

**Nanoskalige biokompatible und bioabbaubare
polymere Arzneistoffträgersysteme
zur Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit
von Peptiden und Proteinen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultäten
der Universität des Saarlandes

von

Andreas Kirchner

Saarbrücken

2015

Tag des Kolloquiums:	16.06.2015
Dekan:	Prof. Dr. Dirk Bähre
Berichterstatter:	Prof. Dr. Marc Schneider Prof. Dr. Christian Ducho
Vorsitz:	Prof. Dr. Claus Jacob
Akad. Mitarbeiter:	Dr. Sonja Keßler

Die vorliegende Arbeit wurde von August 2011 bis Dezember 2014 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Marc Schneider (Institut für Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie, Universität des Saarlandes) und Herrn Dr. Rosario Lizio (Evonik Industries AG) bei Evonik Industries AG in Darmstadt angefertigt.

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bedanken bei:

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Marc Schneider für die Überlassung des hochinteressanten und vielseitigen Themas, das entgegengebrachte Vertrauen, seinen professionellen Rat und seine fachliche Unterstützung in jeder Phase dieser Arbeit, den regelmäßigen wissenschaftlichen Austausch und die hervorragende Erreichbarkeit an jedem Ort zu fast jeder Zeit.

Meinem akademischen Mentor Dr. Rosario Lizio, der mir ermöglicht hat, diese Arbeit bei Evonik Industries AG anfertigen zu können, für das entgegengebrachte Vertrauen und die vielen kompetenten Ratschläge und anregenden Diskussionen. Seine wegweisenden und kreativen Ideen haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Prof. Dr. Christian Ducho für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Prof. Dr. Claus Jacob für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Dr. Sonja Keßler für die Übernahme des Beisitzes der Prüfungskommission.

Dr. Silko Grimm für viele hilfreiche Ratschläge zu wissenschaftlichem Arbeiten, die hervorragende Erreichbarkeit und Unterstützung im Doktorandenalltag und wissenschaftlich kritische Hinterfragung.

Dr. Markus Rossmeißl, Dr. Johannes Vorholz, Wolfgang Luley und Michael Jokiell für die hervorragende Unterstützung und außerordentlich fruchtbare Zusammenarbeit beim Aufbau der RESS Versuchsanlage und bei der Durchführung der Versuche.

Dem Team des Biolabors bei Evonik Industries AG, Dr. Anne Benedikt und Susanne Ullrich, für die Unterstützung mit *in vitro* Charakterisierungen der Formulierungen.

Dem Bioverfügbarkeitsteam des PeTrA Projektes mit Prof. Dr. Roland Brock, Dr. Rike Wallbrecher, Daniel Primaveßy, Dr. Marco Metzger und Matthias Schweinlin.

Michael Damm für die Unterstützung bei der Polymercharakterisierung, seine große Hilfsbereitschaft, ein immer offenes Ohr und die unterhaltsamen Mittagspausen.

Silke Kurz und Sina Henderkes für viele kreative Ideen bei der Erstellung hochwertiger REM Aufnahmen.

Allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der Gruppe Discovery & Development bei Evonik Industries AG für eine stets ausgezeichnete und kollegiale Arbeitsatmosphäre und die große Hilfsbereitschaft.

Den Teams von Dr. Niklaus und Dr. Landgrafe von der analytischen Abteilung und allen weiteren Mitarbeitern von Evonik Industries AG, die ebenfalls zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Dr. Thomas Ebensen und Dr. Wolf-Rainer Abraham vom Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig für die Durchführung der *in vivo* Versuche.

Dem gesamten PeTrA Konsortium für eine wissenschaftlich sehr spannende Projektarbeit auf höchstem Niveau und die stets ergiebigen Konsortialtreffen und Doktorandenseminare.

Rima Jaber für die hervorragende Zusammenarbeit, die regelmäßigen Motivationsschübe und die vielen stets erheiternden Pausen mit spannenden Diskussionen bei Kaffee und Cookies.

Dr. Jessica Müller-Albers für ihre Unterstützung in komplizierten Patentangelegenheiten.

Der Evonik Industries AG für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes und der benötigten Materialien.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich stets in vielerlei Hinsicht in großem Maße unterstützt hat. Auch möchte ich meinen Freunden danken, die mir mit viel Ausdauer, Ruhe und Geduld zur Seite standen und mich stets unterstützt und motiviert haben.

Dem BMBF (Bundesministerium für Bildung und Forschung) danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit im Zuge des PeTrA Projektes (Förderkennzeichen: 13N11454).

1	Allgemeiner Teil und Stand der Technik	1
1.1	Einleitung	1
1.2	Peptidarzneistoffe	2
1.3	Der Verdauungstrakt – Anatomie und Physiologie	5
1.3.1	Anatomie des Verdauungstraktes	5
1.3.2	Barrieren der intestinalen Stoffaufnahme	8
1.3.2.1	Magen.....	10
1.3.2.2	Verdauungsenzyme	10
1.3.2.3	Membranassoziierte Bürstensaumenzyme	11
1.3.2.4	Intestinaler Mukus.....	11
1.3.2.5	Enterozytenmembran.....	12
1.3.2.6	Zytosolische Enzyme.....	13
1.3.2.7	First-Pass-Metabolismus	14
1.3.3	Absorptions- und Transportmechanismen im Darm	14
1.3.3.1	Transzelluläre Route – Transmembran-Transport.....	14
	Passiver Transport	14
	Aktiver Transport	15
1.3.3.2	Parazelluläre Route.....	16
1.3.3.3	Endozytose und Exozytose – Membranverlagernder Transport	17
1.4	Perorale Verabreichung von therapeutischen Peptiden und Proteinen	18
1.4.1	Bioverfügbarkeit	19
1.4.2	Stabilität von Peptiden und Proteinen	20
1.4.2.1	Stabilität im Herstellungsprozess	21
1.4.2.2	Stabilität im Gastrointestinaltrakt	22
1.5	Polymere zur peroralen Verabreichung	23
1.5.1	Natürliche Polymere.....	23
1.5.2	Semi-synthetische Polymere	25
1.5.3	Synthetische Polymere	26
1.6	Strategien zur Bioverfügbarkeitsverbesserung von Peptiden und Proteinen	30
1.6.1	Chemische Modifikationen von Peptid- und Proteinarzneistoffen	30
1.6.2	Zellpenetrierende Peptide.....	32
1.6.3	Mukoadhäsion und Mukuspenetration.....	33
1.6.3.1	Mechanismen der Mukoadhäsion	34
1.6.3.2	Mukoadhäsive Polymere	35
1.6.3.3	Mukoadhäsive partikuläre Trägersysteme	35
1.6.4	Schutz des Wirkstoffes vor Abbau durch Verdauungssäfte	36
1.6.5	Penetrationsförderer.....	37
1.6.6	Nanoskalige Wirkstoffträger	38

1.6.7	Diskussion – Strategien zur Bioverfügbarkeitsverbesserung	39
2	Zielsetzung der Dissertation	40
3	Materialien	42
3.1	Bioabbaubare Polyester als Arzneistoffträger	42
3.2	Neue Polyesteramid Polymere zur Bioverfügbarkeitserhöhung	43
3.2.1	Konzeption der neuen Trägermaterialien	43
3.2.2	Herstellung der Polyesteramide	44
3.2.3	Vorteile der Polyesteramide gegenüber herkömmlichen Trägermaterialien	47
3.3	Modellwirkstoff Desmopressin	48
3.4	Sonstige Hilfsstoffe	50
4	Formulierung und Charakterisierung nanopartikulärer Trägersysteme	51
4.1	Methoden	52
4.1.1	Herstellung von Polymernanopartikeln	53
4.1.1.1	Doppelemulsionsmethode	54
	Aufreinigung der Partikelsuspensionen	55
4.1.1.2	Herstellung von Nanopartikeln aus überkritischen Lösungen	56
4.1.2	Funktionalisierung der Partikeloberfläche mit Peptidmolekülen	56
4.1.3	Gefriertrocknung von Nanosuspensionen	57
4.1.4	Sprühtrocknung von Nanosuspensionen	58
4.1.5	Charakterisierung der Nanopartikel	58
4.1.5.1	DLS Partikelgrößenmessung und ELS Zetapotentialmessung	59
4.1.5.2	Desmopressin Gehaltsbestimmung mittels HPLC	60
4.1.5.3	Rasterelektronenmikroskopie	61
4.1.5.4	Redispergierbarkeit	61
4.1.5.5	Qualitativer Nachweis von Thiolgruppen mit Ellmanns Reagenz	62
4.1.6	<i>In vitro</i> -Charakterisierung der Formulierungen	62
4.1.6.1	Untersuchung der Wirkstofffreisetzung	63
4.1.6.2	Toxikologische Untersuchungen – Viabilität von Caco-2 Zellen	63
	MTT-Assay	64
	CellTiter-Glo-Assay	65
4.1.6.3	Partikelaufnahme in HeLa und Caco-2 Zellen	65
4.1.6.4	Resorptionsstudien an Caco-2-Zellmodellen	65

4.1.7	<i>In vivo</i> -Charakterisierung der Formulierungen	65
4.1.7.1	<i>In vivo</i> -Untersuchung der Bioverfügbarkeit	65
4.2	Evaluation der Doppelemulsionsmethode.....	66
4.2.1	Theorie und Grundlagen der Hochdruckhomogenisation.....	67
4.2.2	Steuerung der Partikelgröße bei der Doppelemulsionsmethode	69
4.2.2.1	Homogenisation	70
	Hochdruckhomogenisation mit Microfluidizer.....	70
	Rotor-Stator Homogenisierung mit Ultra-Turrax	73
	Vergleich zwischen Microfluidizer und Ultra-Turrax	75
4.2.2.2	Aufreinigung	76
4.2.3	Trocknung.....	79
4.2.3.1	Gefriertrocknung	79
4.2.3.2	Sprühtrocknung	82
4.2.4	Verkapselung von Desmopressin in PLGA	84
4.2.5	Stabilität der getrockneten Partikelformulierungen	85
4.2.6	Zusammenfassende Diskussion.....	86
4.3	Formulierung mit Polyesteramid Polymeren	87
4.3.1	Charakterisierung der PEA Polymere - Präformulierung.....	87
4.3.1.1	Löslichkeit	88
4.3.1.2	Säurekonstante (pK_a) von Asparaginsäure PEA	90
4.3.2	Anpassung und Optimierung der Doppelemulsionsmethode für Polyesteramide	92
4.3.2.1	Doppelemulsionsmethode für Asparaginsäure PEA Polymere.....	93
4.3.2.2	Entwicklung der Doppelemulsionsmethode für Cystein PEA Polymere	96
4.3.2.3	Für Cystein PEA angepasste Doppelemulsionsmethode	98
4.3.3	Verkapselung von Desmopressin in PEA Polymere	101
4.3.3.1	Formulierung von Desmopressin mit Asparaginsäure PEA	102
4.3.3.2	Formulierung von Desmopressin mit Cystein PEA	105
4.3.3.3	Zusammenfassung der Mikroverkapselung mit PEA Polymeren	106
4.3.4	Charakterisierung der Polyesteramid Partikel.....	107
4.3.4.1	Rasterelektronenmikroskopie	107
4.3.4.2	<i>In vitro</i> -Freisetzung des Modellwirkstoffes aus PEA Partikeln	110
	Formulierungen mit Asparaginsäure PEA	110
	Formulierungen mit Cystein PEA und PLGA.....	111
4.3.4.3	Chemischer Nachweis der Funktionalität der Cystein PEA Partikel	113
4.3.4.4	<i>In vitro</i> -Toxizität PEA Polymere und Partikelformulierungen.....	113
4.3.5	Zusammenfassende Diskussion.....	117
4.4	Beschichtung von PLGA Partikeln mit dem zellpenetrierenden hLF Peptidfragment	119
4.5	Herstellung einer magensaftresistenten Darreichungsform	121
4.5.1.1	Einbettung der PLGA und PEA Nanopartikel in Eudragit [®] Mikropartikel	122
4.5.1.2	Charakterisierung der PLGA-haltigen Eudragit [®] Mikropartikel	122

4.5.1.3	Charakterisierung der PEA-haltigen Eudragit® Mikropartikel	124
4.5.1.4	In vitro-Freisetzung des Modellwirkstoffes aus PEA haltigen Eudragit® Mikropartikeln	126
4.5.1.5	Zusammenfassung magensaftresistente Darreichungsform	127
4.6	Partikelherstellung aus überkritischen Lösungen	128
4.6.1	Theorie und Grundlagen	129
4.6.2	Aufbau der Versuchsanlage und Versuchsbeschreibung	130
4.6.2.1	Vorläufiger Aufbau für den Machbarkeitsnachweis	130
4.6.2.2	Aufbau für den kontinuierlichen Betrieb	131
4.6.2.3	Anlagenkomponenten im Detail	133
4.6.2.4	Versuchsbeschreibung kontinuierlicher Betrieb	139
4.6.2.5	Trocknung der Partikelsuspension	140
4.6.3	Partikelgröße und Morphologie des verwendeten Ausgangsmaterials	141
4.6.4	Ergebnisse Vorversuche	142
4.6.5	Ergebnisse semi-kontinuierlicher Prozess	144
4.6.5.1	DLS Partikelgrößenmessung	146
4.6.5.2	Rasterelektronenmikroskopie	148
4.6.5.3	Verkapselungseffizienz des Modellwirkstoffes	150
4.6.5.4	Stabilitätsuntersuchungen der Partikelsuspension	152
4.6.5.5	Sprühtrocknung der Partikelsuspension	153
4.6.5.6	Untersuchung der Molekulargewichtsverteilung mittels GPC Analyse	154
4.6.6	Zusammenfassende Diskussion	157
4.7	Resorptions- und Bioverfügbarkeitsuntersuchungen der Desmopressin Formulierungen	159
4.7.1	In vitro-Charakterisierung	160
4.7.1.1	In vitro Partikelaufnahme in HeLa und Caco-2 Zellen	160
	PLGA Partikel – Aufnahme in HeLa Zellen	161
	PEA Cystein Partikel – Aufnahme in HeLa Zellen	161
	PEA Asparaginsäure Partikel – Aufnahme in HeLa Zellen	162
	PLGA Partikel – Aufnahme in Caco-2 Zellen	163
	PEA Cystein Partikel – Aufnahme in Caco-2 Zellen	164
	PEA Asparaginsäure Partikel – Aufnahme in Caco-2 Zellen	165
4.7.1.2	In vitro-Resorptionsstudien am Caco-2-Zellmodell	165
4.7.2	In vivo-Charakterisierung	168
4.7.2.1	In vivo-Untersuchung der Bioverfügbarkeit am Tiermodell	168
	Untersuchung der oralen Bioverfügbarkeit der Partikelformulierungen	171
	Orale Lösung von Desmopressinacetat als Referenz	173
	Berechnung der absoluten oralen Bioverfügbarkeit der Partikelformulierungen	175
	Untersuchung der rektalen Bioverfügbarkeit der Partikelformulierungen	176
4.7.2.2	Anmerkung zur in vivo-Toxizität der Partikelformulierungen	177
4.7.3	In vitro- in vivo-Korrelation	178
4.7.4	Zusammenfassende Diskussion	180

5 Zusammenfassung der Arbeit und Ausblick181

5.1 Zusammenfassungen..... 181

5.1.1 Deutsche Zusammenfassung..... 181

5.1.2 Englische Zusammenfassung..... 182

5.2 Ausblick..... 182

5.3 Schlussbemerkung 183

6 Literaturverzeichnis185

Verwendete Abkürzungen

ABC	<i>ATP-binding cassette</i> , Familie von Membranproteinen (Transporter)
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	<i>Area under the curve</i> , Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve
AVP/ADH	Arginin-Vasopressin / Antidiuretisches Hormon
BBI	Bowman-Birk Proteaseinhibitor
BCS	<i>Biopharmaceutics Classification System</i>
Caco-2	<i>Colorectal adenocarcinoma cell line</i> , humane Dickdarmkarzinomzelllinie
CMC	Carboxymethylcellulose
CPP	<i>Cell-penetrating peptide</i> , Zellpenetrierendes Peptid
Cys	Cystein
DCM	Dichlormethan / Methylenchlorid
DDAVP	1-Desamino-8-D-Arginin-Vasopressin, Desmopressin
DLS	<i>Dynamic light scattering</i> , Dynamische Lichtstreuung
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure, Ellmanns Reagenz
ELS	<i>Electrophoretic light scattering</i> , Elektrophoretische Lichtstreuung
F/F _{abs}	Bioverfügbarkeit / absolute Bioverfügbarkeit
FAE	Follikel-assoziiertes Epithel
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> , Arzneimittelzulassungsbehörde der USA
GA	<i>Glycolic acid</i> , Glycolsäure
GALT	<i>Gut associated lymphoid tissue</i> , darmassoziiertes Immunsystem
GRAS	<i>Generally recognized as safe</i> , Zulassungsbezeichnung der FDA
HeLa	humane Epithelzelllinie eines Zervixkarzinoms
hLF	<i>Human Lactoferrin</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HPMC	Hydroxypropylmethylcellulose
i.v.	intravenös
IEP	Isoelektrischer Punkt
LA	<i>Lactic acid</i> , Milchsäure
lat.	Lateinisch

Lys	Lysin
MDR	<i>Multiple Drug Resistance</i> , MDR1: ein ABC-Transportprotein
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i> , ein Zellkulturmedium
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
MWCO	<i>Molecular weight cut-off</i>
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
p.o.	peroral
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , isotonische phosphatgepufferte Salzlösung
PCL	Poly- ϵ -Caprolacton
PCV	<i>Pressure control valve</i> , Druckregulierungsventil
PDI	Polydispersitätsindex
PDLA	Poly(D-lactid)
PEA	Polyesteramid
PEC	Polyelektrolytkomplex
PEG	Polyethylenglycol
PEPT	Peptid-Transporter
PES	Polyethersulfon, <i>Poly(oxy-1,4-phenylsulfonyl-1,4-phenyl)</i>
PLA	<i>Poly(lactic acid)</i> , Polylactid / Polymilchsäure
PLGA	Poly(lactid-co-Glycolid)
PLLA	Poly(L-lactid)
PVA	Polyvinylalkohol
R&I	Rohrleitungs- und Instrumentenfließschema
REM	Rasterelektronenmikroskopie, -mikroskop
RESS	<i>Rapid Expansion of Supercritical Solutions</i>
RNA	Ribonukleinsäure
s.c.	subkutan
TFE	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMC	N-Trimethylchitosanchlorid
UpM	Umdrehungen pro Minute [min^{-1}]
UT	Ultra-Turrax

1 Allgemeiner Teil und Stand der Technik

1.1 Einleitung

Die Nanotechnologie stellt zweifelsfrei einen der großen Megatrends des 21. Jahrhunderts dar und gehört zu den wichtigsten Wachstums- und Zukunftsmärkten dieser Zeit. Zwischen den Jahren 2011 und 2013 ist die Anzahl der allein in Deutschland ansässigen Institutionen aus Wirtschaft, Forschung und Gesellschaft, die im Bereich der Nanotechnologie aktiv sind, von 1.800 auf 2.300 angestiegen¹. Die kontinuierliche Forschungsförderung durch die Bundesregierung und die Europäische Kommission sind gleichermaßen ein Indiz für das enorme Potential, das dieser Technologie zugeschrieben wird.

Nanomaterialien werden bereits sehr erfolgreich in technischen Bereichen eingesetzt und eröffneten hier bisher unbekannte Möglichkeiten. Der Siegeszug der Nanotechnologie im Bereich der Medizin steht jedoch weiter aus, obwohl hier mit ebenso bahnbrechenden Innovationschancen zu rechnen ist. Einem unzureichenden und häufig unqualifizierten Informationsstand geschuldet bestehen in der Gesellschaft häufig vorwiegend subjektive Sicherheitsbedenken gegenüber Nanoprodukten². Besonders hinsichtlich einer Anwendung der Nanotechnologie in der Medizin oder im Lebensmittelbereich ist die öffentliche Akzeptanz nach wie vor gering³. Aus diesem Grund ist der Einsatz dieser Schlüsseltechnologie in der Medizin bis heute eher verhalten. Eine offene und verständliche Information und Diskussion seitens der Politik und der pharmazeutischen Industrie ist hier gefragt, um mehr Akzeptanz und Vertrauen sowie ein innovationsfreundliches Klima zu schaffen.

Vor allem im Bereich der pharmazeutischen Formulierung von Arzneistoffen bietet die Nanotechnologie immense Chancen hinsichtlich innovativer medizinischer Anwendungen. Neue pharmazeutische Wirkstoffe zur Therapie bedeutender Volkskrankheiten wie Diabetes mellitus oder Krebs können aufgrund ihrer schlechten Löslichkeit und geringen Resorbierbarkeit über den Magen-Darm-Trakt häufig nicht peroral appliziert werden und müssen in aller Regel invasiv verabreicht werden. Dieser Weg ist keinesfalls patientenfreundlich und verursacht zudem erhöhte Kosten für das Gesundheitssystem. Durch die Verwendung geeigneter und bioabbaubarer Nanopartikel als Wirkstoffträger könnten neue und innovative Wirkstoffe wie beispielsweise Peptide und Proteine möglicherweise effizienter über physiologische Barrieren hinweg transportiert werden, um an den Ort ihrer gewünschten Wirkung zu gelangen. Eine Verbesserung der systemischen Verfügbarkeit von häufig sehr teuren Peptid- oder Proteinwirkstoffen, die zum aktuellen Zeitpunkt bereits peroral eingesetzt werden, würde zudem durch Reduzierung der einzunehmenden Dosis eine immense

Einsparung von Kosten ermöglichen. Der Einsatz dieser Arzneistoffe in Form von oralen nanopartikulären Darreichungsformen mit verbesserter Bioverfügbarkeit könnte somit immens zu einer kostengünstigen und gut verträglichen Arzneimitteltherapie beitragen.

Aufgrund der bereits erwähnten Vorbehalte gegenüber einer medizinischen Anwendung von Nanomaterialien wurde die Forschung in diesem Bereich bislang nicht in dem Maße vorangetrieben, wie es in anderen Disziplinen der Fall war. Im Bereich der Entwicklung pharmazeutischer Hilfsstoffe, die sich zur Formulierung nanoskaliger Arzneistoffträger eignen, besteht gleichermaßen Nachholbedarf wie im Hinblick auf industriell attraktive Herstellungsverfahren. Hieraus ergeben sich auch die wesentlichen Ziele der vorliegenden Arbeit: die Entwicklung nanoskaliger Arzneiformulierungen unter Verwendung neuer pharmazeutischer Hilfsstoffe mit spezifischen Funktionalitäten sowie die Weiterentwicklung von Herstellungsmethoden hinsichtlich ihrer industriellen Nutzbarkeit. Damit soll ein entsprechender wissenschaftlicher Beitrag zur Weiterentwicklung der Nanotechnologie für medizinische Anwendungen geleistet werden.

1.2 Peptidarzneistoffe

Als Peptide werden organische Verbindungen bezeichnet, die aus mindestens zwei miteinander verknüpften Aminosäuren aufgebaut sind. Besteht ein Peptid aus bis zu zehn Aminosäuren, wird es auch als Oligopeptid bezeichnet, bei mehr als zehn enthaltenen Aminosäuren spricht man von Polypeptiden und Polypeptide mit mehr als 100 Aminosäuren werden meist als Proteine oder Eiweiße bezeichnet. Die Grundbausteine der Peptide sind in der Regel linear aneinander gereiht und durch Säureamidbindungen, die auch als Peptidbindungen bezeichnet werden, miteinander verknüpft. Diese typische Bindungsart war namensgebend für die gesamte Substanzklasse. Ist die Aminosäurekette zu einem Ring geschlossen, spricht man von einem Cyclopeptid. Während kleinere Peptide durch ihre Aminosäuresequenz (Primärstruktur) und einen eventuellen Ringschluss hinreichend charakterisiert sind, stellen sich bei Proteinen aufgrund spezieller Anordnungen und Faltungen der Proteinketten mitunter auch sehr komplexe dreidimensionale Strukturen (Sekundärstruktur oder Strukturen höherer Ordnung) ein.

Peptide und Proteine stellen zusammen mit Desoxyribonukleinsäuren (DNA) und Ribonukleinsäuren (RNA) die zentralen Moleküle des Lebens dar und finden sich in allen lebenden Zellen. Im menschlichen Organismus nehmen Peptide und Proteine vielfältige Aufgaben als strukturgebende Elemente oder bei physiologischen Stoffwechsel- und Regulationsprozessen wahr⁴. So besteht beispielsweise eine Vielzahl von Hormonen aus Peptiden oder Proteinen (Neuropeptide, Schilddrüsenhormone, Hormone des Magen-Darm-Traktes, Hormone der pankreatischen Inselzellen wie Insulin und Glucagon etc.). Für die

korrekte Funktionsweise des menschlichen Immunsystems sind ebenfalls Proteine, die sogenannten Immunglobuline oder Antikörper, verantwortlich. Weiterhin spielen Proteine bei der Kontrolle der Blutgerinnung in Form von Gerinnungsfaktoren eine wichtige Rolle. Die an dieser Stelle nur beispielhaft genannten vielfältigen und hoch spezifischen Wirkungen von Peptiden im menschlichen Organismus machen den Einsatz dieser Substanzklasse als pharmazeutische Wirkstoffe hoch attraktiv. So wurde bereits 1923 Rinderinsulin zur Therapie von Diabetes mellitus eingesetzt, ohne dass zu diesem Zeitpunkt überhaupt bekannt war, dass es sich bei dieser Substanz um ein Protein handelt.

Die klassischen Extraktionsmethoden aus tierischen Organen (z.B. Insulin aus Bauchspeicheldrüsen von Rindern oder Schweinen) oder aus humanem Plasma (Antikörper, Albumin) sind heute nur noch in Ausnahmefällen von Bedeutung (z.B. bei der Gewinnung von Gerinnungsfaktoren aus humanem Plasma). Heute ist die Herstellung von Peptiden und kleineren Proteinen auf synthetischem Wege möglich. Die komplexeren Biopharmazeutika (*Biologicals*) werden biotechnologisch mithilfe von Mikroorganismen oder mit tierischen oder pflanzlichen Organismen produziert.

Peptide und Proteine besitzen häufig eine höhere Potenz, eine spezifischere Wirkung und eine bessere Wirksamkeit als konventionelle Arzneistoffe⁵, da sie aufgrund ihrer klar definierten Rezeptorspezifität bzw. Antigenität sehr gezielt in unterschiedlichste physiologische oder immunologische Prozesse eingreifen können. In vielen Fällen eröffnete der Einsatz peptidischer Wirkstoffe ganz neue Therapieansätze für eine rationale und gut verträgliche Arzneimitteltherapie. Die Ähnlichkeit oder gar exakte Übereinstimmung mit endogenen Substanzen garantiert dabei eine gute Verträglichkeit vieler Peptidarzneistoffe. Die Erfolgsgeschichte dieser Substanzklasse lässt sich nicht zuletzt auch an der stetig wachsenden Anzahl neu zugelassener Substanzen ablesen. In 2010 lag die Anzahl zugelassener Peptidarzneistoffe bei 51, während sich zu dieser Zeit 132 weitere Kandidaten in der klinischen Prüfung befanden (darunter 15 in Phase III)⁶. Ende 2012 waren bereits über 60 Substanzen zugelassen und 140 befanden sich in der klinischen Erprobung⁷. Die Therapiefelder umfassen beispielsweise die Krebstherapie, die Behandlung von Autoimmunerkrankungen, die Substitutionstherapie fehlender endogener Proteine oder die Therapie chronisch entzündlicher Erkrankungen.

Tabelle 1 enthält eine Auswahl aktuell zugelassener Peptid- und Proteinarzneimittel, um einen Überblick über die vielfältigen Anwendungsgebiete zu geben.

Tabelle 1 Auswahl aktuell zugelassener Peptid- und Proteinanzneimittel mit Darreichungsform und Indikationsgebiet⁸.

Präparat	Wirkstoff	Darreichungsform / Verabreichungsform	Indikationsgebiet
Profact [®]	Buserilin	Implantat (Stäbchen) / s.c.	Prostatakarzinom
Sandimmun Optoral [®]	Ciclosporin A	Lösung / p.o.	Immunsuppressivum
Minirin [®]	Desmopressinacetat	Tablette / p.o.	Diabetes insipidus
Enantone Depot [®]	Leuprorelin	Mikropartikel (PLGA) / s.c.	Prostatakarzinom
Sandostatin LAR Depot [®]	Octreotid	Mikropartikel (PLGA) / s.c.	Gastrointestinale Tumore
Zoladex [®]	Goserelin	Implantat (PLGA) / s.c.	Prostata-/Mammakarzinom
Decapeptyl [®] N	Triptorelin	Mikropartikel (PLGA) / s.c.	Prostatakarzinom
Orasthin [®]	Oxytocin	Infusionslösung / i.v.	Geburtseinleitung
Lantus [®]	Insulin glargin	Injektionslösung / s.c.	Diabetes mellitus
Haemoclin [®] SDH	Blutgerinnungsfaktor VIII	Pulver zur Herstellung einer Injektionslösung / i.v.	Blutungsstillung
PegIntron [®]	Peginterferon alfa-2b	Pulver zur Herstellung einer Injektionslösung / i.v.	Hepatitis C
Tysabri [®]	Natalizumab	Infusionslösung / i.v.	Multiple Sklerose (MS)
Erbix [®]	Cetuximab	Infusionslösung / i.v.	Kolonkarzinom
Herceptin [®]	Trastuzumab	Infusionslösung / i.v.	Brustkrebs
Lucentis [®]	Ranibizumab	Injektionslösung / intravitreal	altersbedingte Makuladegeneration (AMD)
Stelara [®]	Ustekinumab	Injektionslösung / s.c.	Psoriasis

Bei der Durchsicht der Beispiele in Tabelle 1 fällt auf, dass bislang nur sehr wenige Peptidarzneistoffe in oralen Darreichungsformen im Handel verfügbar sind. Der Grund hierfür ist, dass Peptide und Proteine nach peroraler Einnahme nicht oder nur sehr geringfügig im Verdauungstrakt aufgenommen werden können⁹. Dies gilt selbst für die orale Formulierung von Desmopressin. Die absolute Bioverfügbarkeit von Minirin[®] Tabletten liegt laut Herstellerangaben zwischen 0,08 % und 0,16%¹⁰. Dieser Arzneistoff ist allerdings so hoch wirksam, dass eine Aufnahme dieses geringen Anteils der applizierten Dosis bereits für einen Therapieerfolg ausreichend ist. Aus ökonomischer Sicht ist dies allerdings keineswegs befriedigend, da der größte Anteil (>99%) des teuren Arzneistoffs nicht zur Wirkung kommen kann.

Die Entwicklung sinnvoller Ansätze zur Verbesserung dieser unbefriedigenden Situation setzt eine genaue Kenntnis der Gründe für die geringe Resorbierbarkeit dieser Substanzen und der Prinzipien intestinaler Resorptionsprozesse voraus. Im folgenden Kapitel werden daher zunächst die anatomischen und physiologischen Grundlagen beschrieben, die im Zusammenhang mit der Aufnahme von Peptid- und Proteinanzneistoffen über den Verdauungstrakt von Bedeutung sind.

1.3 Der Verdauungstrakt – Anatomie und Physiologie

Unter dem Begriff Verdauungstrakt (lat.: *Apparatus digestorius*) werden sämtliche Organe zusammengefasst, die der Aufnahme, Zerkleinerung und dem Weitertransport von Nahrung dienen. Die Aufgabe des Verdauungstraktes ist neben dem Verdau und der Resorption von Nahrung und Wasser auch die Ausscheidung von unverdaulichen Nahrungsbestandteilen.

Dank seiner besonders gut ausgeprägten Resorptionsfähigkeit können über den Verdauungstrakt bekannter Maßen auch Arzneistoffe in den systemischen Blutkreislauf aufgenommen werden. Eine effiziente Resorption von Wirkstoffen nach peroraler Applikation eines Arzneimittels erfolgt allerdings nur unter ganz bestimmten Voraussetzungen. Besonders für Peptidarzneistoffe oder andere hochmolekulare hydrophile Arzneistoffe sind zunächst einige Hürden zu überwinden¹¹. Zum Verständnis dieser besonderen Herausforderung ist eine genaue Kenntnis der Anatomie und Physiologie des Verdauungstraktes einschließlich der Prinzipien des intestinalen Stofftransportes unabdingbar.

1.3.1 Anatomie des Verdauungstraktes

Die Mundhöhle mit Lippen, Zähnen und der Zunge sowie der Rachen gehören zum Kopfteil des Verdauungstraktes. Hier erfolgt im Wesentlichen die Aufnahme und mechanische Zerkleinerung der Nahrung. Durch die Speiseröhre, die zum Rumpfteil des Verdauungstraktes gehört, gelangt die Nahrung in den Magen, den ersten Abschnitt des Gastrointestinaltraktes. Die Aufgabe des Gastrointestinaltraktes ist der enzymatische Aufschluss der Nahrung und die dadurch ermöglichte Resorption von Nährstoffen sowie die Ausscheidung unverdaulicher Nahrungsbestandteile.

Der Magen dient der Speicherung und kontrollierten Abgabe von Nahrungsbrei in das Duodenum, den ersten Abschnitt des Dünndarms. Außerdem sezerniert der Magen eine Vorstufe des eiweißspaltenden Enzymes Pepsin sowie Salzsäure. Die Umwandlung der inaktiven Vorstufe Pepsinogen in Pepsin läuft nur im sauren Milieu ab und das Enzym wird bei pH-Werten oberhalb von 6 irreversibel inaktiviert. Durch den Pylorus (Magenpförtner) gelangt der Nahrungsbrei weiter in den Dünndarm.

Der Dünndarm eines erwachsenen Menschen hat mit seinen drei Darmabschnitten, dem Duodenum, dem Jejunum und dem Ileum, je nach Tonus eine Länge von 3-6 m¹². Da der Dünndarm gut durchblutet ist und dank einer ganz speziellen Beschaffenheit der inneren Oberfläche eine Resorptionsfläche von rund 180 m² aufweist, stellt er das Haupt-Resorptionsorgan des Verdauungstraktes dar. Diese enorme Vergrößerung der Oberfläche wird durch Falten (Kerckring-Falten), Zotten und Mikrovilli erreicht. Die Oberflächenbeschaffenheit des Dünndarms ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

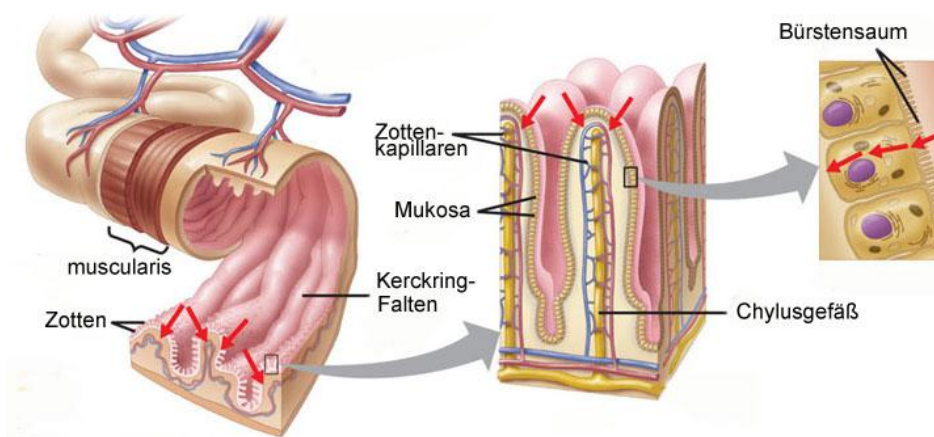


Abbildung 1 Ca. 600fache Vergrößerung der Darmoberfläche im Dünndarm; Bürstensaum entspricht der Gesamtheit der Mikrovilli; © H. Hinghofer-Szalkay¹³.

Unmittelbar nach dem Eintritt in das Duodenum wird die Nahrung mit den Verdauungssäften der Leber, der Galle und der Bauchspeicheldrüse (Pankreas) versetzt. Hauptgallengang und Bauchspeicheldrüsengang besitzen eine gemeinsame Mündung in den Dünndarm. Durch Gallensalze werden die Nahrungsfette emulgiert und somit den fettverdauenden Enzymen zugänglich gemacht. Die im Pankreassekret enthaltenen Verdauungsenzyme Trypsinogen, Chymotrypsinogen, Procarboxypeptidase und Proelastase dienen der Eiweißspaltung, die α -Amylase der Stärkespaltung und die Lipase der Fettspaltung. Die eiweiß- und fettspaltenden Enzyme werden als inaktive Vorstufen sezerniert, um einen Selbstverdau des Organs zu verhindern. Die im Bürstensaum des Duodenums lokalisierte membrangebundene Enteropeptidase aktiviert Trypsinogen durch Abspaltung eines Hexapeptids zu Trypsin, das wiederum für die Aktivierung weiterer Pankreasenzyme verantwortlich ist. Proteine aus der Nahrung werden durch die aktivierten Enzyme bevorzugt in Di- und Tripeptide gespalten, die in dieser Form vor allem im Jejunum resorbiert werden. Größere Peptide oder gar Proteine können nicht ohne weiteres aufgenommen werden¹¹. Weitere Funktionen des Duodenums sind die Neutralisation des vom Magen angesäuerten Speisebreis durch Sekretion von Hydrogencarbonaten sowie die Absonderung von Muzinen. Jejunum und Ileum nehmen ca. 95% der Gesamtlänge des Dünndarms ein und stellen damit den größten Teil an resorbierender Oberfläche. Neben einigen immunologischen Aufgaben ist die Resorption von Nahrungsbestandteilen und Wasser die wesentliche Funktion dieser beiden letzten Dünndarmabschnitte.

Der in etwa 1,5 m lange Dickdarm wird in die drei Abschnitte Blinddarm (*Caecum*), Grimmdarm (*Colon*) und Mastdarm (*Rectum*) eingeteilt. Seine Aufgaben sind im Wesentlichen die Resorption von Wasser und Elektrolyten sowie die Speicherung des Stuhlinhaltes bis zur Entleerung. Der Dickdarm ist mit Bakterien besiedelt, die in ihrer

Gesamtheit die Darmflora bilden. Sie erfüllen wichtige Aufgaben bei der Bildung von essentiellen Aminosäuren und Vitaminen wie beispielsweise Vitamin K.

Die gesamte innere Oberfläche des Gastrointestinaltraktes ist mit einer Schleimhaut (*Mukosa*) ausgekleidet. Die Darmschleimhaut besitzt im Gegensatz zur äußeren Haut keine Hornschicht und keine Haare. Sie besteht aus einer einschichtigen Epitheldecke, die durch die Enterozyten gebildet wird, einer epithelialen Muskelschicht und einer dazwischenliegenden Bindegewebsschicht. Innerhalb des Epithelverbandes befinden sich über die gesamte Darmschleimhaut verteilt becherförmige, Schleim produzierende Zellen, die sogenannten Becherzellen (*Goblet-Zellen*). Sie sind für die Bildung und Sekretion der Mucine auf die luminalen Darmoberfläche verantwortlich. Diese quellen nach Kontakt mit Wasser und bilden einen Schleim (*Mukus*), der dem Schutz der Epithelzellen dient. In der Mukosa des Dünndarms befinden sich außerdem Bereiche aus Gewebe des lymphatischen Systems, die sogenannten Peyer-Plaques. Sie sind Teil des darmassoziierten lymphatischen Gewebes, kurz GALT (engl.: *gut associated lymphoid tissue*). Diese etwa 1 cm großen Bereiche stellen eine zusammenhängende Ansammlung von 10 bis 15 Lymphfollikeln dar und sind vom sogenannten Follikel-assoziierten Epithel (FAE) überdeckt. Etwa 10 bis 15% des FAE bestehen aus spezialisierten Epithelzellen, den sogenannten M-Zellen. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie in besonderem Maße Stoffe oder Partikel aus der Nahrung aufnehmen und diese basolateral an Zellen des Immunsystems wieder abgeben. Dieser Vorgang wird als Transzytose bezeichnet. Durch Aufnahme von Antigenen nehmen sie eine wichtige Aufgabe für das Immunsystem wahr. Oral applizierte Impfstoffe werden beispielsweise über die M-Zellen aufgenommen und entfalten ihre Wirkung durch Interaktion mit Immunzellen der Peyer-Plaques¹⁴.

Eine Voraussetzung für die korrekte Funktionsweise des Verdauungstraktes ist die Aufrechterhaltung eines spezifischen pH-Profiles. Je nach Darmabschnitt liegen typischerweise sehr unterschiedliche pH-Werte vor. Ein typisches pH-Profil des Verdauungstraktes ist Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2 Typisches pH-Profil des Verdauungstraktes vor (*präprandial*) und nach Nahrungsaufnahme (*postprandial*)^{15,16}.

Verdauungsorgan	Abschnitt	Zustand	pH-Bereich
Magen		präprandial	1,4 – 2,1
		postprandial	4,3 – 5,4
Dünndarm	Duodenum	präprandial	4,9 – 6,4
		postprandial	4,2 – 6,1
	Jejunum	präprandial	4,4 – 6,6
		postprandial	5,2 – 6,2
	Ileum	präprandial	6,5 – 7,4
		postprandial	6,8 – 7,5
Dickdarm	Caecum		6,4
	Colon (oberer Abschnitt)		6,0
	Colon (unterer Abschnitt)		7,5
	Rektum		≈ 7

1.3.2 Barrieren der intestinalen Stoffaufnahme

Aus der in Abschnitt 1.3.1 beschriebenen Anatomie des Verdauungstraktes ergeben sich neben hervorragenden Aufnahmemöglichkeiten für peroral applizierte Arzneistoffe auch einige Hindernisse, die von den Substanzen zunächst zu überwinden sind. Im folgenden Abschnitt werden diese Barrieren vor allem spezifisch für Peptid- und Proteinarzneistoffe genauer beschrieben. Dabei ist stets zu bedenken, dass der Verdauungstrakt geradezu darauf spezialisiert ist, Peptide im Zuge der Verdauung zu zersetzen. Peroral applizierte pharmazeutische Proteine erwartet im Verdauungstrakt das gleiche Schicksal wie mit der Nahrung aufgenommene Eiweiße. Prozesse, die im Folgenden eher vor dem Hintergrund der Verdauung von Nahrungseiweißen beschrieben werden, gelten daher selbstverständlich in gleicher Weise für Proteinarzneistoffe.

Um beurteilen zu können, welchen Einflüssen ein Arzneistoff nach peroraler Gabe ausgesetzt ist, muss zunächst ein Augenmerk auf den Weg des Arzneimittels durch den Verdauungstrakt unter Berücksichtigung des Milieus und der Verweilzeit in den jeweiligen Abschnitten gelegt werden.

10 ml Flüssigkeit passieren die Speiseröhre eines gesunden erwachsenen Menschen in sitzender Position innerhalb von ca. 20 s. In stehender Position ist der Zeitraum kürzer. Eine feste Arzneiform benötigt dafür maximal 2 min. Die anschließende Verweilzeit des Arzneistoffes im Magen ist sehr unterschiedlich und hängt von vielzähligen Faktoren wie beispielsweise der Arzneiform oder einer zuvor oder gleichzeitig eingenommenen Mahlzeit ab. In den 1980er Jahren wurde eine Studie zur Verweilzeit von Arzneimitteln im Magen

durchgeführt¹⁷. Die Ergebnisse dieser Studie bezüglich Lösungen und Suspensionen sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3 Mittlere Verweilzeiten unterschiedlicher Arzneiformen in den jeweiligen Darmabschnitten^{12,17}. Die Daten für Pellets und Tabletten wurden einer Veröffentlichung von S. Klein et al. entnommen¹⁸.

Arzneiform	Darmabschnitt	Präprandiale mittlere Verweilzeit	Postprandiale mittlere Verweilzeit
Wässrige Lösung	Magen	8 min	40 min
Suspension (Mikropartikel)	Magen	48 min	58 min
Pellets (< 2 mm)	Magen	30 min	2 – 4 h
	Duodenum	< 10 min	< 10 min
	Jejunum	2 h	2 h
	Ileum	2 h	2 h
	Colon	4 – 12 h	4 – 12 h
Tablette (nicht zerfallend)	Magen	60 min	2 – 10 h
	Duodenum	< 10 min	< 10 min
	Jejunum	60 min	2 h
	Ileum	3 h	2 h
	Colon	4 – 12 h	4 – 12 h

Die Magenverweilzeit von Arzneimitteln ist vor allem bei peroraler Gabe säureempfindlicher Arzneistoffe wie vieler Peptide und Proteine von Bedeutung. Sie unterliegt in Abhängigkeit von der Arzneiform und der Aufnahme von Nahrung erheblichen Schwankungen. Dies gilt es bei der Auswahl der Arzneiform und bei den Einnahmeempfehlungen zu berücksichtigen.

Die mittlere Verweilzeit im Dünndarm wird weder von der Arzneiform noch durch eine vorausgehende Nahrungsaufnahme wesentlich beeinflusst (siehe Tabelle 3). Von Relevanz ist dieser Aspekt jedoch im Hinblick auf die Stabilität von Arzneistoffen, die von Verdauungsenzymen des Pankreas abgebaut werden können. Außerdem ergibt sich hieraus eine weitere Anforderung an das Arzneimittel: Der Wirkstoff muss im Dünndarm rechtzeitig aus dem Arzneimittel freigesetzt werden, um resorbiert werden zu können. Die für die Resorption zur Verfügung stehende Zeit ist auf die Dauer der Passage des Arzneistoffes begrenzt.

Die Verweilzeit im Dickdarm spielt im Zusammenhang mit der peroralen Gabe von Peptiden oder Proteinen keine bedeutende Rolle. Da der Dünndarm aufgrund seiner wesentlich größeren Oberfläche eine deutlich stärker ausgeprägte Resorptionsfähigkeit als der Dickdarm besitzt, wird für diese Wirkstoffe meist eine Resorption im Dünndarm angestrebt. Da zudem viele Verdauungsenzyme des Pankreas auch im Dickdarm noch aktiv sind, würde eine

gezielte Freisetzung von Proteinwirkstoffen im Dickdarm beispielsweise keine geeignete Möglichkeit darstellen, die enzymatische Barriere zu umgehen.

1.3.2.1 Magen

Das saure und Pepsin-haltige Milieu des Magens stellt die erste wesentliche Barriere bei der peroralen Gabe von Peptiden und Proteinen dar. Die hydrolytische Spaltung von Peptidbindungen sowie die Deamidierung von Asparagin- und Glutamin-Seitenketten beispielsweise werden durch Salzsäure katalysiert. Ohne zusätzliche Hitze einwirkung ist eine Spaltung der reaktionsträgen Peptidbindungen durch die Magensäure und damit eine Veränderung in der Primärstruktur allerdings relativ unwahrscheinlich. Chemische Reaktionen der Seitenketten wie zum Beispiel Protonierungs- oder Deprotonierungsreaktionen sind jedoch sehr wahrscheinlich und können Veränderungen der Tertiär- oder Quartärstruktur von Proteinen bewirken. Die Erhaltung der spezifischen und funktionsrelevanten dreidimensionalen Struktur, der Proteinfaltung, beruht auf elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen. Bereits leichte pH-Wert Verschiebungen können zu einer Veränderung der Ladung funktioneller Gruppen eines Proteins führen und damit auf elektrostatische Wechselwirkungen beruhende Bindungen lösen oder andere neu knüpfen. Dies kann zur Denaturierung des Proteins führen, die reversibel oder auch irreversibel sein kann und in aller Regel zu dessen Funktionsverlust führt.

Die Deamidierung von Seitenketten ist eine säurekatalysierte Hydrolyse und läuft bei pH-Werten zwischen 1 und 2 ab, die im Magen durchaus vorherrschen (siehe Tabelle 2). Proteine mit Glutamin- oder Asparagin-Seitenketten können dadurch irreversibel denaturiert und inaktiviert werden.

Das vom Magen sezernierte Pepsin gehört zu den Endopeptidasen, die Peptidbindungen innerhalb der Proteinkette spalten. Es spaltet sequenzspezifisch am N-Terminus von Phenylalanin und wirkt wie bereits erwähnt nur im sauren Milieu des Magens.

1.3.2.2 Verdauungsenzyme

In direktem Anschluss an die Magenpassage werden peroral applizierte Wirkstoffe im Duodenum mit den Verdauungsenzymen des Pankreas und mit Galle vermischt. Eine Vielzahl unterschiedlicher Peptidasen spaltet oral applizierte Peptide und Proteine hydrolytisch in kleinere Peptidfragmente wie Di- und Tripeptide oder einzelne Aminosäuren, die dann von den Enterozyten resorbiert werden können. Die Enzyme spalten Peptidbindungen an ganz spezifischen Stellen innerhalb der Proteinketten (Endopeptidasen) bzw. an deren Enden (Exopeptidasen). Die relevantesten Pankreas-Proteasen sind die Serin-Endopeptidasen Trypsin, Chymotrypsin und Elastase sowie die Exopeptidasen Carboxypeptidase A und B.

Trypsin spaltet sehr selektiv an die basischen Aminosäuren Arginin und Lysin angrenzende Bindungen. Chymotrypsin ist etwas weniger spezifisch und spaltet bevorzugt an hydrophoben Aminosäuren wie Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan. Die geringste Selektivität in dieser Reihe besitzt die Elastase. Sie spaltet an aliphatischen und unverzweigten Aminosäuren wie Valin, Alanin, Leucin und Isoleucin. Die Spaltprodukte der Endopeptidasen stellen hervorragende Substrate für die Exopeptidasen dar. Eine Spaltung durch Trypsin hinterlässt immer ein carboxy-terminales Lysin oder Arginin, das durch die Carboxypeptidase B abgespalten werden kann. Eine ähnliche Beziehung besteht zwischen Chymotrypsin und Carboxypeptidase A: Die nach einer Spaltung durch Chymotrypsin resultierenden carboxy-terminalen aromatischen Aminosäuren werden durch Carboxypeptidase A abgespalten. Zwischen 94 und 98% aller natürlichen Proteine können somit effizient im Dünndarm verdaut und resorbiert werden¹⁹.

1.3.2.3 Membranassoziierte Bürstensaumenzyme

Die durch Mikrovilli ausgestülpte Membran der Enterozyten wird auch als Bürstensaum bezeichnet. Die Membran des Bürstensaumes weist durch Einlagerung einer Vielzahl von Enzymen, Transportern und Rezeptoren eine hohe metabolische Aktivität auf. Unter den Bürstensaumenzymen befindet sich auch eine Reihe peptidspaltender Glycoproteine, die fest mit der Membran assoziiert sind und deren aktives Ende in das Lumen des Dünndarms ragt. Die membranassoziierte Verdauung am Bürstensaum ist zentraler Bestandteil der Eiweißverdauung und schließt sich der luminalen Verdauung durch die Pankreasenzyme an. Als Substrate dienen Oligopeptide (aus maximal 10 Aminosäuren bestehend), die zu resorbierbaren Di- und Tripeptiden und Aminosäuren umgesetzt werden.

Neben einigen Carboxypeptidasen und Endopeptidasen existiert eine Reihe von Peptidasen, die ausgehend vom amino-terminalen Ende Aminosäuren von Peptiden abspalten. Zu diesen gehört die sehr häufig vorkommende Amino-oligopeptidase oder Amino-peptidase N, die weitgehend unspezifisch Aminosäuren von Oligopeptiden mit freier Aminogruppe abspaltet, sofern sie L-konfiguriert sind. Eine Übersicht über weitere membranassoziierte Bürstensaumenzyme, deren Substrate und spezifische Spaltstellen wurde im Jahre 1997 von Langguth et al. veröffentlicht¹⁹.

1.3.2.4 Intestinaler Mukus

Zum Schutz der Epithelzellen vor chemischen und mechanischen Einwirkungen ist die innere Darmschleimhaut mit einer 100-500 µm dicken Schleimschicht (lat. *mucus*) ausgekleidet²⁰. Bevor eine Substanz über die Darmschleimhaut resorbiert werden kann, muss sie zunächst die Mukusschicht passieren.

Diese zähflüssige und klebrige organische Absonderung enthält vor allem sogenannte Mucine als strukturgebende Elemente. Mucine sind Glycoproteine und demzufolge Makromoleküle, die aus einer zentralen Proteinkette mit langen Polysaccharid-Seitenketten bestehen. Es existiert eine Vielzahl unterschiedlicher Mucin-Typen, die sich jeweils in ihren Eigenschaften unterscheiden. In Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Mucin-Gemisches kann beispielsweise die Viskosität des Mukus im Magen-Darm-Trakt gezielt reguliert werden. Die Mucine werden funktional in zwei Gruppen eingeteilt, in membrangebundene und in abgesonderte. Den größten Anteil an intestinal abgesonderten Mucinen bildet der MUC2-Typ²¹. MUC2 besitzt die Fähigkeit über Disulfidbrücken Quervernetzungen zu bilden und dadurch ein Netzwerk von immenser Größe auszubilden, das gegen einen Abbau durch Verdauungsenzyme resistent ist. Die Polysaccharid-Seitenketten stellen den größten Massenanteil des Mucins dar. Durch Sialyl- oder Sulfatgruppen tragen diese häufig eine negative Ladung. Ihrem anionischen Charakter sowie den vielzähligen Hydroxylgruppen verdanken die Mucine ihre Fähigkeit große Mengen Wasser zu binden, eine Voraussetzung zur Bildung einer gelartigen Konsistenz.

Die Durchdringung dieses stark anionischen Gelnetzwerkes stellt auf der einen Seite eine Herausforderung für Peptid- und Proteinwirkstoffe dar. Auf der anderen Seite kann der Mukus aufgrund seiner adhäsiven Eigenschaften allerdings auch zur Verbesserung der Resorption genutzt werden, indem der Kontakt des Arzneimittels zum Epithel intensiviert und verlängert wird. Auf diesen Aspekt wird in Abschnitt 1.6.3 näher eingegangen.

1.3.2.5 Enterozytenmembran

Die apikale sowie die basolaterale Zellmembran der Darmepithelzellen sind aus einer Lipiddoppelschicht aufgebaut. Zur systemischen Aufnahme von Wirkstoffen auf transzellulärem Weg muss diese Diffusionsbarriere folglich zwei Mal überwunden werden.

Die Membran wird von amphiphilen Lipiden gebildet, die einen hydrophilen und einen hydrophoben Molekülteil besitzen. Den größten Anteil an Membranlipiden bilden Phospholipide wie beispielsweise Phosphatidylcholin, das auch als Lecithin bezeichnet wird. Die chemische Struktur von Lecithin ist in Abbildung 2 dargestellt. In polaren Lösungsmitteln zeigen die hydrophoben Schwänze der Phospholipide nach innen und die hydrophilen Köpfe nach außen, sodass sich eine Doppelschicht ausbildet. Kleinere und lipophile Moleküle können ungehindert durch die Membran hindurch diffundieren, was für die meisten Peptide und Proteine aufgrund ihrer Größe und ihrer guten Wasserlöslichkeit jedoch nicht möglich ist. Zur Durchdringung des lipophilen Membrankernes müsste zunächst die hohe Desolvatisierungsenergie der hydratisierten Moleküle aufgebracht werden. Eine weitere

Voraussetzung zur Passage wäre zudem die Aufnahme der Moleküle in die lipophile Phase der Membran. Beides ist nahezu ausgeschlossen.

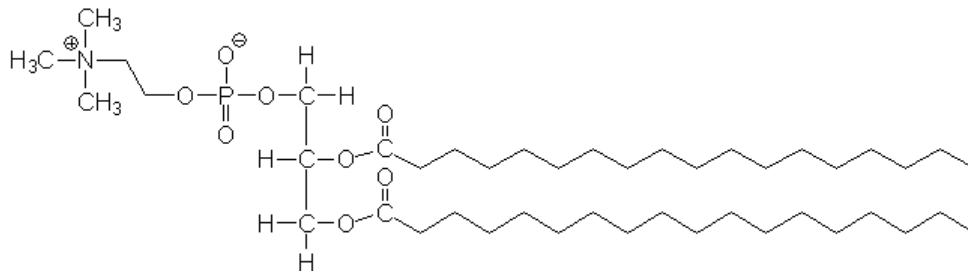


Abbildung 2 Chemische Struktur des membranbildenden Phospholipids Lecithin (Phosphatidylcholin), bestehend aus einem Glycerolrest mit zwei veresterten Fettsäuren und dem Alkoholrest Cholin, der über eine Phosphodiesterbindung an die dritte Alkoholgruppe des Glycerols gebunden ist.

In die Lipiddoppelschicht sind verschiedene Arten von Membranproteinen wie beispielsweise Transporter oder Ionenkanäle eingelagert, welche die Aufnahme bestimmter Moleküle, die nicht ohne weiteres durch die Membran hindurch diffundieren können, dennoch ermöglichen. In Abschnitt 1.3.3 wird dieser Aspekt näher beleuchtet.

1.3.2.6 Zytosolische Enzyme

Zytosolische und lysosomale Enzyme spielen lediglich beim transzellulären Transportvorgang eine Rolle. Dieser wird aus den im Folgenden beschriebenen Gründen häufig nicht als der bevorzugte Weg zur Aufnahme intakter Peptide und Proteine angesehen²².

Die Resorption der Bestandteile von Nahrungseiweißen erfolgt zwar bevorzugt auf transzellulärem Weg, dazu müssen diese jedoch zunächst von Peptidasen zersetzt werden. Di- und Tripeptide werden dann über Transportproteine aktiv in die Enterozyten aufgenommen, müssen jedoch vor der Abgabe ins Blut zunächst weiter gespalten werden. Dies erklärt die Präsenz vielzähliger Peptidasen im Zytosol. Im Zusammenhang mit der Proteinverdauung sind diverse Dipeptidasen und Aminotripeptidase von Bedeutung. Sie spalten die durch Carrier-Proteine aktiv aufgenommenen Di- und Tripeptide im Zytosol weiter in einzelne Aminosäuren, die dann durch eine energieunabhängige Diffusion über die basolaterale Membran ins Blut abgegeben werden^{20,23}.

Der Abbau von Peptiden oder Proteinen, die durch Endozytose in die Epithelzellen aufgenommen wurden, erfolgt zudem auch innerhalb von Lysosomen oder durch das Proteasom. Die Lysosomen enthalten weitere zahlreiche Protein- und Peptid-spaltende Enzyme (z.B. Cathepsine) und spielen eine wichtige Rolle bei der Deaktivierung endogener oder exogener Proteine. Für intrazellulär aufgenommene Peptid- oder Proteinwirkstoffe

stellen die Lysosomen eine bedeutende Barriere dar. Innerhalb der säure- und enzymhaltigen Vesikel werden nahezu alle Proteine und Peptide sehr effizient in ihre kleinsten Bausteine, die Aminosäuren, zerlegt.

1.3.2.7 First-Pass-Metabolismus

Bevor der vom Darm resorbierte Wirkstoffanteil nun tatsächlich im gesamten systemischen Blutkreislauf verteilt werden kann, ist noch eine weitere Hürde zu überwinden. Nahezu der gesamte venöse Blutabfluss des Darmes mündet in die Pfortader, die alle intestinal resorbierten Stoffe zunächst der Leber zuführt. Als zentrales Stoffwechselorgan des Menschen ist die Leber mit unzähligen Enzymen ausgestattet, die unter anderem der Entgiftung schädlicher Stoffwechselprodukte oder der Inaktivierung exogener Substanzen, die mit der Nahrung aufgenommen wurden, dienen. Die unmittelbare Leberpassage nach der Resorption im Darm führt häufig zu einer mehr oder weniger stark ausgeprägten Inaktivierung pharmazeutischer Wirkstoffe. Dieser Effekt ist oftmals, selbst bei gut resorbierbaren Wirkstoffen, für eine geringe orale Bioverfügbarkeit verantwortlich und wird als First-Pass-Effekt bezeichnet.

1.3.3 Absorptions- und Transportmechanismen im Darm

Der Darm im Allgemeinen und speziell der Dünndarm wurde bereits in vorangehenden Kapiteln als äußerst effizientes Resorptionsorgan vorgestellt. Nach der Beschreibung der spezifischen Barrieren für die intestinale Resorption werden im folgenden Abschnitt die hervorragenden Absorptions- und Transportmechanismen des Darmepithels genauer beschrieben und deren Potential hinsichtlich einer effizienten Aufnahme von Peptiden oder Proteinen bewertet.

1.3.3.1 Transzelluläre Route – Transmembran-Transport

Transzelluläre Aufnahme beschreibt die Aufnahme von Substanzen aus dem Darmlumen in die Enterozyten mit anschließendem Weitertransport ins Blut. Prinzipiell existieren zwei Möglichkeiten, der passive Transport, der ohne Energieverbrauch abläuft und der aktive Transport unter ATP-Verbrauch.

Passiver Transport

Es existieren wiederum zwei Arten von transzellulärem passivem Transport: die freie Diffusion durch die Membran und die erleichterte Diffusion unter Beteiligung eines Kanalproteins. Beide erfolgen lediglich entlang eines Konzentrationsgradienten.

Die freie Diffusion hängt von der Permeabilität der Wirkstoffmoleküle durch die Lipiddoppelschicht ab. Die Membranpermeabilität eines Moleküls P_m ist durch Formel 1 definiert:

$$P_m = \frac{K_p * D_m}{L_m}$$

Formel 1 Membranpermeabilität P_m eines Feststoffmoleküls, wobei K_p : Membran/Wasser-Verteilungskoeffizient des Moleküls, D_m : Diffusionskoeffizient der Membran und L_m : Membrandicke.

Moleküle mit einer Permeabilität von $5 \cdot 10^{-6}$ cm/s oder mehr werden im Sinne des Biopharmazeutischen Klassifizierungssystems (BCS) als gut permeabel bezeichnet und den BCS Klassen I und II zugeordnet²⁴. Sie können die Membran durch freie Diffusion passieren und werden transzellulär resorbiert. Peptide und Proteine weisen jedoch aufgrund ihrer Molekülgröße und in der Regel guten Wasserlöslichkeit eine ausgesprochen geringe Permeabilität von weniger als $5 \cdot 10^{-6}$ cm/s auf und werden in Abhängigkeit ihrer Löslichkeit den BCS Klassen III oder IV zugeordnet²⁴.

Durch erleichterte Diffusion unter Beteiligung von Transport- oder Kanalproteinen können auch hydrophile größere Moleküle oder Ionen teilweise sehr selektiv oder auch weniger selektiv die Membran entlang ihres Konzentrationsgradienten passieren. Viele dieser Kanäle öffnen sich erst auf ein bestimmtes Signal hin. Ein solches Signal kann beispielsweise die Bindung eines spezifischen Liganden oder bei spannungsabhängigen Kanälen eine Änderung des Membranpotentials sein. Durch gezielte Exprimierung solcher Transmembranproteine, die teilweise auch sehr spezifisch für bestimmte Substrate sein können, besteht für Zellen die Möglichkeit den Stofftransport zu regulieren. Man spricht hier von Semipermeabilität oder selektiver Permeabilität.

Grundsätzlich ist die Transportrichtung beim passiven Transport nicht festgelegt, sie erfolgt stets entlang des Konzentrationsgefälles in die Zelle hinein oder aus der Zelle heraus, bis sich ein Konzentrationsgleichgewicht eingestellt hat.

Aktiver Transport

Beim aktiven Transport durch Carrier Proteine wird indirekt oder direkt immer Energie in Form von ATP-Äquivalenten verbraucht. Er kann auch entgegen eines Konzentrationsgradienten erfolgen und läuft stets in eine definierte Richtung ab. Beim primär aktiven Transport wird ATP direkt vom Transporter hydrolysiert, wie beispielsweise bei der Na^+/K^+ -ATPase, die unter Energieverbrauch ständig ein Na^+ -Konzentrationsgefälle von extrazellulär nach intrazellulär aufrecht erhält. Der

Transport von Glucose beispielsweise erfolgt sekundär aktiv durch einen Cotransport mit Na^+ -Ionen und wird durch das unter ATP-Verbrauch aufrecht erhaltene Konzentrationsgefälle von Na^+ angetrieben. Der sekundär aktive Transport kann auch als Antiport erfolgen (Na^+ aus der Zelle heraus, Ca^{2+} in die Zelle hinein).

Eine Reihe von Carrier Proteinen steht im Zusammenhang mit dem Transport von Arzneistoffen. Dazu gehören beispielsweise die ABC-Transporter, zu denen die als Effluxpumpen bekannten MDR (Multi Drug Resistance)-Transporter zählen, oder auch die Peptidtransporter (PEPT), die in der Bürstensaummembran lokalisiert sind und Peptide oder Peptidomimetika transportieren²⁵.

Die Peptidtransporter können prinzipiell auch für perorales *Peptid Delivery* genutzt werden, allerdings ist die Größe der transportierbaren Peptide auf maximal 4 Aminosäuren (Tetrapeptide) begrenzt²⁶ und die auf diesem Weg aufgenommenen Wirkstoffe müssten gegenüber den zytosolischen Peptidasen resistent sein.

1.3.3.2 Parazelluläre Route

Beim parazellulären Transport werden Stoffe zwischen den Zellzwischenräumen hindurch über das Epithel transportiert. Der parazelluläre Transport erfolgt passiv und wird durch die sogenannten *Tight Junctions* kontrolliert. Diese bestehen aus Membranproteinkomplexen, die sich wie ein zusammenhängendes Band um die Epithelzellen herum netzartig anlagern und einen festen Kontakt zu den Nachbarzellen herstellen. Je nach Gewebeart sind die Zellkontakte enger oder weiter geknüpft, sodass ein parazellulärer Fluss von Molekülen sehr gut möglich sein kann, wie zum Beispiel im Darm oder auch vollständig unterbunden werden kann, wie beispielsweise in der Blut-Hirn-Schranke. Da auf dem parazellulären Weg keine Membran passiert werden muss, kann er prinzipiell auch von sehr hydrophilen Substanzen genutzt werden. Allerdings ist dieser Transportweg nur für solche Moleküle möglich, deren Molekulargewicht maximal bei etwa 1.200 Da liegt²⁷. Therapeutische Peptide wie beispielsweise einige Peptidhormone (Buserilin, Desmopressin, Goserelin, Oxytocin etc.) liegen noch unterhalb dieses Bereiches, komplexe Proteine hingegen überschreiten ihn in der Regel deutlich.

Diverse Substanzen, von denen einige auch Bestandteil natürlicher Nahrung sein können, wirken als Penetrationsförderer, indem sie die *Tight Junctions* beeinflussen und damit den Zellzusammenhalt lockern^{28,29}. Auf diese Weise kann die Durchlässigkeit des Darmepithels erhöht werden. In Kapitel 1.6.5 wird näher beschrieben, welche Substanzen prinzipiell zur Penetrationsförderung schlecht permeabler Arzneistoffe eingesetzt werden können.

1.3.3.3 Endozytose und Exozytose – Membranverlagernder Transport

Neben dem aktiven oder passiven Transport und der freien Diffusion durch die Enterozytenmembran besteht mit der Endozytose eine weitere Möglichkeit, wie Epithelzellen Stoffe aus ihrer Umgebung aufnehmen können. Durch Einstülpung der Membran können Flüssigkeitstropfen, darin gelöste Stoffe oder auch Feststoffe umschlossen und nach vollständiger Abschnürung von der Membran in Vesikel eingeschlossen werden. Diese Vesikel, auch als Endosomen bezeichnet, werden dann ins Zellinnere transportiert. Sie übernehmen ganz gezielt wichtige Transportprozesse innerhalb der Zelle. Die Vesikel können auch wieder mit der Zellmembran verschmelzen und ihren Inhalt an die Umgebung abgeben (Exozytose) oder sich mit Lysosomen zu einem Endolysosom vereinigen, um ihren Inhalt enzymatisch abzubauen.

Prinzipiell wird zwischen zwei Formen der Endozytose unterschieden: der Pinozytose und der Phagozytose. Die Aufnahme von Flüssigkeitstropfen und darin gelöster Substanzen wird als Pinozytose bezeichnet, während die Aufnahme fester kleiner Partikel oder auch ganzer Zellen wie beispielsweise Bakterien unter dem Begriff Phagozytose zusammengefasst wird. Während die Pinozytose von vielfältigen Zelltypen beherrscht wird, sind lediglich besonders spezialisierte Zellen zur Phagozytose befähigt. Dazu zählen beispielsweise Leukozyten, Makrophagen und M-Zellen, die Epithelzellen des Follikel-assoziierten Systems. Die M-Zellen nehmen Antigene oder kleinere Bakterien durch Phagozytose aus dem Darmlumen auf und leiten diese unverändert an Immunzellen der Peyer-Plaques weiter³⁰. Dieser Vorgang wird allgemein auch als Transzytose bezeichnet. Die Größe der Partikel, die per Phagozytose aufgenommen werden können, liegt in etwa zwischen 200 nm und ca. 1 µm. Da die M-Zellen eine besonders hohe Transzytoseaktivität aufweisen, wurde bereits von einigen Arbeitsgruppen versucht, sie gezielt für die Aufnahme von wirkstoffbeladenen Partikeln zu nutzen^{31,32}. Die M-Zellen stellen allerdings wie bereits weiter oben erwähnt nur einen sehr geringen Teil des gesamten Darmepithels dar, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass sie keinen wesentlichen Beitrag zur Bioverfügbarkeitsverbesserung von Proteinen leisten können. Dass eine gezielte Ansteuerung der M-Zellen bei der oralen Vakzinierung hingegen von großem Nutzen sein kann, wurde bereits 1997 von Robinson et al. gezeigt³³. Auch Borges et al. führten Studien zur M-Zell vermittelten Vakzinierung durch, die vielversprechende Ergebnisse zeigten³⁴.

Die Steuerung der Endozytose kann über Rezeptoren erfolgen und durch Bindung spezifischer Liganden an Bindungsdomänen auf der Zelloberfläche ausgelöst werden. Die Calveoline oder Clathrin sind Membranproteine, die in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen.

Peroral zugeführte Peptide oder Proteine können durchaus per Endozytose von der Darmschleimhaut aufgenommen werden. Jedoch besteht beim transzellulären Weg stets das

Risiko eines enzymatischen Abbaus in Lysosomen oder einer Antigenpräsentation der exogenen Moleküle an Zellen des Immunsystems, sofern eine Aufnahme über die M-Zellen in die Peyer-Plaques erfolgt. Beides ist nicht gewünscht und würde sich negativ auf die systemische Verfügbarkeit auswirken.

1.4 Perorale Verabreichung von therapeutischen Peptiden und Proteinen

Wie bereits in der Einleitung erwähnt wurde, steigt die Anzahl der neu zugelassenen und der sich in der Pipeline befindenden Peptid- und Proteinwirkstoffe nach wie vor von Jahr zu Jahr. Dies liegt zum einen an dem immensen Potential dieser Wirkstoffe hinsichtlich neuer Therapieansätze und zum anderen an der fortschreitenden Entwicklung der Biotechnologie, wodurch eine effiziente Herstellung in großen Maßstäben ermöglicht wurde³⁵. Die weit größte Anzahl der neuen Therapeutika dieser Wirkstoffklasse wird nach wie vor als parenterale Formulierung auf den Markt gebracht, obwohl diese Applikationsart mit deutlichen Nachteilen und Risiken für den Patienten verbunden ist. Ein Nadelstich ist schmerzhaft und wird daher in aller Regel als unangenehm empfunden und jeder invasive Eingriff bringt zudem ein gewisses Infektionsrisiko mit sich. Abhängig von der Darreichungsform besteht außerdem das Risiko der Paravasation (eine Infusion läuft nicht in die Vene, sondern in das umliegende Gewebe) oder der Bildung von Hämatomen an der Einstichstelle. Da die Verabreichung von Parenteralia häufig von medizinischem Fachpersonal durchgeführt werden muss und dafür spezielles Injektionsbesteck benötigt wird, entstehen außerdem zusätzliche Kosten für das Gesundheitssystem. Die perorale Gabe hingegen ist weit sicherer und komfortabler und wird vom Patienten deutlich bevorzugt. Um die Sicherheit für die Patienten und deren Compliance zu verbessern, sollte stets die Formulierung oraler Arzneiformen angestrebt werden, sofern ein orales Einnahmeschema aus pharmakologischer und pharmakokinetischer Sicht sinnvoll ist.

Die perorale Gabe von Peptiden und Proteinen ist allerdings wie bereits erwähnt nicht ohne weiteres möglich, da die systemische Verfügbarkeit häufig nicht ausreicht, um eine pharmakologische Wirkung zu erzielen. Die enzymatische Instabilität, die geringe mukosale Resorption und die schnelle Biotransformation und Elimination aus dem Blutkreislauf führen zu einer geringen oralen Bioverfügbarkeit dieser Wirkstoffe³⁵. Nachdem in Kapitel 1.3.2 die Resorptionsbarrieren ausgehend von der Anatomie und Physiologie des Verdauungstraktes beschrieben wurden, werden im folgenden Kapitel vorwiegend stoffliche Eigenschaften der Arzneistoffmoleküle näher beleuchtet, die für deren geringe orale Bioverfügbarkeit verantwortlich sind.

In der Fachliteratur werden vielfältige Ansätze zur erfolgreichen peroralen Gabe von Peptiden beschrieben, die sich beispielsweise mit gezielten chemischen Modifikationen der Arzneistoffmoleküle oder mit ganz speziellen galenischen Formulierungen beschäftigen. Einige dieser Konzepte werden in Kapitel 1.6 dieser Arbeit genauer beschrieben und diskutiert.

1.4.1 Bioverfügbarkeit

Die Bioverfügbarkeit ist ein zentrales Merkmal im Zusammenhang mit der peroralen Gabe von Peptidarzneistoffen. Nachdem dieser Begriff in voranstehenden Kapiteln bereits häufiger zitiert wurde, erfolgt an dieser Stelle zunächst eine Erläuterung, was sich genau dahinter verbirgt.

Damit ein pharmazeutischer Wirkstoff seine Wirkung entfalten kann, muss er am Ort der gewünschten Wirkung in ausreichender Konzentration vorliegen. Dies stellt ganz spezielle Ansprüche an das Arzneimittel und erfordert in Abhängigkeit des Therapiezieles und des Wirkstoffes die Auswahl einer geeigneten Darreichungsform. Um exakt beurteilen zu können mit welcher Arzneiform die höchsten Konzentrationen am Ort der Wirkung erzielt werden können, wäre eigentlich eine Messung der Arzneistoffkonzentration im Zielorgan oder an der Zielstruktur notwendig. Dies ist jedoch in aller Regel zumindest in Humanstudien nicht möglich. Da der Transport der Wirkstoffe zu ihrem Wirkungsort allerdings meist über den Blutkreislauf erfolgt, kann von der Annahme ausgegangen werden, dass die Konzentration im Blut mit der Konzentration am Zielorgan gut korreliert. Auf Basis dieser Annahme wurde die Bioverfügbarkeit als eine pharmakologische Kenngröße folgendermaßen definiert: Die Bioverfügbarkeit (F) beschreibt, zu welchem Ausmaß und mit welcher Geschwindigkeit eine applizierte Arzneistoffdosis vom Organismus aufgenommen und im systemischen Blutkreislauf verteilt wird³⁶. Nach dieser Definition beträgt die Bioverfügbarkeit eines intravenös verabreichten Arzneimittels 100%. Die orale Bioverfügbarkeit ist definitionsgemäß eine absolute Bioverfügbarkeit und gibt die Bioverfügbarkeit einer peroral applizierten Substanz relativ zur intravenösen Gabe an. Sie stellt das Produkt aus dem im Darm absorbierten Wirkstoffanteil mit jeweils den Anteilen dar, die weder präsystemisch in der Darmwand noch bei der ersten Leberpassage (*First-Pass*) abgebaut wurden.

Die orale Bioverfügbarkeit eines Arzneistoffes wird durch physiologische, physikochemische und biopharmazeutische Faktoren beeinflusst. Die in Abschnitt 1.3.2 beschriebenen physiologischen Barrieren tragen dazu bei, die systemische Verfügbarkeit peroral applizierter Peptide und Proteine zu verringern. Betrachtungen zur physikalischen und chemischen Stabilität der Wirkstoffe erfolgen im anschließenden Abschnitt 1.4.2. Als biopharmazeutische Faktoren sind im Wesentlichen die Freisetzung aus dem Arzneimittel, die Löslichkeit des

Wirkstoffes und dessen Permeabilität zu nennen. Im Blutkreislauf kann nur der Arzneistoffanteil verteilt werden, der zuvor aus dem Wirkstoffträger freigesetzt wurde. Die Untersuchung der Freisetzungseigenschaften ist daher eine Grundvoraussetzung zur erfolgreichen Entwicklung einer galenischen Formulierung.

Unter den genannten Einflussfaktoren stellt die Überwindung der enzymatischen und membranbedingten Resorptionsbarrieren ganz klar die größte Herausforderung bei der Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit von Peptiden und Proteinen dar³⁷.

1.4.2 Stabilität von Peptiden und Proteinen

Es ist allgemein bekannt, dass die Stabilität von Peptiden und Proteinen vor allem in wässrigen Lösungen oder bei Einwirkung äußerer Einflüsse begrenzt ist. Dies stellt eine große Herausforderung bei der Formulierung von Arzneistoffen dieser Stoffklasse dar. Bei der Auswahl der benötigten Hilfsstoffe und hinsichtlich der Herstellungsmethode muss die physikalische und die chemische Stabilität der Wirkstoffmoleküle berücksichtigt werden. Zur Einschätzung der Bioverfügbarkeit und der Pharmakokinetik ist zudem die enzymatische Stabilität zu betrachten. Vor allem nach peroraler Gabe sind Peptidarzneistoffe drastischen Bedingungen ausgesetzt, die zur Verminderung der Bioverfügbarkeit beitragen.

Im Zusammenhang mit der chemischen Stabilität von Proteinen werden unter anderem Veränderungen in der Primärstruktur betrachtet, die beispielweise durch hydrolytische oder enzymatische Spaltung von Peptidbindungen verursacht werden können. Diese Veränderungen sind in aller Regel irreversibel. Weiterhin können bereits chemische Reaktionen der Aminosäurereste wie zum Beispiel Deamidierungen, Säure-Base-Reaktionen oder Redoxreaktionen zu einem Funktionsverlust führen, auch wenn es dabei nicht zu einer Spaltung der Peptidkette kommt³⁸.

Die physikalische Stabilität von Proteinen bezieht sich auf die Erhaltung der nativen Konformation der Moleküle. Das heißt, es werden Veränderungen in der Tertiärstruktur oder in Strukturebenen höherer Ordnung berücksichtigt, die in aller Regel zu einem Funktionsverlust führen. Auch die Bildung von Proteinaggregaten oder die Adsorption an Oberflächen stellen physikalische Effekte dar, die Einfluss auf die Funktion der Moleküle besitzen. Veränderungen der Tertiärstruktur führen zum Verlust der nativen Proteinfaltung und wirken sich in der Regel auf die Löslichkeit der Moleküle aus. Die Folge ist häufig eine flockige Ausfällung der Proteine aus wässrigen Lösungen. Dieser Vorgang wird als Denaturierung bezeichnet, sofern es dabei nicht zur Spaltung kovalenter Bindungen kommt. Die prinzipiell reversible reduktive Spaltung von Disulfidbrückenbindungen stellt diesbezüglich einen Grenzfall dar und wird allgemein zu den Denaturierungen gezählt.

Die Tertiärstruktur von Proteinen wird durch intramolekulare Wechselwirkungen unterschiedlicher Art stabilisiert. Diese sind zum einen elektrostatische Wechselwirkungen wie Ionenpaarbildung, Wasserstoffbrückenbindungen oder van-der-Waals-Kräfte und zum anderen hydrophobe Wechselwirkungen unpolarer Gruppen. Chemische Veränderungen der Aminosäurereste durch Deamidierung, Redoxreaktionen und Säure-Base Reaktionen oder Veränderungen der Hydratisierung beispielsweise aufgrund hoher Salzkonzentrationen können sich auf elektrostatische intramolekulare Bindungen auswirken und dadurch zur Denaturierung führen³⁸. Weiterhin können Proteine auch durch eine Temperaturveränderung denaturiert werden (Hitzedenaturierung). Eine Denaturierung kann häufig reversibel sein, wenn sie beispielsweise vom pH-Wert (Säure/Base), dem Hydratisierungsstatus (Salzkonzentration) oder der Temperatur abhängt. Die Denaturierung aufgrund der Spaltung von Disulfidbrückenbindungen ist in der Regel irreversibel³⁸.

Nicht alle der im Folgenden angeführten Aspekte finden in der vorliegenden Arbeit Berücksichtigung, da sie nicht in jedem Fall relevant für die verwendete Modellsubstanz sind. Da jedoch großen Wert auf die Übertragbarkeit der vorgestellten Konzepte auf andere Peptid- oder Proteinwirkstoffe gelegt wird, sollen sie nicht unerwähnt bleiben. Eine spezifische Betrachtung der verwendeten Modellsubstanz unter dem Aspekt der Stabilität erfolgt in Kapitel 3.3.

