2,72
D 95 %	2,34 ± 0,04	1,38 ± 0,44	1,88 ± 0,06	7,64 ± 0,02	470,73 ± 8,15
D 99 %	2,76 ± 0,05	1,88 ± 0,40	2,15 ± 0,05	10,46 ± 0,06	758,73 ± 8,15
PCS [nm]	720 ± 16	465 ± 24	531 ± 16	2021 ± 313	k. D.
PI	0,321 ± 0,049	0,274 ± 0,063	0,255 ± 0,082	0,554 ± 0,016	k. D.

n=3

k.D.: keine Daten, da Partikelgröße oberhalb des erfassbaren Messbereichs.

Es ist erkennbar, dass bereits das mikronisierte Budesonid eine gute Qualität hinsichtlich der Partikelgröße aufweist. Der D 50 % (charakteristischer Wert für die Hauptpopulation) liegt < 2 µm und der D 99 % bei 10 µm. Der Unterschied der Sättigungslöslichkeiten zwischen

mikronisiertem Produkt und Nanosuspension kann demzufolge nicht sehr groß sein, während vergleichsweise zum auskristallisiertem Produkt deutlich Unterschiede erkennbar sein müssten.

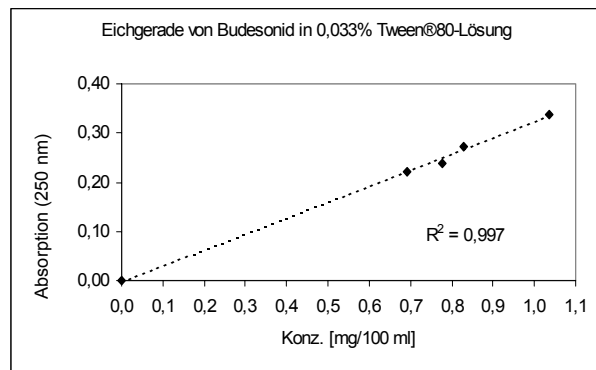
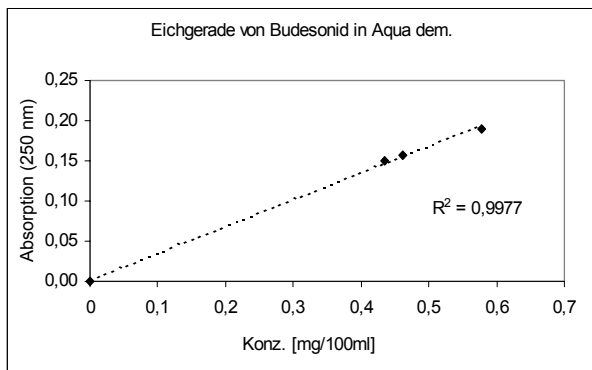
Grundlage für die quantitative Bestimmung von Substanzen mit Hilfe der UV-Vis Spektroskopie ist das Lambert-Beersche Gesetz. Es gibt die Abhängigkeit der Absorption (A) von der Konzentration (c) eines Stoffes bei konstanter Schichtdicke (b) wieder.

$$A = \varepsilon * c * b$$

Der molare Absorptionskoeffiziente (ε) entspricht bei einer bestimmten Wellenlänge, in 1 cm Schichtdicke und einer 1%igen Lösung gemessen, der spezifischen Absorption $A^{1\%}_{1\text{cm}}$, die eine charakteristische Stoffkonstante darstellt. Man erhält folgende Gesetzmäßigkeit:

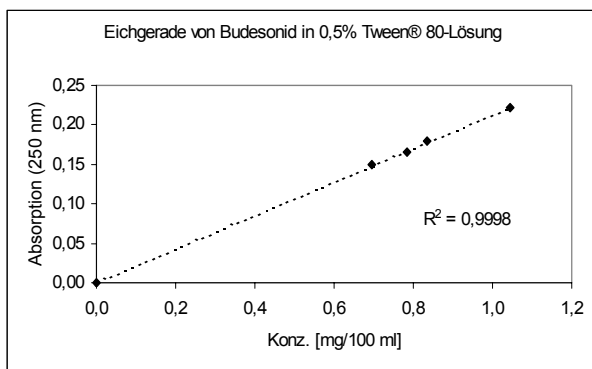
$$A = A^{1\%}_{1\text{cm}} * c * b$$

Zur Erstellung einer Eichgeraden misst man die Absorption mehrerer Lösungen von bekannter aber unterschiedlicher Konzentration und trägt diese in ein Diagramm ein als Funktion der Konzentration auf.



a)

b)



c)

Abbildung 4-18: Eichkurven von Budesonid in a) Aqua dem., b) 0,033 % Tween®80-Lösung und c) 0,5 % Tween®80-Lösung.

Abbildung 3-8 zeigt die Eichgeraden, die den Untersuchungen zugrunde gelegt wurden. Da Budesonid nur schwer in Wasser löslich ist, konnten für die Verdünnungsreihen der Eichgerade nicht immer Absorptionswerte zwischen 0,2 und 0,8 erhalten werden. Deshalb mussten für die Erstellung der Eichgerade auch Absorptionswerte $< 0,2$ herangezogen werden.

Bestimmt wurde die Sättigungslöslichkeit in Aqua dem., Tween[®]80 0,033 % und Tween[®]80 0,5 %. Die Konzentration von 0,033 % Tween[®]80 ergibt sich aus der Verdünnung 1 ml Nano-suspension mit 14 ml Aqua dem. Diese Verdünnung ist geeignet, um Absorptionswerte zwischen 0,2 und 0,8 zu erhalten, sie wurde experimentell ermittelt. Zusätzlich wurde der Einfluss von 0,5 % Tween[®]80 auf die Löslichkeit von Budesonid untersucht, um einen direkten Vergleich von reiner Substanz und Nanosuspension zu haben.

Die Ergebnisse der Bestimmung der Sättigungslöslichkeit von Budesonid in Aqua dem. bei 25°C und 37°C sind in Abbildung 4-19 dargestellt.

