

**INSULIN MIKRO- UND NANOPARTIKEL ZUR
PULMONALEN APPLIKATION**

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

**VORGELEGT VON
CLAUDIA KLINGLER**

KIEL 2009

Referent: Prof. Dr. Dr. h. c. B.W. Müller
Korreferent: Prof. Dr. H. Steckel
Tag der Disputation: 04. Dezember 2009
Zum Druck genehmigt: Kiel, den 04. Dezember 2009

Prof. Dr. L. Kipp
(Dekan)

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht in:

Klingler C. und Müller B.W., Precipitation of a protein, DPhG Joint Meeting, Erlangen (2007)

Klingler C., Steckel H. und Müller B.W., Precipitation of insulin microparticles for pulmonary delivery, DDL 19, Edinburgh (2008)

Klingler C., Müller B.W. und Steckel H., Insulin micro- and nanoparticles for pulmonary delivery, Int. J. Pharm. (2009), 377(1-2), 173-9

Meinen Eltern
und meinem Liebsten gewidmet

Man merkt nie, was schon getan wurde, man sieht immer nur, was noch zu tun ist. (Marie Curie)

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. Die in dieser Arbeit verwendeten Produkte werden ohne Verwendung des Warenzeichens genannt.

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG | 1 |
| 1.1 | EINLEITUNG..... | 1 |
| 1.2 | ZIELSETZUNG | 3 |
| 2 | THEORETISCHER TEIL..... | 5 |
| 2.1 | DIABETES MELLITUS | 5 |
| 2.1.1 | KRANKHEITSBILD | 5 |
| 2.1.2 | BEHANDLUNG | 6 |
| 2.1.2.1 | KONVENTIONELLE THERAPIE..... | 7 |
| 2.1.2.2 | ALTERNATIVE THERAPIEANSÄTZE | 9 |
| 2.2 | PULMONALE APPLIKATION VON WIRKSTOFFEN | 10 |
| 2.2.1 | LOKALE WIRKUNG | 13 |
| 2.2.2 | SYSTEMISCHE WIRKUNG..... | 13 |
| 2.2.2.1 | PULMONALE APPLIKATION VON INSULIN | 14 |
| 2.3 | HERSTELLUNG VON PULVERN ZUR INHALATION | 17 |
| 2.3.1 | MAHLUNG | 18 |
| 2.3.2 | PRÄZIPITATION..... | 19 |
| 2.3.3 | SPRÜHTROCKNUNG | 21 |
| 2.3.4 | ALTERNATIVE METHODEN | 23 |
| 2.3.5 | ZIELORIENTIERTE METHODENAUSWAHL | 25 |
| 3 | MATERIALIEN UND METHODEN | 27 |
| 3.1 | MATERIALIEN | 27 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.1.1 | INSULIN | 27 |
| 3.1.2 | ALBUMIN | 29 |
| 3.1.3 | HYDROXYPROPYLMETHYLCELLULOSE (HPMC) | 29 |
| 3.1.4 | L-LEUCIN..... | 30 |
| 3.1.5 | MANNITOL | 31 |
| 3.1.6 | CYCLOHALER..... | 32 |
| 3.1.7 | EXUBERA | 33 |
| 3.1.8 | TWINCER..... | 35 |
| 3.1.9 | MONOHALER..... | 37 |
| 3.2 | METHODEN | 38 |
| 3.2.1 | PRÄPARATIVE METHODEN | 38 |
| 3.2.1.1 | HERSTELLUNG DER LÖSUNGEN | 38 |
| 3.2.1.2 | PRÄZIPITATION | 39 |
| 3.2.1.3 | SPRÜHTROCKNUNG | 41 |
| 3.2.1.4 | LAGERUNG | 43 |
| 3.2.2 | ANALYTISCHE METHODEN | 45 |
| 3.2.2.1 | PHOTONENKORRELATIONSSPEKTROSKOPIE | 45 |
| 3.2.2.2 | LASERDIFFRAKTOMETRIE | 47 |
| 3.2.2.2.1 | NASSDISPERGIERUNG | 48 |
| 3.2.2.2.2 | TROCKENDISPERGIERUNG | 49 |
| 3.2.2.3 | RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE..... | 51 |
| 3.2.2.4 | HOCHDRUCKFLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE..... | 51 |
| 3.2.2.5 | AUSBEUTEBESTIMMUNG | 52 |
| 3.2.2.6 | SÄTTIGUNGSLÖSLICHKEIT | 53 |
| 3.2.2.7 | NEXT GENERATION PHARMACEUTICAL IMPACTOR..... | 53 |
| 3.2.2.8 | THERMOGRAVIMETRIE | 59 |
| 3.2.2.9 | DYNAMISCHE WASSERDAMPFSORPTION | 60 |
| 3.2.2.10 | AKTIVITÄTSBESTIMMUNG VON INSULIN..... | 62 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 3.2.2.11 | BESTIMMUNG DER WAHREN DICHTEN | 62 |
| 3.2.2.12 | BESTIMMUNG DER OBERFLÄCHENSPIANNUNG | 62 |
| 3.2.2.13 | GEFRIERTROCKNUNG | 63 |
| 3.2.2.14 | KLEINWINKELRÖNTGENDIFFRAKTOMETRIE | 63 |
| 3.2.2.15 | STATISTISCHE AUSWERTUNG | 64 |
| 4 | PRAKTISCHER TEIL | 66 |
| 4.1 | FÄLLUNG VON INSULIN | 66 |
| 4.1.1 | LÖSLICHKEIT VON INSULIN | 67 |
| 4.1.2 | FÄLLUNG DURCH PH-ÄNDERUNG | 68 |
| 4.1.3 | FÄLLUNG DURCH LÖSEMITLEÄNDERUNG | 69 |
| 4.1.3.1 | AUSWAHL DES NICHT-LÖSEMITTELS | 71 |
| 4.1.3.2 | EINFLUSS DER INSULIN- UND METHANOLMENGE | 73 |
| 4.1.3.3 | OPTIMIERUNG DES PRÄZIPITATIONSPIROZESSES | 77 |
| 4.1.3.4 | ÜBERTRAGBARKEIT DER FÄLLUNGSMETHODE | 80 |
| 4.1.3.5 | PARTIKELMORPHOLOGIE | 82 |
| 4.1.3.6 | AERODYNAMISCHE CHARAKTERISIERUNG | 87 |
| 4.1.4 | ZUSAMMENFASSUNG | 97 |
| 4.2 | REPRODUZIERBARKEIT | 99 |
| 4.2.1 | PRÄZIPITATION | 99 |
| 4.2.2 | PARTIKELCHARAKTERISTIK | 103 |
| 4.3 | EINFLUSS VON ADDITIVEN | 106 |
| 4.3.1 | HYDROXYPROPYLMETHYLCELLULOSE (HPMC) | 108 |
| 4.3.2 | L-LEUCIN | 116 |
| 4.3.3 | MANNITOL | 123 |
| 4.3.4 | VERGLEICH DER UNTERSCHIEDLICHEN HILFSSTOFFEINFLÜSSE | 130 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 4.3.4.1 | EINFLUSS VON HILFSSTOFFEN UND LAGERUNGSFEUCHTE AUF DAS AERODYNAMISCHE VERHALTEN IM TWINCER..... | 139 |
| 4.3.5 | ZUSAMMENFASSUNG..... | 151 |
| 4.4 | EINFLUSS UNTERSCHIEDLICHER LAGERUNGSBEDINGUNGEN AUF DIE AERODYNAMISCHEN PULVEREIGENSCHAFTEN..... | 154 |
| 4.4.1 | OFFENE LAGERUNG..... | 158 |
| 4.4.2 | DIFFERENZIERUNG DER PULVER MITTELS LASERDIFFRAKTION | 167 |
| 4.4.3 | LAGERUNG IM BLISTER..... | 170 |
| 4.4.4 | EINFLUSS DER UMGEBUNGSFEUCHTE AUF DIE IMPAKTOR-ANALYSE ... | 180 |
| 4.4.5 | ZUSAMMENFASSUNG..... | 185 |
| 4.5 | UNTERSUCHUNG DER KOMBINATION AUS PULVERFORMULIERUNG UND INHALATOR | 188 |
| 4.5.1 | VERGLEICH MIT DEM HANDELSPRODUKT | 188 |
| 4.5.2 | VERGLEICH VERSCHIEDENER INHALATOREN | 197 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT | 202 |
| 6 | ABSTRACT | 205 |
| 7 | ANHANG..... | 207 |
| 7.1 | VERWENDETE SYMBOLE UND ABKÜRZUNGEN..... | 207 |
| 7.2 | LISTE DER VERWENDETEN SUBSTANZEN | 209 |
| 8 | LITERATURVERZEICHNIS..... | 211 |

1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

1.1 EINLEITUNG

Seit der Entdeckung und Gewinnung des Insulins im Jahre 1916 konnte dieses erfolgreich zur Lebensverlängerung von Diabetes-Patienten eingesetzt werden. Dabei hat sich die Diagnose- und Applikationstechnik bis heute so weit verbessert, dass bei optimaler Patienten-Compliance die Lebensqualität von Diabetikern kaum noch beeinträchtigt wird. Doch trotz der Fortschritte in der Entwicklung von Insulinpräparaten führen der Gebrauch von Spritzen oder Pens und die damit verbundene Nadelangst dazu, dass die parenterale Verabreichungsform vor allem von Typ-2-Diabetikern kritisch betrachtet wird. Dies kann dazu führen, dass diese Patienten nicht rechtzeitig von oralen Antidiabetika auf eine insulinbasierte Therapie wechseln (Scholze, 2005). Dieser Wechsel ist vielfach notwendig, da die Insulinsekretion so weit abnehmen kann, dass die oralen Antidiabetika ihre Wirkung nicht mehr entfalten können. Weitere Nachteile sind neben der schlechten Patienten-Compliance zum Beispiel schwankende Absorption und Wirkungsdauer bei Wechsel der Injektionsstelle (Parhofer, 2004). Wird dieselbe Injektionsstelle zu lange beibehalten und eventuell noch mit mehrfach benutzten Nadeln penetriert, so kann es zur Lipohypertrophie kommen. Diese Fettgewebswucherung ist einerseits ein kosmetisches Problem, andererseits kann es dort durch schlechtere Durchblutung auch zu geringerer Absorption kommen. Die Notwendigkeit der Kühlung der Insulinpräparate, die umständliche Bedienung der Pens und das soziale Stigma beim Gebrauch von Injektionshilfen (Simon und Kissel, 2001)

sind weitere Nachteile einer Injektion. Aus diesen Gründen wird schon lange nach alternativen, nicht-invasiven Applikationsarten gesucht. Als eine vielversprechende Methode hat sich hier die Inhalation erwiesen (Newhouse, 1999). Die große Oberfläche, eine gute Durchblutung, immense Kapazität für die Aufnahme gelöster Stoffe und das sehr dünne Alveolarepithel sind einzigartige Eigenschaften der Lunge, welche die systemische Applikation von Proteinen und Peptiden nach pulmonaler Verabreichung erleichtern (Agu und Ugwoke, 2001). Ein weiterer Vorteil ist im Gegensatz zur peroralen Therapie, dass aufgrund fehlender Enzyme in der Lunge kaum eine Proteolyse der Wirkstoffe stattfindet (Gonda, 2007). Die Bioverfügbarkeit aerosolisierten Insulins liegt bei circa 12% (Rave *et al.*, 2004) und der Wirkungseintritt ist sogar signifikant schneller als nach subkutaner Injektion (Heinemann *et al.*, 1997).

Generell ist für Proteinzubereitungen ein Pulverinhalator einer wässrigen Zubereitung vorzuziehen, da so die Stabilität des Wirkstoffes signifikant erhöht ist (Jacob *et al.*, 2006). Dafür sprechen sowohl eine deutlich längere Lagerstabilität (Chew und Chan, 2002) sowie die Tatsache, dass eine spezielle Kühlung nicht erforderlich ist, was wiederum zu einer besseren Anwenderfreundlichkeit führt. Im Mai 2006 wurde das erste inhalierbare Insulin auf den Markt gebracht (Exubera, Pfizer Pharma GmbH). Die erhoffte Compliance-Steigerung blieb jedoch aus. Die Inhalation von Insulin fand bei den Diabetespatienten wenig Anklang und so hat sich Exubera nicht durchsetzen können. Die schlechte Akzeptanz ist zum Teil auf den recht komplexen, großen und damit auffälligen Inhalator zurückzuführen. Da es sich bei Insulin um ein anabol wirkendes Protein handelt, wurde auch das Risiko, an Lungenkrebs zu erkranken, in klinischen Studien untersucht. Dabei

konnte eine Erhöhung der Lungenkrebsinzidenz nach Exubera-Nutzung festgestellt werden, dies jedoch nur bei ehemaligen Rauchern und in einem so geringen Umfang, dass keine Kausalität belegt werden konnte. Auch mangelnde Bereitschaft seitens der Ärzte, von der gewohnten Applikation abzuweichen und ein Unwille der Patienten, die Mehrkosten auf sich zu nehmen, die unter anderem von der im Vergleich zur Injektion zehnfachen Insulindosis verursacht wird, können Gründe für diesen Fehlstart gewesen sein. Eine Verbesserung hinsichtlich Größe und Handhabung des Inhalators wäre ein großer Schritt in Richtung optimierter Patienten-Compliance.

An zu inhalierende Pulver werden hohe Ansprüche gestellt. Die inhalierbare Fraktion sollte möglichst groß und der mittlere Teilchendurchmesser des Pulverkollektivs dementsprechend klein sein (Hickey *et al.*, 1996). Da sehr kleine Teilchen durch die vergleichsweise große Oberfläche eine starke Agglomerationstendenz besitzen, stellt die gleichzeitige Anforderung nach guter Fließfähigkeit und Dispergierbarkeit im Luftstrom eine erhebliche technologische Herausforderung dar. Der übliche Weg, derart kleine Teilchen zu produzieren, ist die Zerkleinerung unter immensem Energieaufwand. Eine Alternative ist die Sprühtrocknung, bei der allerdings oftmals aufgrund der fragilen und amorphen Partikelstruktur sehr feuchteempfindliche Produkte erhalten werden (Voigt, 2000).

1.2 ZIELSETZUNG

Ziel dieser Arbeit ist es, eine pulmonal applizierbare Insulin-Pulverformulierung zu entwickeln. Diese soll in Verbindung mit einem bereits etablierten Inhalator lungengängige und somit systemisch

verfügbare Partikelfractionen erzeugen können. Mit Blick auf die Kosten der Insulintherapie sollte ein möglichst großer Anteil der verwendeten Dosis am Zielort ankommen, um den Materialeinsatz so gering wie möglich halten zu können. Bezüglich der aerodynamischen Eigenschaften sowie Handhabung und Praktikabilität soll die Formulierung dem Handelspräparat mindestens ebenbürtig, wenn nicht überlegen sein. Für die Pulvererzeugung soll ein aufbauendes Fällungsverfahren angewendet werden. Wenn möglich ist die Präzipitation im Nanometerbereich durchzuführen, da sich von derartigen Primärpartikeln weitere Vorteile versprochen werden. Die erzeugte Suspension soll im Folgenden mittels Sprühtrocknung in ein fließfähiges Pulver überführt werden. Wenn es die Pulvereigenschaften erfordern, dann sollen pulmonal verträgliche Additive in möglichst geringen Konzentrationen eingesetzt werden.

2 THEORETISCHER TEIL

2.1 DIABETES MELLITUS

An Diabetes mellitus („honigsüßer Durchfluss“; gr.: diabainein „hindurchfließen“; lat.: mellitus „honigsüß“) leiden weltweit über 246 Millionen Menschen; in 20 Jahren werden es laut Prognosen über 366 Millionen sein (WHO, 2009). 2006 gab es in Deutschland ca. 8 Millionen Diabeteskranke, davon 550.000 mit Typ-1-Diabetes und 7,5 Millionen mit Typ-2-Diabetes. Die Dunkelziffer wird jedoch weit höher eingeschätzt (Diabetes Atlas Third Edition, International Diabetes Federation, 2007).

2.1.1 KRANKHEITSBILD

Diabetes mellitus ist eine Stoffwechselerkrankung, die durch (absoluten oder relativen) Insulinmangel mit chronischer Hyperglykämie und dadurch bedingte Störungen verschiedener anderer Stoffwechselprozesse sowie nachfolgender Organschäden gekennzeichnet ist (Mutschler *et al.*, 2001). Eine Klassifizierung der Erkrankung erfolgt nach Art der Entstehung (Tabelle 2.1). Typ-1-Diabetes ist eine Folge des Untergangs der Insulin-produzierenden B-Zellen im Pankreas. Daher ist eine Insulinsubstitution unumgänglich. Wenn sich bei übergewichtigen Erwachsenen eine diabetische Stoffwechsellage, d.h. eine vom Körper nicht mehr regulierbare Hyperglykämie einstellt (Typ 2), so herrscht meist ein relativer Insulinmangel: einem erhöhten Insulinbedarf steht eine abnehmende Sekretion gegenüber. Die Ursache für den erhöhten Insulinbedarf ist ein Mangel an Insulinrezeptoren in den Zellmembranen.

So sinkt die Insulinempfindlichkeit der Zellen. Zusätzlich sind häufig die Umwandlung von Proinsulin zu Insulin sowie die pulsatile Freisetzung von Insulin gestört. Die Therapie beruht anfänglich auf diätetischen Maßnahmen und peroralen Antidiabetika, endet allerdings auch oftmals in der Insulinsubstitution.

Tabelle 2.1: Klassifikation des Diabetes mellitus (nach Mutschler, 2001)

| Diabetestyp | Ältere Bezeichnung |
|---|--|
| Typ 1 A: immunologisch bedingt B: idiopathisch | Juveniler Diabetes, insulinabhängiger Diabetes mellitus (IDDM) |
| Typ 2 a ohne Adipositas Typ 2 b mit Adipositas | Altersdiabetes, nicht- insulinabhängiger Diabetes mellitus (NIDDM) |
| Andere spezifische Typen u.a. infolge von Erkrankungen des exokrinen Pankreas oder Arzneimittelwirkungen | |
| Gestationsdiabetes | Schwangerschaftsdiabetes |

2.1.2 BEHANDLUNG

Therapie der ersten Wahl ist, zumindest bei Typ-2-b-Diabetikern, eine Umstellung der Lebensgewohnheiten, die zu einer Gewichtsreduktion führen sollte – nicht die Gabe von Pharmaka. Trotzdem wurden im Jahre 2006 in Deutschland zur Diabetesbehandlung von den gesetzlichen Krankenkassen 5,643 Mrd. € ausgegeben, davon 3,497 Mrd. € für die Patienten über 65 Jahre (Quelle: Statistisches Bundesamt), wobei die

Behandlung der Begleiterkrankungen hier nicht mit eingerechnet ist. Eine medikamentöse Therapie ist demnach oft Mittel der Wahl.

2.1.2.1 KONVENTIONELLE THERAPIE

Als perorale Antidiabetika stehen Sulfonylharnstoffe, Metformin, α -Glucosidase-Inhibitoren und Insulinsensitizer zur Verfügung. Sulfonylharnstoffe setzen Insulin aus den B-Zellen des Pankreas frei und sind demnach nur wirksam, wenn die körpereigene Insulinproduktion noch vorhanden ist. Metformin, ein Biguanid-Derivat, verringert die Glucoseabgabe aus der Leber, steigert die periphere Glucoseverwertung und senkt somit den Blutzuckerspiegel. α -Glucosidase-Inhibitoren hemmen die enzymatische Spaltung von Oligo- und Disacchariden im Gastrointestinaltrakt. Die Absorption von Kohlenhydraten wird dadurch verzögert und der basale Blutzuckerwert sinkt. Insulinsensitizer (Glitazone) verringern die Insulinresistenz durch Förderung der Expression von Glucosetransportern und dadurch gesteigerte Glucoseaufnahme in die Zellen.

Diabetes vom Typ 2 kann als „Wohlstandskrankheit“ bezeichnet werden (Quelle: Kassenärztliche Bundesvereinigung) und ist in vielen Fällen dem Patienten selbst zuzuschreiben. Dem gegenüber steht Typ-1-Diabetes, der vor 100 Jahren noch ein sicheres Todesurteil bedeutete. Die Entdeckung des Insulins 1922 revolutionierte die Diabetestherapie (Banting *et al.*, 1922). Nun konnte bei vollständigem Untergang der insulinsezernierenden Zellen eine Substitutionstherapie durchgeführt werden, die bis heute immer mehr verfeinert wurde und flexibel auf die Lebensgewohnheiten des Patienten angepasst werden kann. Ziel der Therapie ist es, sowohl Hyper- als auch Hypoglykämien zu vermeiden. Zur Verfügung stehen hier Altinsulin, schnell wirksame Insulinanaloga,

Verzögerungsinsuline und Mischinsuline, die alle zur subkutanen Injektion bestimmt sind. Unter Altinsulin versteht man Insulinzubereitungen, die heute aus gentechnologisch gewonnenem Humaninsulin oder tierischem Insulin bestehen und als Lösung gespritzt werden. Sie müssen circa 20-30 min vor der Mahlzeit angewendet werden, da sie ihr Wirkmaximum 1-3 Stunden nach der Injektion haben. Einen deutlich kürzeren Wirkeintritt haben die Analoga Insulin lispro und Insulin aspart. Durch Modifizierung in der Aminosäuresequenz kann die Selbstassoziation zu Hexameren deutlich verringert werden, demzufolge wird die Absorptionsgeschwindigkeit aus der Subkutis erhöht (Garg *et al.*, 1996). Verzögerungsinsuline sind derart modifiziert, dass ihre Wirkdauer bis zu 36 Stunden betragen kann. Dies kann durch gezielte Hexamerbildung oder den Einsatz von Suspensionen erreicht werden. Misch- oder Kombinationsinsuline enthalten ein Gemisch aus einem rasch wirkenden und einem Verzögerungsinsulin.

Zur Blutzuckereinstellung spritzt sich der Patient ein Verzögerungsinsulin, um den Basalbedarf zu decken, und zu den Mahlzeiten eine angepasste Dosis schnell wirksamen Insulins. Eine Sonderform stellt die Therapie mit einer tragbaren Infusionspumpe dar. Hiermit kann kontinuierlich Insulin zugeführt werden. Dieses Verfahren wird aufgrund der hohen Betreuungsintensität und Therapiekosten jedoch nur in Sonderfällen gewählt.

Der Alltag eines Diabetikers besteht neben der subkutanen Insulinzufuhr auch aus regelmäßigen Blutzuckerkontrollen, die mehrmals täglich durchgeführt werden müssen. Diese Notwendigkeit der häufig auch schmerzhaften Hautpenetration verringert die Lebensqualität und auch die Compliance der Patienten.

2.1.2.2 ALTERNATIVE THERAPIEANSÄTZE

Für die Erleichterung der Insulinapplikation gibt es verschiedene Ansätze, wobei sich die transdermale, bukkale oder okulare Applikation generell nicht eignen (Shoyele und Slowey, 2006).

Eine nadelfreie Injektion kann beispielsweise durch das Injex-System realisiert werden. Die Arzneistofflösung wird mit hohem Druck durch die Haut in das subkutane Fettgewebe eingebracht, sucht sich den Weg mit dem geringsten Widerstand und hat die gleiche Effektivität wie eine nadelbasierte Injektion (Hallé *et al.*, 1986).

Eine perorale Insulinapplikation gestaltet sich schwierig, da Insulin als Protein im Gastrointestinaltrakt durch Proteasen zerstört wird (Schilling und Mitra, 1991). Außerdem ist das entsprechende Epithel nicht auf die Aufnahme von Makromolekülen ausgelegt, daher wird geschätzt, dass nur ca. 0,5% des peroral applizierten Insulins den Blutkreislauf erreichen können (Crane und Luntz, 1968). Einen Lösungsansatz bieten nanopartikuläre Strukturen, in denen Insulin mittels bioabbaubarer Polymere vor der Zerstörung durch Proteasen geschützt wird (Sarmiento und *al.*, 2007). Eine Aufnahme könnte dann über para- oder transzelluläre Wege erfolgen (Damgé *et al.*, 2008).

Auch nasal ist eine Insulinapplikation möglich, jedoch liegt die absolute Bioverfügbarkeit unter 10% (Drejer *et al.*, 1992). Der Einsatz von Enhancern ist notwendig, um eine ausreichende Absorption zu erreichen (Chandler *et al.*, 1991), dies ist allerdings nicht für eine Dauertherapie geeignet.

Einer der vielversprechendsten Ansätze ist die inhalative Anwendung von Insulin (Heller *et al.*, 2007), auf die in Kapitel 2.2.2.1 näher eingegangen wird. Hierzu ist es zunächst nötig, die grundlegenden Prinzipien der pulmonalen Applikation zu betrachten.

2.2 PULMONALE APPLIKATION VON WIRKSTOFFEN

Um inhalativ bioverfügbar zu sein, muss ein Wirkstoff in Form eines Aerosols vorliegen, das heißt, als flüssige oder feste Partikel in einer Gasphase dispergiert. Dort angelangt, unterliegen diese Partikel unterschiedlichen Abscheidemechanismen (Abbildung 2.1), die vornehmlich vom aerodynamischen Durchmesser (mass median aerodynamic diameter, MMAD) abhängen. Dieser Durchmesser spiegelt das Verhalten eines Partikels im Luftstrom wider und kann stark vom geometrischen Durchmesser abweichen. Partikel mit hoher Porosität können z.B. eine Teilchengröße von 10-20 μm aufweisen und sich im Luftstrom dennoch wie ein massives Teilchen mit einer Größe von 5 μm verhalten.

Partikel impaktieren, wenn sie aufgrund ihrer Massenträgheit dem Luftstrom im Falle einer Richtungsänderung nicht folgen können, sondern die ursprüngliche Beschleunigungsrichtung beibehalten. Sie prallen auf das Hindernis, welches die Richtungsänderung ausgelöst hat und verbleiben dort. Im Mund-Rachenraum trifft das eingeatmete Aerosol zum ersten Mal auf ein solches Hindernis. Partikel, die dem Luftstrom in Richtung Lunge folgen können, werden zur Feinpartikelfraktion (FPF) gezählt und sind in der Regel kleiner als 5 μm (Lippmann *et al.*, 1977). Die Maximierung der FPF ist demzufolge das Ziel vieler technologischer Entwicklungen (Frijlink und de Boer, 2005).

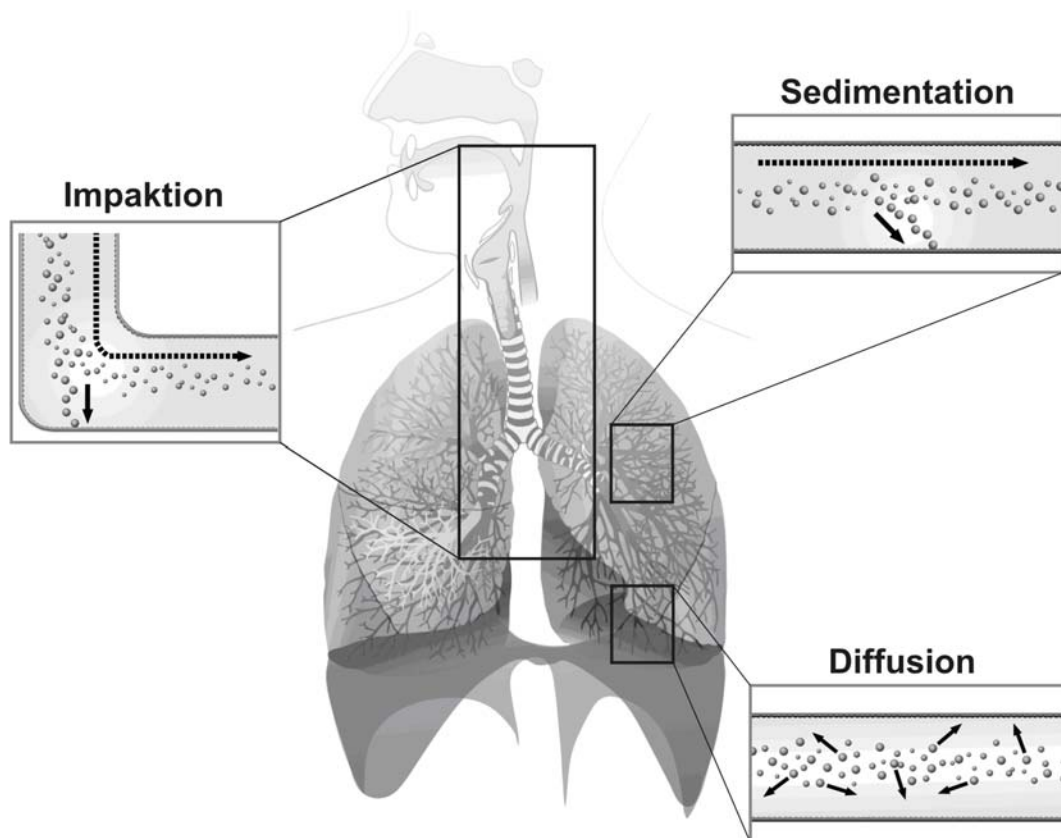


Abbildung 2.1: Abscheidemechanismen in der Lunge

Für Partikel mit einer Größe zwischen 5 und 0,5 μm Partikelgröße ist die Sedimentation der überwiegende Depositionsmechanismus. Partikel unter 0,5 μm unterliegen vermehrt der Brownschen Molekularbewegung und können an die Wandung der Atemwege diffundieren. Ist das nicht der Fall, so folgen sie dem Ausatemstrom.

Zur Aerosolerzeugung steht eine Vielzahl von Applikatoren zur Verfügung. Diese lassen sich unterteilen in:

- Vernebler
- Dosieraerosole (pressurised metered dose inhaler, pMDI) und
- Pulverinhalatoren (dry powder inhaler, DPI)

Der apparative Aufwand der Vernebler ist am höchsten, da hier eine Wirkstofflösung oder -suspension erst vom Gerät durch Druckluft,

Ultraschall oder eine schwingende Membran in den Aerosolzustand überführt werden muss. In den Dosieraerosolen liegt der Wirkstoff als Lösung oder Suspension in Kombination mit einem Treibmittel in einem Druckgasbehälter abgefüllt vor. Der Behälter besitzt ein Dosierventil, das zusammen mit einem so genannten Aktuator für die Partikelzerstäubung sorgt. Die Effektivität der pMDIs ist unter anderem limitiert durch die Patienten-Compliance, da es häufig Probleme bei der Koordination des Auslösevorgangs in Kombination mit dem Einatemmanöver gibt (Anderson, 2001). Pulverinhalatoren bieten das weiteste Spektrum hinsichtlich Aufbau und Handhabung. Allen gemeinsam ist, dass eine abgeteilte Pulverdosis als Aerosol vom Patienten eingeatmet wird. Die Pulverdispergierung erfolgt dabei entweder durch das Gerät oder im einfachsten Fall durch den Einatemstrom. Der Wirkstoff kann aus einem Reservoir des Inhalators oder geeigneten Aufbewahrungseinheiten, wie z.B. Kapseln, bezogen werden. Ein weiteres Unterscheidungskriterium ist die Art der Pulverzubereitung. Bei sehr geringen Wirkstoffdosen oder wenn das Pulver sehr starker Autoadhäsion unterliegt, ist es häufig notwendig, so genannte interaktive Pulvermischungen einzusetzen (Telko und Hickey, 2005). Hierbei wird der Wirkstoff mit groben, pharmakologisch indifferenten Trägerpartikeln vermischt, dies sorgt für besseres Fließ- und Dosierverhalten. Bei der Inhalation trennen sich Wirk- und Hilfsstoff durch die auftretenden Kräfte wieder voneinander, die groben Partikel impaktieren im Rachen und der Wirkstoff erreicht die Lunge. Durch starke Adhäsion der Wirkstoffpartikel an den Trägerpartikeln kommt es zu einer unvollständigen Auftrennung, welche die FPF negativ beeinflusst. Daher ist - wenn möglich - eine Pulverformulierung zu bevorzugen, die größtenteils aus Wirkstoff besteht (French *et al.*, 1996).

2.2.1 LOKALE WIRKUNG

Liegt eine akute oder chronische Erkrankung der Atemwege vor, so ist eine lokale Therapie durch Inhalation angezeigt. Die Krankheit wird so direkt am Auftrittsort behandelt und der Arzneistoff muss nicht den Umweg über den gesamten Organismus nehmen. Nebenwirkungen können auf diese Weise deutlich reduziert werden. Anwendung findet diese Form der Therapie akut bei Atemwegsentzündungen oder Mykosen und Asthmaanfällen. Dabei dienen die verwendeten Wirkstoffe oftmals der Entkrampfung von Bronchialspasmen oder der Bekämpfung von Mikroorganismen. Eine Dauertherapie ist sinnvoll bei chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen, Asthma oder auch zystischer Fibrose. Auch hier kommen antimikrobielle Wirkstoffe sowie Kortikoide zum Einsatz (Mutschler *et al.*, 2001). Eine positive Wirkung bei zähem Bronchialsekret kann jedoch auch ohne Wirkstoffe durch die Inhalation von Wasserdampf erzielt werden. Dies befeuchtet die Atemwege, verflüssigt das Bronchialsekret und erleichtert das Abhusten.

2.2.2 SYSTEMISCHE WIRKUNG

In den Alveolen der Lunge findet bei der Atmung der Gasaustausch zwischen Blut und Alveolarluft statt. Ermöglicht wird dieser Prozess durch ein sehr dünnes Epithel – größtenteils trennt nur eine Zelle die Außenluft vom Blutkreislauf. Diese Tatsache wird schon seit längerer Zeit zur Aufnahme von Rauschmitteln wie Nikotin oder auch gasförmigen Narkotika genutzt (Gonda, 2000). Hinzu kommt, dass die mucoziliäre Clearance in den peripheren Lungenregionen geringer ist als in den zentralen Luftwegen (Edsbäcker *et al.*, 2007), was einen längeren Aufenthalt von Wirkstoffpartikeln ermöglicht. Nicht nur kleine Moleküle

sind in der Lage, das Epithel zu durchdringen - es konnte gezeigt werden, dass auch eine systemische Applikation von Peptiden und Proteinen über die Lunge möglich ist (Agu und Ugwoke, 2001). Erleichtert wird dies außerdem durch eine deutlich geringere Enzymaktivität in der Lunge als beispielsweise im Gastrointestinaltrakt (Patton, 2004). Werden die vorhandenen Proteasen gehemmt, so kann der Effekt inhalierter Proteine jedoch noch gesteigert werden (Park *et al.*, 2007). Weiterhin konnte bereits gezeigt werden, dass die absolute Bioverfügbarkeit mit Absorptionenhancern, wie z.B. Zitronensäure oder Span 85 verbessert werden kann (Todo *et al.*, 2004), wobei eine Langzeitanwendung kritisch zu betrachten ist.

2.2.2.1 PULMONALE APPLIKATION VON INSULIN

Schon vor über 80 Jahren fand man heraus, dass auch inhaliertes Insulin den Blutzuckerspiegel senken kann (Gänsslen, 1925). Es flutet gleich schnell oder sogar schneller als subkutan injiziertes Insulin an (Patton *et al.*, 1999) und hat sich in vielen Studien als effektiv und sicher erwiesen (Laube, 2001; White und Campbell, 2001). Der genaue Absorptionsmechanismus von Proteinen in der Lunge ist derzeit noch nicht vollständig geklärt. Eine vorwiegende Aufnahme durch Transzytose wird als sehr wahrscheinlich erachtet (Klonoff, 1999), ebenso wird an speziellen Proteintransportern geforscht, die ebenfalls für die Absorption zuständig sein könnten (von Wichert und von Wichert, 2006).

2006 wurde das erste Insulinpräparat zur Inhalation (Exubera, Pfizer Pharma GmbH) zugelassen. Es handelt sich um schnell wirksames Humaninsulin in Pulverform mit einem neuartigen Inhalator, der das Pulver auf Knopfdruck aus einem Blister in einen eingebauten Spacer zerstäubt. Zugelassen ist es für die Therapie von Diabetes Typ 1 und 2.

Als Nebenwirkung kann es zusätzlich zur Hypoglykämie auch zu Husten oder seltener auch zu Dyspnoe kommen (Pfizer Pharma GmbH, 2006a). Im Vergleich zu einer subkutanen Injektion ist eine ca. 10-fache Dosis notwendig, um eine vergleichbare Blutzuckersenkung zu erreichen (Parhofer, 2004). Dabei sollen etwa 25% der applizierten Dosis die Alveolen der Lunge erreichen, circa 10% sind später im Plasma nachweisbar (Pfizer Pharma GmbH, 2006b). Der entsprechend hohe Insulineinsatz und der aufwändige Inhalator erhöhen die Therapiekosten um das 3-5-fache der Standardtherapie. Studien haben gezeigt, dass die inhalative Therapie mit Exubera effektiv ist, gut toleriert wird und im Vergleich zum konventionellen System zu einer ähnlich guten Blutzuckerkontrolle führt (DeFronzo und Bergenstal, 2005; Hollander und Blonde, 2004). Es traten außerdem keine Sicherheitsbedenken auf (Barnett, 2004). Die Lungenfunktion wurde reversibel verringert, jedoch klinisch nicht signifikant (Brain, 2005). Trotz erfolgreicher Zulassung wurde Exubera nach 2 Jahren wieder vom Markt genommen, die Blister mit Insulin waren noch bis zum 01.09.2008 erhältlich. Ursachen dafür waren unter anderem eine schlechte Akzeptanz durch die komplizierte Bedienung des Inhalators und hohe Kosten. Der durch die nicht optimale Lungendeposition verursachte Materialaufwand ist für kostenintensive Wirkstoffe wie Insulin nicht tragbar - hier ist eine wesentlich verbesserte Deposition erforderlich (Kleinstreuer *et al.*, 2008).

Eine weitere Entwicklung, die kurz vor der Zulassung stand, ist das AERx-System der Firma NovoNordisk (Dänemark). Die Erzeugung des Aerosols findet bei diesem System atemzuginduziert aus einer Insulinlösung statt (Thipphawong *et al.*, 2002). Das System hat in Studien keine Sicherheitsbedenken verursacht und gewährleistet eine gute Blutzuckereinstellung (McElduff *et al.*, 2005). Anfang 2008 gab

NovoNordisk jedoch bekannt, dass auf diesem Gebiet eine Umorientierung der Produktentwicklung erforderlich ist und das AERX-System nicht weiter Bestandteil der firmeninternen Forschung sein wird. Weiterhin zu nennen ist das Afresa-System der Firma Mannkind Corporation (USA) zur Inhalation von Insulinpulvern (Rave, 2007; Rosenstock *et al.*, 2008). Verwendet wird die so genannte Technosphere-Methode, bei der 3,6-bis(N-fumaryl-N-(n-Butyl)amino-2,5-di-ketopiperazin (FDKP) zu Mikropartikeln gefällt wird und dabei Proteine einschließt (Steiner *et al.*, 2002). Diese Mikropartikel haben in getrockneter Form eine mittlere Teilchengröße von 2-3 μm und sind somit für die Inhalation geeignet. Das Afresa-System wird derzeit in Phase III Studien getestet und die Entwickler rechnen mit einer baldigen FDA-Zulassung.

Bei den genannten Entwicklungen wird kurzwirksames Insulin verwendet, welches zur Vermeidung postprandialer Blutzuckerspitzen eingesetzt wird. Jedoch ist zumindest bei Typ-1-Diabetikern eine konstante Versorgung mit Insulin notwendig, daher wird auch auf dem Gebiet der Wirkverzögerung geforscht. Zum Beispiel können Insulinnanoteilchen in Kombination mit Alginaten auch zu einer verlängerten Freisetzung in der Lunge führen (Pinto Reis *et al.*, 2007). Bioabbaubare Polylaktid - Poly(laktid-co-glykolid)-Mikropartikel erfüllen denselben Zweck (Schöttle, 2006). Ein weiterer Ansatz ist die Kombination lang- und kurzwirksamen Insulins in vergleichsweise großen porösen Partikeln von circa 20 μm Durchmesser mit sehr geringer Dichte, die somit einen kleinen aerodynamischen Durchmesser aufweisen (Hrkach *et al.*, 2000) und in der Alveolarregion deponiert werden. Die Lungentoxizität löslicher Pulver wird generell als minimal eingeschätzt (Okamoto *et al.*, 2002), doch erst jahrelange

Anwendungsbeobachtungen werden die Frage beantworten, ob der Nutzen inhalierten Insulins höher zu bewerten ist als mögliche Risiken aus Langzeitnebenwirkungen (Klappoth, 2001).

2.3 HERSTELLUNG VON PULVERN ZUR INHALATION

Generell wird angenommen, dass Teilchen mit einem mittleren Durchmesser von bis zu 5 μm vorwiegend die tieferen Atemwege erreichen und nicht schon in den oberen Atemwegen abgeschieden werden (Gonda, Hickey, A. J., 2003). Für lokal wirksame Therapeutika wird eine aerodynamische Partikelgröße von 2-5 μm angestrebt, da Teilchen unter 2 μm die Alveolen erreichen und somit systemisch verfügbar werden (Lucas *et al.*, 1999). Dies ist für z.B. bei der Asthmatherapie mit Bronchodilatoren und Kortikoiden nicht gewünscht.

Eine Verringerung der Teilchengröße führt generell zu einer Erhöhung der inhalierbaren Fraktion (Rabbani und Seville, 2005), was das vorrangige Ziel einer Pulverformulierung zur systemischen Applikation ist. In feinen Pulvern überwiegen jedoch die interpartikulären Kohäsionskräfte aufgrund der großen relativen Partikeloberfläche die Gravitationskräfte, daher zeigen sie meist ein schlechtes Fließverhalten (Castellanos *et al.*, 1999). Sphärische Partikel besitzen im Verhältnis zu ihrem Volumen eine geringe Oberfläche und neigen aufgrund ihrer Form wenig zur Agglomeration. Solche Partikel, noch dazu mit möglichst geringer Oberflächenenergie, wären der Theorie nach am besten geeignet, durch geringe Kohäsion einerseits eine genaue Pulverdosierung und andererseits eine optimale Pulverdesagglomeration während der Inhalation zu gewährleisten.

2.3.1 MAHLUNG

In Industrieländern werden für die mechanische Zerkleinerung ca. 3% der erzeugten elektrischen Energie verwendet. Nur ca. 1% dieser aufgewendeten Energie wird zur tatsächlichen Zerkleinerung des Feststoffs bzw. zur Oberflächenvergrößerung genutzt (Wolf, 2005). Nahezu die gesamte eingesetzte Energie wird in Wärme umgewandelt. Bei der Feinmahlung kann die mechanische Beanspruchungsintensität während der Zerkleinerung so groß werden, dass die Partikel Wärme aufnehmen. Aus kalorimetrischen Messungen weiß man, dass dieser Anteil bis zu 10% der mechanisch eingesetzten Energie betragen kann (Redeker, 2003). Der hohe Energieeintrag kann eine chemische Instabilität bewirken (Rasenack, 2004b). Dies ist besonders bei Arzneistoffen zu beachten, da es hier zu einem Wirkverlust kommen kann. Die Mahlung führt außerdem zu elektrostatischer Aufladung, einer breiten Teilchengrößenverteilung, und - da Partikel bevorzugt an Kristallebenen geringer Bindungskraft brechen - einem Zuwachs unpolarer Flächen. Letzteres resultiert in schlechtem Fließ- und Auflösungsverhalten (Feeley *et al.*, 1998). Auch kann es zur Erzeugung amorpher Bereiche kommen, die über die Lagerungszeit rekristallisieren und somit die Teilchengröße durch Bildung von Feststoffbrücken nachträglich verändern können (Berard *et al.*, 2002; Rasenack, 2004a). Diese physikalischen und chemischen Veränderungen können das *in vitro* und *in vivo* Verhalten inhalativer Pulverzubereitungen negativ beeinflussen. Entgegen der vorherrschenden Meinung, dass kristalline Strukturen gegenüber chemischer Zersetzung stabiler sind als amorphe, fanden Pikal und Rigsbee jedoch heraus, dass dies im Falle des Insulins nicht zutrifft. Vielmehr ist eine Zersetzung des amorphen Insulins

signifikant geringer und im Gegensatz zur kristallinen Form unabhängig vom Wassergehalt der Probe (Pikal und Rigsbee, 1997).

Eine Zerkleinerung von Stoffen auf unter 10 µm wird in der Regel mittels Luftstrahlmahlung durchgeführt (Schmidt und Weyhing, 2005). Organische Wirkstoffe müssen jedoch bei dieser Mahlungsart entsprechend lange prozessiert werden, bis ein ausreichender Anteil des Stoffes die erforderliche Teilchengröße erreicht hat. Das macht diesen Prozess zeitaufwändig und ineffizient, zusätzlich ist der Stoff einer großen mechanischen Belastung ausgesetzt (Chow *et al.*, 2007).

2.3.2 PRÄZIPITATION

Mit Fällung oder Präzipitation wird in der Regel das Ausscheiden eines gelösten Stoffes aus einer Lösung als Niederschlag bezeichnet. Die klassische Keimbildungstheorie lässt sich im Allgemeinen wie folgt beschreiben: Ein mehrkomponentiges System liegt zunächst im einphasigen Zustand vor. Durch Änderung der Rahmenbedingungen wie Temperatur, Druck, pH-Wert oder auch durch homogene Vermischung mit einer weiteren Komponente wird der einphasige Zustand zunehmend energetisch ungünstig und ein phasenseparierter Zustand wird angestrebt. Bestandteile (Atome, Ionen oder Moleküle) der einen Phase lagern sich zusammen und bilden separierte Keime (Horn und Rieger, 2001). Nach der Keimbildung kommt es in der Regel zu einem Partikelwachstum, verursacht durch weitere ausfallende Bestandteile.

Eine apparativ einfache Methode, Partikel im unteren Mikrometerbereich herzustellen, ist die Fällung durch das Solvent-Change-Verfahren (Rasenack *et al.*, 2003). Dabei wird der zu fällende Stoff in einem Lösemittel gelöst. Dieser Lösung wird ein mit dem Lösemittel mischbares

Nicht-Lösemittel hinzugefügt. Dies bewirkt, dass die Löslichkeit des zu fällenden Stoffes im Umgebungsmedium rapide abnimmt und ab einer bestimmten Übersättigung eine Keimbildung auftritt. Die Sättigungslöslichkeit, sowie die entsprechende Keimbildungskonzentration des zu fällenden Stoffes lässt sich als Kurve im Ostwald-Miers-Diagramm darstellen (Abbildung 2.2). Durch die Fällung sinkt die Konzentration an gelöstem Stoff so weit, bis die Sättigungslöslichkeit erreicht wird. Findet eine schnelle und massive Übersättigung statt, so ist es möglich, viele sehr kleine Partikel zu erzeugen. Aufgrund der daraufhin schlagartig gesunkenen Stoffkonzentration tritt kaum Partikelwachstum auf. Bei langsamer Übersättigung entstehen zunächst wenige Partikel, die als Keime für nachfolgend ausfallenden Feststoff dienen. So können gezielt größere Partikel erzeugt werden. Die absichtliche Erzeugung großer Teilchen findet z.B. Anwendung bei der Generation von Einkristallen für die Röntgenstrukturanalyse.