1.4.2.1 Stabilität im Herstellungsprozess

Zur Kontrolle der Stabilität während des Herstellungsprozesses empfiehlt es sich In-Prozess-Kontrollen jeweils nach kritischen Prozessschritten durchzuführen. Zum Nachweis der Stabilität und Integrität der Proteine müssen strukturspezifisch geeignete analytische Methoden ausgewählt werden. Kritische Prozessschritte bei der Herstellung von Formulierungen aus Peptiden oder Proteinen sind beispielsweise die Erhitzung bei Trocknungsprozessen oder auch die Trocknung allgemein, das Mischen, Rühren oder Schütteln von Proteinlösungen, die Zugabe von Hilfsstoffen (Salze, Puffer, Polymere, saure oder basische Stoffe etc.), Einwirkungen von Säuren oder Laugen (pH-Wert), Scherbeanspruchungen oder allgemein mechanische Beanspruchungen (Homogenisatoren, Mischer, Tablettenpressen, Extruder, Pumpen etc.) und auch die Einwirkung hoher Drücke. Grundsätzlich sollte die Kompatibilität mit den Hilfsstoffen und die Auswirkung jedes Prozessschrittes untersucht werden. Eine gute Kenntnis der Proteinstruktur und des Prozesses ist für eine Abschätzung der Stabilität im Vorhinein immer hilfreich. Als Faustregel gilt, dass Prozessschritte, die zu Produkttemperaturen oberhalb von 37 °C (Körpertemperatur) führen, bezüglich der Stabilität von Proteinen bereits als kritisch betrachtet werden müssen. Temperaturen oberhalb von 50 °C führen in aller Regel zur Denaturierung von Proteinen. Die Adsorption an Grenzflächen (Phasengrenzflächen in Emulsionen, Schläuche, Gefäße,

Reaktoren etc.) kann auch zu einem Verlust des Proteins aus einer Lösung oder zur Denaturierung führen³⁹.

1.4.2.2 Stabilität im Gastrointestinaltrakt

Wie bereits mehrfach erwähnt stellt das Milieu in unterschiedlichen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes eine der größten Hürden bei der peroralen Gabe von Peptidarzneistoffen dar⁴⁰. Der Verdauungsapparat ist geradezu darauf spezialisiert, Proteine und Peptide abzubauen. Die hoch aktiven eiweißverdauenden Enzyme, drastische pH Bedingungen, hohe Konzentrationen an Salzen und andere Nahrungsbestandteile führen zu Aktivitätsverlusten durch Veränderungen der Konformation oder gar durch Zersetzung der Moleküle.

Typischerweise besitzen Proteine die höchste Stabilität bei pH-Werten im Bereich ihres isoelektrischen Punktes (kurz: IEP). Die Nettoladung beträgt an diesem Punkt 0 und die gegensätzlich geladenen Gruppen tragen zur Stabilisierung der nativen Struktur bei³⁸. Der saure pH-Wert des Magens unterschreitet den IEP der meisten Proteine deutlich. Die Folge der Säureeinwirkung ist ein Funktionsverlust der Moleküle aufgrund einer Denaturierung. Das saure Milieu des Magens begünstigt außerdem die säurekatalysierte Deamidierung von Aminosäureresten (Glutamin, Asparagin).

Der Einfluss der gastrointestinalen Enzymausstattung auf peroral applizierte Peptidarzneistoffe wurde bereits in Abschnitt 1.3.2 „Barrieren der intestinalen Stoffaufnahme“ ausführlich beschrieben.

Grundvoraussetzung zur Beurteilung der Stabilität von Proteinen im Verdauungstrakt ist eine möglichst genaue Kenntnis der Molekülstruktur (Aminosäuresequenz, intramolekulare Bindungen, Disulfidbrückenbindungen, 3D-Struktur etc.) und des IEP. Mittlerweile existieren große und häufig frei zugängliche Datenbanken mit Informationen zu Proteinstrukturen. Im Folgenden sollen einige der bekanntesten Proteindatenbanken genannt werden: PDB (*Protein Databank Brookhaven*), SCOP (*structural classification of proteins*), CATH (*classification by class, architecture, topology and homology*) oder FSSP (*fold classification based on structure-structure alignments of proteins*). Sind keine Daten bezüglich der Proteinstruktur verfügbar, kann eine Aufklärung der Sequenz beispielsweise durch sequenzspezifische Spaltung der Proteine und Identifizierung der Bruchstücke mithilfe eines Massenspektrometers erfolgen. 3D-Strukturdaten können durch Kristallstrukturanalyse oder NMR-Spektroskopie gewonnen werden. Eine Vorhersage der Stabilität im Verdauungstrakt kann dann recht zuverlässig durch einen Abgleich der Proteinstruktur mit den typischen Spaltstellen der enteralen Peptidasen erfolgen. Werden dabei Stabilitätsprobleme identifiziert, müssen Maßnahmen zum Schutz der Wirkstoffe vor dem Milieu des Verdauungstraktes

getroffen werden. Unterschiedliche Möglichkeiten hierfür werden in Kapitel 1.6 genauer beschrieben.

1.5 Polymere zur peroralen Verabreichung

Die Anforderungen an eine Formulierung zur erfolgreichen Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit von Peptiden oder Proteinen sind vielfältig. Den pharmazeutischen Hilfsstoffen kommt hierbei eine wesentliche Bedeutung zu. Natürliche und synthetische Polymere erfüllen ganz spezifische Funktionen und werden seit vielen Jahren erfolgreich in der Pharmazie eingesetzt. Daher soll im folgenden Kapitel ein Überblick über peroral einsetzbare pharmazeutische Polymere gegeben werden.

1.5.1 Natürliche Polymere

- Alginsäure und Natriumalginat

Das Polysaccharid Alginsäure wird aus Braunalgen gewonnen und besteht aus 1,4-glycosidisch verknüpften Uronsäuremolekülen. Die wässrige Lösung des Natriumsalzes bildet nach Zusatz einer Ca^{2+} -Lösung ein hoch viskoses Gel. In der Pharmazie werden Alginat zur Stabilisierung von Emulsionen, zur Viskositätserhöhung oder als Bindemittel eingesetzt. J. D. Smart berichtete in 1982 über mukoadhäsive Eigenschaften von Natriumalginat⁴¹.

- Chitosan

Chitosan ist ein natürlich vorkommendes Polyaminosaccharid. Es wird durch partielle Deacetylierung von Chitin gewonnen und besteht wie dieses aus β -1,4-glycosidisch verknüpften N-Acetylglucosaminresten (siehe Abbildung 3). Das zur Herstellung von Chitosan verwendete Chitin wird überwiegend aus dem Panzer von Krustentieren wie Krabben oder Garnelen gewonnen.

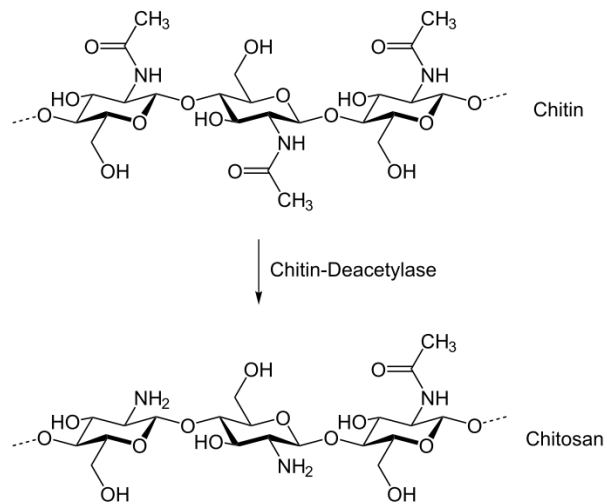


Abbildung 3 Herstellung von Chitosan durch enzymatische Deacetylierung von Chitin.

Chitosan ist in sehr unterschiedlichen Qualitäten kommerziell erhältlich. Die Unterschiede betreffen das Molekulargewicht (10 – 650 kDa), die Viskosität sowie den Deacetylierungsgrad (50-98%). In wässrigen Säuren unterhalb eines pH-Wertes von 6,4 ist Chitosan löslich und liegt als Polykation vor.

Chitosan ist biokompatibel und bioabbaubar und wird in der Lebensmittelindustrie und in der Pharmazie seit vielen Jahren eingesetzt. Aufgrund seiner bioadhäsiven Eigenschaften⁴² beschäftigt sich die pharmazeutische Forschung beispielsweise mit der Herstellung von Arzneistoffträgern aus Chitosan.

Außerdem besitzt Chitosan die Fähigkeit, die parazelluläre Permeabilität durch einen Caco-2 Monolayer (kultivierte menschliche Dickdarmkarzinomzellen) zu erhöhen⁴³. Ihm werden daher penetrationsfördernde Eigenschaften zugeschrieben. Dieser Effekt beruht darauf, dass Chitosan in der Lage ist, *Tight Junctions* von Darmepithelzellen vorübergehend zu öffnen⁴⁴. Hsu et al. versuchten den Mechanismus dieser Wirkung aufzuklären und fanden heraus, dass die Aktivierung von Integrinrezeptoren auf der Oberfläche der Zellmembran von Epithelzellen durch Chitosan eine Kaskade zur Störung des *Tight Junction*-Proteinkomplexes auslöst⁴⁵.

Weitere natürliche Polymere, die als pharmazeutische Hilfsstoffe Verwendung finden, sind Cellulose, Gelatine und Traganth. Cellulose und Traganth sind pflanzlicher Herkunft, während Gelatine ein Stoffgemisch aus tierischen Proteinen ist. Diese Hilfsstoffe werden für sehr vielfältige Zwecke eingesetzt. Besonders zu beachten ist, dass Smart und Kellaway bereits 1982 über mukoadäsive Eigenschaften von Traganth berichteten⁴¹.

1.5.2 Semi-synthetische Polymere

- Cellulosederivate

Die Carboxymethylcellulosen (kurz: CMC) sind Derivate der Cellulose, bei denen ein Teil der freien Hydroxygruppen mit Carboxymethyl-Resten verestert ist. CMC quillt in Wasser, ist aber nur in Laugen löslich während ihr Natriumsalz gut in Wasser löslich ist und mukoadhäsive Eigenschaften besitzt⁴².

Hydroxypropylmethylcellulose (kurz: HPMC) ist ein Gemisch aus Methyl- und Hydroxypropylethern der Cellulose. Sie wird in der Pharmazie als Feuchthaltemittel, Verdickungsmittel, Emulsionsstabilisator und für Tablettenüberzüge verwendet. Weitere Celluloseether wie Methylcellulose (kurz: MC) und Hydroxypropylcellulose (kurz: HPC) werden pharmazeutisch verwendet. In Tabletten verpresst bilden sie nach Kontakt mit Wasser Hydrokolloid-Matrixstrukturen aus, die eine kontrollierte Wirkstofffreigabe ermöglichen.

- Chitosanderivate

Die penetrationsfördernde und mukoadhäsive Wirkung von Chitosan beruht unter anderem auf elektrostatischen Wechselwirkungen der protonierten und positiv geladenen Aminogruppen mit negativ geladenen Molekülresten des Mukus und der *Tight Junctions*⁴⁶. Chitosan muss aus diesem Grund in gelöster und protonierter Form vorliegen, um seine Wirkung entfalten zu können. Als schwache Base ist dies jedoch nur im sauren Milieu der Fall, das im Gastrointestinaltrakt allenfalls im Magen vorliegt. Um eine pH-Wert unabhängige, permanente positive Ladung des Chitosans zu gewährleisten, wurden unterschiedliche quaternisierte Derivate wie beispielsweise N-Diethylmethylchitosan (DEMC), Triethylchitosan (TEC), Dimethylethylchitosan (DMEC) und N-Trimethylchitosanchlorid (TMC) hergestellt^{47,48,49}. Im Zusammenhang mit peroralem Peptid Delivery hat vor allem TMC vielversprechende Resultate gezeigt^{50,51}.

Die mukoadhäsive Eigenschaft von Chitosan konnte durch Thiolierung der Aminogruppen verstärkt werden⁵². Dieser Effekt beruht darauf, dass thiolierte Chitosanderivate, die sogenannten Thiomere, bei pH-Werten oberhalb von 5 in ihrer oxidierten Form vorliegen und somit besonders effektiv Disulfidbrückenbindungen zu Cystein-reichen Domänen der Glycoproteine des Muzins ausbilden können⁵³. Dank der ausgeprägten Mukoadhäsivität und der Fähigkeit der *in situ* Gelbildung im Darm kann die Verweilzeit von Arzneimitteln, die mit Thiomeren formuliert wurden, im Dünndarm deutlich erhöht werden. Die Verlängerung der Kontaktzeit des

Arzneistoffträgers mit der Darmmukosa führt zu höheren Konzentrationen schlecht permeabler Peptide oder Proteine in direkter Umgebung der Enterozyten. Dieser Effekt kann ebenfalls zur Resorptionserhöhung beitragen.

Ein weiterer nützlicher Effekt der Thiomere im Zusammenhang mit der peroralen Gabe von Peptiden oder Proteinen ist der verbesserte Schutz der empfindlichen Wirkstoffe gegen einen enzymatischen Abbau. Sie sind in der Lage Metalloproteasen zu inaktivieren, indem sie deren Metallionen durch Bildung von Chelatkomplexen entziehen⁵⁴.

1.5.3 Synthetische Polymere

- Polyacrylsäureester

Durch Polymerisation unterschiedlich substituierter Acrylsäuremonomere ist eine große Bandbreite an Polyacrylsäureestern mit ganz unterschiedlichen Funktionen herstellbar. Unter dem Handelsnamen Eudragit[®] vertreibt die Evonik Industries AG eine breite Produktpalette kommerziell erhältlicher und für die orale Anwendung zugelassener pharmazeutischer Polymere auf Polyacrylat Basis. Klassischer Weise werden die Eudragite als funktionale Überzugsmaterialien für Tabletten verwendet. Einige Produkttypen befinden sich bereits seit Mitte der 1950er Jahre auf dem Markt. Die Anwendungsmöglichkeiten sind je nach verwendetem Typ vielfältig: magensaftresistente Überzüge, Geschmacks- und Geruchsmaskierung, Überzüge mit Feuchtigkeitsschutz und kontrollierte Wirkstofffreisetzung mit gastrointestinalem Targeting. Die chemischen Strukturen der am häufigsten eingesetzten Eudragit[®] Polymere sind in Abbildung 4 dargestellt.

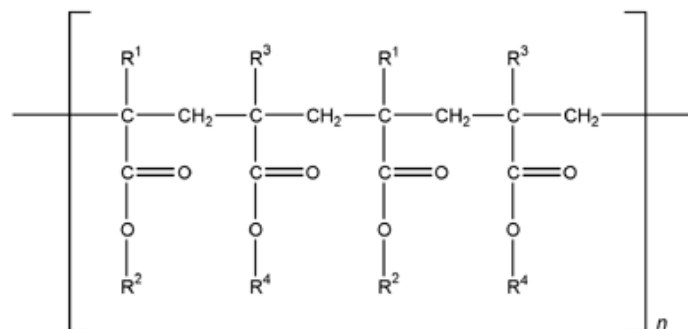


Abbildung 4 Grundstruktur der Eudragit[®] Polyacrylsäureester Produktfamilie.

$R_1 = -CH_3$, $R_2 = -H$ und $R_3 = -CH_3$, $R_4 = -CH_3$ (Eudragit[®] L und S);

$R_1 = -CH_3$, $R_2 = -H$ und $R_3 = -H$, $R_4 = -CH_2-CH_3$ (Eudragit[®] L100-55 und L30D-55);

$R_1 = -H$, $R_2 = -CH_2-CH_3$ und $R_3 = -CH_3$, $R_4 = -CH_3$ (Eudragit[®] NE30D);

$R_1 = -CH_3$, $R_2 = -CH_2CH_2N^+(CH_3)_3Cl^-$, $R_3 = -CH_3$, $R_4 = -CH_3$, $R_{1a} = -H$, $R_{2a} = -CH_2-CH_3$ (Eudragit[®] RL und RS)

Die Eudragit[®] Typen L, S und L-55 werden als magensaftresistente Überzüge verwendet, die sich erst bei höheren pH-Werten im Darm auflösen und den Wirkstoff gezielt in bestimmten Darmabschnitten freigeben. Die Typen NE, RL und RS sind im Darm unlöslich und eignen sich zur Modifizierung der Wirkstofffreisetzung (Retardierung, Verzögerung etc.). Eudragit[®] E wird als Schutzüberzug gegen Feuchtigkeit und zur Geschmacks- und Geruchsmaskierung eingesetzt und löst sich bereits im sauren Magensaft auf. Durch Mischung unterschiedlicher Eudragit[®]-Typen können ihre Eigenschaften ganz individuellen Anforderungen angepasst werden.

Die Eudragit[®] Polymere sind biokompatibel und bei oraler Einnahme nicht toxisch. Sie gelangen nicht in den systemischen Blutkreislauf und werden unverändert wieder ausgeschieden, da sie nicht vom Darm resorbiert werden.

- Polyacrylsäure

Hochmolekulare Polymere der Acrylsäure, auch als Carbomere bezeichnet, werden von der Lubrizol Corporation unter dem Handelsnamen Carbopol[®] vertrieben. Es sind unterschiedliche Typen in pharmazeutischer Qualität verfügbar, die sich in ihrem mittleren Molekulargewicht unterscheiden. Sie werden in der pharmazeutischen Technologie als Gelbildner, Feuchthaltemittel, zur Viskositäts- und als Bindemittel in Tabletten eingesetzt.

Polyacrylsäure besitzt mukoadhäsive Eigenschaften, die auf mechanischen, physikalischen und elektrostatischen Wechselwirkungen mit Mucinen beruhen.

- Polycarbophil

Polycarbophil besteht aus Polymerketten der Acrylsäure, die mit Divinylglycol quervernetzt wurden. Es ist nicht wasserlöslich, quillt aber unter Wasseraufnahme bis zum 1000 fachen seines ursprünglichen Volumens. Unter den pharmazeutisch verwendeten Polymeren zählt es zu denen mit der höchsten Mukoadhäsivität. Außerdem kann es die intestinale Resorption von Wirkstoffen erhöhen⁴².

- Polylactid (PLLA, PDLA) / Polylactid-co-Glycolid (PLGA) / Polycaprolacton (PCL) und Derivate

Die Polymere Polylactid (PLA), Polylactid-co-Glycolid (PLGA) und Poly-ε-Caprolacton (PCL) sind biokompatible und bioabbaubare Polyester, die in zahlreichen behördlich zugelassenen Arzneimitteln und Medizinprodukten enthalten sind¹²³. Da

ihre pharmazeutische Anwendung sehr sicher und toxikologisch unbedenklich ist, besitzen sie den GRAS Status (Generally recognized as safe) der Food and Drug Administration (kurz: FDA, Arzneimittelzulassungsbehörde der USA). Sie gehören zu den am meisten untersuchten Hilfsstoffen für die kontrollierte Wirkstofffreisetzung⁵⁵.

Alle drei Polymertypen können per Ringöffnungspolymerisation unter Verwendung unterschiedlicher Makroinitiatoren synthetisiert werden. Als Monomere für die Synthese von PLA und PLGA dienen nicht die Grundeinheiten Milchsäure und Glycolsäure, sondern deren cyclische Diester Lactid und Glycolid. Der Syntheseprozess ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt. Eine ausführliche Beschreibung der Polymersynthese wurde von Dieter Bendix im Jahre 1997 veröffentlicht⁵⁶, der seinerzeit Mitarbeiter der Boehringer Ingelheim AG war. Bis zur Übernahme der Resomer[®] Produktparte durch Evonik in 2011 wurden Polylactide für medizinische Anwendungen von Boehringer Ingelheim produziert.

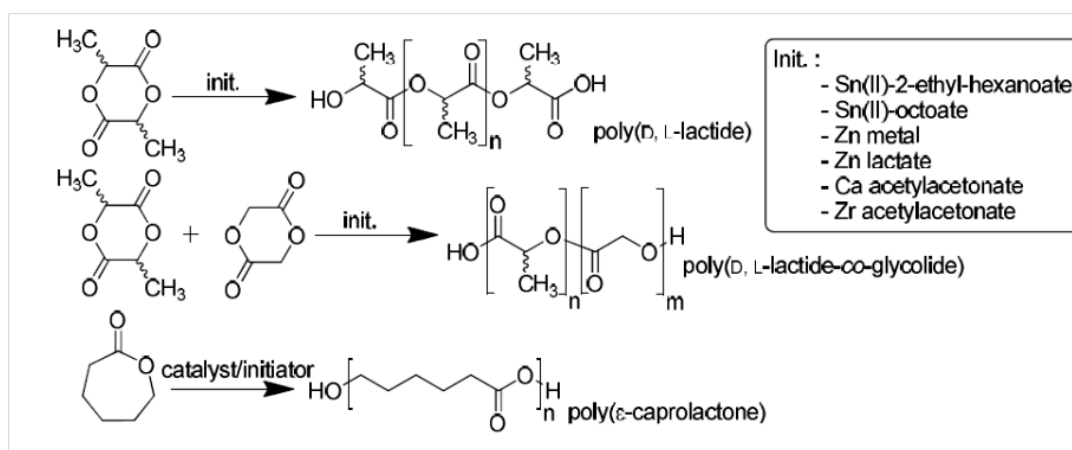


Abbildung 5 Schematische Darstellung der Synthese von PLA, PLGA und PCL per Ringöffnungspolymerisation⁵⁶.

Durch Variation der Kettenlänge, des Anteils der jeweiligen Isomere des Lactids (D- und L-Konformation), der Monomer-Anteile bei der Bildung von Copolymeren und durch Kombination der unterschiedlichen Monomere miteinander ist eine große Bandbreite an Polymeren und Copolymeren mit unterschiedlichen Eigenschaften herstellbar. Die Variation dieser Parameter bewirkt Veränderungen in der Kristallinität und der Hydrophilie der Polymere, was wiederum Auswirkungen auf die Verkapselungseffizienz und das Freisetzungsprofil von Wirkstoffen hat und die Abbaueiten im Organismus deutlich beeinflusst. Die Abbaubarkeit und die Hydrophilie der Polymere können weiterhin durch Bildung von Blockcopolymeren mit Polyethylenglycol (PEG)-Blöcken variiert werden.

PLA und PLGA Polymere in pharmazeutischer Qualität sind unter dem kommerziellen Namen Resomer[®] bekannt und werden heute von der Evonik Industries AG produziert und vertrieben.

Sie sind die am besten untersuchten Materialien zur Herstellung von partikulären Arzneistoffträgern zur kontrollierten Wirkstofffreigabe im nano- und mikroskaligen Größenbereich⁵⁷. Ihre hydrolytischen Abbauprodukte Milchsäure und Glycolsäure sind körpereigene Substanzen und werden daher auf natürlichem Weg ohne toxische Zwischenprodukte eliminiert⁵⁸. Da die Hydrolyse der Polyester durch Säure katalysiert wird, kann auch von einem autokatalytischen Abbau gesprochen werden. Dies ist bei PCL nicht der Fall, da bei dessen Hydrolyse keine sauren Abbauprodukte entstehen. Die Abbauzeiten von PCL sind daher im Vergleich zu denen der anderen beiden Polyester deutlich erhöht und können mehrere Jahre betragen. Bis zu einem Anteil von maximal 50% verringert sich die Abbauzeit von PLGA mit steigendem Glycolid-Anteil⁵⁹. Sie erhöht sich, wenn die Endgruppen durch Veresterung hydrophober gemacht werden. Weiterhin wird die Abbauzeit verlängert, wenn innerhalb des PLA Anteils der Anteil eines bestimmten Isomers überwiegt oder wenn er ausschließlich aus einem der beiden Isomere besteht⁶⁰. In diesem Fall können sich größere kristalline Bereiche ausbilden, was bei Verwendung des Racemats nicht möglich ist.

Die Mikroverkapselung von hydrophilen Wirkstoffen der BCS Klasse III hat sich mit PLA und PLGA Polymeren in der Vergangenheit häufig als schwierig erwiesen, da die Polymere aufgrund ihres hydrophoben Charakters eine relativ geringe Affinität zu hydrophilen Stoffen besitzen. Die Verkapselungseffizienz dieser Polymere für solche Wirkstoffe war dementsprechend stets relativ niedrig und die Freisetzungseigenschaften aufgrund starker Porenbildung eher unvorteilhaft⁶¹.

Mit dem Ziel die Verkapselungseffizienz zu erhöhen und günstigere Freisetzungprofile zu erzielen, stellten unterschiedliche Arbeitskreise diverse Derivate Polylactid-basierter Polymere mit stärker hydrophilen Eigenschaften her. Dazu wurde beispielsweise von Breitenbach et al. Polyvinylalkohol (kurz: PVA) mit PLA oder PLGA Polymerketten verestert, wobei PVA das Polymerrückrat bildete⁶². In einem weiteren Schritt wurden diese Polymere durch Anknüpfung von Diethylaminopropylamin (DEAPA) nochmals modifiziert⁶³. Auf diese Weise wurden sehr gut wasserlösliche amphiphile positiv geladene Polyelektrolyte erhalten, die sich nach einer gezielten Optimierung sehr gut zur Herstellung von Polyelektrolytkomplexen (PEC) mit Insulin eigneten. Der Beladungsgrad von Partikeln konnte durch Verwendung dieser Polyelektrolyte im Vergleich zu handelsüblichem PLGA deutlich erhöht werden⁶³. Ein weiterer Vorteil dieser

Polymere war, dass sich Nanopartikel bzw. PEC mit Insulin spontan aus wässrigen Lösungen bildeten, weshalb vollständig auf organische Lösungsmittel, die üblicherweise bei der Herstellung von Nanopartikeln benötigt werden, verzichtet werden konnte. Ein Nachteil dieser Polymere hinsichtlich einer breiten Anwendung ist jedoch, dass sie ganz speziell für den Wirkstoff Insulin konzipiert wurden. Die Verwertbarkeit für andere Peptide oder Proteine ist aufgrund dieser hoch spezifischen Ausrichtung voraussichtlich nicht gegeben.

1.6 Strategien zur Bioverfügbarkeitsverbesserung von Peptiden und Proteinen

Die Anfänge in der Entwicklung spezieller Formulierungen zur Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit von Peptiden und Proteinen reichen bis in die späten 1960er Jahre zurück, als Liposomen zur Verwendung als peroral applizierbare Arzneistoffträger für Proteine vorgestellt wurden⁶⁴. Während sich die Bemühungen der Formulierungsentwicklung zunächst im Wesentlichen auf Insulin konzentrierten, stieg der Bedarf an nicht invasiven Formulierungen für hydrophile Makromoleküle mit stetig wachsender Anzahl neu zugelassener Peptidarzneistoffe im Laufe der Zeit an. Die Zulassung neuer Substanzen schritt dabei deutlich schneller voran als die Entwicklung effektiver nichtinvasiver Formulierungen⁶⁵, sodass bis heute im Bereich der Formulierungsentwicklung für diese Substanzklasse ein immenser Nachholbedarf besteht.

Einige der bisher vielversprechendsten Ansätze zur Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit von Peptidarzneistoffen werden in den folgenden Abschnitten vorgestellt.

1.6.1 Chemische Modifikationen von Peptid- und Proteinarzneistoffen

Durch chemische Modifikationen endogener Peptide lassen sich häufig Verbesserungen der biopharmazeutischen Eigenschaften und der pharmakologischen Wirkung der Wirkstoffe erreichen. Die Möglichkeiten sind vielfältig und betreffen beispielsweise Veränderungen funktioneller Seitengruppen, den Austausch von Aminosäuren oder die Konjugation mit speziellen funktionalen Molekülen. Die Derivatisierung endständiger Aminogruppen, der Austausch von natürlich konfigurierten L- gegen D-Aminosäuren, die Zyklisierung von Peptiden und die Derivatisierung des C-Terminus sind einige der am häufigsten beschriebenen Modifikationsmöglichkeiten in diesem Zusammenhang⁶⁶. Beispielsweise wurde durch Deaminierung des Cysteins in Position 1 und den Austausch von L-Arginin an Position 8 durch seine D-Form die enzymatische Stabilität und die Membranpermeabilität des körpereigenen antidiuretischen Peptidhormones Vasopressin enorm erhöht. Durch den Einsatz der optimierten Struktur, die später unter dem Namen Desmopressin (DDAVP) zugelassen

wurde, konnte selbst nach Reduzierung der applizierten Menge auf unter 2% der sonst üblichen Dosis eine noch effektivere Wirkung als mit dem natürlichen Peptidhormon erzielt werden⁶⁷.

Morley et al. fanden heraus, dass durch Alkylierung des N-Terminus (Acetylierung oder Formylierung) Peptide oder Proteine vor einem Abbau durch Aminopeptidasen geschützt werden können⁶⁸.

Eine weitere Modifikation, die für eine Reihe von Peptidwirkstoffen deutliche Verbesserungen der biopharmazeutischen Eigenschaften mit sich brachte, stellt die Kopplung mit Polyethylenglycol (PEG) dar. Die Erkenntnis, dass die kovalente Kopplung von PEG-Ketten an Wirkstoffmoleküle zu einer höheren Stabilität gegenüber Proteasen, einer geringeren Immunogenität und einer verminderten renalen Ausscheidung führt, geht auf Arbeiten von Frank F. Davis und Abraham Abuchowski aus den 1970er Jahren zurück⁶⁹. Die Kopplung von Makromolekülen mit PEG wird auch als PEGylierung bezeichnet.

Neben Verbesserungen der Wirksamkeit und der Plasmahalbwertszeit sind außerdem Modifikationen bekannt, die eine Erhöhung der Permeabilität bewirken. Beispielsweise kann durch Konjugation von Peptidmolekülen mit Liganden, die Targets für eine rezeptorvermittelte Endozytose darstellen, die Permeabilität der Wirkstoffmoleküle durch die Darmepithelschicht erhöht werden^{70,71}. Ein Beispiel für diese Strategie stellt die Kopplung mit Transferrin dar. Schlecht permeable Moleküle werden nach Kopplung mit Transferrin durch Transferrin-Rezeptor-vermittelte Endozytose über die Darmschleimhaut aufgenommen. Shah et al. koppelten Transferrin über eine Disulfidbrücke an Insulin und untersuchten anschließend den Transport des Konjugates durch einen Monolayer von kultivierten Darmkrebszellen. Sie stellten dabei fest, dass der Transport des Transferrin-Insulin-Konjugates durch den Zell-Layer im Vergleich zu reinem Insulin um das 5- bis 15-Fache erhöht war⁷².

Als weitere Möglichkeit zur Permeabilitäts-erhöhung wurden hydrophobe Fettsäurereste an schlecht permeable Peptidmoleküle gekoppelt. Die Peptide werden auf diese Weise insgesamt hydrophober und können leichter durch Biomembranen hindurch diffundieren. Diese Strategie hat die Verbesserung des transzellulären Transportweges zum Ziel. Unterschiedliche Fettsäuren wie beispielsweise Palmitinsäure, Caprylsäure, Buttersäure oder Laurinsäure wurden mit Peptiden wie Desmopressin⁷³ oder Insulin⁷⁴ gekoppelt. Die Konjugate zeigten eine erhöhte Plasmahalbwertszeit, eine verbesserte Permeabilität und eine höhere enzymatische Stabilität gegenüber Proteasen.

Eine Möglichkeit zur Löslichkeitsverbesserung und zur Erleichterung des parazellulären Transportweges stellt die Bildung von Salzen oder die kovalente Kopplung mit hydrophilen Molekülresten dar.

Einige der beschriebenen chemischen Modifikationen waren für bestimmte Peptide sehr erfolgreich, sodass seit geraumer Zeit vielfältige Peptidanaloga mit verbesserten biopharmazeutischen Eigenschaften erfolgreich in der Arzneimitteltherapie eingesetzt werden (Minirin[®], Pegasys[®], Pegintron[®], Levemir[®], Lantus[®] etc.). Ein entscheidender Durchbruch in der Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit ist jedoch auch auf diesem Wege bislang nicht gelungen.

Ein grundsätzlicher Nachteil dieser Strategie ist, dass eine Übertragung der vielversprechendsten Konzepte auf die gesamte Stoffklasse der Peptide und Proteine nicht möglich ist, da Modifikationen der Molekülstruktur häufig zu einem Verlust der pharmakologischen Aktivität führen oder eine erhöhte Antigenität hervorrufen können. Aus diesem Grund muss jeder Arzneistoff jeweils für sich betrachtet optimiert werden. Erschwerend bezüglich regulatorischer Aspekte kommt hinzu, dass chemische Modifikationen bekannter und bereits zugelassener Peptidarzneistoffe zu einer neuen chemischen Identität führen (*new chemical entity*, NCE). Aus diesem Grund müssen die Peptidanaloga in der Regel erneut einer vollständigen toxikologischen und klinischen Prüfung unterzogen werden, bevor sie von den Arzneimittelbehörden zugelassen werden können.

1.6.2 Zellpenetrierende Peptide

Zellpenetrierende Peptide oder auch kurz CPPs genannt (*cell-penetrating peptides*) sind Peptide, die Zellmembranen effizient passieren können und daher häufig entgegen der eigentlichen Erwartung über eine hohe orale Bioverfügbarkeit verfügen. Die meisten der heute bekannten CPPs wie zum Beispiel das Tat Peptid⁷⁵ (*transactivator of transcription of HIV-1*), das Penetratin⁷⁶ (*Antennapedia* Protein der *Drosophila* Fliege), ein vom humanen Calcitonin abgeleitetes CPP⁷⁷ oder das hLF Peptidfragment⁷⁸ (Fragment des humanen Lactoferrin Proteins) sind natürlichen Ursprungs. Mithilfe von CPPs können andere Peptide, Proteine, Nucleinsäuren oder gar Nanopartikel in Zellen eingeschleust werden⁷⁹, indem diese entweder kovalent oder nicht kovalent mit dem CPP verknüpft werden. Da sich die CPPs in ihren Aminosäuresequenzen deutlich unterscheiden, wird derzeit davon ausgegangen, dass auch deren Aufnahmemechanismen unterschiedlich sind. Es gibt verschiedene Theorien zu den Wirkmechanismen, eine genaue Aufklärung ist jedoch bislang nicht gelungen. Einige CPPs sind überwiegend aus den basischen und unpolaren Aminosäuren Arginin, Lysin, Tryptophan, Leucin und Phenylalanin aufgebaut. Diese werden auch als polykationischer Typ bezeichnet. Das CPP mit dem einfachsten Aufbau innerhalb dieser Gruppe dürfte Polyarginin

sein, das aus 9 Arginin Molekülen besteht. Das von Duchardt et al. untersuchte aus 22 Aminosäuren bestehende hLF Fragment enthält lediglich 4 Arginin und 2 Lysin Moleküle. Besonders bemerkenswert in diesem Zusammenhang war die Entdeckung, dass die Effektivität dieses Peptids zum großen Teil von dessen Konformation und nicht ausschließlich von der Anzahl an basischen Aminosäuren abhängt. Die Auflösung der zyklischen Struktur durch Reduktion der intramolekularen Disulfidbrücke führte zu einem deutlichen Aktivitätsverlust des hLF Fragments⁷⁸. Bezüglich des Mechanismus gab es Hinweise, dass die Wirkmechanismen von hLF und Arginin-reichen CPPs trotz sehr unterschiedlicher Strukturen ähnlich sind (der Aufnahmeprozess konnte in beiden Fällen durch Rottlerin gehemmt werden)⁷⁸.

Eine weitere Gruppe innerhalb der CPPs stellt der amphipathische Typ dar, dessen Vertreter aus abwechselnd angeordneten polaren und unpolaren Aminosäuren aufgebaut sind.

Zellpenetrierende Peptide stellen eine vielversprechende Möglichkeit zur Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit von Peptidarzneistoffen dar und werden in der einschlägigen Fachliteratur regelmäßig in diesem Zusammenhang zitiert, sind jedoch bislang nicht ausreichend diesbezüglich untersucht worden, oder kamen aufgrund toxikologischer Bedenken⁸⁰ nicht in Frage.

1.6.3 Mukoadhäsion und Mukuspenetration

Unter dem Begriff Bioadhäsion versteht man allgemein die Fähigkeit natürlicher oder synthetischer Makromoleküle an biologischen Oberflächen in besonderem Maße zu haften⁸¹. Sofern es sich bei der biologischen Oberfläche um eine Schleimhaut handelt, spricht man von Mukoadhäsion, da die adhäsive Interaktion mit der biologischen Oberfläche in diesem Fall in erster Linie durch den Mukus zustande kommt. Die Untersuchung der adhäsiven Eigenschaften solcher Moleküle erfolgt dabei häufig in der makroskopischen Form von Filmen oder Partikeln. Mukuspenetration beschreibt die Fähigkeit von Stoffen oder Partikeln, in die Mukusschicht einzudringen oder durch sie hindurch zu wandern.

Im Zusammenhang mit der peroralen Gabe schlecht resorbierbarer Peptidarzneistoffe kann die Adhäsion an den intestinalen Mukus entweder eine Barriere oder aber auch einen Nutzen darstellen. Nach der Freisetzung eines Arzneistoffes im Darmlumen muss dieser zunächst die Mukusschicht durchdringen, um anschließend über die Epithelschicht in den Blutkreislauf aufgenommen werden zu können. Eine zu starke Interaktion des Wirkstoffs mit dem Mukus würde dazu führen, dass dieser nicht aufgenommen werden kann und im Zuge der Erneuerung des Mukus (*mucus turnover*) von der Darmwand abgestoßen wird. Von Nutzen kann das Phänomen der Mukoadhäsion allerdings dann sein, wenn der Formulierung mukoadhäsive Polymere zugesetzt werden, sodass die Arzneiform einen besonders intensiven Kontakt mit

der Darmwand herstellen kann und insgesamt länger im Darm verweilt. Dadurch besteht mehr Zeit zur Freisetzung und zur Resorption des Wirkstoffes. Da der Arzneistoff zudem besonders dicht am resorbierenden Epithel freigesetzt wird und lokal in höherer Konzentration vorliegt, kann er schneller aufgenommen werden und ist vor einem Abbau durch sezernierte Verdauungsenzyme weitgehend geschützt. Außerdem kann auf diese Art und Weise in der unmittelbaren Umgebung des Resorptionsortes ein optimales Mikroklima zur Verbesserung der Resorption geschaffen werden (pH-Bedingungen, Zusatz von Penetrationsbeschleunigern oder Enzyminhibitoren, die nur sehr lokal begrenzt wirken etc.). Diese Strategie ist vor allem durch die Formulierung mukoadhäsiver partikulärer Arzneistoffträger zu realisieren, worauf im weiteren Verlauf noch eingegangen wird.

1.6.3.1 Mechanismen der Mukoadhäsion

In der Fachliteratur werden unterschiedliche Mechanismen diskutiert, um das Phänomen der Mukoadhäsion zu erklären. Klar ist mittlerweile, dass mehrere Effekte synergistisch zu der adhäsiven Wirkung beitragen und dass der Prozess der Bioadhäsion sehr komplex ist.

Grundvoraussetzung für eine Interaktion zwischen dem Arzneimittel und der Mukusschicht ist zunächst eine gute Benetzbarkeit der Darreichungsform mit Mukus, damit ein enger Kontakt zur Oberfläche überhaupt erst hergestellt werden kann⁸². Nur dann können die adhäsiven Makromoleküle in das Gelnetzwerk des Mukus eindringen, um die bioadhäsiven Bindungen aufzubauen und zu manifestieren⁸³.

Ein Erklärungsansatz für die langen Verweilzeiten bestimmter Materialien im Mukus ist die tiefe Durchdringung und mechanische Verflechtung der Polymerketten mit den Glycoproteinketten der Mukusschicht^{83,84}. Zusätzlich kann die Adhäsion von Polymeren auf kovalenten oder nicht kovalenten Bindungen beruhen. Kovalente Bindungen sind in der Regel irreversibel. Sie können beispielsweise zwischen Thiolgruppen von Cystein-reichen Domänen der Glycoproteine der Mucine und thiolierten Polymeren in Form von Disulfidbrückenbindungen ausgebildet werden⁵³. Dieser Effekt wurde bereits in Abschnitt 1.5.2 für thioliertes Chitosan beschrieben und kann möglicherweise auch auf weitere thiolierte Polymere übertragen werden. Als nicht kovalente Bindungen zwischen Polymeren und dem Mukus kommen Wasserstoffbrückenbindungen, van-der-Waals Kräfte oder hydrophobe Wechselwirkungen in Frage⁸⁵. Polymere mit vielen Hydroxyl- oder Carboxylgruppen besitzen sehr gute Möglichkeiten Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden und zeigen daher häufig starke mukoadhäsive Eigenschaften (Polyacrylsäure, Hyaluronsäure, Cellulose etc.). Da die Enden der Glycosidketten der Mucine häufig mit Sialinsäuren oder Sulfatgruppen versehen sind, besteht im Mukus ein Überschuss an negativen Ladungen. Aus diesem Grund interagieren positiv geladene Polymere häufig besonders stark mit der Mukusschicht. Für

Chitosan wurde bereits beschrieben, dass die positiv geladene Form deutlich stärker mukoadhäsiv ist als das neutrale Polymer^{46,50}.

Sehr viele Polymere besitzen in nichthydratisierter und pulverförmiger Form die Fähigkeit an einer feuchten Schleimhaut zu haften. Dies ist durch eine starke Wasseraufnahme und dadurch bedingte Quellung der Polymere zu erklären, wodurch ein besonders enger Kontakt zur stark wasserhaltigen Mukusschicht hergestellt wird⁸⁶. Das ausschließlich aufgrund einer starken Quellung bedingte Anhaften von Stoffen am Mukus wird im Allgemeinen jedoch nicht als Mukoadhäsion bezeichnet⁸⁶. Dennoch ist zu erwarten, dass dieser Effekt zum Aufbau spezifischer Bindungen mit Mukus positiv beiträgt, vor allem vor dem Hintergrund, dass sehr viele mukoadhäsive Polymere ein hohes Wasseraufnahmevermögen besitzen.

Es ist naheliegend, dass das Phänomen der Mukoadhäsion nicht durch einen einzigen Mechanismus beschrieben werden kann, sondern vielmehr auf einem Zusammenspiel der hier beschriebenen Mechanismen beruht.

1.6.3.2 Mukoadhäsive Polymere

Den folgenden Polymeren werden in der Fachliteratur häufig mukoadhäsive Eigenschaften zugeschrieben: Polyacrylsäure und Derivate, Natriumalginat, Cellulose und Derivate, Tragant, Polyethylenglycol, Gelatine, Stärke und Derivate, Thiomere (Chitosan-Cystein, Chitosan-Thioglycolsäure, Polycarbophil-Cysteinamin, Polycarbophil-Cystein, Carboxymethylcellulose-Cystein, Polyacrylsäure-Homocystein, Alginat-Cystein etc.)⁵², Poly(hydroxyethylmethacrylat), Pectin, Gummi arabicum, Polyvinylalkohol und Hyaluronsäure. Diese Auflistung ist nur beispielhaft und nicht erschöpfend.

1.6.3.3 Mukoadhäsive partikuläre Trägersysteme

Es ist allgemein bekannt, dass kleine Partikel besser an Oberflächen haften als große Partikel. Daher untersuchten Lamprecht et al. mukoadhäsive Eigenschaften von Partikeln in Abhängigkeit der Partikelgröße genauer. Getestet wurden Polystyrenpartikel mit einem mittleren Partikeldurchmesser von 0,1 µm, 1,0 µm und 10,0 µm. Sie fanden heraus, dass Partikel mit einem mittleren Durchmesser von 0,1 µm stärker am intestinalen Mukus haften als Partikel mit einem mittleren Durchmesser von 1 µm. Am geringsten ausgeprägt waren die mukoadhäsiven Eigenschaften der Partikel mit einem Durchmesser von 10 µm⁸⁷. Die Untersuchungen von Lamprecht et al. wurden allerdings an entzündetem Dickdarmgewebe durchgeführt, weshalb die Ergebnisse möglicherweise nicht ohne weiteres auf den Mukus des gesunden Dünndarmepithels übertragen werden können.

Studien von Ponchel et al. führten allerdings zu ähnlichen Ergebnissen. Untersucht wurden die mukoadhäsiven Eigenschaften von Polystyren- und Polyisobutylcyanoacrylatpartikeln in Abhängigkeit der Partikelgröße. Durch die Aufzeichnung und Interpretation von Absorptionsisothermen konnten sie zwischen einer reinen Adsorption der Partikel auf der Oberfläche des Mukus und einer tieferen Penetration in die Mukusschicht hinein unterscheiden. Partikel mit einer Größe von weniger als 1 µm wurden vom Mukus absorbiert, wohingegen Partikel mit einer Größe von mehr als 2 µm lediglich einen Monolayer auf der Oberfläche des Mukus bildeten und nicht aufgenommen wurden⁸⁸. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass kleine Partikel tiefer in das Netzwerk der Mucinketten einzudringen vermögen als große Partikel und dass Nanopartikel bereits rein aufgrund ihrer geringen Größe verstärkt in die Mukusschicht hinein penetrieren können.

Die adhäsiven Effekte einer partikulären Darreichungsform können weiter verstärkt werden, indem partikuläre Arzneistoffträger aus mukoadhäsiven Polymeren wie beispielsweise Thiomeren hergestellt werden⁸⁹. Solche Arzneistoffträger lassen sich mit Peptiden beladen und können zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit beitragen⁸⁹.

1.6.4 Schutz des Wirkstoffes vor Abbau durch Verdauungssäfte

Zum Schutz labiler Arzneistoffe vor dem sauren und pepsinhaltigen Magensaft werden seit vielen Jahren erfolgreich magensaftresistente Polymere wie beispielsweise diverse Eudragit[®] Typen eingesetzt. Diese eignen sich hervorragend als Überzugsmaterial für Tabletten, Pellets oder Kapseln und schützen den Inhalt zuverlässig vor der Magensäure, indem sie sich erst bei höheren pH-Werten in späteren Darmabschnitten auflösen und den Inhalt dort freigeben. Dieser Schutz reicht jedoch für Peptide und Proteine oft nicht aus, da diese auch von Verdauungsenzymen angegriffen werden, die im Dünndarm und auch im Dickdarm aktiv sind. Viel diskutiert wurde in diesem Zusammenhang die Koadministration von Proteaseinhibitoren wie beispielsweise Bacitracin, Aprotinin, Kunitz und Bowman-Birk (BBI) Trypsin und Chymotrypsin Inhibitor aus Sojabohnen, Amastatin oder Thiorphan, um Peptidarzneistoffe vor einem Abbau durch sezernierte oder membrangebundene Peptidasen zu schützen²². Diese Strategie wird jedoch aufgrund erheblicher Nebenwirkungen vor allem bei der Langzeitanwendung inzwischen als hoch bedenklich angesehen, weniger aufgrund systemischer Nebenwirkungen, sondern mehr aufgrund von unerwünschten Wirkungen, die aus der Hemmung der Verdauungsenzyme selbst resultieren. Die Hemmung von Proteinverdauenden Enzymen führt zu einer reduzierten Verwertung und Aufnahme von Aminosäuren aus Nahrungseiweißen. Dies wiederum löst einen Rückkopplungseffekt aus, der eine erhöhte Produktion und Sekretion der gehemmten Verdauungsenzyme bewirkt. Infolgedessen entwickelt sich eine Hypertrophie als auch eine Hyperplasie der Bauchspeicheldrüse, die mit einem erhöhten Krebsrisiko einhergehen kann²². Um diesen

Feedbackmechanismus zu reduzieren, wurde vorgeschlagen, Proteaseinhibitoren so zu formulieren, dass sie nur in der unmittelbaren Umgebung des freigesetzten Peptidarzneistoffes wirken können. Eine solche künstliche Mikroumgebung am Ort der Freigabe und Resorption des Wirkstoffes könnte wie bereits beschrieben beispielsweise durch den Einsatz mukoadhäsiver Trägersysteme realisiert werden. Im Optimalfall werden für die Formulierung eines solchen Systems Polymere verwendet, die zugleich mukoadhäsiv und enzymhemmend wirken. Diverse thiolierte Chitosanderivate, die bereits in Abschnitt 1.5.2 genauer beschrieben wurden, besitzen beide Eigenschaften.

Ein zuverlässiger Schutz vor Verdauungsenzymen und dem sauren Magensaft kann durch Verkapselung der Peptidarzneistoffe in nanopartikuläre bioabbaubare Polymere auch sicher und ohne Nebenwirkungen koapplizierter Enzyminhibitoren erfolgen. Die Arzneistoffträger schleusen den Wirkstoff effizient in die Darmepithelzellen ein und setzen diesen erst nach der Überwindung der enzymatischen Barriere des Verdauungstraktes wieder frei. In diesem Fall wird kein Zusatz von Enzyminhibitoren benötigt. Simon et al. zeigten, dass Insulin durch Einbettung in nanopartikuläre Polyelektrolytkomplexe effektiv vor einem Abbau durch Trypsin geschützt werden konnte⁹⁰. Diese Strategie wird im letzten Abschnitt dieses Kapitels genauer beschrieben.

1.6.5 Penetrationsförderer

Eine weitere viel beschriebene Strategie zur Erhöhung der oralen Bioverfügbarkeit von Proteinen durch Verbesserung der intestinalen Resorption ist die Koapplikation von penetrationsfördernden Substanzen⁹¹. So unterschiedlich die Strukturen dieser Substanzen sind, so unterschiedlich sind auch deren Wirkmechanismen. Prinzipiell kann eine penetrationsfördernde Wirkung auf parazellulärem Weg durch reversible oder irreversible Öffnung der *Tight Junctions* oder auf transzellulärem Weg durch Störung der Membranintegrität bzw. durch rezeptorvermittelte Endozytose erzielt werden. Bekannt ist beispielsweise, dass durch eine Komplexierung von Ca^{2+} -Ionen die parazelluläre Aufnahme verstärkt werden kann⁹². Die extrazelluläre Verarmung an Ca^{2+} -Ionen führt zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), die wiederum an der Signaltransduktion zur Steuerung des *Tight Junction*-Proteinkomplexes beteiligt ist.

Weiterhin kann durch Herabsetzung der Viskosität des Mukus beispielsweise mithilfe von N-Acetylcystein (NAC), das mukolytisch wirkt, die Permeation von Arzneistoffen durch die Muzinschicht hindurch erleichtert werden⁹³. Da diese Barriere für beide Transportwege zunächst überwunden werden muss, kann N-Acetylcystein unabhängig vom jeweiligen Aufnahmemechanismus die Resorption von Arzneistoffen verstärken.

Einige der am häufigsten zitierten penetrationsfördernden Substanzen wurden in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4 Penetrationsförderer nach Substanzklasse geordnet mit Wirkmechanismus; modifiziert nach Schäfer⁹⁴.

Klasse	Beispiele	Wirkmechanismen
Komplexbildner	EDTA, Salicylate, Cyclodextrine, Polyacrylsäure, Zitronensäure	Parazellulärer Transport ↑ Stabilisierung des Wirkstoffes ↑
Tenside	Natriumlaurylsulfat (SDS), PEG-9-laurylether, Lysophospholipide, Cetyltrimethylammoniumbromid, Triton-X-100	Transzellulärer Transport ↑ Solubilisierung des Wirkstoffes ↑
Gallensalze und Derivate	Na-Desoxycholat, Na-Glykocholat, Na-Taurocholat, Na-Taurodihydrofusidat, Na-Glykodihydrofusidat	Solubilisierung des Wirkstoffes ↑ Viskosität der Mukusschicht ↓ Enzymatischer Abbau ↓ Transzellulärer Transport ↑
Fettsäuren und Derivate	Ölsäure, Caprylsäure, Caprinsäure, Laurinsäure, Mono- und Diglyceride, Acylcarnitine, Acylcholine, Isopropylmyristat	Transzellulärer Transport ↑ Parazellulärer Transport ↑ Solubilisierung des Wirkstoffes ↑

Die Anwendung dieser Substanzen zur Penetrationsförderung sollte grundsätzlich nur nach sorgfältiger Nutzen-Risiko-Abwägung erfolgen, da einige der zitierten Stoffe bei einer regelmäßigen Anwendung ernstzunehmende Gewebeschädigungen hervorrufen können⁹⁵.

1.6.6 Nanoskalige Wirkstoffträger

In der Fachliteratur werden unterschiedliche Definitionen für den Begriff Nanopartikel zugrunde gelegt. Die am weitesten gefasste Definition beinhaltet alle Partikel mit einem Durchmesser unterhalb eines Mikrometers⁹⁶, während andere Quellen den Bereich auf Partikelgrößen zwischen 1 nm bis ca. 100 nm eingrenzen⁹⁷. Dass die Verwendung von Polymernanopartikeln als Arzneistoffträger Vorteile für die perorale Applikation von Peptid- und Proteinanzneistoffen bringt, wurde bereits gegen Ende der 1980er Jahre von Damgé et al. gezeigt⁹⁸. Diabetische Ratten konnten durch die perorale Gabe Insulin-beladener Polyalkylcyanoacrylat Nanopartikel erfolgreich therapiert werden. Im Gegensatz zur peroral applizierten Insulin-Lösung, die nahezu keine Wirksamkeit zeigte, konnte mithilfe der Nanoformulierung der Blutzuckerspiegel um 50 bis 60% gesenkt werden.

Dass nanopartikuläre Trägersysteme in Fachkreisen als äußerst vielversprechend hinsichtlich der peroralen Gabe von Peptiden oder Proteinen bewertet werden, zeigt die hohe Zahl einschlägiger Veröffentlichungen in diesem Bereich⁹⁹. In den Jahren 2008 bis 2012 hatten 35% aller wissenschaftlichen Veröffentlichungen im Bereich orales *Peptid Delivery* einen nanotechnologischen Ansatz zum Thema¹⁰⁰.

Nanopartikel bieten hinsichtlich der peroralen Gabe von Peptidarzneistoffen mehrere Vorteile. Sie schützen die labilen Substanzen vor einem Abbau durch Verdauungsenzyme und können dazu verwendet werden auch schlecht permeable hydrophile Makromoleküle unbeschadet über die epitheliale Barriere zu transportieren⁹⁶. Die verzögerte Freisetzung der Wirkstoffe aus den Partikeln erfolgt durch Abbau der Polymere im zentralen Kompartiment⁹¹. Aus diesem Grund eignen sich ausschließlich bioabbaubare und untoxische Polymere als nanoskalige Arzneistoffträger. Mikropartikel hingegen können nicht resorbiert werden und bieten daher auch keinen ausreichenden Schutz vor einem enzymatischen Abbau labiler Wirkstoffe. Der Arzneistoff muss wie bei allen herkömmlichen peroralen Darreichungsformen auch zunächst im Lumen freigesetzt werden, bevor er absorbiert werden kann. Weiterhin wurde bereits darauf hingewiesen, dass Nanopartikel leichter in die Mukusschicht eindringen können als Mikropartikel⁸⁸. Diesen Effekt kann man sich zunutze machen, um Arzneistoffe effektiv durch die Mukusschicht hindurch zum Epithel zu transportieren.

Aus den genannten Gründen tragen Nanopartikel zur Überwindung der wesentlichen intestinalen Barrieren für die Aufnahme peroral applizierter Peptidarzneistoffe bei und bieten somit ein hohes Potential zur Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit dieser Substanzklasse.

Die Diskussion der für eine intestinale Resorption optimalen Partikelgröße erfolgt in der Einleitung zu Kapitel 4 dieser Arbeit.

Teils subjektive Bedenken der pharmazeutischen Hersteller bezüglich toxikologischer Fragestellungen und ein Mangel an gut reproduzierbaren und für eine industrielle Produktion geeigneten Herstellungsmethoden verhinderten bislang den Durchbruch der Nanotechnologie in der Medizin.

1.6.7 Diskussion – Strategien zur Bioverfügbarkeitsverbesserung

Isoliert gesehen brachten die in diesem Kapitel vorgestellten Strategien meist lediglich geringfügige Verbesserungen der oralen Bioverfügbarkeit. Erhebliche Fortschritte auf diesem Gebiet werden daher nur möglich sein, wenn mehrere dieser Konzepte bei der Entwicklung einer Formulierung gleichzeitig Anwendung finden. Dies setzt wiederum eine enge Zusammenarbeit von Spezialisten vielfältiger wissenschaftlicher Disziplinen wie beispielsweise der Chemie, der Molekularbiologie, der Medizin oder der Pharmazie voraus. Ein spezialisiertes Wissen in allen diesen Bereichen steht den innovativen Pharmaunternehmen meist jedoch nicht oder zumindest nicht schnell abrufbar zur Verfügung und die Zusammenstellung von Teams mit interdisziplinären Spezialisten und die Entwicklung hoch komplexer galenischer Formulierungen erfordert in der Regel viel Zeit und

verursacht mitunter hohe Kosten. Beides steht den Interessen der Pharmaunternehmen entgegen, mit neuen Wirkstoffen möglichst schnell und ohne zusätzliche Entwicklungskosten in die klinische Erprobung zu gehen. Zugunsten eines möglichst schnellen Marktzuganges wird aus diesem Grund häufig auf altbewährte und oft suboptimale Formulierungen zurückgegriffen.

Um zukünftig tatsächlich bedeutende Erfolge auf dem Gebiet der Bioverfügbarkeitsverbesserung von Peptiden und Proteinen zu erzielen, ist eine enge Zusammenarbeit von Industrie und Forschungsinstituten unabdingbar. Die Rahmenbedingungen für eine solche interdisziplinäre Zusammenarbeit im Bereich der Grundlagenforschung können beispielsweise durch staatlich aufgelegte Förderprogramme geschaffen werden.

So wurde die vorliegende Arbeit im Rahmen des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Verbundprojektes „PeTrA - Plattform für effizienten epithelialen Transport für pharmazeutische Applikationen durch innovative partikuläre Trägersysteme“ angefertigt. Die Förderung zum Thema „Effizienter Wirkstofftransport in biologischen Systemen – BioMatVital: BioTransporter“ erfolgte innerhalb des Förderprogramms „Werkstoffinnovationen für Industrie und Gesellschaft – WING“.

2 Zielsetzung der Dissertation

Ziel dieser Dissertation ist die Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit von Peptidwirkstoffen mithilfe spezieller galenischer Formulierungen mit neu entwickelten funktionalen Hilfsstoffen. Unter Berücksichtigung des Stands der Technik wurde als zu verfolgende Strategie die Verwendung biokompatibler Polymernanopartikel als Arzneistoffträger ausgewählt. Der eingekapselte Wirkstoff soll somit vor einem Abbau durch Verdauungsenzyme geschützt werden und die Partikel sollen aufgrund ihrer geringen Größe zu einem verbesserten Transport über das Darmepithel beitragen⁹⁶. Auf diese Weise sollen die bedeutendsten Barrieren für eine effiziente intestinale Resorption von Peptiden und Proteinen, der Abbau der Wirkstoffe durch Verdauungsenzyme und die geringe Permeabilität durch das Darmepithel, überwunden werden.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Entwicklung und Charakterisierung polymerer Partikelformulierungen, die zunächst aus handelsüblichen PLGA Polymeren und anschließend aus neuen Biopolymeren hergestellt werden sollen. Ziel der Verwendung dieser neuen Polymere ist die Verbesserung der Verkapselungseffizienz für hydrophile Peptidwirkstoffe sowie die Einführung spezifischer Funktionalitäten hinsichtlich der Freisetzungseigenschaften und einer Verbesserung der intestinalen Arzneistoffresorption. Eine möglichst hohe Bandbreite unterschiedlicher Funktionalitäten soll dadurch ermöglicht werden, dass die funktionstragenden Bausteine im Polymer variabel sind.

Die Herstellung wirkstoffbeladener Nanopartikel aus den neuen Polymeren soll durch Anpassung literaturbekannter Methoden oder durch Entwicklung neuer Herstellungsmethoden realisiert werden. Besonders zu berücksichtigen ist hierbei, dass die Methoden für labile Protein- und Peptidwirkstoffe geeignet sein müssen, weshalb ausschließlich entsprechend materialschonende Prozessschritte in Frage kommen. Bei der Entwicklung der Herstellungsmethoden soll zudem ein besonderes Augenmerk auf deren Übertragbarkeit auf industrielle Produktionsmaßstäbe gelegt werden. Ziel ist es mindestens eine innovative und industriell attraktive Methode zur Herstellung von Polymernanopartikeln in größeren Maßstäben zu entwickeln.

Durch Analyse der Fachliteratur unter Einbeziehung toxikologischer Fragestellungen wurde die für das Vorhaben geeignete Partikelgröße auf einen Bereich zwischen 200 nm und 500 nm eingegrenzt. Nicht zuletzt auch um nano-spezifische toxische Wirkungen der Formulierungen ausschließen zu können, muss eine Partikelherstellungsmethode bereitgestellt werden, die eine möglichst exakte und gut reproduzierbare Einstellung der Partikelgröße innerhalb dieses Zielbereiches mit möglichst enger Partikelgrößenverteilung erlaubt. Dies stellt eines der wichtigsten Ziele dieser Arbeit dar. Um dieses Ziel zu erreichen, sollen unterschiedliche Geräte und Methodenvarianten evaluiert werden. Die Stabilität der Formulierungen soll durch Trocknung der Partikelsuspensionen gewährleistet werden. Dazu sollen unterschiedliche Trocknungsmethoden hinsichtlich einer vollständigen Redispersierbarkeit der Nanopartikel in wässrigen Medien evaluiert und optimiert werden.

Die hergestellten und optimierten Partikelformulierungen sollen schließlich mithilfe unterschiedlicher *in vitro*-Tests mit Zellkulturen charakterisiert werden, wobei lediglich die Auswertung und Interpretation der Daten, nicht jedoch die Etablierung und Durchführung dieser Tests Bestandteil dieser Arbeit sind. Gleichmaßen verhält es sich mit den *in vivo*-Bioverfügbarkeitsstudien am Tiermodell, die schließlich das wichtigste Instrument zur Erfolgsbeurteilung des Vorhabens darstellen werden. Hierbei ist speziell zu beurteilen, ob die Formulierungen mit den neu entwickelten Biopolymeren Vorteile gegenüber der Verwendung handelsüblicher bioabbaubarer Polyester mit sich bringen. Zudem sollen die hergestellten Formulierungen bezüglich ihrer Bioverfügbarkeit im Vergleich zu einer zugelassenen und aktuell auf dem Markt befindlichen peroralen Darreichungsform des gleichen Modellpeptids beurteilt werden. Als Modellpeptid zur Untersuchung der oralen Bioverfügbarkeit wird Desmopressin ausgewählt.

3 Materialien

3.1 Bioabbaubare Polyester als Arzneistoffträger

In der vorliegenden Arbeit wurden bioabbaubare Polyester auf Basis von Polylactid und Polyglycolid als Arzneistoffträger verwendet. Da ihre Anwendung auch bei regelmäßiger Einnahme als sehr sicher gilt, wurden PLGA Polymere von der FDA zur Verwendung als Hilfsstoffe in Arzneimitteln zugelassen¹²³. Zudem liegt in der Fachliteratur ein großer Erfahrungsschatz bezüglich der Mikroverkapselung von Wirkstoffen mit diesen Polymeren vor, auf den bei der Methodenentwicklung zurückgegriffen werden konnte. Eine Veröffentlichung von Makadia et al. gibt einen guten Überblick über einige der am häufigsten angewendeten Verkapselungsmethoden von Wirkstoffen in PLGA¹²³. Da es bei der peroralen Einnahme von Nanopartikeln zu einer systemischen Aufnahme der Trägerpolymere kommen kann, stellt die Bioabbaubarkeit der verwendeten Materialien eine wichtige Grundvoraussetzung bei der Auswahl der Materialien dar¹⁰¹.

Zur Erstellung einer Referenzformulierung und zur Methodenentwicklung wurde mit den in Tabelle 5 aufgelisteten handelsüblichen PLGA Polymeren gearbeitet.

Tabelle 5 PLGA Polymere für die Formulierung von wirkstoffbeladenen Nanopartikeln; Quellen: 1: Produktbroschüre von Sigma Aldrich „RESOMER® Biodegradable Polymers for Medical Device Applications Research“ und 2: Middleton et al. 1998¹⁰².

PLGA Typ	MW ¹ [g/mol]	Glycolid-Anteil ¹	Abbauzeit ²	Endgruppe ¹
Resomer® RG 503 H	24.000 – 38.000	50%	1-2 Monate	Carboxyl
Resomer® RG 753 H	22.000 – 36.000	25%	4-5 Monate	Carboxyl
Resomer® RG 752 H	4.000 – 15.000	25%	4-5 Monate	Carboxyl
Resomer® RG 858 S	190.000 – 240.000	15%	5-6 Monate	Ester

Die verwendeten Resomer® Polymere wurden von der Evonik Industries AG in Darmstadt zur Verfügung gestellt.

Um eine höhere Beladungskapazität der Arzneistoffträger mit Peptiden oder Proteinen zu erzielen und um die Möglichkeit für spezifische Funktionalisierungen der Trägerstoffe zu schaffen, wurden ausgehend von der Struktur handelsüblicher PLGA Polymere neue Polymere synthetisiert. Die neuen Polymere werden in Kapitel 3.2 vorgestellt.

3.2 Neue Polyesteramid Polymere zur Bioverfügbarkeitserhöhung

Die Anforderungen an *Drug Delivery* Systeme zur Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit von Peptiden und Proteinen sind sehr hoch und mit den etablierten pharmazeutischen Hilfsstoffen kaum zu erfüllen. Der technologische Entwicklungsstand der derzeit in zugelassenen Arzneimitteln enthaltenen Hilfsstoffe liegt inzwischen weit hinter dem der aktuellen Forschung zurück. Aufwendige toxikologische Untersuchungen machen die Zulassung neuer Materialien für pharmazeutische Anwendungen extrem teuer und so wird in der Regel auf Altbewährtes zurückgegriffen. Dieser Rückgriff auf altbewährte Materialien hat durchaus Vorteile hinsichtlich regulatorischer Aspekte und Produktionskosten, allerdings sind die Möglichkeiten durch rationale Formulierung und Kombination etablierter Hilfsstoffe bald erschöpft und größere Innovationen auf dem Gebiet der Formulierungsentwicklung sind auf diesem Weg nur noch schwer zu erreichen.

Um der geschilderten Innovationsträgheit in der Entwicklung neuer pharmazeutischer Hilfsstoffe entgegen zu wirken, wurden im Zuge eines BMBF Förderprojektes, das von der Evonik Industries AG koordiniert wurde, neue Polymere für pharmazeutische Anwendungen synthetisiert. Die Entwicklung und Herstellung dieser neuen Polyesteramid Polymere (kurz: PEA) erfolgte in enger Zusammenarbeit der beiden Projektpartner Evonik Industries AG und der Universität Jena. Die Monomere wurden von Evonik hergestellt, die Polymerisation und die Entschützung der Polymere erfolgten an der Universität Jena. Die Entwicklung und Herstellung von peroralen Formulierungen zur Bioverfügbarkeitsverbesserung von Peptiden und Proteinen aus den neuen Polymeren war Aufgabe der Universität des Saarlandes und ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Die Universität des Saarlandes hat bereits bei der Konzeption der neuen Polymere beratend mitgewirkt.

3.2.1 Konzeption der neuen Trägermaterialien

Die Synthese der neuen Trägermaterialien erfolgte nach dem Vorbild der handelsüblichen PLGA Polymere mit Polylactid und Polyglycolid als Hauptbestandteile. Auf diese Weise sollte die Bioabbaubarkeit und Biokompatibilität der neuen Materialien sichergestellt werden. Um eine größere Variationsbandbreite der physikochemischen Polymereigenschaften sowie spezifische Funktionalisierungen zu ermöglichen, wurde ein weiterer chemischer Baustein gesucht, der nach Möglichkeit relativ flexibel austauschbar sein sollte. Aus toxikologischen Überlegungen heraus sollte dieser Baustein der Natur entstammen. Also lag es nahe, sich am Baukastenprinzip der natürlichen Proteine zu orientieren und proteinogene Aminosäuren zu verwenden und diese entsprechend der natürlichen Bindungsart peptidisch in das Polymer einzubauen. Dabei wurde durch den Syntheseweg sichergestellt, dass keine Blöcke mit Polyaminosäuren im Polymerrückrat entstehen konnten, die toxikologisch bedenklich wären,

sondern nur einzelne Moleküle statistisch verteilt eingebaut wurden. Da die Monomereinheiten in den Polymerketten chemisch gesehen teilweise durch Esterbindungen und teilweise durch Amidbindungen miteinander verknüpft sind, werden die Vertreter dieser Polymerklasse auch als Polyesteramide (PEA) bezeichnet.

Die wesentlichen Anforderungen an die neuen Polyesteramide waren eine hohe Verkapselungseffizienz für Peptide und Proteine, die Möglichkeit vielfältiger Funktionalisierungen, die Formulierbarkeit von Nanopartikeln sowie deren toxikologische Unbedenklichkeit.

3.2.2 Herstellung der Polyesteramide

Zunächst mussten Monomere mit Aminosäuren hergestellt werden, die sich in den Polymerisationsprozess der PLGA Synthese (siehe Abbildung 5 in Kapitel 1.5.3) integrieren ließen. Dabei war sicherzustellen, dass der variable Aminosäurerest nach der Polymerisation als freie Seitengruppe am Polymerrückrat vorliegt. Optimal erschien hier die Verwendung von Morpholin-2,5-dionen, die nach Literaturvorbild mit unterschiedlichen Aminosäuren synthetisiert wurden^{103,104}. Die Synthese der Monomere verläuft in zwei Schritten und wird in Abbildung 6 schematisch dargestellt.

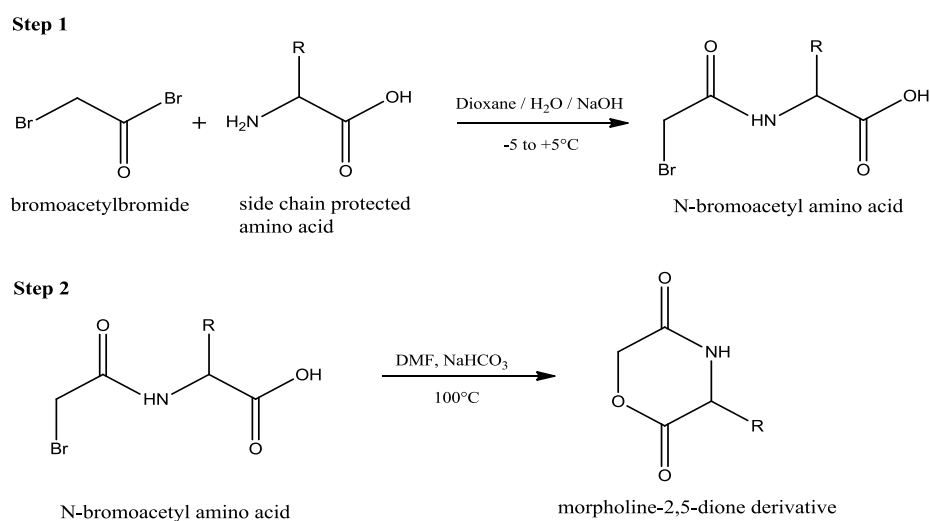


Abbildung 6 Schematische Darstellung der Synthese von Morpholin-2,5-dion Derivaten mit geschützter Aminosäure Seitenkette in Position 3 (R)¹⁰⁵.

In der ersten Stufe wird eine Aminosäure mit geschützter Seitenkettenfunktionalität mit Bromacetylbromid zum entsprechenden N-Bromacetylderivat unter Schotten-Baumann Bedingungen umgesetzt. Dieses wird dann in der zweiten Stufe zum Morpholin-2,5-dion cyclisiert. Alle Produkte konnten nach Aufarbeitung und Umkristallisation in sehr hoher Reinheit (>99%) erhalten werden. Es wurden Monomere mit den Aminosäuren

Asparaginsäure, Cystein und Lysin hergestellt. Formal stellen die Morpholin-2,5-dione eine cyclische Verbindung aus einer Aminosäure mit geschütztem Aminosäurerest und einem Glycolsäuremolekül dar.

Für die Auswahl der Schutzgruppen waren folgende Kriterien maßgebend:

- Stabilität gegenüber den Reaktionsbedingungen bei der Herstellung der Morpholin-2,5-dione.
- Stabilität gegenüber den Reaktionsbedingungen bei der Polymerisation.
- Möglichst milde Bedingungen für die Abspaltung auf der Stufe des Polymers.
- Kommerzielle Verfügbarkeit.

Anschließend wurden die Morpholinderivate an der Universität Jena mittels kationischer Ringöffnungspolymerisation mit L-Lactid zu den entsprechenden Homopolymeren copolymerisiert. Die Polymerisationsreaktion für die Polyesteramide ist in Abbildung 7 schematisch dargestellt:

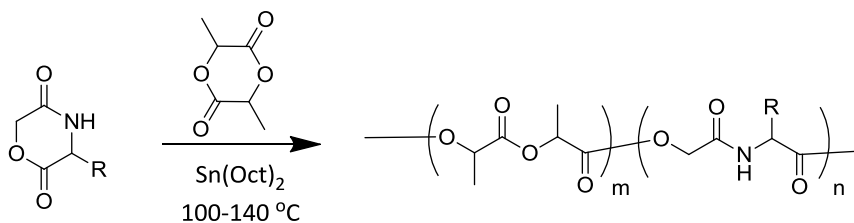


Abbildung 7 Allgemeine Reaktionsgleichung der Copolymerisation der Morpholin-2,5-dion Monomere mit L-Lactid, R: Aminosäureseitenkette mit Schutzgruppe¹⁰⁵

Die beiden cyclischen Monomere Morpholin-2,5-dion und L-Lactid wurden jeweils unter inerter Atmosphäre verschmolzen und nach Zugabe des in Toluol gelösten Initiators Zinn-2-ethyl-hexanoat ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$) unter Argon zwischen $100\text{ }^\circ\text{C}$ und $140\text{ }^\circ\text{C}$ für 24, 48 oder 96 Stunden erhitzt. Nach Abschluss der Polymerisation wurden die Polymere in Chloroform gelöst und in Diethylether ausgefällt. Nach der Trocknung wurde ein weißes Pulver erhalten.

Die anschließende Entfernung der Schutzgruppen ist bei diesen Strukturen nicht trivial. Unter drastischen Reaktionsbedingungen könnten die Schutzgruppen zwar quantitativ entfernt werden, aber dabei kann es vermehrt zu einem Abbau des Polymerrückrates kommen. Zu milde Reaktionsbedingungen hingegen würden zu niedrigen Entschützungsgraden führen. Für die Polyesteramide mit Asparaginsäure und Cystein konnten gute Lösungen gefunden werden, während die Entschützung des Lysin-Typs nicht erfolgreich war. Der Erfolg der Entschützung wurde mittels NMR-Spektroskopie (Entschützungsgrad) und Größenausschlusschromatographie, kurz SEC, (Stabilität des Polymerrückrats) untersucht. Bei den Asparaginsäure und Cystein Polyesteramiden konnten die Schutzgruppen zu annähernd 100% entfernt werden

ohne dabei das Polymerrückrat abzubauen. Beim Lysin Typ gelang die Entfernung der Schutzgruppen unter Erhaltung der Polymerkette maximal zu 50 bis 70%.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Polyesteramid Polymere zur Herstellung von Arzneistoffträgern sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6 Polyesteramide mit Charakterisierungsdetails¹⁰⁵; n.v.: Information nicht verfügbar.

PEA Nr.	Polymer Charge	Typ	xM^a (mol%)	xM^b (mol%)	entschützt (%)	Mn (g/mol) *	Mw (g/mol) *	PDI
01	PCCLA03	Asp	20	28	95	25.000	32.700	1,28
02	PCCLA04	Asp	20	35	95	4.200	5.600	1,33
03	PCCLA05	Asp	25	50	95	10.700	19.800	1,83
04	12SW	Asp	n.v.	40	95	48.400	80.000	1,6
05	14SW	Asp	n.v.	25	90	57.000	97.800	1,7
06	2652-S3	Asp	n.v.	23	93	32.600	53.800	1,65
07	PCC04X	Cys	n.v.	n.v.	97	13.500	21.100	1,54
08	2652-S2	Asp	n.v.	23	73	32.600	53.800	1,65
09	PCC04T	Cys	n.v.	n.v.	100	13.500	21.100	1,54
10	PCC06B	Cys	n.v.	n.v.	99	12.300	18.000	1,46

^a Molenbruch von Morpholin-2,5-dion in der Reaktionsmischung.

^b Molenbruch von [GA-Cys(R)] bzw. [GA-Asp(R)] Einheiten im Copolymer.

*SEC-9: DMAc+ 0.21% LiCl, Polystyrol Kalibration.

Die Grundstrukturen der beiden letztlich in der Arbeit verwendeten PEA-Typen sind in Abbildung 8 dargestellt.

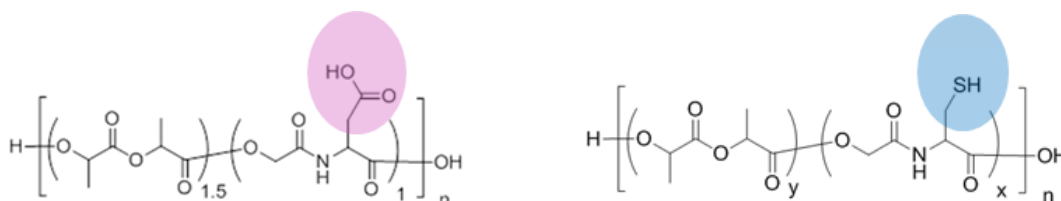


Abbildung 8 Grundstrukturen der zur Formulierung verwendeten PEA Polymere; links: Asparaginsäure-Typ, rechts: Cystein-Typ; Die variablen funktionellen Seitengruppen sind jeweils farblich markiert.

Als Quelle zur Beschreibung der Morpholin- und Polyesteramidsynthese dienten bislang nicht veröffentlichte interne Berichte der Evonik Industries AG¹⁰⁵.

Im Zuge der Synthese der neuen PEA Polymere stellte sich heraus, dass eine exakte Steuerung der Polymerkettenlänge und der Austausch von Aminosäuren prinzipiell zwar möglich, aber keineswegs trivial ist. Die Auswahl der Schutzgruppe hängt von der Art der eingesetzten Aminosäure ab und muss jeweils angepasst werden. Dies erfordert wiederum eine Anpassung des kritischen Prozessschrittes der Entschützung. Der Gehalt an Aminosäuren konnte zudem nur innerhalb bestimmter Grenzen eingestellt werden¹⁰⁵.

3.2.3 Vorteile der Polyesteramide gegenüber herkömmlichen Trägermaterialien

Die Verwendung von PEA Polymeren als Trägermaterial für Peptide und Proteine bietet gegenüber den handelsüblichen PLGA Polymeren erhebliche Vorteile: Durch Variation der Aminosäure besteht die Möglichkeit eine Vielzahl unterschiedlicher Seitenfunktionalitäten bei nur geringfügigen Maßnahmen zur Anpassung des Herstellungsprozesses einzuführen. Außerdem kann bei der Synthese der Polymere der Gehalt an Aminosäureresten kontrolliert werden. Somit können die Eigenschaften der Polymere an die spezifischen Erfordernisse zur Verwendung als Carrier angepasst werden. Die Hydrophilie und die Löslichkeitseigenschaften sind steuerbar und können prinzipiell genau so eingestellt werden, dass optimale Wirkstoffbeladungsraten und Freisetzungsprofile erzielt werden können. Dies wurde von He et al. für ein pH-sensitives PEA Polymer mit Leucin gezeigt¹⁰⁶. Die Arbeiten der Universität Jena an der Synthese und die eigenen Untersuchungen der neuen PEA Polymere in der vorliegenden Arbeit zeigten allerdings, dass die gezielte Einstellung der physikochemischen Eigenschaften der Polymere keineswegs trivial ist und bislang nur innerhalb bestimmter Grenzen realisiert werden konnte¹⁰⁵.

Da sie peptidisch gebundene Aminosäuren enthalten, besitzen die Polyesteramide per se eine erhöhte Hydrophilie im Vergleich zu PLGA. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass durch den Einbau von Carboxylgruppen beim Asparaginsäure-Typ sogar eine pH-abhängige Wasserlöslichkeit des Polymers erzielt werden kann. Die generell höhere Hydrophilie der PEA Polymere gegenüber PLGA und die Möglichkeit diese je nach Bedarf einzustellen, sollte sich für die Verkapselung von Peptiden und Proteinen aus BCS Klasse III voraussichtlich als vorteilhaft erweisen.

Die mukoadhäsiven und enzymhemmenden Effekte, die durch Verwendung thiolierter Polymere zur Formulierung von Arzneistoffträgern erzielt werden können, wurden in Kapitel 1.5.2 für Chitosanderivate detailliert beschrieben. Es ist allerdings allgemein bekannt, dass die etablierten Herstellungsverfahren für nano- und mikroskalige Chitosan Partikel sehr schwer kontrollierbar und häufig kaum zu reproduzieren sind. Dies liegt unter anderem an der stark divergierenden Qualität der Ausgangsmaterialien. Die Einstellung der Partikelgröße innerhalb

enger Grenzen bei geringer Verteilungsbreite ist mit Chitosan bei weitem nicht so gut möglich, wie es für PLGA der Fall ist. Im Cystein-PEA-Typ mit Thiol-Seitengruppen sollten die Vorteile der guten Formulierbarkeit und der Bioabbaubarkeit Polylactid-basierter Polymere mit der Funktionalität thiolierter Polymere und einer hohen Verkapselungseffizienz vereint werden.

