

**INHALATIVE KOMBINATIONSPRÄPARATE
DURCH CO-PRÄZIPITATION**



**DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT
ZU KIEL**

**VORGELEGT VON
REGINA WESTMEIER**

KIEL 2008

Referent: Professor Dr. Hartwig Steckel

Korreferent: Professor Dr. Wolfgang Blaschek

Tag der Disputation: 10. Juli 2008

zum Druck genehmigt: Kiel, den 10. Juli 2008

Prof. Dr. L. Kipp
(Dekan)

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht in:

Westmeier, R. und Steckel, H., Combination particles of Salmeterol xinafoate and Fluticasone propionate: formulation and aerodynamic assessment, J Pharm Sci 97 (2008) 2299-2310

Westmeier, R., Dubois, J., Lewis, N. und Steckel, H., Qualitative analysis of combination particles for pulmonal delivery, 6th World Meeting of Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology (APV), Barcelona (2008)

Westmeier, R. und Steckel, H., Aerodynamic assessment of salmeterol xinafoate and fluticasone propionate co-precipitates, DDL 18, Edinburgh (2007)

Westmeier, R. und Steckel, H., Enhanced dissolution of a new dry powder inhaler formulation, DPhG Joint Meeting, Erlangen (2007)

Westmeier, R. und Steckel, H., Dual particles containing Salmeterol xinafoate and Fluticasone propionate, DDL 17, Edinburgh (2006)

für meine Ma

Per aspera ad astra

Das Fehlen einer besonderen Kennzeichnung oder eines entsprechenden Hinweises auf ein Warenzeichen, ein Gebrauchsmuster oder einen Patentschutz lässt nicht den Schluss zu, dass über die in dieser Arbeit angegebenen Dinge frei verfügt werden kann.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung	1
1.1	Einleitung	1
1.2	Zielsetzung der Arbeit	3
2	Asthma und seine Therapie	4
2.1	Pathophysiologie des Asthmas	4
2.2	Wirkstoffe in der Asthmatherapie	15
2.3	Pulmonale Darreichungsformen.....	27
2.3.1	Pulver zur Inhalation	31
2.4	Bedeutung der Kombinationstherapie.....	33
3	Analytische Methoden.....	36
3.1	Partikelgrößenbestimmung	36
3.1.1	Laserdiffraktion	38
3.1.2	Aerodynamische Untersuchungen.....	39
3.1.2.1	NGI	41
3.1.2.2	Aufgabesysteme.....	44
3.1.2.3	Auswertung.....	50
3.2	Röntgendiffraktometrie.....	54
3.3	Thermoanalytische Verfahren.....	56
3.3.1	Differentielle Thermoanalytik (DSC)	57
3.4	Dynamische Wasserdampfsorption (DVS).....	59
3.5	Bildgebende Verfahren	60
3.5.1	Rasterelektronenmikroskopie	60
3.5.2	Fluoreszenzmikroskopie	61
3.5.3	Raman-Mikroskopie	62
3.6	Quantitative Wirkstoffbestimmung	64
3.7	Statistische Methoden.....	65
4	Verwendete Wirkstoffe	67
4.1	Vergleichspräparat im Handel.....	67

4.2	Charakterisierung der verwendeten Wirkstoffe	70
4.2.1	Salmeterolxinafoat	71
4.2.2	Fluticasonpropionat.....	80
5	Herstellung und Charakterisierung von Pulvern zur Inhalation	86
5.1	Einleitung	86
5.1.1	Kristallinität und Partikelhabitus	86
5.1.2	Hilfsstoffe in pulmonalen Darreichungsformen	91
5.2	Aufbauende Verfahren	92
5.2.1	Sprühtrocknen aus Lösung	93
5.2.1.1	Sprühtrockner	94
5.2.1.2	Sprühtrocknungsparameter	95
5.2.1.3	Formulierungsvariablen	97
5.2.2	Präzipitation	110
5.2.3	Pharmazeutische Rationale für co-kristallisierte Partikel ...	113
5.2.3.1	Mikromischer	119
5.2.3.2	Festlegung der Präzipitationsparameter.....	122
5.2.3.3	Präzipitation mit verschiedenen Additiven	132
5.2.3.4	Habitus der Präzipitate	144
5.2.3.5	Physikochemische Charakterisierung der Präzipitate .	152
5.2.3.6	Wirkstoffgehalt der Präzipitate.....	155
5.2.3.7	Optimierung der aerodynamischen Eigenschaften.....	161
5.2.3.8	Freisetzungsuntersuchungen an den Präzipitaten	175
5.2.3.9	Stabilitätsuntersuchungen	183
5.2.4	Zusammenfassung	193
5.3	Pulvermischungen	193
5.3.1	Pulvermischung mit Laktose	194
5.3.2	Pulvermischung mit feindispersen Hilfsstoffen	197
5.3.3	Zusammenfassung	201

6	Charakterisierung der Einzelpartikelzusammensetzung	202
6.1	Einleitung	202
6.2	Fluoreszenzmikroskopie	203
6.3	Raman-Mikroskopie	205
7	Zusammenfassung der Arbeit	211
8	abstract (english version)	213
9	Anhang	215
9.1	Abkürzungen	215
9.2	verwendete Substanzen	218
10	Literaturverzeichnis	221

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Einleitung

Asthma bronchiale ist eine chronische Entzündung der Atemwege. Die Schleimhaut der Bronchien reagiert dabei überempfindlich auf Reize, wie Kälte, Anstrengung oder Allergene. Tritt ein solcher Reiz auf, verengen sich spontan die Atemwege und das Lungenepithel produziert zähen Schleim. Die Folgen sind immer wiederkehrende Anfälle von Atemnot, Husten und Kurzatmigkeit. Dazwischen können auch längere beschwerdefreie Intervalle liegen. Bei schweren Verläufen treten Beschwerden gehäuft oder anhaltend auf und es kann zu einer deutlichen Einschränkung der physischen Belastbarkeit kommen. Die Therapie umfasst zwei verschiedene Strategien: die Vorbeugung eines Asthmaanfalls und die Behandlung des akuten Anfalls. Die Behandlung ist abhängig vom Schweregrad der Erkrankung, man unterscheidet dabei vier Stufen. Oberstes Ziel ist es, das Fortschreiten der Erkrankung zu minimieren und die Lungenfunktion auf normalem Niveau zu halten, indem man versucht, die bronchiale Hypersensibilität zu reduzieren und die Häufigkeit der Asthmaanfälle möglichst gering zu halten. Bei einem akuten Asthmaanfall wird ein β_2 -Sympathomimetikum als bronchien-erweiterndes Medikament verabreicht. Zusätzlich umfasst der Therapieplan je nach Schwere des Asthmas und Beeinträchtigung des Patienten die zusätzliche Gabe von Glucocorticoiden zur Unterdrückung der zugrunde liegenden Entzündung sowie die vorbeugende Gabe langwirksamer β_2 -Sympathomimetika. Die bevorzugte Art der Applikation ist inhalativ aus einem Dosieraerosol (pressurised metered dose inhaler, pMDI) oder einem Pulverinhalator (dry powder inhaler, DPI). Dadurch kann lokal eine hohe Wirkstoffkonzentration erreicht und die Rate der Nebenwirkungen minimiert werden. Während aus einem Dosieraerosol

feine Tröpfchen einer Lösung oder Suspension des Wirkstoffes in Treibmittel abgegeben werden, enthalten Pulverinhalatoren ein trockenes Pulver, dessen Einzelpartikel beim Inhalieren fein verstäubt werden. Dabei ist der feinpartikuläre Wirkstoff häufig auf einen groben Trägerstoff aufgebracht und löst sich bei der Inhalation von diesem. Bei allen Formulierungen ist die Größe der entstehenden Tröpfchen oder Partikel entscheidend, denn nur Teilchen mit einer Größe kleiner 5 µm gelangen sicher in die Lunge. In der Therapie der schwereren Formen des Asthmas (Stufe 3 und 4) kommen Kombinationspräparate zur Anwendung, die ein langwirksames β_2 -Sympathomimetikum und ein Glucocorticoid enthalten. Die beiden Wirkstoffklassen haben unterschiedliche Angriffspunkte und unterstützen sich in ihrer Wirksamkeit, so dass ein synergistischer Effekt entsteht. Um diesen Effekt auszunutzen, müssen beide Wirkstoffe an dieselbe Zielzelle gelangen. Bisher sind alle Kombinationspräparate als physikalische Mischung der beiden Einzelsubstanzen formuliert. Das hat den Nachteil, dass dieselbe Zielzelle nur zufällig von Partikeln beider Wirkstoffe erreicht wird.

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, neue Formulierungsstrategien für Pulver zur Inhalation zu entwickeln, die mehr als einen Wirkstoff enthalten. Dabei liegt der Fokus auf Formulierungen, in denen ein β_2 -Sympathomimetikum und ein Corticosteroid bereits auf partikulärer Ebene gemeinsam vorliegen. So kann die synergistische Wirkung optimal ausgenutzt werden, da von einem einzigen inhalierten Partikel beide Substanzen an denselben Wirkort transportiert werden. Die Formulierungen sollen gute aerodynamische Eigenschaften aufweisen, ohne dabei auf die Hilfe von Trägerstoffen wie Laktose in einer interaktiven Mischung angewiesen zu sein. Um die Belastung des Körpers zu minimieren, sollte der Gebrauch von Hilfsstoffen in der Formulierung möglichst gering gehalten werden und auf unbedenkliche Substanzen beschränkt bleiben. Zur Herstellung der Pulver zur Inhalation sollen vorrangig aufbauende Verfahren wie die Sprühtrocknung und die simultane Präzipitation (Co-Präzipitation) zu Anwendung kommen.

2 Asthma und seine Therapie

2.1 Pathophysiologie des Asthmas

Asthma, griechisch für Atemnot, war bereits in der Antike bekannt. Der griechische Arzt Galen (129-199 n. Chr.) beschrieb es als eine anfallsähnliche Erkrankung der Lunge und stellte fest, dass es sich dabei um eine Krankheit handelt, die durch eine Blockade der Bronchien zustande kommt. Das zeigt, dass die spätere Einschätzung, Asthma sei eine Erkrankung der Industrienationen, nur teilweise, nämlich in Bezug auf die zunehmende Allergenexposition, zutreffen kann. Asthma bronchiale in seinen beiden Erscheinungsformen Intrinsisches Asthma (Asthma ohne allergische Komponente) und Extrinsisches Asthma (allergisches Asthma) (Kroegel et al., 1997) ist eine Erkrankung der Atemwege, die je nach Schweregrad mit einer geringfügigen bis starken Beeinträchtigung der Lungenfunktion des Patienten einhergeht. Unabhängig von den Auslösern einer asthmatischen Erkrankung ist eine chronische Entzündung der gesamten Atemwege die pathophysiologische Grundlage der Krankheit und gibt damit auch den therapeutischen Ansatz vor (Barnes, 1996). Histologisch lässt sich eine mechanische Zerstörung des Lungenepithels beobachten, die mit einer Umgestaltung der Atemwege (airway remodeling) einhergeht. Dabei lagern sich vermehrt Kollagen und andere Matrixbestandteile unter der Basalmembran des Lungenepithels ein, so dass sich diese verdickt und zunehmend unbeweglich wird (Fibrose). Es kommt zu einer erhöhten Expression von Wachstumsfaktoren, die sowohl zu einer verstärkten Angiogenese im verdickten Gewebe der Bronchien, als auch zu einem Wachstum des Nervengewebes der Lunge, einer Hypertrophie der glatten Muskulatur und einer Hyperplasie der Drüsenzellen mit vermehrter oder gestörter Schleimproduktion führt (Ward und Walters,

2005). Es ist nicht ganz klar, ob dieses irreversible airway remodeling eine direkte Folge der andauernden Entzündung ist, oder ob es vielleicht ein paralleler Primäreffekt ist, der in einer genetischen Prädisposition begründet sein kann. Darüber hinaus bilden sich Ödeme und es ist eine kontinuierliche Aktivierung von Mastzellen zu beobachten, die zum IgE-vermittelten Entzündungsgeschehen beitragen und vor allem für die eintretende Bronchokonstriktion verantwortlich sind. Eine ganze Reihe von inflammatorischen Zellen wandert in das Lungengewebe ein, unter anderem eosinophile Granulozyten, die vorrangig bei allergischen Geschehnissen auftreten, TH₂-Lymphozyten, die Zytokine freisetzen und - insbesondere bei schweren Asthmaanfällen - auch neutrophile Granulozyten. Abbildung 2.1 aus dem expert panel report 2 (1997/2002) zeigt das Zusammenspiel der am Entzündungsgeschehen beteiligten Zelltypen und Zytokine. Darüber hinaus sind viele proinflammatorische Proteine, die unter anderem von entzündungsfördernden Transkriptionsfaktoren wie NF-κB kontrolliert werden, durch erhöhte Produktion in asthmatischem Lungengewebe überrepräsentiert (Barnes und Adcock, 2003). In post-mortem Untersuchungen an Asthmatikern fand man sowohl in den größeren als auch in den kleinen Atemwegen größere Mengen an viskös-festem Sputum, das durchsetzt war mit Serumproteinen, Zellbestandteilen und inflammatorischen Zellen wie beispielsweise Makrophagen (Ward und Walters, 2005). Die Entzündungsreaktion kann in drei Phasen unterteilt werden: zuerst wird eine akute Entzündung mit einer Rekrutierung proinflammatorischer Zellen im Lungengewebe beobachtet, die dann in eine subakute Phase dauerhaft aktivierter Zellen übergeht und schließlich durch andauernde Defekte und daraus resultierende Reparaturmechanismen chronifiziert (Roche, 1991). Die chronische Entzündung des Lungengewebes führt zu einer bronchialen Hypersensibilität, so dass die Lunge deutlich anfälliger

für Reize wird. Die Entzündung und ihre Folgen tragen schließlich auch zu einer Behinderung des Luftstroms in der Lunge bei, so dass Atembeschwerden beim Patienten auftreten.

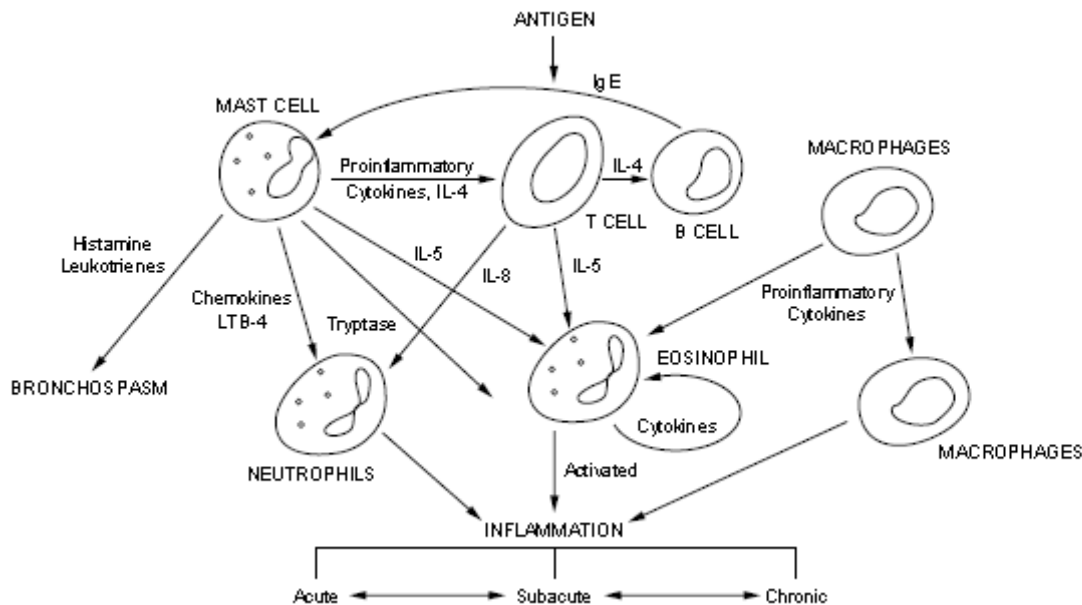


Abbildung 2.1: zelluläres Zusammenspiel in der Entstehung einer Entzündung der Atemwege (aus EPR-2, 1997)

Typisch für eine asthmatische Erkrankung ist eine schleichende (Exazerbation) oder plötzliche (Asthmaanfall) Verschlechterung der Lungenfunktion mit Dyspnoe, Anschwellen der mittleren Atemwege und einer krampfenden Kontraktion der glatten Muskulatur (Bronchokonstriktion) mit vermehrter Produktion zähen Schleims und erhöhter Permeabilität der Epithelzellen für Flüssigkeit, was das Atmen erschwert und mit rasselnd-pfeifenden (Aus)Atemgeräuschen (Giemen) einhergeht. Auslöser für einen solchen Asthmaanfall können kalte Luft, Anstrengung oder ein inhaliertes Allergen sein, ein Asthmaanfall kann jedoch auch in völliger Ruhe (häufig nachts oder am frühen Morgen) auftreten. Für den Patienten ist ein solcher Asthmaanfall nicht akut lebensbedrohend, stellt aber eine starke Stresssituation, teilweise verbunden mit Todesangst, dar. Je nach der Ausprägung des Asthmas

kann die Beeinträchtigung der Atemfunktion auch kontinuierlich sein. Sie äußert sich dann vor allem durch Kurzatmigkeit, Atemgeräusche und eine eingeschränkte physische Belastbarkeit (Bousquet et al., 2000). Nach dem expert panel report 2 (EPR-2) des National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI) des amerikanischen National Institute of Health (1997/2002) wird Asthma entsprechend der Schwere der Symptome in vier Stufen eingeteilt, die unterschiedlich zu therapieren sind. Bei der Klassifizierung sind die Unterschiede zwischen Kindern und Erwachsenen nur geringfügig. Hier ist die Einstufung für Jugendliche ab 12 Jahren und Erwachsene erläutert (siehe Tabelle 2.1). Stufe eins beschreibt ein mildes, intermittierendes Asthma, bei dem der Patient längere symptomfreie Phasen erlebt, in denen er in seiner Lungenfunktion praktisch nicht eingeschränkt ist. Die Stufen zwei bis vier beschreiben persistierendes Asthma, bei dem auch in den symptomfreien Intervallen keine Rückkehr zu normalen Lungenfunktionswerten erfolgt. Stufe zwei beinhaltet dabei Asthmatiker, die regelmäßig asthmatische Symptome erleben, aber nicht jeden Tag unter Beeinträchtigungen leiden. Stufe drei beschreibt ein Asthma, das durch tägliche Symptome gekennzeichnet ist und mit zwei oder mehr Asthmaanfällen pro Woche einhergeht, die die physische Aktivität einschränken. Stufe vier beschreibt die schwerste Form des Asthmas mit häufig auftretenden nächtlichen Anfällen und kontinuierlichen Beeinträchtigungen der Atmung, die zu deutlich eingeschränkter physischer Belastbarkeit führen. Das Update der Asthma guidelines des NHLBI (2007) legt nicht nur Wert auf die Beeinträchtigung der Lungenfunktion als Kriterium, sondern auch auf die Gefahr, schwere Asthmaanfälle zu erleiden, die mit peroralen Corticosteroiden behandelt werden müssen. Dies ist insbesondere für die regelmäßige Überprüfung der Einstufung und der daraus folgenden Therapieanpassung von

Interesse. Die Ursachen einer asthmatischen Erkrankung lassen sich nicht klar abgrenzen, da es ein multifaktorielles Zusammenspiel aus konstitutionellen Faktoren, wie angeborener Immunität und Geschlecht, und Umweltfaktoren, wie Allergenexposition und erlittenen Atemwegsinfektionen, gibt.

Tabelle 2.1: Einteilung des Asthmas nach Schweregraden (nach EPR-2 update, 2002), FEV₁ = forced expiratory flow volume, PEF = peak expiratory flow rate

	Symptome	nächtliche Symptome	Lungenfunktion
Stufe I	Symptome ≤ 2 mal pro Woche	≤2 mal pro Monat	FEV ₁ oder PEF ≥ 80%
(mildes) intermittierendes Asthma	dazwischen asymptomatisch mit normaler PEF kurze Exazerbationen, Intensität variabel		PEF Variabilität < 20%
Stufe II	Symptome > 2 mal pro Woche, aber weniger als täglich	>2 mal pro Monat	FEV ₁ oder PEF ≥ 80%
mildes persistierendes Asthma			PEF Variabilität 20-30%
Stufe III	tägliche Symptome Exazerbationen beeinträchtigen die Aktivität	>1 Nacht pro Woche	FEV ₁ oder PEF > 60%
moderates persistierendes Asthma	Asthmaanfälle ≥ 2 pro Woche, können länger andauern		PEF Variabilität > 30%
Stufe IV	kontinuierliche Symptome häufige Asthmaanfälle begrenzte physische Aktivität	häufig	FEV ₁ oder PEF ≤ 60%
schweres persistierendes Asthma			PEF Variabilität > 30%

Es gibt mit Sicherheit auch eine genetische Disposition für Asthma (Buhl et al., 2006). Vor allem Atopiker sind gefährdet, im Laufe ihres Lebens eine asthmatische Erkrankung zu entwickeln, wobei dies häufig bereits im Kindes- oder frühen Erwachsenenalter manifest wird. Dementsprechend wird auch zwischen atopischem und nicht-atopischem Asthma unterschieden, die sich auch im Muster der aktivierten Zelltypen leicht unterscheiden (Amin et al., 2000) und somit unterschiedliche Therapieoptionen ermöglichen. Ältere Patienten erkranken selten neu an Asthma, häufig ist die Beeinträchtigung der Lungenfunktion im Alter eine chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD). Die diagnostische Abgrenzung kann dabei schwierig sein, da es auch Mischformen gibt. Im Zweifel ist von einer asthmatischen Komponente auszugehen. Bei Erwachsenen spielen Allergien nach wie vor eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Asthmas, aber auch Polypen, chronische Bronchitis sowie chronische Sinusitis, welche mit Entzündungen und Verengungen der Atemwege einhergehen, sind Wegbereiter für Asthma. Interessanterweise trifft man bei erwachsenen Asthmatikern häufig zusätzlich auf eine Unverträglichkeit von Acetylsalicylsäure, ein sogenanntes Analgetika-Asthma (Baenkler, 2008). Unabhängig vom Ursprung der Erkrankung verlaufen Diagnose und Therapie des Asthmas für alle Formen gleich. Das wichtigste Kriterium bei der Diagnose des Asthmas ist neben einer umfangreichen Anamnese, die potentielle Prädispositionen und damit die Wahrscheinlichkeit der Diagnose Asthma abklären soll, das Ergebnis der Lungenfunktionsprüfung (Spirometrie). Dabei werden das maximale Ausatemvolumen (forced vital capacity, FVC) und das in der ersten Sekunde ausgeatmete Volumen (forced expiratory volume_{1sec}, FEV₁) gemessen; FEV₁ und der Quotient FEV₁/FVC sind bei Asthmatikern im Vergleich zum geschätzten oder Referenz-Wert deutlich erniedrigt. Dabei deutet ein reduziertes

Verhältnis $FEV_1/FVC \leq 65\%$ auf eine Behinderung der Ausatemluft durch Obstruktion hin, wie es für Asthma typisch ist, eine reduzierte FVC bei normalem FEV_1/FVC auf eine restriktive Atemwegserkrankung, bei der auch das Einatmen erschwert ist (z.B. COPD). Um die Reversibilität der zugrundeliegenden Bronchokonstriktion zu überprüfen, die ein wichtiges Kriterium für die Diagnose Asthma darstellt, kann anschließend ein schnellwirksames β_2 -Sympathomimetikum appliziert und die Messung wiederholt werden. Bei asthmatischen Patienten sollten sich FVC und FEV_1 nach medikamentöser Behandlung dem Normwert annähern (Änderung $\geq 10-15\%$). Ein weiterer spirometrischer Parameter ist die schnellste Ausatemgeschwindigkeit (peak expiratory flow rate, PEF), die mit einem peak-flow-Meter vom Patienten auch zu Hause einfach gemessen werden kann. Für die Verlaufskontrolle wird in der Regel der prozentuale Anteil der patientenindividuellen PEF (während einer stabilen Phase der Erkrankung) bestimmt. Der PEF-Wert sinkt häufig schon mehrere Tage vor Eintreten weiterer Symptome einer Exazerbation. Um die Entzündung der Atemwege zu quantifizieren, ist die Analyse von ausgeatmeten Stickstoffmonoxid (NO) ein guter Marker, da die Konzentration an NO streng korreliert mit anderen, schwieriger zu messenden, entzündlichen Parametern wie IgE und der Präsenz von Eosinophilen (Payne et al., 2001). NO entsteht unter Katalyse der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS), deren induzierbare Form iNOS auf infiltrierenden Zellen präsent ist und durch proinflammatorische Zytokine induziert wird. Die pulmonale Hypersensibilität eines Patienten kann sehr gut mit einem Provokationstest überprüft werden. Dazu inhaliert der Patient steigende Dosen einer bronchoreaktiven Substanz, in der Regel Histamin oder Metacholin, während die Lungenfunktionsparameter beobachtet werden. Es ist auch möglich, durch Hyperventilation oder Exposition von kalter Luft einen Asthmaanfall zu induzieren und dadurch

klinisch beobachtbar zu machen. Darüber hinaus ist die Variabilität zwischen morgendlichem PEF, der in der Regel der niedrigste Tageswert ist, und abendlichem PEF, der meist dem Tageshöchstwert entspricht, ein gutes Kriterium für die Hypersensibilität der Lunge, welches ebenfalls vom Patienten zu Hause überprüft werden kann. Bei Kindern ist das Generieren spirometrischer Daten schwierig, hier muss gegebenenfalls auf andere diagnostische Mittel ausgewichen werden. Ist die Diagnose Asthma gestellt, wird in der Regel ein Therapieversuch mit einem inhalierbaren Glucocorticoid zur Überprüfung der Hypothese begonnen, an den sich eine bedarfsadaptierte Therapie anschließt.

In der Therapie des Asthmas werden verschiedene Wirkstoffklassen mit unterschiedlichen Angriffspunkten eingesetzt (siehe Kapitel 2.2), die alle zum Ziel haben, die Lungenfunktion des Patienten wiederherzustellen und die zugrunde liegende Entzündung zurückzudrängen, damit das beschriebene airway remodeling möglichst nicht fortschreitet. Die Darreichungsform der Wahl ist die Inhalation (siehe Kapitel 2.3), was gewisse koordinative Fähigkeiten des Patienten voraussetzt und bei Kindern und älteren Patienten trotz Patientenschulung schwierig sein kann. In diesen Fällen ist ein Ausweichen auf perorale Darreichungsformen der entsprechenden Wirkstoffklassen in Betracht zu ziehen. Ein akuter Asthmaanfall kann gut medikamentös durchbrochen werden. Dazu wird ein schnellwirksames β_2 -Sympathomimetikum (SABA) inhaliert, das die Verkrampfung der Bronchialmuskulatur beendet, die Atemwege dadurch erweitert und so das Atmen erleichtert. Dazu sollte der Patient eine entsprechende Bedarfsmedikation („Reliefer“) immer dabei haben. Klinisch kann zusätzlich je nach Schwere des asthmatischen Anfalls eine parenterale Gabe eines Glucocorticoids erwogen werden. Weitere Therapieoptionen bestehen in den bereits erwähnten inhalierbaren Corticosteroiden (ICS,

Glucocorticoide (GC)), die ab Asthma der Stufe zwei als „Controller“ die Grundlage jeder Therapie bilden und antiinflammatorisch wirksam sind. Darüber hinaus werden langwirksame β_2 -Sympathomimetika (long acting beta-agonist, LABA), Mastzellstabilisatoren sowie Leukotrien-Rezeptor-Antagonisten (LTRA) eingesetzt. Bei schwer therapierbaren Patienten kommt auch das Methylxanthin Theophyllin in retardierter peroraler Form zum Einsatz, das allerdings eine weniger starke Wirksamkeit als LABAs hat. In letzter Zeit kommt auch Omalizumab, ein monoklonaler humanisierter Anti-IgE-Antikörper, zum Einsatz, der bei Erwachsenen mit schwer kontrollierbarem atopischen Asthma gut wirksam ist. Die Therapie sollte sich immer an den Leitlinien des NHLBI (siehe Tabelle 2.2 und Abbildung 2.2) oder denen der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie (Buhl et al., 2006) anlehnen, um im Sinne der evidenzbasierten Medizin eine moderne und wissenschaftlich fundierte Therapie zu gewährleisten. Die Therapie von asthmatischen Kindern unterscheidet sich von der erwachsener Asthmatiker durch den Einsatz von Spacern bei der Inhalation und den Verzicht auf Theophyllin zugunsten des Einsatzes von Leukotrien-Rezeptor-Antagonisten. Deren Wirksamkeit reicht zwar nicht an die inhalierbarer Corticosteroide heran, dafür kann man sie aber peroral als Granulat oder Tablette geben und damit die Problematik der richtigen Inhalationstechnik umgehen (Knorr et al., 2001).

Tabelle 2.2: Therapie bei erwachsenen Asthmatikern entsprechend der Schwerestufe des Asthmas (nach EPR-2, 2002 und Deutsche Gesellschaft für Pulmologie, 2006)

	präferierte Therapie	Therapiealternativen
Stufe I	keine tägliche Medikation erforderlich	
Stufe II	niedrigdosiertes inhaliertes Glucocorticoid	Cromoglycinsäure, Leukotrien- Rezeptorantagonist, Nedocromil oder retardiertes Theophyllin
Stufe III	niedrig- bis mitteldosiertes inhaliertes Glucocorticoid und langwirksames inhaliertes β_2 -Sympathomimetikum	anstelle von LABA erhöhte Dosis des GC oder GC plus Montelukast bzw. retardiertes Theophyllin
Stufe IV	hochdosiertes inhaliertes Glucocorticoid und langwirksames inhaliertes β_2 - Sympathomimetikum	zusätzlich perorale Glucocorticoide ret. Theophyllin Omalizumab bei allergischem Asthma

zusätzlich sollen alle Patienten ein schnellwirksames β_2 -Sympathomimetikum (SABA) als Bedarfstherapie erhalten

Man unterscheidet zwischen der step-up-Therapie, in der beginnend mit der geringsten Medikation bedarfsadaptiert weitere Therapieoptionen hinzugefügt werden, und der zurzeit empfohlenen step-down-Therapie. In der step-down Therapie versucht man, mit einer breit angelegten Therapie die zugrundeliegende Entzündung in den Griff zu bekommen, um in der Folge die Medikation bis auf das dauerhaft benötigte Minimum zu reduzieren. Die zugrundeliegende Entzündung kommt erfahrungsgemäß auch unter Glucocorticoid-Therapie nicht völlig zum Erliegen, so dass die Erkrankung fortschreiten kann und eine Adaption der Therapie entsprechend dem Stufenschema erforderlich ist (siehe Abbildung 2.2).

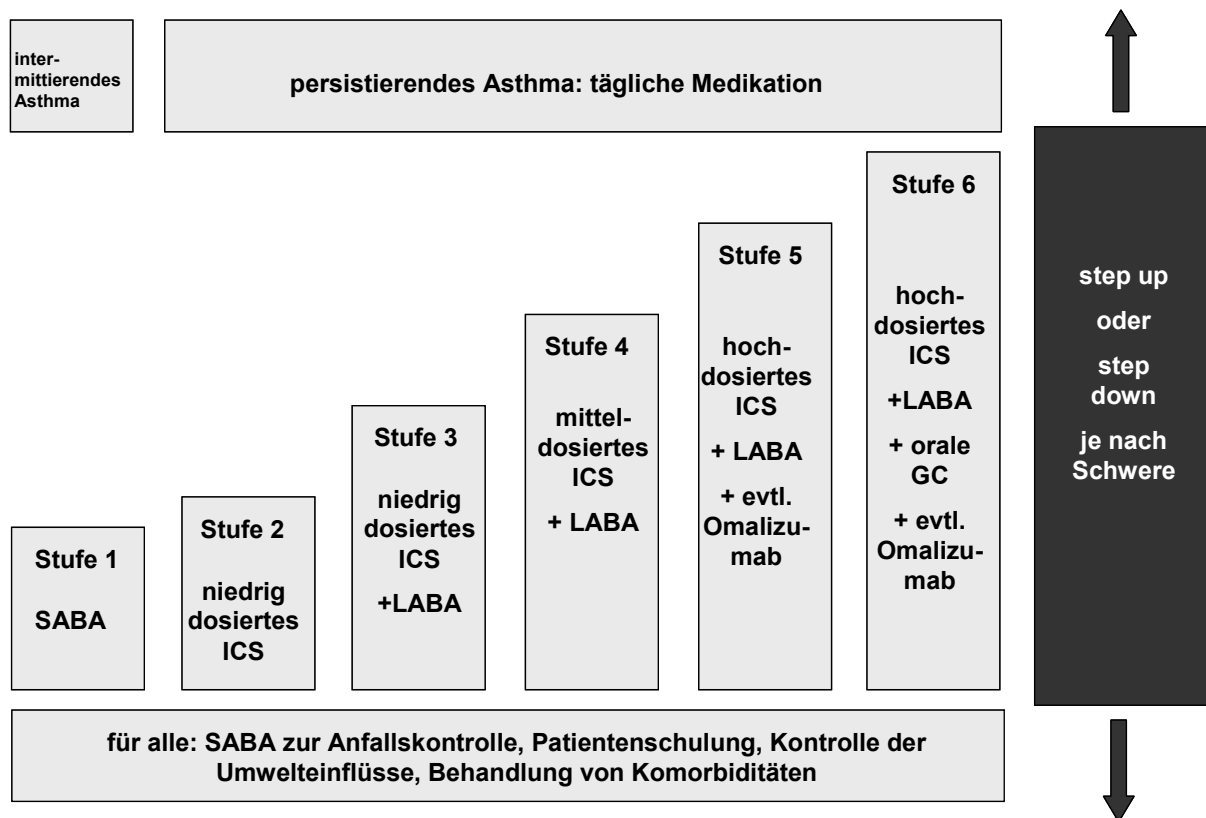


Abbildung 2.2: Stufentherapie bei erwachsenen Asthmatikern (modifiziert nach EPR-3, 2007)

Da Asthma, wie erwähnt, multifaktorielle Ursachen hat, ist neben der medikamentösen Therapie auch eine Analyse der Lebensverhältnisse und gegebenenfalls eine Umstellung in Bezug auf die Allergenexposition (z.B. Hausstaubmilben, Pollen, Tabakrauch) erforderlich.

2.2 Wirkstoffe in der Asthmatherapie

In der Therapie des Asthmas werden, wie zuvor erwähnt, eine Reihe von Wirkstoffklassen eingesetzt (siehe Tabelle 2.3). Im Folgenden werden die Wirkmechanismen dieser Klassen kurz erläutert.

β_2 -Sympathomimetika

β_2 -Sympathomimetika sind Substanzen, die am membranständigen β_2 -Rezeptor als Agonist wirken. Der β_2 -Rezeptor gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten adrenergen Rezeptoren. Man unterscheidet α - und β -Rezeptoren entsprechend der spezifischen Receptoreigenschaften und ihrer Organspezifitäten, in der Familie der β -Rezeptoren wird weiter unterschieden zwischen β_1 - und β_2 -Rezeptoren, wobei der β_1 -Rezeptor in unmittelbarer Nähe der Varikosität anzutreffen ist, der β_2 -Rezeptor dagegen in weiterer Ferne. Das Rezeptorprotein besteht aus einem Peptidfaden, der sich 7-fach in Form von α -Helices durch die Phospholipidmatrix der Zellmembran windet, so dass sich in der Mitte eine Bindungstasche bildet. Intrazellulär geschieht die Signaltransduktion durch ein Guanylnucleotid-bindendes Protein (G-Protein), das wiederum aus drei Untereinheiten α , β und γ aufgebaut ist. An die α -Untereinheit ist im Ruhezustand Guanosindiphosphat (GDP) gebunden. Wird der Rezeptor aktiviert, so ändert sich die Konformation des Rezeptors, der Rezeptor nimmt Kontakt mit einem zugehörigen G-Protein auf, GDP wird von diesem G-Protein abgespalten und an Stelle dessen Guanosintriphosphat (GTP) gebunden. Dadurch trennt sich die α -Untereinheit vom G-Protein und vermag durch Diffusion benachbarte Effektorproteine aktivieren.

Tabelle 2.3: Wirkstoffklassen und Substanzen (ohne ihre Salze und Ester) in der Asthmatherapie (Buhl et al., 2006)

Wirkstoffklasse	Substanz	Besonderheiten
kurzwirksame β_2- Sympathomimetika (SABA)	Salbutamol	
	Fenoterol	
	Terbutalin	
	Reproterol	nur in fester Kombination
langwirksame β_2- Sympathomimetika (LABA)	Formoterol	schneller Wirkeintritt
	Salmeterol	langsamer Wirkeintritt
perorale β_2- Sympathomimetika	Bambuterol	
	Clenbuterol	
	Salbutamol	
	Terbutalin	
inhalative Corticosteroide (ICS)	Beclomethason	
	Budesonid	
	Ciclesonid	
	Fluticason	
	Mometason	
perorale Corticosteroide	Fluocortolon	alle nur zur Therapie
	Methylprednisolon	schwerer Exazerbationen
	Prednison	
	Prednisolon	
	Triamcinolon	
Anticholinergika	Ipratropium	
Methylxanthine	Theophyllin	
Leukotrien-Modulatoren	Montelukast	
	(Zafirlukast)	nur in der Empfehlung des
	(Zileuton)	NLHBI
monoklonale Antikörper	Omalizumab	nur bei IgE-Antwort
Cromone	Cromoglycinsäure	
	Nedocromil	

Je nach Rezeptortyp unterscheidet man dann Gs-Proteine (stimulierender Effekt), Gi-Proteine (inhibierender Effekt) und Gq-Proteine (Inosintri-phosphat-vermittelter Effekt). Im Fall des β_2 -Rezeptors ist ein Gs-Protein nachgeschaltet, das die Adenylatcyclase (AC) aktiviert, welche die Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) katalysiert. cAMP stellt einen intrazellulären Botenstoff dar, der unter anderem die Proteinkinase A, ein phosphorylierendes Enzym, enthemmt. Durch Phosphorylierung können wiederum andere Effektorproteine in ihrer Aktivität moduliert werden. β_2 -Sympathomimetika führen also zu einer Akkumulation von cAMP in der Zelle, dieses phosphoryliert die Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK), was einen wichtigen Schritt zur Relaxation der glatten Muskulatur darstellt. Darüber hinaus werden Na^+/K^+ - Transportsysteme phosphoryliert, die über eine begleitende Aktivierung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austausches ebenfalls eine Relaxation induzieren. Neben diesen Mechanismen werden unter β_2 -Stimulation auch Ca^{2+} -Pumpen aktiviert, die cytosolisches Calcium zurück in die intrazellulären Speicher oder in den Extrazellulärraum transportieren (Reinhardt et al., 2001). In der Lunge sind β_2 -Rezeptoren nicht nur an der glatten Bronchialmuskulatur zu finden, wo sie bei Stimulation zu einer Relaxation der Muskulatur führen, sondern sie sind gleichmäßig über die Lunge verteilt und auch auf der Oberfläche infiltrierender Zellen wie Mastzellen, Eosinophilen, Monozyten und neutrophilen Granulozyten anzutreffen (Johnson, 2002). Eine β_2 -Stimulation führt hier zu einer verminderten Aktivierung dieser Zellen und zu einer verringerten Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren. Alle β_2 -Sympathomimetika haben diesen Effekt, der vor allem bei den langwirksamen β_2 -Sympathomimetika (LABA) zum Tragen kommt (Johnson, 2002). Dies ist ein wichtiger Aspekt in der Therapie der entzündlichen Komponente von Asthma. Ein weiterer Effekt an der

glatten Muskulatur der Bronchien ist die Verringerung der mitogen-induzierten Proliferation der Muskelzellen (Panettieri, 2002). Darüber hinaus tragen auch die Epithelzellen der Lunge und die submucosalen Drüsen β_2 -Rezeptoren (Salathe, 2002). Eine Stimulation führt hier zu einer Zunahme des Zilienschlages, zu einer Beschleunigung der Wundreparatur des Epithels und an den Drüsenzellen zu einer Zunahme der Produktion wässrigen Sekrets (im Gegensatz zum viskos-zähen Sekret der Asthmatiker), was aber klinisch nicht relevant ist. Bei einer anhaltenden Stimulation des β_2 -Rezeptors kann ein zweites G-Protein aktiviert werden, bei einer Dauer- oder Überstimulation des Rezeptors gibt es jedoch zelluläre Mechanismen, die dies unterbrechen. So kann es zu einer Phosphorylierung des Rezeptors selbst kommen, was die Kontaktaufnahme mit einem G-Protein erschwert. Darüber hinaus kann der Rezeptor von der Zelloberfläche genommen werden (Internalisierung), so dass er für Rezeptoragonisten nicht mehr erreichbar ist, und die Neusynthese der Rezeptorproteine kann auf der Ebene der Transkription oder Translation gehemmt werden. Durch beide Mechanismen wird die Rezeptordichte auf der Zellmembran verringert.

In der Therapie kommen kurzwirksame und langwirksame β_2 -Sympathomimetika zum Einsatz. Kurzwirksame Substanzen wie Salbutamol oder Fenoterol werden in der Regel als Bedarfsmedikation für die akute Behandlung einer Exazerbation verwendet. Dabei ist zu beachten, dass die chronische Anwendung von SABAs zu einer Habituation führt, so dass die Bronchien nicht mehr ausreichend dilatiert werden können. Diese Toleranzentwicklung kann ein klinisches Problem darstellen, daher sollten SABAs tatsächlich nur bei Anfällen angewendet werden, deren Frequenz durch eine adäquate Dauertherapie niedrig gehalten werden sollte. Langwirksame β_2 -Sympathomimetika kommen dagegen in der Prophylaxe von Exazerbationen zum Einsatz und haben

einen stabilisierenden Effekt auf die Bronchialmuskulatur (Jackson und Lipworth, 2004). Dabei kommt die Langwirksamkeit (≥ 12 Stunden) durch eine hohe Lipophilie oder eine besonders stabile Rezeptorbindung zustande (Lötvall, 2002). Wenn eine inhalative Gabe nicht möglich ist oder nicht zu einem ausreichenden Effekt führt, können β_2 -Sympathomimetika auch peroral appliziert werden, wobei jedoch die Gefahr kardialer Nebenwirkungen deutlich erhöht ist. Im Vergleich der Einzelsubstanzen spielen vorrangig die Kriterien Wirkeintritt und Wirkdauer bei der Auswahl des geeigneten Präparats eine Rolle (siehe Tabelle 2.4).

Tabelle 2.4: Vergleich der β_2 -Sympathomimetika (modifiziert nach Reinhardt et al., 2001)

Eigenschaft	Rangordnung
Rezeptoraffinität	For > Salm > Salb = Terb
Selektivität	For = Salm > Salb = Terb
intrinsische Aktivität	For > Salb = Ter > Salm
Wirkeintritt	Salb = Ter = For >> Salm
Wirkdauer	For = Salm > Salb = Ter

For = Formoterol, Salm = Salmeterol, Salb = Salbutamol, Terb = Terbutalin

Glucocorticoide

Glucocorticoide sind Agonisten am cytosolischen Glucocorticoid-Rezeptor (GC-Rezeptor) und haben eine antiinflammatorische Wirksamkeit. Der GC-Rezeptor gehört zur Familie der DNA-Transkription-regulierenden Rezeptoren. Der Rezeptor verfügt über zwei Regionen, eine besitzt die Bindungsstelle für Corticosteroide, die zweite ist ein sogenanntes heat-shock-Protein, Hsp90, das den Rezeptor schützt. Bindet ein Corticosteroid an den Rezeptor, löst sich das heat-shock-Protein und der Rezeptor kann mit einem weiteren aktivierten GC-

Rezeptor dimerisieren (Bildung eines Homodimers). Anschließend wandert dieser Komplex in den Zellkern und bindet dort an glucocorticoid response elements (GRE) im transkriptionsmodulierenden Bereich bestimmter Genabschnitte oder er interagiert mit dem Chromatin. Dadurch wird die Transkription bestimmter DNA-Abschnitte verändert, sodass Messenger-RNA zur Herstellung bestimmter Proteine vermehrt produziert wird (Barnes und Adcock, 2003), (Gehring, 2004). Da Transkription und Translation eine vergleichsweise lange Zeit (mehrere Stunden) benötigen, wird diese Wirkung nicht akut manifest. Auch eine verringerte Transkriptionsaktivität kann durch GC-Rezeptoraktivierung vermittelt werden. Dies geschieht durch Inhibition anderer transkriptionsmodulierender Proteine vor dem Eintritt in den Nucleus, wie es für den proinflammatorischen nukleären Faktor NF- κ B beschrieben ist (Tak und Firestein, 2001). NF- κ B findet sich im Cytosol von Lymphozyten und anderen infiltrierenden Zellen und ist ähnlich wie der Glucocorticoid-Rezeptor an ein inhibitorisches Protein gekoppelt, das nach Aktivierung durch ein Cytokin abgespalten wird. Normalerweise wandert das aktivierte NF- κ B dann in den Zellkern und fördert die Transkription für proinflammatorische Proteine wie Phospholipase A₂, Interleukin 2 und den IL₂-Rezeptor. Bei gleichzeitiger Aktivierung des GC-Rezeptors kann dieser Vorgang vor dem Einwandern durch eine Heterodimerisierung von GC-Rezeptor und NF- κ B verhindert werden. Es wird auch vermutet, dass GC einen Effekt auf die Histon-Acetylase bzw. Deacetylase haben und damit die Vorbereitung der auf den Histonen aufgewickelten DNA zur Transkription modulieren (Matthews et al., 2004), (Barnes et al., 2004), (Cosío et al., 2004). Darüber hinaus vermitteln GC durch ihren Einfluss auf membranständige Rezeptoren und Ionenkanäle auch non-genomische Wirkungen, die schnell eintreten (Rodrigo, 2006). Dadurch können Corticosteroide wie Prednison,

Methylprednison und Prednisolon hochdosiert auch in der akuten Therapie eingesetzt werden (z.B. Status asthmaticus, anaphylaktischer Schock). In der Asthmatherapie werden Glucocorticoide nach Möglichkeit inhalativ eingesetzt, um lokal eine ausreichend hohe Konzentration zu erreichen und systemische Nebenwirkungen wie Immunsuppression, Wachstumshemmung, Osteoporose und das Cushing-Syndrom zu minimieren. Ihre Wirkung können sie an allen Zellen der Lunge ausüben, da Glucocorticoid-Rezeptoren gleichmäßig über das Lungenepithel, die glatte Muskulatur sowie alle infiltrierenden Zellen verteilt sind. Auf zellulärer Ebene verringern Corticosteroide die Anzahl inflammatorischer Zellen wie Eosinophilen, T-Lymphozyten, Mastzellen und dendritischen Zellen in der Lunge (siehe Abbildung 2.3).

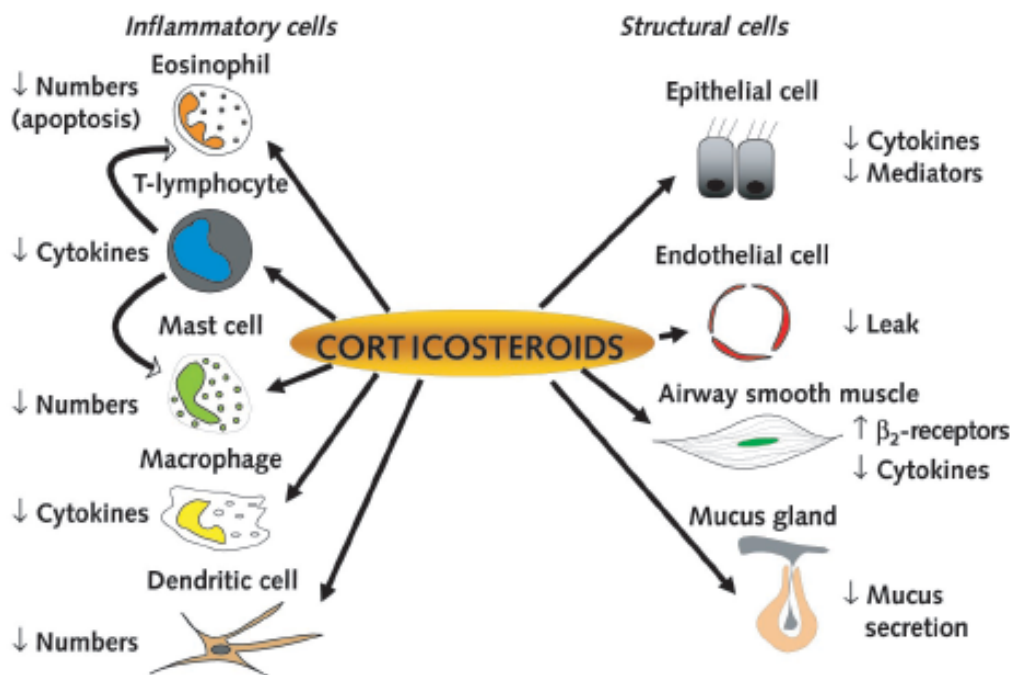


Abbildung 2.3: zelluläre Effekte der Corticosteroide (aus Barnes und Adcock, 2003)

Dies geschieht durch eine effektive Hemmung der Produktion chemotaktischer Substanzen und Adhäsionsmoleküle und durch die Einschränkung der Überlebenszeit infiltrierender Zellen (Barnes und

Adcock, 2003). Darüber hinaus verringern Glucocorticoide den Flüssigkeitsdurchtritt durch die Endothelwand und die Produktion von Mucus. Die eingesetzten Glucocorticoide unterscheiden sich in ihrer Rezeptoraffinität und damit Potenz, in ihrer peroralen Verfügbarkeit und in ihrer Verweildauer im Organismus (siehe Tabelle 2.5).

Tabelle 2.5: Vergleich der inhalativen Glucocorticoide (modifiziert nach Allen, 2003)

Eigenschaft	Rangordnung
Rezeptoraffinität	FP > BMP > Cic-AP > Bud
perorale Bioverfügbarkeit	BMP > Bud > FP = Cic-AP
Clearance	Cic-AP > BMP > FP > Bud
Verteilungsvolumen	Cic-AP > BMP > FP > Bud

FP = Fluticasonpropionat, BMP = Beclomethasonmonopropionat, Cic-AP = aktives Produkt von Ciclesonid, Bud = Budesonid

Idealerweise sollte die Wirkung der GC lediglich in der Lunge eintreten, dazu verfolgt man bei einigen Wirkstoffen ein prodrug-Prinzip. Beclomethason wird beispielsweise als Dipropionat verwendet, das erst in das Monopropionat (BMP) umgewandelt werden muss. Ebenso muss Ciclesonid erst aktiviert werden. Leider ist, vor allem bei BMP, nicht auszuschließen, dass die aktivierte Form auch peroral bioverfügbar ist (Allen et al., 2003). Der pulmonal applizierte Anteil wird in jedem Fall in die systemische Zirkulation gelangen. Dann ist von Interesse, wie hoch das Verteilungsvolumen ist (je größer das Volumen, desto geringer ist die Konzentration) und wie schnell das Glucocorticoid ausgeschieden wird. Bei schweren Formen des Asthmas kommen temporär auch perorale Corticosteroide zum Einsatz. Die orale Gabe von Corticosteroiden kann gelegentlich hinausgezögert werden, wenn das pulmonal applizierte GC in erhöhtem Maße auch systemisch bioverfügbar ist.

Anticholinergika

Aus der Gruppe der anticholinerg wirksamen Substanzen kommt mit Ipratropium nur ein Wirkstoff nach der deutschen Leitlinie zur Anwendung, der in der Therapie des Asthmas aufgrund seiner nur mäßigen Wirksamkeit jedoch eine untergeordnete Rolle spielt. Dahingegen hat Ipratropium in der Therapie der chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) seinen festen Platz. Ipratropium wirkt als Antagonist am muskarinergen Acetylcholin-Rezeptor (M_3) an den glatten Muskelzellen der Lunge und verringert damit den (bei COPD pathologisch erhöhten) cholinergen Tonus. Dadurch verringert sich die durch Acetylcholin über einen G_s -Protein gekoppelten membranständigen Rezeptor vermittelte Kontraktion der glatten Muskulatur und somit der Bronchospasmus (Restrepo, 2007). Die Substanz besitzt einen quartären Stickstoff, wird daher so gut wie nicht absorbiert und ist somit nicht bioverfügbar, sondern nur nach inhalativer Gabe lokal wirksam. Eingesetzt wird sie meist als Bromid. Darüber hinaus wird sie rasch durch Esterhydrolyse inaktiviert. Im Unterschied zu β_2 -Sympathomimetika setzt die bronchodilatierende Wirkung von Anticholinergika schrittweise ein, erreicht erst nach 1-2 Stunden ihren Höhepunkt und hält länger an als der Effekt von SABAs (Chapman, 1990). Dementsprechend werden Anticholinergika gern mit SABAs kombiniert, um einen schnellen Wirkeintritt und eine lange Wirksamkeit zu erreichen. Ipratropium kommt in Kombinationspräparaten mit Salbutamol oder Fenoterol zum Einsatz. Weitere Wirkstoffe aus der Gruppe der Anticholinergika sind Tiotropium und Oxitropium, wobei Tiotropium eine erhöhte Selektivität für den M_3 -Rezeptor und eine deutlich längere Wirksamkeit hat und für mindestens 24 Stunden zu einer Relaxation der Bronchialmuskulatur führen soll (Barnes, 2006). In

der Therapie der COPD ist Tiotropium mittlerweile die Substanz der ersten Wahl.

Methylxanthine

Darüber hinaus wird das Methylxanthin Theophyllin schon seit mehr als 60 Jahren zur Bronchodilatation in der Asthmatherapie eingesetzt. Theophyllin ist jedoch nach Inhalation nicht wirksam, sondern muss peroral appliziert werden. Dabei hat die Substanz einen recht schmalen therapeutischen Bereich (Serumkonzentration 5-20 mg/l); zur Einstellung eines Patienten ist es notwendig, den Serumspiegel zu kontrollieren. Theophyllin wird meistens als sustained release-Präparat gegeben, um einen möglichst gleichmäßigen Plasmaspiegel zu gewährleisten. Der zelluläre Mechanismus der Bronchodilatation besteht in einem Effekt des Theophyllins auf Phosphodiesterasen (PDE). PDE haben physiologisch die Aufgabe, cAMP abzubauen und somit als second messenger unwirksam zu machen. Eine Hemmung der PDE bedingt demnach einen Anstieg von cAMP in der Zelle und damit eine Relaxation der glatten Muskelzelle (Barnes, 2003). Dabei hemmt Theophyllin unselektiv alle Phosphodiesterasen. Darüber hinaus ist Theophyllin ein Antagonist an Adenosin-Rezeptoren, vor allem am A₁- und A₂-Rezeptor. Adenosin vermittelt die Ausschüttung von Histamin und Leukotrienen an Mastzellen und ist damit am bronchokonstriktorisches Geschehen beteiligt. Wichtiger für die Wirkung von Theophyllin in der Asthmatherapie ist aber die Aktivierung der Histon-Deacetylase, welche die Transkription proinflammatorischer Proteine hemmt.

Leukotrien-Modulatoren

Eine relativ neue Wirkstoffklasse sind die Leukotrien-Modulatoren, wozu die Leukotrien-Rezeptor-Antagonisten Montelukast und Zafirlukast sowie

Lipoxygenase-Hemmstoffe wie Zileuton gehören. Leukotriene sind Mediatorsubstanzen, die vorrangig in Leukozyten gebildet werden. Sie entstehen aus Arachidonsäure durch Katalyse der Lipoxygenase und nachfolgende Konjugation mit Glutathion (Barnes, 2006). Bei Cysteinyl-Leukotrienen (LTC₄, LTD₄, LTE₄) handelt es sich um beispielsweise von Mastzellen und eosinophilen Granulozyten freigesetzte, entzündungsfördernde Eikosanoide. Diese wichtigen Asthma-begünstigenden Mediatoren binden an die in den Atemwegen des Menschen vorhandenen Cysteinyl-Leukotrien-Rezeptoren (CysLT) und bewirken dort unter anderem die Verengung der Bronchien, eine erhöhte Schleimsekretion und Gefäßpermeabilität sowie die Anreicherung von eosinophilen Granulozyten. Der CysLT-Typ-1-Rezeptor (CysLT₁) findet sich in den Atemwegen des Menschen einschließlich der glatten Muskelzellen sowie in Makrophagen und anderen proinflammatorischen Zellen, wie eosinophilen Granulozyten und bestimmten Knochenmarkstammzellen. Leukotrien-Rezeptor-Antagonisten binden an den CysLT und verhindern so einen Effekt der Leukotriene. Lipoxygenase-Hemmstoffe greifen noch früher in diesen Regelkreis ein und verhindern bereits die Entstehung der Leukotriene. Beide Substanzgruppen haben im Vergleich zu Corticosteroiden eine milde antiinflammatorische Wirksamkeit und werden daher vorrangig als add-on-Therapie oder bei Patienten, bei denen eine Gabe von Corticosteroiden kontraindiziert ist, verwendet (Knorr et al., 2001).

Monoklonale Antikörper

Bei extrinsischem (allergischem) Asthma, also Asthma mit einer deutlichen IgE-vermittelten Immunantwort, kann auch ein Behandlungsversuch mit dem monoklonalen Antikörper Omalizumab durchgeführt werden. Omalizumab ist ein humanisierter Anti-IgE-

Antikörper, der subkutan alle zwei oder vier Wochen appliziert werden muss. Es bindet an IgE und verhindert somit die Bindung von IgE an den hochaffinen FcεRI-Rezeptor, wodurch die Menge an freiem IgE reduziert wird, welches zum Auslösen der allergischen Kaskade verfügbar ist. Die Behandlung von atopischen Patienten mit Omalizumab führt zu einer merklichen Reduktion der FcεRI-Rezeptordichte auf den basophilen Granulozyten und zu einer verringerten Ausschüttung von Histamin, was sich in der Folge antiinflammatorisch auswirkt (Fachinfo Omalizumab).

Cromone

Des Weiteren werden Cromone in der Therapie eingesetzt, dazu gehören Cromoglycinsäure und das neuere Nedocromil. Sie sind sogenannte Mastzellstabilisatoren, weil sie die allergeninduzierte Degranulation von Mastzellen und damit die Freisetzung von Entzündungsmediatoren hemmen können. Bei den Mediatoren handelt es sich um biologische Effektormoleküle, die entweder in den Zellen bereits präformiert vorliegen (wie beispielsweise Histamin, Kinine, der eosinophile chemotaktische Faktor (ECF) oder der neutrophile chemotaktische Faktor (NCF)), oder die nach Provokation aus arachidonsäurehaltigen Membranstrukturen der Zellen neu synthetisiert werden (wie z.B. Prostaglandine und Leukotriene). Der Wirkmechanismus der Cromone beruht dabei auf einer Interaktion mit IgE-gekoppelten Calciumkanälen. Mastzellstabilisatoren sind in der Lage, den Kanal zu blockieren und so die calciumgetriggerte Degranulation zu verhindern. Cromone sind so gut wie nicht peroral bioverfügbar, haben aber nach lokaler Applikation eine gute Wirksamkeit, die jedoch nicht sofort eintritt. Cromone haben sich in der Dauertherapie des Asthmas bewiesen, wenn auch mit schwächerer Wirksamkeit als Corticosteroide. Aufgrund der geringen

Nebenwirkungsrate sind Cromone eine gute Alternative beispielsweise in der Schwangerschaft. Cromoglycinsäure-haltige Präparate müssen bis zu viermal am Tag appliziert werden, bei Nedocromil reicht eine zweimalige Gabe aus.

2.3 Pulmonale Darreichungsformen

Pulmonale Darreichungsformen müssen so entwickelt sein, dass sie die einer Einzeldosis entsprechende Wirkstoffmenge sicher in der Lunge des Patienten platzieren, so dass der gewünschte Effekt eintreten kann. Entscheidende Faktoren für die Deposition eines Aerosolpartikels oder -tröpfchens sind der aerodynamische Durchmesser (mass median aerodynamic diameter, MMAD) und die Partikelgrößenverteilung des Aerosols, darüber hinaus das Atemzugvolumen des Patienten, der inspiratorische Atemfluss sowie die Atemwegsgeometrie (Voshaar et al., 2001). Dabei sind die einzigen patientenunabhängigen Faktoren MMAD und Verteilung der Partikelgrößen. Partikel, deren MMAD größer ist als 10 μm , werden bei normalen Atemflüssen bereits zu über 90% bei der ersten größeren Richtungsänderung während der Inhalation, also im Oropharynx, abgeschieden. Teilchen ab einer Größe von 3 μm bis 5 μm (je nach der Dichte des Partikels) und größer werden bei Mundatmung effektiv im Bronchialbaum durch Impaktion abgeschieden. Im Partikelgrößenbereich zwischen 5 μm und 0,5 μm ist Sedimentation der relevante Depositionsmechanismus, diese Teilchen gelangen bis tief in die Lunge. Noch kleinere Teilchen diffundieren durch die Brownsche Molekularbewegung entweder an die Wandung der Atemwege oder werden durch den Ausatemstrom wieder ausgetragen. Grundsätzlich können drei pulmonale Darreichungsarten unterschieden werden, das sind:

- Lösungen oder Suspensionen zur Verneblung in einem Druckluft-, Ultraschall- oder Membranvernebler
- Lösungen oder Suspensionen mit Treibmittel in einer Druckgasverpackung als Dosieraerosol (pressurised metered dose inhaler, pMDI)
- Pulverinhalate aus mikronisiertem Wirkstoff, die als interaktive Mischung mit einem Trägerstoff oder agglomeriert zu Softpellets verarbeitet sein können und sich in einem Pulverinhalator (dry powder inhaler, DPI) befinden

Bei allen Darreichungsformen spielt nicht nur die Formulierung für den Erfolg der inhalativen Gabe eine Rolle, sondern auch der verwendete Inhalator hat einen entscheidenden Einfluss. Dementsprechend werden viele pulmonal applizierte Arzneimittel in untrennbarer Einheit mit der entsprechenden Inhalationshilfe vertrieben. Im Fall der pMDIs wird die Formulierung in eine Druckgasverpackung abgefüllt und mit einem Treibmittel, in der Regel einem Hydrofluoralkan (HFA), versetzt. Darin löst sich die Formulierung entweder oder sie liegt als fein verteilte Suspension vor. Verschluss wird der Druckgasbehälter mit einem Dosierventil, das beim Auslösen eine Einzeldosis der entsprechenden Formulierung abteilt und abgibt. Der Behälter wird mit dem Dosierventil nach unten in einen passenden Aktuator eingesetzt, dessen Bohrung für das feine Versprühen und somit für die entstehende Tröpfchengröße entscheidend ist (siehe Abbildung 2.4). Aus diesem Grund wird der Aktuator immer mit dem Dosieraerosol gemeinsam vertrieben. Zur Inhalation ist es normalerweise erforderlich, dass der Patient Auslösevorgang und Atemmanöver koordiniert (press and breathe). Bei neueren atemzuggesteuerten MDIs wird der Inhalator durch Spannen eines Hebels für die Inhalation vorbereitet, das Aerosol wird aber erst beim Einatmen freigegeben.

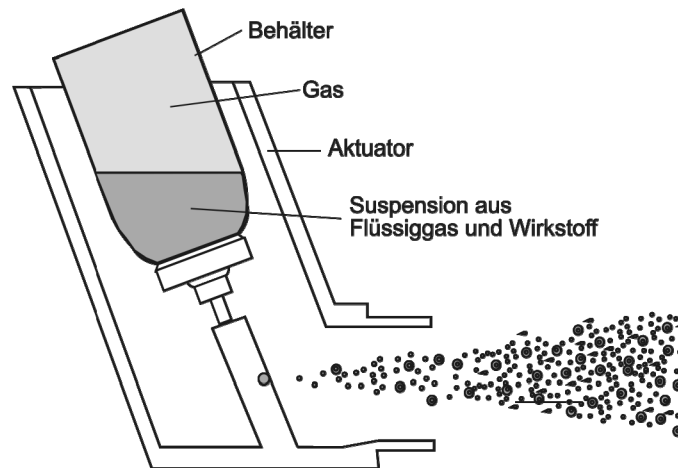


Abbildung 2.4: Dosieraerosol mit Druckgasbehälter, Dosierventil und Aktuator

Lösungen oder Suspensionen zur Verneblung werden als Bulkware oder in Einzeldosisverpackungen angeboten, der entsprechende Vernebler muss vom Arzt (entsprechend der Herstellerempfehlung) zusätzlich verordnet werden. Die Lösung oder Suspension wird in das Reservoir des Verneblers eingefüllt und von diesem dann aktiv dispergiert. Anders als bei pMDIs oder DPIs, deren Inhalationshilfen nach Aufbrauchen bzw. Entleeren des Arzneimittels in der Regel verworfen und mit jeder neuen Einheit erneuert werden, können Vernebler bei entsprechender Pflege über einen längeren Zeitraum verwendet werden, gegebenenfalls sind die produkt- und patientenberührenden Teile regelmäßig auszutauschen. Hier kann des Weiteren zwischen Dauerverneblern und Verneblern, die nur während des Einatemvorgangs Aerosol freisetzen, unterschieden werden.

Pulverinhalatoren stellen die vielfältigste Gruppe der Inhalationshilfen dar, da Pulver zur Inhalation die anspruchsvollsten pulmonalen Formulierungen darstellen und dementsprechend individualisierte Inhalatoren erfordern. Man kann grundsätzlich zwei Varianten von Pulverinhalatoren unterscheiden:

- reservoirbasierte Inhalatoren, in denen ein Bulk an Pulver vorrätig gehalten wird, aus dem die Einzeldosen direkt vor der Inhalation abgeteilt werden (z.B. Turbohaler, siehe Kapitel 3.1.2.2)
- einzeldosierte Pulverinhalatoren, wobei hier die Einzeldosen extern z.B. in Kapseln abgepackt sein können und vor der Inhalation einzeln im Inhalator platziert werden müssen (z.B. Aerolizer, siehe Kapitel 3.1.2.2) oder sich die Einzeldosen vordosiert in einem Blisterstreifen im Inhalator befinden und vor der Inhalation geöffnet werden (z.B. Diskus, siehe Kapitel 4.1).

Bei der Inhalation ist keine Koordination von Auslösen und Atmen erforderlich, da das Inhalat in der Regel erst durch die Inspiration des Patienten dispergiert wird. Dementsprechend sind bei dieser Form der Darreichung Atemzugsvolumen und vor allem Atemfluss des Patienten entscheidend für die Qualität der Dispersion. Es ist jedoch auch eine aktive Dispersion möglich (active device). Die grundlegenden Prinzipien sind in Abbildung 2.5 dargestellt (Telko und Hickey, 2005).

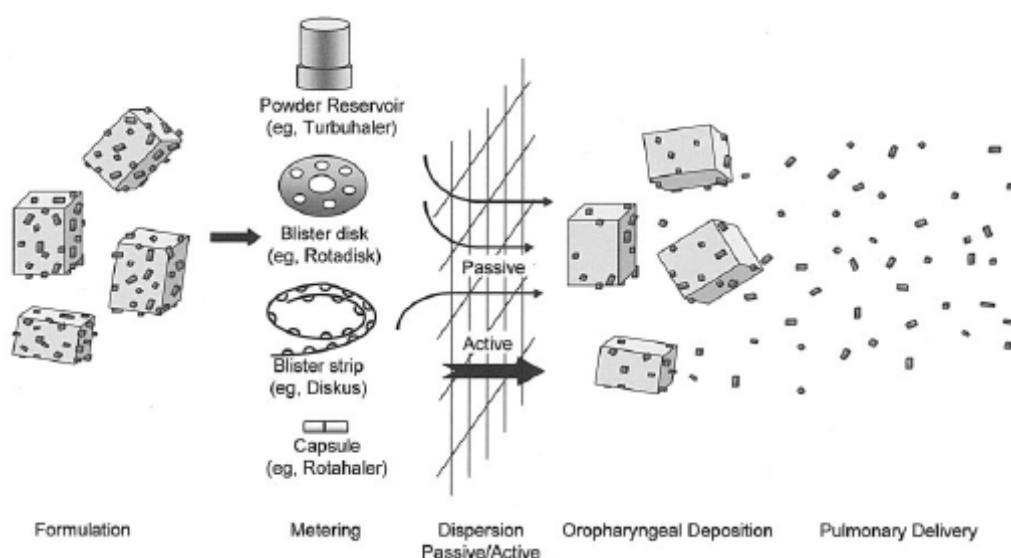


Abbildung 2.5: Prinzip eines Pulverinhalators (aus Telko und Hickey, 2005)

2.3.1 Pulver zur Inhalation

„Pulver zur Inhalation sind Pulver in Einzel- oder Mehrdosenbehältnissen. Zur Erleichterung ihrer Anwendung können die Wirkstoffe mit einem geeigneten Trägerstoff kombiniert werden.“ So einfach definiert das Europäische Arzneibuch (2005b) Inhalationspulver. Die Formulierung von Pulvern zur Inhalation unterliegt jedoch hohen Anforderungen, da das Pulver nicht nur über einen möglichst hohen lungengängigen Feinanteil verfügen soll, sondern dieses feine Pulver auch noch technisch handhabbar sein muss. Das bedeutet, dass das Pulver über ausreichend gute Fließeigenschaften verfügen muss, damit es in Kapseln oder Blister eingefüllt oder aus einem Reservoir abgeteilt werden kann. Gerade in einem Partikelgrößenbereich unter 10 µm, wie er für die pulmonale Applikation erforderlich ist, sind die Kohäsionskräfte zwischen den einzelnen Pulverpartikeln aufgrund der im Vergleich zur Masse großen Oberfläche hoch (Hickey et al., 1994). Darüber hinaus werden Wirkstoffe häufig durch Mahlung in der Luftstrahlmühle zerkleinert, ein Verfahren, das eine hohe Energie in das Produkt einträgt und sehr kohäsive Pulver erzeugt (Joshi et al., 2002). Das führt häufig zu einer Agglomeration (Anhäufung von Primärpartikeln unter Erhaltung der Partikelindividualität) oder Aggregation (Anhäufung von Primärpartikeln, die sich nicht leicht wieder trennen) der Primärpartikel und somit zu einem schlechteren Fließverhalten und erschwert das Redispergieren in die Einzelpartikel vor der Inhalation. Um dieses Problem zu umgehen, werden mikronisierte Wirkstoffe, deren Primärpartikelgröße im inhalativen Bereich liegt, häufig mit einem nicht-mikronisiertem Trägerstoff wie Laktose mit einer Partikelgröße ab 60 µm als interaktive Mischung formuliert. Dabei adhäriert der mikronisierte Wirkstoff an der Oberfläche des Trägerstoffes, liegt so fein verteilt vor und kann bei der Inhalation leichter dispergiert werden. Je nach Beschaffenheit der

Oberfläche wird der Wirkstoff dabei fester oder weniger fest gebunden. Im Fall der Laktose werden sogenannte hot spots beschrieben, also Bereiche höherer Oberflächenenergie, auf denen mikronisierte Partikel besonders gut adhären (Staniforth, 1996). Dort festgehaltene Partikel werden bei der Dispersion im Luftstrom nur schlecht vom Träger getrennt. Wird ein Teil mikronisierter Laktose vor Zugabe des Wirkstoffes zugemischt, besetzt dieser die hot spots, die Wirkstoffpartikel haften an Bereichen niedrigerer Energie an und können leicht dispergiert werden (Zeng et al., 1998). Neben Laktose werden auch feinpartikuläre Hilfsstoffe (Lucas et al., 1998) oder alternative Trägerstoffe (Steckel und Bolzen, 2004) erforscht. Ein anderer Ansatz ist, den mikronisierten Wirkstoff gezielt zu sphärischen Agglomeraten (softpellets) zu verarbeiten, die bessere technische Eigenschaften besitzen als ein mikronisiertes Pulver und sich im Luftstrom leicht in ihre Primärpartikel trennen (Schmidt und Weyhing, 2005). Darüber hinaus kommen particle engineering - Technologien zur Formulierung zum Einsatz. Ziel dieser Technologien ist eine gezielte Herstellung oder Modifikation von Partikeln, so dass sie bestimmte Eigenschaften aufweisen. Bei Pulvern zur Inhalation versucht man beispielsweise durch gezielte Modifikation des Trägers Oberflächen zu erzeugen, von denen der mikronisierte Wirkstoff gut wieder abgelöst werden kann. Ein weiterer Ansatz ist, die Wirkstoffpartikel so herzustellen, dass sie ein besseres Fließverhalten zeigen und im besten Fall auf einen Trägerstoff verzichtet werden kann. So können zum Beispiel durch Sprühtrocknung, Sprühgefriertrocknung (Zijlstra et al., 2004) oder Kristallisation in überkritischen Gasen (Rehman et al., 2003) Partikel mit veränderten aerodynamischen Eigenschaften erzeugt werden, wobei auch der Auswahl geeigneter Hilfsstoffe eine wichtige Bedeutung zukommt (Telko und Hickey, 2005). Diese aufbauenden Verfahren werden auch bottom-up-Techniken

genannt, die Wirkstoffpartikel entstehen dabei nicht durch Zerkleinerung grober Kristalle, sondern aus einer Lösung oder Schmelze des Wirkstoffs. Da neben der Partikelgröße eine Vielzahl weiterer Charakteristika wie Morphologie, Hygroskopizität und Partikeldichte zum aerodynamischen Verhalten des Pulvers beitragen (Chew und Chan, 2002), sind die Möglichkeiten zur Modifikation vielfältig (Chow et al., 2007). Pulver zu Inhalation haben im Vergleich zu pMDI-Formulierungen häufig eine geringere Feinpartikelfraktion (Feddah et al., 2000), haben dafür aber den Vorteil der höheren Stabilität einer festen Darreichungsform.

2.4 Bedeutung der Kombinationstherapie

Bei den Therapiestufen III und IV des Asthmas wird eine Medikation mit inhalierbaren Glucocorticoiden und langwirksamen β_2 -Sympathomimetika empfohlen (siehe Tabelle 2.2), um die komplementäre Wirksamkeit von langanhaltender Bronchialerweiterung durch den LABA plus guter Entzündungshemmung durch das ICS auszunutzen, falls das Glucocorticoid allein zur Kontrolle der Asthmaerkrankung nicht ausreicht (Matz et al., 2001). Neuere Untersuchungen beschreiben allerdings eine positive Interaktion der Wirkstoffklassen, die zu einem mehr als additiven Nutzen für den Patienten führen (Sin und Man, 2006). Die Kombinationstherapie von Glucocorticoid und β_2 -Sympathomimetikum kann einen synergistischen Effekt erzielen (Barnes, 2002). Im Folgenden sollen die pharmakologischen Grundlagen dieser synergistischen Wirkung näher erläutert werden.

Um einen synergistischen Effekt ausüben zu können, müssen die Wirkstoffe nicht nur ihre Einzelwirkung ausüben, sondern zusätzlich die Wirkung des Kombinationspartners positiv unterstützen. Genau diese

Interaktion ist bei Glucocorticoiden und β_2 -Sympathomimetika möglich. Glucocorticoide sind, wie bereits beschrieben, Transkriptions-erhöhende Substanzen, die an Corticoid-sensitiven glucocorticoid response elements (GRE) der DNA andocken. In der Promotor-Sequenz des β_2 -Rezeptor-Gens befinden sich gleich mehrere dieser GRE, so dass die Aktivierung des GC-Rezeptors die Transkription des β_2 -Rezeptor-Gens erhöht und somit die Ausstattung der Zelle mit β_2 -Rezeptoren verbessert (Mak et al., 1995). Dies wirkt der Internalisierung von β_2 -Rezeptoren bei Dauerstimulation entgegen. Dieser Effekt kommt vermutlich an den glatten Muskelzellen klinisch nicht zum Tragen, da diese über eine große Rezeptorreserve verfügen, aber an den anderen β_2 -Rezeptor-tragenden Zellen kann er eine wichtige Rolle spielen und den nicht-bronchodilatorischen Effekt der β_2 -Sympathomimetika erhalten oder verbessern (Barnes, 2002). Darüber hinaus vermag der aktivierte Glucocorticoid-Rezeptor auch die Phosphorylierung und damit Desensitivierung eines membranständigen β_2 -Rezeptors zu verhindern, ein weiterer Effekt, der die Funktionsfähigkeit des Rezeptors und somit die Wirksamkeit von β_2 -agonistischen Substanzen erhält. Bei der Gefahr der Toleranzentwicklung gegenüber kurzwirksamen β_2 -Sympathomimetika spielt das Erhalten der Funktion der β -Rezeptoren durch die zusätzliche Gabe von Glucocorticoiden klinisch eine wichtige Rolle. Umgekehrt haben β_2 -Sympathomimetika auch Einflüsse auf den Glucocorticoid-Rezeptor und nachgeschaltete Effekte. Eickelberg et al. konnten zeigen, dass der GC-Rezeptor auch in Abwesenheit von Glucocorticoiden nach β_2 -Rezeptor-Stimulation aktiviert wird und in den Zellkern einwandert (Eickelberg et al., 1999). An diesem Mechanismus ist offensichtlich das durch β_2 -Stimulation erhöhte cAMP beteiligt. So können β_2 -Sympathomimetika zum antiinflammatorischen Effekt

beitragen. Darüber hinaus beschleunigt die gleichzeitige Gabe von Corticosteroid und β_2 -Sympathomimetikum die Translokation des aktivierten GC-Rezeptors in den Nucleus und erhöht dort seine Bindungsaffinität an den GRE (Sin und Man, 2006). Ein phosphorylierter und damit inaktivierter β_2 -Rezeptor kann wiederum einen zweiten Signalweg über eine MAP-Kinase nutzen, um den inaktiven GC-Rezeptor zu phosphorylieren und damit GC-sensibler zu machen (Adcock et al., 2002). Dadurch verbessert die simultane Wirkung von β_2 -Sympathomimetikum und GC den Effekt der Glucocorticoide. Als Hauptschauplatz der synergistischen Wirkung wird zunehmend die glatte Muskulatur der Atemwege diskutiert, da sie nicht nur den Ort des bronchodilatorischen Effekts darstellt, sondern auch zur Synthese diverser Mediatorsubstanzen wie Interleukin-6 und -8, GM-CSF (Granulozyten- und Makrophagen- koloniestimulierender Faktor) und MCP (Monozyten-chemoattraktives Protein) befähigt ist und damit eine immunmodulatorische Einheit darstellt (Howarth et al., 2004).