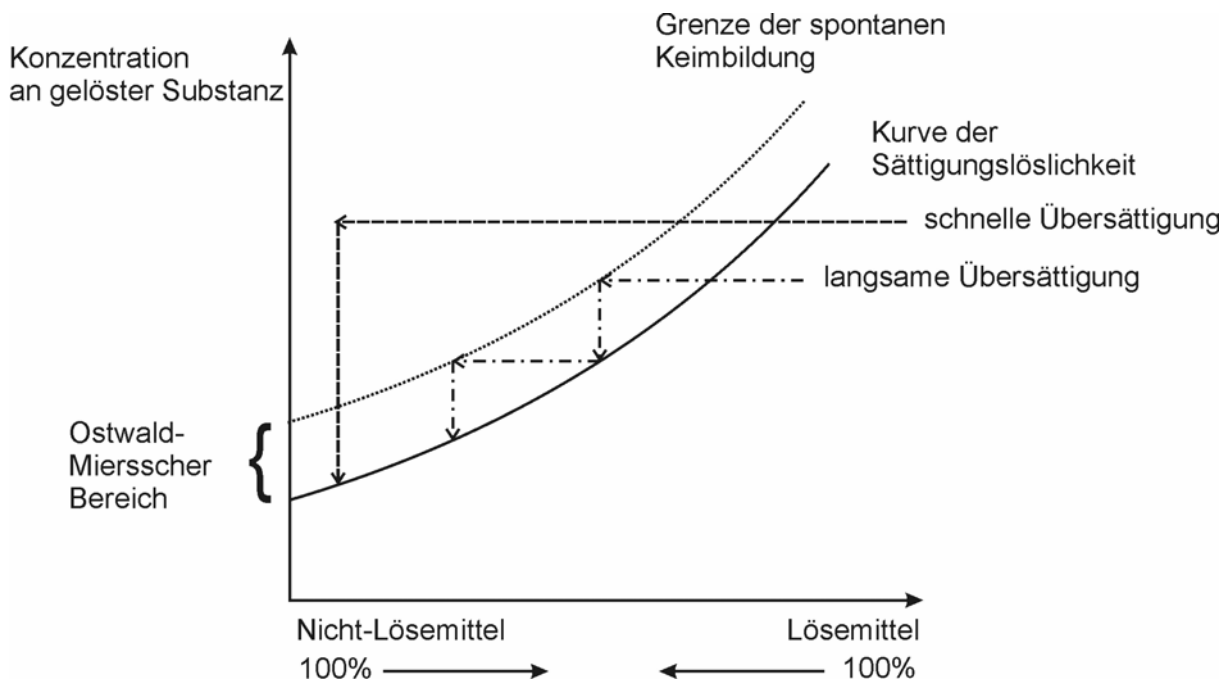


Abbildung 2.2: Ostwald-Miers-Diagramm

Derartige, durch ein aufbauendes Verfahren hergestellte, Partikel unterliegen keinem mechanischen Stress. Außerdem präzipitieren viele organische Moleküle in sphärischer Form, da so die freie Oberflächenenergie minimiert wird (Texter, 2001). Daher besitzen solche Partikel meist günstige Eigenschaften bezüglich der Fließfähigkeit und Desagglomeration. Auch kann man im Vergleich zur Mahlung in beispielsweise einer Luftstrahlmühle engere Teilchengrößenverteilungen bei insgesamt kleinerer mittlerer Teilchengröße erreichen (Rasenack *et al.*, 2003).

2.3.3 SPRÜHTROCKNUNG

Die Sprühtrocknung stellt ein industriell weit verbreitetes Verfahren dar, mit dem aus Lösungen, Suspensionen oder Emulsionen trockene Pulver erhalten werden können. Die Flüssigkeit wird von einer geeigneten Vorrichtung zerstäubt und die Tröpfchen trocknen im Luftstrom. Da nach Kelvin der Dampfdruck über einer gekrümmten Fläche umgekehrt proportional zum Krümmungsradius ist, wird die Erzeugung möglichst kleiner Tröpfchen angestrebt, um den Trocknungsprozess zu beschleunigen. Der Phasenübergang des Lösungs- oder Dispersionsmediums von flüssig zu gasförmig erfordert Energie. Diese wird in Form von Wärme durch den angelegten Luftstrom zugeführt. So lange die Trocknung nicht abgeschlossen ist, werden die Partikel nicht nennenswert aufgeheizt. Ihre Temperatur gleicht sich erst nach abgeschlossener Trocknung der Umgebungsluft an. Die trockenen Partikel werden in der Regel durch einen Zyklon vom Luftstrom getrennt. Dessen Abscheideleistung begrenzt die Teilchengröße des erhaltenen Produkts nach unten.

Wird eine Lösung versprüht, so entstehen sphärische Partikel. Die Tröpfchen trocknen zuerst an der Oberfläche, dort entsteht eine Feststoffschicht und im Laufe der Trocknung lagert sich von innen weiterer Feststoff an diese Schicht an. Es resultieren Hohlkugeln, die je nach Stoffbeschaffenheit stabil bleiben oder kollabieren (Charlesworth und Marshall, 1960). Ist die Hülle dieser Kugeln nicht flexibel, so kommt es durch den Druck, der sich im Inneren durch entstehenden Wasserdampf aufbaut zur Ausbildung einer Ausblasöffnung. Neben den Hohlkugeln, die aus einer Lösung entstehen, ist es auch möglich, durch Einsatz von Suspensionen massive Partikel herzustellen. Das Größenverhältnis suspendierter Partikel zu versprühten Tröpfchen ist dabei von großer Bedeutung. Ähneln sich Partikel und Tröpfchen, so liegt pro Tröpfchen nur ein Partikel vor und dieser wird separat getrocknet. Sind die Partikel jedoch sehr viel kleiner, so liegen mehrere in einem Tröpfchen vor und werden als Aggregat getrocknet, welches - je nach Vorhandensein in Lösung befindlicher Stoffe - durch Feststoffbrücken zusammengehalten werden kann. Gezeigt werden konnte dies bereits an wasserunlöslichen Nanopartikeln, die mit einer wässrigen Laktoselösung sprühgetrocknet wurden. Nach Auflösung der Laktosematrix der trockenen Partikel konnte wiederum eine Nanosuspension erhalten werden (Sham *et al.*, 2004).

Die Sprühtrocknung bietet durch den sehr genau kontrollierbaren und reproduzierbaren Prozess eine gute Möglichkeit, die physikalischen Eigenschaften eines Pulvers zu beeinflussen (Edwards, 2002). Es können außerdem Partikel im Bereich unter 5 μm hergestellt werden, die sich zur Inhalation eignen. Aufgrund dessen stellt die Sprühtrocknung ein geeignetes Verfahren zur Produktion von pulmonal applizierten Pulverformulierungen dar (Bosquillon, 2004).

2.3.4 ALTERNATIVE METHODEN

Die neueren technologischen Entwicklungen zur Herstellung inhalierbarer Zubereitungen fokussieren sich auf zwei Hauptgebiete - die Formulierung nanopartikulärer Systeme und die Verarbeitung temperaturempfindlicher Stoffe.

Abgesehen von den bereits erwähnten Präzipitationsverfahren können inhalierbare Nanosuspensionen durch Hochdruckhomogenisation (Kocbek *et al.*, 2006) oder Nassmahlung in einer Rührwerkskugelmühle (Scherließ, 2008) erzeugt werden. Letzteres wurde auch schon mit Zink-Insulin durchgeführt und resultiert in biologisch aktiven, stabilen Suspensionen (Merisko-Liversidge *et al.*, 2004). Nanopartikel können auch durch kontrollierte Kristallisation bei der Gefriertrocknung gewonnen werden (de Waard *et al.*, 2008). Nanopartikuläre Systeme bieten viele Vorteile, durch z.B. kontrollierte Einbindung von Antikörpern und Nachahmung natürlich vorkommender Strukturen (Freitas, 2005) und sind nicht nur für die inhalative Anwendung geeignet, sondern können auch peroral oder per injectionem verabreicht werden (Gwinn und Vallyathan, 2006).

Neben der reinen Gefriertrocknung, die sich als Trocknungsverfahren für temperaturempfindliche Stoffe bereits etabliert hat, erweist sich die Sprühgefriertrocknung („spray-freeze-drying“) ebenfalls als geeignetes Verfahren. Hierbei wird eine Lösung in flüssigen Stickstoff versprüht und die entstandenen gefrorenen Partikel werden anschließend gefriergetrocknet. So können poröse Partikel (8-10 µm) mit guten aerodynamischen Eigenschaften erzeugt werden (Maa, 1999; van Drooge *et al.*, 2005). Allerdings ist dieses Verfahren sehr energie- und zeitaufwändig und daher nicht für eine industrielle Anwendung geeignet.

Das so genannte ASES-Verfahren (Aerosol Solvent Extraction System) beruht auf der Extraktion des Lösungsmittels einer zu fällenden Substanz, die in überkritischem Kohlenstoffdioxid nicht löslich sein darf. Dazu wird die Substanzlösung in die überkritische Gasphase eingesprüht, das Lösungsmittel mischt sich mit dieser und die gelöste Substanz fällt aus. Die Herstellung von Pulvern im unteren Mikrometerbereich konnte bereits für Budesonid (Pichert, 2006) und auch Insulin (Amidi *et al.*, 2008) gezeigt werden. Abgesehen vom apparativen Aufwand ist das Verfahren hinsichtlich der aerodynamischen Partikeleigenschaften der herkömmlichen mechanischen Mikronisierung überlegen (Rehman *et al.*, 2003).

Das Prinzip der Kohlenstoffdioxid-unterstützten Verneblung (Carbon Dioxide-Assisted Nebulization with a Bubble Dryer, CAN-BD) stellt ebenfalls eine Methode zur schonenden Produktion inhalativ applizierbarer Pulver dar (Sievers *et al.*, 2001). Hierbei wird eine wässrige oder alkoholische Wirkstofflösung mit überkritischem CO₂ in einem niedrigvolumigen T-Stück gemischt, so dass Bläschen im Mikrometerbereich entstehen („microbubbles“). Diese werden in eine Dekompressionskammer geleitet, wo sie sehr schnell bei 25-80°C trocknen. Dieser Prozess ist ebenfalls geeignet für temperaturempfindliche Stoffe wie zum Beispiel inhalativ zu verabreichende Impfstoffe und nicht annähernd so zeitaufwändig wie eine Gefriertrocknung. Man erhält üblicherweise Partikel unter 3 µm (Sievers, 2003).

2.3.5 ZIELORIENTIERTE METHODENAUSWAHL

Aufgrund der resultierenden negativen Partikeleigenschaften (siehe Kapitel 2.3.1) erscheint es nicht sinnvoll, ein Zerkleinerungsverfahren zu wählen, um die in dieser Arbeit gewünschte Insulinformulierung herzustellen. Die Handhabung mit überkritischem Gas erfordert einen hohen apparativen Aufwand und ist genauso wie eine Gefriertrocknung sehr energie- und zeitaufwändig. Ein schneller, schonender Prozess mit geringem apparativem Aufwand ist hier zu bevorzugen. Diese Voraussetzungen erfüllt ein aufbauendes Verfahren mittels Präzipitation. Der größte Vorteil dieses Verfahrens ist die Möglichkeit zur Steuerung der Partikelgröße. Es ist möglich, durch schnelle Übersättigung sehr kleine Partikel zu präzipitieren. Dabei können bei entsprechender Einstellung der Prozessparameter auch Nanopartikel produziert werden, was unter anderem Ziel dieser Arbeit ist. Die Sättigungslöslichkeit von Teilchen im Nanometerbereich ist nach der Ostwald-Freundlich-Gleichung erhöht (Sasson *et al.*, 2007). Gemäß Nernst Brunner trifft dies auch auf die Lösungsgeschwindigkeit infolge der erhöhten volumenspezifischen Oberfläche zu. Da die Wirkstoffmoleküle nur gelöst in den Blutkreislauf gelangen, ist die Erzeugung möglichst kleiner Primärpartikel das Hauptziel der in dieser Arbeit durchgeführten Präzipitation.

Um eine durch Präzipitation erzeugte Suspension in ein trockenes Pulver zu überführen, erscheint die Sprühtrocknung geeignet. Die Temperaturbelastung ist gering und es können Partikel im gewünschten Größenbereich, also kleiner als 5 μm hergestellt werden. Diese Partikel sind im Idealfall Aggregate aus mehreren Nanoteilchen. Die Möglichkeit, einzelne Nanoteilchen zu erhalten, besteht nicht, da die Größe der

erhaltenen Partikel prozessbedingt nach unten begrenzt ist (siehe Kapitel 2.3.3). Diese Tatsache ist allerdings nicht als negativ zu betrachten, da Teilchen unter 0,5 μm kaum in der Lunge abgeschieden, sondern ausgeatmet werden.

3 MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 MATERIALIEN

3.1.1 INSULIN

Das Peptidhormon Insulin ist ein Makromolekül mit einer molekularen Masse von etwa 5700 Dalton und einem isoelektrischen Punkt (IEP) von ca. pH 5,5. Es besteht aus 2 Polypeptidketten, einer A-Kette mit 21 und einer B-Kette mit 30 Aminosäuren (Abbildung 3.1). Die beiden Ketten sind durch zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden, die zwischen den Cystein-Bausteinen der Polypeptide ausgebildet werden. Ein dritte Disulfidbrücke besteht innerhalb der A-Kette, sie dient der Stabilisierung der Raumstruktur (Löffler und Petrides, 2003). Durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Sauerstoffatomen der Carbonylgruppen und den Wasserstoffatomen der Amidgruppen der beiden Polypeptidketten entsteht die Sekundärstruktur des Insulins - die Molekülketten ziehen sich schraubenförmig zusammen. Die A-Kette bildet zwei α -Helices, die durch einen Aminosäurebaustein voneinander getrennt werden. Die B-Kette wickelt sich zu ca. 40% zu einer α -Helix auf. Insulin ist als Monomer aktiv, während der Biosynthese und Speicherung lagert es sich reversibel zu Dimeren und in Gegenwart von Zinkionen zu Hexameren zusammen (Derewenda *et al.*, 1989).

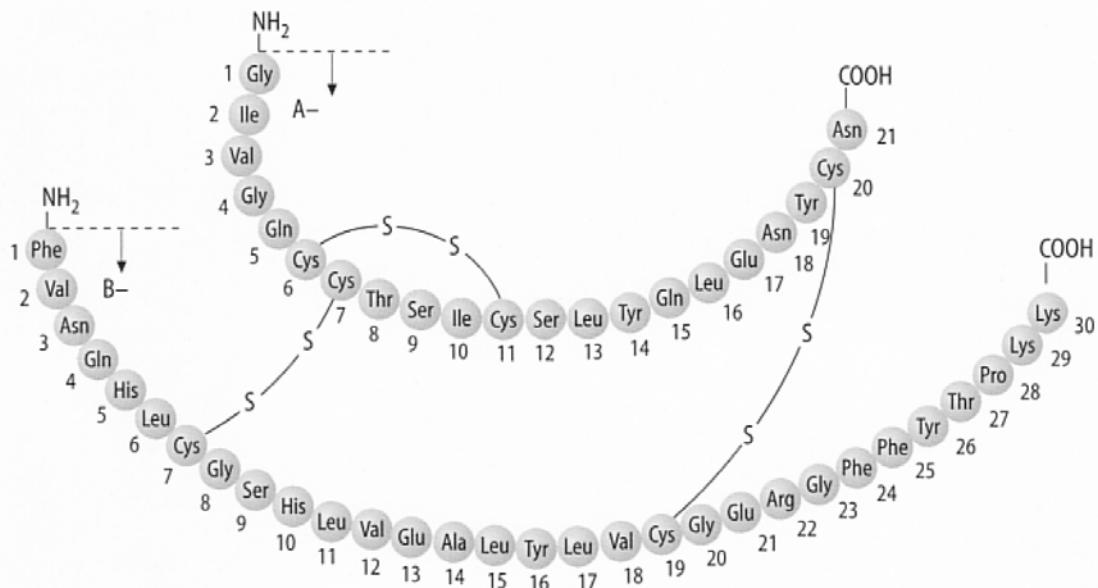


Abbildung 3.1: *Insulin - schematische Darstellung (Löffler, Biochemie & Pathobiochemie)*

Da die Absorptionsrate von Hexameren in der Lunge deutlich geringer ist als die von Di- oder Monomeren (Pang *et al.*, 2007; Rivero und Müller, 1999), eignen sich Zink-Insulin-Formulierungen nicht für die inhalative Anwendung, da hier ein schneller Wirkeintritt gewünscht ist. Ein Wirkungsverlust tritt vorwiegend durch Desaminierung an B3 (Asparagin) oder durch Bildung höhermolekularer, kovalent gebundener Polymere auf (Brange *et al.*, 1992). Bedingt durch eine gewisse physiologische Notwendigkeit – das Milieu in den Sekretions-/Speichergranula ist leicht sauer – ist Insulin auch im Sauren stabil (Bryant *et al.*, 1993).

Das in dieser Arbeit verwendete Humaninsulin (Wanbang Biochemical Pharmaceutical Company, Xuzhou, China) hat eine Aktivität von 28,4 IE/mg. Eine IE (Internationale Einheit) wird als die Menge Insulin definiert, die der biologischen Aktivität von 0,04167 mg eines

internationalen Standardpräparates entspricht und im Tierversuch unter definierten Bedingungen bei einem zwei Kilogramm schweren Kaninchen, dem 24 Stunden die Nahrung entzogen wurde, den Blutzuckerspiegel von 6,66 auf 2,22 mmol/l senkt.

3.1.2 ALBUMIN

Albumin ist ein globuläres Serumprotein und dient im menschlichen Organismus der Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Druckes. Es hat mit 584 bis 590 Aminosäuren ein Molekulargewicht von 66000 Dalton und ist damit deutlich größer als Insulin. Albumin wurde als Modellprotein ausgewählt, da es einen isoelektrischen Punkt von ca. pH 4,6 – also nahe dem des Insulins – sowie eine äußerst geringe Toxizität besitzt und einfach und kostengünstig erhältlich ist. In dieser Arbeit wurde die Fraktion V aus Rinderserumalbumin (Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

3.1.3 HYDROXYPROPYLMETHYLCELLULOSE (HPMC)

Bei der hier verwendeten Metolose 60SH-50 (Shin-Etsu Chemical Company, Tokio, Japan) handelt es sich um einen wasserlöslichen Celluloseether mit Methyl- und Hydroxypropylgruppen (Abbildung 3.2). Die Viskosität einer 2%igen wässrigen Lösung bei 20°C beträgt laut Spezifikation 50 mPa·s. Diese relativ geringe Viskosität wurde gewählt, um Komplikationen während der Fällung und Sprühtrocknung auszuschließen. HPMC wird in der pharmazeutischen Industrie als Binde- und Verdickungsmittel angewendet und findet auch in der Lebensmitteltechnologie Verwendung. Dort ist sie laut FDA als sicher eingestuft und kann laut tierexperimenteller Studien auch ohne

Bedenken pulmonal angewendet werden (Zhou *et al.*, 2003). HPMC besitzt eine gewisse Oberflächenaktivität und ist in der Lage, sich an neu gebildete Oberflächen zu lagern und resultierende Feststoffeigenschaften zu verbessern (Rasenack, 2003).

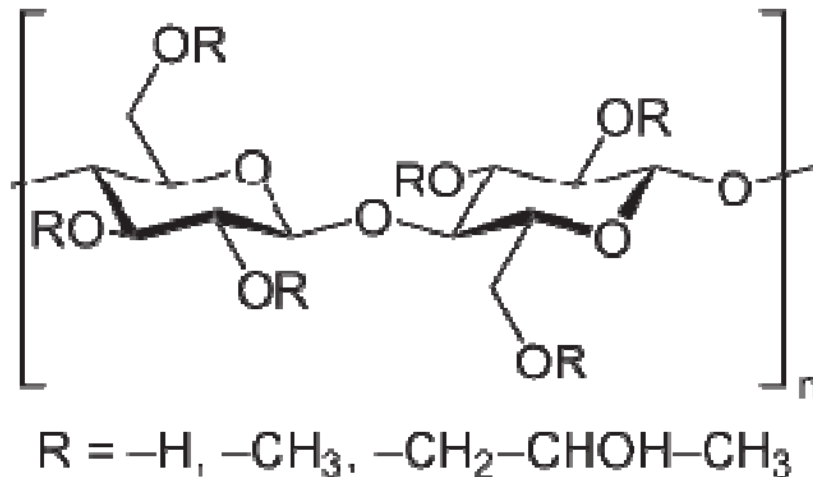


Abbildung 3.2: HPMC - Strukturformel

3.1.4 L-LEUCIN

(S)-2-Amino-4-methylpentansäure (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) oder auch L-Leucin (Abbildung 3.3) ist eine natürliche, für den Menschen essentielle Aminosäure. Sie liegt überwiegend als Zwitterion vor, also nach außen ungeladen. Aufgrund dessen und des vergleichsweise großen hydrophoben Molekülteils ist L-Leucin auch nur wenig löslich in Wasser (100 mg Substanz auf 10 ml Lösungsmittel laut Ph. Eur. 6.0). Da es sich hier um einen körpereigenen Stoff handelt, gibt es keinerlei Bedenken gegen eine inhalative Anwendung (Bosquillon und Lombry, 2001).

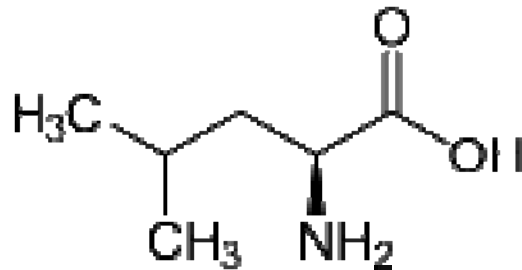


Abbildung 3.3: *L-Leucin - Strukturformel*

3.1.5 MANNITOL

Mannitol (Pearlitol 200 SD, Roquette, Lestrem, Frankreich) (Abbildung 3.4) ist ein Zuckeralkohol und kann bedenkenlos für die Inhalation eingesetzt werden (Bosquillon und Lombry, 2001). Im Gegensatz zu Laktose besitzt Mannitol keine reduzierenden Eigenschaften und bietet daher eine gute Alternative als Hilfsstoff für pulmonale Darreichungsformen. Es ist leicht wasserlöslich (100 mg Substanz auf 1 ml Lösungsmittel laut Ph. Eur. 6.0) und erhöht die Viskosität einer Lösung nur sehr geringfügig. Pharmazeutische Anwendung findet es außer als Zuckeraustauschstoff noch als Osmodiuretikum oder Laxans.

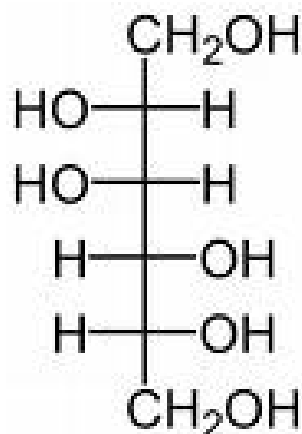


Abbildung 3.4: *D-Mannitol - Strukturformel*

3.1.6 CYCLOHALER

Der Cyclohaler (teva Pharmachemie, Haarlem, Niederlande) ist ein kapselbasierter Inhalator mit vergleichsweise simplem Aufbau (Abbildung 3.5). Die befüllte Kapsel wird in das Unterteil des Inhalators eingelegt und dieser wird verschlossen. Anschließend wird die Kapsel beidseitig mit je vier Perforationsnadeln angestochen und der Inhalationsvorgang kann beginnen. Durch den Luftstrom wird die Kapsel in Rotation versetzt. Die entstehenden Zentrifugalkräfte bewirken eine Leerung der Kapsel, da das Pulver an die jeweiligen Enden gedrückt wird und die Kapsel idealerweise durch die Perforation verlässt, ohne bedeutende Rückstände zu hinterlassen. Die Wirkstoffpartikel passieren danach ein grobes Sieb, welches dazu dient, Kapselfragmente zurückzuhalten, und gelangen über das Mundstück aus dem Inhalator heraus.

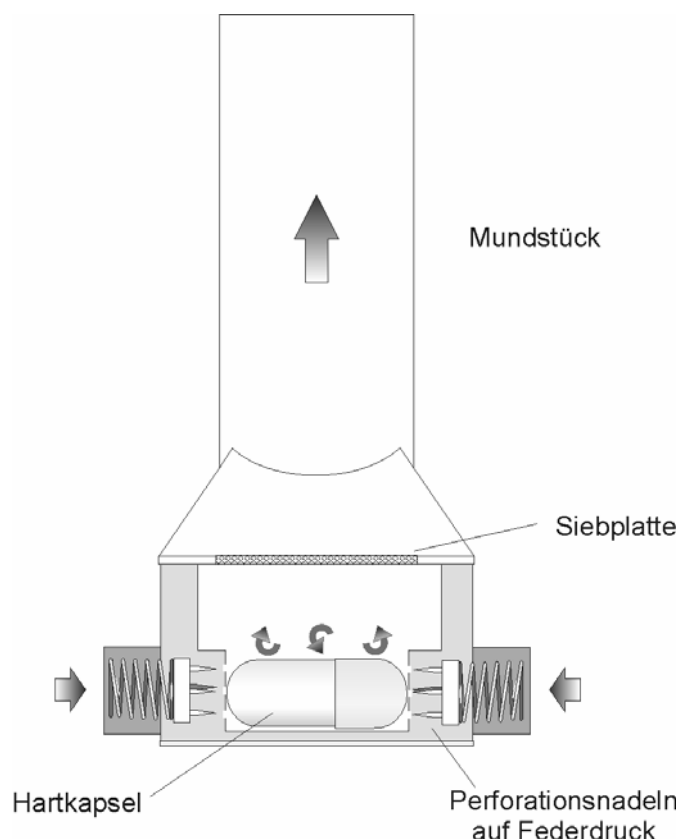


Abbildung 3.5: Cyclohaler- schematische Darstellung

Diese einfache Konstruktion eignet sich - wie sich auch später zeigen wird - sehr gut zur Dispergierung kleiner Partikel und erzeugt einen sehr niedrigen Atemzugswiderstand. Zur Abfassung der jeweiligen Dosis wurden hier HPMC-Kapseln der Größe 3 (Qualicaps, Alcobendas, Spanien) verwendet, es können generell aber auch andere Kapselmaterialien wie Gelatine oder Polyethylen eingesetzt werden.

3.1.7 EXUBERA®

Exubera® war die erste zugelassene inhalierbare Insulinformulierung in Kombination mit einem eigens entwickelten Inhalator und stammt von der Firma Pfizer (New York, USA), wurde jedoch im Oktober 2007 nach circa 1,5jähriger Marktpräsenz nicht weiter vertrieben. Es handelt sich um schnell wirksames Humaninsulin in Pulverform und war für die Therapie von Diabetes Typ 1 und 2 zugelassen, sofern der Patient nicht raucht, keine chronisch-obstruktive Lungenerkrankung hat oder an Asthma leidet. Im Vergleich zu einer subkutanen Injektion ist eine ca. 10-fach höhere Dosierung notwendig, um eine vergleichbare Blutzuckersenkung zu erreichen (Parhofer, 2004). Dies und der aufwändige Inhalator erhöhen die Therapiekosten um das drei- bis fünffache der Standardtherapie. Als Nebenwirkung kann es neben Hypoglykämie auch zu Husten oder seltener auch zu Dyspnoe kommen (Pfizer Pharma GmbH, 2006a).

Das Pulver ist eine sprühgetrocknete Mischung aus Humaninsulin, Mannitol, Glycin, Natriumcitrat · 2 H₂O und Natriumhydroxid, die in Aluminiumblister zu nominell 1 oder 3 mg Insulin abgefasst ist. Dabei

sollen 1 mg nach der Inhalation 3 IE und 3 mg 8 IE schnell wirksamem, subkutan injiziertem Insulin entsprechen (Pfizer Pharma GmbH, 2006a). Der Inhalator besteht aus zwei Teilen, dem Unterteil mit der Dispergiereinheit und dem Oberteil, bestehend aus einem Spacer mit Mundstück (Abbildung 3.6). Um den Wirkstoff freizusetzen, muss zunächst der Pumpengriff herausgeklappt und wieder kräftig in seine Ausgangsposition zurückgedrückt werden. Dies dient der Komprimierung eines Luftreservoirs, welches zur Desagglomeration verwendet wird. Betätigt man nun den Auslöseknopf bei geschlossenem Mundstück, so wird der Aluminiumblister mit zwei Dornen geöffnet und von der komprimierten Luft schlagartig durchströmt. Dadurch zerstäubt das Pulver und verteilt sich im Spacer. Wird nun das Mundstück in die geöffnete Position gebracht, kann die Dosis eingeatmet werden.

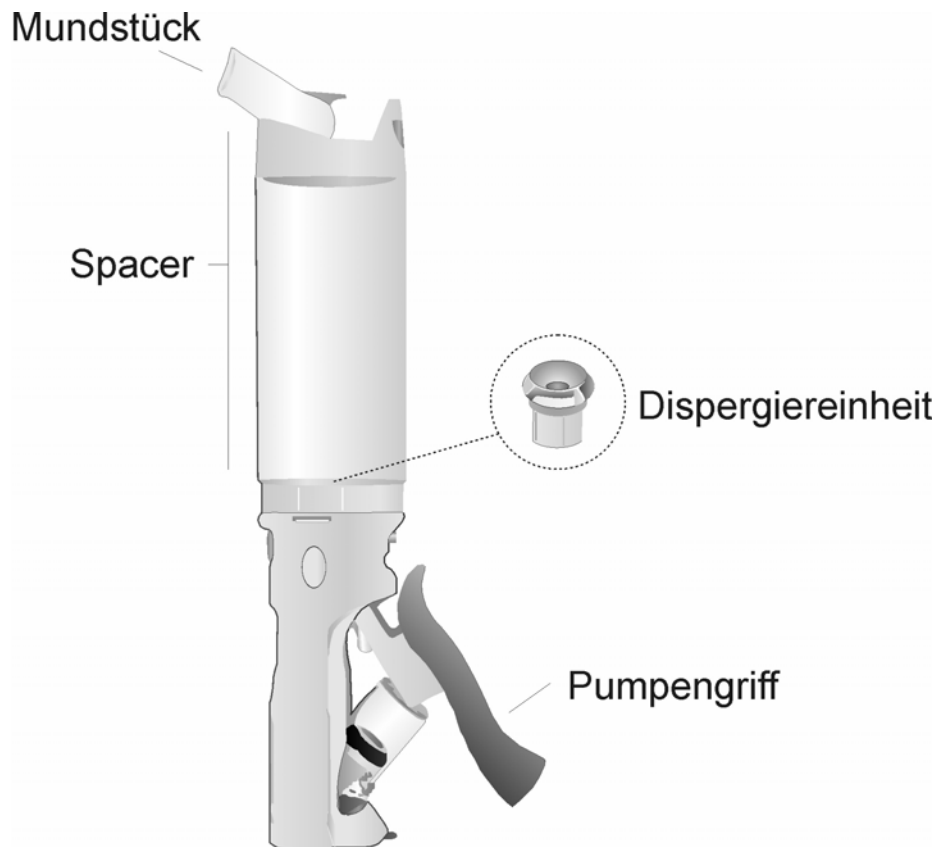


Abbildung 3.6: Exubera® - schematische Skizze

3.1.8 TWINCER

Der an der Universität zu Groningen (Niederlande) entwickelte Twincer ist ein neuartiger Pulverinhalator, der ursprünglich für den Einmalgebrauch in Kombination mit hohen Wirkstoffdosen konstruiert wurde (de Boer, 2006a). Realisiert wird dies durch den kostengünstigen Aufbau des Inhalators, der aus nur drei flächigen Kunststoffteilen besteht. Die Pulverdispergierung findet in zwei Klassierkammern statt, die auch große Mengen an Pulver fassen können. Bewährt hat sich der Twincer bereits in Versuchen zur Applikation hoher Colistindosen zur Behandlung cystischer Fibrose (Westermann *et al.*, 2007).

Der Wirkstoff befindet sich in einem Aluminiumblister, dessen Abdeckfolie aus dem Inhalator herausragt und direkt vor dem Inhalationsvorgang entfernt werden muss. Während der Inhalation strömt die Luft durch mehrere Lufterlässe (Abbildung 3.7) in den Inhalator, einerseits durch den zentralen Einlass, um das Pulver mitzureißen und andererseits durch die seitlichen Öffnungen direkt in die beiden parallel angeordneten Klassierkammern und daran vorbei. Die in den zyklonartigen Kammern vereinigten Luftströme bewirken eine schnelle zirkuläre Bewegung des Pulvermaterials, das durch diese Verwirbelung hohen Scher- und Prallkräften ausgesetzt und schließlich in seine Einzelpartikel dispergiert wird. Erst wenn die Partikel klein genug sind, können sie die Kammer verlassen und sich im oberen Kompartiment des Inhalators in Richtung Mundstück bewegen. Das Prinzip der so genannten „Air Classifier Technology“ hat sich auch schon in anderen Inhalatoren bewährt, beispielsweise dem Novolizer (de Boer, 2006b; de Boer, 2006c). Durch die hohen Zentrifugalkräfte wird das Pulver allerdings auch stark an die Wandungen der Kammern gedrückt

und kann sich dort ablagern. Der Umfang der Ablagerung hängt stark von den jeweiligen Substanzeigenschaften ab. Abhilfe können so genannte „sweeper-crystals“ schaffen. Diese bestehen aus einem pharmakologisch inerten Material – z.B. Laktose – in definierter Teilchengröße, welche so zu wählen ist, dass die Partikel die Klassierkammern nicht oder nur in sehr geringem Anteil verlassen können. Diese Partikel können direkt zu dem Wirkstoff im Blister gegeben werden (keine Mischung erforderlich) und verringern die Pulverablagerung in den Klassierkammern, indem sie abgeschiedene Wirkstoffanteile durch Prall und Scherung von der Wandung lösen.

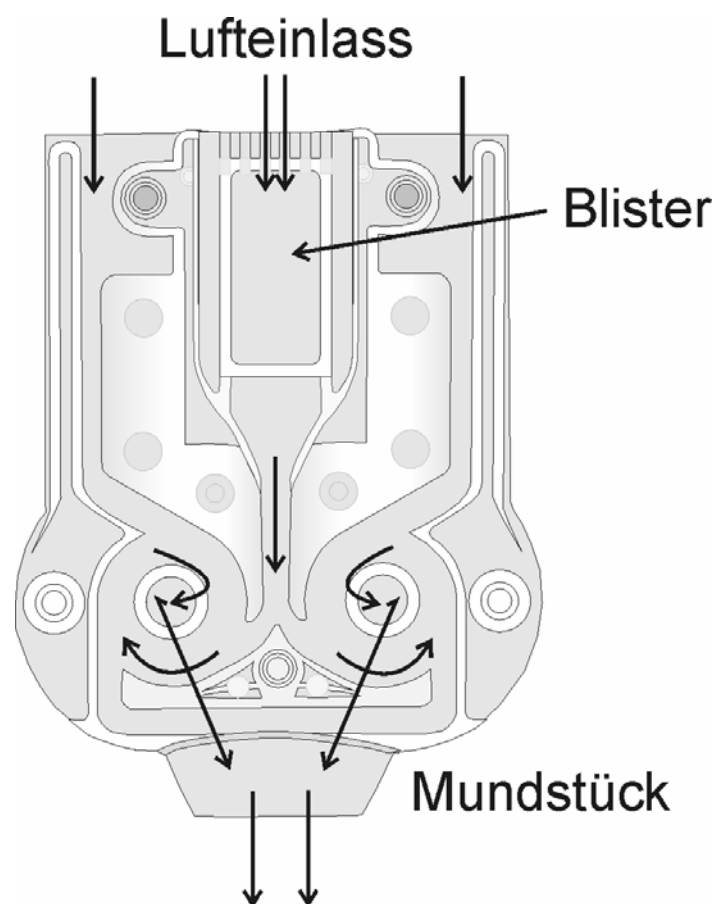


Abbildung 3.7: Twincer - schematische Skizze

3.1.9 MONOHALER

Der Monohaler der Firma RPC Formatec GmbH (Mellrichstadt, Deutschland) ist eine Neuentwicklung und stand als Prototyp zur Verfügung. Das Funktionsprinzip ähnelt dem des Twincers, allerdings ist hier nur eine Klassierkammer vorhanden (Abbildung 3.8). Die Wirkstoffdosis befindet sich in einem Blister, der vor der Inhalation manuell geöffnet werden muss. Das Pulver gelangt mit dem Luftstrom in die Klassierkammer, wo durch Kombination mit einem zweiten, seitlichen Luftstrom die zirkuläre Bewegung induziert wird. Das Pulver wird dispergiert und verlässt den Zyklon in adäquater Teilchengröße in Richtung Mundstück. Ein Einsatz der bereits erwähnten „sweeper-crystals“ (siehe 3.1.8) ist vom Hersteller (noch) nicht empfohlen.

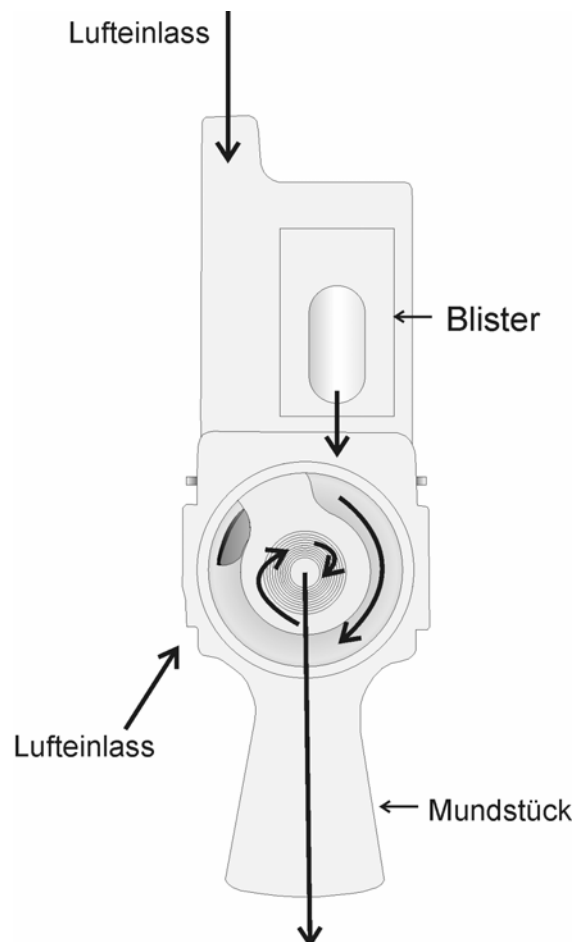


Abbildung 3.8: Monohaler - schematische Skizze

3.2 METHODEN

3.2.1 PRÄPARATIVE METHODEN

3.2.1.1 HERSTELLUNG DER LÖSUNGEN

Um die Fällung reproduzierbar zu gestalten, muss das Insulin vor der Präzipitation komplett gelöst vorliegen. Hierzu wurde die Ausgangsware genau abgewogen und in vorgelegtem Aqua bidest. mit einem Magnetrührer dispergiert. Mit 1 N HCl wurde die Suspension auf ca. pH 3 eingestellt, um eine klare Lösung zu erhalten. Diese Lösung wurde mit 1 N NaOH neutralisiert, wobei um den isoelektrischen Punkt herum (ca. pH 4-6) eine Trübung auftrat, die bei pH 6,5 wieder verschwand. Die neutralisierte Lösung wurde mit 0,1 N HCl auf den erforderlichen pH-Wert eingestellt, dieser wurde dabei mit einem Inolab pH 730 pH-Meter (WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland) überprüft. Sind Additive verwendet worden, so erfolgte an dieser Stelle deren Lösung. Mannitol und L-Leucin konnten direkt unter Rühren hinzugegeben werden, HPMC wurde zunächst auf die Flüssigkeitsoberfläche aufgestreut und erst nach vollständiger Quellung untergerührt. Von der fertigen Lösung wurde ca. 1 ml Probe gezogen, um die tatsächliche Insulinkonzentration mittels HPLC zu bestimmen.

3.2.1.2 PRÄZIPITATION

Für die Vorversuche zur Ermittlung der optimalen Insulinkonzentration, des optimalen pH-Wertes und des Verhältnisses von Lösemittel zu Nicht-Lösemittel wurde die Präzipitation im Becherglas durchgeführt. Dazu wurde die wässrige Insulinlösung vorgelegt und bei 500 U/min auf einem Magnetrührer in Bewegung gehalten. Die erforderliche Menge an Nicht-Lösemittel wurde komplett hinzugegeben. Die Mischung wurde noch mindestens 5 min gerührt, bevor eine Charakterisierung der erhaltenen Suspension stattfand.

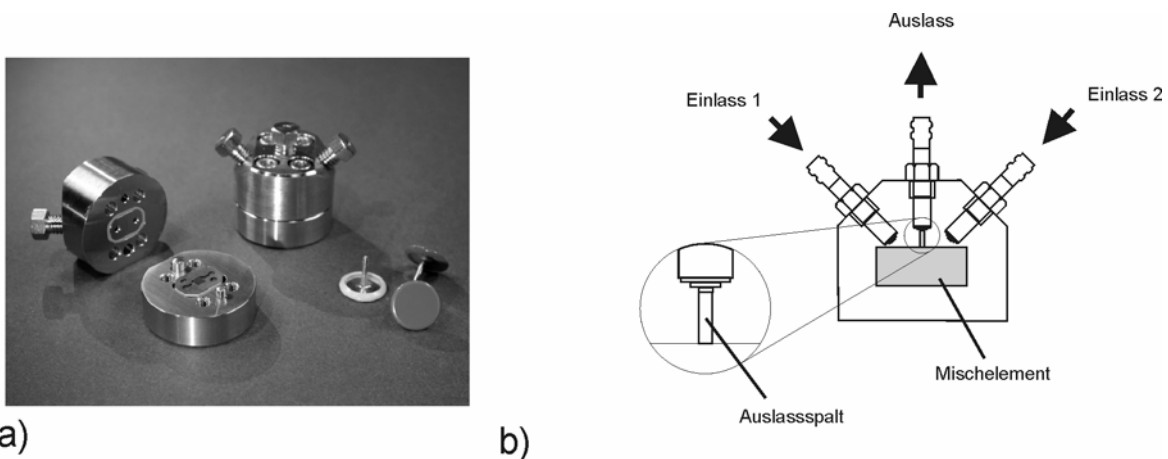


Abbildung 3.9: a) Mikromischer offen und geschlossen
b) schematischer Querschnitt (IMM)

Derartige Batch-Verfahren führen jedoch nicht zu einheitlichen Teilchengrößenverteilungen (Texter, 2001). Daher wurde, um eine kontrollierte und vor allem reproduzierbare Fällung zu ermöglichen, zur Produktion der Suspensionen, die anschließend sprühgetrocknet werden sollten, ein Schlitz-Interdigital-Mikromischer (SIMM-V2, IMM, Mainz, Deutschland) verwendet. Die Mikroreaktortechnik stellt ein kontinuierliches Verfahren da und hat in der chemischen Verfahrenstechnik zunehmend an Bedeutung gewonnen (Jähnisch *et al.*,

2004) und es hat sich bereits gezeigt, dass sie ein vielversprechendes Verfahren zur Produktion organischer und anorganischer Zubereitungen darstellt, das auch im industriellen Maßstab einsetzbar ist (Schenk *et al.*, 2002; Schenk, Nalwa, H. S., 2004). Der Edelmischer besteht aus einem Oberteil mit zwei seitlichen Flüssigkeitseinlässen und einem zentralen Auslass, einem Unterteil und darin eingebettet dem Mischelement (Abbildung 3.9). Letzteres wurde mit Hilfe der sog. LIGA-Technik geformt. Dabei entstehen die Mischkanäle in einer Breite von $40\ \mu\text{m}$ und einer Höhe von $300\ \mu\text{m}$ durch Röntgen-Lithographie, Galvanoformung und Abformen durch Heißprägen (Haverkamp *et al.*, 1999). Pro Phase gibt es 15 derartige sinusförmige Mischkanäle, die verzahnt angeordnet sind (Abbildung 3.10). Die zu mischenden Flüssigkeiten werden dem Mischer über zwei präparative HPLC-Pumpen (Smartline Pump 1000, 50 ml/min Pumpenkopf, Knauer, Berlin, Deutschland) zugeführt. Durch den Einsatz von jeweils zwei Saphirkolben kann eine geringe Pulsation gewährleistet werden.

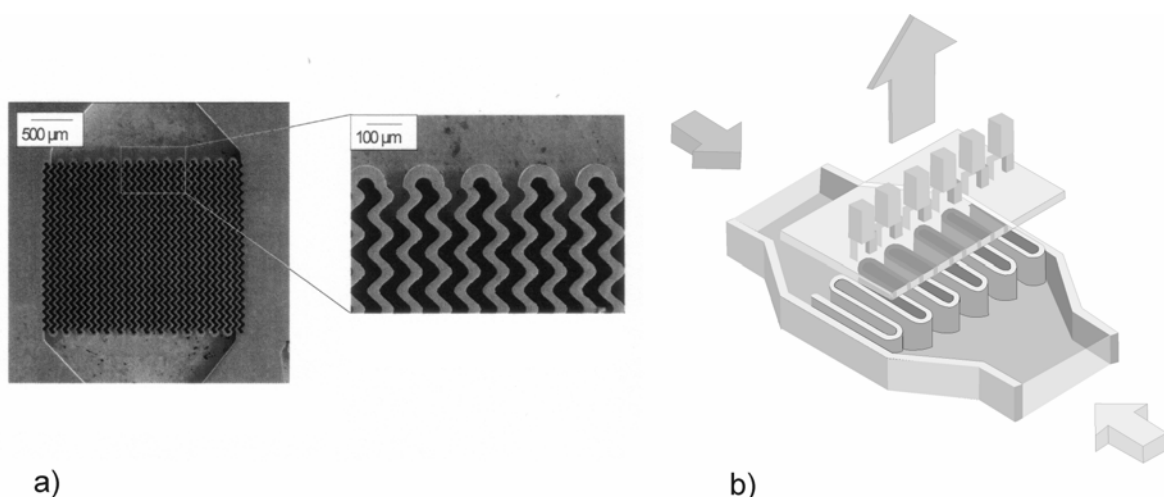


Abbildung 3.10: a) Mischelement

b) Mischprinzip im Mikromischer (modifiziert nach IMM)

Im Mischelement treffen die Flüssigkeiten aufeinander und liegen zunächst lamellar nebeneinander vor. Senkrecht zur ursprünglichen Flussrichtung strömen sie zum Austrittsspalt und mischen sich sehr schnell durch Diffusion und eine auftretende turbulente Strömung, die durch die Spaltverkleinerung im Auslass induziert wird. Da kein bewegliches Mischwerkzeug verwendet wird, spricht man hier von einem passiven Mischen (Hessel *et al.*, 2005). Das sehr kleine Innenvolumen von 8 μl und eine maximal zugelassene Druckbelastung von 100 bar beschränken den Durchsatz eines Mikromischers nach oben, allerdings kann hier auf so genanntes „numbering-up“ zurückgegriffen werden, wobei die Anzahl parallel betriebener Mischer erhöht wird, um diese Mischtechnik industriell nutzbar zu machen (Schenk, 2004).

3.2.1.3 SPRÜHTROCKNUNG

Die Insulinsuspensionen und -lösungen wurden in einem Mini-Büchi B-290 (Büchi, Flawil, Schweiz) Sprühtrockner getrocknet. Über eine Schlauchpumpe wird die zu trocknende Flüssigkeit zu einer pneumatisch selbstreinigenden Zweistoffdüse mit einem Innendurchmesser von 1,4 mm gefördert. Dort wird sie in kleine Tröpfchen versprüht und im Gleichstrom getrocknet (siehe Abbildung 3.11). Dies gewährleistet eine geringe Temperaturbelastung des Sprühgutes, da die feuchtesten Partikel auf die wärmste Luft treffen und diese durch Energieentzug aufgrund von Verdunstung abgekühlt wird, so dass die trockenen Partikel die geringste Wärmebelastung erfahren. Im Hochleistungszyklon werden die Partikel vom Luftstrom getrennt, eine maximale Aspiratorleistung von 40 m^3/h sorgt für eine höchstmögliche Trennleistung von 97% für Teilchen mit der Größe von 3 μm (Büchi, 2009). Nach dem Zyklon folgt ein Filter, um nicht abgeschiedene Partikel

aus der Abluft zu entfernen. Der Trockenraum des Sprühtrockners ist vorwiegend aus Glas gefertigt, um eine visuelle Prozessüberwachung zu ermöglichen.