Ein weiteres Potential der Polyesteramide besteht darin, dass die eingeführten funktionellen Gruppen optimale Möglichkeiten zur kovalenten Anbindung weiterer Moleküle bieten. Weitergehende Funktionalisierungen nahezu jeder Art sind dadurch mit erheblich geringerem Aufwand möglich als es bei den herkömmlichen eher reaktionsträgen PLGA Polymeren der Fall ist. Der Aspekt weitergehender kovalenter Funktionalisierungen der Polymere war jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

3.3 Modellwirkstoff Desmopressin

Desmopressin ist ein synthetisch hergestelltes Peptidanalogen des körpereigenen Hypophysenhinterlappenhormons Arginin-Vasopressin (AVP, auch Antidiuretisches Hormon, ADH, genannt). Als Agonist an den AVP-Rezeptoren (V1 und V2 Rezeptor) wirkt AVP gefäßverengend (über V1 Rezeptoren) und antidiuretisch (über V2 Rezeptoren). Zudem verstärkt es die Ausschüttung des Von-Willebrand-Faktors (V2). Das Peptidanalogen Desmopressin wurde mit dem Ziel entwickelt, die enzymatische Stabilität von Vasopressin zu erhöhen und um den antidiuretischen vom gefäßverengenden Effekt zu trennen. Dies gelang dem tschechischen Chemiker Vladimir Pliska während seiner Tätigkeit für Ferring in den 1960er Jahren durch gezielte chemische Modifikation des Peptids¹⁰⁷. Das von ihm entwickelte Desmopressin (1-desamino-8-D-Arginin-Vasopressin, DDAVP) weist im Vergleich zu AVP eine erhöhte Proteasestabilität und zudem eine stärkere Affinität am V2 Rezeptor und eine reduzierte Affinität am V1 Rezeptor auf. Der V2 Rezeptor ist hauptsächlich für die Wasserretention in den Sammelrohren der Nieren zuständig. Aus diesem Grund hat Desmopressin nahezu keine Wirkung auf die glatte Muskulatur der Gefäße und damit auf den Blutdruck, verstärkt jedoch die Rückresorption von Wasser in den Nieren und damit die Harnkonzentrierung umso effektiver. Aufgrund seiner relativ guten Resistenz gegen Proteasen zeigte Desmopressin in einer Studie von Fjellstad-Paulsen et al. eine deutlich bessere Stabilität in intestinalen Flüssigkeiten als Vasopressin¹⁰⁸. In der gleichen Studie erwiesen sich beide Substanzen gegenüber Bürstensaumenzymen als weitgehend unempfindlich. Aus diesen Gründen ist eine orale Gabe von Desmopressin möglich.

Die orale Bioverfügbarkeit ist mit 0,08% bis 0,16% nach peroraler Einnahme von Minirin® Tabletten zwar noch immer sehr niedrig, bei Gabe entsprechend hoher Dosen jedoch ausreichend für einen therapeutischen Erfolg¹⁰. Die von Vilhardt et al. in 1986

veröffentlichten Ergebnisse einer klinischen Bioverfügbarkeitsstudie von Desmopressin lagen etwas höher. Nach peroraler Gabe von 100 µg oder 200 µg waren es zwischen 0,7 und 1,0%¹⁰⁹. Für die sublinguale Gabe (Minirin® Lyophilisat Schmelztabletten) wird die Bioverfügbarkeit mit 0,28% und für die nasale Darreichungsform (Minirin® Nasenspray) mit 3-5% beziffert (laut Angaben des Herstellers Ferring GmbH). Auch wenn durch die Gabe entsprechend hoher Dosen wirksame Blutspiegel nach peroraler Gabe von Desmopressin erzielt werden können, lohnt sich eine Verbesserung der Bioverfügbarkeit dieser Substanz aus ökonomischen Gesichtspunkten dennoch. Durch einen sparsameren Einsatz des teuren Wirkstoffs könnten erhebliche Kosteneinsparungen für den Patienten und das Gesundheitssystem erzielt werden.

Aufgrund seiner pharmakologischen Wirkungen wird Desmopressin vorrangig in der Therapie von Diabetes insipidus eingesetzt. Weiterhin ist es zur Behandlung der traumatisch bedingten Polyurie, des nächtlichen Bettnässens (*Enuresis nocturna*) und zur Blutstillung bei Hämophilie-Patienten zugelassen.

Abbildung 9 zeigt den Aufbau von Vasopressin und Desmopressin im direkten Vergleich. Das modifizierte Peptidanalogue besteht wie sein natürliches Vorbild aus 9 Aminosäuren (Nonapeptid), wobei das n-terminale Cystein deaminiert und das L-Arginin an Position 8 gegen D-Arginin ausgetauscht wurde.

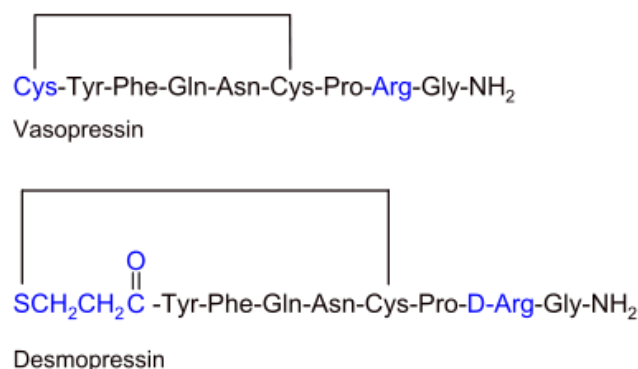


Abbildung 9 Primärstruktur von Vasopressin (AVP) und Desmopressin (DDAVP) mit intramolekularer Disulfidbrücke.

Einige Strukturelemente von Desmopressin sind bezüglich der Stabilität im Gastrointestinaltrakt als kritisch zu bewerten. Das Peptid besitzt insgesamt drei Aminosäurereste mit Amidgruppen (Glutamin, Asparagin und amidiertes C-terminales Glycin), die vor allem im sauren Milieu des Magens zur jeweiligen Carbonsäure hydrolysiert werden können, da die Deamidierung von Seitenketten durch Säure katalysiert wird. Die Spaltung der intramolekularen Disulfidbrücke wird ebenfalls durch Säure katalysiert und weist daher voraussichtlich eine begrenzte Stabilität im Magen auf¹¹⁰.

Der Austausch von L-Arginin gegen D-Arginin stabilisiert das Peptid gegenüber Trypsin. Die Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin wurden nicht modifiziert und sind daher nach wie vor für einen Angriff durch Chymotrypsin anfällig.

Da keine Asparaginsäure enthalten ist, die gegenüber einer säurekatalysierten Peptidspaltung besonders empfindlich wäre, ist nicht zu erwarten, dass es zu einer Spaltung des Peptides durch die Magensäure kommt.

Aufgrund des enthaltenen Arginins reagiert Desmopressin basisch. Kommerziell vertrieben wird das Peptidhormon als Desmopressinacetat, das gut wasserlösliche Salz der Essigsäure. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich Desmopressinacetat verwendet, auch wenn teilweise nur von Desmopressin die Rede ist.

3.4 Sonstige Hilfsstoffe

Alle weiteren Hilfsstoffe, die zur Herstellung der Formulierungen verwendet wurden, sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7 Auflistung verwendeter Hilfsstoffe und Lösungsmittel.

Chemikalie	Charge	Hersteller
Mowiol 4-88 Polyvinylalkohol	361174456	Carl Roth
Ethylacetat	K38080564	Merck KGaA
Pluronic F68	027K0027	Sigma
Aceton	K44014914248	Merck KGaA
Dichlormethan	1320504864	J. T. Baker
Ethanol absolut	K44694483 328	Merck KGaA
Polyethylenglycol 4000	S35145 149	Merck KGaA
Rhodamin-Dextran	1149011	Invitrogen
Lumogen F Red 305	0005007376	BASF SE
Mannitol	412192443	Carl Roth
Trehalose	412185349	Carl Roth
Neosorb P60 W (Sorbitol)	855002	Roquette
Isoleucin	K31912157 709	Merck KGaA
hLF Peptidfragment	EV1-0901	BCN Peptides
Kohlenstoffdioxid Biogon C	UN1013/GA376	Linde
Eudragit L 30 D-55	B140314117	Evonik Industries AG
Ammoniaklösung 25%	K45133932348	Merck KGaA

4 Formulierung und Charakterisierung nanopartikulärer Trägersysteme

Auf Basis des Literaturstudiums, dessen Ergebnisse in der Einleitung dieser Arbeit zusammengefasst wurden, wird als Konzept zur Bioverfügbarkeitserhöhung von Peptiden die Formulierung von nanoskaligen polymeren Wirkstoffträgern zur peroralen Applikation verfolgt. Die Partikel sollen dem Wirkstoff als Carrier zum erleichterten Übertritt über die epitheliale Darmbarriere und zum Schutz vor einem Abbau durch Verdauungsenzyme dienen. Aufgrund der in Kapitel 3 beschriebenen Materialeigenschaften wurden bioabbaubare Polyester und Polyesteramide auf Basis von Polylactid und Polyglycolid als Trägermaterialien für den Modellwirkstoff ausgewählt. Die ausschlaggebenden Faktoren hierbei waren im Wesentlichen die Biokompatibilität, die Bioabbaubarkeit, eine variable Freisetzungskinetik je nach Zusammensetzung des Polymers sowie die Möglichkeit zur Formulierung von nanoskaligen Arzneistoffträgern. Im Anschluss an die Methodenentwicklung und Erstellung der Referenzformulierungen mit handelsüblichen PLGA Polymeren wurden die Methoden für die neuen PEA Polymere angepasst und Formulierungen mit dem Modellpeptid hergestellt und umfassend charakterisiert.

In die Diskussion der optimalen Partikelgröße fließen unterschiedliche Faktoren ein: Aufnahme der Partikel durch die Enterozyten, Wirkstoffbeladungsgrad, regulatorische Aspekte hinsichtlich der Sicherheit sowie Schutz des eingekapselten Wirkstoffes vor Verdauungsenzymen. Zusammenfassend ist davon auszugehen, dass Partikel mit einer Größe von mehr als 500 nm nicht effizient von Epithelzellen aufgenommen werden können. Der von Desai et al. als optimal für die intestinale Resorption beschriebene Partikeldurchmesser zwischen 100 nm und 200 nm bewegt sich jedoch aus regulatorischer Sicht sehr dicht an der Grenze zur Sicherheitsbedenklichkeit¹¹¹. Das „Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks“ (SCENIHR) hat im Auftrag der Europäischen Kommission eine wissenschaftliche Grundlage zur Beurteilung der Sicherheit von Nanomaterialien ausgearbeitet¹¹². Das Komitee kam zu dem Ergebnis, dass bei einem mittleren Partikeldurchmesser von weniger als 100 nm (Kategorie 3) grundsätzlich eine nanospezifische Risikobeurteilung durchzuführen ist. Liegt der mittlere Partikeldurchmesser zwischen 100 nm und 500 nm (Kategorie 2), so ist eine nanospezifische Risikobeurteilung nur dann erforderlich, falls entsprechend der anzahlgewichteten Partikelgrößenverteilung ein Anteil an Partikeln von mehr als 0,15% eine Größe von weniger als 100 nm aufweist. Dies kann bei einer mittleren Partikelgröße von weniger als 200 nm kaum ausgeschlossen werden. Die exakte Kontrolle der Partikelgröße innerhalb enger Grenzen ist vor diesem Hintergrund essentiell wichtig.

Unter Berücksichtigung der physiologischen Gegebenheiten sowie der regulatorischen und pharmazeutischen Aspekte wurde für die Formulierung der Wirkstoffträger ein mittlerer Partikeldurchmesser zwischen 200 nm und 500 nm angestrebt.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob durch Anlagerung eines zellpenetrierenden Peptides (CPP) an die Oberfläche von PLGA Partikeln die Aufnahme von Nanopartikeln in Zellen verstärkt werden kann. Dazu wurde ein Fragment des hLF Peptids als CPP ausgewählt.

4.1 Methoden

Die wichtigsten Anforderungen an die Herstellungsmethoden der Partikelformulierungen sind die Gewährleistung einer hohen pharmazeutischen Qualität der Produkte, eine möglichst exakte und gut reproduzierbare Einstellung der Partikelgröße mit einer engen und monomodalen Partikelgrößenverteilung sowie eine hohe Verkapselungseffizienz für gut wasserlösliche aber schlecht permeable Wirkstoffe der BCS Klasse III wie beispielsweise Desmopressin. Von essentieller Bedeutung ist außerdem die Bereitstellung eines lagerstabilen Produktes, sodass bei der späteren Anwendung der Formulierung eine Redispergierung der unveränderten Primärpartikel ohne Agglomeration oder Abbau der Bestandteile sichergestellt werden kann. Ein weiteres Ziel war die Entwicklung einer Herstellungsmethode, die ein hohes Potential zur Übertragung auf industrielle Produktionsmaßstäbe besitzt.

Die Auswahl der Herstellungsmethoden und deren Beschreibung erfolgt in Abschnitt 4.1.1. Die Weiterverarbeitung der hergestellten Partikelkerne wird in den Abschnitten 4.1.2 (Beschichtung der Partikel), 4.1.3 (Gefriertrocknung) und 4.1.4 (Sprühtrocknung) beschrieben.

Um die genannten Anforderungen umsetzen zu können, mussten die in ihren Prinzipien weitgehend literaturbekannten Methoden optimiert, weiterentwickelt und angepasst werden. In diesem Zusammenhang wurden Methoden zur Partikel- und Wirkstoffanalytik angewendet. Schließlich wurden die nanopartikulären Formulierungen sehr umfassend charakterisiert. Die dazu benötigten Testmodelle und analytischen Methoden werden in den Abschnitten 4.1.5 (Partikel- und Wirkstoffanalytik), 4.1.6 (*in vitro*-Tests) und 4.1.7 (*in vivo*-Tests) genauer beschrieben.

Darüber hinaus wurde ein quasi-kontinuierliches Herstellungsverfahren von Polymernanopartikeln entwickelt, um einen innovativen und effizienten Prozess mit hervorragenden Möglichkeiten zur Übertragung auf industrielle Produktionsmaßstäbe bereitstellen zu können. Die Entwicklung dieses Verfahrens wird gesondert in Kapitel 4.6 beschrieben.

4.1.1 Herstellung von Polymernanopartikeln

Zur Herstellung von Polymerpartikeln werden in der Literatur zwei prinzipielle Vorgehensweisen beschrieben:

- 1) Formung der Partikel während der Polymerisation (z.B. bei der Suspensionspolymerisation¹¹³ oder der Emulsionspolymerisation¹¹⁴).
- 2) Formung der Partikel nach der Polymerisation (z.B. durch Sprühtrocknung von Polymerlösungen, Lösungsmittelverdampfungsmethode oder Vermahlung)¹²³.

Die zweite Methode kann nochmals in zwei prinzipielle Vorgehensweisen gegliedert werden: Erzeugung feiner Partikel durch Zerkleinerung eines Feststoffes (Top-down) oder durch Kristallisation oder Ausfällung eines gelösten Stoffes (Bottom-up). Die Top-down Methode ist in der Größe der zu erzeugenden Partikel begrenzt, da im Allgemeinen keine Partikel mit einem Durchmesser von weniger als 5 µm erzeugt werden können¹¹⁵. Bei einem kleineren Zieldurchmesser steigt der Energieeintrag drastisch an und die mechanischen Kräfte auf den Stoff sind enorm. Die Stabilität sensibler Wirkstoffe wie Proteine oder empfindlicher Biopolymere wäre bei solchen Prozessen nicht gewährleistet. Zudem neigen die auf diesem Weg erzeugten Partikel zur Agglomeration und sind häufig nicht ohne weiteres redispersierbar¹¹⁵.

Die Bottom-up Methoden beruhen auf dem Prinzip, Stoffe ausgehend von der molekularen Ebene zu größeren Partikeln zusammenzulagern. Somit lassen sich auch kleinste Partikel im nanoskaligen Bereich erzeugen. Den in der Literatur beschriebenen Standardverfahren zur Herstellung von Polymernanopartikeln als Wirkstoffträger liegt in der Regel dieses Prinzip zu Grunde. Ausgehend von einer molekulardispersen Lösung des Polymers in einem geeigneten Lösungsmittel (für bioabbaubare Polyester in der Regel organische Lösungsmittel) erfolgt die Partikelgenese durch Entzug des Lösungsmittels, wodurch eine Ausfällung oder Präzipitation des Polymers in partikulärer Form hervorgerufen wird. Den folgenden Methoden liegt dieses Prinzip zugrunde, sie unterscheiden sich lediglich in der speziellen Ausführung: Nanopräzipitation¹¹⁶, Emulsionsmethoden (*single-* und *double emulsion*) mit anschließender Lösungsmittelverdampfung¹¹⁷ oder Lösungsmittelextraktion^{118,119} und Koazervation¹²⁰. Bei der Partikelherstellung aus überkritischer Lösung mit dem sogenannten RESS-Verfahren (Rapid Expansion of Supercritical Solution) oder der Herstellung von Nanopartikeln durch Sprühtrocknung von Polymerlösungen handelt es sich ebenfalls um Bottom-up Verfahren.

Als am besten geeignetes Verfahren zur Mikroverkapselung von hydrophilen Wirkstoffen in eher lipophile Trägermaterialien wie PLGA wird in der Literatur die Doppemulsionsmethode beschrieben^{121,122}. Lamprecht et al. zeigten überdies, dass die Hochdruckhomogenisation mit einem Microfluidizer zur Homogenisierung von Doppemulsionen im Zuge der Herstellung wirkstoffbeladener Nanopartikel sehr gut geeignet ist. Die Partikelgrößen-

verteilung war monodispers und die Verteilungsbreite war deutlich schmaler als bei Verwendung eines herkömmlichen Homogenisators¹²¹. Aus diesen Gründen stellte die Doppalemulsionsmethode unter Verwendung eines Microfluidizers die Methode der Wahl zur Verkapselung des Modellpeptides Desmopressin in bioabbaubare Polymernanopartikel dar. Zum direkten Vergleich mit einer Standardmethode, wurde die Homogenisierung auch mit einem Rotor-Stator Dispergierer durchgeführt.

Da der Doppalemulsionsmethode allgemein kein hohes Potential zur Übertragung auf industrielle Produktionsmaßstäbe zugeschrieben wird, wurde eine alternative Herstellungsmethode zur kontinuierlichen Produktion von Nanopartikeln aus bioabbaubaren Polyestern zur pharmazeutischen Anwendung entwickelt. Dieses Verfahren basiert auf der Versprühung überkritischer Polymerlösungen (RESS).

4.1.1.1 Doppalemulsionsmethode

Das Modellpeptid Desmopressin wurde mittels Doppalemulsionsmethode mit anschließender Lösungsmittelverdampfung, wie in Abbildung 10 schematisch dargestellt, in die unterschiedlichen Trägerpolymere eingekapselt.

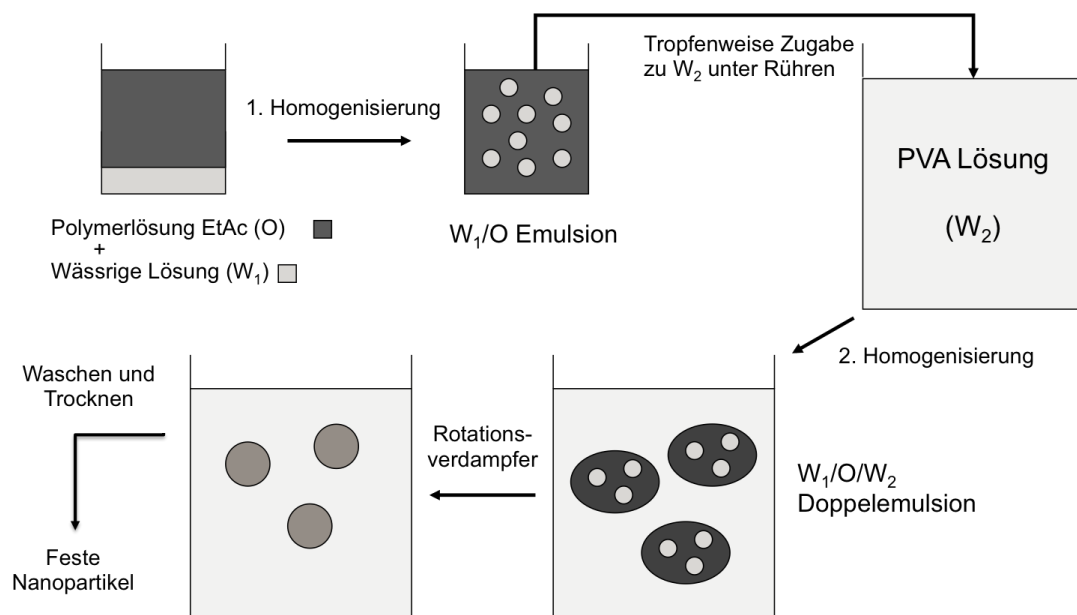


Abbildung 10 Schematische Darstellung der Partikelherstellung mittels Doppalemulsionsmethode (W₁/O/W₂) mit anschließender Lösungsmittelverdampfung.

Zunächst wurden 800 mg Polymer in 40 ml Ethylacetat (O) unter 15 minütigem Rühren mit einem Magnetrührer mit 600 UpM gelöst. Zur Fluoreszenzmarkierung der Partikel wurden dieser Lösung anschließend 750 µl einer Lösung von 1 mg/ml Lumogen Red in Aceton

zugesetzt. Die angefärbte Polymerlösung wurde dann unter Rühren mit einem Magnetrührer mit 600 UpM mit 10 ml einer wässrigen Lösung (W_1) von 80 mg Desmopressinacetat und 150 mg Polyethylenglycol (PEG) 4000 tropfenweise versetzt. Die Mischung (W_1/O) wurde anschließend entweder mit einem Hochdruckhomogenisator (Microfluidizer M-110P „high shear fluid processor“, Microfluidics Corp., USA) mit Z-Typ Interaktionskammer aus Diamant oder mit einem Rotor-Stator Dispergierer (Ultra-Turrax T18 basic, IKA GmbH & Co. KG, Deutschland) mit Rotor-Stator Dispergierwerkzeug homogenisiert.

Mit dem Microfluidizer wurde die Primäremulsion (W_1/O) in 5 Durchläufen homogenisiert. Um den Einfluss des Prozessdrucks auf die Partikelgröße und die Partikelgrößenverteilung zu untersuchen, wurden unterschiedliche Drücke zwischen 250 bar und 1.500 bar gewählt. Die Interaktionskammer wurde mit Eis gekühlt. Mit dem Ultra-Turrax wurde die Primäremulsion für 5 Minuten mit 14.000 UpM homogenisiert.

Zur Herstellung der Doppelemulsion ($W_1/O/W_2$) wurde die Primäremulsion unter Rühren mit einem Magnetrührer mit 750 UpM tropfenweise zu 150 ml einer wässrigen Lösung (W_2) von Polyvinylalkohol (PVA) gegeben. Nach vollständiger Zugabe der Primäremulsion wurde die Doppelemulsion für 20 Minuten mit 1.000 UpM mit einem Magnetrührer gerührt und im Anschluss daran in gleicher Weise wie bereits die Primäremulsion mit dem Microfluidizer bzw. mit dem Ultra-Turrax homogenisiert. Die W_2 Lösung wurde mit unterschiedlichen PVA Konzentrationen zwischen 0,1 und 2,5% hergestellt, indem die entsprechende Menge an Stabilisator in demineralisiertem Wasser unter Rühren mit dem Magnetrührer mit 600 UpM über Nacht gelöst wurde.

Nach der Homogenisierung der Doppelemulsion wurde das Ethylacetat mit einem Rotationsverdampfer (Laborota 4011 digital, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Deutschland) unter Anlegen eines Vakuums von 40 mbar (schrittweise und allmählich absenken) bei einer Temperatur von 30 °C über die Dauer von 20 min abgezogen.

Aufreinigung der Partikelsuspensionen

Zur Aufreinigung der Partikelsuspensionen wurden zwei unterschiedliche Methoden durchgeführt und hinsichtlich ihres Einflusses auf die Partikelgrößenverteilung und ihrer Praktikabilität (z.B. Dauer) bewertet. Zur Evaluierung des Prozesses wurde die Partikelsuspension aus einem Herstellungsgang in zwei gleiche Hälften aufgeteilt und jeweils nach einem der beiden folgenden Verfahren bearbeitet:

- (1) Die Partikelsuspension wurde in Zentrifugalkonzentratoren (Vivaspin 15 mit Polyethersulfon (PES) Membran, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland) mit

einem Molecular Weight Cut Off (MWCO) von 100 kDa eingefüllt und bei 1.400 rcf über die Dauer von einer Stunde zentrifugiert (Centrifuge 5702 R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Anschließend wurde das Filtrat verworfen, die aufkonzentrierte Suspension mit Wasser verdünnt und erneut für eine Stunde zentrifugiert. Nachdem dieser Waschvorgang noch ein weiteres Mal wiederholt wurde, um den größten Anteil an Stabilisator zu entfernen, wurde die Partikelsuspension wieder vereinigt und auf das gleiche Volumen mit Wasser aufgefüllt wie vor dem Waschprozess.

- (2) Die Partikelsuspension wurde auf mehrere Eppendorf Reaktionsgefäße aliquotiert und für 15 min mit 13.400 rcf zentrifugiert (Centrifuge 5415 R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Nach Sedimentation der Partikel wurde der klare Überstand dekantiert und die Partikel wurden redispergiert. Dazu wurden die Reaktionsgefäße mit demineralisiertem Wasser aufgefüllt, für ca. 1 min mit einem Vortexer auf höchster Stufe bearbeitet und zwischendurch mehrmals invertiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt drei Mal durchgeführt. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Partikelsuspensionen wieder vereinigt und auf das gleiche Volumen mit Wasser aufgefüllt wie vor dem Waschprozess.

Um den Einfluss der beiden Aufreinigungsprozesse auf die mittlere Partikelgröße und die Partikelgrößenverteilung zu testen, wurden die Partikelsuspensionen jeweils vor und nach der Aufreinigung mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS, engl.: *Dynamic Light Scattering*) charakterisiert. Die Beschreibung der DLS Methode erfolgt in Abschnitt 4.1.5.

4.1.1.2 Herstellung von Nanopartikeln aus überkritischen Lösungen

Da sie sich deutlich von den hier beschriebenen Methoden unterscheidet und einer besonders umfangreichen Beschreibung bedarf, wird die alternative Herstellungsmethode von Polymernanopartikeln durch Entspannung überkritischer Lösungen in Kapitel 4.6 gesondert abgehandelt. Einige der in diesem Zusammenhang speziell benötigten Methoden werden ausschließlich dort und nicht in Kapitel 4.1 beschrieben.

4.1.2 Funktionalisierung der Partikeloberfläche mit Peptidmolekülen

Die Beschichtung der Partikeloberfläche mit funktionalen Peptidmolekülen erfolgte direkt nach der Herstellung und Aufreinigung der Partikelsuspension durch 2 stündige Inkubation der Polymerpartikel in einer Lösung von 1 mg/ml des funktionalen Peptids. Die Partikel wurden anschließend ohne nochmalige Aufreinigung gefriergetrocknet.

Der Erfolg der Beschichtung wurde durch Vergleich der Oberflächenpotentiale der Partikel vor und nach Inkubation mit dem hLF Peptidfragment beurteilt.

4.1.3 Gefriertrocknung von Nanosuspensionen

Da wesentliche Inhaltsstoffe der Formulierungen bei Anwesenheit von Wasser abgebaut werden, ist die Trocknung der wässrigen Partikelsuspensionen eine grundsätzliche Voraussetzung, um eine ausreichende Lagerstabilität über mehrere Monate hinweg gewährleisten zu können. Bei Anwesenheit größerer Mengen Wasser erfolgt ein hydrolytischer Abbau von PLGA zu Milchsäure und Glycolsäure¹²³. Die Stabilität des Modellpeptides Desmopressin wird durch die Anwesenheit von Wasser ebenfalls drastisch reduziert. Eine Lagerung des festen Materials bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von mehr als 30% wirkt sich bereits innerhalb weniger Wochen deutlich auf die Haltbarkeit des Moleküls aus¹²⁴. Während der Gehalt nach 12 Wochen Lagerung bei einer erhöhten Temperatur von 58 °C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 11% noch bei 100% lag, fiel er bei einer Feuchte von 30% bei gleicher Temperatur bereits auf 47% ab¹²⁴.

Zur Trocknung der Partikelsuspensionen wurden zwei unterschiedliche Verfahren evaluiert: die Gefriertrocknung und die Sprühtrocknung. Es folgt zunächst die Beschreibung der Gefriertrocknung, die Sprühtrocknung wird in Kapitel 4.1.4 beschrieben.

Zur Stabilisierung der getrockneten Partikel wurden der Partikelsuspension vor der Gefriertrocknung weitere Hilfsstoffe zugesetzt. Dazu wurden unterschiedliche Substanzen und deren Mischungen getestet und hinsichtlich ihres Einflusses auf die Redispergierbarkeit der getrockneten Partikel bewertet. Getestet wurden Mannitol, Sorbitol, L-Isoleucin und PVA in unterschiedlichen Konzentrationen zwischen 0,6% und 3,0% relativ zur gesamten Masse der Suspension.

Die Partikelsuspension wurde in Injektionsflaschen aus Glas eingefüllt und mit einem Gefriertrockner (Epsilon 2-6D Ac, Martin Christ, Deutschland) getrocknet. Dazu wurde die Suspension bei -50 °C für 3 Stunden eingefroren und anschließend bei einem Druck von 0,011 mbar getrocknet. Die Stellflächentemperatur wurde zu Beginn der Haupttrocknung auf -10 °C angehoben und sukzessive über einen Zeitraum von 4 Stunden hinweg bis auf 12 °C erhöht. Bei diesen Bedingungen wurde über einen Zeitraum von 35 Stunden getrocknet. Anschließend wurde eine 6 stündige Nach Trocknung bei einem Druck von 0,003 mbar und einer Stellflächentemperatur von 15 °C durchgeführt. Der gesamte Trocknungsprozess dauerte 48 Stunden.

4.1.4 Sprühtrocknung von Nanosuspensionen

Zur Vorbereitung der Sprühlösung wurde der Partikelsuspension eine wässrige Lösung von L-Isoleucin zugesetzt. In der Literatur wird berichtet, dass diese Aminosäure die Redispergierbarkeit sprühgetrockneter Partikel in Wasser verbessert und eine stabilisierende Wirkung auf Proteine hat¹²⁵. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen von L-Isoleucin zwischen 0,2% und 1,0% bei einer Polymerkonzentration von 0,4% (jeweils m/m Verhältnis) getestet. Es wurden aufgereinigte Proben und PVA-haltige Proben ohne Durchführung des Waschschruttes versprüht.

Die Partikelsuspension wurde mit einem Büchi B-90 Sprühtrockner (Büchi AG, Schweiz) bei einer Einlasstemperatur von 60 °C, einem Luftstrom von 130 L/h, einer Sprütrate von 90% unter Verwendung einer Düsenmembran mit einem Porendurchmesser von 7,0 µm getrocknet. Da die Ablufttemperatur während des gesamten Prozesses maximal 37 °C betrug, ist davon auszugehen, dass die Produkttemperatur diesen Betrag zu keinem Zeitpunkt überstieg. Nach dem Sprühvorgang wurden die Partikel mit einem Kunststoffschaber aus dem Partikelsammler entfernt und durch Wiegen des Pulvers die Ausbeute des Prozesses ermittelt.

4.1.5 Charakterisierung der Nanopartikel

Zur Optimierung bestimmter Herstellungsschritte sowie zur allgemeinen Charakterisierung der Partikelkerne wurden die folgenden analytischen Methoden verwendet:

- Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung wurden in unterschiedlichen Phasen während des Herstellungsprozesses und zur Beurteilung der Redispergierbarkeit und der Stabilität getrockneter Partikelformulierungen gemessen. Dazu wurde eine Methode verwendet, die sich die Tatsache zu Nutze macht, dass eingestrahktes Licht von suspendierten Partikeln in unterschiedlichste Richtungen gestreut wird (Dynamic Light Scattering, kurz: DLS). Die Methode zur Messung des Zetapotentials von Partikeln erfolgt ebenfalls durch Streulichtanalyse, allerdings wird hierbei zusätzlich ein elektrisches Feld angelegt (Electrophoretic Light Scattering, kurz: ELS).
- Die morphologische Untersuchung der Partikel erfolgte anhand von rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen (REM).
- Der Beladungsgrad der Partikel und die Verkapselungseffizienz der Materialien wurden durch Gehaltsbestimmungen mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) bestimmt. Dieses Verfahren wurde auch zur Gehaltsbestimmung der Lösungen bei den Freisetzungsuntersuchungen und den *in vitro*-Resorptionsstudien verwendet.

4.1.5.1 DLS Partikelgrößenmessung und ELS Zetapotentialmessung

Mithilfe der dynamischen Lichtstreuung (DLS) kann der hydrodynamische Radius von dispergierten Teilchen ermittelt werden. Diese Methode ist auch als Photonenkorrelationspektroskopie (PCS) bekannt. Das Messverfahren zeichnet sich dadurch aus, dass Partikel mit einer Größe zwischen 1 nm und 5 µm gemessen werden können¹²⁶. In Abbildung 11 ist ein schematischer Aufbau des Messprinzips dargestellt.

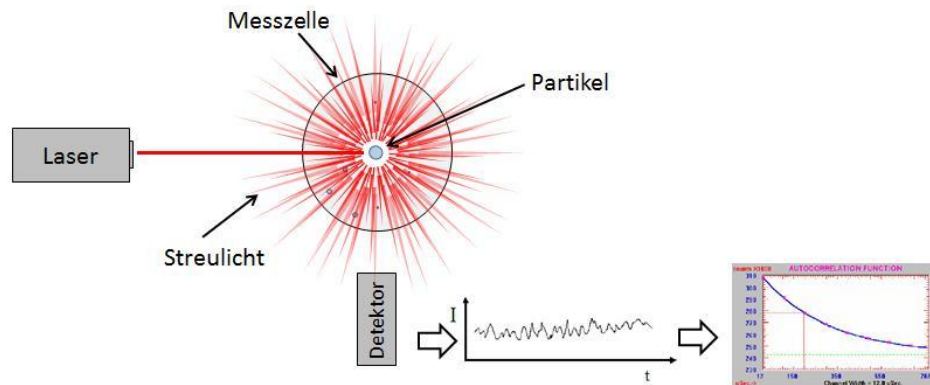


Abbildung 11 Schematischer Aufbau eines Photonenkorrelationspektroskopie Gerätes mit Laser, Messzelle, Detektor, Aufzeichnung und Auswertung des Messsignals; Der Photonendetektor befindet sich auf einem schwenkbaren Arm, sodass unterschiedliche Messwinkel eingestellt werden können. Als Detektor wird meist ein Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) oder eine Avalanche-Photodiode (APD) verwendet.

Der Laserstrahl mit einer Wellenlänge zwischen 630 nm und 660 nm trifft auf die Messzelle mit der Partikelsuspension. Die Partikel streuen das einfallende Licht in alle Richtungen (Rayleigh-Streuung) und es kommt zu einer Interferenz des Streulichts verschiedener Streuzentren. Da sich aufgrund der Brownschen Molekularbewegung die Abstände der Streuzentren zueinander ständig ändern, führt diese Interferenz zu kleinen Fluktuationen in der Streulichtintensität. Auf Basis dieser zeitabhängigen Änderungen der Streulichtintensität lässt sich die Geschwindigkeit der Teilchenbewegung und damit der Diffusionskoeffizient ermitteln. Entsprechend der Stokes-Einstein-Gleichung (Formel 2) besteht folgender Zusammenhang zwischen dem Diffusionskoeffizienten und dem hydrodynamischen Radius der Partikel¹²⁷:

$$R_h = \frac{k_B * T}{6\pi * \eta * D}$$

Formel 2 Stokes-Einstein-Gleichung mit R_h : hydrodynamischer Partikelradius, k_B : Boltzmannkonstante, T : Temperatur, η : Viskosität des Lösungsmittels, D : Diffusionskonstante.

Der Diffusionskoeffizient wird über eine Autokorrelationsfunktion ermittelt, welche auf der zeitlichen Änderung der Streulichtintensität beruht. Mithilfe von Formel 2 kann nun bei

bekannter Temperatur und dynamischer Viskosität der kontinuierlichen Phase der Suspension auf den Partikelradius geschlossen werden.

Über eine statistische Auswertung kann neben dem hydrodynamischen Radius (mittlerer Partikeldurchmesser) auch die Partikelgrößenverteilung dargestellt werden. Allerdings beruhen diese Daten lediglich auf einer statistischen Auswertung und einem Vergleich mit Standards und spiegeln daher nicht unmittelbar die tatsächliche Verteilung wieder. Die Methode gibt Aufschluss über den Größenbereich der Partikel, ist allerdings in Bezug auf die Angabe der Partikelgrößenverteilung nur für monomodale und statistische Verteilungen der Partikelgröße verlässlich.

Zur Partikelgrößenmessung wurden die Suspensionen stark verdünnt bzw. die getrockneten Partikelformulierungen zunächst in demineralisiertem Wasser redispergiert, sodass eine Polymerkonzentration zwischen 0,05 mg/ml und 0,1 mg/ml resultierte. Die Messungen wurden mit einem Nicomp 380 DLS/ZLS particle sizer (Particle Sizing Systems, Santa Barbara, USA) durchgeführt.

Mit dem Nicomp particle sizer wurden außerdem Messungen der Oberflächenladung der Partikel durchgeführt. Tatsächlich gemessen wird mit dieser Methode allerdings das sogenannte Zetapotential, das elektrische Potential, das auf der Scherebene eines in Suspension bewegten Partikels wirkt. Da sich die Scherebene in geringer Entfernung zur Oberfläche befindet, ist das Zetapotential betragsmäßig stets etwas kleiner als die tatsächliche Oberflächenladung. Bei einem in wässrigem Medium suspendierten Partikel entspricht das Zetapotential jedoch der Ladung, die der Partikel nach außen hin effektiv trägt. Die Messung der Oberflächenladung erfolgt durch Untersuchung der Lichtstreuung an den Partikeln nach Anlegen eines elektrischen Feldes. Gemessen wird bei der ELS Methode die sogenannte elektrophoretische Mobilität der Partikel, die Rückschlüsse auf deren Ladung zulässt.

4.1.5.2 *Desmopressin Gehaltsbestimmung mittels HPLC*

Die quantitative Analyse von Desmopressin für die Gehaltsbestimmung der Partikelproben und zur Untersuchung der Freisetzungspen wurde mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, kurz: HPLC) durchgeführt. Dazu wurden die Partikelproben zunächst in Wasser dispergiert und mit Lauge aufgelöst. Das genaue Vorgehen hierzu wird in den entsprechenden Abschnitten für die jeweilige Probe beschrieben. Die wässrigen Proben wurden mit einer Mischung von 80 Teilen 0,1%iger wässriger Lösung von Trifluoressigsäure (TFE) mit 20 Teilen (V:V) Acetonitril (LiChrosolv[®], Merck KGaA, Deutschland) im Verhältnis von 25:75 (V:V) gemischt. Als Trennsäule wurde eine Symmetry300 C18 Umkehrphasensäule (300Å, 5 µm, 250 x 4,6 mm) der Firma Waters verwendet. Die Detektion erfolgte mittels UV Detektor bei einer

Wellenlänge von 210 nm. Injiziert wurden jeweils 100 µl und die Flussrate betrug 0,8 ml/min. Es wurde eine Gradientenelution mit den folgenden Eluenten durchgeführt: Beide Eluenten waren Mischungen einer 0,1%igen wässrigen Lösung von TFE mit Acetonitril, wobei das Volumenverhältnis für Eluent A 80:20 und für Eluent B 20:80 betrug. Der verwendete Elutionsgradient wird in Tabelle 8 beschrieben.

Tabelle 8 Elutionsgradient bei der HPLC Analyse von Desmopressin.

Zeit [min]	Konz. Eluent A [%]	Konz. Eluent B [%]
0	100	0
15	100	0
16	0	100
17	0	100
18	100	0
28	100	0

4.1.5.3 Rasterelektronenmikroskopie

Zur Untersuchung der Partikelmorphologie wurden Aufnahmen mit einem Rasterelektronenmikroskop (JSM-6610LA, Jeol Ltd., Tokyo, Japan) angefertigt. Die Aufnahmen wurden mit einer Beschleunigungsspannung zwischen 7 und 10 kV und einem Arbeitsabstand zwischen 8 und 12 mm erstellt.

Pulverförmige gefriergetrocknete oder sprühgetrocknete Proben wurden auf einen Probenträger aufgestreut und vor der Untersuchung mit Gold bedampft.

Wässrige Partikelsuspensionen wurden 1:5 mit Ethanol verdünnt, auf einen Probenträger aufgetropft und nach Trocknung im Vakuum ebenfalls mit Gold bedampft.

4.1.5.4 Redispergierbarkeit

Die Beurteilung der Redispergierbarkeit der getrockneten Partikel erfolgte durch einen Vergleich des mittleren Partikeldurchmessers und des Polydispersitätsindex (PDI) vor der Trocknung mit den Messergebnissen nach Trocknung und Redispergierung in Wasser. Die Daten hierzu wurden mit der DLS Methode generiert, die bereits am Beginn dieses Kapitels beschrieben wurde.

4.1.5.5 Qualitativer Nachweis von Thiolgruppen mit Ellmanns Reagenz

Die spezifische Funktionalität der PEA Polymere des Cystein-Typs basiert auf der Verfügbarkeit von reaktiven Thiolgruppen, die in der reduzierten Form vorliegen. Nach der Synthese wurde die Anwesenheit der funktionellen Gruppen im frisch hergestellten Polymer mittels NMR Spektroskopie bestätigt. Ob die Funktionalität allerdings für die formulierten Nanopartikel erhalten bleibt, kann nicht sicher vorhergesagt werden. Zur Überprüfung, ob sich auf der Oberfläche der formulierten Nanopartikel nach wie vor reaktive Thiolgruppen befinden, wurde ein qualitativer Nachweis mit Ellmanns Reagenz durchgeführt. Hinter dem nach Ellmann benannten Reagenz verbirgt sich die in Wasser zunächst farblose 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure, oder kurz DTNB, die insbesondere mit Cystein-haltigen Biopolymeren zu dem tief gelb gefärbten 2-Nitro-5-thiobenzoat (TNB⁻) umgesetzt wird¹²⁸.

Dazu wurde zunächst eine Lösung von 4 mg/ml DTNB in 0,1 molarem Kaliumphosphatpuffer mit einem pH Wert von 7,0 hergestellt. Weiterhin wurden 5 mg der Partikelformulierung mit Cystein PEA in 1 ml 1 molarem Tris-Puffer mit einem pH-Wert von 8,0 suspendiert. Anschließend wurden 500 µl der Partikelsuspension zu 1 ml Ellmanns Reagenz gegeben. Dabei wurde darauf geachtet, ob ein Farbumschlag von annähernd farblos nach intensiv gelb-orange erfolgt. In diesem Fall hätte der Nachweis für reaktive Thiolgruppen ein positives Ergebnis. Es wurde jeweils eine Negativprobe mit einer Partikelformulierung aus PLGA mitgeführt.

4.1.6 *In vitro*-Charakterisierung der Formulierungen

Zur Vorhersage und ersten Einschätzung der pharmazeutischen Eigenschaften und Interaktionen der Partikelformulierungen mit biologischen Systemen wurden die folgenden *in vitro*-Untersuchungen durchgeführt:

- Die Freisetzung von Desmopressin aus den Partikelformulierungen wurde bei unterschiedlichen pH-Werten über einen Zeitraum von bis zu 48 Stunden untersucht.
- Weiterhin wurden Tests zur Beurteilung des Einflusses der Formulierungen auf die Viabilität von Caco-2 Zellen durchgeführt. Anhand dieser Daten erfolgte eine erste toxikologische Beurteilung der neuen Polymere und der Partikelformulierungen.
- Die Zellaufnahme fluoreszenzmarkierter Partikel wurde mit *in vitro*-kultivierten HeLa und Caco-2 Zellen getestet und mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet.
- Der Wirkstoff- und Partikeltransport durch ein Epithel wurde von verschiedenen Projektpartnern mit unterschiedlichen *in vitro*-Zellkulturmodellen untersucht.

4.1.6.1 Untersuchung der Wirkstofffreisetzung

Die Freisetzung des Modellpeptids Desmopressin aus den Formulierungen mit PEA Polymeren wurde untersucht, indem eine genau gewogene Menge der getrockneten Formulierung in einem definierten Volumen Freisetzungsmedium dispergiert und bei einer Temperatur von 37 °C mit einem Magnetrührer mit 500 UpM gerührt wurde. Als Freisetzungsmedium wurde 0,1 molare Salzsäure und ein PBS Puffer mit einem pH-Wert von 6,8 verwendet. Die Herstellung des Puffers erfolgte gemäß der Vorschrift des Europäischen Arzneibuchs. Die Zeitpunkte der Probenahme werden bei der Beschreibung der jeweiligen Ergebnisse angegeben. Zum jeweiligen Zeitpunkt wurde 1 ml der Partikelsuspension entnommen und in einem Eppendorf Tube für 5 min bei 13.000 rcf zentrifugiert. Zur Bestimmung des Wirkstoffgehalts per HPLC wurden 500 µl des Überstandes abgezogen. Die entnommene Partikelprobe wurde nach Entnahme des Überstandes mit 500 µl frischem Puffer aufgefüllt und der Freisetzungslösung wieder zugeführt. Es wurden Freisetzungstests bis zu einer maximalen Dauer von 48 Stunden durchgeführt.

4.1.6.2 Toxikologische Untersuchungen – Viabilität von Caco-2 Zellen

Zur ersten toxikologischen Charakterisierung der neuen Polymere und der Partikelformulierungen wurde die Viabilität kultivierter Dickdarmkarzinomzellen (Caco-2) nach Inkubation mit den jeweiligen Proben gemessen.

Die Viabilität von Zellen kann anhand der Konzentration bestimmter Substanzen wie beispielsweise ATP, NADH, NADPH oder Succinat-Dehydrogenase bestimmt werden. Die Konzentration dieser Substanzen wird üblicherweise durch Zugabe von Farbreagenzien gemessen, die eine konzentrationsabhängige Farbreaktion mit diesen eingehen. Das Ausmaß dieser Reaktion wird mittels UV-Spektroskopie ermittelt und lässt Rückschlüsse auf die Überlebensrate der Zellen zu. Der erstmalig im Jahre 1983 von Mosmann beschriebene MTT Test beruht auf der Umsetzung des wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (kurz: MTT) zu einem blau-violett gefärbten wasserunlöslichen Formazan¹²⁹. Der außerdem verwendete CellTiter-Glo Test generiert ein messbares Lumineszenzsignal, das proportional zur ATP Konzentration ist. Diese stellt wiederum einen Indikator der metabolischen Aktivität von Zellen dar und erlaubt somit die Ermittlung der Anzahl lebender Zellen.

Für die Tests wurden Caco-2 (ACC169) *human colon adenocarcinoma* Zellen von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) verwendet. Weitere verwendete Substanzen und Puffer sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9 Für MTT und CellTiter-Glo Viabilitätstests benötigte Substanzen.

Medium	Charge	Caco-2	Caco-2 MTT
MEM with Earle`s salts, L-Glu, phenol ohne Sodium Pyruvate	1228405	500 ml	500 ml
MEM with Earle`s salts, L-Glu, phenol ohne Sodium Pyruvate			500 ml
Supplements			
Pen/Strep 5,000u pen, 5,000 µg strep/ml (100x) 100 ml	1092595	5 ml	5 ml
Sodium Pyruvate MEM 100 mM (100x) 100 ml	898584	5 ml	5 ml
FBS (500ml)	41A1312K	100 ml	---
NEAA / non-essential amino acids (100x) 100 ml	89856	5 ml	5 ml
1 × 10ml CellTiter-Glo® Puffer			
1 vial CellTiter-Glo® Substrat (lyophilisiert)			
Testkit Aqueous One Solution MTS, MTS-Lösung			
Positivkontrolle			
Digitonin Stammlösung: 30 mg/ml	150 µg/ml		

Die Caco-2 Zellen wurden am Tag vor Durchführung der Tests in eine weiße und eine klare 96-well Platte mit 100 µl Medium pro Well ausgebracht.

Als Negativkontrolle wurden Zellen nur mit Medium verwendet. Die Proben wurden in Triplets gemessen. Für jede Verdünnung wurde jeweils ein Well ohne Zellen als Hintergrund mitgemessen und bei der Auswertung von den Werten abgezogen.

Nach 24 Stunden wurde das Medium abgesaugt, durch die Testsubstanzen ersetzt und für weitere 24 Stunden inkubiert. Die Proben wurden in Medium gelöst, sodass sich eine Polymerkonzentration von 2 mg/ml ergab. Neben den Partikelformulierungen wurde reines Polymer und reines Desmopressinacetat getestet.

Es wurde eine Verdünnungsreihe der Partikelproben hergestellt (1:2, 1:10, 1:50).

Digitonin wurde zum Gebrauch 1:200 verdünnt und erst ca. 1 Stunde vor Zugabe der Reagenzien hinzugefügt.

MTT-Assay

1. Das Medium bzw. die Testlösung aus den Wells absaugen.
2. Anschließend durch 100 µl einer Mischung aus 5 Volumenanteilen Medium MTT zu 1 Volumenanteil MTS-Reagenz das Medium ersetzen (MTS-Reagenz Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay; Master Mix ansetzen aus 100 µl Medium und 20 µl MTS-Reagenz pro Well).
3. Inkubation für max. 120 min bei 37 °C und 5% CO₂.
4. Die resultierende Farbreaktion anschließend am Multiplattenreader durch Messung der Absorption bei 492 nm auslesen.

CellTiter-Glo-Assay

1. CellTiter-Glo Substrat und CellTiter-Glo Puffer auftauen und bei Raumtemperatur equilibrieren.
2. Den Puffer zum Substrat geben und mischen durch Invertieren oder vorsichtig vortexen = CellTiter-Glo Reagenz (stabil bei -20 °C für max. 3 Wochen)
3. 96-Well-Platte 30 Min bei Raumtemperatur equilibrieren.
4. CellTiter-Glo Reagenz in gleichen Volumenanteilen zu dem ausgebrachten Medium in die Wells dazugeben (z.B. bei 100µl Medium=100µl Reagenz) und 2 min im Multiplattenreader orbital mischen.
5. 10 min bei Raumtemperatur stehen lassen, bis das Lumineszenzsignal stabil ist.
6. Messung der Lumineszenz im Multiplattenreader (Integrationszeit 0.25-0,1 s/Well).

4.1.6.3 Partikelaufnahme in HeLa und Caco-2 Zellen

Die Aufnahme der formulierten Nanopartikel in HeLa und Caco-2 Zellen wurde von unterschiedlichen Partnern des PeTrA Konsortiums untersucht. Daher werden die Testsysteme in der vorliegenden Arbeit nur zusammenfassend und unmittelbar mit der Darstellung der Ergebnisse in Kapitel 4.7.1 beschrieben.

4.1.6.4 Resorptionsstudien an Caco-2-Zellmodellen

Für die Resorptionsstudien gilt das Gleiche wie für die Partikelauftahmetests. Die zusammenfassende Beschreibung des Testsystems erfolgt in Kapitel 4.7.1 unmittelbar vor der Darstellung der Ergebnisse.

4.1.7 In vivo-Charakterisierung der Formulierungen

Die *in vivo*-Untersuchung der Bioverfügbarkeit der Desmopressin Formulierungen wurde am Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig durchgeführt. Für die Untersuchungen wurden schwarze Mäuse des Stammes C57BL/6 verwendet.

4.1.7.1 In vivo-Untersuchung der Bioverfügbarkeit

Untersucht wurde die Bioverfügbarkeit von Desmopressin sowohl für die orale als auch für die rektale Gabe der Desmopressin Partikelformulierungen mit PEA Cystein, PLGA mit hLF-Beschichtung und PLGA ohne hLF-Beschichtung.

Um später anhand der Ergebnisse die absolute Bioverfügbarkeit der Formulierungen bestimmen zu können, wurden zunächst 200 µl einer Lösung von 20 µg Desmopressinacetat in Wasser für Injektionszwecke intravenös injiziert. Die Blutentnahme zur Bestimmung des

Plasmaspiegels von Desmopressin mittels HPLC Methode erfolgte nach 0,5h, 1h, 2h und 4h. Für jeden Zeitpunkt wurden jeweils 3 Tiere verwendet (n=3).

Zur oralen und rektalen Verabreichung wurde jeweils eine genau gewogene Menge der Partikelformulierungen in Wasser suspendiert, sodass 250 µl dieser Suspension 15 µg Desmopressinacetat enthielten. Die resultierende Partikelkonzentration der jeweils peroral bzw. rektal applizierten Suspensionen lag je nach Formulierung zwischen 2 und 3 mg/ml. Es wurden jeweils 250 µl der Suspension, das heißt 15 µg Desmopressin pro Dosis, oral bzw. rektal verabreicht. Die Applikation erfolgte jeweils mithilfe einer Knopfkanüle. Für die perorale Gabe wurde die Kanüle bis in den oberen Teil der Speiseröhre eingeführt, sodass die Maus weitgehend selbstständig durch den ausgelösten Schluckreflex die Probe aufnimmt. Die rektale Gabe erfolgte durch Einführen der Knopfkanüle in den Anus.

Für alle getesteten Partikelformulierungen wurden zur Ermittlung der Plasmasiegelkurven jeweils nach peroraler und rektaler Gabe Proben nach 0,5h, 1h, 2h und 4h genommen. Bei der peroralen Applikation der Formulierung von Desmopressin mit PEA Cystein wurde eine zusätzliche Probe nach 8h entnommen. Für jeden Probenzeitpunkt wurden jeweils drei Tiere verwendet (n=3).

4.2 Evaluation der Doppelemulsionsmethode

Dass die Doppelemulsionsmethode sehr gut zur Verkapselung von hydrophilen Wirkstoffen in eher lipophile Materialien wie beispielsweise PLGA geeignet ist, wurde in der Vergangenheit bereits mehrfach gezeigt^{121,122}. Jang et al. optimierten diese Methode im Hinblick auf die Verkapselungseffizienz von Wirkstoffen der BCS Klasse III¹²². Eine exakt vorhersagbare und gut reproduzierbare Einstellung der Partikelgröße bei sehr niedrigem Polydispersitätsindex der Partikelgrößenverteilung (PDI) von weniger als 0,05 sowie die Bereitstellung eines lagerstabilen Produktes stellen jedoch nach wie vor eine große Herausforderung dar.

In den folgenden Abschnitten dieses Kapitels wird beschrieben, wie der Prozess der Doppelemulsionsmethode gesteuert werden kann, um die Größe von Polymerpartikeln aus Resomer[®] RG 503 H reproduzierbar innerhalb enger Grenzen einzustellen und wie durch Trocknung der Nanosuspension ein vollständig redispersierbares und lagerstabiles Produkt gewonnen werden kann.

Abschließend erfolgt eine kurze Bewertung der Verfahren bezüglich ihrer Verwertbarkeit für eine industrielle Produktion von Polymernanopartikeln.

4.2.1 Theorie und Grundlagen der Hochdruckhomogenisation

Da in Kapitel 4.2 die Doppelemulsionsmethode schwerpunktmäßig im Hinblick auf die Verwendung eines Hochdruckhomogenisators untersucht werden soll, folgt zunächst eine kurze Einführung in die Grundlagen dieser Homogenisierungsmethode.

Die Hochdruckhomogenisation ist ein Verfahren zur Herstellung besonders feiner Dispersionen mit hoher Stabilität. Sie eignet sich zur Homogenisierung von Suspensionen (disperse Phase ist fest und kontinuierliche Phase ist flüssig) und Emulsionen (disperse Phase und kontinuierliche Phase sind flüssig aber nicht miteinander mischbar). Das Verfahren wurde erstmals auf der Pariser Weltausstellung in 1900 zur Verarbeitung von Milch vorgestellt. Heute wird es in der Lebensmittelindustrie im Großmaßstab eingesetzt, um das Aufrahmen der Fettphase in der Milch zu verhindern. In der pharmazeutischen Industrie wird das Verfahren beispielsweise zur Herstellung von Fettemulsionen für die parenterale Ernährung genutzt¹³⁰.

Bei der Hochdruckhomogenisation wird eine vorgemischte Dispersion mit hohem Druck durch einen schmalen Spalt oder einen engen Kanal gepresst, wodurch hohe Scherkräfte entstehen, die zur Zerkleinerung der inneren Phase führen. Außerdem kommt es aufgrund des verengten Leitungsdurchmessers zur Erhöhung der Strömungsgeschwindigkeit der Dispersion, wodurch der dynamische Druck in diesem Bereich stark ansteigt. Da die Summe aus statischem und dynamischem Druck nach Bernoulli konstant ist, führt dies zu einem enormen Absinken des statischen Drucks. Unterschreitet dieser dabei den Dampfdruck der kontinuierlichen Phase, so bilden sich Gasblasen. Im Anschluss an die Interaktionskammer nimmt der Leitungsquerschnitt wieder zu und es kommt zu einem Anstieg des statischen Drucks. Dabei kommt es zur Implosion der Gasblasen, was zu einer weiteren Zerkleinerung der inneren Phase führt. Dieses Phänomen wird auch als Kavitation bezeichnet.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit einem Microfluidizer der Firma Microfluidics International Corp. gearbeitet. Der Aufbau dieses Gerätes wird schematisch in Abbildung 12 links dargestellt. Das Gerät besteht aus einem Probenvorratsbehälter am Produkteinlass, einer Hochdruckkolbenpumpe, die Drücke bis zu 2750 bar erzeugen kann, einem Manometer zur Druckkontrolle, einer Interaktionskammer bzw. Homogenisierungszone, einer Kühlspirale, die in ein Wasserbad eingebettet ist, und einem Produktauslass.

Der Hersteller bezeichnet dieses Gerät nicht als „high pressure homogenizer“ (zu Deutsch: Hochdruckhomogenisator) sondern vielmehr als „high shear fluid processor“, um eine Abgrenzung zu herkömmlichen Hochdruckhomogenisatoren deutlich zu machen. Diese Abgrenzung wird damit begründet, dass der Microfluidizer mit einer ganz speziellen Interaktionskammer ausgestattet sei, die eine besonders enge Partikelgrößenverteilung der

hergestellten Partikel ermögliche. Dies wird laut Herstellerangaben dadurch erreicht, dass die Homogenisierung in der Kammer bei konstantem Druck abläuft und nicht den üblichen periodischen Schwankungen unterliegt. Die verwendete Z-Typ Interaktionskammer aus Diamant wird in Abbildung 12 rechts schematisch dargestellt.

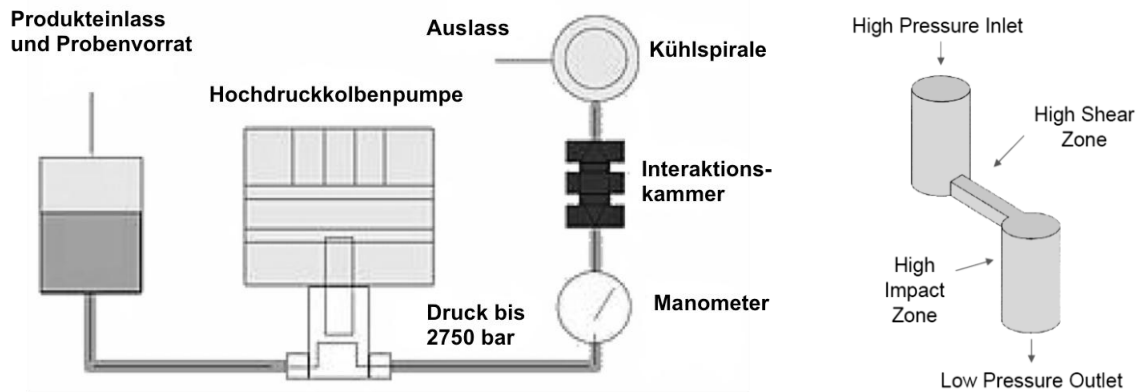


Abbildung 12 Links: Schematische Darstellung des Microfluidizers, © Adams Industrievertretungen; rechts: Schematische Darstellung der Z-Typ Interaktionskammer, © Microfluidics International Corp.

Die Größe der im Prozess erzeugten Emulsionstropfen ist abhängig von der in der Interaktionskammer eingesetzten Leistungsdichte. Diese setzt sich zusammen aus dem Energieeintrag durch die Kolbenpumpe, der wiederum vom Arbeitsdruck abhängig ist, und der Homogenisierungszeit bzw. der Anzahl der Durchläufe. Sie wird bei Hochdruckhomogenisatoren in der Regel auf das Volumen bezogen und trägt die Einheit W/m^3 . Beim Microfluidizer lässt sich also durch Variation des Arbeitsdruckes oder der Anzahl der Durchläufe die volumenbezogene Leistungsdichte und damit die Tropfengröße einstellen.

Die immense Vergrößerung der Oberfläche der dispersen Phase durch die Homogenisierung führt zu einem drastischen Anstieg der Oberflächenenergie. Um eine Koagulation der Emulsionstropfen zu verhindern, müssen Stabilisatoren zur Verringerung der Oberflächenspannung eingesetzt werden. Die Oberfläche wird bereits beim ersten Durchlauf so enorm vergrößert, dass die an der Grenzfläche angereicherten Tensidmoleküle nicht ausreichen, um die neu entstandenen Emulsionstropfen zu stabilisieren. Weitere Tensidmoleküle aus der kontinuierlichen Phase können nicht schnell genug in die Phasengrenzfläche nachwandern, um ein Zusammenfließen einiger Emulsionstropfen bzw. eine Aggregation von Partikeln zu verhindern. Um eine optimale Verteilung und Anreicherung des Stabilisators in der Phasengrenzfläche zu erreichen, sind aus diesem Grund stets mehrere Durchläufe der Dispersion durch das Gerät notwendig.

4.2.2 Steuerung der Partikelgröße bei der Doppalemulsionsmethode

Aus der Einleitung zu Kapitel 4 geht klar hervor, dass eine exakte und reproduzierbare Einstellung der Partikelgröße bei möglichst schmaler Partikelgrößenverteilung eine wesentliche Anforderung an die Herstellungsmethode von Nanopartikeln für pharmazeutische Anwendungen darstellt. Im folgenden Abschnitt wurde daher genauer untersucht, wie bei der Doppalemulsionsmethode die Partikelgröße zuverlässig eingestellt werden kann.

Die resultierende Größe der festen Polymerpartikel ist bereits durch die Tropfengröße der dispersen polymerhaltigen organischen Phase determiniert. Diese kann wiederum unmittelbar durch Auswahl der Homogenisierungsmethode und durch Variation der Prozessparameter bei der Homogenisierung beeinflusst werden. Beim Microfluidizer sind dies der Arbeitsdruck und die Anzahl der Durchläufe. Da der Arbeitsdruck eine kontinuierliche Regelgröße darstellt, sollte dieser Faktor bei der Einstellung der Partikelgröße gegenüber der Variation der Durchläufe, die eine diskrete Regelgröße darstellt, vorgezogen werden. Außerdem dient das Durchlaufen mehrerer Zyklen wie bereits oben beschrieben dazu, dass die zur Stabilisierung der Grenzfläche benötigten Tensidmoleküle aus der kontinuierlichen Phase in die Grenzfläche einwandern und sich optimal verteilen können. Eine zu geringe Anzahl an Zyklen führt zu einer teilweisen Koagulation oder Aggregation der dispersen Phase und damit zu einem größeren mittleren Partikeldurchmesser¹³¹. Eine anteilige Aggregation von Partikeln geht jedoch stets auch mit einer Erhöhung der Polydispersität einher, was nicht gewünscht ist. Aus diesem Grund stellt der Arbeitsdruck zweifelsfrei die optimale Regelgröße zur Steuerung der Partikelgröße mit dem Microfluidizer dar und eine Variation der Anzahl an Zyklen ist nicht empfehlenswert. In der Fachliteratur schwankt die empfohlene Anzahl der Durchläufe zur Herstellung von PLGA Partikeln mit einem Microfluidizer zwischen 3¹³¹ und 25¹³². Nach genauerem Studium der Literatur wurde die Anzahl der Zyklen auf 5 festgelegt und bei allen durchgeführten Versuchen konstant gehalten.

Beim Ultra-Turrax können Rotordrehzahl und Dispergierzeit variiert werden, um die Tropfengröße zu beeinflussen.

Die resultierende Partikelgröße wird außerdem durch die Stabilität der Emulsion im direkten Anschluss an die Homogenisierung beeinflusst. Da diese unter anderem von der Konzentration der Stabilisatoren abhängt, ist davon auszugehen, dass die eingesetzte Menge an Stabilisator ebenfalls einen Einfluss auf die Partikelgröße hat. Der Einfluss dieses Parameters wurde bei beiden Homogenisierungsmethoden untersucht.

In Bezug auf die spätere Anwendung der Formulierung sind alle Bemühungen um eine exakte Einstellung der Partikelgröße jedoch nur dann zielführend, wenn bei weiteren Herstellungsschritten eine Aggregation der Primärpartikel oder eine anderweitig geschuldete

Veränderung der Partikelgröße ausgeschlossen wird. Daher wurden auch alle anschließenden Herstellungsschritte hinsichtlich ihres Einflusses auf die Partikelgröße untersucht und optimiert.

4.2.2.1 Homogenisation

Im folgenden Abschnitt wurde genauer untersucht, wie durch Variation von ausgewählten Prozessparametern bei der Homogenisation die Partikelgröße gezielt eingestellt werden kann. Die Hochdruckhomogenisation wurde anschließend mit der Rotor-Stator Homogenisierung als Standardmethode verglichen.

Hochdruckhomogenisation mit Microfluidizer

Nanopartikel aus Resomer[®] RG 503 H wurden wie in Kapitel 4.1.1 im Abschnitt *Doppelemulsionsmethode* beschrieben unter Verwendung des Microfluidizers hergestellt. Der Einfluss des Arbeitsdruckes und der PVA Konzentration auf die Partikelgröße wurde durch Variation dieser beiden Parameter untersucht. Dazu wurden 5 unterschiedliche PVA Konzentrationen bei jeweils gleichem Arbeitsdruck von 1.000 bar und weitere 5 unterschiedliche Arbeitsdrücke bei jeweils konstanter PVA Konzentration von 0,8% getestet. Als Ergebnis wird der Mittelwert des mittleren Partikeldurchmessers aus je drei Wiederholungen angegeben (n=3). Die Partikelgrößenmessung erfolgte jeweils nach dem Abziehen des Lösungsmittels und dem Verdünnen mit destilliertem Wasser. Die Ergebnisse wurden in Tabelle 10 zusammengefasst und in den Abbildung 13 und Abbildung 14 grafisch aufgetragen. Die Konzentrationsangaben für den Stabilisator in Prozent beziehen sich auf den Massenanteil von PVA an der Gesamtmasse der wässrigen W₂-Phase.

Tabelle 10 Homogenisierung mit dem Microfluidizer; DLS Partikelgrößenmessungen: Mittlerer Partikeldurchmesser in Abhängigkeit von Arbeitsdruck und PVA Konzentration; Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen (n=3).

PVA Konz. [%]	Arbeitsdruck [bar]	Mittlerer Partikeldurchmesser [nm] (Standardabweichung [nm])
2,5	1000	125 (8,3)
0,8	1000	126 (11,3)
0,5	1000	176 (18,6)
0,3	1000	230 (20,4)
0,1	1000	430 (14,6)
0,8	250	171 (16,7)
0,8	500	148 (12,8)
0,8	750	135 (10,8)
0,8	1250	111 (10,6)
0,8	1500	105 (8,4)

Unter Verwendung des Microfluidizers zur Homogenisierung lag der mittlere Partikeldurchmesser in Abhängigkeit von der PVA Konzentration und dem Arbeitsdruck zwischen 105 nm und 430 nm. Die mittlere Standardabweichung betrug 14,1 nm ($\pm 4,9$ nm) und der durchschnittliche Polydispersitätsindex (PDI) der Partikelgrößenverteilung betrug 0,018 ($\pm 0,008$). Der PDI war stets kleiner als 0,03. Daher wurde auf eine Angabe der Werte zu jedem einzelnen Versuch verzichtet.

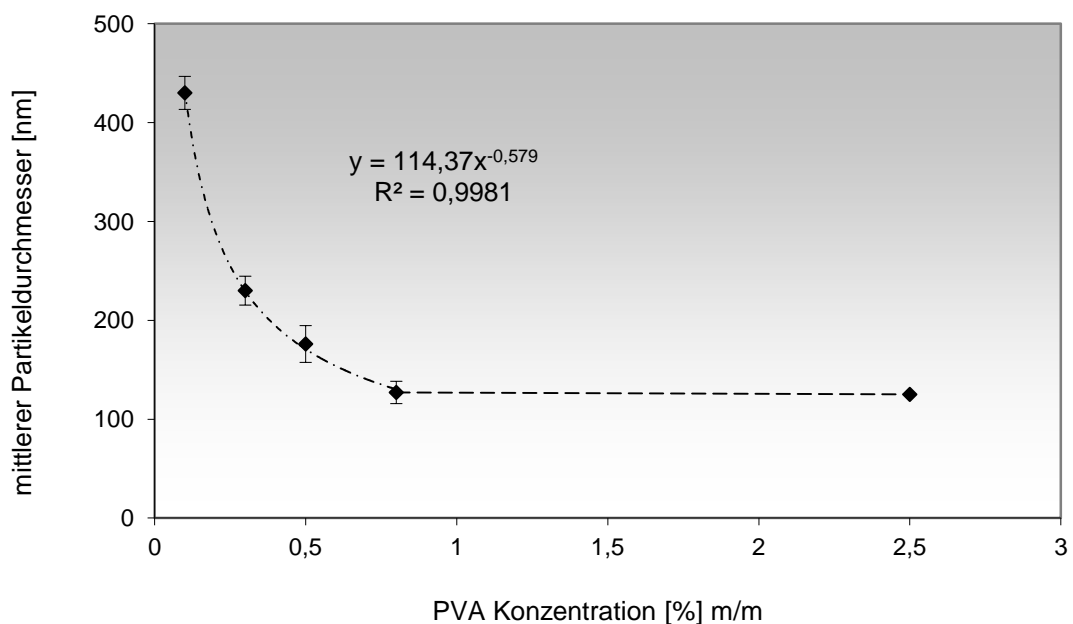


Abbildung 13 Homogenisierung mit Microfluidizer; DLS Partikelgrößenmessungen: Auftragung mittlerer Partikeldurchmesser in Abhängigkeit von der PVA Konzentration; Arbeitsdruck konstant 1.000 bar.

Im Bereich zwischen 0,1% und 0,8% wirkte sich eine Änderung der PVA Konzentration deutlich auf die Partikelgröße aus, wohingegen eine Erhöhung von 0,8% auf 2,5% keine signifikante Verringerung der Partikelgröße mehr bewirkte (siehe Abbildung 13). Die Abhängigkeit der Partikelgröße y von der PVA Konzentration x lässt sich für den Bereich von 0,1% bis 0,8% sehr gut mit der Potenzfunktion $y = 114,37x^{-0,579}$ beschreiben ($R^2=0,998$). Der Partikeldurchmesser wird mit steigender PVA Konzentration bis 0,8% geringer und bleibt für weiter steigende PVA Konzentrationen annähernd konstant. Die bei einem Arbeitsdruck von 1.000 bar kleinste zu erzielende Partikelgröße liegt bei 125 nm.

Aus dem Ergebnis geht hervor, dass die Partikelgröße nur bis zu einer bestimmten maximalen PVA Konzentration von diesem Faktor abhängig ist. Für einen Arbeitsdruck von 1.000 bar liegt dieses Maximum bei ca. 0,8%.

Diese Beobachtung kann dadurch erklärt werden, dass zur Stabilisierung der Emulsionstropfen, die bei einem Arbeitsdruck von 1.000 bar entstehen, eine PVA Konzentration von mindestens 0,8% benötigt wird. Geringere Mengen an PVA reichen nicht aus, um die Phasengrenzfläche ausreichend zu stabilisieren und es kommt zur Koagulation von Emulsionstropfen und damit zu einem größeren Partikeldurchmesser.

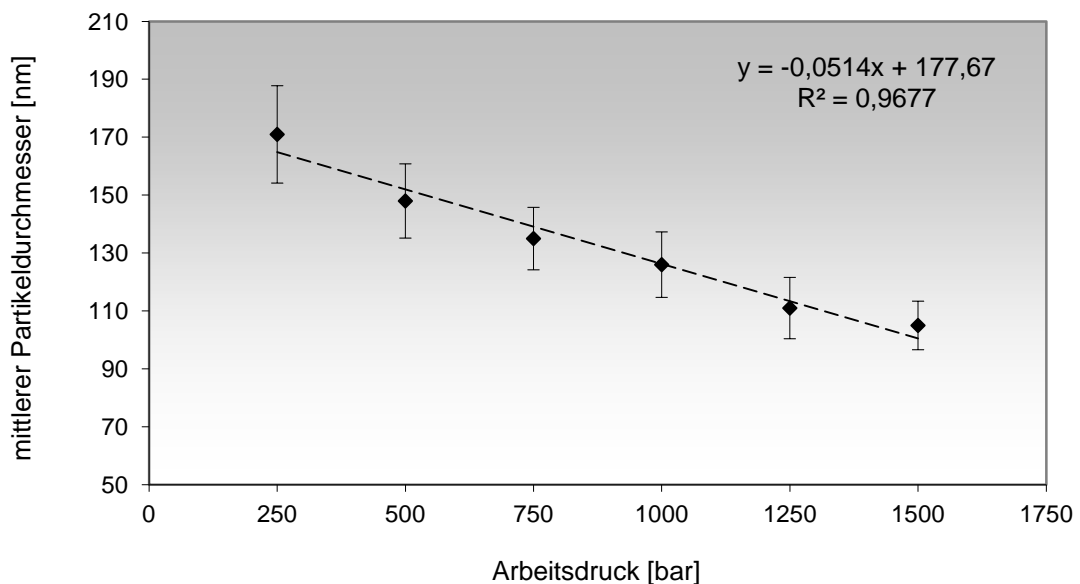


Abbildung 14 Homogenisierung mit Microfluidizer; DLS Partikelgrößenmessung: Auftragung mittlerer Partikeldurchmesser in Abhängigkeit vom Arbeitsdruck; PVA Konzentration 0,8%; lineare Regression.

Durch eine Erhöhung des Arbeitsdruckes auf über 1.000 bar sind bei einer PVA Konzentration von 0,8% auch Partikelgrößen unterhalb von 125 nm zu erzielen. Der annähernd lineare Zusammenhang zwischen Partikelgröße und Arbeitsdruck

(Abbildung 14) bestätigt die Annahme, dass die Partikelgröße bei einer ausreichend vorhandenen Menge an Stabilisator im Wesentlichen vom Arbeitsdruck abhängt. Bis zu einem maximalen Druck von 1.000 bar beträgt die zur vollständigen Stabilisierung der Emulsionstropfen benötigte PVA Konzentration 0,8%. Durch lineare Regression wurde der folgende Zusammenhang zwischen der Partikelgröße y und dem Arbeitsdruck x bei einer PVA Konzentration von 0,8% gefunden:

$y = -0,0514x + 177,67$. Der Korrelationskoeffizient für die lineare Regression beträgt 0,968. Mithilfe dieser Gleichung kann bei einer konstanten PVA Konzentration von 0,8% die Partikelgröße für einen beliebigen Arbeitsdruck zwischen 250 und 1.500 bar vorhergesagt werden.

Da bei der Herstellung mit dem Microfluidizer die Abhängigkeit der Partikelgröße oberhalb einer Mindestkonzentration an Stabilisator im Wesentlichen vom Arbeitsdruck abhängt und für diesen Zusammenhang eine lineare und damit gut kalkulierbare Funktion angenommen werden kann, ist eine Einstellung der Partikelgröße im Bereich zwischen 105 nm und 171 nm durch Variation des Druckes bei konstanter PVA Konzentration von 0,8% zu empfehlen. Wegen des Anstiegs der Standardabweichung der Partikelgröße bei sinkendem Arbeitsdruck werden Drücke unterhalb von 250 bar nicht empfohlen. Partikeldurchmesser oberhalb von 171 nm können durch Verringerung der PVA Konzentration unter 0,8% bei einem Druck von 1.000 bar bis zu einer Größe von 430 nm sehr gut reproduzierbar hergestellt werden.

Rotor-Stator Homogenisierung mit Ultra-Turrax

Es wurden weiterhin Nanopartikel aus Resomer[®] RG 503 H wie in Kapitel 4.1.1 unter *Doppелеmulsionsmethode* beschrieben unter Verwendung des Ultra-Turrax zur Homogenisierung hergestellt. Durch Variation der Rotationsgeschwindigkeit und der PVA Konzentration wurde der Einfluss dieser beiden Faktoren auf die Partikelgröße und den Polydispersitätsindex der Partikelgrößenverteilung untersucht. Es wurden Versuche mit Rotationsgeschwindigkeiten zwischen 10.000 und 18.000 UpM und PVA Konzentrationen zwischen 0,5 und 2,5% durchgeführt. Alle Versuche wurden 3 Mal durchgeführt (n=3). Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11 Homogenisierung mit dem Ultra-Turrax; DLS Partikelgrößenmessungen: Mittlerer Partikeldurchmesser in Abhängigkeit von Rotationsgeschwindigkeit und PVA Konzentration; Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen (n=3).

UpM	PVA Konz. [%]	Partikeldurchmesser [nm] / PDI
10.000	0,6	629 ± 77 / 0,383
14.000	0,5	278 ± 57 / 0,024
14.000	0,6	246 ± 46 / 0,023
14.000	0,8	235 ± 48 / 0,033
14.000	2,5	150 ± 34 / 0,043
18.000	0,8	221 ± 38 / 0,021

Bei Verwendung des Ultra-Turrax zur Homogenisierung der Emulsionen wurden Partikelgrößen zwischen 150 nm und 629 nm erzielt.

Der mittlere Partikeldurchmesser von 629 nm resultierte bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 10.000 UpM und einer PVA Konzentration von 0,6%. Der PDI bei diesem Versuch von 0,383 war deutlich höher als bei allen Versuchen mit höheren Rotationsgeschwindigkeiten. Auch die Standardabweichung war hier mit ± 77 nm am größten.

Die mittlere Standardabweichung bei den Versuchen mit 14.000 UpM betrug 46,25 nm ($\pm 8,2$ nm) und der mittlere PDI lag bei 0,031 ($\pm 0,008$). Durch Variation der PVA Konzentration konnte die Partikelgröße bei konstanter Rotationsgeschwindigkeit von 14.000 UpM zwischen 150 nm und 278 nm variiert werden. Mit steigenden PVA Konzentrationen nimmt die Partikelgröße ab. Bei allen Versuchen mit einer Rotationsgeschwindigkeit von 14.000 UpM war der PDI kleiner als 0,05.

Durch Erhöhung der Rotationsgeschwindigkeit von 14.000 UpM auf 18.000 UpM bei gleichbleibender PVA Konzentration von 0,8% konnte der mittlere Partikeldurchmesser nur geringfügig um 14 nm reduziert werden. Bei drei durchgeführten Versuchen lag die Differenz der mittleren Partikelgröße noch innerhalb der Standardabweichung. Die Erhöhung der Rotationsgeschwindigkeit führte lediglich durch stärkere Erwärmung der Probe zu einer höheren Produktbeanspruchung und eignete sich weniger zur Einstellung der Partikelgröße.

Eine 5 minütige Homogenisierung mit einer Rotationsgeschwindigkeit von 10.000 UpM ist ungeeignet, da die Partikelgrößenverteilung deutlich zu breit war (PDI 0,383). Durch Verlängerung der Homogenisierungszeit könnte das Ergebnis voraussichtlich verbessert werden, dies wurde jedoch wegen der stärkeren Erwärmung

der Probe nicht in Erwägung gezogen. Dass bei diesem Versuch die geringe PVA Konzentration von 0,6% für den hohen PDI verantwortlich war, kann ausgeschlossen werden, da in einem anderen Versuch bereits 0,5% PVA ausreichend waren, um Partikel der Größe von 278 nm sehr gut zu stabilisieren (PDI 0,024). Da die Erhöhung der Drehzahl von 14.000 UpM auf 18.000 UpM keinen Vorteil brachte, wird als optimales Ergebnis eine Rotationsgeschwindigkeit von 14.000 UpM festgehalten. Die Einstellung der Partikelgröße durch Variation der Rotationsgeschwindigkeit ist nicht empfehlenswert. In den anschließenden Vergleich mit der Hochdruckhomogenisation fließen ausschließlich die Ergebnisse mit 14.000 UpM ein.

Vergleich zwischen Microfluidizer und Ultra-Turrax

Beide Homogenisierungsverfahren eigneten sich zur Herstellung von Nanopartikeln aus Resomer[®] RG 503 H innerhalb des angestrebten Größenbereichs zwischen 200 nm und 500 nm. Durch Verwendung des Microfluidizers konnte ein Bereich zwischen 105 nm und 430 nm bedient werden, mit dem Ultra-Turrax konnten Partikel mit einer engen Größenverteilung lediglich zwischen 150 nm und 278 nm hergestellt werden.

Darüber hinaus bietet die Hochdruckhomogenisation mit dem Microfluidizer gegenüber der Verwendung eines Ultra-Turrax noch einige weitere Vorteile: Die mittlere Standardabweichung des Partikeldurchmessers betrug beim Ultra-Turrax 46,25 nm ($\pm 8,2$ nm) und beim Microfluidizer 13,0 nm ($\pm 3,05$ nm). Dies bedeutet, dass durch Verwendung des Microfluidizers anstelle eines Ultra-Turrax die Reproduzierbarkeit deutlich gesteigert werden konnte. Folglich kann die Partikelgröße mit dem Microfluidizer präziser eingestellt werden als mit dem Ultra-Turrax.