Eine Kombinationstherapie aus ICS und LABA kann separat aus zwei Inhalatoren appliziert werden oder als feste Kombination aus einem Inhalator. Dabei hat die Gabe aus einem Inhalator mehrere Vorteile. Zum einen vereinfacht es dem Patienten die Einnahme seiner Medikation, da er nur noch einen Inhalator verwenden muss, zum anderen erhöht die feste Kombination auch die Compliance, das heißt, die Akzeptanz der Therapie und daraus folgend die Mitarbeit des Patienten, vorrangig in Bezug auf das Glucocorticoid (Holt et al., 2004). Bei der Einnahme des β_2 -Sympathomimetikums verspürt der Patient einen unmittelbaren Nutzen durch die Erweiterung der Bronchien, während die Einnahme des Glucocorticoids keinen sofortigen Effekt verspüren lässt und somit die Bereitschaft zur Einnahme mit zunehmender Behandlungsdauer sinkt. Dies gilt insbesondere vor dem Hintergrund der immer noch weit

verbreiteten „Cortison-Angst“, das heißt der Angst vor Nebenwirkungen einer Therapie mit Corticoiden. Darüber hinaus kommt der synergistische Effekt von ICS und LABA bei der Applikation aus einem Produkt besser zum tragen, da die Deposition der Wirkstoffpartikel mit ein und demselben Atemzug erfolgt und somit die Atemzug-individuellen Schwankungen nicht ins Gewicht fallen. Dadurch ist eine potentielle Codeposition im Vergleich zur Gabe aus zwei Inhalatoren begünstigt. Nelson et al. haben dazu eine Metastudie veröffentlicht, die einen klinischen Nutzen und damit einen Vorteil der Kombinationstherapie aus einem einzigen Inhalator belegt (Nelson et al., 2003).

3 Analytische Methoden

3.1 Partikelgrößenbestimmung

Zur Bestimmung der Größe eines Partikels können verschiedene Verfahren herangezogen und unterschiedliche Parameter betrachtet werden. Um einen Partikel zu beschreiben, sind in der Regel wenigstens drei Parameter notwendig (Länge, Breite, Tiefe). Betrachtet man einen Partikel zweidimensional in einer Ebene, zum Beispiel im Lichtmikroskop, so können der Feret-Durchmesser (längste Ausdehnung in Betrachtungsrichtung), der Martinsche Durchmesser (Durchmesser, der die Partikelfläche in zwei gleich große Teile teilt) oder auch der Durchmesser eines flächenäquivalenten Kreises bestimmt werden. Anhand des Umrisses können Parameter wie Rundheit, Rauheit und aspect ratio (Verhältnis von längstem Durchmesser zu kürzestem Durchmesser) errechnet werden. Darüber hinaus können der volumen-, sedimentations-, oberflächen- oder massenäquivalente Kugeldurchmesser abgeleitet werden. Die Laserdiffraktion zählt, wie auch die siebanalytische Bestimmung der Teilchengrößenverteilung (eine

Siebfraktion wird ausgewogen), zu den Mengemessverfahren, wohingegen eine bildanalytische Betrachtung von Partikeln ein Zählverfahren (d.h. es werden Einzelpartikel betrachtet) darstellt. Dementsprechend unterscheiden sich die Teilchengrößenverteilungen; bei Zählverfahren werden alle Teilchengrößen annähernd gleich gewichtet, wohingegen bei Mengemessverfahren große (und damit schwere) Partikel überbewertet werden und es somit zu einer Verschiebung hin zu größeren mittleren Teilchengrößen kommt.

Für die Partikelgrößenbestimmung von Pulvern zur Inhalation muss beachtet werden, dass sich Partikel einerseits im Luftstrom ausrichten und somit ein kleineren Partikeln äquivalentes Flugverhalten zeigen können, Partikel andererseits aber auch miteinander agglomerieren können und so als größere Partikel erscheinen (Telko und Hickey, 2005). Darüber hinaus ist für die sogenannte aerodynamische Teilchengröße auch die Dichte der Pulverpartikel ausschlaggebend, da Partikel geringerer Dichte bei gleichem Durchmesser leichter vom Luftstrom mitgeführt werden können als Partikel hoher Dichte und somit wie kleinere Partikel erscheinen. Entscheidend für die pulmonale Applikation sind weniger die partikelindividuellen Charakteristika eines Pulvers, wie die Rundheit, als vielmehr seine Teilchengrößenverteilung und sein Dispersionsvermögen, da nur Partikel kleiner $5\ \mu\text{m}$ die Lunge erreichen. Größere Partikel werden hingegen schon im Oropharynx abgeschieden, erreichen somit den Wirkort nicht und sind entweder nutzlos oder führen gar zu unerwünschten Wirkungen. Somit sollte ein Pulver zur Inhalation über einen möglichst großen Anteil von Partikeln mit einer Größe kleiner $5\ \mu\text{m}$ verfügen (Hickey et al., 1996). Dieser Anteil wird auch als Feinpartikelfraktion (FPF) bezeichnet.

3.1.1 Laserdiffraktion

Ein einfaches und schnelles Verfahren zur Bestimmung der Teilchengröße von Pulverpartikeln ist die Laserdiffraktion oder Laserbeugung. Dabei macht man sich zunutze, dass ein Laserstrahl definierter Wellenlänge an einem Partikel in Abhängigkeit von dessen Größe charakteristisch gebeugt wird. Aufgrund des entstehenden Beugungsringmusters und des Beugungswinkels können nach der Theorie von Fraunhofer oder Mie Rückschlüsse auf die entsprechende Größe der Partikel im Probenvolumen gezogen werden. Kleine Partikel erzeugen größere Beugungsringe von geringerer Intensität, wohingegen große Partikel einen kleineren Beugungswinkel aufweisen, der Beugungsring aber von höherer Intensität ist. Dabei muss beachtet werden, dass die Berechnung auf der Grundlage einer volumengleichen Kugel erfolgt und daher streng genommen nur für ideale Kugeln gilt; dies ist eine Anforderung, der reale Partikel in der Regel nicht genügen. Die Details der Teilchengrößenbestimmung mithilfe der Laserdiffraktometrie sind in der ISO-13320-1 (1999) beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Laserdiffraktion verwendet, um eine erste Charakterisierung der hergestellten Formulierungen durchzuführen. Dabei wurde ein Sympatec Helos Laserdiffraktometer (Sympatec, Clausthal-Zellerfeld, Deutschland) mit einem 623,8 nm Helium-Neon-Laser benutzt. Das Gerät verfügt über verschiedene Aufgabesysteme, die eine Dispergierung und damit eine Separierung der Pulverpartikel voneinander gewährleisten sollen. Durch die Variation der Linse, die dem Detektor vorgeschaltet ist, kann der Messbereich in einem weiten Bereich (0,1 µm bis 8750 µm) variiert werden. In der Regel wurde die Linse 2 mit einem Messbereich von 0,45 µm bis 87,5 µm verwendet. Diese Linse ist sowohl für die Trockendispergierung mithilfe des Rodos-Aufgabesystems geeignet als auch für die Messung in Dispersion in der

Küvette. Für die Trockenaufgabe wurde das Pulver mit 3 bar Druckluft dispergiert und in den Messspalt geblasen, dabei musste eine optische Mindestkonzentration von 0,5% erreicht werden, um Messdaten aufzuzeichnen. Für die Messung in Dispersion wurde das Pulver in Salmeterolxinafoat-gesättigtem Wasser mithilfe eines Ultraschallbades 15 sec dispergiert, anschließend sofort in die 6 ml Quarzküvette überführt und im Messspalt fixiert. Die optische Konzentration wurde bei der Messung in Dispersion zwischen 10% und 30% eingestellt. Alle Messungen wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt. Als Blindwert diente das reine Dispersionsmedium (Druckluft oder Salmeterolxinafoat-gesättigtes Wasser). Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Windox Software (Version 4, Sympatec), welche die Partikelgrößenverteilung nach der Fraunhofer-Theorie aus der Lichtintensitätsverteilung am Detektor durch das Lösen einer Fredholm-Integralgleichung in eine Partikelgrößenverteilung umrechnet und als Verteilungskurve und Summenhäufigkeitsverteilung ausgibt (Röthele und Witt, 1999). Dabei wird die relative volumenbezogene Häufigkeit Q_3/x gegen die Partikelgröße aufgetragen. Daraus abgelesen werden die Kenngrößen der Partikelgrößenverteilung x_{10} (10% der Partikel des Kollektivs sind kleiner oder gleich groß als der Wert), x_{50} (50% der Partikel der Probe sind kleiner oder gleich groß) und x_{90} (90% der Partikel fallen unter diese Teilchengröße).

3.1.2 Aerodynamische Untersuchungen

Zur Bestimmung der aerodynamischen Teilchengröße und der daraus berechenbaren Feinpartikelfraktion eines Aerosols werden Kaskadenimpaktoren verwendet. Ein Kaskadenimpaktor besteht aus einer oder mehreren aufeinander folgenden Stufen oder Düsen (nozzle plates) mit darunter liegenden Sammelplatten, auf denen Partikel oder

Tröpfchen eines Aerosols entsprechend ihrer Flugeigenschaften abgeschieden und somit klassifiziert werden. Dabei wird die zu testende Substanz mit einem konstanten Luftstrom für eine definierte Zeit durch die Apparatur gesaugt. Die Partikel sedimentieren (Ablagerung aufgrund der Schwerkraft) oder impaktieren (Ablagerung aufgrund von Trägheit) entweder aufgrund ihrer schlechten aerodynamischen Eigenschaften auf den ersten Stufen des Impaktors (große oder schwere Partikel) oder können vom Luftstrom weit mitgetragen werden, so dass sie erst auf den hinteren Stufen abgeschieden werden. Kaskadenimpaktoren stellen jedoch keine in-vitro-Lunge dar, da sie entgegen der physiologischen Verhältnisse bei einem konstanten Fluss betrieben werden. Dementsprechend kann von der Abscheidung in einem Impaktor nicht ohne weiteres auf die Deposition in vivo rückgeschlossen werden. Dennoch lässt die Bestimmung der Feinpartikelfraktion gute Vorhersagen für die zu erwartende lungengängige Fraktion eines oder mehrerer Wirkstoffe in vivo zu (Mitchell und Nagel, 2003). Im aktuellen Arzneibuch sind drei verschiedene Impaktoren beschrieben (Ph. Eur. 5.1, 2.9.18, (2005a), Geräte C, D, E), die zur Bestimmung des „Feinanteils der Dosis“ entsprechend der Monographie „Zubereitungen zur Inhalation: Pulver zur Inhalation“ (2005b) verwendet werden dürfen. Dies sind der mehrstufige Flüssigkeitsimpaktor (Multi Stage Liquid Impactor, MSLI), bei dem vier flüssigkeitsbedeckte Abscheidestufen und eine Filterendstufe vorliegen, der Andersen-Kaskadenimpaktor (ACI) mit acht Abscheidestufen und einem Endfilter und neuerdings der Next Generation Pharmaceutical Impactor (NGI) mit sieben Abscheidestufen und einem Mikroöffnungskollektor (MOC), der den Endfilter in der Regel ersetzt. Ein wertender Vergleich dieser Impaktoren wurde 2004 von Mitchell und Nagel (Mitchell und Nagel, 2004) veröffentlicht. Die Autoren stellen fest, dass für unterschiedliche Anwendungen verschiedene

Impaktoren zur Anwendung kommen können, wobei keiner der Impaktortypen grundsätzlich überlegen ist. Sie stellen heraus, dass die in unterschiedlichen Impaktoren gewonnenen Daten nicht ohne weiteres miteinander verglichen werden dürfen und betonen die Notwendigkeit von einfachen Methoden, die eine hohe Reproduzierbarkeit der erhaltenen Werte gewährleisten. Auch wenn dies nicht im Einklang mit den aktuellen Arzneibuchvorschriften ist, empfehlen sie die Verwendung von Atemzugprofilen sowie eines anatomisch geformten Rachens, um die Deposition von therapeutischen Aerosolen im Respirationstrakt besser zu verstehen.

3.1.2.1 NGI

Der Next Generation Pharmaceutical Impactor (NGI) wurde von einem Konsortium von 15 pharmazeutischen Firmen (Next Generation Impactor Consortium) unter der Führung von MSP (MSP Corporation, Shoreview, Minneapolis, USA) gezielt zur Testung pharmazeutischer Aerosole entwickelt, nachdem die zugrunde liegenden Mechanismen der Partikelabscheidung in Impaktoren aufgeklärt waren. Das Design, die Funktionalität und die Kalibrierung des NGI wurden ausführlich in der Literatur dokumentiert (Marple et al., 2003a, Marple et al., 2003b), 2005 hat er Eingang in das amerikanische Arzneibuch (USP 28) gefunden und seit Herbst 2005 wird er auch im Europäischen Arzneibuch beschrieben. Im Vergleich zu anderen Impaktoren hat der NGI den Vorteil, dass er über einen weiten Flussratenbereich (15 - 100 l/min) kalibriert ist (Marple et al., 2004) und dass er über sehr scharfe Trennungen zwischen den einzelnen Stufen verfügt, so dass die Abscheidung der Partikel in klar abgegrenzten Klassen erfolgt. Aufgrund der nebeneinander liegenden Abscheidestufen, im Unterschied zu übereinander gestapelten Stufen bei anderen Impaktoren, ist das praktische Arbeiten mit dem NGI deutlich

erleichtert. Darüber hinaus sind die Ablagerungen an Flächen zwischen den Stufen im Vergleich zum ACI deutlich geringer (Kamiya et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde der NGI (Abbildung 3.1 und Abbildung 3.2) mit dem Vorabscheider (preseparator) in Kombination mit verschiedenen Aufgabesystemen verwendet, die untenstehend genauer erläutert werden. Entsprechend der Vorgaben des Arzneibuchs wurde der NGI bei einer Flussrate betrieben, die einem Druckabfall von 4 kPa über das Gerät entsprach. Entsprechend der Flussrate wurde die Auslösezeit so berechnet, dass sie einem Inspirationsvolumen von vier Litern gleichkam. Dies ist das mittlere Einatemvolumen eines Erwachsenen bei forcierter Inhalation.

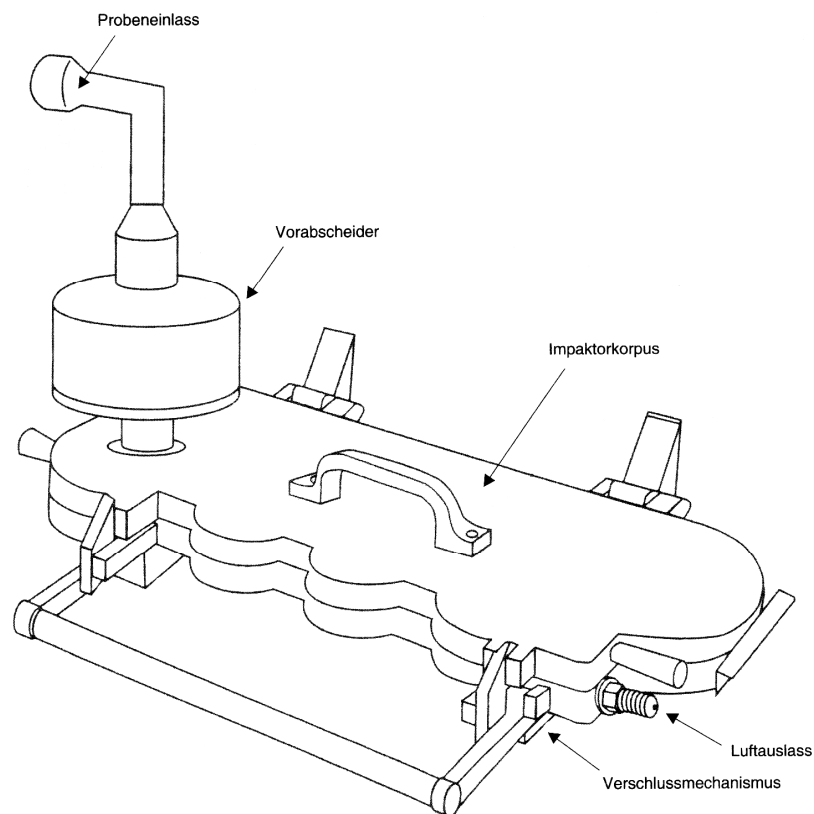


Abbildung 3.1: NGI (geschlossen) mit aufgesetztem Vorabscheider und Rachen

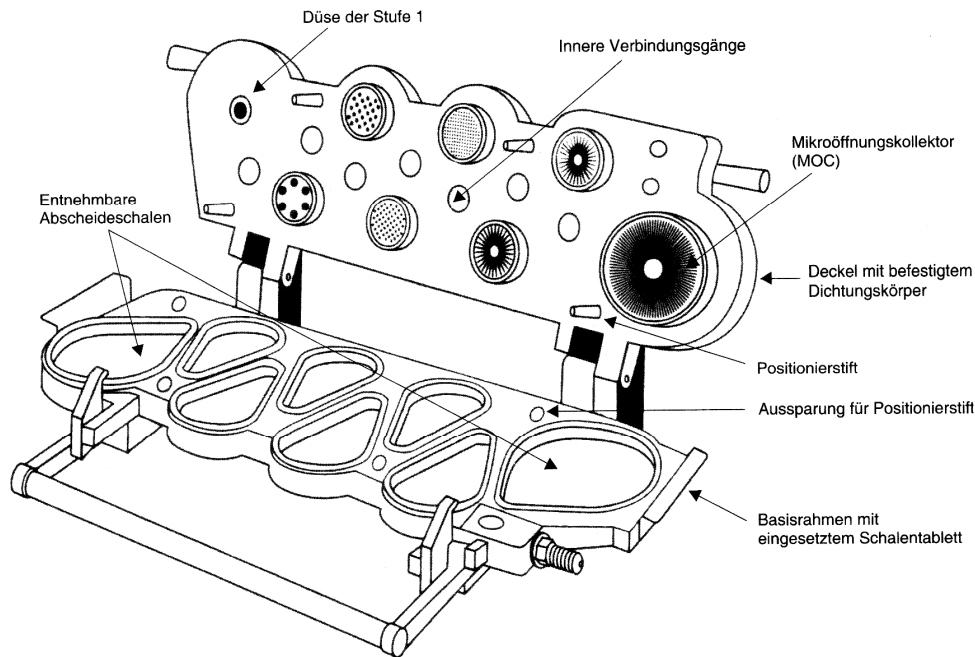


Abbildung 3.2: NGI (geöffnet) mit den 7 Trennstufen und dem Mikroöffnungskollektor (MOC)

In Tabelle 3.1 sind die entsprechenden Flussraten und die resultierende Auslösezeit aufgeführt. Der konstante Fluss wurde durch eine Vakuumpumpe (H.-D.-Pumpe, Erweka GmbH, Heussenstamm, Deutschland) gewährleistet, deren Fluss durch einen vorgeschalteten Flussregulierer mit Zeitschaltuhr (TPK, Copley Scientific Ltd., Nottingham, Großbritannien) eingestellt wurde. Da der resultierende Maximalfluss 90 l/min betrug, wurden die Bestimmungen mit dem Aerolizer bei 90 l/min durchgeführt und die Berechnungen entsprechend adaptiert.

Alle Sammelplatten des NGI wurden mit einem haftenden Überzug (stage coating) versehen, um das Abprallen von Partikeln zu minimieren, wie es im Arzneibuch vorgeschrieben ist. Dazu wurde eine Mischung von Brij 35 in unvergälltem Alkohol und Glycerol (15 Teile Brij 35 in 85 Teilen Ethanol-Glycerol (6+4 m/m)) direkt vor der Analyse auf die einzelnen Stufen aufgespritzt, der NGI wurde nach kurzer Trocknungszeit

verschlossen und mit Preseparator und Rachen versehen. Das mit Inhalationspulver gefüllte Aufgabesystem wurde mit einem geeigneten, dicht abschließenden Adapter auf den Rachen montiert und die Vakuumpumpe gestartet. Durch Auslösen der Zeitschaltuhr wurde für die zuvor eingestellte Auslösezeit ein Luftstrom durch das Gerät freigegeben, der die Pulverdosis in den NGI dispergierte. Nach Abschluss des Dispergierens wurde die Vakuumpumpe ausgestellt, der NGI geöffnet, alle Teile mit einem Lösemittelgemisch aus 75 Teilen Methanol (HPLC-Reinheit, Baker, Niederlande) und 25 Teilen frischem Aqua bidest. ausgewaschen und diese Proben der HPLC-Analytik zur Wirkstoffquantifizierung zugeführt. Alle Bestimmungen wurden drei Mal durchgeführt, bei sehr kleinen Chargen gegebenenfalls zwei Mal. Aus den Ergebnissen der quantitativen Wirkstoffbestimmung konnte, wie in 3.1.2.3 beschrieben, der mittlere aerodynamische Durchmesser (MMAD) sowie die Feinpartikelfraktion $< 5 \mu\text{m}$ bestimmt werden.

Tabelle 3.1: Flussraten und Auslösezeiten für unterschiedliche Aufgabesysteme des NGI

Aufgabesystem	Flussrate für 4 kPa Druckabfall	resultierende Auslösezeit
rack (einfaches Aufgabesystem)	80 l/min	3 sec
Aerolizer	100 l/min (90 l/min)	2,4 sec (2,7 sec)
Turbohaler	60 l/min	4 sec
Flowcaps	32 l/min	7,5 sec

3.1.2.2 Aufgabesysteme

Bei Pulverinhalaten dient das Inhalationsgerät häufig nicht bloß als Aufgabesystem für die pulmonale Applikation, sondern stellt einen wichtigen Bestandteil der Arzneiform dar, da der Inhalator die wichtige

Funktion des Dispergierens übernimmt. Pulverinhalate sind oft agglomerierte Partikelkollektive, deren Partikel vor der Inhalation in ihre Primärpartikel getrennt werden müssen. Dies erfolgt durch ein Zerreißen im wirbelnden Luftstrom oder auch durch Prall an Wandungen oder Prallplatten des Inhalators (Crowder et al., 2001). Dementsprechend können verschiedene Inhalatoren zu unterschiedlich gut dispergierten Pulvern führen, die in der Folge ein voneinander abweichendes aerodynamisches Verhalten mit unterschiedlich hohen Feinpartikelfraktionen zeigen. Für die Untersuchung des aerodynamischen Verhaltens der Formulierungen wurde in den meisten Fällen der Aerolizer, ein kapselbasierter Inhalator, verwendet. Um das Verhalten der Formulierungen in Abhängigkeit vom Aufgabesystem zu charakterisieren, wurden jedoch auch andere Aufgabesysteme getestet (siehe Kapitel 5.2.2.7).

Aerolizer

Der Aerolizer (Abbildung 3.3) ist ein kapselbasierter Inhalator mit einem niedrigen Atemzugswiderstand. Er ist in verschiedenen Varianten (Aerolizer und Cyclohaler) auf dem Markt. Die zu inhalierende Einzeldosis ist in eine Kapsel abgefüllt, welche direkt vor der Inhalation in den geöffneten Inhalator eingelegt und nach dem Schließen des Inhalators von beiden Seiten durch kleine Nadeln angestochen wird. Anschließend wird der Inhalator an den Mund gesetzt und tief durch ihn eingeatmet. Durch den Einatemstrom des Patienten wird die Kapsel aus der Einlegevertiefung herausgehoben und beginnt zu rotieren, was zur Dispersion des Pulvers führt.

Die zu testenden Formulierungen wurden direkt in Hartgelatinekapseln der Größe 3 (Capsugel, Colmar, Frankreich) eingewogen. Dabei wurde die Wirkstoffmenge pro Analyse (run) an die Sensitivität der quantitativen Wirkstoffanalytik angepasst. Es waren mindestens 5 mg Wirkstoff

notwendig, so dass je nach Formulierung zirka 10 mg Pulver (bei interaktiven Mischungen auch deutlich mehr) pro run gebraucht wurden. In den meisten Fällen konnte die entsprechende Menge in eine einzige Kapsel eingewogen werden. Die gefüllten Kapseln wurden bis zur Analyse bei Raumtemperatur (22°C) im Exsikkator über Silicagel gelagert. Zur Analyse wurde die Kapsel in den Aerolizer eingelegt, angestoßen, der Luftstrom einmal ausgelöst und anschließend visuell überprüft, ob die Kapsel vollständig entleert war. War dies nicht der Fall, folgte ein zweites Auslösen, wie es der Patient bei der Benutzung des Aerolizers auch tun sollte. Die entleerte Kapsel wurde anschließend ausgewaschen und der Wirkstoffgehalt der Lösung bestimmt.

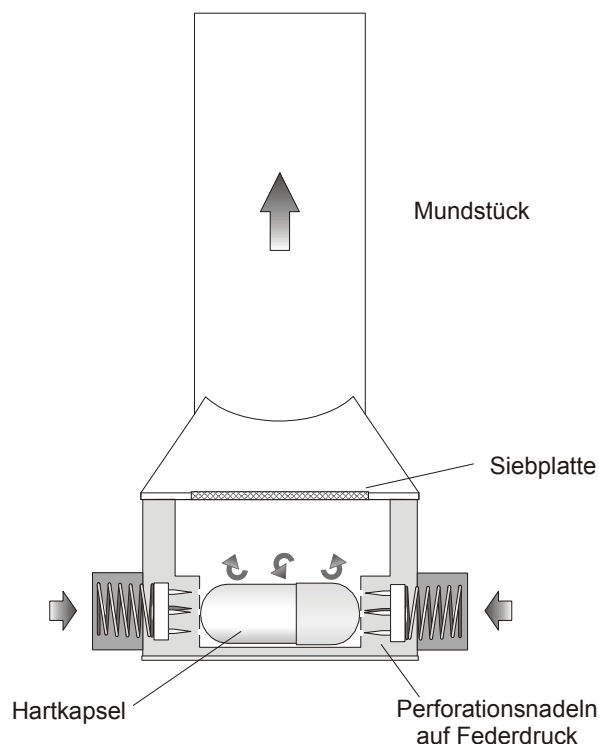


Abbildung 3.3: der Aerolizer

Einfaches Pulveraufgabesystem

Ein einfaches Pulveraufgabesystem (Abbildung 3.4) dient der Aufgabe eines Inhalationspulvers in den NGI ohne weitere Dispergierhilfen, die eine Dispersion des Pulvers fördern könnten. Somit wird allein die Dispersionskapazität des von der Vakuumpumpe erzeugten Luftstroms zur Zerstäubung ausgenutzt. Das Aufgabesystem wurde am Institut in Kiel entwickelt und beschrieben (Steckel und Bolzen, 2004). Es besitzt eine Vertiefung, in die die zu dispergierende Einzeldosis eingebracht und die nach der Aktivierung der Vakuumpumpe durch einen Hebel umgedreht wird. Dabei wird das Pulver in den Luftstrom entleert und von diesem mitgerissen. Das Pulveraufgabesystem wird mithilfe eines Adapters luftdicht an den Rachen des NGI angesetzt. Die zu testenden Formulierungen wurden auf einem Wägebepapier abgewogen und in die Vertiefung gefüllt. Anschließend wurde das Wägebepapier zurückgewogen, um möglicherweise verbliebene Pulverreste zu quantifizieren.

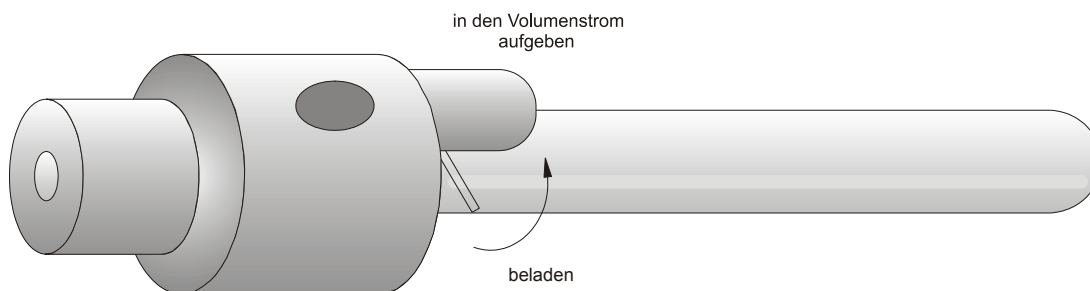


Abbildung 3.4: einfaches Pulveraufgabesystem

Die Vakuumpumpe wurde bei einer Flussrate von 80 l/min so lange betrieben, bis der Dispergiervorgang abgeschlossen war. Anschließend erfolgte die Quantifizierung des Wirkstoffes auf den Stufen des NGI und der am Aufgabesystem verbliebenen Reste.

Flowcaps - Inhalator

Der Flowcaps-Inhalator (Abbildung 3.5) wurde von Hovione (Loures, Portugal) entwickelt und stellt einen dem Aerolizer ähnlichen, kapselbasierten Inhalator dar. Im Unterschied zum Aerolizer können beim Flowcaps-Inhalator bis zu vierzehn Kapseln auf Vorrat im Inhalator mitgeführt werden. Das erleichtert dem Patienten die Anwendung des Inhalators, wenn er sein Arzneimittel unterwegs benötigt. Der Flowcaps-Inhalator ist ein Inhalator mit einem hohen Atemzugwiderstand, dementsprechend wird er bei einer deutlich geringeren Flussrate analysiert als der Aerolizer. Für diesen Inhalator wurden Hydroxypropylmethylcellulose-Kapseln der Größe 4 (blau gefärbt, Hovione, Loures, Portugal) verwendet, in die das zu analysierende Pulver direkt eingewogen wurde. Die Kapseln wurden bis zur Verwendung bei Raumtemperatur (22°C) im Exsikkator über Silicagel gelagert, dann einzeln im Inhalator platziert und durch ein Verdrehen des Inhalator-Oberteils gegen das Unterteil an beiden Enden angeschnitten. Anschließend wurde der Inhalator mit einem geeigneten Adapter am NGI angesetzt, der dispergierende Luftstrom freigegeben und visuell überprüft, ob die Kapsel entleert war. War dies nicht der Fall, folgte ein zweites Auslösen. Anschließend wurde durch Zurückdrehen von Ober- gegen Unterteil die entleerte Kapsel aus dem Inhalator entfernt, ausgewaschen und die verbliebene Wirkstoffmenge wurde ebenso wie die Wirkstoffmenge auf den einzelnen Stufen des NGI quantifiziert.

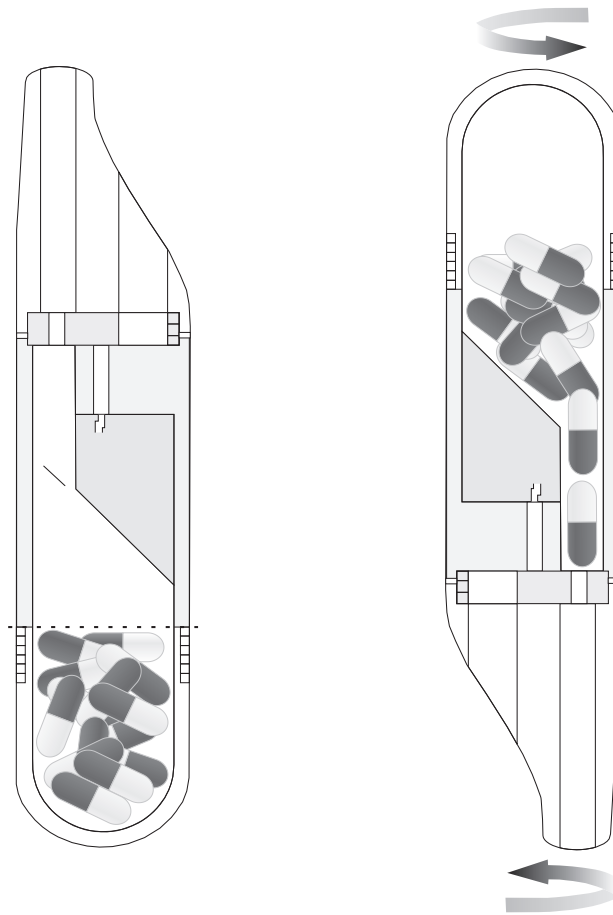


Abbildung 3.5: der Flowcaps-Inhalator

Turbohaler

Der Turbohaler (Abbildung 3.6), eine Entwicklung von Astra Zeneca, ist kein einzeldosierter Inhalator, sondern ein Reservoir-Inhalator. Im Inhalator befindet sich ein Pulverreservoir, unter dem beim Drehen des Inhalatorbodens eine Dosierscheibe (gelochtes Dosierrad) entlang bewegt wird. Durch die über dem Dosierrad angebrachten Schaber wird eine entsprechende Menge an Inhalationspulver in die Dosierlöcher eindosiert und mit dem Weiterdrehen der Dosierscheibe vom Pulverreservoir zum Inhalationskanal bewegt. Durch diesen Kanal inhaliert der Patient und dispergiert damit das Pulver, das im Mundstück des Inhalators durch eine Verwirbelungsdüse (gedrehte Luftführungskanäle) in einem wirbelnden Luftstrom zerrissen wird. Der

Inhalator besitzt einen mittleren Atemzugswiderstand sowie ein sehr effektives Dispergiersystem.

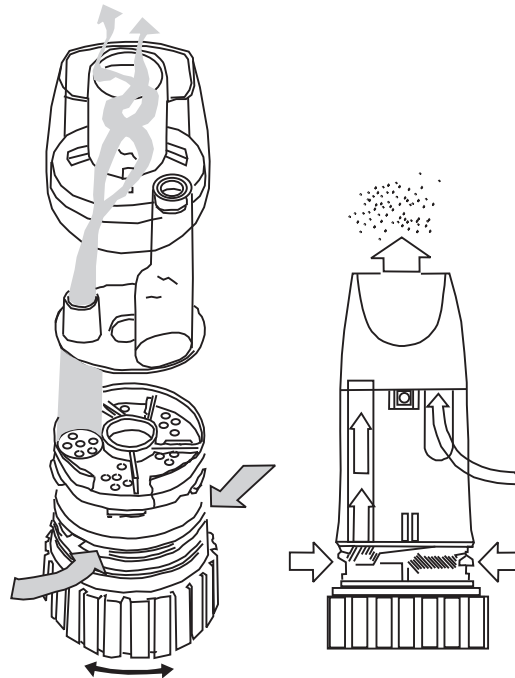


Abbildung 3.6: der Turbohaler

Für diese Arbeit wurde das Pulverreservoir des Inhalators mit der zu testenden Formulierung befüllt und gewogen. Anschließend wurde der Inhalator durch Drehen des Dosierades für die Inhalation vorbereitet, durch einen Adapter am Rachen des NGI befestigt und der Luftstrom durch den NGI ausgelöst. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis die Differenzwägungen ergaben, dass eine für die Quantifizierung ausreichende Menge Pulver in den NGI abgegeben wurde. Um die Schwerkraft-Füllung zu forcieren, wurde der Inhalator jeweils einmal mit dem Boden fest auf die Tischplatte aufgesetzt.

3.1.2.3 Auswertung

Die Auswertung der aerodynamischen Untersuchungen erfolgte mit den Ergebnissen der Wirkstoffquantifizierung der einzelnen Stufen des NGI. Dabei wurden in der Regel 11 Proben pro run ausgewertet, diese

stammten aus Rachen und Adapter bzw. Inhalator, Preseparator, Abscheidestufen 1-7, Mikroöffnungskollektor und der ausgewaschenen Kapsel (bei Verwendung eines kapselbasierten Inhalators). Die Wirkstoffanalytik unterscheidet die Menge an Salmeterolxinafoat M_{SX} und die Menge an Fluticasonpropionat M_{FP} . Die Summe der Wirkstoffgehalte aller Proben M_{GSX} und M_{GFP} ergibt die Gesamtwirkstoffmenge M_G (Gleichung 3.1). Durch Gehaltsbestimmung der eingesetzten Formulierung wurde der Wirkstoffanteil $\%_{WS}$ bestimmt, durch Multiplikation mit von $\%_{WS}$ der im run eingesetzten Pulvermasse M_K (Kapselfüllung) ergibt sich die Soll-Gesamtmenge M_{Gs} (Gleichung 3.2). Das Verhältnis von M_G zu M_{Gs} ergibt die Wiederfindung für den entsprechenden run (Gleichung 3.3), diese musste zwischen 75% und 125% liegen, ansonsten wurde der run verworfen.

$$M_G = M_{GSX} + M_{GFP} \quad \text{Gleichung 3.1}$$

$$M_{Gs} = \frac{\%_{WS}}{100} \cdot M_K \quad \text{Gleichung 3.2}$$

$$\text{Wiederfindung} = \frac{M_G}{M_{Gs}} \cdot 100\% \quad \text{Gleichung 3.3}$$

Für die Bestimmung der Feinpartikelfraktion wurde, beginnend mit der untersten Stufe (MOC), die relative Summenhäufigkeit, bezogen auf M_G , bestimmt, gegen den dekadischen Logarithmus der höchsten noch abgeschiedenen Partikelgröße (Grenzdurchmesser, oberer cutoff, effective cutoff diameter (ECD)) der entsprechenden Stufe aufgetragen und die relative Summenhäufigkeit bei 5 μm interpoliert. Dabei berechnet

sich der cutoff d der Stufen entsprechend der verwendeten Flussrate Q nach Arzneibuch (Ph. Eur. 5.1, 2.9.18-9) wie in Tabelle 3.2 dargestellt.

Rechnerisch lässt sich die FPF durch folgende Rechenabfolge bestimmen:

1. Bestimmung der cutoffs der Stufen nach Tabelle 3.2
2. Bestimmung der relativen Summenhäufigkeit für die einzelnen Proben
3. Berechnung der entsprechenden Quantile der Normalverteilung (Normits)
4. lineare Regression des dekadischen Logarithmus des ECD gegen die Quantile und Bestimmung der Geradengleichung (Quantil = a · log ECD + b)
5. Berechnung des Quantils und daraus der relativen Summenhäufigkeit für einen ECD von 5 µm

Die so berechnete FPF ist der Feinanteil der insgesamt wiedergefundenen Wirkstoffmenge; durch Bereinigung um den in der Kapsel wiedergefundenen und somit nicht dispergierten (nicht abgegebenen) Anteil M_K lässt sich daraus der Feinanteil der abgegebenen Dosis FPF_{ED} berechnen (Gleichung 3.4), der entsprechend höher liegt.

$$FPF_{ED} = \frac{FPM}{M_G - M_K} \cdot 100\% \quad \text{Gleichung 3.4}$$

FPM = Feinpartikelmasse, berechnet aus FPF und M_G

Tabelle 3.2: Bestimmung des Grenzdurchmessers

Grenzdurchmesser (μm)	x	Stufe
$d_7 = 0,34 \cdot q$	0,67	MOC
$d_6 = 0,55 \cdot q$	0,60	Stufe 7
$d_5 = 0,94 \cdot q$	0,53	Stufe 6
$d_4 = 1,66 \cdot q$	0,47	Stufe 5
$d_3 = 2,82 \cdot q$	0,50	Stufe 4
$d_2 = 4,46 \cdot q$	0,52	Stufe 3
$d_1 = 8,02 \cdot q$	0,54	Stufe 2

mit $q = (60/Q)^x$ und x aus der Tabelle 3.2, Q = Flussrate

Zur Bestimmung des massenmittleren aerodynamischen Durchmessers (MMAD) wurde dieselbe Auftragung wie für die FPF gewählt. Der bei einer Summenhäufigkeit von 50% extrapolierte Wert entspricht hierbei dem MMAD, die geometrische Standardabweichung (GSD) errechnet sich dann nach Gleichung 3.5, wobei X die bei einer Summenhäufigkeit von 84% extrapolierte Partikelgröße ist und Y die bei 14% abgelesene (Bosquillon et al., 2001).

$$GSD = \sqrt{\frac{X}{Y}}$$

Gleichung 3.5

Darüber hinaus wurde die Abscheidung auf den einzelnen Stufen des NGI wirkstoffindividuell ausgewertet, um eine Aussage über die Gleichmäßigkeit der Abscheidung der beiden Wirkstoffe zu erhalten. Dazu wurde für jeden Wirkstoff einzeln die Gesamtwirkstoffmenge M_{GSX} und M_{GFP} bestimmt und die prozentualen Anteile auf den einzelnen Stufen errechnet. Mit einem Student-t-Test (siehe Kapitel 3.7) konnten im Anschluss die relativen Wirkstoffablagerungen auf jeder Stufe miteinander verglichen werden. Ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$)

zwischen %_{SX} und %_{FP} deutet dabei auf eine voneinander unabhängige Abscheidung hin, während das Fehlen eines signifikanten Unterschieds ($p > 0,05$) auf eine Codeposition der Wirkstoffe hinweist.

3.2 Röntgendiffraktometrie

Bei der Röntgenbeugung oder Röntgendiffraktometrie wird die Ablenkung (Beugung) von Röntgenstrahlen an der zu analysierenden Probe betrachtet. Röntgenstrahlen sind energiereiche elektromagnetische Strahlen, die beim Auftreffen von beschleunigten Elektronen auf Materie frei werden. Unterschieden wird dabei zwischen kontinuierlicher Röntgenstrahlung (Bremsstrahlung) und diskontinuierlicher (charakteristischer) Röntgenstrahlung, die von der Natur des von den Elektronen getroffenen Objekts abhängt. Zur Analytik wird Röntgenstrahlung im Hochvakuum in Röntgenröhren durch thermisches Lösen und elektrische Beschleunigung von Elektronen mit einer Beschleunigungsspannung von der Kathode zur Anode erzeugt. Dabei entsteht durch Quantensprünge der Elektronen aus den inneren Elektronenschalen ein Röntgenspektrum. In Abhängigkeit von der Schale, auf der ein solcher Quantensprung endet, können unterschiedliche Serien unterschieden werden (K-, L-, M-, N-, O- und P-Serien). Für Röntgenbeugungsuntersuchungen muss monochromatische Röntgenstrahlung verwendet werden, die am häufigsten verwendete Strahlung ist die Cu-K α -Strahlung mit einer Wellenlänge von 0,154 nm. Trifft ein solcher Röntgenstrahl auf eine zu untersuchende kristalline Probe, so wird der Strahl beim Durchtritt durch die Probe die Elektronen im Kristallgitter zu Schwingungen anregen, damit werden sie selbst zu einer Strahlungsquelle. Diese Sekundärstrahlung überlagert die gebeugte Primärstrahlung; befinden sich beide in Phase, so wird die Intensität verstärkt. Für eine Verstärkung müssen bestimmte

geometrische Voraussetzungen gegeben sein, die in den Laue-Gleichungen und in der Braggschen Reflexionsbedingung formuliert sind (Beyer und Maasz, 1987). So können bei Einkristallen aus den Beugungsreflexen Rückschlüsse auf den geometrischen Aufbau des Kristallgitters gezogen werden. Mit der Röntgendiffraktometrie an Pulvern lassen sich zwar nicht ohne weiteres Untersuchungen zum Aufbau der Netzebenen eines Kristalls vornehmen, aber sie ist ein probates Mittel zur Untersuchung von Identität und Reinheit einer kristallinen oder teilkristallinen Substanz. Darüber hinaus lassen sich auch Aussagen zum Grad der Kristallinität machen.

Für diese Arbeit wurden sowohl Transmissionsmessungen als auch Reflexionsmessungen an Pulverproben vorgenommen. Dazu wurde ein Röntgendiffraktometer von Stoe (Stoe&Cie, Darmstadt, Deutschland) verwendet, mit dem bei einer Beschleunigungsspannung von 40 kV und einer Stromstärke von 30 mA Cu-K α -Strahlung erzeugt wurde. Bei der Transmissionsmessung wurde die Probe zwischen zwei röntgendurchlässigen Folien in einem Probenhalter fixiert und während der Messung kontinuierlich in Rotation gehalten, um eine Ausrichtung der Pulverpartikel und somit die Verstärkung bestimmter Beugungsreflexe zu vermeiden. Der nicht gebeugte Primärstrahl wurde im Primärstrahlfänger absorbiert, die gebeugten Röntgenstrahlen wurden von einem Bragg-Brentano-Zählrohr detektiert. Die Messungen wurden in der Regel über einen Bereich von 5 bis 50 2θ durchgeführt, dabei betrug die Schrittbreite ein 2θ mit einer Messzeit von 30 sec pro Schritt. Auf der Reflexionsseite wurde nur in Kombination mit einer Feuchtezelle VGI2000M (Surface Measurement Systems Ltd., London, Großbritannien) gemessen, welche die Probe in einer Atmosphäre einstellbarer relativer Feuchte hält. Dazu wurde die Probe in die Feuchtezelle präpariert, diese verschlossen und mit der Steuereinheit

und der Software (VGI Control System, SMS, Version 2.1) die gewünschte Feuchte eingestellt. Nach Erreichen der gewünschten Feuchte in der Zelle wurde die Probe für 30 Minuten equilibriert, anschließend wurde die Messung gestartet. Die erhaltenen Daten wurden mithilfe der WinXPow-Software (Version 2.06, Stoe&Cie) ausgewertet. Die Diffraktogramme werden dargestellt als absolute Intensität des Beugungsreflexes in Abhängigkeit vom Beugungswinkel 2θ . Durch den Vergleich der Lage der erhaltenen Röntgenreflexe mit Literaturdaten oder Vergleichsmessungen lässt sich eine Aussage zur Identität der Probe machen, während die Intensität und die Ausprägung der Reflexe bei konstanten Messbedingungen auf die Kristallinität der Probe schließen lassen. Das Fehlen jeglicher Röntgenreflexe legt das Vorliegen einer amorphen Probe nahe, das Diffraktogramm zeigt dann ein charakteristisches Halo.

3.3 Thermoanalytische Verfahren

Mithilfe thermoanalytischer Verfahren kann eine physikochemische Charakterisierung von Wirkstoffen, Hilfsstoffen und Formulierungen vorgenommen werden. Dabei werden die Veränderungen von Masse oder Wärmefluss mit der Änderung der Temperatur beobachtet. So können Rückschlüsse auf die Kristallinität, auf mögliche Polymorphe und auf Solvate oder Hydrate gezogen werden. Thermoanalytische Verfahren werden, neben anderen Verfahren wie der Röntgendiffraktometrie und spektroskopischen Methoden, häufig zur Charakterisierung von polymorphen (Wirk)Stoffen verwendet (Yu et al., 1998).

3.3.1 Differentielle Thermoanalytik (DSC)

Die differentielle Thermoanalytik (differential scanning calorimetry, DSC) beobachtet den Wärmefluss einer Probe im Vergleich zu einer Referenz. Sowohl Probe als auch Referenz befinden sich in kaltverschweißten Aluminiumtiegel von zirka 40 μl Fassungsvermögen, die mit einem Loch versehen (open pan) oder komplett verschlossen (closed pan) sind. Diese Tiegel werden in zwei parallel beheizte Öfen gesetzt und einem identischen Temperaturprogramm unterworfen; dabei wird die Temperatur der Öfen gleich gehalten und der Unterschied im Wärmefluss zwischen den beiden Öfen aufgezeichnet. Im Ergebnis erhält man einen Graphen, der endotherme und exotherme Ereignisse in der Probe während des Temperaturprogramms darstellt. Kristalline Proben zeigen einen scharfen endothermen Peak, der ihr Schmelzen darstellt. Dabei ist die Fläche unter der Kurve die zugehörige Schmelzenthalpie ΔH_f . Wenn die Probe in unterschiedlichen Polymorphen vorliegt, kann sich dem Schmelzen der instabileren Modifikation eine exotherme Rekristallisation in die stabilere Modifikation anschließen, die dann ihrerseits einen endothermen Schmelzpeak bei höherer Temperatur zeigt. Ist die Substanz ein enantiotroper Stoff, so durchläuft er bei Abkühlung und Rekristallisation ebenfalls beide Modifikationen, ein monotroper Stoff dagegen kristallisiert nur in der stabileren Modifikation wieder aus. Ein Übergang von fest zu gummiartig, wie ihn der Glasübergang bei amorphen Substanzen darstellt, ist ebenfalls ein endothermes Ereignis, das durch die Änderung der Wärmekapazität c_p beim Übergang vom glasartigen in den gummiartigen Zustand entsteht. Dabei verschiebt sich die Lage der Basislinie. Bei pseudopolymorphen Substanzen, wie Hydraten oder Solvaten, zeigt sich die Dehydratation oder Desolvatation als endothermer Peak in der DSC-Kurve.

In dieser Arbeit wurde eine DSC7 (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) mit nachgeschaltetem Signalwandler TAC 7/DX (Perkin Elmer) verwendet. Es wurde eine Menge Probe eingewogen, die den Boden des Tiegels gut bedeckte, aber nicht an den Deckel stieß (in der Regel zirka 4 mg). Diese Probe wurde im Folgenden einem Temperaturprogramm unterworfen, das je nach Inhalt der Probe so variiert wurde, dass zu erwartende thermische Ereignisse erfasst werden konnten. Dazu diente der Schmelzpunkt als Anhaltspunkt (siehe Kapitel 4.2). In Tabelle 3.3 sind die am häufigsten verwendeten Temperaturprogramme aufgeführt. Alle Messungen wurden unter Inertgasatmosphäre (Stickstoff, 20 ml/min) durchgeführt. Da die Substanzen bei höheren Temperaturen unter Zersetzung schmelzen, wurden keine Abkühl- und Wiederaufheizkurve aufgezeichnet. Die erhaltenen Daten werden in einem Temperatur-Wärmefluss-Diagramm dargestellt. Für die Auswertung wurde die Software des Gerätes verwendet (PYRIS, Version 3.81, Perkin Elmer).

Tabelle 3.3: Verwendete Temperaturprogramme der DSC

	Salmeterolxinafoat enthalten	Flutiasonpropionat enthalten	Salmeterolxinafoat und Fluticasonpropionat enthalten
Starttemperatur	30°C	30°C	30°C
Maximaltemperatur	160°C	300°C	300°C

3.4 Dynamische Wasserdampfsorption (DVS)

Zur Analyse des Verhaltens von Substanzen in Gegenwart von Wasserdampf kann die dynamische Wasserdampfsorption (dynamic vapor sorption, DVS) verwendet werden. Sie detektiert die Masseunterschiede der Probe im Vergleich zu einer leeren Referenzwägeschale in einer Atmosphäre einstellbarer Temperatur und Feuchte. So können zum Beispiel feuchteinduzierte Rekristallisationsprozesse amorpher Substanzen beobachtet werden, wobei die Masse nach anfänglicher Massenzunahme plötzlich wieder abnimmt (Freiwerden von anhaftendem Wasser bei der Rekristallisation) oder durch Einbau von Kristallwasser beziehungsweise Bildung von Hydraten dauerhaft zunimmt. Die Kenntnis des Verhaltens von Formulierungen in Gegenwart von Feuchte ist wichtig für die Abschätzung der Stabilität der Proben und kann darüber hinaus Parameter wie das Fließverhalten und die Freisetzung beeinflussen (Ahlneck und Zografi, 1990). In dieser Arbeit wurde eine DVS1 (Surface Measurement Systems Ltd., London, Großbritannien) verwendet. Die DVS1 arbeitet mit einer eingebauten Mikrowaage von hoher Präzision. Es wurde jeweils eine Probenmenge gewählt, die die Waagschale gut füllte. Der Analyserraum wurde konstant bei 25°C gehalten, wogegen die Feuchte in einem Bereich von 0% relativer Feuchte (rF) bis 90% relativer Feuchte in Stufen von 10% rF schrittweise angehoben und wieder abgesenkt wurde. Nach Einstellung der Feuchte über einen Masseflusscontroller, der einen trockenen Stickstoffgasstrom mit einem wassergesättigten Stickstoffgasstrom im gewünschten Verhältnis mischt, wurde die Feuchte bis zur Einstellung einer Massekonstanz (Abweichung $dm/dt < 0,0005\%$ oder 120 Minuten Equilibrierung) beibehalten, danach wurde die nächste Stufe eingestellt. Insgesamt wurde die Masseänderung der Probe über zwei Zyklen (zwei Mal 0% rF bis 90% rF und zurück auf 0% rF) beobachtet, um zu

überprüfen, ob gegebenenfalls beim ersten Zyklus auftretende Ereignisse reversibel oder irreversibel sind. Die Auswertung erfolgte mithilfe der Software DVSWin (SMS, Version 2.16) sowie Microsoft Excel (Version 2002).

3.5 Bildgebende Verfahren

Bildgebende Verfahren erlauben eine visuelle Vorstellung der Formulierungen und machen Aussagen zur Morphologie von Einzelpartikeln und zur Homogenität der Verteilung unterschiedlicher Bestandteile der Formulierung möglich. Gerade bei nicht-sphärischen Partikeln sind bildgebende Verfahren eine wichtige Ergänzung zu laserdiffraktometrischen Partikelgrößenmessungen. Darüber hinaus können bildgebende Verfahren eine Lokalisation bestimmter Bestandteile in einer Formulierung ermöglichen.

3.5.1 Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie (REM) ist ein bildgebendes Verfahren, bei dem ein Elektronenstrahl in einem bestimmten Muster über das vergrößert abzubildende Objekt geführt (gerastert) wird und Wechselwirkungen der Elektronen mit dem Objekt zur Erzeugung eines Bildes des Objekts genutzt werden. Die mit einem Rasterelektronenmikroskop erzeugten Bilder sind Abbildungen der Objektflächen und weisen eine hohe Schärfentiefe auf. Der maximale theoretische Vergrößerungsfaktor liegt etwa bei 1.000.000:1. Der Elektronenstrahl eines Rasterelektronenmikroskops wird von einer Glühkathode oder einer Feldemissionskathode erzeugt, durch Magnetspulen fokussiert und über das im Vakuum befindliche, leitfähig fixierte Objekt geführt. Dabei regt der Elektronenstrahl auf der

Oberfläche weitere Elektronen an, die als Sekundärelektronenstrahl von der Oberfläche abgestrahlt werden und vom Detektor eingefangen werden können. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Detektion der zurück gestreuten Elektronen des Primärstrahls. In dieser Arbeit wurden wegen Verfügbarkeitsproblemen drei unterschiedliche Rasterelektronenmikroskope verwendet. Dabei handelt es sich um ein Philips XL20 (Philips B.V., Eindhoven, Niederlande), um ein DSM940 und um ein S240 (beide Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland). Die Proben wurden auf runden Aluminiumprobenträgern (Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland), die mit einer beidseitig haftenden Kohlefolie beklebt sind, fein verteilt und anschließend im sputter coater (SCD 005, Bal-Tec AG, Liechtenstein) nach mehrmaligem Evakuieren und Begasen mit Argon im Vakuum bei 50 mA für 65 sec mit Gold bedampft, um eine leitfähige Oberfläche zu erzeugen. Anschließend wurden die Proben bis zur Analyse trocken gelagert. Die Bilder wurden bei einer Spannung zwischen 12 kV und 15 kV und in einem Vergrößerungsbereich zwischen 100-fach und 10000-fach aufgenommen. Alle Bilder wurden mit einem kalibrierten Mikrometerbalken versehen und digitalisiert.

3.5.2 Fluoreszenzmikroskopie

Zur Fluoreszenzmikroskopie wurde ein konfokales Laserscanning Mikroskop (CLSM, TCS SP, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) verwendet. Dabei rastert ein scharf fokussierter Laserstrahl die Probe, das Abbild ist durch die konfokale Optik (pinhole optic) immer nur in einem einzigen Punkt scharf dargestellt. So kann man die Probe nicht nur in x-y-Richtung rastern, sondern auch eine Tiefeninformation entlang der z-Achse erhalten, sofern die Probe ausreichend transparent ist. In der Fluoreszenzmikroskopie wird ein Laser definierter Wellenlänge zum Rastern verwendet, der der Anregungswellenlänge von zur

Fluoreszenz befähigten Teilen der Probe entspricht. Detektiert wird in einem zur Anregungswellenlänge verschobenen Wellenlängenbereich, in dem die Fluoreszenz auftritt. Somit werden nur die Strukturen abgebildet, die bei der entsprechenden Energie auch tatsächlich Fluoreszenz zeigen. Im einfachsten Fall sind dies originäre Teile der Probe oder aber in die Probe eingebrachte Fluoreszenzfarbstoffe, die bestimmte Probenteile gezielt anfärben, z.B. bestimmte Strukturen einer Zelle bei Zellpräparaten oder Mikropartikel, deren Zellpassage über die Zeit verfolgt wird. Durch das Arbeiten mit unterschiedlichen Farbstoffen und unterschiedlichen Anregungswellenlängen können verschiedene Bereiche derselben Probe abgebildet werden, durch die Superposition der Bilder kann eine Co-Lokalisation visualisiert werden. Darüber hinaus ist ein Fluoreszenzmikroskop auch in der Lage, ein normales Weißlichtbild der Probe darzustellen. In dieser Arbeit wurde die Fluoreszenzmikroskopie verwendet, um eine Information über die Zusammensetzung der Einzelpartikel der Formulierungen zu erhalten. Dabei wurde ausgenutzt, dass Salmeterolxinafoat bei 350 nm zur Fluoreszenz angeregt werden kann, die bei 450 – 470 nm detektierbar ist. Fluticasonpropionat und die anderen Bestandteile der Formulierungen fluoreszieren in diesem Bereich nicht. Die Probe wurde in Wasser auf einem Objektglas dispergiert, sofort ein Weißlichtbild aufgenommen und mit einem 63x-Objektiv sowie einem digitalen Zoom von 1,69 fluoreszenzgerastert. Die erhaltenen Daten wurden mit der Software des CLSM (LCSLite, Leica) ausgewertet.

3.5.3 Raman-Mikroskopie

Die Raman-Mikroskopie verknüpft die orts aufgelöste Darstellung von Objekten mit einer Substanz-Identifizierung über die Aufnahme eines Raman-Spektrums an entsprechender Stelle. Durch einen

ortsspezifischen Scan der Probe können für viele nebeneinander liegende Punkte Spektren aufgenommen werden (Raman mapping). Dabei wird die Probe durch einen Laser definierter Wellenlänge angeregt, dieser versetzt die Elektronen der Probe in einen energiereicheren Zwischenzustand, aus dem sie unter Abgabe von Energie in den Grundzustand (elastische (Rayleigh-) Streuung) oder einen leicht energiereicheren Zustand (unelastische (Raman-) Streuung) zurückfallen. Dabei ist das Verhältnis von Elektronen, die Rayleigh-Strahler sind, zu Raman-Strahlern etwa 10^7 zu 1 (Spiess, 1999). Durch Einstrahlen eines linear polarisierten, monochromatischen Lasers und geeigneter Filtersysteme, die Anregungsstrahlung, Rayleighstrahlung sowie ebenfalls entstehende Fluoreszenzstrahlung vom Detektor fernhalten, kann gezielt die Raman-Strahlung mit ihrer charakteristischen Verschiebung gegenüber der Anregungsstrahlung (Raman shift) detektiert werden. Analog zu einem Infrarot-Spektrum kann für viele Substanzen ein charakteristisches Raman-Spektrum (Intensität der Raman-Strahlung gegen Wellenzahl) aufgezeichnet werden. Dabei unterscheidet man Raman-Banden, die bestimmten Molekülteilen zuzuordnen sind, und den fingerprint-Bereich eines Raman-Spektrums, der für jede Substanz einmalig ist. Die Identifizierung aus einer Probe heraus kann dann über die Auswahl und Zuordnung substanzcharakteristischer Banden geschehen, die bei ausreichender Trennung auch über das Integral zur Quantifizierung herangezogen werden können. Einen ausführlichen Überblick über die Anwendungsmöglichkeiten der Raman-Spektroskopie in der Pharmazie findet sich bei Frank (Frank, 1999).

Um die Zusammensetzung von Einzelpartikeln innerhalb der Formulierungen zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit eine Kombination aus mikroskopischer Bildanalyse (Morphologi G3, Malvern Instruments,

Worcestershire, Großbritannien) mit einem neuen Raman-Modul verwendet. Dazu wurden von allen Komponenten der Formulierungen Referenzspektren aufgenommen, die anschließend mit den Raman-Spektren der analysierten Einzelpartikel verglichen wurden. Die Analysen wurden extern bei Malvern Instruments (Analytical Imaging, Columbia, MD, USA) durchgeführt. Die Anregung der Raman-Schwingung wurde durch einen Laser mit einer Anregungswellenlänge von 785 nm vorgenommen, dessen Lichtkegel einen Durchmesser von ungefähr 3 μm hat. Die spektrale Auflösung betrug 4 cm^{-1} bei einem Wellenzahlbereich von 100 bis 3450 cm^{-1} . Das Raman-Spektrum wurde für jeden Punkt über 20 Sekunden aufgenommen.

3.6 Quantitative Wirkstoffbestimmung

Für die quantitative Bestimmung der Wirkstoffe wurde eine HPLC-Methode nach Michael (Michael et al., 2000) verwendet, die in Bezug auf Säule und Flussrate leicht modifiziert wurde. Diese Methode dient der gleichzeitigen Quantifizierung von Salmeterolxinafoat und Fluticasonpropionat aus einer Probe nach Auftrennung auf der HPLC-Säule. Die Analytik wurde an einer HPLC-Anlage von Waters (Waters Corp., Milford, USA) durchgeführt. Als stationäre Phase wurde eine RP-8 Säule (LiChroChart 125-4, LiChroSpher 100, 5 μm , Merck, Darmstadt, Deutschland) mit entsprechender Vorsäule (LiChroChart 4-4, LiChroSpher 100, 5 μm , Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet, die während der Bestimmung in einem Säulenofen auf 40°C temperiert wurde. Mobile Phase war eine Mischung aus Acetonitril, Methanol und frisch hergestelltem bidestilliertem Wasser im Verhältnis 30:30:40, die mit 0,2% (m/V) Tetrabutylammoniumhydrogensulfat versetzt und anschließend mit Ammoniumacetat auf pH 3,1 eingestellt wurde. Die Flussrate betrug 1 ml/min, das Einspritzvolumen 100 μl . Beide

Substanzen konnten bei 228 nm photometrisch detektiert werden, dabei hatte Salmeterolxinafoat eine Retentionszeit von ungefähr 3,4 min (Salmeterolpeak, zuvor kommt der Peak des Xinafoats) und Fluticasonpropionat eine Retentionszeit von etwa 5,6 min. Abbildung 3.7 zeigt ein typisches Chromatogramm für die Bestimmung beider Wirkstoffe. Die Auswertung erfolgte mithilfe zweier externer Standards, wobei für beide Substanzen eine Kalibrierung im Bereich von 1 µg/ml bis 100 µg/ml vorgenommen wurde (linear mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,999 bis 1).

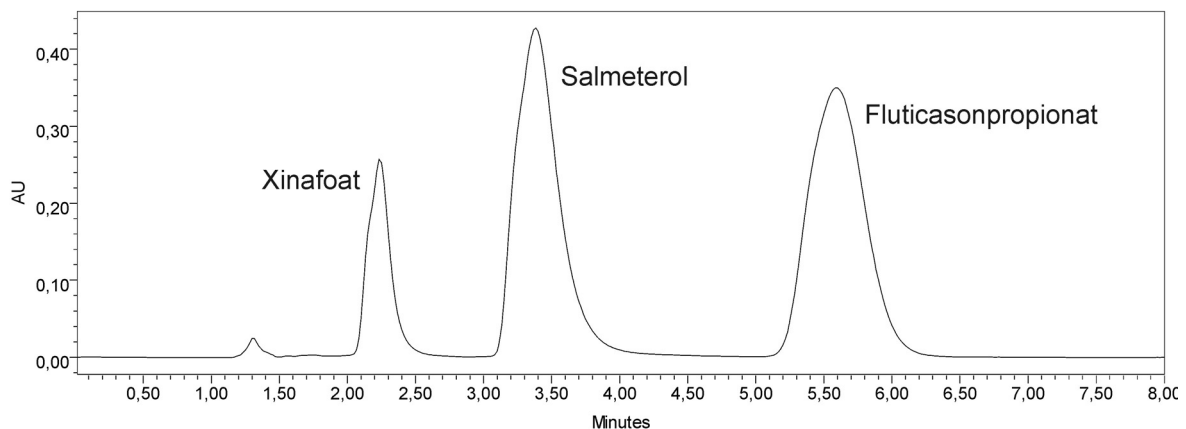


Abbildung 3.7: Charakteristisches HPLC-Chromatogramm mit zwei Peaks des Xinafoats bzw. Salmeterols und einem Peak des Fluticasonpropionatss

3.7 Statistische Methoden

Zur Darstellung der Ergebnisse wurden verschiedene Methoden der deskriptiven und induktiven Statistik verwendet. Dazu gehört die Berechnung des Mittelwerts mehrerer Einzelmessungen nach Gleichung 3.6 sowie die Berechnung der beidseitigen Abweichung nach Gleichung 3.7 und Gleichung 3.8. Diese Abweichung wird als Fehlerbalken in den entsprechenden Diagrammen eingetragen und lässt einen besseren Eindruck der tatsächlichen Schwankung eines Wertes zu als die Angabe einer (relativen) Standardabweichung.

$$\bar{x} = \frac{\sum \text{Einzelwerte}}{n \text{ Einzelwerte}} \quad \text{Gleichung 3.6}$$

$$\text{Abweichung (+)} = \text{Maximalwert} - \bar{x} \quad \text{Gleichung 3.7}$$

$$\text{Abweichung (-)} = \bar{x} - \text{Minimalwert} \quad \text{Gleichung 3.8}$$

Darüber hinaus wurde für den Vergleich von Chargen oder Bestimmungen ein Signifikanztest durchgeführt. Dazu wurden die zu vergleichenden Chargen nach der erfolgreichen Prüfung auf gleiche Varianz (F-Test) einem Student-t-Test unterworfen, mit dem das Signifikanzlevel p des Unterschieds berechnet wurde (Analyse-Funktionen von Microsoft Excel, 2002). Dabei wurde die Signifikanz wie folgt bewertet:

$p > 0,05$ kein signifikanter Hinweis auf einen Unterschied (-)

$p < 0,05$ indifferentes Ergebnis, mehr Daten notwendig (*)

$p < 0,01$ signifikanter Hinweis auf einen Unterschied (**)

$p < 0,001$ hochsignifikanter Hinweis auf einen Unterschied (***)

Eine manuelle Berechnungsvariante, die zum gleichen Ergebnis führt, beruht auf der Berechnung der Differenz der Stichprobenmittelwerte (Effekt) und einem anschließenden Vergleich der Vertrauensbereiche (Kleppmann, 2001). Für die Erstellung und Auswertung von Versuchsplänen wurde das Modul „industrielle Statistiken“ von Statistika (Version 6.1, Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA) verwendet. Sofern möglich, wurden dabei vollständige Versuchspläne erstellt und ausgewertet. Bei allen Auswertungen wurde das Vertrauensintervall $100\% - \alpha$ auf 95% festgelegt.

4 Verwendete Wirkstoffe

4.1 Vergleichspräparat im Handel

Wie in Kapitel 2 beschrieben, gibt es verschiedene Wirkstoffe, die in der Asthmatherapie eingesetzt werden können und die in einer Reihe von Fertigarzneimitteln enthalten sind. Für diese Arbeit sind insbesondere die Kombinationen von β_2 -Sympathomimetikum und Glucocorticoid von Interesse, von denen sich derzeit vier Präparate auf dem deutschen Markt befinden: Symbicort[®] von AstraZeneca mit den Wirkstoffen Formoterolhemifumarat $\cdot 1 \text{ H}_2\text{O}$ und Budesonid in drei unterschiedlichen Dosiskombinationen mit jeweils verschiedener Indikationsempfehlung, Viani[®] von GlaxoSmithKline mit den Wirkstoffen Salmeterol (eingesetzt als Xinafoat) und Fluticasonpropionat, das identisch ist mit atmadisc[®] von Schwarz Pharma, und Foster[®] der Firma AscheChiesi, ein Dosieraerosol mit $100 \mu\text{g}$ Beclomethasondipropionat und $6 \mu\text{g}$ Formoterolhemifumarat $\cdot 1 \text{ H}_2\text{O}$. Viani[®] ist in verschiedenen festen Dosiskombinationen erhältlich (siehe Tabelle 4.1); das Präparat ist sowohl als einzeldosiertes Pulver zur Inhalation im Diskus[®] Mehrdoseninhalator (Abbildung 4.1) formuliert als auch als Suspension in einem Druckgasinhalator. Der Diskus Inhalator ist ein Mehrdoseninhalator, wobei die 60 Einzeldosen bereits vordosiert in einem Blister vorliegen. Bei der Inhalationsvorbereitung wird eine Blistermulde geöffnet, das Inhalationspulver freigegeben und der Leerstreifen innerhalb des Diskus aufgewickelt. Sind alle Einzeldosen aufgebraucht, wird der Inhalator verworfen. Die Formulierungen werden in zwei Patenten (Gavin und Sykes, 2003), (Palmer, 1991) beschrieben, dabei handelt es sich im Fall der Pulverinhalate um interaktive Mischungen der mikronisierten Wirkstoffe mit Laktose als Trägerstoff (Abbildung 4.2 und Abbildung 4.3), die Dosieraerosolformulierungen

stellen Suspensionen der Wirkstoffe ohne weiteren Hilfsstoffzusatz in mittlerweile FCKW-freien Treibmitteln dar.

Tabelle 4.1: Dosierungen von Viani® (bzw. atmadisc®)

	Fluticasonpropionat pro Einzeldosis	Salmeterol pro Einzeldosis
Viani Diskus	250 µg	50 µg
Viani mite Diskus	100 µg	50 µg
Viani forte Diskus	500 µg	50 µg
Viani Dosier-Aerosol	125 µg	25 µg
Viani mite Dosier-Aerosol	50 µg	25 µg
Viani forte Dosier-Aerosol	250 µg	25 µg

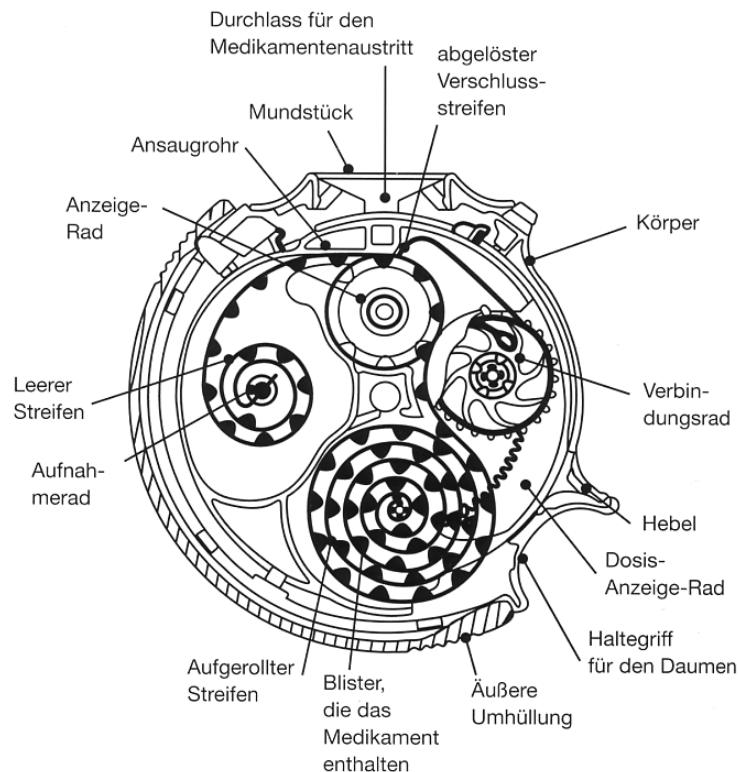


Abbildung 4.1: Diskus-Inhalator im Querschnitt

In dieser Arbeit wurden die Wirkstoffe Salmeterolxinafoat und Fluticasonpropionat, wie im Handelspräparat Viani® bzw. atmadisc®

enthalten, für die Formulierung von Kombinations-Pulverinhalaten eingesetzt. Um ein therapieübliches Verhältnis der beiden Wirkstoffe in den neuen Formulierungen zu gewährleisten, wurde das im Viani mite[®] verwendete Wirkstoffverhältnis (Salmeterol zu Fluticasonpropionat 1+2) eingesetzt.

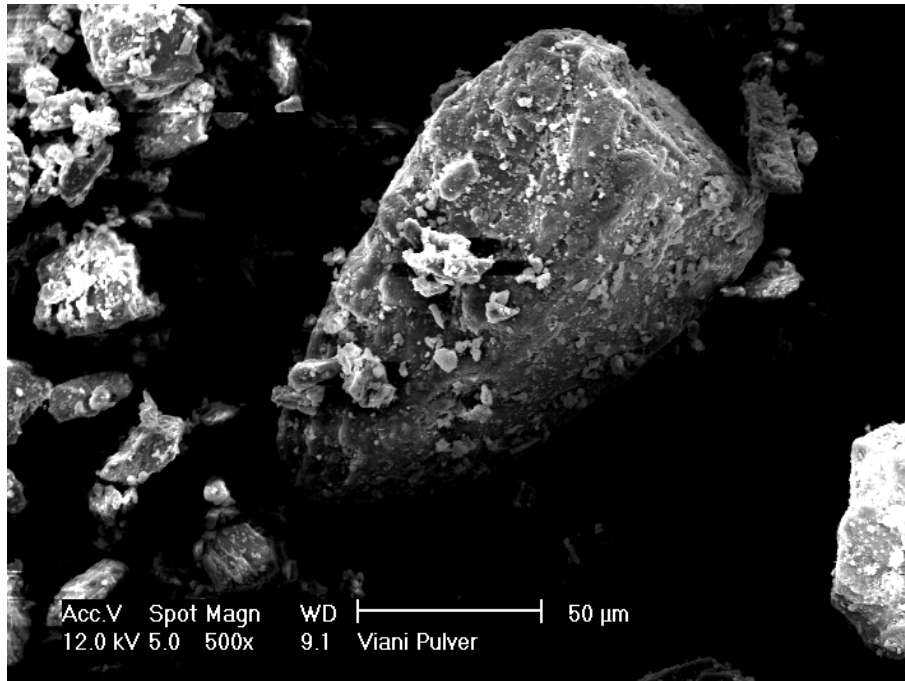


Abbildung 4.2: REM-Aufnahme des Pulverinhalats von Viani mite

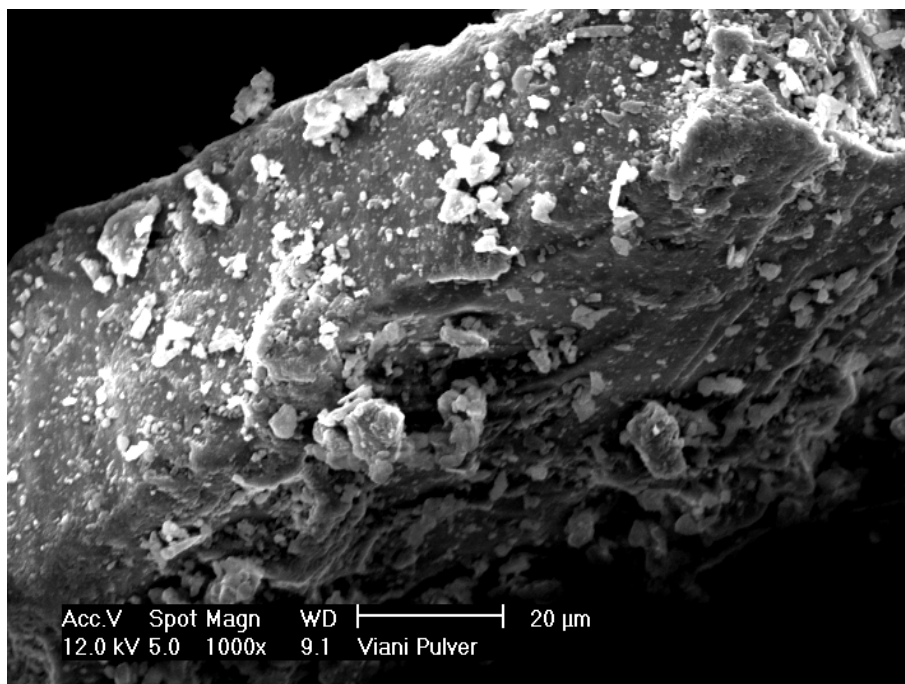


Abbildung 4.3: REM-Aufnahme des Pulverinhalats von Viani mite

Die aerodynamische Charakterisierung des Handelpräparats ergab eine Feinpartikelfraktion von 23,3% mit einem Depositionsmuster auf den Abscheidestufen des NGI, wie in Abbildung 4.4 dargestellt. Dabei ist für die ersten fünf dargestellten Abscheidestufen ein signifikanter Unterschied in der Deposition von SX im Vergleich zu FP zu beobachten (siehe Kapitel 5.2.2.7), was auf eine mangelnde Codeposition schließen lässt.