Die Stabilität von Insulin ist bei längerer Temperaturbelastung nicht gewährleistet. So ergibt sich ein Aktivitätsverlust von ca. 17% wenn die Probe eine Woche lang bei 52°C gelagert wird (Sahyun *et al.*, 1936). Neuere Studien jedoch zeigen die Unbedenklichkeit des Sprühtrocknungsprozesses, bei dem das Insulin nur sehr kurz der erhöhten Temperatur ausgesetzt ist, sofern die Ablufttemperatur unter 120°C gehalten wird (Stahl *et al.*, 2002). Die Zulufttemperatur wurde auf 100°C festgelegt und die Ablufttemperatur durch Regulierung des Produktflusses auf 50°C eingestellt. Je nach Lösung/Suspension resultierte eine Pumpenleistung von 10 – 20%, entsprechend einem Massefluss von 3,3 bis 7,8 g/min. Die Ausbeute, berechnet als die Menge an trockenem Pulver im Verhältnis zur eingesetzten Feststoffmenge, schwankte zwischen 45% und 70%.

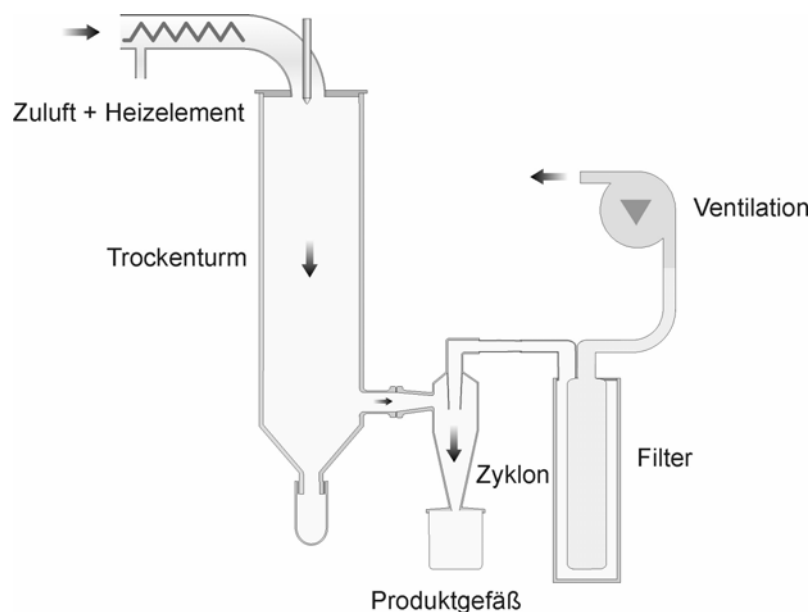


Abbildung 3.11: Schematische Zeichnung des Luftweges im Büchi B-290

3.2.1.4 LAGERUNG

Die sprühgetrockneten Insulinpulver wurden je nach weiterem Verwendungszweck entweder in auf spezielle Luftfeuchten eingestellten Exsikkatoren oder Klimaschränken gelagert. Sollte die Probe möglichst trocken aufbewahrt werden, so wurde sie in einem verschlossenen Schnappdeckelgefäß in einem Silicagel-Exsikkator eingelagert. Die Untersuchung der Proben bei verschiedenen Luftfeuchten und Raumtemperatur wurde in Exsikkatoren mit gesättigten Salzlösungen im offenen Gefäß durchgeführt. Hier betrug der Einlagerungszeitraum mindestens zwei Wochen, um eine ausreichende Konditionierung der Pulver zu gewährleisten. Die Luftfeuchten wurden mit einem testo 601 Hygrometer (Testo GmbH & Co., Lenzkirch, Deutschland) überprüft (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Exsikkatorenfeuchte

| Lagerung über | Zielfeuchte | gemessene Luftfeuchte | gemessene Temperatur |
|--|-------------|-----------------------|----------------------|
| Silicagel | - | 6,6% rF | 22,4°C |
| gesättigter Kaliumacetatlsq. | 23% rF | 23,6% rF | 24,4°C |
| gesättigter Magnesiumnitratlsq. | 53% rF | 55,1% rF | 23,7°C |
| gesättigter Kaliumchloridlsq. | 85% rF | 84,2% rF | 24,3°C |

Die Langzeitlagerung (siehe Kapitel 4.4) wurde in konditionierten Klimaschränken bei den Bedingungen 25°C/60% rF (300 SB, Weiss Technik, Lindenstruth, Deutschland) und 40°C/75% rF (SB1113³⁰⁰, Weiss

Technik) durchgeführt. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Lagerungsarten gewählt, einerseits im offenen Gefäß und andererseits in verblisterten Kapseln. Dazu wurde das Pulver in benötigter Menge in HPMC-Kapseln eingewogen, PVC Folie (Perlalux[®]-130 950 glasklar, Dicke 250 µm, ac-Folien GmbH, Müllheim, Deutschland) mit einer Blisterpresse (Fantasy, O.M.A.R., Mailand, Italien) tiefgezogen, die Kapseln in den Blister gefüllt und der Blister mit Aluminiumfolie (Alu lidding foil LA 1723, Dicke 20 µm, Alcan Packaging Singen GmbH, Singen, Deutschland) versiegelt. Da die PVC-Folie in Bezug auf Wasserdampf nur geringfügige Barrierefunktion besitzt, wurde eine Anzahl gefüllter Kapseln darüber hinaus in geschlossenen Aluminiumbeuteln (Alu lidding foil LA 1723, Dicke 20 µm, Alcan Packaging Singen GmbH) gelagert.

3.2.2 ANALYTISCHE METHODEN

3.2.2.1 PHOTONENKORRELATIONSSPEKTROSKOPIE

Die Partikelgrößenverteilung nach der Präzipitation wurde mittels dynamischer Lichtstreuung, auch bekannt als Photonenkorrelationsspektroskopie (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Malvern, UK) ermittelt. Anders als bei statischen Lichtstreuerverfahren wird hier die zeitliche Schwankung der Streuintensität beobachtet. Dem zu Grunde liegt die Brownsche Molekularbewegung, die durch Zusammenstoß mit Lösemittelmolekülen im umgebenden Dispersionsmedium zustande kommt. Kleine Teilchen werden dadurch intensiver beeinflusst und bewegen sich dementsprechend schneller als größere Teilchen. Die Streulichtintensität fluktuiert somit auch je stärker, desto kleiner die Partikel sind. Die zu verschiedenen Zeiten gemessenen Intensitäten werden mit sich selbst korreliert, es entsteht eine e-Funktion. Im Fall einer monomodalen Verteilung lässt sich aus dem exponentiellen Abfall der Kurve der Diffusionskoeffizient D ermitteln. Mit Hilfe der Stokes-Einstein-Beziehung (Gleichung 3.1) lässt sich somit auch der hydrodynamische Durchmesser d_h der Partikel bestimmen.

$$d_h = \frac{k_B \cdot T}{3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D} \qquad \text{Gleichung 3.1}$$

k_B Boltzmann-Konstante

T absolute Temperatur

η dynamische Viskosität

Der Diffusionskoeffizient ist umgekehrt proportional zum hydrodynamischen Durchmesser, also sind die Teilchen umso kleiner, je steiler die Korrelationsfunktion abfällt. In den meisten Fällen wird keine streng monomodale Intensitätsverteilung erhalten. Um diese Verteilungen mathematisch beschreiben zu können, werden Polynome herangezogen, aus denen sich der Polydispersitätsindex (PDI) berechnet. Dieser ist eine dimensionslose Größe mit Zahlenwerten zwischen 0 und 1 und beschreibt gewissermaßen die Qualität der Größenverteilung (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Beurteilung der PDI-Werte

| PDI-Wert | Verteilungsqualität |
|-----------------|-----------------------------|
| < 0,05 | monodispers |
| 0,05 - 0,2 | enge Verteilung |
| 0,2 - 0,7 | breite Verteilung |
| > 0,7 | Ergebnisse nicht auswertbar |

Im Messgerät wurde das Streulicht nach Einstrahlung eines Lasers (633 nm) in einem Winkel von 173° detektiert, um den Effekt von Mehrfachstreuung zu minimieren (Abbildung 3.12). Zwei bis fünf Minuten nach der Fällung wurden ca. 1,5 ml der Suspension in eine Polystyrol-Einmalküvette überführt und diese in den Küvettenhalter gestellt. Nach zwei Minuten Equilibrierungszeit bei 25°C wurde die Probe vermessen. Die Auswertung erfolgte mit der zugehörigen Software DTS Nano (Malvern Instruments) und fokussierte sich auf die Parameter der mittleren Teilchengröße nach Intensitätsverteilung und PDI.

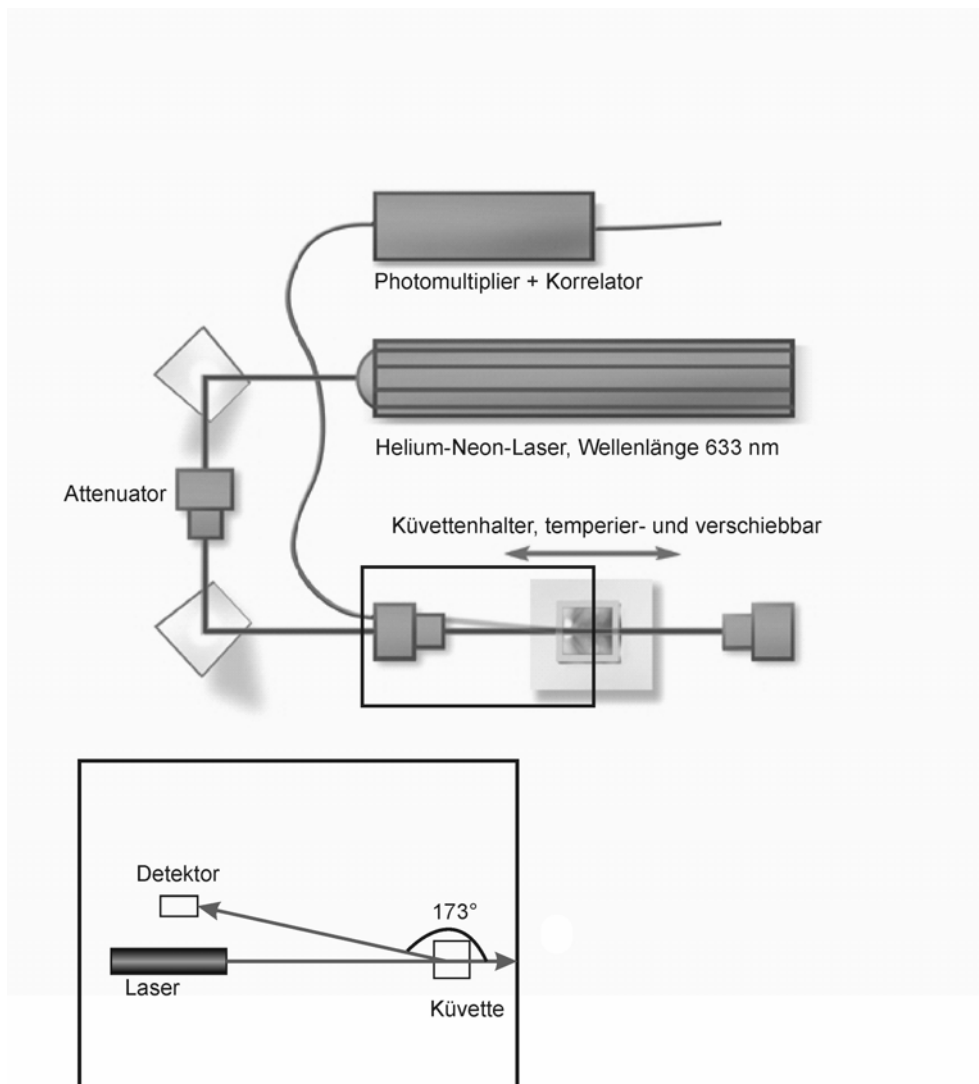


Abbildung 3.12: Schematischer Messaufbau im Zetasizer

3.2.2.2 LASERDIFFRAKTOMETRIE

Das Verfahren der Laserdiffraktometrie nutzt den Beugungseffekt von Laserstrahlen an Partikeln, der je nach Krümmung des Partikels unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Durch rechnerische Aufschlüsselung der Beugungsmuster nach Mie oder Fraunhofer lässt sich entsprechend auf die Partikelgröße rückschließen. Kleine Partikel erzeugen große Beugungsringe, große Partikel entsprechend kleinere. Die ermittelte Teilchengröße bezieht sich jedoch rechnerisch betrachtet nur auf runde Partikel, die in der Realität kaum anzutreffen sind. Die Werte können

also nicht als „absolut“ betrachtet werden, ein Vergleich unter verschiedenen Chargen ist aber ohne weiteres möglich.

Für Laserbeugungsmessungen im Rahmen dieser Arbeit wurde ein HELOS-Laserdiffraktometer (Sympatec GmbH, Clausthal-Zellerfeld, Deutschland) verwendet. Es weist einen modularen Messaufbau auf, d.h. unterschiedliche Dispergiermodule können in das Grundgerät eingesetzt werden und ermöglichen sowohl eine Trocken- als auch eine Nassdispergierung des Probenmaterials. Eine Reihe von Linsen unterschiedlicher Brennweiten und ein semizirkular aufgebauter Multielementphotodetektor gewährleisten einen theoretischen Messbereich von 0,1 bis 8750 μm .

Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit der Windox-Software (Version 5.4.2.0, Sympatec) nach der Fraunhofer-Theorie. Graphisch dargestellt wurde die relative volumenbezogene Häufigkeit als Verteilungssumme und -dichte in Abhängigkeit der Partikelgröße (x). Die Verteilungssummenkurve konnte zur Ermittlung charakteristischer Quantile benutzt werden. So stellen die Quantile x_{50} , x_{90} und x_{99} aussagekräftige Werte zur Beschreibung einer Partikelgrößenverteilung dar. Ein x_{90} -Wert von 5 μm bedeutet hierbei, dass 90% des Gesamtvolumens an vermessenen Partikeln eine Größe $< 5 \mu\text{m}$ aufweisen.

3.2.2.2.1 NASSDISPERGIERUNG

Um die Teilchengröße der sprühgetrockneten Pulver ohne aerodynamische Einflüsse zu ermitteln, wurde die Messung nach Nassdispergierung durchgeführt. Als Dispersionsmedium diente Miglyol 812. Die Dispergierung erfolgte hierbei in einem Ultraschallbad (Sonorex, Bandelin GmbH, Berlin, Deutschland) für mindestens 10 min,

anschließend wurde die Flüssigkeit in eine 6 ml fassende Quarzküvette gegeben. Vor der eigentlichen Messung wurde eine Referenzmessung mit reinem Dispersionsmedium durchgeführt.

Die Messdauer der Referenz- und Probenmessungen betrug bei allen Messungen fünf Sekunden auf einer Messbasis von 500 Millisekunden, und es wurde der Mittelwert aus drei Messungen pro Probe verwendet. Die optische Konzentration der Messsuspension wurde auf 10-20% eingestellt, um ein reproduzierbares Messergebnis sicherzustellen. Es wurde stets die R1-Linse mit einem Messbereich von 0,18 bis 35 μm verwendet.

3.2.2.2 TROCKENDISPERGIERUNG

Für die Trockendispergierung im Helos-System stehen unterschiedliche Module zur Verfügung. Ist eine Vermessung der komplett dispergierten Partikel gewünscht, so kann die Pulverprobe mittels Luftdruck (maximal 3 bar) zerstäubt und in den Messspalt geblasen werden. Einen anderen Ansatz bietet das hier verwendete INHALER-Modul (Abbildung 3.13, Abbildung 3.14). Hier ist durch eine komplett geschlossene Messkammer die Möglichkeit gegeben, unter definierten Druckbedingungen, wie sie auch bei simulierter Inhalation in Impaktoren herrschen, zu arbeiten. Das Modul beinhaltet einen Adapter für den jeweiligen Inhalator, einen Vorabscheider, in welchem z.B. grobe Trägerlaktose abgeschieden werden soll, die Zentraleinheit mit Quarzglasscheiben Richtung Laser und Detektor, einen Feinpartikelkollektor und den Anschluss zu einer Vakuumpumpe. Mit dem eingebauten Venturimeter kann der Druckabfall gemessen werden, der letztendlich zur Einstellung der gewünschten Flussrate notwendig ist. In dieser Arbeit wurde auf die Verwendung des

Vorabscheiders verzichtet, da nicht mit groben Partikeln gearbeitet wurde.

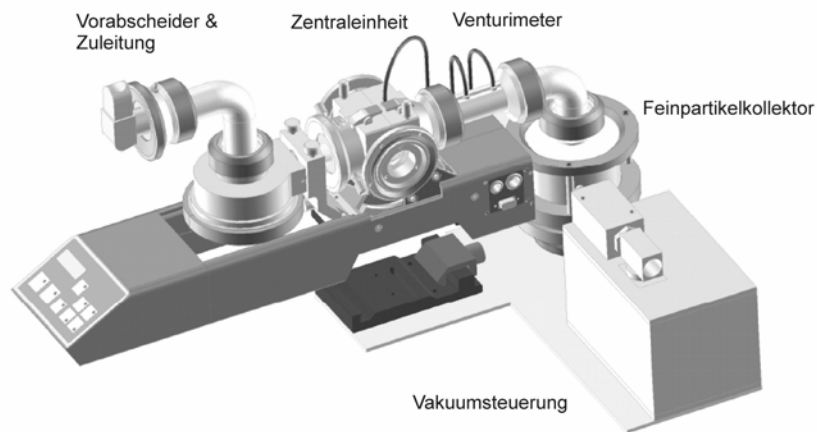


Abbildung 3.13: *INHALER Modul – Seitenansicht (Sympatec)*

Die Messdauer der Referenzmessungen betrug 10 Sekunden, die Probenmessung wurde im Zeitraum von 0,2 – 0,6 s nach Messstart auf einer Messbasis von 10 ms durchgeführt (Linse: R3, Messbereich 0,9 – 175 μm). Es wurde der Mittelwert aus mindestens 10 Messungen pro Probe verwendet.

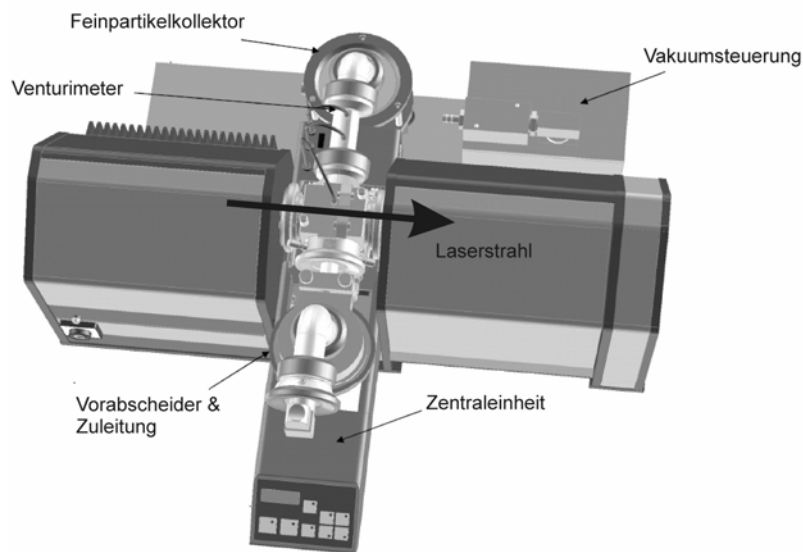


Abbildung 3.14: INHALER Modul im Helos –Aufsicht (Sympatec)

3.2.2.3 RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE

Die rasterelektronenmikroskopischen Bilder wurden mit einem Rasterelektronenmikroskop der Firma Zeiss (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Deutschland) aufgenommen. Die Proben wurden durch Aufstreuen auf Aluminiumträger mit doppelseitig klebender, leitfähiger Folie (Leit-Tabs, Plano, Wetzlar) beklebt, präpariert und anschließend unter Argon-Atmosphäre (50 Pa) bei 50 mA für 65 s mit Gold beschichtet (Sputter Coater, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein).

3.2.2.4 HOCHDRUCKFLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE

Die Ermittlung der Insulinmengen auf den NGI-Stufen, im Inhalator und in den Kapseln sowie im Überstand der Ausbeute- und Löslichkeitsuntersuchungen erfolgte chromatographisch unter Verwendung einer Agilent-HPLC-Anlage (Agilent Technologies, Santa Clara, USA), bestehend aus Pumpe, Entgaser, Autosampler, Säulenofen und Photodioden-Array-Detektor. Die Messungen erfolgten isotherm bei einer Säulenofentemperatur von 25°C. Die Auswertung der

Chromatogramme wurde mit der systemeigenen Software ChemStation durchgeführt. Die Komponenten des Fließmittels wurden vor der Messung 30 min im Ultraschall entgast, Puffer und Acetonitril wurden über den Komponentenmischer direkt von der Anlage gemischt. Die Kalibrierung erfolgte mittels externem Standard in Konzentrationen zwischen 5 µg/ml und 100 µg/ml (Bestimmtheitsmaß 0,998 – 1,0).

Stationäre Phase: Merck Kartuschensystem
Säule: LiChroChart 125-4
LiChroSpher 100 RP-18 (5 µm)
Vorsäule: LiChroChart 4-4
LiChroSpher 100 RP-18 (5 µm)

Mobile Phase: 70% (V/V) Puffer 0,01 M KH_2PO_4 und 0,1 M Na_2SO_4 mit H_3PO_4 auf pH 3,0 eingestellt
30% Acetonitril

Flussrate: 1,0 ml/min

Injektionsvolumen: 50 µl

Retentionszeit: 3-4 min

Wellenlänge: 215 nm

3.2.2.5 AUSBEUTEBESTIMMUNG

Um die Ausbeute an gefällttem Insulin zu bestimmen, wurde 1 ml der zu testenden Suspension für 10 Minuten bei einer Geschwindigkeit von 17000 U/min, entsprechend einer Erdbeschleunigung von $25000 \cdot g$, zentrifugiert (Biofuge 17 RS, Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland). Der klare Überstand wurde vom Sediment getrennt und die Insulinmenge, die sich noch in Lösung befand, wurde mittels HPLC quantifiziert.

3.2.2.6 SÄTTIGUNGSLÖSLICHKEIT

Für die Bestimmung der Sättigungslöslichkeit bei verschiedenen pH-Werten wurde eine gesättigte Insulinlösung (mit deutlich sichtbarem Bodensatz) in Aqua bidest. mit verdünnter Salzsäure auf einen Start-pH-Wert von 3,0 eingestellt. Der pH-Wert der Lösung wurde in 0,5er Schritten mit verdünnter Natriumhydroxidlösung auf pH 7,0 angehoben. Es wurde sichergestellt, dass kontinuierlich ein Bodensatz vorhanden war. Zehn Minuten nach jedem Einstellungsschritt wurde eine Probe von ca. 1 ml entnommen, zentrifugiert und quantifiziert (siehe 3.2.2.5).

Die Proben für die Untersuchung der Sättigungslöslichkeit in organischen Lösungsmitteln wurden nach 30minütiger Ultraschallbehandlung der jeweiligen gesättigten Lösung entnommen und wie oben beschrieben behandelt.

3.2.2.7 NEXT GENERATION PHARMACEUTICAL IMPACTOR

Zur aerodynamischen Beurteilung feiner Teilchen lässt das Europäische Arzneibuch diverse Impaktoren zu. Das Prinzip der Impaktion wurde bereits in Kapitel 2.2 näher beschrieben. Impaktoren nutzen dieses Prinzip, um Teilchen nach ihrem aerodynamischen Durchmesser zu trennen und dadurch Rückschlüsse über das bei der Inhalation entstehende Partikelkollektiv ziehen zu können.

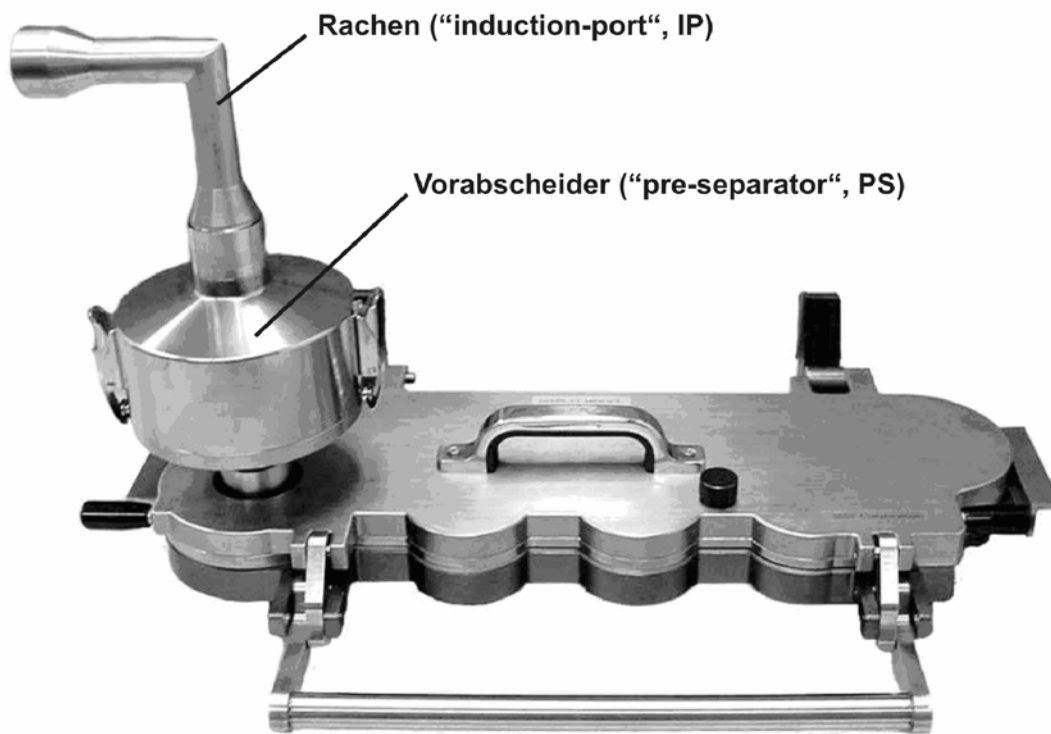


Abbildung 3.15: NGI geschlossen

Der Next Generation Pharmaceutical Impactor (NGI, MSP Corporation, Minneapolis, USA) ist eine der neusten Entwicklungen auf diesem Gebiet (Marple *et al.*, 2003). Es handelt sich hierbei um einen siebenstufigen Kaskadenimpaktor mit endständigem Mikroöffnungskollektor (MOC), der im aktuellen Europäischen Arzneibuch beschrieben ist (Ph. Eur. 6.0 – 2.9.18 Zubereitungen zur Inhalation: Aerodynamische Beurteilung feiner Teilchen, Gerät E). Am Rachen, auch Induktionsport genannt, wird der jeweilige Inhalator mithilfe eines Adapters angesetzt. Durch den rechtwinkligen Aufbau erfahren die zu testenden Partikel hier die erste Richtungsänderung und könnten abgeschieden werden. Der in Abbildung 3.15 dargestellte Vorabscheider dient normalerweise der Abtrennung grobdisperser Partikel wie z.B. Trägerlaktose und wurde in dieser Arbeit daher nicht verwendet. Es folgen acht Lochplatten mit unterschiedlicher

Öffnungsgröße und -anzahl im Oberteil, sowie die zugehörigen Abscheidungsschalen im Unterteil (Abbildung 3.16).



Abbildung 3.16: Luftführung im NGI

Zum Start der Untersuchung muss zuerst das vorbereitete Inhalationsgerät an den Rachen angebracht werden. Durch einen per Vakuumpumpe angelegten Luftstrom wird das Aerosol in den Impaktor gesogen. Es passiert die erste Düse und sofern die Partikel nicht aufgrund ihrer Massenträgheit abgeschieden wurden, folgen sie dem Luftstrom über eine Öffnung im Impaktoroberteil zur nächsten Stufe. Von Stufe zu Stufe werden die Düsenöffnungen bei steigender Anzahl kleiner, was die lokale Strömungsgeschwindigkeit erhöht und somit zur Abscheidung zunehmend feinerer Partikel führt (Abbildung 3.17). Die letzte Stufe, der Mikroöffnungs-kollektor kurz MOC, besitzt eine Düse mit

4032 Öffnungen ($\varnothing 70 \mu\text{m}$) und bewirkt daher eine Impaktion von Partikeln kleiner als $0,3 \mu\text{m}$ in der zugehörigen Abscheideschale.

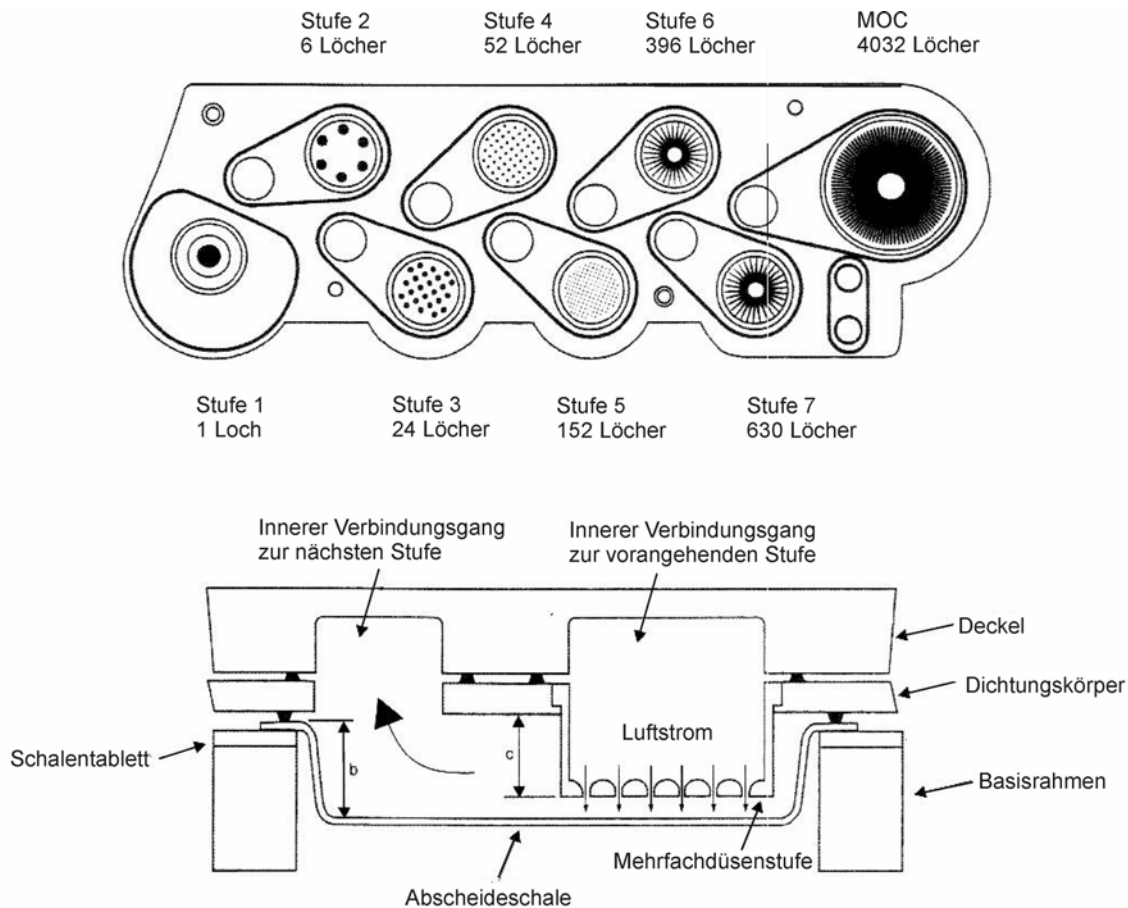


Abbildung 3.17: NGI Düsenaufteilung und Querschnitt (Quelle: Pharm. Eur.)

Die einzelnen Schalen wurden kurz vor dem Versuch mit einem haftenden Überzug („stage-coating“), bestehend aus Brij 35, Glycerol und Ethanol, überzogen, um ein Abprallen der Partikel und somit eine Verfälschung der Messwerte zu minimieren. Nachdem, der jeweiligen Handhabung der Inhalatoren entsprechend (siehe Kapitel 3.1.6 bis 3.1.9), circa 3 mg Wirkstoff (3·1 mg oder 1·3 mg) appliziert wurden, konnte die Wirkstoffverteilung quantifiziert werden. Dazu wurden die Auffangschalen, der Rachen, der Inhalator und die Kapseln mit einer definierten Menge 0,01 N HCl ausgewaschen und die einzelnen

Insulingehalte mittels HPLC bestimmt. Die Säurebehandlung des Insulins wird als unkritisch betrachtet, da bis zu einem pH-Wert von 2,0 im sauren Bereich sogar eine Stabilisierung der Proteinstruktur beobachtet werden kann (Bryant *et al.*, 1993).

Das Europäische Arzneibuch schreibt für diese Untersuchung bei Pulverinhalatoren einen Druckabfall über den Inhalator von 4 kPa vor. Bietet der Inhalator so wenig Widerstand, dass die 4 kPa nicht erreicht werden können, so ist eine Flussrate von 100 l/min vorgeschrieben. Die Dauer des Durchflusses muss entsprechend so eingestellt werden, dass 4 l Luft pro Auslösung durch das Gerät geleitet werden. Die genauen Daten sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst.

Tabelle 3.3: Flussratencharakteristika der unterschiedlichen Inhalatoren

| Inhalator | Flussrate (l/min) | Zeitdauer (s) |
|----------------------|-------------------|---------------|
| Cyclohaler | 100 | 2,4 |
| Exubera [®] | 56 | 4,3 |
| Twincer | 59 | 4,1 |
| Monohaler | 56,5 | 4,3 |

Die Stärke des per Vakuumpumpe angelegten Luftstromes entscheidet über die mittleren Abscheidedurchmesser der einzelnen Trennstufen. Diese Grenzdurchmesser („effective cut-off diameter“, ECD) entsprechen dem höchsten noch auf der jeweiligen Stufe abgeschiedenen Partikeldurchmesser. Eine Berechnung kann mithilfe der im Pharm. Eur. (2.9.18 Zubereitungen zur Inhalation: Aerodynamische Beurteilung feiner Teilchen, Gerät E) beschriebenen Gleichungen erfolgen. Dieser Gleichungen bedient sich auch die hier verwendete Auswertungssoftware der Firma Copley (CITDAS, Version 3.00). Ermittelt wurden hiermit die

jeweilige Feinpartikeldosis (FPD), sprich die Masse an Arzneistoff kleiner oder gleich 5 bzw. 2 μm , und der mittlere massenbezogene aerodynamische Durchmesser (MMAD) in μm . Weitere Berechnungsgrößen waren die Gesamtarzneistoffmasse im Impaktor (Rachen + 8 Schalen) M_{NGI} , und die Arzneistoffmassen in Inhalator M_I und Kapsel M_K . Zunächst wurde die wiedergefundene Wirkstoffmenge M_G nach Gleichung 3.2 berechnet:

$$M_G = M_{NGI} + M_K + M_I \quad \text{Gleichung 3.2}$$

Die sogenannten absoluten Feinpartikelfraktionen berechnen sich aus der Feinpartikeldosis in Relation zu M_G nach Gleichung 3.3, beispielhaft für die Fraktion $< 5 \mu\text{m}$:

$$abs.FPF < 5\mu\text{m} = \frac{FPD < 5\mu\text{m} \cdot 100\%}{M_G} \quad \text{Gleichung 3.3}$$

Die relativen Feinpartikelfraktionen sind unabhängig von der gesamt wiedergefundenen Menge an Wirkstoff, dementsprechend immer höher als die absoluten FPFs, und wurden nach Gleichung 3.4 ermittelt, ebenfalls beispielhaft für die Fraktion $< 5 \mu\text{m}$ dargestellt:

$$rel.FPF < 5\mu\text{m} = \frac{FPD < 5\mu\text{m} \cdot 100\%}{M_{NGI}} \quad \text{Gleichung 3.4}$$

Der Wirkstoffanteil, der nach dem Inhalationsvorgang in Kapsel (WS_K) und Inhalator (WS_I) verblieben ist, berechnet sich nach Gleichung 3.5:

$$WS_{K/I} = \frac{M_{K/I} \cdot 100\%}{M_G}$$

Gleichung 3.5

Zur graphischen Darstellung wurde außerdem noch die relative Durchgangssumme gegen den logarithmisch aufgetragenen ECD herangezogen, um eine bessere Visualisierung über die Wirkstoffverteilung ermöglichen zu können.

3.2.2.8 THERMOGRAVIMETRIE

Zur Ermittlung der Restfeuchten in den unterschiedlich gelagerten Pulverproben konnte kein übliches Restfeuchtemessgerät basierend auf Infrarottrocknung (wie für z.B. Granulate verwendet) genutzt werden, da diese eine zu große Probenmenge erfordern. Daher wurde hier auf eine Thermogravimetrie-Anlage TGA7 (Perkin Elmer, Waltham, USA) mit nachgeschaltetem Signalwandler TAC 7/DX (Perkin Elmer) zurückgegriffen. Es genügt eine Probe von ca. 2 mg, die in einen an eine Mikrowaage gekoppelten Platintiegel eingewogen wird. Die Messung erfolgt in einem geschlossenen Raum unter Stickstoffatmosphäre, in welchem der Tiegel komplett vom Heizelement umschlossen wird. Mit der dazugehörigen Software Pyris (Version 3.81, Perkin Elmer) kann das gewünschte Temperaturprogramm eingestellt werden und die resultierende Masseänderung wird in Abhängigkeit von Temperatur und Zeit aufgezeichnet. Zur Ermittlung der Restfeuchte hat sich folgendes Temperaturprogramm bewährt:

Schritt 1: Aufheizen von 40°C bis 120°C, Heizrate 10°C/min

Schritt 2: 10 min isotherm bei 120°C

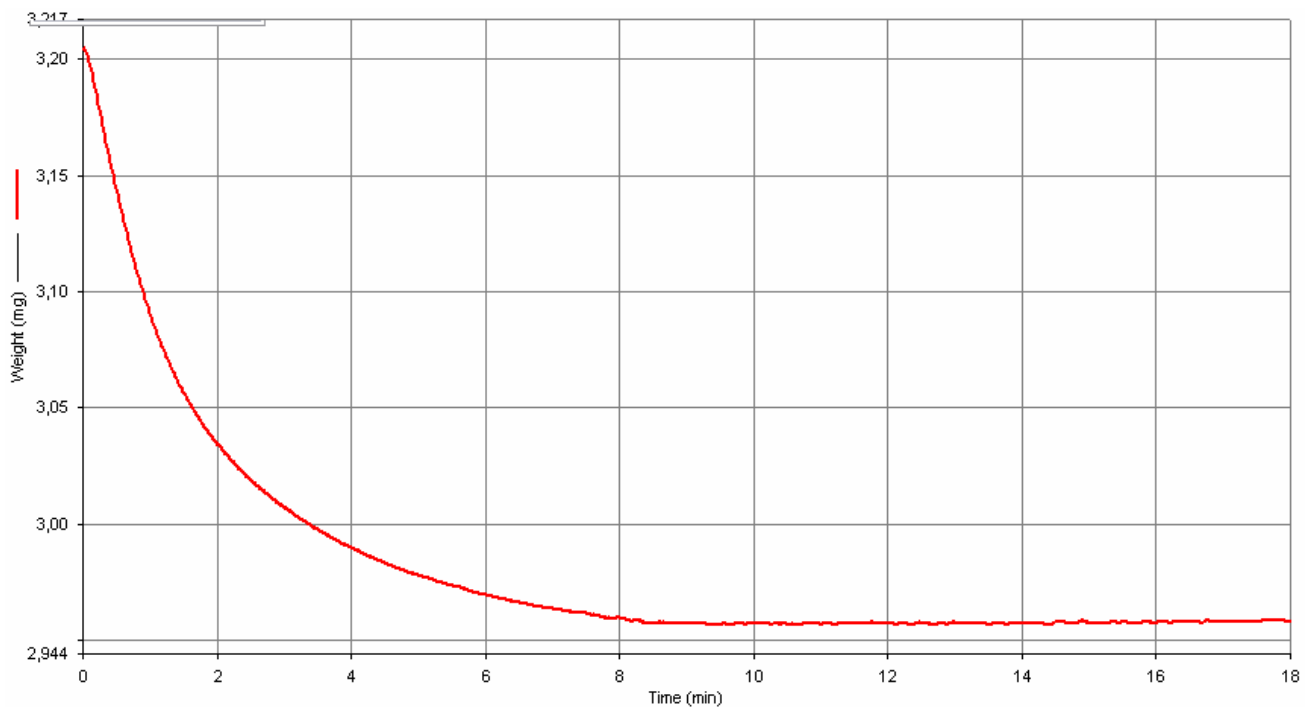


Abbildung 3.18: TGA Masse/Zeit-Diagramm der Probe 00B-U01 (exemplarisch)

Eine typische Masse/Zeit Kurve ist in Abbildung 3.18 dargestellt. Zur Auswertung wurden die Einwaage ($Masse_{\text{feucht}}$) und die Endmasse ($Masse_{\text{trocken}}$) herangezogen. Die Restfeuchte wurde wie in Gleichung 3.6 dargestellt berechnet, es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt.

$$Rf = \frac{(Masse_{\text{feucht}} - Masse_{\text{trocken}}) \cdot 100\%}{Masse_{\text{trocken}}} \quad \text{Gleichung 3.6}$$

3.2.2.9 DYNAMISCHE WASSERDAMPFSORPTION

Ein weiteres gravimetrisches Analyseverfahren stellt die Dynamische Wasserdampfsorption (DVS) dar. Hier wird die Massenänderung einer Pulverprobe bei unterschiedlichen Umgebungsfeuchten aufgezeichnet,

verwendet wurde eine DVS1 (Surface Measurement Systems, Alperton, UK). Circa 20-30 mg des Pulvers werden in ein genau tariertes (Ultramikronwaage, Cahn D200) Glaswägeschälchen gegeben. Anschließend wird die temperierte Messkammer ($25^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$) verschlossen und die Proben- sowie die leere Referenzschale werden mit Stickstoff umströmt. Der Gasstrom wird teilweise durch ein Gefäß mit Aqua bidest. geleitet, um die benötigten Luftfeuchten von 0% bis 90% einzustellen (Abbildung 3.19). Pro Messung wurden zwei Zyklen absolviert, in denen die Luftfeuchte jeweils in Zehnerschritten von 0% auf 90% angehoben und wieder auf 0% abgesenkt wurde. Nach jeder Luftfeuchteänderung wurde die Feuchte bis zur Massenkonstanz oder maximal 120 min beibehalten.

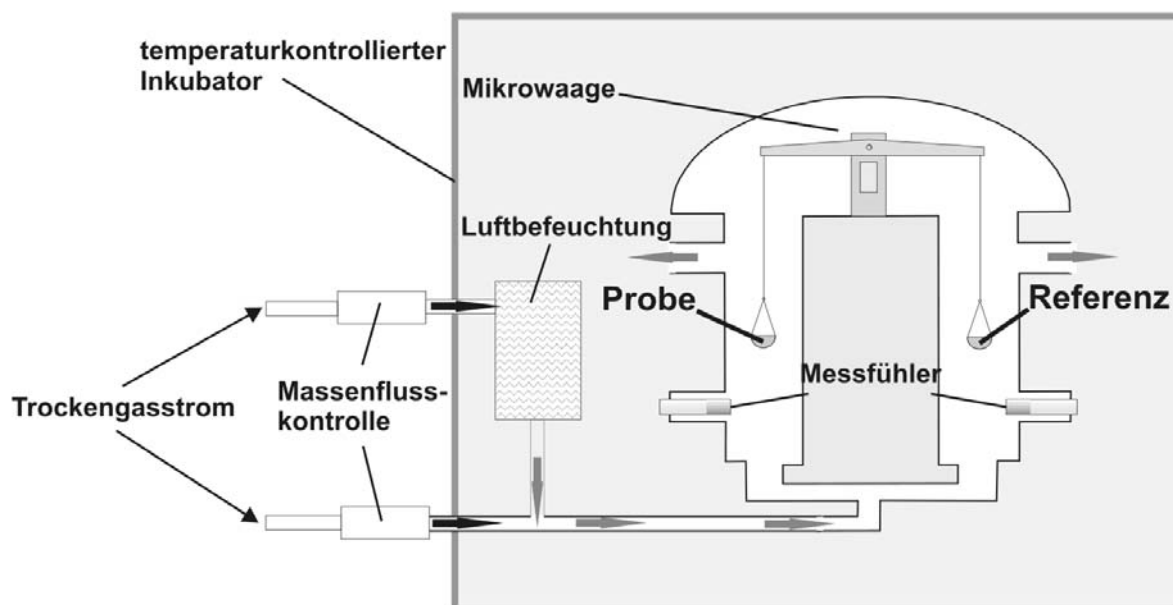


Abbildung 3.19: Dynamische Wasserdampfsorption, schematischer Aufbau

3.2.2.10 AKTIVITÄTSBESTIMMUNG VON INSULIN

Die Aktivität der verwendeten Insulinpulver wurde mit einem Architect CI 8200 System der Firma Abbott (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, USA) bestimmt. Der Architect Insulin Assay ist ein Chemilumineszenz-Mikropartikelimmunoassay (CMIA) zur quantitativen Bestimmung von Insulin (human) in Humanserum oder -plasma. Die Probe, die mit Anti-Insulin beschichteten Mikropartikel und das Anti-Insulin:Akridinium-markierte Konjugat werden gemischt. Das in der Probe enthaltene Insulin bindet an die mit Anti-Insulin beschichteten Mikropartikel und das Anti-Insulin:Akridinium-markierte Konjugat. Nach dem Waschen werden die Pre-Triggerlösung (1,32% Wasserstoffperoxid) und die Triggerlösung (0,35 mol/l Natriumhydroxid) dem Reaktionsgemisch zugegeben, so dass die Chemilumineszenzreaktion ausgelöst wird, welche in relativen Lichteinheiten gemessen wird. Die Menge an Insulin in der Probe ist zu den vom optischen System gemessenen relativen Lichteinheiten direkt proportional.

3.2.2.11 BESTIMMUNG DER WAHREN DICHTE

Die Bestimmung der wahren Dichte erfolgte mit dem Gaspyknometer Accupyc 1330 (Micromeritics Instrument Corporation, Norcross, USA). Als Messgas wurde chemisch inertes Helium 5.0 verwendet. Die Probe wurde zehn Mal vermessen, die ersten vier Messungen wurden verworfen. Als Messergebnis wurde der Mittelwert aus den letzten sechs Messungen verwendet.

3.2.2.12 BESTIMMUNG DER OBERFLÄCHENSPIGUNG

Die Messungen wurden mit einem Plattentensiometer durchgeführt (Processor Tensiometer K12, Krüss GmbH, Hamburg, Deutschland). Circa

20 ml jeder Probe wurden in Glasschälchen überführt und 5 min auf 22°C temperiert. Es wurde eine Messreihe mit 10 Messpunkten vermessen, von denen jeweils der Mittelwert verwendet wurde. Das Gerät wurde mit Aqua bidest. (72 mN/m) kalibriert.