Weiterhin ist der durchschnittliche PDI beim Microfluidizer mit 0,018 ($\pm 0,008$) niedriger als beim Ultra-Turrax mit 0,031 ($\pm 0,008$). Demzufolge ist die Partikelgrößenverteilung bei der Hochdruckhomogenisation etwas schmäler als bei der Rotor-Stator Homogenisierung.

Ein möglichst sparsamer Einsatz von Stabilisatoren in pharmazeutischen Produkten ist grundsätzlich erstrebenswert. Daher sollten vorzugsweise Methoden eingesetzt werden, die eine effiziente Nutzung des Stabilisators ermöglichen. Im Vergleich der beiden Homogenisierungsmethoden miteinander fällt auf, dass bei der Verwendung des Microfluidizers deutlich geringere Mengen an Stabilisator benötigt wurden als beim Ultra-Turrax. Beim Microfluidizer ist eine PVA Konzentration von 0,8% bereits ausreichend, um Nanopartikel mit einem mittleren Partikeldurchmesser von 105 nm zu stabilisieren. Die kleinsten Partikel, die bei dieser Konzentration mit dem Ultra-Turrax

selbst bei einer erhöhten Drehzahl von 18.000 UpM hergestellt werden konnten, hatten einen mittleren Partikeldurchmesser von 221 nm. Um Partikel mit einem Durchmesser von 150 nm herstellen zu können, mussten beim Ultra-Turrax 2,5% PVA eingesetzt werden. Bei anderen in der Fachliteratur beschriebenen Herstellungsverfahren von Doppelemulsionen sind solche Konzentrationen ebenfalls üblich. Die Homogenisierung von Doppelemulsionen mit Ultraschallsonden wird beispielsweise mit PVA Konzentrationen zwischen 2% und 5% beschrieben^{133,134}. Ein möglicher Erklärungsansatz für dieses Phänomen ist, dass bei der Hochdruckhomogenisation der Stabilisator effektiver in der Phasengrenzfläche angereichert wird als bei der Rotor-Stator Homogenisierung. Die Hochdruckhomogenisation trägt demzufolge zu einem sparsamen Einsatz von Stabilisatoren bei der Herstellung nanopartikulärer pharmazeutischer Formulierungen bei.

Im Hinblick auf die Reinheit und die pharmazeutische Qualität der Produkte soll außerdem darauf hingewiesen werden, dass bei der Hochdruckhomogenisation keine rotierenden Metallteile mit der Probe in Berührung kommen. Damit kann eine Verunreinigung durch eventuellen Metallabrieb von rotierenden Teilen ausgeschlossen werden.

Da beim Ultra-Turrax das Homogenisierungsergebnis auch von der Durchmischung der Emulsion und damit vom eingesetzten Volumen abhängt, ist eine Übertragung auf einen größeren Maßstab voraussichtlich nicht ohne weiteres möglich. Beim Microfluidizer hat das Gesamtvolumen der Emulsion bei guter Vorhomogenisierung der Probe keinen wesentlichen Einfluss auf den Homogenisierungsprozess, der in der Prozesskammer unter konstanten Bedingungen abläuft. Es verlängert sich lediglich die zum Durchlauf der Emulsion benötigte Zeit. Bei Verwendung der gleichen Interaktionskammer ist eine Durchführung des Prozesses in größeren Maßstäben direkt möglich.

Als Ergebnis der Evaluation der beiden Homogenisierungsmethoden kann festgehalten werden, dass die Hochdruckhomogenisation mit einem Microfluidizer die optimale Methode zur reproduzierbaren und exakten Einstellung der Partikelgröße bei der Doppelemulsionsmethode ist und entscheidende Vorteile gegenüber der Verwendung herkömmlicher Homogenisierungsmethoden wie beispielsweise der Rotor-Stator Homogenisierung mit einem Ultra-Turrax bietet.

4.2.2.2 Aufreinigung

Nach der Herstellung enthalten die Suspensionen neben den Polymerpartikeln noch überschüssige Mengen an Stabilisatoren. Da diese in der fertigen Formulierung nicht mehr

benötigt werden und sich wie in Abschnitt 4.2.3 weiter unten beschrieben sogar eher negativ auf die Redispergierbarkeit gefriergetrockneter Partikel auswirkten, wurde ein geeignetes und möglichst praktikables Verfahren benötigt, um die Nanopartikel vom Überstand abzutrennen. Die Reduzierung von Restmengen an nicht benötigtem Stabilisator ist bei pharmazeutischen Produkten bereits grundsätzlich angezeigt. Weiterhin wird durch eine Aufreinigung der Polymergehalt und damit auch der Wirkstoffgehalt der finalen Darreichungsform erhöht. Unter Berücksichtigung des Verhältnisses von eingesetzter PVA Menge zur Polymermenge kann der Polymergehalt der getrockneten Formulierung durch eine Aufreinigung rechnerisch von ca. 12% bei vollständiger Entfernung des Stabilisators auf bis zu 20% erhöht werden.

Bei der Aufreinigung mit Zentrifugalkonzentratoren musste die Methode angepasst werden, da nach einer Stunde erst die Hälfte der wässrigen Phase die Membran passiert hatte. Nachdem die Zentrifugationsdauer auf 1,5 Stunden erhöht wurde, konnte das Volumen der Partikeldispersion auf ein Drittel ihres ursprünglichen Volumens reduziert werden. Dann wurde die Kartusche mit Wasser aufgefüllt und die restlichen Waschschrte wurden wieder jeweils mit 1,5 stündiger Zentrifugation durchgeführt. Der Prozess dauerte somit insgesamt 5 Stunden. Die mittlere Partikelgröße betrug nach der Aufreinigung 197 nm (± 18 nm) mit einem PDI von 0,016.

Bei der alternativen Methode sedimentierten die Partikel nach 15 minütiger Zentrifugation der in Eppendorf Tubes eingefüllten Partikeldispersion bei 13.400 rcf vollständig und lagerten sich bei Färbung mit Lumogen Red als rosa gefärbtes Pellet am Boden der Gefäße ab. Nachdem der klare Überstand dekantiert und frisches Wasser aufgefüllt wurde, konnten die sedimentierten Partikel wieder vollständig redispergiert werden. Dazu mussten die Proben dreimalig für jeweils eine Minute gevortext und die Eppendorf Tubes zwischendurch mehrfach invertiert werden. Um das Pellet wieder vollständig zu redispergieren, wurden jeweils ca. 15 Minuten benötigt. Damit dauerte der Prozess insgesamt 1,5 Stunden. Nach der Aufreinigung der Partikeldispersion durch Sedimentation und Redispergierung betrug der mittlere Partikeldurchmesser 211 nm (± 21 nm) und der PDI 0,005.

Hinsichtlich der Resultate waren beide Verfahren zur Aufreinigung der Partikeldispersionen prinzipiell geeignet. Vor dem Waschen betrug der mittlere Partikeldurchmesser 205 nm (± 29 nm) mit einem PDI von 0,027 und veränderte sich bei beiden Prozessen nicht signifikant. Nach der Aufreinigung durch Sedimentation betrug der PDI nur noch 0,005. Dies ist dadurch zu erklären, dass ein geringer Anteil an kleinsten Partikeln bei der gewählten Rotationsgeschwindigkeit nicht sedimentierte und mit dem Überstand entfernt wurde. Durch Abtrennung dieser Partikelfraktion im niedrigen Korngrößenbereich wurde die Partikelgrößenverteilung schmäler und damit der PDI niedriger. Der geringfügige Anstieg des

mittleren Partikeldurchmessers ist ebenfalls dadurch zu erklären, wobei die Differenz noch innerhalb der Standardabweichung liegt und daher vernachlässigbar ist.

Ein wesentlicher Unterschied der beiden getesteten Verfahren besteht in der Zeitdauer, die zur Aufreinigung der Partikeldispersionen benötigt wurde. Sie betrug 1,5 Stunden bei der Variante mit Sedimentation gegenüber 5 Stunden bei der Filtration mit Zentrifugalkonzentratoren. Die enorme Zeitersparnis ist ein deutlicher Vorteil der erstgenannten Methode.

Die bei der Filtration mit den Zentrifugalkonzentratoren benötigte extrem lange Dauer kann dadurch erklärt werden, dass die Poren der PES Membran von einem der Inhaltsstoffe blockiert wurden. Das mittlere Molekulargewicht des verwendeten PVAs beträgt 31 kDa und der MWCO der Membran liegt bei 100 kDa. Damit ein Molekül die Membran quantitativ passieren kann, empfiehlt der Hersteller einen MWCO zu wählen, der in etwa fünffach über dem Molekulargewicht des Stoffes liegt, der die Membran passieren soll. Dies ist im Falle von PVA nicht gegeben. Ein vergleichbarer Zentrifugalkonzentrator mit einem größeren MWCO war zum Versuchszeitpunkt jedoch nicht im Handel erhältlich. Da die Kettenlänge der PVA Moleküle, wie bei Polymeren üblich, variiert, sind im Material auch Moleküle mit einem Molekulargewicht von mehr als 31 kDa enthalten. Vor diesem Hintergrund ist eine Blockierung der Poren durch PVA noch wahrscheinlicher. Die Porengröße bei einem MWCO von 100 kDa ist laut Hersteller so klein, dass eine Blockierung durch Nanopartikel mit einer Größe von über 150 nm weitgehend auszuschließen ist. Daher ist es am wahrscheinlichsten, dass PVA Moleküle für die Blockierung der Poren verantwortlich sind.

Ein weiterer Unterschied besteht in der Effektivität der beiden Methoden. Die Einengung des Volumens der Dispersion war bei Verwendung der Zentrifugalkonzentratoren maximal bis auf ca. ein Drittel möglich. Dies bedeutet, dass bei jedem Waschschrift jeweils zwei Drittel der Stabilisator-haltigen Lösung entfernt wurden. Wohingegen durch Dekantieren des Überstandes nach dem Absetzen der Partikel in den Eppendorf Tubes bei jedem Waschschrift deutlich größere Mengen als zwei Drittel der Lösung entfernt wurden. Auch ohne dies mit quantitativen Daten zu belegen, kann davon ausgegangen werden, dass bei der Aufreinigung durch Sedimentation in Eppendorf Tubes die Restkonzentration an Stabilisator gegenüber der zweiten Variante deutlich stärker reduziert werden konnte.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Aufreinigung durch Zentrifugation in Eppendorf Gefäßen deutliche Vorteile gegenüber der Filtration mit Zentrifugalkonzentratoren bietet. Neben der Zeitersparnis ist auch ein höherer Reinheitsgrad des Produktes dank effektiverer Abtrennung der wässrigen Phase zu beachten. Außerdem können bei Verwendung der ersten Variante die relativ hohen Kosten der Zentrifugalkonzentratoren eingespart werden.

4.2.3 Trocknung

Auf die Notwendigkeit der Trocknung der Partikelsuspensionen wurde bereits in der Einleitung zu Kapitel 4.1.3 hingewiesen. Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Optimierung und Evaluation des Trocknungsprozesses vorgestellt.

4.2.3.1 Gefriertrocknung

Es wurden 7 unterschiedliche Formulierungen mittels Doppelemulsionsmethode unter Verwendung des Microfluidizers hergestellt und entsprechend der in Kapitel 4.1.3 beschriebenen Methode gefriergetrocknet.

Nach 48 Stunden waren alle Proben vollständig trocken. Zur Beurteilung der Redispergierbarkeit der unterschiedlichen Formulierungen wurde die Partikelgröße jeweils vor der Trocknung und nach der Trocknung und Redispergierung in Wasser mit der DLS Methode gemessen. Außerdem wurden weitere Eigenschaften der Lyophilisate wie Hygroskopizität und Beschaffenheit des Lyophilisatkuchens organoleptisch geprüft und bei der Beurteilung der Formulierungen mit berücksichtigt.

Die Ergebnisse der Versuche zur Optimierung der Gefriertrocknungsmethode sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12 Untersuchung unterschiedlicher Hilfsstoffe und Hilfsstoffgemische zur Optimierung der Gefriertrocknung.

Formulierung Nr.	Hilfsstoff [%] m/m	Mittlerer Partikeldurchmesser [nm] / PDI vor Trocknung	Mittlerer Partikeldurchmesser [nm] / PDI nach Trocknung und Redispergierung	Lyophilisat hygroskopisch	Lyophilisat kollabiert
1	---	352 / 0,084	403 / 0,100	nein	ja
2	L-Isoleucin 1,0	135 / 0,020	161 / 0,170	nein	ja
3	Mannitol 1,5	228 / 0,058	235 / 0,076	nein	nein
4	Sorbitol 3,0	128 / 0,014	134 / 0,011	ja	ja
5	PVA 0,6 Sorbitol 3,0	128 / 0,014	143 / 0,097	ja	nein
6	Sorbitol 2,0	137 / 0,035	142 / 0,037	ja	ja
7	Sorbitol 0,9 Mannitol 0,6	311 / 0,048	316 / 0,045	nein	nein

Bei den Formulierungen 1, 2, 4 und 6 waren die Pulver kollabiert und teilweise stark verkrustet. Sie bildeten nicht den für eine optimale Gefriertrocknung typischen „Lyophilisatkuchen“. Die Formulierungen 4, 5 und 6 waren stark hygroskopisch und

entwickelten sich aufgrund der Luftfeuchtigkeit im geöffneten Gefäß im Labor innerhalb von Minuten zu einer hochviskosen und klebrigen Masse.

Für die Formulierungen 4 und 5 wurde eine Partikelsuspension aus dem gleichen Herstellungsgang gewählt. Formulierung 4 wurde jedoch vor Zugabe des Sorbitols mit der Zentrifuge aufgereinigt, während bei Formulierung 5 die Suspension nicht aufgereinigt wurde und somit die überschüssige Menge an PVA noch vollständig enthalten war. Die Differenz des mittleren Partikeldurchmessers vor der Trocknung zur redispergierten Probe betrug bei Formulierung 4 lediglich +6 nm und bei Formulierung 5 +15 nm. Der PDI ist bei Formulierung 4 etwas kleiner geworden und bei Formulierung 5 von 0,014 auf 0,097 gestiegen. Der Anstieg des mittleren Partikeldurchmessers und der Polydispersität bei der Trocknung der PVA haltigen Probe deuten auf eine Bildung von Partikelaggregaten hin.

Von der nicht aufgereinigten und daher stark PVA-haltigen lyophilisierten Partikelprobe (Formulierung 5 in Tabelle 12) wurden REM Aufnahmen angefertigt. Zwei dieser Aufnahmen sind in Abbildung 15 dargestellt.

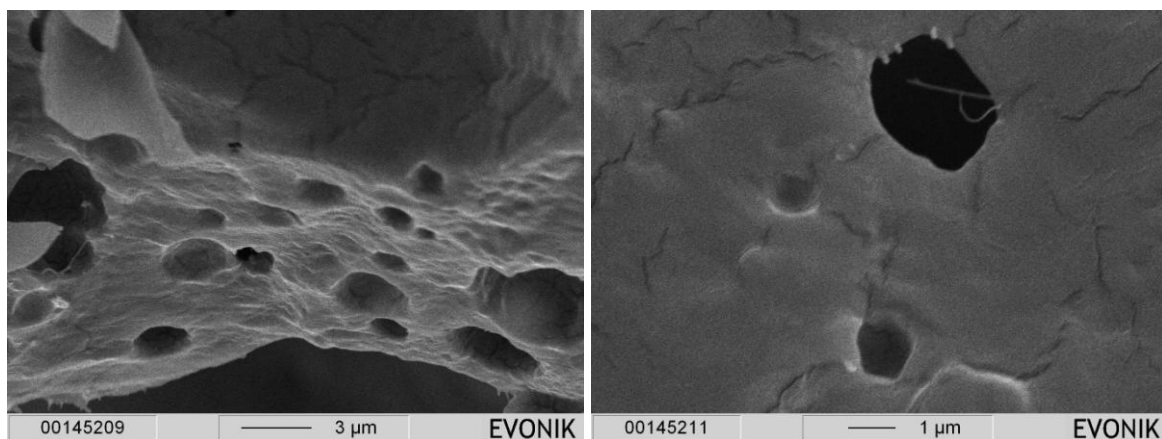


Abbildung 15 REM Aufnahmen gefriergetrockneter Resomer[®] RG 503 H Partikel, die vor der Trocknung nicht aufgereinigt wurden und noch überschüssiges PVA enthalten, Formulierung 5 in Tabelle 12, hergestellt mittels Doppelmulsionsmethode unter Verwendung des Microfluidizers.

In beiden REM Aufnahmen von Formulierung 5 in Abbildung 15 sind keine partikulär geformten Strukturen zu erkennen. Die Probe enthält jeweils bezogen auf den Feststoffanteil 73% Sorbitol, 14% PVA und 13% PLGA. Der Polymeranteil sollte damit ausreichend hoch sein, um Partikel erkennen zu können. Es ist also davon auszugehen, dass das enthaltene Polymer nicht mehr partikulär geformt ist. Die Bestandteile scheinen miteinander zu einem Film verschmolzen zu sein.

Bei Verwendung aufgereinigter Proben hingegen trat keine Aggregation oder Verschmelzung der lyophilisierten Partikel auf (vgl. Abbildung 16).

Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung wäre, dass PVA als Weichmacher wirkt und daher die Glasübergangstemperatur von Polymeren senkt. Dies kann zu einem Verschmelzen der Partikel und einer irreversiblen Aggregation führen. Auch wenn der PDI nach dem Redispergieren von Formulierung 5 in Wasser deutlich anstieg, so war die Redispergierung dennoch weitgehend möglich. Dies würden die REM Aufnahmen von Formulierung 5 jedoch keineswegs vermuten lassen. Demzufolge ist davon auszugehen, dass die starke Aggregation und Verfilmung der Partikel vorwiegend im Zuge der Probenaufbereitung zur REM Analyse erfolgte. Der Anstieg des PDI mit gleichzeitiger Zunahme der Partikelgröße nach der Redispergierung des Lyophilisats deutet jedoch auf eine Aggregation von Partikeln auch bereits vor der REM Analyse hin. Daher ist die Aufreinigung der Partikelsuspension vor der Gefriertrocknung in jedem Fall empfehlenswert.

Obwohl die Redispergierbarkeit der Formulierungen 4 und 6 hervorragend war, konnten sie noch nicht als optimiert angesehen werden. Ihre starke Hygroskopizität würde eine weitere Handhabung der Pulver extrem schwierig machen. Da Sorbitol zwar hygroskopisch ist, aber sehr gute Stabilisierungseigenschaften zeigte, wurde versucht die Hygroskopizität zu reduzieren, ohne jedoch ganz auf diesen Hilfsstoff verzichten zu müssen. Eine Reduzierung des Sorbitolanteils auf 2% bei Formulierung 6 war nicht erfolgreich. Also wurde er weiter reduziert und stattdessen zusätzlich Mannitol zugegeben, da dieses in Formulierung 3 ein Kollabieren verhinderte und nicht hygroskopisch war. Nachdem zunächst unterschiedliche Mischungsverhältnisse von Sorbitol und Mannitol getestet wurden, erwies sich ein 3:2-Verhältnis in Formulierung 7 schließlich als optimal in Bezug auf alle geprüften Faktoren.

Unabhängig von der Optimierung der Redispergierbarkeit wurden REM Aufnahmen von gefriergetrockneten Partikeln angefertigt. Anhand dieser Aufnahmen wurden die Partikel morphologisch charakterisiert. Es konnten nur dann aussagekräftige Aufnahmen generiert werden, wenn die Suspension vor der Trocknung aufgereinigt wurde und die Gefriertrocknung ohne jeglichen Zusatz von Hilfsstoffen erfolgte. In Abbildung 16 werden Aufnahmen der gefriergetrockneten Formulierung 1 aus Tabelle 12 gezeigt.

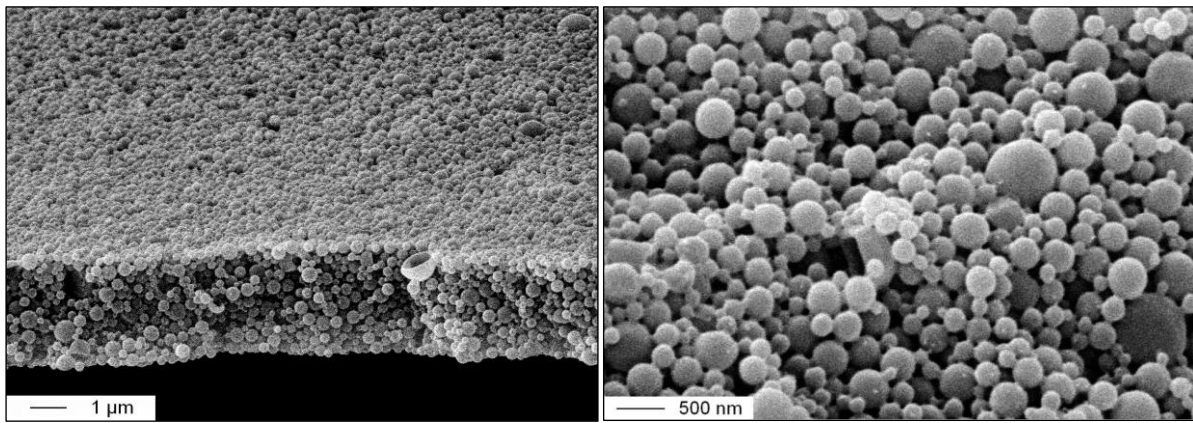


Abbildung 16 REM Aufnahmen gefriergetrockneter Resomer® RG 503 H Partikel, Formulierung 1 aus Tabelle 12, hergestellt mittels Doppemulsionsmethode unter Verwendung des Microfluidizers.

Der mittlere Partikeldurchmesser der abgebildeten Partikel lag laut DLS-Messung vor der Trocknung bei 352 nm mit einem PDI von 0,084. Dieses Ergebnis kann mit den REM Aufnahmen sehr gut untermauert werden: Es sind einzelne sphärische Partikel mit einem Durchmesser zwischen 200 nm und 500 nm zu erkennen. Neben einigen wenigen deutlich größeren Partikeln erscheint die Probe in der Gesamtansicht bezüglich der Partikelgrößenverteilung weitgehend homogen.

Makroskopisch ordnen sich die Partikel als Plättchen und Nadeln an. Die linke Aufnahme in Abbildung 16 zeigt die Aufsicht auf die Bruchstelle eines plättchenförmigen Aggregates. Da kein Matrix-bildender Hilfsstoff bei der Trocknung zugesetzt wurde, besteht ein relativ dichter Kontakt zwischen den Partikeln. Die Redispergierung der Partikel ist dennoch weitgehend möglich. Nach Redispergierung der Probe in destilliertem Wasser wurde ein mittlerer Partikeldurchmesser von 403 nm gemessen (PDI 0,100). Dies bestätigt die Beobachtung, dass die gefriergetrockneten Partikel nur reversibel agglomeriert und nicht aggregiert sind.

4.2.3.2 Sprühtrocknung

Zur Untersuchung des Effektes unterschiedlicher Stabilisatorzusätze bei der Sprühtrocknung wurde eine Suspension mit Partikeln aus Resomer® RG 503 H verwendet, die mittels Doppemulsionsmethode hergestellt wurde. Der mittlere Durchmesser der Partikel in dieser Suspension betrug vor der Trocknung 128 nm und der PDI 0,014.

Die Ergebnisse der Optimierung des Sprühtrocknungsprozesses sind in Tabelle 13 zusammengefasst. Der Erfolg der Sprühtrocknung wurde am PDI der Partikelsuspension nach der Trocknung und Redispergierung in Wasser gemessen. Bei der Optimierung wurde ein möglichst niedriger PDI unter 0,1 angestrebt.

Tabelle 13 Einfluss unterschiedlicher Zusammensetzungen der Sprühlösung auf den PDI der Partikelgrößenverteilung nach Sprühtrocknung und Redispergierung in Wasser.

Versuch Nr.	PVA Konz.	L-Isoleucin Konz.	Polymer Konz. (Partikel)	PDI
1	0,80%	---	0,27%	0,475
2	0,08%	0,20%	0,20%	0,366
3	0,50%	0,27%	0,13%	0,228
4	0,80%	0,50%	0,27%	0,072
5	0,80%	0,83%	0,27%	0,121
6	0,80%	1,00%	0,27%	0,150

Die durchschnittliche Ausbeute des Sprühtrocknungsprozesses betrug 65,8% ($\pm 8,4\%$) bezogen auf die eingesetzte Menge an Feststoffen.

Ohne Zusatz von L-Isoleucin (Versuch Nr.1 in Tabelle 13) war der PDI mit 0,475 unter allen durchgeführten Versuchen am höchsten. Ein Zusatz von 0,27% L-Isoleucin in Versuch Nr. 3 verbesserte die Redispergierbarkeit bereits deutlich, wobei die Anwesenheit von PVA einen positiven Effekt hatte. In Versuch Nr. 2 wurde PVA vor der Trocknung ausgewaschen und ausschließlich L-Isoleucin zugesetzt, was zu einem PDI von 0,366 führte. Durch Erhöhung der Konzentration von L-Isoleucin auf 0,5% bei Anwesenheit der ursprünglich eingesetzten Menge an PVA von 0,8% wurde in Versuch Nr. 4 der niedrigste PDI von 0,072 erhalten. Eine weitere Erhöhung der L-Isoleucin Konzentration in den Versuchen Nr. 5 und 6 führte zu einem Anstieg des PDI mit steigender Konzentration.

Das beste Ergebnis bezüglich der Redispergierbarkeit der getrockneten Partikel wurde durch einen Zusatz von 0,5% L-Isoleucin zur nicht aufgereinigten PVA haltigen Partikelsuspension erreicht (Versuch Nr. 4). Die optimale Konzentration von L-Isoleucin erreichte bei ca. 0,5% ein Maximum, höhere Konzentrationen wirkten sich negativ aus.

Abbildung 17 zeigt eine REM Aufnahme der optimierten sprühgetrockneten Formulierung Nr. 4 in Tabelle 13.

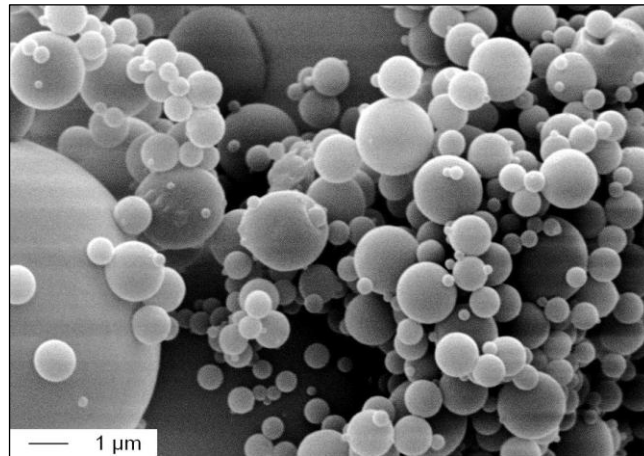


Abbildung 17 REM Aufnahme der gefriergetrockneten Formulierung Nr. 4 (Tabelle 13), enthält Nanopartikel aus Resomer[®] RG 503 H sowie PVA und L-Isoleucin.

In der REM Aufnahme des sprühgetrockneten Pulvers in Abbildung 17 sind einzeln vorliegende, sphärische Partikel mit einer Größe zwischen 100 nm bis zu mehreren Mikrometern zu erkennen. Die Primärpartikel aus PLGA können in der REM Aufnahme nicht von den Hilfsstoffen PVA und L-Isoleucin differenziert werden und sind somit als solche nicht zu erkennen. Die Nanopartikel konnten jedoch nahezu vollständig in Wasser redispersiert werden. Dabei wurde ein mittlerer Partikeldurchmesser von 139 nm mit einem PDI von 0,072 gemessen (vor der Trocknung: 128 nm, PDI 0,014).

Die Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass ein kleinerer Teil der Partikel agglomerierte und nicht in Wasser redispersierbar war. Dadurch erhöhte sich der mittlere Partikeldurchmesser leicht und die Polydispersität stieg etwas an. Ein Peak bei Vielfachen des ursprünglichen Partikeldurchmessers würde auf eine Agglomeration von Partikeln hindeuten, konnte in der DLS Messung jedoch nicht getrennt aufgelöst werden. Dies ist bei der gewählten Messmethode auch erst dann möglich, wenn eine größere Anzahl an Partikeln agglomeriert ist. Sind nur relativ wenige deutlich größere Partikel enthalten, wird lediglich eine monomodale Verteilung ausgegeben und alle Partikelgrößen fließen statistisch in diese Verteilung mit ein.

4.2.4 Verkapselung von Desmopressin in PLGA

Die Verkapselungseffizienz von Desmopressin in Nanopartikel aus Resomer[®] RG 503 H wurde mittels der optimierten Doppulemulsionsmethode untersucht. Dazu wurden jeweils drei Ansätze mit dem Microfluidizer und mit dem Ultra-Turrax hergestellt.

Um den Desmopressingehalt der Partikel zu bestimmen, wurden die Polymerpartikel zunächst vollständig aufgelöst. Dazu wurde eine definierte Menge der Formulierung in destilliertem Wasser suspendiert und anschließend mit einer 1,0 molaren Natriumhydroxidlösung versetzt

und für 30 Sekunden inkubiert. Nach Ablauf der 30 Sekunden wurde die Lauge sofort mit dem gleichen Volumen 1,0 molarer Salzsäure neutralisiert. Nun lag eine klare Lösung vor, die per HPLC Methode analysiert werden konnte.

Die Ergebnisse der Mikroverkapselungsversuche mit Resomer[®] RG 503 H wurden in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14 Ergebnisse der Mikroverkapselung von Desmopressin in Resomer[®] RG 503 H mittels optimierter Doppemulsionsmethode; Verkapselungseffizienz: Anteil an verkapselter Masse zu eingesetzter Masse Desmopressin; Beladungsgrad: Massenanteil von verkapseltem Desmopressin an der Gesamtmasse der Partikel.

Versuch Nr.	Methode	Partikelgröße [nm] / PDI	Beladungsgrad	Verkapselungseffizienz
1	Microfluidizer	165 / 0,008	1,04%	9,1%
2	Microfluidizer	310 / 0,045	0,71%	6,8%
3	Microfluidizer	264 / 0,049	0,62%	5,5%
4	Ultra-Turrax	301 / 0,048	1,21%	10,3%
5	Ultra-Turrax	260 / 0,108	0,64%	5,8%
6	Ultra-Turrax	257 / 0,083	0,83%	7,3%

Bei Verwendung des Microfluidizers betrug die durchschnittliche Verkapselungseffizienz für Desmopressin 7,13% ($\pm 1,49\%$) und bei Verwendung des Ultra-Turrax 7,8% ($\pm 1,87\%$). Zwischen beiden Methoden besteht bezüglich der Verkapselungseffizienz von Desmopressin kein signifikanter Unterschied, daher werden die Ergebnisse zu einem Mittelwert mit $n=6$ zusammengefasst. Die durchschnittliche Verkapselungseffizienz von Desmopressin in Nanopartikel aus Resomer[®] RG 503 H betrug 7,47% ($\pm 1,72\%$). Der Beladungsgrad der Partikel betrug durchschnittlich 0,84% ($\pm 0,22\%$).

4.2.5 Stabilität der getrockneten Partikelformulierungen

Die Stabilität der hergestellten Nanopartikel aus Resomer[®] RG 503 H wurde im Verlauf des Herstellungsprozesses und nach 3 monatiger Lagerung der getrockneten Formulierung bei 5 °C (± 2 °C) überprüft. Es wurden jeweils zwei Muster von zwei unterschiedlichen Proben gemessen. Beide Proben, Nr. 1 und Nr. 2, wurden gefriergetrocknet (a) und sprühgetrocknet (b). Die Ergebnisse der DLS Messungen zur Stabilitätskontrolle sind in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15 Stabilitätskontrolle von Partikeln aus Resomer[®] RG 503 H während der Herstellung und nach Lagerung der getrockneten Formulierungen über einen Zeitraum von 3 Monaten; Ergebnisse der DLS Messungen, mittlere Standardabweichung für Partikeldurchmesser $\pm 18,4$ nm; a: gefriergetrocknete Probe, b: sprühgetrocknete Probe.

Probe Nr.	Mittlerer Partikeldurchmesser vor der Aufreinigung [nm]/PDI	Mittlerer Partikeldurchmesser nach der Aufreinigung [nm]/PDI	Mittlerer Partikeldurchmesser nach dem Trocknen [nm]/PDI	Mittlerer Partikeldurchmesser nach 3 Monaten Lagerung der getrockneten Partikel [nm]/PDI
1a	125 / 0.046	128 / 0.014	134 / 0.011	134 / 0.029
1b	125 / 0.046	128 / 0.014	136 / 0.025	137 / 0.019
2a	228 / 0.056	229 / 0.031	240 / 0.092	235 / 0.088
2b	228 / 0.056	229 / 0.031	224 / 0.093	229 / 0.091

Im Rahmen der Messgenauigkeit der DLS Messung sind die Partikeldurchmesser aller getesteten Proben unverändert. Bezüglich der Stabilität der getrockneten Formulierungen besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den gefriergetrockneten und den sprühgetrockneten Proben. Der PDI ist bei keiner Probe kritisch angestiegen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die ursprüngliche Partikelgröße sich während des Herstellungsprozesses und nach drei monatiger Lagerung bei 5 °C nicht signifikant verändert hat.

4.2.6 Zusammenfassende Diskussion

Die Doppelemulsionsmethode mit Anwendung der Hochdruckhomogenisation stellt eine optimale Möglichkeit dar, die Partikelgröße im Zielbereich zwischen 104 nm und 430 nm sehr gut reproduzierbar und bei sehr enger Verteilungsbreite der Partikelgröße einzustellen. Die Hochdruckhomogenisation wird bereits seit vielen Jahren industriell angewendet und eine Übertragung aus dem Labor auf größere Maßstäbe sollte relativ unproblematisch sein. Durch die Verwendung des Microfluidizers konnte folglich das Potential zur industriellen Herstellung von nanoskaligen polymeren Wirkstoffträgern mithilfe der Doppelemulsionsmethode gesteigert werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz des Microfluidizers an Stelle herkömmlicher Homogenisierungsmethoden bei der Partikelherstellung die benötigte Menge an Stabilisatoren reduziert werden konnte.

Hinsichtlich der Aufreinigung der Partikelsuspensionen stellte sich heraus, dass das Verfahren durch Sedimentation der Partikel mit einer Zentrifuge diverse Vorteile gegenüber der Filtration mit Zentrifugalkonzentratoren aufweist. Das Verfahren ist effizienter, weniger zeitaufwendig und kostengünstiger. Die Übertragung der Methode auf einen größeren Maßstab kann beispielsweise mithilfe einer Scheibenzentrifuge erfolgen.

Als optimale Trocknungsmethode der Partikelsuspensionen zur Erhöhung der Lagerstabilität stellte sich vor allem in Bezug auf die Redispergierbarkeit der Partikel die optimierte Gefriertrocknung heraus. Wobei auch die Sprühtrocknungsmethode unter Zusatz von Isoleucin durchaus zufriedenstellende Ergebnisse lieferte. Eine Lagerung der getrockneten Pulver bei 5 °C über einen Zeitraum von 3 Monaten hinweg führte hinsichtlich der Redispergierbarkeit der Partikel und der Partikelgröße nicht zu Qualitätseinbußen.

Die durchschnittliche Verkapselungseffizienz von Desmopressin in Nanopartikel aus Resomer[®] RG 503 H war mit 7,47% ($\pm 1,72\%$) relativ niedrig. Der Beladungsgrad der Partikel betrug durchschnittlich 0,84% ($\pm 0,22\%$). Diese Ergebnisse basieren jeweils auf 6 Versuchen (n=6). Hinsichtlich der Wirtschaftlichkeit und eines wirkungsvollen Einsatzes als pharmazeutische Trägersysteme sind diese Werte nicht zufriedenstellend. Dies war wie bereits beschrieben aufgrund der Materialeigenschaften von PLGA bereits zu erwarten und stellt daher kein überraschendes Ergebnis dar. Unter anderem mit dem Ziel die Verkapselungseffizienz und die Partikelbeladung zu erhöhen, wurden die von der Universität Jena neu synthetisierten PEA Polymere zur Verkapselung des Modellpeptids in Nanopartikel verwendet. Im folgenden Kapitel werden die Formulierungsversuche mit den neuen Polymeren beschrieben.

4.3 Formulierung mit Polyesteramid Polymeren

Im folgenden Kapitel wird die Herstellung von nanoskaligen Wirkstoffträgern aus den neuen PEA Polymeren beschrieben. Der Herstellungsprozess wurde auf Basis der für Resomer[®] RG 503 H optimierten Doppalemulsionsmethode entwickelt. Im Anschluss an eine Charakterisierung der PEA Polymere erfolgt die Beschreibung der Herstellungsversuche mit den notwendigen Anpassungen bis hin zur Findung der optimierten Versuchsbedingungen. Im letzten Abschnitt dieses Kapitels werden die optimierten Formulierungen pharmazeutisch, biopharmazeutisch und toxikologisch charakterisiert.

4.3.1 Charakterisierung der PEA Polymere - Präformulierung

Die PEA Polymere können entsprechend der enthaltenen Aminosäure in drei Gruppen eingeteilt werden. Von der Universität Jena wurden jeweils mehrere Vertreter von Polyesteramiden mit Asparaginsäure, Cystein und Lysin bereitgestellt. Die Polymere unterscheiden sich innerhalb der jeweiligen Gruppe im Wesentlichen im Verhältnis der Milchsäure zur Glykolsäure-Aminosäure-Verbindung sowie in ihrem Molekulargewicht (siehe Tabelle 6 in Kapitel 3.2.2). Eine wesentliche Information für die Versuchsplanung zur Herstellung der Formulierungen war die Löslichkeit der Polymere in organischen

Lösungsmitteln und in Wasser. Deshalb wurde zunächst die Löslichkeit der PEA Polymere untersucht.

4.3.1.1 Löslichkeit

Es wurde jeweils getestet, ob eine 2%ige Lösung (m/m) des Polymers hergestellt werden kann. Gerührt wurde die Lösung mit einem Magnetrührer mit 500 UpM. Der Versuch wurde beendet, sobald eine klare Lösung entstanden ist oder spätestens nach einer Stunde. Als Lösungsmittel wurden für die Partikelherstellung relevante organische Lösungsmittel getestet. Als wässrige Lösungsmittel wurden Phosphatpufferlösungen mit unterschiedlichen pH-Werten verwendet. Zur Beurteilung der Löslichkeit wurde folgende Klassifizierung gewählt: (--) praktisch unlöslich; (-) in Spuren löslich; (+) teilweise löslich mit Trübung; (++) vollständig löslich, klare Lösung; (+++) vollständig und schnell löslich, klare Lösung. Die Ergebnisse der Versuche zur Löslichkeit sind in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16 Löslichkeit der PEA Polymere in organischen Lösungsmitteln, deren Mischungen und in unterschiedlichen wässrigen Phosphatpuffer Lösungen.

Polymer	Ethylacetat	DCM	Aceton	Ethylacetat / Aceton Mischung	wässriger Puffer	Ethylacetat / DCM Mischung
PEA 01 (Asp)	--	+++	++	++ 4:1	+ pH ≥ 9,5	na.
PEA 03 (Asp)	--	+	+	--	++ pH ≥ 6	na.
PEA 04 (Asp)	--	+++	++	++ 3:1	++ pH ≥ 7	na.
PEA 05 (Asp)	-	++	++	++ 3:1	++ pH ≥ 8	na.
PEA 06 (Asp)	-	++	+++	++ 3:1	++ pH ≥ 8	na.
PEA 07 (Cys)	--	+++	+	-	--	++ 3:1
PEA 09 (Cys)	--	++	+	-	--	++ 3:1
PEA 10 (Cys)	-	++	+	-	--	++ 2:1

Aus den Löslichkeitsversuchen geht hervor, dass alle getesteten PEA Polymere in Ethylacetat praktisch unlöslich oder nur in Spuren löslich waren. Alle Polymere waren wenig bis sehr gut in Dichlormethan (DCM) löslich. Aus toxikologischen Gesichtspunkten sollte der Einsatz dieses Lösungsmittels jedoch auf ein Minimum reduziert werden. Die Polymere mit Asparaginsäure waren bis auf PEA 03 gut in Aceton löslich. Aufgrund der hervorragenden Mischbarkeit mit Wasser eignet sich Aceton jedoch nicht zur Herstellung wässriger Emulsionen. Die Cystein PEA Polymere waren nur teilweise in Aceton löslich, es verblieb bei allen Chargen ein unlöslicher Anteil, der die Lösung trübte. Sie konnten jedoch mit einer

Konzentration von 2% vollständig in einer Mischung von Ethylacetat und DCM in unterschiedlichen Verhältnissen gelöst werden. In den Mischungen von Ethylacetat und Aceton, die sich zum Lösen der Asparaginsäure PEA Polymere hervorragend eigneten, waren die Cystein PEA Polymere nicht löslich.

Die Lysin PEA Polymere konnten wie bereits erwähnt nur bis zu maximal 70% entschützt werden und waren offensichtlich aus diesem Grund in keinem der getesteten Lösungsmittel löslich. Sie kamen daher nicht für die Formulierung von Nanopartikeln in Frage. Eine Optimierung des Entschützungsprozesses im Zuge der Synthese ist nicht zuletzt auch aus toxikologischen Gründen für diese PEA Klasse zunächst angezeigt.

Ein besonders hervorzuhebendes Ergebnis der Löslichkeitstests ist die Beobachtung, dass die Asparaginsäure PEA Polymere in Abhängigkeit vom pH-Wert in Wasser löslich waren. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Carboxyl-Seitengruppen der Asparaginsäure PEA Polymere in wässrigen Lösungen abhängig vom pH-Wert deprotoniert werden können, wodurch eine negative Ladung des Polymers resultiert. Aufgrund der Zunahme negativer Ladungen im Polymer steigt dessen Löslichkeit in Wasser stark an, sodass es schließlich in Abhängigkeit des pH-Wertes vollständig in Lösung geht. Es besteht ein Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Asparaginsäure und dem pH-Wert, ab dem die Polymere beginnen sich zu lösen. Mit steigendem Anteil an Asparaginsäure Seitengruppen ist dieser pH-Grenzwert niedriger. Mit sinkendem Gehalt an Asparaginsäure hingegen werden höhere pH-Werte zum Lösen des Polymers benötigt. Der Lösevorgang ist reversibel. Durch Zugabe von 0,1 molarer Salzsäure zur wässrigen Polymerlösung konnten die Polymere wieder ausgefällt werden. Eine naheliegende Erklärung für dieses Phänomen ist, dass mit steigendem Gehalt an Asparaginsäure auch die Anzahl der Carboxyl-Seitengruppen im Polymer steigt und das Polymer erwartungsgemäß stärker sauer reagiert und bereits bei niedrigeren pH-Werten zu einem größeren Anteil in dissoziierter Form vorliegt.

Die pH-abhängige Wasserlöslichkeit des Asparaginsäure PEA Polymers mit dem höchsten Morpholingehalt von 50% (PEA 03) wurde mit einem Sirius T3 (Sirius Analytical Instruments Ltd., East Sussex, UK) genauer untersucht. Die mittlere Molekülladung sowie der logD-Wert wurden in Abbildung 18 jeweils gegen den pH-Wert aufgetragen.

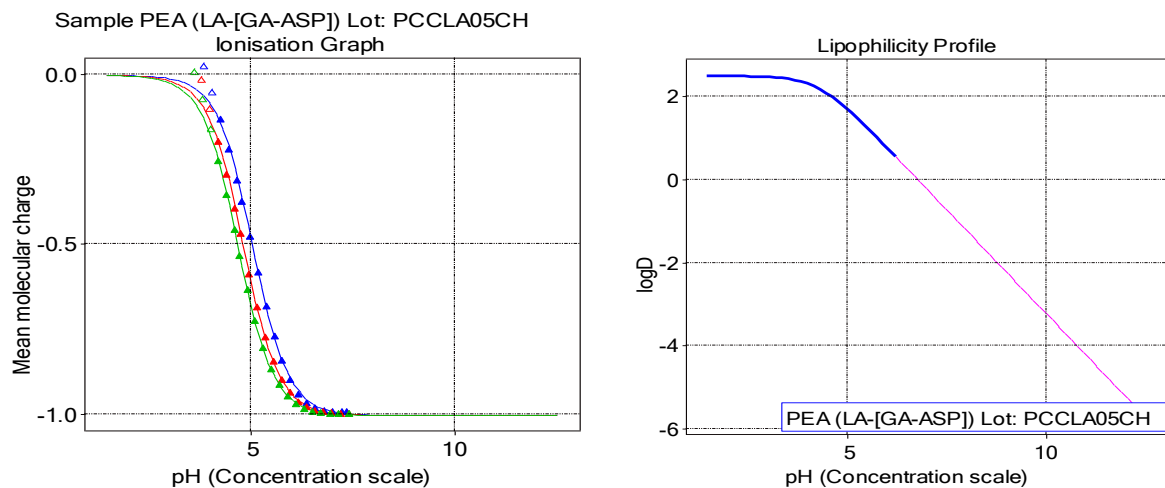


Abbildung 18 Messungen von PEA 03 mit Sirius T3; links: Auftragung mittlere Molekülladung in Abhängigkeit des pH-Wertes; rechts: Auftragung logD-Wert in Abhängigkeit des pH-Wertes.

Aus Abbildung 18 links geht hervor, dass bei einem pH-Wert zwischen 4 und 5 ungefähr 50% der Carboxylgruppen eine negative Ladung tragen. Die vollständige Deprotonierung des Polymers erfolgt bei pH-Werten zwischen 6 und 7. Dies erklärt die gute Wasserlöslichkeit von PEA 03 ab einem pH-Wert von 6 aufwärts.

Dass mit zunehmender Ladung des Polymers die Wasserlöslichkeit von PEA 03 tatsächlich steigt, zeigt auch die Auftragung des logD-Wertes gegen den pH-Wert (Abbildung 18 rechts). Der logD-Wert des neutralen Polymers beträgt 2,49 (dieser Wert entspricht dem logP-Wert). Ab einem pH-Wert von 4 sinkt der logD-Wert mit steigenden pH-Werten und erreicht bei pH 8 einen Wert von -1,22.

Die Cystein PEA Polymere zeigen keine pH-abhängige Wasserlöslichkeit und reagieren entsprechend den Erwartungen nicht sauer.

4.3.1.2 Säurekonstante (pK_a) von Asparaginsäure PEA

Im vorherigen Abschnitt wurde bereits auf die sauren Eigenschaften der Asparaginsäure PEA Polymere hingewiesen. Zur genaueren Charakterisierung dieser Eigenschaft wurde mithilfe des Sirius T3 die Säurekonstante pK_a von zwei Asparaginsäure PEA Polymeren gemessen.

Die Bestimmung der Säurekonstante setzt prinzipiell eine gute Wasserlöslichkeit der zu untersuchenden Substanzen voraus. Im Verlauf der Säure-Base-Titration darf es nicht zu einer Ausfällung kommen. Bei schwer wasserlöslichen Substanzen, oder wenn auch nur eine Spezies der zu analysierenden Substanz unlöslich ist, wie im konkreten Fall die protonierte und neutrale Form der Asparaginsäure PEA Polymere, können mit Wasser mischbare Cosolventien zur Erhöhung der Löslichkeit zugesetzt werden. Der wahre Wert der Säurekonstante in Wasser wird anschließend durch Extrapolation auf einen Wassergehalt von

100% ermittelt¹³⁵. Als geeignetes Cosolvens für die Asparaginsäure PEA Polymere wurde Methanol identifiziert.

Die Ermittlung der Säurekonstante pK_a erfolgte durch ein Verfahren, das von Yasuda und Shedlovsky erstmalig beschrieben wurde, die sogenannte Yasuda-Shedlovsky-Extrapolation^{136,137}. Die beiden Wissenschaftler fanden heraus, dass bei der Auftragung der p_sK_a Werte (Säurekonstante in Mischungen aus Wasser und Cosolvens) für unterschiedliche Lösungsmittelgemische gegen den reziproken Wert der zugehörigen Dielektrizitätskonstante ein linearer Zusammenhang resultiert. Durch lineare Regression der Messwerte und Extrapolation auf einen Wassergehalt von 100% kann anschließend die Säurekonstante pK_a ermittelt werden. Die Bestimmung von Säurekonstanten mithilfe der Yasuda-Shedlovsky Extrapolation wurde von Avdeef für Ibuprofen und Chinin ausführlich beschrieben¹³⁸.

Bei der Durchführung der Säure-Base-Titration zur Bestimmung der p_sK_a Werte wurden die Polymere jeweils in drei unterschiedlichen Mischungen aus Wasser und Methanol gelöst (34%, 43% und 56% Massenanteil Methanol). Durch den Zusatz von Methanol konnte ein Ausfallen der Polymere während der Titration verhindert werden. Die Titration von sauer nach alkalisch erfolgte mit einer Kaliumhydroxid Lösung, von alkalisch nach sauer wurde mit verdünnter Salzsäure titriert.

Die Ergebnisse der Yasuda-Shedlovsky-Extrapolation für PEA 03 sind in Abbildung 19 dargestellt.

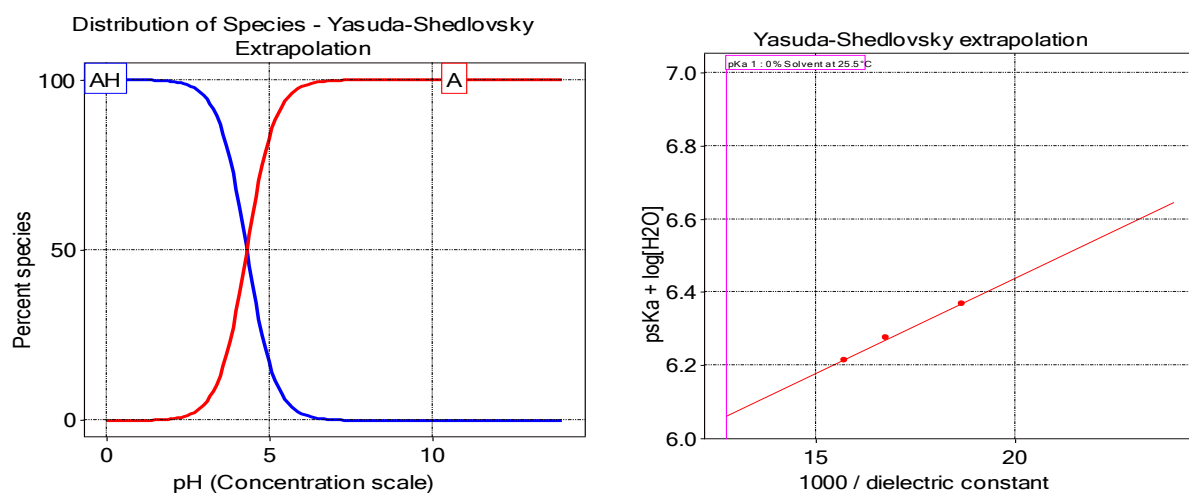


Abbildung 19 Yasuda-Shedlovski-Extrapolation für Asparaginsäure PEA Polymer PEA 03, links: Titrationskurven für protonierte und deprotonierte Form nach Yasuda-Shedlovsky Extrapolation, rechts: Auftragung von $p_sK_a + \log[H_2O]$ gegen $1000 / \text{Dielektrizitätskonstante}$ und Yasuda-Shedlovsky Extrapolation mit drei unterschiedlichen Methanol-Wasser Mischungen, Ionenstärke 0,193 M, Temperatur 25,5 °C.

Die bei drei unterschiedlichen Methanol Konzentrationen gemessenen p_sK_a Werte wurden in Abbildung 19 rechts gegen den reziproken Wert der Dielektrizitätskonstante des jeweiligen Lösungsmittelgemisches aufgetragen. Die tatsächliche Säurekonstante wird am Schnittpunkt der extrapolierten Geraden mit dem x-Wert für reines Wasser abgelesen. Durch Subtraktion des Logarithmus der Wasserkonzentration ($\log[\text{H}_2\text{O}]$) wird der pK_a Wert des Polymers in Wasser erhalten. Die Auswertung der Daten erfolgte mithilfe der Gerätesoftware des Sirius T3.

Die Bestimmung der Säurekonstante pK_a des Asparaginsäure PEA Polymeres PEA 06 erfolgte in der gleichen Weise wie bereits für PEA 03 beschrieben wurde.

Die Säurekonstante von PEA 03 beträgt $pK_a = 4,32 (\pm 0,01)$ und die Säurekonstante von PEA 06 beträgt $pK_a = 4,99 (\pm 0,02)$.

PEA 03 mit einem höheren Asparaginsäure Gehalt (Morpholinanteil 50%) reagiert stärker sauer als PEA 06 mit einem geringeren Asparaginsäure Gehalt (Morpholinanteil 23%). Dass ein höherer Gehalt an Asparaginsäure Seitengruppen im Polymer eine höhere Säurestärke bewirkt, entspricht voll und ganz den Erwartungen. Dieses Ergebnis steht auch im Einklang mit den Beobachtungen bei den Löslichkeitstests in wässrigen Pufferlösungen. Die Polymere mit einem höheren Morpholingehalt liegen bereits bei niedrigeren pH-Werten zu einem größeren Anteil in dissoziierter und daher gelöster Form vor als diejenigen Polymertypen mit einem niedrigeren Morpholingehalt.

4.3.2 Anpassung und Optimierung der Doppelemulsionsmethode für Polyesteramide

Die für die handelsüblichen PLGA Polymere etablierte Doppelemulsionsmethode konnte aus mehreren Gründen nicht unverändert für die PEA Polymere übernommen werden. Alle PEA Polymere waren nicht ausreichend in Ethylacetat löslich (siehe Tabelle 16). Weiterhin erwies sich der Microfluidizer als ungeeignet für die Homogenisierung der Emulsionen mit PEA. Im Wesentlichen wurden folgende Anpassungen vorgenommen: Anstelle von reinem Ethylacetat wurden für den Asparaginsäure-Typ Mischungen von Ethylacetat und Aceton im Verhältnis zwischen 3:1 und 4:1 als Lösungsmittel verwendet. Für den Cystein-Typ wurde entweder reines Dichlormethan (DCM) oder eine Mischung aus Ethylacetat und DCM im Verhältnis zwischen 2:1 und 3:1 verwendet.

Bei der Homogenisierung mit dem Microfluidizer wurde ein grobes Ausflocken der PEA Polymere beobachtet. Daher konnte die Hochdruckhomogenisation bei den PEA Polymeren nicht angewendet werden. Stattdessen wurde der Ultra-Turrax zur Homogenisierung der Emulsionen verwendet.

Der Grund für die irreversible Ausflockung der Polyesteramide während der Hochdruckhomogenisation liegt möglicherweise in der kurzzeitigen stärkeren Erwärmung der Probe in der Interaktionskammer, was zu einer kurzzeitigen Überschreitung der Löslichkeitsgrenze der Polymere führen könnte. Denkbar wäre zudem ein Abbau der Polymerketten aufgrund der extrem hohen Scherbeanspruchung des Polymers während der Hochdruckhomogenisation. Dieser Aspekt wurde jedoch nicht genauer untersucht.

4.3.2.1 Doppelemulsionsmethode für Asparaginsäure PEA Polymere

Im Folgenden wird die für die Gruppe der PEA mit Asparaginsäure angepasste Methode detailliert beschrieben.

Als Lösungsmittel für die Polymere wurden 3 Teile Ethylacetat mit 1 Teil Aceton gemischt. Aufgrund der pH-abhängigen Wasserlöslichkeit der Asparaginsäure Polyesteramide wurde als kontinuierliche Phase ein Puffer mit einem pH Wert von 5,0 verwendet. Die Auswahl des Puffers erfolgte auf Basis der für die PEA Polymere ermittelten pK_a Werte. Die Herstellung der verwendeten wässrigen Phosphatpufferlösungen (PBS) erfolgte entsprechend der jeweiligen Monographie des Europäischen Arzneibuches (Ph.Eur.). Die Bestandteile wurden eingewogen und die Lösungen entsprechend der Angaben in Tabelle 17 hergestellt. Die PVA Lösung wurde für 3 Stunden mit dem Magnetrührer bei 800 UpM gerührt, die mit Parafilm abgedeckte Polymerlösung für 15 min bei 500 UpM.

Tabelle 17 Zusammensetzung der Lösungen, die zur Herstellung von PEA Asparaginsäure Partikeln verwendet wurden.

Lösung Nr.	Substanzen	Einwaage [g]	Lösungsmittel	Anteil [%]	Menge [g]
1	PEG 4000	0,06	Destilliertes Wasser	3	2,0
	Desmopressinacetat	0,01		0,5	
2	PEA Asparaginsäure	0,08	Ethylacetat / Aceton Mischung 3:1	1,0	8,0
3	PVA	variabel	Phosphatpuffer Ph.Eur. pH 5,0	0,3-1,5	30,0
4	Partikelsuspension	9,85	Phosphatpuffer Ph.Eur. pH 5,0	1,5	10,0
	Sorbitol / Mannitol (3:2)	0,15			

Lösung Nr. 1 (W_1) wurde tropfenweise unter Rühren mit dem Ultra-Turrax (UT) bei 10.000 UpM zu Lösung Nr. 2 gegeben, sodass eine milchig trübe W_1/O Emulsion entstand. Nach vollständiger Zugabe der wässrigen Lösung wurde 1 min bei 14.000 UpM homogenisiert. Die W_1/O Emulsion wurde tropfenweise unter Rühren zu Lösung drei gegeben. Die nun entstandene $W_1/O/W_2$ Emulsion wurde für 1 min bei 14.000 UpM mit dem

UT homogenisiert. Anschließend wurde der Emulsion mithilfe des Rotationsverdampfers unter Anlegen eines Vakuums das restliche Ethylacetat entzogen (Wasserbad 27 °C, allmähliche Druckabsenkung bis ein Druck von 40 mbar erreicht wird, ca. 20 min).

Es entstand eine milchig trübe Suspension, die während der Destillation etwas klarer wurde. Mithilfe des Nicomp particle sizing Systems (DLS) wurde die Partikelgröße ermittelt. Die Partikelgrößen lagen für alle getesteten Polymere im Bereich zwischen 240 nm und 300 nm mit einem PDI zwischen 0,03 und 0,1.

Die Aufreinigung und Gefriertrocknung der Partikelsuspensionen wurde entsprechend den für PLGA optimierten Methoden durchgeführt (Beschreibung der Methoden in den jeweiligen Abschnitten der Kapitel 4.1 und 4.2.).

Zur Überprüfung, ob die Herstellungsmethode geeignet ist, wurde nach den einzelnen Herstellungsschritten die Partikelgröße gemessen. Die Ergebnisse dieser In-Prozess-Kontrolle sind in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18 Ergebnisse der In-Prozess-Kontrolle während der Partikelherstellung mit PEA Asparaginsäure; DLS Messung.

Zeitpunkt der Messung bezogen auf Herstellungsschritte	Mittlerer Partikeldurchmesser [nm]	PDI
Nach Abziehen des Lösungsmittels	246,2	0,023
Nach Aufreinigung	252,7	0,059
Nach Trocknung und Resuspendierung	253,8	0,043
Nach 2 Tagen in Suspension	237,6	0,076

Die In-Prozess-Kontrolle durch DLS Messung ergab, dass die Partikelgröße sich während der Herstellung nur unwesentlich änderte. Im Rahmen der Messgenauigkeit der DLS Messung von ± 12 nm sind die Partikelgrößen konstant geblieben. Die Methode ist zur Herstellung von Desmopressin-beladenen PEA Asparaginsäure Nanopartikeln mit einem mittleren Partikeldurchmesser zwischen 240 nm und 300 nm mit monomodaler und enger Partikelgrößenverteilung geeignet.

Die Stabilität der Partikel in wässriger Suspension über einen Zeitraum von 2 Monaten wurde durch DLS Messungen überprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19 DLS Messungen einer wässrigen PEA 06 Partikelsuspension aus Versuch Nr. 10 in Tabelle 22 zur Stabilitätskontrolle.

	Nach Herstellung	nach 1 Tag	nach 7 Tagen	nach 2 Monaten
Partikeldurchmesser	244 nm	236 nm	235 nm	167 / 650 nm
PDI	0,035	0,064	0,146	0,254 (bimodal)

Die Partikel wiesen in wässriger Suspension über einen Zeitraum von bis zu einer Woche eine gute Stabilität hinsichtlich Größe und Größenverteilung auf (Tabelle 19). Die Verteilung war nach wie vor monomodal und die Partikelgröße veränderte sich nicht wesentlich, die Verteilung wurde lediglich etwas breiter. Nach zwei Monaten hatte sich eine bimodale Partikelgrößenverteilung eingestellt, die Primärpartikel sind kleiner geworden (167 nm) und haben größere Agglomerate gebildet (650 nm). Für eine Lagerung von mehr als 7 Tagen empfiehlt sich daher die Trocknung der Partikelsuspension. Für PLGA Nanopartikel wurde bereits gezeigt, dass eine drei monatige Lagerung der getrockneten Pulver keine negative Auswirkung auf die Partikelgröße und Redispergierbarkeit hatte.

4.3.2.2 Entwicklung der Doppemulsionsmethode für Cystein PEA Polymere

Im folgenden Abschnitt wird der Entwicklungsprozess zur Optimierung der Doppemulsionsmethode mit Cystein PEA beschrieben.

In Tabelle 20 sind die Ergebnisse der für die Optimierung des Herstellungsprozesses wesentlichen Versuche zusammengefasst. Alle Herstellungsparameter, die in Tabelle 20 keine Erwähnung finden, wurden unverändert von der Herstellung der Asparaginsäure PEA Partikel übernommen.

Tabelle 20 Versuche zur Optimierung der Partikelherstellungsmethode mit Cystein PEA Polymeren.

Versuch Nr. / Polymer	Lösungsmittel	Methode / W ₂ Phase	PVA Konz. [%]	Partikelgröße vor dem Trocknen / PDI	Partikelgröße nach Trocknen und Redispersieren / PDI
1 PEA 07	2T EtAc : 1T Aceton	Doppemulsion / Wasser pH 7,0	0,8	629 nm / 0,379	630 nm (56%) 3900 nm (40%)
2 PEA 07	DCM	Doppemulsion / PBS pH 5,0	0,8	167 nm (4%) 3255 nm (96%)	3180 nm / 0,874
3 PEA 07	DCM	Doppemulsion / PBS pH 5,0	1,5	1630 nm / 0,349	1440 nm / 0,317
4 PEA 07	DCM	Doppemulsion / PBS pH 3,5	2,5% Pluronic F68	74 nm (3%) 230 nm (27%) 1450 nm (70%)	na.
5 PEA 07	DCM	Doppemulsion / PBS pH 3,0 /	0,8	2200 nm / 0,253	2700 nm / 0,331
6 PEA 07	DCM	Doppemulsion / Wasser pH 7,0	1,0	162 nm (13%) 2000 nm (87%)	2210 nm / 0,206
7 PEA 07	Aceton	Nanopräzipitation / Wasser pH 7,0	1,0	225 nm / 0,007	164 nm / 0,073
8 PEA 09	3T EtAc : 1T DCM	Doppemulsion / Wasser pH 7,0	0,8	392 nm / 0,150	509 nm / 0,370
9 PEA 10	2T EtAc : 1T DCM	Doppemulsion / Wasser pH 7,0	0,8	489 nm / 0,25	607 nm / 0,326
10 PEA 10	2T EtAc : 1T DCM	Doppemulsion / Wasser pH 7,0	0,8	457 nm / 0,126	509 nm / 0,259

Aufgrund der geringen Löslichkeit der Cystein PEA Polymere in Ethylacetat-Aceton-Mischungen (siehe Tabelle 16 in Abschnitt 4.3.1) wurde als Lösungsmittel zur Durchführung der Doppemulsionsmethode zunächst reines Dichlormethan (DCM) verwendet. Bis auf die verwendeten Lösungsmittel erfolgte die Versuchsdurchführung analog zum Asparaginsäure-Typ. Als wässrige äußere Phase (W₂) wurden unterschiedliche PBS Puffer und reines destilliertes Wasser verwendet.

Bei der Doppemulsionsmethode mit DCM (Versuche 2-6 in Tabelle 20) konnten die gewünschten Ziele bezüglich Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung jedoch nicht erreicht

werden. Die Partikelgrößenverteilung war nicht monomodal, es entstanden unabhängig von Art und Menge des Stabilisators immer große Partikel im Bereich zwischen 1,4 µm und 3,3 µm. Die Verwendung von Pluronic F68 statt PVA (Versuch Nr. 3) brachte diesbezüglich keine Verbesserung.

Da das Cystein PEA Polymer freie Thiolgruppen trägt, wäre unter entsprechenden Reaktionsbedingungen eine Bildung von Disulfidbrücken zwischen den Partikeln durch Oxidation denkbar. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die Aggregation der Partikel. Da diese Oxidationsreaktion basenkatalysiert abläuft und durch Protonen gehemmt wird, wurde die Partikelherstellung im sauren Milieu getestet. Jedoch war auch die Durchführung der Versuche in PBS Puffern mit unterschiedlichen pH Werten zwischen 3,0 und 7,0 nicht zielführend (Versuche 2-5 in Tabelle 20).

Die Erhöhung der Rotationsgeschwindigkeit des Ultra-Turrax auf 16.000 UpM führte offensichtlich aufgrund der stärkeren mechanischen Belastung und Erwärmung der Probe zu einer grobflockigen Ausfällung und Aggregation des Polymers. Aus diesem Grund wurde die Rotationsgeschwindigkeit bei den folgenden Versuchen auf maximal 12.000 UpM reduziert.

Da Cystein PEA teilweise in Aceton löslich war, wurde folgende Nanopräzipitationsmethode getestet: Eine 1%ige Lösung des Polymers in Aceton wurde durch 30 minütiges Rühren mit einem Magnetrührer hergestellt. Die bestehende leichte Trübung wurde mithilfe eines Sterilfilters mit einer Porengröße von 2,0 µm zu einer klaren Lösung abfiltriert. 8 ml der klaren Lösung wurden unter Bearbeitung mit dem Ultra-Turrax bei 6.000 UpM tropfenweise zu 30 ml einer 1%igen wässrigen PVA-Lösung gegeben. Anschließend wurde das Aceton mithilfe des Rotationsverdampfers abgezogen.

Diese Methode lieferte optimierte Partikeleigenschaften (siehe Versuch 7 in Tabelle 20), der mittlere Partikeldurchmesser betrug 225 nm bei einem PDI von 0,007. Die Nanopräzipitation eignet sich grundsätzlich nicht zur effizienten Verkapselung des hydrophilen Wirkstoffes Desmopressin. Da aufgrund der teilweisen Löslichkeit in Aceton einige nicht näher charakterisierte Polymerbestandteile abgetrennt werden mussten, war die Zusammensetzung der Partikelformulierung nicht mehr eindeutig definiert. Aus diesen Gründen wurde der Ansatz zur Herstellung der Partikelformulierung mit Cystein PEA mittels Nanopräzipitation verworfen.

Nachdem bei der Nanopräzipitation sehr gut gezeigt werden konnte, dass das Polymer an sich zur Herstellung von stabilen Nanopartikeln geeignet ist, war davon auszugehen, dass der Austausch des Lösungsmittels für die Bildung von größeren Partikeln im Mikrometerbereich verantwortlich war. Dass Ethylacetat sehr gut zur Herstellung von Nanopartikeln mit der Doppelemulsionsmethode geeignet ist, wurde bereits in Kapitel 4.2 hinreichend gezeigt. Um

die positiven Eigenschaften von Ethylacetat auch bei der Partikelherstellung mit Cystein PEA zu nutzen, wurden Mischungen von DCM und Ethylacetat mit einem möglichst hohen Anteil an Ethylacetat getestet. In Tabelle 16 wurde bereits gezeigt, in welchen Mischungsverhältnissen der beiden Komponenten die Cystein PEA Polymere gut löslich sind. Die aus dieser Überlegung resultierende angepasste Methode zur Verkapselung von Desmopressin in Cystein PEA wird im folgenden Abschnitt beschrieben.

4.3.2.3 Für Cystein PEA angepasste Doppalemulsionsmethode

Als Lösungsmittel für PEA 09 wurden 3 Teile Ethylacetat mit 1 Teil DCM gemischt. Abhängig von der verwendeten Polymercharge musste der DCM-Anteil bis zu einem Verhältnis von 2:1 erhöht werden (beispielsweise für PEA 10). Die Bestandteile wurden eingewogen und die Lösungen entsprechend der Angaben in Tabelle 21 hergestellt. Die PVA Lösung wurde für 3 Stunden mit dem Magnetrührer bei 800 UpM gerührt, die mit Parafilm abgedeckte Polymerlösung für 15 min bei 500 UpM.

Falls eine Fluoreszenzmarkierung der Partikel gewünscht war, wurden der Polymerlösung 300 µl einer Lumogen Red Lösung (1 mg/ml) in Aceton zugesetzt.

Tabelle 21 Zusammensetzung der Lösungen, die zur Herstellung von PEA Cystein Partikeln verwendet wurden.

Lösung Nr.	Substanzen	Einwaage[g]	Lösungsmittel	Anteil [%]	Menge [g]
1	PEG 4000 Desmopressinacetat	0,2 0,040	demineralisiertes Wasser	2,5 0,5	8,0
2	Polyesteramid Cystein	0,32	Ethylacetat/DCM Mischung 3:1 oder 2:1	1,0	32,0
3	PVA	0,96	dem. Wasser	0,8	120,0
4	Sorbitol Mannitol	0,432 0,288	dem. Wasser	0,9 0,6	48,0

Lösung Nr. 1 (W_1) wurde tropfenweise unter Rühren mit dem Ultra-Turrax bei 10.000 UpM zu Lösung Nr. 2 gegeben, sodass eine milchig trübe W_1/O -Emulsion entstand. Nach vollständiger Zugabe der wässrigen Lösung wurde für 5 min bei 12.000 UpM homogenisiert. Die W_1/O -Emulsion wurde tropfenweise unter Rühren mit dem Magnetrührer bei 800 UpM zu Lösung Nr. 3 gegeben. Die nun entstandene $W_1/O/W_2$ Rohemulsion wurde für 5 min bei 12.000 UpM mit dem Ultra-Turrax homogenisiert. Anschließend wurde der Emulsion mithilfe des Rotationsverdampfers unter Anlegen eines Vakuums das restliche Ethylacetat entzogen

(Wasserbad 29 °C, bis durch schrittweises Absenken ein Druck von 30 mbar erreicht wird, für die Dauer von ca. 20 min).

Es entstand eine milchig trübe Suspension, die während der Destillation etwas klarer und mehr opaleszierend wurde. Mithilfe des Nicomp particle sizing Systems (DLS-Methode) wurde die Partikelgröße ermittelt. Das Ergebnis der Partikelgrößenmessung von Partikeln aus PEA 09 ist in Abbildung 20 dargestellt.

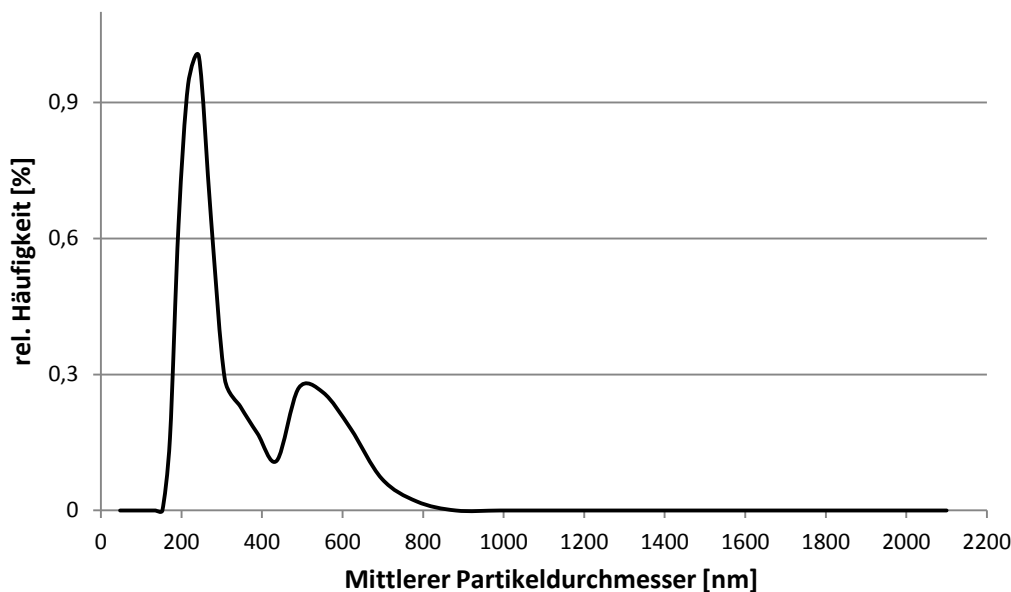


Abbildung 20 DLS-Messung: Partikelgrößenverteilung der PEA Cystein Partikelsuspension nach Anwendung der optimierten Doppemulsionsmethode, Versuch Nr. 8 in Tabelle 20 mit PEA 09.

Die optimierte Herstellungsmethode führte mit PEA 09 noch immer zu einer bimodalen Partikelgrößenverteilung (siehe Abbildung 20), wobei ein hoher und schmaler Peak bei 243 nm liegt und ein kleinerer etwas breiterer bei 491 nm erscheint. Der mittlere Partikeldurchmesser lag bei 392 nm mit einem PDI von 0,150. Die Bildung von größeren Partikeln im Bereich zwischen 1,4 μm und 3,3 μm konnte durch die Beimischung von Ethylacetat erfolgreich verhindert werden.

Ein weiterer Versuch wurde mit einer neuen Polymercharge des Cystein PEA Typs, mit PEA 10, durchgeführt. Nachdem die Partikel mit der optimierten Methode hergestellt wurden, wurde Lösung Nr. 4 aus Tabelle 21 angesetzt und entsprechend der in den Kapiteln 4.1.3 und 4.2.3 beschriebenen optimierten Gefriertrocknungsmethode getrocknet. Die Partikelgrößenverteilung wurde direkt nach der Herstellung und Aufreinigung der Partikel in Suspension und nach der Trocknung und Redispersierung des Lyophilisats gemessen. Die Ergebnisse wurden in Abbildung 21 grafisch aufgetragen.

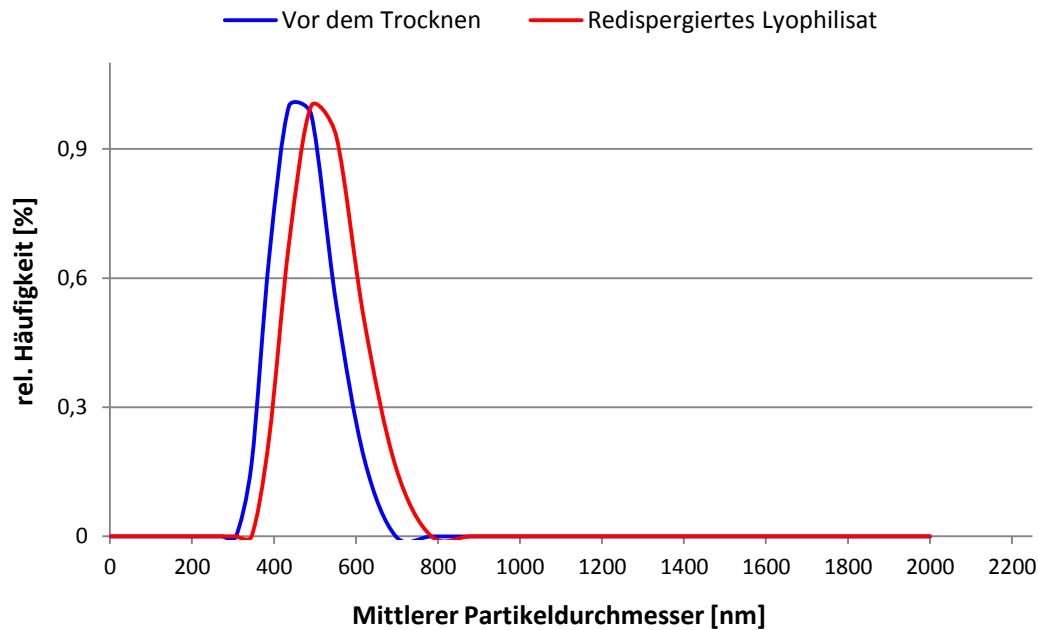


Abbildung 21 DLS-Messung: Partikelgrößenverteilung der PEA Cystein Partikelsuspension nach Anwendung der optimierten Doppemulsionsmethode, Versuch Nr. 10 in Tabelle 20 mit PEA 10, blau: vor dem Trocknen, rot: nach dem Trocknen und Redispergieren der Probe in destilliertem Wasser.

Bei der Partikelherstellung mit PEA 10 wurde eine monomodale Partikelgrößenverteilung erhalten (siehe Abbildung 21), der mittlere Partikeldurchmesser liegt bei 457 nm und der PDI beträgt 0,126.

Ein Vergleich der Partikelgrößenverteilung vor der Trocknung (blaue Kurve) mit der Verteilung nach der Trocknung und Redispergierung der Partikel in Wasser (rote Kurve) zeigt, dass sich die Partikelgröße durch die Trocknung leicht zu größeren Partikeldurchmessern hin verschoben hat. Nach der Trocknung betrug der anzahlgewichtete mittlere Partikeldurchmesser 509 nm und der PDI 0,259.

Die Erhöhung des mittleren Partikeldurchmessers um 52 nm kann dadurch erklärt werden, dass ein Anteil der Partikel nicht redispergiert werden konnte. Eine relativ geringe Anzahl an deutlich größeren Partikeln wird bei der verwendeten DLS Messung noch nicht als getrennter Peak aufgelöst, fließt jedoch in die Gesamtverteilung statistisch mit ein und führt zu einem größeren mittleren Partikeldurchmesser. Für diese Erklärung spricht auch, dass der volumenbezogene mittlere Partikeldurchmesser mit 557 nm größer ist, als der anzahlgewichtete mittlere Durchmesser mit 509 nm. Bei der volumengewichteten Auswertung fallen gegenüber der anzahlgewichteten Verteilung wenige große Partikel bereits stärker ins Gewicht. Daher kann davon ausgegangen werden, dass der größte Anteil der Primärpartikel unverändert redispergierbar war.

Für die Partikel aus PEA 10 wurde im Gegensatz zu denen aus PEA 09 eine monomodale Partikelgrößenverteilung erhalten, wobei der höhere der beiden Peaks von 243 nm im Versuch mit PEA 09 bei Verwendung von PEA 10 wegfiel (Vergleich von Abbildung 20 mit Abbildung 21) und alle Partikel im Bereich des zweiten und bei PEA 09 kleineren Peaks zwischen 380 nm und 700 nm lagen.

Als Erklärung für diese Beobachtung kommen mehrere Faktoren in Frage. Da zwischen den Polymerchargen Unterschiede in der Löslichkeit bestanden, musste die Zusammensetzung des Lösungsmittelgemisches geändert werden. Diese Anpassung der Methode kann durchaus einen Einfluss auf die Partikelgröße haben. Die Versuche mit PEA 09 konnten aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit des Materials nicht mit dem gleichen Verhältnis von Ethylacetat zu DCM wie im Versuch mit PEA 10 wiederholt werden. Somit konnte nicht sicher geklärt werden, ob ausschließlich die Zusammensetzung des Lösungsmittels für die Unterschiede in der Partikelgrößenverteilung verantwortlich war. Außerdem unterscheiden sich die Polymere, wenn auch nur eher geringfügig, in ihrem Molekulargewicht voneinander. Das mittlere Molekulargewicht von PEA 10 beträgt 18.000 g/mol und das von PEA 09 liegt bei 21.100 g/mol. Die Anzahl der enthaltenen Cysteingruppen sollte ausgehend von den Reaktionsbedingungen bei beiden Chargen gleich sein. Die Unterschiede zwischen den beiden Polymerchargen erscheinen daher geringfügig, führten jedoch bereits zu einer Veränderung der Löslichkeit. In Bezug auf die Partikelgrößenverteilung ist jedoch eher davon auszugehen, dass die Unterschiede in der Zusammensetzung des Lösungsmittels für die unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich waren und nicht die geringen chemischen Unterschiede zwischen den beiden Polymerchargen. Aufgrund dieser Ergebnisse wird als Lösungsmittel zur Herstellung von Partikeln aus Cystein PEA Polymeren mittels Doppemulsionsmethode eine Mischung aus 2 Teilen Ethylacetat mit 1 Teil DCM empfohlen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die angepasste Doppemulsionsmethode zur Herstellung von Nanopartikeln aus Cystein PEA mit einem mittleren Partikeldurchmesser zwischen 390 und 460 nm und einer monomodalen Partikelgrößenverteilung geeignet ist. Die für Partikel aus Resomer[®] RG 503 H optimierte Gefriertrocknungsmethode (Kapitel 4.2.3) eignete sich auch zur Trocknung der Cystein PEA Partikel. Die geringfügige Vergrößerung des mittleren Partikeldurchmessers durch die Trocknung ist durch eine Agglomeration eines geringen Anteils an Partikeln zu erklären.