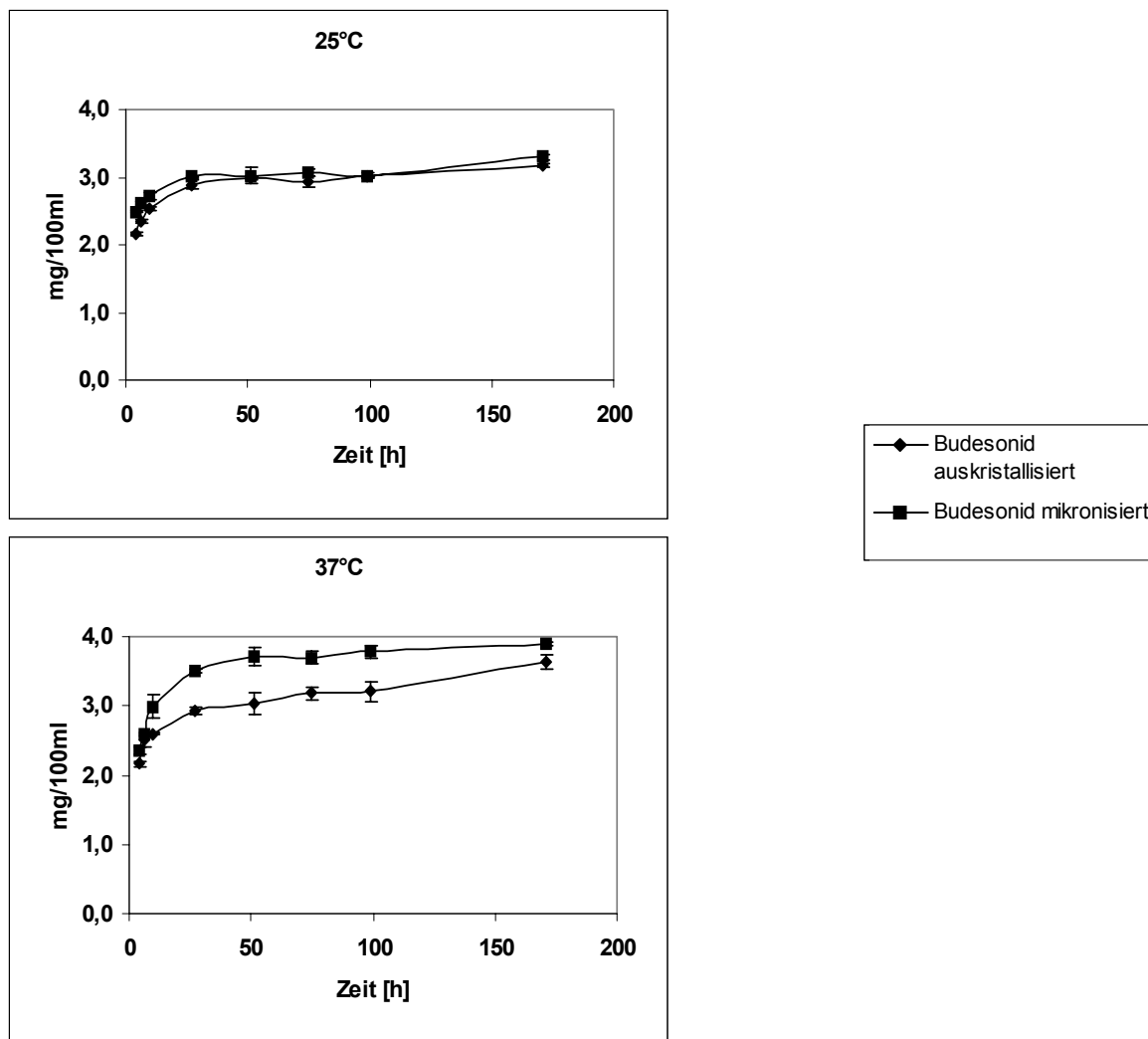


Abbildung 4-19: Gelöste Menge von Budesonid in Aqua dem. bei 25°C und 37°C in Abhängigkeit von der Zeit (n=3).

Die Sättigungslöslichkeit von Budesonid in Wasser ist nach ca. 2 Tagen mit 3,0 mg (25°C) und 3,75 mg (37°C) erreicht. Der geringe Unterschied der Löslichkeiten von Budesonid auskristallisiert und Budesonid mikronisiert ist darauf zurückzuführen, dass Budesonid schlecht benetzbar ist und die mikronisierte Substanz Agglomerate bildet. Diese für mikronisierte Substanzen typische Eigenschaften (sogenannter "Schneeball-Effekt") ist häufig in einer elektrostatischen Aufladung der aerophoben Partikel begründet. Durch die Agglomeratbildung verringert sich die benetzbare Oberfläche, so dass die Mikronisierung der Substanz nur noch zu geringen Erhöhung der Sättigungslöslichkeit führt.

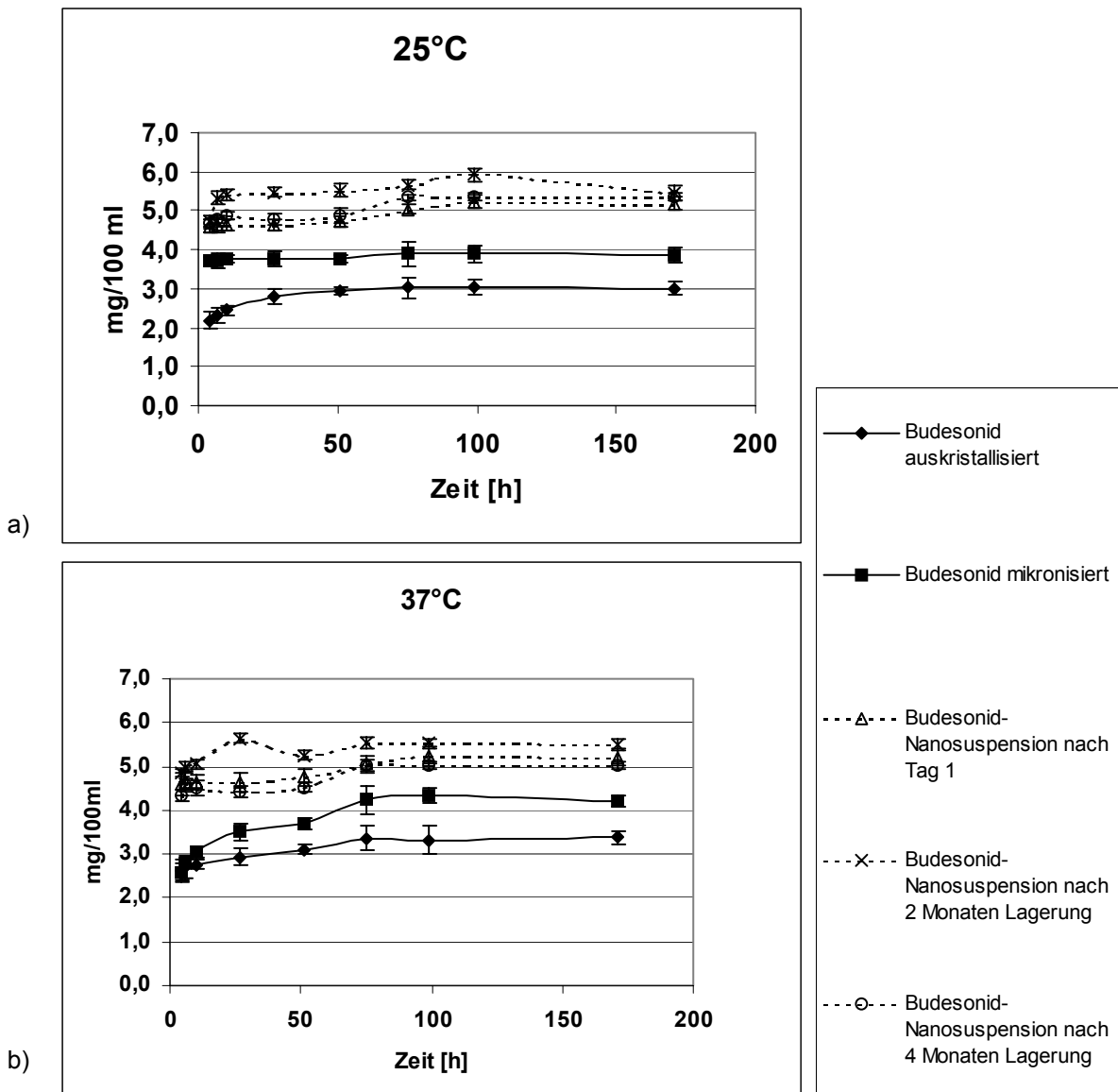


Abbildung 4-20: Sättigungslöslichkeit von Budesonid in 0,033 % Tween[®]80-Lösung im Vergleich, a) bei 25°C und b) bei 37°C (n=3).

Es ist zu erkennen, dass die Sättigungslöslichkeit von Budesonid als Nanosuspension im Gegensatz zu der mikronisierten und auskristallisierten Substanz deutlich erhöht ist. Sie stieg von 3,0 mg (25°C) bzw. 3,2 mg (37°C) auf 5,7 mg (25°C) bzw. 5,5 mg (37°C), wobei die Temperaturerhöhung von 25°C auf 37°C keinen wesentlichen Einfluss hat. Ebenfalls wenig Einfluss hat die Einlagerungszeit der Nanosuspension auf die Sättigungslöslichkeit. Die einen Tag nach der Herstellung untersuchte Nanosuspension zeigte die niedrigsten Werte. Dies kann damit erklärt werden, dass direkt nach der Herstellung noch Aggregate vorhanden sein könnten, die sich erst ein bis zwei Tagen lösen (vgl. 4.1.4.), und somit die Partikelgrößenverteilung zu größeren Partikeln hin verschoben ist (siehe Tabelle 4-1). Der Unterschied der Sättigungslöslichkeit zwischen auskristallisierter und mikronisierter Substanz wurde bei dieser Versuchsreihe deutlicher. Durch den Zusatz von Tween[®]80 änderte sich die Sättigungslöslichkeit der auskristallisierten Substanz nicht, sie blieb unverändert bei 3,0 mg/100 ml bei 25°C und 3,4 mg/100 ml bei 37°C. Die Sättigungslöslichkeit der mikronisierten Substanz erhöhte sich jedoch auf 3,8 mg/100 ml bei 25°C und 4,2 mg/100 ml bei 37°C. Da die Substanz durch den Tensidzusatz jetzt besser benetzt werden kann und damit der oben beschriebene "Schneeballeffekt" eliminiert wurde, bot die mikronisierte Substanz dem Lösungsmittel eine größere Angriffsfläche (Aggregate zerfielen), was zur Erhöhung der Sättigungslöslichkeit führte, da diese mikronisierte Substanz einen großen Feinanteil, das heißt eine große Partikelfraktion mit Partikeln < 2 µm besaß. Wie bereits beschrieben erhöht sich die Sättigungslöslichkeit bei Partikeln unterhalb dieses Durchmessers. Bei dieser Versuchsreihe ist also unter anderem erkennbar, dass der Feinanteil der mikronisierten Substanz schon zur Erhöhung der Sättigungslöslichkeit beiträgt.