3.2.2.13 GEFRIERTROCKNUNG

Um die gefällten Nanopartikel sichtbar zu machen, wurden ausgewählte Suspensionen gefriergetrocknet. Hierzu wurden circa 10 ml Probe in ein Gefriertrocknungsvial überführt und mit flüssigem Stickstoff eingefroren. In einem Alpha 1-4 Gefriertrockner (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, Deutschland) fand die Primärtrocknung bei einer Temperatur von -25°C und die Sekundärtrocknung bei 20°C statt.

3.2.2.14 KLEINWINKELRÖNTGENDIFFRAKTOMETRIE

Die Messungen erfolgten an der Technischen Universität Braunschweig. Verwendet wurde eine Kratky-Kompaktkamera bei ca. 10^{-4} bar. Die Proben wurden mittels der Temperiereinheit K-Pr temperiert (beide: Anton Paar, Graz, Österreich). Die eingesetzte Röntgenstrahlung war Cu-K α -Strahlung mit einer Wellenlänge von $\lambda=0,1542$ nm, die vom Generator PW1830 mit der Röhre PW2253/11 (beide: Philips, Deutschland) bei einer Spannung von 30 kV und einer Stromstärke von 20 mA produziert wurde. Die Detektion erfolgte mittels ortsempfindlichem Detektor (OED 50M, MBraun, Garching, Deutschland). Die Messzeit wurde um die Totzeit des Detektors korrigiert. Für die Auswertung der Beugungskurven wurde das Programmpaket ITR-92 (Anton Paar) eingesetzt. Das Pulver wurde zwischen zwei Kaptonfolien (Kapton H25, DuPont, Wilmington, USA) vermessen. Die Proben wurden vor der Messung für 10 min bei 20°C temperiert und anschließend 10000 s vermessen.

3.2.2.15 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Ein Großteil der Experimente wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt. Dabei wurde eine Charge mehrfach vermessen, die Anzahl der Messungen findet sich in der jeweiligen Bildunterschrift. Sind mehrere Chargen unter denselben Bedingungen hergestellt und vermessen worden, so wird zusätzlich darauf hingewiesen. Dies war aus wirtschaftlichen Gründen jedoch nur bei einigen ausgewählten Experimenten der Fall.

In den Auswertungen wird ein Mittelwert betrachtet, der sich aus Gleichung 3.7 berechnet, wobei x die jeweiligen Messwerte und n die Anzahl der Experimente darstellt.

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n} \qquad \text{Gleichung 3.7}$$

Waren drei oder mehr Messwerte vorhanden, so diente die Standardabweichung s (Gleichung 3.8) als Maß für die mittlere Abweichung vom Mittelwert und wurde in Grafiken als Fehlerbalken oder bei Nennung der Werte als $\pm s$ angegeben.

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \qquad \text{Gleichung 3.8}$$

Um Chargen miteinander vergleichen zu können, wurde nach Prüfung auf gleiche Varianz (F-Test) ein zweiseitiger Student-t-Test durchgeführt,

um das Signifikanzlevel p zu berechnen (Microsoft Excel XP). Dieses wurde wie folgt bewertet:

| | |
|-----------------------|--|
| $p \geq 0,05$ | kein signifikanter Unterschied |
| $0,05 > p \geq 0,01$ | Trend erkennbar, mehr Daten notwendig |
| $0,01 > p \geq 0,001$ | signifikanter Unterschied (Kennzeichnung: *) |
| $p < 0,001$ | hoch signifikanter Unterschied (**) |

4 PRAKTISCHER TEIL

4.1 FÄLLUNG VON INSULIN

Proteine können durch unterschiedliche Verfahren gefällt werden. Eine Möglichkeit ist das Verfahren der Lösemitteländerung. Es handelt sich hierbei im Fall eines hydrophilen Proteins wie Insulin im Prinzip um einen Aussalzeffekt, bei dem das Lösemittel hydrophobisiert und dem Molekül entzogen wird (Bhat und Timasheff, 1992). Eine Präzipitation durch pH-Änderung ist ebenfalls möglich. Hier wird das Molekül durch Ladungsausgleich am isoelektrischen Punkt hydrophobisiert (Kwon *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2006). Die Zugabe von Metallionen kann zur Bildung schwerlöslicher Komplexe führen (James *et al.*, 1981) und auch Polyethylenglykole sind in der Lage, Proteine ohne nachträglichen Aktivitätsverlust zu fällen (Kumar *et al.*, 2009).

Die in dieser Arbeit verwendeten Ansätze zur Fällung von Insulin beruhen einerseits auf der Solvent-Change-Methode, bei der ein mit dem Lösemittel mischbares Nicht-Lösemittel hinzugegeben wird und andererseits auf einer pH-Änderung. Auf die Verwendung von Metallionen wird im Hinblick auf die Löslichkeit am Wirkort verzichtet. Polyethylenglykol eignet sich hier nicht zur Fällung, da es nach der Sprühtrocknung im Produkt verbleiben würde. Üblicherweise werden Polyethylenglykole mit mittleren molekularen Massen von 200 bis 1000 g/mol eingesetzt (Bhat und Timasheff, 1992), die einen flüssigen bis halbfesten Charakter haben und zur Erzeugung fließfähiger Pulver nicht geeignet sind.

4.1.1 LÖSLICHKEIT VON INSULIN

Basis einer Präzipitation ist die Änderung der Löslichkeit des auszufällenden Stoffes im Umgebungsmedium. Hierzu ist es wichtig, die Sättigungslöslichkeit des jeweiligen Stoffes in diversen Löse- und Nicht-Lösemitteln zu kennen.

Als Lösemittel für Insulin wird zweifach destilliertes Wasser verwendet. Da das Protein über verschiedene funktionelle Gruppen verfügt, kann es als Protonendonator oder -akzeptor dienen. Das bedeutet, dass es sowohl das Umgebungsmedium beeinflussen kann, aber auch von diesem hinsichtlich der Ladungsverteilung beeinflusst wird.

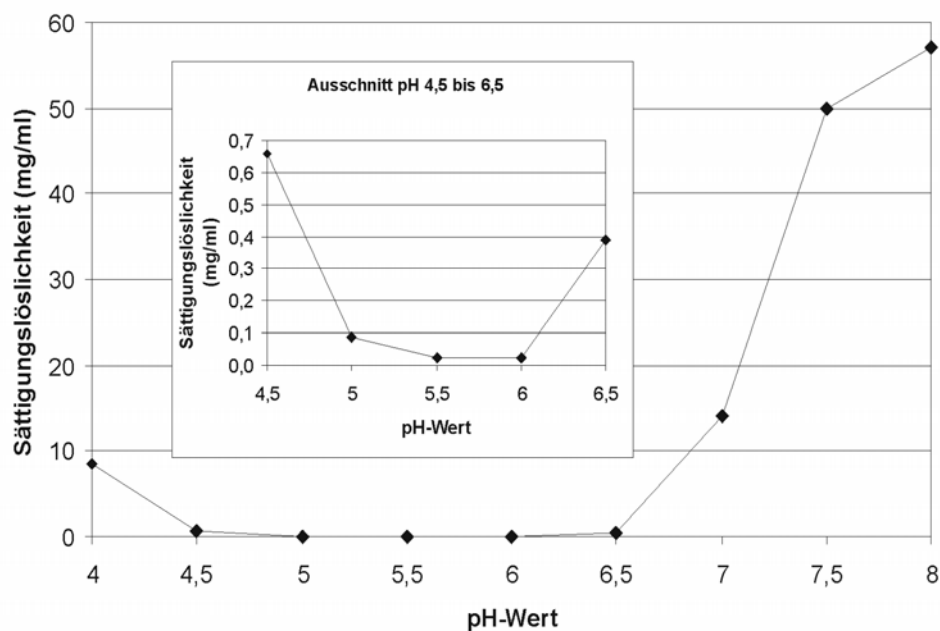


Abbildung 4.1: Sättigungslöslichkeit von Humaninsulin in wässriger Lösung unterschiedlicher pH-Werte; $n=1$

Die Löslichkeit im wässrigen Medium hängt stark vom Grad der Ionisierung ab – ist das Molekül stark geladen und somit hydrophil, löst es sich gut. Mit abnehmender Ladung sinkt die Hydrophilie und demnach auch die Löslichkeit in der wässrigen Umgebung. Am isoelektrischen

Punkt (IEP) – dem pH-Wert, an dem das Molekül nach außen hin ungeladen ist – ist die Löslichkeit am geringsten. Dies konnte auch experimentell gezeigt werden. Das Löslichkeitsprofil von Insulin in wässriger Lösung zeigt ein Minimum bei pH 5,5-6,0 (Abbildung 4.1), in diesem Bereich befindet sich der isoelektrische Punkt. Tabelle 4.1 zeigt die Sättigungslöslichkeit des Humaninsulins in den hier verwendeten mit Wasser mischbaren organischen Lösemitteln. In Ethanol und Isopropanol war mit der verwendeten Methode kein Insulin nachweisbar, es ist in diesen Medien praktisch unlöslich. Die Löslichkeit von Humaninsulin in Methanol ist circa 100fach geringer als die in Wasser bei pH 7.

Tabelle 4.1: Sättigungslöslichkeit von Humaninsulin in organischen Lösemitteln

| Organisches Lösemittel | Sättigungslöslichkeit (mg/ml) |
|------------------------|-------------------------------|
| Methanol | 0,127 |
| Ethanol | nicht nachweisbar |
| Aceton | 0,235 |
| Isopropanol | nicht nachweisbar |

4.1.2 FÄLLUNG DURCH pH-ÄNDERUNG

Durch eine Änderung des pH-Wertes von pH 7,0 auf pH 6,0 kann die Löslichkeit von Humaninsulin um das 1000fache gesenkt werden (Abbildung 4.1). Dies ermöglicht eine schnelle und massive Übersättigung und sollte somit auch zur Präzipitation sehr kleiner Partikel führen (siehe 2.3.2). In der Praxis führte diese Methode jedoch nicht zum gewünschten Ergebnis. Derart ausgefällte Primärpartikel neigten stark zur Flockenbildung und es war nicht möglich, ihre Größe zu bestimmen. Der Ladungsausgleich am IEP bewirkt eine Hydrophobisierung der Insulinpartikel. Im hydrophilen Medium lagern

diese sich mangels ausreichender Hydratation aneinander. Die Bindungen in solchen Agglomeraten beruhen vorwiegend auf van-der-Waals-Kräften und sind im Vergleich zu Wasserstoffbrückenbindungen und ionischen Wechselwirkungen relativ schwach. Daher ließen sich die Agglomerate mittels Scherung durch Schütteln oder Rühren leicht zerteilen, agglomerierten allerdings im Ruhezustand sofort wieder. Eine Vermessung der Agglomerate mittels Laserdiffraktion ergab eine mittlere Teilchengröße von 8-10 µm. Diese Fällungsmethode wurde zugunsten der erfolgreichereren Solvent-Change-Methode nicht weiter verfolgt.

4.1.3 FÄLLUNG DURCH LÖSEMITTELÄNDERUNG

Die verschiedenen Nebengruppen der Aminosäuren des Insulinmoleküls lassen sich in drei Kategorien unterteilen:

- unpolar, z.B. Leucin und Isoleucin
- polar, z.B. Serin und Threonin und
- ionisch, z.B. Glutaminsäure und Lysin

Die polaren und ionischen Gruppen können in wässrigem Medium hydratisiert werden. Auch um die hydrophoben Teile des gelösten Insulins existiert eine strukturierte Wasserschicht. Diese kann jedoch durch Zugabe organischer Lösemittel zerstört werden (Bergeron *et al.*, 2003). Die Insulinmoleküle agglomerieren infolge dessen, um einen energetisch günstigeren Zustand einzunehmen. Die Tertiärstruktur des Proteins, welche für die biologische Aktivität relevant ist, bleibt dabei erhalten (Bocian *et al.*, 2008). Auch bei der Fällung durch Lösemitteländerung (Solvent-Change) spielt der pH-Wert eine wichtige Rolle. Durch Änderung des pH-Wertes in Richtung des IEP nimmt die

Anzahl ionisierter Gruppen ab und das Molekül wird insgesamt hydrophober (siehe 4.1.2). Dadurch wird eine Fällung stark erleichtert.

In Vorversuchen wurde ermittelt, dass eine genaue Einstellung auf pH 6,75 erforderlich ist, um eine Fällung zu ermöglichen. Dieser pH-Wert liegt dicht genug am IEP, um eine ausreichende Hydrophobisierung der Moleküle zu gewährleisten; es tritt jedoch noch keine pH-induzierte Fällung auf. Für alle weiteren Fällungsversuche wurden die Insulinlösungen auf diesen pH-Wert eingestellt.

Im Folgenden werden verschiedene Messparameter in Abhängigkeit vom Mischungsverhältnis des Nicht-Lösemittels zum Lösemittel dargestellt. Als Beschriftung diente eine vereinfachte Nomenklatur, die in Tabelle 4.2 erläutert wird.

Tabelle 4.2: Nomenklatur der Mischungsverhältnisse Nicht-Lösemittel zu Lösemittel

| Charge | Massenteile Nicht-Lösemittel | Massenteile Insulinlösung pH 6,75 | Anteil Nicht-Lösemittel in der Mischung in % (m/m) |
|---------------------|-------------------------------------|--|---|
| 1+8 | 1 | 8 | 11,1 |
| 2+8 oder 1+4 | 2 | 8 | 20,0 |
| 3+8 | 3 | 8 | 27,3 |
| 4+8 oder 2+4 | 4 | 8 | 33,3 |
| 5+8 | 5 | 8 | 38,5 |
| 6+8 oder 3+4 | 6 | 8 | 42,9 |
| 7+8 | 7 | 8 | 46,7 |
| 8+8 oder 4+4 | 8 | 8 | 50,0 |

4.1.3.1 AUSWAHL DES NICHT-LÖSEMITTELS

Zur Fällung von Insulin kommen verschiedene, mit Wasser mischbare, organische Flüssigkeiten in Frage. Die hier verwendeten Nicht-Lösemittel lassen sich bezüglich ihrer Polarität wie folgt sortieren (Engelhardt, 1977):

Methanol > Ethanol > Isopropanol > Aceton

Jedes Nicht-Lösemittel wurde in unterschiedlichen Anteilen mit einer 1%igen Insulinlösung im Becherglas gemischt. Anschließend wurden die mittlere hydrodynamische Teilchengröße der erhaltenen Präzipitate und die Ausbeute an gefällter Substanz bestimmt.

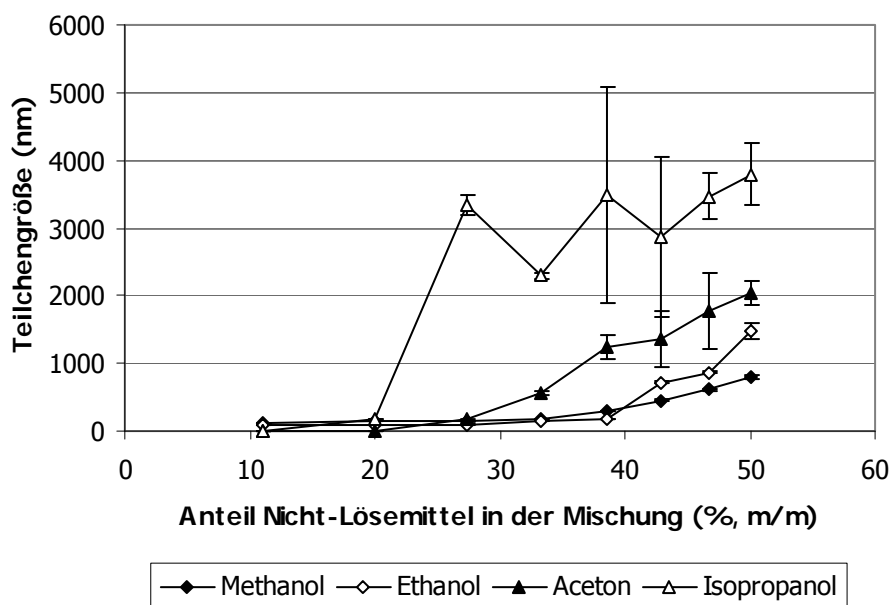


Abbildung 4.2: Einfluss von Art und Menge des Nicht-Lösemittels auf die Größe gefällter Partikel aus 1%iger Insulinlösung, ermittelt per Photonenkorrelationsspektroskopie; $n=3$, Fehlerbalken = SD

Generell war für jedes Nicht-Lösemittel zu beobachten, dass die Teilchengröße mit steigendem Anteil zunahm (Abbildung 4.2). Je mehr Wasser den Insulinmolekülen entzogen wird, desto eher tendieren diese zur Agglomeration. Die Zugabe von Isopropanol führte erst ab einem

Anteil von 20% zu einer Fällung. Die gefällten Partikel zeigten eine große Tendenz zur Agglomeration und lagerten sich schon ab einem Anteil von 27,3% zu 2 bis 4 µm großen Partikeln zusammen. Aceton löste erst ab einem Anteil von 27,3% eine Fällung aus. Schon ab einer Acetonmenge von 38,5% stieg hier die Teilchengröße auf über 1 µm. Die großen Schwankungen der Teilchengrößen nach einer Präzipitation mit Isopropanol und Aceton lassen auf eine schlechte Reproduzierbarkeit schließen, was das Ausschlusskriterium für diese beiden Nicht-Lösemittel darstellt. Methanol und Ethanol waren in ähnlichem Ausmaß in der Lage, Insulin bis zu einem Nicht-Lösemittelanteil von 46,7% zu Partikeln unter 1 µm zu fällen. Lagen Lösemittel und Nicht-Lösemittel allerdings in gleichen Anteilen vor, so zeigte sich Methanol als überlegen.

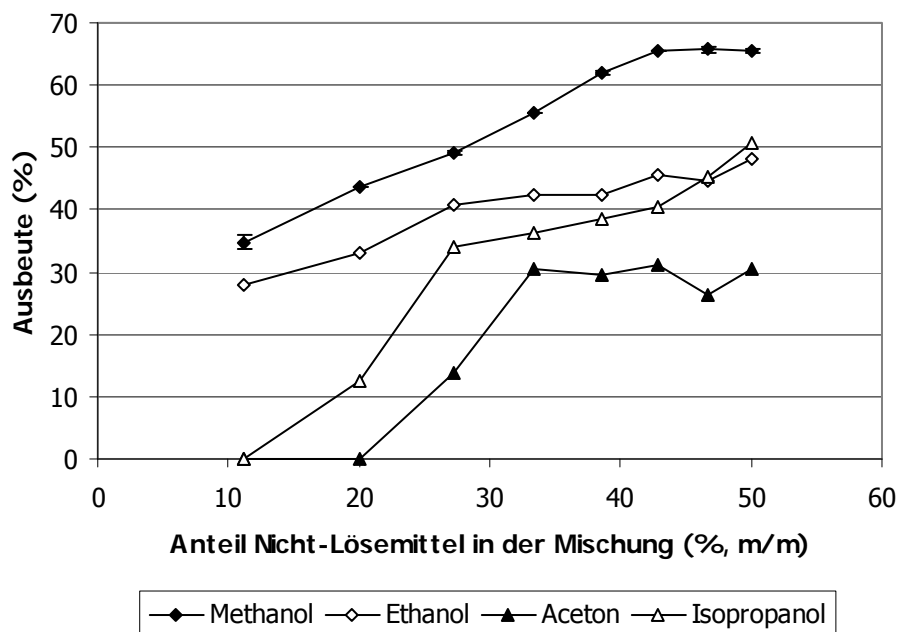


Abbildung 4.3: Einfluss von Art und Menge des Nicht-Lösemittels auf die Ausbeute gefällter Partikel aus 1%iger Insulinlösung; Methanol: $n=3$; Fehlerbalken = SD; Ethanol, Aceton, Isopropanol: $n=1$

Betrachtet man die Ausbeute an gefällttem Insulin in Abhängigkeit vom Nicht-Lösemittel, so lassen sich deutliche Unterschiede erkennen (Abbildung 4.3). Mit Methanol konnte unabhängig von der eingesetzten Konzentration die höchste Ausbeute an gefälltten Partikeln erzielt werden. Mit abnehmender Polarität des Nicht-Lösemittels sank die Fällungsausbeute. Begründet werden kann dies durch den Aussalzeffekt (siehe 4.1). Je unpolarer das Nicht-Lösemittel ist, desto weniger Wassermoleküle kann es aus der Hydrathülle des Insulins entfernen. Dadurch stehen mehr Wassermoleküle zur Hydratation der Insulinmoleküle zur Verfügung und die Fällungsausbeute sinkt. Generell stieg die Ausbeute an gefällttem Insulin mit steigendem Nicht-Lösemittel-Anteil, da die Umgebungsbedingungen für gelöstes Insulin umso schlechter werden, je mehr Nicht-Lösemittel vorhanden ist.

Eine ideale Präzipitation wird als Kombination aus hoher Fällungsausbeute und kleiner Partikelgröße erachtet. Durch eine möglichst hohe Ausbeute wird der Anteil an gelöstem Stoff minimiert, der im späteren Prozess durch die Sprühtrocknung in eine feste Form überführt wird. Dies führt zu Pulvern, die zu einem möglichst großen Anteil aus präzipitierten Partikeln bestehen und sich damit von aus Lösung sprühgetrockneten Partikeln abheben. Als am ehesten geeignetes Nicht-Lösemittel wurde Methanol für weitere Untersuchungen ausgewählt. Es erzeugte die größte Fällungsausbeute bei kleinster Partikelgröße und wurde daher im Folgenden als Fällungsmittel verwendet.

4.1.3.2 EINFLUSS DER INSULIN- UND METHANOLMENGE

Betrachtet man die Präzipitation von Insulin mit Methanol genauer (Abbildung 4.4), so stellt man fest, dass nicht nur die Teilchengröße mit

zunehmender Methanolmenge ansteigt, sondern auch der Polydispersitätsindex (PDI). Die Partikelgrößenverteilung wird demnach breiter. Die Teilchengröße steigt also durch Agglomeration der Teilchen an (siehe Kapitel 4.1.3.1). Die Versuchsergebnisse deuten darauf hin, dass diese Agglomeration nicht gleichmäßig verläuft, sondern zunehmend unterschiedliche Agglomerate entstehen. Bis zu einem Mischungsverhältnis von 6+8 ist der PDI noch kleiner als 0,2, was auf eine enge Verteilung hindeutet. Erst ab einem Nicht-Lösemittelanteil von 46,7% steigt der PDI stark an und man kann von einer breiten Verteilung sprechen.

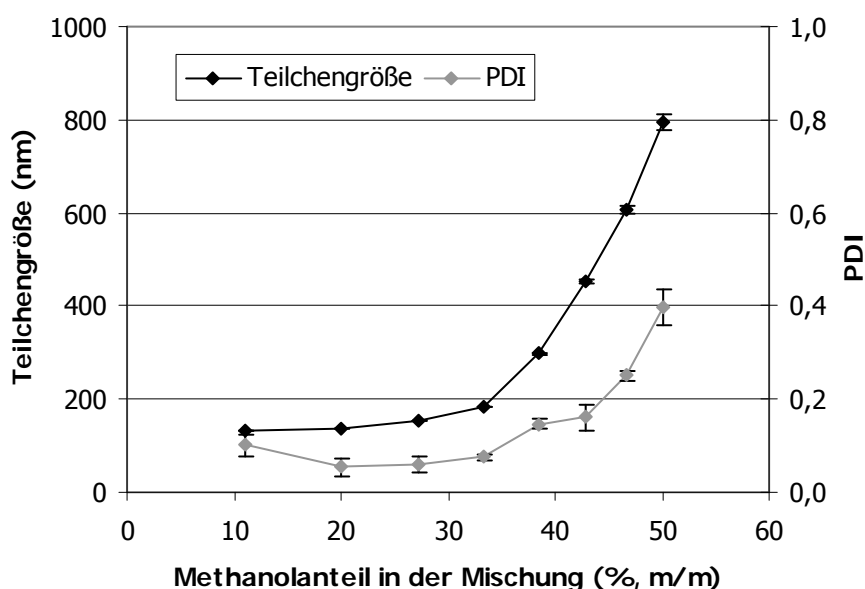


Abbildung 4.4: Teilchengröße und PDI gefällter Partikel aus 1%iger Insulinlösung in Abhängigkeit von der Methanolmenge, ermittelt per Photonenkorrelationsspektroskopie; $n=3$, Fehlerbalken = SD

Wie erwartet, stieg die Ausbeute an gefällttem Insulin mit steigender Nicht-Lösemittel-Menge. Jedoch konnte ab einem Mischungsverhältnis von 6+8 keine weitere Ausbeuteerhöhung mit zunehmender

Methanolvolumen erreicht werden (Abbildung 4.5). Dies kann zum einen damit erklärt werden, dass Insulin sich auch zu einem geringen Teil in Methanol löst (siehe Kapitel 4.1.1). Je mehr Methanol im Umgebungsmedium vorhanden ist, desto größer ist der Anteil an Insulin, der sich darin lösen kann. Zum anderen ist Methanol kein pH-indifferentes Lösungsmittel. Es kann sowohl Protonen aufnehmen als auch abgeben. Der pH-Wert einer sauren Lösung driftet nach der Zugabe von Methanol ins Alkalische (Kromidas, 2006), was auch im Experiment ermittelt werden konnte. Mit zunehmendem Methanolgehalt stieg auch der pH-Wert der entstandenen Suspension (Abbildung 4.5). Durch den steigenden pH-Wert verbessert sich wiederum die Löslichkeit des Insulins (siehe auch Abbildung 4.1) und folglich sinkt die Fällungsausbeute.

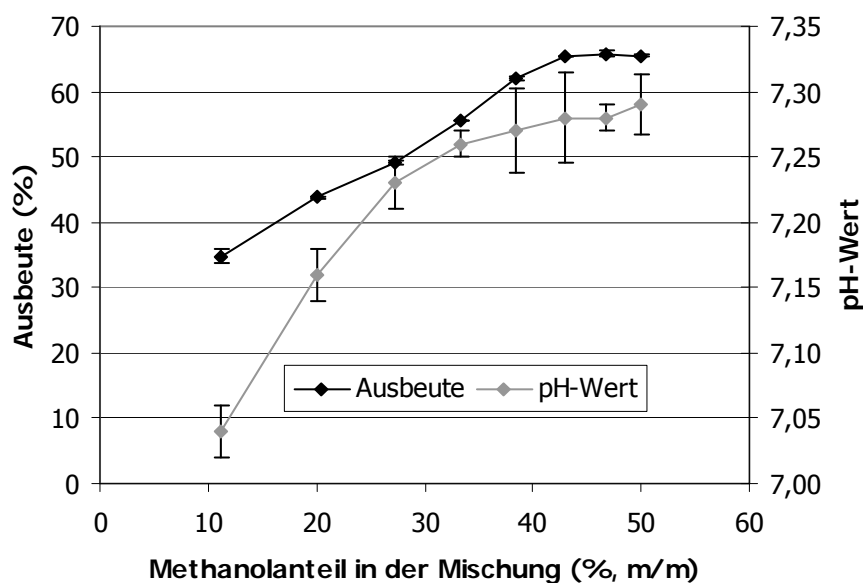


Abbildung 4.5: Ausbeute und pH-Wert in Abhängigkeit von der eingesetzten Methanolvolumen, Insulinlösung 1%, $n=3$, Fehlerbalken = SD

Um den Einfluss der Insulinmenge auf das Präzipitationsergebnis zu testen, wurde die Konzentration des Insulins in wässriger Lösung von 1% auf 2% verdoppelt. Es konnte beobachtet werden, dass sowohl die Teilchengröße als auch der PDI anstiegen (Abbildung 4.6). Eine zweiprozentige Insulinlösung bei pH 6,75 liegt im übersättigten Zustand vor, da die Sättigungslöslichkeit bei circa 0,8% liegt (Abbildung 4.1). Dabei befindet sie sich offensichtlich im Ostwald-Miersschen-Bereich, da noch keine spontane Keimbildung stattgefunden hat (siehe Kapitel 2.3.2, Abbildung 2.2). Der Effekt, den Methanol hervorruft, wirkt auf die höher konzentrierte Lösung stärker, da hier pro Insulinmolekül per se weniger Wassermoleküle zur Hydratation bereitstehen. Mit derselben Methanoldmenge wird einer größeren Anzahl von Insulinmolekülen das Wasser entzogen, und es entstehen mehr und größere Agglomerate, die eine breitere Größenverteilung aufweisen. Da der Fokus auf möglichst kleinen Partikeln mit enger Größenverteilung liegt, wurde im Folgenden eine Insulinausgangskonzentration von 1% verwendet.

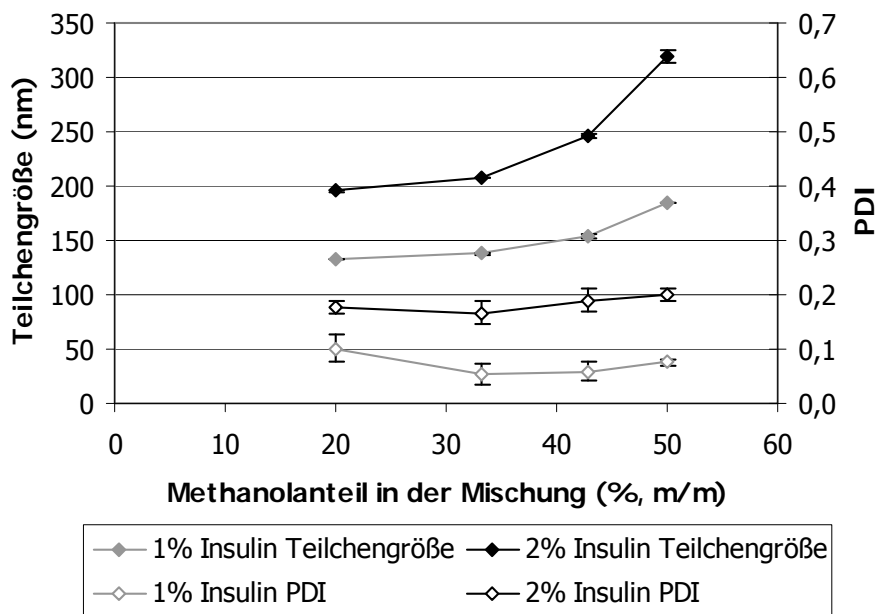


Abbildung 4.6: Teilchengröße und PDI in Abhängigkeit von der eingesetzten Methanolmenge und Insulinkonzentration, ermittelt per Photonenkorrelationsspektroskopie; $n=3$, Fehlerbalken = SD

4.1.3.3 OPTIMIERUNG DES PRÄZIPITATIONSPROZESSES

Um eine Reproduzierbarkeit zu gewährleisten und den Fällungsprozess zu standardisieren, wurde die Fällung im Folgenden mit dem Mikromischer (siehe 3.2.1.2) durchgeführt. Generell führt eine schnelle Übersättigung zur Präzipitation kleiner Partikel (Kapitel 2.3.2), daher wird erwartet, dass umso kleinere Partikel entstehen, je höher die Durchflussrate im Mischer gewählt wird (Douroumis und Fahr, 2006; Ikegami *et al.*, 2002). Die maximale Flussrate ist jedoch durch die Druckempfindlichkeit der HPLC-Pumpen nach oben begrenzt. Mit dem hier verwendeten Versuchsaufbau war es möglich, die wässrige, insulinhaltige Phase konstant mit einer Geschwindigkeit von 10 ml/min zu fördern, ohne dass ein zu hoher Druck zur Abschaltung der Pumpen führte. Der Einfluss der Methanolzugabe wurde mit dem Mikromischer nur noch in vier verschiedenen Anteilen untersucht.

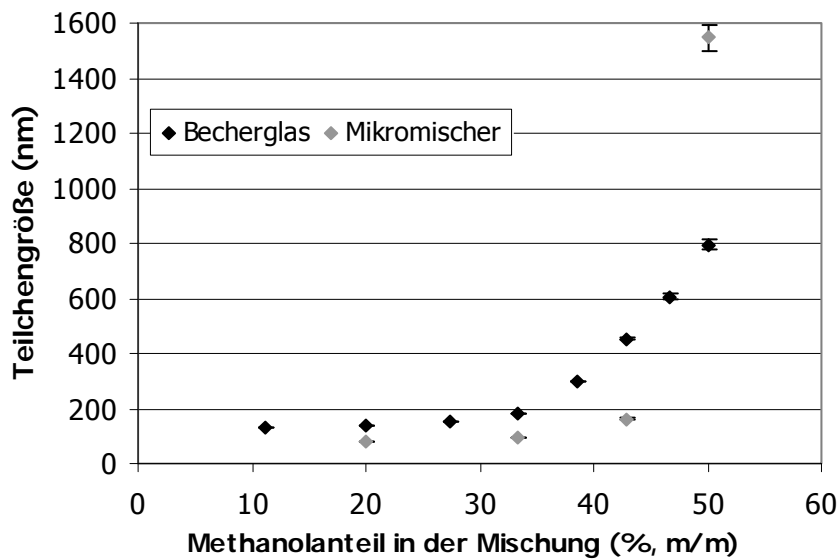


Abbildung 4.7: Teilchengröße in Abhängigkeit von der Mischmethode und der eingesetzten Methanolmenge, ermittelt per Photonenkorrelationsspektroskopie; $n=3$, Fehlerbalken = SD

Abbildung 4.7 zeigt, dass zwischen 2 und 6 Teilen Methanol auf 8 Teile Insulinlösung mit dem Mikromischer tendenziell kleinere Partikel erhalten werden können. Für eine Fällung mit 50% Methanol konnte dieser Zusammenhang nicht gefunden werden. Hier scheint nach der Fällung im Auffanggefäß eine Flockung stattzufinden, die durch die ständig steigende Menge an Suspension und somit auch Insulinpartikeln ungleichmäßiger stattfindet als im Becherglas. Dort wird die Methanolmenge im Ganzen hinzugefügt, dadurch ist im gesamten Gefäß eine gleichmäßigere Flockung möglich. Die hohe und sehr schnell auftretende lokale Übersättigung in der Mischkammer ermöglicht eine Präzipitation vieler Nanopartikel. Die komplette Zugabe des Methanols zur Insulinlösung im Becherglas führt nicht zu einer gleichmäßigen Übersättigung und die entstandenen Partikel haben so die Möglichkeit

durch später ausfallendes Insulin zu wachsen. Wie erwartet, führt die gleichmäßige und kontinuierliche Fällung im Mikromischer - bis auf die bereits erwähnte Methanolmenge von 50% - zu einer engen Teilchengrößenverteilung (Abbildung 4.8).

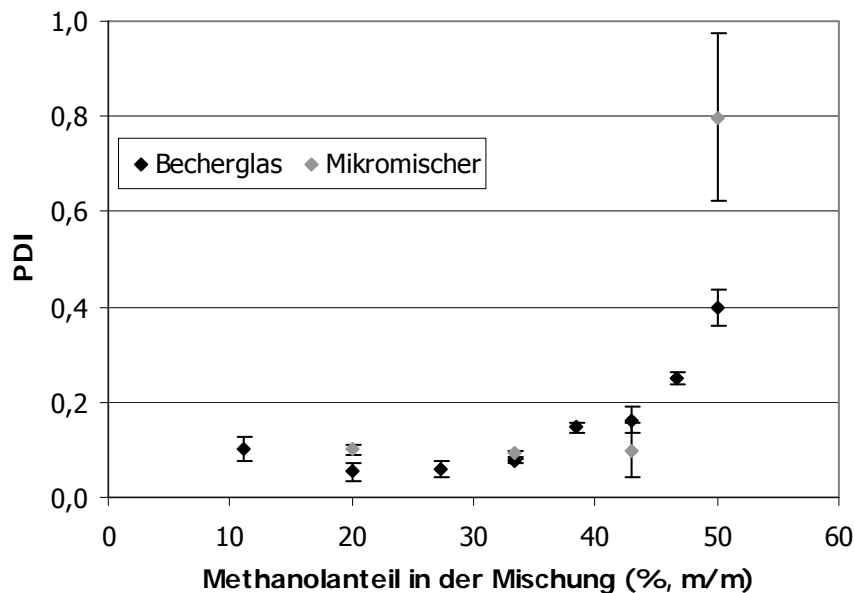


Abbildung 4.8: PDI in Abhängigkeit von der Mischmethode und der eingesetzten Methanolmenge, ermittelt per Photonenkorrelations-spektroskopie; $n=3$, Fehlerbalken = SD

Um die gefällten Nanopartikel sichtbar zu machen, wurde eine Insulinsuspension (Methanol + Insulinlösung 1% pH 6,75, Methanolanteil 42,9%) gefriergetrocknet. Da auf gerüstbildende Hilfsstoffe verzichtet wurde, entstand kein poröser Kuchen sondern die Suspension trocknete als Film an der Gefäßwand. Dieser Film wurde unter dem Rasterelektronenmikroskop betrachtet (Abbildung 4.9). Auf einer Schicht aus Insulin, welches sich vor der Trocknung in Lösung befunden hat, kann man deutlich die gefällten Primärpartikel erkennen, welche eine Größe von circa 200 nm haben.

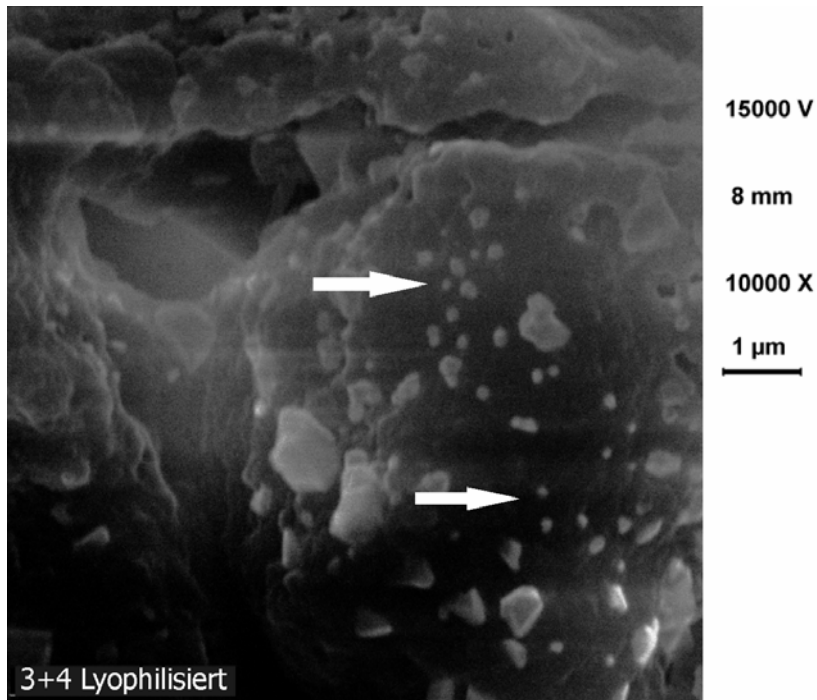


Abbildung 4.9: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer gefriergetrockneten Nanosuspension (Fällung 3+4, Methanolanteil 42,9%)

4.1.3.4 ÜBERTRAGBARKEIT DER FÄLLUNGSMETHODE

Nachdem für Insulin eine geeignete Präzipitationsmethode etabliert wurde, sollte diese auch bezüglich ihrer Anwendbarkeit auf andere Proteine überprüft werden. Als Testprotein wurde hier Rinderserumalbumin verwendet. Es hat im Vergleich zu Insulin die zehnbis elffache Anzahl an Aminosäuren und einen ähnlichen IEP (pH 4,7). Albumin ist allerdings sehr viel besser wasserlöslich als Insulin. Selbst in 1%iger Konzentration lässt es sich nicht durch eine reine pH-Änderung am isoelektrischen Punkt ausfällen. Als idealer Präzipitations-pH-Wert hat sich pH 5,6 erwiesen. Bei höheren pH-Werten ist die Löslichkeit des Albumins so hoch, dass die Zugabe eines Nicht-Lösemittels keine Präzipitation hervorrufen kann.

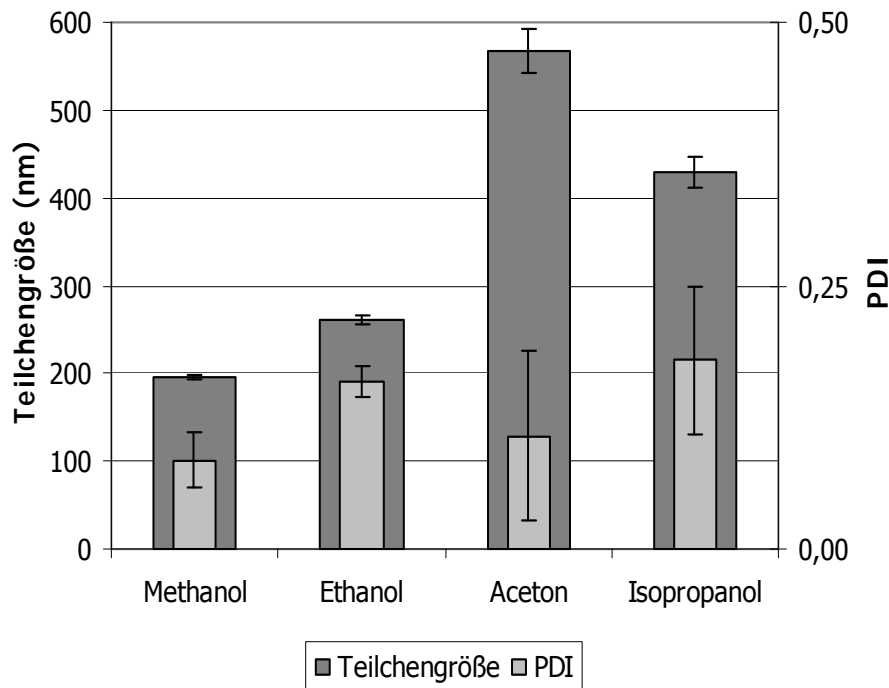


Abbildung 4.10: Einfluss des Fällungsmittels auf Teilchengröße und PDI gefällter Albuminpartikel, ermittelt per Photonenkorrelationspektroskopie, Nicht-Lösemittelanteil: 20%; $n=3$, Fehlerbalken = SD

Es wurden vier unterschiedliche Fällungsmittel eingesetzt – Methanol, Ethanol, Aceton und Isopropanol – in Kombination mit einer 1%igen Albuminlösung. Abbildung 4.10 zeigt deren Einfluss auf die Partikelgröße und –größenverteilung der entstehenden Albuminpräzipitate bei einem Nicht-Lösemittelanteil von 20% nach Fällung im Becherglas. Wie auch für Insulin kann hier beobachtet werden, dass Ethanol und Methanol die kleinsten Partikel erzeugen. Dabei liegt der PDI für Methanol jedoch deutlich niedriger, was für eine engere Verteilung spricht. Aceton und Isopropanol erzeugen Teilchen zwischen 400 und 600 nm und eignen sich daher weniger zur Präzipitation. Eine Erhöhung der Methanoldmenge führte auch hier aufgrund der stärkeren Dehydratation zu einer größeren Fällungsausbeute (Abbildung 4.11).

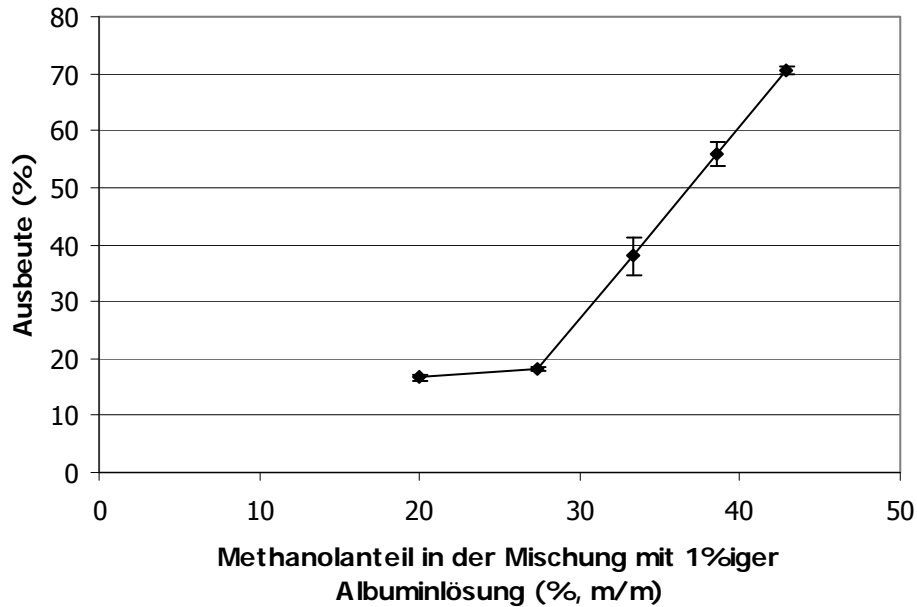


Abbildung 4.11: Fällungsausbeute in Abhängigkeit von der eingesetzten Methanolmenge, Albuminlösung 1%; $n=2$, Fehlerbalken = min/max

Generell deuten die Versuchsergebnisse darauf hin, dass Albumin ähnlich gut zu Nanopartikeln zu präzipitieren ist wie Insulin. Die einzige Änderung im Präzipitationsverfahren bestand darin, den Fällungs-pH-Wert hinsichtlich des niedrigeren isoelektrischen Punktes nach unten anzupassen. Ansonsten funktioniert die Fällung nach denselben Prinzipien und lässt den Schluss zu, dass auch andere Proteine auf diesem Weg zu Nanopartikeln verarbeitet werden können.

4.1.3.5 PARTIKELMORPHOLOGIE

Zum Vergleich der sprühgetrockneten Insulinpartikel wurden fünf unterschiedliche Pulverchargen produziert. Eine Charge wurde aus einer Insulinlösung und vier Chargen aus Suspensionen hergestellt, die durch Präzipitation mit unterschiedlichen Methanolanteilen entstanden. Die genaue Zusammensetzung der Sprühflüssigkeit kann Tabelle 4.3

entnommen werden. Die unterschiedlichen Pulver wurden hinsichtlich ihrer Teilchengröße und Morphologie mittels Laserdiffraktion und Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Um eine Aussage über aerodynamische Eigenschaften machen zu können, wurden die Insulinformulierungen in Kombination mit dem Cyclohaler im Impaktor getestet.

Tabelle 4.3: Übersicht der im Folgenden untersuchten Chargen

| Charge | Herstellungsmethode |
|---------------|--|
| Lösung | Insulinlösung 1% Sprühtrocknung |
| 1+4 | Methanol + Insulinlösung 1% (1+4) Methanolanteil 20% Sprühtrocknung der Suspension |
| 2+4 | Methanol + Insulinlösung 1% (2+4) Methanolanteil 33,3% Sprühtrocknung der Suspension |
| 3+4 | Methanol + Insulinlösung 1% (3+4) Methanolanteil 42,9% Sprühtrocknung der Suspension |
| 4+4 | Methanol + Insulinlösung 1% (4+4) Methanolanteil 50% Sprühtrocknung der Suspension |

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 4.12) lassen einen deutlichen Unterschied zwischen den verschiedenen hergestellten Partikeln erkennen. Die Partikel, die aus einer Lösung sprühgetrocknet wurden, zeigen die charakteristische Morphologie kollabierter

Hohlkugeln. Dieses Phänomen lässt sich erklären, wenn man detailliert die Vorgänge während des Trocknungsprozesses betrachtet. Nach dem Versprühen der Lösung im Sprühturm wird zunächst die äußere Hülle des Partikels getrocknet, da diese zuerst in Kontakt mit der heißen Luft kommt. Die Flüssigkeit im Inneren des Tröpfchens verdampft daraufhin und weitere Substanz kann sich an der Innenseite der Hülle anlagern, die üblicherweise Kugelform besitzt. Ist die Hülle durchlässig für den Lösemitteldampf, so kann dieser entweichen. Ist sie das nicht, so expandiert die Hülle und wird damit ausgedünnt, bis es zu einer Ruptur kommt, an der das verdampfte Lösemittel austreten kann. Das Insulin liegt anscheinend amorph vor und ist in der Lage, eine flexible Hülle auszubilden. Daher wird vermutet, dass sie der Ausdehnung des Gases im Innenraum zu einem gewissen Teil folgen kann und nach der Ruptur in sich zusammenfällt.