4.3.3 Verkapselung von Desmopressin in PEA Polymere

Eine wichtige Anforderung, die an die neuen Polymere gestellt wurde, ist eine möglichst hohe Verkapselungseffizienz für Wirkstoffe der BCS Klasse III. Als Modellsubstanz für diese Wirkstoffklasse wurde Desmopressin ausgewählt und mittels der jeweils angepassten

Doppelemulsionsmethode in die beiden PEA Polymere mit Asparaginsäure und Cystein eingekapselt. Zum Vergleich mit dem aktuellen Stand der Technik wurden die Ergebnisse der Mikroverkapselung von Desmopressin in Resomer[®] RG 503 H als Referenz herangezogen.

4.3.3.1 Formulierung von Desmopressin mit Asparaginsäure PEA

Die Ergebnisse der Formulierungsversuche von Desmopressin mit Asparaginsäure PEA wurden in Tabelle 22 zusammengefasst.

Tabelle 22 Ergebnisse der Versuche zur Mikroverkapselung von Desmopressin in Asparaginsäure PEA (Auswahl).

Versuch Nr. / Polymer	EtAc:Ac Verhältnis	PVA Konz.	Partikelgröße vor Trocknung / PDI	Partikelgröße nach Redispergierung / PDI	molarer Anteil [GL-Asp]	Beladung [%]	Verkapselungseffizienz [%]
1 PEA 01	4:1	0,6	246 nm / 0,023	253 nm / 0,043	28%	--	--
2 PEA 01	4:1	0,6	106 nm / 0,113	na.	28%	2,0	6,6
3 PEA 01	4:1	1,0	106 nm / 0,060	110 nm / 0,187	28%	--	--
4 PEA 03	nicht löslich	--	--	--	50%	--	--
5 PEA 04	3:1	0,6	70 nm / 0,06	55 nm / 0,425	40%	2,1	17,7
6 PEA 04	3:1	0,6	3.800 nm / 0,16	2.500 nm / 0,10	40%	1,4	14,0
7 PEA 04	3:1	0,3	263 nm / 0,079	421 nm / 0,307	40%	1,9	11,25
8 PEA 05	3:1	0,3	114 nm / 0,052	Redispergierung nicht möglich	25%	3,0	14,5
9 PEA 05	3:1	0,8	291 nm / 0,099	Redispergierung nicht möglich	25%	--	--
10 PEA 06	3:1	0,5	244 nm / 0,035	278 nm / 0,14	23%	10,0	13,3
11 PEA 08	3:1	0,8	410 nm / 0,146	Redispergierung nicht möglich	23%	8,2	14,9
12 PEA 08	3:1	0,8	292 nm / 0,084	241 nm / 0,104	23%	--	--

Die für PLGA gefundene Korrelation zwischen Partikelgröße und Konzentration des Stabilisators PVA gilt für PEA nicht in gleicher Weise. Da nicht nur das Polymer sondern auch das Lösungsmittel ausgetauscht wurde, war dies allerdings auch nicht zu erwarten. Dass innerhalb der getesteten Konzentrationsgrenzen zwischen 0,5% und 2,5% kein konsistenter Zusammenhang zwischen der PVA Konzentration und der Partikelgröße festzustellen war, entsprach zunächst jedoch nicht den Erwartungen.

Eine mögliche Erklärung hierfür liegt in der genaueren Betrachtung des Prozessablaufes. Da das beigemischte Aceton im Gegensatz zu Ethylacetat mit Wasser mischbar ist, kann davon ausgegangen werden, dass der Herstellungsprozess mechanistisch anders abläuft als unter Verwendung reinen Ethylacetats. Bei Verwendung der Lösungsmittelgemische wird das enthaltene Aceton voraussichtlich direkt nach der Zugabe der organischen Polymerlösung zur W_1 -Phase aus den Emulsionstropfen in die wässrige Phase extrahiert. Hierbei kann es bereits vor der Homogenisierung und der Zerkleinerung der Emulsionstropfen mit dem Ultra-Turrax durch Lösungsmittelentzug zu einer Verfestigung der Polymerpartikel kommen. Dieser Prozess würde dann mehr einer Nanopräzipitation als einer Emulsionsmethode entsprechen. Weiter oben wurde bereits beschrieben, dass bei der Doppelemulsionsmethode die Größe der Emulsionstropfen für die Partikelgröße bestimmend ist. Diese ist wiederum von deren Stabilität und damit von der PVA Konzentration abhängig. Erfolgt nun bereits vor der Zerkleinerung der Emulsionstropfen eine Präzipitation des Polymers, so ist der Einfluss der Tropfengröße nicht mehr für die Partikelgröße entscheidend. Damit sinkt erwartungsgemäß auch der Einfluss der PVA Konzentration auf die Partikelgröße. Da das Polymer zu einem gewissen Anteil auch in reinem Ethylacetat löslich war, kann allerdings nicht mit letzthlicher Sicherheit geklärt werden, ob es sich bei dem Prozess mehr um eine Nanopräzipitation oder um eine Emulsionsmethode handelt. Beispielsweise könnten auch Unterschiede der Dichte und Viskosität durch Beimischung von Aceton zu Ethylacetat für den gegenüber der Doppelemulsionsmethode mit reinem Ethylacetat abweichenden Einfluss der PVA Konzentration verantwortlich sein. Da die Forschung an dieser Stelle vorrangig ergebnisorientiert betrieben wurde, erfolgte keine genauere Untersuchung des mechanistischen Prozessablaufes.

PEA 03 mit einem Morpholingehalt von 50% konnte nicht in einer Mischung von Ethylacetat und Aceton gelöst werden. Das Polymer ist offensichtlich zu hydrophil, um sich im organischen Lösungsmittel zu lösen. Versuch Nr. 4 konnte daher nicht erfolgreich durchgeführt werden. Auch PEA 02 war nicht löslich, obwohl der Morpholinanteil hier mit 35% bereits deutlich niedriger war als bei PEA 03 (vgl. Tabelle 6 auf S. 46).

Die Polymerchargen PEA 01, 04, 05, 06 und 08 eigneten sich zur Verkapselung von Desmopressin in Nanopartikel, wobei die getrockneten Partikel von PEA 05 und PEA 08 nicht redispergierbar waren. Für PEA 01, 04 und 06 hingegen war die mit Resomer[®] RG 503 H Partikeln optimierte Gefriertrocknungsmethode geeignet. Das unterschiedliche Verhalten von PEA 05 und 08 gegenüber PEA 01 und 06 kann möglicherweise durch veränderte Polymereigenschaften aufgrund des relativ niedrigen Entschützungsgrades dieser beiden Polymerchargen von 90% bzw. 73% erklärt werden. In der Formulierung von Placebo Partikeln aus PEA 08 (Versuch Nr. 12) waren die getrockneten Partikel allerdings vollständig redispergierbar. Bei PEA 05 wurde für die Placebo

Formulierung keine bessere Redispergierbarkeit beobachtet als bei der Formulierung mit Desmopressin.

In Versuch Nr. 5 wurde der Microfluidizer mit einem Arbeitsdruck von 250 bar zur Homogenisierung verwendet. Ein Teil des Polymers bildete bereits beim ersten Durchlauf einen grobflockigen Niederschlag, der mit einem Papierfilter abgetrennt wurde. Die verbleibenden Nanopartikel waren mit 70 nm unerwartet klein. Wegen der geringen Partikelkonzentration der Probe war die Standardabweichung bei der DLS Messung dieser Probe jedoch sehr hoch (± 68 nm). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der Microfluidizer, wie bereits weiter oben erwähnt, fortan nicht mehr für die PEA Polymere verwendet. Die Verkapselungseffizienz dieses Versuches von 17,7% fließt nicht in die Gesamtauswertung mit ein.

Der vergleichsweise große Partikeldurchmesser von 3.800 nm bei Versuch Nr. 6 kam dadurch zustande, dass hier die Dopplemulsion (2. Homogenisierung) nicht nochmals homogenisiert, sondern nur mit dem Magnetrührer bei 1.000 UpM für 20 min gerührt wurde. Bei diesem Versuch sollte getestet werden, ob eine möglichst schonende Homogenisierung der Dopplemulsion eine höhere Verkapselungseffizienz bewirken kann. Dies war jedoch mit 14,0% nicht der Fall, es wurden lediglich größere Partikel erzeugt.

Anhand der durchgeführten Versuche ist kein Zusammenhang zwischen dem Morpholingehalt und der Verkapselungseffizienz für Desmopressin erkennbar. Auch auf Basis des Molekulargewichts ist kein eindeutiger und konsistenter Trend festzustellen. Allenfalls die geringere Verkapselungseffizienz von 6,6% bei PEA 01 könnte durch das für Asparaginsäure PEA vergleichsweise niedrige Molekulargewicht von 32.700 g/mol erklärt werden.

Für den Beladungsgrad der Polymere mit Desmopressin besteht ein konsistenter Zusammenhang mit dem Morpholingehalt. Der Beladungsgrad war mit durchschnittlich 9,1% für die Polymere mit dem niedrigsten Morpholinanteil (PEA 06 und 08 mit 23%) am höchsten ($n=2$) und mit durchschnittlich 1,8% für das Polymer mit dem höchsten Morpholinanteil (PEA 04 mit 40%) am niedrigsten ($n=3$). Die Polymere PEA 01 (28% Morpholin) mit einer Beladung von 2,0% und PEA 05 (25% Morpholin) mit 3,0% fügen sich in diese Reihe konsistent ein (jeweils $n=1$). Diese Beobachtung steht den eigentlichen Erwartungen, dass der Beladungsgrad der Partikel mit steigendem Aminoräuregehalt und dadurch bedingten Zunahme der hydrophilen Eigenschaften der Polymere steigen sollte, entgegen. Die Anzahl der durchgeführten Versuche ist allerdings nicht ausreichend, um eine statistisch belastbare Aussage aus den Ergebnissen abzuleiten. Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit der Polymere war die Anzahl der machbaren Versuche limitiert. Eine Untersuchung, ob dieser Trend tatsächlich allgemein für Asparaginsäure PEA zutreffend ist, sollte durch Wiederholung der Versuche in weitergehenden Arbeiten erfolgen.

Die durchschnittliche Verkapselungseffizienz von Desmopressin beträgt für die Gruppe der Asparaginsäure PEA Polymere $12,4\% \pm 2,9\%$ ($n=6$) und der durchschnittliche Beladungsgrad $4,09\% \pm 3,24\%$ ($n=6$).

4.3.3.2 Formulierung von Desmopressin mit Cystein PEA

Die Ergebnisse der Formulierungsversuche von Desmopressin mit Cystein PEA wurden in Tabelle 23 zusammengefasst. Die Diskussion der Partikeleigenschaften im Zusammenhang mit den Herstellungsparametern erfolgte bereits in den vorhergehenden Abschnitten dieses Kapitels „Entwicklung der Doppemulsionsmethode für Cystein PEA Polymere“ und „Für Cystein PEA angepasste Doppemulsionsmethode“. Im folgenden Abschnitt werden daher lediglich die Ergebnisse der Verkapselung von Desmopressin in Cystein PEA diskutiert.

Tabelle 23 Ergebnisse der Versuche zur Verkapselung von Desmopressin in Cystein PEA Partikel.

Versuch Nr. / Polymer	Lösungsmittel	Methode / W ₂ Phase	PVA Konz. [%]	Partikelgröße vor dem Trocknen / PDI	Partikelgröße nach Trocknen, Redispergierung / PDI	Beladung [%]	Verkapselungseffizienz [%]
1 PEA 07	2T EtAc : 1T Aceton	Doppemulsion / Wasser pH 7,0	0,8	629 nm / 0,379	630 nm (56%) 3900 nm (40%)	4,0	28,8
2 PEA 07	DCM	Doppemulsion / PBS pH 5,0	0,8	167 nm (4%) 3255 nm (96%)	3180 nm / 0,874	1,9	15,8
3 PEA 07	DCM	Doppemulsion / PBS pH 5,0	1,5	1630 nm / 0,349	1440 nm / 0,317	4,2	42,9
4 PEA 07	DCM	Doppemulsion / PBS pH 3,5	2,5% Pluronic F68	74 nm (3%) 230 nm (27%) 1450 nm (70%)	na.	--	--
5 PEA 07	DCM	Doppemulsion / PBS pH 3,0 /	0,8	2200 nm / 0,253	2700 nm / 0,331	2,6	20,1
6 PEA 07	DCM	Doppemulsion / Wasser pH 7,0	1,0	162 nm (13%) 2000 nm (87%)	2210 nm / 0,206	4,5	32,6
7 PEA 07	Aceton	Nanopräzipitation / Wasser pH 7,0	1,0	225 nm / 0,007	164 nm / 0,073	--	--
8 PEA 09	3T EtAc : 1T DCM	Doppemulsion / Wasser pH 7,0	0,8	392 nm / 0,150	509 nm / 0,370	1,8	19,3
9 PEA 10	2T EtAc : 1T DCM	Doppemulsion / Wasser pH 7,0	0,8	489 nm / 0,25	607 nm / 0,326	1,7	11,8
10 PEA 10	2T EtAc : 1T DCM	Doppemulsion / Wasser pH 7,0	0,8	457 nm / 0,126	509 nm / 0,259	0,9	13,0

Da die verwendeten Cystein PEA Polymere im Gegensatz zur Gruppe der Asparaginsäure PEA Polymere untereinander nur sehr geringfügige Unterschiede in ihrer chemischen Zusammensetzung aufwiesen (vgl. Tabelle 6 auf S. 46), sind die zum Teil deutlichen Unterschiede in der Verkapselungseffizienz vor allem auf Variationen des Herstellungsverfahrens zurückzuführen. Im Wesentlichen können die Versuche aus Tabelle

23 zu zwei Varianten zusammengefasst werden: 1. Verwendung von reinem DCM als Lösungsmittel (Versuche 2-6) und 2. Verwendung von Mischungen aus Ethylacetat und DCM (Versuche 8-10). Dabei stellt Variante 2 die bezüglich der Partikelmorphologie optimierte Methode dar.

Die Verkapselungseffizienz betrug bei Variante 1 durchschnittlich $27,9\% \pm 10,7\%$ ($n=4$) und bei Variante 2 durchschnittlich $14,7\% \pm 3,3\%$ ($n=3$).

Bei Variante 1 betrug der durchschnittliche Beladungsgrad $3,3\% \pm 1,1\%$ ($n=4$) und bei Variante 2 durchschnittlich $1,5\% \pm 0,4\%$ ($n=3$).

Innerhalb der Ergebnisse für Variante 1 fällt auf, dass Verkapselungseffizienz und Beladungsgrad mit steigender PVA Konzentration zunehmen. Bei Versuch Nr. 3 wurde mit einer PVA Konzentration von 1,5% eine besonders hohe Verkapselungseffizienz von 43,9% erzielt. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass ein höherer Anteil des amphiphilen Stabilisators PVA in den Partikeln diese insgesamt hydrophiler macht, wodurch die Affinität zu Desmopressin erhöht wird. Dies wiederum führt zu einem höheren Beladungsgrad und steigert die Verkapselungseffizienz. Aufgrund unzureichender Materialmengen konnte bei Variante 2 der Einfluss der PVA Konzentration auf die Verkapselungseffizienz nicht näher untersucht werden.

Beim Vergleich der Ergebnisse der beiden Varianten fällt auf, dass die mittlere Partikelgröße bei Variante 1 mit einem hohen Anteil an Mikropartikeln mit einer Größe zwischen 1.500 und 3.300 nm stets deutlich größer ist als bei Variante 2. Bekanntlich können größere Partikel tendenziell höher mit Wirkstoff beladen werden als kleine Partikel. Das Ziel der Partikelformulierung war jedoch Nanopartikel mit einer maximalen Größe von 500 nm herzustellen. Aus diesem Grund scheidet Variante 1 trotz höherer Verkapselungseffizienz aus und Variante 2 wird insgesamt als optimierte Herstellungsmethode für die Formulierung von Desmopressin Nanopartikeln aus Cystein PEA Polymer betrachtet.

4.3.3.3 Zusammenfassung der Mikroverkapselung mit PEA Polymeren

Durch Verwendung der neuen PEA Polymere zur Verkapselung von Desmopressin in Nanopartikel sollte die Verkapselungseffizienz der Doppemulsionsmethode erhöht werden.

Die im Zuge der Evaluation der Doppemulsionsmethode gewonnenen Erkenntnisse hinsichtlich einer kontrollierten Herstellung von Nanopartikeln aus PLGA konnten nicht für die PEA Polymere angewendet werden. Daher wurden die Herstellungsmethoden (Doppemulsion, Aufreinigung, Trocknung) zunächst anhand von Placeboversuchen für die neuen Polymere angepasst und optimiert. Letztendlich gelang es lagerstabile und

redispersierbare Polymernanopartikel sowohl aus Asparaginsäure PEA als auch aus Cystein PEA in trockener Form herzustellen.

Anschließend wurde mit Verkapselungsversuchen gezeigt, dass durch die Verwendung der PEA Polymere an Stelle von PLGA eine teils deutlich höhere Verkapselungseffizienz für das Modellpeptid Desmopressin erzielt werden konnte.

Die durchschnittliche Verkapselungseffizienz von Desmopressin in Nanopartikel aus Resomer[®] RG 503 H betrug 7,47% ($\pm 1,72\%$). Durch Verwendung von Asparaginsäure PEA wurde die Verkapselungseffizienz im Vergleich zum PLGA um 66% auf 12,4% ($\pm 2,9\%$) gesteigert. Mithilfe der Methode, die bezüglich der Verkapselungseffizienz optimale Ergebnisse zeigte, wurde für Cystein PEA eine Steigerung um 273% auf 27,9% ($\pm 10,7\%$) erzielt. Die hinsichtlich der Partikelmorphologie optimierte Methode mit Cystein PEA ermöglichte eine Steigerung der Verkapselungseffizienz um 97% auf 14,7% ($\pm 3,3\%$).

Auch der Beladungsgrad der Partikel konnte mit den PEA Polymeren im Vergleich zu PLGA erhöht werden. Der Beladungsgrad der Partikel aus Resomer[®] RG 503 H betrug durchschnittlich 0,84% ($\pm 0,22\%$). Die Asparaginsäure PEA Partikel waren zu 4,09% ($\pm 3,24\%$) mit Desmopressin beladen und die Cystein PEA Partikel bei Methodenvariante 1 zu 3,3% ($\pm 1,1\%$) und bei Variante 2 zu 1,5% ($\pm 0,4\%$).

Basierend auf den Ergebnissen der Herstellungsvariante 1 für Cystein PEA Partikel ist davon auszugehen, dass durch Erhöhung der PVA Konzentration auch bei der optimierten Herstellungsvariante 2 die Verkapselungseffizienz für Desmopressin weiter gesteigert werden kann. Um diese Annahme zu bestätigen, müssten jedoch im Rahmen anschließender Arbeiten weitere Versuche durchgeführt werden.

4.3.4 Charakterisierung der Polyesteramid Partikel

Im folgenden Abschnitt erfolgt die pharmazeutische und biopharmazeutische Charakterisierung der nanopartikulären PEA Formulierungen mit Desmopressin. Die Ergebnisse der *in vitro*-Resorptionsversuche und der *in vivo*-Bioverfügbarkeitsstudien werden in Kapitel 4.7 vorgestellt.

4.3.4.1 Rasterelektronenmikroskopie

Anhand von REM Aufnahmen erfolgte eine morphologische Charakterisierung der PEA Partikel. Außerdem wurden die Aufnahmen zur Plausibilitätsüberprüfung der DLS Messungen herangezogen. In Abbildung 22 sind einige Aufnahmen von gefriergetrockneten Asparaginsäure PEA Partikeln zu sehen.

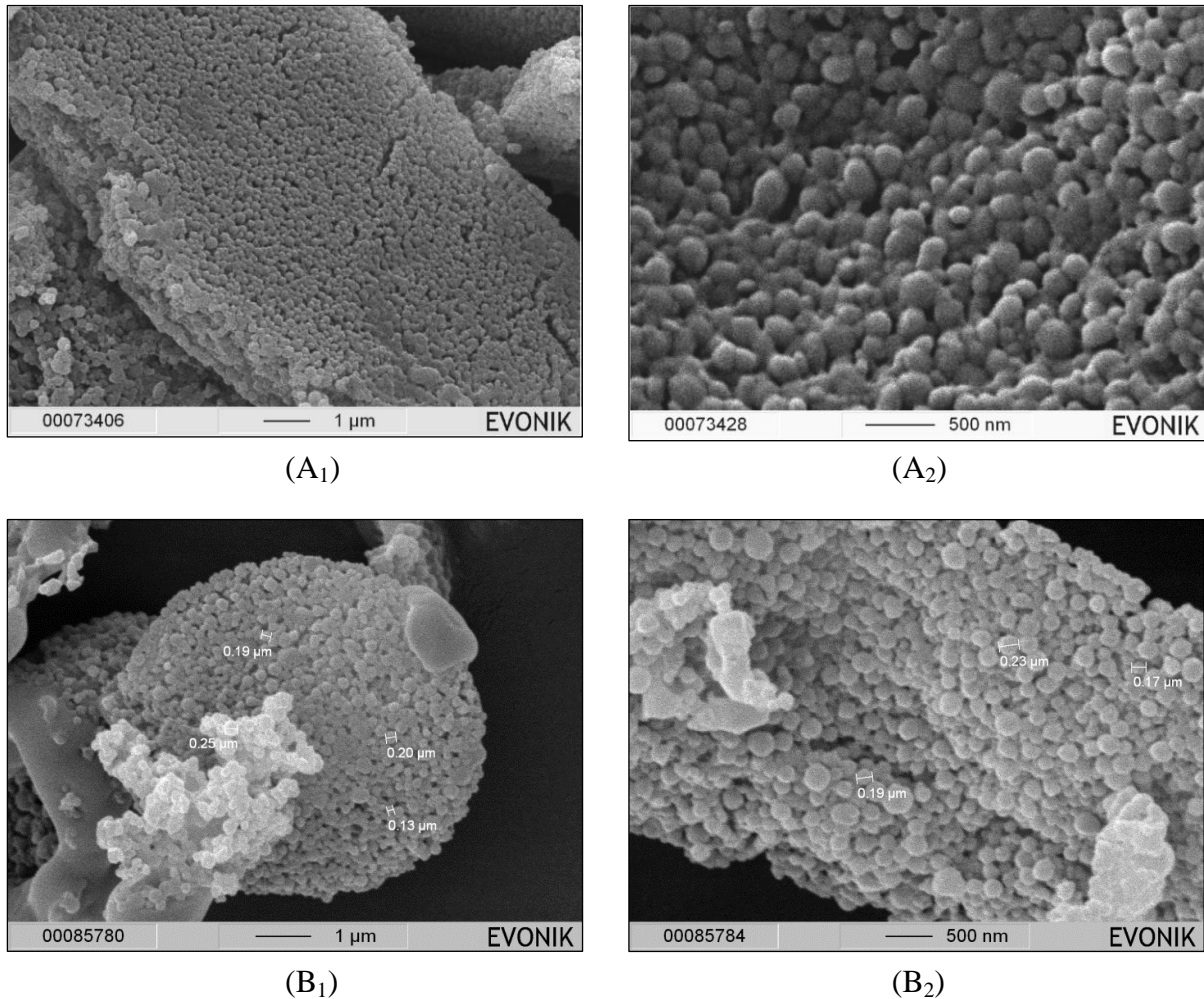


Abbildung 22 REM Aufnahmen von gefriergetrockneten Nanopartikeln aus Asparaginsäure PEA; Probe A: Placebopartikel aus PEA 01, Versuch Nr. 1 in Tabelle 22; Probe B: Desmopressin-beladene Partikel aus PEA 06, Versuch Nr. 10 in Tabelle 22.

Die Aufnahmen beider Proben in Abbildung 22 zeigen sphärische und teilweise uneinheitlich geformte Partikel. In Probe A sind die Partikel makroskopisch als Plättchen angeordnet (A₁) und in Probe B lagern sie sich zu kugelförmigen Agglomeraten zusammen (B₁). In Probe A besteht das gesamte zu sehende Material aus Partikeln, die einen Durchmesser zwischen 100 nm und 300 nm aufweisen. Die Partikel in Probe B erscheinen in der Gesamtübersicht in etwa ähnlich groß wie die Partikel aus Probe A, sie haben einen Durchmesser zwischen 150 nm und 300 nm. Die DLS Messung ergab für Probe A einen mittleren Partikeldurchmesser von 246 nm (Versuch Nr. 1 in Tabelle 22) und für Probe B von 244 nm (Versuch Nr. 10 in Tabelle 22). Die Beobachtungen der REM Analyse stehen mit den Ergebnissen der DLS Partikelgrößenmessungen sehr gut in Einklang.

Probe B enthält auch Bereiche mit stärker aggregierten Partikeln und geringe Mengen an nicht partikulär geformtem Material. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass Probe B im Gegensatz zu Probe A den Wirkstoff Desmopressin enthält, der auch an der Außenseite der

Partikel anhaftet und eine Art „Kit“ zwischen den Partikeln bildet. Im Zusammenhang mit Untersuchungen zur Schmelzextrusion wurde zudem beobachtet, dass neben den häufig verwendeten klassischen Weichmachern auch Wirkstoffe die Glasübergangstemperatur von Polymeren herabsetzen können und auf diese Weise ebenfalls als Weichmacher wirken¹³⁹. Es ist anzunehmen, dass dies auch für Desmopressin zutrifft, wodurch die stärkere Verfilmung der wirkstoffhaltigen Probe zu erklären wäre.

In beiden Proben liegen die Partikel sehr dicht aneinander und scheinen teilweise miteinander verschmolzen zu sein. Die DLS Messungen der redispergierten Proben zeigten jedoch jeweils, dass sich die Partikel weitgehend vereinzelt redispergieren ließen. Es ist naheliegend, dass die starke Agglomeration der Partikel im Zuge der Probenaufbereitung für die REM Analyse mit Vakuumtrocknung und Goldbeschichtung verursacht wurde.

Die Partikelgrößenverteilung erscheint in der Übersicht weitgehend einheitlich. Diese Beobachtung steht mit den sehr niedrigen per DLS gemessenen PDIs von 0,023 für Probe A und 0,035 für Probe B in Einklang.

Abbildung 23 zeigt Aufnahmen von Cystein PEA Partikeln. Diese Aufnahmen wurden mit einer Probe der Partikelsuspension direkt nach der Herstellung und Aufreinigung der Partikel erstellt. Die Suspension wurde 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt und direkt auf einen REM Probenträger aufgetragen. Nach dem Eintrocknen der Probe im Vakuum und der Bedampfung mit Gold wurde die Analyse durchgeführt. Eine direkte Aufnahme des gefriergetrockneten Pulvers war mit Cystein PEA nicht erfolgreich, da die Partikel im Zuge der Probenaufbereitung für die REM Analyse vollständig ineinander verschmolzen waren und einen Film bildeten.

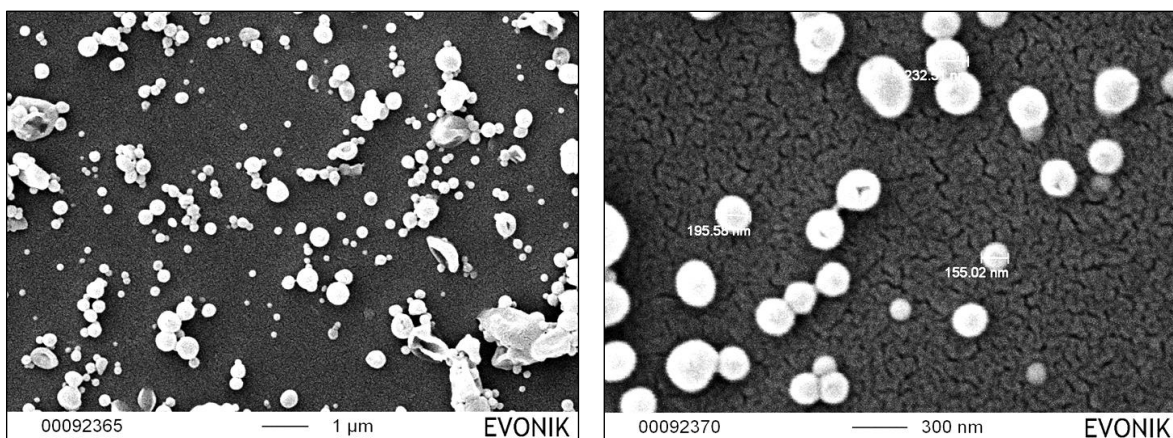


Abbildung 23 REM Aufnahmen von gefriergetrockneten mit Desmopressin beladenen Nanopartikeln aus Cystein PEA, Versuch Nr. 8 in Tabelle 23, verwendetes Polymer: PEA 09.

Die Übersichtsaufnahme in Abbildung 23 links zeigt weitgehend vereinzelte und nicht agglomerierte sphärische Partikel mit einer relativ breiten Partikelgrößenverteilung. Anhand beider Aufnahmen können Partikel mit ungefähren Durchmessern zwischen 100 nm und 600 nm identifiziert werden. Außerdem finden sich einige wenige Bruchstücke mit einer Größe zwischen 1 µm und 2 µm. Die DLS Messung der Probe (Versuch Nr. 8 in Tabelle 23) ergab 392 nm mit einem PDI von 0,150. Diese Ergebnisse stehen sehr gut in Einklang mit den Beobachtungen der REM Analytik. Vergleicht man die Aufnahmen der Cystein PEA Partikel mit denen der Asparaginsäure PEA Partikel, so ist die breitere Partikelgrößenverteilung der Cystein PEA Partikel, die sich auch in der DLS Messung widerspiegelt, zu erkennen.

4.3.4.2 In vitro-Freisetzung des Modellwirkstoffes aus PEA Partikeln

Formulierungen mit Asparaginsäure PEA

Die Wirkstofffreisetzung aus unterschiedlichen Asparaginsäure PEA Partikelformulierungen wurde jeweils in zwei verschiedenen wässrigen Medien getestet (0,1 molare Salzsäure und Phosphat-Pufferlösung pH 7,2 nach Ph.Eur.).

Ergebnisse der Freisetzung in Phosphatpuffer pH 7,2:

	10 min	5 Stunden
Formulierung 1 (PEA 01, 106 nm):	80.7%	92.4%
Formulierung 2 (PEA 04, 114 nm):	20.0%	24.0%
Formulierung 3 (PEA 05, 263 nm):	59.3%	60.5%

In 0,1 molarer Salzsäure wurde bei allen drei Formulierungen nach fünf Stunden nicht mehr als 1% des verkapselten Wirkstoffanteils freigesetzt. Parallel wurde die Stabilität des Wirkstoffes in den beiden Medien bei gleichen Versuchsbedingungen per HPLC überprüft und bestätigt.

Als Ergebnis für Asparaginsäure PEA kann festgehalten werden, dass die Freisetzung des Wirkstoffs Desmopressin aus den Partikeln pH-abhängig erfolgt. Bei einem magensauren pH-Wert erfolgte nahezu keine Freisetzung, während bei einem pH-Wert von 7,2 die Freisetzung sehr schnell ablief. Außerdem wurde festgestellt, dass der Wirkstoff aus dem relativ gesehen lipophilsten PEA 01 Polymer bereits innerhalb von wenigen Stunden nahezu vollständig freigesetzt wurde, während die Freigabe aus dem am wenigsten lipophilen PEA 04 nach schneller Freisetzung von 20% (*burst release*) nur noch sehr langsam ablief und nach 5 Stunden erst 24% erreichte. Der hydrophile Wirkstoff Desmopressin ist aufgrund der höheren

Affinität zum relativ gesehen hydrophilsten PEA Polymer stärker in den Partikeln gebunden und wird daher langsamer freigesetzt als aus den Formulierungen mit den Polymeren mit stärker lipophilen Eigenschaften.

Es kann allerdings lediglich der geringere enthaltene Wirkstoffanteil vor der Magensäure geschützt werden, der auch in das Polymer eingekapselt wurde.

Formulierungen mit Cystein PEA und PLGA

Da für Cystein PEA im Gegensatz zum Asparaginsäure-Typ aufgrund der chemischen Polymerstruktur keine pH-abhängige Freisetzung zu erwarten war, wurde der Test lediglich in wässrigem Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 6,8 durchgeführt.

Untersucht wurden drei unterschiedliche Chargen von Desmopressin Formulierungen mit Cystein PEA (Nr. 6, 8 und 10 in Tabelle 23 auf S. 105). Da die Freisetzungsprofile aller drei Formulierungen sehr ähnlich waren, die mittlere Standardabweichung des freigesetzten Anteiles betrug $\pm 4,8\%$, wurden die Daten gemittelt und in Abbildung 24 in einer Darstellung zusammengefasst.

Analog zum Freisetzungstest der Cystein PEA Formulierungen wurde die Freisetzung von Desmopressin aus PLGA (Resomer[®] RG 503 H) Partikeln untersucht und ebenfalls in Abbildung 24 grafisch aufgetragen.

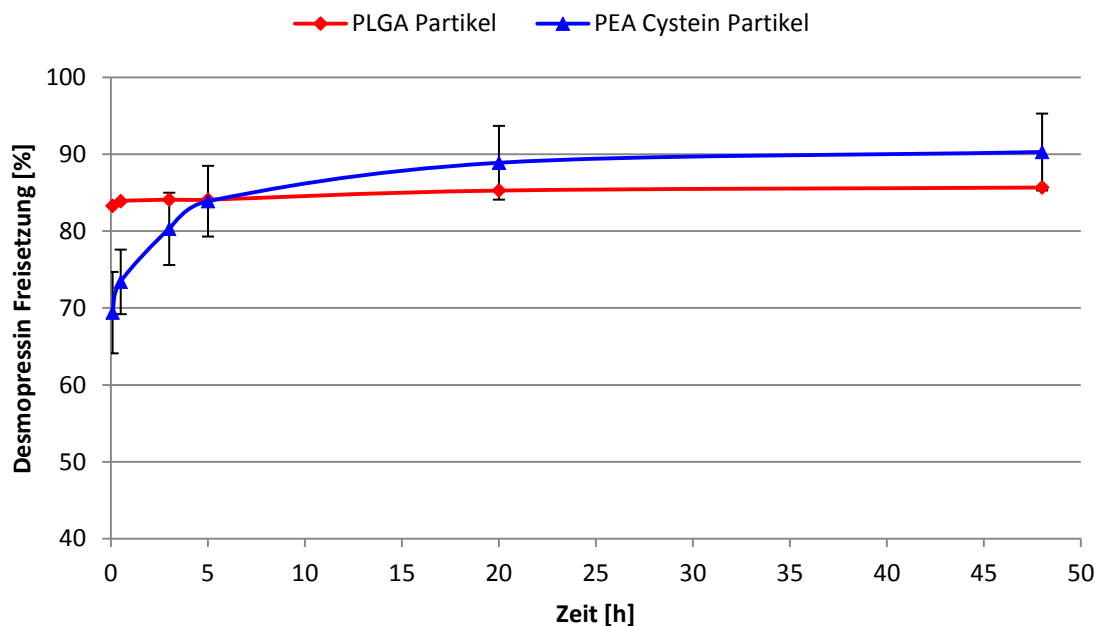


Abbildung 24 Freisetzung von Desmopressin aus PEA Cystein und PLGA Partikelformulierungen; kumulativ pro Zeit aufgetragen; FreisetzungsmEDIUM: Phosphatpuffer pH 6,8 nach Ph.Eur.; rote Kurve: Freisetzung aus PLGA Partikeln, blaue Kurve: Freisetzung aus PEA Cystein Partikeln; 100% entsprechen dem gesamten Wirkstoffgehalt der Formulierungen; Proben wurden nach 5min, 30min, 3h, 5h, 20h und 48h entnommen.

Der bereits nach 5 min freigesetzte Wirkstoffanteil betrug bei PEA Cystein 69,4% und bei PLGA waren es 83,3%. Es liegt nahe, dass es sich hierbei um den Wirkstoffanteil handelt, der nicht in die Polymere eingekapselt wurde. Bis zum Zeitpunkt von 5 Stunden wurden aus der Cystein PEA Formulierung weitere 14,5% des enthaltenen Wirkstoffes retardiert freigesetzt. Bei PLGA waren es im gleichen Zeitraum lediglich 0,8%. Im Zeitraum zwischen 5 Stunden und 20 Stunden wurden aus den PEA Partikeln lediglich noch weitere 5% Desmopressin freigesetzt. Bei PLGA waren es im gleichen Zeitraum 1,2%.

An den absoluten Werten gemessen liegt die Freisetzungskurve von Desmopressin aus PLGA insgesamt auf einem deutlich niedrigeren Niveau als die der PEA Formulierungen. Dies liegt daran, dass die Formulierung mit PLGA insgesamt weniger Desmopressin enthielt als die Formulierungen mit PEA. Dieser Aspekt ist in Abbildung 24 nicht ersichtlich.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass der größte Anteil des aus den Cystein PEA Nanopartikeln insgesamt retardiert freigesetzten Desmopressins nach 5 Stunden freigesetzt wurde. Der gesamte nach 48 Stunden aus Cystein PEA Partikeln retardiert freigesetzte Anteil betrug 20,3% des in der trockenen Formulierung insgesamt enthaltenen Desmopressins.

Nach 48 Stunden wurden aus den Formulierungen mit Cystein PEA insgesamt 90,3% ($\pm 5,0\%$) und aus der Formulierung mit PLGA 85,7% Desmopressin freigesetzt.

Aus der PLGA Formulierung wurden nach einem hohen *burst release* keine weiteren nennenswerten Wirkstoffanteile freigesetzt. Die hohe Freisetzung bereits nach 5 Minuten erklärt sich dadurch, dass die Beladung der PLGA Partikel mit Wirkstoff deutlich geringer war als die der Cystein PEA Partikel. Daher macht der nicht verkapselte Wirkstoffanteil bei PLGA mehr vom gesamten Gehalt der Formulierung aus als bei Cystein PEA. Ein weiterer Grund für die schnelle Freisetzung aus der Formulierung ist die geringe Affinität des hydrophilen Desmopressins mit dem eher hydrophoben PLGA. Hier stellt sich jedoch die Frage, weshalb trotz einer schnellen Freisetzung und geringen Affinität zwischen Desmopressin und Polymer insgesamt nach 48 Stunden lediglich 85,7% freigesetzt wurden. Da die Beladung der PLGA Partikel wie bereits beschrieben sehr niedrig war, handelt es sich bei dem nicht freigesetzten Wirkstoffanteil von 14,3% absolut gesehen lediglich um ca. 0,1 μg Desmopressin pro 100 μg Polymer. Dies entspricht im Freisetzungstest einer Menge von 20 μg Desmopressin in einem Volumen von 100 ml. Es ist naheliegend, dass diese geringe Wirkstoffmenge durch Absorption an Partikel- und Gefäßoberflächen aus dem Freisetzungsmedium entzogen wurde.

Verglichen mit PLGA eignet sich Cystein PEA erheblich besser zur kontrollierten Freisetzung von Desmopressin aus Nanopartikeln. Da der größte Anteil des verkapselten Wirkstoffs aus Cystein PEA innerhalb eines Zeitraumes von 5 bis 6 Stunden retardiert freigesetzt wird, ist

eine orale Anwendung der Formulierung auch dann sinnvoll, falls die polymeren Arzneistoffträger nicht in den systemischen Blutkreislauf aufgenommen werden sollten und die Freisetzung des Wirkstoffs auf der apikalen Seite des Darmepithels erfolgen sollte. Basierend auf den im allgemeinen Teil dieser Arbeit zitierten Literaturdaten ist zudem davon auszugehen, dass die Cystein-haltigen Polymernanopartikel aufgrund von mukoadhäsiven Eigenschaften eine im Vergleich zu den üblichen 5 bis 6 Stunden verlängerte Dünndarmpassagezeit besitzen. Bezüglich ihres Freisetzungsprofils eignen sich die Cystein PEA Nanopartikel daher hervorragend für eine perorale Applikation von Desmopressin mit verlängerter Wirkstofffreisetzung und einer insgesamt verbesserten Bioverfügbarkeit. Um abzuklären, ob der Plasmaspiegel von Desmopressin nach peroraler Gabe der Partikelformulierung gegenüber der Gabe einer handelsüblichen Formulierung tatsächlich länger aufrecht erhalten werden und ob die Bioverfügbarkeit mithilfe der Nanopartikel insgesamt verbessert werden kann, wurden *in vivo*-Bioverfügbarkeitsstudien durchgeführt. Die Ergebnisse der *in vivo*-Studien werden in Kapitel 4.7.2 beschrieben.

4.3.4.3 Chemischer Nachweis der Funktionalität der Cystein PEA Partikel

Verantwortlich für die spezifische Funktionalität der Cystein PEA Polymere sind wie bereits erwähnt die mit Cystein ins Polymer eingebrachten Thiolgruppen. Zur Überprüfung, ob diese Funktionalität auch für die Partikelformulierungen gegeben ist, wurde ein qualitativer Nachweis für Thiolgruppen mit Ellmanns Reagenz entsprechend der in Kapitel 4.1.5 beschriebenen Methode durchgeführt.

Beim Mischen der Partikellösung mit Ellmanns Reagenz erfolgte ein Farbumschlag von annähernd farblos zu intensiv gelb-orange (positiv auf reduzierende Gruppen). Bei der Negativkontrolle mit PLGA Partikeln hingegen wurde kein Farbumschlag beobachtet (negativ auf reduzierende Gruppen).

Damit war der Nachweis für die Anwesenheit reduzierender Thiolgruppen auf der Partikeloberfläche erbracht. Die Funktionalität der Nanopartikel aus Cystein PEA wurde somit chemisch bestätigt.

4.3.4.4 In vitro-Toxizität PEA Polymere und Partikelformulierungen

Eine erste toxikologische Beurteilung der neuen PEA Polymere und deren Partikelformulierungen erfolgte durch Untersuchung des Einflusses der Proben auf die Viabilität kultivierter Caco-2 Zellen. Die zu testenden Polymerkonzentrationen ergaben sich aus dem durchschnittlichen Wirkstoffbeladungsgrad und einer üblichen Desmopressin Dosis unter der Annahme, dass im Darm ein Flüssigkeitsvolumen von 100 ml zur Auflösung des Arzneimittels zur Verfügung steht. Die Überlegungen haben ergeben, dass bei einer Gabe von

200 µg Desmopressin eine maximale Polymerkonzentration von 0,2 mg/ml im Darm resultieren kann. Folgende Polymerkonzentrationen wurden daher getestet: 2 mg/ml (1:1), 1 mg/ml (1:2), 0,2 mg/ml (1:10) und 0,04 mg/ml (1:50). Die Konzentrationsangabe der Partikelformulierung bezieht sich immer auf die aufgereinigten Polymerpartikel und nicht auf die gesamte Einwaage der Formulierung inklusive Zuckeralkohole. Um den Einfluss von Desmopressin zu testen, wurde auch reines Desmopressin mit einer maximalen Konzentration von 30 µg/ml und in den gleichen Verdünnungen wie die Polymerproben getestet.

Die Viabilität wurde berechnet, indem der Wert der Negativkontrolle auf 100% gesetzt wurde und alle anderen Werte darauf bezogen wurden. Von allen Werten wurden die jeweiligen Hintergrundwerte (Medium bzw. Polymerlösung) abgezogen.

Die Ergebnisse des MTT-Assays mit Asparaginsäure PEA sind in Abbildung 25 dargestellt.

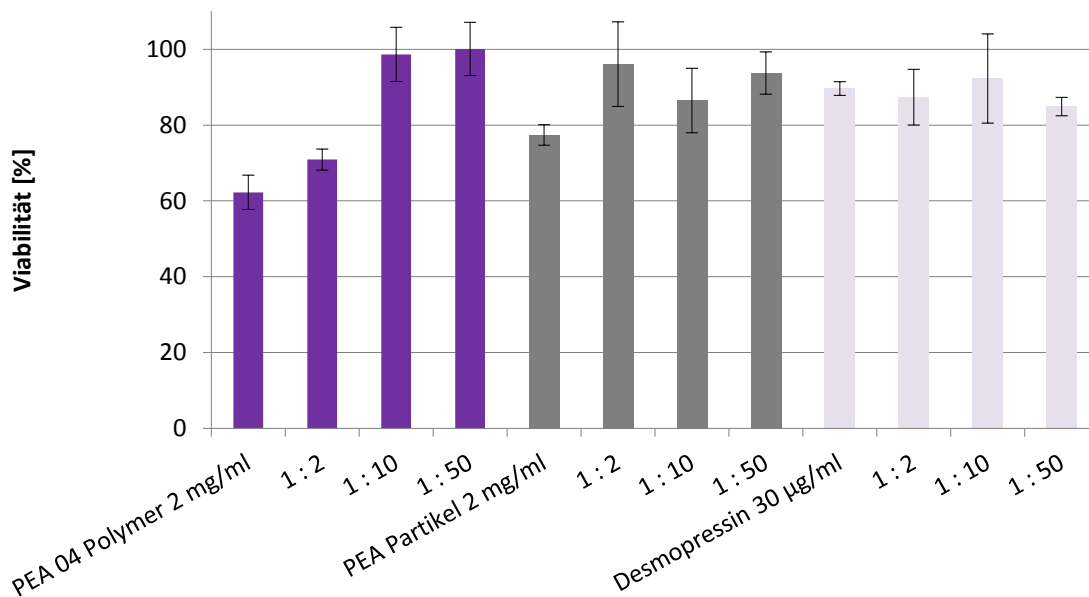


Abbildung 25 Caco-2 Zellviabilität im MTT-Assay mit einer wässrigen Lösung von Asparaginsäure PEA (PEA 04) und mit Desmopressin-beladenen Partikeln aus PEA 04.

Mit den gleichen Proben wurde außerdem ein CellTiter-Glo Test durchgeführt. Die Ergebnisse des CellTiter-Glo Tests sind in Abbildung 26 dargestellt.

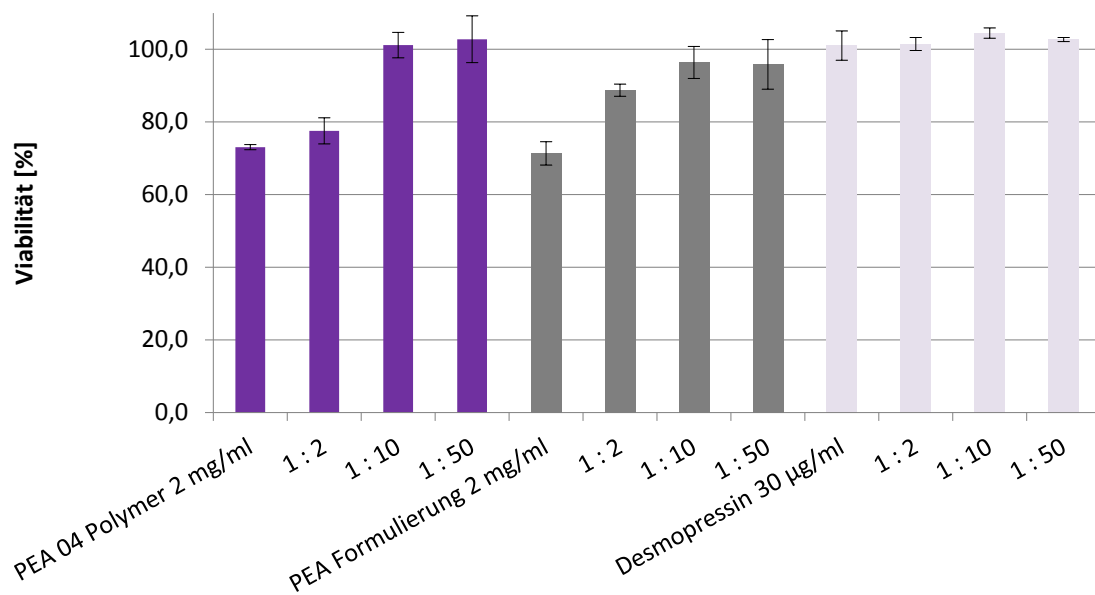


Abbildung 26 Caco-2 Zellviabilität im CellTiter-Glo Assay mit einer wässrigen Lösung von Asparaginsäure PEA (PEA 04) und mit Desmopressin-beladenen Partikeln aus PEA 04.

Ein Vergleich der beiden Diagramme zeigt schnell, dass die Ergebnisse des MTT Tests in Abbildung 25 mit denen des CellTiter-Glo Tests in Abbildung 26 sehr gut korrelieren und nahezu übereinstimmen. Da jedoch beim CellTiter-Glo Test die Standardabweichung generell etwas geringer war, erfolgte die Auswertung der Daten vorwiegend anhand dieses Tests.

Von einer toxischen Wirkung der getesteten Substanzen auf die Zellen wird erfahrungsgemäß dann gesprochen, wenn die Viabilität außerhalb des Bereiches von 80 bis 120% liegt. Liegt die Zellviabilität im MTT und im CellTiter-Glo Test innerhalb dieses Bereiches ist mit großer Wahrscheinlichkeit nicht von einer zytotoxischen Wirkung auf Caco-2 Zellen auszugehen.

Bei den Partikelformulierungen wurde eine signifikante Unterschreitung der 80%-Schwelle nur bei den höchsten Konzentrationen von 2 mg/ml beobachtet. Für die wässrige Lösung von Asparaginsäure PEA (PEA 04) sank die Viabilität bei 2 mg/ml auf 73% ($\pm 0,7\%$) und bei 1 mg/ml auf 77,5% ($\pm 3,6\%$) ab. Die weiteren Verdünnungen der Polymerlösung von 1:10 und 1:50 hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Viabilität.

Die Ergebnisse der Partikelformulierung mit Desmopressin aus dem gleichen PEA 04 waren denen der wässrigen Lösung des gleichen Polymers relativ ähnlich: Bei einer Konzentration von 2 mg/ml sank die Viabilität auf 71,3% ($\pm 3,2\%$) und bei 1 mg/ml auf 88,7% ($\pm 1,7\%$) ab. Die weiteren Verdünnungen lagen nur knapp und nicht signifikant unterhalb von 100%.

Die Viabilität der getesteten Desmopressin Lösungen lag jeweils in allen Konzentrationen beim MTT Test um 90% und beim CellTiter-Glo Test knapp über 100%.

In einem weiteren Viabilitätstest mit CellTiter-Glo wurden Partikel getestet, die aus einem Asparaginsäure PEA Polymer hergestellt wurden, das nach der Polymerisation lediglich zu 73% entschützt werden konnte (PEA 08). Mit diesem Test wurde untersucht, ob sich die Anwesenheit einer höheren Anzahl an Seitengruppen, die noch mit Schutzgruppen versehen sind, auf die Toxizität der Polymere auswirkt.

Im gleichen Test wurden weiterhin zwei Desmopressin-haltige Partikelformulierungen aus Cystein PEA (PEA 07 und PEA 09) mitgeführt, die entsprechend der optimierten Doppalemulsionsmethode hergestellt wurden.

Außerdem wurde im gleichen Versuch der Einfluss einer wässrigen Lösung von PVA auf die Zellviabilität untersucht.

Die Ergebnisse dieses CellTiter-Glo Tests sind in Abbildung 27 dargestellt.

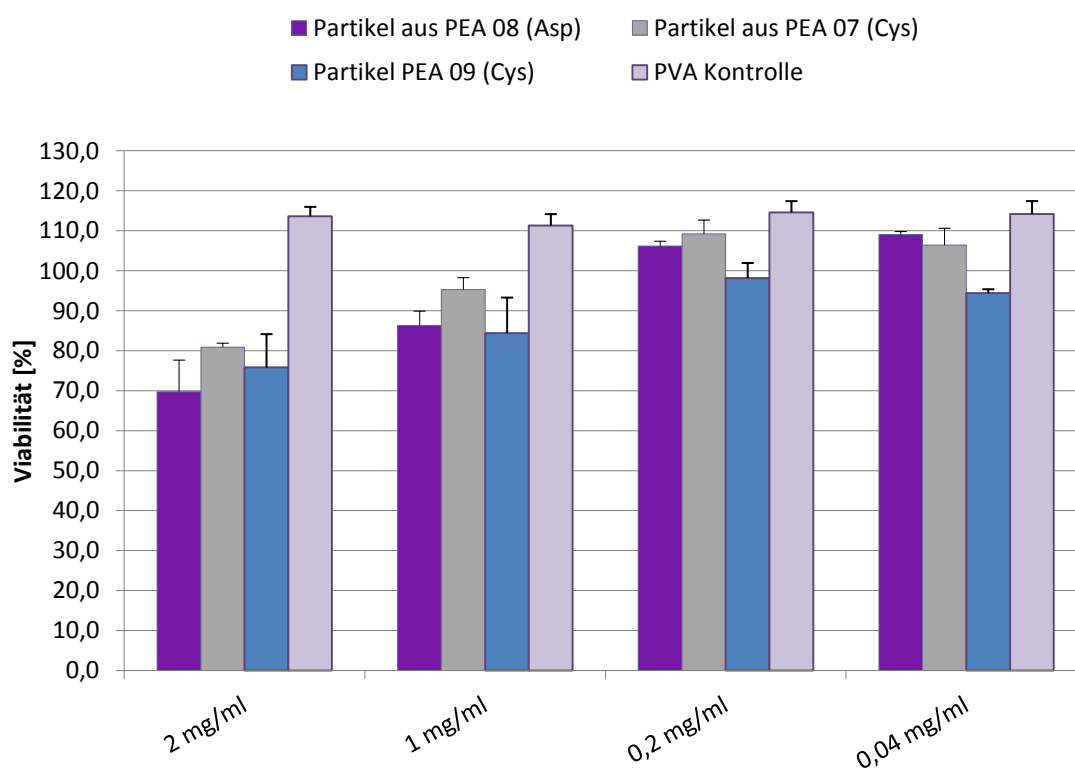


Abbildung 27 Caco-2 Zellviabilität im CellTiter-Glo Assay mit Partikeln aus teilentschütztem Asparaginsäure PEA 08, Desmopressin-beladenen Partikeln aus Cystein PEA 07 und Cystein PEA 09 und mit reiner PVA Lösung.

Die Ergebnisse decken sich weitgehend mit denen des ersten Tests mit Asparaginsäure PEA. Ein Absinken der Zellviabilität unter die Schwelle von 80% wurde lediglich jeweils in der höchsten Konzentration von 2 mg/ml bei den Partikelformulierungen aus Asparaginsäure PEA 08 (69,8% \pm 7,9%) und Cystein PEA 09 (75,8% \pm 7,8%) beobachtet. Die 1:2-Verdünnung der Asparaginsäure Formulierung lag bei 86,3% (\pm 3,6%) und die weiteren Verdünnungen bei 106,2% (1:10) und 109,1% (1:50). Für die 1:2-Verdünnung der Partikel aus Cystein PEA 09 wurde eine Viabilität von 84,4% (\pm 8,0%) gemessen. Bei den weiteren Verdünnungen dieser Probe resultierten Viabilitäten zwischen 94% und 101%.

Die Formulierung aus Cystein PEA 07 führte in der Konzentration von 2 mg/ml zum Absinken der Viabilität auf 80,9% (\pm 1,0%). Alle weiteren Verdünnungen der Partikelsuspension mit Cystein PEA 07 hatten nur einen sehr geringfügigen, jedoch kaum signifikanten Einfluss auf die Zellviabilität.

Die Untersuchung der reinen PVA Lösung ergab einen leichten Anstieg der Viabilität bei allen getesteten Konzentrationen zwischen 114% und 116%. Der obere Schwellenwert von 120% wurde jedoch bei keiner der Proben überschritten. Demnach hat eine PVA Lösung mit einer Konzentration zwischen 0,04 mg/ml und 2 mg/ml keine signifikant toxische Wirkung auf Caco-2 Zellen.

Ein Test mit reinem, nicht partikulärem Cystein PEA Polymer konnte aufgrund der unzureichenden Wasserlöslichkeit dieser Polymerklasse nicht durchgeführt werden.

4.3.5 Zusammenfassende Diskussion

Ziel der Formulierungsversuche mit den neuen PEA Polymeren war die Herstellung wirkstoffbeladener Nanopartikel mit einem mittleren Partikeldurchmesser im Bereich zwischen 200 und 500 nm. Dabei galt es zu untersuchen, ob die neuen Polymere unter Anwendung der Doppemulsionsmethode eine im Vergleich zu PLGA höhere Verkapselungseffizienz für hydrophile Peptide wie beispielsweise Desmopressin besitzen. Zudem galt es die spezifischen Funktionalitäten der Polymere zunächst zu charakterisieren und anschließend deren Erhalt in den Partikelformulierungen zu belegen. Die möglichen Effekte der funktionellen Gruppen sind sehr vielfältig und konnten im Zuge dieser Arbeit zumindest teilweise ganz spezifisch untersucht und beschrieben werden. Eine weitere wesentliche Anforderung war die toxikologische Unbedenklichkeit der Polymere und der Formulierungen innerhalb des therapeutischen Konzentrationsbereiches. Erste Hinweise hierauf wurden durch Untersuchungen der Zellviabilität kultivierter Darmepithelzellen gewonnen. Um wie gefordert ein lagerstabiles und versandfähiges Produkt bereitstellen zu können, mussten die Partikelsuspensionen getrocknet werden. Dazu wurden die für PLGA etablierten Trocknungsverfahren für PEA evaluiert und falls nötig angepasst. Schließlich

wurden die Polymerpartikel morphologisch charakterisiert und die Freisetzungseigenschaften des Modellpeptides aus den Formulierungen untersucht. Die biologische *in vitro*- und *in vivo*-Charakterisierung der Partikelformulierungen zur Beurteilung der Effekte der Partikelformulierungen auf die Bioverfügbarkeit des Modellpeptides wird in einem der nachfolgenden Kapitel gesondert beschrieben.

Nach Anpassung und Optimierung einiger Parameter der für die handelsüblichen PLGA Polymere etablierten Doppelemulsionsmethode konnten nanopartikuläre Wirkstoffträger aus den neuen PEA Polymeren mit Partikeldurchmessern innerhalb des Zielgrößenbereiches erfolgreich hergestellt werden (PEA Asparaginsäure 250-300 nm; PEA Cystein 300-500 nm). Die Optimierung der Herstellungsmethode gelang im Wesentlichen durch die Identifizierung geeigneter Mischungen organischer Lösungsmittel sowie durch eine Anpassung des Homogenisierungsverfahrens. Die hergestellten Partikelsuspensionen konnten mittels Gefriertrocknung erfolgreich in stabile und redispergierbare trockene Pulver überführt werden.

Die Verkapselungseffizienz der Doppelemulsionsmethode für Desmopressin wurde durch Verwendung beider getesteter PEA Polymere (PEA Asparaginsäure 12,4%; PEA Cystein 27,9%) gegenüber PLGA (7,5%) vor allem für PEA Cystein deutlich erhöht.

Als spezifische Funktionalität von Asparaginsäure PEA wurde eine pH-abhängige Wasserlöslichkeit festgestellt, die durch Variation des Asparaginsäuregehalts justierbar ist. Diese Funktionalität blieb für die Partikelformulierungen erhalten und äußerte sich in einer pH-abhängigen Wirkstofffreisetzung des Modellpeptides Desmopressin. Die Freisetzung der verkapselten Anteile von Desmopressin in simuliertem Magensaft konnte nahezu vollständig verhindert werden, während die Freisetzung bei einem pH-Wert von 7,2 abhängig vom Aminosäuregehalt sehr schnell ablief. Aus diesen Ergebnissen lässt sich eine Verwendung des Asparaginsäure PEA Polymers als magensaftresistenter Wirkstoffträger ableiten. Anzumerken ist allerdings, dass der verkapselte und damit geschützte Wirkstoffanteil lediglich bei durchschnittlich 12,4% liegt. Weiterhin lässt sich durch Variation des Asparaginsäuregehalts der Beladungsgrad des Polymers mit Desmopressin steuern.

Die spezifische Funktionalität der Cystein PEA Polymere basiert auf dem Vorhandensein reduzierender Thiolgruppen, die in den wirkstoffbeladenen Partikeln chemisch nachgewiesen wurden. Ein möglicher Effekt dieser Funktionalität wäre wie bereits erwähnt eine besonders ausgeprägte Mukusadhäsivität der Polymerpartikel. Im Zuge dieser Arbeit erfolgte jedoch keine spezifische Untersuchung der mukoadhäsiven Eigenschaften der Partikel. Dieser Aspekt sollte in nachfolgenden Arbeiten detaillierter untersucht werden.

Die Viabilitätstests mit kultivierten Caco-2 Zellen ließen bis zu einer Konzentration von 1 mg/ml an PEA Polymer in Lösung oder als nanopartikuläre Formulierung mit Desmopressin, was in etwa dem 5fachen der *in vivo* zu erwartenden Konzentration von 0,2 mg/ml entspricht, keine toxische Wirkung erkennen. Die negativen Effekte der 10fachen therapeutischen Dosis auf die Zellviabilität sind unabhängig vom Polymertyp bei allen getesteten Proben, auch bei PLGA, aufgetreten. Daher ist davon auszugehen, dass diese Effekte nicht materialspezifisch sind, sondern unspezifisch auf besonders hohe Stoffkonzentrationen auf den Zellen zurückzuführen sind.

4.4 Beschichtung von PLGA Partikeln mit dem zellpenetrierenden hLF Peptidfragment

Die Beschichtung Desmopressin-haltiger PLGA Nanopartikel erfolgte mit dem Ziel, die Aufnahme der Partikel in Darmepithelzellen zu erhöhen und dadurch die Bioverfügbarkeit von Desmopressin zu verbessern. Auf diese Weise, nämlich durch die rationale Formulierung bekannter Substanzen, sollte ein alternativer Weg zur Verwendung vollständig neuer Polymere untersucht werden. Dabei war zu überprüfen, ob durch eine nicht kovalente Funktionalisierung von Nanopartikeln aus herkömmlichen PLGA Polymeren mit dem hLF Peptidfragment bereits ähnliche Ergebnisse wie durch die Verwendung neuer PEA Polymere, die eine kovalent funktionalisierte PLGA Variante darstellen, erzielt werden können.

Dazu wurden mit Lumogen Red[®] und Desmopressin beladene Nanopartikel, die mittels Doppalemulsionsmethode aus Resomer[®] RG 503 H hergestellt wurden, entsprechend der in Abschnitt 4.1.2 auf S. 56 beschriebenen Methode mit hLF beschichtet und anschließend lyophilisiert. Um durch spätere *in vitro* und *in vivo* Tests die ausschließlich auf die Funktionalisierung mit hLF zurückzuführenden Effekte untersuchen zu können, wurde jeweils ein Teil der hergestellten Partikel ohne Inkubation mit Peptid getrocknet. Es wurden jeweils drei Chargen hergestellt und getestet.

Um den Erfolg der Beschichtung der negativ geladenen Oberfläche der PLGA Partikel mit positiv geladenen hLF Molekülen zu bestätigen, wurden die lyophilisierten Partikel in Wasser redispergiert und deren Zetapotential mittels ELS Methode gemessen. Zudem wurde untersucht, ob die Beschichtung einen messbaren Einfluss auf die Partikelgröße besitzt. Die Ergebnisse der DLS und ELS Messungen zur Untersuchung der Oberflächenbeschichtung sind in Tabelle 24 dargestellt.

Tabelle 24 DLS Partikelgrößen- und ELS Zetapotentialmessungen zur Charakterisierung der Beschichtung von PLGA Partikeln mit dem zellpenetrierenden hLF Peptidfragment.

Charge Nr.	Partikeldurchmesser vor Beschichtung und vor Trocknung [nm] / PDI	Partikeldurchmesser ohne hLF , redispergierte Partikel [nm] / PDI	Partikeldurchmesser mit hLF , redispergierte Partikel [nm] / PDI	Zetapotential ohne hLF , redispergierte Partikel [mV]	Zetapotential mit hLF , redispergierte Partikel [mV]
1	243 / 0,003	238 / 0,052	254 / 0,058	-34,3	+7,0
2	263 / 0,049	260 / 0,056	257 / 0,083	-25,4	+2,3
3	199 / 0,008	N/A	N/A	-24,8	+4,2

Aus den DLS Partikelgrößenmessungen, deren Ergebnisse in Tabelle 24 aufgeführt sind, geht hervor, dass sich der mittlere Partikeldurchmesser weder durch die Gefriertrocknung noch durch die Inkubation mit dem Peptid nennenswert verändert hat. Im Rahmen der Messgenauigkeit sind bei den Proben 1 und 2 die mittleren Partikeldurchmesser konstant geblieben. Für Probe 3 wurden daher die entsprechenden DLS Messungen nicht mehr durchgeführt.

Das Zetapotential der jeweils unbeschichteten redispergierten Partikel der drei Chargen betrug durchschnittlich $-28,2$ mV ($\pm 4,1$ mV). Die negative Oberflächenladung der Partikel kommt durch die Carboxyl-Endgruppen des Polymers zustande und entspricht auch betragsmäßig den Erwartungen für PLGA Partikel¹⁴⁰. Durch die Inkubation der Partikel mit hLF veränderte sich das Zetapotential auf durchschnittlich $+4,5$ mV ($\pm 1,7$ mV). Dies ist eine Erhöhung der Oberflächenladung der Partikel um $+32,7$ mV unter Umkehrung der Nettoladung von einem negativen auf einen positiven Wert.

Der beschriebene Einfluss der Inkubation mit dem hLF Peptidfragment auf die Oberflächenladung der PLGA Partikel zeigt, dass sich das positiv geladene Peptid an der Oberfläche der negativ geladenen PLGA Partikel angelagert hat und deren negative Ladung nicht nur kompensiert, sondern sogar einen positiven Ladungsüberschuss bewirkt. Dies ist ein starkes Indiz für den Erfolg der Oberflächenbeschichtung mit dem zellpenetrierenden Peptid.

Um wie bereits erwähnt einige für die perorale Gabe von Peptidwirkstoffen relevante Effekte dieser nicht kovalenten Funktionalisierung zu untersuchen, wurden die unbeschichteten und die beschichteten PLGA Partikelformulierungen mit Desmopressin *in vitro*-Zellaufnahme- und *in vitro*-Resorptionstests unterzogen. Zudem wurde ein eventueller Effekt der beschichteten Partikel auf die Bioverfügbarkeit von Desmopressin *in vivo* getestet. Die Ergebnisse hierzu werden in Kapitel 4.7 ab S. 159 beschrieben.

4.5 Herstellung einer magensaftresistenten Darreichungsform

Zum Schutz des Arzneistoffträgers und sensibler Peptid- und Proteinwirkstoffe vor einem Abbau durch den sauren Magensaft ist die Formulierung einer magensaftresistenten Darreichungsform angezeigt. Bezogen auf die in dieser Arbeit verwendete Modellsubstanz Desmopressin, die wie bereits erwähnt nicht besonders säureempfindlich ist, wird ein solcher Schutz voraussichtlich nicht benötigt. Um jedoch eine Übertragbarkeit der Methoden und Konzepte dieser Arbeit auf säureempfindliche Peptide und Proteine zu gewährleisten, sollte dennoch gezeigt werden, wie ein Schutz vor der Magensäure erreicht werden kann.

Standardmäßig werden hierzu Pulver oder besser Granulate zu Tabletten verpresst, die anschließend mit einem magensaftresistenten Überzug versehen werden. Die gastrointestinale Transitzeit monolithischer Darreichungsformen unterliegt jedoch erheblichen interindividuellen Schwankungen. Dadurch bedingt kommt es zu einer starken Variabilität der pharmakokinetischen Parameter. Außerdem ist eine Gabe überzogener Tabletten an Mäuse im Zuge von *in vivo*-Studien nicht möglich. Durch die Verwendung einer partikulären Darreichungsform hingegen kann zum einen die interindividuelle Variabilität gesenkt werden¹⁴¹ und zum anderen wird eine *in vivo*-Testung der magensaftresistenten Formulierung an Mäusen ermöglicht¹⁴². Daher wurde die Erstellung einer partikulären magensaftresistenten Darreichungsform angestrebt.

Zhu et al. entwickelten eine mikropartikuläre Darreichungsform, die eine gezielte pH-abhängige Freisetzung der darin enthaltenen Nanopartikel in unterschiedlichen Darmabschnitten ermöglichte¹⁴³. Durch Verwendung von Eudragit® FS 30 D zur Erstellung der Mikropartikel gelang eine gezielte Freisetzung der Nanopartikel im Dickdarm. Wurden die Nanopartikel hingegen in Mikropartikel aus Eudragit® L 100-55 eingebettet, so erfolgte die Freisetzung bereits im Dünndarm.

Auf der Jahrestagung der CRS Germany Local Chapter im März 2013 wurde von Schiller et al. eine Methode vorgestellt, die es ermöglicht, Nanopartikel aus PLGA in Mikropartikel aus Eudragit® L mittels Sprühtrocknung so einzubetten, dass sie erst nach der Magenpassage im Dünndarm unverändert wieder freigesetzt werden¹⁴⁴. Diese Arbeiten wurden mit einem Sprühtrockner der Firma ProCepT durchgeführt.

Die gezielte Freisetzung der enthaltenen Nanopartikel im Dünndarm wird bei den beiden zitierten Verfahren dadurch ermöglicht, dass sich die Eudragit® Matrix der Mikropartikel noch nicht bereits im sauren Magensaft, sondern erst bei höheren pH-Werten um 5,5 im Dünndarm auflöst.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode nach Vorbild von Zhu et al. und Schiller et al. verwendet, um fluoreszenzmarkierte Nanopartikel aus PLGA und PEA in Eudragit[®] L 30 D-55 Mikropartikel einzubetten.

4.5.1.1 Einbettung der PLGA und PEA Nanopartikel in Eudragit[®] Mikropartikel

Zunächst wurden jeweils mit Lumogen Red[®] beladene Nanopartikel aus Resomer[®] RG 503 H und aus Cystein PEA mittels Doppemulsionsmethode hergestellt. Die Agglomeration der Partikel erfolgte durch Sprühtrocknung einer wässrigen Eudragit[®] L haltigen Suspension der Nanopartikel. Dazu wurde eine Eudragit[®] L 30 D-55 Dispersion zunächst 1:2 mit Wasser verdünnt und mit 25%iger Ammoniaklösung zu 15% teilneutralisiert. Zu dieser Dispersion wurde so viel von der wässrigen Suspension der Nanopartikel hinzugefügt, dass zwischen Partikeln und Eudragit[®] ein Verhältnis von 1:2 resultierte. Die Sprühtrocknung erfolgte anschließend ohne Zusatz weiterer Substanzen mit einem Nano B-90 Sprühtrockner (Büchi Labortechnik AG, Schweiz). Die Einlasstemperatur betrug 60 °C, die Auslasstemperatur < 37 °C bei einem Luftstrom von 130 L/h, einer Sprütrate von 80% und unter Verwendung einer Membran mit einer Porenweite von 7 µm.

4.5.1.2 Charakterisierung der PLGA-haltigen Eudragit[®] Mikropartikel

Zunächst wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht, ob die mit Lumogen Red beladenen Nanopartikel aus Resomer[®] RG 503 H in die Eudragit[®] L Matrix eingebettet werden konnten. Dazu wurde eine Probe der sprühgetrockneten Mikropartikel in 0,1 molarer Salzsäure und eine zweite Probe in PBS Puffer mit einem pH-Wert von 6,8 dispergiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. In Abbildung 28 ist jeweils eine Aufnahme der beiden Proben gezeigt.

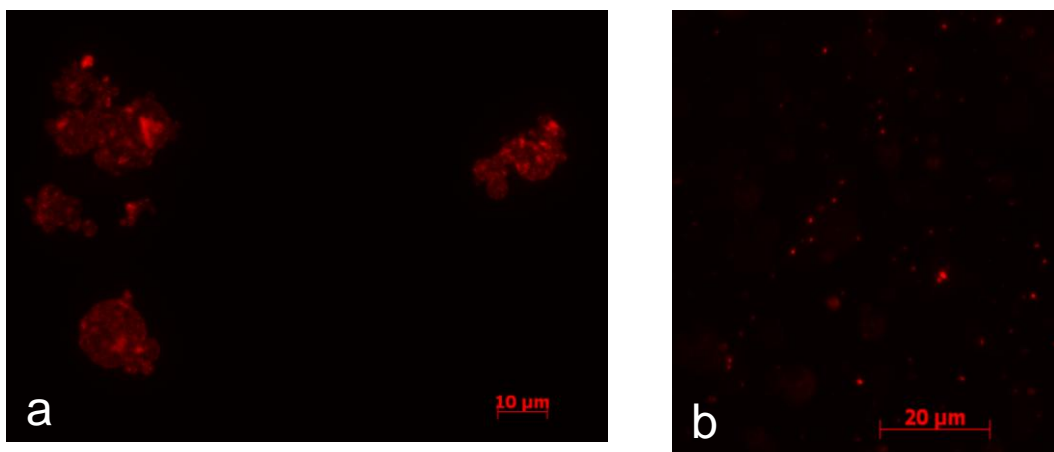


Abbildung 28 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, a: Mit PLGA Partikeln beladene L30 D-55 Mikropartikel dispergiert in 0,1 molarer Salzsäure, b: mit PLGA Partikeln beladene L30 D-55 Mikropartikel dispergiert in PBS Puffer pH 6,8.

In 0,1 molarer Salzsäure sind fluoreszierende Mikropartikel mit einer Größe zwischen 1 μm und 12 μm zu erkennen (Abbildung 28a). Eine Fluoreszenz ist ausschließlich innerhalb der Mikropartikel zu erkennen, was darauf hindeutet, dass die fluoreszenzmarkierten PLGA Nanopartikel vollständig zu Mikropartikeln agglomeriert sind. Dunklere Bereiche der Mikropartikel lassen darauf schließen, dass sie nicht ausschließlich aus agglomerierten PLGA Partikeln bestehen, sondern dass diese vielmehr in eine Art Matrix eingebettet wurden. In der Aufnahme der in PBS Puffer mit einem pH-Wert von 6,8 dispergierten Probe sind keine derartigen größeren Agglomerate von fluoreszierenden Partikeln zu erkennen (Abbildung 28b). Es ist jedoch eine deutlich höhere Anzahl an wesentlich kleineren Partikeln zu erkennen, deren Größe anhand des vorliegenden Maßstabes nicht genauer abgelesen werden kann.

Die Beobachtungen der Fluoreszenzmikroskopie legen den Schluss nahe, dass die PLGA Nanopartikel in Mikropartikel aus Eudragit[®] L eingebettet wurden. In 0,1 molarer Salzsäure waren die Mikropartikel stabil, lösten sich jedoch bei einem gepufferten pH-Wert von 6,8 auf und setzten die fluoreszierenden PLGA Nanopartikel frei. Aus der Überlagerung mit lichtmikroskopischen Aufnahmen ging hervor, dass sich die fluoreszierenden Nanopartikel vollständig innerhalb der Mikropartikel befanden. PLGA und Eudragit[®] waren demnach kolokalisiert und die PLGA Nanopartikel wurden vollständig in Eudragit[®] Mikropartikel eingekapselt. Die Überlagerung mit der lichtmikroskopischen Aufnahme wurde lediglich unter dem Mikroskop betrachtet. Hiervon existieren keine Aufnahmen.

Die pH-kontrollierte Freisetzung der PLGA Nanopartikel aus den magensaftresistenten Mikropartikeln wurde außerdem mittels DLS Messung der Partikelgrößenverteilung untersucht. Ein Teil der PLGA Partikelsuspension wurde ohne Eudragit[®] gefriergetrocknet, ein weiterer Teil der gleichen Suspension wurde wie oben beschrieben mit Eudragit[®] L 30 D-55 sprühgetrocknet. Die Mikropartikel mit Eudragit[®] wurden in 0,1 molarer Salzsäure und in PBS Puffer mit einem pH Wert von 6,8 dispergiert und analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 29 dargestellt.

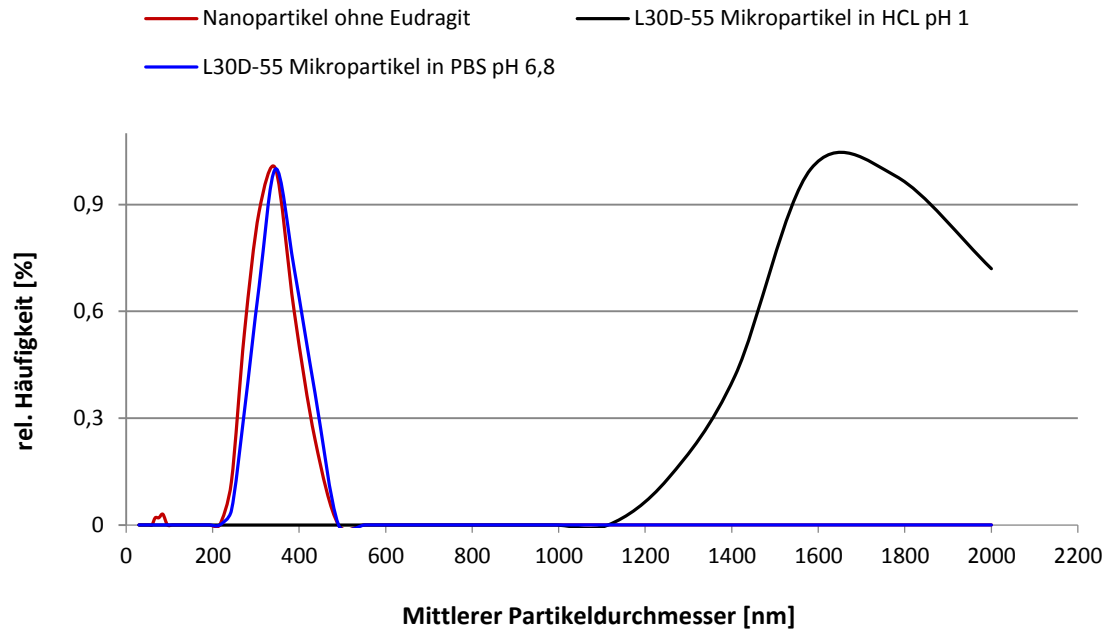


Abbildung 29 DLS Messung der Partikelgrößenverteilung zum Nachweis der pH-kontrollierten Freisetzung von PLGA Partikeln aus Eudragit[®] L Mikropartikeln; rote Kurve: gefriergetrocknete und in Wasser redispersierte Nanopartikel aus Resomer[®] RG 503 H; schwarze Kurve: mit PLGA Partikeln beladene Eudragit[®] L Mikropartikel dispergiert in 0,1 molarer Salzsäure; blaue Kurve: mit PLGA Partikeln beladene Eudragit[®] L Mikropartikel dispergiert in PBS Puffer pH 6,8.

Als Ergebnis der DLS Messung, die in Abbildung 29 dargestellt ist, geht hervor, dass die verwendeten PLGA Nanopartikel erfolgreich und vollständig in Eudragit[®] L Mikropartikel mit einer Größe zwischen 1,2 μm und 2,0 μm eingekapselt wurden.

In Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 6,8 wurden die Nanopartikel in unveränderter Form wieder aus den Eudragit[®] L Mikropartikeln freigesetzt (blaue und rote Kurve in Abbildung 29 sind nahezu deckungsgleich). Die Eudragit[®] Matrix löst sich bei einem pH-Wert von 6,8 aufgrund einer verstärkten positiven Teilladung nach Deprotonierung von Carboxyl-Seitengruppen der Methacrylsäure-Reste vollständig im Puffer auf. Da sich die Mikropartikel im PBS Puffer sehr schnell auflösten, wurde die Messung bereits nach 5 bis 10 min durchgeführt.

4.5.1.3 Charakterisierung der PEA-haltigen Eudragit[®] Mikropartikel

Die pH-abhängige Freisetzung der in Eudragit[®] eingekapselten PEA Cystein Nanopartikel wurde ebenfalls per DLS Messung der Partikelgrößenverteilung analysiert. Gemessen wurden gefriergetrocknete und in Wasser redispersierte Partikel ohne Eudragit[®] sowie eine Probe der magensaftresistenten Mikropartikel, die zum einen in 0,1 molarer Salzsäure und zum anderen in PBS Puffer mit einem pH-Wert von 6,8 dispergiert wurde. Die Ergebnisse sind in Abbildung 30 dargestellt.