Um zu untersuchen, wie sich ein erhöhter Tensidzusatz auf die Sättigungslöslichkeit auswirken könnte, wurden auch Versuche in einer 0,5%igen Tween[®]80-Lösung durchgeführt. Diese Versuche wurden mit einer frisch hergestellten Nanosuspension durchgeführt.

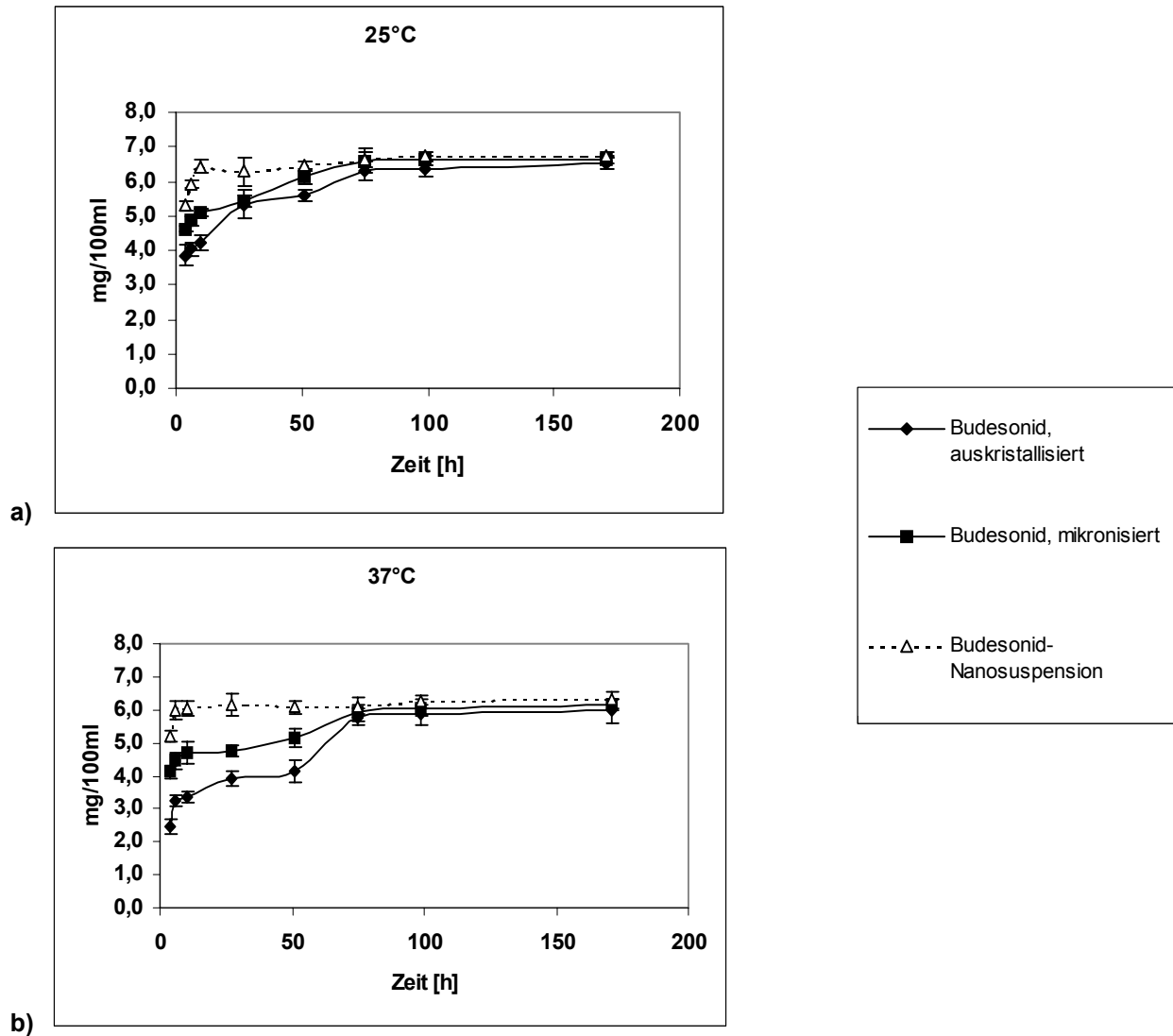


Abbildung 4-21: Sättigungslöslichkeit von Budesonid in 0,5%iger Tween[®] 80-Lösung bei a) 25°C und b) 37°C (n=3).

Die Löslichkeit von Budesonid-Substanz und Budesonid-Nanosuspension konnte durch den weiteren Zusatz von Tween[®] 80 auf 6,6 mg/100 ml erhöht werden. Hierbei ist die Sättigungslöslichkeit der Budesonid-Nanosuspension genauso groß wie die der Budesonid-Substanz. Es tauchen auch keine Unterschiede mehr zwischen auskristallisiert und mikronisiert auf. Bei der Versuchsreihe in einer 0,033%igen Tween[®] 80-Lösung (vgl. Abbildung 4-20) waren noch deutliche Unterschiede zu erkennen.

Das liegt möglicherweise an der Probenaufbereitung. Durch das verhältnismäßig lange Zentrifugieren (insgesamt 2 Stunden) wurde die Substanz am Boden des Eppendorfgesäß verfestigt. Die sonst typischen Eigenschaften der Nanopartikel konnten ihre Wirkung nicht erzielen, weil sich die Substanz wie ein großes Partikel verhielt. Eine weitere Erklärung wäre, dass bei der höheren Tween[®]80 Konzentration eine Solubilisation des Budesonids stattgefunden haben könnte, und somit eine höhere Löslichkeit erreicht wurde.