Betrachtet man allerdings die Partikel, die aus der Suspension entstanden sind (Abbildung 4.12 rechts, exemplarisch für Charge 4+4), so zeigt sich ein völlig anderes Bild. Man kann Teilchen mit rauer Oberfläche erkennen, die aus mehreren Untereinheiten bestehen. Es handelt sich hier um Aggregate aus den gefällten Nanopartikeln, die durch Feststoffbrücken zusammengehalten werden, welche aus nicht gefälltem Insulin bestehen.

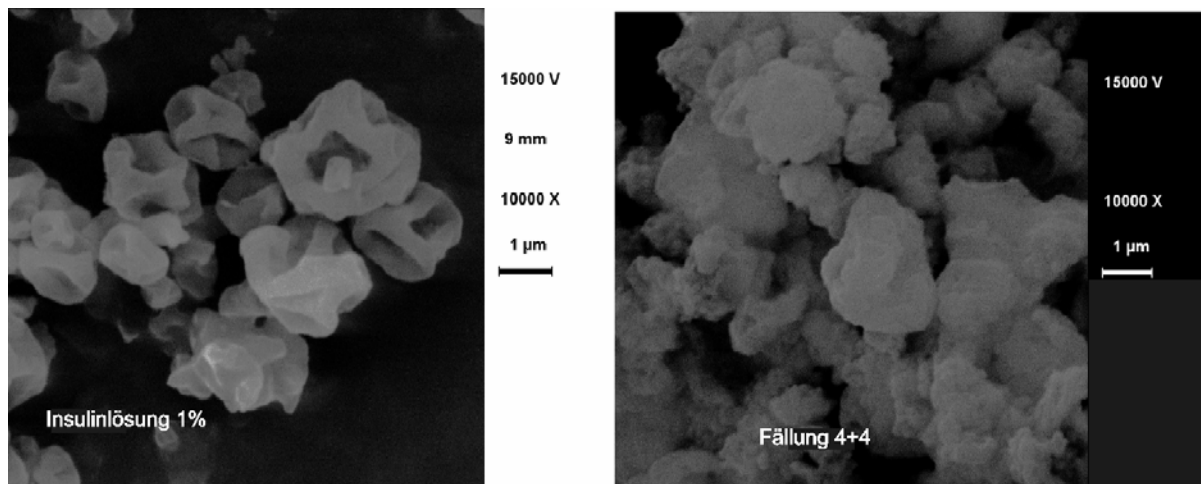


Abbildung 4.12: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen, links: sprühgetrocknet aus 1%iger Lösung, rechts: sprühgetrocknet aus Suspension 4+4; 10000fache Vergrößerung

Eine Teilchengrößenuntersuchung mittels Laserdiffraktometrie ergab, dass bei diesen Chargen mindestens 90% aller hergestellten Partikel kleiner als 7 µm waren, wobei deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Chargen bestanden (Tabelle 4.4).

Tabelle 4.4: Charakteristische Teilchengrößen verschieden hergestellter Insulinpulver ermittelt per Laserdiffraktion (Nassdispergierung); n=3 Messungen, Fehler = SD

| Charge | x ₅₀ (µm) | x ₉₀ (µm) |
|---------------|----------------------|----------------------|
| Lösung | 3,34 ± 0,02 | 6,96 ± 0,02 |
| 1+4 | 2,40 ± 0,01 | 5,54 ± 0,06 |
| 2+4 | 2,01 ± 0,01 | 5,04 ± 0,06 |
| 3+4 | 1,76 ± 0,01 | 3,84 ± 0,05 |
| 4+4 | 1,78 ± 0,01 | 3,57 ± 0,01 |

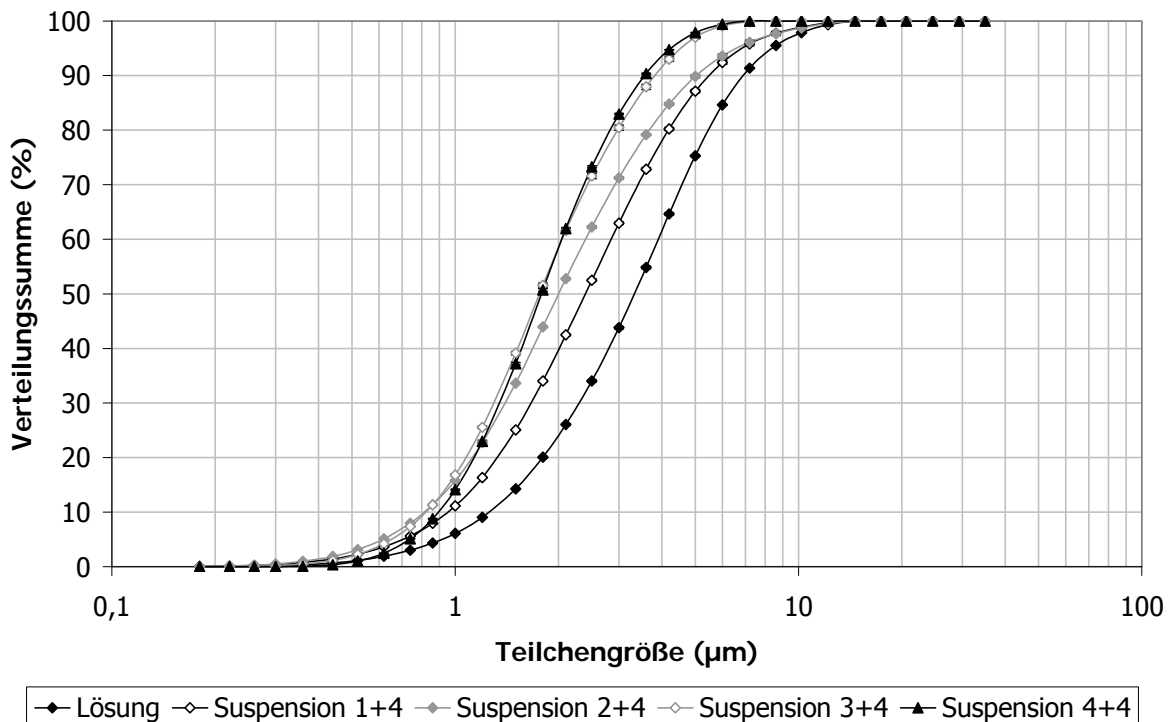


Abbildung 4.13: Teilchengrößenverteilung verschieden hergestellter Insulinpulver, ermittelt per Laserdiffraktion (Nassdispergierung); $n=3$ Messungen, Fehlerbalken = SD

Mit steigendem Methanolanteil sank die mittlere Partikelgröße der Teilchen nach der Sprühtrocknung (Abbildung 4.13). Je mehr Methanol zur 1%igen Insulinlösung gegeben wurde, desto niedriger war die resultierende Gesamtkonzentration an Insulin. Dadurch verringerte sich auch die Stoffmenge in den bei der Sprühtrocknung erzeugten Tröpfchen. Geht man davon aus, dass ein Tröpfchen zu einem Partikel trocknet, so führt eine geringere Stoffmenge pro Tröpfchen automatisch zu kleineren Partikeln (Elversson *et al.*, 2003). Die Chargen 3+4 und 4+4 unterschieden sich kaum. Hier scheint die untere Abscheidungsgrenze des verwendeten Zyklons erreicht worden zu sein. Ein Teil der entstandenen kleineren Teilchen von Charge 4+4 konnte wahrscheinlich nicht vom Luftstrom abgetrennt werden.

4.1.3.6 AERODYNAMISCHE CHARAKTERISIERUNG

Zur Charakterisierung der aerodynamischen Eigenschaften der Pulver wurden zwei unterschiedliche Dosierungen verwendet (1 mg und 3 mg). Diese wurden in Anlehnung an das Handelsprodukt Exubera ausgewählt, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten (siehe auch Kapitel 4.5.1).

Für alle hier getesteten Pulver war eine relative Feinpartikelfraktion unter $5\ \mu\text{m}$ von über 80% zu beobachten (Abbildung 4.14). Dabei unterschieden sich die Chargen mit präzipitierten Partikeln nicht voneinander. Die Dispergierung der aus Lösung sprühgetrockneten Partikel resultierte in einer circa 7% niedrigeren relativen FPF $< 5\ \mu\text{m}$ und unterschied sich damit hoch signifikant von den anderen Chargen. Ein ähnlicher Zusammenhang konnte für die rel. FPF $< 2\ \mu\text{m}$ beobachtet werden (Abbildung 4.15). Diese betragen für die präzipitierten Pulverformulierungen über 65%, was für eine sehr gute Partikeldesagglomeration während des Inhalationsprozesses spricht.

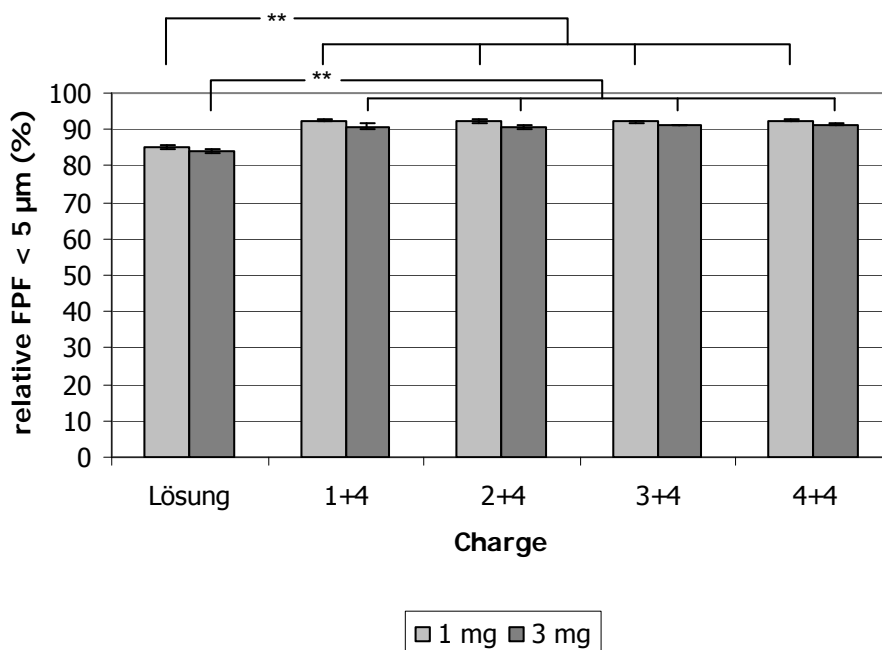


Abbildung 4.14: Relative Feinpartikelfraktion $< 5\ \mu\text{m}$ verschieden hergestellter Insulinpulver; $n=3$ Messungen, Fehlerbalken = SD

Dass trotz deutlicher Unterschiede in der Partikelgrößenverteilung der Chargen 1+4 bis 4+4 kein Unterschied in der Feinpartikelfraktion zu sehen ist, war nicht zu erwarten. Im Normalfall können für kleinere Teilchen höhere Feinpartikelfraktionen erwartet werden, da mehr Teilchen im geforderten Größenbereich liegen. Geht man allerdings davon aus, dass die durch Präzipitation hergestellten Pulver ähnliche Oberflächeneigenschaften besitzen, lässt sich folgender Erklärungsansatz finden. Da bereits ein Großteil der Teilchen im Größenbereich unter 5 bzw. unter 2 μm liegt, bestimmen die Oberflächeneigenschaften allein die Feinpartikelfraktionen. Durch die Fällung und/oder die Verwendung von Methanol während der Sprühtrocknung scheint die Oberfläche der Partikel derart beeinflusst worden zu sein, dass eine Desagglomeration leichter vonstatten gehen kann und die Feinpartikelfraktionen gleichbleibend höher sind, als bei den Partikeln, die aus wässriger Lösung sprühgetrocknet wurden.

Die eingesetzte Insulindosis beeinflusste unabhängig von der getesteten Charge die relativen FPF kleiner 5 μm nur mäßig und die FPF kleiner 2 μm nicht signifikant. Daraus lässt sich schließen, dass die Kombination aus eingesetzter Luftmenge und Inhalationszeit ausreichend ist, um auch eine größere Menge Insulin in gleicher Qualität zu zerstäuben.

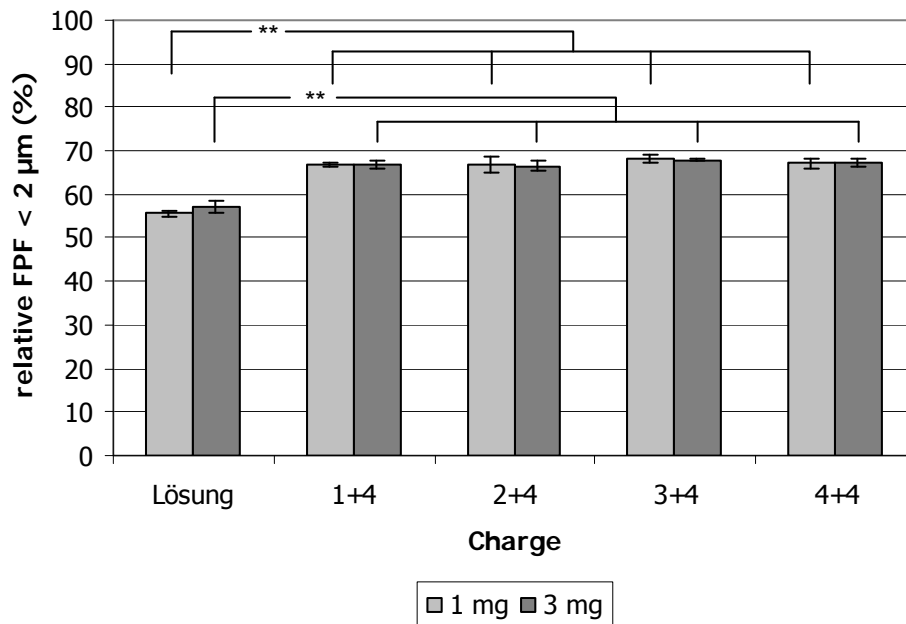


Abbildung 4.15: Relative Feinpartikelfraktion < 2 μm verschieden hergestellter Insulinpulver; $n=3$ Messungen, Fehlerbalken = SD

Neben der Feinpartikelfraktion wurde auch der Insulinrückstand in der Kapsel nach der Inhalation bestimmt (Abbildung 4.16). Dabei ist zu erkennen, dass die Dosis keinen signifikanten Einfluss auf den Rückstand hatte. Alle gemessenen Werte schwankten um 100 μg . Die verschiedenen Chargen haben alle ein ähnliches Adhäsionsverhalten. Ausschlaggebend für die Menge an anhaftendem Insulin ist allein die Kapselinnenoberfläche, die durch die Verwendung einer einheitlichen Kapselgröße konstant gehalten wurde.

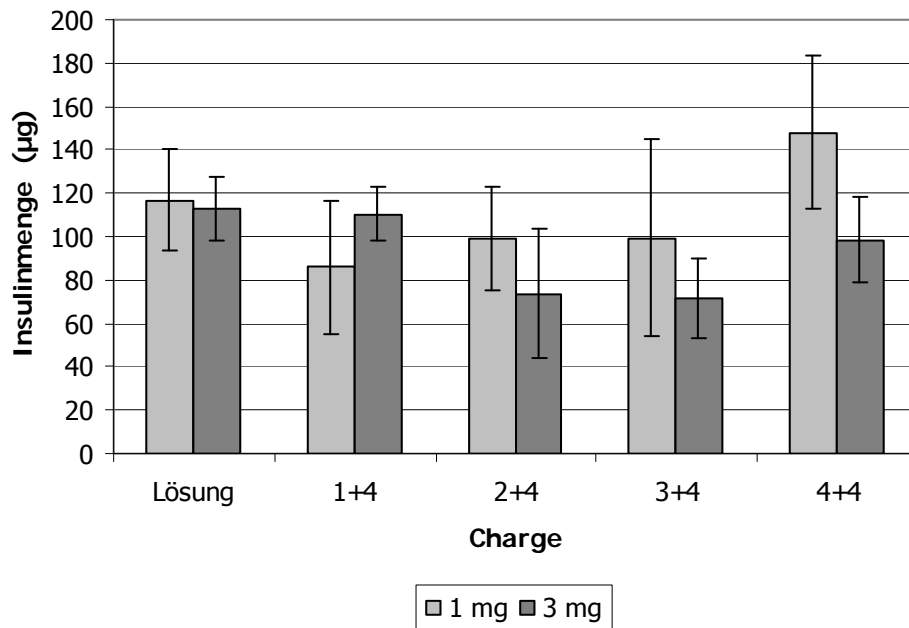


Abbildung 4.16: Nach der Inhalation in der Kapsel verbleibende Insulinmenge; $n=3$ Messungen, Fehlerbalken = SD

Da die Ergebnisse darauf hindeuteten, dass die Feinpartikelfraktion nicht nur von der Teilchengröße sondern vorrangig von den interpartikulären Auto-Adhäsionskräften abhängt, wurden noch zwei weitere Chargen hergestellt und getestet. Als Bezugschargen dienten die Partikel aus der Fällung im Verhältnis 4+4 sowie die aus 1%iger wässriger Lösung sprühgetrockneten Partikel. Zusätzlich wurde eine Charge mit einer effektiven Insulinkonzentration von 0,5% in wässriger Lösung hergestellt. Diese sollte laut Theorie eine deutlich geringere Teilchengröße besitzen als aus 1%iger Lösung sprühgetrocknete Partikel. Außerdem sollte der Einfluss des Methanols überprüft werden. Dazu wurde eine 0,5%ige Insulinlösung in einem Methanol/Wasser-Gemisch 4+4 hergestellt. Die Präzipitation wurde durch Einstellung eines höheren pH-Wertes (ca. pH 7,5) verhindert. Chargenbezeichnungen,

Herstellungsdetails und laserdiffraktometrisch ermittelte Teilchengrößen sind Tabelle 4.5 zu entnehmen.

Tabelle 4.5: Chargenzusammensetzung und Teilchengröße, ermittelt per Laserdiffraktion (Nassdispergierung), n=3 Messungen, Fehler = SD

| Charge | Herstellung | x ₅₀ (µm) | x ₉₀ (µm) |
|---------------------------|--|----------------------|----------------------|
| Lösung 1% | Insulinlösung 1% | 3,34 ± 0,02 | 6,96 ± 0,02 |
| Lösung 0,5% | Insulinlösung 0,5% | 2,13 ± 0,01 | 5,70 ± 0,06 |
| 4+4 nicht präzipitiert | Insulinlösung 1% pH 7,5 + Methanol 4+4 | 1,89 ± 0,02 | 5,72 ± 0,17 |
| 4+4 präzipitiert | Insulinlösung 1% pH 6,75 + Methanol 4+4 | 1,78 ± 0,01 | 3,57 ± 0,01 |

Vergleicht man die Teilchengrößen der aus 1% und 0,5%iger wässriger Insulinlösung hergestellten Partikel, so sieht man hier die Theorie bestätigt, dass geringere Stoffkonzentrationen zu kleineren Partikeln führen. Zusätzlich scheint die Anwesenheit von Methanol bei der Sprühtrocknung einen Einfluss auf die Teilchengröße zu besitzen. Bei gleicher Insulinkonzentration ist die mittlere Partikelgröße niedriger bei gleichzeitig breiterer Größenverteilung (siehe x₉₀), wenn die Hälfte des Lösungsmediums aus Methanol besteht. Das Methanol/Wasser-Gemisch besitzt eine deutlich geringere Oberflächenspannung als Wasser (Abbildung 4.17) und bildet dementsprechend auch kleinere Tropfen. Überträgt man das auf den Sprühtrocknungsprozess, so kann man davon ausgehen, dass kleinere Tröpfchen infolge geringerer Stoffmenge auch zu kleineren Partikeln trocknen.

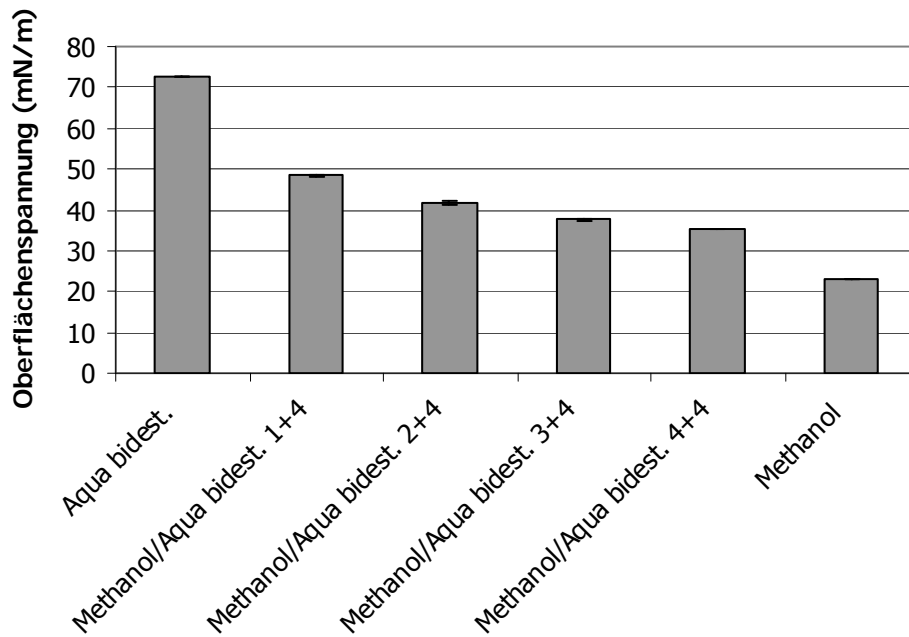


Abbildung 4.17: Oberflächenspannung verschiedener Methanol/Wasser-Gemische; $n=3$ Messungen, Fehlerbalken = SD

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der vier Chargen (Abbildung 4.18) zeigen deutliche Unterschiede auf. Bei den aus Lösung sprühgetrockneten Insulinpartikeln lassen sich kollabierte Hohlkugeln erkennen, die bei Verwendung einer 0,5%igen Lösung kleiner sind, als bei doppelter Konzentration. Ist jedoch Methanol in der Lösung enthalten, so sind neben einigen Hohlkugeln auch flächige Objekte zu erkennen. Diese Strukturunterschiede können durch die unterschiedlichen Siedepunkte der Lösemittel zustande kommen. Methanol verdampft schneller und hinterlässt eine aufkonzentrierte wässrige Lösung, in der Insulin ausfallen kann. Trocknen diese Partikel, so entstehen nicht die beschriebenen Hohlkugeln sondern die dargestellten Strukturen. Einen nanopartikulären Aufbau wie die

Teilchen, die aus vorangehender Präzipitation hervorgehen, erhalten die aus methanolhaltiger Lösung sprühgetrockneten Teilchen jedoch nicht.

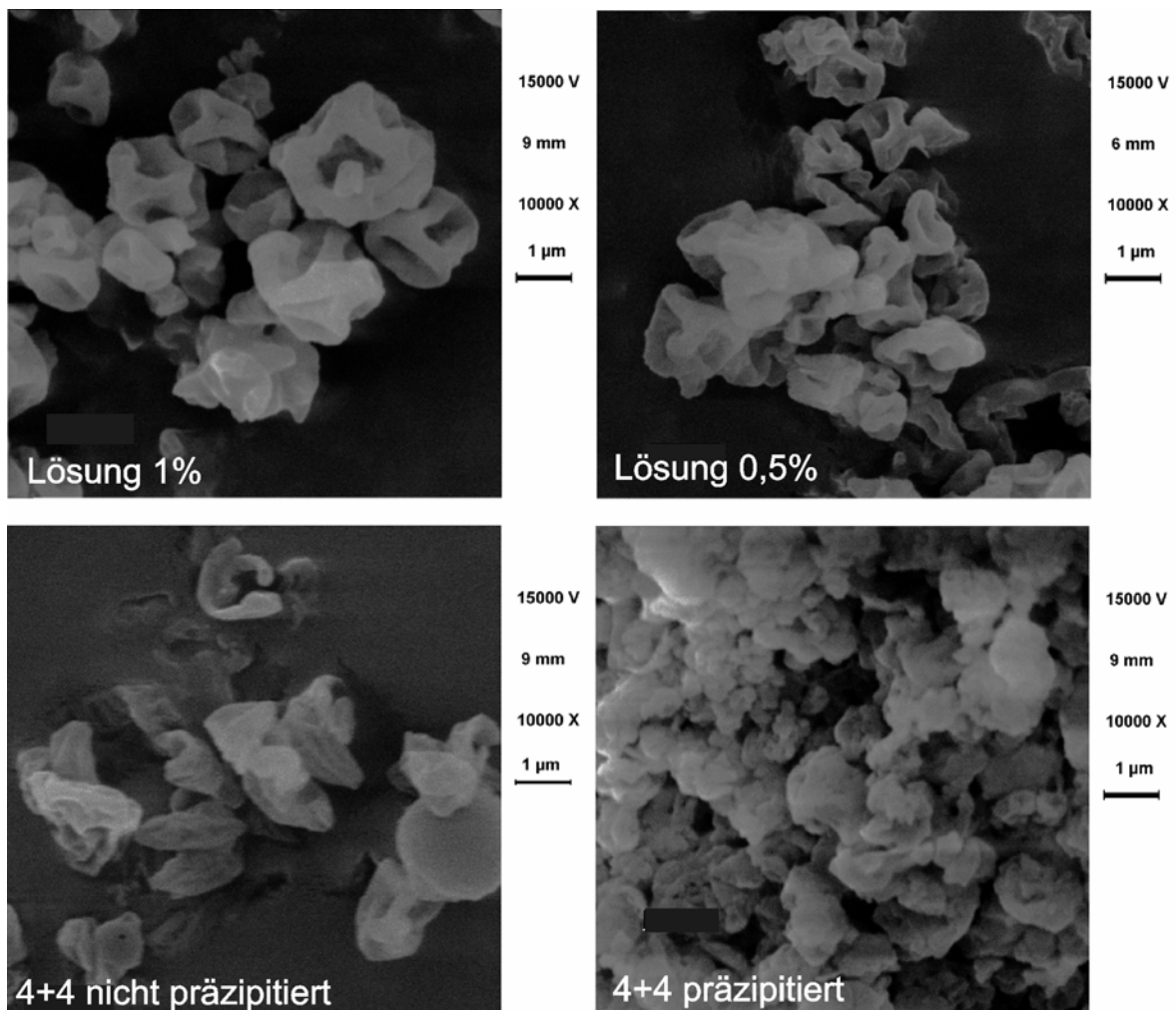


Abbildung 4.18: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen unterschiedlich hergestellter Insulinpulver; 10000fache Vergrößerung

Untersucht man die Feinpartikelfractionen der vier Chargen (Abbildung 4.19), so wird deutlich, dass die Partikel aus wässriger Lösung signifikant niedrigere relative Feinpartikelfractionen erzeugen. Die Teilchengröße scheidet als Ursache zumindest für die aus wässriger, 0,5%iger Lösung sprühgetrockneten Teilchen aus, da diese zwischen denen der Chargen 1+4 und 2+4 liegt, die sich hinsichtlich ihrer aerodynamischen Eigenschaften nicht von Charge 4+4 unterscheiden. Der Methanolanteil

scheint einen Einfluss auf die Oberfläche der Teilchen zu haben und die interpartikuläre Kohäsion herab- sowie das Desagglomerationsvermögen heraufzusetzen. Vermutlich entstehen aus rein wässriger Lösung hydrophilere Oberflächen, die miteinander stärker wechselwirken können, als hydrophobe Oberflächen. Dadurch können die Kräfte, die bei der Inhalation entstehen möglicherweise nicht ausreichen, um alle Partikel ausreichend voneinander zu trennen. Da mit sinkender Teilchengröße die volumenspezifische Oberfläche größer wird, wirken sich diese oberflächenspezifischen Effekte stärker auf die Feinpartikelfractionen unter 2 µm aus. Über diesen Parameter lassen sich die Pulver stärker differenzieren, als über die FPF < 5 µm. Hier sind teils hoch signifikante Einflüsse zu beobachten und auch die Chargen mit Methanol unterscheiden sich in diesem Punkt.

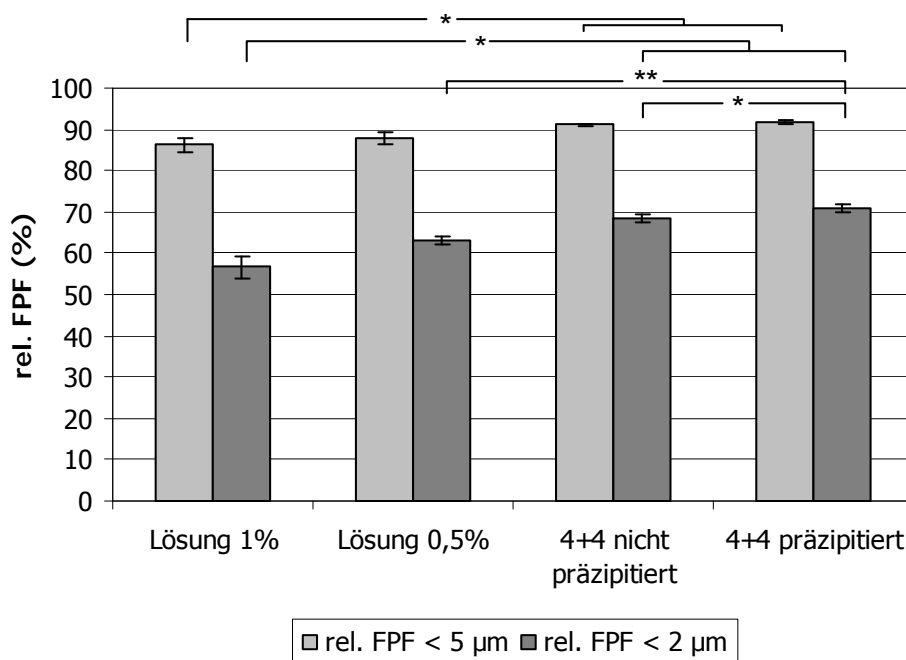


Abbildung 4.19: Relative Feinpartikelfractionen verschieden hergestellter Insulinpulver; Dosis 1 mg; n=3 Messungen, Fehlerbalken = SD

Die Rachendeposition stellt einen indirekten Indikator für die Partikeldesagglomeration dar. Ist die Deposition bei ähnlicher Teilchengröße höher, so können sich die Partikel im Verlauf der Inhalation nicht genügend voneinander trennen und impaktieren bereits im Rachen. Die Vermutung, dass Partikel, die in methanolischer Umgebung erzeugt wurden, ein besseres Desagglomerationsverhalten zeigen, lässt sich anhand der Rachendeposition der vier Chargen bestätigen (Abbildung 4.20). Während zwischen 6 und 7% der Partikel, die aus wässriger Lösung hergestellt wurden, im Rachen impaktieren, sind es nur circa 3,5% der Partikel, die mit einer Methanol/Wasser Mischung in Berührung kamen – unabhängig von einer Präzipitation.

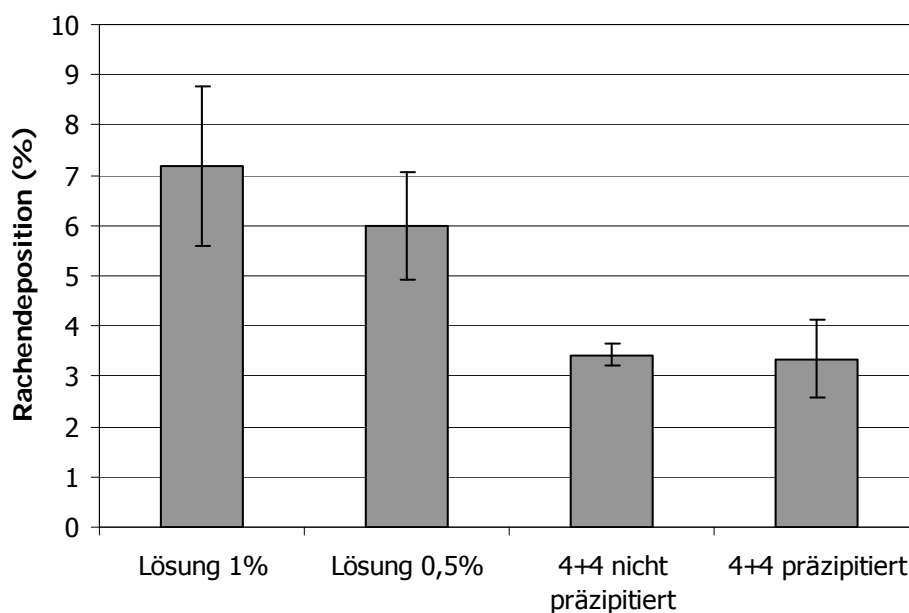


Abbildung 4.20: Rachendeposition verschiedener Pulverchargen; $n=3$ Messungen, Fehlerbalken = SD

Die Chargen mit Methanol unterscheiden sich untereinander nur geringfügig und auch nur im Hinblick auf die relative FPF < 2 μm . Die

Präzipitation scheint bezüglich der Feinpartikelfraktion nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

4.1.4 ZUSAMMENFASSUNG

Es konnte gezeigt werden, dass eine Präzipitation von Insulin im Nanometerbereich möglich ist, sofern man das Solvent-Change-Verfahren anwendet. Dabei spielt der pH-Wert für die Fällung eine entscheidende Rolle. Ausgehend vom isoelektrischen Punkt verbessert sich die Löslichkeit des Insulins mit steigendem pH-Wert und die Fällungsausbeute verringert sich entsprechend. Methanol hat sich als ideales Fällungsmittel erwiesen, da es kleine Partikel bei gleichzeitig hoher Fällungsausbeute erzeugen kann. Eine Optimierung der Präzipitationsmethode vom Laboransatz im Becherglas zur kontinuierlichen Fällung im Mikromischer war erfolgreich. Die Verwendung einer 1%igen Insulinlösung mit pH 6,75 bei einer Fördergeschwindigkeit von 10 ml/min hat sich als ideal erwiesen, um Partikel im Teilchengrößenbereich von 100 bis 200 nm mit enger Größenverteilung ($PDI < 0,2$) zu erhalten.

Die grundsätzlichen Prinzipien der Fällung ließen sich auf Albumin übertragen. Der Fällungs-pH-Wert musste jedoch den Eigenschaften des Proteins angepasst werden. Auch hier erwies sich Methanol als das am besten geeignete Fällungsmittel, und es konnten Nanopartikel erzeugt werden. Das lässt den Schluss zu, dass unter Beachtung des isoelektrischen Punktes auch andere Proteine auf dieselbe Art präzipitiert werden können.

Die Teilchengröße der sprühgetrockneten Pulver ist stark von der Stoffkonzentration in der Sprühflüssigkeit und dementsprechend vom Methanoleinsatz abhängig. Je geringer die Stoffkonzentration, desto kleiner sind die entstehenden Partikel, wobei die Partikelgröße nach

unten wahrscheinlich durch die Abscheideleistung des Zyklons im Sprühtrockner begrenzt ist.

Die Feinpartikelfraktion ist im erzielten Partikelgrößenbereich weniger vom Teilchendurchmesser sondern eher von den interpartikulären Auto-Adhäsionskräften abhängig, die durch Methanol verringert werden können. Ob eine Präzipitation tatsächlich notwendig ist, um eine gute Partikeldesagglomeration zu gewährleisten, geht aus den hier gezeigten Daten nicht hervor.

Für nachfolgende Experimente wurde die Präzipitation im Verhältnis 3+4 durchgeführt, da sich weder die resultierende Teilchengröße noch die Feinpartikelfraktion stark von einer Präzipitation im Verhältnis 4+4 unterschied und ein geringerer Methanoleinsatz als wirtschaftlicher erachtet wird.

4.2 REPRODUZIERBARKEIT

Der Herstellungsweg von der Ausgangsware zur fertigen Pulverformulierung erfordert mehrere Prozessschritte, die mit Fehlern behaftet sein können. Zu nennen wäre zum Beispiel die Einstellung des nötigen pH-Wertes der wässrigen Insulinlösung, die, da es sich nicht um ein standardisiertes Verfahren handelte, zu unterschiedlichen Konzentrationen führen kann. Weiterhin können die Zeitspannen zwischen Präzipitation und Sprühtrocknung schwanken. Ein Teilchenwachstum in dieser Zeit könnte die Partikel nachhaltig beeinflussen. Unterschiedliche Messbedingungen und unregelmäßiges Arbeiten mit dem Impaktor können zu Messwertschwankungen führen, die fälschlicherweise als signifikante Unterschiede interpretiert werden können. Zur besseren Beurteilung der Ergebnisse wurde die Fällung der 1%igen Insulinlösung bei pH 6,75 mit Methanol im Verhältnis Nicht-Lösemittel zu Lösemittel 3+4 innerhalb eines Jahres mehrfach durchgeführt. Die Sprühtrocknung und Partikelcharakterisierung fand durch unterschiedliche Personen statt, um sämtliche Einflussfaktoren zu erfassen.

4.2.1 PRÄZIPITATION

Die Präzipitation im Verhältnis 3+4 im Mikromischer wurde siebenfach durchgeführt. Dadurch konnten nicht nur die Abweichungen mehrfacher Messungen einer Charge sondern auch die Schwankungen unterschiedlicher Chargen erfasst werden. Die Konzentration der Insulinlösungen nach der pH-Einstellung betrug 8,18 mg/ml ($\pm 0,19$ mg/ml). Es konnte eine mittlere Fällungsausbeute von 70,3%

$\pm 3,7\%$ erzielt werden. Diese Proben mussten für die HPLC-Untersuchung stark verdünnt werden, wobei Fehler durch mangelnde Pipettengenauigkeit oder fehlerhafte Bedienung auftreten konnten. Zusätzlich zu den Differenzen zwischen den Chargen kann dies eine Schwankung der Messergebnisse bewirken.

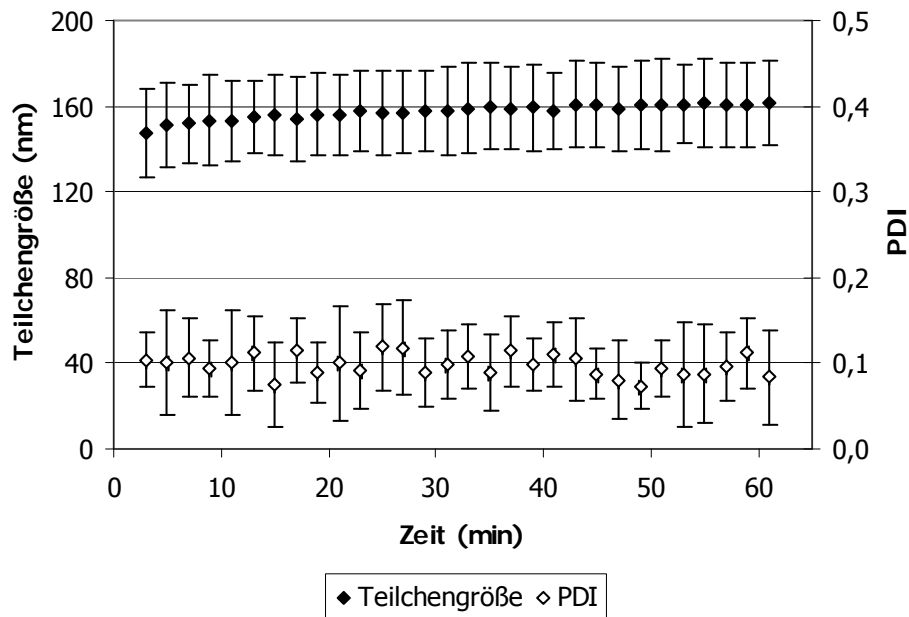


Abbildung 4.21: Teilchengrößen- und PDI-Entwicklung über 61 Minuten nach Fällung im Mischungsverhältnis 3+4, ermittelt per Photonenkorrelationsspektroskopie; $n=7$ Chargen, je 3 Messungen, Fehlerbalken = SD

Die Teilchengrößenverteilungen wurden nicht nur direkt nach der Herstellung sondern über eine Stunde hinweg beobachtet (Abbildung 4.21). Man kann erkennen, dass die Partikelgröße in den ersten 30 Minuten um circa 15 nm anstieg und dann konstant blieb. Dabei schwankte der PDI geringfügig um 0,1. Die Standardabweichung der Teilchengrößen – im Mittel 19,6 nm – war recht hoch. Sie betrug 12 bis 13% der jeweiligen Teilchengröße. Dies kann unter anderem durch die

schwankende Ausgangskonzentration erklärt werden. Wie in Kapitel 4.1.3.2 beschrieben wurde, hat die Insulinkonzentration in der Lösung einen Einfluss auf die Teilchengröße nach der Präzipitation. Außerdem kann es durch unterschiedliche Temperaturen der Fällungskomponenten zu unterschiedlichen Ergebnissen gekommen sein. Der Einfluss der Temperatur auf die Präzipitation wurde in dieser Arbeit nicht überprüft. Um den Prozess zu vereinfachen, wurde bei Raumtemperatur gearbeitet. Diese lag jahreszeitlich bedingt zwischen 20°C und 25°C. Da die Sättigungslöslichkeit gelöster Stoffe von der Umgebungstemperatur abhängt, kann bei unterschiedlichen Temperaturen entsprechend auch mit schwankenden Fällungsergebnissen gerechnet werden.

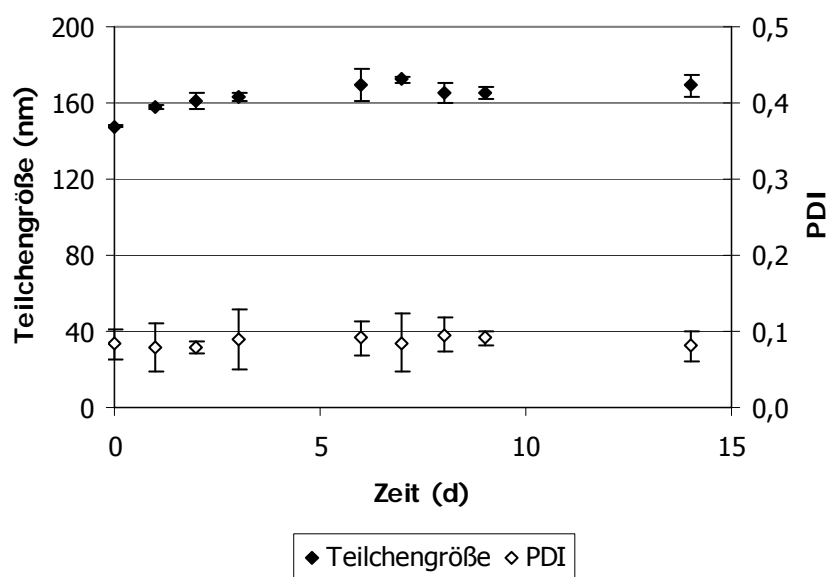


Abbildung 4.22: Teilchengrößen- und PDI-Entwicklung in Suspension über 14 Tage nach Fällung im Mischungsverhältnis 3+4, ermittelt per Photonenkorrelationsspektroskopie; $n=3$ Messungen, Fehlerbalken = SD

Die Sprühtrocknung fand in den meisten Fällen in der ersten Stunde nach der Präzipitation statt. Daher war das Teilchenwachstum in der Suspension in Hinblick auf die Eigenschaften der trockenen Partikel nur in diesem Zeitraum relevant. Eine Suspensionscharge wurde jedoch über einen längeren Zeitraum bei Raumtemperatur gelagert, um die Suspensionsstabilität beurteilen zu können (Abbildung 4.22). Dabei war zu beobachten, dass sich nach zwei Wochen kein Bodensatz bildete und demnach kaum Sedimentation stattgefunden hatte. Die Teilchengröße stieg innerhalb des ersten Tages nach der Präzipitation um circa 15 nm. Danach traten keine weiteren Änderungen auf, die nicht durch Messungenauigkeiten zu erklären waren. Nach 14 Tagen hatten die Partikel eine mittlere Größe von 170 nm bei monomodaler Verteilung ($PDI < 0,1$). Die Insulinpartikel tendierten somit nur in sehr geringem Umfang zum Partikelwachstum. Es scheint kein Hilfsstoff nötig zu sein, um eine längerfristige Stabilisierung zu gewährleisten, wie es für andere Wirkstoffe der Fall ist (Rasenack, 2003). Die Insulinpartikel unterliegen im untersuchten Zeitraum kaum der Ostwald-Reifung. Bei dieser löst sich ein Feststoff in flüssiger oder halbfester Umgebung bevorzugt aus kleineren Partikeln aufgrund ihrer stärkeren Oberflächenkrümmung und des dadurch bedingt höheren Lösungsdruckes. Die entstandene Übersättigung führt dazu, dass sich der gelöste Stoff an größeren Partikeln wieder abscheidet. Die dehydrierten Insulinmoleküle zeigten diesen Effekt nicht oder nur in sehr geringem Umfang.

4.2.2 PARTIKELCHARAKTERISTIK

Aufgrund des höheren Materialeinsatzes, der für eine Sprühtrocknung notwendig ist, wurden nur vier Chargen der zuvor untersuchten Suspensionen getrocknet.

Die laserdiffraktometrische Untersuchung der getrockneten Partikel mittels Nassdispergierung ergab ähnliche Teilchengrößenverteilungen mit einer maximalen Differenz der mittleren Teilchengröße von $0,26 \mu\text{m}$ (Abbildung 4.23).