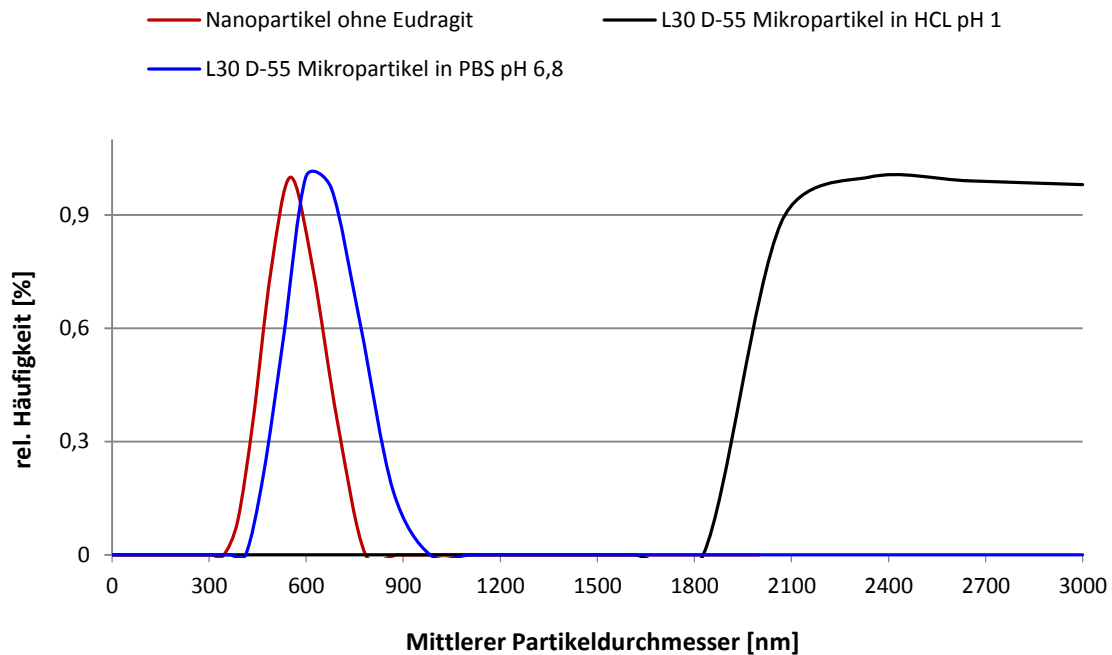


Abbildung 30 DLS Messung der Partikelgrößenverteilung zum Nachweis der pH-kontrollierten Freisetzung von Cystein PEA Partikeln aus Eudragit[®] L Mikropartikeln; rote Kurve: gefriergetrocknete und in Wasser redispersierte Nanopartikel aus Cystein PEA; schwarze Kurve: mit Cystein PEA Partikeln beladene Eudragit[®] L Mikropartikel dispergiert in 0,1 molarer Salzsäure; blaue Kurve: mit Cystein PEA Partikeln beladene Eudragit[®] L Mikropartikel dispergiert in PBS Puffer pH 6,8.

Aus den DLS Messungen, deren Ergebnisse in Abbildung 30 dargestellt sind, geht hervor, dass auch die Nanopartikel aus PEA Cystein vollständig in Eudragit[®] Mikropartikel verkapselt und in Abhängigkeit des pH-Wertes wieder nahezu unverändert freigesetzt werden konnten. Nach der Freisetzung der PEA Partikel in PBS Puffer mit einem pH-Wert von 6,8 war die Partikelgrößenverteilung gegenüber der ohne Eudragit[®] getrockneten PEA Partikel (rote Kurve) leicht zu größeren Werten hin verschoben (blaue Kurve). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass vor allem Partikel aus der kleineren Fraktion nicht vollständig aus den Mikropartikeln redispersiert werden konnten und Agglomerate bildeten. Die Partikelgrößenverteilungen überschneiden sich jedoch weitgehend. Die Abweichung der mittleren Partikeldurchmesser voneinander beträgt 72 nm.

In 0,1 molarer Salzsäure waren die Eudragit[®] Mikropartikel sehr leicht dispergierbar und setzten keine Nanopartikel frei. Sie hatten einen mittleren Partikeldurchmesser zwischen 1.800 nm bis zu mehr als 3.000 nm. Die Partikelgrößenmessung mittels DLS Methode gerät hier an ihre Grenzen, Partikel mit einem Durchmesser von mehr als 3.000 nm können nicht mehr zuverlässig gemessen werden.

4.5.1.4 In vitro-Freisetzung des Modellwirkstoffes aus PEA haltigen Eudragit® Mikropartikeln

Im folgenden Abschnitt dieses Kapitels wird die Freisetzung des Modellpeptides aus Eudragit® Mikropartikeln, die Desmopressin-beladene Cystein PEA Nanopartikel enthalten, beschrieben. Der Freisetzungstest wurde analog zu der in Kapitel 4.1.6 im Abschnitt „Untersuchung der Wirkstofffreisetzung“ beschriebenen Methode durchgeführt. Proben wurden nach 5 min, 30 min, 3h, 5h, 20h und 48h gezogen. Die Freisetzung aus den Eudragit® Mikropartikeln wurde in 0,1 molarer Salzsäure sowie in PBS Puffer mit einem pH-Wert von 6,8 durchgeführt. Für die Freisetzungsuntersuchung aus den Cystein PEA Nanopartikeln ohne Eudragit® wurde ein PBS Puffer mit einem pH-Wert von 6,8 verwendet.

Die Ergebnisse der Freisetzungsuntersuchung sind in Abbildung 31 dargestellt.

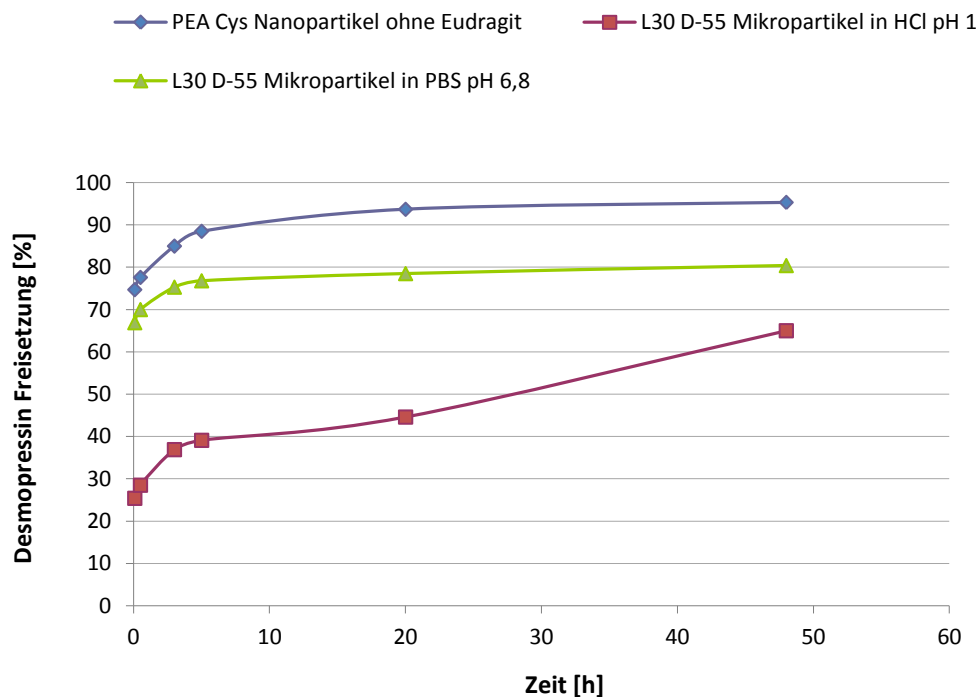


Abbildung 31 Desmopressin Freisetzung aus Formulierungen mit Cystein PEA über einen Zeitraum von 48 Stunden; 100% Desmopressin stellt den gesamten Wirkstoffgehalt der Formulierung dar; blaue Kurve: Freisetzung aus Cystein PEA Nanopartikeln ohne Eudragit® in PBS pH 6,8; grüne Kurve: Freisetzung aus PEA Nanopartikel-haltigen Eudragit® Mikropartikeln in PBS pH 6,8; rote Kurve: Freisetzung aus PEA Partikel-haltigen Eudragit® Mikropartikeln in verdünnter Salzsäure pH 1,0.

Der bereits nach 5 min freigesetzte Wirkstoffanteil betrug bei der Formulierung ohne Eudragit® 74,7%, bei den Mikropartikeln waren es in Salzsäure 25,4% und in PBS Puffer 66,9%. Es liegt nahe, dass es sich hierbei um den Wirkstoffanteil handelt, der nicht in PEA Nanopartikel eingekapselt war, sondern frei in der Eudragit® - bzw. Zuckermatrix vorlag. Im Anschluss an den *burst release* wurde innerhalb der darauffolgenden fünf Stunden bei allen

drei Proben ein Wirkstoffanteil zwischen 10% und 15% retardiert freigesetzt. Bei den PEA Nanopartikeln wurde dann ein Wert von 88,5% erreicht. Aus den Formulierungen mit Eudragit[®] wurden nach 5 Stunden in Salzsäure 39,1% Desmopressin freigesetzt und bei einem pH-Wert von 6,8 waren es 76,8%. Innerhalb der nächsten 15 Stunden wurden aus den PEA Nanopartikeln weitere 5,2% Desmopressin freigesetzt, aus den Mikropartikeln in PBS Puffer waren es lediglich noch weitere 1,7%. Zwischen dem Zeitpunkt von 20 Stunden und 48 Stunden wurden lediglich aus den Eudragit[®] Mikropartikeln in Salzsäure größere Wirkstoffanteile freigesetzt (20,4%). Die Magensaftresistenz der Formulierung brach nach mehr als 20 Stunden deutlich ein, nach 48 Stunden wurden insgesamt 65% des Wirkstoffes freigesetzt, damit jedoch immer noch deutlich weniger als in PBS Puffer. Aus den reinen Nanopartikeln wurden nach 48 Stunden insgesamt 95,3% und aus der magensaftresistenten Formulierung insgesamt 80,4% freigesetzt. Dass aus der magensaftresistenten Formulierung im Anschluss an den *burst release* weniger Desmopressin retardiert freigesetzt wurde als aus den reinen Nanopartikeln, kann dadurch erklärt werden, dass während der Herstellung der Mikropartikel im Vergleich zur Herstellung der reinen Nanopartikel ein größerer Teil des verkapselten Desmopressins bereits wieder freigesetzt wurde. Bei der Mikroverkapselung in Eudragit[®] wurde die Suspension der Nanopartikel stärker verdünnt als die Probe für die Gefriertrocknung und es verging mehr Zeit bis zur Trocknung. Bei der Gefriertrocknung wurde die Freisetzung durch sofortiges Einfrieren der Suspension direkt nach der Herstellung deutlich verlangsamt. Zum Zeitpunkt 5 min betrug die Differenz zwischen beiden Proben lediglich 7,8% und nach 48 Stunden waren es 14,9%. Dies bestätigt, dass die Differenz in der Freisetzung auf Unterschiede im verkapselten Anteil zurückzuführen ist.

Die retardierte Wirkstofffreisetzung in PBS Puffermedium mit einem pH-Wert von 6,8 beschreibt bei den reinen Nanopartikeln sowie bei den Mikropartikeln mit Eudragit[®] die Freisetzung aus den PEA Nanopartikeln. Weiter oben in diesem Kapitel wurde bereits erwähnt, dass die Freisetzung der Nanopartikel aus den Eudragit[®] Mikropartikeln bei einem pH-Wert von 6,8 bereits nach 5 bis 10 min vollständig erfolgte. Der Auflösungsprozess der Mikropartikel verzögerte die Wirkstofffreisetzung nicht merklich. Bei den beiden Proben in PBS Puffer war die Desmopressin Freisetzung nach 5 Stunden zum größten Teil abgeschlossen. In Salzsäure wurden nach diesem Zeitraum und bis zu 20 Stunden erheblich geringere Mengen Desmopressin freigesetzt. 60,9% des enthaltenen Wirkstoffes konnten durch die Eudragit[®] Partikel bis zu 5 Stunden und 55,4% bis zu 20 Stunden vor einer Freisetzung in Salzsäure geschützt werden.

4.5.1.5 Zusammenfassung magensaftresistente Darreichungsform

Eine Freisetzung der nanoskaligen Wirkstoffträger in den sauren Magensaft konnte durch die Mikroverkapselung von PLGA oder PEA Nanopartikeln in Eudragit[®] L 30 D-55 nahezu

vollständig verhindert werden. Damit ist ein sehr effizienter Schutz der Nanopartikel vor einem Abbau durch die Magensäure gewährleistet.

In 0,1 molarer Salzsäure wurden aus den Eudragit[®] Mikropartikeln bis zu einer Dauer von 20 Stunden ca. 50% weniger Desmopressin freigesetzt als in PBS Puffer mit einem pH-Wert von 6,8. Die Eudragit[®] Matrix löst sich entsprechend den Herstellerangaben erst bei pH-Werten oberhalb von 5,5 auf und setzt die Wirkstoffträger und damit den Wirkstoff auf diese Weise am gewünschten Resorptionsort im Dünndarm frei. Durch *in vitro*-Untersuchungen mit einem simulierten Magen pH-Wert von 1,0 und einem simulierten Darm pH-Wert von 6,8 konnte erfolgreich gezeigt werden, dass das System prinzipiell funktioniert.

Vor allem für besonders säureempfindliche Wirkstoffe ist ein Schutz von 50% noch nicht zufriedenstellend. Da die zu erwartende Magenverweilzeit der Arzneiform allerdings deutlich weniger als 20 Stunden beträgt, kann davon ausgegangen werden, dass im Magen keine nennenswerten Wirkstoffanteile, die über den *burst release* von 25% hinausgehen, freigesetzt werden.

Durch Variation unterschiedlicher Prozessparameter wie beispielsweise des Mengenverhältnisses zwischen Eudragit[®] und Partikeln oder des Neutralisierungsgrades sind in weitergehenden Versuchen die optimalen Bedingungen zu evaluieren. Hier besteht gewiss noch Raum zur Optimierung der magensaftresistenten Mikropartikel.

4.6 Partikelherstellung aus überkritischen Lösungen

Die akademische Forschung im Bereich der pharmazeutischen Nanotechnologie brachte seit den 1970er Jahren vielfältige Erkenntnisse hervor, die Lücke zur industriellen Verwertbarkeit dieser Ansätze konnte jedoch bislang nicht geschlossen werden.

Die in der Fachliteratur viel beschriebenen Standardherstellungsmethoden von Nanopartikeln aus bioabbaubaren Polyestern für pharmazeutische Anwendungen erlauben in der Regel keine ökonomisch attraktive Übertragung in einen industriellen Produktionsmaßstab. Die Prozesse ermöglichen keine kontinuierliche Produktionsweise und sind durch die Abhängigkeit vieler schwer kontrollierbarer Einflussfaktoren in großem Maßstab kaum reproduzierbar. Die Herstellung ist nur chargenweise bei jeweils kleiner Ansatzgröße und mit vielen Prozessschritten möglich. Die dadurch bedingt extrem hohen Produktionskosten machen die bisher bekannten Herstellungsmethoden für eine industrielle Umsetzung unattraktiv. Ein weiterer Nachteil der meisten bekannten Herstellungsmethoden für Polymernanopartikel besteht darin, dass in der Regel nicht auf toxikologisch zum Teil sehr bedenkliche organische Lösungsmittel und Stabilisatoren verzichtet werden kann. Dies gilt grundsätzlich auch für die in den Kapiteln 4.2 und 4.3 beschriebene Doppemulsionsmethode, auch wenn durch

Verwendung des Microfluidizers das Potential zur Übertragung dieser Methode auf größere Maßstäbe voraussichtlich verbessert werden konnte.

Die Partikelherstellung mithilfe überkritischer Medien bietet gegenüber den etablierten Methoden, wie beispielsweise der Doppemulsionsmethode, den erheblichen Vorteil ganz ohne die Verwendung toxikologisch bedenklicher organischer Lösungsmittel auszukommen. Das sogenannte RESS-Verfahren (Rapid Expansion of Supercritical Solution) ist bereits seit einigen Jahrzehnten als Partikelherstellungsmethode bekannt und nach wie vor Gegenstand aktueller Forschung. Aufgrund der milden Prozessbedingungen eignet sich die Methode zur Bearbeitung und Verkapselung besonders labiler Substanzen wie beispielsweise Proteine¹⁴⁵. Allgemein wird diesem Verfahren neben dem bereits erwähnten Vorteil im Hinblick auf die pharmazeutische Anwendung ein hohes Potential zur Übertragung auf industrielle Produktionsmaßstäbe zugeschrieben. Neben der Bearbeitung von Wirkstoffen zur Löslichkeitsverbesserung wurde die Methode auch bereits in der Vergangenheit zur Herstellung von Polymerpartikeln herangezogen. Die Umsetzung mit bioabbaubaren PLGA Polymeren scheiterte jedoch in der Regel an der geringen Löslichkeit in überkritischem Kohlenstoffdioxid. Die vollständige Löslichkeit des Substrats im überkritischen Fluid stellt allerdings eine notwendige Voraussetzung zur erfolgreichen Durchführung des RESS-Prozesses dar. Hieraus ergab sich eine der wesentlichen Aufgabenstellungen der Arbeit, die Verbesserung der Löslichkeit der Polymere in überkritischem Fluid bzw. die Identifikation löslicher Polymertypen. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, den Prozess möglichst effizient zu gestalten und somit dessen Attraktivität für eine industrielle Nutzung zu steigern.

4.6.1 Theorie und Grundlagen

Die Entdeckung, dass ein Feststoff in einem überkritischen Fluid gelöst werden kann, stammt aus dem 19. Jahrhundert und geht auf Arbeiten von Hannay und Hogarth zurück¹⁴⁶. Spätere Arbeiten auf diesem Gebiet, woraus sich schließlich der RESS-Prozess entwickelte, stammen von einem Team des Battelle Instituts (USA) in den 1980er Jahren^{147,148,149}. Einen sehr guten Überblick über Prozesse mit überkritischen Fluiden zur Erzeugung von Partikeln bietet die Literatur- und Patentrecherche von J. Jung und M. Perrut aus dem Jahre 2001¹⁵⁰. Darin werden unterschiedliche Verfahren sowie bereits angemeldete Patente beschrieben. Neuere Zusammenfassungen über Veröffentlichungen von Arbeiten mit überkritischen Fluiden zur Partikelgenese haben Fanges et al. (2004)¹⁵¹, S. Yeo und E. Kiran (2005)¹⁵², K. Mishima (2008)¹⁵³, M. Türk (2009)¹⁵⁴ und Reverchon et al. (2009)¹⁵⁵ ausgearbeitet. Eine der aktuellsten Veröffentlichungen über Prozessdesign mit überkritischen Fluiden stammt aus dem Jahre 2013 von Priamo et al.¹⁵⁶.

Beim RESS-Verfahren wird das Substrat in einem überkritischen Gas (meist Kohlenstoffdioxid = CO₂) gelöst und durch eine Düse in einen Sammelbehälter gesprüht.

Dabei wird die überkritische Lösung schlagartig auf atmosphärischen Druck entspannt. Diese extrem schnelle Druckabsenkung bewirkt einen sprunghaften Übergang des Kohlenstoffdioxids vom überkritischen in den gasförmigen Aggregatzustand. Damit wird aus dem Lösungsmittel schlagartig ein Nichtlösungsmittel für das Substrat, die Löslichkeitsgrenze wird sprunghaft überschritten und das Substrat fällt als Feststoff in feinpartikulärer Form aus. Ein allgemeiner Aufbau einer RESS-Versuchsanlage wird in Abbildung 32 skizziert.

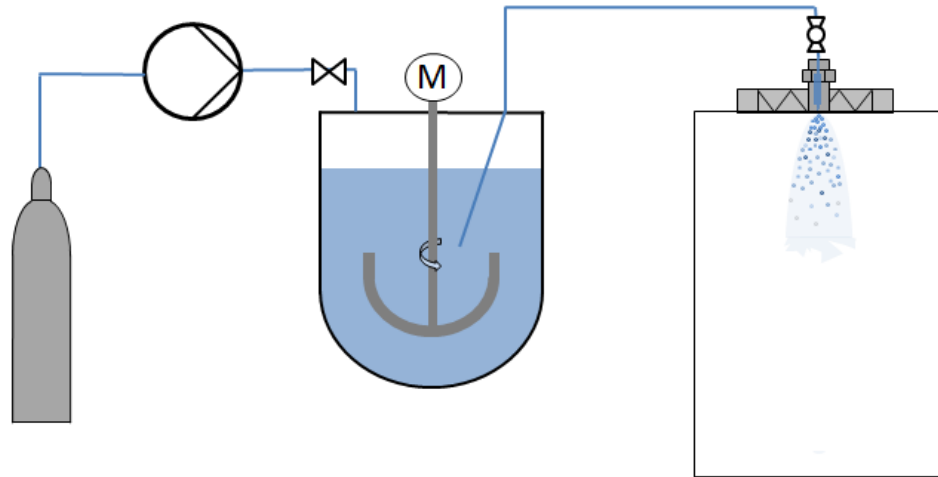


Abbildung 32 Allgemeiner Aufbau einer RESS-Versuchsanlage; links: Druckgasflasche mit Pumpe; Mitte: Druckbehälter mit Rührvorrichtung, enthält die überkritische Lösung; rechts: Düse und Sammelbehälter für das Produkt.

4.6.2 Aufbau der Versuchsanlage und Versuchsbeschreibung

4.6.2.1 Vorläufiger Aufbau für den Machbarkeitsnachweis

Zunächst wurde ein einfacher Versuchsaufbau nach Vorbild einer von Kongsombut et al. beschriebenen Versuchsanlage gewählt, um den Machbarkeitsnachweis für die Partikelherstellung aus PLGA zu erbringen¹⁵⁷. Kongsombut zeigte, dass durch die Verwendung von Ethanol als Lösungsvermittler die Löslichkeit von PLGA in CO_2 deutlich erhöht werden kann. Da die Verwendung von Ethanol in pharmazeutischen Produkten weit verbreitet und unter toxikologischen Gesichtspunkten gerade im Vergleich zu anderen organischen Lösungsmitteln unbedenklich ist, wurde es in der vorliegenden Arbeit als Cosolvens eingesetzt.

Bei diesem vorläufigen Aufbau bestand keine Möglichkeit während des Entspannensvorganges CO_2 und Cosolvens nachzufördern. Nach dem Befüllen des Druckbehälters mit Polymer, Ethanol und CO_2 und einer Lösungsphase von drei Stunden wurde das überkritische Gemisch durch eine beheizte Düse entspannt, während der Druck im Sprühbehälter abfiel.

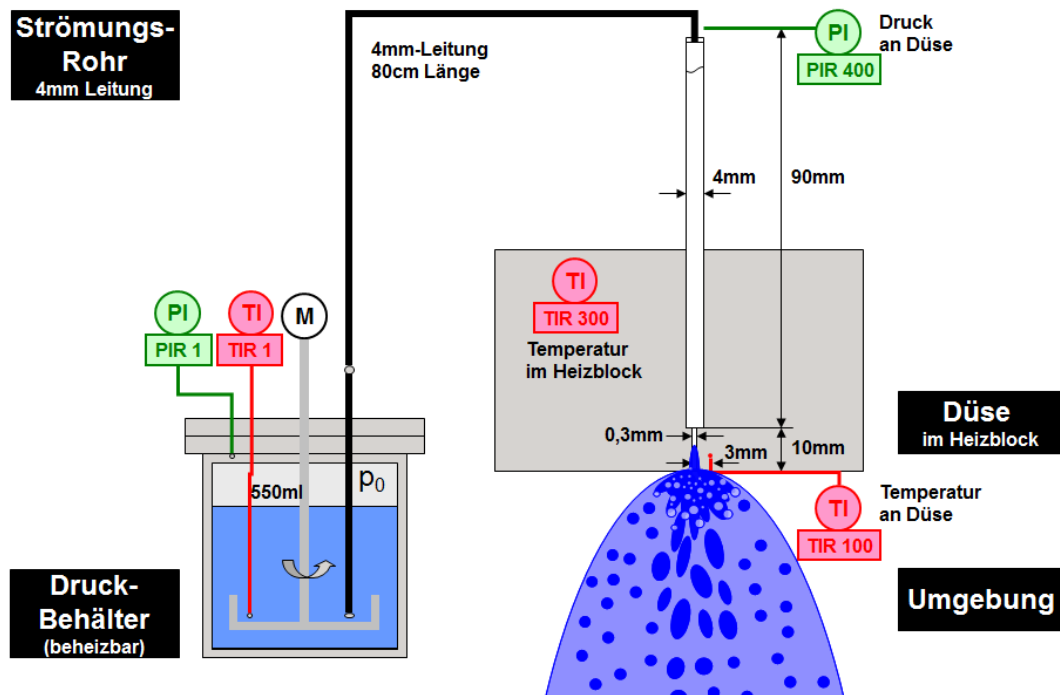


Abbildung 33 Schematische Skizze der RESS-Versuchsanlage zur Durchführung der Vorversuche zur Erbringung des Machbarkeitsnachweises der Erzeugung von PLGA Nanopartikeln.

Das Produkt wurde nicht quantitativ gesammelt, der Düsenausgang mündete in einen Abzug. Proben für die spätere Analytik der erzeugten Polymerpartikel mit einem Rasterelektronenmikroskop (REM) wurden direkt aus dem Sprühstrahl gezogen. Hierzu wurden unterschiedliche Targets im Abstand von 10 bis 30 cm zur Düse für 3 bis 10 Sekunden in den Sprühstrahl eingebracht. Als Target wurden zum einen mit Aluminiumfolie bespannte Glasplatten verwendet und zum anderen mit Kohlenstoff beschichtete Kupfernetze, die üblicherweise in der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) Verwendung finden. Alternativ wurden außerdem Kohlenstoff Leitpads besprüht und analysiert.

4.6.2.2 Aufbau für den kontinuierlichen Betrieb

Nach Abschluss der Vorversuche wurde die Anlage zur Steigerung der Effizienz dahingehend erweitert, dass ein kontinuierlicher Sprühvorgang zur vollständigen Umsetzung des im Druckbehälter vorgelegten Polymeres durchgeführt werden konnte. Voraussetzung hierfür war, dass die Betriebsparameter Druck und Temperatur während des Sprühvorganges durch Nachspeisung von Cosolvens und CO₂ konstant gehalten werden. Außerdem galt es eine Sprühkammer zur Sammlung des Produktes zu konzipieren und zu erproben. Der exakte Aufbau der RESS-Anlage mit Erweiterungen für den kontinuierlichen Sprühbetrieb kann dem Rohrleitungs- und Instrumentenfließschema (R&I) in Abbildung 34 entnommen werden.

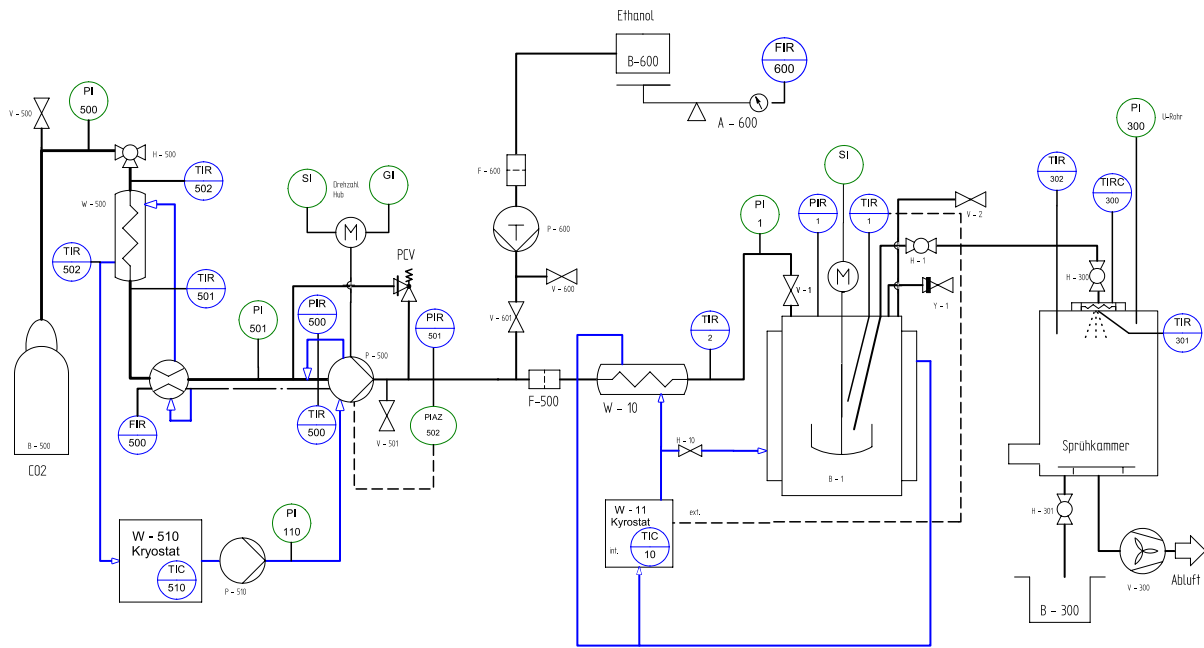


Abbildung 34 Rohrleitungs- und Instrumenten Fließschema der erweiterten RESS-Anlage für kontinuierlichen Sprühbetrieb.

Die genaue Funktion der einzelnen Anlagenteile wird im folgenden Abschnitt entlang des Weges, den das CO₂ nimmt, detailliert beschrieben.

Kohlenstoffdioxid wird handelsüblich in druckverflüssigter Form in Steigrohrflaschen (B-500) zur Verfügung gestellt. Um das Gas in den überkritischen Aggregatzustand zu überführen, müssen der kritische Druck von 73,8 bar und die kritische Temperatur von 31,0 °C überschritten werden¹⁵⁸. Der Druck der Vorratsflasche (B-500) von ca. 60 bar muss also mithilfe einer CO₂ Pumpe (Kolbenmembranpumpe, Modell LDB 1, LEWA GmbH, Deutschland, P-500 in Abbildung 34) weiter erhöht werden. Da sich das Gas während der Kompression stark erwärmt, wird es zunächst auf -10 °C herunter gekühlt. Dazu ist direkt nach der Steigrohrflasche ein Wärmeüberträger (W-500) installiert, der über den Kryostat (W-510) temperiert wird. Die entnommene Menge an Kohlenstoffdioxid wird von einem Massendurchflussmesser (FIR-1) erfasst, bevor der Strom in die Kolbenmembranpumpe (P-500) gelangt. Der Förderstrom der Pumpe wird durch die Variation des Hubs und der Drehzahl des Motors gesteuert.

Um einen konstanten Betriebsdruck bei permanenter CO₂-Förderung zu gewährleisten, wurde die Anlage um eine Druckregulierungseinheit erweitert. Für diese Regelung wurde zwischen Saug- und Druckseite der Pumpe ein Bypass mit einem Druckregelventil (PCV) installiert. Der gewünschte Druck wird am PCV eingestellt, wobei die Regelgröße am Manometer (PIAZ-502) oder am Prozessleitsystem (PLS) abgelesen werden kann. Im laufenden Betrieb beeinflusst die Festwertregelung den Massenstrom durch den Bypass, sodass der

Betriebsdruck aufrechterhalten wird. Das PIAZ-502 dient außerdem als Sicherungseinrichtung, da es bei einem zu hohen Betriebsdruck die Pumpe automatisch abschaltet.

Das Ethanol wird aus einem Vorratsgefäß (B-100) entnommen, wobei eine Waage kontinuierlich das Gewicht des Behälters erfasst und elektronisch an das Prozessleitsystem übermittelt. Vor der Verdichtung durch eine HPLC-Pumpe (P-600) läuft das Ethanol durch einen Filter. Nach der Kompression wird der Ethanol-Strom mit dem CO₂-Strom in einem T-Mischer zusammengeführt. Die Förderleistung der HPLC Pumpe P-600 wird so einreguliert, dass ein Ethanolgehalt von 23% (m/m) resultiert. Damit sich die beiden Lösungsmittel ausreichend miteinander mischen, wurde ein als statischer Mischer fungierender Filter (F-500) direkt nach der Zusammenführung der beiden Lösungsmittelströme installiert. Die Wahl des Massenstromverhältnisses von CO₂ und Ethanol spielt hinsichtlich der Löslichkeit des Feststoffes eine wichtige Rolle. Voraussetzung ist zunächst die Mischbarkeit der beiden Lösungsmittel, die laut Secuianu et al. innerhalb der gewählten Betriebsparameter vollständig gegeben ist¹⁵⁹.

Anschließend strömt das Lösungsmittelgemisch durch einen Wärmeüberträger (W-10), welcher über den Kryostat (W-11) auf die gewünschte Betriebstemperatur gebracht wird. Die überkritische Lösung gelangt schließlich in den gerührten Autoklaven, der das Polymer enthält. Nach einer entsprechenden Verweilzeit wird die überkritische mit Polymer angereicherte Lösung über ein Tauchrohr durch eine beheizte Düse auf atmosphärischen Druck entspannt. Die Düse ist an der Oberseite einer Sprühkammer (Abbildung 37) angebracht. Durch ein Gebläse (V-300) wird das zugeführte Gas abgesaugt und in der Sprühkammer ein leichter Unterdruck gegenüber der Atmosphäre erzeugt. Jedoch wird nur so stark abgesaugt, dass in der Sprühkammer eine zur Aufnahme der Partikel ausreichende Menge Ethanol kondensieren kann. So können die Polymerpartikel während des Sprühvorganges in Form einer Suspension separat vom Gasstrom aus der Kammer entfernt und gesammelt werden. Da Ethanol ein Nichtlösemittel für PLGA darstellt, sind die Partikel in der ethanolischen Suspension stabil.

4.6.2.3 Anlagenkomponenten im Detail

Die drei wesentlichen Anlagenteile Hochdruckautoklav, Düse und Sprühkammer werden im folgenden Abschnitt detailliert beschrieben.

Hochdruckautoklav:

Es wurde ein Hochdruckautoklav (MidiClave Typ 3 Modell 0,5 L) der Firma Büchi Glas Uster AG, Schweiz verwendet. Abbildung 35 zeigt den Autoklaven mit werksseitiger

Standardausstattung. Der Autoklav wird mit einem Reaktorgestell mit Gefäßlift und Sicherheitsschnellverschluss ausgeliefert.

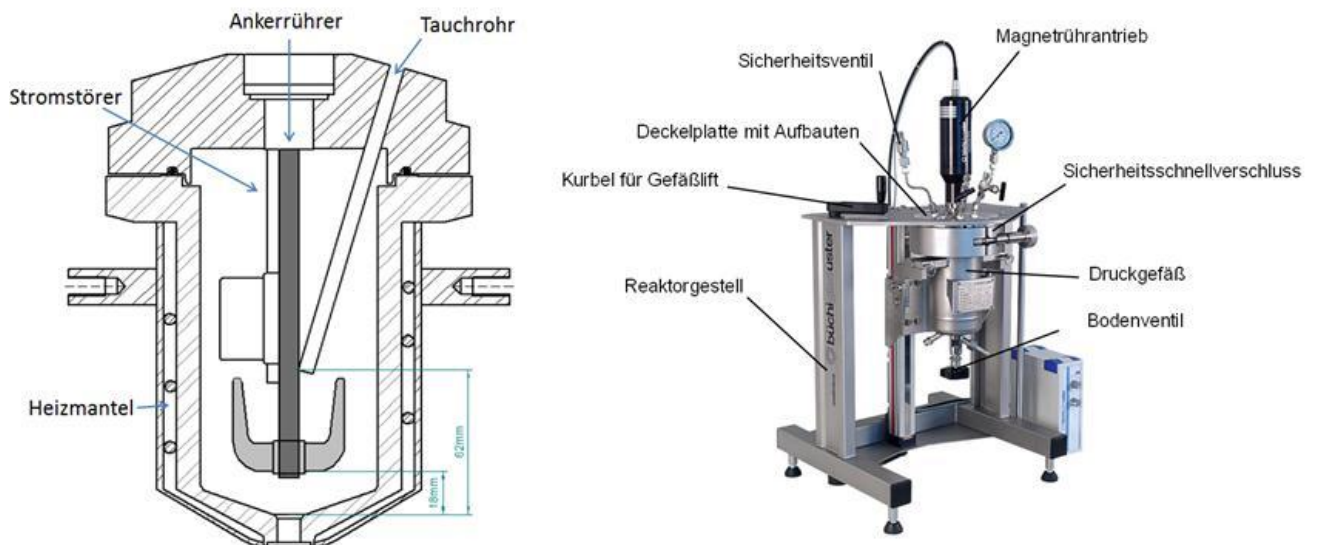


Abbildung 35 Links: Schnittzeichnung des Druckbehälters; rechts: Fotografische Abbildung des Druckbehälters mit Haltegestell und Rührer.

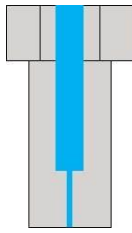
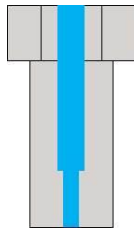
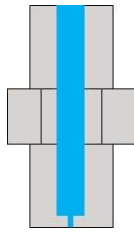
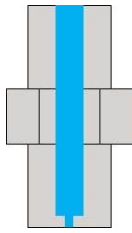
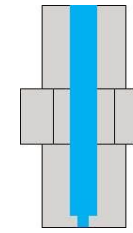
Außerdem ist der Autoklav mit einem Magnetührantrieb ausgestattet, der über eine Magnetkupplung einen Ankerührer im Behälter antreibt. Weitere Einbauten sind ein Stromstörer zur Erzeugung einer turbulenten Strömung, ein Thermoelement zur Messung der Temperatur des Inhalts sowie ein Tauchrohr zur Entnahme der Lösung aus dem Autoklaven. Die Mündung des Tauchrohres endet direkt oberhalb des Ankerührers. Dies hat den Vorteil, dass am Ort der Entnahme große Turbulenzen herrschen, wodurch eine gute Durchmischung der Lösung vor der Entnahme sichergestellt ist. Außerdem verhindert das Tauchrohr eine Kurzschlussströmung im Autoklaven. Das einströmende Medium kann nicht auf direktem Wege wieder ausströmen, ohne sich zuvor mit der Lösung zu vermischen.

Temperiert wird der Autoklaveninhalt über einen Heizmantel, dessen Temperatur von einem Thermostat (Kryostat W-11 in Abbildung 34) geregelt wird.

Düse:

Zur Identifizierung der für den Prozess am besten geeigneten Düse wurden in Vorversuchen unterschiedliche Düsentypen getestet. Die Versuche und Berechnungen hierzu werden in dieser Arbeit nicht detailliert beschrieben, es werden lediglich die wesentlichen Ergebnisse hieraus zusammengefasst. Tabelle 25 gibt einen Überblick über die getesteten Düsen und Blenden.

Tabelle 25 Überblick über die getesteten Düsen und Blenden.

Strömungs- kanal	Düsen		Blenden		
	Funken-Erosion		Firma Schlick		
Durchmesser [mm]	0,1	0,3	0,1	0,15	0,2
Länge [mm]	10	10	2	2	2
$\frac{L}{D}$ [-]	100	33	20	13	10
					
Kürzel	Düse 0,1	Düse 0,3	Blende 0,1	Blende 0,15	Blende 0,2

Aufgrund der begrenzten Förderleistung der CO₂ Pumpe war es bei allen getesteten Düsen und Blenden mit einem Strömungskalldurchmesser von mehr als 0,1 mm nicht möglich, einen Betriebsdruck von 200 bar aufrecht zu erhalten. Daher wurden diese Düsen nicht weiter berücksichtigt und die Auswahl beschränkte sich für den kontinuierlichen Sprühvorgang auf eine Düse und eine Blende mit einem Durchmesser von jeweils 0,1 mm.

Zum Vergleich der Sprühkegel wurden fotografische Aufnahmen erstellt (Tabelle 26). Hieraus wird ersichtlich, dass der Sprühkegel bei Verwendung der Blende 0,1 mit einem Durchmesser von 10,4 mm die größte Aufweitung unter allen getesteten Düsen aufweist. Bei der Düse 0,1 beträgt der Durchmesser des Sprühkegels lediglich 4,5 mm. Allgemein ist davon auszugehen, dass durch eine größere Aufweitung des Sprühkegels eine geringere Tropfengröße erzielt wird. Daraus folgt, dass eine möglichst hohe Zerstäubungsleistung eine Voraussetzung zur Herstellung von Nanopartikeln mittels Entspannung einer überkritischen Lösung durch eine Düse ist.

In den Vorversuchen wurde gezeigt, dass die Blende 0,1 bei gleicher Druckdifferenz einen geringeren Massendurchsatz als die Düse 0,1 aufweist. Durch den niedrigeren Massendurchsatz der Blende steht mehr Druckenergie für die Zerstäubung des Fluidkontinuums zur Verfügung. Daher kann festgehalten werden, dass die Blende 0,1 die beste Zerstäubungsleistung unter den getesteten Düsen aufweist.

Tabelle 26 Fotografische Aufnahme und Ausmessung der Sprühkegel unterschiedlicher Düsen und Blenden mit Angabe des Durchmessers und der Länge des Srichkanals.

Düse		Blende		
0,1	0,3	0,1	0,15	0,2
10	10	2	2	2

Bei der Düse 0,1 ist aufgrund des langen Düsenkanals während den Versuchen hin und wieder eine Verblockung aufgetreten. Die Düse 0,1 war weitaus anfälliger für eine Verblockung mit Polymer als die Blende 0,1.

Aufgrund der hervorragenden Zerstäubungsleistung, des für permanentes Sprühen geeigneten Massenstromes und der geringen Verblockungsgefahr wurden die Versuche in der vorliegenden Arbeit mit der Blende 0,1 (siehe Abbildung 36) durchgeführt. Bei der Blende 0,1 handelt es sich um das Modell 629, Größe 1, Bohrgröße 0,1 mm der Firma Düsen-Schlick GmbH, Deutschland.

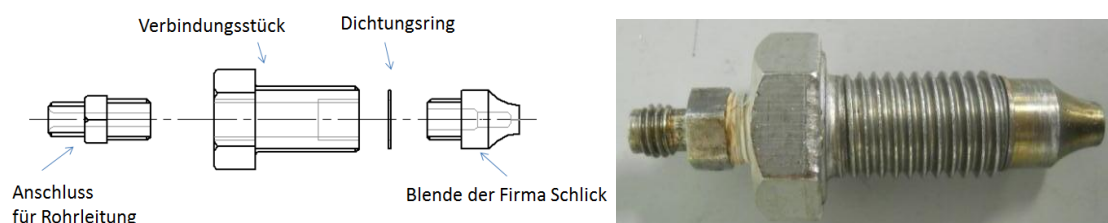


Abbildung 36 Links: Explosionszeichnung und rechts: fotografische Aufnahme des Düsenkörpers.

Der Düsengrundkörper wurde so konzipiert, dass unterschiedliche Blenden aufgeschraubt werden können. Somit werden sämtliche Einflüsse durch fertigungsbedingte Unterschiede des Düsenkörpers ausgeschlossen.

Sprühkammer:

Zur quantitativen Gewinnung des Produktes war eine Abtrennung des Sprühstrahls von der Umgebung notwendig. Hierzu wurde eine Sprühkammer mit separater Absaugung konzipiert. Durch eine spezielle Strömungsführung kann der Gasstrom vom Flüssigkeitsstrom abgetrennt werden.

Die Sprühkammer trägt außerdem maßgeblich zur Erhöhung der Arbeitssicherheit bei, indem eine Kontamination der Raumluft mit Partikeln oder pharmazeutischen Wirkstoffen verhindert wird.

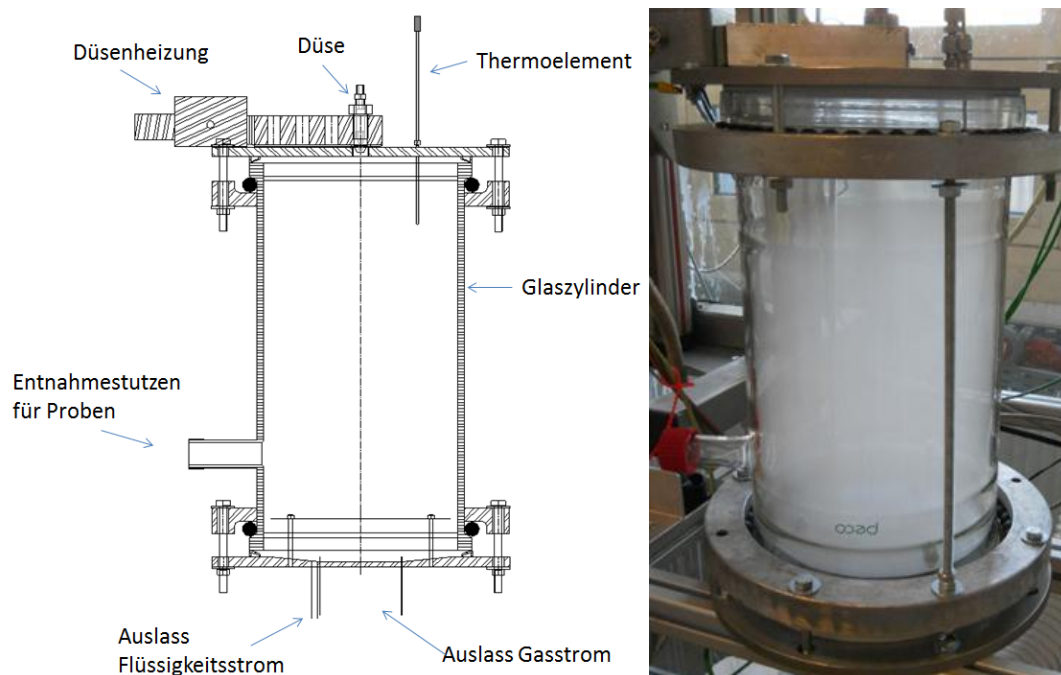


Abbildung 37 Links: schematische Zeichnung der Sprühkammer mit Deckelplatte; rechts: fotografische Aufnahme der Sprühkammer.

Die Kammer besteht aus einem Glaszylinder, dessen Enden mit einer Metallplatte verschlossen wurden. Auf der oberen Abdeckplatte befindet sich ein Heizblock, der über eine Leistung von 800 W verfügt und über das PLS geregelt wird. In eine Bohrung im Heizblock, die mit einem Gewinde versehen wurde, wird der Düsenkörper eingeschraubt. Der Glaszylinder ist mit einem verschließbaren Anschlussstutzen versehen, durch welchen Proben direkt aus dem Spraykegel entnommen werden können. Die Bodenplatte der Spraykammer ist so konstruiert, dass Gas- und Flüssigkeitsstrom getrennt voneinander gesammelt werden. Das Innenvolumen der Kammer beträgt 12,6 l. Die Sprühkammer ist vollständig reinigbar, da sie komplett in ihre Einzelteile zerlegt werden kann.

Zur Erfassung des Temperaturverlaufs wurden zwei Thermoelemente integriert, die die Oberflächentemperatur der Düse und die Temperatur in der Sprühkammer messen. Der Unterdruck aufgrund der Absaugung wird durch ein U-Rohr-Manometer überwacht. Durch den in der Sprühkammer herrschenden Unterdruck wird eine Kontamination der Umgebung ausgeschlossen. Vor allem bei Arbeiten mit Wirkstoffen ist dies zum Schutz der Mitarbeiter von größter Wichtigkeit.

Aus dem Volumenstrom der Düse und dem Innenvolumen der Sprühkammer wurde die durchschnittliche Verweilzeit des Sprays in der Kammer errechnet, sie beträgt 43 s. Durch Beobachtungen konnte bestätigt werden, dass Verwirbelungen in der Kammer entstehen und der Volumenstrom nicht isokinetisch abgesaugt wird. Dies erklärt die relativ lange Verweilzeit des Aerosols in der Kammer. Der Strömungsverlauf in der Sprühkammer wurde in Abbildung 38 skizziert.

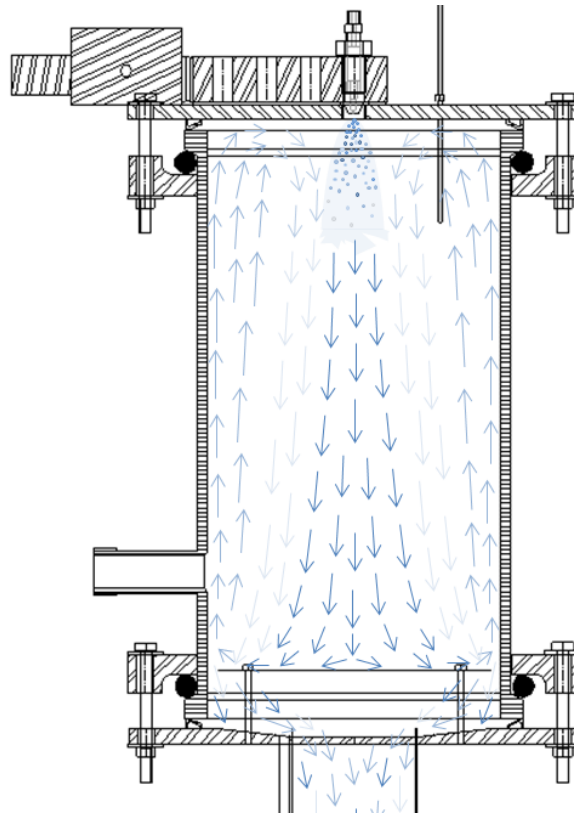


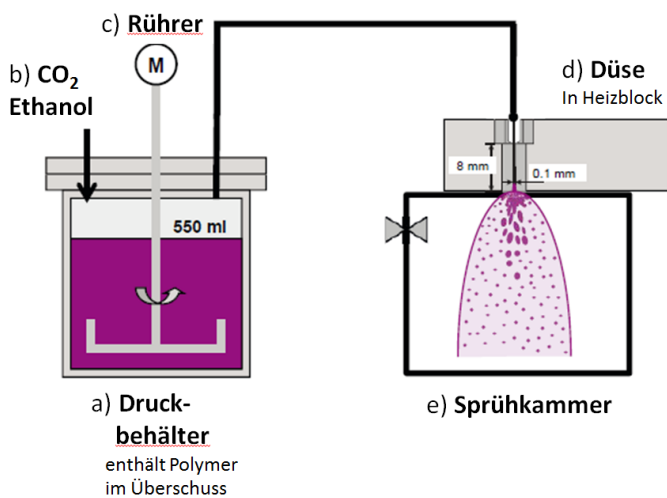
Abbildung 38 Strömungsverlauf in der Sprühkammer (schematisch skizziert).

Ausgehend von der Düse verlaufen die Stromfäden zunächst nach unten. Durch die Abdeckplatte des Auslasses für den Gasstrom wird der Stromfluss wieder nach oben umgelenkt. An der Deckelplatte der Spraykammer wird die Strömung abermals umgelenkt und tritt als *Entrainment* (Einschluss) wieder in den Sprühkegel der Düse ein. Währenddessen trennt sich die verbleibende Flüssigphase des Ethanols ab und gelangt in ein separates

Sammelgefäß. Ein Großteil der Partikel wird mit der flüssigen Ethanol Phase aufgefangen und kann somit während des laufenden Sprühbetriebes entnommen werden.

Aufgrund des beschriebenen Strömungsverlaufes und der relativ langen Verweilzeit des Aerosols kommt es zu unerwünschten Polymerablagerungen an der Wandung der Sprühkammer. Diese Ablagerungen führen zu Produktverlusten und verringern die Ausbeute an Polymerpartikeln in der gesammelten Suspension.

4.6.2.4 Versuchsbeschreibung kontinuierlicher Betrieb



- a) Ethanol, Polymer und evtl. Wirkstoff einfüllen
- b) Druckbehälter mit CO₂ befüllen, Nachspeisung von CO₂ und Ethanol für kontinuierlichen Betrieb
- c) Rühren während der Lösungsphase (1-3 Stunden)
- d) Entspannung der überkritischen Lösung durch eine beheizte kapillare Düse auf atmosphärischen Druck, extrem schnelle Ausfällung der Polymerpartikel
- e) Partikelsammlung in Sprühkammer mit Absaugung, Probenentnahme während des Sprühens durch Öffnung in Kammer möglich

Abbildung 39 Schematische Darstellung des kontinuierlichen RESS-Prozesses.

Die in Abbildung 39 dargestellte schematische Versuchsbeschreibung gibt einen zusammenfassenden Überblick über die Versuchsdurchführung. Die in der folgenden detaillierten Versuchsbeschreibung in Klammern gesetzten Kürzel zur Bezeichnung der Anlagenteile beziehen sich auf das R&I Diagramm in Abbildung 34.

Das pulverförmige Polymer wird vor Beginn des Versuches in den Druckbehälter (B-1) eingefüllt. Anschließend wird Ethanol hinzugegeben und der Druckbehälter wird verschlossen. Um einen Betriebsdruck von maximal 200 bar einzustellen, wird der Behälter mit CO₂ beaufschlagt. Mithilfe des Kryostaten (W-11) wird der Druckbehälter mit dessen Inhalt auf die gewünschte Temperatur gebracht. Sobald die gewünschten Betriebsparameter eingestellt wurden und konstant sind, wird das überkritische Gemisch mit einem integrierten Ankerrührer mit Magnetkupplung über einen definierten Zeitraum hinweg gerührt (Lösungsphase).

Tabelle 27 Betriebsparameter kontinuierliches RESS Verfahren.

Polymer	0,7 g (7,0 g)	0,12% (1,2%)	Druck	200 bar
Ethanol	130 g	23,0%		
CO ₂	434,5 g	76,88%		
Temperatur Hochdruckbehälter	40 °C	Lösungszeit	1h	
		Sprühzeit	1h	
Düsentemperatur	240 °C		Rührerdrehzahl	500 UpM

Nach Ablauf der Lösungsphase wird das überkritische Gemisch über ein Tauchrohr aus dem Druckbehälter entnommen und strömt über eine beheizte Düse in die Sprühkammer. Während des Sprühvorgangs werden kontinuierlich CO₂ und Cosolvens in den Druckbehälter nachgefördert, um die Betriebsparameter konstant zu halten.

Nach einem einstündigen Sprühvorgang bei konstantem Druck wurde der Inhalt des Druckbehälters rechnerisch ca. 4-6 Mal ausgetauscht. Somit ist bei ausreichender Löslichkeit eine annähernd vollständige Extraktion des enthaltenen Polymers gewährleistet. Um Partikelgrößenverteilung und Morphologie der Partikel zu ermitteln, wurde die ethanolische Partikelsuspension näher charakterisiert. Die Größenverteilung wurde mithilfe der DLS-Methode untersucht. Zur Untersuchung der Morphologie mithilfe eines Rasterelektronenmikroskops (REM) wurde die Partikelsuspension im Verhältnis von 1:5 mit Ethanol verdünnt und anschließend ein Tropfen davon auf einen Probenträger aufgebracht und im Vakuum eingetrocknet. Nach Bedampfung mit Gold wurden REM Aufnahmen von der Probe erstellt.

Der gesamte Prozess wurde mithilfe eines Prozessleitsystems (PLS) überwacht, welches die Messsignale der Druckaufnehmer und Thermoelemente aufzeichnete. Nach Versuchsende wurden der Druckbehälter und die Sprühkammer sorgfältig gereinigt, um eine Kontamination der Folgeversuche auszuschließen.

4.6.2.5 Trocknung der Partikelsuspension

Um die Suspension durch Gefriertrocknung in ein trockenes Endprodukt überführen zu können, wurde die ethanolische Suspension zunächst im Verhältnis 1:1 (m/m) mit einer 1%igen wässrigen PVA Lösung oder mit reinem destilliertem Wasser verdünnt. Anschließend wurde mithilfe eines Rotationsverdampfers das Ethanol so weit wie möglich abgezogen. Die weitestgehend wässrige Suspension konnte nun zur Partikelgrößenmessung per DLS-Methode verwendet werden. Durch Gefriertrocknung der wässrigen Suspension wurde nach Waschen der Partikel mithilfe einer Zentrifuge ein trockenes und lagerstabiles Endprodukt erhalten.

Um den Trocknungsprozess zu verkürzen, wurde zur Trocknung der Partikelsuspension alternativ ein Sprühtrockner verwendet. Das Abziehen des Ethanol mit dem Rotationsverdampfer nach dem Verdünnungsschritt mit Wasser fiel somit weg. Zur Trocknung der Partikelsuspension wurde ein Nano B-90 Sprühtrockner (Büchi AG, Schweiz) verwendet. Die in der Sprühkammer gesammelte ethanolische Suspension wurde zunächst 1:1 mit Wasser bzw. mit einer wässrigen Lösung von 0,5% PVA (m/m) bezogen auf die fertige Sprühlösung gemischt. Außerdem wurden 2% Mannitol als Trägerstoff zugesetzt. Getrocknet wurde bei 60 °C Einlasstemperatur, einem Luftstrom von 130 L/h, einer Sprütrate von 95% unter Verwendung einer 7,0 µm Membran. Die Auslasstemperatur stieg während der Trocknung maximal bis auf 37 °C an.

4.6.3 Partikelgröße und Morphologie des verwendeten Ausgangsmaterials

Zum sicheren Nachweis, dass der RESS-Prozess tatsächlich eine Veränderung der Partikelgröße und Morphologie des Ausgangsmaterials bewirkt, wurde eine Charakterisierung des eingesetzten Polymerpulvers vor der Prozessierung mit RESS durchgeführt.

Dazu wurde zunächst eine Partikelgrößenanalyse des pulverförmigen Resomer[®] RG 752 H im Ausgangszustand durchgeführt. Das Analysengerät stammt vom Hersteller Sympatec (Modell: RODOS/L) und arbeitet nach der Methode der Trockendispergierung mit Druckluft und anschließender Bildanalyse. Das Ergebnis der Bestimmung ist in Abbildung 40 dargestellt.

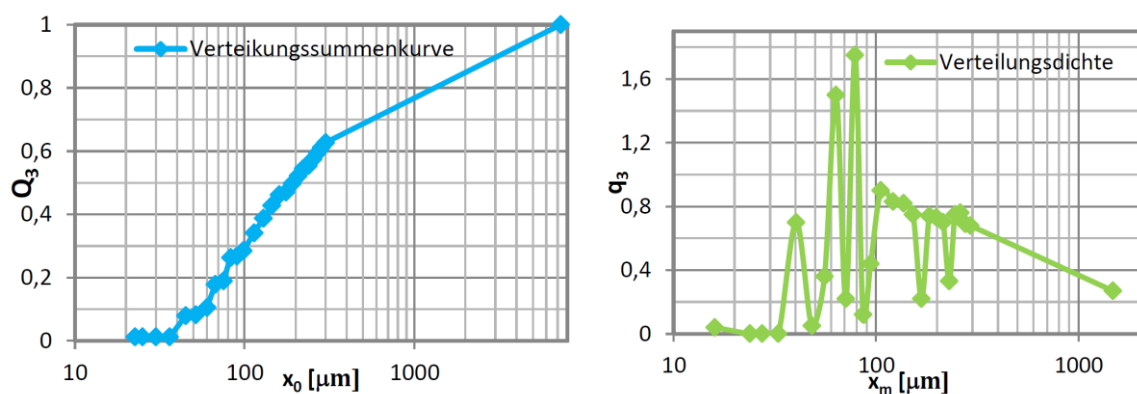


Abbildung 40 Resomer[®] RG 752 H Ausgangszustand; links: Verteilungssummenfunktion; rechts: Verteilungsdichtefunktion.

Die Verteilungssummenkurve (Abbildung 40 links) zeigt, dass 60% der Polymerpartikel eine Größe zwischen 20 und 300 µm besitzen. Zudem wurden Partikel mit einer Größe bis zu 7.000 µm gemessen. Die Verteilungsdichte (Abbildung 40 rechts) deutet darauf hin, dass die Kornklassen mit unterschiedlicher Häufigkeit vorkommen.

Anschließend erfolgte eine morphologische Charakterisierung des Ausgangsmaterials. Die REM-Aufnahmen in Abbildung 41 zeigen die Oberflächenstruktur von Resomer[®] RG 752 H vor der Prozessierung mit dem RESS-Prozess.

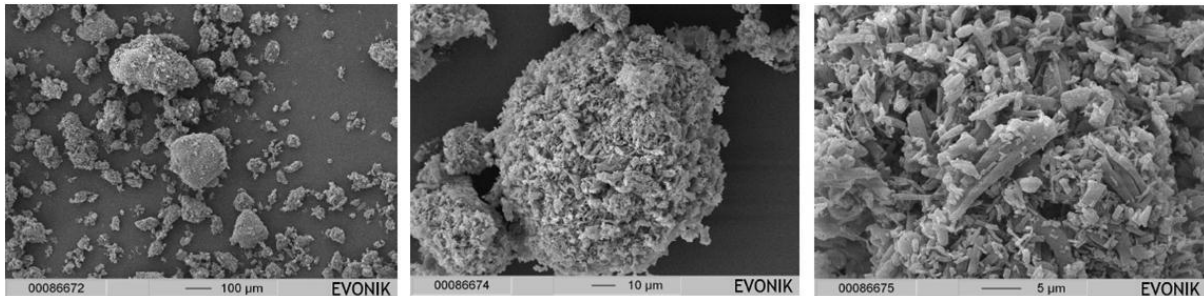


Abbildung 41 REM-Aufnahmen von Resomer[®] RG 752 H im Ausgangszustand vor der Prozessierung.

In den REM-Aufnahmen sind Agglomerate des amorphen Polymers zu erkennen. Die Oberflächenstruktur lässt sich als zerklüftet oder porös beschreiben. Die Ergebnisse der Partikelgrößenmessung per Bildanalyse können durch die REM-Analytik bestätigt werden.

4.6.4 Ergebnisse Vorversuche

Zu Beginn wurden Versuche mit Resomer[®] RG 503 H durchgeführt (PLA:GL Verhältnis 50:50). Auch unter Verwendung von Ethanol als Cosolvens war dieses Polymer allerdings nicht im überkritischen Medium löslich. Nahezu das gesamte Polymer verblieb als aufgequollene Masse nach Versuchsende im Autoklaven und auf den besprühten Targets konnten per REM-Analytik nur vereinzelt Partikel gefunden werden. Weitere Versuche wurden mit dem lipophileren Resomer[®] RG 858 S (PLA:GL Verhältnis 85:15) durchgeführt. Erwartungsgemäß lösen sich lipophile Polymere besser in überkritischem CO₂, was durch Versuche mit Resomer[®] RG 858 S, das mit Ethanol als Cosolvens deutlich verbesserte Löslichkeitseigenschaften als RG 503 H zeigte, bestätigt wurde. Durchschnittlich 5% wurden durch den Sprühvorgang aus dem Autoklaven ausgetragen und auf den besprühten Targets konnte mit dem REM eine größere Zahl an Partikeln sichtbar gemacht werden.

Nachdem Resomer[®] RG 858 S unter den bisher getesteten Polymeren als am besten geeignet identifiziert wurde, konnten erste Sprühversuche durchgeführt werden. Abbildung 42 zeigt ein Prozessdiagramm aus einem RESS-Herstellungsgang. Ein Anstieg des Düsendrucks (violette Linie) zeigt, dass die Düse geöffnet wurde. Bei jedem Sprühvorgang wurde eine neue Platte mit Alufolie verwendet. Es wurde entweder 3 s oder 10 s lang gesprüht. Aus dem Diagramm können unterschiedliche Informationen gewonnen werden: Beispielsweise würde man eine Blockierung der Düse erkennen, da in diesem Fall der Düsendruck nach Schließen des Ventils nicht abgebaut würde. Anhand der Düsentemperatur kann überprüft werden, ob die

eingestellte Heizleistung des Düsenheizblocks ausreicht, um genügend Wärme zur Verdampfung des Ethanol zu liefern und um ein Einfrieren der Düse zu verhindern. Anhand des Kesseldruck- und Temperaturverlaufs können Aussagen zur Phasenlage des Gemisches gemacht werden. Hierüber erfolgt auch die Kontrolle, ob während der gesamten Versuchsdurchführung der überkritische Zustand vorliegt. Des Weiteren kann durch spätere Auswertung ein eventuell bestehender Zusammenhang zwischen den Partikeleigenschaften und der jeweiligen Sprühphase in Abhängigkeit von Ausgangsdruck und Temperatur gefunden werden.

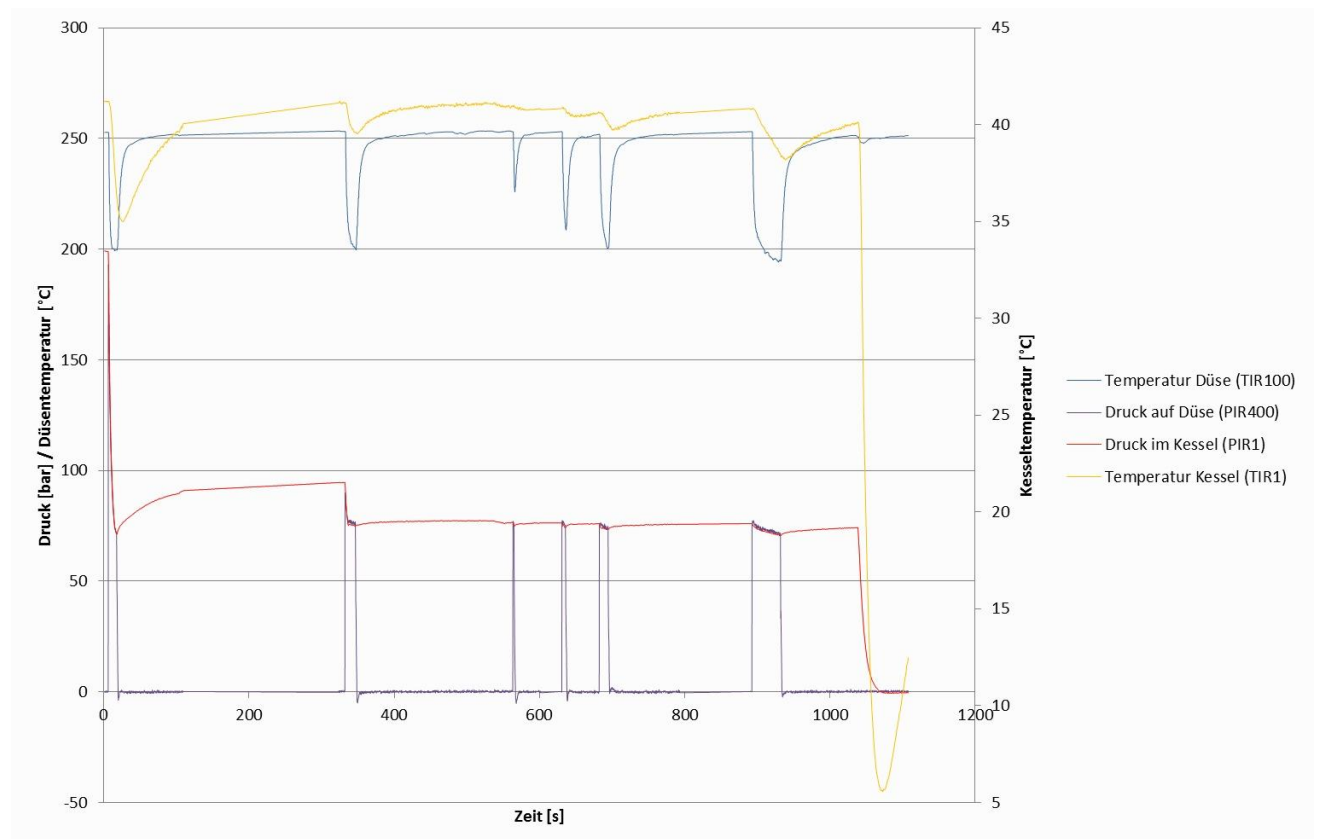


Abbildung 42 Prozessdiagramm RESS-Sprühversuch; Vorversuch diskontinuierlich.

Zur Charakterisierung der hergestellten Partikel wurden mit handelsüblicher Aluminiumfolie bespannte Glasplatten besprüht, die anschließend per REM untersucht wurden. Von den besprühten Alufolien wurden aus unterschiedlichen Regionen Ausschnitte im Größenbereich von jeweils ca. 1 cm^2 entnommen und nach Bedampfung mit Gold unter dem Rasterelektronenmikroskop untersucht. Zwei der Aufnahmen sind in Abbildung 43 gezeigt.

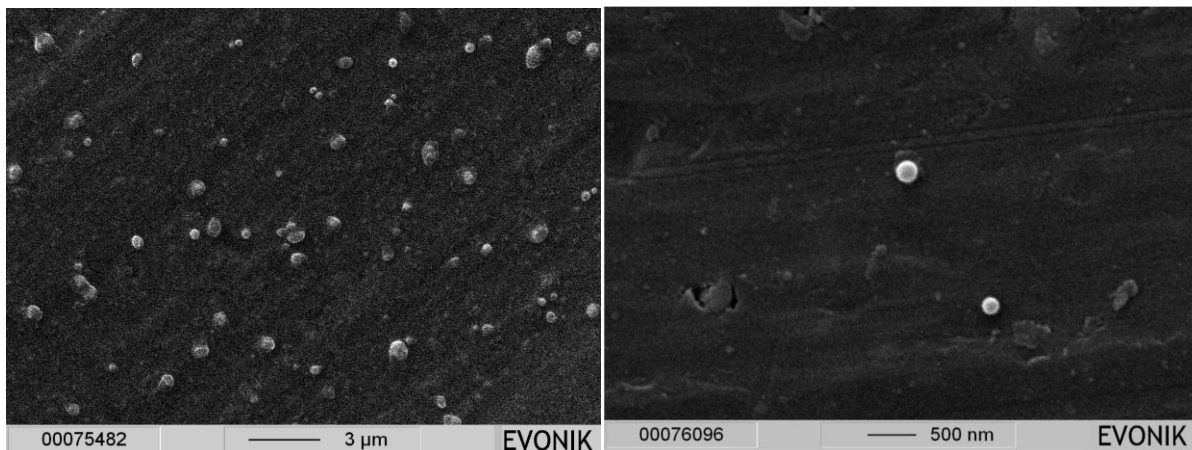


Abbildung 43 REM Aufnahmen von besprühten Aluminiumfolien aus RESS-Vorversuch mit Resomer[®] RG 858 S.

Der mittlere Partikeldurchmesser wurde anhand einer größeren Anzahl an REM Aufnahmen ermittelt. Er liegt zwischen 200 nm und 300 nm. Zur Bestimmung wurden 100 Partikel aus mehreren Aufnahmen vermessen.

Die Auswertung der besprühten Alufolien ergab, dass die Morphologie der Partikel in den verschiedenen Sprühphasen, die in Abbildung 42 dokumentiert wurden, keine signifikanten Unterschiede aufwies. Erkennbar war lediglich eine geringere Anzahl an Partikeln ab der vierten Sprühphase (um die 11. Minute).

4.6.5 Ergebnisse semi-kontinuierlicher Prozess

Mithilfe der in Kapitel 4.6.2 beschriebenen Erweiterungen der Anlage konnte ein kontinuierlicher Sprühvorgang bei konstantem Druck und konstantem Massenverhältnis zwischen Ethanol und CO₂ erfolgreich durchgeführt werden. Da eine kontinuierliche Nachspeisung von Polymer noch nicht vorgesehen ist oder implementiert war, wird der Prozess als semi- und nicht als vollkontinuierlich bezeichnet.

Nach einer einstündigen Lösungsphase und anschließendem Sprühen über einen Zeitraum von einer Stunde hinweg wurde das im Druckbehälter vorgelegte Polymer vollständig gelöst und versprüht. Mit der eingebauten Sprühkammer konnten die Partikel in Form einer ethanolischen Suspension gesammelt und kontinuierlich aus der Anlage entnommen werden. Die Ergebnisse der getesteten PLGA Typen sind in Tabelle 28 dargestellt. Als Kriterien zur Beurteilung der Löslichkeit des Polymers wurden Ausbeute und etwaige Polymerrückstände im Druckbehälter nach Versuchsende herangezogen. Da der gesamte Feststoffgehalt der Suspension dem Polymergehalt entspricht, wurde nach Eindampfen einer genau gewogenen Menge Suspension eine gravimetrische Bestimmung des Polymergehalts und damit der Ausbeute durchgeführt.

Tabelle 28 Getestete PLGA Polymere und Ergebnisse; die in Klammern stehenden Werte in der Spalte MW entsprechen den mittels GPC gemessenen mittleren Molekulargewichten der PLGA Polymere (Kalibration mit Polystyrol), die nicht in Klammern stehenden Werte sind Angaben des Herstellers.

PLGA Typ	MW [g/mol]	Glycolid-Anteil	Ausbeute / Rückstand im Autoklaven	Partikelgröße
Resomer [®] RG 503 H	24.000 – 38.000 (27.400)	50%	<1% / großer Rückstand >90%	keine Partikel detektierbar
Resomer [®] RG 858 S	190.000 – 240.000 (154.000)	15%	2% / großer Rückstand >90%	200 – 300 nm
Resomer [®] RG 753 H	22.000 – 36.000 (32.800)	25%	5% / Rückstand ca.40%	350 – 450 nm
Resomer [®] RG 752 H	4.000 – 15.000 (11.200)	25%	40% / kein Rückstand <1%	300 – 400 nm

Obwohl sich laut Conway et al. ein erhöhter Glycolid-Anteil negativ auf die Löslichkeit in überkritischem CO₂ auswirken sollte¹⁶⁰, wurde für Resomer[®] RG 752 H (Glycolid-Anteil 25%, MW 11.200 g/mol) überraschender Weise eine deutlich bessere Löslichkeit im überkritischen CO₂-Ethanol-Gemisch im Vergleich zu Resomer[®] RG 858 S (Glycolid-Anteil 15%, MW 154.000 g/mol) beobachtet. Dieser Effekt kann dadurch erklärt werden, dass der negative Einfluss des höheren Glycolid-Anteils auf die Löslichkeit durch den positiven des erheblich geringeren Molekulargewichts überkompensiert wird. Diese Erklärung steht mit den Ergebnissen einer Untersuchung von Tom et al. aus dem Jahre 1991 in Einklang. Sie fanden heraus, dass die Löslichkeit von Polyhydroxysäuren in überkritischem CO₂ mit abnehmendem Molekulargewicht steigt¹⁶³.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Löslichkeit der in Tabelle 28 aufgeführten PLGA Polymere in überkritischem Gemisch von CO₂ und Ethanol untersucht. Dabei wurden folgende Trends beobachtet: Mit steigendem Glycolid-Anteil und mit steigendem Molekulargewicht nimmt die Löslichkeit jeweils ab. Das Molekulargewicht hat dabei einen größeren Einfluss als das Lactid zu Glycolid-Verhältnis.

Durch den kontinuierlichen Betrieb konnte die Ausbeute von Partikeln aus Resomer[®] RG 752 H deutlich erhöht werden. Vor der Umsetzung der beschriebenen Modifikationen verblieb der größte Teil des Polymers nach Versuchsende im Druckbehälter (>90%). Nun konnte nach Versuchsende bis auf geringfügige, kaum sichtbare Spuren keine erfassbare Menge an ungelöstem Polymer als Rückstand im Druckbehälter gefunden werden. Dies war selbst bei Erhöhung der eingesetzten Polymermenge auf 7,0 g der Fall.

Durch die beschriebenen Erweiterungen der Anlage zum semi-kontinuierlichen Betrieb wurde die Partikelausbeute von 6% auf knapp 40% gesteigert. Damit konnte die Effizienz des Prozesses deutlich gesteigert werden.

4.6.5.1 DLS Partikelgrößenmessung

Per DLS Verfahren wurde die mittlere Partikelgröße sowie die Partikelgrößenverteilung der erzeugten Polymerpartikel ermittelt. Zur Durchführung der Messung wurde ein Teil der ethanolischen Partikelsuspension mit einer 0,5%igen wässrigen PVA-Lösung im Verhältnis von 1:1 gemischt. Diese wässrige Suspension wurde für die Messung verwendet. Um einen Einfluss des Ethanols auf das Messergebnis auszuschließen, wurde eine weitere Messung nach Abziehen des Lösungsmittels mit einem Rotationsverdampfer durchgeführt. Diese Probe wurde anschließend gefriergetrocknet und nach Redispersierung in destilliertem Wasser erneut gemessen. Die Ergebnisse hierzu sind in Tabelle 29 und Abbildung 44 dargestellt.

Tabelle 29 Mittlerer Partikeldurchmesser und Polydispersitätsindex der per RESS Verfahren erzeugten Partikel aus Resomer[®] RG 752 H.

	mittlerer Partikeldurchmesser	Polydispersitätsindex (PDI)
1) Gemisch ethanolische Suspension mit wässriger PVA-Lösung (1:1)	346 nm	0,051
2) Partikelsuspension nach Abziehen des Ethanols	320 nm	0,048
3) In Wasser redispersiertes Lyophilisat	313 nm	0,040

Es wurden erfolgreich Nanopartikel aus Resomer[®] RG 752 H mit einem mittleren Partikeldurchmesser von 320 nm und einem PDI von 0,048 hergestellt.

Ein Vergleich der erzielten Partikelgrößen mit den Partikelgrößen des Polymeres im Ausgangsmaterial vor der Bearbeitung mit RESS (Partikeldurchmesser >20 µm) zeigt, dass das Polymer während des Prozesses tatsächlich in Lösung gegangen sein muss und beim Versprühen wieder ausgefallen ist. Eine rein mechanische Stofftrennung kann somit ausgeschlossen werden.

Da Viskosität und Brechungsindex das Messergebnis beeinflussen, war ein Effekt des Ethanols auf die Messung festzustellen. Nach Abziehen des Lösungsmittels wurde ein geringfügig kleinerer Partikeldurchmesser von 320 nm statt 346 nm ermittelt. Da destilliertes Wasser bei der Messung als Referenzmedium herangezogen wird, ist davon auszugehen, dass der zweite Wert nach Entfernen des Ethanols näher an dem wahren Wert liegt. Die detaillierte

Betrachtung der Partikelgrößenverteilung dieser Probe in Abbildung 44 erfolgt aus diesem Grund anhand von Probe 2 in Tabelle 29.

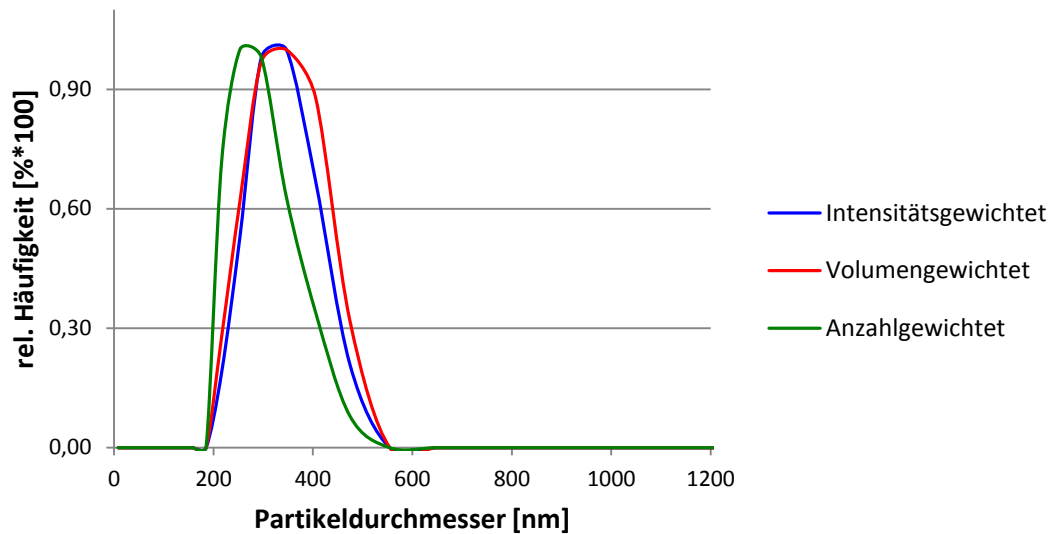


Abbildung 44 Resomer[®] RG 752 H Partikelsuspension; DLS Partikelgrößenverteilung von Probe 2 aus Tabelle 29.

Abbildung 44 zeigt eine eng verteilte monomodale Partikelgrößenverteilung. Ein geringfügiger Unterschied zwischen anzahlgewichteter und volumengewichteter Größenverteilung deutet darauf hin, dass einige wenige große Partikel enthalten sind, die zahlenmäßig jedoch nicht ins Gewicht fallen. Eine leichte Verunreinigung durch Staubpartikel oder einzelne große Partikel oder Agglomerate können bereits einen solchen Effekt hervorrufen.

Die dritte Messung in Tabelle 29 zeigt, dass die Partikel durch Gefriertrocknung der wässrigen Suspension in ein trockenes lagerfähiges Endprodukt überführt werden konnten. Die mittlere Partikelgröße und die Breite der Partikelgrößenverteilung wurden durch den Trocknungsprozess nicht wesentlich beeinflusst. Vor dem Trocknen betrug der Durchmesser 320 nm und der PDI 0,048 und nach dem Trocknen und Redispergieren in destilliertem Wasser 313 nm und der PDI 0,04.

Obwohl für Resomer[®] RG 753 H die Ausbeute mit 5% sehr gering war, sollen die Ergebnisse der Partikelgrößenmessung nicht unerwähnt bleiben. Der mittlere Partikeldurchmesser betrug 393 nm ($\pm 47,3$ nm) bei einem PDI von 0,015. Die Partikelgrößenverteilung ist in Abbildung 45 dargestellt.

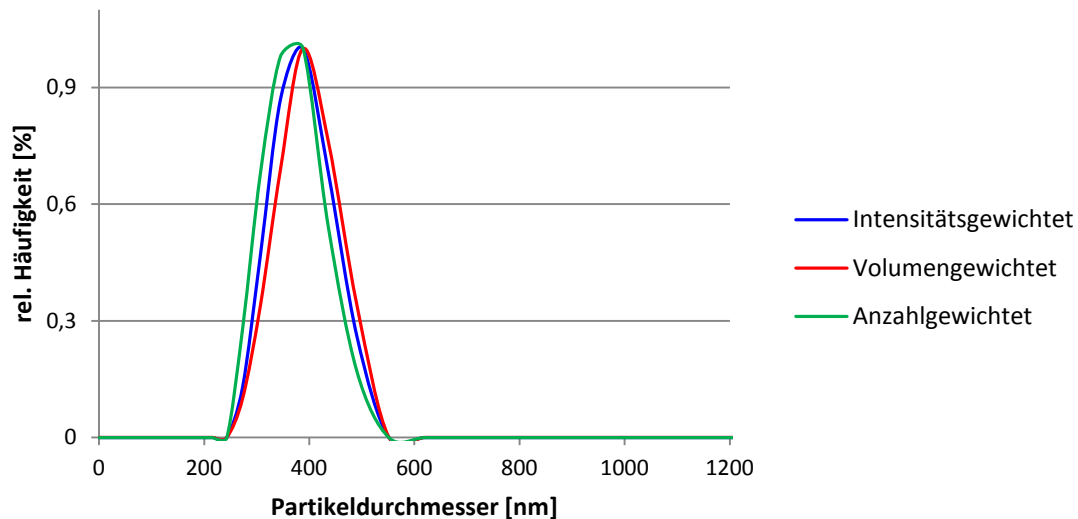


Abbildung 45 Resomer® RG 753 H Partikelsuspension; DLS Partikelgrößenverteilung.