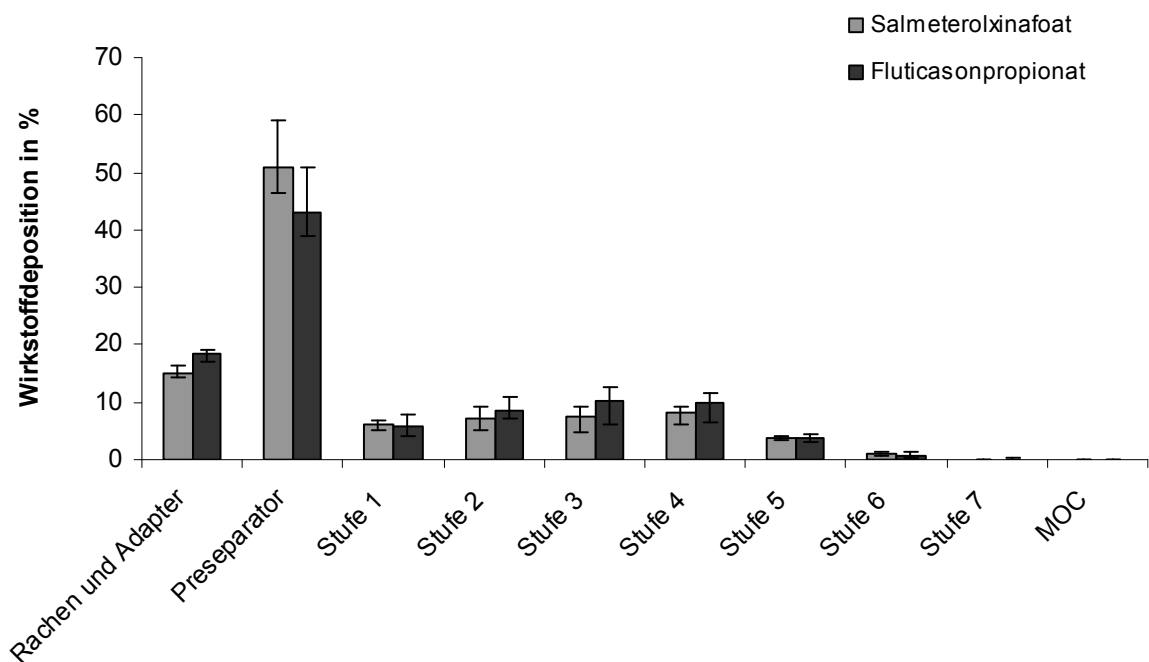


Abbildung 4.4: Depositionsmuster des Viani mite Diskus nach Wirkstoffen aufgeschlüsselt, (hellgrau = SX, dunkelgrau = FP, Fehlerbalken geben Maximal- bzw. Minimalwert an (n=3))

4.2 Charakterisierung der verwendeten Wirkstoffe

Eine physikochemische Charakterisierung der eingesetzten Wirkstoffe ist Voraussetzung für das Verarbeiten von Wirkstoffen in Arzneiformulierungen, da nur so abgeschätzt werden kann, welchen Herstellungskonditionen die Wirkstoffe unterworfen werden können,

ohne dass Stabilitätsprobleme zu erwarten sind. Darüber hinaus sind Daten zu Kristallinität, Löslichkeit und vorliegender Polymorphie wichtige Vergleichswerte zur Beurteilung der erzeugten Wirkstoffformulierungen.

4.2.1 Salmeterolxinafoat

Salmeterolxinafoat (SX, Abbildung 4.5), chemische Bezeichnung (\pm) 4-Hydroxy- α -1-[[[6-(4-phenylbutoxy)hexyl]amino]m-ethyl]-1,3-benzendimethanol, 1-hydroxy-2-naphthalencarboxylat (Summenformel $C_{25}H_{37}NO_4 \cdot C_{11}H_8O_3$), ist ein langwirksames β -Sympathomimetikum mit hoher Selektivität für den β_2 -Rezeptor, das in der Dauertherapie des Asthmas eingesetzt wird. Es schützt die Lunge bis zu 12 Stunden vor bronchokonstriktiven Agenzien. Diese lange Wirksamkeit wird mit der sogenannten „Exo-site“-Hypothese erklärt (Reinhardt et al., 2001). Angenommen wird, dass das Salmeterolmolekül aufgrund seiner Länge (gestreckt 2,5 nm) neben dem β_2 -Rezeptor an einer weiteren Bindungsstelle (exo-site) quasi-irreversibel binden kann, so dass das Salmeterol-Molekül in der Nähe des Rezeptors verbleibt und erneut binden kann. Eine andere Erklärung liefert die „mikrokinetische Diffusionstheorie“, die von einer allgemein verlängerten Aufenthaltszeit lipophiler Substanzen an der Phospholipidmembran ausgeht. Salmeterolxinafoat, das als Racemat verwendet wird, hat ein Molekulargewicht von 603,75 g/mol (415,5 g/mol für die freie Base) und ist eine deutlich lipophile Substanz mit einem log P von 4,15 für die freie Base (Cazzola et al., 2002). Im Vergleich zu Formoterol, einem ebenfalls inhalativ eingesetzten β_2 -Sympathomimetikum, hat SX eine geringere Potenz und eine verlängerte Wirklatenz, so dass es nicht in der Akuttherapie eines asthmatischen Anfalls angewendet werden kann (Johnson, 2002). Salmeterol wird in der Regel als Salz des 1-Hydroxy-2-

naphthoats (Xinafoat) verwendet, entsprechend müssen die Masseangaben zwischen Salz und Base umgerechnet werden (72,5 µg Salmeterolxinafoat entsprechen 50 µg Salmeterol). Salmeterol wird im Körper extensiv durch Hydroxylierung metabolisiert und ist dadurch praktisch nicht systemisch bioverfügbar (Reynolds et al., 2005).

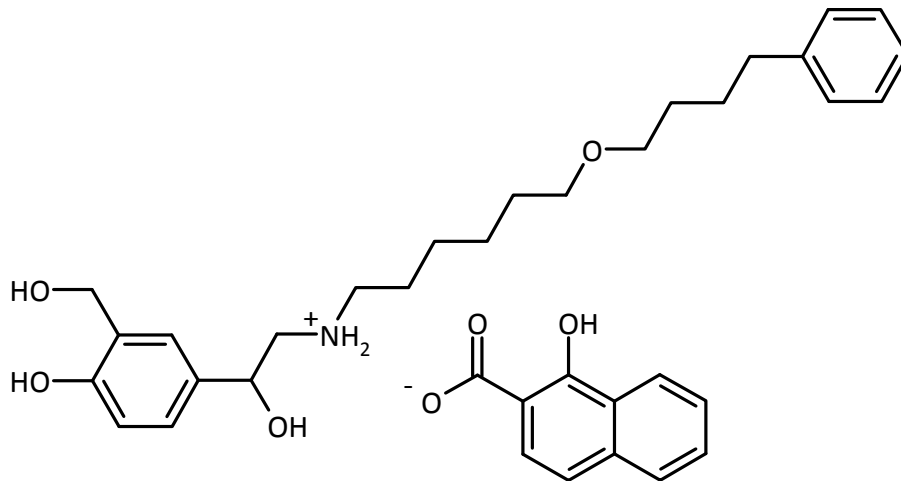


Abbildung 4.5: Strukturformel von Salmeterolxinafoat

Salmeterol ist in zwei Kristallmodifikationen beschrieben, wovon Modifikation I mit einem Schmelzpunkt von 123°C die bei Raumtemperatur stabilere ist, die metastabile Modifikation II mit 138°C aber den höheren Schmelzpunkt hat (Tong et al., 2001). Beide Formen sind enantiotrop zueinander, so dass aus organischem Lösemittel bei einer Temperatur unter 80°C kristallisiertes und anschließend mikronisiertes Salmeterolxinafoat, wie es kommerziell erhältlich ist, in Modifikation I vorliegt (Beach et al., 1999). Der Kristallhabitus zeigt plättchenförmige Kristalle (Abbildung 4.6). Reine Modifikationen können durch Kristallisation in überkritischem CO₂ (Modifikation I oder II je nach Prozessbedingungen) (Tong et al., 2002) oder Kristallisation durch schnelles Abkühlen (Modifikation I) (Beach et al., 1999) erzeugt werden.

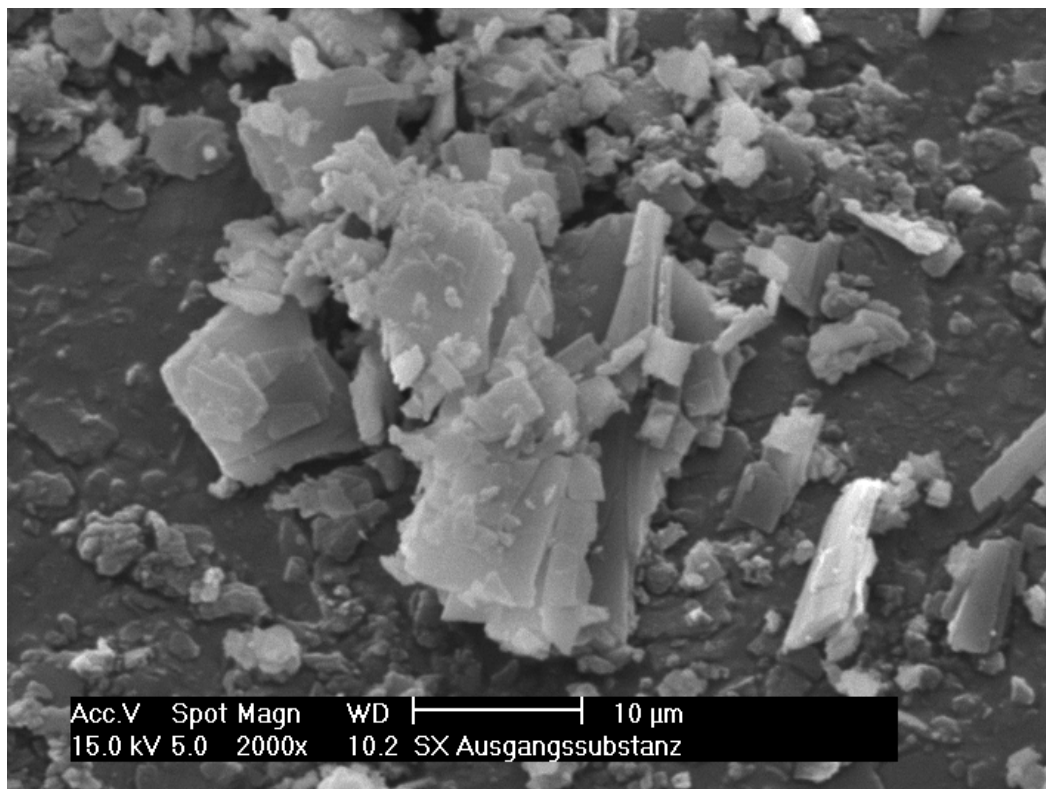


Abbildung 4.6: REM-Aufnahme von Salmeterolxinafoat (Ausgangssubstanz)

In dieser Arbeit wurden zwei Chargen von mikronisiertem Salmeterolxinafoat verwendet, die sich in ihren physikochemischen Charakteristika nicht unterschieden. Abbildung 4.7 zeigt eine DSC-Kurve von SX, dabei ist der Schmelzpeak von Modifikation I deutlich erkennbar, an den sich ein schwacher Rekristallisationspeak anschließt, gefolgt vom Schmelzpeak der Modifikation II. Die Ausprägung der Rekristallisation in Modifikation II kann sowohl von der Heizrate abhängig sein als auch vom Anteil an polymorphen Unreinheiten in der Ausgangsware (Tong et al., 2003). Ein typisches Röntgendiffraktogramm ist in Abbildung 4.8 dargestellt; hier sind ausgeprägte Röntgenreflexe erkennbar, die die Kristallinität der Ausgangsware unterstreichen. Für SX charakteristische Reflexe liegen bei $10,7\ 2\theta$, bei $22,4\ 2\theta$ und bei $24,7\ 2\theta$.

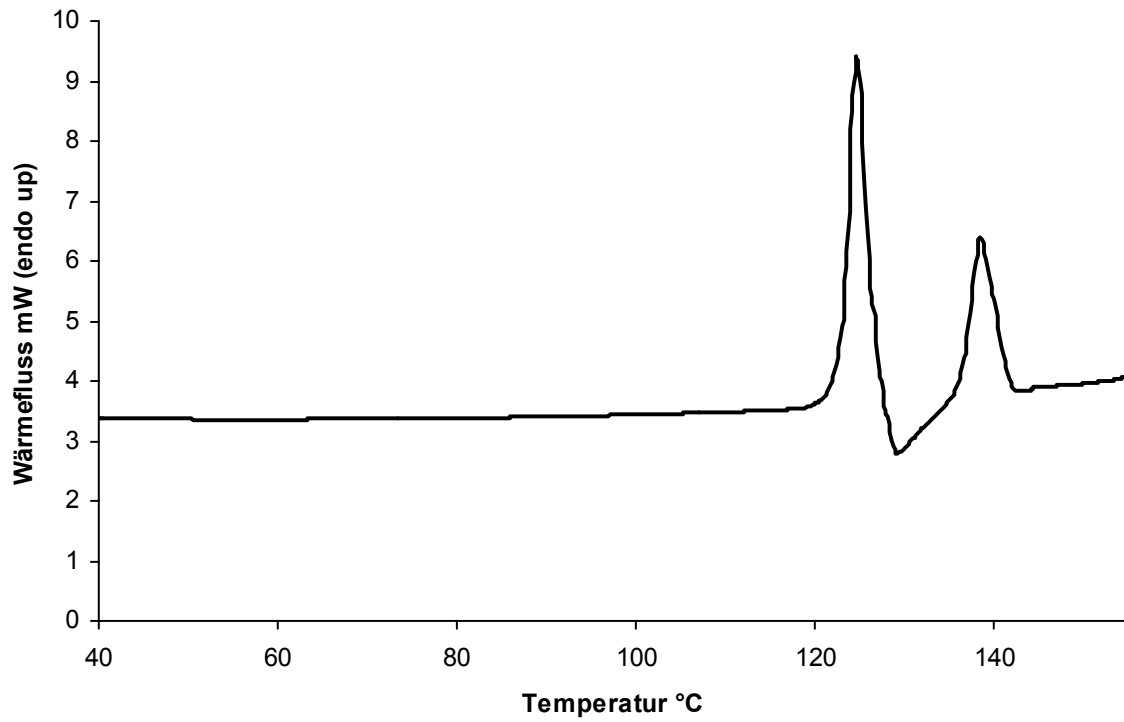


Abbildung 4.7: DSC-Diagramm von Salmeterolxinafoat (Ausgangssubstanz)

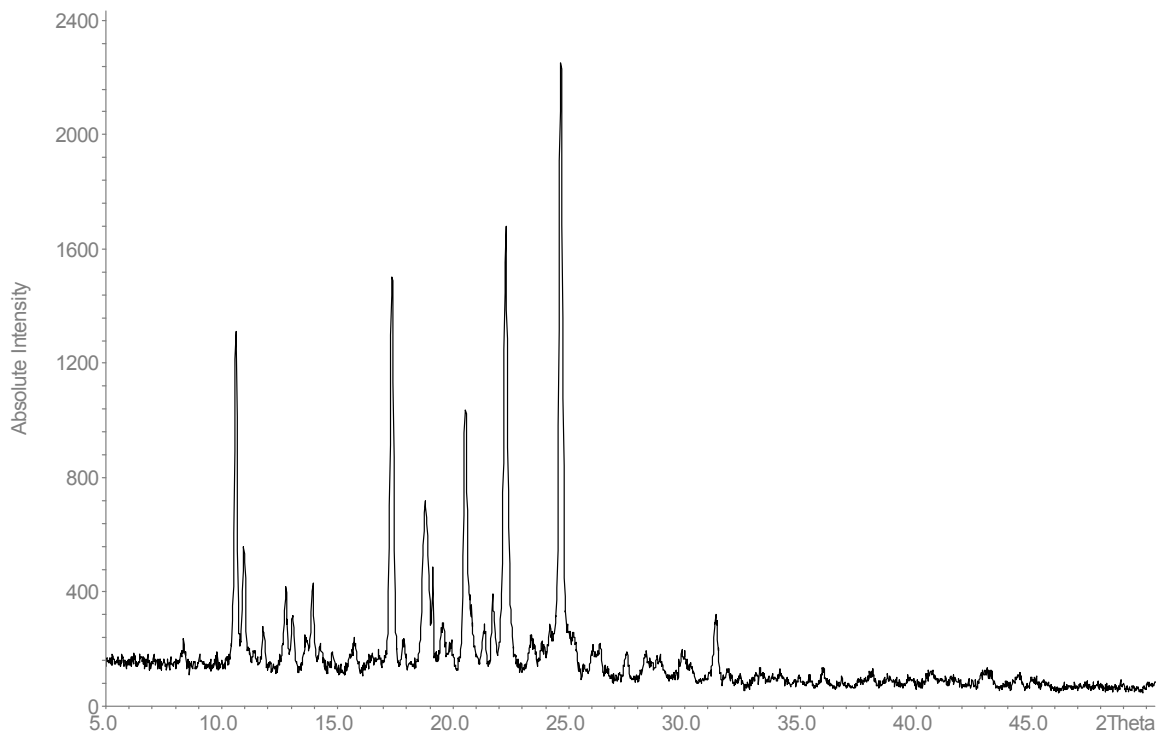


Abbildung 4.8: Röntgendiffraktogramm von Salmeterolxinafoat (Ausgangssubstanz)

Durch Sprühtrocknung im Mini-Büchi B290 (Büchi, Flawil, Schweiz) aus organischer Lösung (1% (m/V) SX in Aceton) bei 100°C Einlasstemperatur und 40°C Auslasstemperatur konnte amorphes Salmeterolxinafoat hergestellt werden. Das entsprechende Röntgendiffraktogramm (Abbildung 4.9) zeigte ein charakteristisches Halo (siehe Kapitel 2.2), eine DSC-Untersuchung zeigte eine Rekristallisation zwischen 40 und 60°C und anschließend einen verbreiterten Schmelzpeak von Modifikation I (Abbildung 4.10).

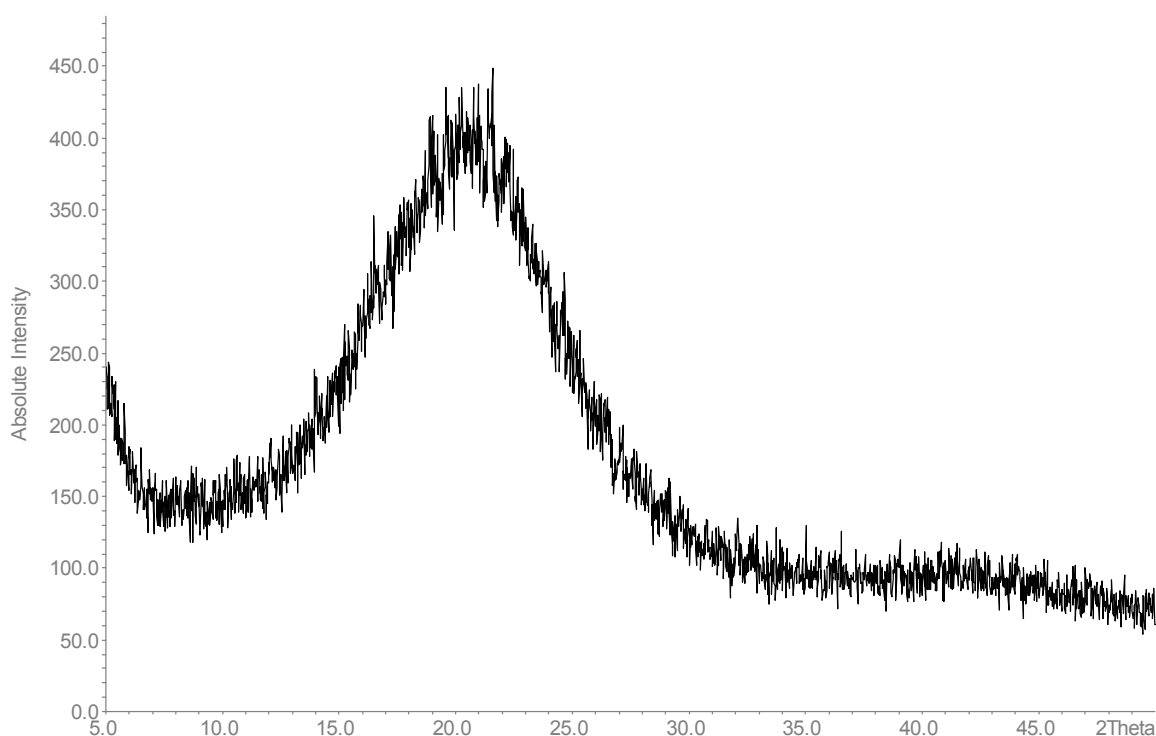


Abbildung 4.9: Röntgendiffraktogramm von frisch sprühgetrocknetem Salmeterolxinafoat

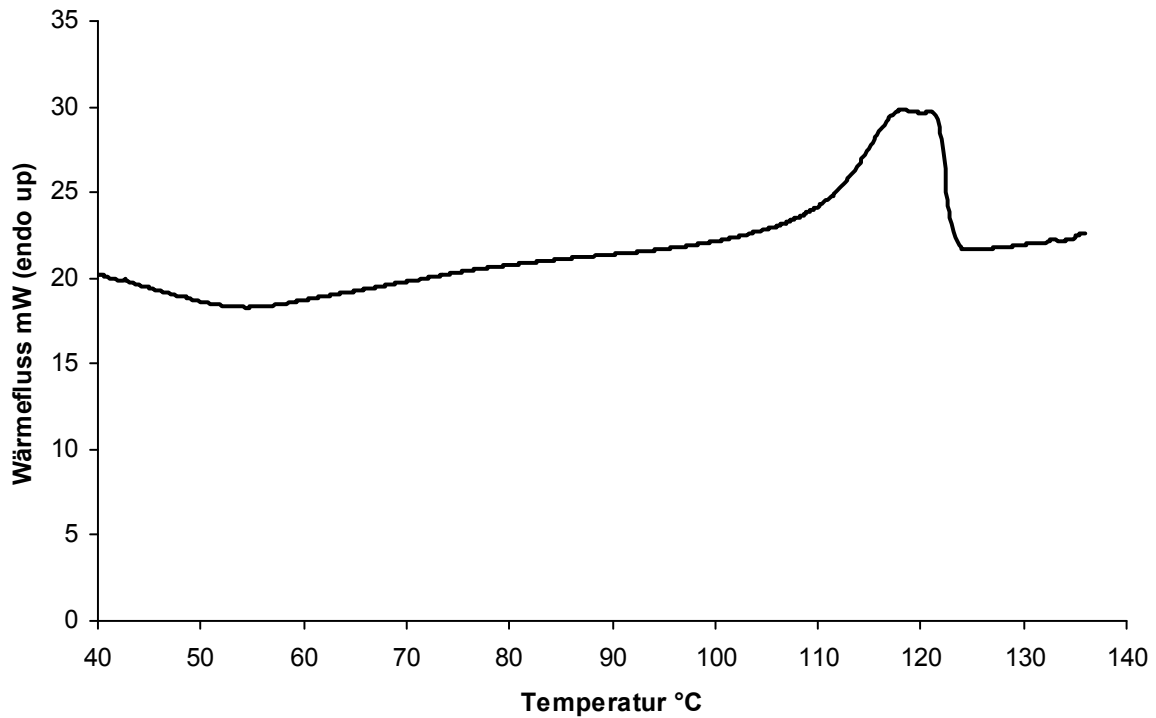


Abbildung 4.10: DSC-Diagramm von frisch sprühgetrocknetem Salmeterolxinafoat

Amorphes Salmeterolxinafoat ist eine graue, klebrige Masse und rekristallisiert bei normalen Umgebungsbedingungen innerhalb von 16 Stunden, was mithilfe der Röntgendiffraktometrie beobachtet werden konnte. Dazu wurden in zeitlichem Abstand in einem Bereich von 20 bis 28 2θ , in dem charakteristische Röntgenreflexe der kristallinen Substanz liegen, Diffraktogramme im Transmissionsmessverfahren (siehe Kapitel 3.2) aufgenommen (siehe Abbildung 4.11).

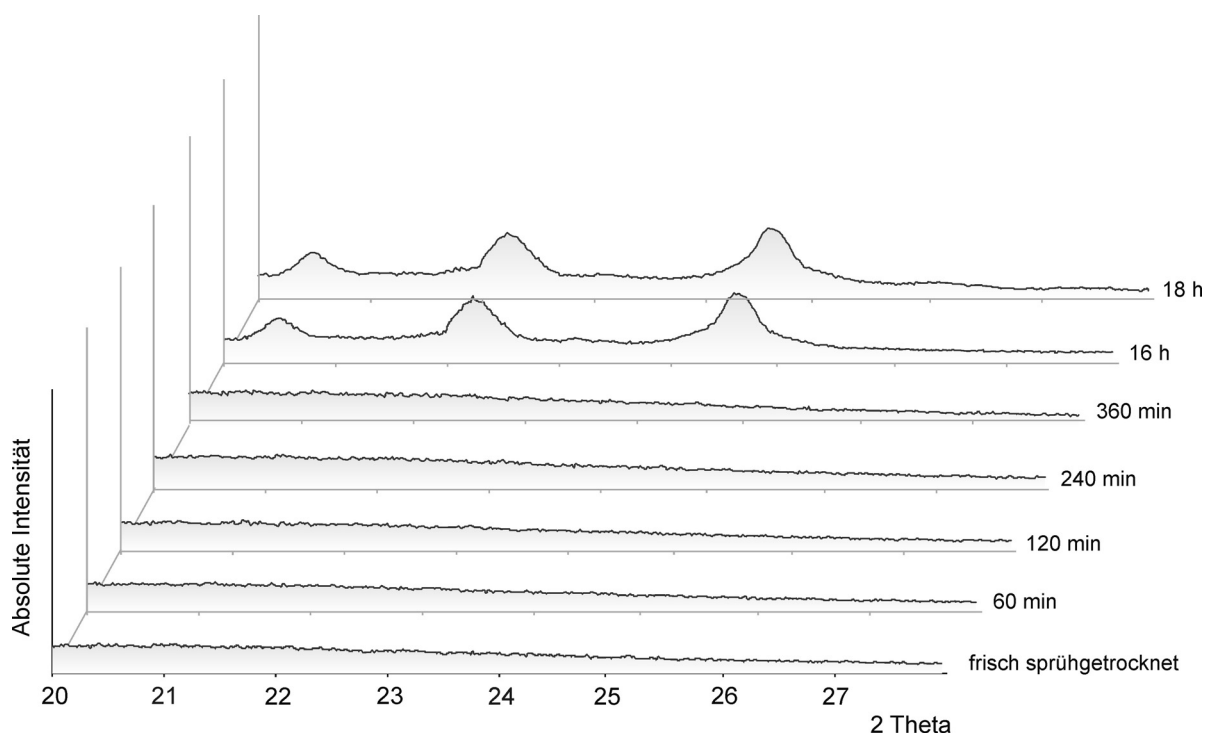


Abbildung 4.11: Röntgendiffraktogramme von sprühgetrocknetem SX im zeitlichen Verlauf (aufsteigend: frisch sprühgetrocknet, 1h, 2h, 4h, 5h, 16h, 18h)

Bei direktem Kontakt von amorphem SX mit Wasser konnte eine spontane Rekristallisation beobachtet werden. Um festzustellen, ob und in wie fern die Luftfeuchte einen Einfluss auf das Rekristallisationsverhalten von amorphem SX hat, wurde frisch hergestelltes amorphes SX in der Feuchtezelle des Röntgendiffraktometers präpariert und es wurden Diffraktogramme bei unterschiedlichen relativen Luftfeuchten zwischen 12% und 90% aufgezeichnet. In Abbildung 4.12 ist deutlich zu erkennen, wie mit zunehmender Luftfeuchte die Röntgenreflexe stärker werden, ab 60%-70% relativer Feuchte kann von einer Rekristallisation des Salmeterolxinafoats gesprochen werden.

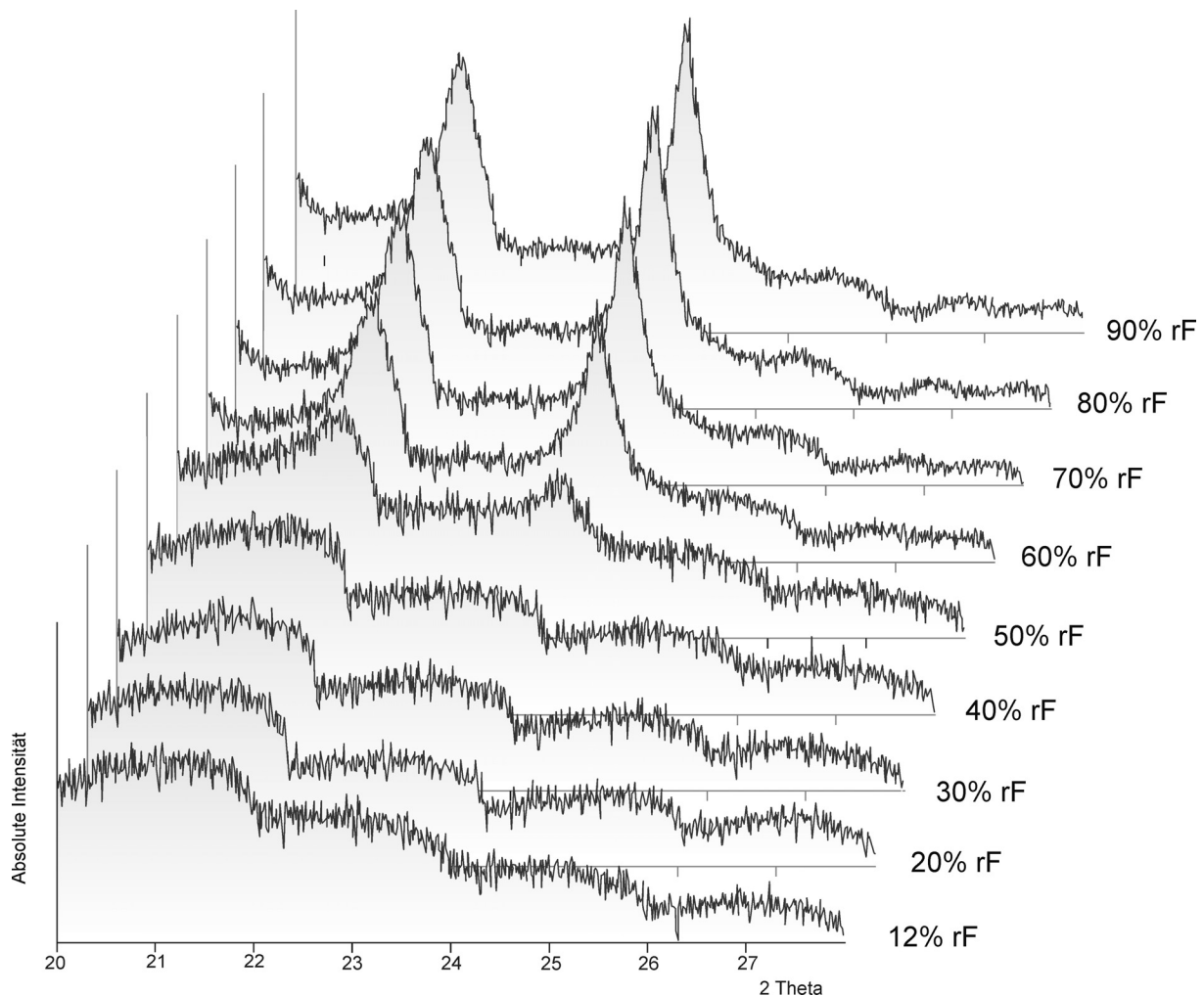


Abbildung 4.12: Röntgendiffraktogramme von sprühgetrocknetem SX bei ansteigenden relativen Feuchten (rF)

Salmeterolxinafoat ist schlecht wasserlöslich, wenig löslich in Ethanol, aber gut löslich in Methanol (Datenblatt SX, Sigma-Aldrich). Eigene Untersuchungen zur Löslichkeit ergaben eine Löslichkeit von Salmeterolxinafoat in Wasser von 0,08 mg/ml, von 5,0 mg/ml in 96% (V/V) Ethanol, 8,58 mg/ml in reinem Methanol und 30,94 mg/ml in reinem Aceton. Dazu wurden gesättigte Lösungen mit Bodensatz von SX im entsprechenden Lösemittel hergestellt und für 24 Stunden bei Raumtemperatur (22°C) im Wasserbad (SW20, Gerhardt, Deutschland) geschüttelt, anschließend durch einen 0,2 µm Celluloseacetat-Membranfilter (Sartorius, Göttingen, Deutschland) klar filtriert und der Gehaltsbestimmung per HPLC (siehe Kapitel 3.6) unterworfen. Alle

Löslichkeitsbestimmungen wurden dreifach durchgeführt. Untersuchungen zur Löslichkeit in unterschiedlichen Gemischen von organischem Lösemittel und Wasser zeigten die in Abbildung 4.13 dargestellte Abhängigkeit der Löslichkeit vom Wasseranteil. Interessanterweise erhöht sich die Löslichkeit von SX durch die Zugabe von Wasser in das Lösemittel zuerst, bevor bei höheren Wasseranteilen die Löslichkeit im Vergleich zum reinen organischen Lösemittel wie erwartet sinkt. Dieser Effekt ist umso ausgeprägter, je lipophiler das eingesetzte organische Lösemittel ist (Lipophilie von Methanol < Ethanol < Aceton). Salmeterolxinafoat benötigt demnach eine gewisse Polarität (Hydrophilie) des Lösemittels, um molekulardispers stabilisiert und damit gelöst zu werden.

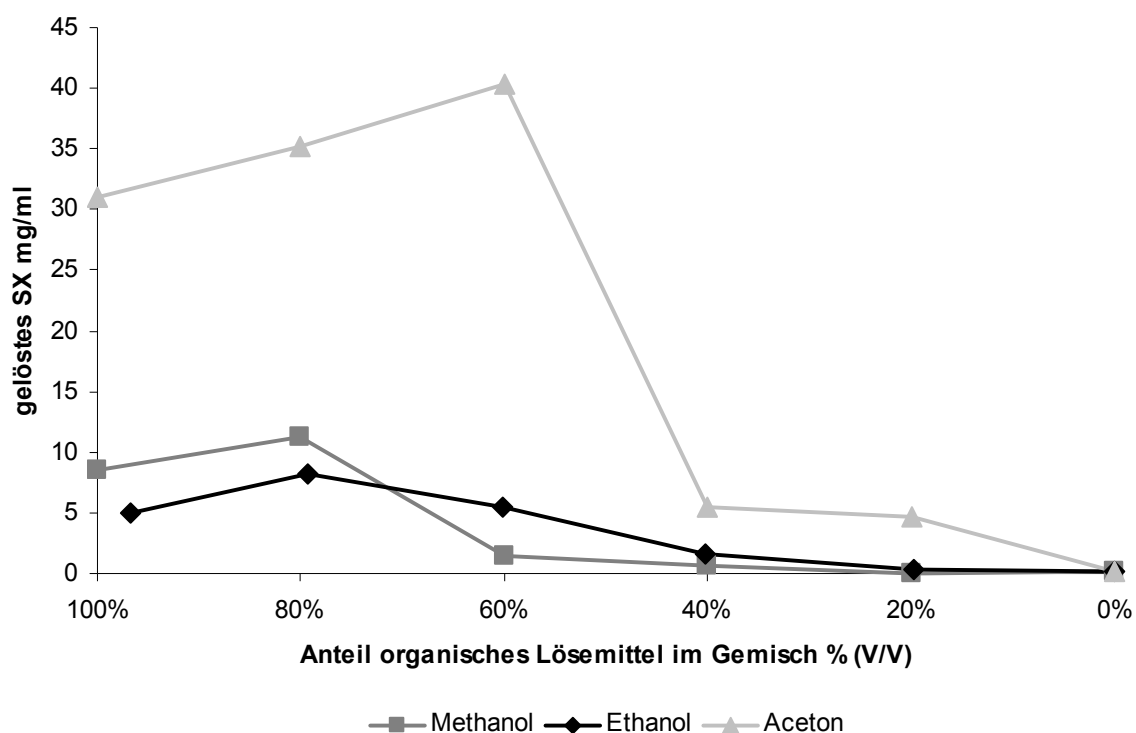


Abbildung 4.13: Löslichkeiten von Salmeterolxinafoat in unterschiedlichen Gemischen aus organischem Lösemittel und Wasser

Mikronisiertes Salmeterolxinafoat ist ein lichtempfindliches, weißes bis cremefarbenes Pulver, das sich unter Lichteinfluss, besonders in

organischer Lösung (Aceton), rasch zu violett gefärbten Produkten zersetzt. Pulver, die SX enthalten, verfärben sich unter Lichteinfluss bräunlich, zeigen jedoch keine Veränderung in der DSC-Untersuchung, in der HPLC-Analytik oder im Röntgendiffraktogramm. Darüber hinaus unterliegt SX einer temperaturabhängigen chemischen Zersetzung, die bei Temperaturen über 50°C beginnt (Tong et al., 2001). Salmeterolxinafoat kann des Weiteren bei 350 nm zur Fluoreszenz angeregt werden, die bei 450 – 470 nm detektierbar ist.

4.2.2 Fluticasonpropionat

Fluticasonpropionat (FP, Abbildung 4.14), chemische Bezeichnung (6 α ,11 β ,16 α ,17 α)-6,9-Difluoro-11-hydroxy-16-methyl-3-oxo-17-(1-oxopropoxy)androsta-1,4-dien-17-carbothionsäure-S-(fluoromethyl)-ester (Summenformel C₂₅H₃₁F₃O₅S) ist ein inhalatives Glucocorticoid der zweiten Generation, das in der Asthmatherapie zur effektiven Unterdrückung der Synthese von Entzündungsmediatoren verwendet wird.

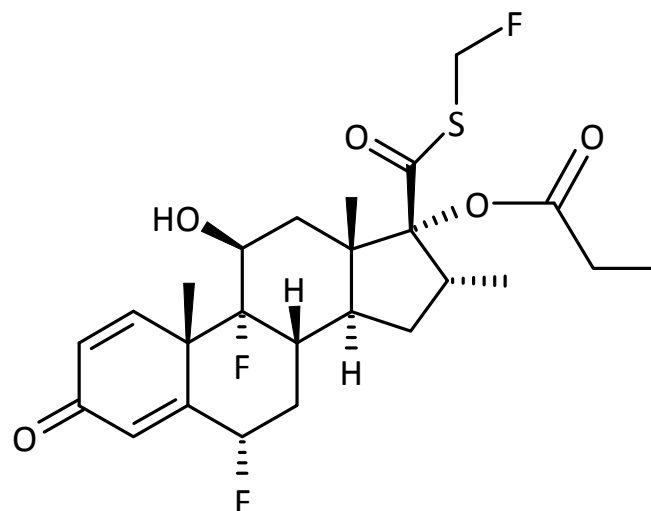


Abbildung 4.14: Strukturformel von Fluticasonpropionat

Im Vergleich mit anderen inhalativ angewendeten Glucocorticoiden wie Budesonid oder Flunisolid weist FP eine stärkere Bindung an das humane Lungengewebe auf und kann somit einen stärkeren Effekt erzielen (Michael et al., 2000). Fluticasonpropionat hat darüber hinaus die zweitstärkste relative Bindungsaffinität aller Glucocorticoide an den Glucocorticoid-Rezeptor (Winkler et al., 2004). Fluticasonpropionat ist nach inhalativer Gabe zu zirka 10-30% systemisch bioverfügbar (dem Anteil an lungengängigem Wirkstoff entsprechend) und wird über das CYP450-Enzymsystem der Leber abgebaut (Reynolds et al., 2005). Daran ist vor allem das Isoenzym CYP3A4 beteiligt, daher sind mögliche Interaktionen mit anderen über dieses Enzym metabolisierten Xenobiotika bei der Therapie mit Fluticasonpropionat zu beachten. Nach oraler Aufnahme (Verschlucken von im Rachenraum abgeschiedenem Inhalat) ist Fluticasonpropionat praktisch nicht bioverfügbar, da es einem ausgeprägten first-pass-Metabolismus unterliegt. Darüber hinaus hat FP nach systemischer Aufnahme ein deutlich größeres Verteilungsvolumen als Budesonid, was zu niedrigeren Blutspiegeln und damit auch zu einer niedrigeren Nebenwirkungsrate führt. Der Ester Fluticasonpropionat hat ein Molekulargewicht von 500,57 g/mol und ist relativ lipophil mit einem log P (Octanol/Wasser bei pH 7) von 2,78 (Hovione Datenblatt). Fluticasonpropionat wird rasch in der Lunge absorbiert (Absorptionshalbwertszeit 11 min) und hat eine Eliminationshalbwertszeit von ungefähr 8 Stunden (Minto et al., 2000). Einige Arbeiten postulieren, dass die Absorption von Fluticasonpropionat deutlich länger dauert und erklären die lange Eliminationshalbwertszeit mit einer langsamen pulmonalen Absorption (Allen et al., 2003). Allerdings legt die Tatsache, dass FP eines der lipophileren Glucocorticoide ist (Ciclesonid und sein Metabolit sind noch lipophiler), nahe, dass eine Absorption über das Lungenepithel rasch erfolgt. Einzig seine schlechte Löslichkeit im

wässrigen Milieu könnte dem entgegenstehen, so dass die pulmonale Verweilzeit erhöht ist (Winkler et al., 2004). Das Datenblatt von Hovione gibt zu Fluticasonpropionat eine geringe Löslichkeit in Methanol und Ethanol sowie eine gute Löslichkeit in Dimethylsulfoxid an. Eigene Untersuchungen zur Löslichkeit analog zu 4.2.1 ergaben, dass FP praktisch unlöslich in Wasser ist (0,37 µg/ml), die Löslichkeit in Ethanol wurde mit 1,30 mg/ml bestimmt, für Methanol betrug sie 3,11 mg/ml und für Aceton 34,48 mg/ml. Weiterhin wurde die Löslichkeit in unterschiedlichen Gemischen aus organischem Lösemittel (Methanol, Ethanol oder Aceton) und Wasser bestimmt (Abbildung 4.15). Dabei nimmt die Löslichkeit von FP mit zunehmendem Wasseranteil im Lösemittelgemisch rapide ab und ist bereits bei einem Wasseranteil von 60% (V/V) unabhängig vom verwendeten organischen Lösemittel praktisch unlöslich.

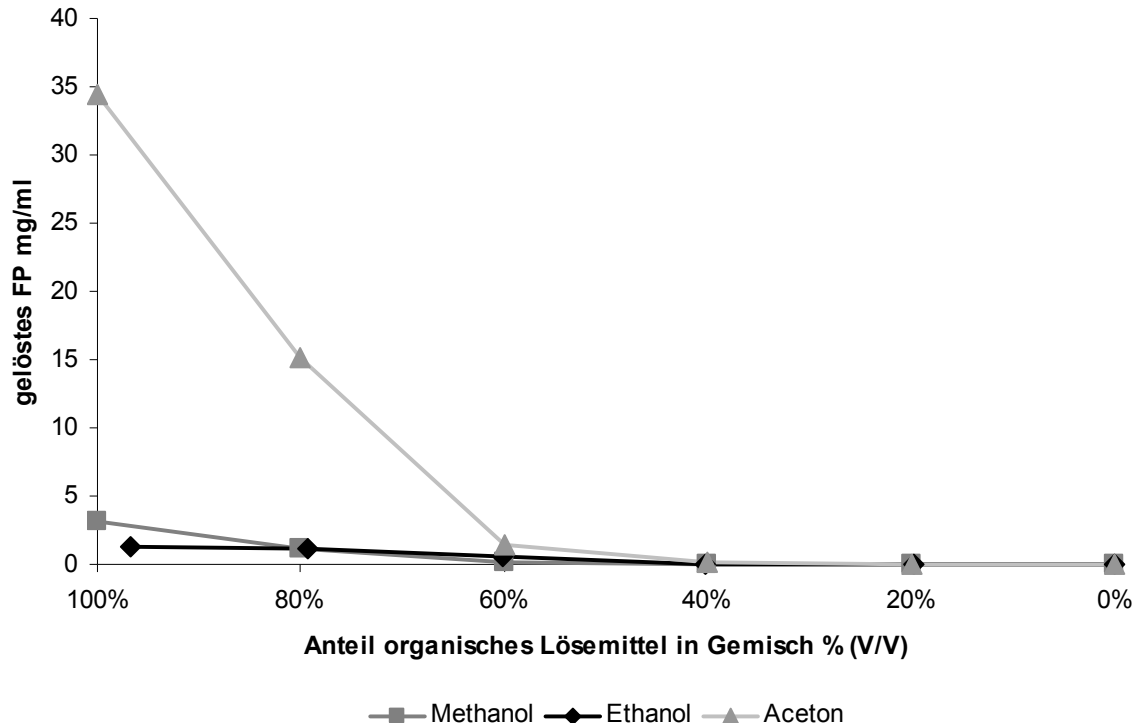


Abbildung 4.15: Löslichkeiten von Fluticasonpropionat in unterschiedlichen Gemischen aus organischem Lösemittel und Wasser

FP ist eine polymorphe Substanz, in der Literatur werden zwei Modifikationen mit ihren Röntgendiffraktogrammen beschrieben. Modifikation I ist die thermodynamisch stabile Form, die bei der Kristallisation aus organischen Lösemitteln mittlerer Polarität entsteht (Cejka et al., 2005), Modifikation II konnte bisher nur in überkritischem CO₂ hergestellt werden (Cooper, 1998). Modifikation II geht bei Temperaturen zwischen 154°C und 165°C in Modifikation I über, die zwischen 279°C und 291°C unter Zersetzung schmilzt (Kariuki et al., 1999). Kristalle von Fluticasonpropionat haben einen länglichen nadelförmigen Habitus, der allerdings bei der Mikronisation zerstört wird (Abbildung 4.16 und Abbildung 4.17). In dieser Arbeit wurde mikronisiertes Fluticasonpropionat als Rohstoff verwendet. Abbildung 4.18 zeigt ein typisches Röntgendiffraktogramm der Ausgangsware mit charakteristischen Röntgenreflexen bei 10,2 2 θ , bei 13,3 2 θ und bei 15,1 2 θ . Der Vergleich mit Literaturdaten (Cooper, 1998) zeigt, dass es sich bei dem verwendeten Fluticasonpropionat um Modifikation I handelt. DSC-Untersuchungen an der Ausgangsware legen ebenfalls nahe, dass sich FP ab 280°C beim Schmelzen zersetzt (Abbildung 4.19). Mikronisiertes Fluticasonpropionat ist ein weißes Pulver, das ohne Berücksichtigung besonderer Lagerbedingungen stabil ist. Das in dieser Arbeit verwendete FP wurde bei Raumtemperatur im Exsikkator über Silicagel gelagert.

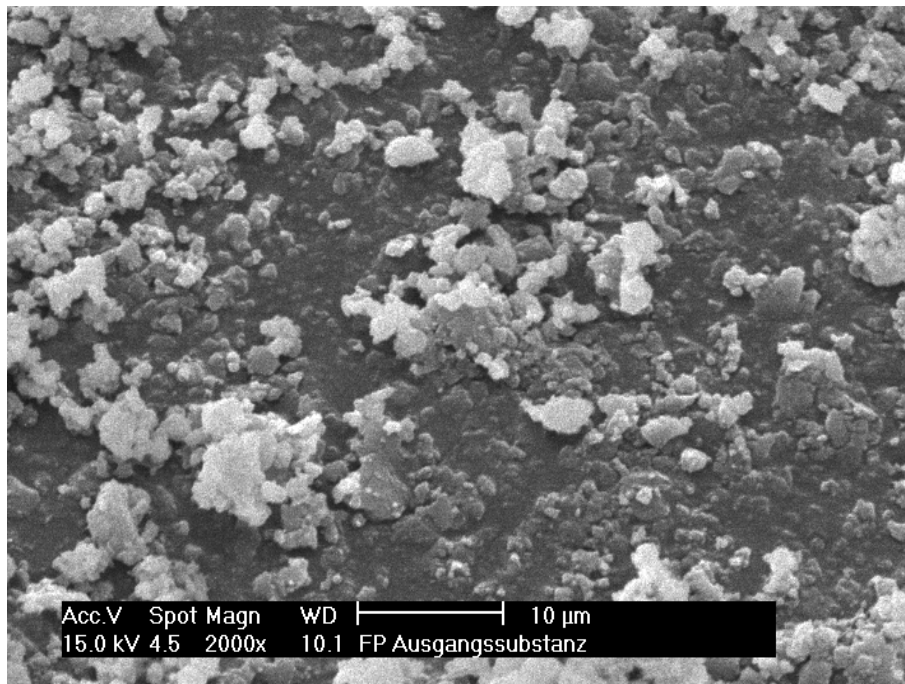


Abbildung 4.16: REM-Aufnahme von mikronisiertem Fluticasonpropionat (Ausgangssubstanz), 2000-fache Vergrößerung

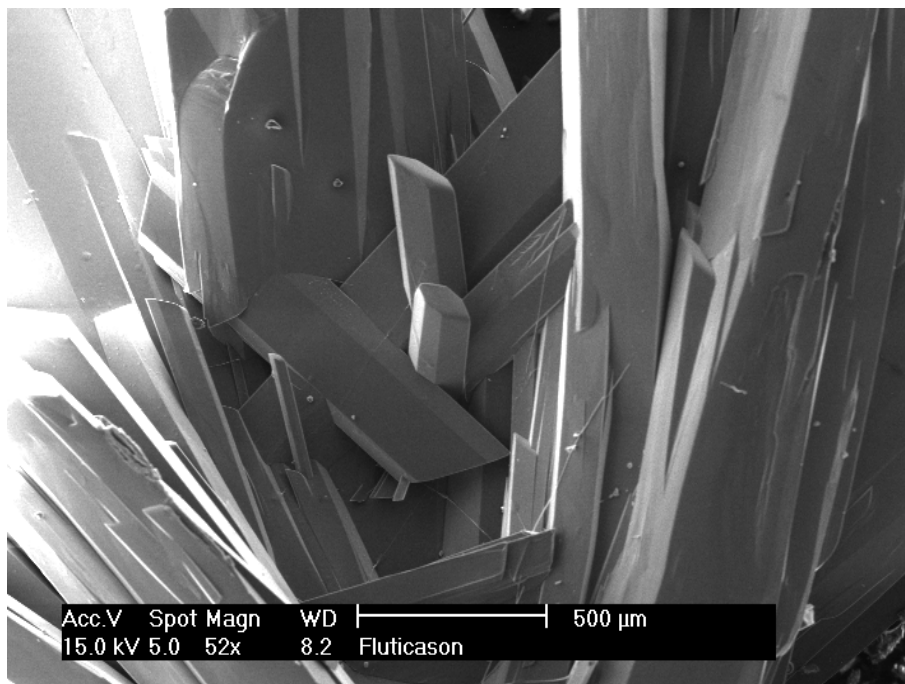


Abbildung 4.17: REM-Aufnahme von Fluticasonpropionat, langsam rekristallisiert aus Aceton, 52-fache Vergrößerung

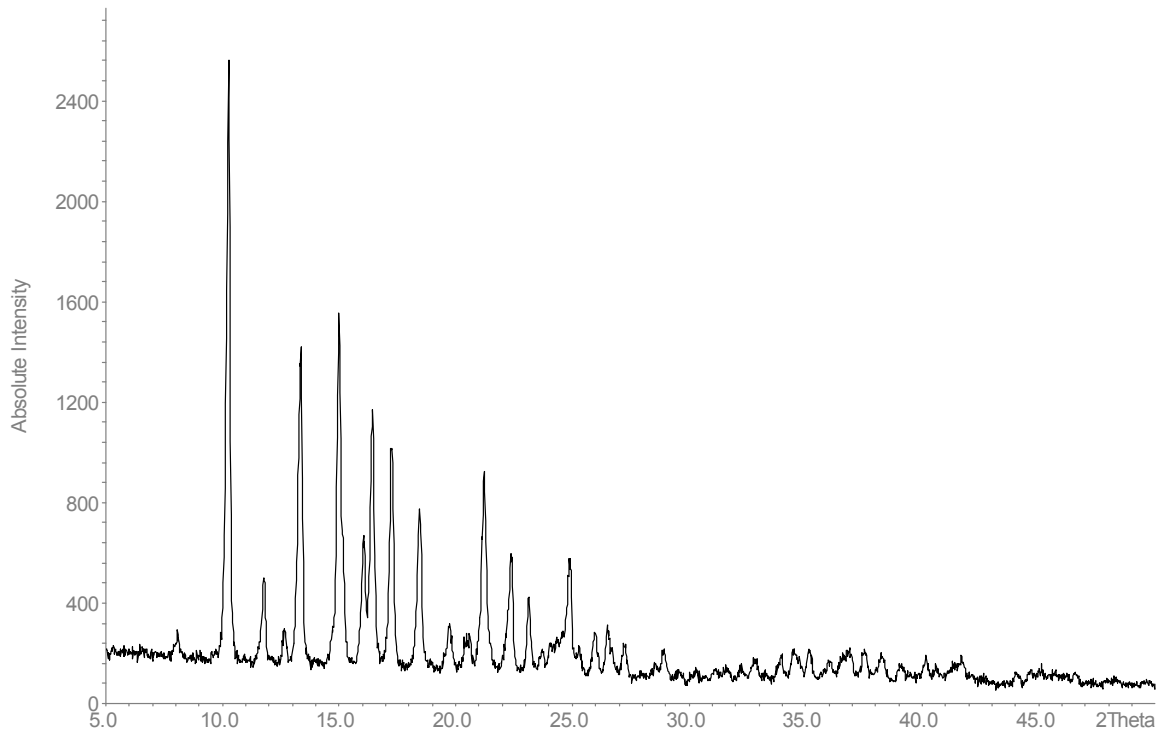


Abbildung 4.18: Röntgendiffraktogramm von Fluticasonepropionat (Ausgangssubstanz)

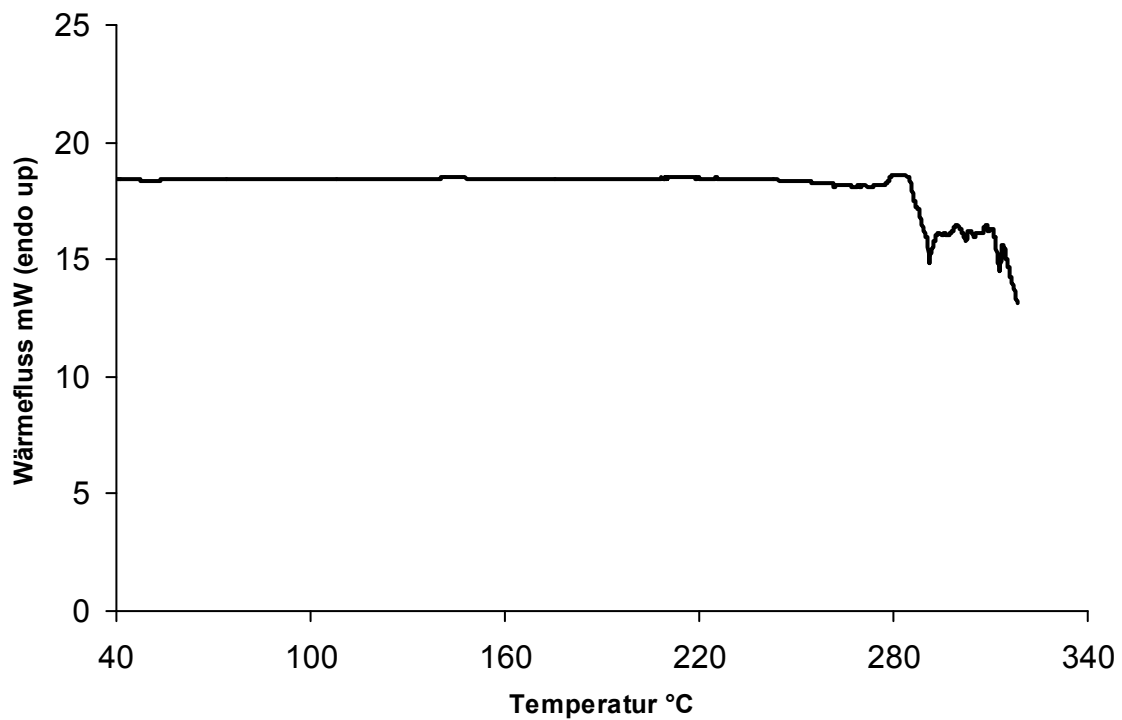


Abbildung 4.19: DSC-Diagramm von Fluticasonepropionat (Ausgangssubstanz)

5 Herstellung und Charakterisierung von Pulvern zur Inhalation

5.1 Einleitung

Zur Formulierung von Pulvern zur Inhalation werden Methoden zur Erzeugung von Partikeln mit einer Teilchengröße zwischen 0,5 µm und 10 µm, idealerweise unter 5 µm, benötigt. Dazu stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung, die grundsätzlich nach aufbauenden und abbauenden Verfahren unterschieden werden können (siehe Kapitel 2.3.1 und 5.2). Die Formulierungen sollen als trockene Pulver in geeigneter Partikelgrößenverteilung vorliegen und ein gutes aerodynamisches Verhalten aufweisen. Dazu werden die hergestellten Formulierungen hinsichtlich ihrer Teilchengröße mithilfe der Laserdiffraktometrie sowie bezüglich ihres aerodynamischen Verhaltens im Next Generation Pharmaceutical Impactor (NGI) charakterisiert.

5.1.1 Kristallinität und Partikelhabitus

Eine kristalline Substanz verfügt im festen Zustand über eine klar definierbare räumliche Anordnung der Moleküle zueinander. Es lässt sich eine sogenannte Elementarzelle beschreiben, deren räumliche Anordnung sich im Kristallgitter wiederholt. Ein Kristall, der ausschließlich aus der Wiederholung der Elementarzelle aufgebaut ist, wird Einkristall genannt und ist nur unter bestimmten Bedingungen herstellbar. Eine Elementarzelle wird durch ihre räumliche Ausdehnung a , b , und c in die drei Raumrichtungen sowie durch die jeweils umschließenden Winkel α , β , und γ beschrieben. Durch die unterschiedlichen Kombinationen können so sieben Kristallsysteme und die daraus erweiterten 14 Bravais-Gitter dargestellt werden, mit denen

alle Kristalle erklärt werden können (Vippagunta et al., 2001). Der Aufbau einer Elementarzelle lässt sich durch röntgendiffraktometrische Messungen am Einkristall darstellen, da die Elementarzellgrenzen Netzebenen im Kristall bilden, an denen der Röntgenstrahl gebrochen werden kann (Beyer und Maasz, 1987). Zumeist liegen im festen Zustand neben hochgeordneten Bereichen auch ungeordnete Bereiche vor, der Kristall weist Defekte auf. Eine Reihe von Substanzen verfügt nicht nur über eine einzige Möglichkeit des räumlichen Aufbaus einer Elementarzelle, sondern über zwei oder mehr. Solche Substanzen werden polymorphe Substanzen genannt, sie können in unterschiedlichen Modifikationen vorliegen. So kann innerhalb der kristallinen Modifikationen zwischen thermodynamisch stabileren und instabileren Modifikationen unterschieden werden (siehe Kapitel 3.3). Dabei differieren die Modifikationen nicht nur im Aufbau ihrer Elementarzelle, sondern auch in ihren physikochemischen Eigenschaften, wie Schmelzpunkt und Löslichkeit, und können dadurch voneinander unterschieden werden. Darüber hinaus können kristalline Substanzen auch als molekulare Addukte in pseudo-polymorphen Modifikationen als Solvate oder in nicht-stöchiometrischen Verbindungen, beispielsweise als Einschlussverbindungen, vorliegen (Halebian, 1975). Ist die räumliche Anordnung der Moleküle im Feststoff völlig ungeordnet, so liegt ein amorpher Stoff vor. Amorphie ist ein thermodynamisch instabiler Zustand, der sich mit der (Lager)Zeit in eine stabilere kristalline Modifikation umwandeln wird. Der amorphe Zustand einer Substanz kann etwa entstehen, wenn die gelöste oder geschmolzene Substanz einer rapiden Trocknung oder Abkühlung ausgesetzt ist, so dass keine Kristallisationskeime entstehen können. Darüber hinaus können auch Prozesse, bei denen die Substanz hohen Energien ausgesetzt ist, wie beispielsweise ein Mahlvorgang, Amorphie

induzieren (Ward und Schultz, 1995). Dabei werden amorphe Bereiche vorrangig auf der Oberfläche des Produkts zu finden sein. Eine Reihe von Substanzen, vorrangig makromolekulare Verbindungen, liegen ausschließlich als amorphe Substanzen vor (Hancock und Zografi, 1997). Amorphe Substanzen zeigen keinen Schmelzpunkt und haben eine im Vergleich zur kristallinen Modifikation deutlich erhöhte Löslichkeit. Amorphe Zustände normalerweise kristalliner Substanzen neigen insbesondere unter dem Einfluss von Feuchtigkeit zur Rekristallisation.

Neben der Modifikation eines Feststoffes, die durch das Aussehen der Elementarzelle beschrieben wird, kann auch der Habitus eines Kristalls deutliche Unterschiede aufweisen. Der Habitus beschreibt das makroskopische Aussehen eines Kristalls und sagt nichts über das Aussehen der Elementarzelle, wenn auch die Kristalltracht ein Abbild der Elementarzelle sein *kann*. Der Habitus eines Kristalls hängt unter anderem von der Art des Lösemittels ab, aus dem er kristallisiert wurde. In vielen Molekülen lassen sich polare und apolare Bereiche definieren. Entsprechend dem Elementarzellaufbau werden diese Bereiche an bestimmten Seiten der Elementarzelle und damit letztlich auch an bestimmten Seiten des Kristalls bevorzugt zu finden sein. Eine polare Kristallseite kann von polaren Lösemitteln besser stabilisiert werden, wohingegen eine apolare Seite von apolaren Lösemitteln besser stabilisiert werden kann (siehe Abbildung 5.1). Dementsprechend wachsen die jeweils schlechter stabilisierten Seiten des Kristalls bei der Kristallisation stärker als die gut stabilisierten Seiten; der Kristall bekommt seinen Habitus. In der Literatur wird dies am Beispiel von α -Glycin durch die starke Bindung zwischen Lösemittel und Oberfläche an der entsprechenden Kristallseite erklärt, die dadurch das Wachstum inhibiert (Lahav und Leiserowitz, 2001). Dabei ist die im Kristall

dominierende *Fläche* diejenige, die gut stabilisiert wird und auf der sich entsprechend weniger neue Feststoffschichten aufbauen (Bauer et al., 2006).

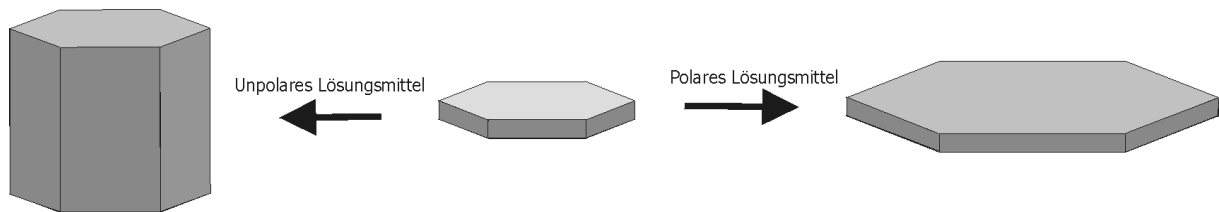


Abbildung 5.1: Kristallhabitusbildung in Abhängigkeit vom Lösungsmittel (dunkelgrau = lipophile Fläche, hellgrau = hydrophile Fläche)

Grundsätzlich werden zwei Habiti unterschieden, allotriomorphe (anhedrale) Kristalle mit irregulärer Oberfläche und idiomorphe (euhedrale) Kristalle mit glatten Oberflächen (Halebian, 1975). Idiomorphe Kristalle können weiter eingeteilt werden in quaderförmige, plättchenförmige, prismatische, nadelförmige und klingenförmige Kristalle (siehe Abbildung 5.2).

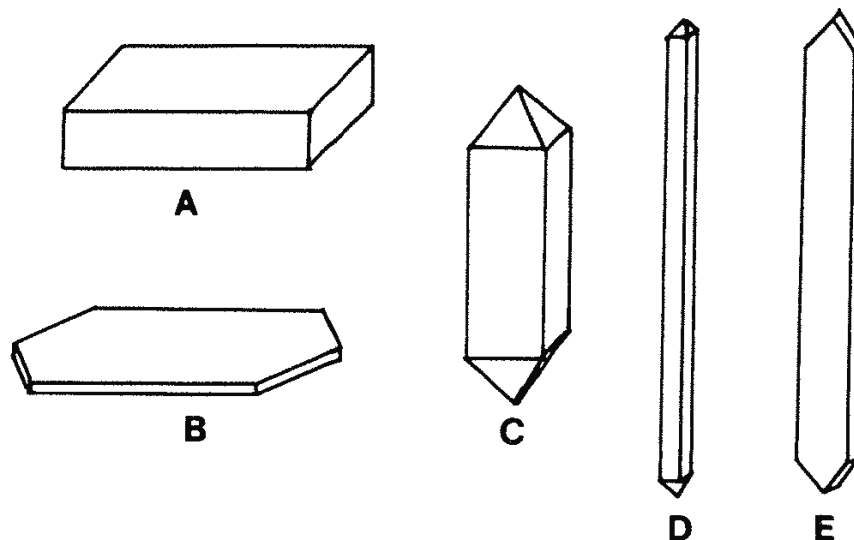


Abbildung 5.2: Formen idiomorpher Kristalle. A quaderförmig, B plättchenförmig, C prismatisch, D nadelförmig, E klingenförmig (modifiziert nach Halebian, 1975)

Die Kristallinität einer Formulierung spielt bei festen Darreichungsformen eine wichtige Rolle, da ein kristallines Vorliegen der Wirkstoffe im Vergleich zu einer amorphen Form deutliche Vorteile in der Stabilität bringt (Yu, 2001). Die höchste Stabilität zeigen naturgemäß Formulierungen der thermodynamisch stabilen Modifikation. Gleichzeitig hat diese Modifikation im Vergleich zu thermodynamisch instabileren Modifikationen oder dem amorphen Zustand aber auch die geringste Löslichkeit. Bei ohnehin schlecht wasserlöslichen Substanzen (Klassen 2 und 4 nach dem biopharmazeutischen Klassifikationssystem) kann dieser Unterschied entscheidend für das Ausmaß der Bioverfügbarkeit sein. Dementsprechend wichtig ist es, von vorneherein zu charakterisieren, in welchem Zustand der Wirkstoff in der Formulierung vorliegt und wie stabil dieser ist, damit nicht während der Lagerzeit Modifikationsänderungen eintreten, die zu einer Beeinträchtigung der Löslichkeit und somit zu einem Verlust an Wirkung führen.

Für Pulver zur Inhalation ist auch der Partikelhabitus entscheidend, denn die Morphologie des Partikels beeinflusst sowohl das Fließverhalten als auch die aerodynamischen Eigenschaften. In Abhängigkeit von der Gestalt des Partikels kann der aerodynamische Partikeldurchmesser berechnet werden, der eine Funktion der Dichte und des dynamic shape factors ist (Telko und Hickey, 2005). So können nadelförmige Partikel ein besseres Flugverhalten zeigen als sphärische, weil sie sich im Luftstrom orientieren können und damit ein kleineren Partikeln äquivalentes Flugverhalten zeigen. Darüber hinaus können auch größere Agglomerate eines Pulverinhalats durch die Inhalation gut getrennt werden, wenn die Primärpartikel nicht rund, sondern nadelförmig sind, da diese nicht so eng aneinander liegen und aggregieren können wie sphärische oder plättchenförmige Partikel. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Feinpartikelfraktion für Pulvermischungen mit

einem nadelförmigen Wirkstoffkristallisat deutlich höher ist als die eines plättchenförmigen Kristallisats desselben Wirkstoffes (Ikegami et al., 2003).

5.1.2 Hilfsstoffe in pulmonalen Darreichungsformen

Grundsätzlich muss bei der Hilfsstoffauswahl bedacht werden, dass die Hilfsstoffe ebenso wie die Wirkstoffe in die Lunge gelangen, dort über das Epithel absorbiert werden und einen lokalen oder systemischen Effekt hervorrufen können. Dementsprechend muss ein Formulierungshilfsstoff in den eingesetzten Konzentrationen sicher untoxisch sein und darf keine eigene Wirkung aufweisen. Es gibt nur wenige Hilfsstoffe, die bereits in inhalativen Darreichungsformen eingesetzt werden. Die Food and Drug Administration (FDA) in den USA akzeptiert neben Laktose als grobem Trägerstoff in Pulverformulierungen auch Materialien, die in der Lunge endogen vorkommen, wie Albumin und Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) oder Lecithin, sowie Trehalose und Mannitol als Träger oder proteinstabilisierende Hilfsstoffe (Bosquillon et al., 2001). Darüber hinaus sind Produkte zugelassen, die den oberflächenaktiven Stoff Sorbitantrioleat, das Cosolvens Ethanol sowie das Konservierungsmittel Benzalkoniumchlorid oder Zitronensäure enthalten. Diese Produkte sind als Lösung oder Suspension zur Inhalation formuliert und enthalten des weiteren Wasser oder ein druckverflüssigtes Treibmittel. In Deutschland ist die Auswahl an Hilfsstoffen weniger eingeschränkt, es gibt beispielsweise auch Präparate, die Glucose als Trägerstoff enthalten oder mit Glycerol und Polysorbaten (Polysorbat 20 und Polysorbat 80) formuliert sind.

5.2 Aufbauende Verfahren

Aufbauende Verfahren, sogenannte „bottom up“ Technologien, sind Verfahren, die von molekularer Ebene ausgehend größere Einheiten durch Molekülassoziation entstehen lassen. Dabei können diese Einheiten homogen aus einer Art von Molekülen oder heterogen aus verschiedenen Molekültypen aufgebaut sein. Die molekulare Verteilung findet sich beispielsweise in einer Lösung oder einer Schmelze, aus der größere Einheiten hergestellt werden können. Aus einer Lösung kann dies durch Entfernen des Lösemittels durch Evaporation geschehen. Dabei bestimmt das Verfahren der Trocknung die Charakteristik der entstehenden Einheiten. Bei einem langsamen Trocknen einer Wirkstofflösung wird die Lösung übersättigen, es beginnt Kristallisation und die Kristalle können mit zunehmender Trocknung wachsen. Bei einem schnellen Trocknungsvorgang, wie der Sprühtrocknung, ist ein langsames Kristallisieren nicht möglich, dementsprechend fallen die Substanzen häufig amorph an. Darüber hinaus können auch durch Präzipitation aus einer Substanzlösung größere Molekülassoziate abgeschieden werden (siehe Kapitel 5.2.2). Dies kann einerseits bei Normalbedingungen, etwa durch eine Änderung der Löslichkeit bei Temperaturänderung oder durch Zugabe eines Nicht-Lösemittels erfolgen, eine Präzipitation kann andererseits auch in überkritischen Gasen stattfinden (Rehman et al., 2003). Dabei wird die Substanzlösung in eine überkritische Gasphase eingebracht, deren Löseeigenschaften so eingestellt sind, dass das eingesprühte Lösemittel ebenfalls gelöst werden kann, während der darin gelöste Feststoff ausfällt (supercritical fluid technology).

5.2.1 *Sprühtrocknen aus Lösung*

Das Verfahren der Sprühtrocknung kann angewendet werden, um aus einer Lösung, Suspension oder Emulsion in einem Verfahrensschritt ein trockenes Pulver mit einer für die Inhalation geeigneten Teilchengrößenverteilung zu erzeugen. In einem typischen Sprühtrockner wird die flüssige Formulierung mithilfe einer Sprühvorrichtung in viele kleine Tröpfchen zerstäubt, die in einem erwärmten Gasstrom getrocknet werden. Das verwendete Gas ist in der Regel Luft oder ein Inertgas, wie beispielsweise Stickstoff. Während Laborsprühtrockner häufig mit einer Zerstäuberdüse arbeiten, die in Abhängigkeit von der Auslassöffnung eine mittlere Tröpfchengröße von 10 µm produzieren, verfügen Sprühtrockner im Produktionsmaßstab oft über eine Zerstäuberscheibe, bei der die Zentrifugalkraft einer rotierenden Scheibe zum Zerreißen der Lösung in Tröpfchen ausgenutzt wird. Das Trocknen der Tröpfchen beginnt sofort nach dem Zerstäuben. Dabei verdunstet das Lösemittel von der Tropfenoberfläche und kühlt gleichzeitig das Produkt, das auf diese Weise nur einer geringen thermischen Belastung ausgesetzt ist. Erst nach vollständiger Trocknung erwärmt sich auch das Produkt. Die Zeit, während der sich ein Tröpfchen durch den Sprühturm bewegt, ist sehr kurz und liegt je nach Größe und Bauweise des Sprühtrockners im Bereich von 10^{-4} Sekunden. Während des Trocknungsprozesses findet, insbesondere bei einer Grenzflächenaktivität der gelösten Feststoffe, eine Anreicherung der Substanzen an der Tröpfchenoberfläche statt, so dass sprühgetrocknete Partikel morphologisch häufig einer Hohlkugel entsprechen. Diese kann anschließend kollabieren oder auch eine Ausblasöffnung aufweisen. Durch die Oberflächenorientierung der Substanzen können gezielt Partikel mit besonderen Oberflächeneigenschaften erzeugt werden. Die Größe der Partikel im Produkt ist abhängig von der initialen

Tropfengröße, dem Feststoffgehalt sowie von der Abscheideeffektivität des Zyklons (Elversson, 2005). Das Verfahren der Sprühtrocknung zur Erzeugung von Partikeln zur Inhalation ist beispielsweise für Salbutamolsulfat und Ipratropiumbromid (Corrigan et al., 2006) wie auch für Terbutalin als eine sustained-release-Formulierung (Learoyd et al., 2007) beschrieben und bildet die Basis für das patentierte PulmoSphere-Verfahren (sprühgetrocknete Partikel niedriger Dichte für die Anwendung in HFA-Suspensionen). Der Sprühtrocknungsvorgang bietet die Möglichkeit, mehrere Substanzen in einem Partikel zusammenzufassen und kann so das Problem, eine homogene Mischung herzustellen, wie es bei Pulvermischungen häufig auftaucht, umgehen.

5.2.1.1 Sprühtrockner

Der für diese Arbeit verwendete Laborsprühtrockner B-290 (Büchi, Flawil, Schweiz) arbeitet mit einer pneumatisch selbstreinigenden Zweistoffdüse (Düsendurchmesser 1,4 mm), die die zu versprühende Lösung oder Dispersion und den Zerstäubergasstrom parallel führt. Der Sprühtrockner arbeitet im Gleichstromverfahren (maximale Aspiratorleistung 40 m³/h), bei dem Düse und Trocknungsgasstrom in die gleiche Richtung strömen (siehe Abbildung 5.3). Dies führt zu einer besonders geringen thermischen Belastung des Produktes. Zur Produktsammlung wurde der Hochleistungszyklon verwendet, der auch sehr kleine Partikel noch aus dem Gasstrom abscheiden kann. Hinter den Zyklon ist ein Filter gesetzt, der die nicht abgeschiedenen Partikel aus der Abluft entfernt. Der gesamte Trockenraum des B-290 ist aus Glas gefertigt, was die visuelle Beobachtung der Trocknung ermöglicht.

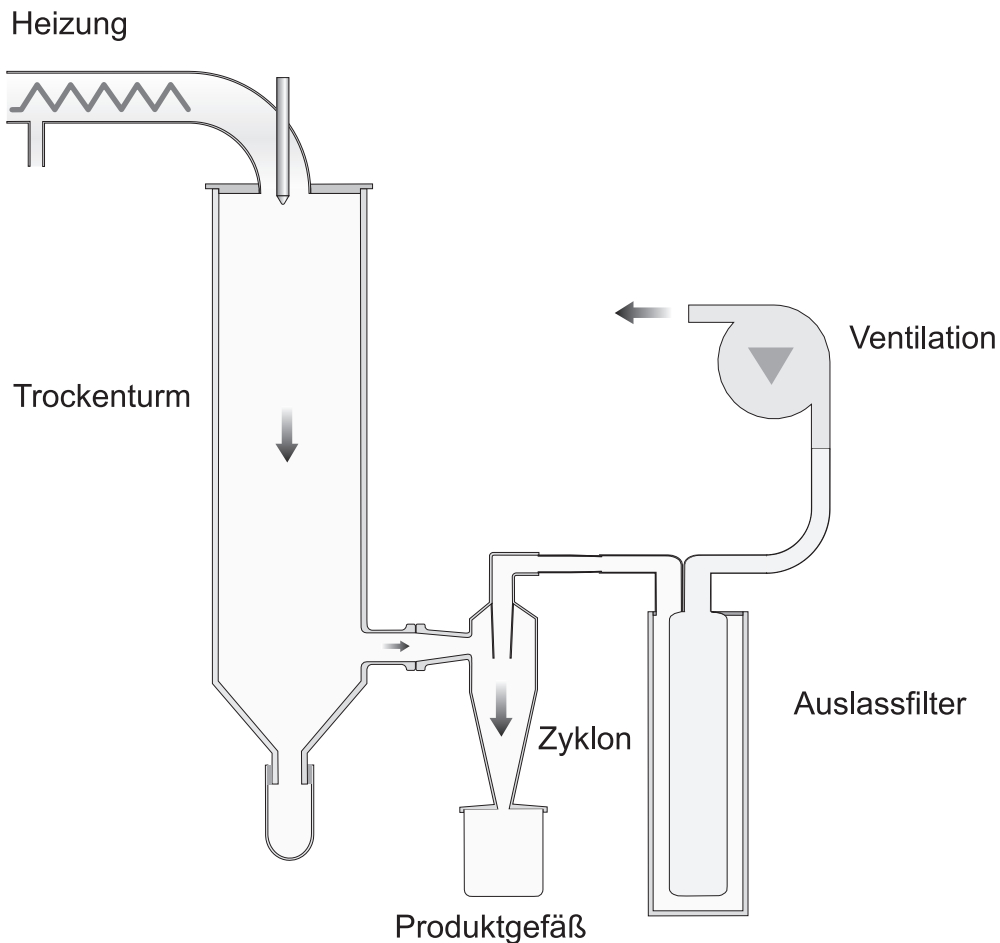


Abbildung 5.3: Skizze des Luftweges im Sprühtrockner B-290

5.2.1.2 Sprühtrocknungsparameter

Zur Festsetzung der Sprühtrocknungsparameter wurden folgende Überlegungen angestellt. Die Auslasstemperatur entspricht beim Sprühtrocknungsvorgang derjenigen Temperatur, die das Produkt tolerieren muss. Wenn das Produkt temperaturempfindlich ist, muss eine entsprechend niedrige Auslasstemperatur gewählt werden. Diese ist abhängig von der Einlasstemperatur und von der Förderrate. Die Differenz zwischen Ein- und Auslasstemperatur sollte nicht zu groß sein. Da Salmeterolxinafoat ab 50°C einer thermischen Zersetzung unterliegt (siehe Kapitel 4.2.1), sollte die Auslasstemperatur 50°C nicht überschreiten. Um eine ausreichende Temperaturdifferenz zur Trocknung zu gewährleisten, wurde eine Einlasstemperatur zwischen

85°C und 120°C gewählt. Die Pumpeneinstellungen wurden dementsprechend angepasst und lagen in der Regel zwischen 10% und 25% Pumpleistung. Der Aspirator wurde bei seiner Maximalleistung betrieben, um eine optimale Abscheidung kleiner Partikel im Hochleistungszyklon zu gewährleisten. Zur Reinigung der Düse wurde diese in regelmäßigen Abständen von einer pneumatisch betriebenen Nadel durchstoßen. Die Parameter sind in Tabelle 5.1 noch einmal zusammengefasst.