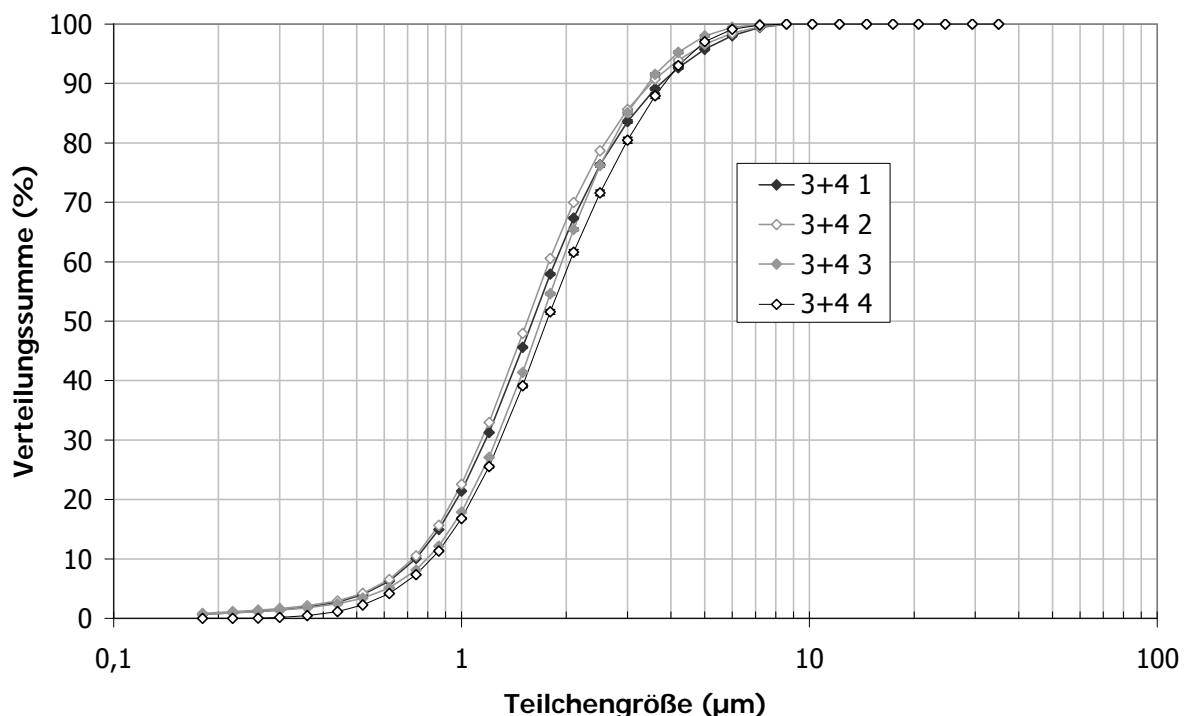


Abbildung 4.23: Teilchengrößenverteilung unter identischen Bedingungen hergestellter Insulinpulver; Laserdiffraktion Nassdispergierung; Verhältnis Nicht-Lösemittel zu Lösemittel 3+4; $n=3$ Messungen, Fehlerbalken = SD

Die aerodynamische Charakterisierung wurde mit einer Wirkstoffdosis von 1 mg durchgeführt, da bereits gezeigt werden konnte, dass eine Erhöhung keinen Einfluss auf die Feinpartikelfractionen hat (siehe Kapitel

4.1.3.6). Die Messungen wurden bei jahreszeitlich bedingt unterschiedlichen klimatischen Bedingungen durchgeführt. Diese wichen maximal 3°C und 11% rF voneinander ab (siehe Tabelle 4.6). Die Untersuchung von Charge 3+4 4 wurde von einer zweiten Person durchgeführt, um das Spektrum zufälliger Fehler zu erhöhen.

Tabelle 4.6: Messbedingungen während der Impaktoruntersuchungen vier identisch hergestellter Pulverchargen

| Charge | Messbedingungen | |
|--------|-----------------|------------------|
| | Temperatur | rel. Luftfeuchte |
| 3+4 1 | 20,0°C | 31% |
| 3+4 2 | 20,0°C | 31% |
| 3+4 3 | 21,5°C | 34% |
| 3+4 4 | 23,0°C | 23% |

Betrachtet wurden die relativen und absoluten Feinpartikelfraktionen unter 2 und 5 µm, sowie die Wirkstoffmenge, die nach der Inhalation in der Kapsel und im Inhalator verblieb (Abbildung 4.24). Die relativen Feinpartikelfraktionen unter 5 µm der vier Chargen lagen mit durchschnittlich 95,6% sehr hoch und schwankten um nur 1% nach oben und unten. Ähnlich gering ausgeprägt war die Schwankung bei dreifacher Vermessung derselben Probe. Diese Beobachtung wiederholt sich bei der Betrachtung der relativen FPF < 2 µm. Hier differierten die Chargen um circa ± 2% vom Mittelwert, was ebenfalls der Schwankung innerhalb einer Charge gleichkommt. In Kapsel und Inhalator verblieben durchschnittlich 11,2% bzw. 12,4% des Insulins. Auch hier traten nur sehr geringe Schwankungen auf. Dies überträgt sich auf die absoluten Feinpartikelfraktionen, die von den Kapsel- und Inhalatorrückständen abhängig sind und demnach auch nur geringe Abweichungen

voneinander aufwiesen. Wurden die Untersuchungen von verschiedenen Personen durchgeführt, so zeigten sich keine nennenswerten Abweichungen.

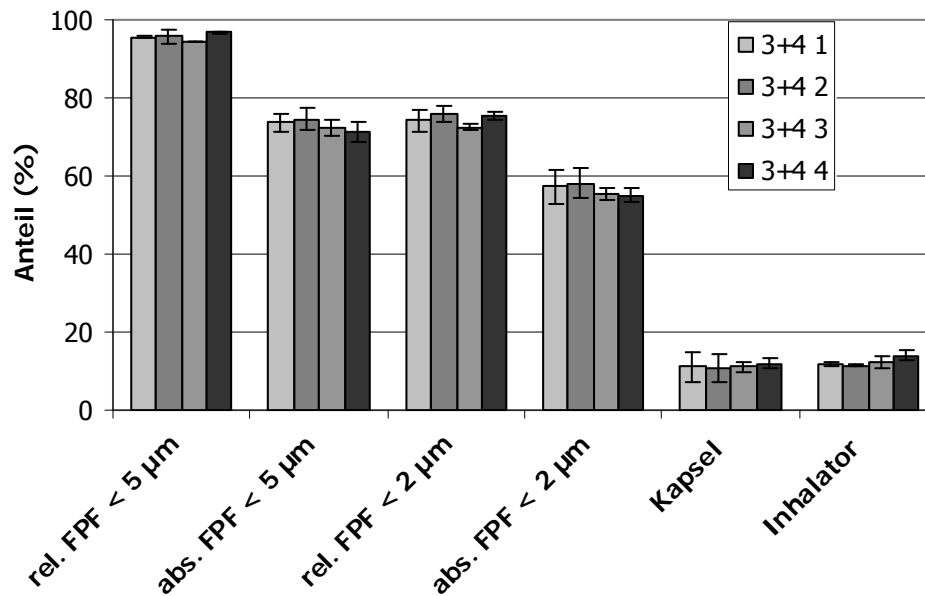


Abbildung 4.24: Aerodynamische Charakterisierung unter identischen Bedingungen hergestellter Insulinpulver; Verhältnis Nicht-Lösemittel zu Lösemittel 3+4; Dosis: 1 mg; $n=3$ Messungen, Fehlerbalken = SD

Es konnte gezeigt werden, dass trotz vieler möglicher Fehlerquellen mit der entwickelten Methode reproduzierbar gleiche Pulver erzeugt werden können. Dies ist eine wichtige Voraussetzung, um einen solchen Herstellprozess industriell etablieren zu können.

4.3 EINFLUSS VON ADDITIVEN

Durch den Präzipitationsprozess entsteht eine große neue Teilchenoberfläche. Diese kann durch den Einsatz von Additiven stark beeinflusst und die Eigenschaften des trockenen Pulvers können dadurch entscheidend verbessert werden (Rasenack, 2003). Es ist möglich, das Teilchenwachstum zu beeinflussen, die Lösungsgeschwindigkeit der Teilchen durch Hydrophilisierung der Oberfläche zu verbessern, oder die interpartikulären Kohäsionskräfte herabzusetzen und damit die aerodynamischen Eigenschaften zu verbessern.

Die drei hier verwendeten Hilfsstoffe HPMC, L-Leucin und Mannitol wurden ausgewählt, weil sie gänzlich unterschiedlichen chemischen Gruppen angehören und in der inhalativen Applikation anwendbar sind. Wie schon in anderen Arbeiten gezeigt werden konnte, ist HPMC in der Lage, als Additiv die Teilchengröße zu verringern und die Feinpartikelfraktion eines sprühgetrockneten Pulvers signifikant zu erhöhen (Westmeier, 2008). L-Leucin und Mannitol können zu geringerer Feuchteempfindlichkeit des Insulins beitragen (You *et al.*, 2007). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass L-Leucin einen positiven Effekt auf die Dispergierbarkeit sprühgetrockneter Pulver hat (Najafabadi und Gilani, 2004; Seville *et al.*, 2007).

Die im Folgenden getesteten Pulverchargen wurden aus 1%iger Insulinlösung mit Methanol im Verhältnis Nicht-Lösemittel zu Lösemittel 3+4 im Mikromischer präzipitiert und anschließend sprühgetrocknet. Die verwendeten Hilfsstoffe wurden vor der Fällung in der wässrigen Phase gelöst. Deren Mengenangabe bezieht sich auf die Insulinmenge in der

Lösung. Die genaue Zusammensetzung der einzelnen Chargen kann Tabelle 4.7 entnommen werden.

Tabelle 4.7: Verhältnis von Insulin zu entsprechendem Hilfsstoff vor der Präzipitation

| Charge | Zusammensetzung der wässrigen Phase |
|---------------|--|
| 1% HPMC | 10 mg/ml Insulin; 0,1 mg/ml HPMC 50; Aqua bidest. |
| 5% HPMC | 10 mg/ml Insulin; 0,5 mg/ml HPMC 50; Aqua bidest. |
| 10% HPMC | 10 mg/ml Insulin; 1,0 mg/ml HPMC 50; Aqua bidest. |
| 5% L-Leucin | 10 mg/ml Insulin; 0,5 mg/ml L-Leucin; Aqua bidest. |
| 20% L-Leucin | 10 mg/ml Insulin; 2,0 mg/ml L-Leucin; Aqua bidest. |
| 5% Mannitol | 10 mg/ml Insulin; 0,5 mg/ml Mannitol; Aqua bidest. |
| 20% Mannitol | 10 mg/ml Insulin; 2,0 mg/ml Mannitol; Aqua bidest. |

Untersucht wurde der Einfluss der Additive auf die Teilchengröße vor und nach der Sprühtrocknung sowie das aerodynamische Verhalten der Pulver. Letzteres wurde in Kombination mit dem Cyclohaler und einer Dosis von 1 mg Pulverformulierung getestet. Als Vergleichsdaten wurden die in Kapitel 4.2 diskutierten Mittelwerte der Fällung 3+4 ohne Hilfsstoff verwendet. Dabei handelt es sich um Messungen mehrerer Chargen, während die Chargen mit Hilfsstoff einfach hergestellt und mehrfach vermessen wurden.

In Vorversuchen wurde sichergestellt, dass die Hilfsstoffe selbst durch das angewendete Verfahren nicht gefällt werden können sondern in Lösung verbleiben, sofern sie keine Wechselwirkung mit dem Protein eingegangen sind.

4.3.1 HYDROXYPROPYLMETHYLCELLULOSE (HPMC)

HPMC ist als grenzflächenaktives Molekül in der Lage, sich an eben solche anzulagern und dadurch die Oberflächeneigenschaften präzipitierter Partikel zu verändern. Zusätzlich kann es stabilisierend auf Proteine wirken. Die Hydroxylgruppen des Moleküls können Wasserstoffbrücken mit dem Protein bilden. Damit fungiert der Hilfsstoff als Wasserersatz („water replacement theory“) und hält die Struktur des Proteins auch nach der Trocknung aufrecht (Carpenter und Crowe, 1988).

Die Verwendung von HPMC 50 führte nur zu einer sehr geringen Viskositätserhöhung von maximal 0,2 mPa·s. Die Viskosität der äußeren Phase einer Suspension wurde im Rahmen der Photonenkorrelations-spektroskopie berücksichtigt, um eine möglichst genaue Berechnung der Partikelgröße aus der Korrelationsfunktion sicher zu stellen. Betrachtet man die Teilchengröße der durch die Präzipitation entstehenden Insulinsuspensionen (Abbildung 4.25), so kann man feststellen, dass 1% HPMC keinen Einfluss zeigte. Erst mit größeren HPMC-Konzentrationen stieg auch die Teilchengröße an. Das Polymer ist offensichtlich in der Lage, sich aufgrund seiner Grenzflächenaktivität an die Teilchenoberflächen anzulagern. Polymerreste ragen dabei in das Umgebungsmedium, verringern die Beweglichkeit des Partikels und erhöhen somit den gemessenen hydrodynamischen Durchmesser. Über den Zeitraum von einer Stunde war kein Partikelwachstum zu erkennen. Mit der höchsten HPMC-Konzentration schien es sogar wieder zu einer Verkleinerung der Partikel zu kommen, dies kann allerdings auch auf messbedingte Schwankungen zurückzuführen sein.

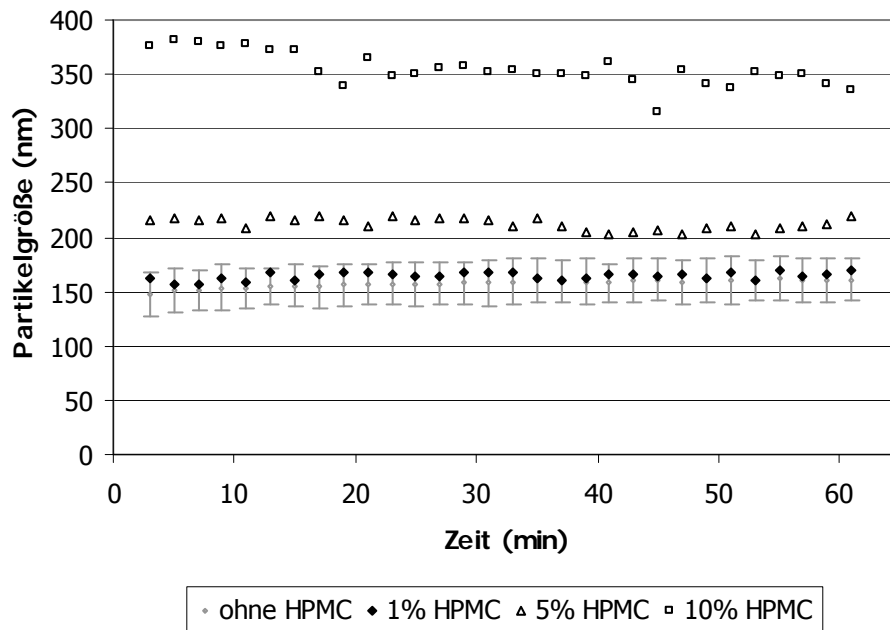


Abbildung 4.25: Einfluss der HPMC-Konzentration auf die Teilchengrößenentwicklung in der Suspension, Photonenkorrelationspektroskopie; ohne HPMC $n=7$ Chargen, Fehlerbalken = SD, mit HPMC $n=1$ Charge

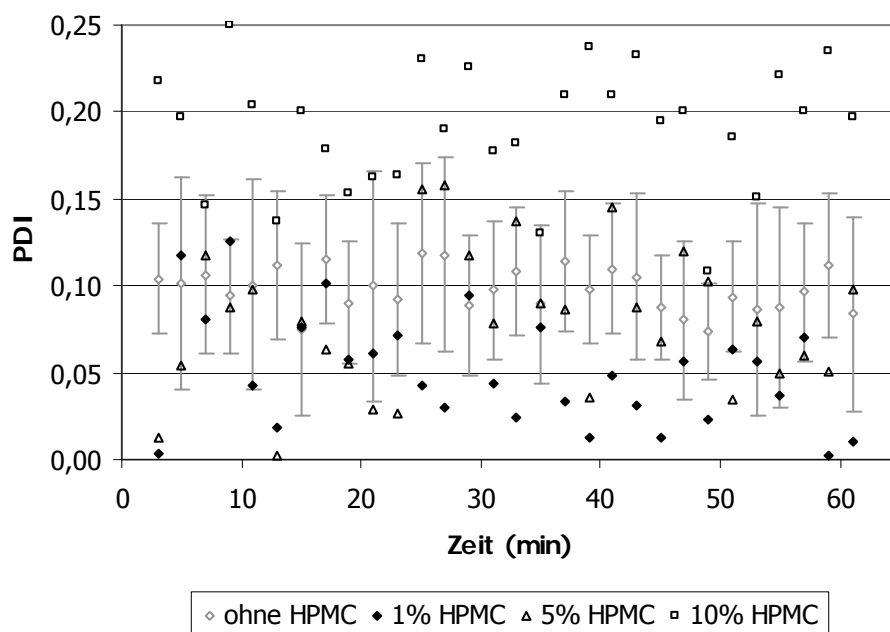


Abbildung 4.26: Einfluss der HPMC-Konzentration auf die PDI-Entwicklung in der Suspension, Photonenkorrelationsspektroskopie; ohne HPMC $n=7$ Chargen, Fehlerbalken = SD, mit HPMC $n=1$ Charge

Grundsätzlich waren die erzeugten Partikelgrößen eng verteilt (PDI < 0,2), eine Ausnahme bildete nur die Charge mit 10% HPMC (Abbildung 4.26). Hier schwankten die Werte aufgrund der größeren und wahrscheinlich unregelmäßiger entstandenen Partikel um 0,2.

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen keine sichtbaren Unterschiede zwischen den Chargen (Abbildung 4.27). Zu erkennen sind Aggregate aus Nanopartikeln (siehe Pfeile) und kollabierte Hohlkugeln, die aus dem Insulin entstanden sind, welches auch nach der Methanolzugabe in Lösung vorliegt, oder aus HPMC bestehen.

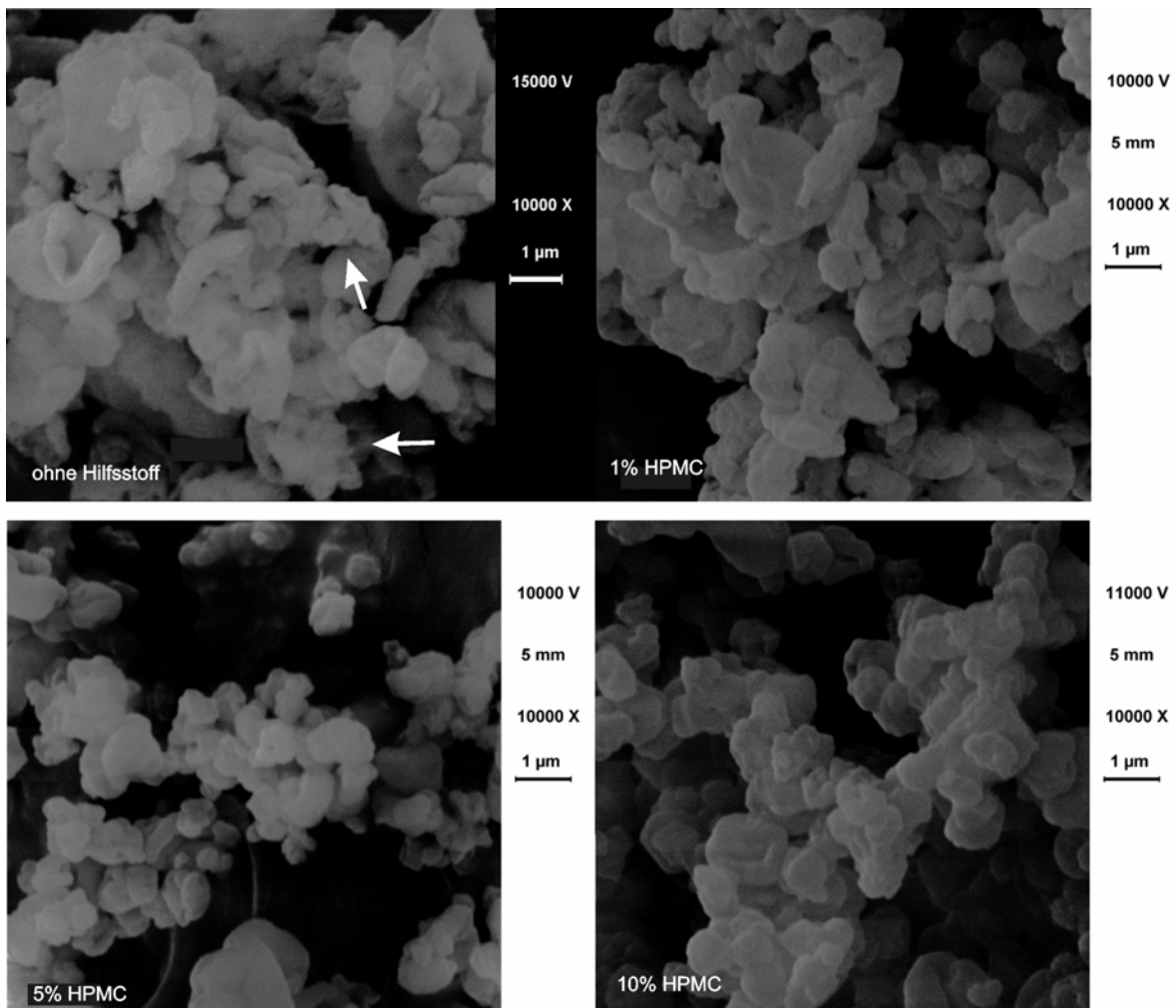


Abbildung 4.27: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen sprühgetrockneter Pulver ohne Hilfsstoff und mit unterschiedlichen HPMC-Anteilen; Präzipitation Nicht-Lösemittel zu Lösemittel 3+4

Auch bei einer laserdiffraktometrischen Untersuchung (Abbildung 4.28) kann man feststellen, dass 1% Hilfsstoff kaum Einfluss auf die resultierende Teilchengröße nimmt. Größere HPMC-Konzentrationen waren dagegen in der Lage, die mittlere Teilchengröße nach der Sprühtrocknung um circa 0,5 μm zu verringern.

Nicht nur Methanol ist in der Lage, die Oberflächenspannung herabzusetzen (siehe Kapitel 4.1.3.6), auch bei Verwendung von HPMC in Lösung kann dieser Effekt beobachtet werden. Dadurch wird die Tröpfchengröße während der Sprühtrocknung herabgesetzt und die resultierenden Partikel werden kleiner. Dieser Effekt ist jedoch begrenzt und hat anscheinend für 5% HPMC das gleiche Ausmaß wie für 10% HPMC, da die Partikelgrößen dieser beiden Chargen nicht voneinander abweichen. Für mizellenbildende Tenside ist dieser Effekt bekannt – ab einer charakteristischen Konzentration besetzen die Tensidmoleküle nicht mehr die Grenzflächen und setzen so die Oberflächenspannung herab, sondern lagern sich zu Mizellen zusammen. Diese haben keinen Einfluss auf die Oberflächenspannung. HPMC eignet sich aufgrund seiner Molekülform nicht zur Mizellenbildung. Allerdings könnte es zu einer vollständigen Besetzung der entstandenen Grenzfläche und somit zu einem Maximaleffekt gekommen sein.

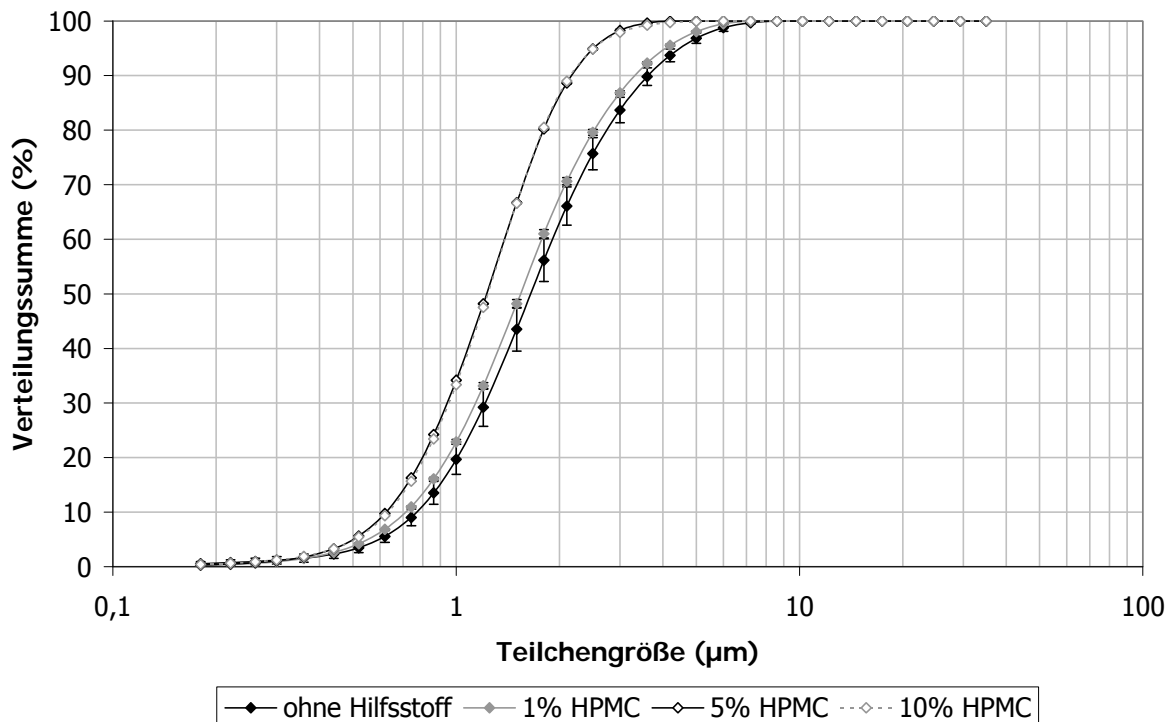


Abbildung 4.28: Teilchengrößenverteilung in Abhängigkeit von der HPMC-Konzentration; Laserdiffraktion Nassdispersion; ohne HPMC $n=4$ Chargen, mit HPMC $n=3$ Messungen, Fehlerbalken = SD

Die aerodynamische Untersuchung der Pulver zeigte, dass im erzielten Teilchengrößenbereich eine kleinere mittlere Teilchengröße keinen positiven Einfluss auf die relativen Feinpartikelfractionen hat. Die Charge mit 10% HPMC unterscheidet sich signifikant von den anderen Chargen (Abbildung 4.29). HPMC erhöht die Auto-Adhäsivität der Pulver und führt bei einer Konzentration von 10% dazu, dass die auftretenden Kräfte im Inhalator die Agglomerate weniger stark in ihre Einzelteile zerteilen. Das wird umso deutlicher, je kleiner die Partikel werden. Die relativen Feinpartikelfractionen unter $2 \mu\text{m}$ der ersten drei Chargen unterscheiden sich alle hoch signifikant von der Charge mit 10% HPMC, während die relativen FPF $< 5 \mu\text{m}$ nur teilweise und in geringerem Umfang abweichen. Die erhöhte Auto-Adhäsivität war auch bei optischer

Betrachtung zu beobachten. Das Pulver mit 10% HPMC tendierte stark zur Verklumpung und wies äußerst schlechte Fließeigenschaften auf.

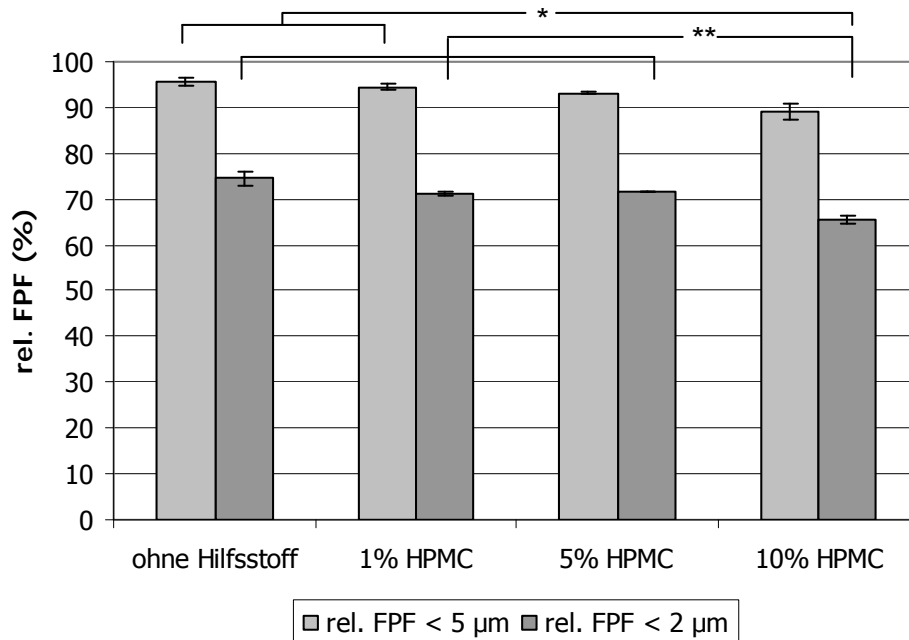


Abbildung 4.29: Relative Feinpartikelfractionen in Abhängigkeit von der HPMC-Konzentration; Dosis 1 mg; ohne HPMC $n=4$ Chargen, mit HPMC $n=3$ Messungen, Fehlerbalken = SD

Mit dem HPMC-Anteil steigt nicht nur die Auto-Adhäsivität sondern auch die Adhäsivität an Oberflächen. Wie in Abbildung 4.30 zu erkennen ist, nimmt die Rückstandsmenge sowohl in der Kapsel als auch im Inhalator mit steigender HPMC-Konzentration zu.

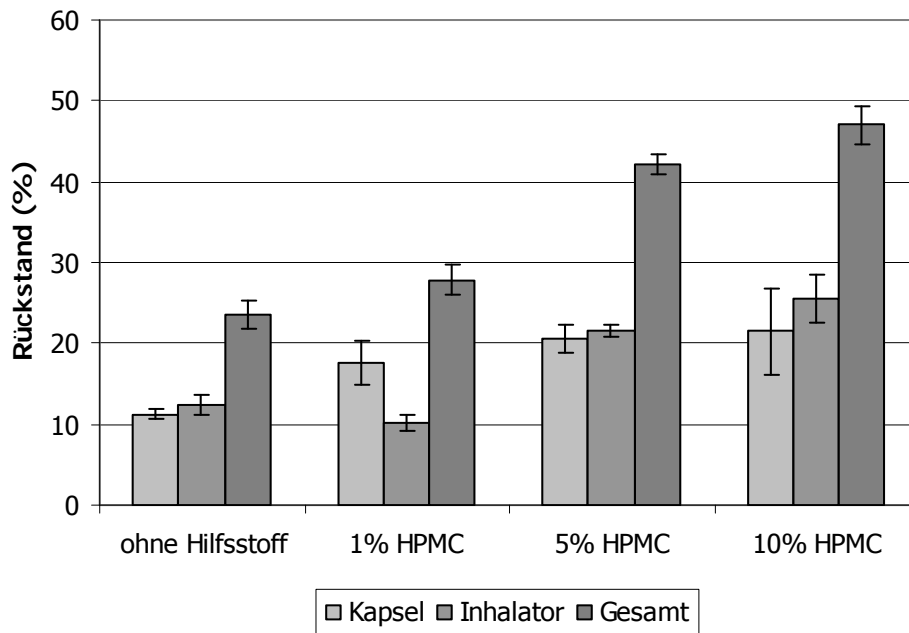


Abbildung 4.30: Rückstände in Kapsel und Inhalator nach der Inhalation in Abhängigkeit von der HPMC-Konzentration; Dosis 1 mg; ohne HPMC $n=4$ Chargen, mit HPMC $n=3$ Messungen, Fehlerbalken = SD

Durch die stetig ansteigende Menge Insulin, die in Kapsel und Inhalator verblieb, wurden auch die absoluten Feinpartikelfractionen beeinflusst. Mit steigendem HPMC-Anteil verringert sich die Menge an Wirkstoff, die in die Lunge gelangen kann und die absoluten Feinpartikelfractionen fallen stetig ab (Abbildung 4.31). Die absoluten FPF $< 5 \mu\text{m}$ der Chargen mit 5% und 10% HPMC unterscheiden sich nicht voneinander. Alle anderen dargestellten Feinpartikelfractionen unterscheiden sich untereinander signifikant oder hoch signifikant.

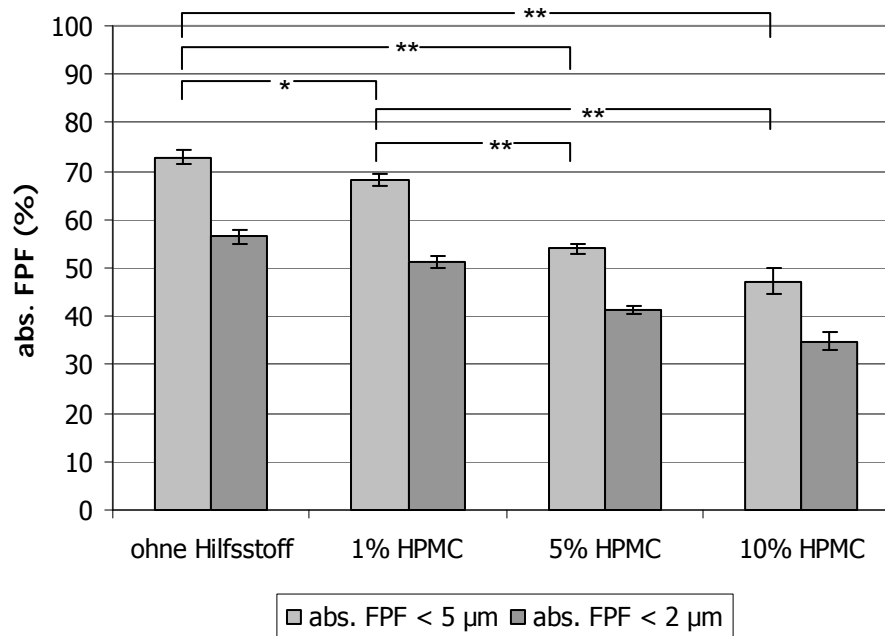


Abbildung 4.31: Absolute Feinpartikelfraktionen in Abhängigkeit von der HPMC-Konzentration; Dosis 1 mg; ohne HPMC $n=4$ Chargen, mit HPMC $n=3$ Messungen, Fehlerbalken = SD, Signifikanzen exemplarisch für abs. FPF < 5 µm

In Anbetracht der schlechten Desagglomeration und der hohen Adhäsion an Kapsel und Inhalator wird HPMC in dieser Formulierung in Kombination mit dem verwendeten Inhalator als eher ungeeignet erachtet.

Da der Einsatz von 1% Hilfsstoff bezogen auf die Insulinmenge nur wenig Einfluss auf die Partikeleigenschaften zeigte, wurden für die folgenden Versuche als niedrigste Konzentrationen 5% Hilfsstoff verwendet. Um einen Effekt des Hilfsstoffes besser betrachten zu können, wurde 20% als zweite Konzentration gewählt.

4.3.2 L-LEUCIN

L-Leucin liegt vorwiegend als Zwitterion – also nach außen hin ungeladen – vor und besitzt einen Kohlenwasserstoffrest. Daher ist es relativ hydrophob und kann sich an die ebenfalls hydrophoben Teile der ausgefällten Insulinpartikel anlagern. Deren hydrodynamischer Durchmesser vergrößert sich dementsprechend mit steigender L-Leucin-Konzentration (Abbildung 4.32). Ein Partikelwachstum findet nach der Fällung mit 5% L-Leucin nur in geringem Ausmaß statt. Die Teilchengrößenentwicklung nach einer Präzipitation mit 20% L-Leucin schwankt so stark, dass keine Aussage über ein Partikelwachstum getroffen werden kann.

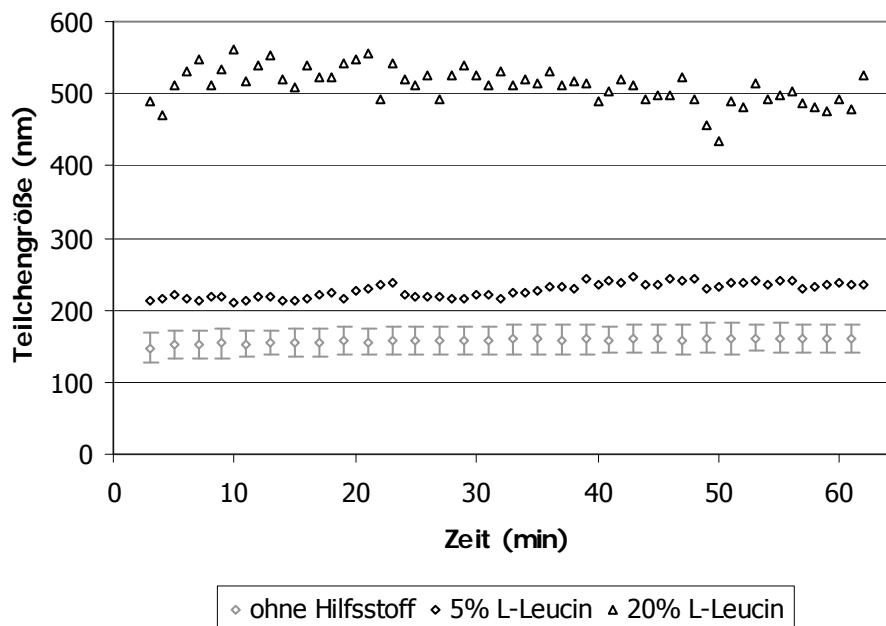


Abbildung 4.32: Einfluss der L-Leucin-Konzentration auf die Teilchengrößenentwicklung in der Suspension, Photonenkorrelationspektroskopie; ohne L-Leucin n=7 Chargen, Fehlerbalken = SD, mit L-Leucin n=1 Charge

Diese offensichtlich unregelmäßige Teilchengrößenverteilung schlägt sich auch in der Betrachtung der Verteilungsbreite nieder. Der PDI der Suspension mit 20% L-Leucin liegt bei 0,3 und damit nicht mehr im akzeptablen Bereich (Abbildung 4.33).

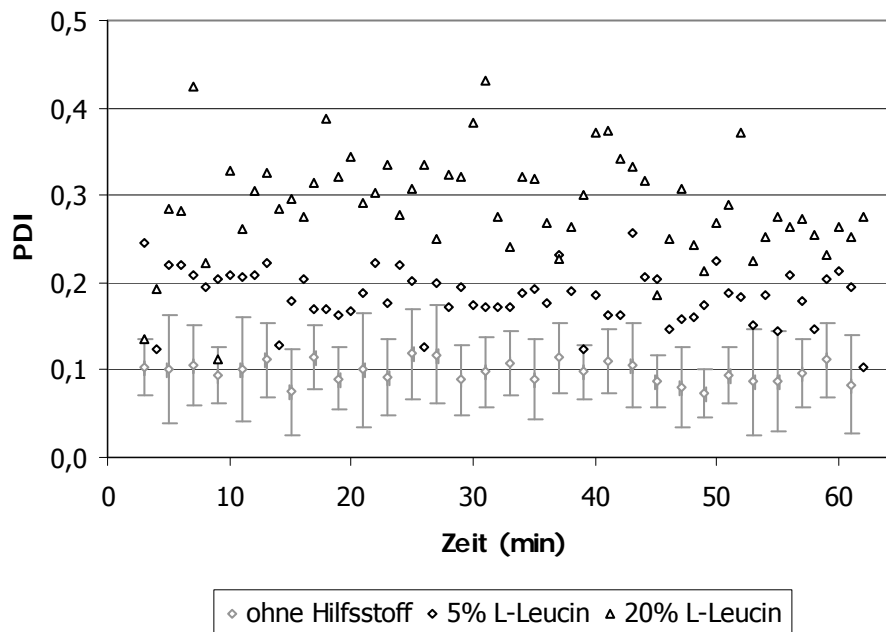


Abbildung 4.33: Einfluss der L-Leucin-Konzentration auf die PDI-Entwicklung in der Suspension, Photonenkorrelationsspektroskopie; ohne L-Leucin $n=7$ Chargen, Fehlerbalken = SD, mit L-Leucin $n=1$ Charge

Auf den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 4.34) lassen sich für eine Präzipitation ungewöhnlich glatte und runde Strukturen erkennen (siehe Pfeile). Auf der Abbildung der Charge mit 5% L-Leucin sieht man am linken Rand ein Agglomerat aus Nanopartikeln, welches teilweise von einer Hülle umschlossen ist. Dies kann nur von in Lösung befindlichem L-Leucin hervorgerufen worden sein, da solche Phänomene ohne Hilfsstoff nicht zu beobachten sind.

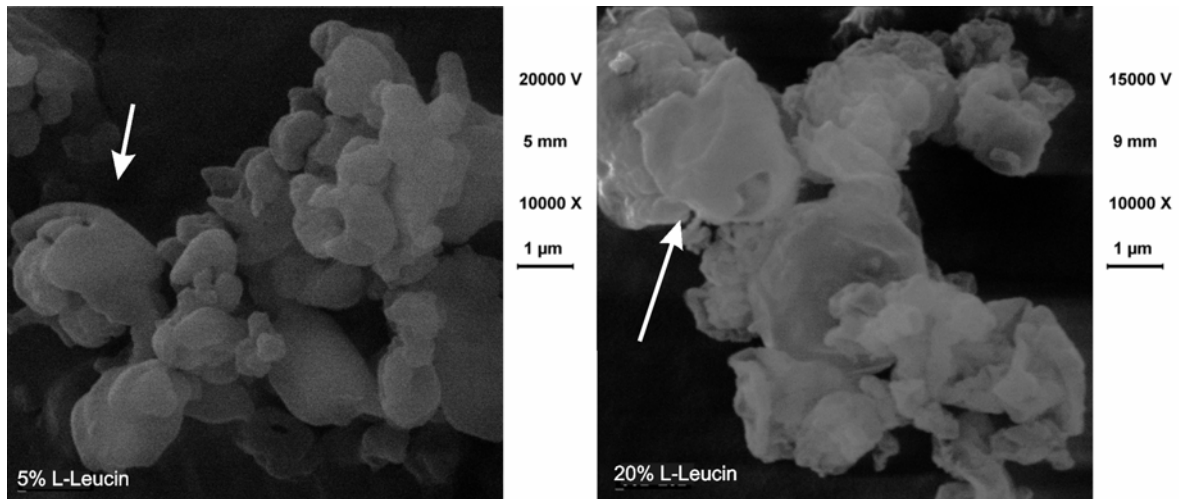


Abbildung 4.34: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen sprühgetrockneter Pulver mit unterschiedlichen L-Leucin-Anteilen; Präzipitation Nicht-Lösemittel zu Lösemittel 3+4

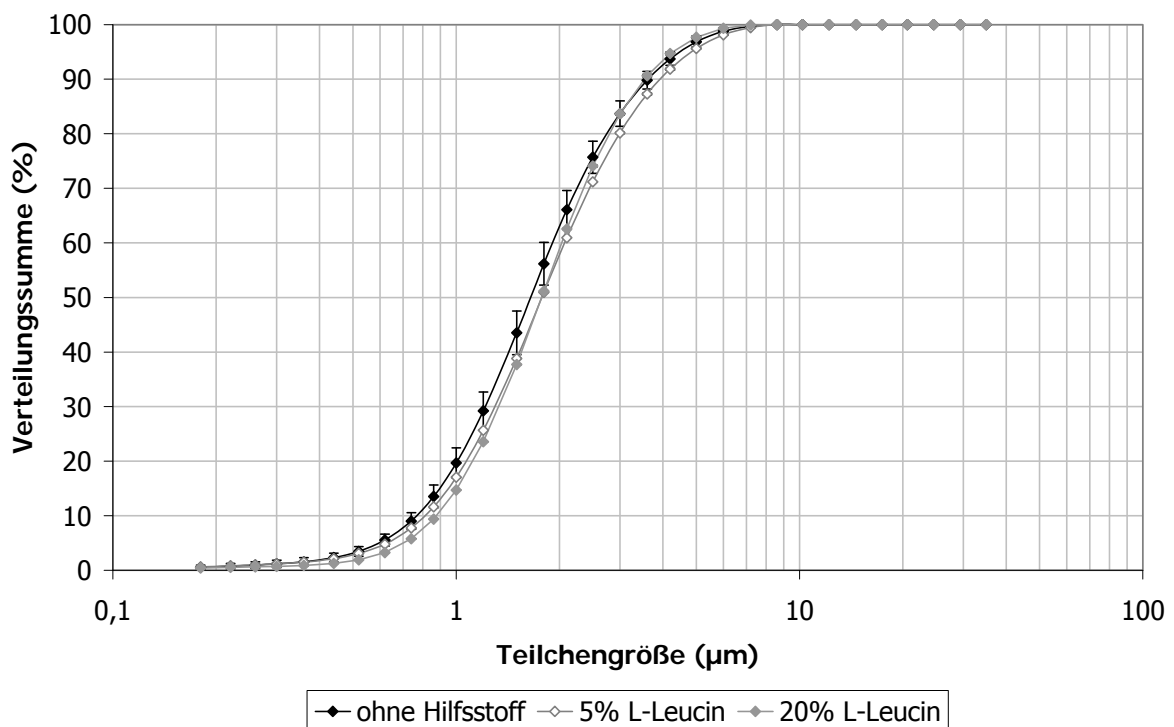


Abbildung 4.35: Teilchengrößenverteilung sprühgetrockneter Insulinpulver in Abhängigkeit von der L-Leucin-Konzentration; Laserdiffraktion Nassdispergierung; ohne L-Leucin n=4 Chargen, mit L-Leucin n=3 Messungen, Fehlerbalken = SD

Dies hat allerdings kaum Einfluss auf die Partikelgröße nach der Sprühtrocknung. Diese steigt mit dem Einsatz von L-Leucin geringfügig an (Abbildung 4.35), was jedoch auch auf die höhere Konzentration an Substanz in der Sprühflüssigkeit zurückzuführen sein kann (siehe Kapitel 4.1.3.5).

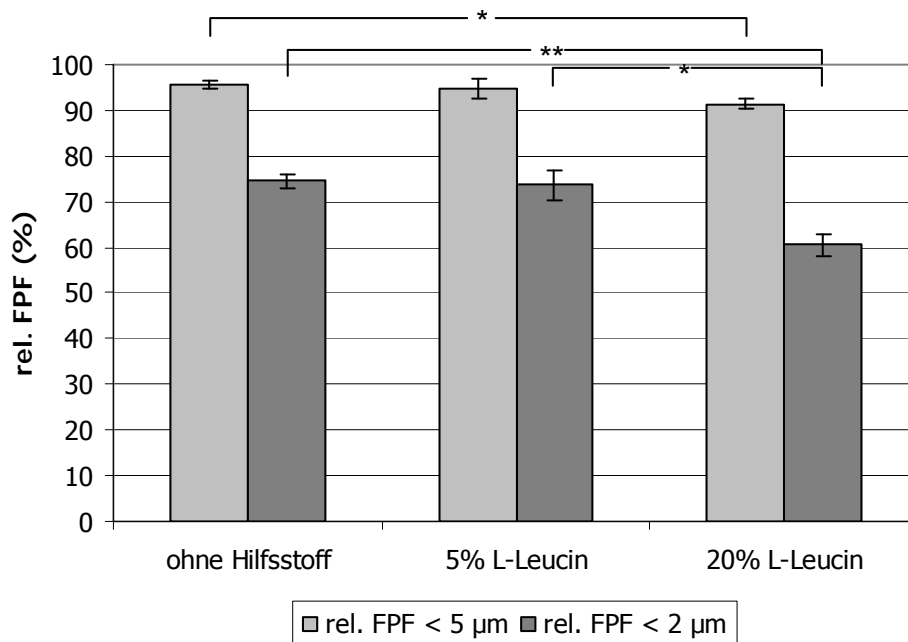


Abbildung 4.36: Relative Feinpartikelfractionen in Abhängigkeit von der L-Leucin-Konzentration; Dosis 1 mg; ohne L-Leucin $n=4$ Chargen, mit L-leucin $n=3$ Messungen, Fehlerbalken = SD

Die Formulierungen ohne Hilfsstoff und mit 5% L-Leucin differieren untereinander bezogen auf die relative Feinpartikelfraktion statistisch betrachtet nicht. Als einzige Charge zeigt das Pulver mit 20% L-Leucin Abweichungen (Abbildung 4.36). Durch Beobachtungen während der Verarbeitung des Pulvers nach der Sprühtrocknung wurde deutlich, dass die Oberfläche des Insulins mit 20% L-Leucin elektrostatisch aufgeladen sein muss. Da es sich bei L-Leucin um einen ionischen Hilfsstoff handelt, tritt dieser Effekt hier weit stärker auf als bei den nichtionischen

Hilfsstoffen HPMC und Mannitol. Die Partikel haften nicht nur an Oberflächen sondern auch stärker aneinander und lassen sich schlechter im Inhalator desagglomerieren. Dieser Effekt ist besonders ausgeprägt bei Partikeln unter 2 μm , weil diese eine größere volumenspezifische Oberfläche als Partikel unter 5 μm besitzen.