Die Verteilungsbreite der Partikelgröße ist noch geringer als bei den Partikeln aus Resomer® RG 752 H. Dafür sprechen der niedrige PDI von 0,015 sowie die Tatsache, dass kein nennenswerter Unterschied zwischen intensitäts-, anzahl- und volumengewichteter Verteilung besteht.

4.6.5.2 Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie (REM) ist die Methode der Wahl, um die Partikelmorphologie zu untersuchen. Außerdem kann anhand von REM Aufnahmen das Ergebnis der DLS Partikelgrößenmessung überprüft werden und es kann eine Aussage darüber getroffen werden, ob die Partikel einzeln oder als Agglomerate vorliegen. Zur Erstellung der Aufnahmen wurde ein Rasterelektronenmikroskop des Typs JSM-6610LA der Firma Jeol Ltd., Tokyo, Japan verwendet. Die Aufnahmen wurden mit einer Beschleunigungsspannung zwischen 7 und 10 kV und einem Arbeitsabstand zwischen 8 und 12 mm erstellt.

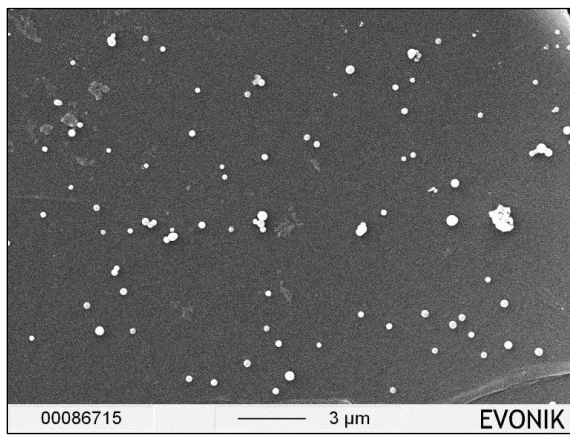
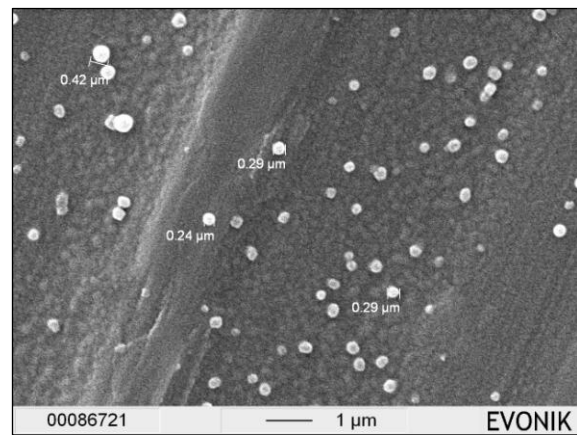
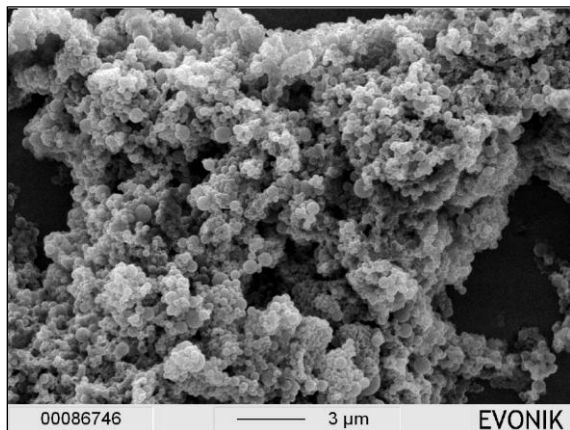
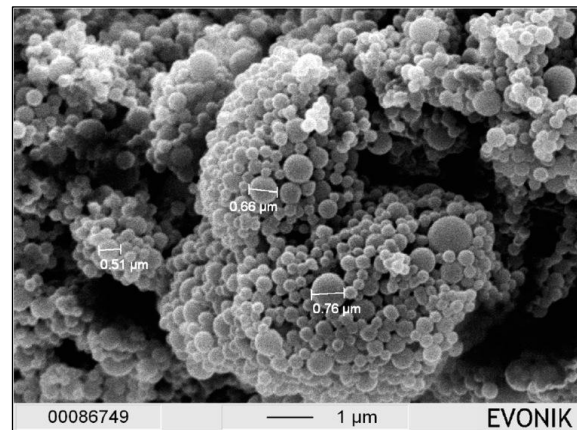
(A₁)(A₂)(B₁)(B₂)

Abbildung 46 REM Aufnahmen von Resomer[®] RG 752 H Partikeln aus kontinuierlichem Sprühvorgang; (A₁), (A₂): Gleiche Charge wie Probe Nr. 1 in Tabelle 29; Partikelsuspension 1:10 mit Ethanol verdünnt und auf einem Probenträger eingetrocknet; (B₁), (B₂): entspricht Probe Nr. 3 in Tabelle 29 vor dem Redispersieren; gefriergetrocknete Partikel.

In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Partikelproben spiegeln sich die Ergebnisse der DLS Messungen klar wieder. Der mittlere Partikeldurchmesser liegt für Resomer[®] RG 752 H im Bereich zwischen 300 nm und 350 nm. Die Partikel aus Resomer[®] RG 753 H (Abbildung 47) haben einen mittleren Partikelgrößendurchmesser zwischen 370 nm und 420 nm und sind damit durchschnittlich um etwa 70 nm größer als die Partikel aus Resomer[®] RG 752 H. Einzelne wenige Partikel mit einer Größe bis zu maximal 800 nm sind bei allen Proben erkennbar. Die Partikelgrößenverteilung ist dennoch eng und die Partikel weisen eine sphärische Form auf. In der ethanolischen Suspension liegen die Partikel einzeln vor und sind nicht agglomeriert. Im Lyophilisat liegen die Partikel agglomeriert vor, lassen sich jedoch vollständig in Wasser redispersieren, was mittels DLS Messung gezeigt wurde (Probe Nr. 3 in Tabelle 29).

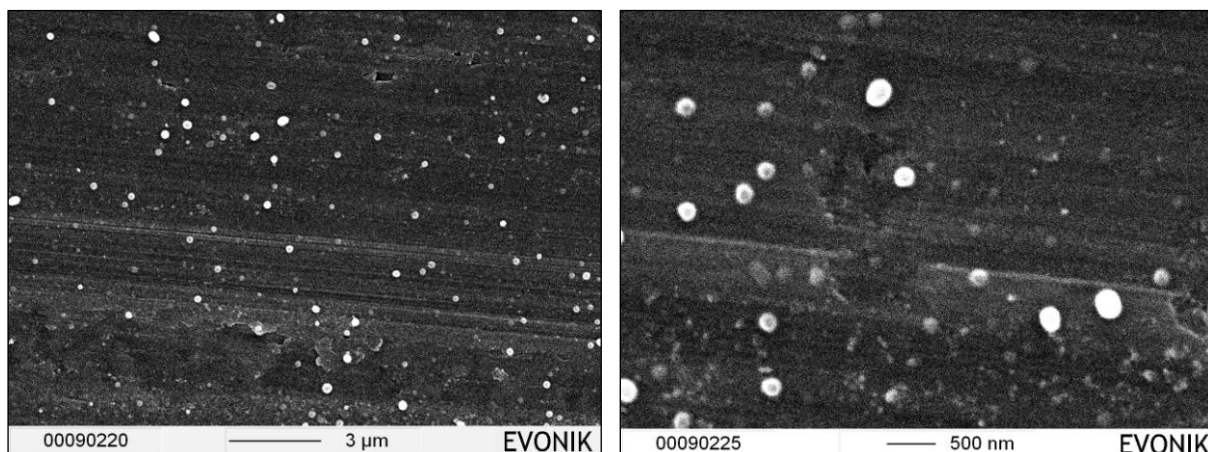


Abbildung 47 REM Aufnahmen von Resomer® RG 753 H Partikeln aus kontinuierlichem Sprühvorgang; rechts und links: Partikelsuspension mit Ethanol 1:10 verdünnt und eingetrocknet auf einem Probenträger.

4.6.5.3 Verkapselungseffizienz des Modellwirkstoffes

Es wurde geprüft, ob die RESS Methode zur effizienten Mikroverkapselung des wasserlöslichen Modellpeptides Desmopressin in PLGA geeignet ist, womit sie eine industriell und ökologisch attraktive Alternative zur Doppalemulsionsmethode darstellen würde.

Dazu wurden 70 mg Desmopressinacetat zusammen mit 700 mg Resomer® RG 752 H und 130 g Ethanol in den Hochdruckbehälter eingefüllt, mit CO₂ beaufschlagt und nach drei stündiger Lösungsphase über einen Zeitraum von einer Stunde hinweg versprüht.

Zur Auswertung des Versuchs wurde per HPLC Methode der Gehalt an Desmopressinacetat in den Polymerpartikeln, im Ethanol-Überstand aus der Sprühkammer sowie im Rückstand aus dem Hochdruckbehälter bestimmt. Die Massenbilanz des Modellwirkstoffes für den Verkapselungsversuch mit der semi-kontinuierlichen RESS Methode ist Tabelle 30 zu entnehmen.

Tabelle 30 Massenbilanz des Modellwirkstoffes Desmopressinacetat beim Verkapselungsversuch per RESS-Methode.

Einwaage	Anteil im Überstand Ethanol	In Polymer verkapselter Anteil	Im Autoklav verbliebener Anteil	In Sprühkammer verbliebener Anteil	Sonstige Verluste
70,0 mg	8,38 mg	0,364 mg	11,71 mg	31,2 mg	18,35 mg
100%	12%	0,52%	16,7%	44,6%	26,2%

Der in Polymerpartikel verkapselte Anteil an Desmopressinacetat betrug 0,52% der ursprünglich eingesetzten Menge. Dieser Wert entspricht der Verkapselungseffizienz. Der mit 44,6% höchste Anteil lagerte sich auf der Wandung der Sprühkammer ab. Der nächsthöchste Anteil von 26,2% wurde nicht wiedergefunden und wird unter sonstige Verluste geführt.

Die folgenden Überlegungen können als Begründung für die geringe Verkapselungseffizienz herangezogen werden:

- **Löslichkeit von Desmopressinacetat in Ethanol und PLGA**

In Vorversuchen wurde festgestellt, dass Desmopressinacetat gut löslich in Ethanol ist. 1 mg Desmopressinacetat bildet innerhalb kurzer Zeit eine klare Lösung in 1 ml Ethanol. Weiterhin ist allgemein bekannt, dass hydrophile Wirkstoffe wie Desmopressinacetat schwer löslich in PLGA sind. Aus diesem Grund weist PLGA mit den üblichen Verkapselungsmethoden eine geringe Verkapselungseffizienz für Desmopressin auf.

Beim semi-kontinuierlichen RESS-Verfahren wird der Wirkstoff gemeinsam mit Ethanol und Polymer versprüht, sodass stets ein Verteilungsgleichgewicht zwischen Ethanol- und Polymerphase vorliegt. Die eingesetzte Menge an Desmopressinacetat löst sich beim Befüllen des Autoklaven direkt vollständig in der Ethanolphase und wird sich voraussichtlich nicht in die Polymerphase umverteilen.

Aufgrund der wesentlich höheren Löslichkeit in Ethanol im Vergleich zu PLGA und der großen Menge an Lösungsmittel verteilt sich der Wirkstoff voraussichtlich auch während der Expansion durch die Düse und der Nukleation der Polymerpartikel deutlich zugunsten der Ethanolphase.

In Polymer verkapselte Anteile werden nach Versuchsende relativ schnell wieder in die Ethanolphase freigesetzt.

- **Löslichkeit von Desmopressinacetat in überkritischem Gemisch aus Ethanol und CO₂**

Erwartungsgemäß ist die Löslichkeit von hydrophilen Stoffen wie Peptidsalzen (Desmopressinacetat) in überkritischem CO₂ sehr gering.

Es ist davon auszugehen, dass der Wirkstoff im Autoklaven ausfällt, sobald das Lösungsmittelgemisch in die überkritische Phase übergeht. Beim gemeinsamen Versprühen mit Ethanol und PLGA geht der Wirkstoff aufgrund der wesentlich höheren Affinität in gelöster Form in die Ethanolphase über.

4.6.5.4 Stabilitätsuntersuchungen der Partikelsuspension

Um die hergestellten Partikel für die spätere Anwendung oder eine Weiterverarbeitung nutzbar zu machen, ist eine hinreichende Stabilität der Partikelsuspension von entscheidender Bedeutung. Da die Suspension durch die Verwendung wasserfreien Ethanols weitgehend wasserfrei sein sollte, ist eine hydrolytische Spaltung der Polymere allenfalls in sehr geringem Ausmaß möglich. Dies sollte sich voraussichtlich positiv auf die Stabilität der PLGA Polymere auswirken. Die Stabilitätsbeurteilung der Suspension erfolgte in der vorliegenden Arbeit allerdings ausschließlich durch Partikelgrößenanalyse und durch die Begutachtung von REM Aufnahmen. Aussagen zur chemischen Stabilität des Polymers können daher nicht getroffen werden.

Zur Untersuchung der Stabilität der Partikel wurde eine Partikelgrößenmessung jeweils unmittelbar nach der Herstellung, einen Tag später und nach zwei Monaten Lagerung der ethanolschen Partikelsuspension im Kühlschrank bei 5 °C durchgeführt. Das Ergebnis der DLS Partikelgrößenmessung ist in Abbildung 48 dargestellt. Außerdem wurden nach Ablauf von 2 Monaten erneut REM Aufnahmen der Partikel angefertigt, um diese mit den Aufnahmen der frischen Partikelsuspension zu vergleichen (Abbildung 49).

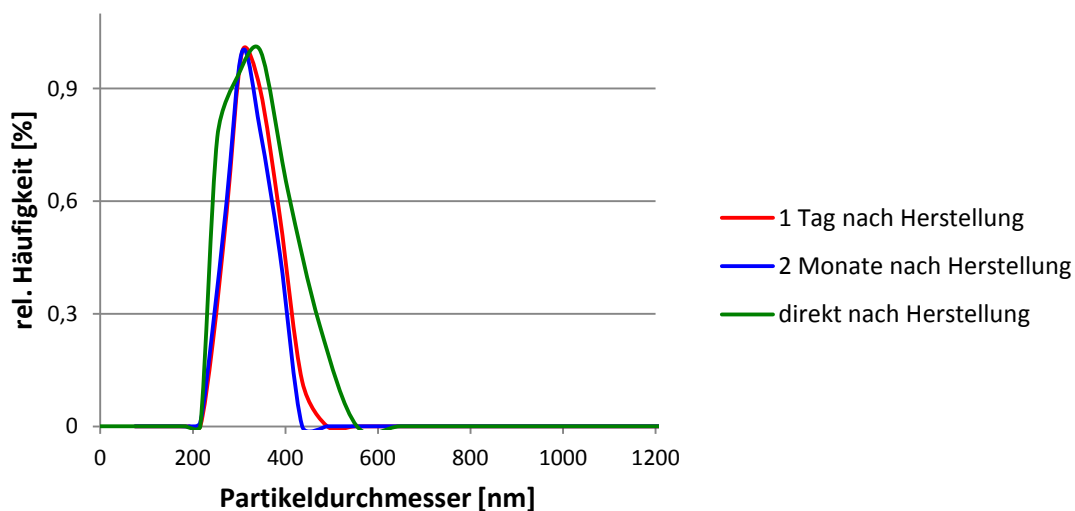


Abbildung 48 DLS Messungen einer Resomer[®] RG 752 H Partikelsuspension aus dem semi-kontinuierlichen RESS-Prozess zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Lagerung bei 5 °C; grün: Messung unmittelbar nach der Herstellung; rot: Messung 1 Tag nach der Herstellung; blau: Messung 2 Monate nach der Herstellung.

Die DLS Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten zeigen, dass die Lagerung der ethanolschen Partikelsuspension über einen Zeitraum von mindestens zwei Monaten hinweg keinen signifikanten Einfluss auf die Partikelgröße hat. Es ist weder zu einer Agglomeration der Partikel noch zu einem Abbau und damit einer Verkleinerung des Partikeldurchmessers

gekommen. Der Abbau von Polymerketten muss allerdings nicht zwangsläufig mit einer Veränderung des Partikeldurchmessers einhergehen. Zumindest in wässrigen Medien erfolgt der Abbau von PLGA zunächst im *Bulk* und daher meist ohne messbare Veränderung der Partikelgröße oder der Oberflächenstruktur^{161,162}. Da jedoch wie bereits erwähnt allenfalls Spuren von Wasser in der Suspension enthalten sind, kann eine Hydrolyse der Polymere weitgehend ausgeschlossen werden. Die chemische Integrität der Polymere kann auf Basis der durchgeführten Untersuchungen allerdings nicht mit letztllicher Sicherheit garantiert werden.

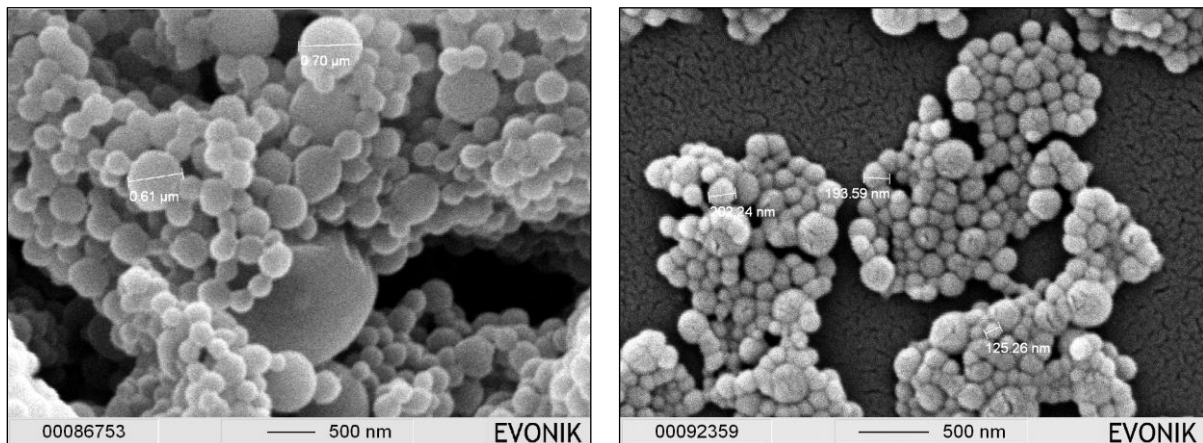


Abbildung 49 REM Aufnahmen von Resomer® 752 H Partikeln; links: unmittelbar nach der Herstellung; rechts: 2 Monate nach der Herstellung und Lagerung der ethanolischen Suspension bei 5 °C.

Ein Vergleich der beiden REM Aufnahmen in Abbildung 49 zeigt im Einklang mit den Ergebnissen der DLS Analysen, dass die Lagerung bei 5 °C in Ethanol über einen Zeitraum von 2 Monaten keine erkennbaren Auswirkungen auf Größe oder Morphologie der Partikel hatte.

Bezüglich der Partikelgröße und -morphologie konnte somit die Stabilität der ethanolischen Partikelsuspension als Produkt des semi-kontinuierlichen RESS-Verfahrens über einen Zeitraum von mindestens zwei Monaten hinweg bestätigt werden.

4.6.5.5 *Sprühtrocknung der Partikelsuspension*

Die Trocknung der Partikelsuspension wurde wie in Abschnitt 4.6.2 beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse der Redispersierbarkeit der getrockneten Partikel mit und ohne Zusatz von PVA als Stabilisator werden in Abbildung 50 gezeigt.

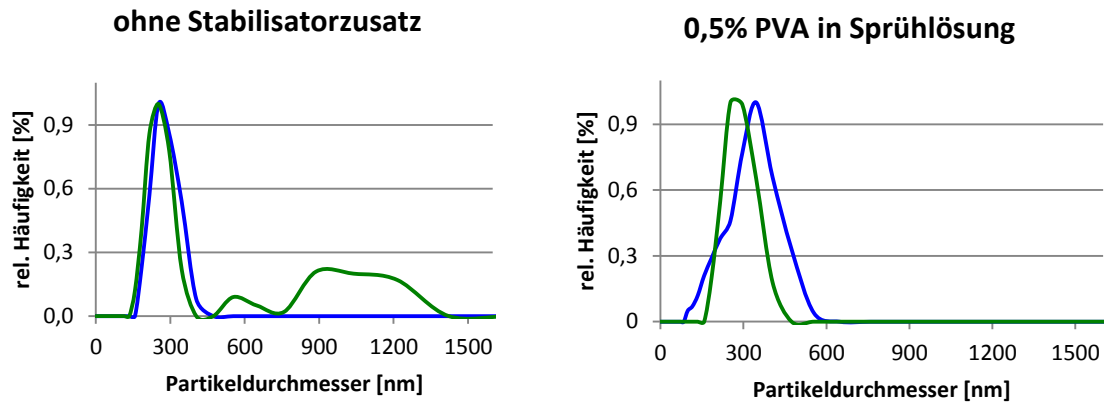


Abbildung 50 DLS Partikelgrößenverteilung; blaue Kurve: Messung der mit Wasser verdünnten ethanolischen Partikelsuspension direkt nach der Herstellung mittels RESS; grüne Kurve: Messung der sprühtrockneten und in Wasser redispergierten Partikel; links: ohne Zusatz von Stabilisator; rechts: Zusatz von 0,5% PVA (m/m) zur Sprühh Lösung.

Die grünen Kurven in Abbildung 50 zeigen jeweils das Ergebnis einer DLS Messung der Partikelgrößenverteilung nach der Sprühtrocknung und der anschließenden Redispergierung des Pulvers in Wasser. Bei der Messung der Probe ohne Stabilisator in der linken Abbildung ist neben dem größten Peak bei der ursprünglichen Partikelgröße vor der Trocknung (in blau dargestellt) ein deutlicher Anteil von größeren Partikeln um 600 nm sowie zwischen 900 nm und 1200 nm zu erkennen. Dies deutet auf eine Bildung von Zweier-, Dreier- und Viereragglomeraten der Primärpartikel hin, die sich durch Dispergierung in Wasser nicht trennen ließen. Vergleicht man diese Kurve mit der grünen Kurve im rechten Teil von Abbildung 50, so wird deutlich, dass durch einen Zusatz von 0,5% PVA die Agglomeration der Primärpartikel verhindert werden konnte. Zudem ist die Partikelgrößenverteilung insgesamt etwas schmaler geworden und der mittlere Partikeldurchmesser ist etwas kleiner.

Durch Sprühtrocknung wurde ein rieselfähiges und in Wasser schnell redispergierbares Pulver der Partikel erhalten. Ein Zusatz von PVA zur Sprühh Lösung konnte die Agglomeration von Partikeln bei der anschließenden Redispergierung des Pulvers in Wasser verhindern. Die Trocknung der Partikel trägt grundsätzlich zur Verbesserung der Lagerstabilität bei.

4.6.5.6 Untersuchung der Molekulargewichtsverteilung mittels GPC Analyse

In einer Veröffentlichung von Tom et al. aus dem Jahre 1991 wird die erfolgreiche Herstellung von Mikropartikeln mit einem mittleren Partikeldurchmesser zwischen 5 μm und 25 μm aus L-PLA und DL-PLA beschrieben¹⁶³. Beide Polymere hatten ein mittleres Molekulargewicht zwischen 5.000 und 6.000 g/mol und zeigten bei Verwendung von Aceton als Lösungsvermittler eine gewisse Löslichkeit im überkritischen Gemisch mit CO_2 . Im Zuge von GPC Analysen des im Autoklaven verbliebenen Restpolymeres und des extrahierten Polymeres fiel jedoch auf, dass bei beiden Polymertypen vorwiegend die niedermolekularen

Anteile extrahiert wurden und die höhermolekularen Anteile im Autoklaven verblieben. Diese Beobachtung von Tom et al. führte zu der Schlussfolgerung, dass kurzkettige Polylactid Polymere in überkritischem CO₂ besser löslich sind als solche mit höherem Molekulargewicht. Die bisher beschriebenen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass dieser Trend tendenziell auch für PLGA Co-Polymere mit unterschiedlichen durchschnittlichen molaren Massen gilt.

Aufgrund der von Tom et al. beschriebenen Beobachtung wurde untersucht, ob bei den Sprühversuchen mit PLGA ebenfalls vorwiegend bestimmte Anteile des Polymeres extrahiert wurden.

Dazu wurde eine GPC-Analyse der Molekulargewichtsverteilungen des Ausgangsmaterials Resomer[®] 752 H und des extrahierten Materials durch Auflösen der getrockneten Polymerpartikel durchgeführt. Die Analysen wurden mit einem GPC System von Agilent Technologies (1100 Series, Agilent Technologies Inc. / Hewlett Packard, USA) unter Verwendung eines Brechungsindexdetektors (1100 Series, G1362A, Agilent / HP, USA) durchgeführt. Das frische Referenzpolymer Resomer[®] RG 752 H wurde in Tetrahydrofuran (THF) gelöst (1,6 mg/ml) und die Partikel wurden in Wasser redispergiert, zentrifugiert und nach Dekantieren des Überstandes im Eppendorf Tube getrocknet. Nachdem das Wasser vollständig verdunstet war, wurden die sedimentierten Partikel ebenfalls in THF gelöst (0,75 mg/ml). Es wurden jeweils 100 µl injiziert, als Eluent wurde THF verwendet und die Flussrate betrug 1,00 ml/min. Als Polymerstandard für die Kalibration diente Polystyrol. Die Auswertung der Messungen wurde mithilfe der Software WinGPC UniChrom (PSS GmbH, Deutschland) durchgeführt. Die Ergebnisse der GPC-Messungen sind in Abbildung 51 dargestellt. Da jeweils drei Injektionen durchgeführt wurden, treten für jede der beiden untersuchten Proben auch je drei Kurven im Elugramm auf, die sich weitgehend überlagern. Da die Zuordnung der Farblegende zu den einzelnen Kurven aus diesem Grund schwer fällt, wurde zur Unterscheidung der Proben innerhalb der Abbildung eine Markierung mit Pfeilen vorgenommen.

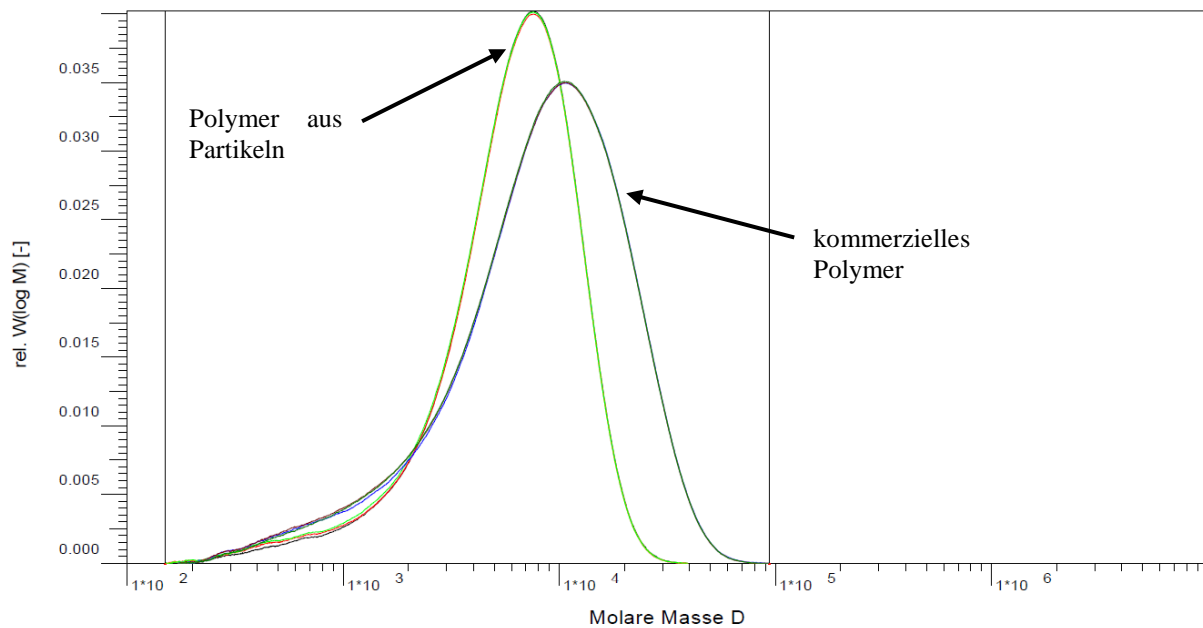


Abbildung 51 Relative Molekulargewichtsverteilung; blau, braun (vgl. Beschriftung mit Pfeil): kommerzielles Resomer[®] RG 752 H; hellgrün, rot (vgl. Beschriftung mit Pfeil): in THF aufgelöste Partikel, die mittels RESS aus Resomer[®] RG 752 H hergestellt wurden.

Die GPC Analyse des extrahierten Materials hat gezeigt, dass die Polymeranteile im oberen Molmassenbereich zwischen 30.000 und 70.000 g/mol im Produkt vollständig fehlten (Abbildung 51). Die Polymeranteile des Ausgangsmaterials unter 30.000 g/mol hingegen wurden über den gesamten Bereich wiedergefunden. In diesem Bereich kamen die Polymerketten mit einer molaren Masse zwischen 400 und 2.000 g/mol und zwischen 10.000 und 30.000 g/mol in den Partikeln reduziert vor, während diejenigen mit einer molaren Masse zwischen 2.000 und 10.000 g/mol einen höheren Anteil an der Molekulargewichtsverteilung aufwiesen. Das Maximum des Peaks wurde zu kleineren Werten hin verschoben und die durchschnittliche molare Masse des extrahierten Polymeres ist mit 7.180 g/mol deutlich niedriger als die des kommerziellen Polymeres mit 11.200 g/mol.

Die relative Molmassenverteilung in Abbildung 51 deutet allerdings nicht auf einen chemischen Abbau der Polymerketten hin, da in diesem Fall mit einem vermehrten Auftreten der Monomere Lactid (144 g/mol) und Glycolid (116 g/mol) oder Vielfachen davon zu rechnen wäre. In den Partikeln wurden mittels GPC Messung jedoch keine Moleküle mit einer molaren Masse zwischen 100 und 200 g/mol gefunden und bis zu einem Molekulargewicht von 2000 g/mol konnten keine im Vergleich zum Ausgangsmaterial erhöhten Anteile gefunden werden. Die Verteilung stimmt in diesem Bereich exakt mit der des Ausgangsmaterials überein. Eine chemische Veränderung des Materials durch den Prozess kann also mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Eine naheliegende Erklärung für die Verschiebung der Molekulargewichtsverteilung ist, dass Polymerketten mit einer Molmasse zwischen 2.000 und 10.000 g/mol besonders gut im überkritischen Medium löslich waren und daher verstärkt extrahiert wurden. Die Polymeranteile oberhalb von 30.000 g/mol waren nahezu unlöslich im überkritischen Gemisch aus CO₂ und Ethanol und diejenigen zwischen 400 und 2.000 g/mol waren geringfügig schlechter löslich, wobei in diesem unteren Bereich die Signifikanz des Effektes noch zu überprüfen wäre.

Aus den Ergebnissen der GPC Analysen der Partikel aus Resomer[®] RG 753 H und RG 858 S (nicht gezeigt) ließen sich exakt die gleichen Schlüsse ziehen wie für RG 752 H. Auch bei diesen beiden Resomer[®]-Typen konnten Polymeranteile mit einer molaren Masse zwischen 2.000 g/mol und 10.000 g/mol bevorzugt extrahiert werden. Da bei RG 753 H und vor allem bei RG 858 S der Anteil an Polymerketten mit einer molaren Masse in diesem Bereich jedoch nur sehr gering ist, war hier die Partikelausbeute im Vergleich zu RG 752 H deutlich niedriger.

4.6.6 Zusammenfassende Diskussion

Um eine alternative Methode zur Herstellung von Polymernanopartikeln aus PLGA ohne Verwendung toxisch bedenklicher Lösungsmittel und mit einer guten Übertragbarkeit auf industrielle Produktionsmaßstäbe bereitstellen zu können, wurde zunächst ein Versuchsstand zur Durchführung des RESS Prozesses nach Literaturvorbild im Technikumsmaßstab aufgebaut. Nach einem ersten erfolgreichen *proof of concept* für die Partikelgenese wurde die Anlage zur Steigerung der Effizienz dahingehend erweitert, dass sie kontinuierlich betrieben werden konnte. Durch diese Erweiterung und die Identifizierung gut löslicher PLGA Polymere wurde die Partikelausbeute von 6% auf 40% gesteigert. Weiterhin wurden wichtige Informationen zur Löslichkeit unterschiedlicher PLGA Polymere in überkritischem CO₂ mit Ethanol als Cosolvens gewonnen. Die Löslichkeit von PLGA nimmt jeweils mit steigendem Molekulargewicht und steigendem Glycolid-Anteil ab. Die Löslichkeitsgrenze für PLGA mit einem Lactid- zu Glycolid-Verhältnis von 75 zu 25 liegt bei 30.000 g/mol. Polymerketten mit einem höheren Molekulargewicht konnten nicht aus dem Autoklaven extrahiert werden und wurden daher nicht in den Partikeln nachgewiesen. Der mittlere Partikeldurchmesser der erzeugten Partikel lag zwischen 300 und 400 nm und der PDI war stets kleiner als 0,1 bei monomodaler Partikelgrößenverteilung. Damit lagen die erzeugten Partikel innerhalb des Zielgrößenbereiches von 200 bis 500 nm und die Partikelgrößenverteilung erfüllte die gestellten Anforderungen hinsichtlich der Breite der Verteilung und der Modalität. Als Einflussfaktoren auf die Partikelgröße wurden die Düse, die Massenstromdichte des Lösungsmittelstromes sowie die Polymerkonzentration identifiziert. Der Zusammenhang dieser Parameter mit der Partikelgröße wurde im Zuge dieser Arbeit jedoch nicht systematisch

untersucht. Wie die Partikelgröße gezielt einzustellen ist, wäre durch weitere Versuche in anschließenden Arbeiten zu untersuchen.

Als Produkt wurde eine Suspension der Partikel in Ethanol kontinuierlich aus der RESS Anlage entnommen. Dies wurde durch die Entwicklung einer speziellen Sprühkammer ermöglicht, die außerdem eine wesentliche Maßnahme zur Gewährleistung der Arbeitssicherheit bei Arbeiten mit hoch potenten Wirkstoffen darstellte. Die Stabilität der Polymernanopartikel in der ethanolischen Suspension wurde für einen Zeitraum von mindestens zwei Monaten nachgewiesen. Zur Verlängerung der Stabilität konnte die Partikelsuspension mittels Sprühtrocknung erfolgreich in ein trockenes und in Wasser vollständig redispersierbares Pulver überführt werden. Zudem wurde die chemische Stabilität des Polymers im Prozess mittels GPC Analyse bestätigt.

Da die Anlage so aufgebaut wurde, dass die Anforderungen an Umwelt, Sicherheit und Gesundheit (USG) erfüllt wurden, konnte mit hoch potenten Wirkstoffen wie Desmopressin gearbeitet werden. Zur Mikroverkapselung von Desmopressinacetat in PLGA war die Methode aufgrund einer sehr geringen Verkapselungseffizienz von 0,52% jedoch nicht geeignet. Die Gründe hierfür sind die hohe Löslichkeit der Modellsubstanz im Cosolvens Ethanol und die voraussichtlich sehr geringe Löslichkeit des Peptidsalzes im überkritischen Medium sowie in PLGA. Eine besonders hohe Verkapselungseffizienz wird für solche Wirkstoffe erwartet, die eine hohe Löslichkeit im überkritischen Medium und eine geringe Löslichkeit im Cosolvens besitzen.

Die aus dem Autoklaven extrahierte Polymermenge konnte mit dem verwendeten Druckautoklaven mit einem Volumen von 500 ml auf bis zu 7 g PLGA pro Füllvorgang gesteigert werden. Die zur Umsetzung benötigte Zeitdauer betrug 2 Stunden. Dabei wurden ca. 2 kg CO₂ und 700 ml Ethanol verbraucht. Eine Rückgewinnung der Lösungsmittel war bisher nicht vorgesehen, würde sich jedoch mit relativ geringem Aufwand realisieren lassen, zumal eine Trennung von Gas- und Feststoff- bzw. Flüssigphase bereits in der Sprühkammer erfolgt. Mit dieser Erweiterung würde das Verfahren einen ökologisch besonders nachhaltigen Prozess zur Herstellung von Polymerpartikeln darstellen.

Die Partikelausbeute von 40% sollte sich durch Optimierung der Prozessparameter voraussichtlich weiter steigern lassen. Die Verluste ergaben sich in erster Linie durch Abscheidungen an der Autoklavenwand, an der Wandung der Sprühkammer und in den Verrohrungen. Diese Verluste sind zum Teil konstant und würden bei vollkontinuierlicher Prozessführung oder bei Erhöhung der Polymermenge an Bedeutung verlieren. Die nicht erwünschten Abscheidungen der Partikel an der Wandung der Sprühkammer sollten sich voraussichtlich durch Optimierung der Verweilzeit des Aerosols in der Sprühkammer reduzieren lassen.

Beim aktuellen Aufbau der Anlage muss der Autoklav nach Ablauf der jeweils einstündigen Lösungs- und Extraktionsphase (insgesamt 2 Stunden) geöffnet und neu mit Polymer befüllt werden. Diese semi-kontinuierliche Prozessführung würde sich zum einen durch den Einbau eines zweiten Hochdruckautoklaven, der in Serie geschaltet wird, oder zum anderen durch eine kontinuierliche Nachförderung von Polymer in ein vollkontinuierliches Verfahren überführen lassen. Zur Realisierung des zweiten Weges sollte das Polymer in einem zusätzlichen Hochdruckautoklaven im Überschuss vorgelegt und bei niedrigen Temperaturen um 40 °C mit CO₂ unter einem Druck von etwa 200 bar behandelt werden. Da CO₂ auf Polylactide als Weichmacher wirkt, entsteht unter diesen Bedingungen eine Polymerschmelze¹⁶⁴, die durch Erzeugung eines leichten Überdrucks gegenüber dem Extraktionsautoklaven in diesen kontinuierlich überführt werden kann. Dadurch kann die Sprühdauer und die umzusetzende Polymermenge deutlich erhöht werden. Voraussichtlich würde der vollkontinuierliche Betrieb außerdem zu einer weiteren Steigerung der Ausbeute beitragen, da die fixen Materialverluste durch Benetzung der Oberflächen in diesem Fall weniger ins Gewicht fallen würden.

Mithilfe der aufgebauten Technikumsanlage wurde erfolgreich gezeigt, dass handelsübliches PLGA Polymer mit einem kontinuierlichen RESS Verfahren effizient in eine stabile Nanosuspension überführt werden kann. Dieses Verfahren bietet wie weiter oben beschrieben gegenüber üblichen Herstellungsmethoden erhebliche Vorteile und bringt die Voraussetzungen zur Übertragung auf industrielle Produktionsmaßstäbe bereits mit sich. Extraktionsanlagen mit überkritischem CO₂ werden bereits seit einiger Zeit industriell eingesetzt, wie beispielsweise bei der Extraktion von Koffein aus Kaffeebohnen, in der Ledergerbung oder zur Extraktion von Pflanzenölen. Zudem eignet sich das Verfahren prinzipiell für die Verkapselung pharmazeutischer Wirkstoffe, wobei der Prozess für die Verkapselung der Modellsubstanz Desmopressin in PLGA voraussichtlich nicht effizient genug ist. Die als Produkt anfallende Suspension der Nanopartikel ist mittels Sprühtrocknung in ein redispergierbares und lagerstabiles Pulver überführbar.

4.7 Resorptions- und Bioverfügbarkeitsuntersuchungen der Desmopressin Formulierungen

Die Resorptions- und Bioverfügbarkeitsuntersuchungen der Partikelformulierungen mit Desmopressin erfolgten mithilfe unterschiedlicher Testmodelle, die von Projektpartnern des PeTrA Konsortiums entwickelt bzw. zur Verfügung gestellt wurden. So wurde die Aufnahme von Partikeln in HeLa und Caco-2 Zellen an den Universitäten in Nijmegen und Würzburg sowie bei Evonik in Darmstadt untersucht. Weiterhin wurden *in vitro*-Resorptionsstudien zur Untersuchung des Desmopressin- und Partikeltransportes durch ein kultiviertes

Darmepithelgewebe an der Universität in Würzburg durchgeführt. Die *in vivo*-Untersuchung der Bioverfügbarkeit der unterschiedlichen nanopartikulären Formulierungen von Desmopressin erfolgte schließlich am Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung (HZI) in Braunschweig.

4.7.1 In vitro-Charakterisierung

4.7.1.1 In vitro Partikelaufnahme in HeLa und Caco-2 Zellen

Getestet wurde die Aufnahme der fluoreszenzmarkierten Partikel aus Resomer[®] mit und ohne hLF Beschichtung in HeLa und Caco-2 Zellen. Weiterhin wurde die Aufnahme der optimierten Cystein und Asparaginsäure PEA Partikel in HeLa und Caco-2 Zellen untersucht.

Dazu wurden 20.000 HeLa bzw. Caco-2 Zellen in Chamberslides ausgebracht und für 2 Tage bei 37 °C in CO₂-Atmosphäre und entsprechendem Nährmedium inkubiert. Verwendet wurden kultivierte Zelllinien der DSMZ in Braunschweig.

Eine entsprechend eingewogene Menge der Partikelformulierungen wurde in Medium suspendiert, sodass eine Polymerkonzentration von 1,0 mg/ml resultierte.

Zur Durchführung der Tests wurde das Medium abgesaugt und in den Chamberslides durch 500 µl der Partikelsuspensionen ersetzt. Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C für 1,5-2,5h und bis zu 24h im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurde die Partikelsuspension abgesaugt und die Zellen wurden 3 Mal für je 5 min mit mindestens 500 µl Medium gewaschen. Nun wurden die Zellen mit einem Fluoreszenzmikroskop oder einem Konfokalmikroskop untersucht.

Tabelle 31 Zur Testung der Partikelaufnahme in HeLa und Caco-2 Zellen eingesetzte Materialien.

Medium	Menge
MEM with Earle's salts, L-Glu, phenol ohne Sodium Pyruvate	500 ml
DPBS	500 ml
Supplements	
Pen/Strep 5,000u pen, 5,000 µg strep/ml (100x) 100 ml	5 ml
Sodium Pyruvate MEM 100mM (100x) 100 ml	5 ml
FCS (500 ml)	100 ml
NEAA/ non-essential amino acids (100x) 100 ml	5 ml

Die im Folgenden gezeigten Abbildungen wurden nach Begutachtung vielzähliger Aufnahmen jeweils als repräsentatives Ergebnis ausgewählt.

PLGA Partikel – Aufnahme in HeLa Zellen

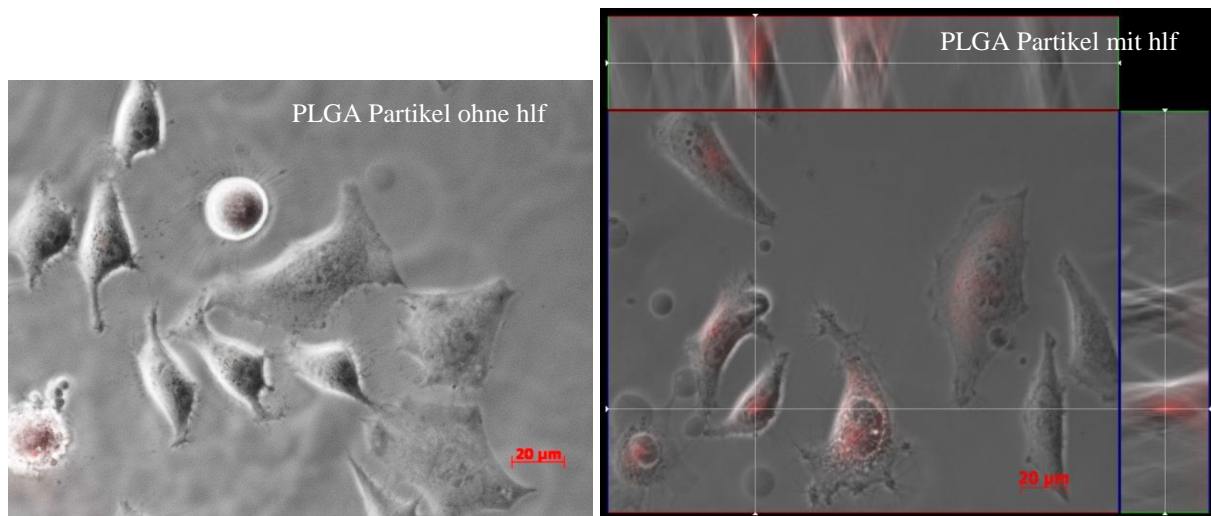


Abbildung 52 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HeLa Zellen, die für 1,5 Stunden bei 37 °C mit einer 1 mg/ml konzentrierten Suspension von Lumogen-haltigen PLGA Nanopartikeln inkubiert wurden. Vor Erstellung der Aufnahme wurden die Zellen mit Medium gewaschen. Links: PLGA Partikel ohne hLF; rechts: PLGA Partikel mit hLF.

Die Aufnahmen in Abbildung 52 zeigen, dass die mit dem zellpenetrierenden hLF Peptid beschichteten PLGA Partikel (rechts) von HeLa Zellen aufgenommen wurden. Dass sich die Partikel tatsächlich im Zellinneren befanden, wurde anhand von Querschnittsaufnahmen bestätigt. Die unbeschichteten Partikel (links) hingegen wurden nicht von den Zellen aufgenommen.

PEA Cystein Partikel – Aufnahme in HeLa Zellen

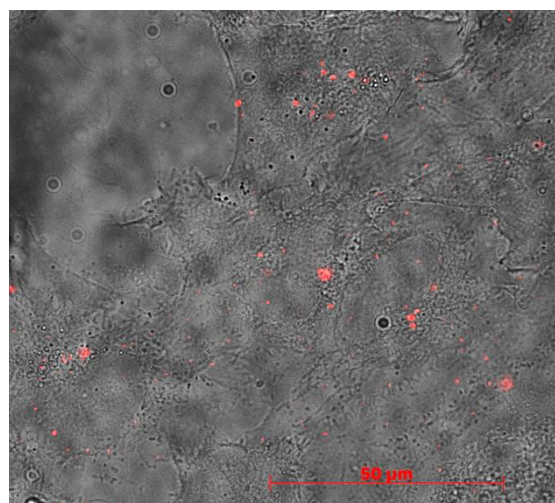


Abbildung 53 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von HeLa Zellen, die für 24 Stunden bei 37 °C mit einer 1 mg/ml konzentrierten Suspension von Lumogen-haltigen Cystein PEA Nanopartikeln inkubiert wurden. Vor Erstellung der Aufnahme wurden die Zellen mit Medium gewaschen.

Abbildung 53 gibt Hinweise auf eine Aufnahme von Cystein PEA Partikeln in HeLa Zellen. Ob sich die Partikel jedoch tatsächlich innerhalb der Zellen befinden, ist anhand der vorliegenden Aufnahme nicht hinreichend zu belegen. Da allerdings selbst nach dem Waschen der Zellen mit Medium noch fluoreszierende Partikel im Bereich der Zellen zu erkennen sind, ist zumindest davon auszugehen, dass die Partikel stärker als unbeschichtete PLGA Partikel an den Zellen anhaften oder aufgenommen werden.

PEA Asparaginsäure Partikel – Aufnahme in HeLa Zellen

Es wurden Partikel aus den drei unterschiedlichen Asparaginsäure PEA Polymeren PEA 01, PEA 04 und PEA 05 getestet.

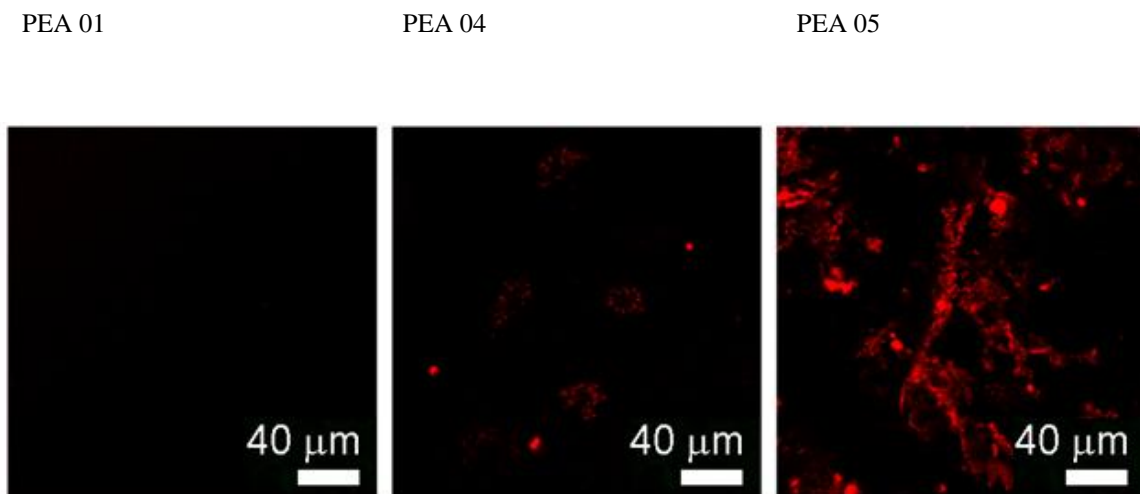


Abbildung 54 Konfokale Aufnahmen von HeLa Zellen, die für 2,5 Stunden bei 37 °C mit einer 1 mg/ml konzentrierten Suspension von Lumogen-haltigen Asparaginsäure PEA Nanopartikeln inkubiert wurden. Vor Erstellung der Aufnahme wurden die Zellen mit Medium gewaschen. Links: PEA 01 Partikel; Mitte: PEA 04 Partikel, rechts: PEA 05 Partikel (Quelle: Uni Nijmegen).

Die Partikel aus Asparaginsäure PEA 01 (Abbildung 54 links) wurden nicht in HeLa Zellen aufgenommen, wohingegen die Partikel aus Asparaginsäure PEA 04 geringfügig (Mitte) und die Partikel aus PEA 05 in dieser Reihe am stärksten (rechts) aufgenommen wurden. Die PEA 05 Partikel bildeten in der Probe größere Agglomerate (rechts).

PLGA Partikel – Aufnahme in Caco-2 Zellen

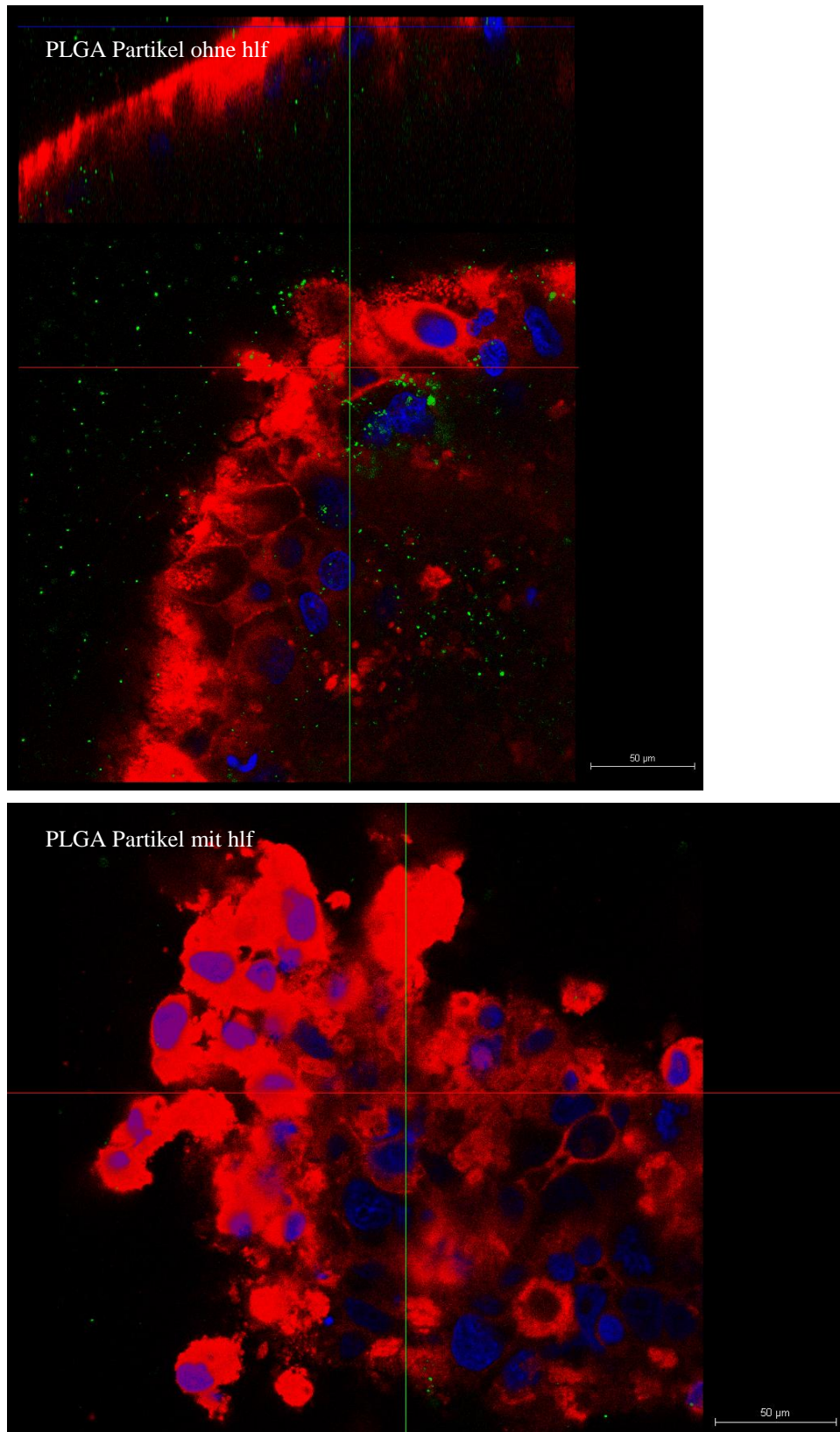


Abbildung 55 Konfokale Aufnahmen von Caco-2 Zellen, die für 2 Stunden bei 37 °C mit einer 1 mg/ml konzentrierten Suspension von Lumogen-haltigen PLGA Nanopartikeln inkubiert wurden. Vor Erstellung der Aufnahme wurden die Zellen mit Medium gewaschen; rot: Zellmembran, blau: Zellkerne, grün: Partikel. (Quelle: Uni Würzburg).

Die Aufnahmen in Abbildung 55 geben Hinweise darauf, dass die unbeschichteten PLGA Partikel (oben) besser in Caco-2 Zellen aufgenommen wurden, als die mit hLF beschichteten Partikel (unten), wo nahezu keine Partikel innerhalb der Zellen zu erkennen sind. In der oberen Abbildung (PLGA Partikel ohne hLF) sind allerdings auch Partikel außerhalb der Zellen zu erkennen, obwohl die Proben vor Erstellung der Aufnahmen gewaschen wurden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass in diesem Versuch die Zellen nicht ausreichend gewaschen wurden.

PEA Cystein Partikel – Aufnahme in Caco-2 Zellen

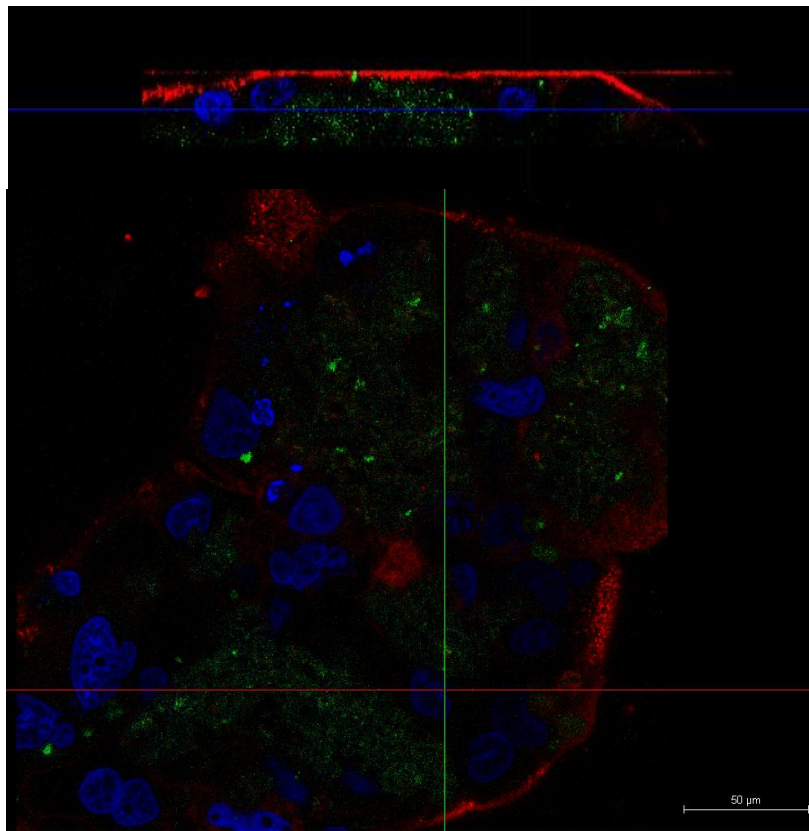


Abbildung 56 Konfokale Aufnahme von Caco-2 Zellen, die für 2 Stunden bei 37 °C mit einer 1 mg/ml konzentrierten Suspension von Lumogen-haltigen Cystein PEA Nanopartikeln inkubiert wurden. Vor Erstellung der Aufnahme wurden die Zellen mit Medium gewaschen; rot: Zellmembran, blau: Zellkerne, grün: Partikel. (Quelle: Uni Würzburg).

In Abbildung 56 ist klar zu erkennen, dass die Cystein PEA Nanopartikel in Caco-2 Zellen aufgenommen wurden. Die Querschnittsaufnahme zeigt, dass die Partikel nicht in einer Ebene unterhalb oder oberhalb der Zelle liegen, sondern tatsächlich im Zellinneren lokalisiert sind.

PEA Asparaginsäure Partikel – Aufnahme in Caco-2 Zellen

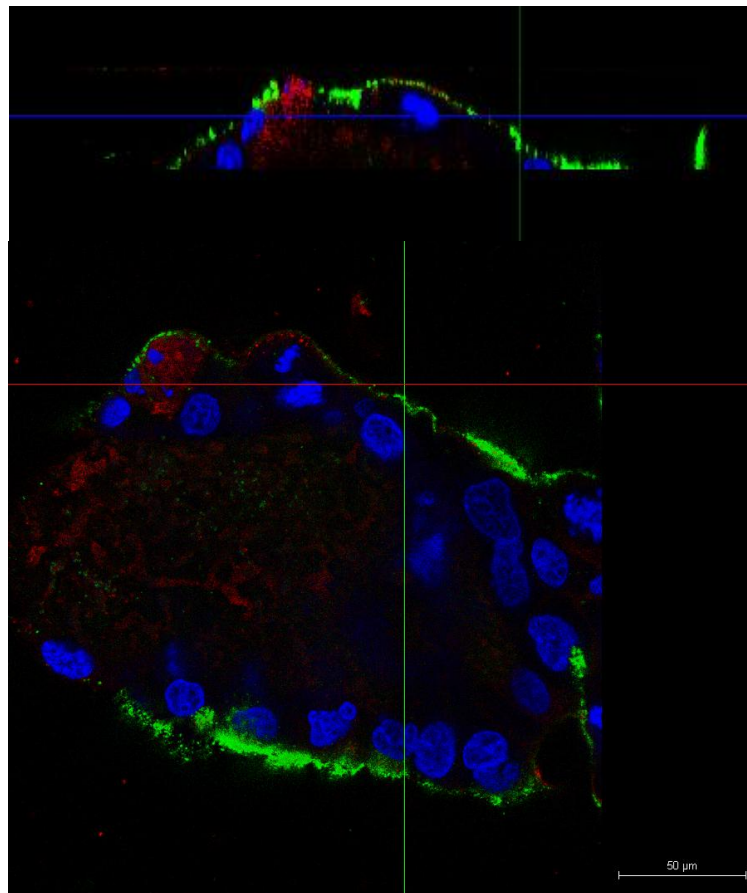


Abbildung 57 Konfokale Aufnahme von Caco-2 Zellen, die für 2 Stunden bei 37 °C mit einer 1 mg/ml konzentrierten Suspension von Lumogen-haltigen Asparaginsäure PEA (PEA 05) Nanopartikeln inkubiert wurden. Vor Erstellung der Aufnahme wurden die Zellen mit Medium gewaschen; rot: Zellmembran, blau: Zellkerne, grün: Partikel. (Quelle: Uni Würzburg).

Die Partikel aus Asparaginsäure PEA 05 wurden nur geringfügig in Caco-2 Zellen aufgenommen. In Abbildung 57 ist allerdings eine starke grüne Fluoreszenz im Bereich der Zellbegrenzung zu erkennen. Die Partikel lagern sich also vermehrt an der Zellmembran an. Die Querschnittaufnahme zeigt, dass sich die Partikel im mittleren Bereich nicht im Zellinneren befinden, sondern unter der Zelle oder darauf liegen müssen.

4.7.1.2 *In vitro*-Resorptionsstudien am Caco-2-Zellmodell

Die *in vitro*-Resorptionsstudien der Partikelformulierungen wurden mit einem erweiterten 3D-Darmgewebemodell durchgeführt. Das verwendete Modell des Darmepithels wurde am Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik in Stuttgart entwickelt und an der Universität Würzburg für die Testung der Partikelformulierungen etabliert. Es erlaubt eine dynamische Kultivierung von Caco-2 Zellen auf einer azellularisierten „BioVasc“ Matrix. Zitat: „Die dynamische 3D-Kultivierung hat sich [...] als vorteilhaft für den Erhalt

polarisierter, funktionaler Epithelzellen herausgestellt, was sich in der Expression spezifischer Enzyme (Dipeptidase) oder Transportaktivitäten von Referenzsubstanzen zeigt¹⁶⁵. Damit bildet das verwendete System besser die tatsächliche *in vivo*-Situation ab als herkömmliche statische Modelle. Der Aufbau des dynamisch kultivierten Epithelmodells ist in Abbildung 58 dargestellt.

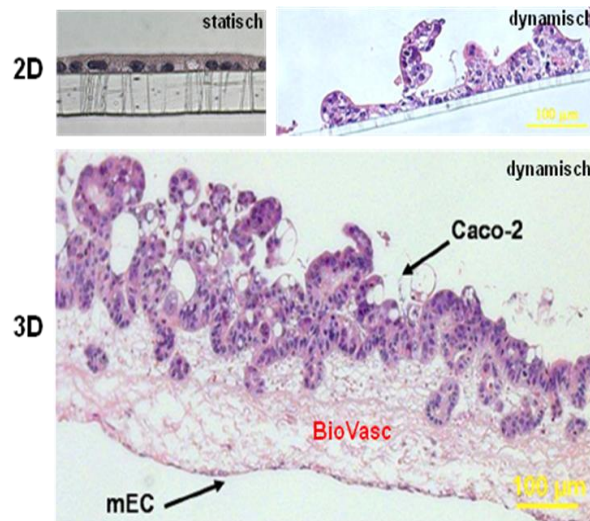


Abbildung 58 Histologische Darstellung des Darmepithels nach statischer oder dynamischer Kultivierung¹⁶⁵.

Die Partikelformulierungen von Desmopressin mit PLGA und PEA wurden an der Universität in Würzburg mit dem dynamischen *in vitro*-Gewebemodell getestet. Untersucht wurde sowohl der Partikel- als auch der Desmopressintransport durch die Epithelschicht.

Im Donorkompartiment wurde eine Suspension der Partikel in Zellmedium mit einer Polymerkonzentration von 1,5 mg/ml bzw. 10 µg Desmopressin eingesetzt. Die Proben aus dem Akzeptorkompartiment wurden nach 6 Stunden gezogen. Der Desmopressingehalt der Proben wurde mittels HPLC-Analytik bestimmt und die Quantifizierung der transportierten fluoreszenzmarkierten Polymerpartikel erfolgte fluorimetrisch. Die Ergebnisse der Transportstudie sind in Tabelle 32 dargestellt.

Tabelle 32 Ergebnisse der *in vitro*-Transportstudie der nanopartikulären Desmopressin Formulierungen.

	Desmopressin Transport mit Zellen [%]	Desmopressin Transport durch Matrix ohne Zellen [%]	Partikeltransport mit Zellen [%]	Partikeltransport durch Matrix ohne Zellen [%]
Desmopressin Kontrolle ohne Partikel	19,6	58,1	ohne Partikel	ohne Partikel
PLGA Partikel	12,7	38,7	<1	<1
PLGA Partikel +hLF	29,7	66,1	<1	<1
PEA Cystein Partikel	18,1	62,0	<1	<1
PEA Asparaginsäure Partikel	27,9	71,3	<1	<1

Da die Fluoreszenzintensität aller Proben aus dem Akzeptorkompartiment unterhalb der Nachweisgrenze lag, konnte kein Transport von Partikeln durch das simulierte Caco-2 Darmepithel nachgewiesen werden. Aufgrund der Sensibilität der analytischen Methode kann somit lediglich ausgeschlossen werden, dass mehr als 1% der eingesetzten Partikel über die Zellbarriere transportiert wurden. Für den Bereich zwischen 0% und 1% kann keine Aussage getroffen werden.

Die Angaben des Desmopressintransportes in Tabelle 32 beziehen sich auf den Anteil des eingesetzten Wirkstoffes, der die Epithelschicht passiert hat.

Bei den Ergebnissen in Tabelle 32 fällt zunächst auf, dass der Transport des nicht formulierten Desmopressins mit 19,6% bereits unerwartet hoch war. Kahns et al. ermittelten im Transwell-Transporttest durch einen konfluenten Caco-2 Monolayer für Desmopressin einen Permeationskoeffizienten von $5,12 \cdot 10^{-7} \text{ cm/s}$ ¹⁶⁶. Dieser Wert liegt im Bereich schlecht permeabler Substanzen und würde nach 6 Stunden lediglich einen Transport von ca. 2 bis maximal 6% der eingesetzten Desmopressinmenge über die Barriere erwarten lassen¹⁶⁷.

Die Formulierung der unbeschichteten PLGA Partikel zeigte gegenüber der Kontrolle einen verminderten Transport von 12,7%. Allerdings konnten in diesem Versuch lediglich 37,8% des Wirkstoffes die reine Matrix ohne Zellen passieren. Daher ist nicht klar, ob der Transport aufgrund der reduzierten Durchlässigkeit der reinen Matrix geringer ausgefallen ist, oder ob der Effekt tatsächlich auf die Zellbarriere zurückzuführen ist. Die mit hLF beschichteten PLGA Partikel zeigten mit 29,7% die höchste Transportrate für Desmopressin und damit eine deutliche Steigerung gegenüber der nicht formulierten Kontrolllösung. Auch die Partikelformulierung mit Asparaginsäure PEA führte gegenüber der Kontrolle zu einem erhöhten Desmopressintransport, der jedoch mit 27,9% etwas geringer ausfiel als für PLGA Partikel mit hLF. Die Formulierung der Cystein PEA Partikel zeigte im Resorptionsmodell keine wesentliche Veränderung im Vergleich zum nicht formulierten Desmopressin. Nach 6 Stunden wurden 18,1% des Wirkstoffes über die Barriere transportiert.

4.7.2 *In vivo*-Charakterisierung

Die *in vivo*-Charakterisierung der Desmopressin Formulierungen beschäftigt sich im Wesentlichen mit der Untersuchung der Bioverfügbarkeit von Desmopressin nach peroraler und rektaler Gabe der unterschiedlichen Partikelformulierungen, die im Zuge dieser Arbeit entwickelt wurden.

In Vorversuchen zur *in vivo*-Charakterisierung der Formulierungen wurde die Analytik von Desmopressin aus Blutserumproben mittels HPLC Methode mit MS Detektion etabliert. Die Nachweisgrenze für Desmopressin in Blutserum lag nach erfolgreicher Optimierung der Methode bei einer Konzentration von 2 ng/ml. Wirksame Blutspiegel werden allerdings bereits ab einer Serumkonzentration zwischen 1 pg/ml und 5 pg/ml erreicht¹⁶⁸ und die Konzentrationen nach Gabe einer üblichen therapeutischen Dosis bewegen sich in etwa zwischen 1 pg/ml und 15 pg/ml¹⁷². Da die zur Verfügung stehende Analytik eine zuverlässige Gehaltsbestimmung innerhalb dieses Konzentrationsbereichs nicht leisten konnte, wurden den Versuchstieren entsprechend höhere Dosen verabreicht. Die Dosis von Desmopressin wurde insofern an die Vorgaben der analytischen Methode angepasst.

4.7.2.1 *In vivo*-Untersuchung der Bioverfügbarkeit am Tiermodell

Die Bioverfügbarkeitsuntersuchungen wurden wie in Kapitel 4.1.7 auf Seite 65 beschrieben durchgeführt.

Die spezifische Funktionalität der Asparaginsäure PEA Formulierung bezieht sich wie bereits beschrieben auf ein pH-abhängiges Löslichkeits- und Freisetzungsverhalten im Verdauungstrakt. Da das typische pH-Profil des Magen-Darm-Traktes von Nagetieren jedoch deutlich von dem des Menschen abweicht¹⁴², erschien die *in vivo*-Testung der PEA Partikel vom Asparaginsäuretyp an Mäusen nicht sinnvoll. Daher wurden lediglich die Formulierungen von Desmopressin mit PEA Cystein und mit PLGA sowie eine auf dem Markt befindliche Referenzformulierung getestet.

Um die absolute Bioverfügbarkeit der Formulierungen berechnen zu können, wurde zunächst eine Plasmaspiegelkurve nach intravenöser Gabe einer wässrigen Lösung von 20 µg Desmopressinacetat ermittelt. Anhand dieser Daten wurden zudem einige wesentliche pharmakokinetische Kenngrößen ermittelt. Die Ergebnisse sind grafisch in Abbildung 59 dargestellt.

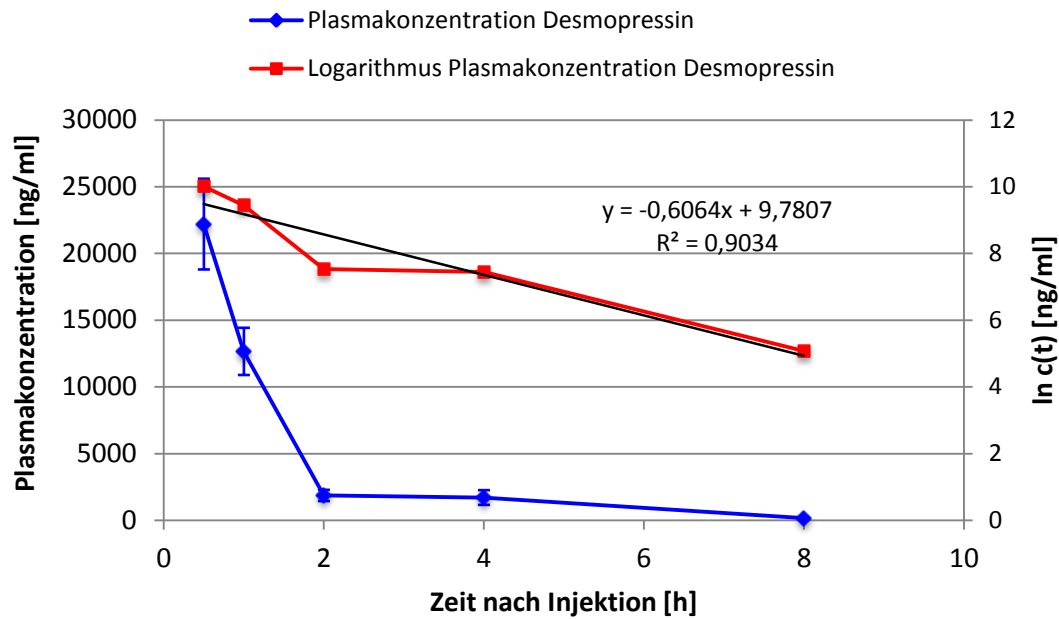


Abbildung 59 blau: Plasmaspiegel von Desmopressin nach i.v. Injektion einer wässrigen Lösung von 20 µg Desmopressinacetat; n=3 pro Zeitpunkt; rot: natürlicher Logarithmus der Plasmaspiegelkurve nach i.v. Injektion; schwarz: lineare Regression der logarithmierten Plasmaspiegelkurve.

Die erste Probennahme erfolgte 0,5h nach Injektion der Dosis in die Schwanzvene der Versuchstiere. Zu diesem Zeitpunkt wurde entsprechend den Erwartungen mit 22,2 µg/ml ($\pm 3,4$ µg/ml) die höchste Plasmakonzentration von Desmopressin gemessen. Durch Elimination des Desmopressins aus dem Blutkreislauf fiel der Plasmaspiegel stetig ab (blau dargestellt in Abbildung 59), wobei der Abbau nicht linear erfolgte. Wie für Desmopressin zu erwarten war, lief die Elimination demnach nicht entsprechend einer Kinetik nullter Ordnung ab¹⁶⁹. Eine Kinetik erster Ordnung würde einen exponentiellen Zusammenhang zwischen Plasmakonzentration und Zeit voraussetzen. Um dies zu überprüfen, wurden die Werte halblogarithmisch aufgetragen (rot dargestellt in Abbildung 59). Dabei wurde näherungsweise eine Gerade erhalten. Der Korrelationskoeffizient der linearen Regression der halblogarithmischen Auftragung beträgt 0,90344. Dies spricht für einen annähernd exponentiellen Verlauf des Plasmaspiegels und damit eine Eliminationskinetik erster Ordnung entsprechend folgender Funktion:

$$c(t) = c_0 * e^{-k_e * t}$$

Formel 3 Zeitlicher Verlauf der Plasmakonzentration bei Elimination erster Ordnung; c_0 : Anfangskonzentration, k_e : Eliminationskonstante, t: beliebiger Zeitpunkt.

Durch Logarithmieren von Formel 3 erhält man die folgende lineare Funktion:

$$\ln c(t) = \ln c_0 - k_e * t$$

Formel 4 Logarithmus von Formel 3, der Funktion der Plasmakonzentration in Abhängigkeit von der Zeit.

Durch lineare Regression der halblogarithmischen Auftragung der Plasmakonzentration von Desmopressin über der Zeit wird die folgende Funktion erhalten:

$$\ln c(t) = 9,7807 - 0,6064 * t$$

Formel 5 Funktion der Regressionsgeraden der halblogarithmischen Auftragung der Plasmakonzentration von Desmopressin über der Zeit.

Aus Formel 5 können nun einige wesentliche pharmakokinetische Parameter abgelesen oder hergeleitet werden. Durch Einsetzen von $t=0$ in Formel 5 kann nun die Konzentration zum Zeitpunkt null berechnet werden. Löst man die Gleichung nach c_0 auf, ergibt sich eine Konzentration von $c_0=17,7 \mu\text{g/ml}$. Diese Plasmakonzentration ergibt sich letztlich aus der verabreichten Dosis D von $20 \mu\text{g}$ und dem zur Verfügung stehenden Verteilungsvolumen V entsprechend $c_0=D/V$. Der Betrag von c_0 ist kleiner als D , da die Dosis in einem Volumen von etwas mehr als 1 ml verteilt wurde. Mithilfe der bekannten Informationen lässt sich das Verteilungsvolumen zu 1,13 ml berechnen. Das Blutvolumen einer Maus liegt je nach Alter und Geschlecht zwischen 1,1 ml und 3,0 ml¹⁷⁰. Das berechnete Verteilungsvolumen von Desmopressin liegt innerhalb dieses Bereiches. Daher ist davon auszugehen, dass die verabreichte Dosis vollständig im Blutkreislauf verteilt wurde und sich nicht in tiefere Kompartimente wie beispielsweise Fettgewebe umverteilt hat. Dies entspricht voll und ganz den Erwartungen für hydrophile Wirkstoffe wie Desmopressin¹⁷¹. Weiterhin wird c_0 zur Berechnung der Plasmakonzentration zu einem beliebigen Zeitpunkt mithilfe von Formel 3 benötigt. Als letzte Größe zur Vervollständigung dieser Gleichung fehlt nur noch die Eliminationskonstante k_e . Sie wird durch die Steigung der linearisierten halblogarithmischen Funktion beschrieben und beträgt im konkreten Fall $k_e = 0,6064 \text{ h}^{-1}$. Sie hat die Dimension einer inversen Zeit: $k_e=1/\tau$ und stellt ein Maß für die Geschwindigkeit der Elimination aus dem zentralen Kompartiment, dem systemischen Blutkreislauf, dar. Eine weitaus geläufigere Kenngröße der Eliminationsgeschwindigkeit ist jedoch die Halbwertszeit $t_{1/2}$. Sie gibt das Zeitintervall an, in dem die Wirkstoffkonzentration im Blutkreislauf jeweils auf die Hälfte absinkt. Zwischen der Halbwertszeit $t_{1/2}$ und τ besteht folgender Zusammenhang: $t_{1/2} = \tau * \ln(2)$. Mithilfe dieser Funktionen lässt sich die Halbwertszeit zu $t_{1/2} = 1,14 \text{ h}$ berechnen. Dies entspricht einem Zeitraum von rund 68 Minuten. Beim Menschen liegt die Eliminationshalbwertszeit $t_{1/2}$ von Desmopressin nach intravenöser Gabe zwischen 80 und

120 Minuten¹⁷². Daraus lässt sich schließen, dass der Wirkstoff Desmopressin von der Maus etwas schneller eliminiert wird als vom menschlichen Organismus.

Untersuchung der oralen Bioverfügbarkeit der Partikelformulierungen

Zur Untersuchung der oralen Bioverfügbarkeit der Partikelformulierungen mit Desmopressin wurde zunächst jeweils der zeitliche Verlauf der Plasmakonzentration von Desmopressin nach peroraler Gabe grafisch aufgetragen. Als Referenz wurde Minirin[®] Lyophilisat (sublinguale Schmelztablette) ausgewählt und in gleicher Weise wie die Partikelformulierungen den Versuchstieren peroral verabreicht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 60 dargestellt.

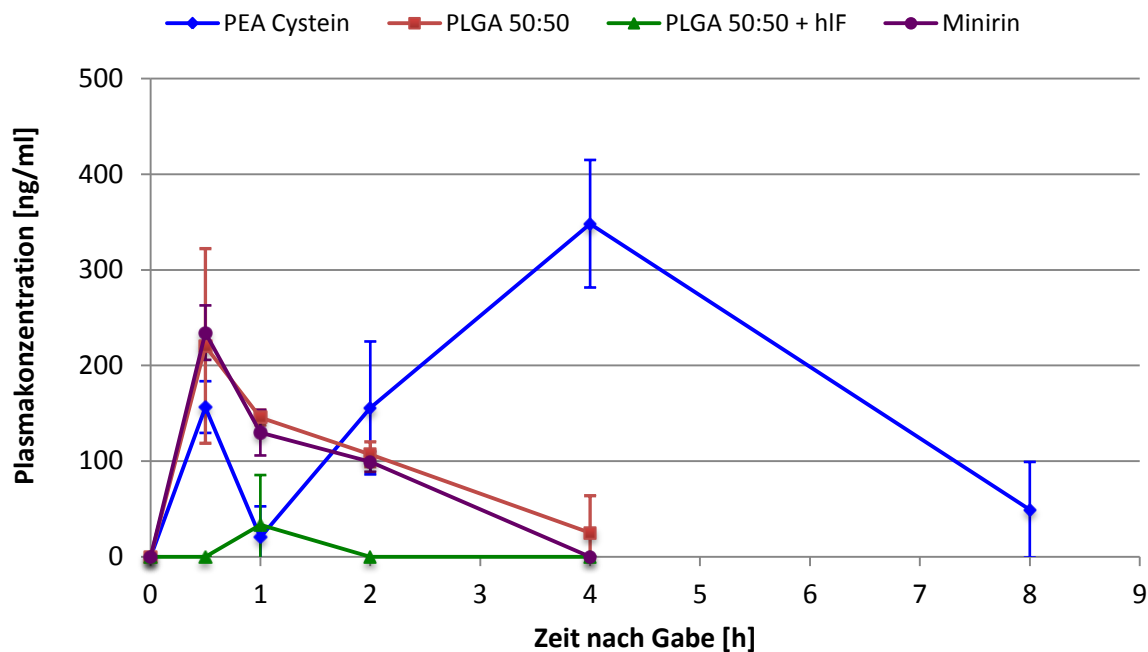


Abbildung 60 Plasmaspiegelkurven von Desmopressin nach peroraler Gabe der Formulierungen an Mäuse. Die applizierte Dosis betrug für die Partikelformulierungen jeweils 15 µg Desmopressinacetat und für Minirin[®] 20 µg. n=3 pro Zeitpunkt, die erste Messung erfolgte nach 30 min.