Tabelle 5.1: Sprühparameter für die Sprühtrocknung aus Lösung am B-290

Parameter	Einstellung
Einlasstemperatur	85°C - 120°C
Auslasstemperatur	< 50°C
Aspiratorleistung	100 %
Pumpleistung	variabel (entsprechend Auslasstemp.)

Um den Einfluss der Einlasstemperatur auf die resultierende Partikelgrößenverteilung zu untersuchen, wurden Versuche mit unterschiedlichen Einlasstemperaturen zwischen 85°C und 120°C durchgeführt. Die Sprühdrate wurde jeweils so angepasst, dass die Auslasstemperatur bei 50°C oder niedriger lag. Die Bestimmung der Partikelgrößenverteilung der trockenen Pulver wurde mittels Laserdiffraktometrie nach Resuspendierung unter Ultraschall in Wirkstoff-gesättigtem Wasser vorgenommen (siehe Kapitel 3.1.1). Wie in Abbildung 5.4 ersichtlich, hat die Einlasstemperatur keinen signifikanten Einfluss auf die Partikelgrößenverteilung. Es ist lediglich eine Tendenz zu etwas größeren Teilchen bei höherer Einlasstemperatur erkennbar, allerdings liegen die Werte für das 90%-Quantil der Teilchengrößenverteilung einiger Chargen niedriger als die mittleren Teilchengrößen (x_{50}) anderer Chargen und die Konfidenzintervalle überschneiden sich. Daraus folgend wurde für die späteren Versuche

eine Einlasstemperatur von 120°C festgelegt, da dies eine akzeptable Sprühgeschwindigkeit ermöglicht ohne die Teilchengröße signifikant zu beeinflussen.

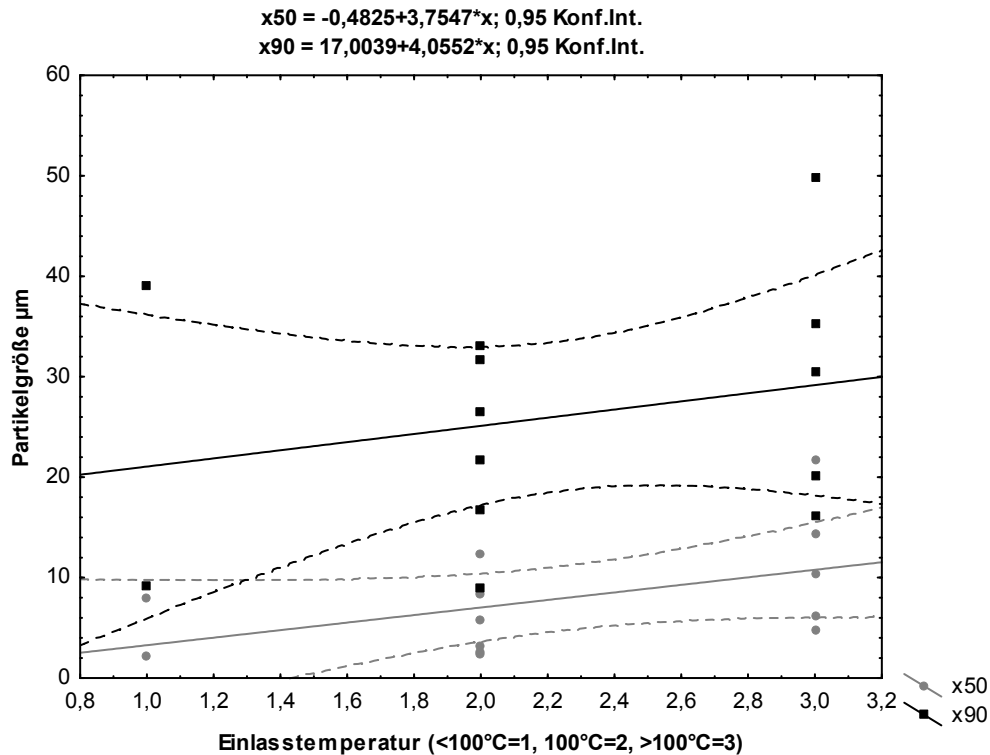


Abbildung 5.4: Einfluss der Einlasstemperatur auf die Teilchengrößenverteilung sprühgetrockneter Pulver

5.2.1.3 Formulierungsvariablen

Lösemittel

Es wurde eine Reihe von Versuchen mit den beiden Wirkstoffen Salmeterolxinafoat und Fluticasonpropionat durchgeführt. Die Wirkstoffe wurden dabei immer in einem Verhältnis von 1,45 plus 2 (1 plus 2 bezogen auf Salmeterol, siehe Kapitel 4.1) eingesetzt. Für die Herstellung der Lösung zur Sprühtrocknung wurden unterschiedliche Lösemittel getestet, diese waren Aceton, Methanol, 96% (V/V) Ethanol und Acetonitril. In allen Lösemitteln ist die Wirkstoffkombination löslich,

die Löslichkeit liegt zwischen 0,3% (m/V) für Ethanol und 1,5% (m/V) für Aceton.

Tabelle 5.2: Viskositäten der verwendeten Lösemittel

Lösemittel	Viskosität bei 20°C in mPa·s
Aceton	0,33
Ethanol	0,79
Methanol	0,792
Acetonitril	0,84

Der Sprühtrocknungsvorgang wurde ohne Inertbegasung durchgeführt. Da alle verwendeten Lösemittel mit Luft explosionsfähige Gemische bilden, wurde dafür zuvor die maximale Sprührate berechnet, die eingehalten werden muss, um im Gasvolumen unterhalb der Explosionsgrenze zu bleiben. Die tatsächlichen Sprühraten, die sich aus Einlasstemperatur und gewünschter Auslasstemperatur ergaben, lagen in allen Versuchen weit unter der berechneten Maximalsprührate. Die untersuchten Lösemittel unterscheiden sich neben ihrer Lösefähigkeit für die verwendete Wirkstoffkombination auch in ihrer Viskosität. Die Viskosität liegt bei allen Lösemitteln unter der von Wasser mit 1 mPa·s, das bedeutet für den Prozess der Tropfenformung, dass im Vergleich zu Wasser kleinere Tröpfchen entstehen. Die Viskositäten bei 20°C können aus Tabelle 5.2 entnommen werden. Unter der Annahme gleicher Temperaturabhängigkeit der Viskositäten lässt sich daraus ableiten, dass Aceton die kleinste Tropfengröße ergibt, während Acetonitril die größten Tröpfchen formt. Dies müsste sich bei gleicher Feststoffbeladung auch in der Partikelgröße der resultierenden Pulver niederschlagen. Aus allen Lösemitteln konnten ohne weiteren Hilfsstoffzusatz trockene Pulver hergestellt werden, die jedoch stark an der Glaswand des Zyklons und des Produktgefäßes des Sprühturms hafteten und deren Haptik stumpf war. Rasterelektronenmikroskopische

Aufnahmen der Pulver zeigen stark aggregierte Pulverpartikel mit einem runden Habitus der Primärpartikel (Abbildung 5.5). Es ist anzunehmen, dass die Aggregate auch bei Dispergierung in Wasser im Ultraschallbad nur teilweise getrennt wurden, was insbesondere die hohen Werte des 90%-Quantils der Teilchengrößenverteilung erklärt (siehe Abbildung 5.4).

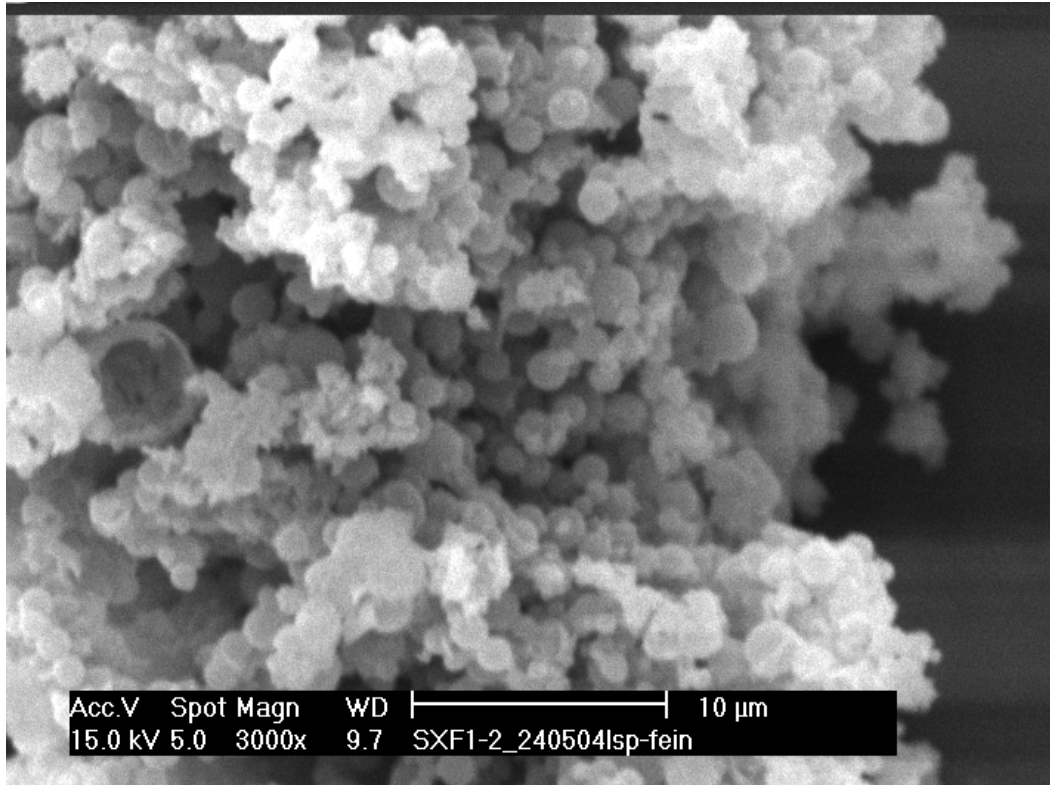


Abbildung 5.5: REM-Aufnahme sprühgetrockneter Partikel aus Aceton (1,5% (m/V) Wirkstoff), 3000-fache Vergrößerung

Darüber hinaus scheinen die Primärpartikel aneinander zu kleben. In den rasterelektronischen Aufnahmen sind Brücken zwischen den Primärpartikeln zu erkennen, die sich durch ein Erwärmen der Probe deutlich verstärken lassen. Dazu wurde eine Partikelprobe für REM-Aufnahmen präpariert, untersucht, anschließend für 24 Stunden bei 40°C im Trockenschrank getempert und nach dem Abkühlen im Exsikkator bei Raumtemperatur über Silicagel erneut rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Wie Abbildung 5.6 zeigt, führt dies zu einer deutlichen Verstärkung der Brücken zwischen den Primärpartikeln. Einer

Temperatur von 40°C ist das Produkt in jedem Fall bereits im Sprühturm ausgesetzt, so dass anzunehmen ist, dass dieser Effekt bereits während der Herstellung eintritt und sich mit zunehmender Verweilzeit im Sprühturm verstärkt.

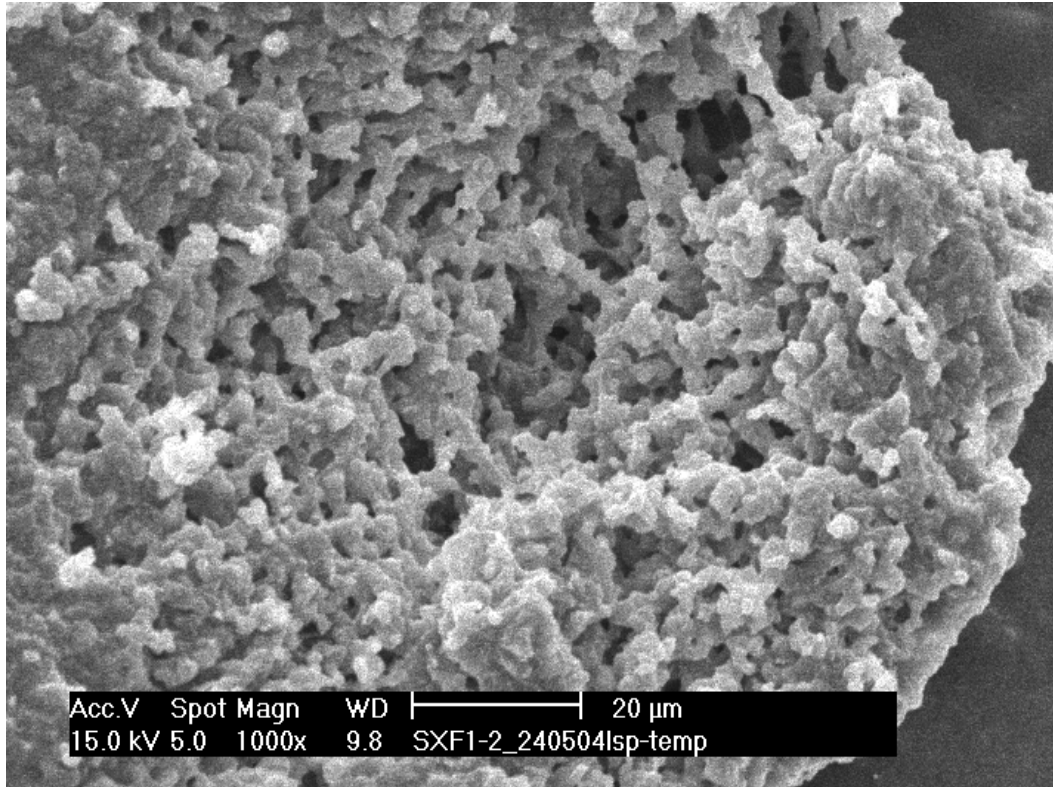


Abbildung 5.6: REM-Aufnahme aus Aceton sprühgetrockneter Partikel nach 24 Stunden Tempern bei 40°C, 1000-fache Vergrößerung

Zusätzlich kommt dabei zum Tragen, dass Salmeterolxinafoat beim alleinigen Sprühen aus acetoni-ger Lösung zu einem klebrigen, amorphen Produkt führt (siehe Kapitel 4.2.1), welches das Verbrücken der Partikel verstärken kann. Die thermoanalytische Untersuchung der sprühgetrockneten Pulver ließ in der DSC-Kurve (Abbildung 5.7) sowohl Peaks erkennen, die den beiden Modifikationen von Salmeterolxinafoat zugeordnet werden können, als auch eine thermische Zersetzung bei der für Fluticasonpropionat zu erwartenden Temperatur. Das zeigt, dass beide Substanzen bei der Sprühtrocknung zumindest teilweise kristallin im Produkt angefallen sind. Die Peaks sind überlagert von einer

Basislinienverschiebung zwischen 80°C und 160°C, wie sie für amorphe Substanzen an ihrem Glasübergang beschrieben ist. Darüber hinaus ist ein Rekristallisationsereignis im Bereich zwischen 60°C und 80°C zu beobachten. Dementsprechend ist anzunehmen, dass ein Teil der Substanzen nach der Sprühtrocknung auch amorph vorliegt.

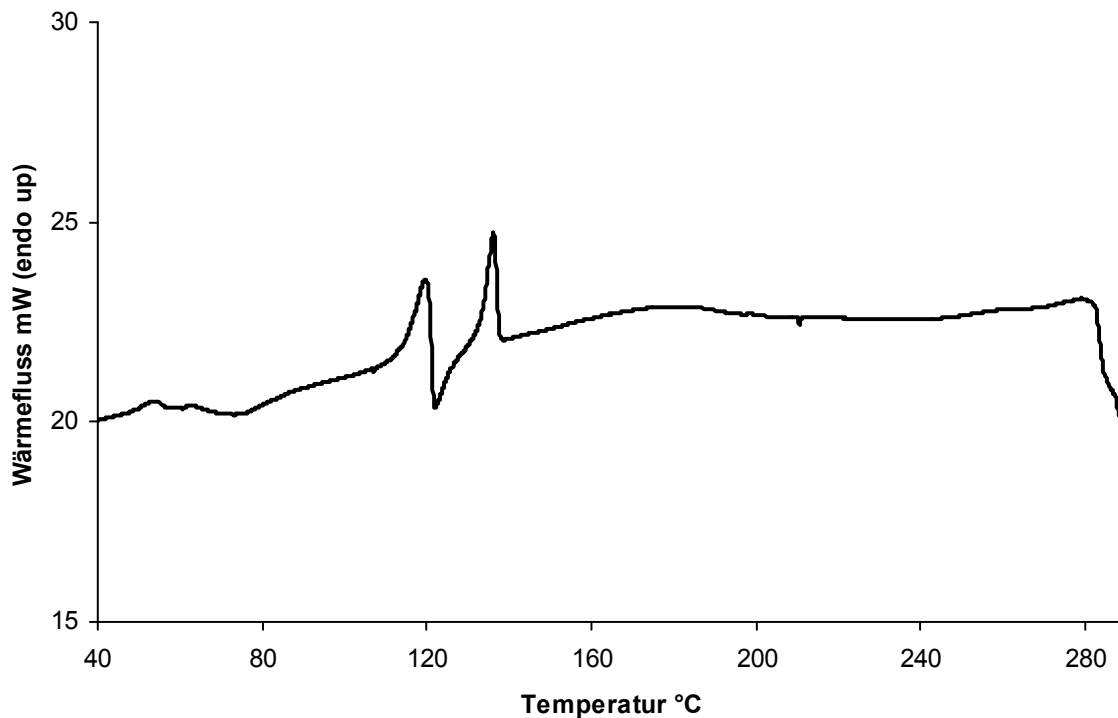


Abbildung 5.7: DSC-Diagramm eines sprühgetrockneten Pulvers, das Salmeterolxinafoat und Fluticasonpropionat enthält

Röntgendiffraktometrische Untersuchungen zeigen noch deutliche Röntgenreflexe, die auf eine Teilkristallinität des Pulvers hindeuten (siehe Abbildung 5.8), allerdings sind die gemessenen Intensitäten überaus schwach. Entsprechend der unterschiedlichen Viskositäten der Lösemittel sind unterschiedliche Tröpfchengrößen bei der Zerstäubung zu erwarten, die konsekutiv zu unterschiedlich großen Partikeln führen könnten. Da die Feststoffbeladung der Lösemittel entsprechend der maximalen Löslichkeit jedoch unterschiedlich und zur Viskosität antiproportional war (Aceton mit der niedrigsten Viskosität erreicht mit

1,5% (m/V) die höchste Feststoffbeladung), ist dieser Einfluss nicht so stark ausgeprägt. Dennoch lässt sich zeigen, dass mit zunehmender Viskosität die resultierende mittlere Partikelgröße zunimmt (Abbildung 5.9).

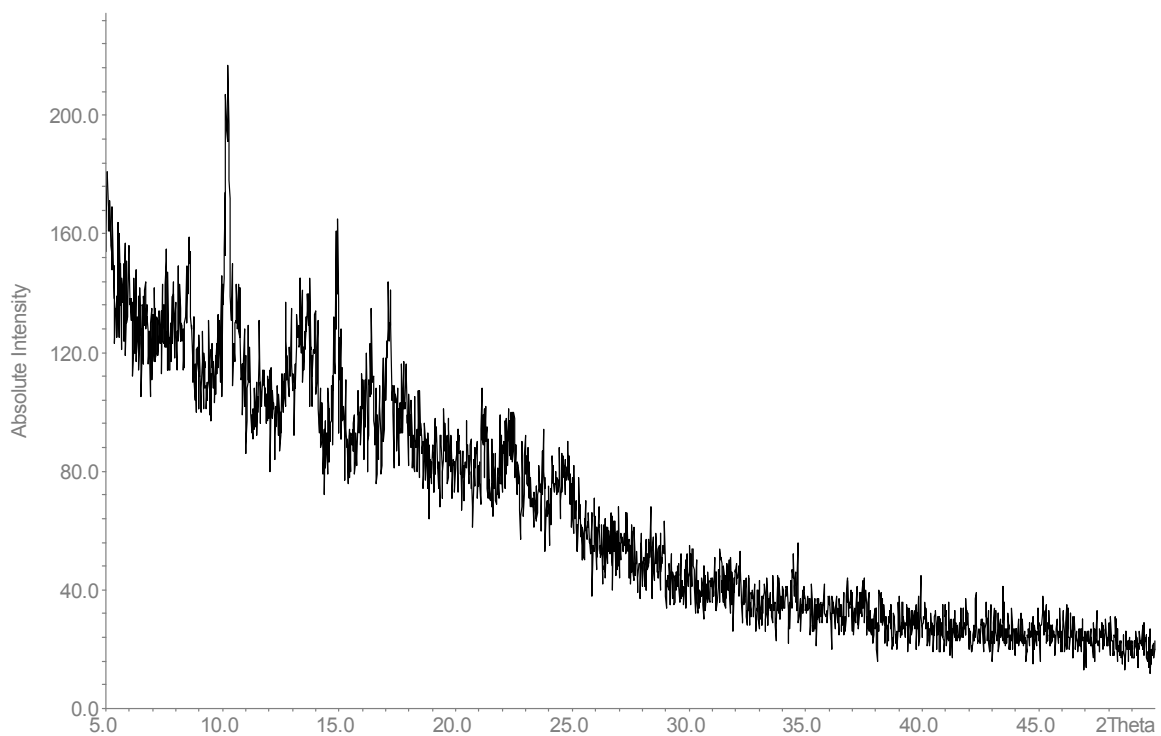


Abbildung 5.8: Röntgendiffraktogramm von sprühgetrockneten Partikeln

Das Fließverhalten der so hergestellten Pulver ließ sich aufgrund der kleinen Chargengröße nicht mit konventionellen Methoden wie dem Böschungswinkel oder der Fließgeschwindigkeit charakterisieren. Visuell wiesen die Pulver, unabhängig vom verwendeten Lösemittel, eine schlechte Fließfähigkeit auf. Die Pulver adhärten an allen Oberflächen und neigten zur elektrostatischen Aufladung. Die aerodynamische Untersuchung eines aus Aceton sprühgetrockneten Pulvers, das den laserdiffraktometrischen Daten (x_{50} 2,7 μm , x_{90} 13,9 μm) entsprechend eine pulmonale Anwendung zulassen könnte, mithilfe des Pulveraufgabesystems am NGI ergab eine sehr niedrige Feinpartikelfraktion von nur 5,6%. Das unterstreicht die Annahme, dass

das Pulver stark aggregiert ist und sich im Luftstrom nicht suffizient in seine Primärpartikel trennen lässt.

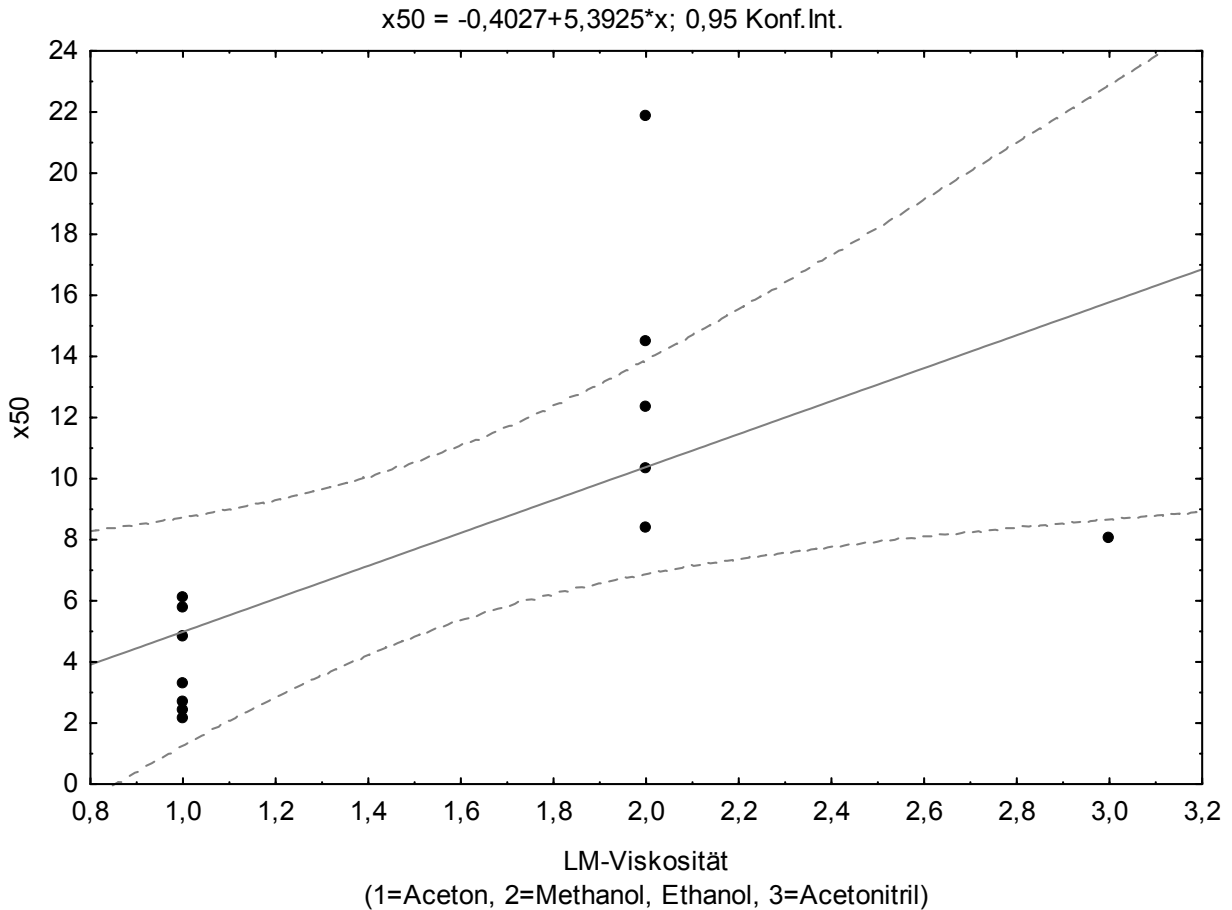


Abbildung 5.9: Abhängigkeit der mittleren Partikelgröße (x_{50}) sprühgetrockneter Pulver aus SX und FP von der Viskosität des Lösemittels

Additive

Um das Fließverhalten und die Dispersionsfähigkeit der sprühgetrockneten Pulver zu verbessern, wurde der Zusatz verschiedener Additive getestet. Ein geeignetes Additiv sollte in der Lage sein, die Oberfläche der im Sprühtrocknungsprozess entstehenden Tröpfchen zu belegen und somit die Oberflächeneigenschaften der getrockneten Partikel zu modifizieren. Das Additiv sollte selbst bei Normalbedingungen fest vorliegen und nicht kleben, um das Pulver nicht

negativ zu beeinflussen. Es sollte keine Hygroskopizität zeigen und muss sich im Lösemittel mit den Wirkstoffen lösen können. Viele pharmazeutische Hilfsstoffe zeigen eine Oberflächenaktivität, jedoch sind viele dieser potentiellen Additive Substanzen, die bereits bei Raumtemperatur halbfest vorliegen und damit zum Verkleben eines Produktes beitragen oder eine für die Sprühtrocknung ungeeignet niedrige Erweichungstemperatur unterhalb der erreichbaren Auslasstemperatur haben. Daher wurden zwei Ansätze zum Einsatz von Additiven verfolgt: das direkte Lösen des Additivs in der wirkstoffhaltigen organischen Lösung, die sprühgetrocknet wurde, und ein Resuspendieren der sprühgetrockneten Partikel in additivhaltiger Lösung mit anschließendem wiederholtem Sprühtrocknen. Für den einstufigen Ansatz des direkten Lösens wurden die Hilfsstoffe Polyvinylpyrrolidon (PVP), Leucin, Ethylcellulose und Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) ausgewählt. Alle diese Substanzen weisen eine Oberflächenaktivität auf und liegen bei Normalbedingungen fest vor, so dass sie das Produkt nicht kleben lassen. Leucin ist darüber hinaus bereits als Hilfsstoff beschrieben, der das aerodynamische Verhalten von Pulvern verbessern kann (Najafabadi et al., 2004). PVP und HPMC verfügen über eine sehr begrenzte Löslichkeit in organischen Lösemitteln, daher konnten diese nur in geringen Konzentrationen eingesetzt werden. Um eine Vergleichbarkeit der Formulierungen zu gewährleisten, wurden die anderen Hilfsstoffe in einer ähnlichen Größenordnung eingesetzt. Ethylcellulose löst sich gut in organischen Lösemitteln und ist ein Filmbildner, so dass mit diesem Additiv möglicherweise Partikel erzeugt werden können, die eine glatte Ethylcellulose-Oberfläche aufweisen und somit besser dispergiert werden können. Für alle Versuche wurden die Lösungen frisch hergestellt und direkt sprühgetrocknet. Für die weitere Charakterisierung wurde lediglich das Produkt verwendet, das sich im

Auffanggefäß am Zyklon befand. Im Zyklon anhaftendes Pulver wurde verworfen. Die Bestimmung der Partikelgrößenverteilung erfolgte nach Dispergierung in wirkstoffgesättigtem Wasser mithilfe der Laserdiffraktometrie (siehe Kapitel 3.1.1).

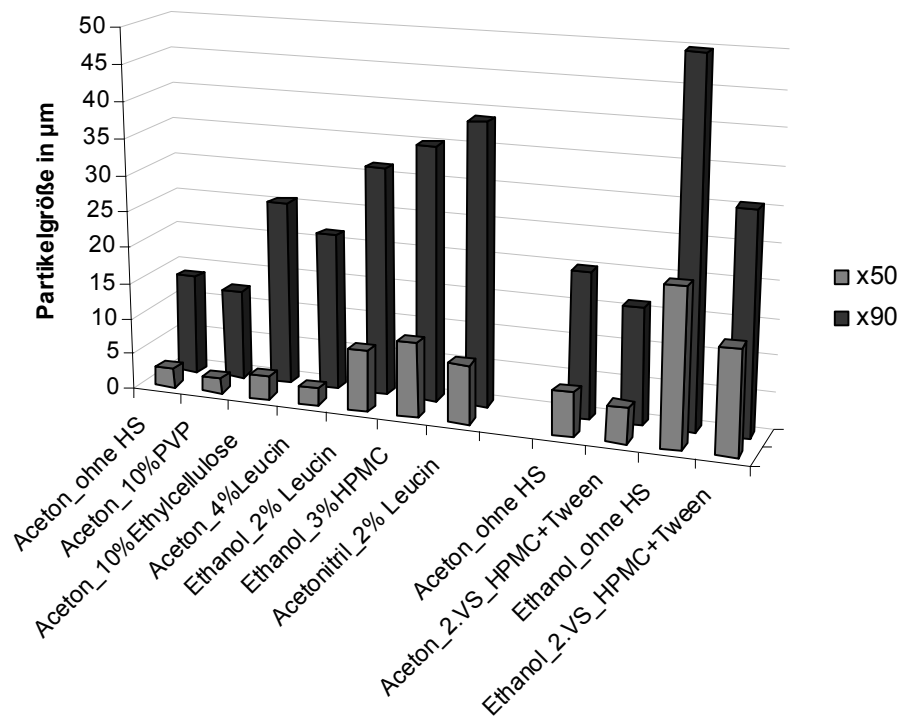


Abbildung 5.10: mittlere Partikelgröße und 90%-Quantil der Partikelgrößenverteilung verschiedener sprühgetrockneter Chargen mit Additiven (prozentualer Zusatz bezogen auf den Wirkstoffgehalt), ganz links eine hilfsstofffreie Formulierung zum Vergleich

Der direkte Zusatz der ausgewählten Additive zur Sprühlösung führte lediglich im Fall von Polyvinylpyrrolidon zu einer leichten Reduktion der Partikelgröße im Vergleich zur additivfreien Formulierung, wie in Abbildung 5.10 ersichtlich. Dies bezieht sich sowohl auf die mittlere Teilchengröße als auch auf den x_{90} -Wert, der eine Aussage über die nicht redispergierten Agglomerate und Aggregate des Pulvers zulässt. Liegen x_{50} - und x_{90} -Wert weit auseinander, beobachtet man meist eine bimodale Teilchengrößenverteilung, bei der zu höheren Partikelgrößen

hin ein zweites Maximum auftritt, das auf nicht redispergierbare Aggregate im sprühgetrockneten Pulver hinweist. Dies ist beispielsweise bei dem Produkt zu beobachten, das unter Zusatz von 4% Leucin aus Aceton gesprüht wurde (siehe Abbildung 5.11).

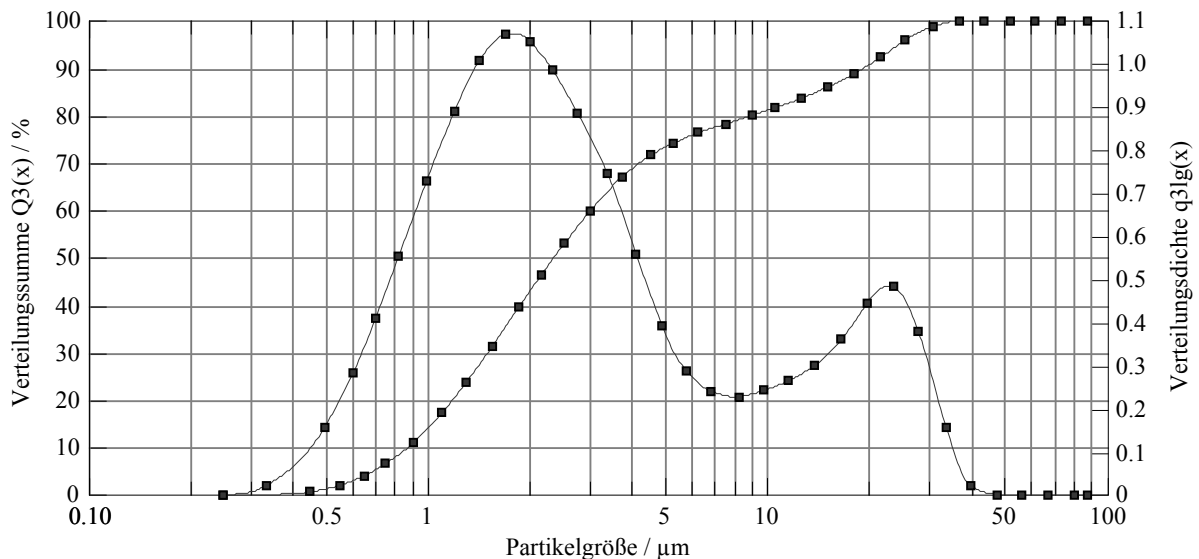


Abbildung 5.11: bimodale Partikelgrößenverteilung des mit 4% Leucin sprühgetrockneten Wirkstoffpulvers

Das mit PVP-Zusatz gesprühte Pulver unterscheidet sich im Fließverhalten visuell kaum vom dem ohne Additive hergestellten Pulver. Eine Bestimmung des aerodynamischen Verhaltens mit dem rack am NGI ergab eine Feinpartikelfraktion von 7,0%. Dies zeigt, dass eine Dispersion im Luftstrom praktisch unmöglich ist. Im rasterelektronischen Bild lassen sich Körner aggregierter Primärpartikel erkennen, die offensichtlich eng aneinander haften. Da die weiteren Chargen sowohl nach der laserdiffraktometrischen Bestimmung Teilchengröße als auch nach visueller Charakterisierung ein schlechteres aerodynamisches Verhalten vermuten ließen, wurden dahingehend keine weiteren Untersuchungen durchgeführt.

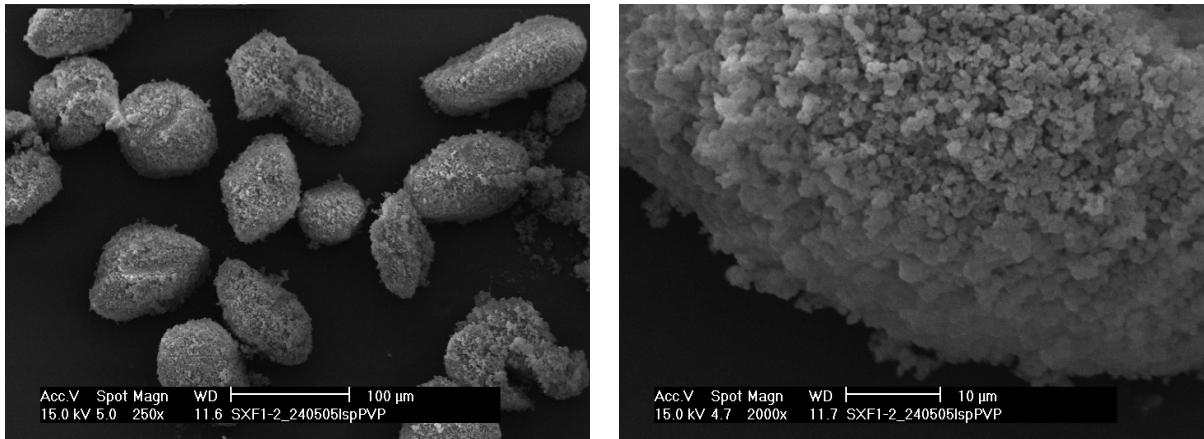


Abbildung 5.12: zu Körnern aggregierte Primärpartikel eines mit PVP sprühgetrockneten Wirkstoffpulvers; links 250-fache Vergrößerung, rechts 2000-fache Vergrößerung

Der zweistufige Versuchsansatz wurde aus Aceton und aus Ethanol durchgeführt. Dazu wurde in beiden Fällen zuerst eine 0,3 %ige Wirkstofflösung sprühgetrocknet, das Produkt wurde danach in einer wässrigen Hilfsstofflösung im Ultraschallbad redispergiert. Die Hilfsstofflösung enthielt 0,01% Hydroxypropylmethylcellulose und 0,01% Polysorbat 80, das entspricht einer Gesamthilfsstoffkonzentration von 16,7% bezogen auf den dispergierten Wirkstoff. Wie in Abbildung 5.10 rechts ersichtlich, führen Redispergieren und erneutes Sprühtrocknen zu einer leichten Abnahme der Partikelgröße. Offensichtlich lassen sich die mit Hilfsstoff belegten Partikel besser dispergieren. Die zugehörige Verteilungskurve ist sehr breit, aber nahezu monomodal (siehe Abbildung 5.13). Visuell ist ein verbessertes Fließverhalten nach dem zweiten Sprühtrocknungsschritt zu beobachten. Dies lässt sich zum Teil mit der Belegung der Oberflächen durch die Hilfsstoffe erklären. Dabei wird insbesondere das Polysorbat an der Wirkstoffpartikeloberfläche anhaften und damit die Aggregationsneigung der Einzelpartikel in Dispersion verringern.

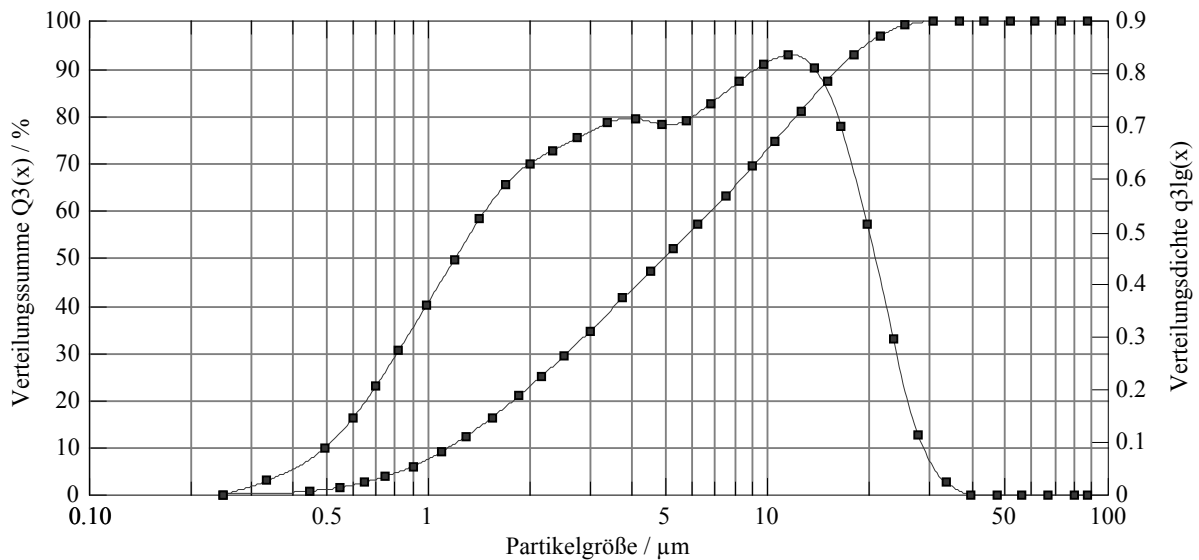


Abbildung 5.13: Partikelgrößenverteilung eines in zwei Verfahrensschritten (Sprühtrocknung ohne Additiv, redispergieren in Hilfsstofflösung und erneutes Sprühtrocknen) hergestellten Wirkstoffpulvers

HPMC kann ebenfalls die Oberfläche belegen, zusätzlich bildet HPMC bei der Sprühtrocknung kleine sphärische Partikel, die das Fließverhalten verbessern können, da sie ähnlich wie hochdisperses Siliciumdioxid in Pulvermischungen als Fließregulierungsmittel fungieren. Abbildung 5.14 zeigt eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines durch zwei Verfahrensschritte hergestellten Pulvers. Es ist ein feinpartikuläres Pulver zu erkennen. Die aerodynamische Untersuchung des Pulvers mit dem Aerolizer am NGI lieferte jedoch nur eine geringe Feinpartikelfraktion von 5,1%. Bei aerodynamischer Bestimmung wiesen die Partikel einen sehr hohen MMAD von 107,6 μm auf, eine Dispergierung im Luftstrom ist offensichtlich nicht möglich.

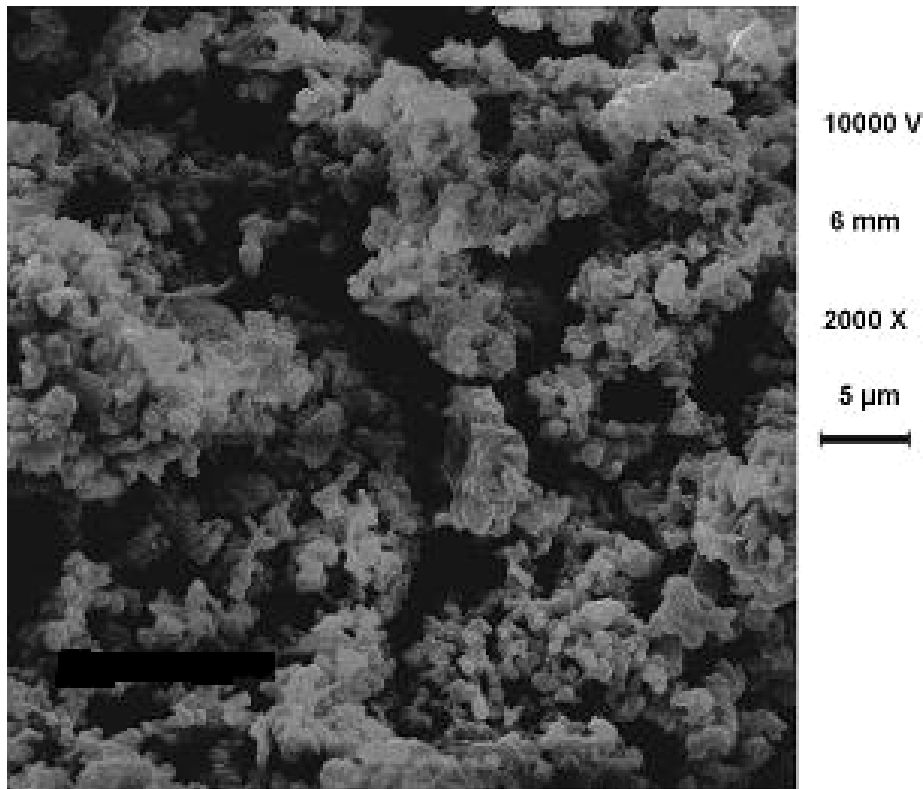


Abbildung 5.14: REM-Aufnahme eines in zwei Verfahrensschritten hergestellten Pulvers (1. Sprühtrocknung ohne Additiv, 2. Dispergieren in Additivlösung und erneutes Sprühtrocknen), 2000-fache Vergrößerung

Zusammenfassung

Der Sprühtrocknungsprozess ist dafür bekannt, dass die so erzeugten Produkte häufig amorph anfallen (Tong und Chow, 2006). Dies lässt die Idee, eine feste Formulierung anstelle einer Lösung oder Suspension zu entwickeln, um die Stabilität des Produktes zu erhöhen, fagwürdig erscheinen, da durch den Herstellprozess wiederum Instabilitäten im Produkt präsent sind, wie anhand der thermoanalytischen Untersuchungen gezeigt werden konnte (siehe Abbildung 5.7). Es gibt Möglichkeiten, den amorphen Anteil in einem sprühgetrockneten Produkt durch gezieltes Prozessieren zu minimieren, wie beispielsweise für den Zusatz von Polyethylenglycol zu Laktose gezeigt wurde (Mosen et al., 2006). Da die mit dem Verfahren der Sprühtrocknung erzielten Pulver aus Salmeterolxinafoat und Fluticasonpropionat jedoch nicht über die

gewünschten aerodynamischen Eigenschaften verfügen und zudem die Gefahr eines hohen amorphen Anteils im Produkt besteht, wurde dieses Verfahren nicht weiter optimiert.

5.2.2 Präzipitation

Eine Präzipitation erfolgt, wenn sich die Parameter, welche die Löslichkeit einer Substanz bestimmen, schlagartig oder allmählich ändern, so dass eine übersättigte Lösung entsteht und Kristallisation einsetzt. Dies kann durch Zugabe eines Nichtlösemittels erfolgen (solvent-change-Präzipitation), durch Evaporation des Lösemittels oder durch Temperaturänderung. Einen Überblick über die Varianten der Präzipitation organischer Substanzen gibt Texter (Texter, 2001). In Abhängigkeit von der Geschwindigkeit der Präzipitation können auch hier unterschiedliche Partikelcharakteristika entstehen. Bei der Kristallisation durch Präzipitation spielt der Ostwald-Mierssche Bereich eine wichtige Rolle (siehe Abbildung 5.15). Wird demnach eine schnelle Übersättigung des Systems durch Zugabe eines Nichtlösemittels erreicht, entstehen viele voneinander unabhängige Kristallisationskeime und es erfolgt eine feinpartikuläre Fällung (homogene Nukleation). Befinden sich bereits Fremdpartikel in der Lösung, die als Kristallisationskeime dienen können, können gelöste Substanzen daran auskristallisieren (heterogene Nukleation). Für die Abscheidung fester Stoffe aus einer Lösung ist allein der Übersättigungsgrad maßgeblich. Die Übersättigung k beschreibt die Abweichung der Löslichkeit c von der makroskopischen Löslichkeit c_S und ist als $k = (c - c_S) / c_S$ definiert. Die entstehenden kleinen Kristalle sind thermodynamisch nicht stabil, so dass Partikelwachstum einsetzt (Ostwald-Reifung). Die Lösungsgeschwindigkeit, die für kleinere Partikel

entsprechend der Nernst-Brunner-Gleichung erhöht ist, spielt dabei ebenso eine Rolle wie auch die Sättigungslöslichkeit.

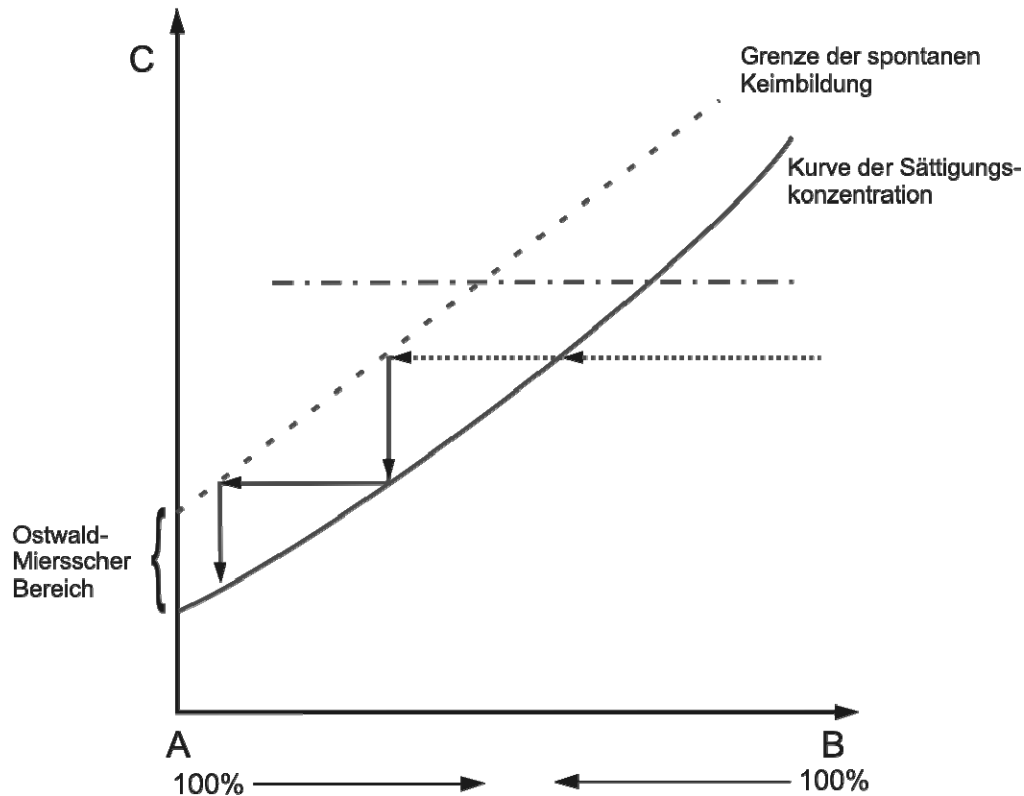


Abbildung 5.15: Ostwald-Miers-Diagramm (A = schlechtes Lösemittel, B = gutes Lösemittel, C = Konzentration an gelöster Substanz)

Mit abnehmender Größe erhöht sich entsprechend der Ostwald-Freundlich-Gleichung die Löslichkeit, so dass in Umfeld sehr kleiner Partikel eine höhere Sättigungslöslichkeit entstehen kann als im Umfeld größerer Kristalle (Texter, 2001). Dadurch lösen sich kleinere Partikel zunehmend auf und die gelöste Substanz kristallisiert an größeren Partikeln wieder aus. Das Wachstum der Partikel lässt sich jedoch unterbinden, wenn eine homogene Teilchengröße erreicht wird oder die Oberflächen der kleinen Partikel effektiv stabilisiert werden. Dazu werden in der Regel Makromoleküle eingesetzt, die die Oberfläche der Kristalle belegen und somit ein Fortschreiten der Kristallisation unmöglich machen (Michaels und Colville, 1960). Dabei wird die

Oberfläche der Partikel so dicht mit einem Additiv besetzt, dass der notwendige Materialaustausch durch Diffusion nicht mehr erfolgen kann (Horn und Rieger, 2001). Zusätzlich bewirken die adsorbierten Makromoleküle eine sterische Stabilisation und verhindern einen engen Kontakt zwischen den Partikeln (siehe Abbildung 5.16). In gleicher Weise können Partikel in Dispersion auch durch Ladungsträger auf der Oberfläche stabilisiert werden (Lucks et al., 1990).

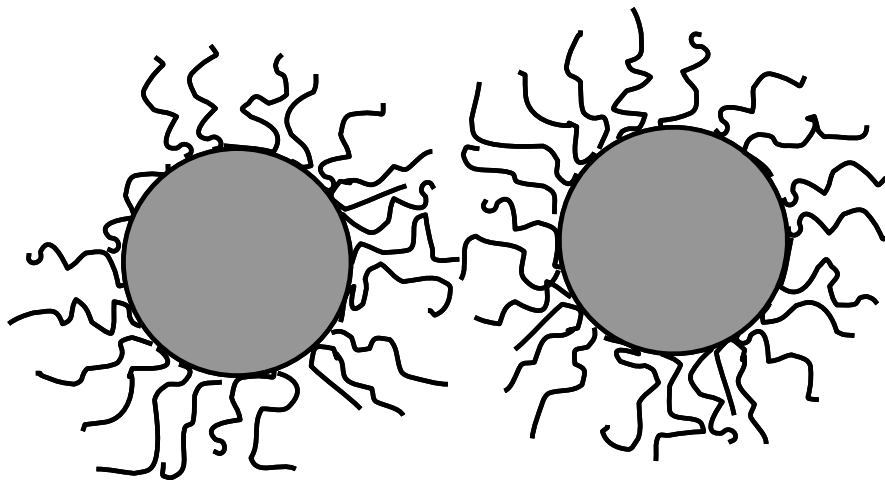


Abbildung 5.16: sterische Stabilisation durch auf der Partikeloberfläche adsorbierte Makromoleküle

Die Oberfläche eines durch Kristallisation entstandenen Partikels unterscheidet sich in der Regel klar von der eines durch Zerkleinerungsverfahren hergestellten Mikropartikels (Rasenack, 2003). Die Oberfläche ist natürlich gewachsen und daher deutlich gleichmäßiger und weniger stark elektrostatisch aufgeladen. Im Vergleich zu Pulvern, die durch Sprühtrocknung hergestellt wurden, zeigen präzipitierte Pulver häufig eine höhere Feinpartikelfraktion und ein besseres aerodynamisches Verhalten bei gleichzeitiger Reduktion des amorphen Anteils (Chow et al., 2007). In Abhängigkeit von den Bedingungen der Kristallisation kann der Habitus der entstehenden Kristalle sehr unterschiedlich sein. Dabei ist nicht nur die Art des Lösemittels entscheidend (Lahav und Leiserowitz, 2001), sondern auch

die Auswahl der Hilfsstoffe (Raghavan et al., 2001). Das Ergebnis einer solchen Präzipitation ist in der Regel ein Hydrosol, also ein von Hilfsstoffen stabilisierter Wirkstoffpartikel in Mikro- oder Nanometer-Maßstab in wässriger Dispersion (Horn und Rieger, 2001). Um daraus ein trockenes Pulver zu erhalten, ist ein weiterer Verfahrensschritt zur Entfernung des Dispersionsmittels nötig.

5.2.3 Pharmazeutische Rationale für co-kristallisierte Partikel

Jede Form der Anordnung in einer festen Phase ist geprägt von der Fähigkeit zur Selbstorganisation der Moleküle (Rodiguez-Spong et al., 2004). Dabei läuft folgende Entwicklung ab:

Molekül → molekulare Anordnung → molekulares Netzwerk → Kristall

Gelingt dies nur in geringem Maße, so ist der resultierende Stoff amorph, bei einer höheren Selbstorganisation wird eine höhere Ordnung im System erreicht und die Substanz kristallisiert. Dabei ist eine Symmetrie der Moleküle für eine dichte Packung vorteilhaft und bedingt eine einfachere Kristallisation durch eine niedrigere freie Energie (Byren, 1982). Kristalline Feststoffe können dabei als Einzelsubstanzen oder als molekulare Addukte kristallisieren. Die einfachste Form des molekularen Addukts ist ein Addukt mit dem Lösemittel, aus dem die Kristallisation erfolgt. Es bildet sich ein Solvat. Eine andere Möglichkeit ist die Adduktbildung mit anderen Substanzen, die in der Lösung präsent sind wie beispielsweise weitere gelöste Wirk- oder Hilfsstoffe (Haleblian, 1975). In einem solchen Fall spricht man von einer Co-Kristallisation. Eine solche Co-Kristallisation ist begünstigt, wenn im entstehenden Co-Kristall oder Multikomponenten-Kristall alle am Addukt beteiligten Substanzen ihre freien Valenzen abdecken und somit einen gegenüber der Kristallisation in homogenen Kristallen begünstigten energetischen Zustand einnehmen können (Boese et al.). Diese Art der Synthese wird

auch supramolekulare Synthese (supramolecular heterosynthon approach) genannt und bezieht sich auf die Verbindung verschiedener Komponenten über schwächere, nicht-kovalente Bindungen. Dabei spielen für die intermolekulare Stabilisierung vor allem die energiereicheren Wasserstoffbrücken sowie Dipol-Wechselwirkungen eine Rolle. Sind beide Bindungsarten nicht möglich, so können auch schwächere Interaktionen wie van-der-Waals-Kräfte und π - π -Interaktionen ausgenutzt werden (Batchelor et al., 2000). Das Design von Co-Kristallen erscheint sehr geradlinig, da sich Donor- und Akzeptorstrukturen zueinander besser ausrichten können als bei einer homogenen Kristallisation, allerdings ergibt sich immer eine Konkurrenzreaktion durch die separate Kristallisation der Einzelsubstanzen.

Im pharmazeutischen Bereich wurde der Ansatz der supramolekularen Synthese bereits für eine Reihe von Arzneistoffen erfolgreich eingesetzt. So kann beispielsweise die Löslichkeit des schlecht wasserlöslichen Triazols Itraconazol durch eine Co-Kristallisation mit zweiwertigen Säuren wie Fumarsäure oder Succinylsäure deutlich verbessert werden (Remenar et al., 2003). Dabei sind die Voraussetzungen für die Formation eines solchen Co-Kristalls nicht identisch mit denen für eine Salzbildung in wässriger Lösung. Daher sind auch Substanzen mit einem Unterschied von weniger als zwei im pK_s -Wert zur Co-Kristallisation befähigt (sie würden aber in Lösung kein Salz bilden). Weitere supramolekulare Multikomponenten-Kristalle sind beispielsweise die Kombination von Nicotinamid mit Octadecansäure, die die Hygroskopizität von Nicotinamid verringert, sowie ein Co-Kristall von Indomethacin mit Saccharin, der veränderte Löseeigenschaften zeigt (Basavoju et al., 2008). Für Carbamazepin wurden 13 neue Co-Kristalle mit Nicotinamid und weiteren neutralen Molekülen beschrieben, die

teilweise deutlich veränderte Schmelz- und Löseeigenschaften gegenüber reinem Carbamazepin haben (Fleischman et al., 2003).

Mithilfe von Simulationsprogrammen lassen sich Vorhersagen treffen, in wiefern ein heterogenes Addukt von zwei unterschiedlichen Molekülen energetisch gegenüber einem homogenen Addukt zweier gleicher Moleküle, das zu einem substanzreinen Kristall führt, begünstigt sein kann. Dazu simuliert man die durch die Brownsche Molekularbewegung entsprechend der Temperatur beförderte Ausrichtung zweier benachbarter Moleküle. Die Ausrichtung der Moleküle nebeneinander ist zudem beeinflusst von den van-der-Waals-Kräften. Gelangen die Moleküle bei der Ausrichtung aneinander in einen energetisch niedrigeren Zustand, so ist eine heterogene Adduktbildung wahrscheinlich begünstigt.

Für die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen Salmeterolxinafoat und Fluticasonpropionat wurde eine solche Simulation mithilfe der Programms Atomsmith (Version 1.5.0, Bitwixt Software Systems LLC, Minnetonka, USA) unter Anwendung des Molecular Mechanics-Moduls durchgeführt. Dabei wurden zuerst die zwei zu betrachtenden Moleküle nebeneinander gelegt und bezüglich ihrer dreidimensionalen Anordnung dreimal auf eine minimale Energie optimiert (jeweils 100 Schritte nach der Methode des steilsten Abstiegs und 2500 Schritte mit dem konjugierte-Gradienten-Verfahren nach Polak-Ribière). Anschließend wurde eine dynamische Simulation gestartet, die bei 300K 50000 Simulationsschritte mit einer Dauer von 0,001 ps berechnet. Dabei wird die Temperatur im steady state gehalten und keinerlei Impuls angewendet. Darauf folgend wurde wiederum eine dreifache Optimierung der dreidimensionalen Anordnung bezüglich der Energie vorgenommen.

Die Grundlage der Simulation bildet die Berechnung aufgrund der klassischen Mechanik, die auf molekularer Ebene angewendet wird (molecular mechanics). Dabei werden zwei Näherungen angenommen:

- Die Born-Oppenheimer-Näherung, die besagt, dass in der mathematischen Betrachtung der Kern eines Atoms aufgrund seiner deutlich höheren Masse von seinen Elektronen getrennt betrachtet werden kann. Es werden die Bewegungen der Elektronen herausgemittelt und resultierend allein die Bewegung des Kerns betrachtet.
- Die klassische Näherung, die annimmt, dass alle Energieänderungen kontinuierliche Änderungen sind (im Unterschied zur Quantenmechanik, die diskrete Änderungen annimmt).

Dementsprechend werden die Molekülbewegungen nach Newtons zweitem Gesetz ($F=m \cdot a$) berechnet, worin m die Atommasse (Kernmasse) darstellt und die Beschleunigung a aufgrund der Temperatur ermittelt wird.

Die berechneten potentiellen Energien (siehe Tabelle 5.3) stellen keine Absolutwerte dar, sondern lassen sich nur relativ zueinander betrachten. Vergleicht man die berechneten Energien aus den Simulationen der Anordnung zweier Salmeterolxinafoat- beziehungsweise zweier Fluticasonpropionatmoleküle untereinander mit den Energien, die eine Adduktbildung zwischen Salmeterol und Fluticasonpropionat ergibt, so erscheint die heterogene Adduktbildung zumindest für Fluticasonpropionat energetisch begünstigt.

Tabelle 5.3: berechnete potentielle Energien der Addukte nach Simulation

betrachtetes Molekül-Addukt	berechnete Energie nach Simulation
SX-SX	-143,74 kcal/mol
FP-FP	177,94 kcal/mol
SX-FP	19,13 kcal/mol

Ein ebensolches Bild ergibt sich bei einer extern durchgeführten Berechnung (SYBYL 6.8, Minimierung mit Tripos Forcefield und Charges mit Gasteiger-Hückel), es wird in diesem Fall ein Energieminimum für die heterogene Adduktbildung SX-FP von -7,96 kcal/mol errechnet. Die resultierende Anordnung ist in Abbildung 5.17 ersichtlich. Es ist erkennbar, dass die Sauerstoff-haltigen Gruppen am planaren Ringsystem des SX mit FP in Wechselwirkung treten können. Diese Anordnung wird zusätzlich stabilisiert durch das Xinafoat.

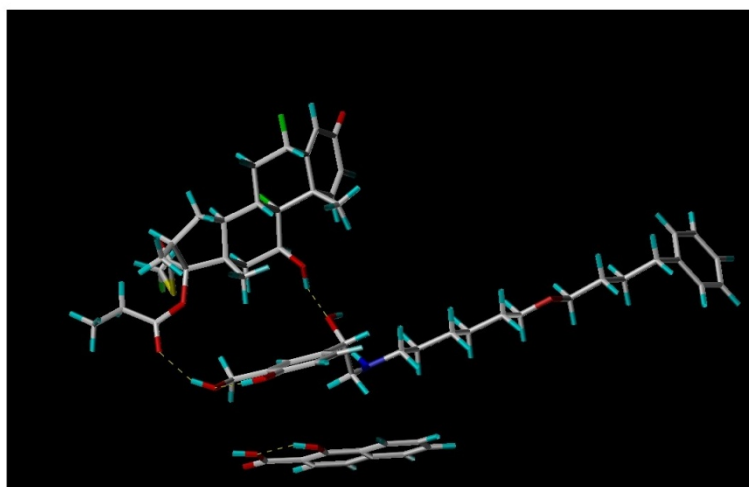


Abbildung 5.17: energetisch begünstigte Anordnung von SX (S mitte, X unten) und FP (oben links)

Würde anstelle des ungeladen vorliegenden Fluticasonpropionats eine negativ geladene Variante oder eine Säure verwendet werden, so könnte eine energetisch begünstigte Packung der beiden Wirkstoffmoleküle zueinander noch gefördert werden (Remenar et al., 2003), da dann das

negativ geladene Xinafoat durch ein Wirkstoffmolekül ersetzt werden könnte. Ebenso wäre es denkbar, mit der freien Base Salmeterol zu arbeiten, da dann die starke Ionenpaarbindung zum Xinafoat wegfällt, die in der Simulation eine homogene Adduktbildung zwischen SX und SX energetisch begünstigt.

Für die Formation eines Co-Kristalls ist nicht allein eine mögliche energieminierte Anordnung ausschlaggebend. Zusätzlich müssen weitere Faktoren gegeben sein, damit tatsächlich eine Adduktbildung eintritt. Diese Faktoren sind vorrangig durch die Auswahl der Kristallisationsbedingungen beeinflussbar. Für die Co-Kristallisation ist es wichtig, dass die miteinander zu kristallisierenden Substanzen im selben Lösemittel löslich sind und dabei im besten Fall dieselbe Sättigungslöslichkeit zeigen. Nur so kann der gleiche Grad der Sättigung im Lösemittel erreicht werden und dementsprechend eine simultane Übersättigung durch Zugabe eines Nichtlösemittels erreicht werden. Die Wirkstofflösung sollte eine Konzentration nahe der Sättigungslöslichkeit aufweisen, damit eine rasche Übersättigung des Systems erreicht werden kann, denn der Grad der Übersättigung stellt einen Schlüsselparameter bei der Kristallisation dar (Murnane et al., 2007). Das Nichtlösemittel sollte ein gleich schlechtes Lösevermögen für die miteinander zu kristallisierenden Substanzen aufweisen, damit die Substanzen auch im entstehenden Lösemittelgemisch eine gleich schlechte Löslichkeit haben. Auf molekularer Ebene begünstigen Analogien in der Molekülstruktur eine Co-Kristallisation, da sehr ähnliche Moleküle einfacher in dasselbe Kristallgitter eingebaut werden können. Wenn darüber hinaus noch Möglichkeiten zur gegenseitigen Stabilisierung über Wasserstoffbrücken oder Dipol-Wechselwirkungen gegeben sind, ist die Formation eines Co-Kristalls recht wahrscheinlich (Rodriguez-Spong et al., 2004).

Überträgt man diese Überlegungen auf die verwendeten Substanzen Salmeterolxinafoat und Fluticasonpropionat, so lassen sich nicht alle Bedingungen für Co-Kristallisation erfüllen. Zwar findet sich mit Aceton ein Lösemittel, das für beide Substanzen ein annähernd gleiches Lösevermögen aufweist, allerdings ist das Nichtlösemittel Wasser für FP ein schlechteres Lösemittel als für SX, so dass eine nennenswerte Menge SX in Lösung bleibt. Um die Bildung eines heterogenen Addukts zu fördern, wäre es sinnvoll, ein noch schlechteres Lösemittel zur Fällung zu verwenden. Dies müsste eine höhere Hydrophilie als Wasser aufweisen. Andernfalls könnte ein Fällungsmedium verwendet werden, das für beide Substanzen, wenn schon nicht Nichtlösemittel, dann zumindest gleich schlechteres Lösemittel als Aceton darstellt. Damit könnten die Wirkstoffe zwar nicht quantitativ, aber doch im konstanten Verhältnis ausfallen.

SX und FP haben auf den ersten Blick keine hohe molekulare Ähnlichkeit, allerdings verfügen beide Moleküle über die Möglichkeit der Wasserstoffbrückenbildung, mit der sie sich molekülübergreifend stabilisieren können. Es erscheint von der theoretischen Seite aus also durchaus möglich, dass beide Substanzen bei Präzipitation ein molekulares Addukt bilden.

5.2.3.1 Mikromischer

Die in dieser Arbeit betrachteten Präzipitate wurden durch ein solvent-change-Verfahren hergestellt, bei dem durch Zugabe des Nichtlösemittels Wasser zu einer organischen Lösung der entsprechenden Wirkstoffe die Fällung herbeigeführt wurde. Um das Mischverfahren von Löse- und Nichtlösemittel reproduzierbar zu gestalten, wurde ein Mikromischer verwendet. Kontinuierliche Mischverfahren haben den Vorteil, dass sie eine uniforme

Partikelgrößenverteilung der Präzipitate hervorbringen (Texter, 2001). Mikromischer sind bisher vor allem in der chemischen Verfahrenstechnik sowie zur Produktion anorganischer Präzipitate beschrieben (Schenk et al., 2004) und gehören zur Gruppe der Mikrostrukturreaktoren (Jähnisch et al., 2004). Bei dem verwendeten Mikromischer (Standard Slit Interdigital Micro Mixer, IMM, Mainz, Deutschland, Abbildung 5.18) handelt es sich um einen Interdigital-Mischer mit einer Mischkammer aus intermittierend angeordneten sinusförmigen Lamellen, die von beiden Seiten mit Flüssigkeit durchströmt werden (Abbildung 5.19). Dabei wird das Lösemittel durch HPLC-Pumpen (Knauer, Berlin, Deutschland) von der einen und das Nichtlösemittel von der anderen Seite zugeführt (Gegenstromverfahren). In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Mischkammern verwendet, die eine Lamellenbreite von 25 μm beziehungsweise 40 μm haben. Die Mischkammer besteht aus einem mit Silber beschichteten Kupfersockel, in den die Mikrokanäle mithilfe der LIGA-Technologie (Röntgen-Lithographie, Galvanoformung und Abformen durch Heißprägen) etwa 300 μm tief eingebracht sind, alle anderen Teile des Mikromischers sind aus rostfreiem Stahl gefertigt. Der Mikromischer besteht insgesamt aus drei Teilen, dem Oberteil mit zwei Flüssigkeitseinlässen und dem Auslass, dem Unterteil, das über eine Vertiefung für das Mischelement verfügt und der eigentlichen Mischkammer (inlay). Die Dimensionen sind in Abbildung 5.20 dargestellt. Aufgrund der feinen Kapillaren des Mischelements weist der Mikromischer nur eine begrenzte Druckstabilität auf und darf nicht mit mehr als 30 bar belastet werden. Ein Interdigitalmischer ist in der Lage, zwei Flüssigkeiten schnell und effektiv zu mischen, so dass die bei der Präzipitation gewünschte Übersättigung rapide eintreten kann. Das zugrunde liegende Mischprinzip ist ein passives Mischen, bei dem die Flüssigkeiten extern durch Pumpen zugeführt werden (Hessel et al.,

2005). Da die beim Mischen durch lamellare Strömung initial entstehenden Flüssigkeitslamellen noch vergleichsweise dick sind, wird die Anordnung darauf bis auf einen 60 µm breiten Auslassschlitz



Abbildung 5.18: der Mikromischer

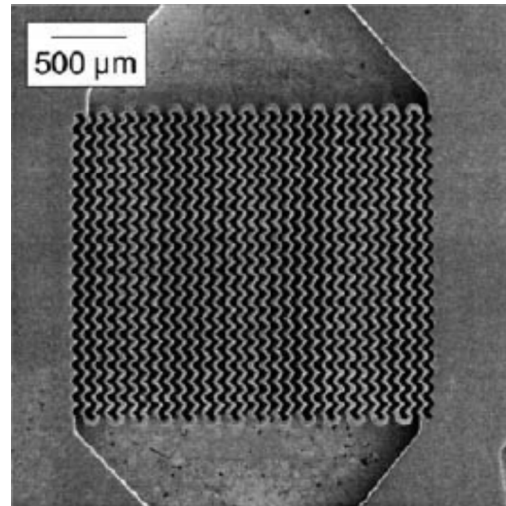


Abbildung 5.19: Mischkammer des Mikromischers in der Aufsicht, Flüssigkeitszufuhr von oben bzw. unten

verengt, so dass sich die Lamellen innerhalb weniger Millisekunden effektiv durch Diffusion und turbulente Strömung durchmischen. Der Mischprozess ist schematisch in Abbildung 5.21 dargestellt. Für den Präzipitationsprozess bedeutet das, dass eine Übersättigung zuerst an den Schichtgrenzen zwischen Wirkstofflösung und Nichtlösemittel auftritt, sich jedoch infolge des intensiven Mischens schnell auf die gesamte Dispersion ausdehnt. An die Stelle eines „scale up“-Prozesses tritt im Fall der Verwendung von Mikromischern ein so genanntes „numbering up“, wobei für einen höheren Durchsatz einfach mehrere Mikromischer parallel betrieben werden. So kann auch bei großen Ansätzen die Mischeffizienz des Mikromischers optimal genutzt werden.

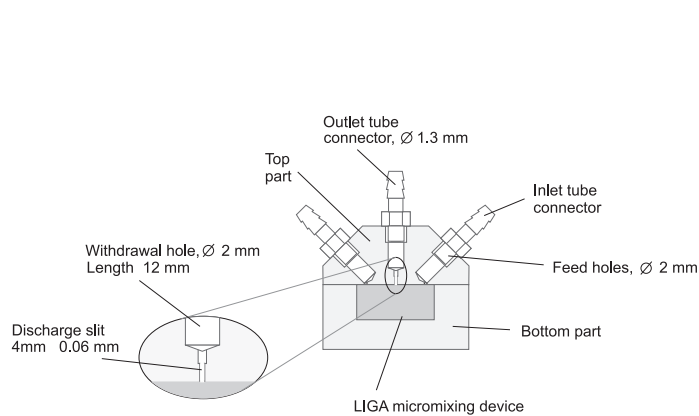


Abbildung 5.20: Abmessungen des Mikromischers (IMM, 2004)

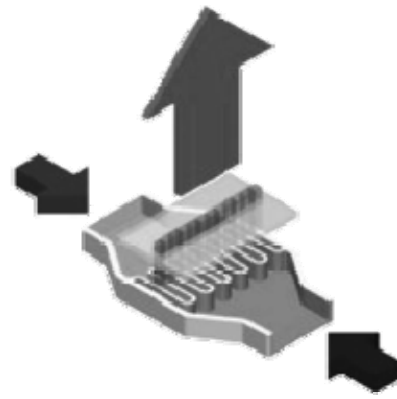


Abbildung 5.21: der Mischprozess im Mischelement des Mikromischers

5.2.3.2 Festlegung der Präzipitationsparameter

Zur ersten Festlegung der Präzipitationsparameter im Mikromischer wurde ein 2^{4-1} Versuchsplan mit einem Zentralwert erstellt. Variiert wurden darin die Flussraten von Löse- und Nichtlösemittel, der Gesamtfluss durch den Mikromischer sowie der Zusatz eines Additivs. Bei allen Versuchen wurde aus einer 1%igen (m/V) Lösung der beiden Wirkstoffe Salmeterolxinafoat und Fluticasonpropionat im Verhältnis 1,45 plus 2 (entspricht 1 plus 2 für Salmeterol zu FP, siehe Kapitel 4.1) in Aceton präzipitiert. Als Additiv wurde in diesen Vorversuchen Hydroxypropylmethylcellulose mit der Viskosität einer 2%igen Lösung von 50 mPa·s eingesetzt, die eine gute Wasserlöslichkeit besitzt und bereits in anderen Arbeiten als gutes Additiv für die Kristallisation beschrieben ist (Rasenack, 2003). HPMC wurde 0,01%ig (m/V) im Nichtlösemittel gelöst. Primärer Endpunkt der Versuche war das Auftreten einer Fällung, die erhaltenen Dispersionen wurden anschließend einer Teilchengrößenbestimmung unterzogen und sprühgetrocknet, dann wurde erneut die Partikelgrößenverteilung bestimmt. In Tabelle 5.4 sind die getesteten Variablen dargestellt.