Die nach der Inhalation im Inhalator verbleibende Wirkstoffmenge war unabhängig von der L-Leucin-Konzentration (Abbildung 4.37). Es waren keine statistisch signifikanten Unterschiede zu beobachten. Die in der Kapsel verbleibende Menge an Wirkstoff mit 20% L-Leucin differierte jedoch hoch signifikant von der Charge ohne Hilfsstoff ($p < 0,001$) und signifikant von der Charge mit 5% L-Leucin ($p < 0,01$). Die hydrophobere Partikeloberfläche scheint ein geringeres Adhäsionsvermögen an die HPMC-Kapseln zu besitzen. Dadurch verringert sich die Wirkstoffmenge, die nach der Inhalation in der Kapsel verbleibt um circa 4%. Bei der Betrachtung des Gesamtrückstandes lässt sich zwar ein Trend zu niedrigeren Werten bei Verwendung von L-Leucin erkennen, dieser kann jedoch statistisch nicht belegt werden.

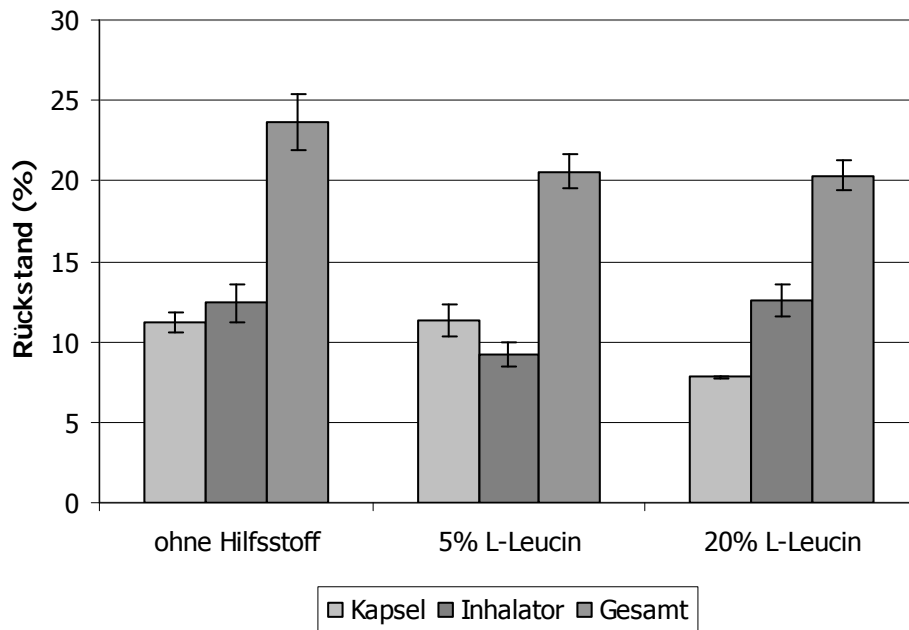


Abbildung 4.37: Rückstände in Kapsel und Inhalator nach der Inhalation in Abhängigkeit von der L-Leucin-Konzentration; Dosis 1 mg; ohne L-Leucin n=4 Chargen, mit L-Leucin n=3 Messungen, Fehlerbalken = SD

Da sich der Gesamtrückstand für alle drei Chargen kaum unterschied, konnte auch für die absoluten Feinpartikelfractionen eine ähnliche Beobachtung gemacht werden wie schon für die relative FPF. Signifikant unterscheidet sich nur der Anteil unter 2 μm der Charge mit 20% L-Leucin von den anderen Chargen (Abbildung 4.38). Durch den etwas höheren Rückstand der Charge ohne Hilfsstoff ist dessen absolute FPF im Vergleich zu den anderen Chargen niedriger. Dadurch unterscheiden sich die absoluten Feinpartikelfractionen unter 5 μm der Chargen ohne Hilfsstoff und mit 20% L-Leucin nicht mehr.

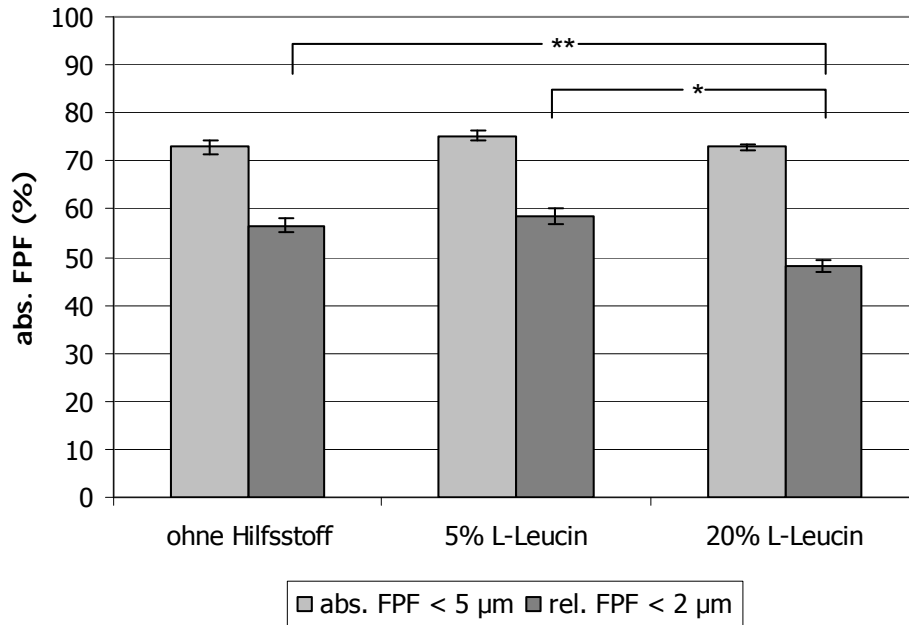


Abbildung 4.38: Absolute Feinpartikelfraktionen in Abhängigkeit von der L-Leucin-Konzentration; Dosis 1 mg; ohne L-Leucin n=4 Chargen, mit L-Leucin n=3 Messungen, Fehlerbalken = SD

Der Einsatz von L-Leucin hatte nicht den gewünschten Effekt, eine Desagglomeration der Partikel zu vereinfachen, es ist vielmehr ein gegenteiliger Effekt aufgetreten. Durch die hydrophobisierte Oberfläche der Partikel kam es zwar zu einer verringerten Rückstandsmenge in der Kapsel, diese konnte die schlechte Desagglomeration jedoch nicht aufwiegen. Aus diesem Grund ist der Einsatz von L-Leucin in einer Formulierung nicht sinnvoll.

4.3.3 MANNITOL

Als Zuckeralkohol ist Mannitol ein sehr hydrophiles Molekül. Es ist in der Lage, über den Effekt der sogenannten präferentiellen Hydratation („preferential exclusion“) Proteine in Lösung zu stabilisieren (Barisch, 2009). Der Stabilisator wird dabei von der Proteinoberfläche ausgeschlossen und das Protein verstärkt hydratisiert (Timasheff, 1998). Dies steht der Fällung mit Methanol entgegen, und infolge dessen wird mit einem Einfluss auf das Fällungsergebnis gerechnet. Andererseits kann dieser Effekt auch dazu führen, dass das gefällte Molekül keinen oder einen nur geringen Aktivitätsverlust durch den Präzipitationsprozess erleidet, weil die Tertiärstruktur durch die verstärkte Hydratation erhalten bleiben kann.

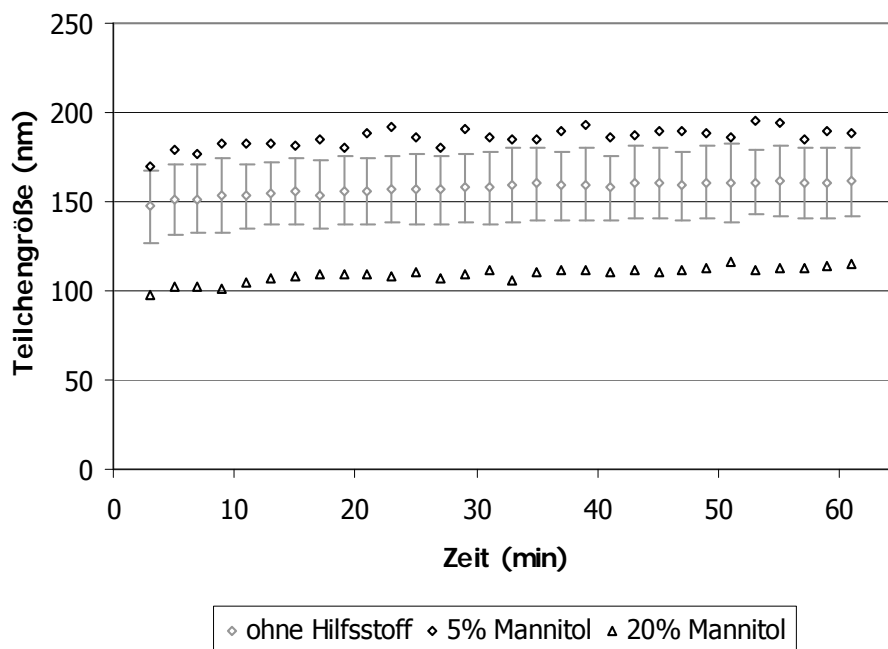


Abbildung 4.39: Einfluss der Mannitol-Konzentration auf die Teilchengrößenentwicklung in der Suspension, Photonenkorrelationspektroskopie; ohne Mannitol $n=7$, Fehlerbalken = SD, mit Mannitol $n=1$

Betrachtet man die Fällung mit 5% und 20% Mannitol, so bestätigt sich diese Theorie. Während 5% Mannitol keinen Einfluss auf die Teilchengröße zeigten (diese lag innerhalb der messbedingten Schwankungen), entstanden mit einer größeren Menge Mannitol kleinere Partikel (Abbildung 4.39). Auch die Fällungsausbeute sank von 70% (ohne Hilfsstoff) auf 56% (20% Mannitol). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass Mannitol in der Lage ist, die Hydratation des Insulinmoleküls zu verstärken und dadurch einer Fällung entgegenzuwirken. Eine Teilchenvergrößerung fand über die Zeit von einer Stunde nur sehr geringfügig statt.

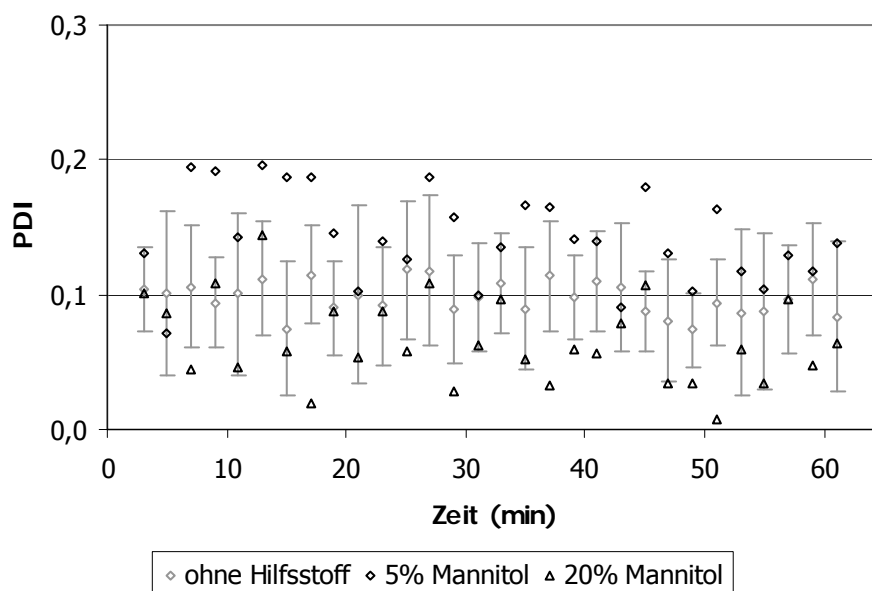


Abbildung 4.40: Einfluss der Mannitol-Konzentration auf die PDI-Entwicklung in der Suspension, Photonenkorrelationsspektroskopie; ohne Mannitol $n=7$, Fehlerbalken = SD, mit Mannitol $n=1$

Die Polydispersitätsindizes liegen für die Chargen mit Mannitol sowie auch für die Chargen ohne Hilfsstoff über die gesamte getestete

Zeitspanne unter 0,2, was für eine enge Teilchengrößenverteilung spricht (Abbildung 4.40).

Die rasterelektronenmikroskopischen Bilder (Abbildung 4.41) zeigen keine auffälligen Unterschiede zu einer Präzipitation ohne Hilfsstoff. Man kann Aggregate aus Nanopartikeln und kollabierte Hohlkugeln erkennen. Letztere scheinen beim Einsatz von 20% Mannitol vermehrt vorzukommen (siehe Pfeile). Dies ließe sich damit erklären, dass die Fällungsausbeute deutlich verringert wurde und mehr Insulin in gelöster Form vorlag, welches sich bei der Sprühtrocknung zu den erwähnten Strukturen formt. Möglich ist auch eine Entstehung von Teilchen, die aus reinem Mannitol bestehen. Allerdings handelt es sich bei den Aufnahmen um einen sehr begrenzten Ausschnitt des Pulverkollektivs, welcher keine quantitative Aussage zulässt.

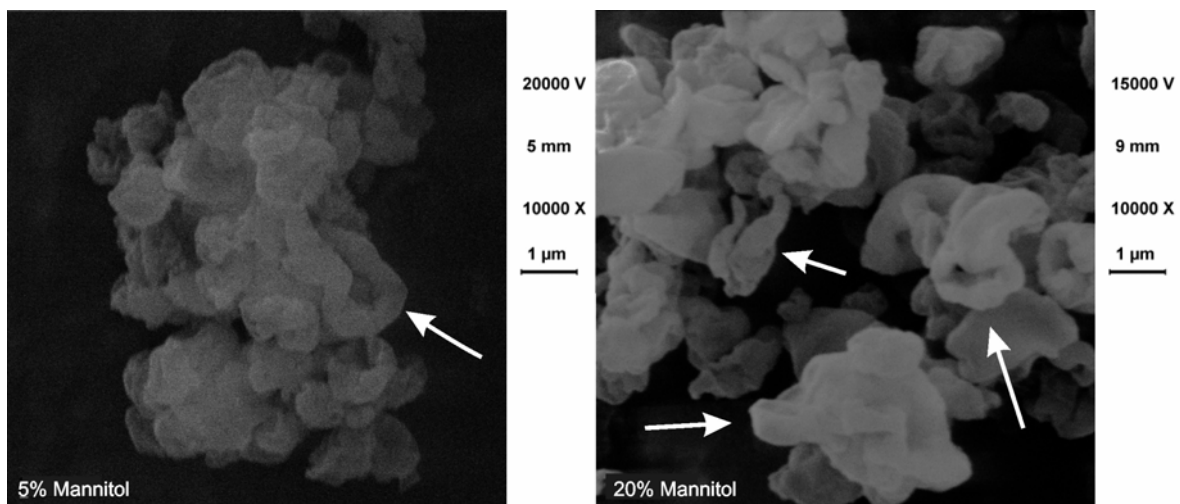


Abbildung 4.41: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen sprühtrockneter Pulver mit unterschiedlichen Mannitol-Anteilen; Präzipitation Nicht-Lösemittel zu Lösemittel 3+4

Die Teilchengrößenverteilung der Charge mit 5% Mannitol weicht nur geringfügig von den Chargen ohne Hilfsstoff ab (Abbildung 4.42). Bei

einem Einsatz von 20% Mannitol entstehen durch die höhere Stoffkonzentration in der Sprühflüssigkeit geringfügig größere Partikel.

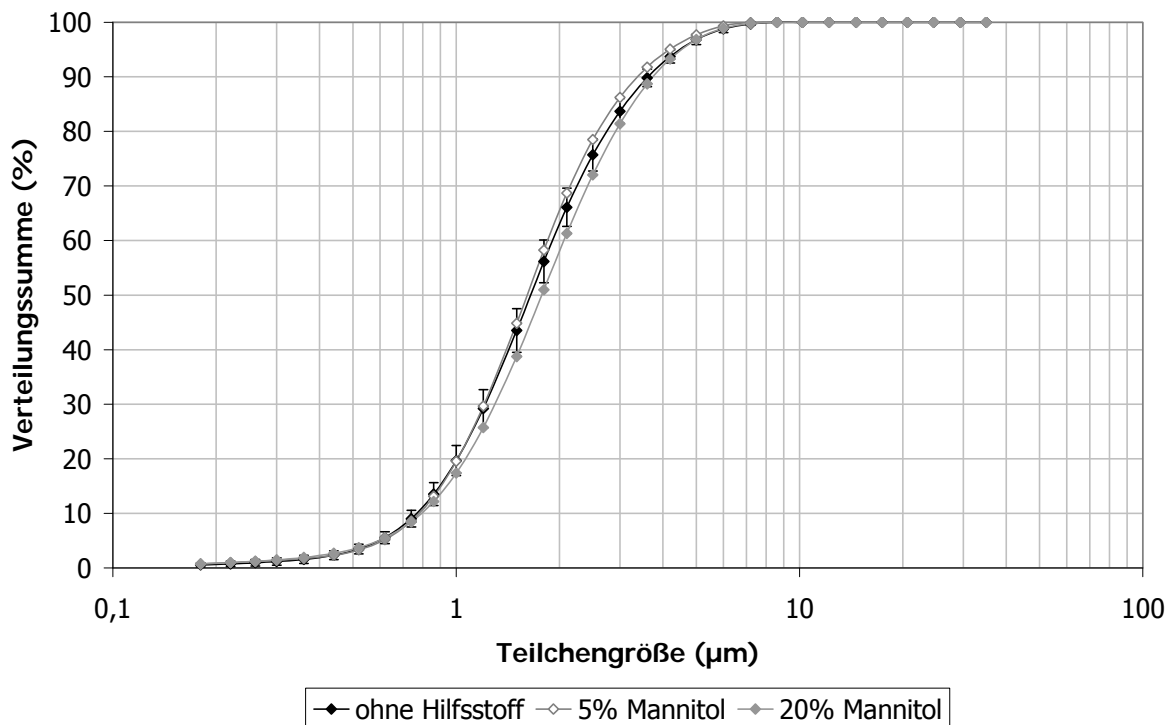


Abbildung 4.42: Teilchengrößenverteilung sprühgetrockneter Insulinpulver in Abhängigkeit von der Mannitol-Konzentration; Laserdiffraktion Nassdispersion; ohne Mannitol $n=4$ Chargen, mit Mannitol $n=3$ Messungen, Fehlerbalken = SD

Der Einsatz von Mannitol als Hilfsstoff wirkt sich nicht relevant auf die aerodynamischen Eigenschaften des Pulvers aus. Zwischen den relativen Feinpartikelfractionen unter $5 \mu\text{m}$ und unter $2 \mu\text{m}$ der Chargen mit und ohne Hilfsstoff sind keine Unterschiede zu beobachten (Abbildung 4.43). Da die Teilchengrößen der Pulver sich stark ähnelten, kann man davon ausgehen, dass sich auch die Auto-Adhäsionskräfte zwischen den Partikeln, die zusätzlich zur Partikelgröße einen Einfluss auf die relativen Feinpartikelfractionen haben können, durch die Verwendung von Mannitol nicht verändert haben.

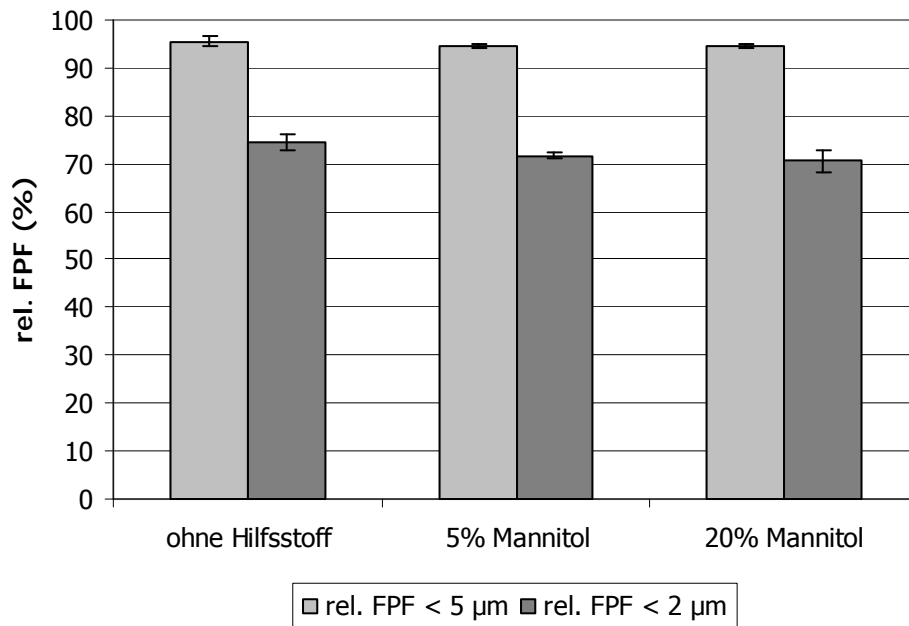


Abbildung 4.43: Relative Feinpartikelfractionen in Abhängigkeit von der Mannitol-Konzentration; Dosis 1 mg; ohne Mannitol n=4 Chargen, mit Mannitol n=3 Messungen

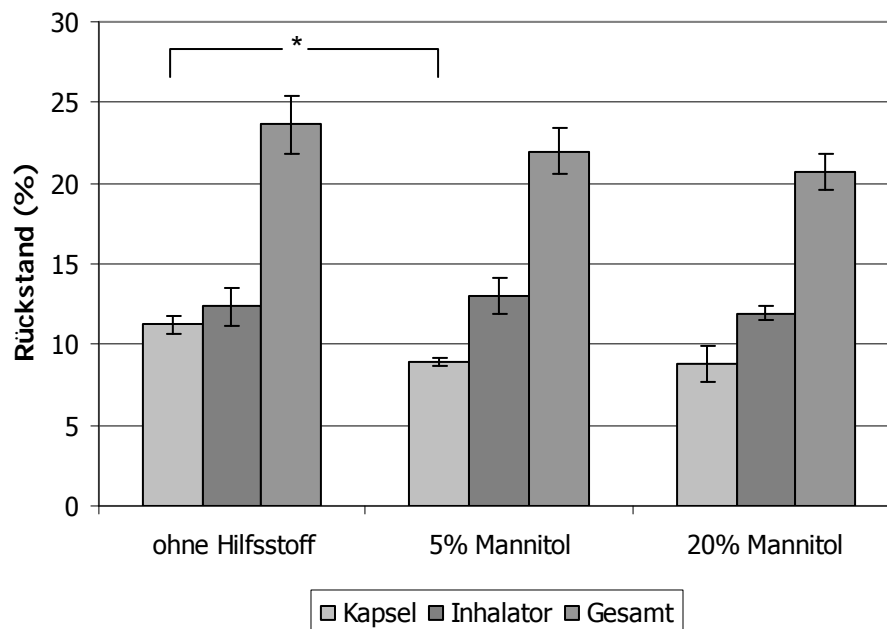


Abbildung 4.44: Rückstände in Kapsel und Inhalator nach der Inhalation in Abhängigkeit von der Mannitol-Konzentration; Dosis 1 mg; * = signifikanter Unterschied; ohne Mannitol n=4 Chargen, mit Mannitol n=3 Messungen

Betrachtet man den Wirkstoffrückstand in Inhalator und Kapsel, so kann bestenfalls ein Trend abgeleitet werden (Abbildung 4.44). Je mehr Mannitol in der Formulierung vorhanden ist, desto weniger Wirkstoff scheint nach der Inhalation in der Kapsel zu verbleiben. Eine Signifikanz dieser Aussage findet sich allerdings nur beim Vergleich der Charge ohne Hilfsstoff mit der Charge, die 5% Mannitol beinhaltet. Für den Rückstand im Inhalator lassen sich keine derartigen Aussagen machen. Der Gesamtrückstand nimmt zwar mit steigender Mannitol-Konzentration ab, dies ist jedoch aufgrund der großen Schwankungen nicht signifikant.

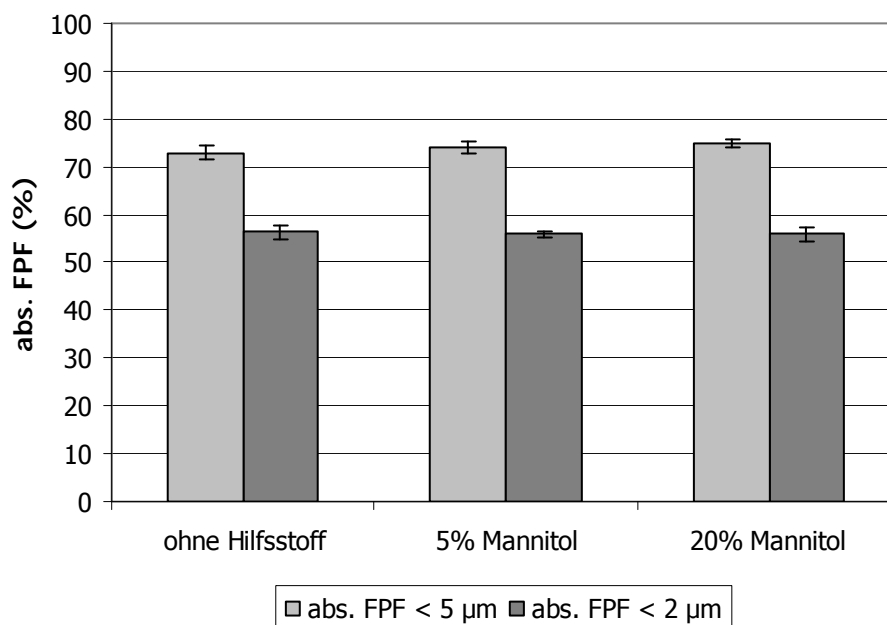


Abbildung 4.45: Absolute Feinpartikelfraktionen in Abhängigkeit von der Mannitol-Konzentration; Dosis 1 mg; ohne Mannitol n=4 Chargen, mit Mannitol n=3 Messungen

Die absolute Feinpartikelfraktion wird aus der relativen Feinpartikelfraktion unter Berücksichtigung der Rückstände in Kapsel und Inhalator berechnet. Da sich letztere nicht signifikant durch den Einsatz von Mannitol als Hilfsstoff beeinflussen ließen, wird auch bezüglich der

absoluten Feinpartikelfraktionen nicht mit signifikanten Unterschieden gerechnet. In Abbildung 4.45 ist zu erkennen, dass diese Annahme durch die Versuchsergebnisse bestätigt wurde.

Mannitol hatte in den verwendeten Konzentrationen zwar einen Einfluss auf die Teilchengröße nach der Fällung und die Fällungsausbeute jedoch nicht auf das aerodynamische Verhalten der erzeugten Pulver. Im Gegensatz zu den beiden anderen getesteten Hilfsstoffen ist Mannitol ausschließlich hydrophil und zeigt weniger Tendenz, sich an die Oberfläche der präzipitierten Partikel zu lagern. Daher unterscheiden sich die Eigenschaften der trockenen Partikel mit Mannitol auch kaum von denen ohne Hilfsstoff, da die Adhäsivität und Auto-Adhäsivität – die von den Oberflächeneigenschaften abhängig sind – nicht beeinflusst werden. Ein möglicher positiver Einfluss auf die strukturelle Stabilität des Insulins und damit auf die Aktivität wird in Kapitel 4.3.4 näher diskutiert.

4.3.4 VERGLEICH DER UNTERSCHIEDLICHEN HILFSSTOFFEINFLÜSSE

Um einen Vergleich zwischen den unterschiedlichen Hilfsstoffen ziehen zu können, werden im Folgenden nur die Chargen mit 5% Additiv betrachtet. In Abbildung 4.46 ist zu erkennen, dass es auch mit Hilfsstoffzusatz möglich ist, Partikel im Nanometerbereich zu präzipitieren. Setzt man Substanzen ein, die in der Lage sind, sich durch eine Grenzflächenaktivität (HPMC) oder durch unpolare Gruppen (L-Leucin) an die gefällten Partikel anzulagern, so entstehen tendenziell größere Partikel. Hydrophile Hilfsstoffe wie Mannitol haben in der eingesetzten Konzentration einen geringeren Einfluss auf die Partikelgröße. Das Partikelwachstum der Teilchen, welches ohne Hilfsstoff nur in sehr geringem Umfang stattfindet, wurde durch keinen der Hilfsstoffe deutlich beeinflusst.

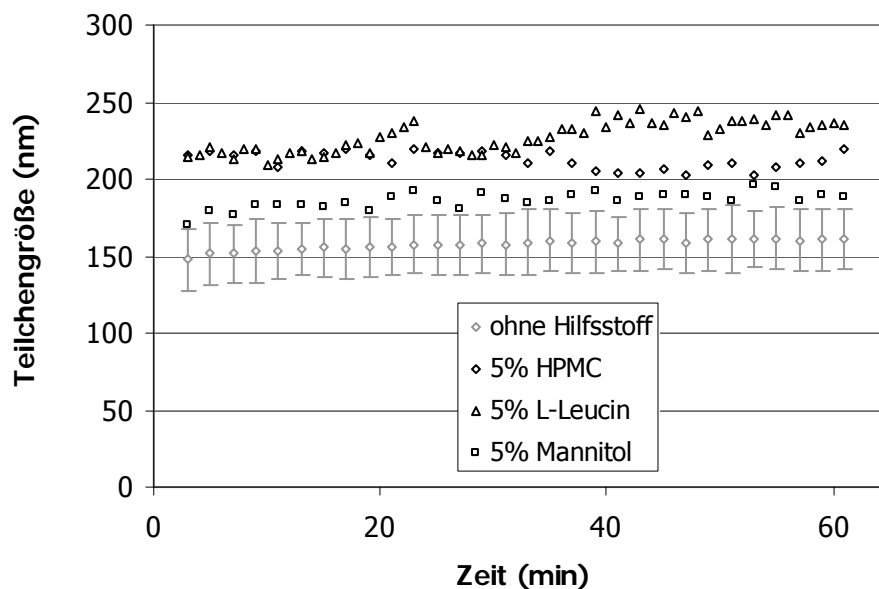


Abbildung 4.46: Einfluss des Hilfsstoffes auf die Teilchengrößenentwicklung in der Suspension, Photonenkorrelationsspektroskopie; ohne Hilfsstoff $n=7$ Chargen, Fehlerbalken = SD, mit Hilfsstoff $n=1$ Charge

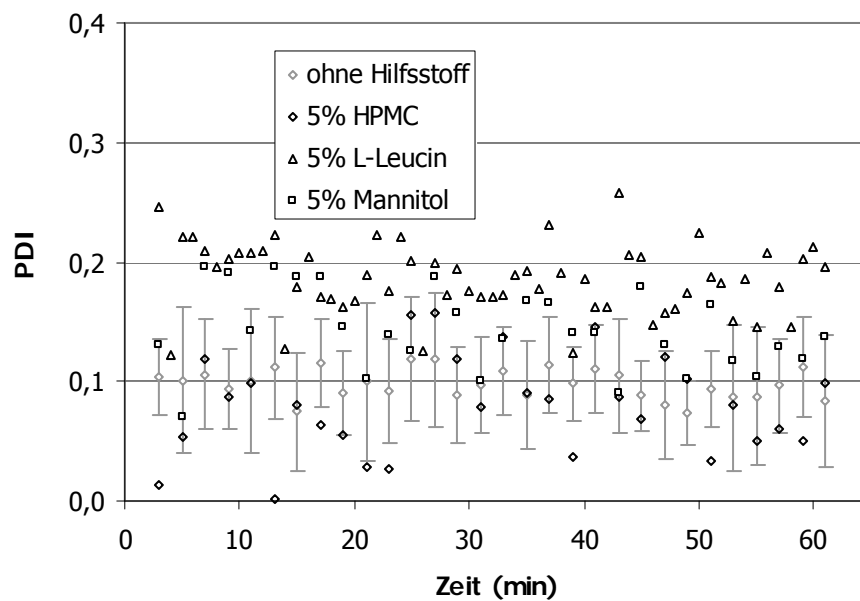


Abbildung 4.47: Einfluss des Hilfsstoffes auf die PDI-Entwicklung in der Suspension, Photonenkorrelationsspektroskopie; ohne Hilfsstoff $n=7$ Chargen, Fehlerbalken = SD, mit Hilfsstoff $n=1$ Charge

Die Fällung resultierte in nahezu ebenso engen Partikelgrößenverteilungen, wie das ohne Wirkstoff der Fall ist (Abbildung 4.47). Hier zeigte sich lediglich der in Kapitel 4.1.3.2 beschriebene Effekt der PDI-Erhöhung, der generell mit größeren Teilchen einhergeht.

Eine Untersuchung der Teilchengrößenverteilung nach der Sprühtrocknung zeigte eine deutliche Abweichung der mit HPMC präzipitierten Partikel (Abbildung 4.48). Die Chargen ohne Hilfsstoff, mit L-Leucin und mit Mannitol differierten kaum voneinander, während mit HPMC deutlich kleinere Partikel erzeugt werden konnten. Dies ist - wie bereits in Kapitel 4.3.1 erwähnt - auf die Oberflächenaktivität des Moleküls zurückzuführen, welche durch das Vorhandensein einer hydrophoben Methylgruppe im ansonsten hydrophilen Molekül zustande kommt. HPMC ist als einziger der verwendeten Hilfsstoffe in der Lage,

die Oberflächenspannung einer wässrigen Lösung in der eingesetzten Konzentration deutlich zu senken.

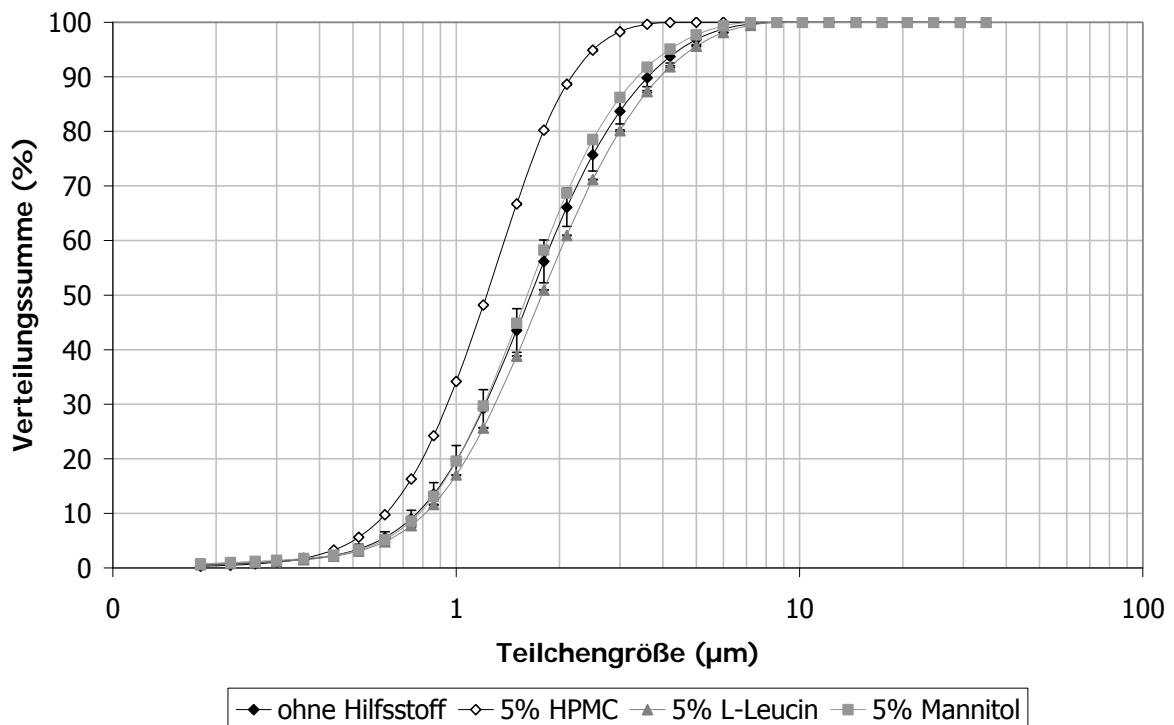


Abbildung 4.48: Teilchengrößenverteilung sprühgetrockneter Insulinpulver in Abhängigkeit vom Hilfsstoff; Laserdiffraktion Nassdispergierung; ohne Hilfsstoff $n=4$ Chargen, mit Hilfsstoff $n=3$ Messungen, Fehlerbalken = SD

Vergleicht man die Oberflächenspannung der Lösung mit der resultierenden mittleren Partikelgröße nach der Sprühtrocknung in Abhängigkeit von dem eingesetzten Hilfsstoff (Abbildung 4.49), so fällt im Fall von HPMC eine deutliche Abhängigkeit auf. Die Reduzierung der Oberflächenspannung und damit der Tröpfchengröße erzeugt während der Sprühtrocknung kleinere Partikel.

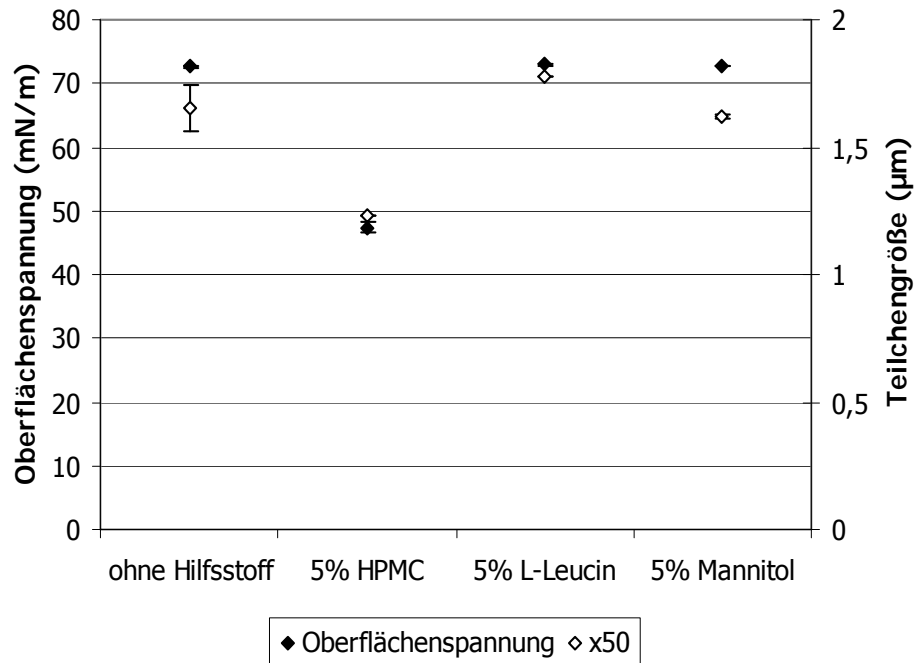


Abbildung 4.49: Oberflächenspannung der wässrigen Lösung und Teilchengröße nach Sprühtrocknung in Abhängigkeit vom Hilfsstoffeinsatz; $n=3$ Messungen, Fehlerbalken = SD

Durch Fällung und Sprühtrocknung ist das Insulinmolekül verschiedenen Stresssituationen ausgesetzt, welche die Tertiärstruktur des Moleküls und damit dessen Aktivität beeinflussen können. Die dreidimensionale Struktur des Proteins wird zusätzlich zu den vorhandenen Disulfidbrücken von ionischen Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Da das Insulinmolekül durch die Präzipitation in einen weitgehend ungeladenen Zustand versetzt und ihm durch die Sprühtrocknung zusätzlich Wasser entzogen wird, kann die Tertiärstruktur beeinträchtigt werden. Diese Beeinträchtigung wird auch Denaturierung genannt und kann reversibel oder irreversibel geartet sein. Eine Veränderung von Proteinen z.B. unter Hitzeeinfluss verursacht durch Erzeugung neuer kovalenter Bindungen häufig irreversible Aktivitätsverluste. Sollte es sich im Fall der Präzipitation jedoch um eine

reversible Denaturierung gehandelt haben, so kann der Effekt nach einer Rekonstitution der trockenen Partikel in wässrigem Medium wieder aufgehoben werden.

Um dies zu überprüfen, wurde die Aktivität der hergestellten Insulinpulver mit und ohne Hilfsstoff bestimmt und mit der Ausgangsware verglichen. In Abbildung 4.50 ist zu erkennen, dass der Prozess das Protein kaum in seiner Aktivität beeinflusst. Ein Aktivitätsverlust von maximal 3,5 IE/mg kann beobachtet werden. Mannitol scheint sich positiv auf die Molekülstruktur des Insulins auszuwirken. Die Fähigkeit des Mannitols, Proteine in Lösung zu stabilisieren (siehe Kapitel 4.3.3) sorgt während der Produktion dafür, dass die Aktivität des Insulins auch nach der Sprühtrocknung nicht verringert ist. Dies wäre durchaus eine Legitimation, Mannitol als Hilfsstoff einzusetzen, sofern es sich als wirtschaftlich sinnvoll erweist. Da es sich in diesem Fall um Einfachherstellungen handelt, steht die statistische Relevanz der Daten allerdings in Frage. Ein stabilisierender Effekt von HPMC ist aufgrund der großen Messschwankungen nicht zu erkennen.

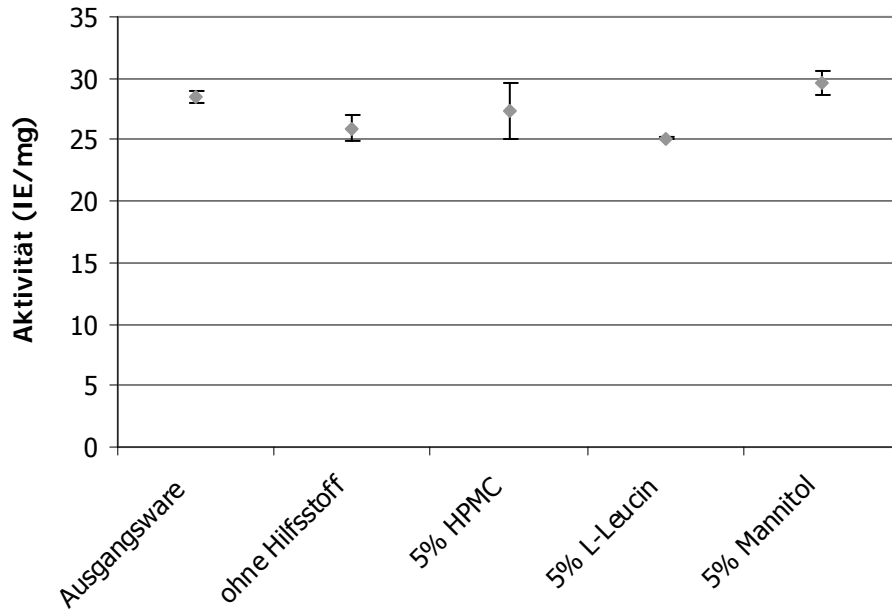


Abbildung 4.50: Aktivitätsbestimmung verschiedener Pulverchargen; ohne Hilfsstoff $n=3$ Chargen, mit Hilfsstoff und Ausgangsware $n=3$ Messungen

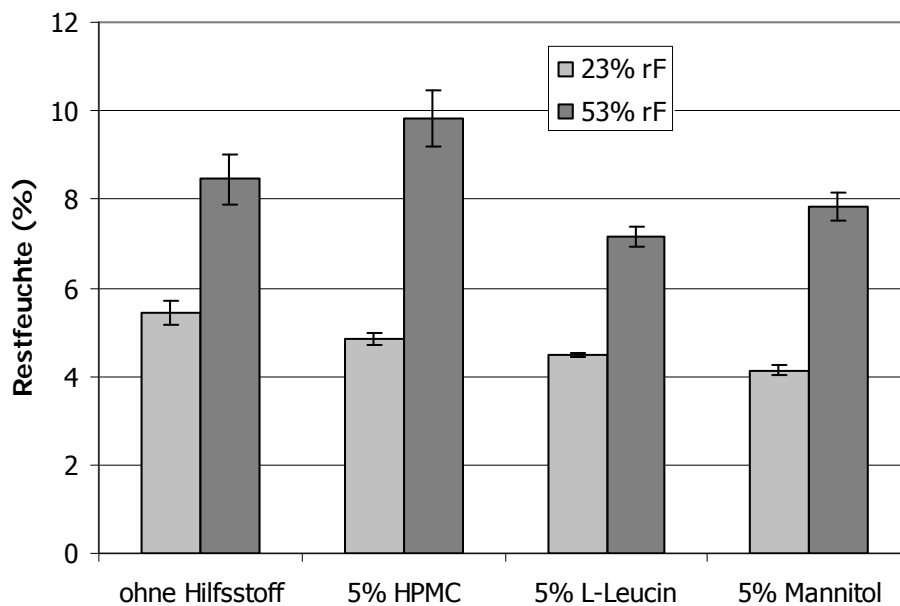


Abbildung 4.51: Restfeuchte der Chargen mit und ohne Hilfsstoff nach zweiwöchiger Lagerung im Exsikkator bei 23% und 53% relativer Feuchte; $n=2$

Zur Untersuchung der Feuchteaufnahmefähigkeit der Pulver, wurden diese einige Zeit in unterschiedlich konditionierten Exsikkatoren gelagert und anschließend auf ihre Restfeuchte überprüft. Erwartungsgemäß steigt die Restfeuchte bei Erhöhung der Lagerungsfeuchte (Abbildung 4.51). Wurden die Proben bei 53% rF statt bei 23% rF gelagert, so erhöhte sich die resultierende Restfeuchte um 3 bis 5%. Die Proben mit L-Leucin und Mannitol besaßen dabei die niedrigsten Wasseranteile, wie das aufgrund von Literaturdaten bereits erwartet wurde (siehe Kapitel 4.3). Das Insulinpulver mit HPMC zeigt eine höhere Feuchteaufnahmefähigkeit. Bedingt durch seine polymere und dadurch amorphe Struktur zeigt es eine deutlich höhere Hygroskopizität als das ähnlich hydrophile Mannitol, welches üblicherweise kristallin vorliegt. Durch den hydrophoben Charakter des L-Leucins fällt die Wasseranlagerung bei dieser Charge am geringsten aus. Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass HPMC nicht als Hilfsstoff geeignet ist, da bei höherer Luftfeuchte mit einer überproportionalen Wasseraufnahme gerechnet werden muss, welche die Desagglomerationseigenschaften des Pulvers negativ beeinflussen könnte.

Weder auf die relative Feinpartikelfraktion unter 5 µm noch auf selbige unter 2 µm hat ein Hilfsstoffzusatz von 5% einen Einfluss (Abbildung 4.52). Aufgrund der ähnlichen Teilchengrößenverteilungen der Chargen ohne Hilfsstoff, mit L-Leucin und Mannitol waren hier keine Unterschiede zu erwarten. Die Charge mit HPMC bestand jedoch aus deutlich kleineren Partikeln. Dies schlägt sich allerdings nicht in der Feinpartikelfraktion nieder, da HPMC zu einer erhöhten Auto-Adhäsivität des Pulvers führte und eine Desagglomeration im Inhalator erschwerte.