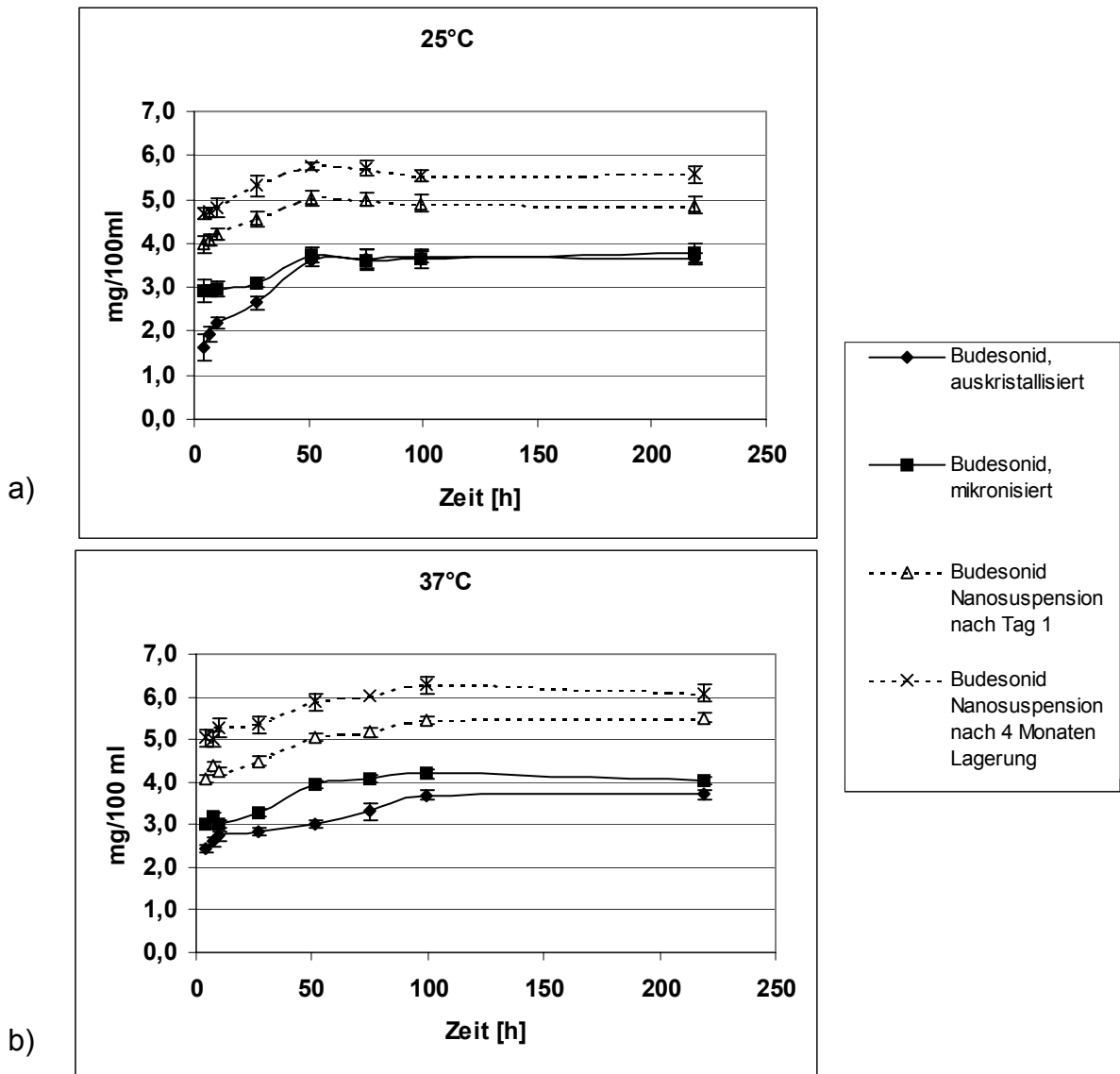


Abbildung 4-22: Sättigungslöslichkeit von Budesonid in 0,033 % Tween[®]80-Lösung auf pH 4,6 eingestellt, a) bei 25°C und b) bei 37°C (n=3).

Der pH-Wert der 0,033%igen Tween[®]80-Lösungen lag bei 6,8 und veränderte sich auch in Gegenwart des gelösten Budesonids über den Untersuchungszeitraum hinweg nicht. Der pH-Wert der 0,5%igen Lösung von Tween[®]80 betrug 4,6-4,8. Aus diesem Grunde wurde eine weitere Versuchsreihe durchgeführt, um zu überprüfen, ob sich ein geringerer pH-Wert günstiger auf die Sättigungslöslichkeit auswirken würde. Dazu wurde die 0,033%ige Tween[®]80- Lösung mit 0,1N HCl auf pH 4,6 eingestellt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-22 dargestellt.

Wie deutlich zu erkennen ist, hat die Veränderung des pH-Wertes keinen großen Einfluss auf die Sättigungslöslichkeit der Substanz. Die auskristallisierte Substanz hat eine Sättigungslöslichkeit in 0,033%iger Tween[®]80-Lösung (je nach Versuchstemperatur) von 3,0 mg - 3,3 mg; in der gleichen Lösung, mit eingestelltem pH-Wert auf 4,6 beträgt sie 3,6 mg - 3,7 mg. Die Sättigungslöslichkeit von der mikronisierten Substanz liegen um bis zu 0,3 mg höher. Die Sättigungslöslichkeiten der Budesonid-Nanosuspensionen liegen zwischen 5,1 und 6,0 mg.

Zum besseren Vergleich sind die Werte der ermittelten Sättigungslöslichkeiten in Tabelle 4-2 dargestellt.

Tabelle 4-2: Löslichkeit von Budesonid nach 99 Stunden.

		Budesonid, auskristallisiert [mg/100ml]	Budesonid, mikronisiert [mg/100ml]	Budesonid- Nanosuspension 1 Tag [mg/100ml]	Budesonid- Nanosuspension nach 4 Monaten Lagerung [mg/100ml]
0,033 % Tween [®] 80- Lösung, pH 6,8	25°C	3,0 ± 0,2	3,8 ± 0,3	5,2 ± 0,2	5,4 ± 0,1
	37°C	3,3 ± 0,3	4,2 ± 0,2	5,3 ± 0,1	5,1 ± 0,1
0,033 % Tween [®] 80- Lösung, pH:4,6	25°C	3,7 ± 0,1	3,7 ± 0,2	5,0 ± 0,2	5,5 ± 0,3
	37°C	3,7 ± 0,1	4,0 ± 0,1	5,5 ± 0,1	6,0 ± 0,2

5.4.2 Bestimmung der Lösungsgeschwindigkeit

Die Lösungsgeschwindigkeit von Budesonid wurde mit der Blattrührmethode in zwei unterschiedlichen Auflösungsmedien bestimmt (Aqua dem. mit Zusatz von Tween[®]80 0,033% , Phosphat-Puffer-Lösung pH 6,8). Budesonid wird zwar hauptsächlich in der Asthmatherapie eingesetzt, jedoch gibt es auch Formulierungen zur Behandlung des akuten Morbus Crohn magensaftresistente Kapseln (Budenofalk[®], Falk GmbH). Budesonid soll hier lokal wirken. Das Lösungsverhalten der verschiedenen Partikelgrößen wurde deshalb auch im pH-Medium 6,8 (Phosphatpuffer Ph.Eur.), das am Applikationsort Dünndarm vorliegt, untersucht. Die Versuche wurden bei 25°C und 37°C durchgeführt, die Umdrehungsgeschwindigkeit des Rührers betrug 100 rpm. Bei der Ermittlung der Auflösungsgeschwindigkeit sollte das Ver-

hältnis von c_s zu c_x möglichst groß sein. Entsprechend der Freisetzungsbestimmung nach Ph.Eur. und USP wird gefordert, dass der gelöste Anteil nur 10 % der Sättigungskonzentration betragen darf. Die sogenannten „Sink-Bedingungen“ konnten jedoch unter diesen Versuchsbedingungen (geschlossenes System) nicht eingehalten werden, da die dabei erhaltenen Konzentrationen aufgrund der Nachweisgrenze des eingesetzten analytischen Verfahrens zur Bestimmung von Budesonid nicht mehr quantitativ erfasst werden konnten. Es wurde 1,35 ml Nanosuspension mit einem Gehalt 13,5 mg Budesonid.

Zur Bestimmung der Lösungsgeschwindigkeit wurden jeweils nach 2, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 und 120 min. 2 ml Proben gezogen, die direkt im Anschluss UV-metrisch vermessen wurden. Anschließend wurde das Freisetzungsmedium mit reinem Lösungsmedium wieder aufgefüllt.

Die Lösungsgeschwindigkeit von Budesonid in einer Nanosuspension und als Rohstoff (mikronisiert und auskristallisiert) wurde in Aqua dem. mit einem Zusatz von Tween[®]80 untersucht, dessen Konzentration im Auflösungsmedium 0,033 % betrug. Die Ergebnisse sind graphisch in Abbildung 4-23 dargestellt.

Rezeptur der eingesetzten Nanosuspension: Budesonid 1,0 %, Tween[®]80 0,5 %, Aqua dem. ad 100,0 %.