Tabelle 5.4: Versuchsvariablen zur Determinierung der Präzipitationsparameter im Mikromischer. +/- Hilfsstoff = mit bzw. ohne Hilfsstoffzusatz gefällt, +/- Fällung = Fällung erfolgt bzw. nicht erfolgt

Lösemittelfluss	Nichtlösemittelfluss	Hilfsstoff	Fällung erfolgreich
0,5 ml/min	50 ml/min	+	-
5 ml/min	50 ml/min	-	+
5 ml/min	5 ml/min	-	-
5 ml/min	5 ml/min	+	+
5 ml/min	50 ml/min	+	+
30 ml/min	30 ml/min	-	+
30 ml/min	30 ml/min	+	+
50 ml/min	5 ml/min	-	-
50 ml/min	50 ml/min	+	+
50 ml/min	5 ml/min	+	-

Erwartungsgemäß führten nicht alle Kombinationen zu einem Präzipitat, da ein etwa 10-facher Überschuss des Lösemittels gegenüber dem Fällungsmittel nicht zu einer ausreichenden Übersättigung und damit nicht zu einer Fällung führte. Im entstehenden Lösemittelgemisch sind beide Substanzen offensichtlich noch ausreichend löslich. Eine 1+1 Mischung von Lösemittel und Nichtlösemittel führte nicht in allen untersuchten Fällen zu einer direkten Präzipitation. Bei einem Gesamtfluss von 10 ml/min (5+5) ohne Zusatz von Hilfsstoffen erfolgte keine sofortige Präzipitation, wohingegen ein Gesamtfluss von 60 ml/min zu einer Fällung führte. Diese Beobachtung lässt sich durch das Mischprinzip des Mikromischers erklären. Durch das passive Mischen ist die Geschwindigkeit der über die Pumpen zugeführten Flüssigkeiten ein entscheidendes Kriterium für den Mischablauf. Werden die Flüssigkeiten mit einer geringeren Gesamtflussrate gefördert, können sie sich nicht so schnell durchmischen wie bei einer höheren Gesamtflussrate, so dass die Übersättigung nicht sofort eintritt und somit auch die Präzipitation verzögert ist. Dementsprechend ist eine möglichst hohe Gesamtflussrate

anzustreben, die jedoch durch die Kapazität der HPLC-Pumpen limitiert ist. Die Pumpen können maximal 50 ml/min fördern. Darüber hinaus ist die begrenzte Druckresistenz des Mikromischers bei der Einstellung des Gesamtflusses zu berücksichtigen. Eine eingehendere Untersuchung des Einflusses der Gesamtflussrate bei Präzipitationen mit Hilfsstoffzusatz im Rahmen eines weiteren Versuchsplans ergab jedoch keinen signifikanten Effekt (siehe Abbildung 5.22), so dass bei geeigneter Auswahl der anderen Präzipitationsbedingungen eine feine Präzipitatbildung auch bei geringeren Gesamtflussraten möglich erscheint. Das Verhältnis von Löse- zu Nichtlösemittel von 1 + 10 hat sich als geeignet herausgestellt. Eine weitere Verschiebung des Verhältnisses zugunsten des Nichtlösemittels hatte wiederum einen negativen Effekt, da sich dann so wenig Feststoff im Gemisch befindet, dass keine Übersättigung erreicht wird. Die Konzentration der Wirkstofflösung sollte demnach möglichst nahe an der Sättigungslöslichkeit sein, um eine schnelle Übersättigung des Systems zu erhalten. Dabei ist sicherzustellen, dass sich keine ungelösten Wirkstoffkristalle in Dispersion befinden, die als Kristallisationskeime dienen könnten. Der Zusatz von HPMC als Additiv wirkte sich positiv auf das Einsetzen der Fällung aus. Dieser Effekt ist bereits in der Literatur beschrieben und ist vermutlich mit einer heterogenen Nukleation zu erklären, bei der Wirkstoffmoleküle an den gelösten Makromolekülen auszukristallisieren beginnen.

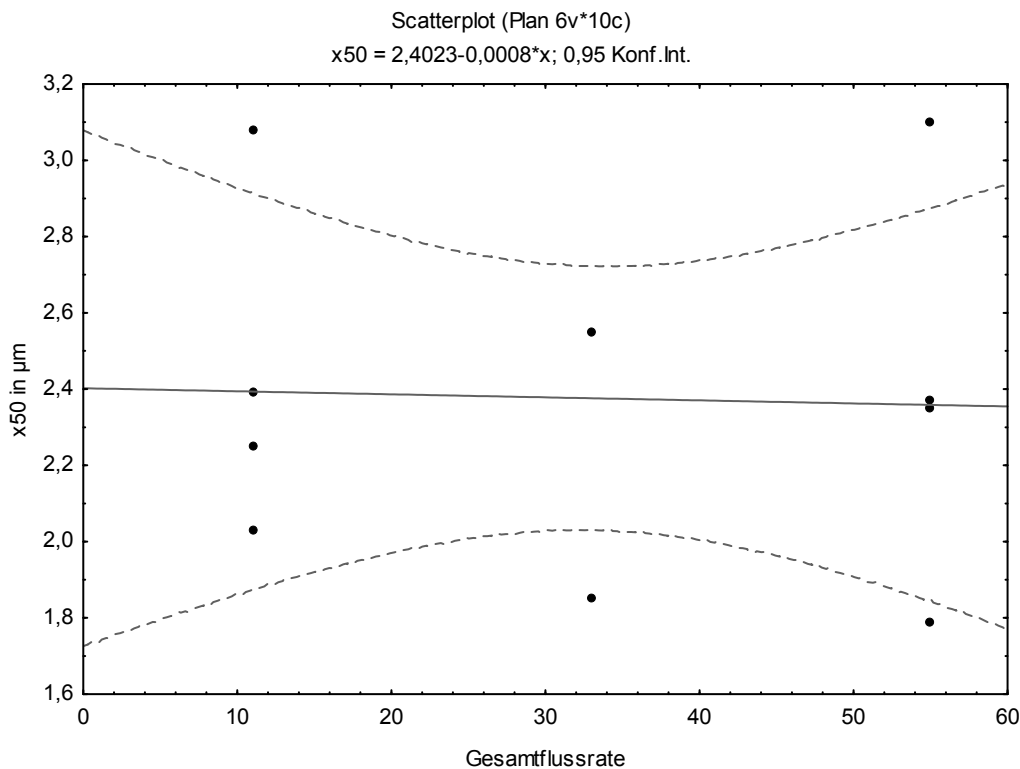


Abbildung 5.22: Einfluss der Gesamtflussrate auf die mittlere Partikelgröße der getrockneten Präzipitate

Alle erfolgreich präzipitierten Chargen wurden mit den unter 5.2.1.2 beschriebenen Bedingungen sprühgetrocknet (Einlasstemperatur 120°C, Auslasstemperatur < 50°C). Die für die Sprühtrocknung aus Lösung erarbeiteten Bedingungen wurden für die Trocknung der Präzipitat-Dispersionen beibehalten, da die Überlegungen zur Temperaturtoleranz des Produktes in gleicher Weise gelten. Betrachtet man die Partikelgrößenverteilung der resultierenden Produkte (siehe Abbildung 5.23) im Vergleich zur gemessenen Partikelgröße der Dispersionen, so ist zu erkennen, dass die Partikelgrößenverteilung der sprühgetrockneten Produkte zugunsten kleinerer Partikelgrößen verändert ist. Dies trifft insbesondere auf die ohne Hilfsstoff präzipitierten Produkte zu. Durch die fehlende Kristallisationsinhibition konnten hier größere Kristalle wachsen, die beim anschließenden Sprühtrocknungsprozess durch die auftretenden Scherkräfte beim Zerreißen der

Dispersion an der Sprühdüse zerbrachen und nach anschließendem Redispergieren kleiner gemessen wurden. Eine Bewertung der signifikanten Einflussfaktoren in Bezug auf die mittlere Partikelgröße des trockenen Produkts zeigt, dass lediglich die Flussrate des Nichtlösemittels einen signifikanten Effekt auf die Partikelgröße hat (siehe Abbildung 5.24).

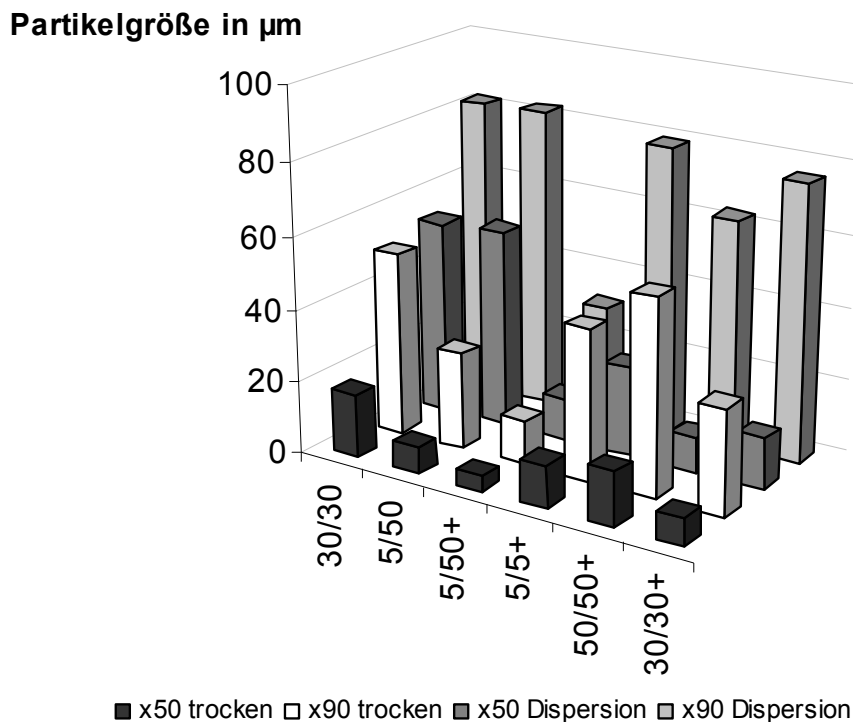


Abbildung 5.23: mittlere Partikelgröße und 90%-Quantil der Partikelgrößenverteilung erfolgreich präzipitierter Versuche; Bruch gibt Verhältnis der Flussraten von Löse- zu Nichtlösemittel an, + indiziert Hilfsstoffzusatz

Die Erhöhung der Fließgeschwindigkeit resultiert in kleineren Präzipitaten. Eine hohe Flussrate bedingt eine intensive Durchmischung der Flüssigkeiten in der Mischkammer des Mikromischers und führt so zu einer raschen Übersättigung. Entsprechend des Ostwald-Miersschen Diagramms wird in diesem instabilen übersättigten System eine Nukleation simultan an unzähligen Stellen entstehen, die zu einer Vielzahl kleiner Kristalle führt. Insgesamt führte ein Flussratenverhältnis

von 5 ml/min für das Lösemittel plus 50 ml/min (1+10) für das Nichtlösemittel unter Hilfsstoffzusatz zur kleinsten mittleren Partikelgröße. Das Produkt liegt mit einer mittleren Partikelgröße von 4,3 µm im inhalierbaren Bereich und weist visuell ein akzeptables Fließverhalten auf.

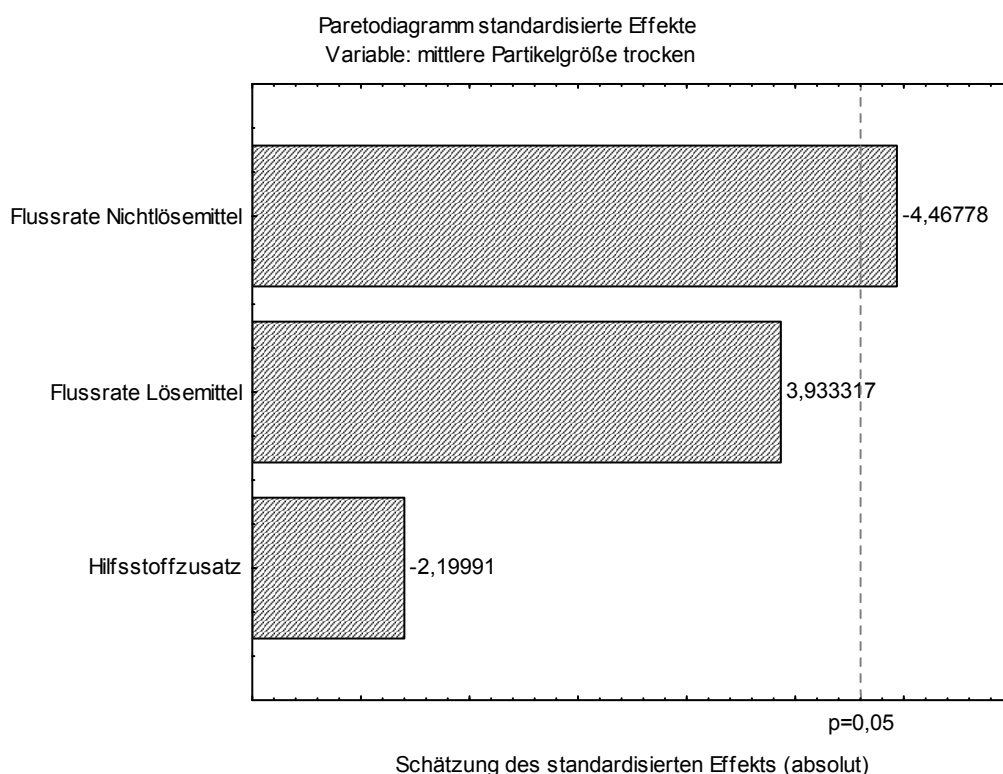


Abbildung 5.24: Paretdiagramm zur Abschätzung signifikanter Präzipitationsfaktoren in Bezug auf die mittlere Partikelgröße sprühgetrockneter Präzipitate

Der Effekt des Hilfsstoffzusatzes war in diesem Versuchsaufbau nicht signifikant, allerdings führte der Zusatz eines Additivs tendenziell zu kleineren Partikelgrößen, so dass der Zusatz eines Additivs grundsätzlich befürwortet werden kann. Weitere Versuchsreihen wurden durchgeführt, um den Effekt der Temperatur sowie den Einfluss der Spaltbreite der Mischkammer auf das Produkt zu testen. Da sich die Löslichkeit der meisten Substanzen proportional zur Temperatur verhält, könnte eine solvent-change-Präzipitation bei erniedrigter Temperatur zu einer schnelleren Übersättigung und damit zu einer feineren Fällung

führen. Um dies für die Wirkstoffkombination von Salmeterolxinafoat und Fluticasonpropionat experimentell zu überprüfen, wurden sowohl das Nichtlösemittel als auch die Mischkammer im Eisbad auf 4°C abgekühlt und dann Präzipitationen durchgeführt. Die Resultate ergaben keinen signifikanten Einfluss der Temperatur auf die mittlere Partikelgröße. Wie in Abbildung 5.25 erkennbar, bestand eine Tendenz zu einer Zunahme der mittleren Partikelgröße bei Raumtemperatur im Vergleich zu einer Präzipitation bei 4°C. Betrachtet man den Einfluss der Fällungstemperatur auf die resultierende Feinpartikelfraktion oder den MMAD des Produkts, ergibt sich ein ebensolches Bild (siehe Abbildung 5.26), jedoch ist der Effekt nicht besonders ausgeprägt und ist vermutlich nicht der entscheidende Parameter, wie die große Spannweite impliziert.

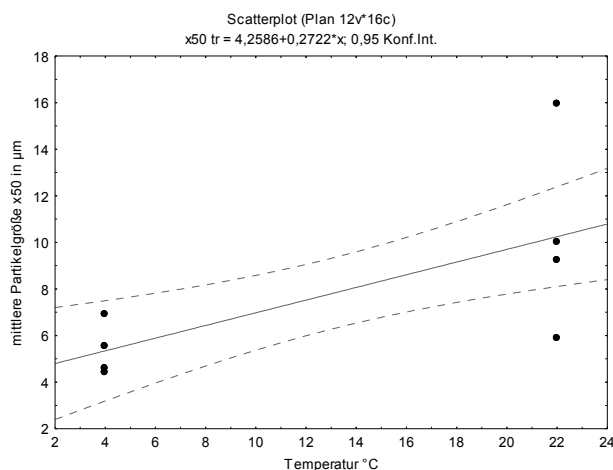


Abbildung 5.25: Einfluss der Präzipitationstemperatur auf die resultierende mittlere Partikelgröße (Laserdiffraktometrie)

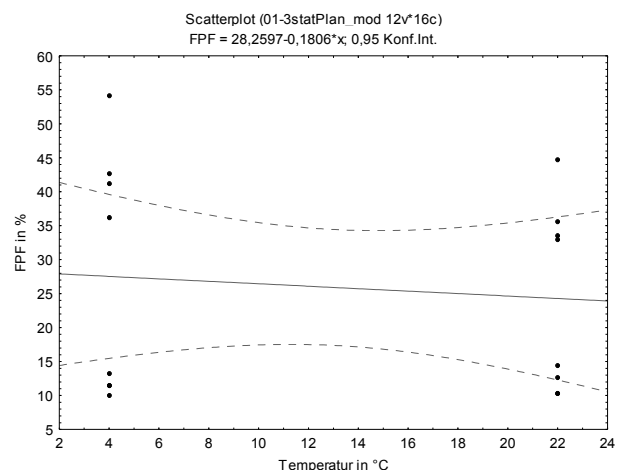


Abbildung 5.26: Einfluss der Präzipitationstemperatur auf die FPF

Da die Kühlung der Hilfsstofflösung und des Mikromischers einen zusätzlichen Verfahrensparameter darstellt, der kontrolliert werden müsste, wurden die weiteren Fällungen zur Vereinfachung des Prozesses bei Raumtemperatur (22°C) durchgeführt.

Der Abstand der Interdigital-Mischlamellen im Mikromischer kann unterschiedlich gewählt werden. Für diese Arbeit wurde der Einfluss der

Spaltbreite anhand von zwei Mikromischern mit einer Spaltbreite von 25 μm beziehungsweise 40 μm getestet. Beide Spaltbreiten sollten deutlich über der bei Präzipitation entstehenden Kristallisationsgröße liegen. Ein schmalerer Spalt bedingt bei gleich bleibender Größe der Mischkammer eine Erhöhung der Anzahl sich abwechselnder Lamellen. Zusätzlich verschmälert sich die Dicke der entstehenden Flüssigkeitslamellen. Beide Effekte sollten zu einer verbesserten Mischleistung führen, was sich in einer schnelleren Übersättigung und daraus folgend in einer feineren Fällung niederschlagen kann. In der Praxis ist die Auswahl der Lamellenbreite jedoch von untergeordneter Bedeutung, wie Abbildung 5.27 zeigt. Bei Verwendung des Mikromischers mit 25 μm Spaltweite war gelegentlich ein plötzlicher Druckanstieg im Mikromischer zu beobachten. Er tritt besonders bei einer Präzipitation unter Zusatz wenigen Additivs oder ohne Additiv auf und konnte durch Spülen mit organischem Lösemittel beseitigt werden. Vermutlich ist er auf ein Verstopfen der Mischkammer beziehungsweise der nachfolgenden Teile des Systems (Ansatz zum Produktschlauch) zurückzuführen. Dabei kommt es tendenziell zur Bildung größerer Kristallite, die miteinander aggregieren können und so den Mikromischer verstopfen. Das fällt besonders dann ins Gewicht, wenn die Kristallisation durch schmalere Lamellen beschleunigt wird und der Mischer zusätzlich durch deren geringeren Abstand schneller verstopfen kann. Da kein Effekt der Spaltbreite auf die Partikelgrößenverteilung nachgewiesen werden konnte, wurde für die weiteren Präzipitationsversuche eine Spaltbreite von 40 μm verwendet.

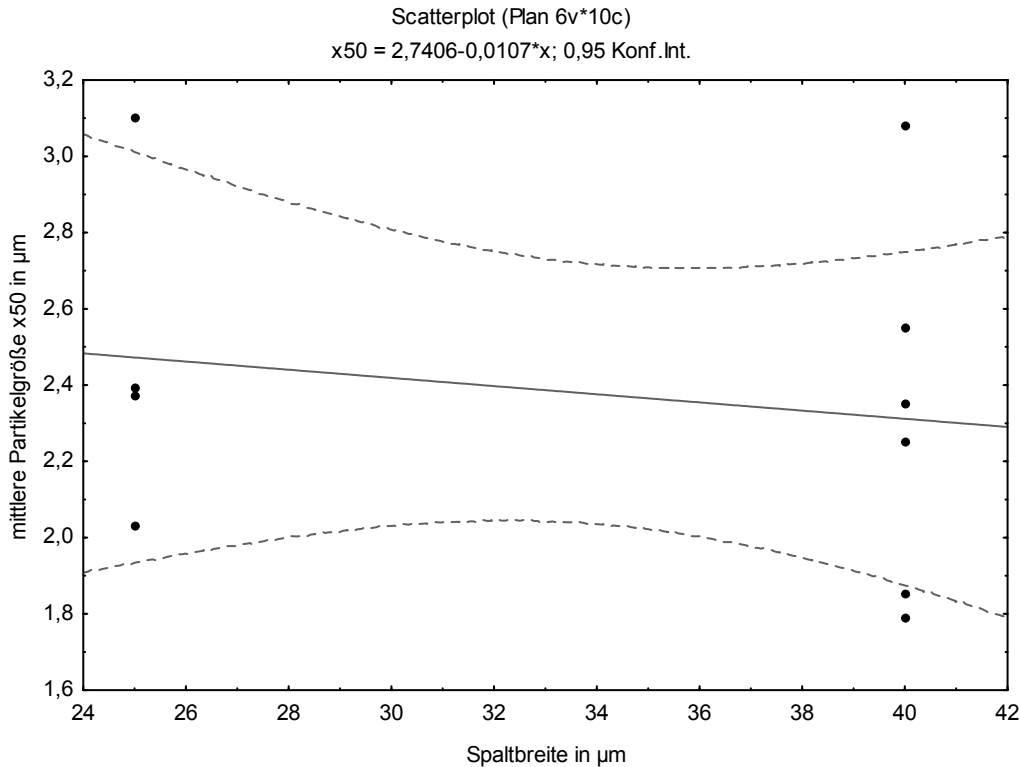


Abbildung 5.27: Einfluss der Spaltbreite der Mischkammer auf die mittlere Partikelgröße sprühgetrockneter Präzipitate

In weiteren Versuchen wurde der Einfluss der Standzeit einer fertigen Dispersion vor der Sprühtrocknung untersucht. Durch eine verlängerte Standzeit der präzipitierten Dispersion ist es möglich, dass es vermehrt zu Kristallwachstum durch Umlagerungsprozesse wie etwa der Ostwald-Reifung kommt. Normalerweise wird die erhaltene Dispersion daher nach erfolgter Präzipitation zügig (innerhalb von 15 Minuten) sprühgetrocknet. Demgegenüber wurde untersucht, ob eine 24-stündige Standzeit vor der Sprühtrocknung (bei Raumtemperatur beziehungsweise im Kühlschrank) die mittlere Teilchengröße oder das aerodynamische Verhalten des Produkts beeinflusst. Es konnte kein signifikanter Effekt der Standzeit auf die mittlere Partikelgröße des Produkts nach Sprühtrocknung festgestellt werden. Die Tendenz deutet jedoch eine leichte Vergrößerung der Partikel an (siehe Abbildung 5.28). Ein direkter Effekt auf die Feinpartikelfraktion und damit auf das

aerodynamische Verhalten des Produkts war nicht zu erkennen. Das bedeutet, dass die Stabilisierung der Präzipitate bereits innerhalb der ersten 15 Minuten abgeschlossen ist und innerhalb des Beobachtungszeitraums keine Veränderungen manifest werden. Daraus lässt sich jedoch nicht ableiten, dass die erhaltene Dispersion über eine längere Standzeit stabil sein wird, dies ist aber auch nicht die Intention der Arbeit.

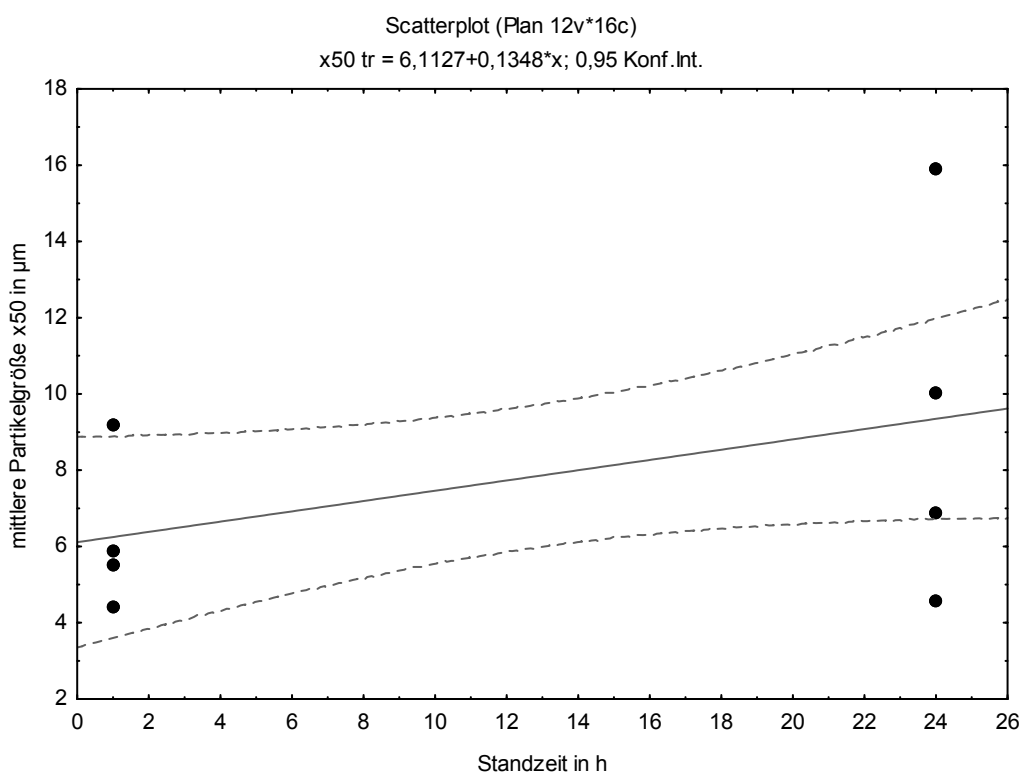


Abbildung 5.28: Einfluss der Standzeit auf die mittlere Partikelgröße sprühgetrockneter Präzipitate

Um larvierten Instabilitäten zuvor zu kommen, wurde eine zügige Weiterverarbeitung der Dispersion beibehalten. Anhand dieser Ergebnisse wurden die grundlegenden Präzipitationsparameter für die weiteren Versuche festgelegt, wie in Tabelle 5.5 aufgeführt. Da die Pumpleistung ein kritischer Punkt für das Mischverhältnis von Wirkstofflösung und Nichtlösemittel ist und damit auch den Wirkstoffgehalt des Produktes beeinflusst, wurden die Pumpen vor jeder

Fällung auf ihre Fördervolumina hin überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass die HPLC-Pumpen bei höheren Flussraten (über 15 ml/min) nicht mehr in der Lage sind, das Nennvolumen zu fördern, wenn sie an den Mikromischer angeschlossen sind. Dies kann an dem durch den Mikromischer aufgebauten Widerstand liegen. Da der Effekt der Unterleistung sich jedoch linear verhielt, konnte dies bei den Einstellungen der Pumpen berücksichtigt werden.

Tabelle 5.5: Standard-Präzipitationsparameter

Parameter	Einstellung
Flussrate Lösemittel	1 Teil
Flussrate Nichtlösemittel	10 Teile
Hilfsstoffzusatz	ja
Gesamtfluss	möglichst hoch (5+50)
Temperatur	Raumtemperatur (22°C)
Spaltbreite der Mischkammer	40 µm

5.2.3.3 Präzipitation mit verschiedenen Additiven

Im Folgenden wurde untersucht, wie der Zusatz von Additiven die Partikelgrößenverteilung der Präzipitate sowie ihr aerodynamisches Verhalten beeinflusst. Ein optimaler Hilfsstoff stabilisiert die bei der Präzipitation entstehenden Kristallite so, dass die Partikel kein übermäßiges Wachstum zeigen und eine möglichst enge Partikelgrößenverteilung aufweisen (Michaels und Colville, 1960). Dabei muss der Hilfsstoff schnell an die Grenzfläche wandern und die neu entstehenden Flächen belegen. Dazu sind insbesondere grenzflächenaktive Additive wie beispielsweise Tenside in der Lage. Zusätzlich kann der Hilfsstoff den Partikelhabitus beeinflussen und für eine gute Fließfähigkeit im trockenen Produkt sorgen. Daneben kann ein hydrophiles, oberflächenaktives Additiv auch die Benetzbarkeit der

entstehenden Kristallisate verbessern und somit die Lösungsgeschwindigkeit erhöhen. Für eine optimale Wirkung kann dabei auch eine Additivkombination eingesetzt werden. Ausgehend von der Arbeit von Rasenack (Rasenack, 2003) wurde eine Reihe von Additiven bezüglich ihres Einflusses auf die resultierende Partikelgröße untersucht. Die Auswahl der Additive erfolgte unter den Gesichtspunkten einer guten Löslichkeit im Fällungsmedium und einer Oberflächenaktivität, die ein rasches Belegen der neu entstehenden Oberflächen bei der Präzipitation gewährleisten sollte. Darüber hinaus ist zu berücksichtigen, dass ein potentiell geeignetes Additiv den Sprühtrocknungsprozess schadlos überstehen muss und dabei nicht als viskoses Produkt die Kristallisate verkleben darf. Daher sind viele Additive in ihrer Einsatzkonzentration limitiert und können nur in geringen Mengen eingesetzt werden, um den beschriebenen Effekt zu umgehen. Neben der bereits beschriebenen Hydroxypropylmethylcellulose, die im Vergleich zu Hydroxypropylcellulose zwar eine geringere Oberflächenaktivität aufweist, aber aufgrund der Methylgruppe bevorzugter an hydrophoben Oberflächen adhärert (Rasenack et al., 2003), wurden die in Tabelle 5.6 aufgeführten Hilfsstoffe und ihre Kombinationen untersucht. Bei den eingesetzten Additiven handelt es sich hauptsächlich um nichtionische, gut wasserlösliche Hilfsstoffe mit einer Oberflächenaktivität. Durch ihre amphiphile Molekülstruktur sind die Additive in der Lage, eine tendenziell hydrophobe Oberfläche eines Präzipitats zu belegen. Darüber hinaus können sie diese auch ausreichend in wässriger Umgebung stabilisieren. Der Hilfsstoff bzw. die Hilfsstoffkombination wurde in entsprechender Konzentration im zur Präzipitation verwendeten Wasser gelöst. Anschließend wurde eine solvent-change-Präzipitation durch Zusammenführen von acetoniger Wirkstofflösung (1% (m/V) der Wirkstoffkombination von SX und FP) und wässrigem Nichtlösemittel im

Verhältnis 1+10 durchgeführt. Die erhaltene Dispersion wurde wie zuvor beschrieben sprühgetrocknet. Die Bestimmung der Partikelgröße erfolgte nach Redispergierung unter Ultraschall in SX-gesättigtem Wasser mithilfe der Laserdiffraktion. Wie in Abbildung 5.29 ersichtlich, führten die unterschiedlichen Hilfsstoffzusätze zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich der Partikelgrößenverteilung.

Tabelle 5.6: als Präzipitationsadditive verwendete Hilfsstoffe

Hilfsstoff	Charakteristika	Einsatzkonzentrationen in % m/V im Nicht-LM
HPMC	sterische Stabilisation	0,01 bis 1
Polysorbat 80, 20, 65	sterische Stabilisation	0,01 bis 1
Poloxamer 188	sterische Stabilisation	0,01 bis 1
Gelatine	elektrosterische Stabilisation	0,01 bis 0,5
Leucin	elektrosterische Stabilisation	0,01 bis 1
Na-Alginat	elektrosterische Stabilisation	0,01
Polyvinylalkohol	sterische Stabilisation	0,01 bis 5
Polyvinylpyrrolidon	sterische Stabilisation	1

Unter der Annahme, dass die 90%-Quantile der Partikelgrößenverteilung auf Aggregatbildung im redispergierten Produkt zurückzuführen sind und daher nicht die tatsächliche Partikelgröße angeben, wurden die mittleren Partikelgrößen betrachtet. Eine Reihe von Additiven führte zu einer guten Stabilisierung der Wirkstoffkombination mit mittleren Partikelgrößen deutlich unter 5 µm und damit im inhalierbaren Größenbereich. Dabei ist bei Polysorbat 80 (Tween) eine Zunahme der mittleren Teilchengröße mit zunehmender Additivkonzentration zu beobachten, wohingegen ein gegenteiliger Effekt bei Poloxamer 188 zu

beobachtet ist. Dementsprechend ist bei Verwendung einer 1%igen Poloxamer-Lösung eine noch verbesserte Stabilisation zu erwarten. Da Poloxamer 188 jedoch bei der verwendeten Auslasstemperatur von etwa 50°C im Sprühturm als viskoses Produkt anfällt, ist der Einsatz höherer Konzentrationen nicht möglich. Bereits eine 0,05%ige Konzentration führt zu einem klebrigen Produkt, das zwar im Ultraschallbad in Wasser redispersiert werden kann, jedoch niemals für eine inhalative Dispergierung verwendbar ist. Entsprechendes ist auch bei höheren Konzentrationen von Polysorbat 80 zu beobachten. Polysorbat 20 und Polysorbat 65 wurden als alternative Additive mit anderer Lipophilie getestet, wobei besonderes Augenmerk auf den Habitus der resultierenden Partikel gelegt wurde (siehe 5.2.2.4). Das Ergebnis zeigte keinen Unterschied in der Partikelgrößenverteilung.

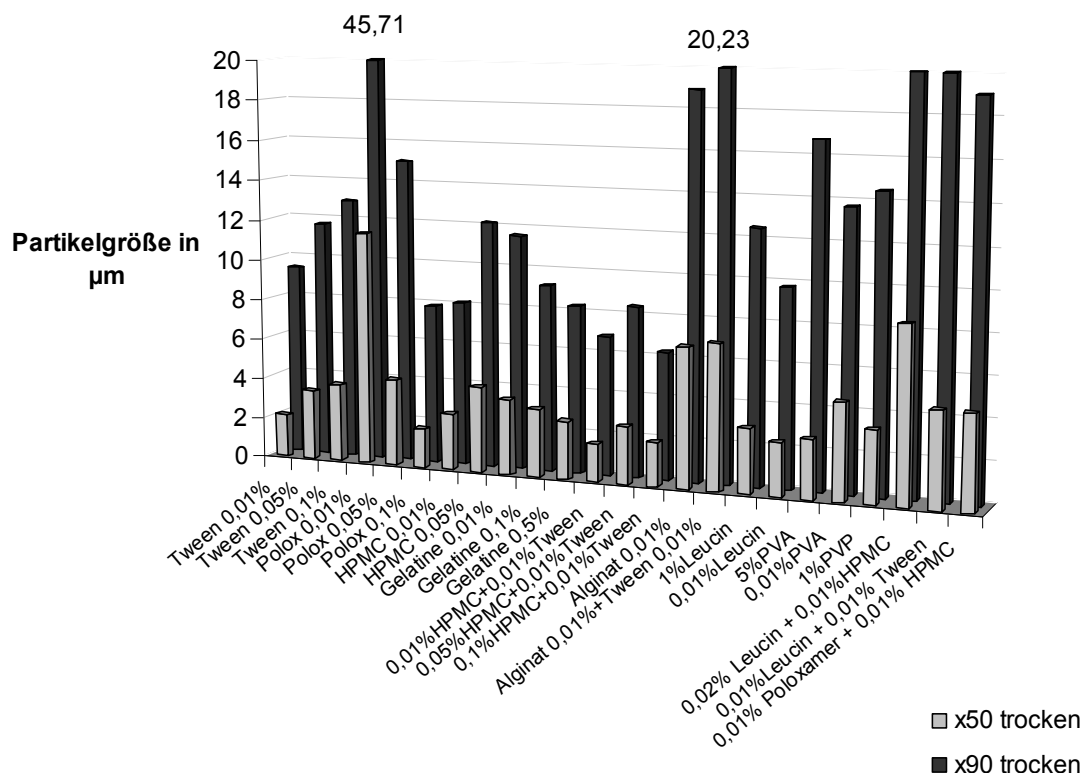
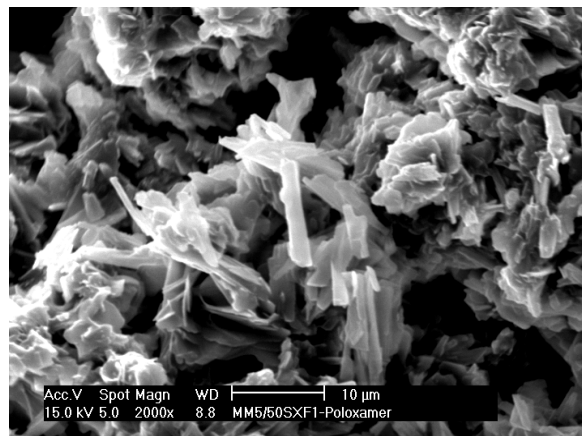


Abbildung 5.29: Partikelgrößen der mit unterschiedlichen Additiven gefällten Präzipitate nach Sprühtrocknung

Der Zusatz von Gelatine führte zu einer feinen Fällung, das sprühgetrocknete Produkt verklebte jedoch sofort bei Wasserkontakt und ließ sich kaum redispergieren. Ein Zusatz von Leucin, das in der Sprühtrocknung gerne zur Verringerung des interpartikulären Zusammenhalts verwendet wird und das die Dispergierfähigkeit erhöhen soll (Learoyd et al., 2007), führte zu einem hydrophobisierten und schlecht dispergierbaren Produkt. Eine Präzipitation in Gegenwart von HPMC führte zu einem fließfähigen Produkt, das keinerlei Klebrigkeit aufwies und sich gut redispergieren ließ. Mit steigender Konzentration war ein leichter Anstieg der mittleren Partikelgröße des Präzipitats zu beobachten, gleichzeitig verbesserte sich aber visuell das Fließverhalten. Abbildung 5.30 zeigt die Morphologie verschiedener Präzipitate, die unter Zusatz unterschiedlicher Additive hergestellt wurden.

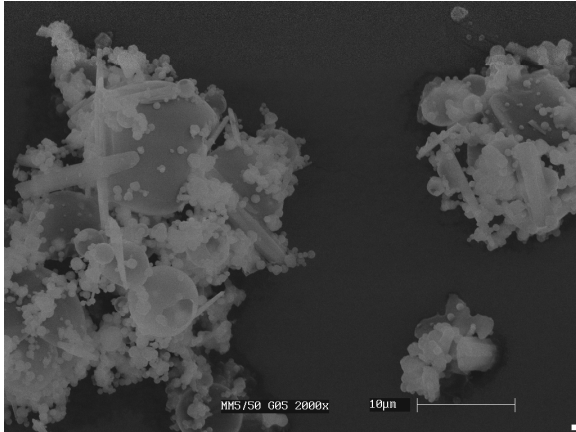


Präzipitat ohne Additiv
(2000-fache Vergrößerung)

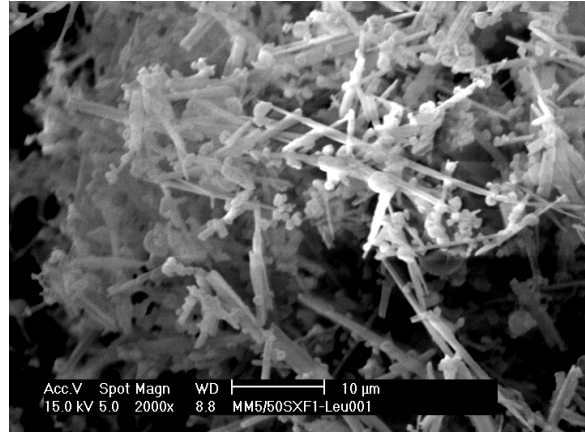


Präzipitation mit 0,01% Poloxamer 188
(2000-fache Vergrößerung)

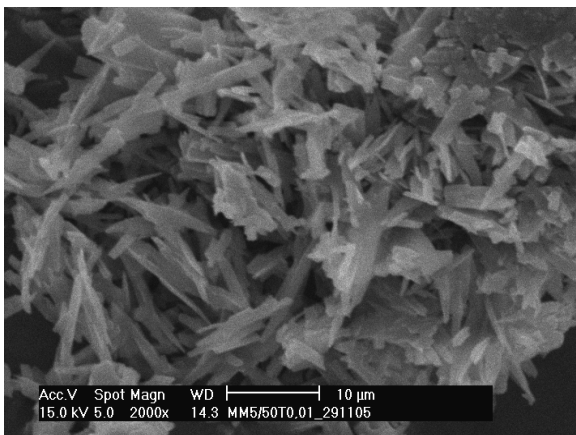
Abbildung 5.30a: REM-Aufnahmen der Morphologie von Wirkstoffpräzipitaten mit unterschiedlichen Additiven



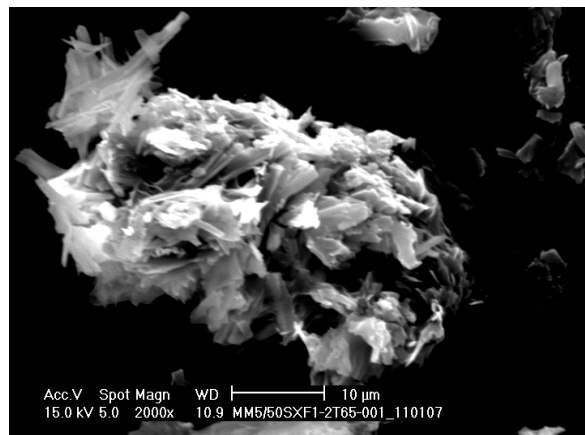
Präzipitation mit 0,5% Gelatine
(2000-fache Vergrößerung)



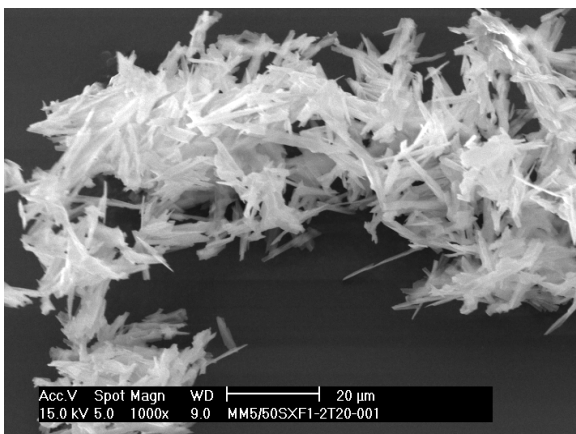
Präzipitation mit 0,01% Leucin
(2000-fache Vergrößerung)



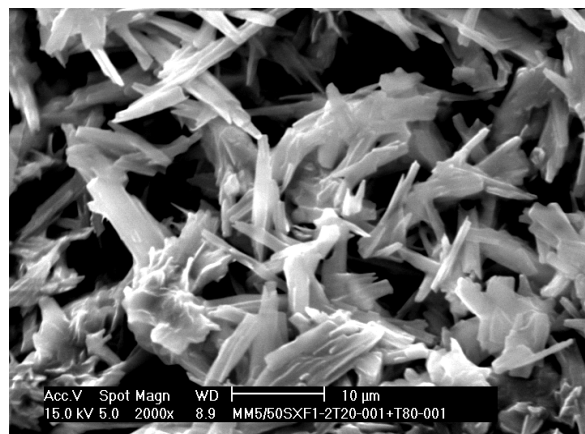
Präzipitation mit 0,01% Polysorbat 80
(2000-fache Vergrößerung)



Präzipitation mit 0,01% Polysorbat 65
(2000-fache Vergrößerung)

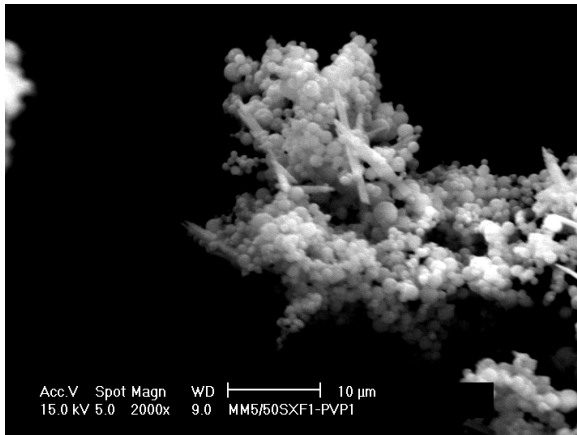


Präzipitation mit 0,01% Polysorbat 20
(1000-fache Vergrößerung)

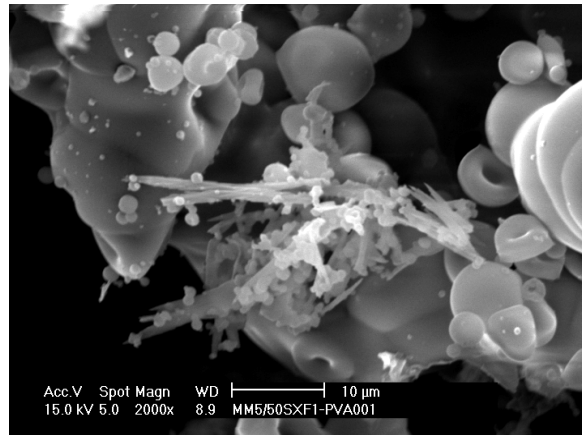


Präzipitation mit 0,01% Polysorbat 20
und 0,01% Polysorbat 80 (2000-fache
Vergrößerung)

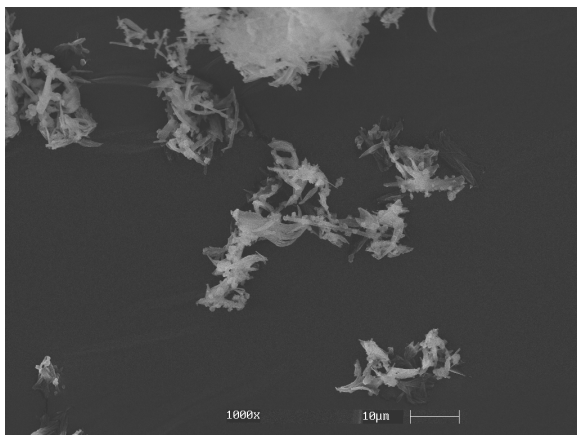
Abbildung 5.31b: REM-Aufnahmen der Morphologie von Wirkstoffpräzipitaten mit unterschiedlichen Additiven



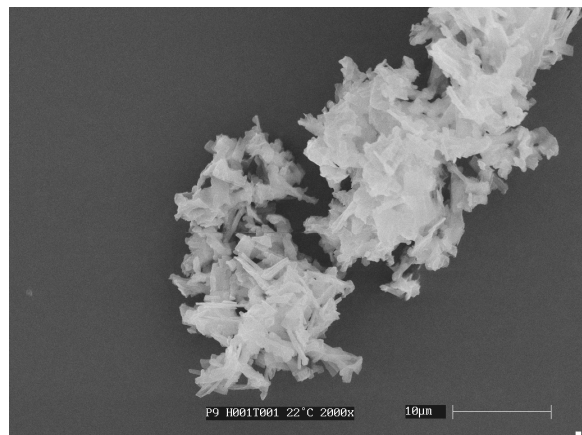
Präzipitation mit 0,01% PVP
(2000-fache Vergrößerung)



Präzipitation mit 0,01% PVA
(2000-fache Vergrößerung)



Präzipitation mit 0,05% HPMC
(1000-fache Vergrößerung)



Präzipitation mit 0,01% HPMC und
0,01% Polysorbat 80 (2000-fache Vergr.)

Abbildung 5.32c: REM-Aufnahmen der Morphologie von Wirkstoffpräzipitaten mit unterschiedlichen Additiven

Alle Präzipitate weisen eine mehr oder minder ausgeprägte nadelförmige Struktur auf. Anhand der Abbildungen ist zu erkennen, dass der Zusatz von PVA oder PVP zu Aggregaten von ausgerundeten Partikeln führte, die vermutlich vor allem aus dem bei der Sprühtrocknung ausgefallenen Hilfsstoff bestehen. Die mittlere Partikelgröße dieser Präzipitate ließ sie für die inhalative Gabe nicht geeignet erscheinen. Bei Poloxamer 188 zeigte sich ein starkes Verkleben der Partikel untereinander, das bei höheren Konzentrationen noch ausgeprägter war.

Die Präzipitate konnten bei der Fällung nie im Nanometerbereich stabilisiert werden. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass beide Wirkstoffe mit einem $\log P$ von 4,15 (Salmeterol) bzw. 2,78 (FP) nicht ausreichend lipophil sind und daher noch eine zu hohe Löslichkeit in der Dispersion aufweisen. Kegel beschreibt in ihrer Arbeit die Abhängigkeit der Präzipitatgröße vom $\log P$ der eingesetzten Wirkstoffe und kommt zu dem Ergebnis, dass ein $\log P$ von mindestens sechs erforderlich ist, um zu einer Fällung im Nanometerbereich zu gelangen (Kegel, 2006).

Aufgrund der Partikelgrößenverteilung und der Morphologie der resultierenden Präzipitate aus diesen Vorversuchen erschienen Polysorbat 80 und HPMC aussichtsreiche Additive für die Präzipitation von Partikeln mit zwei Wirkstoffen im Mikromischer zu sein, diese wurden daher einer eingehenderen Betrachtung unterzogen. Der Zusatz von Polysorbat 80 führt zu einer signifikanten Verkleinerung der entstehenden Kristallite im Vergleich zu einer additivfreien Präzipitation, wobei der Effekt bei einer Einsatzkonzentration von 0,01% im Fällungsmedium am ausgeprägtesten ist (siehe Abbildung 5.33). Polysorbat ist im Vergleich zu HPMC ein kleines Molekül, das in der Lage ist, neue Oberflächen rasch zu besetzen und diese sterisch zu stabilisieren. Dabei adsorbiert Polysorbat unspezifisch an die Oberfläche, die Adsorptionsisotherme lässt sich nach Langmuir beschreiben (Duro et al., 1998).

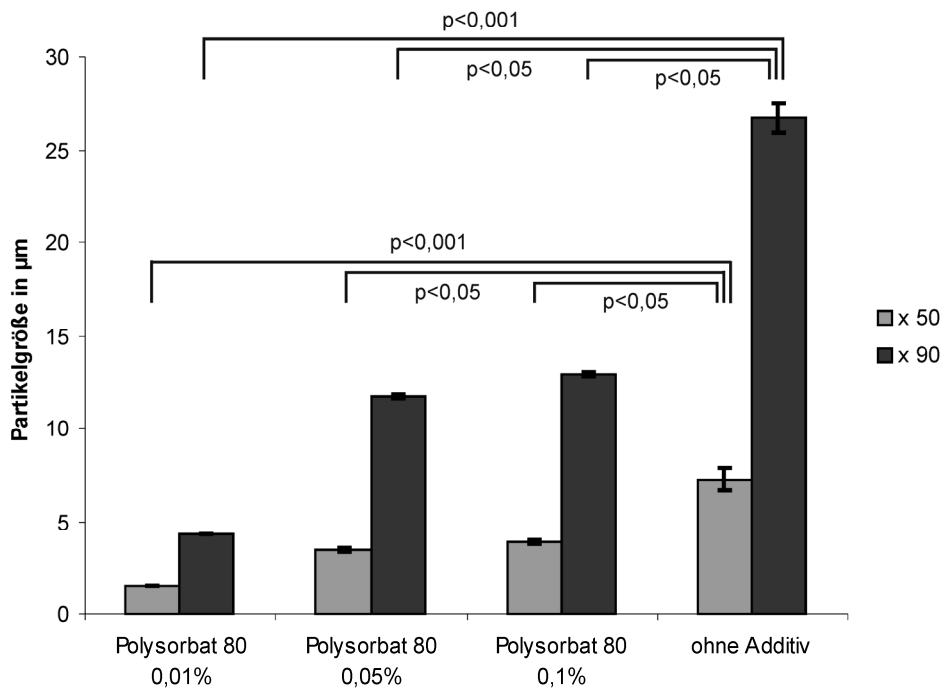


Abbildung 5.33: Abhängigkeit der Partikelgröße der Wirkstoffpräzipitate von der Polysorbat-Konzentration ($n = 3$)

HPMC ist ein wenig oberflächenaktiver Stoff, dessen Oberflächenadsorption vor allem durch die Wechselwirkung der hydrophoben Molekülanteile (Methylrest) mit der Oberfläche zustande kommt. HPMC benötigt länger, um neue Grenzflächen zu belegen. Dies ist an der unterschiedlichen Stabilisierung und damit der unterschiedlichen Partikelgröße von Präzipitaten zu beobachten, die bei unterschiedlichen Gesamtflussraten hergestellt wurden. Wenn die Gesamtflussrate 11 ml/min beträgt, führt ein 0,05%iger Zusatz von HPMC bei gleichen Bedingungen (LM zu Nicht-LM 1+10, Fällung bei Raumtemperatur, $n=3$) zu signifikant ($p<0,001$) kleineren Präzipitaten (mit einer mittleren Partikelgröße von 2,0 µm), als bei einer Fällung mit einer Gesamtflussrate von 55 ml/min (mittlere Partikelgröße 3,8 µm). Bei einer langsameren Durchmischung und Präzipitation hat das Additiv HPMC länger Zeit, die entstehenden Grenzflächen zu belegen und damit

zu stabilisieren. Die Partikelgröße einer Fällung unter Zusatz von 0,01% Polysorbat 80 zeigt hingegen keine Abhängigkeit von der Geschwindigkeit, das Molekül ist immer in der Lage, die neuen Flächen schnell zu stabilisieren. HPMC hat im Gegensatz zu Polysorbat 80 den Vorteil, dass das Produkt nach Sprühtrocknung gut fließfähig ist und nicht verklebt. Um die Vorteile beider Hilfsstoffe (gute Stabilisierung von Polysorbat und Fließfähigkeit von HPMC) auszunutzen, wurden Kombinationen aus beiden Hilfsstoffen als Additiv getestet. Abbildung 5.34 zeigt den Einfluss sowohl von HPMC als auch der Kombination von HPMC mit Polysorbat 80 auf die Partikelgröße der getrockneten Präzipitate. Dabei führt die Kombination von HPMC mit Polysorbat zu einer Reduktion der Partikelgröße im Vergleich zum alleinigen Einsatz von HPMC. Das Produkt lässt sich besser dispergieren und weist visuell ein gutes Fließverhalten auf. Die Kombination der beiden Hilfsstoffe führt zu einer guten Stabilisation der Präzipitate, wobei das kleine Molekül Polysorbat 80 schnell die Grenzfläche besetzt und das Wachsen des Kristallisats verhindert, während das größere Molekül HPMC eine sterische Barriere ausbildet und somit Partikelaggregation verhindert. Darüber hinaus ist HPMC nicht nur auf der Oberfläche der Partikel zu finden, sondern fällt bei der Sprühtrocknung auch separat als kleine sphärische Partikel an, die das Fließverhalten des Produkts verbessern.

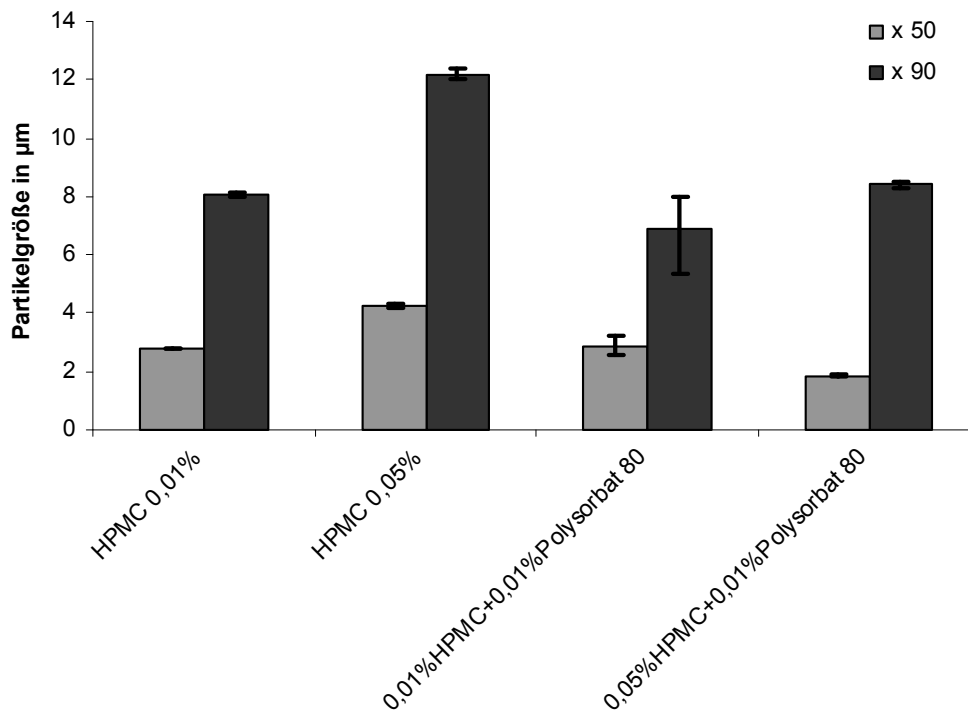
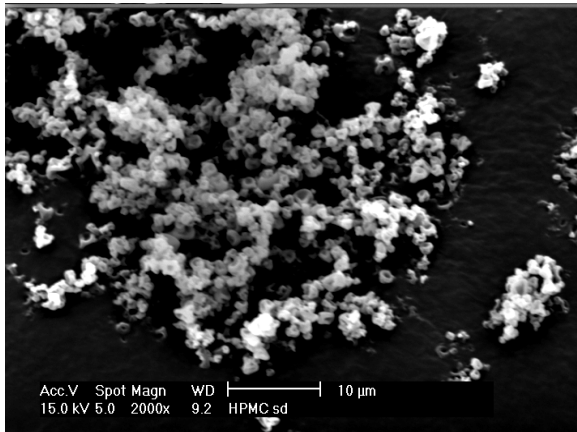


Abbildung 5.34: Einfluss von HPMC und Kombinationen von HPMC und Polysorbat 80 als Additiv in der Präzipitation auf die Partikelgröße ($n = 3$)

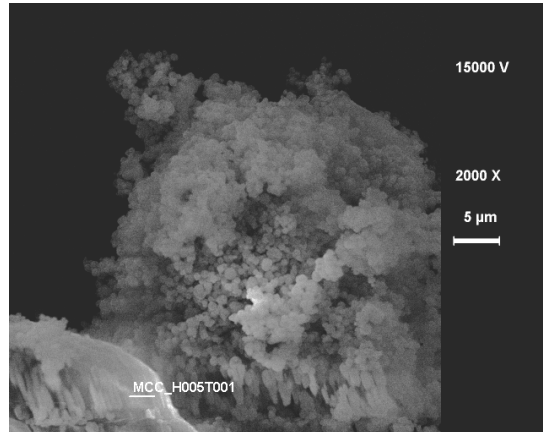
Ein Vergleich der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen von reiner sprühgetrockneter HPMC mit den erhaltenen Wirkstoffpräzipitaten und einer sprühgetrockneten Dispersion mikrokristalliner Cellulose (als wasserunlöslichem Wirkstoffäquivalent) mit HPMC bestätigt diese Annahme (siehe Abbildung 5.35).

Da die Formulierungen für die pulmonale Applikation entwickelt wurden, müssen die ausgewählten Hilfsstoffe gut verträglich sein und dürfen keine Reizung hervorrufen. Für Additive aus der Familie der Polysorbate ist dies für vielfältige Applikationsrouten belegt, so kann Polysorbat unter anderem auch parenteral angewendet werden (Varma et al., 1985). Es befinden sich auch bereits Inhalativa auf dem Markt, die Polysorbat 20 oder Polysorbat 80 enthalten. HPMC wird von der FDA für den Lebensmittelbereich als GRAS-Substanz (generally recognised as safe)

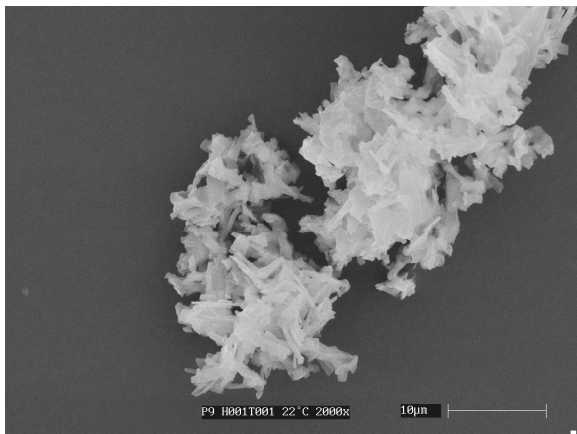
geführt und hat in tierexperimentellen Studien bereits seine pulmonale Unbedenklichkeit unter Beweis gestellt (Zhou et al., 2003).



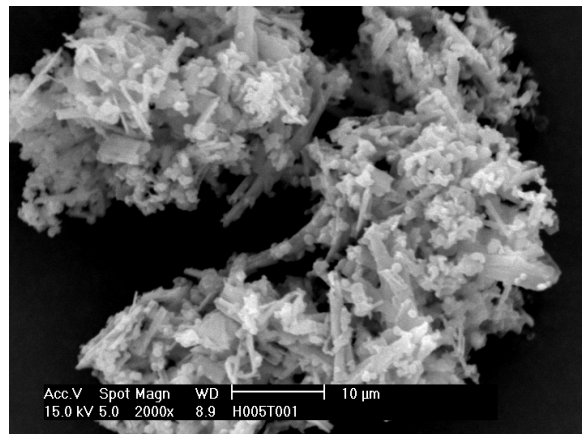
sprühgetrocknete HPMC (2000-fache Vergrößerung)



mikrokristalline Cellulose mit 0,05% HPMC sprühgetrocknet (2000-fache Vergrößerung)



Wirkstoffpräzipitat mit 0,01% HPMC und 0,01% Polysorbat 80 (1000-fache Vergrößerung)



Wirkstoffpräzipitat mit 0,05% HPMC und 0,01% Polysorbat 80 (2000-fache Vergrößerung)

Abbildung 5.35: REM-Aufnahmen unterschiedlicher Präzipitate, deutlich zu sehen sind die sphärischen HPMC-Partikel

5.2.3.4 Habitus der Präzipitate

Wie bereits gezeigt, haben die Wirkstoffpräzipitate ein nadelförmiges Aussehen. Dadurch ist es schwierig, ihre Partikelgröße mithilfe der Laserdiffraktometrie adäquat zu bestimmen, da sich dieses Verfahren auf runde Partikel bezieht. Nadelförmige Partikel können sich ungerichtet in der Messsuspension befinden, entsprechend ist der mittlere Partikeldurchmesser eine statistische Näherung der mittleren Partikelausdehnung aus Querbetrachtung, längster Ausdehnung und Aufsicht. Im Extremfall nimmt die Partikelgrößenverteilung eine bimodale Form an, bei der das kleinere Maximum für den Partikelquerschnitt (Aufsicht) steht und das größere Maximum ein Maß für die längste Ausdehnung ist. Dennoch bietet die Partikelgrößenbestimmung mittels Laserlichtbeugung eine schnelle batch-to-batch Charakterisierung für die Präzipitate. Zur detaillierteren morphologischen Charakterisierung der Partikel wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen herangezogen (siehe Kapitel 3.5.1). Um den Einfluss von Lösemittel und Hilfsstoff auf den Habitus der Partikel näher zu untersuchen, wurden Präzipitate aus unterschiedlichen Lösemitteln und mit unterschiedlichen Additiven hergestellt. Dabei kamen neben Aceton als vergleichsweise gutem Lösemittel für die Kombination aus Salmeterolxinafoat und Fluticasonpropionat eine Aceton-Wasser-Mischung (60% Aceton) mit einer besseren Löslichkeit für Salmeterol (siehe Kapitel 4.2.1) sowie 96% (V/V) Ethanol und Methanol zum Einsatz. In den beiden letztgenannten hat die Wirkstoffkombination eine schlechtere Löslichkeit als in Aceton und kann nur in einer Konzentration von 0,3% (m/V in Ethanol) beziehungsweise 0,5% (m/V in Methanol) gelöst werden. Um eine Vergleichbarkeit der hergestellten Chargen zu gewährleisten, wurde daher für diesen Versuch die Wirkstoffkonzentration in allen Lösemitteln bei 0,3% (m/V) gehalten. Die Wirkstofflösung wurde mit dem

Nichtlösemittel (gegebenenfalls mit Additiv in 0,01%iger Konzentration) im Mikromischer im Verhältnis 1+10 gemischt, die erhaltene Dispersion wurde anschließend sprühgetrocknet. Wurde die Wirkstoffkombination ohne Additive aus unterschiedlichen Lösemitteln präzipitiert, so ergab sich in allen Fällen ein plättchen- bis nadelförmiges Aussehen der Partikel. In Abhängigkeit vom Lösemittel ließ sich jedoch ein unterschiedlicher Partikelhabitus erkennen, wie in Abbildung 5.36 dargestellt.

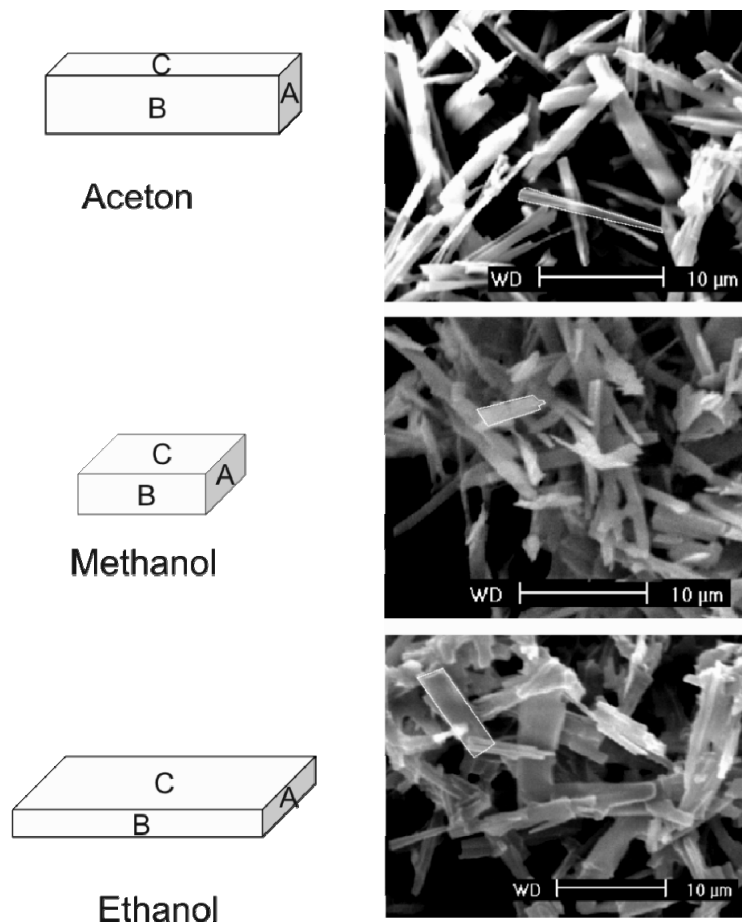


Abbildung 5.36: unterschiedlicher Habitus der Präzipitate in Abhängigkeit vom Lösemittel, charakteristische Partikel sind weiß umrandet

Ein idiomorpher Kristall lässt sich durch mindestens drei Flächen beschreiben, an denen Kristallwachstum stattfinden kann. Kristallwachstum findet vorrangig an schlecht stabilisierten Flächen statt beziehungsweise an Flächen, deren Partiallöslichkeit schlechter ist.

Betrachtet man an den Präzipitaten die Flächen A, B und C, wie in Abbildung 5.36 definiert, so lassen sich unterschiedliche Wachstumsrichtungen in Abhängigkeit vom Lösemittel beschreiben. Aus einer 60%igen acetonigen Lösung wächst vorrangig Fläche A, was lange Nadeln hervorbringt. Aus methanolischer Lösung ist das Kristallisieren auf Fläche A zugunsten von Fläche B eingeschränkt, so dass kurze Plättchen entstehen, während aus ethanolischer Lösung an den Flächen A und B Wachstum stattfindet und sich lange dünne Blätter ausbilden. Im Umkehrschluss müssten die Flächen mit weniger ausgeprägtem Wachstum in der Dispersion besser stabilisiert sein. Da Wasser als Nichtlösemittel in allen Fällen vorhanden war, kann der Unterschied nur durch die verschiedenen Lösemittel beziehungsweise Lösemittelgemische zustande kommen. Betrachtet man nun die Dielektrizitätskonstanten der verwendeten Lösemittel (siehe Tabelle 5.7), die ein Maß für das Vermögen zur Ladungstrennung und somit für die Polarität des Lösemittels sind, so lassen sich am Präzipitat Flächen unterschiedlicher Polarität definieren. Ein ähnlicher Ansatz wird in der Literatur zur Erklärung des Habitus von Resorcinol-Kristallen verwendet (Hussain und Anwar, 1999).

Tabelle 5.7: Dielektrizitätskonstanten der verwendeten Lösemittel bei 20°C

Lösemittel	Dielektrizitätskonstante
60% Aceton	21,7 (Aceton), 80,4 (Wasser)
Methanol	33,7
96% Ethanol	25,7

Die Dielektrizitätskonstanten der verwendeten Lösemittel nehmen von 60% Aceton über Methanol zu Ethanol hin ab. Aceton/Wasser stabilisiert das Wachstum der Fläche B, diese ist also die Fläche höchster Polarität. Methanol stabilisiert das Wachstum der Fläche A und der Fläche C, wohingegen Ethanol vorrangig Fläche C stabilisiert. Daraus leitet sich

ab, dass Fläche A eine gegenüber Fläche C leicht erhöhte Polarität hat. Insgesamt nimmt die Polarität der Kristallflächen von B über A zu C hin ab. Der Zusatz von Polysorbat 80 als Additiv führte zu einer Stabilisierung der Fläche A, die Präzipitate waren weniger nadelförmig (siehe Abbildung 5.30b). Um die noch stärker polare Fläche B ebenfalls effektiv zu stabilisieren und das Kristallwachstum zurückzudrängen, erschien es sinnvoll, ein Additiv mit einer höheren Hydrophilie zu verwenden. Da sich Polysorbat 80 als ein schnell an die Grenzfläche wanderndes Additiv herausgestellt hat, wurden andere Vertreter der Polysorbate verwendet. Polysorbat 80 mit einem HLB-Wert von 15 wurde durch Polysorbat 20 ersetzt, dessen HLB-Wert bei 16,2 liegt. Auch mit diesem Additiv ließen sich feine Präzipitate erhalten, der Habitus der Partikel unterschied sich allerdings nicht maßgeblich von den Präzipitaten mit Polysorbat 80.

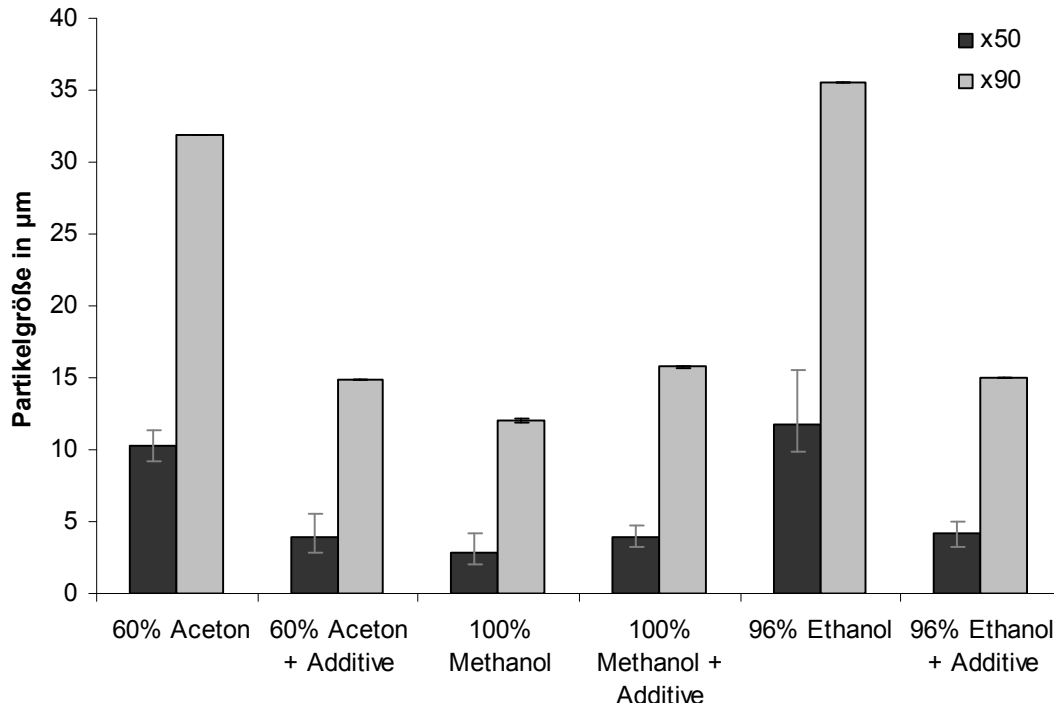


Abbildung 5.37: Partikelgrößen der Präzipitate aus unterschiedlichen Lösemitteln (-/+ Additivkombination aus 0,01% Polysorbat 80 und 0,01% HPMC), $n = 3$

Auch ein Polysorbat mit höherer Lipophilie (Polysorbat 65 mit einem HLB-Wert von 10,5) bewirkte keine Änderung im Habitus gegenüber dem Präzipitat, das unter Zusatz von Polysorbat 80 hergestellt wurde (siehe Abbildung 5.30b). Der Zusatz von HPMC zu Polysorbat 80 änderte den Partikelhabitus nicht, verbesserte aber das visuelle Fließverhalten. Zusätzlich wurde untersucht, ob der Zusatz von 0,01% Polysorbat 80 und 0,01% HPMC, wie es als optimale Additivkombination gefunden wurde, in Abhängigkeit vom verwendeten Lösemittel zu unterschiedlichen Ergebnissen führt. Wie in Abbildung 5.37 ersichtlich, führt der Zusatz von Additiven zu einer deutlichen Verkleinerung der Präzipitate, die aus Ethanol und Aceton gefällt werden können, wohingegen die Partikelgröße der Methanol-Präzipitate keiner signifikanten Änderung unterworfen ist. Die rasterelektronischen Bilder der Partikel zeigen für das Präzipitat aus Aceton und das aus Methanol eine vergleichbare Morphologie, während das Ethanol-Präzipitat deutlich längere Nadeln von mehr als 10 μm Länge enthält (siehe Abbildung 5.38). Hier hat die Kristallisationsinhibition durch Polysorbat nur einen unzureichenden Effekt. Die Präzipitation aus Ethanol wurde daher nicht weiter verfolgt. Vergleicht man die aerodynamischen Eigenschaften von aus Aceton gefällten Präzipitaten mit solchen, die aus Methanol erzeugt wurden, so lässt sich ein signifikant besseres aerodynamisches Verhalten der aus Methanol hergestellten Wirkstoffpräzipitate feststellen. Dies bezieht sich sowohl auf den MMAD als auch auf die resultierende Feinpartikelfraktion (siehe Abbildung 5.39).