Der Verlauf der Plasmakonzentration nach peroraler Gabe der Partikelformulierung mit PLGA ohne hLF, in Abbildung 60 in braun dargestellt, weist gegenüber dem Verlauf des Plasmaspiegels nach Gabe des Referenzarzneimittels Minirin[®], in violett dargestellt, keinen signifikanten Unterschied auf. Bei beiden Formulierungen wurde die höchste Plasmakonzentration bereits 30 min nach der Verabreichung der Dosis gemessen. Dies spricht dafür, dass Desmopressin sehr schnell aus der Arzneiform freigesetzt und vom Darm resorbiert wurde. Die *in vitro*-Freisetzungstests der PLGA Formulierung haben gezeigt, dass die Freisetzung von Desmopressin bereits nach 5 min weitgehend abgeschlossen war. Zudem war die Wirkstoffbeladung der Partikel sehr niedrig, sodass ohnehin nicht mit einer modifizierten

Freisetzung nennenswerter Wirkstoffanteile zu rechnen war. Das Referenzpräparat Minirin[®] Lyophilisat wurde wie auch die Partikelformulierungen vor der Applikation in Wasser dispergiert. Hier ist aufgrund der Formulierung als Schmelztablette ebenfalls nicht mit einer modifizierten Wirkstofffreisetzung zu rechnen. Bei beiden Präparaten ist folglich davon auszugehen, dass der Wirkstoff bereits vor der Gabe an die Versuchstiere weitgehend freigesetzt wurde und sich in Lösung befand. Dies erklärt, dass zwischen der PLGA Formulierung und Minirin[®] kein signifikanter Unterschied des Plasmaspiegelverlaufs resultierte. Zu beachten ist hierbei allerdings, dass die von Minirin verabreichte Wirkstoffdosis 20 µg betrug während die Dosis der PLGA Partikelformulierung bei 15 µg lag. Bei der späteren Berechnung der absoluten Bioverfügbarkeit wurde dieser Einflussfaktor berücksichtigt. 2h nach der Applikation wurden Konzentrationen um 100 ng/ml gemessen und nach 4h war der Wirkstoff bei den beiden Formulierungen annähernd vollständig aus dem Blut eliminiert.

Bei Anwesenheit von hLF in der Desmopressin Formulierung mit PLGA Partikeln war über den gesamten Messzeitraum hinweg kein signifikanter Nachweis von Desmopressin im Blutplasma möglich (grüne Kurve in Abbildung 60). Lediglich bei einem von drei Versuchstieren und ausschließlich beim Messpunkt 1h wurde die Nachweisgrenze überschritten. Auf Basis der vorliegenden Daten ist dieser Effekt jedoch nicht signifikant, sodass insgesamt davon auszugehen ist, dass nach peroraler Gabe der Formulierung mit hLF beschichteten PLGA Partikeln kein Desmopressin aufgenommen wurde. Die Plasmaspiegelkurve von Desmopressin nach Gabe der PLGA Formulierung mit hLF liegt somit deutlich unterhalb der Plasmakonzentrationen aller anderen getesteten Formulierungen.

Der Plasmaspiegelverlauf nach peroraler Gabe der Formulierung mit PEA Cystein Nanopartikeln, in Abbildung 60 in blau dargestellt, hebt sich deutlich von den anderen Formulierungen ab. Der nach 0,5h gemessene Wert von 156 ng/ml steht noch im Einklang mit den Beobachtungen bei der PLGA Formulierung ohne hLF und bei Minirin[®]. Nachdem jedoch die Plasmakonzentration zwischen 0,5h und 1h zunächst abfiel, stieg sie anschließend wieder an und erreichte erst bei 4h ihr Maximum von 348 ng/ml (± 67 ng/ml). Bei allen anderen getesteten Formulierungen hingegen war nach 4h kaum mehr Wirkstoff im Plasma nachzuweisen. Erst 8h nach Gabe der PEA Formulierung war die Plasmakonzentration auf durchschnittlich 49 µg/ml (± 50 µg/ml) abgesunken. Damit lag die maximale Plasmakonzentration deutlich über den Werten aller anderen getesteten Formulierungen und der Wirkstoff Desmopressin konnte über einen längeren Zeitraum hinweg im Blut der Versuchstiere nachgewiesen werden.

Das schnelle Anfluten von Desmopressin nach peroraler Gabe der PEA Cystein Partikel ist offensichtlich auf den Wirkstoffanteil der Formulierung zurückzuführen, der nicht in Partikel

eingekapselt war und dadurch unmittelbar für eine Resorption zur Verfügung stand. Bei der PLGA Formulierung ohne hLF und bei Minirin[®] war diese schnelle Resorption des freien Wirkstoffanteils ebenfalls zu erkennen. Da bei diesen schnell freisetzenden Formulierungen jedoch im Gegensatz zur PEA Cystein Formulierung bereits unmittelbar nach der Gabe annähernd der gesamte enthaltene Wirkstoffanteil zur Resorption frei zur Verfügung stand, blieb es insgesamt bei diesem frühen Konzentrationsmaximum bei 0,5h. Der nun bei der PEA Cystein Formulierung folgende Anstieg der Konzentration zwischen 1h und 4h kann dadurch erklärt werden, dass weitere Wirkstoffanteile retardiert aus den PEA Partikeln freigesetzt und daher über einen längeren Zeitraum hinweg ins Blut aufgenommen werden konnten. Dieser Erklärungsansatz steht mit den Beobachtungen der *in vitro*-Freisetzungstudien in Einklang. Die Freisetzungstests der PEA Cystein Formulierung zeigten eine verlängerte Wirkstofffreisetzung des verkapselten Desmopressins über einen Zeitraum von 5 Stunden hinweg.

Nach peroraler Gabe der PEA Cystein Partikelformulierung wurde der maximale Plasmaspiegel erst nach 4h gemessen. Dieser Zeitpunkt liegt innerhalb des Bereiches, der auf die retardierte Wirkstofffreisetzung aus den PEA Partikeln zurückzuführen ist. Der direkt zu Beginn schnell freigesetzte, nicht in Polymerpartikel verkapselte Anteil an Desmopressin führte lediglich zu einem vergleichsweise geringen Anstieg des Plasmaspiegels bei 0,5h, obwohl dieser mit ca. 70% den größten Anteil des insgesamt in der Formulierung enthaltenen Wirkstoffes darstellte. Die höheren Plasmakonzentrationen nach 4 und 8 Stunden sind auf den retardiert freigesetzten Wirkstoffanteil zurückzuführen, der allerdings nur 30% des insgesamt enthaltenen Wirkstoffes ausmacht. Aus dieser Beobachtung kann der Schluss gezogen werden, dass die PEA Cystein Partikel neben einer retardierten Wirkstofffreisetzung und dadurch bedingten Verlängerung der Plasmaspiegel auch zu einer effizienteren intestinalen Resorption von Desmopressin beigetragen haben.

Orale Lösung von Desmopressinacetat als Referenz

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Proben wurde eine wässrige Lösung von 20 µg Desmopressinacetat peroral appliziert und die Plasmaspiegel wurden ermittelt. Die mittleren Plasmaspiegel der Lösung waren deutlich höher als die der Minirin[®]-Referenz und bis zu einem Zeitpunkt von 2 Stunden auch höher als die der PEA Cystein Partikelformulierung. Aus folgenden Gründen wurde diese Probe in der nachfolgenden Diskussion allerdings nicht berücksichtigt: Die gemessenen Plasmaspiegel weichen sehr stark von den Erwartungen ab, die sich aus dem Stand der Technik ergeben. Untersuchungen der oralen Bioverfügbarkeit einer Desmopressin-Lösung von Vilhardt et al. am Menschen¹⁰⁹ und Lundin et al. an der Ratte¹⁷³ führten zu erheblich geringeren Werten. Außerdem steht dieses Ergebnis im

Widerspruch zu dem der Minirin[®]-Referenz. Da nach Auflösen des Minirin[®] Lyophilisats gleichfalls eine wässrige Desmopressin-Lösung vorlag, sollten die Ergebnisse der reinen Wirkstofflösung mit denen des aufgelösten Lyophilisats erwartungsgemäß weitgehend übereinstimmen. Dies war jedoch nicht der Fall, womit das Ergebnis der Desmopressin-Lösung auch in diesem Punkt nicht den Erwartungen entsprach. Ein weiteres Argument dafür, dass die Ergebnisse der Minirin[®]-Referenz zuverlässiger sind als die der reinen Wirkstofflösung (neben den Literaturreferenzen), ist die geringere Standardabweichung der Plasmakonzentrationen. Die Standardabweichung der Plasmaspiegel nach Gabe der Desmopressin-Lösung betrug im Mittel 42% im Vergleich zu 10% bei den Minirin[®] Proben.

Ein sehr entscheidender Grund dafür, dass die Ergebnisse der peroral verabreichten Desmopressin-Lösung nicht als Referenz zur Bioverfügbarkeit der Partikelformulierungen herangezogen werden können, stellt der Umstand dar, dass aufgrund von Materialengpässen unterschiedliche Chargen des Wirkstoffes mit stark abweichendem Peptid-Gehalt verwendet werden mussten. Die folgenden beiden Chargen von Desmopressinacetat wurden verwendet:

- Charge A: Hergestellt vor > 12 Jahren, Peptid-Gehalt ca. 50% (basierend auf den Ergebnissen einer Reevaluation der Substanz, die zum aktuellen Zeitpunkt bereits mehrere Jahre zurück liegt).
- Charge B: Hergestellt vor < 2 Jahren, Peptid-Gehalt ca. 98% (Analysezertifikat).

Die getesteten Partikelformulierungen wurden mit Desmopressin Charge A beladen, während für die orale Desmopressin-Referenzlösung Material von Charge B verwendet wurde. Da für die Kalibrierung jeweils die der Probe entsprechende Charge verwendet wurde, macht sich der unterschiedliche Gehalt in der Darstellung zwar zunächst nicht bemerkbar, allerdings ist davon auszugehen, dass unterschiedliche Dosen die Resorption und die Pharmakokinetik und damit auch die Bioverfügbarkeit beeinflussen. Unter Berücksichtigung des wahren Gehalts an Desmopressinacetat und der ohnehin um 5 µg höheren Dosis der oralen Desmopressin-Lösung lag der wahre Peptid-Gehalt der verabreichten Dosis der Partikelformulierungen bei jeweils ca. 7,5 µg während die Dosis der oralen Desmopressin-Lösung ca. 19,6 µg betrug.

Aufgrund dieser erheblichen Unterschiede der jeweils verabreichten absoluten Dosis (Faktor 2,6) ist eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse der Partikelformulierungen mit denen der Desmopressin-Referenzlösung nicht gegeben. Daher wurde die Wiederholung dieser Versuche bereits konkret geplant. Hierbei ist unbedingt darauf zu achten, dass die absolute Dosis der verabreichten Formulierungen und Referenzen jeweils gleich ist und dass möglichst eine einheitliche Wirkstoffcharge verwendet wird. Da diese Ergebnisse zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht vorlagen, eine zuverläßige Verifizierung aus den genannten Gründen allerdings dringend empfehlenswert ist, wurde in der vorliegenden Arbeit ausschließlich Minirin[®] Lyophilisat als Referenz zu den Partikelformulierungen herangezogen.

Berechnung der absoluten oralen Bioverfügbarkeit der Partikelformulierungen

Die Berechnung der Bioverfügbarkeit der Formulierungen erfolgte auf Basis der im voranstehenden Abschnitt in Abbildung 60 gezeigten Plasmakonzentrationsverläufe. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass die Ergebnisse aufgrund der zu geringen Anzahl an Messpunkten und da die Studien lediglich an Mäusen durchgeführt wurden, im Zuge eines Zulassungsverfahrens nicht verwertbar wären und allenfalls als erste Hinweise bezüglich der absoluten Bioverfügbarkeit zu werten sind.

Anhand der Plasmaspiegelverläufe wurde jeweils die AUC (*Area under the curve*) als Maß für die systemische Verfügbarkeit von Desmopressin berechnet. Die absolute orale Bioverfügbarkeit der Formulierungen F_{abs} ergibt sich schließlich aus dem Verhältnis der AUC nach peroraler Gabe der Formulierungen zur AUC nach intravenöser Gabe der reinen Wirkstofflösung. Die Berechnung von F_{abs} erfolgte unter Berücksichtigung der jeweils verabreichten Dosis mithilfe der folgenden Formel:

$$F_{abs} = \frac{AUC_{p.o.} * D_{i.v.}}{AUC_{i.v.} * D_{p.o.}} * 100[\%]$$

Formel 6 Formel zur Berechnung der absoluten Bioverfügbarkeit F_{abs} der peroral verabreichten Desmopressin Formulierungen; $AUC_{p.o.}$: Fläche unter der Plasmaspiegelkurve nach p.o. Gabe einer Formulierung; $AUC_{i.v.}$: Fläche unter der Plasmaspiegelkurve nach i.v. Gabe einer Desmopressin Lösung; $D_{i.v./p.o.}$: jeweils verabreichte Dosis an Desmopressinacetat. Quelle: C.-J. Estler, H. Schmidt¹⁷⁴.

Die Ergebnisse der Berechnung der oralen Bioverfügbarkeit der getesteten Formulierungen und einige weitere pharmakokinetische Kenngrößen wurden in Tabelle 33 zusammengefasst.

Tabelle 33 Ergebnisse der *in vivo*-Bioverfügbarkeitsuntersuchung der Desmopressin Formulierungen; t_{max} : Zeitpunkt, an dem die höchste Plasmakonzentration gemessen wurde; C_{max} : höchste gemessene Plasmakonzentration; AUC: Fläche unter der Plasmaspiegelkurve; F_{abs} : absolute Bioverfügbarkeit.

Formulierung	Dosis [μ g]	t_{max} [h]	C_{max} [ng/ml]	AUC [ng*h/ml]	F_{abs} [%]
Desmopressin Lösung i.v.	20,0	0,5	22.195	29.483	F = 100
PEA Cystein Partikel p.o.	15,0	4	348	1.218	5,51
PLGA Partikel p.o.	15,0	0,5	220	578	2,61
PLGA Partikel + hLF p.o.	15,0	0,5	33	25	0,11
Minirin [®] Lyophilisat p.o.	20,0	1	234	366	1,24

Definitionsgemäß beträgt die Bioverfügbarkeit der intravenös applizierten Desmopressin Lösung 100%. Die Bioverfügbarkeit der peroral applizierten Formulierungen wurde zu diesem Wert entsprechend Formel 6 ins Verhältnis gesetzt, um die absolute Bioverfügbarkeit F_{abs} zu berechnen.

Die Partikelformulierung von Desmopressin mit PEA Cystein Polymer besitzt mit 5,51% die höchste absolute orale Bioverfügbarkeit unter allen getesteten Formulierungen. Die relative Bioverfügbarkeit bezogen auf die Referenzformulierung Minirin[®] Lyophilisat beträgt 443,7%. Dies entspricht einer rund 4,4fachen Steigerung der oralen Bioverfügbarkeit gegenüber der handelsüblichen Referenzformulierung. Legt man die Ergebnisse einer klinischen Humanstudie von Vilhardt et al. zugrunde, die die orale Bioverfügbarkeit von Desmopressin auf rund 0,9% bezifferte¹⁰⁹, so wurde mit der Partikelformulierung aus PEA Cystein eine mehr als 6fache Steigerung der oralen Bioverfügbarkeit erzielt.

Die Formulierung mit unbeschichteten PLGA Partikeln erzielte ebenfalls eine Steigerung der oralen Bioverfügbarkeit des Modellpeptids gegenüber der Referenzformulierung, wenn auch etwas geringer ausfallend als bei der PEA Formulierung. Die absolute orale Bioverfügbarkeit von Desmopressin betrug hier 2,61%. Damit wird bezüglich Minirin[®] Lyophilisat eine relative Bioverfügbarkeit von 210,6% erzielt. Dies entspricht einer rund 2,1fachen Erhöhung.

Mithilfe der hLF beschichteten PLGA Partikel wurde unter allen getesteten Formulierungen die niedrigste Bioverfügbarkeit des Modellpeptids erzielt. Sie betrug lediglich 0,11%. Die relative Bioverfügbarkeit der hLF beschichteten Partikel gegenüber der Referenzformulierung Minirin[®] Lyophilisat betrug 9,11%. Dies entspricht einer mehr als 11fachen Verringerung der oralen Bioverfügbarkeit.

Untersuchung der rektalen Bioverfügbarkeit der Partikelformulierungen

Zusätzlich zur Untersuchung der oralen Bioverfügbarkeit von Desmopressin sollte die Bioverfügbarkeit des Modellwirkstoffes nach rektaler Gabe der Partikelformulierungen an die Versuchstiere untersucht werden. Die Tests wurden wie in Kapitel 4.1.7 auf Seite 65 beschrieben durchgeführt.

Die rektale Gabe der in Wasser dispergierten Formulierungen mithilfe der Knopfkanüle erwies sich als problematisch. Nicht in allen Fällen konnte das gesamte Volumen der Partikeldispersionen ohne Verluste in das Versuchstier eingebracht werden. Teilweise wurden erhebliche Mengen der Partikelsuspension von den Tieren wieder ausgeschieden. Aufgrund dieser Schwierigkeit bei der Applikation der Proben war bereits zu erwarten, dass starke interindividuelle Schwankungen zwischen den Versuchstieren auftreten würden.

Das Ergebnis der Plasmakonzentrationsbestimmung zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten ist in Abbildung 61 dargestellt.

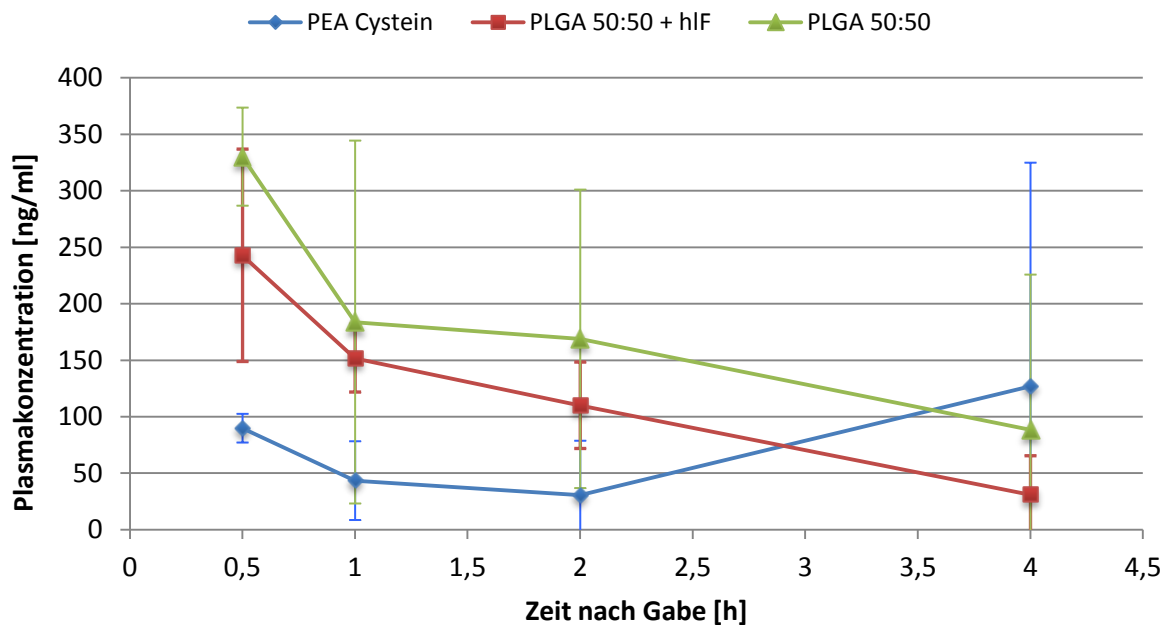


Abbildung 61 Plasmaspiegelkurven von Desmopressin nach rektaler Gabe der Partikelformulierungen an Mäuse; n=3.

Wie bei der *in vivo*-Untersuchung der oralen Bioverfügbarkeit wurden für jeden Messzeitpunkt jeweils drei Versuchstiere verwendet. Die gemessenen Plasmakonzentrationen wichen häufig so stark voneinander ab, dass mit drei Versuchstieren keine zuverlässigen und statistisch belastbaren Aussagen zur rektalen Bioverfügbarkeit der Formulierungen getroffen werden konnten. Wie in Abbildung 61 ersichtlich ist, überschneiden sich die Standardabweichungen der Formulierungen zu großen Teilen vollständig. Die dargestellten Unterschiede zwischen den rektalen Plasmaspiegelverläufen der Partikelformulierungen sind somit möglicherweise nicht signifikant. Aus diesem Grund wurde von einer weiteren Auswertung dieser Daten zunächst abgesehen.

Die bisherigen Daten sollten durch weitere Versuche ergänzt werden, um die statistische Belastbarkeit zu erhöhen. Gleichzeitig sollte die Methode zur Applikation der Proben verbessert werden. Dem Wiederausscheiden der applizierten Partikelsuspensionen könnte beispielsweise durch eine Erhöhung der Viskosität der Probe entgegengewirkt werden. Hilfreich könnte beispielsweise eine Immobilisierung der Probe nach der Applikation durch eine Gelbildung sein.

4.7.2.2 Anmerkung zur *in vivo*-Toxizität der Partikelformulierungen

Auch wenn die durchgeführten *in vivo*-Studien nicht speziell auf die Untersuchung der Toxizität der Partikelformulierungen ausgerichtet waren, können dennoch einige Aussagen zur akuten Toxizität getroffen werden.

Um mit den Partikelformulierungen jeweils eine Wirkstoffdosis von 15 µg zu applizieren, wurden jedem Tier zwischen 4 mg und 6 mg Polymer in Form von Nanopartikeln verabreicht. Bei einem durchschnittlichen Körpergewicht einer Maus von ca. 30 g entspricht dies einer Dosis zwischen 0,13 g und 0,2 g Polymernanopartikel pro Kilogramm Körpergewicht¹⁷⁰. Selbst bei dieser vergleichsweise hohen Dosis an verabreichten Polymernanopartikeln sind keine Versuchstiere innerhalb des maximalen Versuchszeitraumes von 24 Stunden verstorben. Auch konnten keine klinischen Symptome wie beispielsweise Bewusstlosigkeit oder Lähmungserscheinungen, die auf eine akut toxische Wirkung der Formulierungen hinweisen würden, beobachtet werden¹⁷⁵.

Unter der Annahme eines durchschnittlichen Körpergewichtes eines erwachsenen Menschen von 70 kg entspräche dies einer Gabe zwischen 9 und 14 g Polymernanopartikel pro Einzeldosis. Zur Gabe einer üblichen therapeutischen peroralen Dosis von 200 µg Desmopressin¹⁷⁶ müssten allerdings lediglich ca. 70 mg der wirkstoffbeladenen Polymerpartikel verabreicht werden. Dies entspricht einer Partikeldosis von 1 mg pro Kilogramm Körpergewicht. Der Grund für die Verabreichung dieser stark erhöhten Dosis war die Sensibilität der analytischen Methode zur Gehaltsbestimmung von Desmopressin in Serumproben. Bei der Gabe einer üblichen therapeutischen Dosis wären keine Serumkonzentrationen oberhalb der Nachweisgrenze von 2 ng/ml zu erwarten gewesen. Die verabreichte Dosis orientierte sich an den Vorgaben der analytischen Methode und musste daher gegenüber einer üblichen therapeutischen Dosis entsprechend stark erhöht werden.

Bei Mäusen hat allerdings selbst die perorale Gabe des 200fachen der therapeutischen Dosis der nanopartikulären Formulierung keine akut toxischen Effekte gezeigt. In Ergänzung zu den Ergebnissen der *in vitro*-Zytotoxizitätstests ist dies ein weiteres Indiz für die toxikologische Unbedenklichkeit der Desmopressin-beladenen polymeren Nanopartikel.

4.7.3 *In vitro- in vivo*-Korrelation

Die Untersuchung der Partikelaufnahme in kultivierte HeLa und Caco-2 Zellen zeigte für die beiden Zelltypen jeweils sehr unterschiedliche Ergebnisse. Diese Daten müssen daher getrennt voneinander betrachtet werden. Da die Partikelauftahmetests nur bedingt reproduzierbar waren und die gezeigten Beobachtungen und daraus abgeleiteten Schlussfolgerungen zum Teil nur auf einzelnen Proben beruhen, sollten diese Daten weniger als gesicherte Erkenntnis, sondern vielmehr als Hinweise gewertet werden.

Die stärkste Aufnahme von Partikeln in HeLa Zellen wurde bei den hLF beschichteten PLGA Partikeln beobachtet, während bei den unbeschichteten PLGA Partikeln keine und bei den PEA Cystein Partikeln eine geringe Aufnahme zu erkennen war. Auf Basis der aktuellen Datenlage tragen diese Ergebnisse nicht zur Interpretation der *in vivo*-Daten bei, da kein

konsistenter Zusammenhang zwischen der Partikelaufnahme in der Zellkultur und den Bioverfügbarkeiten zu erkennen war.

Die Partikelauftakmetests mit Caco-2 Zellen ließen deutlich eine Aufnahme von PEA Cystein Partikeln in das Zellinnere erkennen. Auch für die unbeschichteten PLGA Partikel konnte gezeigt werden, dass eine wenn auch etwas geringere Aufnahme erfolgte. Eine Aufnahme hLF beschichteter Partikel in Caco-2 Zellen konnte nicht gezeigt werden. Diese Ergebnisse korrelieren sehr gut mit den ermittelten absoluten Bioverfügbarkeiten der Formulierungen. Die PEA Cystein Partikelformulierung hatte die höchste orale Bioverfügbarkeit und die PEA Cystein Partikel wurden auch am effektivsten in Caco-2 Zellen aufgenommen. Die PLGA Partikelformulierung ohne hLF hatte unter den getesteten Formulierungen die zweithöchste Bioverfügbarkeit und es konnte nur eine geringe Aufnahme in Caco-2 Zellen beobachtet werden. Die hLF beschichteten PLGA Partikel hatten die geringste orale Bioverfügbarkeit und wurden auch nicht in Caco-2 Zellen aufgenommen.

HeLa Zellen sind menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms. Caco-2 Zellen sind zwar ebenfalls menschliche Epithelzellen, sie entstammen jedoch einem Kolonkarzinom. Aus diesem Grund entspricht das Modell mit Caco-2 Zellen verglichen mit HeLa Zellen besser der Physiologie der epithelialen Darmbarriere. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass die *in vitro* Daten mit Caco-2 Zellen besser mit den *in vivo* Ergebnissen korrelieren als die Daten, die mit HeLa Zellen generiert wurden.

Im Zuge der *in vitro*-Transportstudien konnte kein Transport von Partikeln über den Caco-2 Zelllayer nachgewiesen werden. Die untere Nachweisgrenze von 1% wurde nicht überschritten. Die Sensibilität der fluorimetrischen Messung ist nicht ausreichend, um geringere Mengen an Partikeln zu detektieren. Im Zusammenhang mit einer Bioverfügbarkeitsuntersuchung ist die Information, dass weniger als 1% der Partikel die Membran passierten, allerdings auch ausreichend. Eine Verringerung der Nachweisgrenze durch Auswahl einer anderen analytischen Methode beispielsweise erschien daher nicht erstrebenswert.

Die Korrelation der Ergebnisse der *in vivo*-Untersuchungen mit den *in vitro*-Freisetzungsdaten der Partikelformulierungen erfolgte bereits im voranstehenden Kapitel 4.7.2.

Zusammenfassend betrachtet liegt der Schluss nahe, dass die Verbesserung der Bioverfügbarkeit des Modellpeptids durch die Partikelformulierungen unter anderem dadurch zustande kam, dass die mit Wirkstoff beladenen Nanopartikel in Darmepithelzellen aufgenommen wurden und erst dort den Wirkstoff Desmopressin freisetzen. Von einer Aufnahme der Partikel ins Blut ist aufgrund der Ergebnisse der *in vitro*-Transporttests nicht

auszugehen. Es wird angenommen, dass das Peptid durch den polymeren Arzneistoffträger vor einem Abbau im Darmlumen geschützt werden konnte und erst nach der Überwindung der bedeutendsten intestinalen Resorptionsbarrieren, der Magensäure, den Verdauungsenzymen, dem Mukus und der apikalen Enterozytenmembran, aus den Partikeln freigesetzt wurde. Für PEA Cystein fiel dieser Effekt größer aus als für PLGA, da die PEA Partikel offensichtlich effizienter aufgenommen wurden und da sie einen höheren Wirkstoffbeladungsgrad hatten. Zudem wurde bereits darauf hingewiesen, dass für PEA Cystein zusätzlich eine spezifische mukoadhäsive Wirkung zu erwarten ist. Sicher ist jedoch, dass die PEA Cystein Partikel gegenüber den PLGA Partikeln bereits aufgrund des deutlich höheren Beladungsgrades und des geeigneteren Freisetzungprofiles entscheidende Vorteile hinsichtlich einer Verwendung als Arzneistoffträger für die perorale Applikation von Peptidarzneistoffen besitzen.

Weshalb sich die Beschichtung der PLGA Partikel mit hLF offensichtlich negativ auf deren Aufnahme in Caco-2 Zellen und die Bioverfügbarkeit der Formulierung auswirkte, kann mit dem aktuellen Wissensstand nicht plausibel erklärt werden. Mögliche Interaktionen von hLF mit Epithelzellen oder dem Wirkstoff Desmopressin müssen in weiteren Arbeiten detailliert untersucht werden, um die Wirkungsweise des hLF Peptides näher aufzuklären.

4.7.4 Zusammenfassende Diskussion

Aus der *in vivo*-Bioverfügbarkeitsuntersuchung der Formulierungen am Mausmodell geht klar hervor, dass durch die Formulierung nanopartikulärer Arzneistoffträger die orale Bioverfügbarkeit des Modellpeptids Desmopressin verbessert werden konnte. Gegenüber Minirin[®] Lyophilisat, einer im gleichen Testsystem mitgeführten Referenzformulierung, konnte mithilfe der Partikelformulierung mit PEA Cystein eine 4,4fache Steigerung der absoluten Bioverfügbarkeit erzielt werden. Verglichen mit Literaturangaben aus Humanstudien kann die erzielte Steigerung auf ein 6faches beziffert werden¹⁰⁹. Legt man Angaben Ferrings zugrunde, dem Hersteller von Minirin[®], so wurde gegenüber der handelsüblichen monolithischen Darreichungsform (Minirin[®] Tabletten) von Desmopressin sogar eine mindestens 34fache Erhöhung der absoluten Bioverfügbarkeit erzielt¹⁰.

Auch wenn die Ergebnisse der Untersuchungen am Tier nicht unmittelbar auf den menschlichen Organismus übertragen werden können, so liefern diese Daten dennoch bereits wichtige erste Hinweise zur Beurteilung der Formulierungen hinsichtlich ihres Potentials zur Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit.

Die Ergebnisse der *in vitro*-Untersuchungen tragen teilweise zu einer Aufklärung der Mechanismen bei, liefern jedoch keine vollständige Erklärung der Phänomene und sind nicht in allen Punkten konsistent. Der unerwartet hohe Transport des nicht formulierten

Desmopressins über den Caco-2 Layer lässt sich dadurch erklären, dass während der Untersuchung der Zellzusammenhalt nicht lückenlos gegeben war. Dies wurde durch entsprechende Tests auch belegt. Zumal die Daten auch nicht mit den Ergebnissen der *in vivo*-Untersuchungen der Partikelformulierungen korrelieren, wurde eine weitergehende Interpretation dieser Ergebnisse nicht als sinnvoll erachtet.

Eine Untersuchung der Korrelation der *in vivo*-Daten mit den Ergebnissen der *in vitro*-Partikelauftakmetests führt zu der Annahme, dass die Desmopressin-beladenen PEA Cystein Partikel und die PLGA Partikel ohne hLF nicht durch das Darmepithel hindurch bis ins Blut transportiert wurden, sondern lediglich von den Enterozyten aufgenommen wurden und dort den Wirkstoff freisetzen. Basierend auf dieser Annahme kann die Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit schließlich darauf zurückgeführt werden, dass der Wirkstoff im Trägerpolymer vor einem Abbau durch intestinale Enzyme geschützt wurde und dass durch eine Freisetzung im Inneren der resorbierenden Epithelzellen der für hydrophile Arzneistoffe sonst sehr unwahrscheinliche transzelluläre Transportweg verstärkt wurde. Die Ergebnisse der *in vitro*-Freisetzunguntersuchungen der Formulierungen korrelieren an dieser Stelle sehr gut mit den *in vivo*-Plasmaspiegelverläufen. Bei Verwendung von PLGA fällt der Effekt der Bioverfügbarkeitsverbesserung deutlich geringer aus als mit PEA Cystein. Durch nicht-kovalente Funktionalisierung von PLGA mit dem zellpenetrierenden hLF Peptidfragment konnte die orale Bioverfügbarkeit *in vivo* nicht erhöht werden. Eine plausible Erklärung für dieses unerwartete Ergebnis konnte mit dem aktuellen Wissensstand nicht gefunden werden.

Somit ist das neue PEA Cystein Polymer den handelsüblichen Biopolymeren, selbst wenn diese auf nicht-kovalente Weise mit einem zellpenetrierenden hLF Peptidfragment funktionalisiert wurden, hinsichtlich einer Verwendung zur Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit von Peptidarzneistoffen klar überlegen.

5 Zusammenfassung der Arbeit und Ausblick

5.1 Zusammenfassungen

5.1.1 Deutsche Zusammenfassung

Diese Dissertation wurde mit dem Ziel angefertigt, mithilfe spezieller Formulierungen die orale Bioverfügbarkeit von Peptid- und Proteinwirkstoffen zu erhöhen. Dazu wurden nanoskalige, mit dem Modellpeptid Desmopressin beladene Arzneistoffträger zunächst aus handelsüblichen bioabbaubaren PLGA Polymeren und anschließend aus unterschiedlichen neuen Polyesteramid Polymeren (PEA) hergestellt. Unter anderem wurde ein kontinuierliches Herstellungsverfahren von PLGA Nanopartikeln entwickelt. Mithilfe der neuen Polymere

konnte die Verkapselungseffizienz für Desmopressin gegenüber PLGA von 7,5% auf 28% gesteigert werden. Zudem waren die Freisetzungsprofile der PEA Polymere für eine perorale Applikation besser geeignet als die der PLGA Polymere. Je nach verwendetem PEA-Typ wurde eine pH-Wert kontrollierte oder eine retardierte Freisetzung des Wirkstoffs ermöglicht. Die Aufnahme von Partikeln in Caco-2 Zellen wurde vor allem für PEA Cystein bestätigt. Ein Transport der Partikel durch die epitheliale Barriere hindurch konnte im *in vitro*-Resorptionsmodell nicht nachgewiesen werden. Die *in vivo*-Bioverfügbarkeitsuntersuchungen der Formulierungen ergaben eine Verbesserung der absoluten Bioverfügbarkeit von Desmopressin mit PEA Cystein ($F_{\text{abs}}= 5,5\%$) und mit PLGA ($F_{\text{abs}}= 2,6\%$). Damit wurde das Ziel der Bioverfügbarkeitsverbesserung erreicht. Die Neu- und Weiterentwicklung diverser Methoden leistete zudem einen wissenschaftlichen Beitrag im Hinblick auf die Anwendung der Nanotechnologie in der Medizin.

5.1.2 Englische Zusammenfassung

The aim of this work was to increase the oral bioavailability of peptide and protein drugs by the use of advanced formulations. For that purpose nanoscaled polymeric drug carriers were first prepared from commercially available biodegradable PLGA polymers and subsequently from different new polyester amide polymers (PEA). Inter alia, a continuous manufacturing method for PLGA nanoparticles was developed. By the use of the new polymers instead of PLGA, the encapsulation efficiency of Desmopressin was increased from 7.5% to 28%. In addition, the release profiles of the PEA particles were suitable for oral delivery unlike the PLGA particles. Depending on the PEA type, either a pH-controlled or a sustained release of Desmopressin was achieved. An uptake into Caco-2 cells was confirmed particularly for the PEA cysteine particles. There was no transport of particles through a confluent monolayer of Caco-2 cells *in vitro*. *In vivo* bioavailability studies with mice showed an improvement of the absolute oral bioavailability of Desmopressin using PEA cysteine ($F_{\text{abs}}= 5,5\%$) or PLGA particles ($F_{\text{abs}}= 2,6\%$). Thus, the main objective of this work has been accomplished. The development of new methods and improvement of known processes made a scientific contribution in the field of nano medicines.

5.2 Ausblick

Für das Modellpeptid Desmopressin wurde am Tiermodell gezeigt, dass die orale Bioverfügbarkeit durch die Formulierung nanoskaliger polymerer Arzneistoffträger verbessert werden kann. Dies gelang vor allem mithilfe der neu entwickelten Polyesteramid Polymere. Bei Verwendung handelsüblicher bioabbaubarer Polyester zur Formulierung der Partikel fiel dieser Effekt geringer aus. Im Zuge der Herstellung der Formulierungen mit den neuen

Polymere fiel auf, dass bei Verwendung einer neuen Charge des gleichen Polymers häufig eine Anpassung der Methode nötig war. Eine wichtige Voraussetzung zur Standardisierung der Herstellungsverfahren wäre die Sicherstellung einer weitgehenden Chargengleichheit. Um dies gewährleisten zu können, ist zunächst eine Optimierung der Polymersyntheseprozesse notwendig.

Bislang wurde die Bioverfügbarkeit der Formulierungen lediglich an Mäusen getestet. Nachteilig hierbei ist allerdings, dass pro Tier die Plasmakonzentration lediglich zu einem Zeitpunkt bestimmt werden kann. Eine vollständige pharmakokinetische Charakterisierung innerhalb eines Individuums war somit nicht möglich. Im Hinblick auf eine bessere Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den menschlichen Organismus müssen die Bioverfügbarkeitsuntersuchungen mit größeren Tieren durchgeführt werden.

Bislang wurde lediglich die Zytotoxizität der Formulierungen und Polymere mit kultivierten Zellen getestet (*in vitro*). Auch wenn in diesen Vortests keine toxischen Effekte zu beobachten waren, würde die Testung der neuen Polymere und Partikelformulierungen am Menschen zunächst eine umfassende toxikologische Untersuchung der Materialien voraussetzen.

Zur weiteren Aufklärung des Mechanismus der Bioverfügbarkeitsverbesserung durch die Formulierung mit PEA Cystein muss eine Untersuchung der Mukoadhäsivität und Mukuspenetration der Partikel erfolgen.

Konkrete Vorschläge, wie das semi-kontinuierliche Partikelherstellungsverfahren mittels RESS in einen vollkontinuierlichen Prozess überführt werden könnte, erfolgten bereits an entsprechender Stelle in dieser Arbeit. Ob diese Vorschläge tatsächlich zielführend sind, muss durch weitere Versuche nach einer entsprechenden Erweiterung der Versuchsanlage zunächst noch überprüft werden. Zudem sollten die Verkapselungsversuche von pharmazeutischen Wirkstoffen mit solchen Substanzen durchgeführt werden, die eine hohe Löslichkeit im überkritischen Medium besitzen.

In dieser Dissertation wurde besonderen Wert auf eine Übertragbarkeit der Konzepte auf andere Peptid- und Proteinwirkstoffe gelegt. Um dies zu bestätigen, müssen zunächst weitere Versuche mit zusätzlichen Wirkstoffen durchgeführt werden.

5.3 Schlussbemerkung

Diese Arbeit wurde im Rahmen eines staatlich geförderten Verbundprojektes mit Partnern aus dem universitären und dem industriellen Sektor angefertigt. Dadurch wurde ein sehr innovatives und interdisziplinäres Arbeitsumfeld zur Diskussion der Lösungsansätze und der

erzielten Ergebnisse geschaffen. Fachleute aus diversen relevanten Disziplinen wurden in allen Entwicklungsstufen beginnend bei der Synthese neuer Hilfsstoffe bis hin zur Charakterisierung fertiger Arzneiformulierungen im Tiermodell einbezogen. Somit konnte gewährleistet werden, dass alle wesentlichen Aspekte zu jedem Zeitpunkt Berücksichtigung fanden.

Dieses fruchtbare und interdisziplinäre Arbeitsumfeld hat in hohem Maße dazu beigetragen, dass die wesentlichen Ziele dieser Arbeit erreicht werden konnten.

Eine intensive Zusammenarbeit von Industrie und Forschungsinstituten sollte daher mehr gefördert werden als es gegenwärtig der Fall ist. Bedingung für einen Erfolg ist, dass beide Partner, die Industrie und die Forschung, trotz teilweise konträrer Interessen mehr aufeinander zu gehen. Dabei ist es auch dringend an der Zeit, dass sich die Pharmaunternehmen mehr für innovative Forschungsansätze öffnen und sich stärker bei der Verfolgung neuer vielversprechender Konzepte engagieren.

6 Literaturverzeichnis

- ¹ Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), „nano.DE-Report 2013 – Status quo der Nanotechnologie in Deutschland“, 05/2014.
- ² G.-F. Böl, A. Epp, R. Hertel (Hrsg.), „Wahrnehmung der Nanotechnologie in internetgestützten Diskussionen - Ergebnisse einer Onlinediskursanalyse zu Risiken und Chancen von Nanotechnologie und Nanoprodukten“, Bundesinstitut für Risikobewertung Berlin, ISBN 3-938163-57-7, *BfR-Wissenschaft* 04, 2010.
- ³ R. Zimmer, R. Hertel, G.-F. Böl (Hrsg.), „Wahrnehmung der Nanotechnologie in der Bevölkerung - Repräsentativerhebung und morphologisch-psychologische Grundlagenstudie“, Bundesinstitut für Risikobewertung Berlin, ISBN 3-938163-35-6, *BfR-Wissenschaft* 05, 2008.
- ⁴ C. Adessi, C. Sotto, „Converting a peptide into a drug: Strategies to improve stability and bioavailability“, *Curr Med Chem.* 9: 963–978, 2002.
- ⁵ C. Johnson-Leger, C. A. Power, G. Shomade, J. P. Shaw, E. I. Proudfoot, „Protein therapeutics – lessons learned and a view of the future.“, *Exp. Opin. Biol. Ther.* 6(1): 1-7, 2006.
- ⁶ J. Reichert, „Development trends for peptide therapeutics: a comprehensive quantitative analysis of peptide therapeutics in clinical development.“, *Peptide Therapeutics Foundation*, Macmillan Publishers, London, UK, 2010.
- ⁷ A. Kaspar, J. Reichert, „Future directions for peptide therapeutics development“, *Drug Discovery Today* 18(17-18): 807-817, 2013.
- ⁸ Rote Liste 2014, Rote Liste Service GmbH, Auflage 1, April 2014.
- ⁹ D. Crommelin, E. van Winden, A. Mekking, „Delivery of pharmaceutical proteins“, M. E. Aulton (Ed.), *Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design*, Churchill Livingstone, Edinburgh, UK, 544-553, 2002.
- ¹⁰ Fachinformation Minirin[®] 0,2 mg Tabletten, Ferring GmbH, Stand: Januar 2013
- ¹¹ J.A. Fix, „Oral controlled release technology for peptides: Status and future prospects“, *Pharm Res.* 13: 1760–64, 1996.
- ¹² Renate Lüllmann-Rauch, *Taschenlehrbuch Histologie*. Georg Thieme Verlag, 2. Aufl., ISBN 978-3-13-129242-1, S. 375, 2006.
- ¹³ H. Hinghofer-Szalkay, „Eine Reise durch die Physiologie – Ernährung und Verdauungssystem – Physiologie der Absorptionsprozesse“, Online, Available at: <http://user.medunigraz.at/helmut.hinghofer-szalkay/IV.8.htm> Accessed on 21 February 2015.
- ¹⁴ H. Shima, T. Watanabe, S. Fukuda, S. Fukuoka, O. Ohara, H. Ohno, „A novel mucosal vaccine targeting Peyer's patch M cells induces protective antigen-specific IgA responses.“, *Int Immunol.* 26(11): 619-25, 2014.
- ¹⁵ J. Fallingborg, L. A. Christensen, M. Ingeman-Nielsen, B. A. Jacobsen, K. Abildgaard, H. H. Rasmussen, „pH-profile and regional transit times of the normal gut measured by a radiotelemetry device“, *Aliment Pharmacol Ther.* 3(6): 605-613, 1989.
- ¹⁶ J. B. Dressman, et al., „Upper gastrointestinal (GI) pH in young, healthy men and women.“, *Pharm. Res.* 7(7): 756-761, 1990.
- ¹⁷ P. Macheras, C. Reppas, J. B. Dressman, „Biopharmaceutics of orally administered drugs“, ISBN 0-13-108093, Ellis Horwood, Series in Pharmaceutical Technology, London, 1995.
- ¹⁸ S. Klein, M. Wunderlich, E. Stippler, J. B. Dressman, „Development of Dissolution Tests on the Basis of Gastrointestinal Physiology“, *Pharmaceutical Dissolution Testing*, Taylor and Francis Group, LLC, Boca Raton, 2005.
- ¹⁹ P. Langguth, V. Bohner, J. Heizmann, H. P. Merkle, S. Wolfram, G. L. Amidon, S. Yamashita, „The challenge of proteolytic enzymes in intestinal peptide delivery“ *Journal of Controlled Release* 46: 39-57, 1997.

- ²⁰ G. L. Amidon (ed.), P. I. Lee, E. M. Topp „Transport Processes in Pharmaceutical Systems”, Marcel Dekker, ISBN: 0-8247-6610-5, *Drugs and the pharmaceutical sciences* 102, 2000.
- ²¹ K.M.A.J. Tytgat et al., „Muc2 is the prominent secretory mucin in ulcerative colitis.“, *Netherl. J. Med.* 47(2): 41, 1995.
- ²² A. Bernkop-Schnürch, „The use of inhibitory agents to overcome the enzymatic barrier to perorally administered therapeutic peptides and proteins”, *Journal of Controlled Release* 52: 1–16, 1998.
- ²³ G. Westphal, G. Gerber, B. Lipke, „Proteine – nutritive und funktionelle Eigenschaften“, Springer, Berlin, XXII, ISBN 978-3-540-00232-1, 2003.
- ²⁴ J. Rautio, H. Kumpulainen, T. Heimbach, R. Oliyai, D. Oh, T. Järvinen, J. Savolainen, „Prodrugs: design and clinical applications.“, *Nature Reviews Drug Discovery* 7: 255-270, 2008.
- ²⁵ D. A. Groneberg, F. Döring, P. R. Eynott, A. Fischer, H. Daniel, „Intestinal peptide transport: ex vivo uptake studies and localization of peptide carrier PEPT1“, *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 281(3), 2001.
- ²⁶ D. Burston, E. Taylor, D. M. Matthews, „Intestinal handling of two tetrapeptides by rodent small intestine in vitro“, *Biochem Biophys Acta* 553(1): 175-178, 1979.
- ²⁷ T. Lindmark, N. Schipper, L. Lazorova, A. G. de Boer, P. Artursson, „Absorption enhancement of intestinal epithelial Caco-2 monolayers by sodium caprate: assessment of molecular weight dependence and demonstration of transport routes.“, *J. Drug Target* 5(3): 215-223, 1998.
- ²⁸ H.J.R. Lemmer, J. H. Hamman, „Paracellular drug absorption enhancement through tight junction modulation“, *Expert Opin. Drug Deliv.* 10(1): 103-114, 2013.
- ²⁹ W. Chen, A. Viljoen, J. Hamman, „Intestinal drug transport enhancement by Aloe vera“, *Planta Med* 75: 587-595, 2009.
- ³⁰ Y. Fujimura, „Functional morphology of microfold cells (M cells) in Peyer's patches-phagocytosis and transport of BCG by M cells into rabbit Peyer's patches.“, *Gastroenterol Jpn.* 21(4): 325-335, 1986.
- ³¹ Z. H. Wu, Q. N. Ping, Y. Wei, J. M. Lai, „Hypoclycemic efficacy of chitosan-coated insulin liposomes after oral administration in mice“, *Acta Pharm. Sin.* 25(7): 966-972, 2004.
- ³² G. Adams, N. Wang, Y. Cui, „Future alternative therapies in a quest to halt aberrations in diabetes mellitus.“, *Biomed. Pharm.* 59(6): 296-301, 2005.
- ³³ K. Robinson, L. M. Chamberlain, K. M. Schofield, J. M. Wells, R. W. Le Page, „Oral vaccination of mice against tetanus with recombinant *Lactococcus lactis*.“, *Nat Biotechnol* 15(7): 653-657, 1997.
- ³⁴ O. Borges, A. Cordeiro-da-Silva, S. G. Romeijn et al., „Uptake studies in rat Peyer's patches, cytotoxicity and release studies of alginate coated chitosan nanoparticles for mucosal vaccination.“ *J. Control. Release* 114(3): 348-358, 2006.
- ³⁵ J. Shaji, V. Patole, „Protein and Peptide Drug Delivery: Oral Approaches“, *Indian J Pharm Sci.* 70(3): 269–277, 2008.
- ³⁶ V. H. Thomas, S. Bhattachar, L. Hitchingham, P. Zocharski, M. Naath, N. Surendran, C. L. Stoner, A. El-Kattan, „The roadmap to oral bioavailability: an industrial perspective.“, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2(4): 591-608, 2006.
- ³⁷ V.H.L. Lee, A. Yamamoto, „Penetration and enzymatic barriers to peptide and protein absorption.“ *Adv. Drug Del. Rev.* 4: 171-207, 1990.
- ³⁸ „Protein formulation and delivery“ edited by Eugene J. McNally, *Drugs and the pharmaceutical sciences* 99, 2000.

- ³⁹ H.-D. Jakubke, H. Jeschkeit, „Aminosäuren, Peptide, Proteine“, Verlag Chemie, Weinheim, 403, 1982.
- ⁴⁰ A. Bernkop-Schnürch, G. Walker, „Multifunctional matrices for oral peptide delivery.“, *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.* 18(5): 459-501, 2001.
- ⁴¹ J. D. Smart, I. W. Kellaway, „In vitro techniques for measuring mucoadhesion.“, *J. Pharm. Pharmacol.* 34: 70, 1982.
- ⁴² C. M. Lehr, J. A. Bouwstra, E. H. Schacht, H. E. Junginger, „In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers.“, *Int. J. Pharm.* 78: 43-48, 1992.
- ⁴³ P. Artursson, T. Lindmark, S. S. Davis, L. Illum, „Effect of Chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2).“, *Pharm. Res.* 11(9): 1358-1361, 1994.
- ⁴⁴ R. Rosenthal, D. Günzel, C. Finger, S. M. Krug, et al., „The effect of chitosan on transcellular and paracellular mechanisms in the intestinal epithelial barrier.“, *Biomaterials* 33: 2791-2800, 2012.
- ⁴⁵ Li-Wen Hsua, Pei-Ling Leea, Chiung-Tong Chenb, Fwu-Long Mic, Jyuhn-Huarng Juangd, Shiaw-Min Hwange, Yi-Cheng Hoc, Hsing-Wen Sunga, „Elucidating the signaling mechanism of an epithelial tight-junction opening induced by chitosan“, *Biomaterials* 33(26): 6254–6263, 2012.
- ⁴⁶ A. F. Kotzé, B. J. de Leeuw, H. L. Lueßen, A. G. de Boer, J. C. Verhoef, H. E. Junginger, „Chitosans for enhanced delivery of therapeutic peptides across intestinal epithelia: in vitro evaluation in Caco-2 cell monolayers.“, *Int. J. Pharm.* 159: 243-253, 1997.
- ⁴⁷ A.M.M. Sadeghi, F. A. Dorkoosh, M. R. Avadi, P. Saadat, M. Rafiee-Tehrani, H. E. Junginger, „Preparation, characterization and antibacterial activities of chitosan, N-trimethyl chitosan (TMC) and N-diethylmethyl chitosan (DEMC) nanoparticles loaded with insulin using both the ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation methods.“, *Int. J. Pharm.* 355: 299-306, 2008.
- ⁴⁸ M.M. Thanou, A. F. Kotzé, T. Scharringhausen, H.L. Leußen, A. G. de Boer, J. C. Verhoef, et al., „Effect of degree of quaternization of N-trimethyl chitosan chloride for enhanced transport of hydrophilic compounds across intestinal Caco-2 cell monolayers.“ *J. Control. Release* 64: 15-25, 2000.
- ⁴⁹ A.M.M. Sadeghi, F. A. Dorkoosh, M. R. Avadi, M. Weinhold, A. Bayat, F. Delie, et al., „Permeation enhancer effect of chitosan and chitosan derivatives: Comparison of formulations as soluble polymers and nanoparticulate systems on insulin absorption in Caco-2 cells“, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70: 270-278, 2008.
- ⁵⁰ M. Thanou, J. C. Verhoef, J.H.M. Verheijden, H. E. Junginger, „Intestinal absorption of octreotide using trimethyl chitosan chloride: Studies in pigs.“, *Pharm. Res.* 18: 823-828, 2001.
- ⁵¹ S. M. van der Merwe, J. C. Verhoef, A. F. Kotzé, H. E. Junginger, „N-Trimethyl chitosan chloride as absorption enhancer in oral peptide drug delivery. Development and characterization of minitablet and granulate formulations.“, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57: 85-91, 2004.
- ⁵² A. Bernkop-Schnürch, A. H. Krauland, V. M. Leitner, T. Palmberger, „Thiomers: Potential excipients for non-invasive peptide delivery systems“, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58: 253-263, 2004.
- ⁵³ V. M. Leitner, G. F. Walker, A. Bernkop-Schnürch, „Thiolated polymers: Evidence for the formation of disulphide bonds with mucus glycoproteins.“ *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 56: 207-214, 2003.
- ⁵⁴ V. K. Mourya, N. N. Inamdar, „Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore“, *React. Funct. Polym.* 68: 1013-1051, 2008.

- ⁵⁵ Y. Ikada, H. Tsuji, „Biodegradable polyesters for medical and ecological applications“, *Macromol. Rapid Commun.* 21: 117-132, 2000.
- ⁵⁶ D. Bendix, „Chemical synthesis of polylactide and its copolymers for medical applications“, *Polymer Degradation and Stability* 59: 129-135, 1998.
- ⁵⁷ X. Song, X. Zhao, Y. Zhou, S. Li, Q. Ma, „Pharmacokinetics and disposition of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles“, *Curr. Drug Metab.* 11: 859-869, 2010.
- ⁵⁸ J. M. Brady, D. E. Cutright, R. A. Miller, and G. C. Battestone, *J. Biomed. Mater. Res.* 7: 155, 1973.
- ⁵⁹ M. Dorta, O. Munguía, M. Llabres, „Effects of polymerization variables on PLGA properties: molecular weight, composition and chain structure“, *Int. J. Pharm.* 100: 9-14, 1993.
- ⁶⁰ L. Brandon-Peppas, M. Vert, In: Handbook of pharmaceutical controlled release technology, Marcel Dekker, New York, 2000.
- ⁶¹ E. S. Lee, K.-H. Park, D. Kang, I. S. Park, H. Y. Min, D. H. Lee, „Protein complexed with chondroitin sulfate in poly(lactide-co-glycolide) microspheres“, *Biomaterials* 28: 2754-2762, 2007.
- ⁶² A. Breitenbach, T. Kissel, „Biodegradable comb polyesters: Part I. Synthesis, characterization and structural analysis of poly (lactide) and poly (lactide-co-glycolide) grafted onto water-soluble poly (vinyl alcohol) as backbone“, *Polymer* 39: 3261-3271, 1998.
- ⁶³ M. Simon, M. Wittmar, U. Bakowsky, T. Kissel, „Self-assembling nanocomplexes from insulin and water-soluble branched polyesters, poly[(vinyl-3-(diethylamino)-propylcarbamate-co-(vinyl acetate)-co-(vinyl alcohol)]-graft-poly(l-lactic acid): A novel carrier for transmucosal delivery of peptides“, *Bioconjugate Chem.* 15: 841-849, 2004.
- ⁶⁴ Y. E. Rahman, „Studies on liposomes (lipid spherules) prepared from mitochondrial and microsomal phospholipids. Their surface charge and their interactions with various proteins.“, *Anl. Rep.*, 225-226, 1969.
- ⁶⁵ J. A. Fix, „Oral controlled release technology for peptides: status and future prospects.“, *Pharm. Res.* 13: 1760-1764, 1996.
- ⁶⁶ H. E. Junginger, J. C. Verhoef, „Perorale Applikation von Peptiden und Proteinen.“ *Dtsch. Apotheker Ztg.*, 132. Jhg., 24, 1279-1290, 1992.
- ⁶⁷ V.H.L. Lee, S.D. Kashi, G.M. Grass, W. Rubas, „Oral route of peptide and protein drug delivery.“, *Peptide and protein drug delivery*, V.H.L. Lee (Ed.), Marcel Dekker Inc., New York, 691-738, 1991.
- ⁶⁸ J. S. Morley, C. F. Hayward, R. J. Carter, S. Shuster, *Neuropeptides* 2:109, 1981.
- ⁶⁹ F. F. Davis, „The origin of peganology“, *Advanced Drug Delivery Reviews* 54(4): 457-458, 2002.
- ⁷⁰ P. W. Swaan, „Recent advances in intestinal macromolecular drug delivery via receptor mediated transport pathways.“, *Pharm. Res.* 15(6): 826-834, 1998.
- ⁷¹ D. M. Oh, H. K. Han, G. L. Amidon, „Drug transport and targeting. Intestinal transport.“, *Pharm. Biotechnol.* 12: 59-88, 1999.
- ⁷² D. Shah, W.-C. Shen, „Transcellular delivery of an insulin-transferrin conjugate in enterocyte-like Caco-2 cells“, *J. Pharm. Sci.* 85: 1306-1311, 1994.
- ⁷³ A. H. Kahns, A. Buur, H. Bundgaard, „Prodrugs of peptides. Synthesis and evaluation of various esters of desmopressin (dDAVP).“, *Pharm. Res.* 10(1): 68-74, 1993.
- ⁷⁴ H. Asada, T. Douen, Y. Mizokoshi et al., „Stability of acyl derivatives of insulin in the small intestine: relative importance of insulin association characteristics in aqueous solution.“, *Pharm. Res.* 11(8): 1115-1120, 1994.
- ⁷⁵ E. Vive`s, P. Brodin, B. Lebleu, *J. Biol. Chem.* 272: 16010-16017, 1997.

- ⁷⁶ D. Derossi, A. H. Joliot, G. Chassaing, A. Prochiantz, *J. Biol. Chem.* 269: 10444–10450, 1994.
- ⁷⁷ G. J. Ding, P. A. Fischer, R. C. Boltz, J. A. Schmidt, J. J. Colaianne, A. Gough, R. A. Rubin, D. K. Miller, *J. Biol. Chem.* 273: 28897–28905, 1998.
- ⁷⁸ F. Duchardt, I. R. Ruttekolk, W.P.R. Verdurmen, H. Lortat-Jacob, J. Bürck, H. Hufnagel, R. Fischer, M. van den Heuvel, D.W. Löwik, G. W. Vuister, A. Ulrich, M. de Waard, R. Brock, „A Cell-penetrating Peptide Derived from Human Lactoferrin with Conformation-dependent Uptake Efficiency“, *J. Biol. Chem.* 284(52): 36099–36108, 2009.
- ⁷⁹ P. M. Fischer, E. Krausz, D. P. Lane, „Cellular delivery of impermeable effector molecules in the form of conjugates with peptides capable of mediating membrane translocation.“, *Bioconjug Chem.* 12(6): 825-841, 2001.
- ⁸⁰ L. Parhamifar, A. K. Larsen, A. C. Hunter, T. L. Andresen, S. Moein Moghimi, „Polycation cytotoxicity: a delicate matter for nucleic acid therapy-focus on polyethylenimine“, *Soft Matter* 6: 4001-4009, 2010.
- ⁸¹ N. A. Peppas, J. J. Sahlin, „Hydrogels as Muco- and Bioadhesive Materials: A Review“, *Biomaterials* 17: 1553-1561, 1996.
- ⁸² N. A. Peppas, „Surface, interfacial and molecular aspects of polymer bioadhesion on soft tissues“, *J. Control. Release* 2: 257-275, 1985.
- ⁸³ E. Jabbari, N. Wisniewski, N. A. Peppas, „Evidence of mucoadhesion by chain interpenetration at a poly(acrylic acid)/mucin interface using ATR-FTIR spectroscopy“, *J. Control. Release* 26: 99-108, 1993.
- ⁸⁴ A. J. Kinloch, „Adhesion and Adhesives“, *Science and Technology*, London: Chapman and Hall, 1987.
- ⁸⁵ M. A. Longer, J. R. Robinson, „Fundamental aspects of bioadhesion“, *Pharm. Int.* 5: 114-117, 1986.
- ⁸⁶ C.-M. Lehr, „Bioadhäsion und bioadhäsive Arzneiformen“, Hrsg.: R. H. Müller, *Moderne Arzneiformen*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1998.
- ⁸⁷ A. Lamprecht, U. Schäfer, C.-M. Lehr, „Size-Dependent Bioadhesion of Micro- and Nanoparticulate Carriers to the Inflamed Colonic Mucosa“, *Pharmaceutical Research* 18(6): 788-793, 2001.
- ⁸⁸ G. Ponchel, M.-J. Montisci, A. Dembri, C. Durrer, D. Duchêne, „Mucoadhesion of colloidal particulate systems in the gastro-intestinal-tract“, *Eur. J. Pharm. Biopharm* 44: 25-31, 1997.
- ⁸⁹ A. H. Krauland, A. Bernkop-Schnürch, „Thiomers: development and in vitro evaluation of a peroral microparticulate peptide delivery system“, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57: 181-187, 2004.
- ⁹⁰ M. Simon, I. Behrens, L. A. Dailey, M. Wittmar, T. Kissel, „Nanosized insulin-complexes based on biodegradable amine-modified graft polyesters poly[vinyl-3-(diethylamino)-propylcarbamate-co-(vinyl acetate)-co-(vinyl alcohol)]-graft-poly(L-lactic acid): protection against enzymatic degradation, interaction with Caco-2 cell monolayers, peptide transport and cytotoxicity.“, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 66: 165-172, 2007.
- ⁹¹ T. Uchiyama, T. Sugiyama, Y. S. Quan, A. Kotani, N. Okada, T. Fujita, et al., „Enhanced permeability of insulin across the rat intestinal membrane by various absorption enhancers: Their intestinal mucosal toxicity and absorption enhancing mechanism of n-lauryl-b-D-maltopyranoside“, *J. Pharm. Pharmakol.* 51: 1241-1250, 1999.
- ⁹² M. Tomita, M. Hayashi, S. Awazu, „Absorption-enhancing mechanism of EDTA, caprate, and decanoylcarnitin in Caco-2 cells“, *J. Pharm. Sci.* 85: 608-611, 1996.
- ⁹³ S. Takatsuka, T. Kitazawa, T. Morita, Y. Horikiri, H. Yoshino, „Enhancement of intestinal absorption of poorly absorbed hydrophilic compounds by simultaneous use of mucolytic agent and non-ionic surfactant“, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 62(1): 52-58, 2006.

- ⁹⁴ O. Schäfer, „Beeinflussung der peroralen Bioverfügbarkeit des Dekapeptids Cetrorelix, eines LHRH-Antagonisten, durch galenische Formulierungen“, Inauguraldissertation, Universität zu Freiburg i. Br., 25, 1999.
- ⁹⁵ E. S. Swenson, W. J. Curatolo, „Intestinal permeability enhancement for proteins, peptides and other polar drugs: Mechanism and potential toxicity.“, *Adv. Drug. Del. Rev.* 8: 39-92, 1992.
- ⁹⁶ A. Bernkop-Schnürch, „Strategien zur peroralen Applikation von Peptid- und Proteinwirkstoffen“, *Sci. Pharm.* 65: 61-82, 1997.
- ⁹⁷ M. R. Rekha, C. P. Sharma, „Nanoparticle Mediated Oral Delivery of Peptides and Proteins: Challenges and Perspectives“, In: Peptide and Protein Delivery, C. van der Walle, London, UK, 2011.
- ⁹⁸ C. Damgé, C. Michel, M. Aprahamian, P. Couvreur, „New approach for oral administration of insulin with polyalkylcyanoacrylate nanocapsules as drug carrier.“, *Diabetes* 37: 246, 1988.
- ⁹⁹ R. C. Mundargi, V. R. Babu, V. Rangaswamy, P. Patel, T. M. Aminabhavi, „Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives“, *Journal of Controlled Release* 125: 193-209, 2008.
- ¹⁰⁰ E. P. Herrero, M. J. Alonso, N. Csaba, „Polymer-based oral peptide nanomedicines“, *Therapeutic Delivery* 3(5): 657-668, 2012.
- ¹⁰¹ J. M. Anderson, M. S. Shive, „Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres.“, *Adv Drug Deliv Rev.* 28: 5-24, 1997.
- ¹⁰² J. C. Middleton, A. J. Tipton, „Synthetic Biodegradable Polymers as Medical Devices“, *Medical Plastics and Biomaterials* 30, 1998.
- ¹⁰³ N. Franz, H.-A. Klok, „Synthesis of Functional Polydepsipeptides via Direct Ring-Opening Polymerisation and Post-Polymerisation Modification“, *Macromolecular Chemistry and Physics* 211: 809-820, 2010.
- ¹⁰⁴ X. Deng, J. Yao, M. Yuan, X. Li, C. Xiong, „Polymerization of lactides and lactones“, part 12, *Macromolecular Chemistry and Physics* 201: 2371-2376, 2000.
- ¹⁰⁵ Jahresberichte zum PeTrA Projekt von 2012 und 2013, „private communication“, Evonik Industries AG - Pharma Polymers & Services, Darmstadt.
- ¹⁰⁶ P. He, Z. Tang, L. Lin, M. Deng, X. Pang, X. Zhuang, X. Chen, „Novel Biodegradable and pH-Sensitive Poly(ester amide) Microspheres for Oral Insulin Delivery“, *Macromol. Biosci.* 12: 547-556, 2012.
- ¹⁰⁷ B. Amon, „Der Zeit voraus; Dr. Frederik Paulsen (1909-1997), der Mann, der Ferring gründete“, Hrsg.: Ferring GmbH, Kiel, 1999.
- ¹⁰⁸ A. Fjellestad-Paulsen, C. Söderberg-Ahlm, S. Lundin, „Metabolism of vasopressin, oxytocin, and their analogues in the human gastrointestinal tract.“, *Peptides* 16: 1141-1147, 1995.
- ¹⁰⁹ H. Vilhardt, S. Lundin, „Biological effect and plasma concentrations of DDAVP after intranasal and peroral administration to humans“, *Gen. Pharmac.* 17 (4): 481-483, 1986.
- ¹¹⁰ M. C. Manning, K. Patel, R. T. Borchardt, „Stability of protein pharmaceuticals“, *Pharm. Res.* 6(11): 903-918, 1989.
- ¹¹¹ M. P. Desai, V. Labhasetwar, G. L. Amidon, R. J. Levy, „Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size“, *Pharm. Res.* 13: 1838-1845, 1996.
- ¹¹² Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, „Scientific Basis for the Definition of the Term nanomaterial“, The European Union, doi:10.2777/39703, 2010.
- ¹¹³ Vivaldo-Lima, E., Wood, P., and Hamielec, A., „An Updated Review on Suspension Polymerization“. *Ind. Eng. Chem. Res.* 36: 939-965, 1997.
- ¹¹⁴ Arshady, R. „Suspension, Emulsion, and Dispersion Polymerization: A Methodological Survey“. *Colloid. Polym. Sci.* 270: 717-732 1992.

- ¹¹⁵ M. Baerns, A. Behr, A. Brehm, J. Gmehling, H. Hofmann, U. Onken und A. Renken, *Technische Chemie*, Wiley-VCH, 2006.
- ¹¹⁶ H. Fessi, J.P. Devissaguet, F. Puisieux, C. Thies, U.S. patent 5 (118) 528, 1992.
- ¹¹⁷ J. W. Vanderhoff, M. S. El-Aasser, J. Ugelstad, "Polymer emulsification process", U.S. Pat. 4 (177) 177, 1979.
- ¹¹⁸ T. Niwa, H. Takeuchi, T. Hino, N. Kunou, Y. Kawashima, "Preparations of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with d,l-lactide glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and the drug release behavior", *J. Control. Release* 25 (1-2): 89-98, 1993.
- ¹¹⁹ D. Quintanar-Guerrero, E. Allemann, H. Fessi, E. Doelker, "Pseudolatex preparation using a novel emulsion-diffusion process involving direct displacement of partially water-miscible solvents by distillation", *Int. J. Pharm.* 188 (2): 155-164, 1999.
- ¹²⁰ V. J. Mohanraj, Y. Chen, "Nanoparticles - A Review", *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 5 (1): 561-573, 2006.
- ¹²¹ A. Lamprecht, N. Ubrich, M. Hombreiro Pérez, C.-M. Lehr, M. Hoffman, P. Maincent, „Biodegradable monodispersed nanoparticles prepared by pressure homogenization-emulsification“, *Int. J. of Pharmaceutics*, 184(1): 97-105, 1999.
- ¹²² J. Y. Jang, B. S. Kwon, H. E. Lee, D. H. Kim, H. K. Kang, J. S. Kang, S. Lee, and G. J. Choi, „Preparation of Biodegradable PLGA Nanospheres Employing a Fast Solvent Evaporation Method“, *J. Ind. Eng. Chem.* 13(6): 1043-1046, 2007.
- ¹²³ H. K. Makadia, S. J. Siegel, „Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier“, *Polymers (Basel)* 1, 3(3): 1377-1397, 2011.
- ¹²⁴ Susanne C. Wratschko, „Feste Dispersion eines Peptides (Desmopressin) mit einem multifunktionalen Polymer (Polycarbophil): Untersuchungen zur Herstellung und Stabilität“, Dissertation, Universität Hamburg, 1999.
- ¹²⁵ S. Schüle, T. Schulz-Fademrecht, P. Garidel, K. Bechtold-Peters, W. Frieß, „Stabilization of IgG1 in spray-dried powders for inhalation“, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69: 793-807, 2008.
- ¹²⁶ M. Stieß, *Mechanische Verfahrenstechnik - Partikeltechnologie 1*, Berlin Heidelberg: Springer Verlag, 2009.
- ¹²⁷ U. Käzel, M. Stinz und S. Ripperger, „Applikationsuntersuchungen zur Photonenkorrelationsspektroskopie im Rückstrahlbereich“, *Chemie Ingenieur Technik* 66-69, 2004.
- ¹²⁸ G. Ellman, „A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans.“ *Arch. Biochem. Biophys.* 74(2), 443-450, 1958.
- ¹²⁹ T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays.", *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63, 1983.
- ¹³⁰ C. Washington, S.S. Davis, „The production of parenteral feeding emulsions by Microfluidizer“, *Int. J. of Pharm.* 44(1-3): 169-176, 1988.
- ¹³¹ J. Vandervoort, K. Yoncheva, A. Ludwig, „Influence of the Homogenization Procedure on the Physicochemical Properties of PLGA Nanoparticles“, *Chem. Pharm. Bull.* 52 (11): 1273-1279, 2004.
- ¹³² G. F. Dawson, G. W. Halbert, „The In Vitro Cell Association of Invasin Coated Polylyctide-Co-Glycolide Nanoparticles“, *Pharmaceutical Research* 7(11): 1420-1425, 2000.
- ¹³³ E. Cohen-Sela, M. Chorny, N. Koroukhov, H. D. Danenberg, G. Golomb, „A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles“, *J. of Controlled Release* 133: 90-95, 2009.
- ¹³⁴ M.F. Zambaux, F. Bonneaux, R. Gref, P. Maincent, E. Dellacherie, M.J. Alonso, P. Labrude, C. Vigneron, „Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method“, *J. of Controlled Release* 50: 31-40, 1998.

- ¹³⁵ A. Albert, E. P. Serjeant, „The Determination of Ionization Constants“, Chapman and Hall, London, 1984.
- ¹³⁶ M. Yasuda, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 32: 429 – 432, 1959.
- ¹³⁷ T. Shedlovsky, in: B. Pesce (Ed.), *Electrolytes*, Pergamon, New York, 1962.
- ¹³⁸ A. Avdeef, K. J. Box, J.E.A. Comer, M. Gilges, M. Hadley, C. Hibbert, W. Patterson, K. Y. Tam, „PH-metric logP 11. pK_a determination of water-insoluble drugs in organic solvent – water mixtures“, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 20: 631-641, 1999.
- ¹³⁹ M. M. Crowley, F. Zhang, M. A. Repka, S. Thumma, S. B. Upadhye, S. Kumar Battu, J. W. McGinity, C. Martin, „Pharmaceutical Applications of Hot-Melt Extrusion: Part I“, *Drug Development and Industrial Pharmacy* 33: 909-926, 2007.
- ¹⁴⁰ T. Govender, S. Stolnik, M. C. Garnett, L. Illum, S. S. Davis, „PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug“, *Journal of Controlled Release* 57(2): 171-185, 1999.
- ¹⁴¹ J. Goole, F. Vanderbist, K. Amighi, „Development and evaluation of new multiple-unit levodopa sustained-release floating dosage forms“, *Int. J. Pharm.* 334(1-2): 35-41, 2007.
- ¹⁴² S. C. Sutton, „Companion animal physiology and dosage form performance.“, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 1383-1398, 2004.
- ¹⁴³ Q. Zhu, J. Talton, G. Zhang, T. Cunningham, Z. Wang, R. C. Waters, J. Kirk, B. Eppler, D. M. Klinman, Y. Sui, S. Gagnon, I. M. Belyakov, R. J. Mumper, J. A. Berzofsky, „Large intestine-targeted, nanoparticle-releasing oral vaccine to control genitorectal viral infection“, *Nature Medicine* 18: 1291-1296, 2012.
- ¹⁴⁴ S. Schiller, A. Hanefeld, M. Schneider, C.-M. Lehr, „Spray encapsulation of PLGA nanoparticles for oral vaccination“, Abstract book, CRS Germany Local Chapter, Annual meeting 2013.
- ¹⁴⁵ K. Mishima, K. Matsuyama, D. Tanabe, S. Yamauchi, T. J. Young und K. P. Johnson, „Microencapsulation of proteins by rapid expansion of supercritical solution with a nonsolvent“, *AIChE Journal* 46: 857-865, 2000.
- ¹⁴⁶ J. B. Hannay, J. Hogarth, „On the solubility of solids in gases“, *Proc. Roy. Soc. (London)*, 29: 324, 1879.
- ¹⁴⁷ R. D. Smith, R. Wash, US Patent 4,582,731, April 15, 1986 (Priority 01/09/1983).
- ¹⁴⁸ D. W. Matson, R. C. Petersen, R. D. Smith, „Production of Powders and Films from Supercritical Solutions.“ *Journal of Material Science* 22: 1919–1928, 1987.
- ¹⁴⁹ R. D. Smith, US Patent 4 734 451, 1988.
- ¹⁵⁰ J. Jung und M. Perrut, „Particle design using supercritical fluids: Literature and patent survey“, *The Journal of Supercritical Fluids* 20: 179-219, 2001.
- ¹⁵¹ J. Fages, H. Lochard, J.-J. Letourneau, M. Sauceau und E. Rodier, „Particle formation for pharmaceutical applications using supercritical fluid technology“, *Powder Technology* 141: 219-226, 2004.
- ¹⁵² S.-D. Yeo und E. Kiran, „Formation of polymer particles with supercritical fluids: A review“, *The Journal of Supercritical Fluids* 34: 287-308, 2005.
- ¹⁵³ M. Kenji, „Biodegradable particle formation for drug and gene delivery using supercritical fluid and dense gas“, *Advanced Drug Delivery Reviews* 60: 411-432, 2008.
- ¹⁵⁴ M. Türk, „Manufacture of submicron drug particles with enhanced dissolution behavior by rapid expansion process“, *The Journal of Supercritical Fluids* 47: 537-545, 2009.
- ¹⁵⁵ E. Reverchon, R. Adami, S. Cardea und G. D. Porta, „Supercritical fluids processing of polymers for pharmaceutical and medical applications“, *The Journal of Supercritical Fluids* 47: 484-492, 2009.
- ¹⁵⁶ W. L. Priamo, I. Dalmolin, D. L. Boschoetto, N. Mezzomo, S. R. Salvador Ferreira und J. V. Oliveira, „Mocronization processes by supercritical fluid technologies: a short review on process design (2008-2012)“, *Acta Scientiarum Technology* 695-709, 2013.

- ¹⁵⁷ B. Kongsombut, W. Chen, A. Tsutsumi, W. Tanthapanichakoon und T. Charinpanitkul, „Formation of deagglomerated PLGA particles and PLGA-coated ultra fine powders by rapid expansion of supercritical solution“, *Korean J. Chem. Eng.* 25: 838-845, 2008.
- ¹⁵⁸ David R. Lide (Hrsg.): CRC Handbook Of Chemistry And Physics. 85. Auflage, CRC Press LLC, 6–53, 2004
- ¹⁵⁹ C. Secuianu, V. Feroiu und G. Dan, „Phase behaviour for carbon dioxide + ethanol system: Experimental measurements and modeling with cubic equation of state“, *The Journal of supercritical Fluids* 47: 109-116, 2008.
- ¹⁶⁰ S. E. Conway et al., *J. of Appl. Polym. Sc.* 80: 1155–1161, 2001.
- ¹⁶¹ A. Göpferich, „Mechanisms of polymer degradation and erosion“, *Biomaterials* 17: 103, 1996.
- ¹⁶² S. Li, „Hydrolytic degradation characteristics of aliphatic polyesters derives from lactic and glycolic acids“, *J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.)* 48: 342, 1999.
- ¹⁶³ J. W. Tom, P. G. Debenedetti, „Formation of Bioerodible Polymeric Microspheres and Microparticles by Rapid Expansion of Supercritical Solutions“, *Biotechnol. Prog.* 7: 403-411, 1991.
- ¹⁶⁴ J. Hao, M. J. Whitaker, B. Wong, G. Serhatkulu, K. M. Shakesheff, S. M. Howdle, „Plasticization and Spraying of Poly (DL-lactic acid) using Supercritical Carbon Dioxide: Control of Particle Size“, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 93(4): 1083-1090, 2004.
- ¹⁶⁵ Zwischenbericht zum Teilvorhaben „Intestinale Gewebemodelle“ im Verbundprojekt PeTrA, „private communication“, Fraunhofer-Gesellschaft e.V. IGB Stuttgart, Jahresbericht 2012.
- ¹⁶⁶ A. H. Kahns, A. Buur, H. Bundgaard, „Prodrugs of Peptides. 18. Synthesis and Evaluation of Various Esters of Desmopressin (dDAVP)“, *Pharmaceutical Research* 10(1): 68-74, 1993.
- ¹⁶⁷ V. Gupta, N. Doshi, S. Mitragotri, „Permeation of Insulin, Calcitonin and Exenatide across Caco-2 Monolayers: Measurement Using a Rapid, 3-Day System“, *PLOS ONE*, DOI: 10.1371/journal.pone.0057136, 2013.
- ¹⁶⁸ M. Hammer, H. Vilhardt, „Peroral treatment of diabetes insipidus with a polypeptide hormone analog, desmopressin“, *JPET* 234(3): 754-760, 1985.
- ¹⁶⁹ H. Agersø, L. S. Larsen, A. Riis, U. Lövgren, M. O. Karlsson, T. Senderovitz, „Pharmacokinetics and renal excretion of desmopressin after intravenous administration to healthy subjects and renally impaired patients“, *Br J Clin Pharmacol.* 58(4): 352-358, 2004.
- ¹⁷⁰ S. Wolfensohn, M. Lloyd, "Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare", Third Edition, Blackwell Publishing, 2003.
- ¹⁷¹ C. Greiner, „Verteilungsvolumen – Wie sich Substanzen im Körper verteilen“, *NeuroTransmitter* 3: 36-37, 2011.
- ¹⁷² K. Vinter Juul, L. Erichsen, G. L. Robertson, „Temporal delays and individual variation in antidiuretic response to desmopressin“, *Am J Physiol Renal Physiol.* 304: F268–F278, 2013.
- ¹⁷³ S. Lundin, P. Melin, H. Vilhardt, „Plasma concentrations of 1-deamino-8-d-arginine vasopressin after intragastric administration in the rat“, *Acta Endocrinol.* 108: 179-183, 1985.
- ¹⁷⁴ C.-J. Estler, H. Schmidt, „Pharmakologie und Toxikologie: für Studium und Praxis“, Hrsg.: H. Schmidt, Schattauer Verlag, 2007.
- ¹⁷⁵ J. Wanga, G. Zhoua, C. Chena, H. Yua, T. Wangc, Y. Mad, G. Jiae, Y. Gaoa, B. Lia, J. Suna, Y. Lia, F. Jiaoa, Y. Zhaoa, Z. Chaia, „Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration“, *Toxicology Letters* 168(2): 176-185, 2007.
- ¹⁷⁶ Rote Liste 2010, Rote Liste Service GmbH, Auflage 1, April 2010.