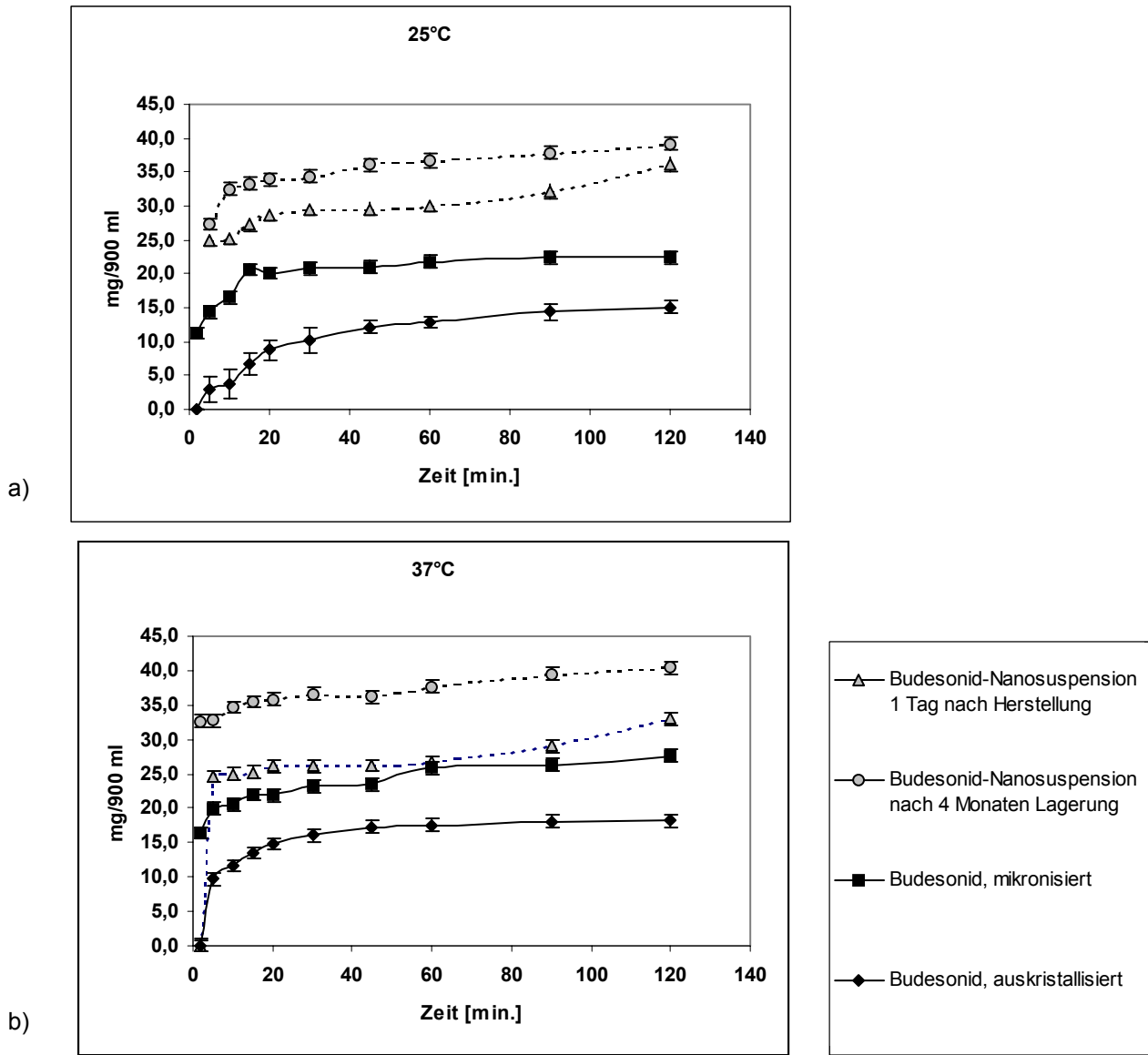


Abbildung 4-23: Lösungsgeschwindigkeit von Budesonid in einer Nanosuspension und als Reinsubstanz, auskristallisiert oder mikronisiert (n=3) a) in 25°C und b) in 37°C.

Es konnte gezeigt werden, dass sich Budesonid als Nanosuspension wesentlich schneller auflöst als in mikronisierter oder auskristallisierter Form. So liegen bei 25°C nach 5 Minuten bereits 25 mg (1 Tag nach Herstellung) und 27 mg (nach 4 Monaten Lagerung) Budesonid gelöst vor. Von der auskristallisierten Substanz liegen lediglich 3 mg und von der mikronisierten 14 mg in Lösung vor. Zusätzlich ist die nach 120 Minuten insgesamt gelöste Budesonid-Menge in einer Nanosuspension mit 36 mg und 39 mg wesentlich größer als bei der Reinsubstanz (zum Vergleich: 22 mg mikronisiert und 15 mg auskristallisiert).

Im Puffermedium pH 6,8 löst sich Budesonid als Nanosuspension sehr viel schneller, als die mikronisierte oder auskristallisierte Substanz. Außerdem wird auch hier ersichtlich, dass sich wesentlich mehr Substanz auflöst.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Budesonid als Nanosuspension formuliert nicht nur eine höhere Sättigungslöslichkeit besitzt sondern auch eine höhere Lösungsgeschwindigkeit im Vergleich zu mikronisierter oder auskristallisierter Substanz aufweist. Die Versuche haben die Theorie nach Noyes und Whitney und die Beobachtungen von Nyström weitestgehend bestätigt.

5.5 Unterschiedliche Herstellungsbedingungen von Budesonid-Nanosuspensionen

Anhand des Arzneistoffs Budesonid wurde das Partikelzerkleinerungsvermögen verschiedener Homogenisatoren und der Einfluss des Homogenisierdruckes untersucht. Dabei wurden eingesetzt: Microfluidizer MF111, LAB 40 und ein Homogenisator der Firma Stansted Fluid Power Ltd. (siehe Abschnitt 1).

Zunächst wurde Budesonid auf dem Microfluidizer MF 111 produziert. Hierbei können im Gegensatz zum LAB 40 (1500 bar) nur Drücke bis 700 bar aufgebaut werden. Deshalb wurden bei diesem Versuch ca. 100 anstatt 40 Zyklen durchgeführt. Geht man jedoch davon aus, dass 1x1500 bar gleich 2,14 x 700 bar entsprechen, würden hierfür 86 Zyklen ausreichen, diese Kalkulation kann natürlich nur eine grobe Abschätzung sein, da mehrere Faktoren in diese Berechnung eingehen. Die genaue Bestimmung der Leistung etc. sollte jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit sein. Die Zyklenzahl wird beim Microfluidizer über die Zeit ermittelt und ist damit fehlerbehaftet. Als Sicherheitszuschlag wurden einige Zyklen mehr gefahren, da mit Substanz die Homogenisierungsgeschwindigkeit geringer sein kann als mit reinem Wasser, das zur Ermittlung der Zyklenzahl/Zeiteinheit herangezogen wurde. Bei allen Versuchen wurde eine 1%ige Suspension eingesetzt, die mit 0,5% Tyloxapol stabilisiert. Im Abschnitt über das Scale up konnte bereits gezeigt werden, dass nahezu kein qualitativer Unterschied von Partikelgröße bzw. Partikelgrößenverteilung zwischen kontinuierlicher und diskontinuierlicher Herstellung beim LAB 40 besteht. Deshalb wurde hier auf diesen Parameter nicht weiter eingegangen.

5.5.1 Einfluss des Homogenisierdruckes auf die Partikelgröße

In Abbildung 5-24 sind die Partikelgrößen, die mit dem Microfluidizer erreicht wurden, in Abhängigkeit von der Zyklenzahl dargestellt.