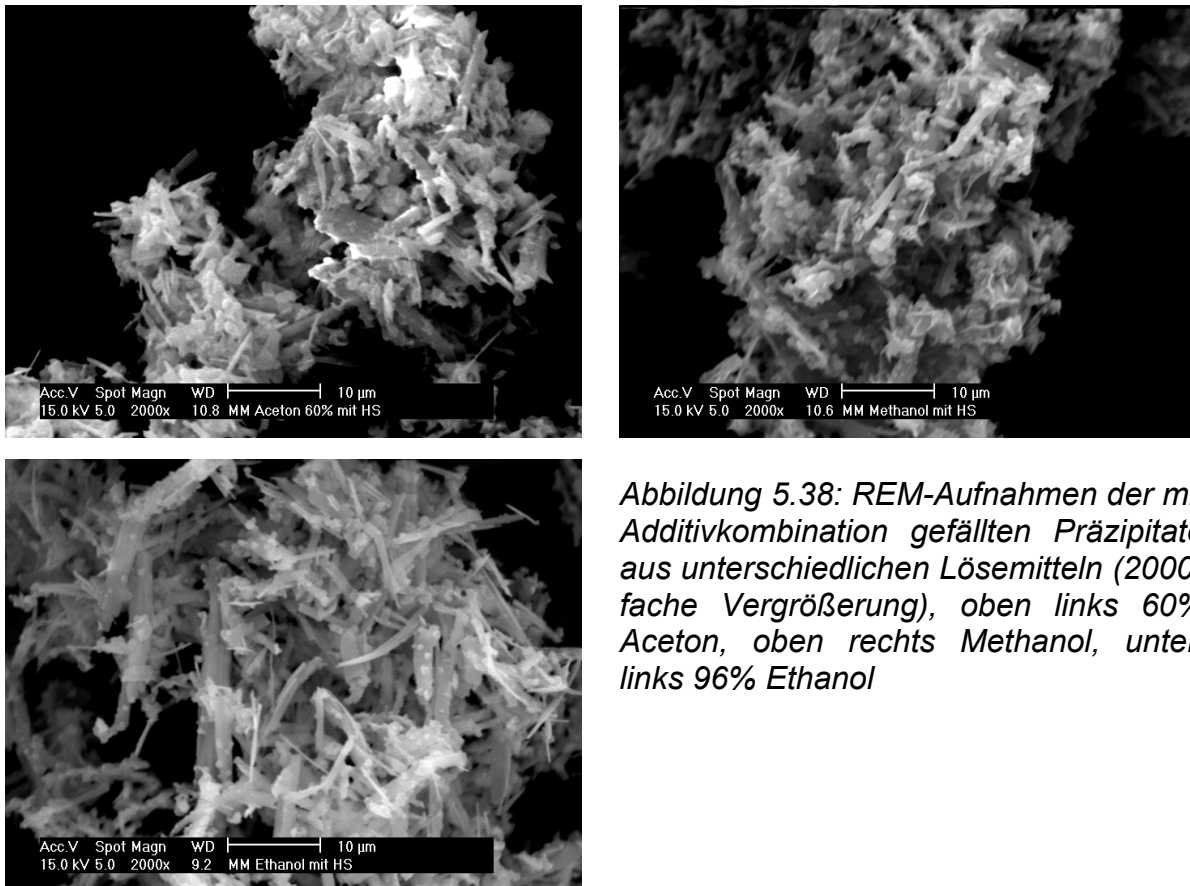


Abbildung 5.38: REM-Aufnahmen der mit Additivkombination gefällten Präzipitate aus unterschiedlichen Lösemitteln (2000-fache Vergrößerung), oben links 60% Aceton, oben rechts Methanol, unten links 96% Ethanol

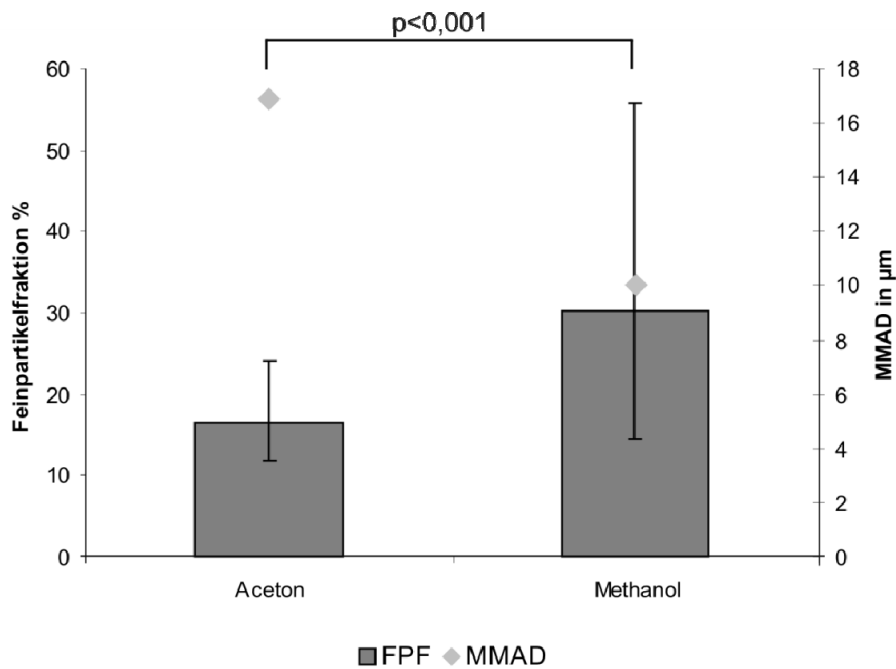


Abbildung 5.39: Feinpartikelfraktion und MMAD von Präzipitaten aus Aceton ($n = 11$) und Methanol ($n = 20$), Fehlerbalken gilt für FPF, Signifikanzniveau gilt sowohl für MMAD als auch für FPF

Für die Inhalation ist nicht primär entscheidend, welchen Habitus die Partikel besitzen, sie müssen sich vielmehr gut aus dem Pulverband trennen und dispergieren lassen und gute aerodynamische Eigenschaften zeigen. Sphärische Partikel fließen in der Regel gut, können aber im Vergleich zu elongierten Partikeln einen stärkeren Kontakt zu benachbarten Partikeln aufweisen, da sie dicht nebeneinander liegen können. Elongierte, nadelförmige Partikel können sich im Pulver wie in einem Heuhaufen miteinander verhaken und zeigen dadurch ein schlechtes Fließverhalten. Durch einen weniger engen Kontakt im Pulver ist es jedoch einfacher, sie zu dispergieren. Darüber hinaus können sie sich im Luftstrom ausrichten und dadurch ein kleineren Partikeln äquivalentes aerodynamisches Verhalten zeigen (siehe Abbildung 5.40).

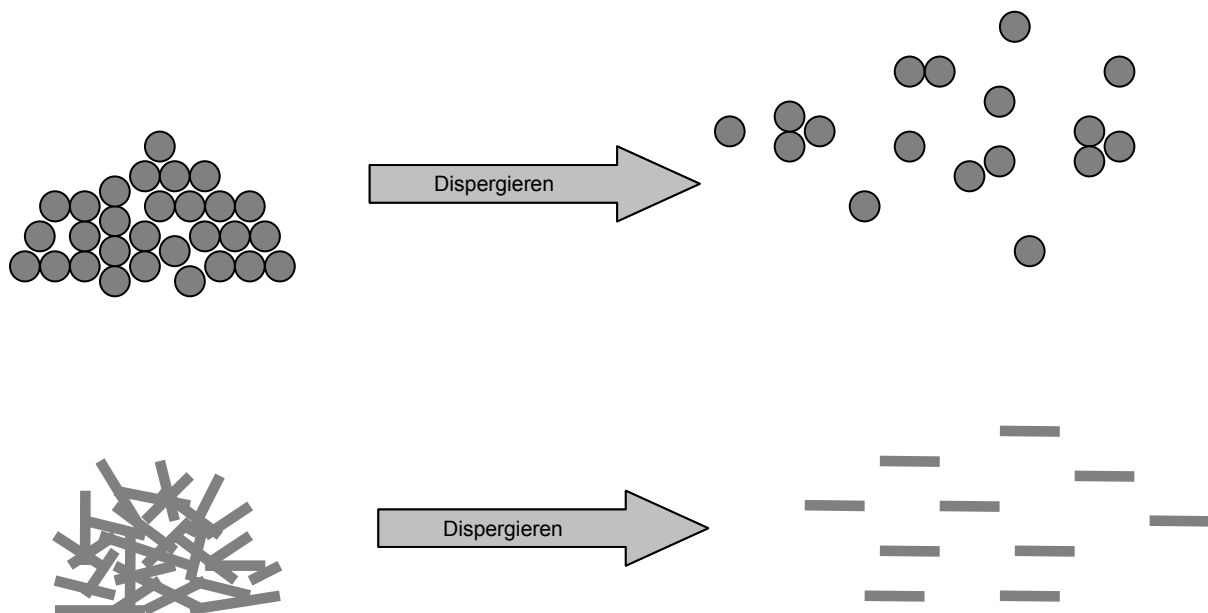


Abbildung 5.40: Deagglomeration und Ausrichten von sphärischen bzw. nadelförmigen Partikeln beim Dispergieren im Luftstrom (schematisch)

Da die aus Methanol unter Zusatz von 0,01% Polysorbat 80 und 0,01% HPMC präzipitierten Partikel sowohl in der Laserdiffraktometrisch

bestimmten Partikelgröße als auch in ihrem aerodynamischen Verhalten den aus Aceton gefällten Wirkstoffpräzipitaten überlegen waren, wurden weitere Optimierungen der Formulierung in Bezug auf den Einsatz als Pulver zur Inhalation mit aus Methanol hergestellten Präzipitaten vorgenommen.

5.2.3.5 Physikochemische Charakterisierung der Präzipitate

Die hergestellten Präzipitate wurden physikochemisch charakterisiert, um Aussagen über die Kristallinität und mögliche vorliegende Modifikationen machen zu können. Dazu wurden röntgen-diffraktometrische sowie thermoanalytische Untersuchungen durchgeführt. Betrachtet man das Schmelzverhalten der Präzipitate, so sind zwei Peaks zu erkennen, die den beiden Modifikationen des Salmeterolxinafoats zugeordnet werden können (siehe Abbildung 5.41), obwohl sie zu etwas niedrigeren Temperaturen verschoben sind.

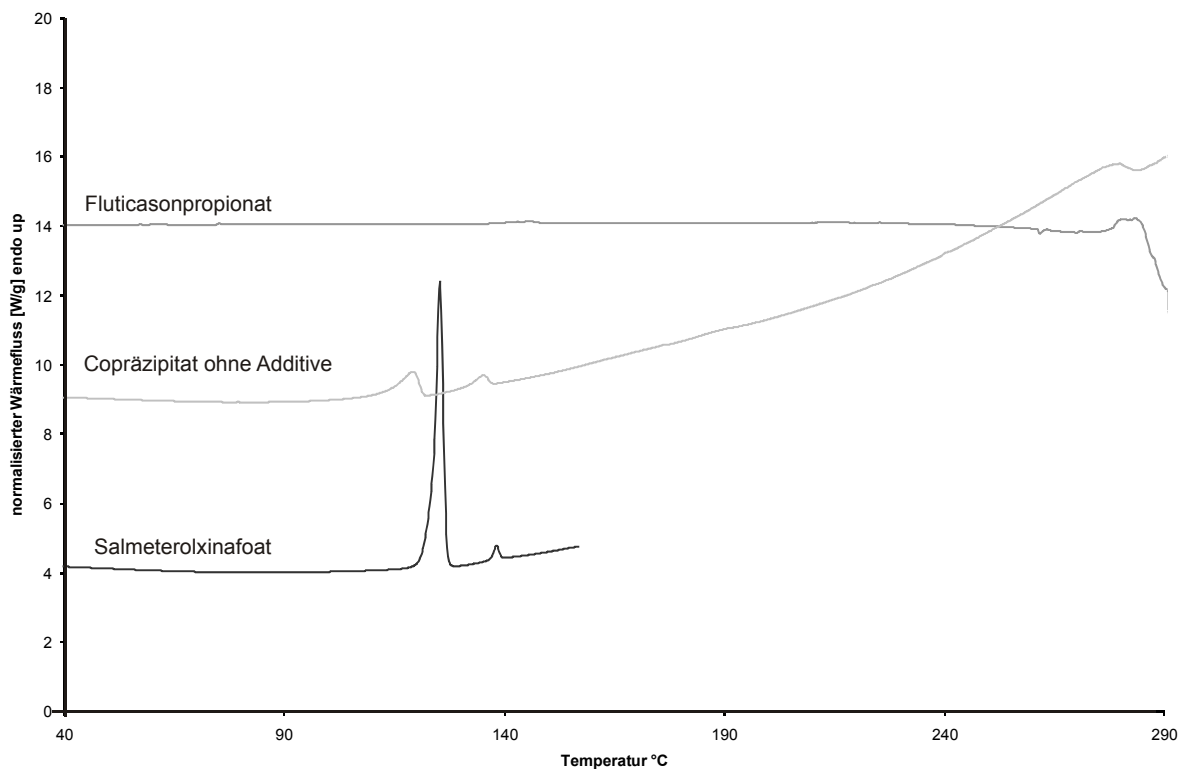
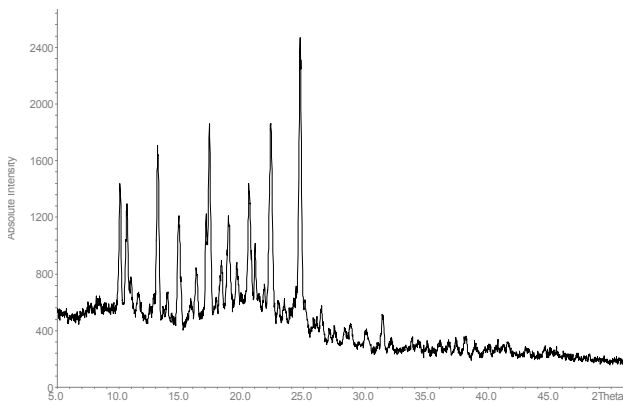


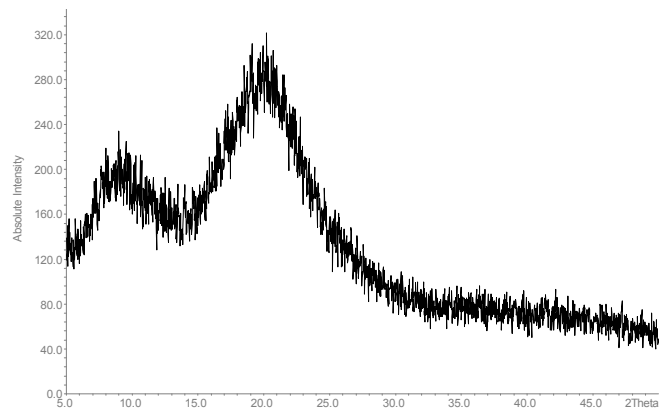
Abbildung 5.41: Vergleich der DSC-Diagramme der beiden Wirkstoffe mit einem Copräzipitat ohne Additive

Auch ein Schmelzen unter Zersetzung, wie es für Fluticasonpropionat charakteristisch ist, kann im Diagramm beobachtet werden. Die thermoanalytische Untersuchung ergibt nur bei additivfreien Präzipitaten

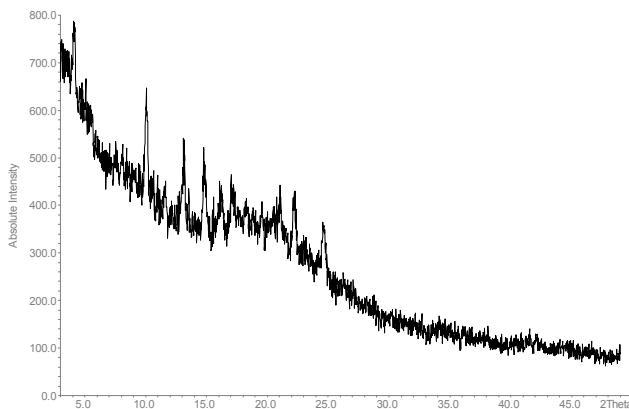
ein auswertbares Ergebnis, da nach Additivzusatz keine Peaks mehr zu erkennen sind. Da die beiden eingesetzten Additive Polysorbat 80 und HPMC amorpher Natur sind, können sie Kristallinitäten der Wirkstoffkombination überdecken. Dies gilt auch für die in Röntgendiffraktogrammen abgebildeten Röntgenbeugungsreflexe.



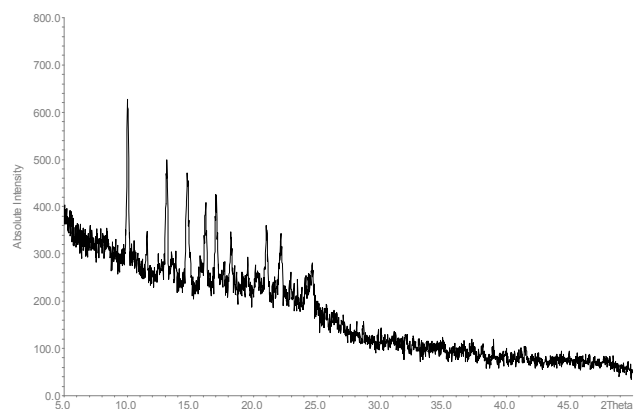
Röntgendiffraktogramm einer physikalischen Mischung von Wirk- und Hilfsstoffen (max. Intensität 2400)



Röntgendiffraktogramm der reinen Hilfsstoffe (Mix aus 1T Polysorbat 80 und 5 T HPMC) (max. Intensität 320)



Röntgendiffraktogramm eines Präzipitats mit Additivzusatz (max. Intensität 800)



Röntgendiffraktogramm eines Präzipitats ohne Additive (max. Intensität 800)

Abbildung 5.42: Röntgendiffraktogramme einer physikalischen Mischung, der reinen Additive und zweier Präzipitate (-/+ Additive) zum Vergleich

In Abbildung 5.42 sind zum Vergleich die Röntgendiffraktogramme einer physikalischen Mischung der Wirkstoffe mit Polysorbat und HPMC (im eingesetzten Verhältnis von 1T Polysorbat 80 und 5T HPMC plus 5T

Wirkstoff) und einer reinen Hilfsstoffkombination dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Hilfsstoffe selbst keine Röntgenreflexe erzeugen, während in der physikalischen Mischung deutliche Reflexe zu beobachten sind, die den Wirkstoffen zugeordnet werden können. Im präzipitierten Produkt liegt dem Röntgendiffraktogramm ein Halo der amorphen Substanzen als Basislinie zugrunde, darüber hinaus lassen sich aber sowohl für das additivfreie Präzipitat als auch für das Produkt einer Fällung mit Additiv Röntgenreflexe ausmachen, die auf kristallin vorliegende Wirkstoffe hindeuten. Wie bereits in Kapitel 4 beschrieben, kann Salmeterolxinafoat durch Sprühtrocknung in den amorphen Zustand überführt werden, die Substanz kristallisiert jedoch, insbesondere in feuchter Umgebung, rasch wieder. Fluticasonpropionat konnte durch Sprühtrocknung nicht in einem amorphen Zustand hergestellt werden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die möglicherweise im Produkt präsenten, amorphen Wirkstoffanteile vorrangig aus Salmeterolxinafoat bestehen, das in wasserdampf-angereicherter Atmosphäre Rekristallisation zeigen müsste. Die präzipitierten Pulver wurden daher hinsichtlich ihres Verhaltens bei unterschiedlichen relativen Luftfeuchten untersucht. Es ist zu erkennen, dass das Pulver entsprechend der Luftfeuchte geringe Mengen an Wasser adsorbierte, die jedoch bei Trocknung ebenso wieder desorbiert wurden (siehe Abbildung 5.43). Ab einer relativen Feuchte von 50% wurde die Wasseradsorption des Pulvers deutlich stärker. Ein Rekristallisationsprozess, der mit einem Gewichtsverlust einhergehen würde, ließ sich nicht beobachten. Daraus lässt sich schließen, dass die Wirkstoffe entweder bereits kristallin vorliegen und durch die Additive in der Analytik abgeschirmt werden, oder aber die Wirkstoffe durch die zugesetzten Additive effektiv in ihrer Kristallisation behindert werden. Weitere Untersuchungen wurden über die Lagerzeit vorgenommen

(siehe Kapitel 5.2.2.8), auch diese ließen keine bedeutende Änderung in den DVS-Diagrammen erkennen, die auf eine Rekristallisation hindeuten würde. Somit scheinen die Wirkstoffe bereits teilkristallin vorzuliegen und werden durch die Hilfsstoffe in ihrem Zustand stabilisiert.

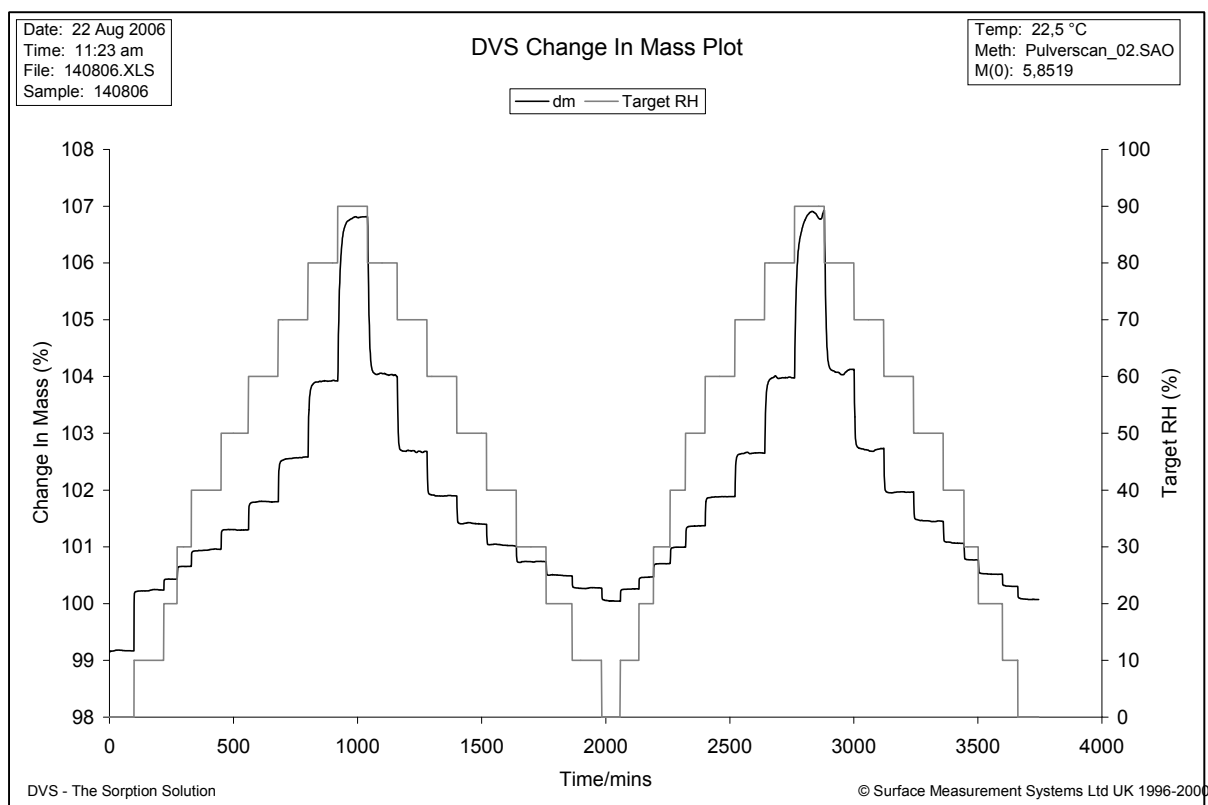


Abbildung 5.43: DVS-Daten eines mit Additiven copräzipitierten Wirkstoffpulvers (schwarz = Masseänderung in %, grau = eingestellte relative Luftfeuchte)

5.2.3.6 Wirkstoffgehalt der Präzipitate

Im Folgenden wird betrachtet, welchen Einfluss das Herstellungsverfahren auf den Wirkstoffgehalt der Präzipitate hat. Dazu wurden Gehaltsbestimmungen durchgeführt, die den Wirkstoffanteil quantifizieren und für Salmeterolxinafoat und Fluticasonpropionat getrennt analysieren (siehe Kapitel 3.6). Der Anteil an Hilfsstoff wurde entsprechend berechnet, wobei davon ausgegangen wurde, dass sich keine zusätzlichen Bestandteile im Produkt befinden und sich das Verhältnis der Hilfsstoffe nicht ändert. Grundsätzlich ist der Gehalt der

Präzipitate durch die eingesetzten Mengen an Wirkstoffen und Additiven sowie das Verhältnis von Lösemittel und Nichtlösemittel bestimmt. In Tabelle 5.8 sind die häufigsten verwendeten Kombinationen mit ihren theoretischen Gehalten dargestellt.

Tabelle 5.8: Präzipitationskombinationen und ihre theoretischen Gehalte im Produkt

in Lösung					im Produkt		
WS-Verhältnis	% WS im LM	LM + n-LM	% HPMC im n-LM	% Polysorbat im n-LM	% SX	% FP	% HS
1,45/2	1	1 + 10	0,01	0,01	35,0	48,3	16,7
1,45/2	1	1 + 10	0,05	0,01	26,3	36,2	37,5
1,45/2	0,5	1 + 10	0,01	0,01	30,0	41,4	28,6
1,45/2	0,5	1 + 10	0,05	0,01	19,1	26,4	54,5
1,45/2	0,3	1 + 10	0,01	0,01	25,2	34,8	40,0
1,9/2	0,5	1 + 10	0,01	0,01	34,8	36,6	28,6
1,9/2	0,5	1 + 10	0,05	0,01	22,1	23,3	54,5
2/2	0,5	1 + 10	0,05	0,01	22,7	22,7	54,5

WS = Wirkstoff, HS = Hilfsstoff, LM = Lösemittel, n-LM = Nichtlösemittel, SX = Salmeterolxinafoat, FP = Fluticasonpropionat

Betrachtet man die tatsächlichen Gehalte der Wirkstoffpräzipitate, so weichen diese zum Teil deutlich von den berechneten Gehalten ab. Insgesamt ist der Hilfsstoffgehalt in allen Präzipitaten zugunsten des Wirkstoffanteils vermindert (siehe Abbildung 5.44). Auffällig ist, dass in allen Präzipitaten der Salmeterolgehalt nach unten von Sollwert abweicht, was beim Vergleich von berechnetem Wirkstoffverhältnis (Anteil SX / Anteil FP) mit dem tatsächlichen Wirkstoffverhältnis erkennbar wird (siehe Abbildung 5.45). Daher stellt sich die Frage, ob dieser Mindergehalt an Salmeterolxinafoat durch eine Zersetzung des Wirkstoffs zustande kommt, oder durch einen Verlust im Prozess zu

erklären ist. Darüber hinaus ist zu klären, warum die hergestellten Pulver einen Hilfsstoffanteil aufweisen, der niedriger als der berechnete Anteil liegt.

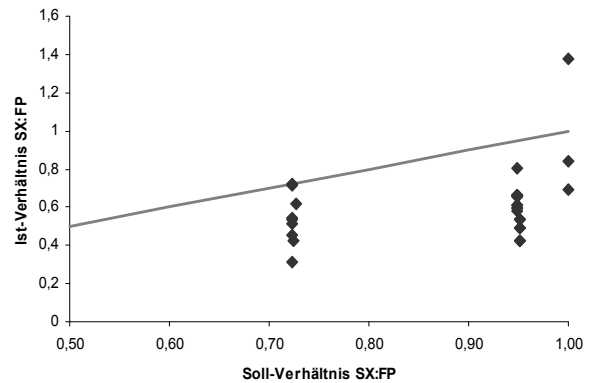
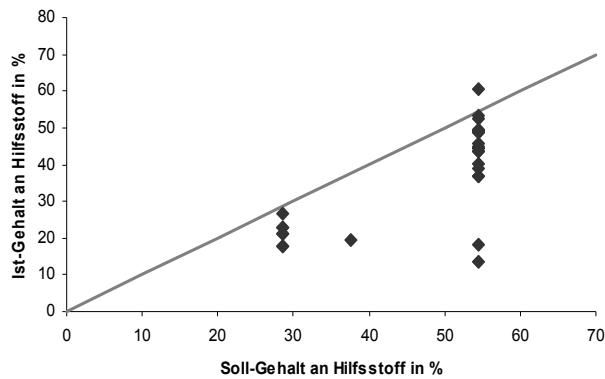


Abbildung 5.44: Vergleich von Soll- und Ist-Hilfsstoffgehalt in mit Additiv hergestellten Präzipitaten (n=29)

Abbildung 5.45: Vergleich des Soll- und Ist-Verhältnisses SX/FP in mit Additiv hergestellten Präzipitaten (n=29)

die graue Linie zeigt den Sollwert an

Hierzu wurde der Präzipitationsprozess genauer betrachtet. Beide Additive zeigen ein oberflächenaktives Verhalten, was dazu führt, dass sich die Additive an allen Grenzflächen anreichern. Durch Adhäsion an den Oberflächen der verwendeten Gefäße kann es somit zu einem Verlust von Hilfsstoff kommen, so dass nicht die vollständige Hilfsstoffmenge im Produkt anfällt. Außerdem befindet sich nach der Präzipitation noch gelöster Hilfsstoff in der Dispersion. Dieser wird erst bei der Sprühtrocknung partikulär anfallen und kann damit andere aerodynamische Eigenschaften aufweisen. Dadurch werden die Hilfsstoffpartikel im Zyklon des Sprühtrockners nicht in gleicher Weise wie die Wirkstoffpartikel abgeschieden und können beispielsweise aufgrund ihrer geringeren Masse vorrangig im Filter aufgefangen werden. Sprüht man eine reine Hilfsstofflösung mit den gleichen Parametern, wie sie auch für die präzipitierten Dispersionen verwendet

werden, so ist mit zunehmender Prozessdauer eine deutliche Weißfärbung des Auslassfilters zu beobachten, die Hilfsstoffpartikel werden also nicht vollständig im Zyklon abgeschieden. So lässt sich der Mindergehalt an Hilfsstoff in den Produkten erklären. Ähnlich verhält es sich auch für den Mindergehalt an Salmeterolxinafoat. Wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben, hat Salmeterolxinafoat eine höhere Wasserlöslichkeit und kann damit in der Dispersion nach Präzipitation noch teilweise gelöst vorliegen. Damit kann auch SX separat vom Präzipitat Partikel formen, die unter Umständen andere aerodynamische Eigenschaften aufweisen. Eine halbquantitative Untersuchung der Zusammensetzung der Filterrückstände ergab eine deutliche Anreicherung von SX im Vergleich zu FP. Dies unterstreicht die Hypothese, dass beim Sprühtrocknungsprozess SX-Partikel anfallen, die nicht zusammen mit dem Produkt aufgefangen werden. Darüber hinaus ist auch an den Wänden des Sprühturms Salmeterolxinafoat zu finden, jedoch kaum Fluticasonpropionat. Vergleicht man die Abweichungen der Hilfsstoffkonzentration vom Sollwert und die der SX-Konzentration für unterschiedliche Präzipitate, so lässt sich erkennen, dass ein Mindergehalt an Salmeterolxinafoat einhergeht mit einem Mindergehalt an Hilfsstoff (siehe Abbildung 5.46). Das bedeutet, dass ein höherer Hilfsstoff-Verlust durch Anfallen von Hilfsstoffpartikeln im Filter einhergeht mit einem erhöhten Auftreten von Salmeterolxinafoat-Partikeln im Filter. Diese Tatsache verdeutlicht, dass der Sprühtrocknungsprozess und das Abscheidevermögen des Zyklons für separat anfallende Partikel den Gehalt der Partikel beeinflussen.

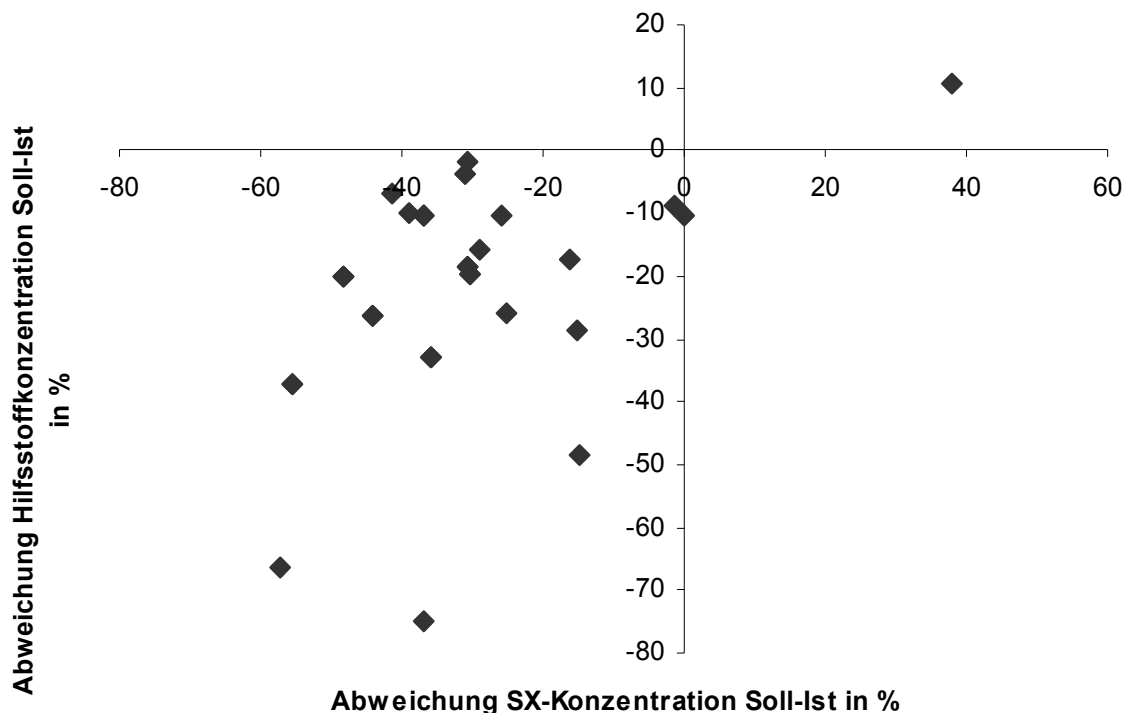


Abbildung 5.46: Abhängigkeit des Mindergehalts an Hilfsstoff vom Mindergehalt an Salmeterolxinafoat (SX)

Um einer Verschiebung des gewünschten Wirkstoffverhältnisses im Produkt entgegenzuwirken, wurden zwei Ansätze verfolgt. Zum einen wurde bei der Herstellung der Wirkstofflösung ein Verlustzuschlag für SX zugesetzt, so dass das Verhältnis in Lösung zugunsten des SX verschoben war. Betrachtet man die prozentuale Verschiebung des Verhältnisses im Produkt, so ergibt sich, dass eine Erhöhung des Salmeterolxinafoat-Anteils von 1,45 auf 1,8 Teile SX (plus 2 Teile FP) bis 2 Teile SX (plus 2 Teile FP) im Ansatz zu dem gewünschten Verhältnis von 1,45 Teilen plus 2 Teilen im Produkt führen müsste. Entsprechend wurden Präzipitationen mit erhöhtem SX-Anteil durchgeführt, wie in Tabelle 5.9 dargestellt. Das Resultat zeigt, dass die Angleichung der Wirkstoffanteile (2 + 2) einen zu hohen SX-Anteil im Produkt ergibt, wogegen ein Verhältnis von 1,9 Teilen SX und 2 Teilen FP zu einem verbesserten Verhältnis der Wirkstoffe im Produkt führt.

Tabelle 5.9: Auswirkungen eines erhöhten SX-Anteils auf den Gehalt und das Verhältnis im Produkt

Wirkstoff-Verhältnis SX + FP	Wirkstoffgehalt im Produkt	Wirkstoffverhältnis SX/FP (soll 0,725)
1,8 + 2	70,1%	0,552 (0,187)
1,9 + 2	55,2%	0,684 (0,060)
2 + 2	47,4%	0,970 (0,364)

n = 3, Werte in Klammern geben Standardabweichung an

Zum anderen wurden Präzipitationen mit Salmeterolxinafoat-gesättigtem Wasser durchgeführt. Durch eine Vorsättigung des Fällungsmediums müsste ein vollständiges Präzipitieren der im organischen Lösemittel gelösten Wirkstoffe zu erzwingen sein, so dass nur das überschüssige, bereits in der wässrigen Lösung befindliche SX tatsächlich noch gelöst vorliegt, im Sprühtrocknungsprozess separat anfallen kann und gegebenenfalls im Filter aufgefangen wird. Dabei wurde ein Verhältnis von 1,45 Teilen SX plus 2 Teilen FP ebenso getestet wie ein erhöhter SX-Anteil von 1,9 Teilen SX plus 2 Teilen FP. Dabei führte die alleinige Sättigung des Fällungsmediums mit SX mit einer Ratio von 0,633 (SX/FP) im Produkt nicht zu einer Normalisierung des Verhältnisses, wogegen die gesättigte Präzipitation bei Verwendung des erhöhten SX-Anteils von 1,9 Teilen zu einer Ratio von 0,802 und somit bereits zu einem etwas zu hohen SX-Anteil im Produkt führte.

Insgesamt stellt die Einstellung des korrekten Wirkstoffgehalts im Produkt eine kritische Zielgröße dar, die von vielen Verfahrensparametern beeinflusst wird und daher schwierig einzustellen ist. Werden konstante Präzipitationsparameter (Gesamtfluss, Flussratenverhältnis, Temperatur) sowie konstante Wirkstoff- und Hilfsstoffkonzentrationen eingehalten und wird die Dispersion bei konstanten

Bedingungen getrocknet, so lässt sich ein reproduzierbarer Wirkstoffgehalt im Produkt erzeugen.

5.2.3.7 Optimierung der aerodynamischen Eigenschaften

Ein Pulver zur Inhalation soll über herausragende aerodynamische Eigenschaften verfügen, die eine reproduzierbar hohe Feinpartikelfraktion gewährleisten. Dabei spielt neben der Formulierung des Pulvers auch die Inhalationshilfe eine wichtige Rolle, denn der Inhalator trägt in entscheidender Weise zur Beschleunigung und Verwirbelung des Einatemstroms und damit zur Dispergierung des Pulvers bei. Nur ein Pulver, das über ausreichend feine Primärpartikel verfügt und das in hinreichender Weise dispergiert werden kann, ist in der Lage, Wirkstoffe adäquat in der Lunge zu deponieren. Für den Ansatz, kombinierte Pulver herzustellen, die beide Wirkstoffe (SX und FP) in einem einzelnen Partikel vereinen, ist neben der Feinpartikelfraktion auch die Gleichmäßigkeit der Deposition beider Wirkstoffe von großer Bedeutung. Nur wenn die Wirkstoffe bei der aerodynamischen Untersuchung auch im gewünschten Verhältnis auf allen Stufen des NGI abgeschieden werden, kann sichergestellt werden, dass sie gemeinsam formuliert wurden und daher auch in vivo an denselben Wirkort gelangen werden.

Gleichmäßigkeit

Die Gleichmäßigkeit der Deposition lässt sich bei einer wirkstoffindividuellen Betrachtung der Deposition auf den Stufen des NGI beurteilen. Betrachtet man exemplarisch von zwei Formulierungen P3 und P15 die Feinpartikelfraktion und die Gesamtwirkstoffablagerung auf den Stufen des NGI (siehe Abbildung 5.47 und Abbildung 5.48), so scheinen beide über gute aerodynamische Eigenschaften zu verfügen. Wenn jedoch die Wirkstoffdeposition für Salmeterolxinafoat und

Fluticasonpropionat getrennt voneinander dargestellt wird, ist zu erkennen, dass die Wirkstoffe im Fall von P3 sehr ungleichmäßig abgeschieden werden, wogegen die Gleichmäßigkeit bei P15 deutlich höher ist (siehe Abbildung 5.49 und Abbildung 5.50).

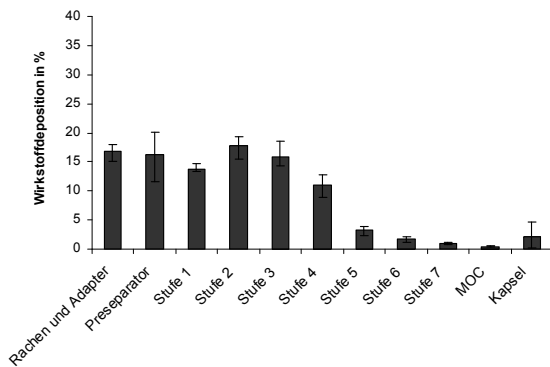


Abbildung 5.47: Depositionsmuster von P3, FPF 39,8%

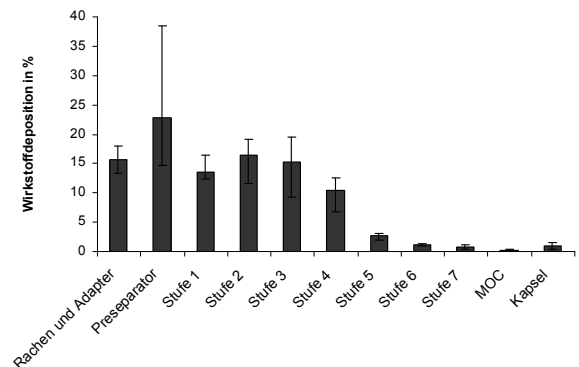


Abbildung 5.48: Depositionsmuster von P15, FPF 37,0%

Fehlerbalken geben Maximal- bzw. Minimalwert an (n=4)

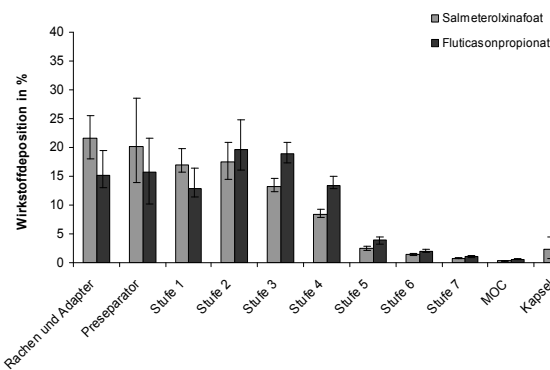


Abbildung 5.49: Depositionsmuster von P3 nach Wirkstoffen aufgeschlüsselt hellgrau = SX, dunkelgrau = FP, Fehlerbalken geben Maximal- bzw. Minimalwert an (n=4)

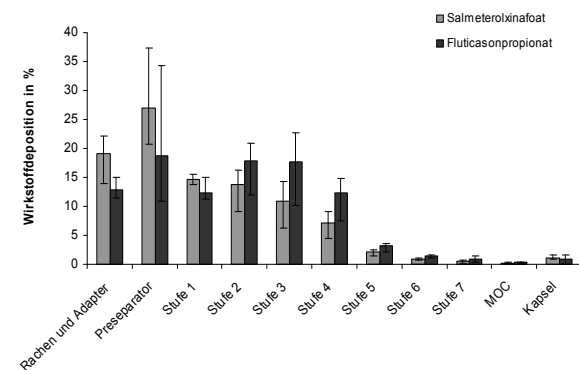


Abbildung 5.50: Depositionsmuster von P15 nach Wirkstoffen aufgeschlüsselt hellgrau = SX, dunkelgrau = FP, Fehlerbalken geben Maximal- bzw. Minimalwert an (n=4)

Um einen Zahlenwert zur Beurteilung der Gleichmäßigkeit der Deposition zu erhalten, wurden die prozentualen Werte der Ablagerung der beiden Wirkstoffe für jeden Depositionsort einzeln mithilfe eines t-Tests auf Unterschiede geprüft. Liegen Unterschiede vor, so ist die

Homogenität der Deposition nicht gegeben, wohingegen das Fehlen von Unterschieden eine gleichmäßige Deposition anzeigt (siehe Kapitel 3.1.2.3). Die Signifikanz eines Unterschieds kann dann evaluiert werden und entsprechend Kapitel 3.7 mit einer Anzahl von Sternen (0 bis 3) belegt werden. Die Summe der Sterne wurde dann als Maß für die Gleichmäßigkeit der Deposition gewertet, wobei das völlige Fehlen von Sternen eine gleichmäßige Verteilung über alle Abscheidestufen bedeutet. Je mehr Sterne vergeben werden, desto auffälliger sind die Unterschiede. Bei den hier vorgestellten Formulierungen erhält die Formulierung P3 15 Sterne, was eine hohe Ungleichmäßigkeit in der Deposition indiziert, wohingegen der Formulierung P15 lediglich 4 Sterne zugeordnet wurden (siehe Tabelle 5.10).

Tabelle 5.10: p-Werte der Signifikanz des Unterschieds in der Deposition von SX und FP auf den einzelnen Stufen und Belegung mit Sternen

Abscheidestufe	Formulierung P3		Formulierung P15	
	p-Wert	Sterne	p-Wert	Sterne
Rachen und Adapter Preseparator	0,024	*	0,019	*
Stufe 1	0,295		0,244	
Stufe 2	0,040	*	0,056	
Stufe 3	0,422		0,178	
Stufe 4	0,001	**	0,077	
Stufe 5	0,000	***	0,036	*
Stufe 6	0,009	**	0,043	*
Stufe 7	0,008	**	0,030	*
MOC	0,003	**	0,199	
Kapsel	0,008	**	0,296	
	0,849		0,640	

Insgesamt wurden 16 Formulierungen dieser Beurteilung unterzogen. Betrachtet man nach diesem Auswertungsschema die Faktoren, die eine homogene Deposition der beiden Wirkstoffe beeinflussen, so ist

festzustellen, dass die Kombination einer erniedrigten Präzipitations-temperatur von 4°C und einer kurzen Standzeit der Dispersion

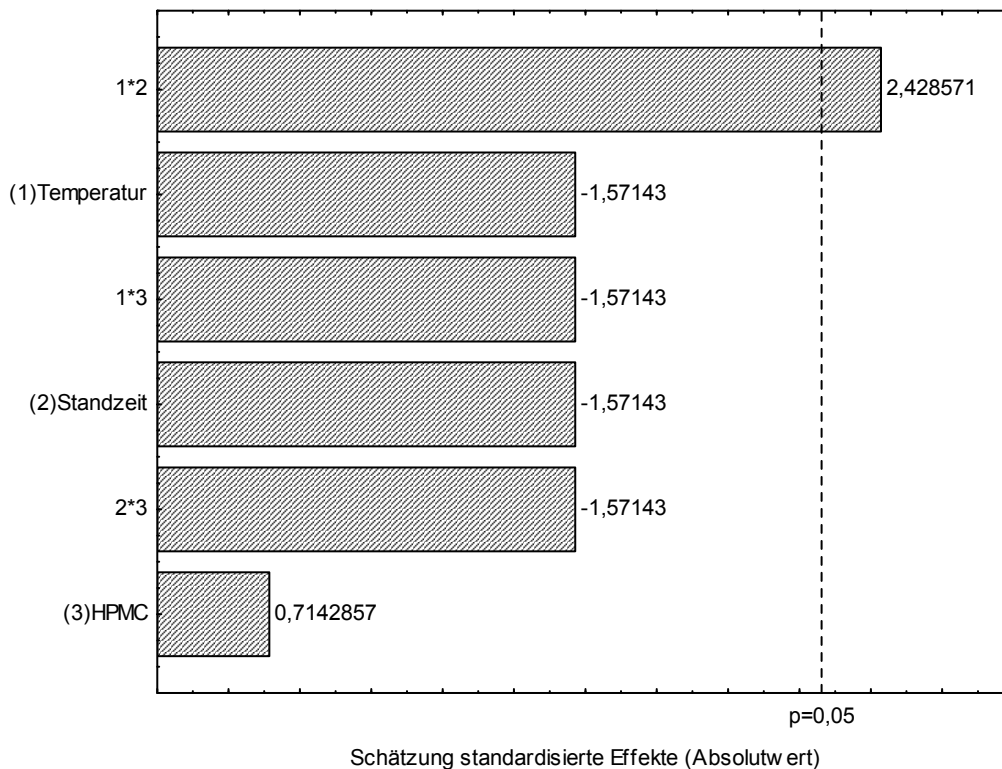


Abbildung 5.51: Paretodiagramm zur Abschätzung signifikanter Einflussfaktoren auf die Gleichmäßigkeit der Deposition, niedrige Zahl bedeutet Gleichmäßigkeit

zu einer signifikanten Verschlechterung der Gleichmäßigkeit der Deposition des trockenen Pulvers führen (siehe Abbildung 5.51). Dabei wurden im Versuchsplan neben der Konzentration an HPMC (0,01% oder 0,05% im Fällungsmedium) auch die Standzeit der präzipitierten Dispersion vor der Sprühtrocknung (15 Minuten oder 24 Stunden) sowie die Temperatur der Fällung (22°C oder 4°C, gegebenenfalls mit anschließender Lagerung bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank) variiert. Unabhängig voneinander betrachtet lassen sich Tendenzen zu einer besseren Homogenität der Deposition bei Normaltemperatur beziehungsweise bei einer verlängerten Standzeit beobachten, wobei der Effekt nicht signifikant ist. Es ist anzunehmen, dass der Unterschied in der Löslichkeit zwischen den beiden verwendeten Wirkstoffen SX und

FP bei erniedrigter Temperatur noch ausgeprägter ist, so dass bereits die Fällung zu inhomogeneren Partikeln führt. Bei niedriger Temperatur wird das ohnehin schlechter lösliche FP vollständig ausfallen, so dass mehr SX in Lösung bleibt und in der nachfolgenden Sprühtrocknung separat anfallen kann. Dadurch wird eine inhomogene Deposition gefördert. Eine Verlängerung der Standzeit der Dispersion gibt dem System Zeit, sich in einem dynamischen Gleichgewicht von gelösten und präzipitierten Wirkstoffanteilen einzupendeln. Dabei kann es sein, dass durch die schnelle Präzipitation zuerst ein untersättigtes System entsteht, da mehr Wirkstoff ausgefallen ist. Über die Standzeit kann sich ein Teil des Wirkstoffes wieder auflösen und es können zudem noch Kristallisationsvorgänge stattfinden. Dies resultiert offensichtlich in einem Produkt, dessen Wirkstoffzusammensetzung in den Einzelpartikeln homogener ist, so dass auch die Wirkstoffdeposition gleichmäßiger erfolgt.

HPMC-Gehalt

Es wurde der Einfluss des Anteils an HPMC im Produkt auf die resultierende Feinpartikelfraktion untersucht. Bei einer Erhöhung des HPMC-Anteils wurde zunehmend das Auftreten sphärischer Partikel im Präzipitat beobachtet (siehe Abbildung 5.52), die offensichtlich aus sprühgetrockneter HPMC bestehen (siehe Kapitel 5.2.2.3) und das visuelle Fließverhalten wie auch das aerodynamische Verhalten der Präzipitate positiv beeinflussen. Eine Auswertung der signifikanten Einflussfaktoren auf die Feinpartikelfraktion ergibt einen deutlichen Effekt der HPMC-Konzentration dahingehend, dass mit erhöhter HPMC-Konzentration auch die Feinpartikelfraktion ansteigt (siehe Abbildung 5.53).

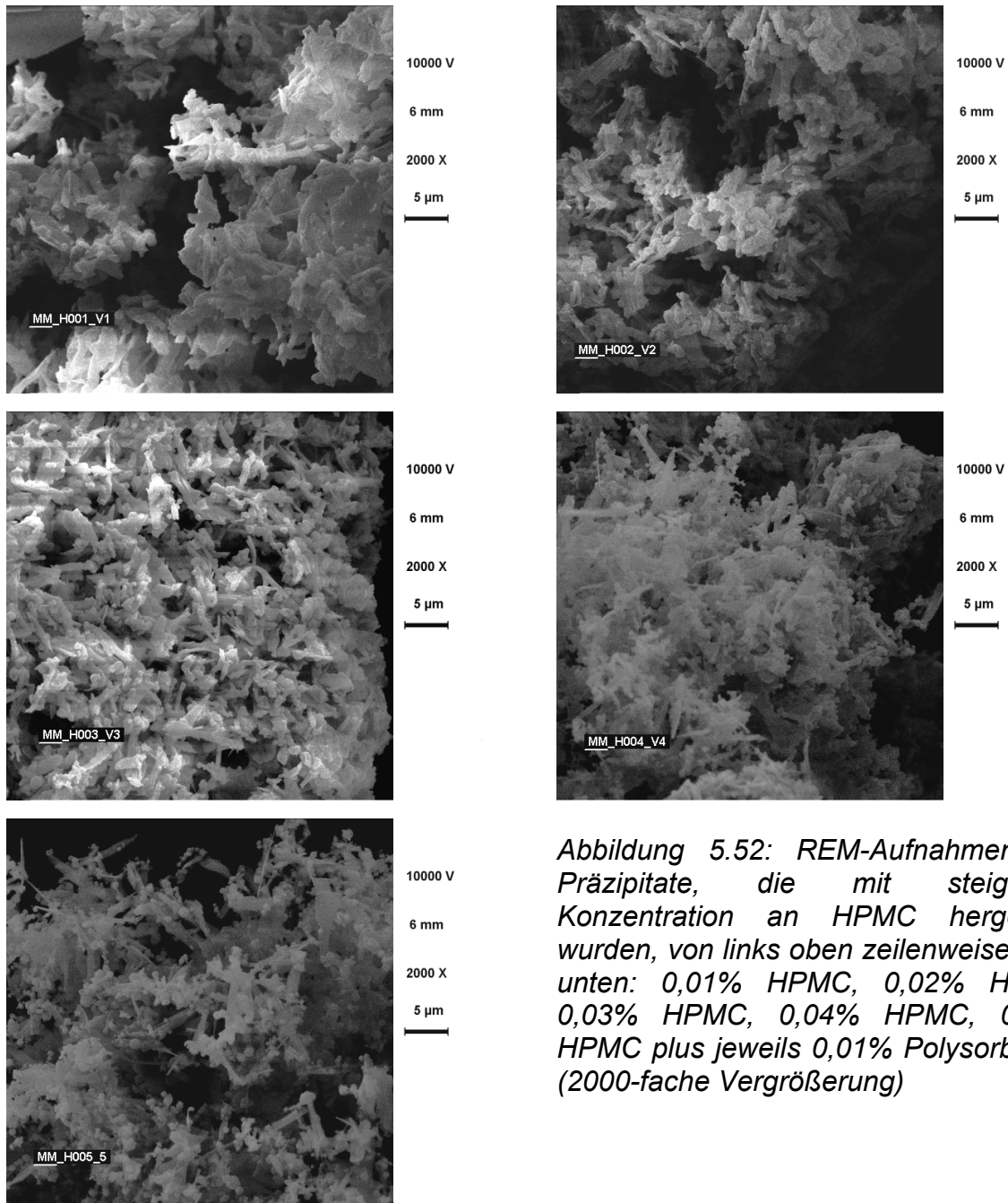


Abbildung 5.52: REM-Aufnahmen der Präzipitate, die mit steigender Konzentration an HPMC hergestellt wurden, von links oben zeilenweise nach unten: 0,01% HPMC, 0,02% HPMC, 0,03% HPMC, 0,04% HPMC, 0,05% HPMC plus jeweils 0,01% Polysorbat 80 (2000-fache Vergrößerung)

Vergleicht man eine Reihe von Formulierungen, so ist unabhängig von weiteren Änderungen im Herstellungsverfahren eine hoch signifikante ($p < 0,001$) Erhöhung der Feinpartikelfraktion der Pulver bei Erhöhung der HPMC-Konzentration von 0,01% auf 0,05% im Fällungsmedium zu beobachten (siehe Abbildung 5.54). Bei detaillierter Betrachtung ist ein kontinuierlicher Anstieg der Feinpartikelfraktion bei steigenden HPMC-Anteilen zu erkennen (siehe Abbildung 5.55).

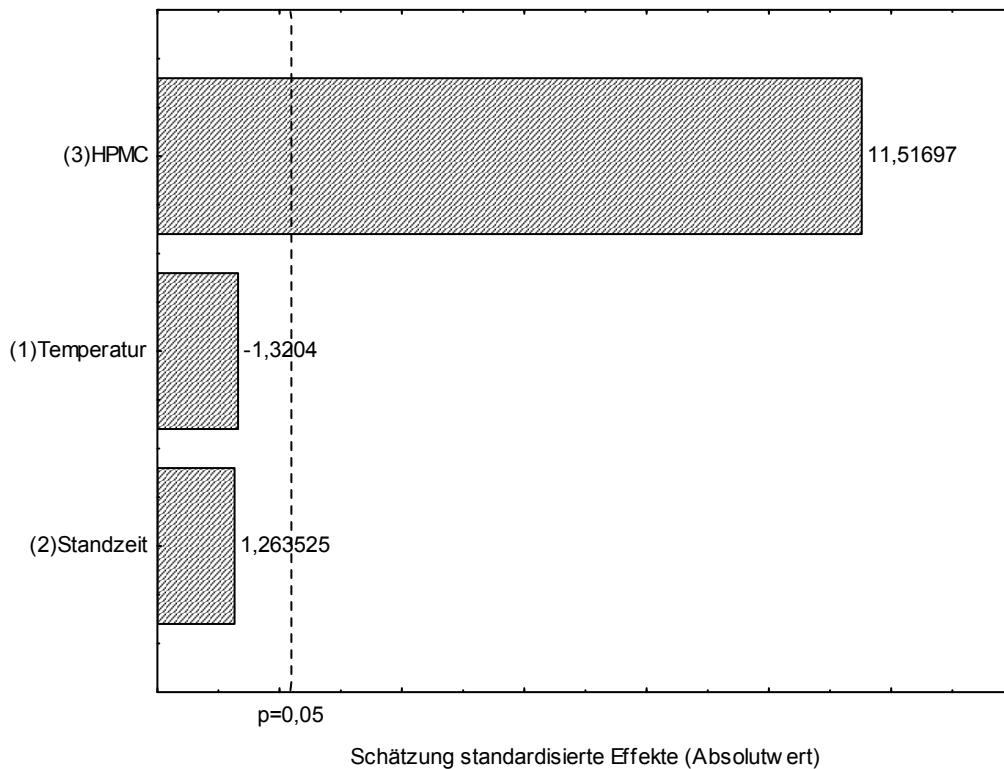


Abbildung 5.53: Paretodiagramm zur Abschätzung signifikanter Einflussfaktoren auf die Feinpartikelfraktion

Dabei ist in den niedrigeren Konzentrationsbereichen nur eine moderate Verbesserung der FPF zu beobachten, während ein deutlicher Sprung bei der Erhöhung der Konzentration von 0,03% auf 0,04% feststellbar ist. Es ist möglich, dass eine weitere Erhöhung der HPMC-Konzentration über 0,05% hinaus zu einer weiteren Verbesserung des aerodynamischen Verhaltens führt. Die Erhöhung der Konzentration an HPMC geht aber einher mit einem erhöhten Hilfsstoffanteil, der in die Lunge gelangt, so dass eine Erhöhung über 0,05% hinaus (resultierend in einem theoretischen Hilfsstoffgehalt im Produkt von mehr als 55%) für wenig sinnvoll erachtet wird.

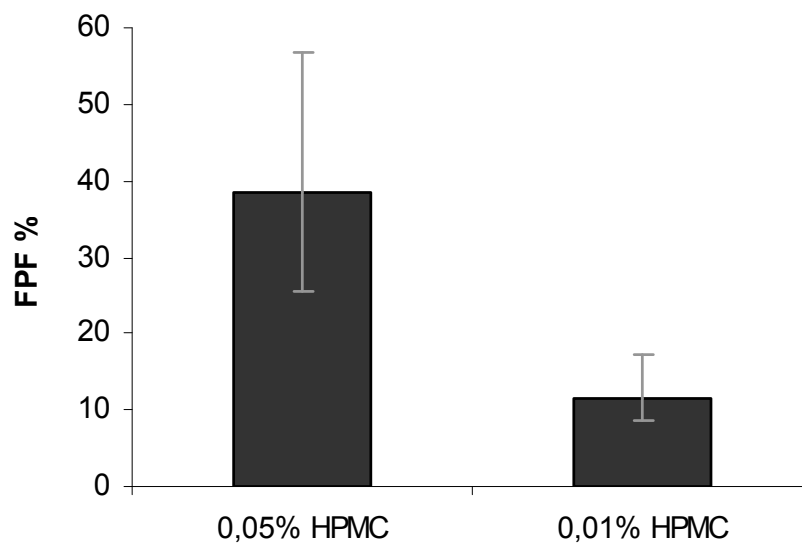


Abbildung 5.54: Mittelwert der Feinpartikelfractionen bei Fällung unter Zusatz von 0,05% HPMC im Vergleich zur Fällung unter Zusatz von 0,01% HPMC (plus jeweils 0,01% Polysorbat 80, Fehlerbalken geben Maximal- bzw. Minimalwert an, n=8)

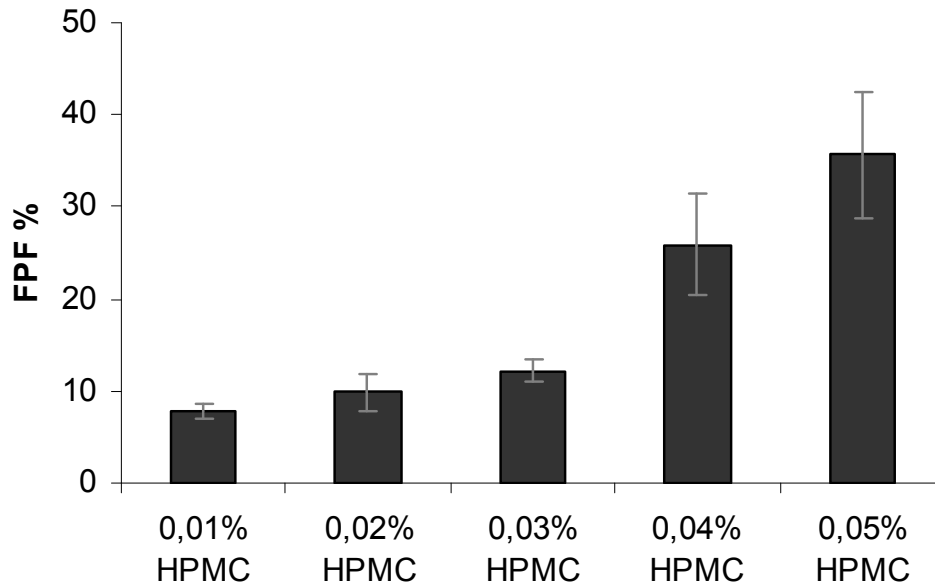


Abbildung 5.55: Anstieg der Feinpartikelfraction bei Zusatz steigender Konzentration HPMC im Fällungsmedium (plus jeweils 0,01% Polysorbat 80, Fehlerbalken geben Maximal- bzw. Minimalwert an, n=3)

Unterschiedliche Dispergierhilfen

Wie bereits erwähnt, hat die Dispergierhilfe einen wichtigen Einfluss auf die Dispergiertüte des Pulvers und damit auf die resultierende Feinpartikelfraktion. In dieser Arbeit wurde vorrangig mit dem Aerolizer gearbeitet, da diese Inhalationshilfe einen niedrigen Atemzugwiderstand hat und durch die Befüllung mit Kapseln vielfältig einsetzbar ist. Der Dispergiermechanismus des Aerolizers ist vergleichsweise einfach. Durch den Atemstrom wird die an beiden Enden angestochene Kapsel in Rotation versetzt und schleudert dadurch das Pulver aus der Kapsel, welches anschließend durch das gerade Mundstück zum Patienten geführt wird. Um zu untersuchen, in wiefern andere Inhalationshilfen mit anderen Dispergiermechanismen beziehungsweise anderen Atemzugwiderständen das aerodynamische Verhalten der copräzipitierten Pulver beeinflussen, wurden vergleichende Untersuchungen mit dem Aerolizer, dem Turbohaler und dem Flowcaps-Inhalator vorgenommen. Die Inhalatoren sind in Kapitel 3.1.2.2 beschrieben. Dabei sollte der Flowcaps Inhalator über ein mit dem Aerolizer vergleichbares Dispergiervermögen bei niedrigerer Flussrate verfügen, wenn auch die Kapsel selbst im Inhalator nicht bewegt wird. Der Turbohaler verfügt über ein sehr effizientes Dispergiersystem, das dem Aerolizer vermutlich überlegen ist. Da die drei getesteten Inhalatoren unterschiedliche Flussraten haben, bei denen sie einen Druckabfall von 4 kPa zeigen und bei dem sie dementsprechend getestet werden müssen, wurden alle Inhalatoren bei den drei unterschiedlichen Flussraten untersucht (siehe Tabelle 5.11).

Tabelle 5.11: untersuchte Flussraten und zugehörige Inhalatoren

Inhalator	Flussrate für 4 kPa Druckdifferenz
Aerolizer	100 l/min (90 l/min)*
Turbohaler	60 l/min
Flowcaps	32 l/min

*der Aerolizer wurde mit der maximal möglichen Flussrate von 90 l/min untersucht

Für alle Untersuchungen wurde dieselbe Charge eines aus Methanol unter Zusatz von 0,01% Polysorbat 80 und 0,05% HPMC im Nichtlösemittel präzipitierten Wirkstoffpulvers verwendet. Die mittlere Partikelgröße betrug 4,9 µm (Laserdiffraktometrie).

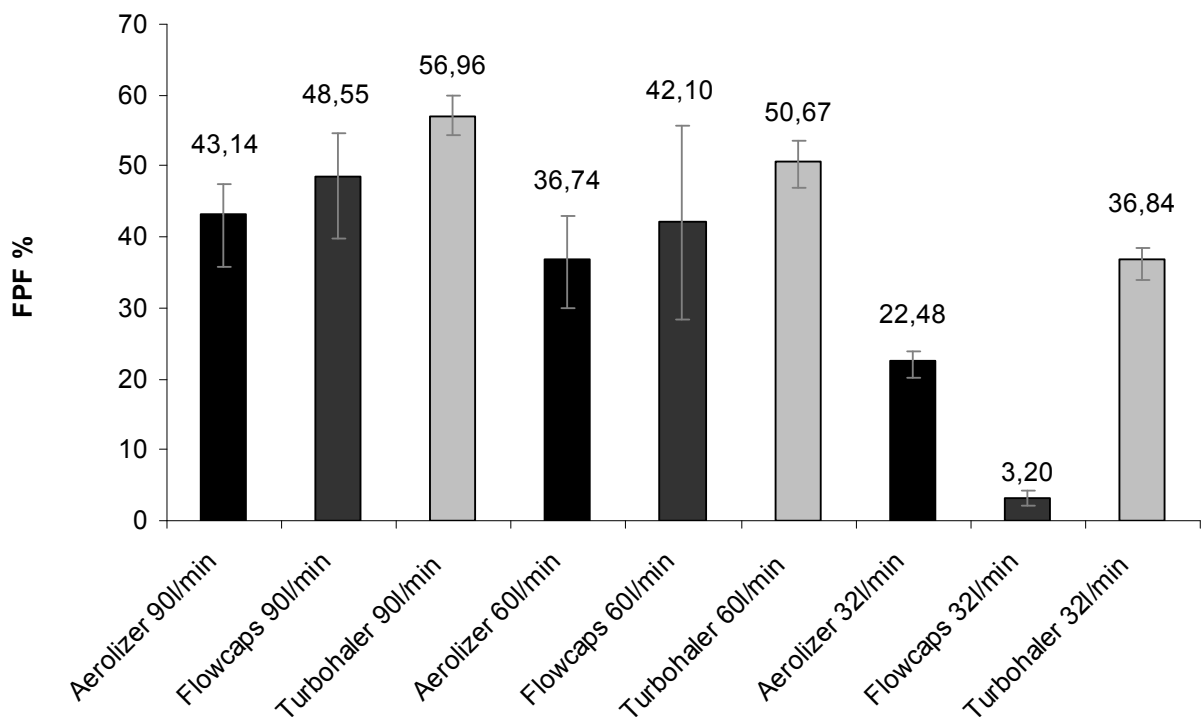


Abbildung 5.56: Feinpartikelfractionen eines Copräzipitats bei Verwendung unterschiedlicher Inhalatoren und bei unterschiedlichen Flussraten, Fehlerbalken geben Maximal- bzw. Minimalwert an, n=3

Die Ergebnisse der aerodynamischen Untersuchung sind in Abbildung 5.56 dargestellt. Es ist erkennbar, dass der Turbohaler bei gleicher

Flussrate tatsächlich ein besseres Dispergiervermögen hat und eine entsprechend höhere Feinpartikelfraktion erzeugen kann. Der Turbohaler hat jedoch im Gebrauch den großen Nachteil, dass sowohl das Pulverreservoir als auch alle anderen Teile des Inhalators aus Kunststoff gefertigt sind und sich beim Drehen des Dosierrads elektrostatisch aufladen. Dadurch adhäriert das Pulver an allen Oberflächen und ist kaum noch in der Lage, in die Löcher des Dosierrads einzufließen; der Turbohaler muss sehr oft ausgelöst werden, um eine den Kapselfüllungen entsprechende Pulvermenge abzugeben. Bei hohen Flussraten zeigte auch der Flowcaps-Inhalator eine bessere FPF als sie mithilfe des Aerolizers zu erzielen war, bei der für den Widerstand des Flowcaps Inhalators richtigen Flussrate von 32 l/min war die resultierende Feinpartikelfraktion mit 3,2% allerdings enttäuschend niedrig.

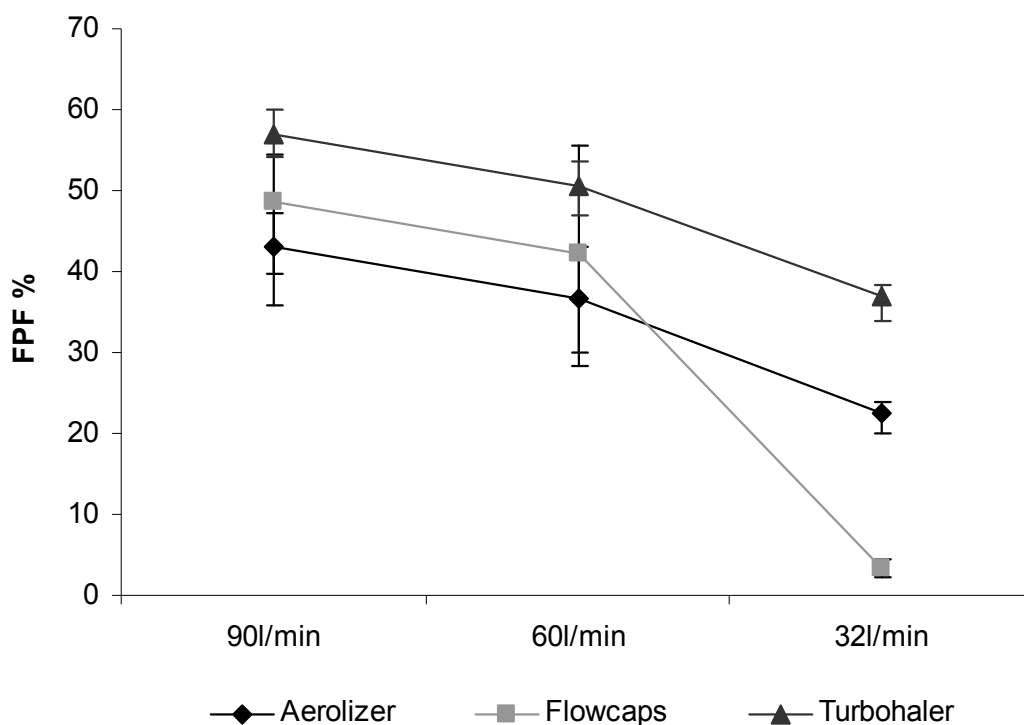


Abbildung 5.57: Flussratenabhängigkeit der Feinpartikelfraktion bei unterschiedlichen Inhalatoren, Fehlerbalken geben Maximal- bzw. Minimalwert an, $n=3$

Abbildung 5.57 zeigt die Flussratenabhängigkeit der Feinpartikelfraktion. Dabei nimmt die FPF mit geringerer Flussrate naturgemäß ebenfalls ab. In der Literatur ist beschrieben, dass der Turbohaler eine geringere Flussratenabhängigkeit zeigt als andere Inhalatoren wie beispielsweise der Diskus (Borgström et al., 2005b). In der hier betrachteten Untersuchung scheinen Aerolizer und Turbohaler eine ähnlich konstante Flussratenabhängigkeit über den gesamten untersuchten Flussratenbereich aufzuweisen, während der Flowcaps-Inhalator nur zwischen 90 l/min und 60 l/min eine ähnliche Abhängigkeit zeigt, welche bei niedrigeren Flussraten allerdings von der der anderen beiden Inhalatoren abweicht. Im Bereich zwischen 60 l/min und 32 l/min ist die mit dem Flowcaps Inhalator bestimmte FPF sehr stark beeinflusst von der gewählten Flussrate. Es ist gut zu erkennen, dass die Präzision der FPF-Bestimmung insgesamt bei niedrigeren Flussraten größer ist. Die beobachtete Abhängigkeit der bestimmten FPF copräzipitierter Wirkstoffpulver von der Flussrate und vom verwendeten Inhalator lässt sich nicht ohne Weiteres auf andere Formulierungen übertragen, da jede Formulierung eigene Charakteristika bezüglich ihrer Dispergierfähigkeit aufweist. Deshalb ist es wichtig, ein Inhalationspulver immer gemeinsam mit dem später zu verwendenden Inhalator zu entwickeln und zu testen. Ein weiterer Parameter, der bei Laboruntersuchungen die Feinpartikelfraktion beeinflussen kann, ist die Auswahl der Kapselfüllung und damit die Anzahl der pro Bestimmung verwendeten Kapseln. Eine stärker gefüllte Kapsel bietet im Kapselinneren wenig Möglichkeit für das Pulver, sein Volumen bei der Dispergierung zu vergrößern und damit eine Separation der Primärpartikel zu erreichen. Somit kann die Dispergierung des Pulvers reduziert und die Feinpartikelfraktion erniedrigt sein. Dies spricht für die Verwendung mehrerer wenig gefüllter Kapseln. Umgekehrt kann Pulver auch an der Kapselwandung

adhärieren und damit nicht mehr aus der Kapsel ausgetragen werden. Je mehr weniger stark befüllte Kapseln verwendet werden, desto größer ist die Gesamtwandfläche und desto größer kann auch die Menge adhärerten Pulvers sein, was die resultierende FPF ebenfalls negativ beeinflussen kann. Um diesen Einfluss im Fall der copräzipitierten Pulver zu untersuchen, wurden aerodynamische Bestimmungen durchgeführt, wobei eine Menge von zirka 10 mg Copräzipitat in einer Kapsel pro run mit der gleichen Menge, aufgeteilt auf fünf Kapseln, verglichen wurde. Das Ergebnis zeigt eine leicht erhöhte Feinpartikelfraktion bei Verwendung von fünf Kapseln im Vergleich zu der Verwendung einer einzigen Kapsel pro run, für eine statistische Signifikanz sind die Daten allerdings nicht aussagekräftig genug.

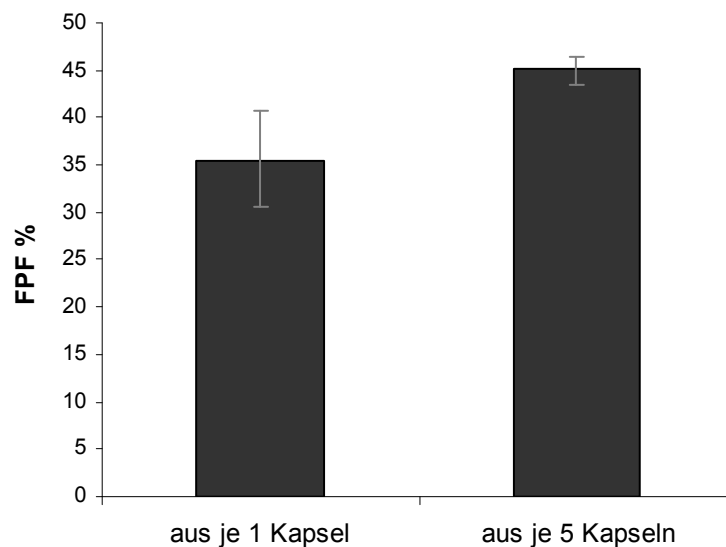


Abbildung 5.58: Einfluss der pro run verwendeten Kapselzahl auf die bestimmte Feinpartikelfraktion, Fehlerbalken geben Maximal- bzw. Minimalwert an, $n=3$

Daran kann gezeigt werden, wie durch gezielte Auswahl der analytischen Bedingungen die resultierende Aussage beeinflusst werden kann. Für die praktische Arbeit ist die Verwendung einer einzigen Kapsel deutlich besser geeignet. Im Hinblick auf die wirksame Einzeldosis

müsste die für die aerodynamische Untersuchung am NGI notwendige Menge von etwa 10 mg Pulver (entsprechend etwa 4,5 mg Wirkstoff) auf etwa 25 Kapseln aufgeteilt werden, um eine Einzeldosis pro Kapsel zu erhalten. In den vorgestellten Versuchen wurde eine Verfünffachung der Kapselzahl und damit der Oberfläche untersucht. Ob eine Verfünfundzwanzigfachung der Oberfläche den gleichen oder vielleicht einen gegenteiligen Effekt hätte, lässt sich davon nicht ableiten. Darüber hinaus stellt es eine große Herausforderung dar, manuell 0,4 mg Pulver pro Kapsel einzuwiegen, so dass hier maschinelle Verfahren zum Einsatz kommen müssten.

Zusammenfassung

Insgesamt führt die Erhöhung des Zusatzes an HPMC auf 0,05% im Präzipitationsmedium zu einer signifikanten Verbesserung der aerodynamischen Eigenschaften des Produkts. Um eine Codeposition der Wirkstoffe auf den Abscheidestufen des NGI zu erreichen, sollte die Präzipitation bei Raumtemperatur erfolgen. Für die aerodynamischen Untersuchungen ist eine Standardisierung der Dispergierbedingungen erforderlich, da nur so ein Vergleich der unterschiedlichen Formulierungen möglich ist. Zur Optimierung der Feinpartikelfraktion eines Pulvers zur Inhalation ist es notwendig, die Formulierung in Kombination mit dem zugehörigen Inhalator zu entwickeln, da der Inhalator einen wichtigen Beitrag zur Dispergierung des Pulvers leistet und damit die resultierende FPF entscheidend beeinflussen kann.

5.2.3.8 Freisetzungsuntersuchungen an den Präzipitaten

Ein Pulver zur Inhalation soll die enthaltenen Wirkstoffe in der Lunge verfügbar machen. Um eine Wirkung ausüben zu können, müssen die Wirkstoffe im epithelialen Wasserfilm beziehungsweise im Mucus gelöst werden. Dies muss mit ausreichender Geschwindigkeit erfolgen, da die Lunge über mehrere effektive Mechanismen verfügt, eingeatmete Fremdkörper sowie überschüssigen Schleim zu entfernen. Natürlich unterliegen auch inhalierte Arzneistoffpartikel der pulmonalen clearance, wobei diese vorrangig durch Makrophagen aufgenommen und verdaut werden (Möller et al., 2002). Darüber hinaus spielen auch Mechanismen wie der mucoziliäre Schleimtransport bei der pulmonalen clearance eine Rolle. Bei Asthmatikern differiert die Effizienz der clearance-Mechanismen stark je nach der aktuellen Krankheitslage. Darüber hinaus muss bedacht werden, dass die Partikelabscheidung in der Lunge bei einer akuten Bronchokonstriktion vorrangig in der zentralen Lunge erfolgt, wo die Reinigungsmechanismen sehr effizient sind, wohingegen bei einer Inhalation in die dilatierte Lunge Partikel bis in die Lungenperipherie vordringen können und dort in geringerem Maße entfernt werden. Bei einer unzureichenden Lösegeschwindigkeit können wirkstoffhaltige Partikel bereits aus der Lunge entfernt werden, bevor sie vollständig aufgelöst sind (Edsbäcker et al., 2007). Die Folge ist eine reduzierte Effektivität der Therapie. Um das Auflöseverhalten der copräzipitierten Pulver zu untersuchen, wurden vergleichende Freisetzungen durchgeführt. Dazu wurden etwa 6 mg der zu testenden Formulierung beziehungsweise eine entsprechende Menge der reinen Wirkstoffe in 500 ml Wasser bei 37°C gelöst. Die Freisetzungsuntersuchung wurde mit einer Distek Paddle-Apparatur (100 Umdrehungen/min) durchgeführt; das Pulver wurde auf die Oberfläche des Mediums aufgestreut. In regelmäßigen Abständen

wurden 2 ml Probe mithilfe des automatischen Probensammlers entnommen und der Wirkstoffgehalt per HPLC quantifiziert. Um eine noch quantifizierbare Menge der Wirkstoffe im Freisetzungsmedium zu erhalten, konnten sink-Konditionen nicht eingehalten werden. Dies trifft insbesondere für FP zu, so dass die maximal freigesetzten Mengen nicht als Absolutwerte betrachtet werden dürfen. Die Bestimmung des Modells zur Berechnung der initialen Lösungsgeschwindigkeit erfolgte durch eine linearisierte Anpassung der experimentell ermittelten Lösungsdaten an unterschiedliche Auflösemodelle und Ermittlung der Güte anhand des Bestimmtheitsmaßes. Dabei wurden für die initiale Lösungsgeschwindigkeit die Daten im Bereich von 0 bis 10 Minuten herangezogen.