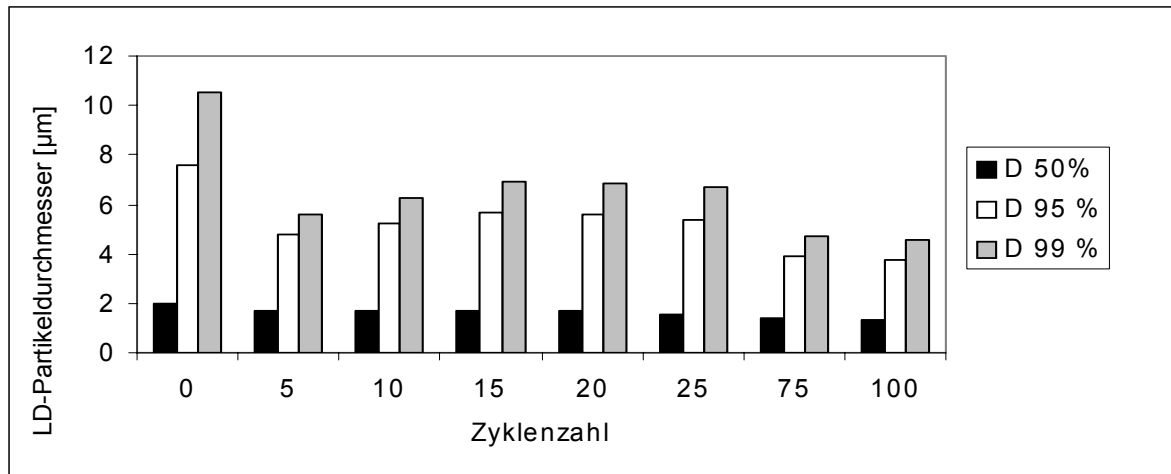
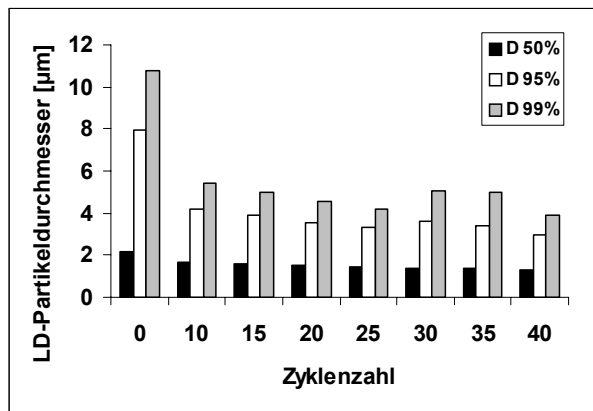


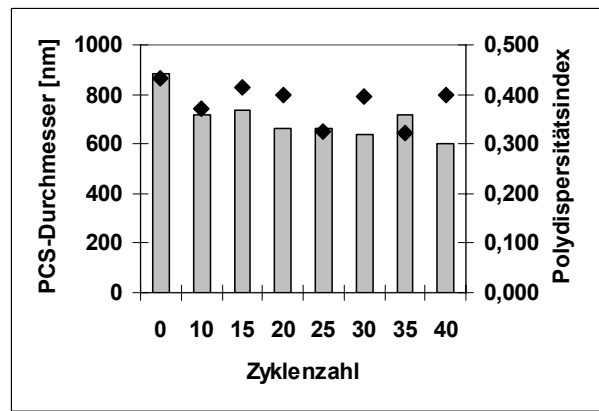
Abbildung 5-24: Zerkleinerungsprofil einer Budesonid-Suspension mit dem Microfluidizer MF111, maximaler Homogenisierdruck: 700 bar. Dargestellt sind die LD-Durchmesser D 50 %, D 95 % und D 99 % in Abhängigkeit von der Zyklenzahl.

Obwohl 100 Homogenisationszyklen eingesetzt wurden, konnte nicht annähernd das Ergebnis der mit einem APV Homogenisator erreichten Partikelgrößen erzielt werden (Abbildung 5-25, 500 bar und Abbildung 5-26, 1500 bar), wenngleich Nanosuspensionen gemäß Patenten [Haynes, 1988, 1992; Mishra et al., 2000, Dearn, 1994] auch mit einem Microfluidizer herstellbar sind. Aufgrund der relativ schlechten Ergebnisse der LD-Analyse (kein D 50 %-Wert unter 1,3 µm und D 99 % bei 4,60 µm) wurde auf eine Partikelgrößenbestimmung mittels PCS verzichtet.

Um weitere Vergleichsdaten zu bekommen, wurde eine weitere Charge mit dem LAB 40 hergestellt, Homogenisationsdruck 500 bar, 40 Zyklen. Wie in Abbildung 5-25 zu erkennen ist, liefert der LAB 40 bereits nach 40 Homogenisationszyklen bei 500 bar ähnliche Ergebnisse wie der Microfluidizer nach 100 Zyklen bei 700 bar. Der LD 50 % beträgt hier, nach 40 Zyklen 1,30 µm (gegenüber 1,33 µm), der LD 99 % erreicht 3,84 µm gegenüber 4,60 µm. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass nicht nur der aufgebaute Druck, sondern auch die Zerkleinerungsart bzw. Bauart der Homogenisationskammer, bzw. des Homogenisationsventils einen nicht unerheblichen Einfluss auf das Homogenisierungsergebnis haben. Bei dem Microfluidizer wird die Zerkleinerung durch Prall und Scherkräfte erreicht, während der Hauptzerkleinerungsmechanismus der LAB 40 die Kavitation ist, die nach diesen Versuchen eine stärkere Zerkleinerungswirkung erzielt als Prall und Scherkraft.



a)



b)

Abbildung 5-25: Zerkleinerungsprofil einer Budesonid-Suspension mit dem LAB 40 (kontinuierlicher Modus), a) LD-Durchmesser D 50 %, D 95 % und D 99 % in Abhängigkeit von der Zykluszahl und b) PCS-Durchmesser und Polydispersitätsindex ebenfalls als Funktion der Zykluszahl, Homogenisationsdruck: 500 bar.

Zum direkten Vergleich eine 1%ige Budesonid-Suspension mit 1500 bar auf dem LAB 40 hergestellt. Die Partikelgrößen LD 50 %, 95 % und 99 % und PCS Durchmesser sind in Abbildung 5-26 wiedergegeben. Schon nach wenigen Zyklen wird eine Hauptpopulation mit einem Partikeldurchmesser D 50 % < 2 µm erreicht. Die größte Partikelreduktion findet zwischen den Homogenisationszyklen 1-10 statt. Ab 20 Zyklen stellt sich ein Plateau ein, es werden kaum noch Verkleinerungen erreicht, die Grenzdispersität ist somit bei 20 Zyklen erreicht. Die PCS-Analyse weist auf eine enge gleichbleibende Partikelgrößenverteilung der Hauptpopulation nach Zyklus 35-40 hin.

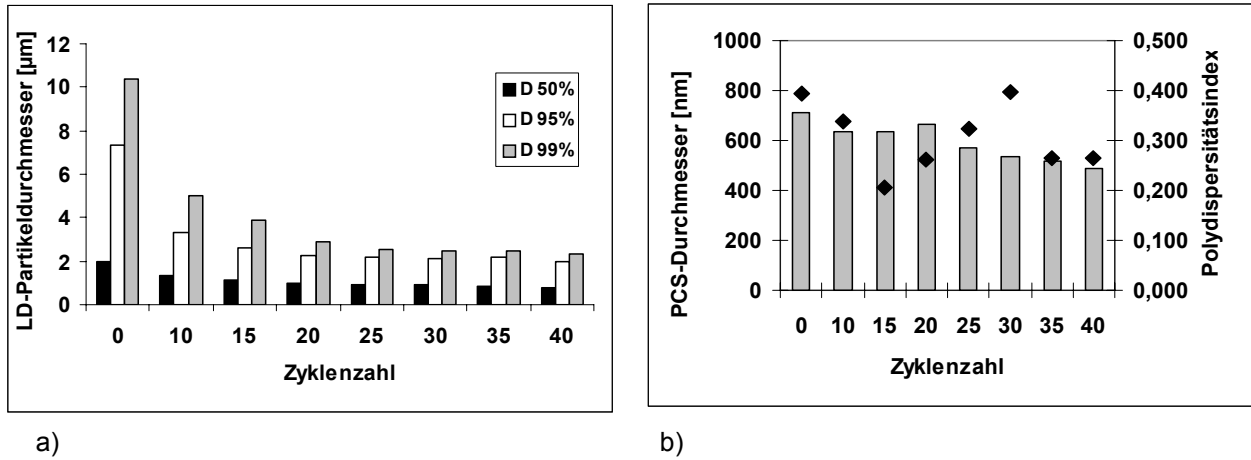


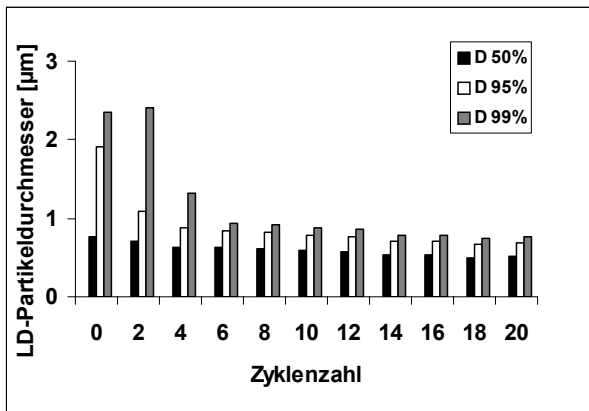
Abbildung 5-26: Zerkleinerungsprofil einer Budesonid-Suspension hergestellt mit dem LAB 40 (kontinuierlicher Modus), a) LD-Partikeldurchmesser D 50 %, D 95 % und D 99 % in Abhängigkeit von der Zykluszahl und b) PCS-Durchmesser und Polydispersitätsindex ebenfalls in Abhängigkeit von der Zykluszahl, Homogenisationsdruck: 1500 bar.

Bei der Charge die mit einem Druck von 1500 bar hergestellt wurde, konnte der Mikropartikelanteil wesentlich reduziert werden. Der LD 99 % lag nach 40 Homogenisationszyklen und 1500 bar bei 2,32 µm. Mit der gleichen Anzahl von Zyklen, jedoch mit nur 500 bar, wurde ein LD 99 % von lediglich 3,94 µm erreicht. Vergleicht man jetzt das Produkt aus Homogenisationsdruck und Zyklusanzahl, werden hinsichtlich der Partikelgröße vergleichbare Ergebnisse erzielt (Tabelle 5-1).

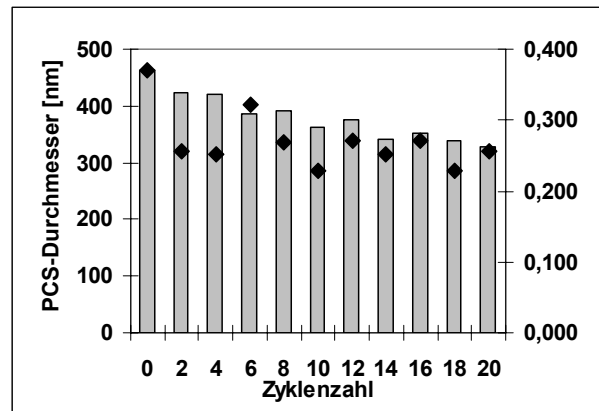
Tabelle 5-1: Vergleich der LD 50 % und LD 99 % bei verschiedenen Homogenisationsdrücken und Zyklusanzahl.

500 bar	30 Zyklen		1500 bar	10 Zyklen
LD 50 %	1,40 µm		LD 50 %	1,31 µm
LD 99 %	5,04 µm		LD 99 %	4,99 µm

Allerdings wird mit höherem Druck bereits nach einer geringeren Zykluszahl eine Partikelreduktion erreicht.



a)



b)

Abbildung 5-27: Zerkleinerungsprofil einer Budesonid-Suspension mit einem Stansted Homogenisier, nach Vorhomogenisation mit einem LAB 40.

Abbildung 5-27 zeigt das Zerkleinerungsprofil einer Budesonid-Nanosuspension in einem Homogenisator der Firma Stansted. Nach Vorhomogenisation mit dem LAB 40, 20 Zyklen mit 1500 bar, wurde nochmals homogenisiert. Der Stansted Homogenisator arbeitet mit einem Kugelventil. Um eine Blockierung des Ventils zu vermeiden, wurde mit einer vorhomogenisierten Suspension gearbeitet. Danach wurde pro Zyklus mit 2300 bar homogenisiert. Es wurde dadurch nicht nur ein starke Minimierung des mikropartikulären Anteils, deutlich unter 1 µm erreicht, sondern auch noch ein beachtliche Reduktion in der Hauptpopulation um mehr als 100 nm erbracht. Die Partikelgrößen sind zur besseren Vergleichbarkeit in Tabelle 5-2 dargestellt.

Tabelle 5-2: Vergleich der LD-Partikelgrößen und PCS-Durchmesser vom LAB 40 (1500 bar) und Stansted (2300 bar, 20 Zyklen mit dem LAB vorhomogenisiert) .

Homogenisator	LAB 40	Stansted	LAB 40	Stansted	LAB 40	Stansted
Zyklenzahl	D 50 % [µm]	D 50 % [µm]	D 99 % [µm]	D 99 % [µm]	PCS / PI	PCS / PI
20 (0)	0,98	-	2,88	-	664 / 0,261	-
30 (10)	0,89	0,60	2,49	0,88	533 / 0,397	363 / 0,229
40 (20)	0,80	0,50	2,32	0,76	491 / 0,266	327 / 0,256

Es ist also möglich, mit höheren Homogenisierdrücken kleinere Partikel zu erzeugen. Die kleinstmöglich erreichbare Partikelgröße ist unter anderem von dem ausgeübten Druck abhängig. Denn im Vergleich zu 40 Zyklen mit 1500 bar konnten durch einen Druck von 2300 bar in den letzten 20 Zyklen noch eine deutliche Partikelgrößenreduzierung erreicht werden.

5.6 Form der Nanopartikel

Nanopartikel, die mittels Hochdruckhomogenisation hergestellt werden, werden auch Disso-Cubes[®] genannt [Müller et al., 1999]. Diese Bezeichnung verdanken sie zum einen ihren besseren Löseeigenschaften (siehe vorhergehende Studie) und zum anderen ihrer quaderähnlichen Gestalt (engl. cube), die sie als Nanopartikel, oftmals unabhängig von ihrer Ausgangsgestalt als auskristallisierte Substanz, einnehmen. Grundsätzlich ist jedoch die Kristallform vom eingesetzten Wirkstoff und weniger von den verwendeten Tensiden abhängig [Müller et al., 1996].

Es sollte im folgenden untersucht werden, welche Kristallform Budesonid als Reinsubstanz und nach Hochdruckhomogenisation als Nanosuspension aufweist, ob auch diese Substanz nach Hochdruckhomogenisation quaderförmig wird. Zudem wurden zwei Nanosuspensionen verglichen, die mit verschiedenen Homogenisatoren und verschiedenen Pressdrücken hergestellt wurden. Weiterhin sollte betrachtet werden, ob nach längerer Einlagerungszeit Aggregate gebildet werden oder tatsächliches Kristallwachstum stattfindet. Während der Einlagerungszeit (1 Jahr) gab es zwar einen geringen, aber dennoch merklichen Partikelgrößenanstieg.

5.6.1 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen

Abbildung 6-28 zeigt Budesonid als mikronisierte Substanz.

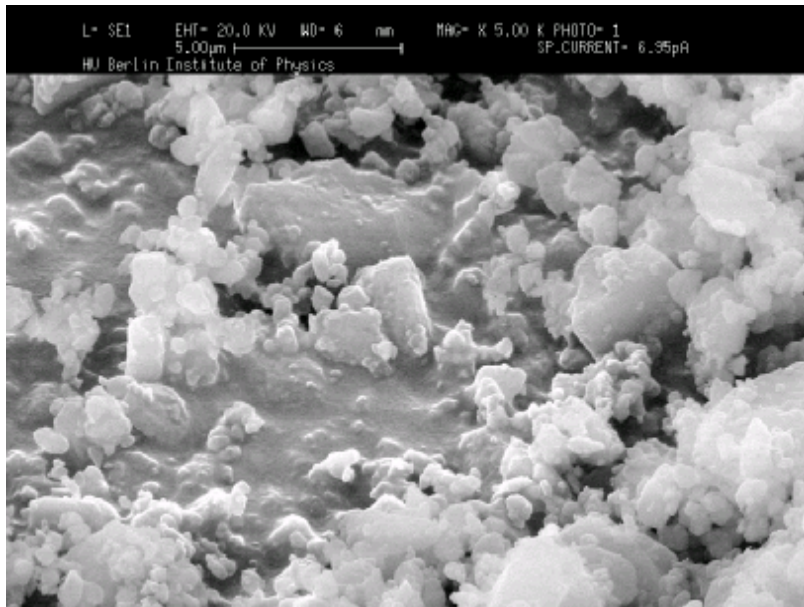


Abbildung 6-28: Budesonid, mikronisiert.