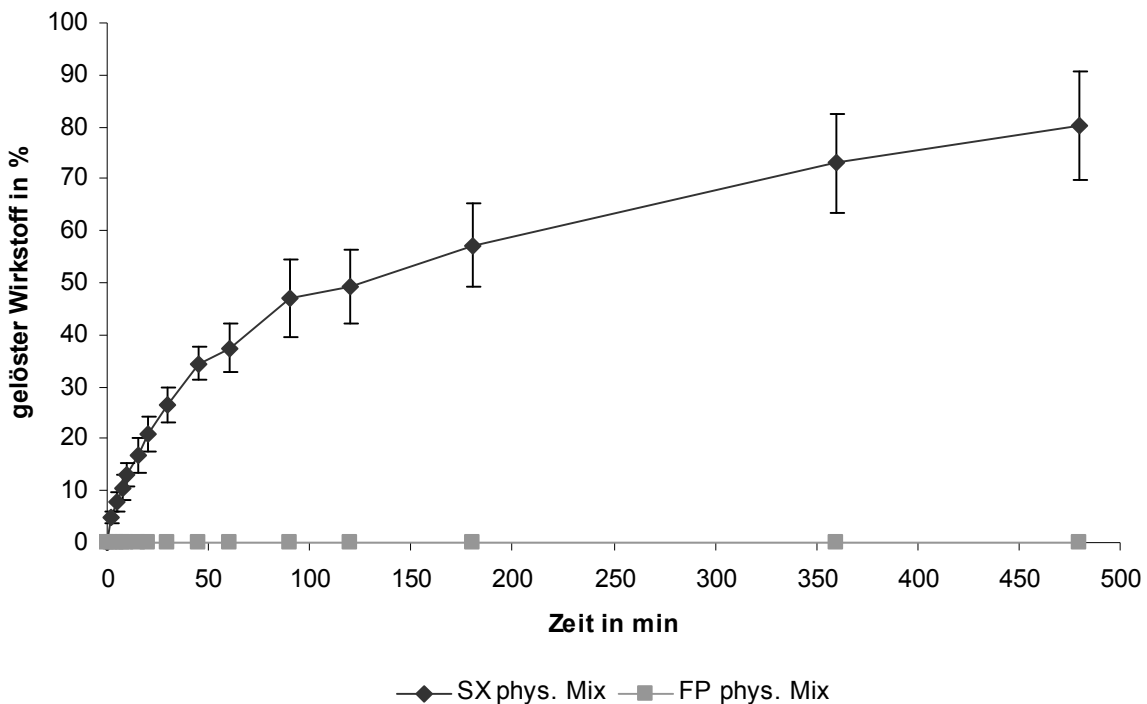


Abbildung 5.59: Auflöseverhalten der Ausgangware, Fehlerbalken geben die Standardabweichung an (n=4)

Wie in Abbildung 5.59 erkennbar, löste sich reines Fluticasonpropionat in dieser Untersuchung überhaupt nicht, wohingegen Salmeterolxinafoat eine Auflösung zeigte, die einer Kinetik 1. Ordnung folgt. Betrachtet man die Zeitachse, so ist erkennbar, dass die Auflösung sehr langsam erfolgt. Dies kann in vivo ein Problem darstellen, da die nicht gelösten partikulär vorliegenden Wirkstoffanteile aus der Lunge entfernt werden können und somit nicht mehr am Wirkort bereitstehen. Die hier beobachtete langsame Auflösung von SX ist vermutlich auch der Grund für das verzögerte Einsetzen der Wirkung (siehe Kapitel 2.2). Zum Vergleich wurden verschiedene Formulierungen der Einzelwirkstoffe sowie der Wirkstoffkombination mit und ohne Zusatz von Additiven untersucht. Es ist zu beobachten, dass bereits das gemeinsame Präzipitieren der Wirkstoffe schon zu einer verbesserten Lösungsgeschwindigkeit führt (siehe Abbildung 5.60 und Abbildung 5.61).

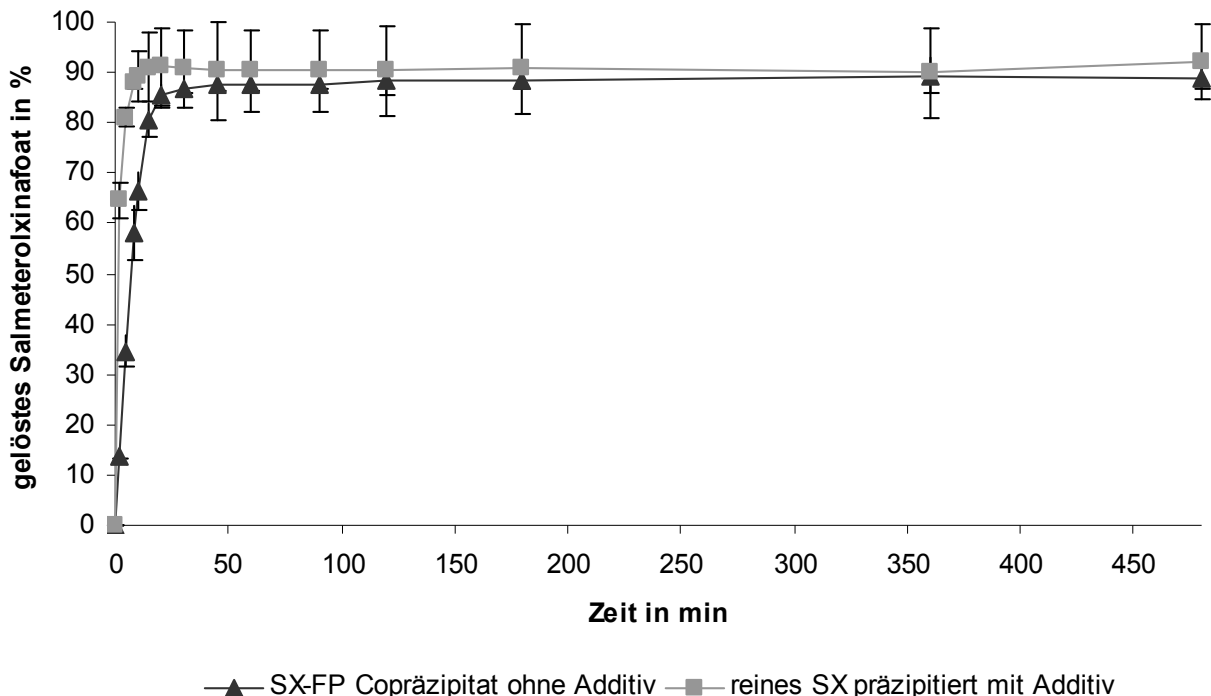


Abbildung 5.60: Auflöseverhalten von SX nach Copräzipitation mit FP und nach einzelner Präzipitation mit Additiv, Fehlerbalken geben die Standardabweichung an ($n=4$)

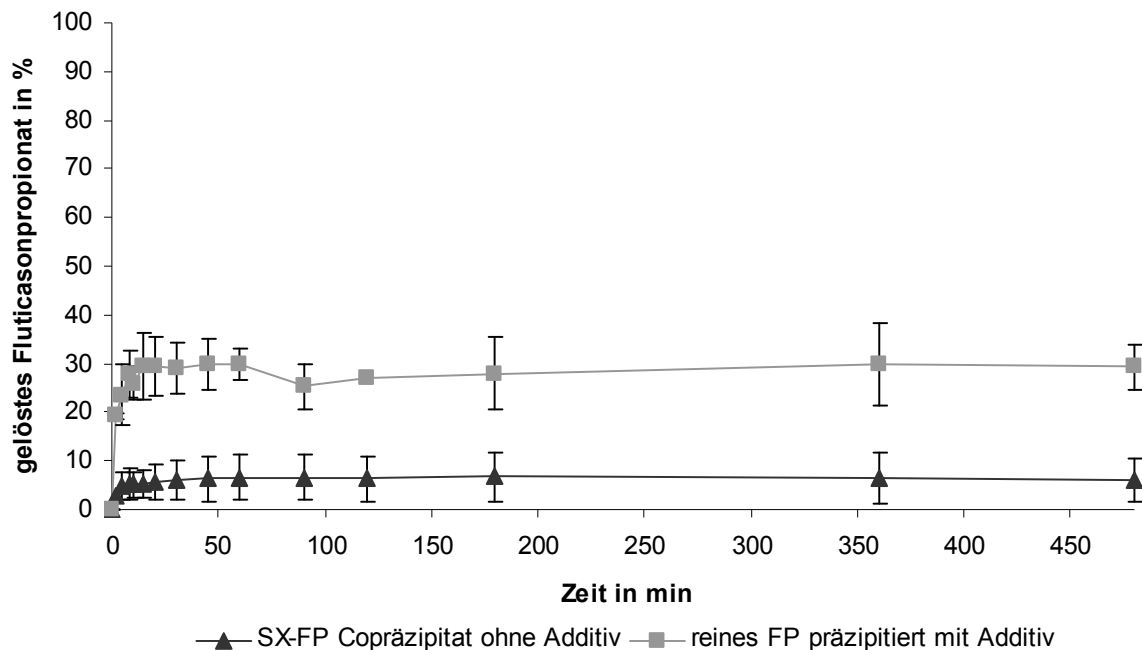


Abbildung 5.61: Auflösungsverhalten von FP nach Copräzipitation mit SX und nach einzelner Präzipitation mit Additiv, Fehlerbalken geben die Standardabweichung an ($n=4$)

Wenn beide Substanzen separat unter Hilfsstoffzusatz präzipitiert werden, kann die Lösungsgeschwindigkeit für FP deutlich verbessert werden, wohingegen SX nur einen geringen Effekt zeigt. Eine gemeinsame Präzipitation mit Additiven hat den stärksten Effekt auf die Lösungsgeschwindigkeit (siehe Abbildung 5.62 und Abbildung 5.63). Dabei ändert sich die Lösungskinetik für den initialen Teil der Kurve von einer Auflösung 1. Ordnung, die durch die Nernst-Brunner-Gleichung beschrieben werden kann, zu einer Auflösung, die zumeist dem Gesetz von Higuchi folgt (Quadratwurzelgesetz). Dies ist durch den Zusatz vom HPMC als Additiv erklärbar. HPMC bildet eine Matrix, die den Wirkstoff teilweise umschließt. Um den Wirkstoff zu lösen, muss dieser die Matrix passieren, dies hat ein etwas flacheres Anfluten des gelösten Arzneistoffs zur Folge. Zusätzlich erhöht der Additivzusatz von Polysorbat 80 und HPMC die Benetzbarkeit des Pulvers und

beschleunigt damit das Auflösen, wie bereits in der Literatur beschrieben (Rasenack et al., 2003).

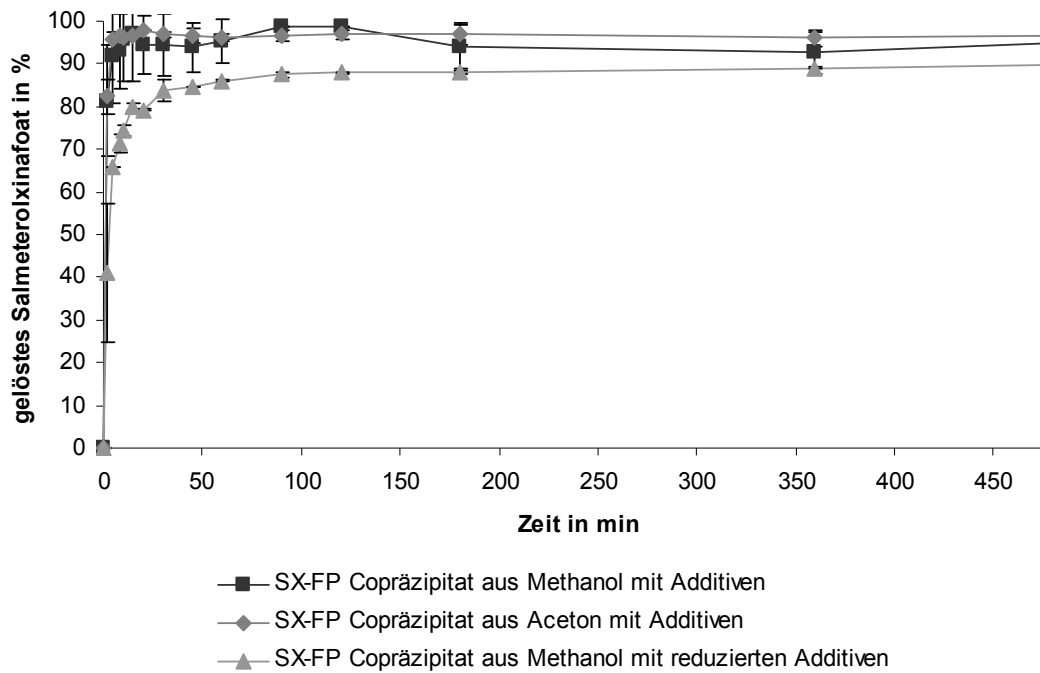


Abbildung 5.62: Auflöseverhalten von SX aus unterschiedlichen copräzipitierten Formulierungen, Fehlerbalken geben die Standardabweichung an (n=4)

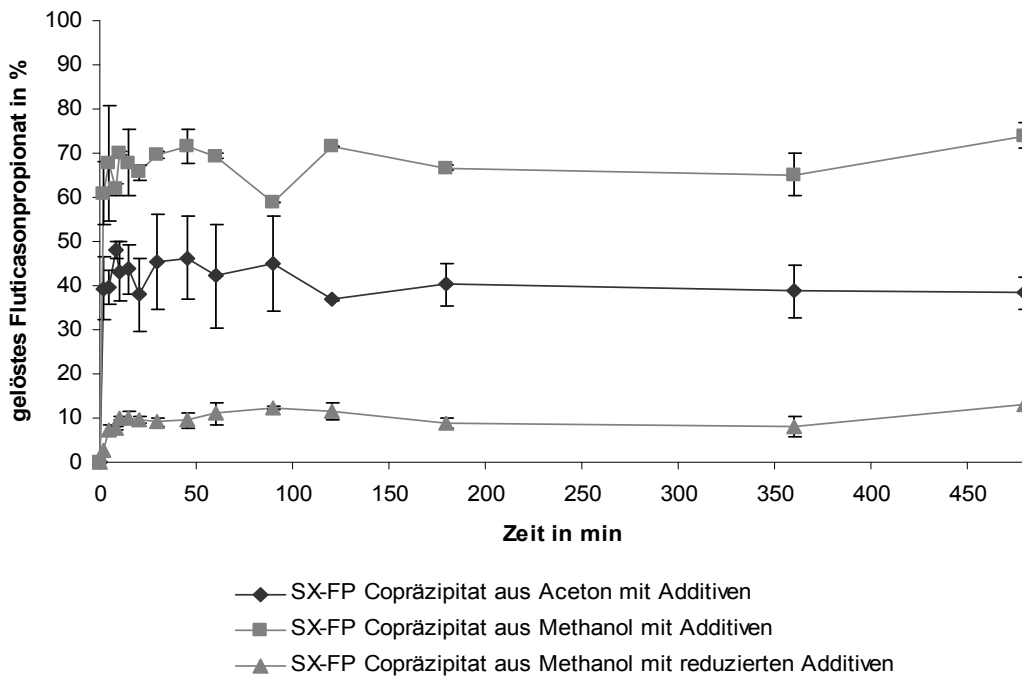


Abbildung 5.63: Auflöseverhalten von FP aus unterschiedlichen copräzipitierten Formulierungen, Fehlerbalken geben die Standardabweichung an (n=4)

Nach den ersten 10 Minuten ist das Plateau in der Auflösung nahezu erreicht und die Lösungsgeschwindigkeit nimmt, auch infolge der verringerten Differenz zwischen gelöster Menge und Sättigungslöslichkeit, ab. Geringfügige Veränderungen im Auflöseverhalten können auch in Abhängigkeit vom für die Präzipitation verwendeten Lösemittel sowie in Abhängigkeit von der eingesetzten Hilfsstoffkonzentration beobachtet werden. Diese Änderungen sind für die ohnehin schlechter wasserlösliche Substanz Fluticasonpropionat ausgeprägter als für Salmeterolxinafoat, das praktisch nicht beeinflusst wird. Umgekehrt verhält es sich bei Zusatz eines hydrophilen Trägers wie Laktose in der Viani mite-Formulierung. Hier löst sich SX deutlich besser als der reine Wirkstoff in einer physikalischen Mischung und auch FP zeigt ein verbessertes Auflöseverhalten, das jedoch nicht an das der copräzipitierten Formulierung heranreicht (siehe Abbildung 5.64 und Abbildung 5.65).

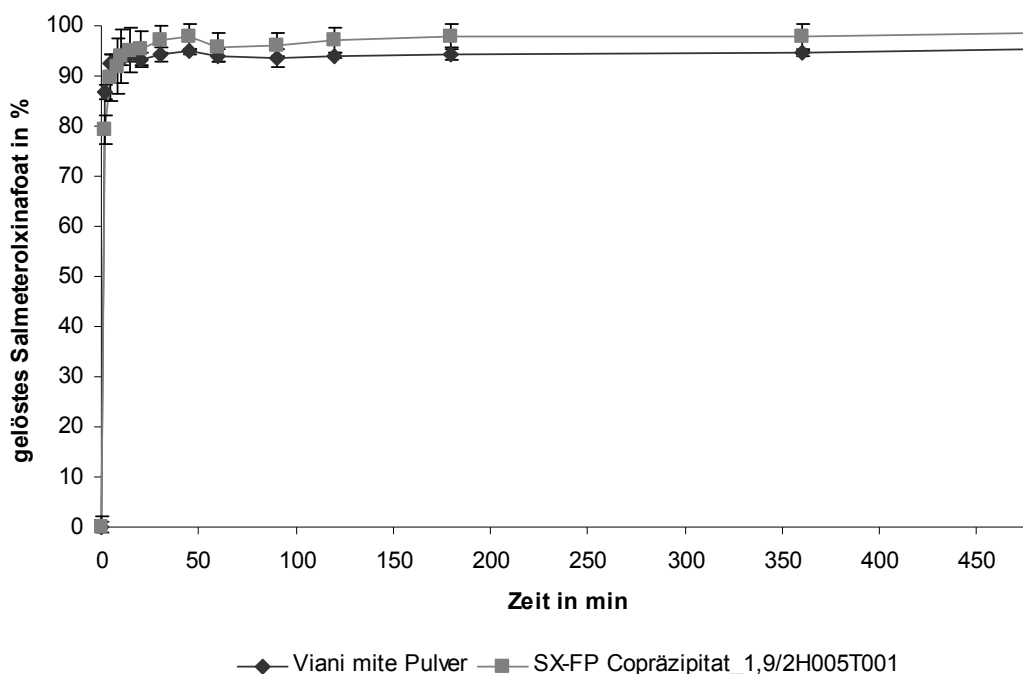


Abbildung 5.64: Auflöseverhalten von SX aus der Viani mite Formulierung sowie einem Copräzipitat aus Methanol mit Additivzusatz, Fehlerbalken geben die Standardabweichung an (n=3)

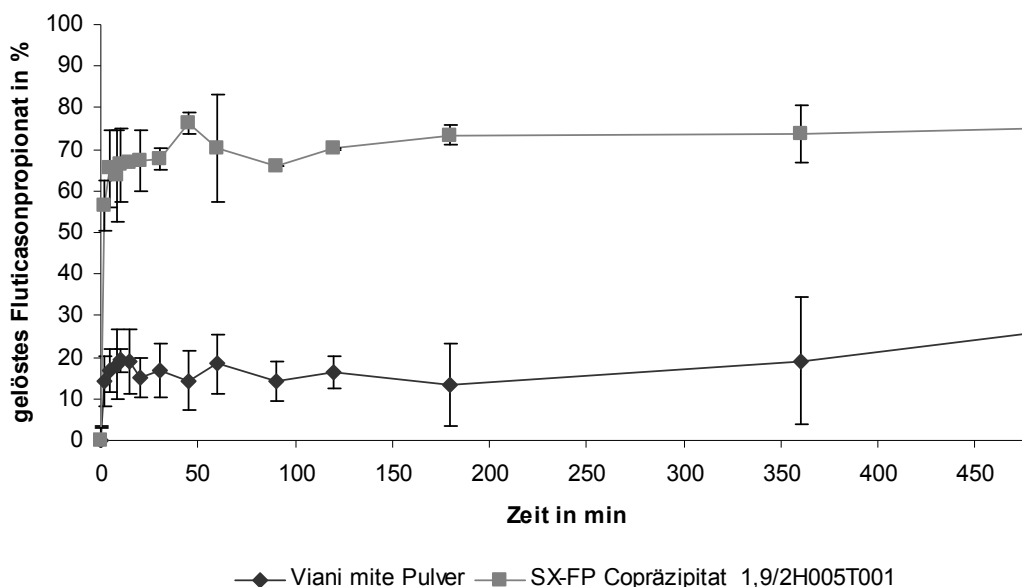


Abbildung 5.65: : Auflöseverhalten von FP aus der Viani mite Formulierung sowie einem Copräzipitat aus Methanol mit Additivzusatz, Fehlerbalken geben die Standardabweichung an (n=3)

Tabelle 5.12 listet die ermittelten initialen Auflöseraten der unterschiedlichen untersuchten Präzipitate im Vergleich zu den reinen Wirkstoffen in einer physikalischen Mischung sowie zu der im Handelsprodukt verwendeten interaktiven Mischung mit Laktose als Trägerstoff auf. Es zeigt sich, dass die durch Co-Präzipitation hergestellten Formulierungen in der Lage sind, die Wirkstoffe schnell und effektiv zur Verfügung zu stellen und sie damit für die pulmonale Applikation verwendet werden können. Zusätzlich könnte durch das schnellere Auflösen im Vergleich zum Handelsprodukt die lag time bis zum Einsetzen der Wirkung von Salmeterolxinafoat umgangen werden.

Tabelle 5.12: berechnete initiale Auflöseraten für unterschiedliche Formulierungen

Formulierung	Verhältnis WS / HS im Produkt	initiale Auflöserate (0-10 min)
SX in physikalischer Mischung	ohne HS	0,12 % *min ⁻¹ (R ² 0,99)
FP in physikalischer Mischung	ohne HS	n.a.
SX aus Viani mite Pulver	0,006 (Trägerstoff Laktose)	28,5 %*min ^{-1/2} (R ² 0,77)
FP aus Viani mite Pulver	0,008 (Trägerstoff Laktose)	0,60 % *min ⁻¹ (R ² 0,99)
SX alleine präz. mit HS	0,83	25,2 %*min ^{-1/2} (R ² 0,91)
FP alleine präz. mit HS	0,83	8,48 %*min ^{-1/2} (R ² 0,91)
SX+FP präzipitiert aus Methanol	ohne HS	SX: 6,84 %*min ⁻¹ (R ² 1) FP: 1,72 %*min ^{-1/2} (R ² 0,95)
SX+FP präzipitiert aus Aceton + HS	1,67	SX: 30,12 %*min ^{-1/2} (R ² 0,83) FP: 13,82 %*min ^{-1/2} (R ² 0,82)
SX+FP präzipitiert aus Methanol + HS	0,83	SX: 29,35 %*min ^{-1/2} (R ² 0,83) FP: 20,53 %*min ^{-1/2} (R ² 0,78)
SX+FP präzipitiert aus Methanol + wenig HS	1,67	SX: 6,82 %*min ^{-1/2} (R ² 0,97) FP: 3,15 %*min ^{-1/2} (R ² 0,95)

SX = Salmeterolxinafoat, FP = Fluticasonpropionat, HS = Hilfsstoff, R² = Bestimmtheitsmaß, n.a. = nicht anwendbar

5.2.3.9 Stabilitätsuntersuchungen

Eine Arzneiformulierung soll nicht nur direkt nach der Herstellung über die gewünschten Charakteristika verfügen, sondern sollte ihre Eigenschaften über die Lagerzeit auch nicht verändern. Um eine Abschätzung der Lagerstabilität von präzipitierten Pulvern zur Inhalation mit Salmeterolxinafoat und Fluticasonpropionat zu erhalten, wurde eine größere Charge hergestellt, charakterisiert und anschließend unterschiedlichen Lagerbedingungen ausgesetzt. Die initiale Charakterisierung bezog sich auf die mittlere Partikelgröße (Laserdiffraktometrie) sowie eine rasterelektronenmikroskopische Betrachtung der Morphologie. Darüber hinaus wurde eine Gehaltsbestimmung durchgeführt und das Pulver bezüglich seiner aerodynamischen Eigenschaften charakterisiert (FPF und MMAD). Außerdem wurde die Kristallinität des Produktes röntgendiffraktometrisch evaluiert und das Verhalten bei unterschiedlichen Luftfeuchten in der DVS betrachtet. Die wichtigsten Parameter der frisch produzierten Charge sind in Tabelle 5.13 aufgeführt.

Tabelle 5.13: Charakteristika der Stabilitätscharge direkt nach Herstellung

Parameter	Wert
mittlerer Partikeldurchmesser x_{50}	4,9 μm
FPF	43,1%
MMAD	6,2 μm
Wirkstoffgehalt	50,9% (SX 18,7%, FP 32,2%)

Die frische Charge zeigt ein gutes aerodynamisches Verhalten mit einer Feinpartikelfraktion von mehr als 40%. In der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme sind nadelförmige Wirkstoffpartikel zu erkennen, die von sphärischen Partikeln umgeben sind, welche vermutlich aus HPMC bestehen (siehe Abbildung 5.66). Das Pulver zeigt

visuell ein gutes Fließverhalten. Die röntgendiffraktometrische Untersuchung zeigt ein teilkristallines Produkt, bei dem aus einer amorphen Basislinie deutliche Röntgenreflexe hervortreten (siehe Abbildung 5.67).

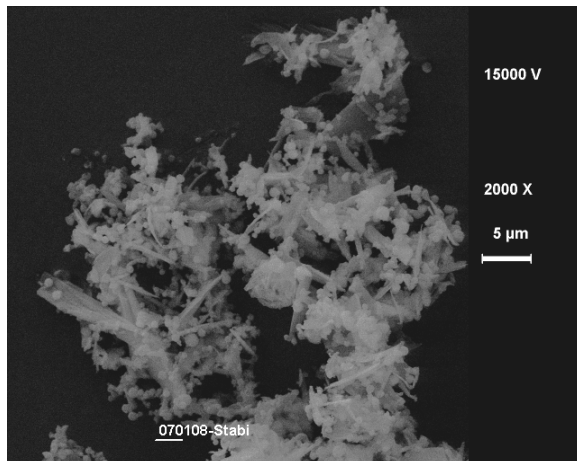


Abbildung 5.66: REM-Aufnahme des frisch hergestellten Copräzipitats

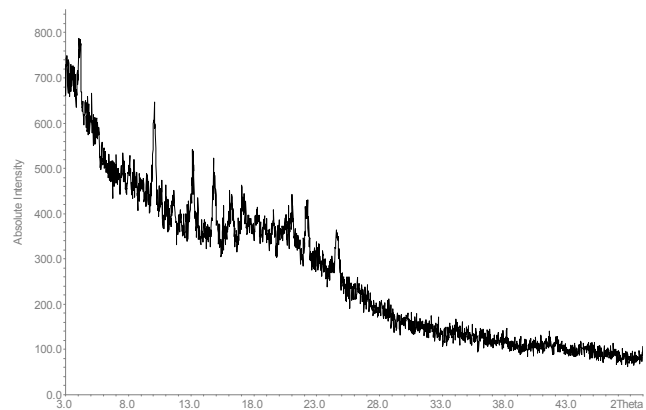


Abbildung 5.67: Röntgendiffraktogramm des frisch hergestellten Copräzipitats

Die Untersuchung der Feuchteempfindlichkeit mithilfe der DVS ergab, dass mit steigenden relativen Luftfeuchten kontinuierlich Wasser durch das Pulver adsorbiert wurde, welches aber bei der Trocknung ebenso wieder desorbiert wurde (siehe Abbildung 5.68). Es ist kein Rekristallisationsereignis zu beobachten, was auf eine gute, zumindest kurzfristige, Stabilität des Pulvers gegenüber Luftfeuchte hindeutet. Die visuelle Fließfähigkeit des Pulvers bleibt auch nach der Exposition in wasserdampfgesättigter Atmosphäre erhalten. Die Charge wurde anschließend in vier Subchargen geteilt und bei unterschiedlichen Bedingungen über 56 Tage (8 Wochen) gelagert.

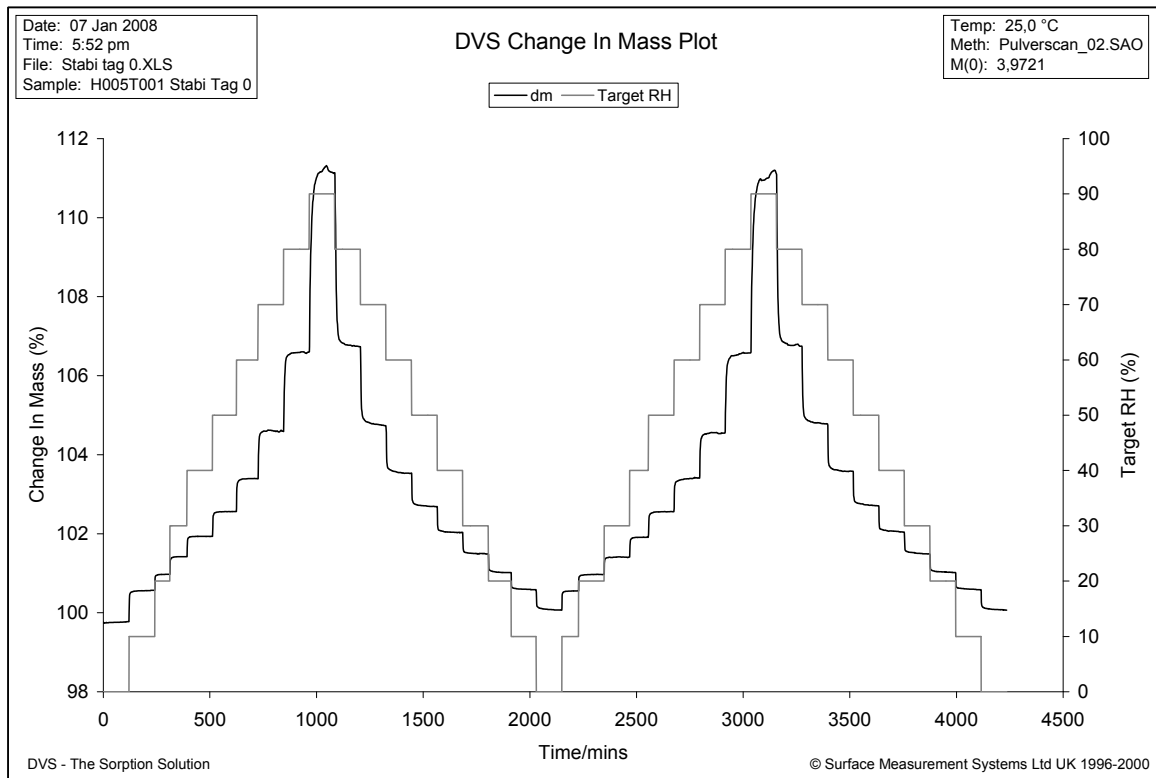


Abbildung 5.68: DVS-Diagramm des frisch hergestellten copräzipitierten Pulvers (schwarz = Masseänderung in %, grau = eingestellte relative Luftfeuchte)

Folgende Lagerbedingungen wurden gewählt:

- normale Lagerung (verschlossen, unter Lichtausschluss über Silicagel im Exsikkator (4% rF)
- offene Lagerung (im offenen Gefäß unter Licht bei Raumtemperatur und –feuchte)
- Lagerung in gesättigter Methanol-Atmosphäre im offenen Gefäß
- Lagerung bei 75% relativer Feuchte und 40°C im offenen Gefäß

Alle zuvor hergestellten Formulierungen wurden trocken und unter Lichtausschluss gelagert, da Pulver im Allgemeinen trocken zu lagern sind und speziell Salmeterolxinafoat-haltige Pulver unter Lichteinfluss eine bräunliche Färbung annehmen. Entsprechend wurden diese Lagerbedingungen in die Stabilitätsuntersuchung aufgenommen. Demgegenüber steht eine Lagerung unter Lichteinfluss, bei Raumtemperatur (22°C) und bei normaler Raumfeuchte (20 – 35% rF),

welche gegebenenfalls die Stabilität des Produktes einschränken wird. Da das Präzipitat aus methanolischer Lösung hergestellt wurde, sollte darüber hinaus überprüft werden, ob eine Lagerung im Lösemitteldampf eine Veränderung des Produktes, beispielsweise eine weitere Rekristallisation, mit sich bringt. Schließlich wurden auch klassische Bedingungen eines Stresstests für die Stabilitätsbestimmung ausgewählt. Bereits nach einer Lagerdauer von sieben Tagen waren visuell deutliche Unterschiede zwischen dem in Methanol-Atmosphäre gelagerten Pulver und den anderen Proben erkennbar. Das in Methanol-Atmosphäre gelagerte Pulver war geschrumpft, dabei stark aggregiert und feucht. Der Wirkstoffgehalt des Pulvers schien bei Lagerung in methanolischer Atmosphäre rapide abzunehmen. Dies ist jedoch bedingt durch die Feuchte des Pulvers. Wird das gelagerte Pulver vor der Gehaltsbestimmung getrocknet, so ist kein Gehaltsverlust erkennbar (siehe Abbildung 5.69).

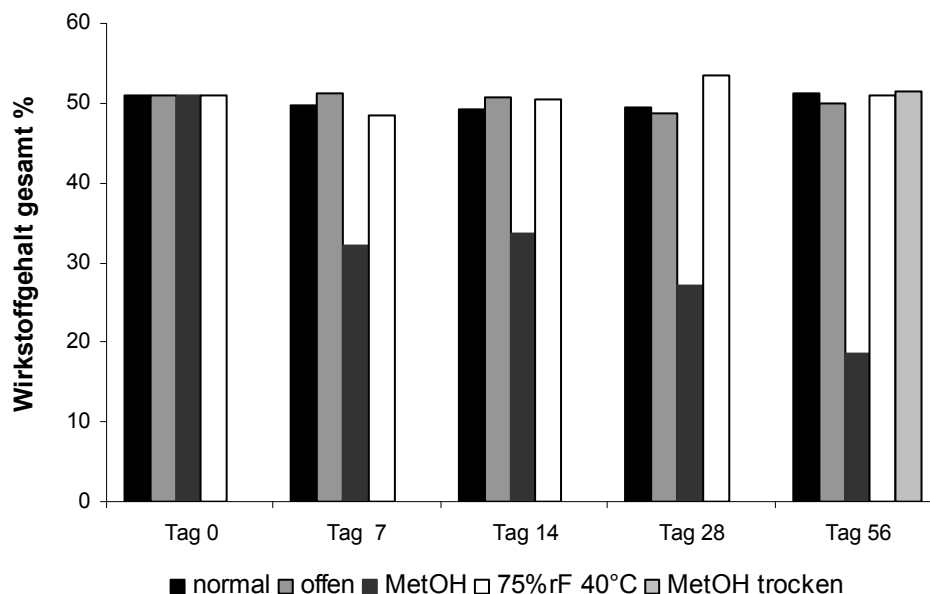


Abbildung 5.69: Gesamtwirkstoffgehalt in den unterschiedlich gelagerten Pulvern über die Lagerzeit (Tag 56, letzter Balken: in methanolischer Atmosphäre gelagert und anschließend getrocknet)

Die anderen Proben zeigten keine Veränderungen im Gehalt über die Lagerzeit. Sowohl der Gehalt an Salmeterolxinafoat als auch der Gehalt an Fluticasonpropionat waren nahezu unverändert, so dass auch das Verhältnis der Wirkstoffe zueinander nicht bedeutend unterschiedlich war (siehe Abbildung 5.70). Es war zu beobachten, dass die beiden Proben, die einer Lagerung bei erhöhter Feuchte (Methanol- beziehungsweise Wasserdampf) unterzogen wurden, leichte Schwankungen im Gehalt und somit auch im daraus berechneten Wirkstoffverhältnis zeigten (siehe Abbildung 5.71).

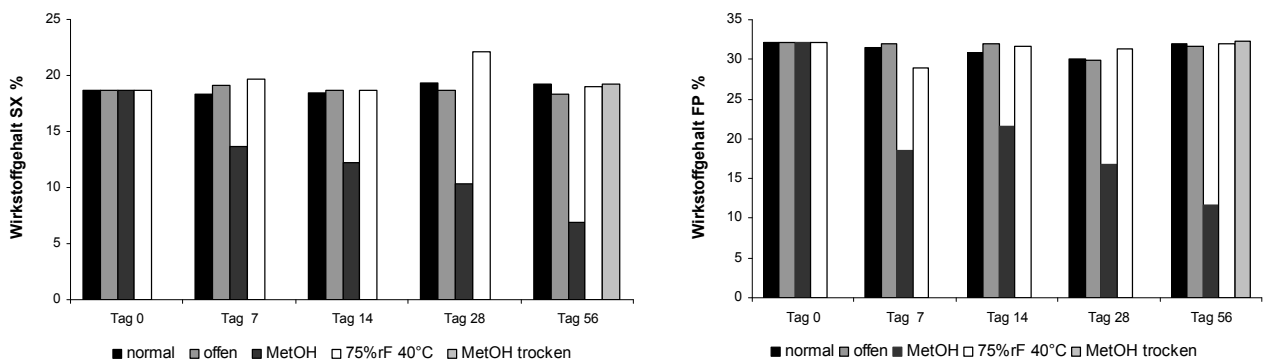


Abbildung 5.70: Wirkstoffgehalt der unterschiedlich gelagerten Proben über die Zeit

(links Salmeterolxinafoat-Gehalt, rechts Fluticasonpropionat-Gehalt, Tag 56, letzter Balken: in methanolischer Atmosphäre gelagert und anschließend getrocknet)

Es ist anzunehmen, dass diese Schwankungen ein Analyseartefakt sind, welches durch unterschiedliche Feuchten der Pulver vor der Gehaltsbestimmung zustande kommt. Wurden alle Pulver vor der Gehaltsbestimmung 24 Stunden im Exsikkator gelagert, ließen sich die Schwankungen im Gehalt minimieren (siehe Tag 56).

Die Feinpartikelfraktion der Pulver wurde mithilfe des Aerolizers am NGI an Tag 28 und an Tag 56 bestimmt. Dazu wurden Hartgelatine kapseln mit den entsprechenden Pulvern befüllt und vor der aerodynamischen Untersuchung für 24 Stunden trocken im Exsikkator über Silicagel gelagert. Durch die Adsorption von Methanol war das Pulver nicht mehr

fließfähig und deaggregierte auch bei anschließender Trocknung nicht mehr. Dadurch sank die Feinpartikelfraktion des Pulvers bereits nach 28 Tagen Lagerung praktisch auf Null. Auch bei den anderen Lagerarten sank die Feinpartikelfraktion während der Lagerzeit (siehe Abbildung 5.72). Dabei waren die Pulver, die bei erhöhter oder erniedrigter Feuchte gelagert sind, stärker beeinflusst, als das offen bei Umgebungsbedingungen gelagerte. Diese Erkenntnis ist für ein Produkt von großer Bedeutung, da so auf eine besonders trockene Lagerung des Produktes verzichtet werden kann, die in der Praxis häufig problematisch ist.

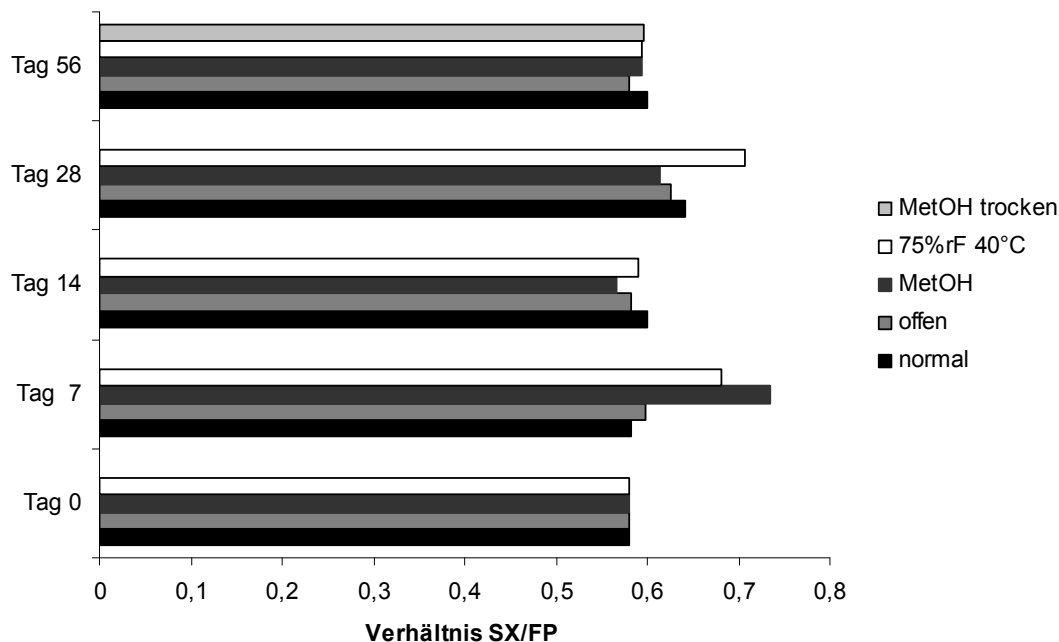


Abbildung 5.71: Wirkstoffverhältnis SX / FP in den unterschiedlich gelagerten Pulvern über die Lagerzeit (Tag 56, oberster Balken: in methanolischer Atmosphäre gelagert und anschließend getrocknet)

Auch nach achtwöchiger Lagerung zeigte das bei Umgebungsbedingungen gelagerte Produkt noch eine Feinpartikelfraktion von 34% bei konstantem Wirkstoffgehalt und Wirkstoffverhältnis, obwohl das Pulver während der Lagerzeit eine leichte Braunfärbung angenommen hat. Betrachtet man die röntgendiffraktometrischen Untersuchungen

(siehe Abbildung 5.73), so ist festzustellen, dass bei erhöhter Feuchte über die Lagerzeit verstärkt Röntgenreflexe im Produkt auftraten. Dies deutet auf eine Rekristallisation hin und ist insbesondere in methanolischer Atmosphäre zu beobachten. Bei einer Lagerung über Silicagel, bei Umgebungsfeuchte oder bei einer Lagerung in 75% rF und bei 40°C trat diese Rekristallisation nicht im selben Maße ein, was für die Stabilität der Formulierung spricht. Vermutlich wird die Rekristallisation durch die Additive ausreichend gut verhindert (siehe Kapitel 5.2.2.5).

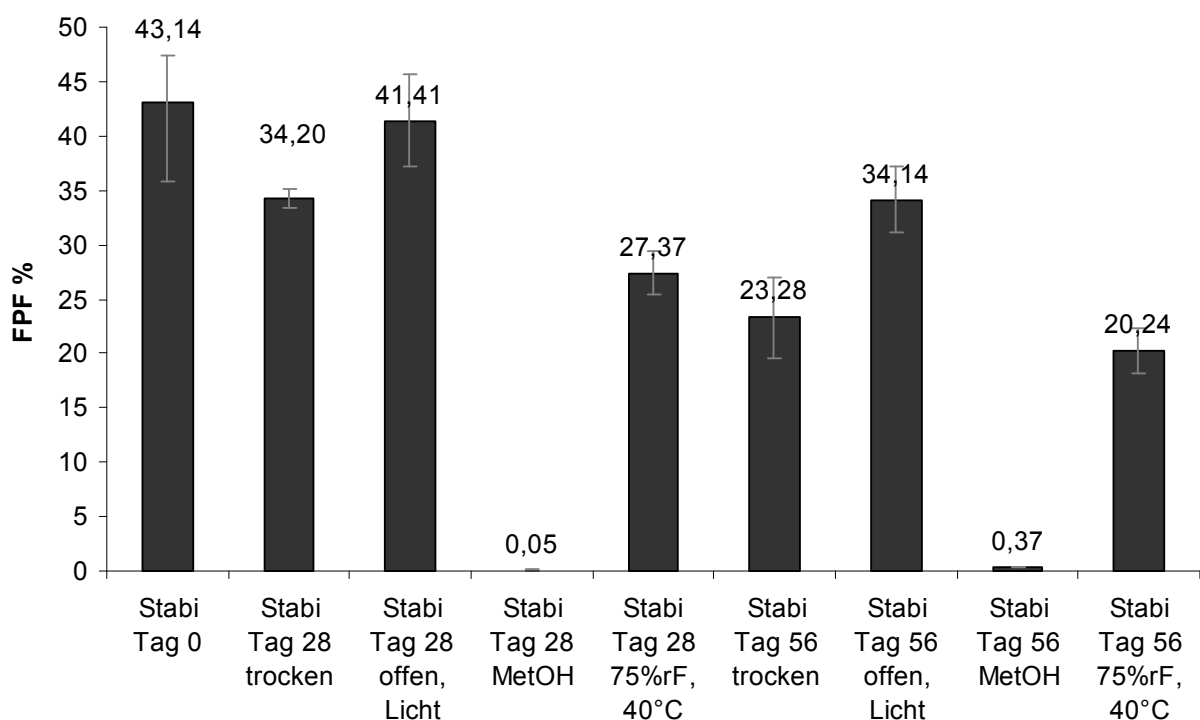
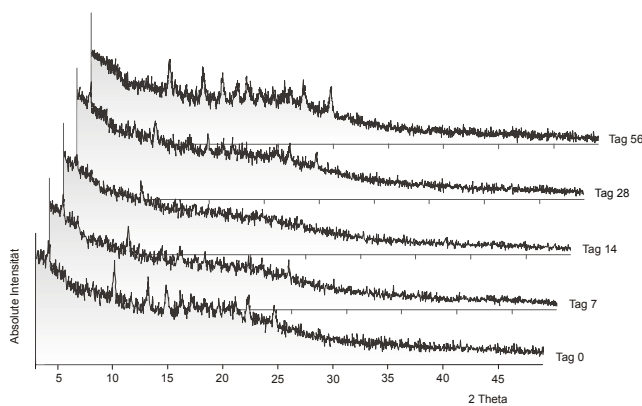


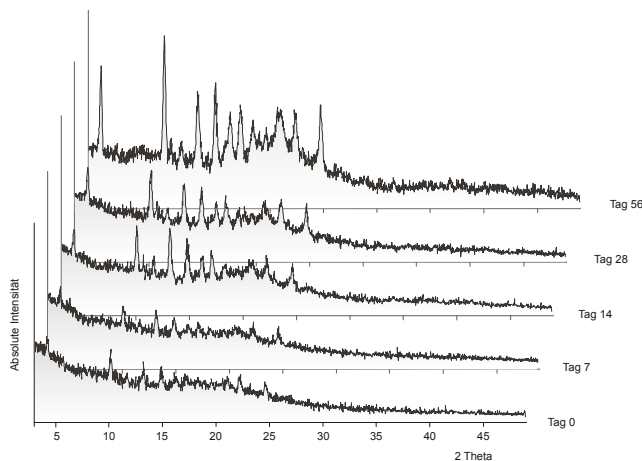
Abbildung 5.72: Feinpartikelfraktionen der unterschiedlich gelagerten Pulver über die Lagerzeit

Die Ergebnisse der DVS-Untersuchungen nach 56 Tagen Lagerdauer ergaben sowohl für die trockene Lagerung als auch für die Lagerung bei Umgebungsbedingungen keine Unterschiede zum Verhalten des frisch hergestellten Pulvers in Gegenwart unterschiedlicher relativer Feuchten (siehe Abbildung 5.74 und Abbildung 5.75). Das Pulver adsorbierte mit steigenden Feuchten steigende Mengen Wasser, so dass es bei 90% relativer Luftfeuchte zu einer relativen Massezunahme von 11 bis 12%

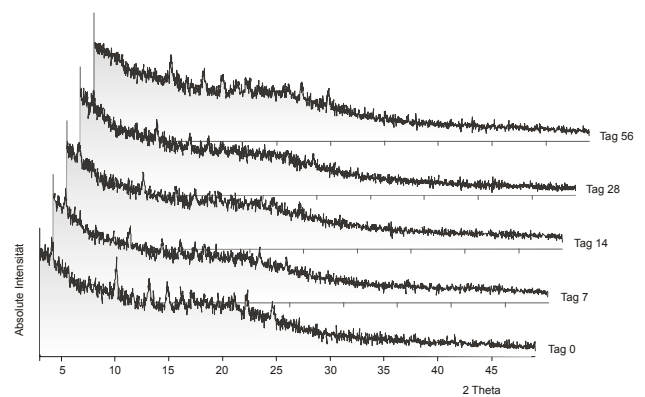
kam. Bei der Trocknung wurden diese 12% wieder vollständig desorbiert, der zweite Zyklus zeigte keine Unterschiede zum ersten Zyklus. Ähnlich verhielt sich auch das bei 75% relativer Feuchte und 40°C gelagerte Produkt, wohingegen das in Methanoldampf gelagerte Pulver eine geringere Massenzunahme von zirka 10% zeigte. Das DVS-Diagramm zeigte, dass die Einstellung einer Gleichgewichtsfeuchte für eine Stufe nach 2 Stunden noch nicht abgeschlossen war. Dies lässt sich durch die veränderte Morphologie des Pulvers erklären.



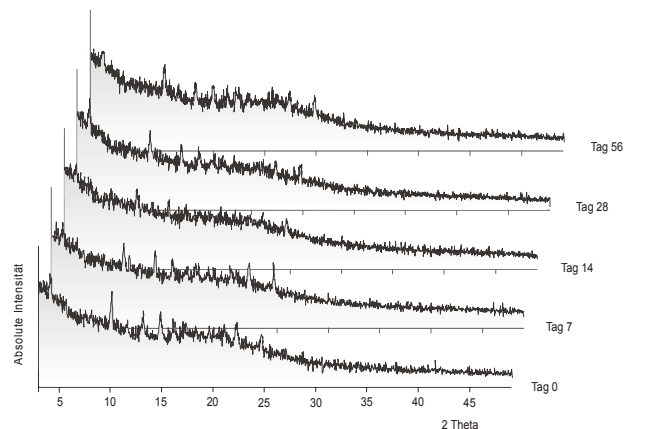
normale Lagerung



Lagerung in Methanol-gesättigter Atmosphäre



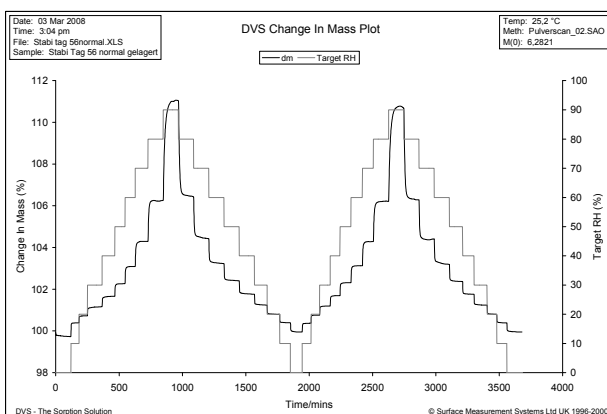
offene Lagerung



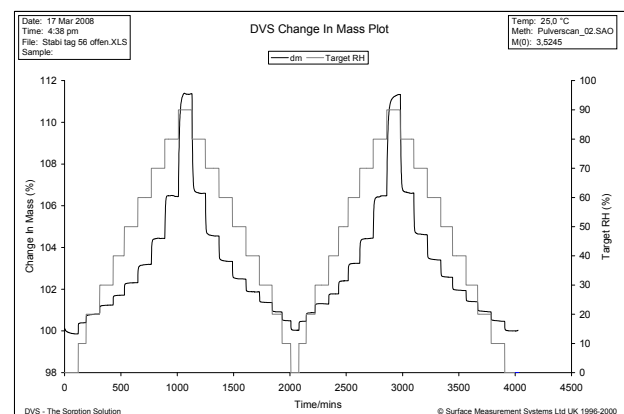
Lagerung bei 75% rF und 40°C

Abbildung 5.73: Röntgendiffraktogramme der unterschiedlich gelagerten Pulver im zeitlichen Verlauf (jeweils von unten nach oben: frisches Pulver, 7 Tage Lagerung, 14 Tage Lagerung, 28 Tage Lagerung, 56 Tage Lagerung)

Das in Methanoldampf gelagerte Pulver aggregierte bereits nach kurzer Lagerdauer zu einem miteinander verschmolzenen Klumpen (siehe Abbildung 5.76 unten links). Dadurch ist das Durchdringen des Pulvers mit Wasserdampf erschwert und die Einstellung einer Gleichgewichtsfeuchte ist verzögert. Ein so gelagertes Pulver ist für eine pulmonale Anwendung keinesfalls geeignet. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der anderen gelagerten Proben zeigten keinen Unterschied zum frisch hergestellten Copräzipitat (siehe Abbildung 5.76). Lediglich bei dem bei 75% relativer Feuchte und 40°C gelagerten Pulver lässt sich visuell eine Vergrößerung der nadelförmigen Wirkstoffpartikel erkennen. Dies schlägt sich auch in den aerodynamischen Daten nieder, die sich über die Lagerzeit verschlechtern. Insgesamt ist das copräzipitierte Pulver bezüglich des Wirkstoffgehalts und der Kristallinität lagerstabil, sofern es nicht bei Extrembedingungen gelagert wird, die aerodynamischen Eigenschaften sind allerdings der kritische Parameter bei der Lagerung. Dieses Problem ist in der Literatur bekannt (Borgström et al., 2005a) und lässt sich möglicherweise durch einen effektiven Schutz des Produktes vor jeglichen Änderungen in der Feuchte umgehen.

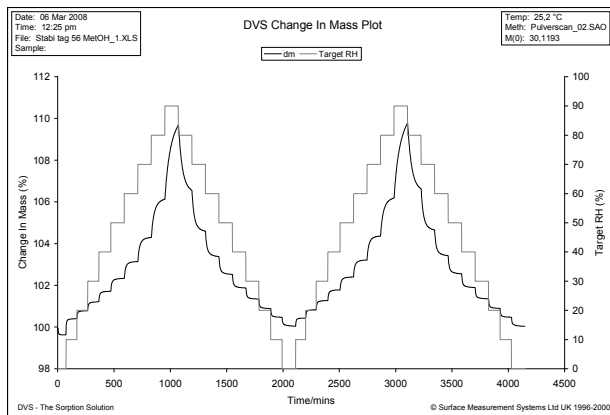


normale Lagerung

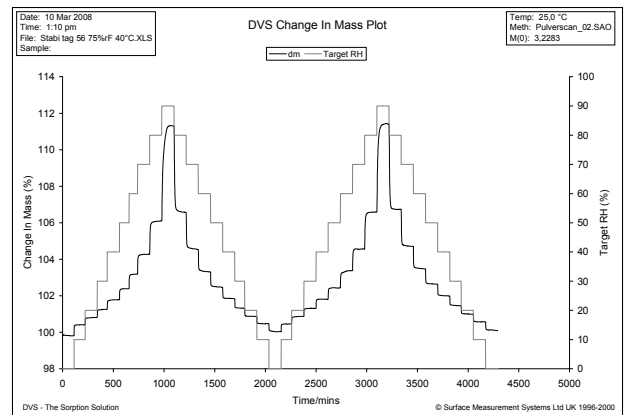


offene Lagerung

Abbildung 5.74: DVS-Diagramme der bei unterschiedlichen Bedingungen gelagerten Pulver nach 56 Tagen (schwarz = Masseänderung in %, grau = eingestellte relative Luftfeuchte)

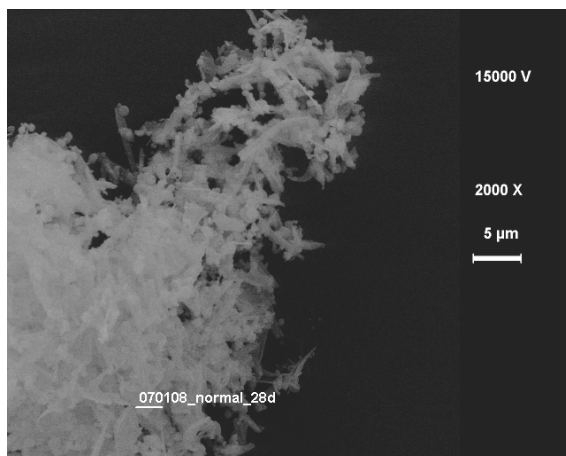


Lagerung in Methanol-gesättigter Atmosphäre

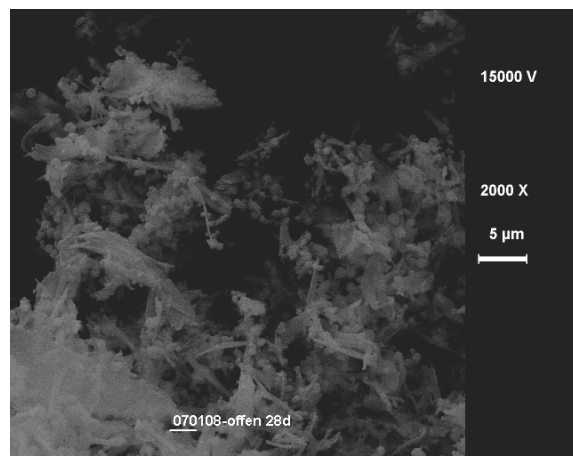


Lagerung bei 75% rF und 40°C

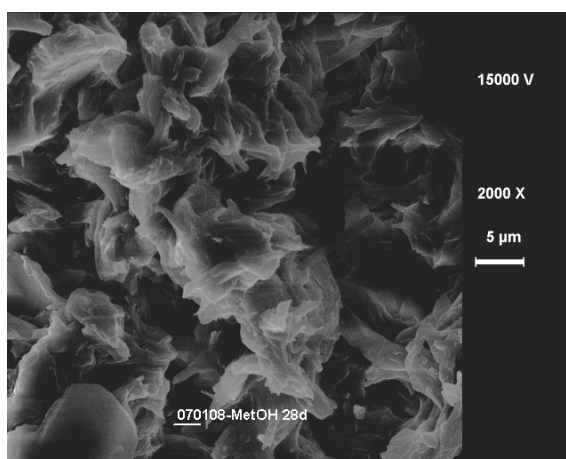
Abbildung 5.75: DVS-Diagramme der bei unterschiedlichen Bedingungen gelagerten Pulver nach 56 Tagen (schwarz = Masseänderung in %, grau = eingestellte relative Luftfeuchte)



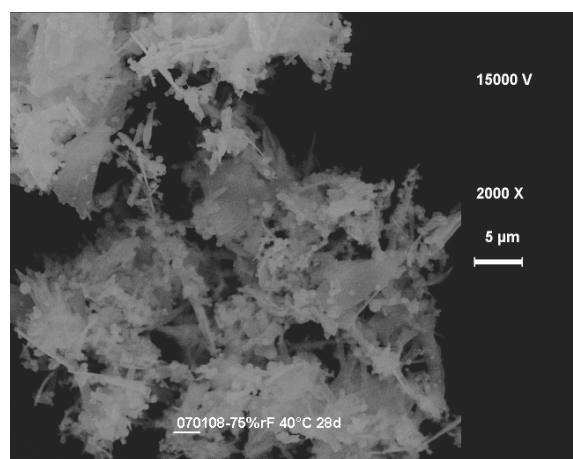
Tag 28: normale Lagerung



Tag 28: offene Lagerung



Tag 28: Lagerung in Methanol-gesättigter Atmosphäre



Tag 28: Lagerung bei 75% rF und 40°C

Abbildung 5.76: REM-Aufnahmen der bei unterschiedlichen Bedingungen gelagerten Pulver nach 28 Tagen (2000-fache Vergrößerung)

5.2.4 Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass das Verfahren der Copräzipitation des β_2 -Sympathomimetikums Salmeterolxinafoat mit dem Corticosteroid Fluticasonpropionat aus methanolischer Lösung unter Zugabe von Wasser als Nichtlösemittel und anschließender Sprühtrocknung der Dispersion zu einem Produkt führt, das gute aerodynamische Eigenschaften zeigt. Dabei lässt sich der Präzipitationsvorgang durch den Einsatz eines Mikromischers standardisieren. Durch den gezielten Einsatz von Lösemittel und Additiven können Größe und Habitus der Partikel sowie das Dispergiervermögen des Pulvers so optimiert werden, dass eine Formulierung für ein Pulver zur Inhalation entwickelt werden konnte, das über Feinpartikelfractionen von mehr als 40% verfügt. Das erzeugte Pulver ist teilkristallin und hat eine gute Stabilität bezüglich des Wirkstoffgehalts und der Kristallinität. Das aerodynamische Verhalten ist ein kritischer Parameter über die Lagerzeit, da sich die FPF über die Lagerzeit in Abhängigkeit von der Art der Lagerung deutlich verringert. Daher sollte die Formulierung möglichst wenig Schwankungen in der Feuchte ausgesetzt sein. Die höchste Lagerstabilität bezüglich der Feinpartikelfraction ergab sich bei Lagerung unter Umgebungsbedingungen (Raumtemperatur und -feuchte).

5.3 Pulvermischungen

Fast alle auf dem Markt befindlichen Inhalationspulver sind als interaktive Mischung aus mikronisiertem Wirkstoff und einem groben Träger wie Laktose formuliert. So auch das Pulver im Viani mite[®] Diskus, das die gleiche Wirkstoffkombination aus Salmeterolxinafoat und Fluticasonpropionat beinhaltet, wie auch in dieser Arbeit verwendet wurde. Wie bereits in Kapitel 2.3.1 dargestellt, dient diese interaktive

Mischung dazu, die mikronisierten Wirkstoffpartikel besser im Luftstrom zu dispergieren und damit pulmonal verfügbar zu machen.

5.3.1 Pulvermischung mit Laktose

Um zu untersuchen, ob eine Mischung der copräzipitierten Wirkstoffpartikel mit einem Trägerstoff ebenfalls die aerodynamischen Eigenschaften des Pulvers verbessert und damit zu einer höheren Feinpartikelfraktion führt, wurden Mischungen mit aus Methanol unter Hilfsstoffzusatz (0,01% HPMC und 0,01% Polysorbat 80) präzipitierten Partikeln und Laktose hergestellt. In Tabelle 5.14 sind die Charakteristika des verwendeten Copräzipitats aufgeführt. Als Trägerstoff wurde eine gesiebte Laktose mit einer mittleren Partikelgröße von 250 µm verwendet, die bereits in anderen Arbeiten für die Herstellung interaktiver Pulvermischungen zur Inhalation verwendet wurde (Bernhard, 2006). Es wurden zwei Mischungen mit unterschiedlichen Wirkstoffgehalten hergestellt, dabei handelte es sich um eine Mischung mit 1% Wirkstoffgehalt sowie eine Mischung mit 0,25% Wirkstoffgehalt.

Tabelle 5.14: Charakteristika des in den Pulvermischungen verwendeten Copräzipitats

Parameter	Wert
mittlere Partikelgröße x_{50}	2,9 µm
FPF	19,5%
MMAD	12,0 µm
Wirkstoffgehalt	79,5%

Beide Mischungen wurden in einer Ansatzgröße von 25 g hergestellt. Dazu wurde die Laktose vorgesiebt, so dass Agglomerate getrennt werden konnten. Anschließend wurde die Hälfte der Trägerlaktose im Mischgefäß vorgelegt, mit der entsprechenden Menge des

Wirkstoffpräzipitats überschichtet und mit dem restlichen Trägerstoff aufgefüllt. Diese Mischung wurde im Folgenden evakuiert, um auf der Oberfläche anhaftende Gas- und Wassermoleküle zu desorbieren und damit die Oberflächen für ein Anhaften der Wirkstoffpartikel zugänglich zu machen. Danach wurde die Mischung mit dem Inertgas Stickstoff begast, um den Normaldruck wiederherzustellen. Die Mischung wurde dann für 15 min im Turbula-Mischer (W.A. Bachofen, Basel, Schweiz) durchmischt, anschließend wurden gegebenenfalls entstandene Agglomerate durch Siebung entfernt. Die Pulvermischung wurde per HPLC auf Homogenität geprüft (Kriterium: relative Standardabweichung des Wirkstoffgehalts der Mischung $< 3\%$ bei 10 Proben), war die Mischung nicht homogen, wurde der Mischvorgang wiederholt. Die homogenen Pulvermischungen wurden anschließend in Hartgelatine kapseln gefüllt, wobei hier für eine Bestimmung der Feinpartikelfraktion im NGI 20 Kapseln (1% Wirkstoffgehalt) beziehungsweise 50 Kapseln (0,25% Wirkstoffgehalt) pro Analyse verwendet wurden. Die aerodynamische Untersuchung erfolgte mithilfe des Aerolizers als Inhalationshilfe. Zum Vergleich wurden zwei weitere Mischungen der reinen Wirkstoffe (0,25% und 1%), wie sie als Ausgangsware vorliegen, mit Laktose hergestellt und ebenfalls untersucht. Wie Abbildung 5.77 zeigt, kann die Mischung der präzipitierten Wirkstoffpartikel mit Laktose zu höheren Feinpartikelfraktionen führen als sie mit dem reinen Copräzipitat zu erreichen sind. Dabei wird die Feinpartikelfraktion bei höherem Wirkstoffanteil in der Mischung stärker verbessert als bei einem geringeren Wirkstoffanteil. Ein entgegengesetzter Effekt ist bei den Mischungen mit den reinen Wirkstoffen zu beobachten, wobei die damit erzielten Feinpartikelfraktionen insgesamt sehr gering sind und der Unterschied zwischen ihnen nicht signifikant ist.

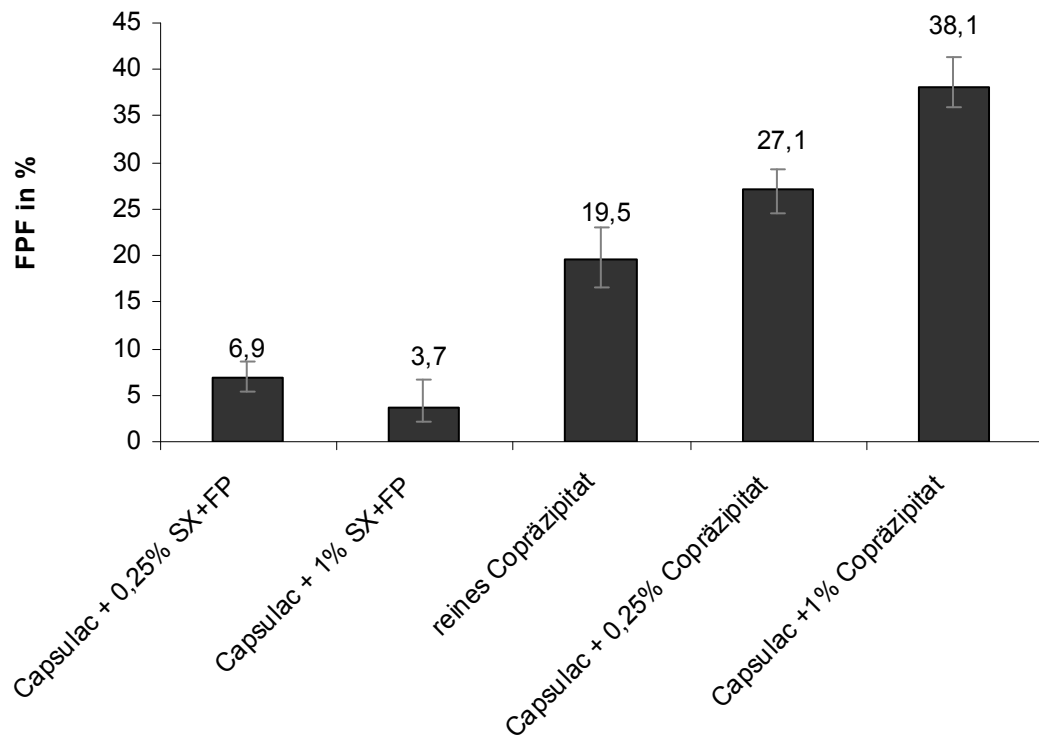


Abbildung 5.77: Feinpartikelfractionen der Mischungen und des reinen Copräzipitates (n=3)

Ein Träger kann nur dann die Trennung der inhalierbaren Partikel fördern und damit die Feinpartikelfraktion erhöhen, wenn die Pulverpartikel zwar am Träger adhären, anstelle Agglomerate zu bilden, sich aber auch ausreichend leicht vom Träger wieder lösen. Dazu müssen die Bereiche hoher Oberflächenenergie auf dem Träger bereits mit Substanz bedeckt sein. Dies ist im Fall der reinen Wirkstoffe offensichtlich nicht der Fall, so dass die resultierende FPF sehr gering ist. Da das Copräzipitat bei gleicher Wirkstoffkonzentration in höherer Gesamtkonzentration eingesetzt wird, weil der Hilfsstoffanteil berücksichtigt werden muss, steht mehr Material zur Sättigung der Laktoseoberfläche zur Verfügung. Dieser Effekt ist bei höherer Konzentration umso ausgeprägter. Bei weiterer Erhöhung des Wirkstoffanteils kann es wieder zu einer Agglomeration der Partikel des Copräzipitates untereinander kommen und die Feinpartikelfraktion würde wieder sinken. Im Vergleich zu einer

copräzipitierten Formulierung, die hinsichtlich ihrer aerodynamischen Eigenschaften optimiert ist (siehe Kapitel 5.2.2.7), ist die hier vorgestellte Mischung mit einem Trägerstoff unterlegen und benötigt darüber hinaus noch mehrere zusätzliche Verfahrensschritte in der Herstellung, die die Formulierung erschweren.

5.3.2 Pulvermischung mit feindispersen Hilfsstoffen

Da ein Ziel dieser Arbeit ist, den Hilfsstoffanteil möglichst gering zu halten und nach Möglichkeit auch auf die Mischung mit einem groben Träger zu verzichten, wurde untersucht, ob auch das Zumischen von feinpartikulären Hilfsstoffen die Dispergierfähigkeit des Pulvers verbessern und somit zu einer höheren Feinpartikelfraktion führen kann. Dieses Phänomen wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben. Lucas et al. beschreiben die Verbesserung der Feinpartikelfraktion einer Modellarzneistoffmischung durch die Zugabe von feinpartikulärer Laktose zu einer binären Mischung von Albumin-Maltodextrin Partikeln und Trägerlaktose (Lucas et al., 1998), ebenso wird der Zusatz von Partikeln mit sehr geringer Dichte zur Verbesserung der FPF einer Pulvermischung diskutiert (Lucas et al., 1999). Darüber hinaus gibt es auch Untersuchungen, bei denen hochdisperses Siliciumdioxid (Aerosil) einer Pulvermischung zugefügt wurde, um so die Feinpartikelfraktion zu erhöhen (Mykhaylova et al., 2006). Insgesamt dient das Zumischen feinpartikulärer Zusatzstoffe der Erhöhung der interpartikulären Abstände im Pulver. Das kann dazu führen, dass eine offene Agglomeratstruktur entsteht, die bei der Dispergierung besser aufgebrochen werden kann, so dass die Pulverpartikel effektiver in ihre Einzelpartikel getrennt werden können. Wie bereits gezeigt, kann die Erhöhung des HPMC-Anteils in copräzipitierten Formulierungen zu einer Verbesserung der FPF führen. Dies wird erreicht durch die Entstehung von sphärischen

HPMC-Partikeln während der Herstellung, die auf diese Weise perfekt im Produkt verteilt sind. Es wurde daher untersucht, ob auch ein nachträgliches Zumischen von feinpartikulären Hilfsstoffen zu einem copräzipitierten Pulver das aerodynamische Verhalten positiv beeinflussen kann. Dazu wurden zuerst Mischungen mit einem aus Aceton unter Hilfsstoffzusatz (0,01% HPMC und 0,01% Polysorbat 80) gefällten Wirkstoffpräzipitat und verschiedenen Additiven hergestellt. Die Charakteristika des hergestellten Copräzipitats sind in Tabelle 5.15 zusammengestellt. Als Additive wurden Aerosil und Aerosil R (hochdisperses Siliciumdioxid mit einer hydrophobisierten Oberfläche) verwendet, die beide Partikel im Nanometerbereich aufweisen und die Oberfläche der Copräzipitate sehr gut belegen können.

Tabelle 5.15: Charakteristika des in den Mischungen mit feinpartikulärem Hilfsstoff verwendeten Copräzipitat

Parameter	Wert
mittlere Partikelgröße x_{50}	2,6 μm
FPF	12,8 %
MMAD	16,5 μm
Wirkstoffgehalt	91,9 %

Außerdem wurde Magnesiumstearat als klassisches Fließregulierungsmittel eingesetzt, das aufgrund der Schmierwirkung die interpartikulären Kräfte im Pulver minimieren kann. Die Mischungen wurden im Kleinmaßstab in Schnappdeckelgefäßen hergestellt, die im Turbula-Mischer gemischt wurden. Anschließend wurden die Formulierungen in Kapseln abgefüllt und der aerodynamischen Untersuchung am NGI unterzogen. Die untersuchten Zusätze konnten die Feinpartikelfraktion gegenüber dem reinen Copräzipitat mit einer Ausnahme nicht signifikant beeinflussen, wie Abbildung 5.78 zeigt. Magnesiumstearat scheint die FPF leicht negativ zu beeinflussen,

wogegen bei den unterschiedlichen Mischungen mit Aerosil eine Tendenz zu höheren Feinpartikelfractionen zu erkennen ist. Einzig der Zusatz von 2% Aerosil bewirkt eine signifikante Erhöhung ($p < 0,05$) der FPF im Vergleich zum reinen Präzipitat.

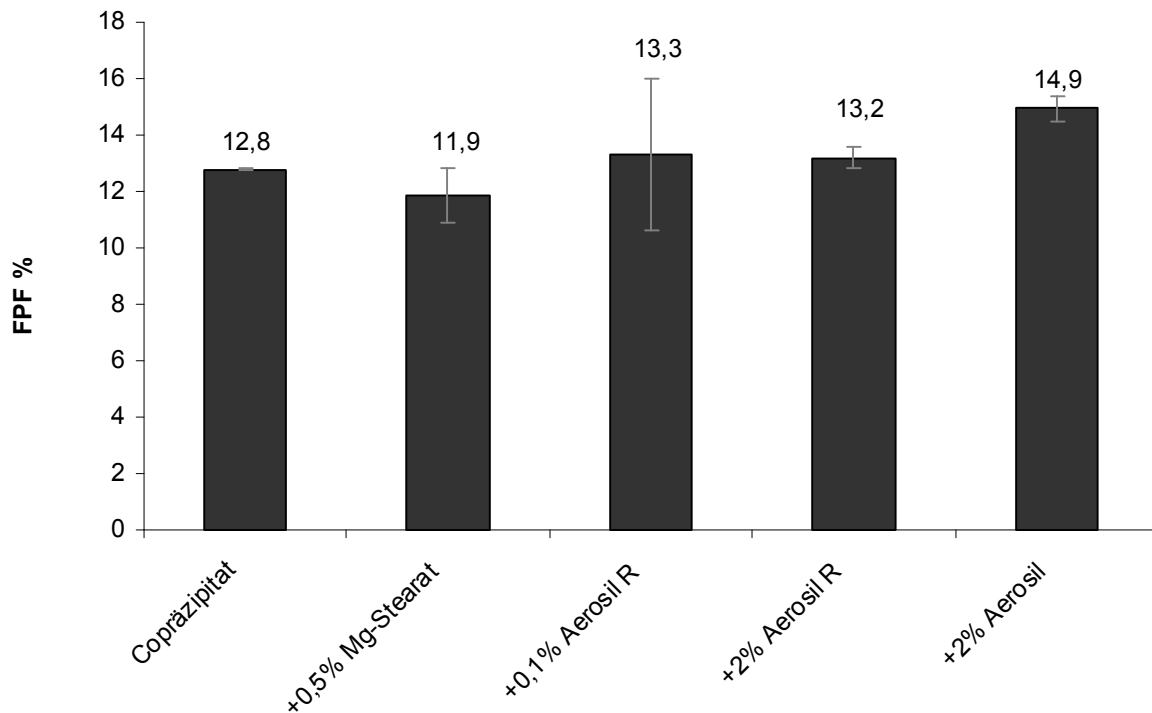


Abbildung 5.78: Feinpartikelfractionen der unterschiedlichen Copräzipitat-Hilfsstoff-Mischungen im Vergleich zum reinen Copräzipitat ($n=3$)

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob die nachträgliche Zugabe von sprühgetrocknetem, feinpartikulärem Hilfsstoff zu einem Präzipitat die aerodynamischen Eigenschaften des Produktes verbessern kann. Dazu wurde ein aus Methanol unter Hilfsstoffzusatz (0,05% HPMC und 0,01% Polysorbat 80) gefälltes Präzipitat mit zusätzlicher sprühgetrockneter HPMC beziehungsweise sprühgetrocknetem Leucin gemischt und untersucht. Die Herstellung der Mischungen mit 5% zusätzlichem Hilfsstoff und die Bestimmung der FPF erfolgte wie zuvor beschrieben. Parallel wurde eine Mischung mit 5% Aerosil untersucht. Sowohl HPMC als auch Leucin bilden bei der separaten Sprühtrocknung

kleine sphärische Partikel aus, die sich gut zwischen die Partikel des Copräzipitats setzen und damit den Abstand zueinander vergrößern könnten.

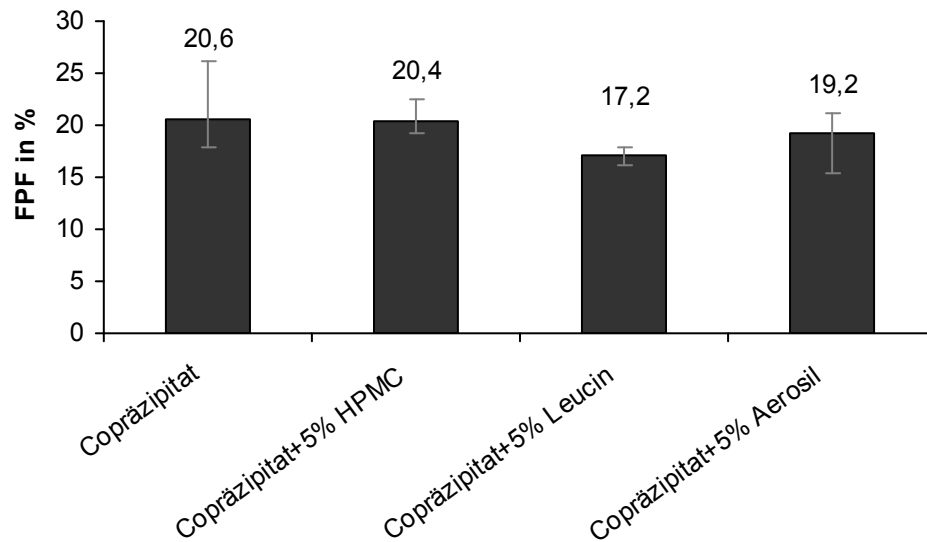


Abbildung 5.79: Feinpartikelfractionen der Mischungen von Copräzipitat mit sprühgetrocknetem Hilfsstoff im Vergleich zum reinen Copräzipitat (n=3)

Auch in diesem Versuchsansatz konnten die zugesetzten Additive die FPF nicht signifikant beeinflussen (siehe Abbildung 5.79). Die Tendenz geht vielmehr hin zu einer Verschlechterung der Feinpartikelfraktion nach Addition zusätzlicher feinpartikulärer Hilfsstoffe. Vermutlich lassen sich die sprühgetrockneten Additive, die selbst zu starker Kohäsion neigen, durch das angewendete Mischverfahren nicht ausreichend im Pulver verteilen, so dass Hilfsstoffagglomerate im Pulver vorhanden sind, die Wirkstoffpartikel adhärieren können und die somit die FPF verschlechtern. Es gibt effizientere Mischtechniken, wie beispielsweise ein triboelektrisch unterstütztes Mischen (Mykhaylova et al., 2006) oder ein Mischen im high shear mixer, mit denen feinpartikuläre Additive homogener im Pulver verteilt werden könnten und möglicherweise andere Ergebnisse bezüglich der Verbesserung der FPF eines Pulvers zur Inhalation bringen könnten.

5.3.3 Zusammenfassung

Die nachträgliche Mischung eines Copräzipitats mit einem Trägerstoff kann zu einer Verbesserung in der Dispergierfähigkeit des Pulvers führen, was sich in einer Erhöhung der Feinpartikelfraktion niederschlägt. Im Vergleich zu einer copräzipitierten Formulierung, die hinsichtlich ihrer aerodynamischen Eigenschaften optimiert ist (siehe Kapitel 5.2.2.7), ist die hier vorgestellte Mischung mit einem Trägerstoff hinsichtlich der aerodynamischen Eigenschaften unterlegen und benötigt darüber hinaus noch mehrere zusätzliche Verfahrensschritte in der Herstellung, die die Formulierung erschweren. Ein nachträgliches Zumischen von feinpartikulärem sprühgetrockneten Hilfsstoff liefert nicht so gute Ergebnisse, wie ein bereits während der Herstellung eingebrachter Hilfsstoff. Durch die in-situ Entstehung sphärischer HPMC-Partikel im Sprühtrocknungsprozess kann das Copräzipitat optimal durch Variation des HPMC-Anteils in seinem Fließ- und Dispergierverhalten eingestellt werden. Von großem Vorteil ist dabei, dass dies in einem einzigen Verfahrensschritt möglich ist und das Produkt nach der Sprühtrocknung ohne weitere Modifikationen zur Inhalation verwendbar ist.

6 Charakterisierung der Einzelpartikelzusammensetzung

6.1 Einleitung

Der Ansatz der Co-Formulierung von Salmeterolxinafoat als β_2 -Sympathomimetikum und Fluticasonpropionat als Glucocorticoid wurde gewählt, um die synergistische Wirkung der beiden Substanzen bei Erreichen der gleichen Zielzelle optimal ausnutzen zu können. Dazu ist es essentiell, dass im entwickelten Inhalationspulver beide Wirkstoffe auch tatsächlich in einem Partikel vorliegen. Die quantitative Analyse des Wirkstoffgehalts aus an verschiedenen Stellen der Pulverchargen entnommenen Proben ergibt eine homogene Verteilung der beiden Wirkstoffe über das Pulver mit einer relativen Standardabweichung unter 3%. Für klassische analytische Verfahren, wie beispielsweise die HPLC-Analytik, werden jedoch stets mehrere Mikrogramm Substanz verwendet, um eine Signalstärke oberhalb des Detektionslimits zu erhalten. Unter der vereinfachten Annahme, ein einzelner nadelförmiger Partikel des Copräzipitats sei 6 μm lang und habe einen quadratischen Querschnitt mit einer Kantenlänge von 1,5 μm , so ergibt sich daraus ein Partikelvolumen von nur 13,5 μm^3 . Bei einer hypothetischen Feststoffdichte des copräzipitierten Partikels von 1,5 g/cm^3 ergibt sich daraus eine Masse von zirka 20 pg pro Partikel. Somit kann mit klassischen Verfahren der quantitativen Analytik keine Einzelpartikelanalytik vorgenommen werden, da immer mehrere Zehntausend Partikel gleichzeitig untersucht werden. Dabei kann nicht unterschieden werden, ob dabei das gefundene Wirkstoffverhältnis in jedem Partikel so vorliegt, oder ob es eine Summenbeobachtung ist. Um dennoch eine Aussage über die Einzelpartikelzusammensetzung zu erhalten, wurden zwei Ansätze verfolgt.

6.2 Fluoreszenzmikroskopie

Für erste Untersuchungen wurde die Fluoreszenz von Salmeterolxinafoat ausgenutzt, um eine Aussage über die Präsenz und die Verteilung der Wirkstoffe im Produkt zu erhalten. Diese Untersuchungen wurden an gemeinsam sprühgetrockneten Pulvern durchgeführt, die keine weiteren Hilfsstoffe enthielten (siehe Kapitel 5.2.1.3). Salmeterolxinafoat zeigt nach Anregung bei 350 nm eine blaue Fluoreszenz, die bei 450 – 470 nm detektierbar ist. Vergleichende Untersuchungen an Fluticasonpropionat zeigten, dass diese Substanz bei einer Anregungswellenlänge von 350 nm keinerlei Fluoreszenz zeigt. Das hergestellte Pulver wurde wie in Kapitel 3.5.2 beschrieben zur Untersuchung mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop vorbereitet. Zuerst wurde ein Transmissionsbild im Weißlicht aufgenommen, das die Lage der Partikel anzeigt (siehe Abbildung 6.1 und Abbildung 6.2 oben rechts). Anschließend wurde das Weißlicht gelöscht und die Probe durch einen Laser mit 350 nm Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt. Das so erhaltene Bild zeigt eine blaue Färbung an den Stellen, an denen SX präsent ist (siehe Abbildung 6.1 und Abbildung 6.2 oben links). Durch Superposition der beiden Bilder (Weißlicht- und Fluoreszenzaufnahme) lassen sich SX-reiche Stellen den Partikeln zuordnen. Darüber hinaus müssten Partikel, die kein SX enthalten und nur aus FP bestehen, zwar in der Weißlichtaufnahme erkennbar sein, aber keine Fluoreszenz zeigen. Betrachtet man die überlagerten Bilder, so ist erkennbar, dass alle in der Weißlichtaufnahme erkennbaren Partikel auch die blau dargestellte Fluoreszenz zeigen (siehe Abbildung 6.1 und Abbildung 6.2 unten links). Demzufolge bestehen alle Partikel zumindest qualitativ sowohl aus Salmeterolxinafoat als auch aus Fluticasonpropionat.

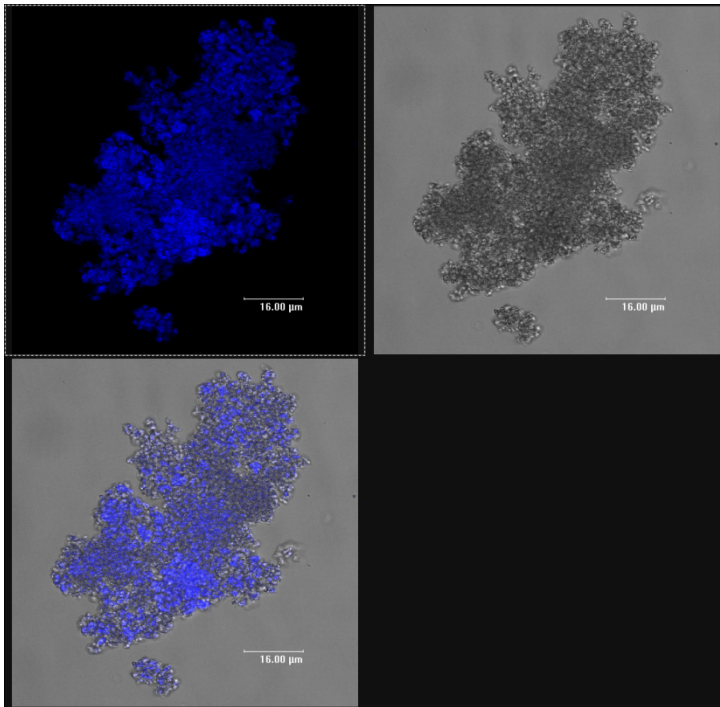


Abbildung 6.1: Fluoreszenzaufnahme (oben links), Weißlichtaufnahme (oben rechts) und Superposition der Bilder (unten links) von gemeinsam sprühgetrockneten Partikeln aus SX und FP

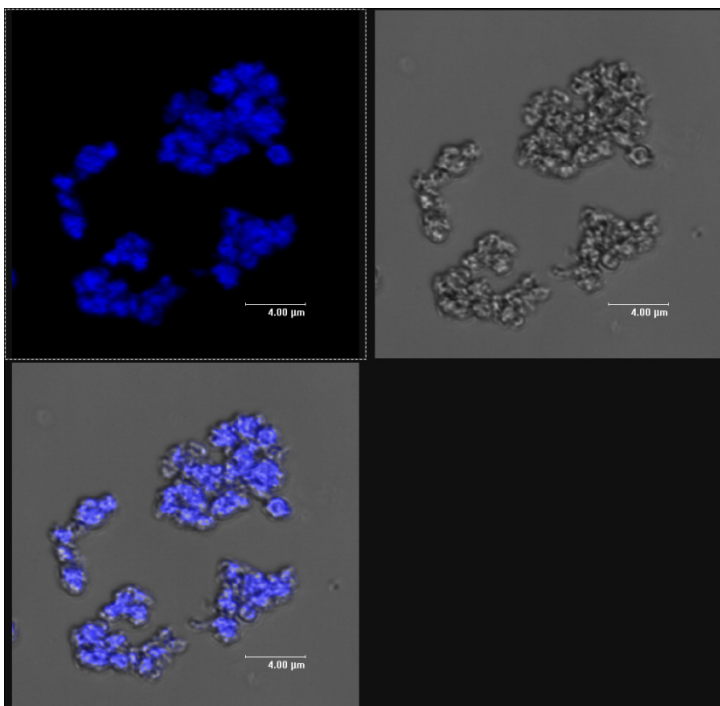


Abbildung 6.2: Fluoreszenzaufnahme (oben links), Weißlichtaufnahme (oben rechts) und Superposition der Bilder (unten links) von gemeinsam sprühgetrockneten Partikeln aus SX und FP (Detail)

6.3 Raman-Mikroskopie

In einer zweiten Versuchsreihe sollte die Kombination von orts aufgelöster Darstellung und Wirkstoffanalytik verfeinert werden. Dazu wurde in Zusammenarbeit mit Malvern (Malvern Instruments, Columbia, MD, USA) die Kombination von morphologischer Charakterisierung mithilfe einer mikroskopischen Bildanalyse und Raman-Mikroskopie zur Charakterisierung der Einzelpartikelzusammensetzung verwendet. Die Raman-Mikroskopie wurde bereits für die Charakterisierung der in vitro Deposition einer Dosieraerosol-Formulierung mit Salmeterolxinafoat und Fluticasonpropionat genutzt (Theophilus et al., 2006). Es wurden zwei Formulierungen von copräzipitierten Pulvern untersucht, wobei Formulierung 1 ohne den Zusatz von Additiven hergestellt wurde, um mögliche Interaktionen der Additive bei der Messung auszuschließen. Formulierung 2 wurde aus methanolischer Lösung unter Zusatz von 0,05% HPMC und 0,01% Polysorbat 80 im Fällungsmedium hergestellt. Beide Formulierungen wurden zuerst einer ausführlichen morphologischen Untersuchung unterzogen. Dabei fällt auf, dass Partikel der Formulierung 2 (mit Additiv) einen deutlich geringeren Partikeldurchmesser (dargestellt als der Durchmesser des flächenäquivalenten Kreises, circular equivalent diameter (CE)) haben, als Formulierung 1 ohne Additivzusatz (siehe Abbildung 6.3 und Abbildung 6.4). Dies bestätigt die Ergebnisse früherer Untersuchungen, die zeigen, dass der Zusatz von Additiven in der Präzipitation das Partikelwachstum einschränken kann (siehe Kapitel 5.2.2.3). Bezüglich der aspect ratio (Quotient der maximalen Partikelausdehnung und der minimalen Partikelausdehnung) ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Formulierungen erkennbar.

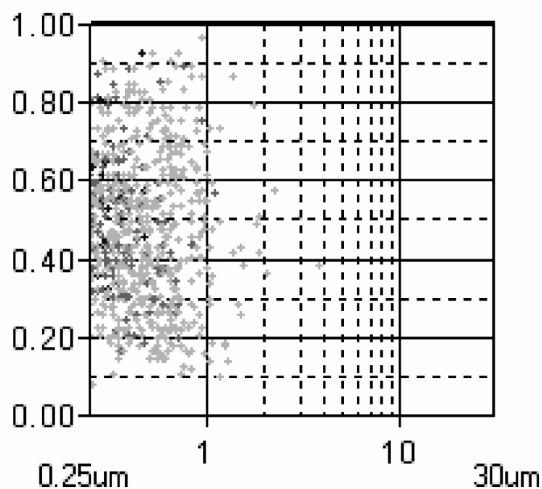


Abbildung 6.3: Auswertung bildanalytischer Daten der Formulierung 1 ohne Additivzusatz. Aufgetragen sind der Durchmesser des flächenäquivalenten Kreises (x-Achse) gegen die aspect ratio (y-Achse)

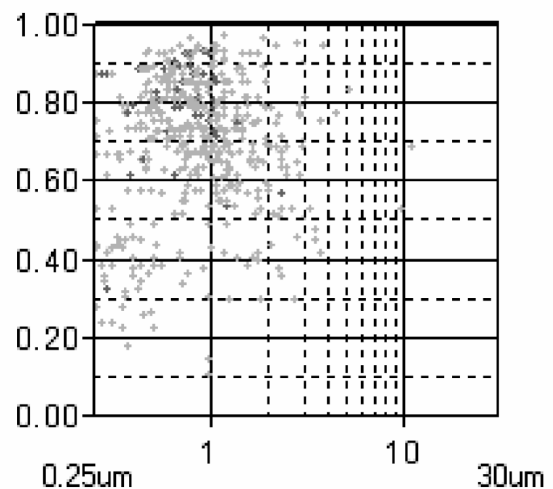


Abbildung 6.4: Auswertung bildanalytischer Daten der Formulierung 2 mit Additiven. Aufgetragen sind der Durchmesser des flächenäquivalenten Kreises (x-Achse) gegen die aspect ratio (y-Achse)

Morphologisch fällt auf, dass die Partikel der additivfreien Formulierung 1 ausschließlich nadelförmig sind (siehe Abbildung 6.5 links). Dabei sind die kürzeren Partikel vermutlich Bruchstücke von Nadeln. Formulierung 2 kann hingegen in drei morphologisch unterschiedliche Gruppen getrennt werden (siehe Abbildung 6.5 rechts). Neben länglichen, hellen Partikeln (1 und 7 left) sind kleine sphärische Partikel (2, 5, 8, 9) sowie oblonge, dunklere Partikel (3, 4, 7 right) erkennbar. Partikel 6 stellt vermutlich ein Agglomerat dar. Von diesen charakteristischen Partikeln der beiden Formulierungen wurden anschließend Ramanspektren aufgenommen (siehe Kapitel 3.5.3). In Abbildung 6.8 sind die Vergleichsspektren der Wirkstoffe sowie der verwendeten Additive zu sehen, in Abbildung 6.6 und Abbildung 6.7 sind die entsprechenden Spektren der Einzelpartikel dargestellt.

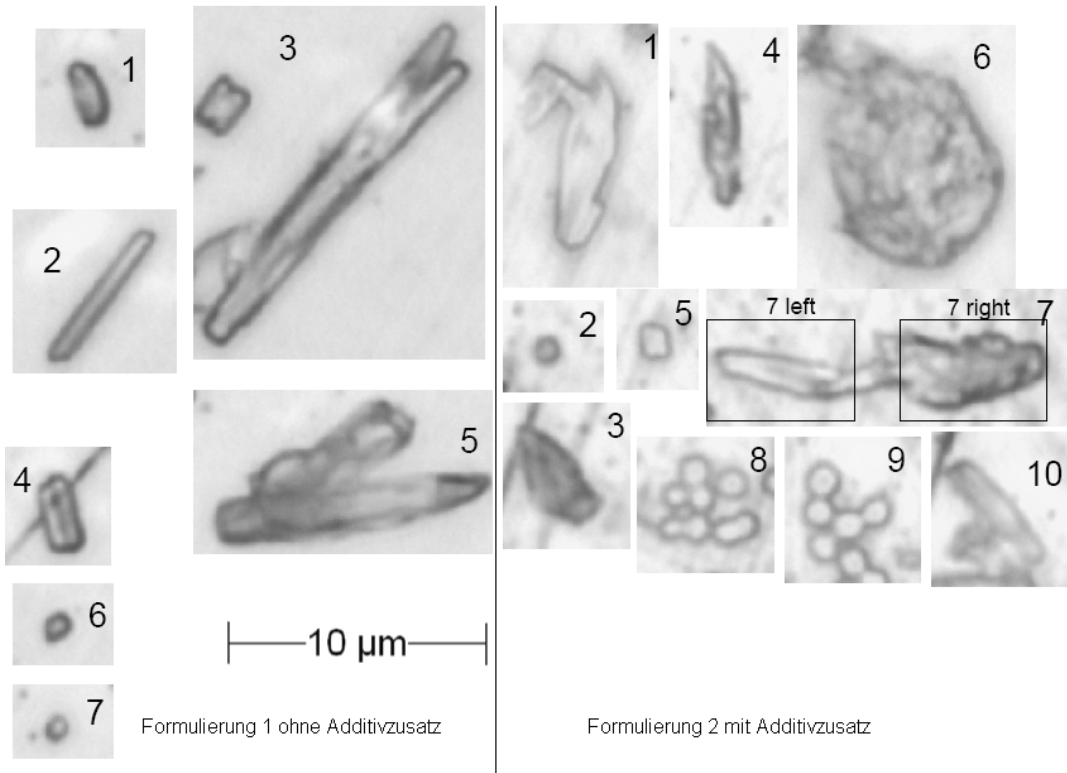


Abbildung 6.5: lichtmikroskopisches Bild von charakteristischen Partikeln der Formulierungen (links Formulierung 1 ohne Additiv, rechts Formulierung 2 mit Additiv)

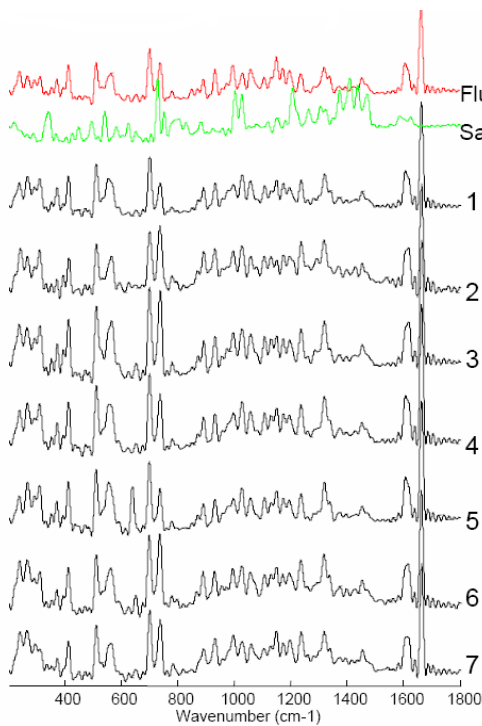


Abbildung 6.6: Ramanspektren der oben dargestellten Einzelpartikel von Formulierung 1

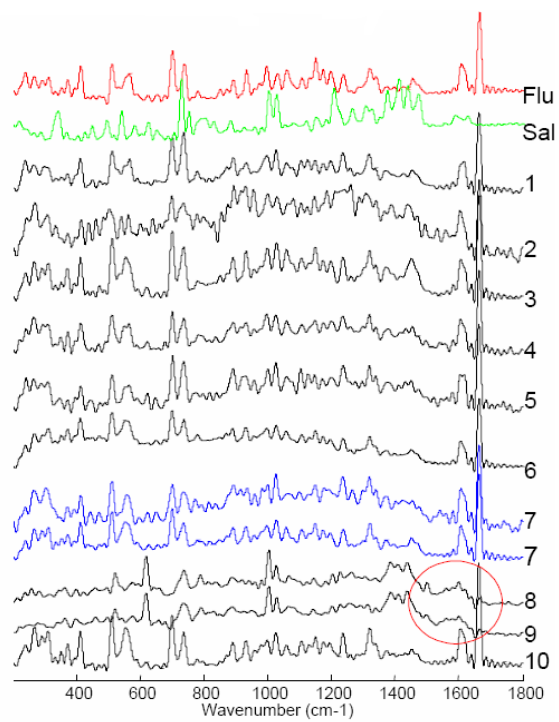


Abbildung 6.7: Ramanspektren der oben dargestellten Einzelpartikel von Formulierung 2

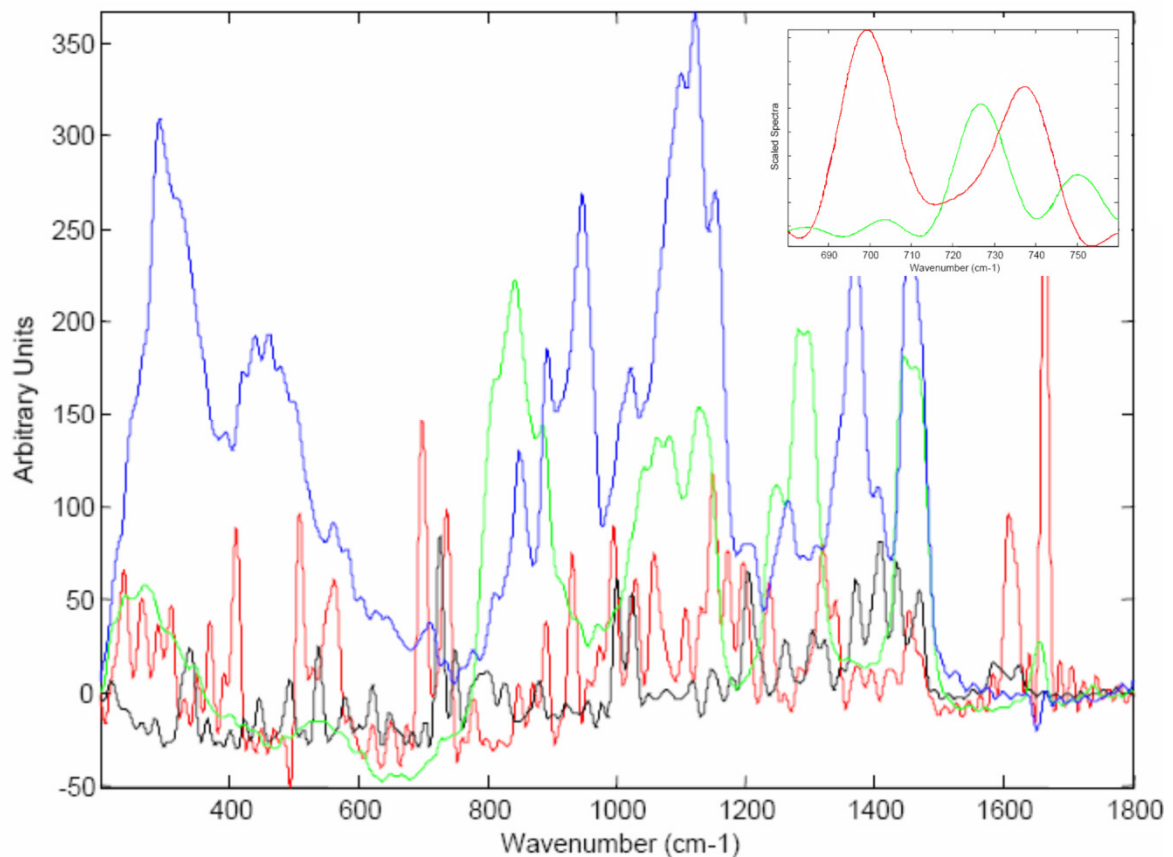
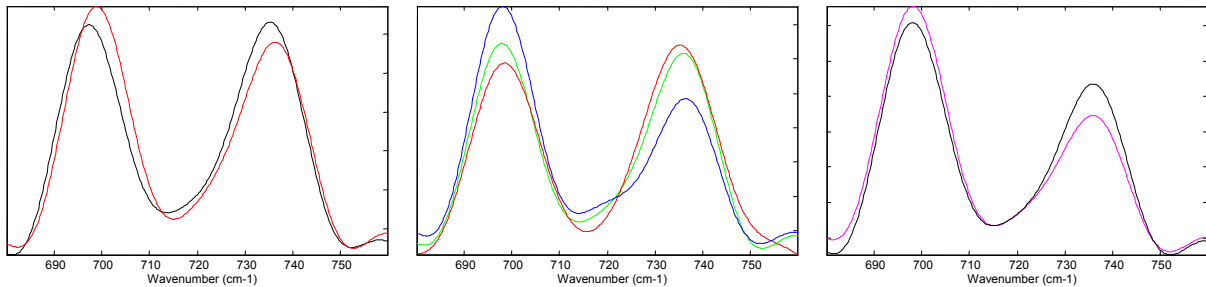


Abbildung 6.8: Referenz-Ramanspektren der Wirkstoffe und der Hilfsstoffe (blau = HPMC, grün = Polysorbat 80, rot = FP, schwarz = SX), rechts oben Detaildarstellung (grün = SX, rot = FP)

Die Referenzspektren zeigen deutliche Unterschiede zwischen den Einzelsubstanzen, so dass die Spektren zur Identifizierung verwendet werden können. Die ohne Additivzusatz copräzipitierten Partikel zeigen sehr einheitliche Ramanspektren, was auf eine uniforme Zusammensetzung hindeutet. Ein Vergleich mit den Referenzspektren der Wirkstoffe lässt darauf schließen, dass diese Partikel aus einem größeren Anteil Fluticasonpropionat bestehen, während der Anteil an Salmeterolxinafoat geringer ist. Die Gehaltsbestimmung des Präzipitats ergab ebenfalls einen Mindergehalt an SX, der vermutlich durch ein verstärktes Anfallen separater SX-haltiger Partikel im Filter des Sprühturms zu erklären ist (siehe Kapitel 5.2.2.6). Unabhängig von der

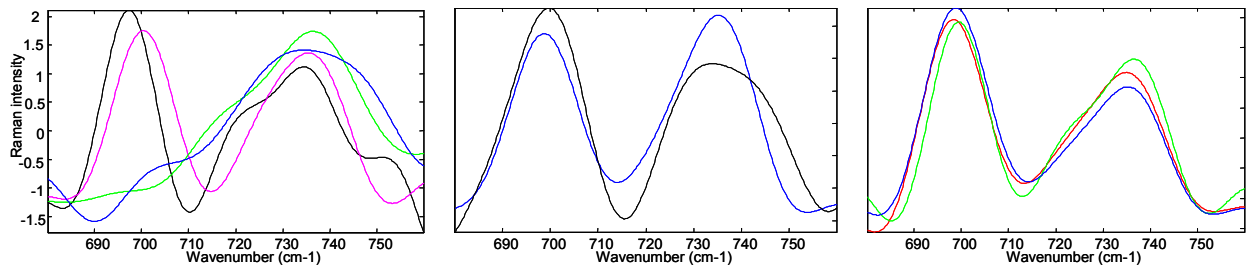
Morphologie (lange dünne Nadeln (2, 3, 5), Nadelbruchstücke (6, 7) oder etwas dickere Nadeln (1, 4)) zeigen die Partikelspektren auch bei Betrachtung der Detailregion zwischen 680 nm und 760 nm lediglich leichte Unterschiede in der Intensität der Banden, aber nicht in der Lage der Banden (siehe Abbildung 6.9). Auch dies deutet auf eine gleiche Partikelzusammensetzung hin.



Bruchstücke (rot = 7, schwarz = 6), dünne Nadeln (rot = 2, grün = 3, blau = 5), etwas dickere Nadeln (pink = 1, schwarz = 4)

Abbildung 6.9: Detailbetrachtung der Ramanbanden der Einzelpartikel aus Formulierung 1, y-Achse: Raman-Intensität

Die Ramanspektren der Einzelpartikel von Formulierung 2 lassen sich in drei Gruppen einteilen (siehe Abbildung 6.10), die den morphologischen Gruppen entsprechen. Die Spektren der oblongen, dunkleren Partikel (3, 4 und 7 right) zeigen eine deutliche Schulter bei 725 cm^{-1} , welche die Präsenz von Salmeterolxinafoat anzeigt (siehe Abbildung 6.8). Diese Schulter fehlt bei der detaillierteren Betrachtung der nadelförmigen, helleren Partikel (1, 7 left und 10). Die sphärischen Partikel zeigen eine hohe Variabilität in den zugehörigen Spektren, wobei sich manche Banden keiner der Ausgangssubstanzen zuordnen lassen. Dies könnte mit der Formation von Co-Kristallen erklärt werden, die andere Raman-Eigenschaften haben können.



runde Partikel (schwarz = 2, pink = 5, grün = 8, blau = 9) nadelförmige helle Partikel (blau = 1, schwarz = 7 left) oblonge, dunkle Partikel (rot = 3, grün = 4, blau = 7 right)

Abbildung 6.10: Detailbetrachtung der Ramanbanden der Einzelpartikel aus Formulierung 2, y-Achse: Raman-Intensität

Insgesamt scheinen alle Partikel beide Wirkstoffe zu enthalten, wobei sich die Intensitäten der Raman-Banden unterscheiden und dementsprechend die Verhältnisse der Wirkstoffe in den unterschiedlichen Partikeln verschieden sind. Offensichtlich ist die Morphologie der Einzelpartikel eng mit der chemischen Zusammensetzung der Einzelpartikel verknüpft. Wenn daher über eine Modifikation des Präzipitationsprozesses eine stärkere Einheitlichkeit in der Morphologie zu erreichen ist, so ist dies wahrscheinlich auch mit einer homogenen Zusammensetzung der Einzelpartikel verbunden.

7 Zusammenfassung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wird eine neue Methode zur Herstellung von Pulvern zur Inhalation beschrieben, die zwei Wirkstoffe beinhalten. Dabei handelt es sich um das langwirksame β_2 -Sympathomimetikum Salmeterolxinafoat und das Glucocorticoid Fluticasonpropionat. Beide Substanzen werden in der Asthmatherapie eingesetzt und finden Anwendung in der Behandlung bei einem Schweregrad der Stufe drei und vier. Neuere Untersuchungen belegen eine synergistische Wirkung, wenn beide Substanzen an derselben Zielstruktur in der Lunge zur Wirkung kommen. Dazu ist eine Codeposition beider Wirkstoffe im Respirationstrakt notwendig. Die bisher auf dem Markt befindlichen Kombinationspräparate versuchen dies über eine physikalische Mischung der beiden Substanzen zu realisieren.

In dieser Arbeit wird eine Copräzipitation der beiden Substanzen zur Herstellung von Wirkstoffpartikeln verwendet, die zur Inhalation geeignet sind und beide Wirkstoffe in einem Partikel vereinigen. Dazu werden beide Substanzen im therapeutischen Verhältnis in einem organischen Lösemittel gelöst und anschließend in einem Mikromischer im Verhältnis 1 + 10 kontinuierlich mit Wasser als Nichtlösemittel gemischt, das verschiedene oberflächenaktive Additive enthalten kann. Die so hergestellte Dispersion wird anschließend durch Sprühtrocknung in ein Pulver überführt. Dieses kann dann beispielsweise in Kapseln abgefüllt und mithilfe eines Pulverinhalators inhaliert werden. Das Lösemittel, aus dem die Präzipitation erfolgt, beeinflusst den Habitus der Partikel und damit auch die aerodynamischen Eigenschaften der resultierenden Pulver. Eine Präzipitation aus methanolischer Lösung ergibt flache nadelförmige Partikel, die mit einer Feinpartikelfraktion von zirka 30% gute aerodynamische Eigenschaften aufweisen. Auch die Additivauswahl

und deren Einsatzkonzentration haben einen Einfluss auf die resultierende Partikelgröße, da sie ein Partikelwachstum bei der Präzipitation behindern können. Hier hat vor allem das eingesetzte Polysorbat 80 einen guten Effekt bewiesen. Darüber hinaus beeinflussen die Additive auch das aerodynamische Verhalten der Pulver, da sie sich feinverteilt im Pulver zwischen den Wirkstoffpartikeln befinden können und so das Dispergiervermögen deutlich verbessern. Dies wird in der vorliegenden Arbeit für Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) gezeigt, welche fein verteilte sphärische Partikel im Produkt ergibt, die die Feinpartikelfraktion des Pulvers signifikant erhöhen. Die optimierte Formulierung mit 0,01% Polysorbat 80 und 0,05% HPMC im Nichtlösemittel ergibt inhalierbare Pulver mit einer Feinpartikelfraktion von mehr als 40% bei einem Wirkstoffgehalt von etwa 50%. Anders als bei den meisten Pulvern zur Inhalation kann so auf die Mischung mit einem grobdispersen Trägerstoff verzichtet werden. Betrachtet man die in-vitro Deposition im Next Generation Pharmaceutical Impactor, so ist eine gleichmäßige Deposition der beiden Wirkstoffe zu beobachten, welche auf eine gute Co-Deposition schließen lässt. Die Bestimmung der Einzelpartikelzusammensetzung mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie sowie der Raman-Mikroskopie zeigt, dass die hergestellten Partikel beide Wirkstoffe enthalten. Dabei kann eine unterschiedliche Partikelmorphologie mit unterschiedlichen Verhältnissen der Wirkstoffe im Partikel in Zusammenhang gebracht werden.

Durch das vorgestellte Verfahren lässt sich ein Kombinationspräparat zur Therapie des Asthmas herstellen, das die synergistische Wirkung der beiden Wirkstoffe Salmeterolxinafoat und Fluticasonpropionat optimal ausnutzen kann, da die Wirkstoffe durch die Formulierung bereits auf partikulärer Ebene kombiniert werden und dadurch an denselben Wirkort gelangen.

8 abstract (english version)

In this work, a novel method for the formulation of dry powders for inhalation containing two active ingredients is described. The active ingredients used are Salmeterol xinafoate, a long acting β_2 -agonist, and Fluticasone propionate, a corticosteroid, which are both utilised in the therapy of asthma with a severity of stage three and four. Recent studies suggest a synergistic effect of these substances when acting at the same target cell in the lung. For this, both substances have to be co-deposited at the same place in the respiratory tract after inhalation. The formulations of the combination products being currently on the market, exclusively work with physical mixtures of β_2 -agonist and corticosteroid to address co-deposition in the lung.

In this work, co-precipitation as a novel formulation approach is utilised for the production of particles capable of being inhaled and containing both active ingredients. For the precipitation, both substances are dissolved in a therapeutic ratio in an organic solvent. This solution is then mixed with the non-solvent water containing surface active additives in a ratio of 1 + 10 with continuous mixing in a micromixer. The obtained dispersion is spraydried subsequently to obtain a dry powder capable of being filled in a capsule and being dispersed with the help of an inhalation device. It is shown, that the solvent used for the precipitation, influences the resulting particle shape. A precipitation from methanol results in elongated needle-like particles having a good particle fraction of about 30% after aerodynamic assessment with the Next Generation Pharmaceutical Impactor (NGI). Further on, the choice of excipient and its concentration influences the particle size of the precipitate and its aerodynamic behaviour. Within the developed additive combination of Polysorbate 80 and hydroxypropyl methylcellulose (HPMC), Polysorbate can alter particle size and minimise particle growth after precipitation

while HPMC can influence the aerodynamic behaviour depending on the used concentration. An excess concentration of HPMC results in small excipient spheres being evenly distributed throughout the dry product and acting as dispersion modifier. With an optimised formulation containing 0.01% Polysorbate 80 and 0.05% HPMC in the non-solvent solution, powders with about 50% drug content and with a fine particle fraction of more than 40% can be produced. In contrast to most of the dry powder inhalation formulations, the use of a coarse carrier like lactose can be avoided with these formulations. The two drugs are distributed very evenly throughout the stages of the NGI indicating good co-deposition. A closer analysis of the single particle composition with fluorescence microscopy and Raman microscopy revealed that every particle contains Salmeterol xinafoate as well as Fluticasone propionate. The proportion varies with differences in particle morphology.

With the method described, a combination product can be created, which utilises the synergistic effect of β_2 -agonist and corticosteroid in an advantageous way, as the substances are already combined on a particulate level by the formulation and with this delivers both drugs to the same site of action.

9 Anhang

9.1 Abkürzungen

µg	Mikrogramm (10^{-6} Gramm)
µm	Mikrometer (10^{-6} Meter)
2θ	2 Theta (Winkelmaß in der Röntgendiffraktometrie)
AC	Adenylatcyclase
ACI	Andersen Cascade Impactor
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CE	circular equivalent diameter
CLSM	confocal laser scanning microscope
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
CYP450	Cytochrom P450 - Enzymsystem
CysLT	Cysteinyl-Leukotrien-Rezeptor
DNA	desoxy ribonucleic acid
DPI	dry powder inhaler
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
DSC	differential scanning calorimetry
DVS	dynamic vapour sorption
ECD	effective cutoff diameter
ECF	eosinophile chemotaktische Faktoren
EPR-2	expert panel report 2
FCKW	Fluor-Chlor-Kohlenwasserstoff
FDA	Food and Drug Administration
FEV ₁	forced expiratory flow _{1minute}
FP	Fluticasonpropionat
FPF	Feinpartikelfraktion
FVC	forced vital capacity
g	Gramm
GC	Glucocorticoid
GDP	Guanosindiphosphat
GM-CSF	Granulozyten- und Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor
GRAS	generally recognised as safe

GRE	glucocorticoid response element
GSD	geometric standard deviation
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HFA	Hydroflouralkan
HPLC	high performance liquid chromatography
HPMC	Hydroxypropylmethylcellulose
HS	Hilfsstoff
ICS	inhaled corticosteroid
IgE	Immunglobulin E
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
kg	Kilogramm (10^3 Gramm)
kPa	Kilopascal (10^3 Pascal)
kV	Kilovolt (10^3 Volt)
l	Liter
LABA	long acting beta-agonist
LM	Lösemittel
log P	Logarithmus des Verteilungskoeffizienten
LTRA	Leukotrien-Rezeptor-Antagonisten
m/m	Masse pro Masse
m/V	Masse pro Volumen
mA	Milliampere (10^{-3} Ampere)
MAP	mitogen-activated-pathway
MCP	Monozyten-chemoattraktives Protein
mg	Milligramm (10^{-3} Gramm)
min	Minute
ml	Milliliter (10^{-3} Liter)
MLCK	myosin light chain kinase
mm	Millimeter (10^{-3} Meter)
MMAD	mass median aerodynamic diameter
MOC	multi orifice collector
mPa·s	Millipascal · Sekunde
MSLI	Multi Stage Liquid Impinger
mW	Milliwatt (10^{-3} Watt)

n	Anzahl der Versuche
n.a.	nicht anwendbar
NCF	neutrophile chemotaktische Faktoren
NGI	Next Generation Pharmaceutical Impactor
NHLBI	National Heart Lung and Blood Institute
n-LM	Nichtlösemittel
nm	Nanometer (10^{-9} Meter)
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
p	Signifikanzlevel
PDE	Phosphodiesterasen
PEF	peak expiratory flow
pH	potentia hydrogenii
pMDI	pressurised metered dose inhaler
PVA	Polyvinylalkohol
PVP	Polyvinylpyrrolidon
Q	Flussrate
REM	Rasterelektronenmikroskopie
rF	relative Feuchte
RNA	ribonucleic acid
RP	reverse phase
SABA	short acting beta-agonist
sec	Sekunde
SX	Salmeterolxinafoat
T	Teil
USA	United States of America
V/V	Volumen pro Volumen
W/g	Watt pro Gramm
WS	Wirkstoff
X ₁₀	10% Quantil der Partikelgrößenverteilung
X ₅₀	50% Quantil der Partikelgrößenverteilung
X ₉₀	90% Quantil der Partikelgrößenverteilung
z.B.	zum Beispiel

9.2 verwendete Substanzen

Aceton

99,5% Reinheit (HPLC-Reinheit)

J.T. Baker, Deventer, Holland

Acetonitril

99,8% Reinheit (HPLC-Reinheit)

J.T. Baker, Deventer, Holland

Aerosil

Evonik Degussa, Essen

Aerosil R 972

Evonik Degussa, Essen

Ammoniumacetat

Merck, KGaA, Darmstadt

Aqua bidest.

frisch hergestellt

FinnAqua 75 Anlage, San Asalo Sohlberg Corp., Helsinki, Finnland

Brij 35

ICI Specialty Chemicals, Essen

Ethanol 96%

reinst

Merck KGaA, Darmstadt

Ethylcellulose

Herkules, USA

Fluticasonpropionat

Charge 05ST75.HQ000011.02

Hovione, Portugal

mikronisiertes Pulver, gelagert bei Raumtemperatur über Silicagel im Exsikkator

Gelatine

Gelita Pharmagelatine 180 Bloom Typ B

DGF Stoess, Eberbach

Glycerol

Charge 2495

Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen

Hydroxypropylmethylcellulose

Metolose 60 SH 50

Shin-Etsu Chemicals, Japan

Laktose

Capsulac 60 Inh
Charge 444
Meggle, Wasserburg

Leucin

Merck Chemikalien, Darmstadt

Magnesiumstearat

Mallinckrodt, USA

Methanol

99,8% Reinheit (HPLC-Reinheit)
J.T. Baker, Deventer, Holland

Na-Alginat

Fluka Chemie, Buchs, Schweiz

Poloxamer 188

Lutrol F 68
BASF, Ludwigshafen

Polysorbat 20

Tween 20
Caelo, Hilden

Polysorbat 65

Tween 20
Caelo, Hilden

Polysorbat 80

Tween 80, Charge 13683082
Caelo, Hilden

Polyvinylalkohol

MW 30000
Sigma Chemical Co., St. Louis, USA

Polyvinylpyrrolidon

Kollidon K 25
Charge 51-7482
BASF, Ludwigshafen

Salmeterolxinafoat

Charge 2004013144
Midas Pharma, Ingelheim
mikronisiertes Pulver, unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur über Silicagel im
Exsikkator gelagert

Tetrabutylammoniumhydrogensulfat
Fluka Chemie, Buchs, Schweiz

10 Literaturverzeichnis

Aerodynamische Beurteilung feiner Teilchen: Gerät E in Pharm. Eur. , 5.01, (2005a) 3746-3751

Expert panel report 2 (EPR-2): Guidelines for the diagnosis and management of asthma (and update 2002), NIH Publication, (1997/2002) 1-146

Expert Panel Report 3 (EPR-3): Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma-Summary Report 2007, J Allergy Clin Immunol, 120 (2007) S94-138

ISO 13320-1: Particle size analysis- Laser diffraction methods-Part 1: General principles, (1999)

Zubereitungen zur Inhalation: Pulver zur Inhalation in Pharm. Eur., 5.01, (2005b) 3793-3795

Adcock, I. M., Maneechotesuwan, K. und Usmani, O., Molecular interactions between glucocorticoids and long-acting beta-2-agonists, J Allergy Clin Immunol, 110 (2002) S261-268

Ahlneck, C. und Zografi, G., The molecular basis of moisture effects on the physical and chemical stability of drugs in the solid state, Int J Pharm, (1990) 87-95

Allen, D. B., Bielory, L., Derendorf, H., Dluhy, R., Colice, G. L. und Szeffler, S. J., Inhaled Corticosteroids: past lessons and future issues, J Allergy Clin Immunol, 112 (2003) 1-40

Amin, K., Ludviksdottir, D., Janson, C., Nettelbladt, O., Bjornsson, E., Roomans, G. M., Boman, G., Seveus, L. und Venge, P., Inflammation and structural changes in the airways of patients with atopic and nonatopic asthma. BHR Group, Am J Respir Crit Care Med, 162 (2000) 2295-2301

Baenkler, H.-W., Salicylatintoleranz, Deutsches Ärzteblatt, 105 (2008) 137-142

Barnes, P. J., Drugs for asthma, Br J Pharmacol, 147 (2006) S297-303

Barnes, P. J., Pathophysiology of asthma, *Br J Clin Pharmacol*, 42 (1996) 3-10

Barnes, P. J., Scientific rationale for inhaled combination therapy with long acting beta(2)-agonists and corticosteroids, *Eur Respir J*, 19 (2002) 182-191

Barnes, P. J., Theophylline: New Perspectives for an Old Drug, *Am J Respir Crit Care Med*, 167 (2003) 813-818

Barnes, P. J. und Adcock, I. M., How do corticosteroids work in asthma?, *Ann Intern Med.*, 139 (2003) 359-370

Barnes, P. J., Ito, K. und Adcock, I. M., Corticosteroid resistance in chronic obstructive pulmonary disease: inactivation of histone deacetylase, *Lancet*, 363 (2004) 731-733

Basavoju, S., Boström, D. und Velaga, S. P., Indomethacin-Saccharin Cocrystal: Design, Synthesis and Preliminary Pharmaceutical Characterization, *Pharm Res*, 25 (2008) 530-541

Batchelor, E., Klinowski, J. und Jones, W., Crystal engineering using co-crystallisation of phenazine with dicarboxylic acids, *J. Mater. Chem.*, 10 (2000) 839-848

Bauer, Frömming und Führer, *Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie in Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft*, Stuttgart (2006)

Beach, S., Latham, D., Sidgwick, C., Hanna, M. und York, P., Control of the physical form of salmeterol xinafoate, *Org. Process R&D*, 3 (1999) 370-376

Bernhard, F., Einfluss der Oberflächenbeschaffenheit von Laktose auf die Inhalationseigenschaften interaktiver Pulvermischungen, *Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Christian-Albrechts-Universität, Kiel* (2006)

Beyer, C. und Maasz, J., Röntgendiffraktometrie in der Pharmazie, *Pharmazie Zeit*, 16 (1987) 12-29

Boese, R., Kirchner, M. T., Gehrke, A., Bendele, T. und Sustmann, R., Co-crystallisation - the supramolecular synthesis

Borgström, L., Asking, L. und Lipniunas, P., An in vivo and in vitro comparison of two powder inhalers following storage at hot/humid conditions, *J Aerosol Med*, 18 (2005a) 304-310

Borgström, L., Asking, L. und Thorsson, L., Idealhalers or realhalers? A comparison of Diskus and Turbuhaler, *Int J Clin Pract*, 59 (2005b) 1488-1495

Bosquillon, C., Lombry, C., Préat, V. und Vanbever, R., Influence of formulation excipients and physical characteristics of inhalation dry powders on their aerosolization performance, *J Control Release*, 70 (2001) 329-339

Bousquet, J., Jeffery, P. K., Busse, W. W., Johnson, M. und Vignola, A. M., Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling, *Am J Respir Crit Care Med*, 161 (2000) 1720-1745

Buhl, R., Berdel, D., Criée, C.-P., Gillissen, A., Kardos, P., Kroegel, C., Leupold, W., Lindemann, H., Magnussen, H., Nowak, D., Pfeiffer-Kascha, D., Rabe, K., Rolke, M., Schultze-Werninghaus, G., Sitter, H., Ukena, D., Vogelmeier, C., Welte, T., Wettengel, R. und Worth, H., Leitlinie zur Diagnose und Therapie von Patienten mit Asthma, *Pneumologie*, 60 (2006) 139-183

Byren, S. R., Introduction in Solid state chemistry of drugs, Academic Press, New York (1982) 3-26

Cazzola, M., Testi, R. und Matera, M. G., Clinical pharmacokinetics of salmeterol, *Clin. Pharmacokin.*, 41 (2002) 19-30

Cejka, J., Kratochvil, B. und Jegorov, A., Crystal structure of fluticasone propionate, *Z. Kristallogr. NCS*, 220 (2005) 1-2

Chapman, K. R., The Role of Anticholinergic Bronchodilators in Adult Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease, *Lung*, (1990) S295-303

Chew, N. Y. K. und Chan, H.-K., The role of particle properties in pharmaceutical powder inhalation formulations, *J Aerosol Med*, 15 (2002) 325-330

Chow, A. H. L., Tong, H. H. Y., Chattopadhyay, P. und Shekunov, B. Y., Particle Engineering for Pulmonary Drug Delivery, *Pharm. Res.*, 24 (2007) 411-437

Cooper, S. M., Glaxo Group Ltd., A novel polymorphic crystalline form of fluticasone propionate, a method for its production and pharmaceutical compositions thereof, WO 98/17676, GB, (1998)

Corrigan, D. O., Corrigan, O. I. und Healy, A. M., Physicochemical and in vitro deposition properties of salbutamol sulphate/ipratropium bromide and salbutamol sulphate/excipient spray dried mixtures for use in dry powder inhalers, *Int J Pharm*, 322 (2006) 22-30

Cosío, B. G., Mann, B., Ito, K., Jazrawi, E., Barnes, P. J., Chung, K. F. und Adcock, I. M., Histone acetylase and deacetylase activity in alveolar macrophages and blood monocytes in asthma, *Am J Respir Crit Care Med*, 170 (2004) 141-147

Crowder, T. M., Louey, M. D., Sethuraman, V. V., Smyth, H. D. C. und Hickey, A. J., 2001: An Odyssey in Inhaler Formulation and Design, *Pharm Technol*, (2001) 99-113

Duro, R., Gómez-Amoza, J. L., Martínez-Pacheco, R., Souto, C. und Concheiro, A., Adsorption of polysorbate 80 on pyrantel pamoate: effects on suspension stability, *Int J Pharm*, 165 (1998) 211-216

Edsbäcker, S., Wollmer, P., Selroos, O., Borgström, L., Olsson, B. und Ingelf, J., Do airway clearance mechanisms influence the local and systemic effects of inhaled corticosteroids?, *Pulm Pharmacol Ther*, doi:10.1016/j.pupt.2007.08.005 (2007)

Eickelberg, O., Roth, M., Lörx, R., Bruce, V., Rüdiger, J., Johnson, M. und Block, L.-H., Ligand-independent activation of the glucocorticoid receptor by beta(2)-adrenergic receptor agonists in primary human lung fibroblasts and vascular smooth muscle cells, *J. Biol. Chem.*, 274 (1999) 1005-1010

Elversson, J., Spray dried powders for inhalation, Faculty of Pharmacy, Uppsala University, Uppsala (2005)

Feddah, M. R., Brown, K. F., Gipps, E. M. und Davies, N. M., In-Vitro Characterisation Of Metered Dose Inhalers Versus Dry Powder Inhaler

Glucocorticoid Products: Influence Of Inspiratory Flow Rates, J Pharm Pharmaceut Sci, 3 (2000) 317-324

Fleischman, S. G., Kuduva, S. S., McMahon, J. A., Moulton, B., Bailey Walsh, R. D., Rodriguez-Hornedo, N. und Zaworotko, M. J., Crystal Engineering of the Composition of Pharmaceutical Phases: Multiple-Component Crystalline Solids Involving Carbamazepine, Crystal Growth & Design, 3 (2003) 909-919

Frank, C. J., Review of pharmaceutical applications of Raman Spectroscopy in Analytical applications of Raman spectroscopy, Pelletier, M. J., Blackwell Science, Oxford (1999) 224-275

Gavin, B. C. und Sykes, J. A., Glaxo Group Ltd., Pharmaceutical Combinations comprising Salmeterol and Fluticasone propionate for the treatment of asthma WO03/033000A1, GB, (2003)

Gehring, U., Glukokortikoidrezeptoren: Grundlage für das Verständnis differenzierter klinischer Wirkungen von Glukokortikoiden, Medizinische Klinik, 99 (2004) 228-235

Haleblian, J. K., Characterization of habits and crystalline modification of solids and their pharmaceutical applications, J Pharm Sci, 64 (1975) 1269-1287

Hancock, B. C. und Zografi, G., Characteristics and significance of the amorphous state in pharmaceutical systems, J. Pharm. Sci., 86 (1997) 1-12

Hessel, V., Löwe, H. und Schönfeld, F., Micromixers - a review on passive and active mixing principles, Chem Eng Sci, 60 (2005) 2479-2501

Hickey, A. J., Concessio, N. M., Van Oort, M. und Platz, R. M., Factors Influencing the dispersion of Dry Powders as Aerosols, Pharm Technol, (1994) 58-64

Hickey, A. J., Martonen, T. B. und Yang, Y., Theoretical relationship of lung deposition to the fine particle fraction of inhalation aerosols, Pharm Acta Helv, 71 (1996) 185-190

Holt, S., Masoli, M. und Beasley, R., Increasing compliance with inhaled corticosteroids through the use of combination therapy, *J Allergy Clin Immunology*, (2004) 219-220

Horn, D. und Rieger, J., Organische Nanopartikel in wässriger Phase - Theorie, Experiment und Anwendung, *Angew. Chem.*, 113 (2001) 4460-4492

Howarth, P. H., Knox, A. J., Amrani, Y., Tliba, O., Pannetieri, R. A. und Johnson, M., Synthetic responses in airway smooth muscle, *J Allergy Clin Immunol*, 114 (2004) S32-50

Hussain, M. und Anwar, J., The Riddle of resorcinol Crystal Growth Resvisited: molecular Dynamics Simulations of alpha-Resorcinol Crystal - Water Interface, *J Am Chem Soc*, 121 (1999) 8583-8591

Ikegami, K., Kawashima, Y., Takeuchi, H. und Yamamoto, H., A new agglomerated KSR-592 beta-form crystal system for dry powder inhalation formulation to improve inhalation performance in vitro and in vivo, *J Control Release*, 88 (2003) 23-33

Schematic presentation of the assembly in the micro mixing system, *IMM* (2004)

Jackson, C. M. und Lipworth, B., Benefit-risk assessment of long-acting beta(2)-agonists in asthma, *Drug Safety*, 27 (2004) 243-270

Jähnisch, K., Hessel, V., Löwe, H. und Baerns, M., Chemie in Mikrostrukturreaktoren, *Angew. Chem.*, 116 (2004) 410-451

Johnson, M., Effects of beta-2-agonists on resident and infiltrating inflammatory cells, *J Allergy Clin Immunol*, 110 (2002) S282-290

Joshi, V., Dwivedi, S. und Ward, G. H., Increase in the specific surface area of budesonide during storage postmicronisation, *Pharm. Res.*, 19 (2002) 7-12

Kamiya, A., Sakagami, M., Hindle, M. und Byron, P. R., Aerodynamic sizing of metered dose inhalers: an evaluation of the Andersen and Next Generation Pharmaceutical impactors and their USP methods, *J Pharm Sci*, 93 (2004) 1828-1837

Kariuki, B. M., Psallidas, K., Harris, K. D., R.L., J., Lancaster, R. W., Staniforth, S. E. und Cooper, S. M., Structure determination of a steroid directly from powder diffraction data, Chem Commun, (1999) 1677-1678

Kegel, J., Formulierung und Charakterisierung steroidaler ‚NanoCompounds‘ mit Hilfe eines aufbauenden Verfahrens, Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Christian-Albrechts-Universität, Kiel (2006)

Kleppmann, W., Taschenbuch Versuchsplanung in Praxisreihe Qualitätswissen (Brunner, F. J.), Hanser, München (2001)

Knorr, B., Franchi, L. M., Bisgaard, H., Vermeulen, J. H., LeSouef, P., Santanello, N., Michele, T. M., Reiss, T. F., Nguyen, H. H. und Bratton, D. L., Montelukast, a leukotriene receptor antagonist, for the treatment of persistent asthma in children aged 2 to 5 years, Pediatrics, 108 (2001) E48

Kroegel, C., Jäger, L. und Walker, C., Is there a place for intrinsic asthma as a distinct immunopathological entity?, Eur Respir J, 10 (1997) 513-515

Lahav, M. und Leiserowitz, L., The effect of solvent on crystal growth and morphology, Chem. Eng. Sci., 56 (2001) 2245-2253

Learoyd, T. P., Burrows, J. L., French, E. und Seville, P. C., Chitosan-based spray-dried respirable powders for sustained delivery of terbutaline sulfate, Eur J Pharm Biopharm., epub ahead of print (2007)

Lötvall, J., The long and short of beta(2)-agonists, Pulm. Pharm. Ther., 15 (2002) 497-501

Lucas, P., Anderson, K., Potter, U. J. und Staniforth, J. N., Enhancement of Small Particle Size Dry Powder Aerosol Formulations using an Ultra Low Density Additive, Pharm. Res., 16 (1999) 1643-1647

Lucas, P., Anderson, K. und Staniforth, J. N., Protein Deposition from Dry Powder Inhalers: Fine Particle Multiplets as Performance Modifiers, Pharm. Res., 15 (1998) 562-569

Lucks, J. S., Müller, B. W. und Müller, R. H., Inorganic suspensions - interaction with salts and ionic surfactants, Int J Pharm, 58 (1990) 229-235

Mak, J., Nishikawa, M. und Barnes, P., Glucocorticosteroids increase beta (2) adrenergic receptor transcription in human lung, *American Journal of Physiology*, 268 (1995) L41-46

Marple, V. A., Olson, B. A., Santhanakrishnan, K., Mitchell, J. P., Murray, S. C. und Hudson-Curtis, B. L., Next generation pharmaceutical impactor (a new impactor for pharmaceutical inhaler testing). Part II: Archival calibration, *J Aerosol Med*, 16 (2003a) 301-324

Marple, V. A., Olson, B. A., Santhanakrishnan, K., Roberts, D. L., Mitchell, J. P. und Hudson-Curtis, B. L., Next Generation Pharmaceutical Impactor: A New Impactor for Pharmaceutical Inhaler Testing. Part III. Extension of Archival Calibration to 15 L/min, *J Aerosol Med*, 17 (2004) 335-343

Marple, V. A., Roberts, D. L., Romay, F. J., Miller, N. C., Truman, K. G., Van Oort, M., Olsson, B., Holroyd, M. J., Mitchell, J. P. und Hochrainer, D., Next generation pharmaceutical impactor (a new impactor for pharmaceutical inhaler testing). Part I: Design, *J Aerosol Med*, 16 (2003b) 283-299

Matthews, J. G., Ito, K. und Barnes, P. J., Defective glucocorticoid receptor nuclear translocation and altered histone acetylation patterns in glucocorticoid-resistant patients, *J. Allergy Clin Immunol*, 113 (2004) 1100-1108

Matz, J., Emmett, A., Rickard, K. und Kalberg, C., Addition of salmeterol to low-dose fluticasone versus higher-dose fluticasone: an analysis of asthma exacerbations, *J Allergy Clin Immunol*, 107 (2001) 783-789

Michael, Y., Chowdhry, B. Z., Ashurst, I. C., Snowden, M. J., Davies-Cutting, C. J. und Gray, S., The physico-chemical properties of salmeterol and fluticasone propionate in different solvent environments, *Int J Pharm*, 200 (2000) 279-288

Michaels, A. S. und Colville, A. R., The effect of surface active agents on crystal growth rate and crystal habit, *J Phys Chem*, 64 (1960) 13-19

Minto, C., Li, B., Tattam, B., Brown, K. F., Seale, J. P. und Donnelly, R., Pharmacokinetics of epimeric budesonide and fluticasone propionate after repeat dose inhalation – intersubject variability in systemic absorption from the lung, *Br J Clin Pharmacol*, 50 (2000) 116-124

Mitchell, J. P. und Nagel, M. W., Cascade impactors for the size characterisation of aerosols from medical inhalers: their uses and limitations, *J Aerosol Med*, 16 (2003) 341-377

Mitchell, J. P. und Nagel, M. W., Particle Size Analysis of Aerosols from Medicinal Inhalers, *KONA*, 22 (2004) 32-65

Möller, W., Kohlhäufel, M., Häußinger, K. und Heyder, J., Pneumological Diagnostics by means of models aerosols, *Pneumologie*, 56 (2002) 503-510

Mosen, K., Backstrom, K., Thalberg, K., Schaefer, T., Axelsson, A. und Kristensen, H. G., The apparent plasticizing effect of polyethylene glycol (PEG) on the crystallinity of spray dried lactose/PEG composites, *Eur J Pharm Biopharm.*, 64 (2006) 206-211

Murnane, D., Marriott, C. und Martin, G. P., Comparison of salmeterol xinafoate microparticle production by conventional and novel antisolvent crystallization, *Eur J Pharm Biopharm.*, epub ahead of print... (2007)

Mykhaylova, V., Urbanetz, N. A. und Schmitz, A., New concepts of dry powder inhalation: powder blends of drug microparticles and nanoparticles acting as spacers, 5th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Geneva (2006)

Najafabadi, A. R., Gilani, K., Barghi, M. und Rafiee-Tehrani, M., The effect of vehicle on physical properties and aerosolisation behaviour of disodium cromoglycate microparticles spray dried alone or with L-leucine, *Int J Pharm*, 285 (2004) 97-108

Nelson, H. S., Chapman, K. R. und Pyke, S. D., Enhanced synergy between fluticasone propionate and salmeterol inhaled from a single inhaler versus separate inhalers, *J Allergy Clin Immunology*, 112 (2003) 29-36

Palmer, J. B. D., Glaxo Group Ltd., Inhalation medicaments, GB2235627A, GB, (1991)

Panettieri, R. A., Airway smooth muscle: an immunomodulatory cell, *J Allergy Clin Immunol*, 110 (2002) S269-S274

Payne, D. A., Adcock, I. M., Wilson, N. M., Oates, T., Scallan, M. und Bush, A., Relationship between exhaled nitric oxide and mucosal eosinophilic inflammation in children with difficult asthma, after treatment with oral prednisolone, *Am J Respir Crit Care Med*, 164 (2001) 1376-1381

Raghavan, S. L., Trividic, A., Davis, A. F. und Hadgraft, J., Crystallization of hydrocortisone acetate: influence of polymers, *Int J Pharm*, 212 (2001) 213-221

Rasenack, N., Optimierung physiko-chemischer Arzneistoffeigenschaften durch Verfahren zur kontrollierten Kristallisation, Institut für Pharmazeutische Technologie, Christian-Albrechts-Universität, Kiel (2003)

Rasenack, N., Hartenauer, H. und Müller, B., Microcrystals for dissolution rate enhancement of poorly water-soluble drugs, *Int J Pharm*, 254 (2003) 137-145

Rehman, M., Kippax, P. und York, P., Particle engineering for improved dispersion in dry powder inhalers, *Pharm. Tech. Eur.*, sept (2003) 34-39

Reinhardt, D., Berg, A. v. und Lemoine, H., Die Langzeit-beta2-Mimetika Formoterol und Salmeterol im Vergleich, *Monatsschr Kinderheilkd*, 149 (2001) 934-948

Remenar, J. F., Morissette, S. L., Peterson, M. L., Moulton, B., MacPhee, J. M., Guzman, H. R. und Almarsson, Ö., Crystal engineering of novel cocrystals of a triazole drug with 1,4-dicarboxylic acids, *J. Am. Chem. Soc.*, 125 (2003) 8456-8457

Restrepo, R. D., Inhaled Anticholinergics in Obstructive Airway Disease, *Resp. Care*, 52 (2007) 833-851

Reynolds, N. A., Lyseng-Williamson, K. A. und Wiseman, L. R., Inhaled salmeterol/fluticasone propionate: a review of its use in asthma, *Drugs*, 65 (2005) 1715-1734

Roche, W. R., Fibroblasts and Asthma, *Clin Exp Allerg*, 21 (1991) 545-548

Rodriguez-Spong, B., Price, C. P., Jayasankar, A., Matzger, A. J. und Rodriguez-Hornedo, N., General principles of pharmaceutical solid

polymorphism: a supramolecular perspective, *Adv Drug Del Rev*, 56 (2004) 241-274

Rodrigo, G. J., Rapid Effects of Inhaled Corticosteroids in Acute Asthma, *Chest*, 130 (2006) 1301-1311

Röthele, S. und Witt, W., Laser Diffraction: millenium-link to particle size analysis, *Powder Handling & Process.* , 11 (1999)

Salathe, M., Effects of beta-agonists on airway epithelial cells, *J Allergy Clin Immunol*, 110 (2002) S275-S281

Schenk, R., Hessel, V., Jongen, N., Buscaglia, V., Guillemet-Fritsch, S. und Jones, A. G., Nanopowders produced using microreactors, *ENN*, 7 (2004) 287-296

Schmidt, P. C. und Weyhing, K., Pulverinhalate aus der Nähe betrachtet, *DAZ*, 145 (2005) 68-75

Sin, D. D. und Man, S. F. P., Corticosteroids and adrenoceptor agonists: The compliments for combination therapy in chronic airways diseases, *Eur J Pharmacol* 533 (2006) 28-35

Spiess, G., Eine einfache Einführung in die Raman-Spektroskopie, LMU München (1999)

Staniforth, J. N., Pre-Formulation Aspects of Dry Powder Aerosols, *Respiratory Drug Delivery V*, Illinois, USA (1996)

Steckel, H. und Bolzen, N., Alternative sugars as potential carriers for dry powder inhalations, *Int J Pharm*, 270 (2004) 297-306

Tak, P. P. und Firestein, G. S., NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases, *J Clin Invest*, 107 (2001) 7-11

Telko, M. J. und Hickey, J. A., Dry Powder Inhaler Formulation, *Resp. Care*, 50 (2005) 1209-1227

Texter, J., Precipitation and Condensation of Organic Particles, *J. Disp. Sci*, 22 (2001) 499-527

Theophilus, A., Moore, A., Prime, D., Rossomanno, S., Whitcher, B. und Chrysosyn, H., Co-deposition of salmeterol and fluticasone propionate by a combination inhaler, *Int J Pharm*, 313 (2006) 14-22

Tong, H. H. Y. und Chow, A. H. L., Control of Physical Forms of Drug Particles for Pulmonary Delivery by Spray Drying and Supercritical Fluid Processing, *KONA*, 24 (2006) 27-40

Tong, H. H. Y., Shekunov, B. Y., York, P. und Chow, A. H. L., Characterization of two polymorphs of Salmeterol xinafoate crystallized from supercritical fluids, *Pharm. Res.*, 16 (2001) 852-858

Tong, H. H. Y., Shekunov, B. Y., York, P. und Chow, A. H. L., Influence of polymorphism on the surface energetics of salmeterol xinafoate crystallized from supercritical fluids, *Pharm. Res.*, 19 (2002) 640-648

Tong, H. H. Y., Shekunov, B. Y., York, P. und Chow, A. H. L., Thermal analysis of trace levels of polymorphic impurity in salmeterol xinafoate samples, *Pharm. Res.*, (2003) 1423-1429

Varma, R. K., Kaushal, R., Junnarkar, A. Y., Thomas, G. P., Naidu, M. U., Singh, P. P., Tripathi, R. M. und Shridhar, D. R., Polysorbate 80: a pharmacological study, *Arzneimittelforschung*, 53 (1985) 804-808

Vippagunta, S. R., Brittain, H. G. und Grant, D. J. W., Crystalline solids, *Adv Drug Del Rev*, 48 (2001) 3-26

Voshaar, T., App, E. M., Berdel, D., Buhl, R., Fischer, J., Gessler, T., Haidl, P., Heyder, J., Köhler, D., Kohlhäufel, M., Lehr, C.-M., Lindemann, H., Matthys, H., Meyer, T., Olschewski, H., Paul, K. D., Rabe, K., Raschke, F., Scheuch, G., Schmehl, T., Schulze-Werninghaus, G., Ukena, D. und Worth, H., Empfehlungen für die Auswahl von Inhalationssystemen zur Medikamentenverabreichung, *Pneumologie*, 55 (2001) 579-586

Ward, C. und Walters, H., Airway wall remodelling: the influence of corticosteroids, *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 5 (2005) 43-48

Ward, G. H. und Schultz, R. K., Process-Induced Crystallinity Changes in Albuterol Sulfate and Its Effect on Powder Physical Stability, *Pharm. Res.*, 12 (1995) 773-779

Winkler, J., Hochhaus, G. und Derendorf, H., Pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters of inhaled and intranasal corticosteroids, *Proc Am Thorac Soc*, 1 (2004) 356-363

Yu, L., Amorphous pharmaceutical solids: preparation, characterization and stabilization, *Adv Drug Del Rev*, 48 (2001) 27-42

Yu, L., Reutzel, M. und Stephenson, G. A., Physical characterization of polymorphic drugs: an integrated characterization strategy, *PSTT*, 1 (1998) 118-127

Zeng, X. M., Martin, G. P., Tee, S.-T. und Marriott, C., The role of fine particle lactose on the dispersion and deaggregation of salbutamol sulphate in an airstream in vitro, *Int J Pharm*, 176 (1998) 99-110

Zhou, J., Kang, Z. M., Xie, Q. M., Liu, C., Lou, S. J., Chen, Y. Z. und Jiang, C. L., Rapid nongenomic effects of glucocorticoids on allergic asthma reaction in the guinea pig, *J Endocrinol*, 177 (2003) R1-4

Zijlstra, G. S., Hinrichs, W. L., de Boer, A. H. und Frijlink, H. W., The role of particle engineering in relation to formulation and de-agglomeration principle in the development of a dry powder formulation for inhalation of cetorelix, *Eur J Pharm Sci*, 23 (2004) 139-149

DANKSAGUNG

Zu guter Letzt bleibt, Danke zu sagen.

Zuerst möchte ich mich von Herzen bei meinem Doktorvater Professor Dr. H. Steckel (Hardy) bedanken, der mich auf seine nordisch-unkomplizierte Art in seinen Arbeitskreis aufgenommen hat, mir dieses schöne Thema vorgeschlagen hat und mir vom ersten Tag an mit seinem Rat zur Seite stand. Du hast eine wunderbare Art, Dinge zu leiten und doch geschehen zu lassen. Ich bin froh, dass die „Fernbetreuung“ von Berlin aus in Deinem Ruf zurück nach Kiel ein gutes Ende gefunden hat und der Lehrstuhl wieder einen guten Chef hat. Professor Dr. Dr. B. W. Müller möchte ich Danke sagen für die großartige Arbeit, die die Pharmazeutische Technologie in Kiel zu dem gemacht hat, was sie heute ist – und er nimmt glücklicherweise ja immer noch großen Anteil daran. Professor Müller war immer für fachliche Gespräche offen und ebenso auch für einen Schwatz auf dem Flur. Vielen Dank dafür. Als ich im Sommer 2004 meine Promotion begonnen habe, bin ich in einen Arbeitskreis hineingewachsen, in dem ich mich schnell wohl gefühlt habe. Daran hatte vor allem mein langjähriger Laborkollege Lars großen Anteil. Vielen Dank für unsere schöne gemeinsame Zeit, für viele Gespräche und auch für Deine große Schulter, an der man sich manchmal anlehnen konnte. Daneben möchte ich aus dem „alten“ Arbeitskreis auch Günter und Inga-Lis noch einmal Danke sagen. Die beiden haben mir mit ihrer Art viel Mut gemacht. Mit Malte und Frank hatte ich viele lustige, interessante und manchmal auch wissenschaftliche Diskussionen, die den Alltag gewürzt haben, vielen herzlichen Dank dafür. Frank ist mir darüber hinaus ein lieber Freund, dem auch noch ein großes Dankeschön für das Korrekturlesen meiner Arbeit gebührt. Dieses Dankeschön hat auch Christian verdient, der sich außerdem für den Arbeitskreis sehr engagiert. Christian, dafür kann man

Dir nicht genug danken. Davon könnten sich andere gelegentlich gerne etwas anschauen. Außerdem gehört Christian gemeinsam mit Holger, Marieke und Claudia zur Mittagsessensrunde, die ich nicht missen möchte. Ein Dankeschön gebührt auch meiner neuen Laborkollegin Claudia für ein gutes Miteinander in Raum 106, viele Gespräche und manch kleine Überraschung. Meinem REM-Kollegen Thorsten möchte ich für seine unglaublich ruhige, entspannte und hilfsbereite Art danken, mit der er viele Dinge möglich macht. Er ist quasi mein längster Begleiter hier, denn wir haben bereits gemeinsam unser Studium begonnen. Für den Endspurt in Deiner Promotion wünsche ich Dir viel Erfolg und drücke fest die Daumen!

Ebenso möchte ich Regina K., Nora, Hanna, Simone und Maren für die Unterstützung danken, die sie mir als TA-Team geleistet haben. Insbesondere Regina hat sehr viel HPLC-Arbeit für mich gemacht, ein herzliches Dankeschön dafür noch einmal. Unser Urgestein Rüdiger ist ein kleiner Tausendsassa und so kann ich Dir, Rüdi, eigentlich nur für alles Danke sagen. Du hast mir viel Arbeit am Röntgengerät abgenommen, Du hast mir Grafiken gebastelt, wenn meine Nerven das kaum noch ertrugen und Du weißt so viele Geschichten zu erzählen, dass ich Dir tagelang zuhören könnte.

Arne und Detlef danke ich für vielfältige Hilfe bei Computersachen sowie Dirk für alle handwerkliche Hilfe.

Ein großer Dank gebührt auch Janie Dubois von Malvern Instruments, die die Raman-Untersuchungen für mich durchgeführt hat.

Bei allen Kolleginnen und Kollegen möchte ich mich herzlich für die schöne Zeit bedanken, die ich während meiner Promotion hier hatte und zu der jeder auf die eine oder andere Weise beigetragen hat, auch wenn ich Euch vielleicht nun nicht namentlich bedacht habe. Ich wünsche Euch für die Zukunft viel Erfolg und gutes Gelingen bei der Promotion.

Bei meiner Ma und meinem Bruder Johannes möchte ich mich für das große Interesse bedanken, mit dem Ihr meine Arbeit immer begleitet habt. Über alles möchte ich aber Holger danken, der es, in der schweren Lage, Kollege und Freund zu sein, in großartiger Weise geschafft hat, mir immer mit Rat und Tat zur Seite zu stehen, mich durch Höhen und Tiefen begleitet hat und alle meine Launen ertragen hat. Von ganzem Herzen danke, Holger!

LEBENS LAUF

NAME	Regina Westmeier
GEBURTSDATUM	27. Februar 1979
GEBURTSORT	Marburg/ Lahn
STAATSANGEHÖRIGKEIT	deutsch
SCHULBILDUNG	
1985 - 1989	Grundschule, Dreihausen
1989 - 1995	additive Gesamtschule Ebsdorfer Grund, Heskem (Gymnasialzweig)
1995 - 1998	Gymnasium Philippinum, Marburg
JUNI 1998	Abitur
STUDIUM	
1998 - 2003	Studium der Pharmazie an der Christian- Albrechts-Universität zu Kiel (seit 2000 als Stipendiatin des Cusanuswerks)
JULI 2000	1. Staatsexamen
SEPT. 2001 – FEB. 2002	Auslandsaufenthalt an der Royal Danish School of Pharmacy, Kopenhagen
JUNI 2003	2. Staatsexamen
PRAKTISCHE AUSBILDUNG	
JULI 2003 – JUNI 2004	Central – Apotheke, Kiel
JULI 2004	3. Staatsexamen und Approbation als Apothekerin
PROMOTION	
JULI 2004 – JULI 2008	am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, CAU Kiel

Erklärung

Hiermit erkläre ich gemäß § 10 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, dass ich die vorliegende Arbeit, abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer, selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis entstanden und wurde bei keiner anderen Universität zur Begutachtung eingereicht.

Regina Westmeier