Es sind deutlich größere Kristalle zu erkennen (Größenskala siehe oberer Teil der Abbildung), jedoch wird auf diesem rasterelektronenmikroskopischen (REM) -Bild auch der große Teil an Partikeln im unteren Mikrometerbereich sichtbar, was schon aus der LD-Analyse (vgl. 3.1) hervor ging. Die größeren Partikel haben eine plattenartige, leicht rechteckige Gestalt, während die kleineren fast kugelförmig sind.

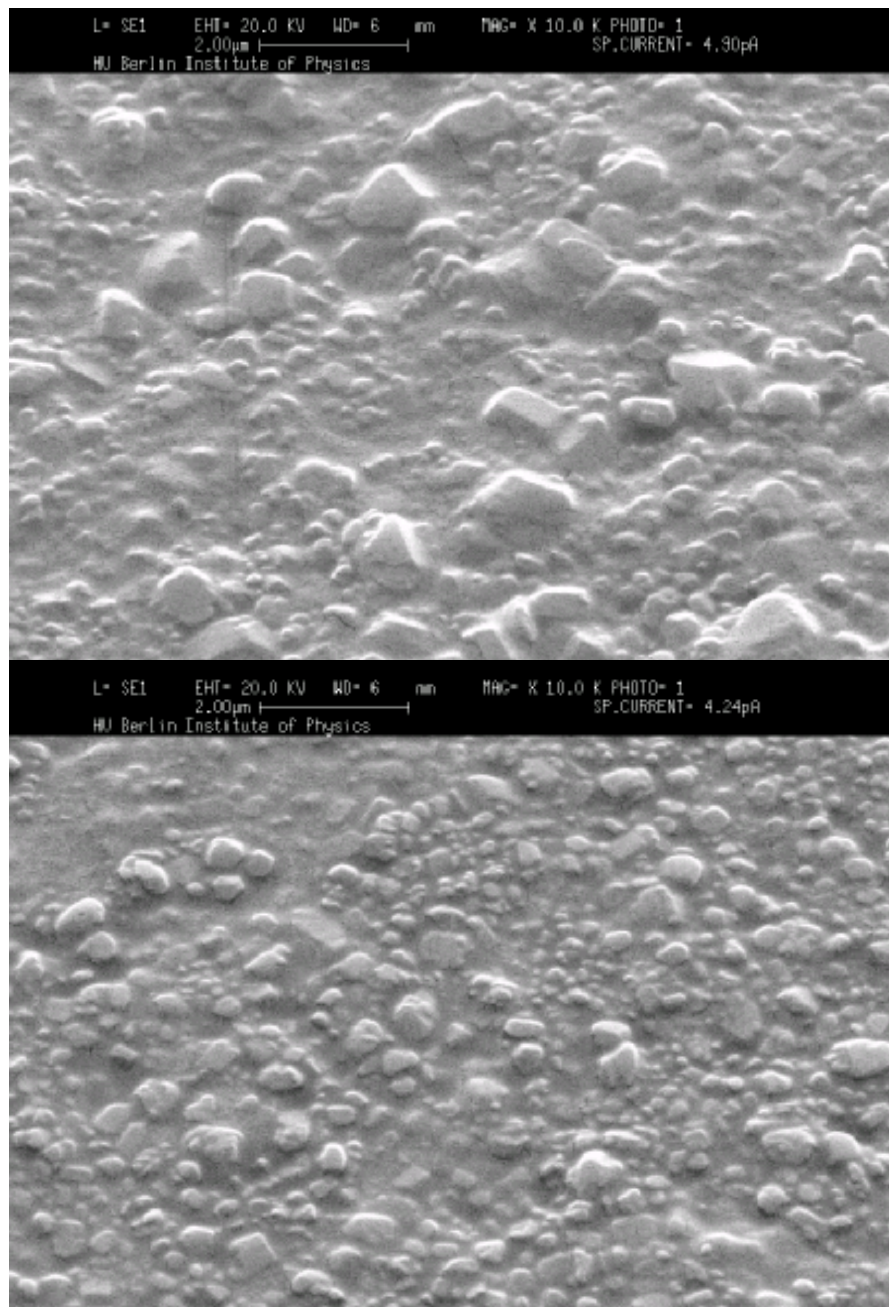


Abbildung 6-29: Die obere Aufnahme zeigt eine Budesonid-Nanosuspension Rezeptur BD4 nach 20 Zyklen bei 1500 bar, APV Homogenisator. Die untere Aufnahme zeigt eine Budesonid-Nanosuspension stabilisiert mit 0,5 % Lecithin nach 20 Zyklen bei ca. 2300 bar, Stansted Homogenisator (vorhomogenisiert mit dem LAB 40).

Deutlich erkennbar sind die Unterschiede zwischen der oberen und untere Aufnahme von Budesonid-Nanosuspension in Abbildung 6-29 . Es konnte eine höhere Homogenität, das heißt, eine engere Partikelgrößenverteilung erreicht werden. Je höher der angewandte Druck, desto enger ist die Partikelgrößenverteilung. Dieses wurde bereits durch die Partikelgrößenanalyse, der Photonenkorrelationsspektroskopie und Laserdiffraktometrie bestätigt. Der Einfluss des Herstellungsverfahrens auf die Partikelgröße und deren Verteilung ist in Abbildung 6-29 dargestellt deutlich zu erkennen. Je höher der angewandte Druck ist, desto enger ist die Partikelgrößenverteilung (Abbildung 6-29).

Die obere Aufnahme zeigt, dass einige Partikel nach wie vor plattenförmig-kantig bis rechteckig sind, daneben befinden sich aber auch abgerundete Partikel, die wesentlich kleiner sind. Die untere Aufnahme zeigt die Suspension nach weiterer Homogenisation. Hier haben alle Partikel eine ähnlich rundliche Gestalt. Die Nanosuspension der oberen Aufnahme hat als zusätzlichen Stabilisator Tyloxapol. Der zusätzliche Stabilisator wird vermutlich keinen Einfluss auf die Partikelform gehabt haben, denn wie in anderen Studien mit Nanosuspensionen gezeigt wurde, haben die stabilisierenden Tenside keinen Einfluss auf die Partikelform [Müller et al., 1996]

5.7 Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, mit Budesonid Nanosuspensionen herzustellen. Es konnte am Beispiel dieser Substanz auch die verbesserten Lösungseigenschaften von Nanosuspensionen gegenüber Formulierungen mit größeren Partikeldurchmessern gezeigt werden. Sowohl die Sättigungslöslichkeit als auch die Lösungsgeschwindigkeit von Budesonid sind als Nanosuspension wesentlich verbessert im Vergleich zur mikronisierten oder auskristallisierten Reinsubstanz. So kann nach Applikation einer Budesonid-Nanosuspension eine ebenfalls verbesserte Bioverfügbarkeit erwartet werden, da bei schwerlöslichen Arzneistoffen die Auflösung den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt für die Verfügbarkeit darstellt.

Durch röntgendiffraktometrische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Budesonid auch nach Zerkleinerung durch Hochdruckhomogenisation seinen kristallinen Charakter beibehalten hat.

Mit Budesonid wurde der Einfluss unterschiedlicher Homogenisationsprinzipien und -bedingungen (Druck, Zyklenzahl, Zerkleinerungsmechanismus) ausführlich untersucht. Hierbei zeigte sich insbesondere, dass durch Anwendung sehr hoher Drücke (2300 bar) Nanosuspensionen hergestellt werden, die eine sehr enge homogene Verteilung aufweisen, die kaum noch Mikropartikel enthalten und somit zur intravenösen Applikation geeignet wären. Die Nanosuspensionstechnologie stellt für schwer (wasser-) lösliche Arzneistoffe eine neuartige Arzneiformulierung für unterschiedliche Applikationswege dar, so auch für die pulmonale Applikation.

Dieser Weg erlaubt die Applikation von schwerlöslichen Arzneistoffen, über die Aerosolbildung von wässrigen Suspensionen in die Lunge.

Außerdem wird mit dem Einsatz von Nanosuspensionen aufgrund einer verbesserten Bedeckung des Applikationsortes bei lokaler Applikation eine erhöhte Effizienz erreicht. Dies wird durch die wesentlich höhere Anzahl an Partikeln im Vergleich zur Applikation der gleichen Arzneistoffmenge als Mikropartikel erreicht.