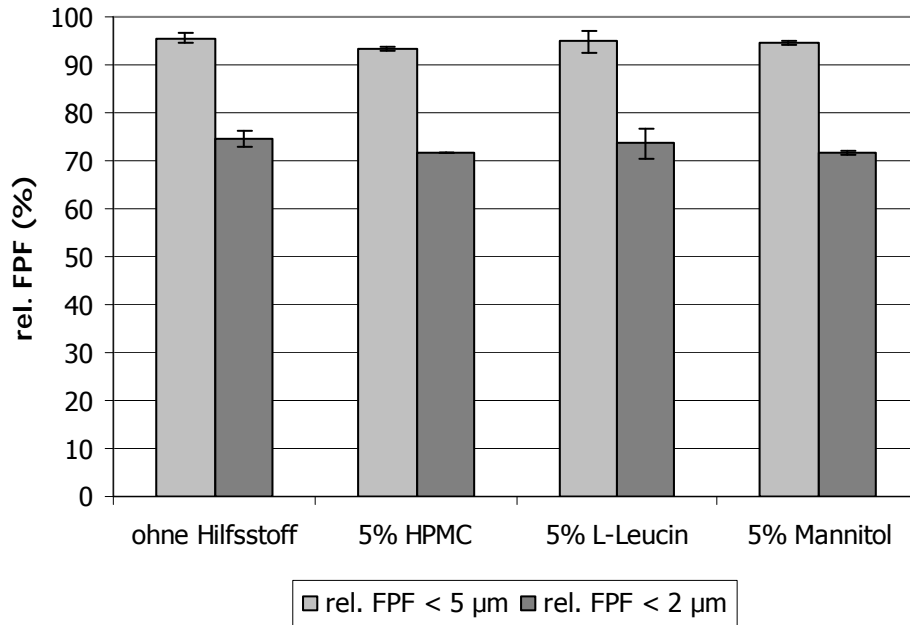


Abbildung 4.52: Relative Feinpartikelfraktionen in Abhängigkeit vom Hilfsstoff; Dosis 1 mg; ohne Hilfsstoff n=4 Chargen, mit Hilfsstoff n=3 Messungen, Fehlerbalken = SD

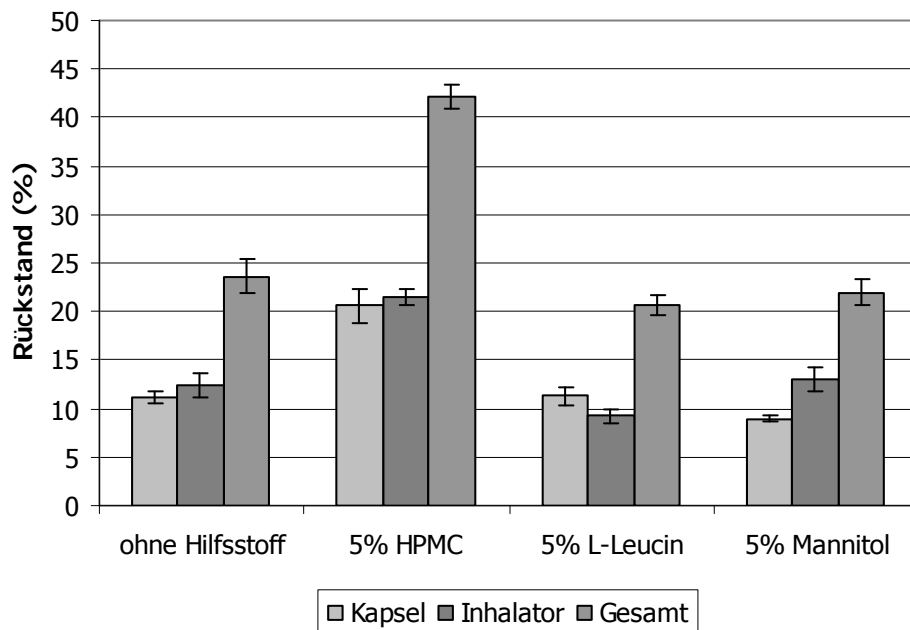


Abbildung 4.53: Rückstände in Kapsel und Inhalator nach der Inhalation in Abhängigkeit vom Hilfsstoff; Dosis 1 mg; ohne Hilfsstoff n=4 Chargen, mit Hilfsstoff n=3 Messungen, Fehlerbalken = SD

Auch die Adhäsivität der Partikel wurde durch HPMC erhöht. Zu beobachten war daher ein erhöhter Rückstand in Kapsel und Inhalator nach der Inhalation (Abbildung 4.53). Die geringste Haftungstendenz zeigte die Charge mit dem lipophilsten Hilfsstoff L-Leucin. Dieser Effekt kann jedoch nicht als statistisch signifikant bezeichnet werden.

Diese Beobachtungen finden sich auch bei Betrachtung der absoluten Feinpartikelfractionen wieder (Abbildung 4.54). Hier lassen sich statistisch hoch signifikante Unterschiede zur Charge mit HPMC erkennen, die auf dem stark erhöhten Gesamtrückstand im Vergleich zu den anderen Chargen beruhen.

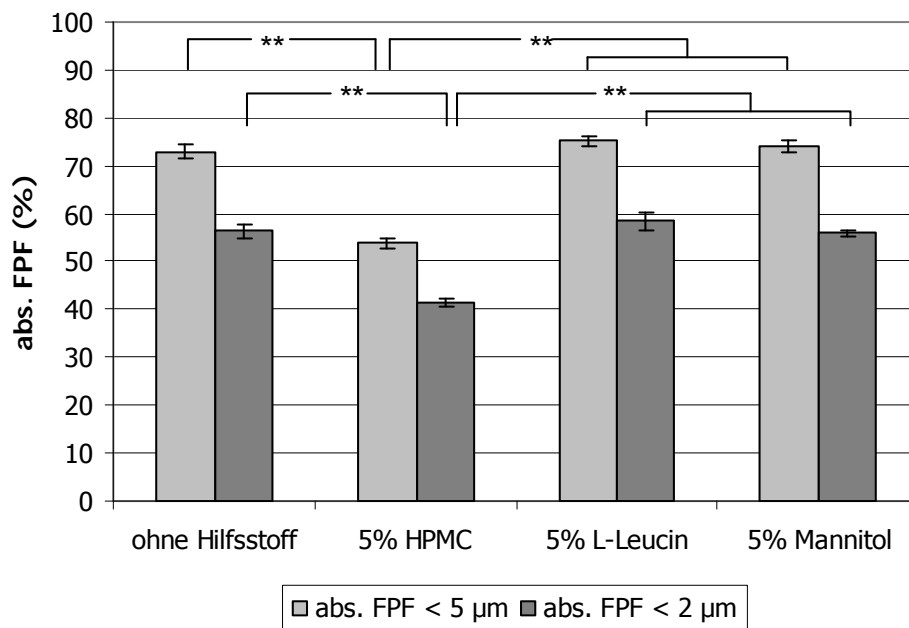


Abbildung 4.54: Absolute Feinpartikelfractionen in Abhängigkeit vom Hilfsstoff; Dosis 1 mg; ohne Hilfsstoff n=4 Chargen, mit Hilfsstoff n=3 Messungen, Fehlerbalken = SD

4.3.4.1 EINFLUSS VON HILFSSTOFFEN UND LAGERUNGSFEUCHTE AUF DAS AERODYNAMISCHE VERHALTEN IM TWINCER

Während die zuvor präsentierten Ergebnisse direkt nach der Pulverherstellung ermittelt wurden, erfolgte eine weitere Untersuchung nach zweiwöchiger Lagerung bei unterschiedlichen relativen Luftfeuchten. Hierzu wurden die Pulverchargen mit 5% sowie ohne Hilfsstoff in Exsikkatoren mit 23% und 53% relativer Luftfeuchte eingelagert. Es wurde der Twincer als Inhalator verwendet, um beurteilen zu können, ob sich die Pulverchargen ähnlich verhalten, wie unter Verwendung des Cyclohalers. Der Twincer bietet die Zusatzoption der so genannten „sweeper crystals“ (siehe Kapitel 3.1.8), welche sich nicht auf die Feinpartikelfractionen auswirken sollen, dafür aber den Pulverrückstand im Inhalator verringern können (de Boer *et al.*, 2002b). Für jede Lagerungsfeuchte wurden die Pulverchargen mit und ohne Sweeper-Kristalle zunächst im Vorversuch mittels Laserdiffraktion im Inhaler-Modul vermessen. Die Dosis betrug wie im Cyclohaler 1 mg pro Blister.

Abbildung 4.55 zeigt die laserdiffraktometrisch ermittelten Anteile an Partikeln kleiner als 5 μm . Mithilfe dieser Kenngröße können die Unterschiede zwischen den Chargen und Messbedingungen übersichtlich dargestellt werden. Der Einsatz von Sweeper-Kristallen hat keinen Einfluss auf die Teilchengröße der aus dem Inhalator abgegebenen Partikel. Die Charge mit HPMC sticht allerdings deutlich heraus, da hier nahezu alle gemessenen Partikel kleiner als 5 μm sind. Da für diese Charge auch bei Verwendung der Nassdispergierung deutlich kleinere Partikelgrößen ermittelt wurden (siehe Abbildung 4.48), war dies für die laserdiffraktometrische Analyse mit dem Inhaler-Modul ebenfalls zu erwarten.

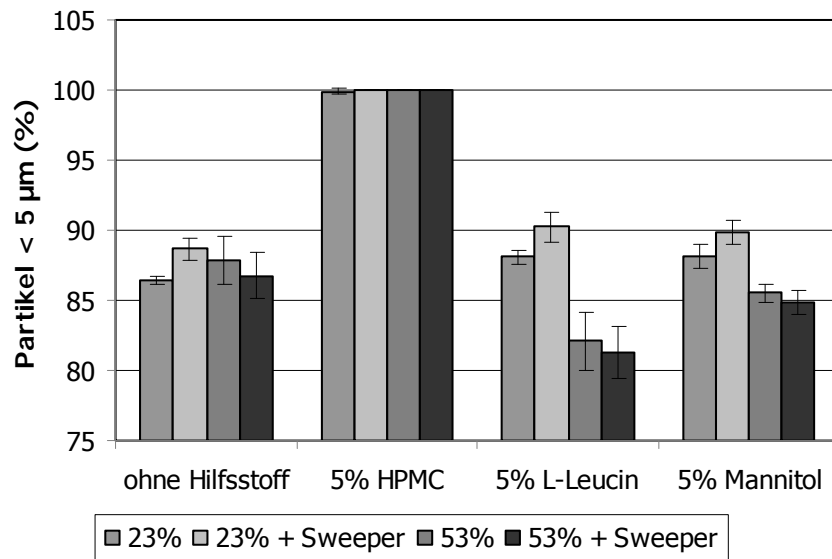


Abbildung 4.55: Partikel kleiner als 5 µm unterschiedlicher Insulinpulver bei unterschiedlichen Messbedingungen; Laserdiffraktion Inhaler-Modul, Inhalator: Twincer; n=3 Messungen, Fehlerbalken = SD

Das HPMC-haltige Pulver war außerdem das Einzige, das sich im Inhalatorrückstand deutlich von den anderen Chargen unterschied und dessen Reduzierung durch Sweeper-Kristalle optisch sichtbar war. Die durch den Einsatz von HPMC erhöhte Adhäsivität des Pulvers war aufgrund der Ergebnisse aus Kapitel 4.3.1 zu erwarten. Ein Einfluss der Lagerungsfeuchte war nur bei den Pulvern mit L-Leucin und Mannitol zu ermitteln. Bei einer relativen Feuchte von 53% besaßen diese Chargen einen deutlich geringeren Anteil an Partikeln unter 5 µm als nach Lagerung bei 23% rF.

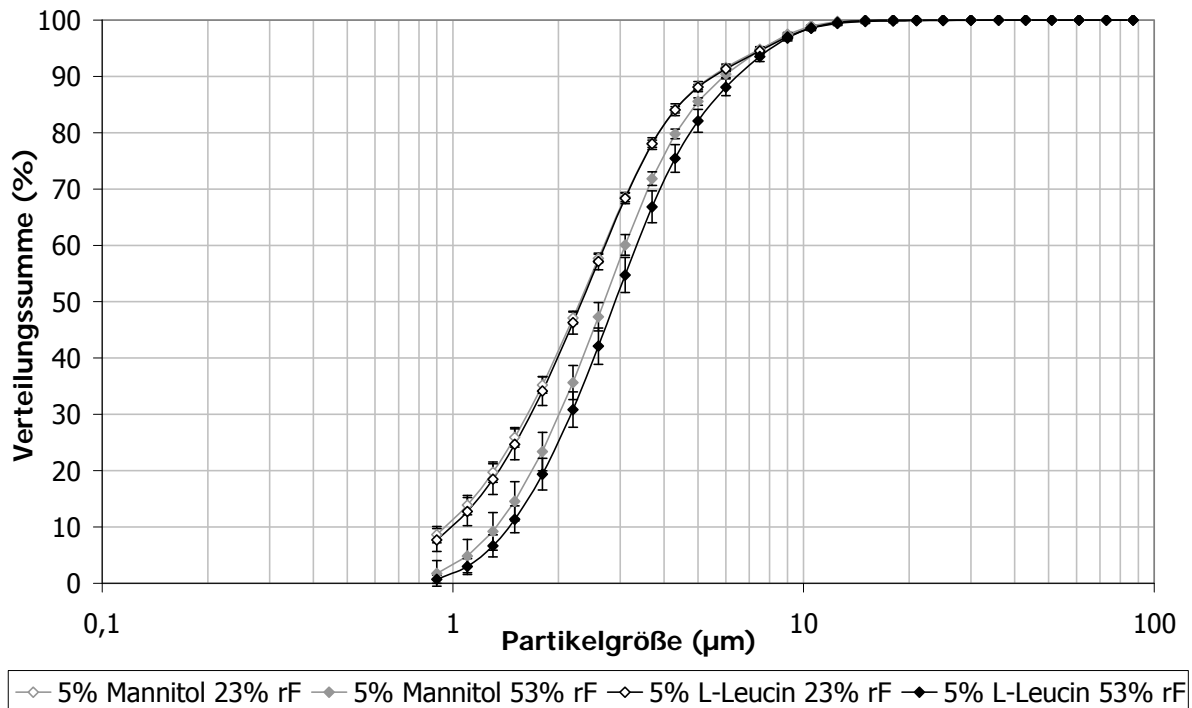


Abbildung 4.56: Teilchengrößenverteilung unterschiedlicher Insulinpulver nach zweiwöchiger Lagerung bei verschiedenen relativen Luftfeuchten; Laserdiffraktion Inhaler-Modul, Inhalator: Twincer; $n=3$ Messungen, Fehlerbalken = SD

Dies wird umso deutlicher, betrachtet man die Teilchengrößenverteilung (Abbildung 4.56). Die Verteilungskurven der bei höherer Lagerungsfeuchte eingelagerter Proben zeigen im Vergleich zu den Kurven der bei niedrigerer Feuchte eingelagerten Proben eine Rechtsverschiebung. Dies ist ein Hinweis auf Agglomerate, die nicht durch die Zentrifugalkräfte im Inhalator zerteilt werden konnten. Die Pulverchargen mit 5% HPMC und ohne Hilfsstoff zeigten keine sichtbare Feuchteabhängigkeit (Abbildung 4.57), was zumindest für die Charge mit HPMC nicht zu erwarten war, da diese die höchste Restfeuchte besaß (Abbildung 4.51).

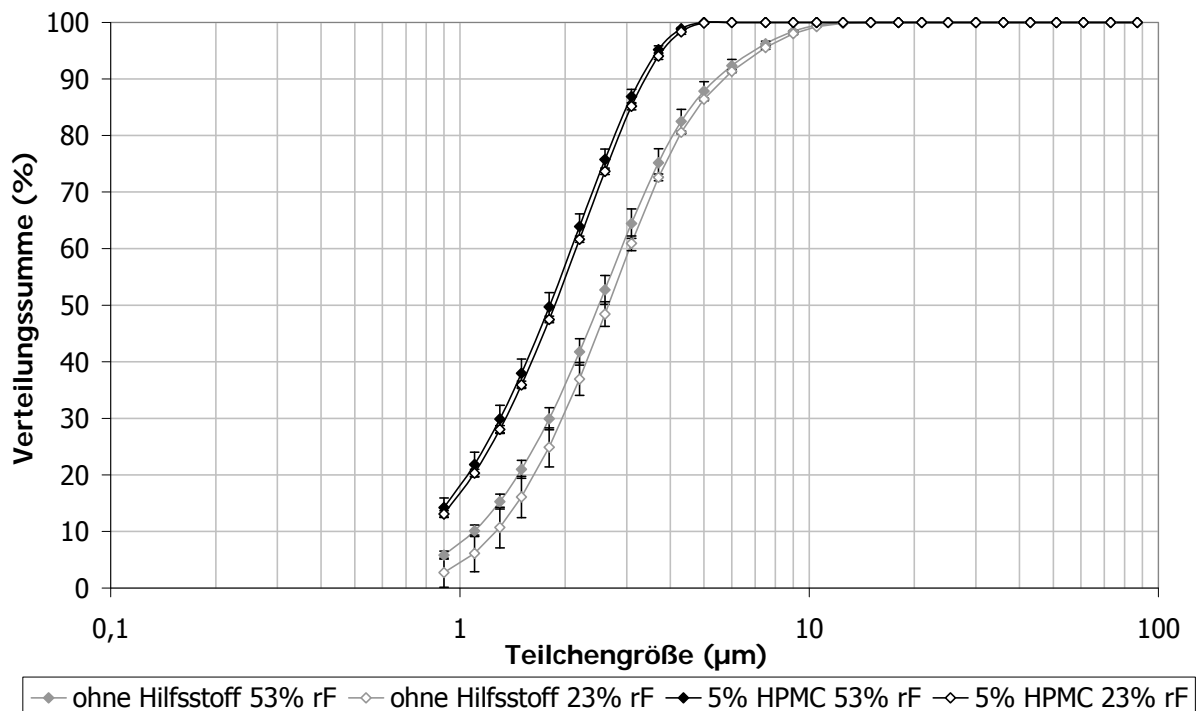


Abbildung 4.57: Teilchengrößenverteilung unterschiedlicher Insulinpulver nach zweiwöchiger Lagerung bei verschiedenen relativen Luftfeuchten; Laserdiffraktion Inhaler-Modul, Inhalator: Twincer; n=3 Messungen, Fehlerbalken = SD

Die Teilchengrößenermittlung mithilfe des Inhaler-Moduls stellte ein zeitsparendes Screeningverfahren dar, auf dessen Ergebnissen basierend ein verkürzter Versuchsplan für die Impaktor-Analyse ausgearbeitet wurde. Da die Verwendung von Sweeper-Kristallen keinen Einfluss auf die Größe der zerstäubten Teilchen zeigte, wurde die Kombination mit einer Lagerung bei 53% rF nicht weiter getestet. Die restlichen drei Kombinationsmöglichkeiten wurden nur da zum Einsatz gebracht, wo im Vorversuch ein Einfluss zu sehen war, d.h. beide Lagerungsfeuchten für die Chargen mit L-Leucin und Mannitol und der Einsatz von Sweeper-Kristallen (23% rF) bei der Charge mit HPMC. Das Insulinpulver ohne Hilfsstoff diente dabei jeweils als Vergleich.

Bei Betrachtung der relativen Feinpartikelfraktionen zeigen sich die Einflüsse der Lagerungsbedingungen, wie sie nach den Vorversuchen zu erwarten waren (Abbildung 4.58). Während sich die relativen FPF < 5 µm der Lagerungsfeuchten der Chargen mit L-Leucin und Mannitol nicht signifikant unterscheiden, ist die Senkung der relativen FPF < 2 µm der bei 53% rF gelagerten Pulver im Vergleich zu den bei 23% rF gelagerten Chargen signifikant. Die Lagerungsfeuchte hatte auf die Charge ohne Hilfsstoff keinen Einfluss. Ein Unterschied zwischen den vier bei 23% rF gelagerten Pulverchargen konnte ebenso wenig ermittelt werden, wie ein Einfluss der Sweeper-Kristalle auf die relativen Feinpartikelfraktionen.

Obwohl die Pulver mit L-Leucin und Mannitol bei einer Lagerungsfeuchte von 53% weniger Wasser aufnahmen, als die Charge ohne Hilfsstoffe und mit HPMC, reagierten sie bezüglich ihrer Desagglomerierbarkeit empfindlicher. Eine mögliche Erklärung bietet die unterschiedliche Oberflächenrauigkeit der Partikel, denn je größer diese ist, desto weniger Kontaktfläche besitzen die Teilchen. Mit L-Leucin und Mannitol erschien die Partikeloberfläche deutlich glatter, als ohne Hilfsstoff (Abbildung 4.34 und Abbildung 4.41), die Partikel besitzen also eine größere Kontaktfläche. Nach Lagerung bei erhöhter Luftfeuchte liegt adsorbiertes Wasser in einer Schicht auf den entsprechenden Partikeln vor. Kommen diese Schichten miteinander in Kontakt, so sind sie in der Lage, Wasserstoffbrücken auszubilden und somit den Zwischenraum zwischen zwei Partikeln aufzufüllen (Lohrmann, 2005). Je mehr Kontaktfläche die Partikel besitzen, umso stärker sind demnach auch die entstehenden Kohäsionskräfte. Auswirkungen hat dies vorwiegend bei den Partikeln unter 2 µm, da diese eine größere volumenspezifische Oberfläche besitzen als die Partikel unter 5 µm.

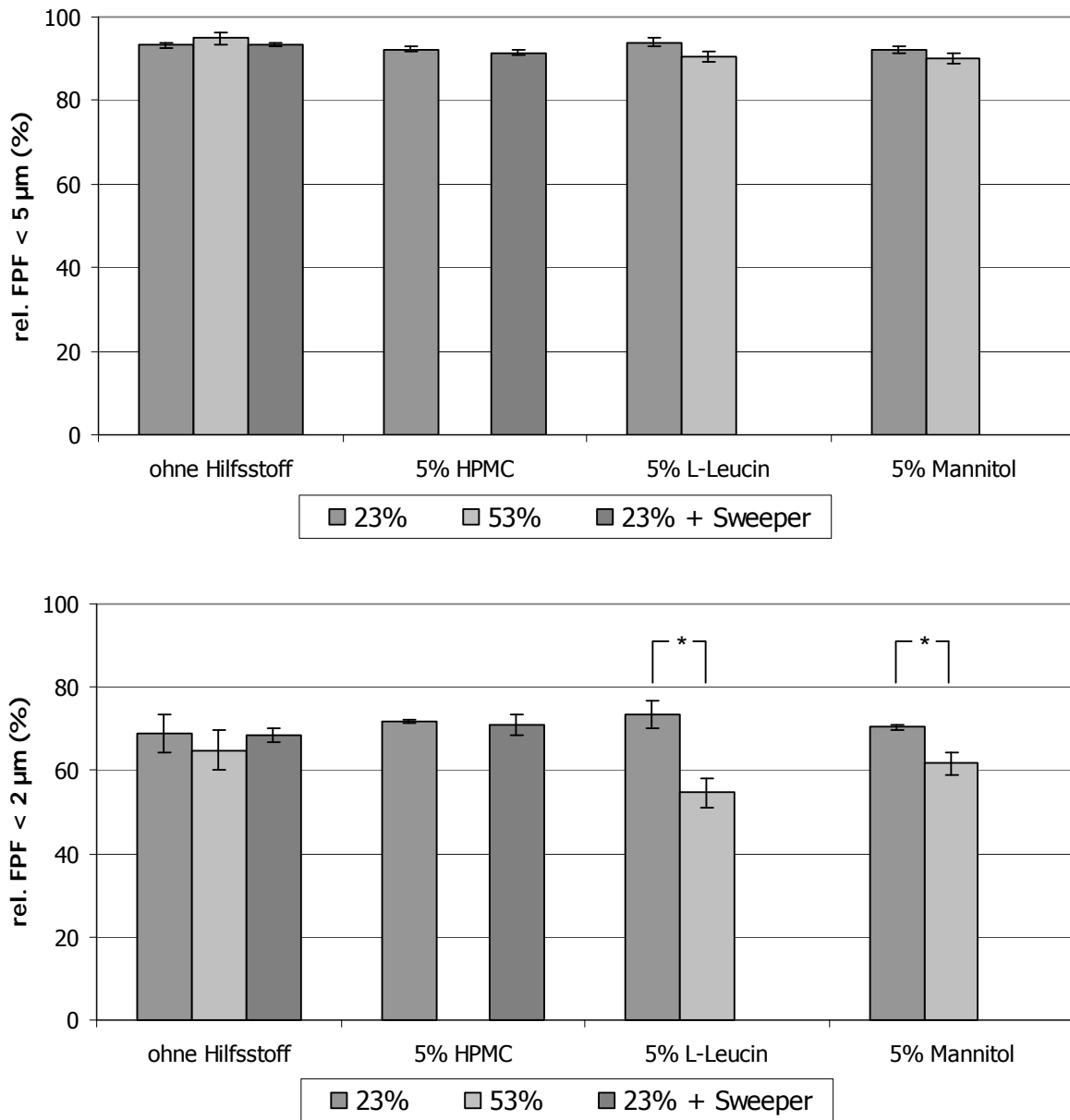


Abbildung 4.58: Feinpartikelfractionen unterschiedlicher Insulinpulver in Abhängigkeit von Lagerungs- und Untersuchungsbedingungen; oben: relative FPF < 5 µm, unten: relative FPF < 2 µm; n=3 Messungen, Fehlerbalken = SD

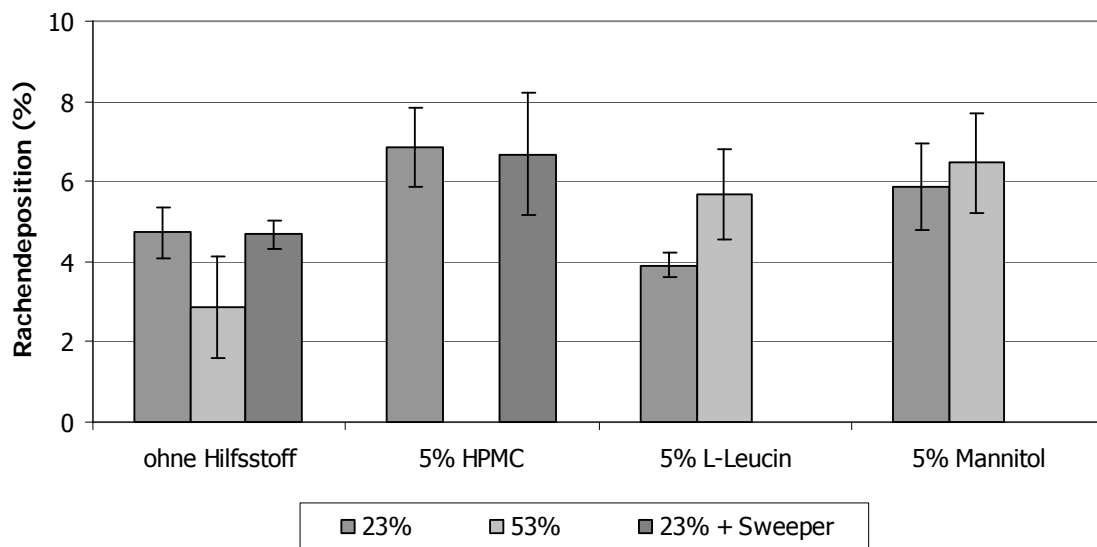


Abbildung 4.59: *Rachendeposition unterschiedlicher Insulinpulver in Abhängigkeit von Lagerungs- und Untersuchungsbedingungen; n=3 Messungen, Fehlerbalken = SD*

Bei Betrachtung der Rachendeposition (Abbildung 4.59) wird deutlich, dass die Sweeper-Kristalle keinen Einfluss auf die Desagglomeration im Inhalator besitzen. Auch ist die Deposition der Partikel mit HPMC im Vergleich zu den anderen Chargen nur geringfügig höher. Obwohl die Partikel mit HPMC laut Laserdiffraktometrie deutlich am kleinsten waren, verhalten sie sich im Impaktor ähnlich wie die anderen Chargen. Hier kommt zum Tragen, dass im Impaktor die geometrische Teilchengröße ermittelt wird, im NGI allerdings der aerodynamische Durchmesser, was für den Vergleich von Impaktion zu Laserdiffraktion von entscheidender Wichtigkeit ist (de Boer, 2002). Der kleinere geometrische Durchmesser bei gleichem aerodynamischen Verhalten bedeutet, dass die Partikel mit HPMC eine größere Dichte besitzen müssen. Dadurch sind sie optisch kleiner, zeigen aber das gleiche Flugverhalten, wie ein poröseres größeres Teilchen. Trägt man die durch Impaktor-Analyse ermittelten

aerodynamischen Teilchengrößenverteilungen der vier Chargen bei einer Lagerungsfeuchte von 23% rF gemeinsam auf (Abbildung 4.60), so wird ebenfalls deutlich, dass sich die Pulver unter diesen Bedingungen trotz abweichender geometrischen Teilchengröße der Charge mit HPMC nicht unterscheiden.

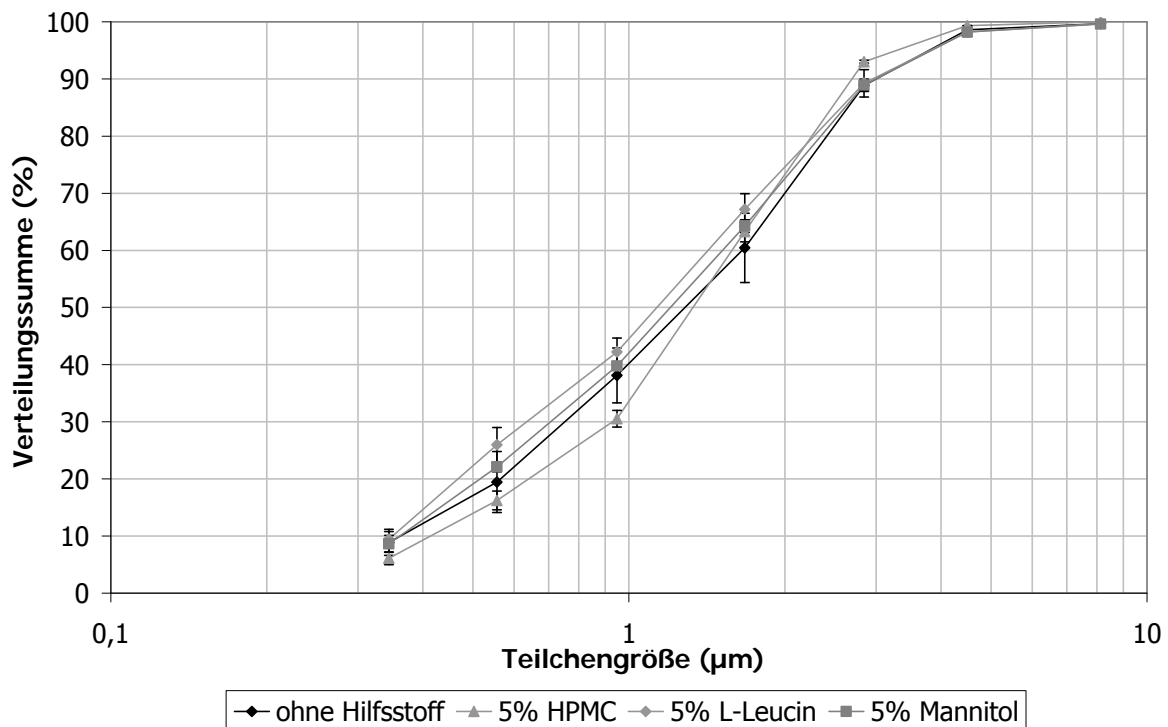


Abbildung 4.60: Aerodynamische Teilchengrößenverteilung nach zweiwöchiger Lagerung bei 23% rF; Impaktor-Analyse, Inhalator: Twincer; $n=3$ Messungen, Fehlerbalken = SD

Die Rückstände im Blister des Twincers betragen unabhängig von den unterschiedlichen Lagerungsfeuchten und der Verwendung von Sweeper-Kristallen maximal circa 10% (Abbildung 4.61).

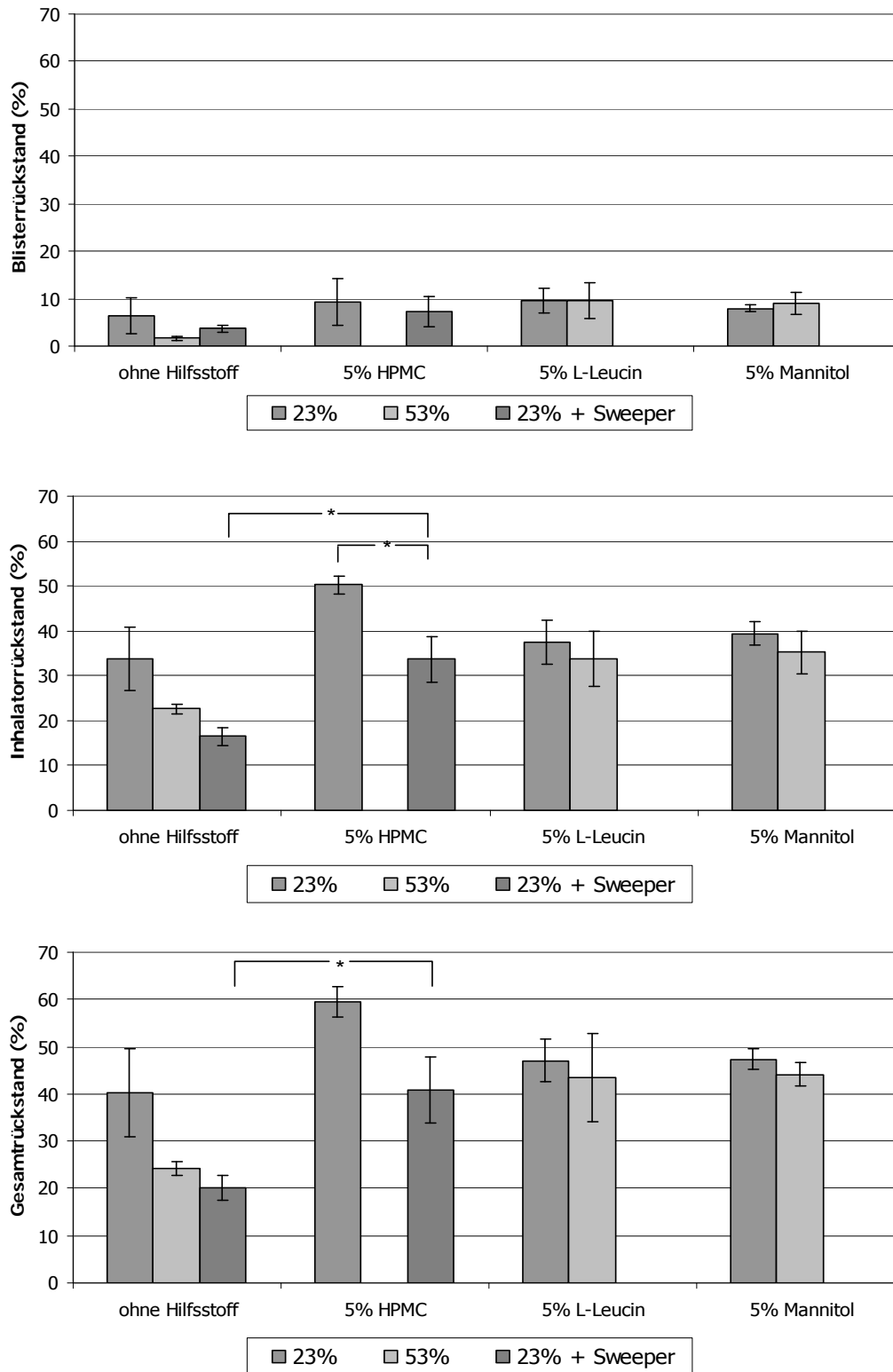


Abbildung 4.61: Einfluss verschiedener Hilfsstoffe und Lagerungsbedingungen auf die Rückstände nach der Impaktor-Analyse, oben: Blister, Mitte: Inhalator, unten: Gesamtrückstand; Inhalator: Twincer; n=3 Messungen, Fehlerbalken = SD

Im Gegensatz dazu konnte der Rückstand im Inhalator mit Sweeper-Kristallen deutlich reduziert werden, da die groben Laktosekristalle aufgrund ihrer größeren Masse durch die Zentrifugalkraft stärker an die Außenwandung der Klassierkammern gedrückt werden als die Wirkstoffpartikel. Somit lagert sich an dieser Stelle weniger Insulin ab. Dieser Effekt ist sowohl bei der Charge ohne Hilfsstoff als auch bei der Charge mit 5% HPMC sichtbar. Trotz des deutlich verringerten Rückstandes in der Klassierkammer, war der Inhalatorrückstand der Charge mit HPMC und Sweeper-Kristallen signifikant höher als der Rückstand der Charge ohne Hilfsstoff mit Sweeper-Kristallen. Dies deutet auf eine größere Adhäsivität der Partikel mit HPMC hin, wie sie auch schon in Kapitel 4.3.1 beschrieben wurde. Hinzu kommt, dass das Pulver nicht nur in der Klassierkammer sondern auch an anderen Stellen des Inhalators impaktieren kann. Durch die Vertiefung des Blisters und die resultierende Luftströmung (Abbildung 4.62), kann noch nicht desagglomeriertes Pulver am oberen Inhalatorkompartiment haften bleiben. Dieser Rückstand wird nicht von Sweeper-Kristallen beeinflusst.

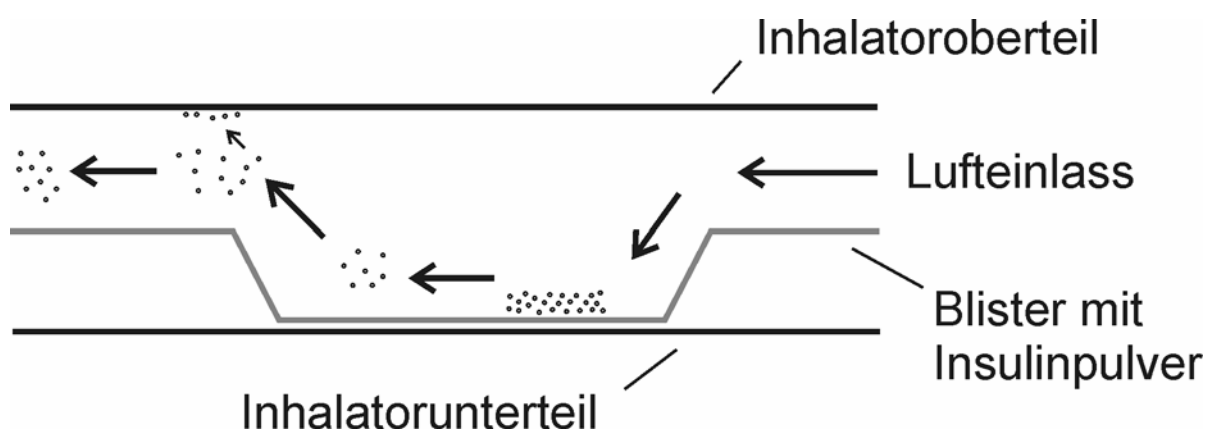


Abbildung 4.62: Schematische Darstellung der Luftführung im Blister des Twincers; Seitenansicht

Betrachtet man die Gesamtrückstände als Summe aus den Rückständen in Blister und Inhalator, so setzen sich hier die bei den Inhalatorrückständen beobachteten Gegebenheiten fort (Abbildung 4.61, unten). Wenn auch aufgrund der großen Standardabweichungen die Unterschiede zwischen den Messungen ohne und mit Sweeper-Kristallen nicht signifikant sind, so ist doch anhand der deutlich kleineren Mittelwerte der Messungen mit Sweeper-Kristallen ein Trend zu geringeren Rückständen ablesbar. Ebenfalls eindeutig ist die höhere Adhäsivität der Partikel mit HPMC gegenüber der Partikel ohne Hilfsstoff oder mit L-Leucin und Mannitol. Die Lagerungsfeuchte wirkt sich nur auf die Charge ohne Hilfsstoff durch deutlich niedrigere Rückstände in Blister und Inhalator mit steigender Luftfeuchte aus. Möglicherweise kommt hier zum Tragen, dass bei erhöhter Luftfeuchte elektrostatische Effekte weniger Einfluss besitzen und das Pulver daher eine niedrigere Tendenz zeigt, am aus Kunststoff bestehenden Inhalator haften zu bleiben.

Die Gesamtrückstände wirken sich stark auf die absoluten Feinpartikelfraktionen aus (Abbildung 4.63). So können die Sweeper-Kristalle diese teils signifikant erhöhen, wogegen sich HPMC als Hilfsstoff negativ auf die absoluten Feinpartikelfraktionen auswirkt, da es eine deutlich höhere Adhäsivität der Pulver an die Inhalatorwandung bewirkt und somit weniger Wirkstoff zur Inhalation bereitsteht. Durch die niedrigeren Rückstände der Charge ohne Hilfsstoff bei höherer Lagerungsfeuchte, sind die absoluten Feinpartikelfraktionen hier entsprechend höher.

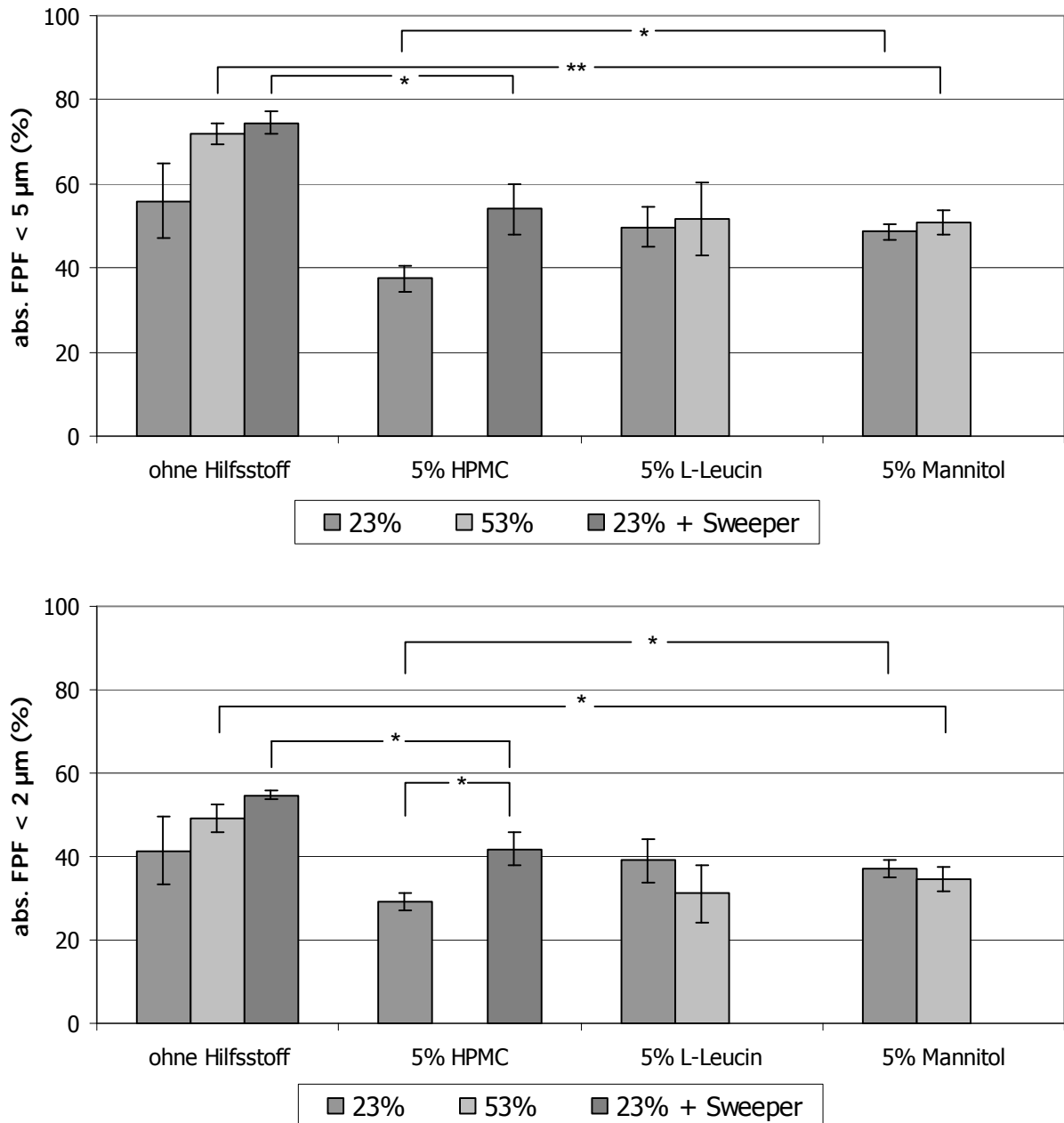


Abbildung 4.63: Feinpartikelfractionen unterschiedlicher Insulinpulver in Abhängigkeit von Lagerungs- und Untersuchungsbedingungen; oben: absolute FPF < 5 µm, unten: absolute FPF < 2 µm; Inhalator: Twincer; n=3 Messungen, Fehlerbalken = SD

Die Untersuchungen mit dem Twincer dienten nicht nur der Charakterisierung verschiedener Insulinpulverchargen, sondern auch dem Vergleich von Laserdiffraktometrie und Impaktor-Analyse. Die

Verwendung des Inhaler-Moduls zur Untersuchung verschiedener Pulverchargen bietet diverse Vorteile. Im Gegensatz zur Impaktor-Analyse, bei der mit Rücksicht auf die Detektionsgrenze der HPLC je drei Inhalationen pro Analyse simuliert werden müssen, kann mit der Laserdiffraktometrie jede Wirkstoffdosis einzeln vermessen werden. Dadurch können Schwankungen innerhalb einer Charge besser abgeschätzt werden. Zusätzlich ist die Untersuchung im Vergleich zur Impaktor-Analyse zeitsparend und durch weniger Schritte im Messablauf unempfindlicher (de Boer *et al.*, 2002a). Dieses Verfahren eignet sich zur Bestimmung der Gleichförmigkeit bereits etablierter Formulierungen im Rahmen der Qualitätskontrolle. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass von der geometrischen Teilchengröße nicht direkt auf das aerodynamische Verhalten geschlossen werden kann und eine Impaktor-Analyse zur Formulierungsentwicklung daher unerlässlich ist.

4.3.5 ZUSAMMENFASSUNG

Unterschiedliche Hilfsstoffzusätze sind in der Lage, sich auf das Präzipitationsverhalten des Insulins auszuwirken. Grenzflächenaktive und hydrophobe Moleküle sind in der Lage, die Teilchengröße in der Suspension zu erhöhen, und hydrophile Proteinstabilisatoren können die gefällten Partikel verkleinern. Dabei beeinflusste keiner der getesteten Hilfsstoffe das Partikelwachstum, welches auch ohne Hilfsstoff nur in sehr geringem Umfang stattfand.

Die Partikelgröße nach der Sprühtrocknung wurde weniger durch die Größe der präzipitierten Partikel als durch die Hilfsstoffeigenschaften und -konzentrationen beeinflusst. HPMC als oberflächenaktiver Stoff war in der Lage, während der Sprühtrocknung durch Einflussnahme auf die

Tröpfchengröße im Sprühnebel die Teilchengröße zu verringern. Dagegen vergrößerten die anderen Hilfsstoffe die Partikel nur geringfügig durch eine höhere Stoffkonzentration in der Sprühflüssigkeit. Die Insulinaktivität der Pulver blieb größtenteils erhalten, daher kann die Präzipitation mit anschließender Sprühtrocknung als geeignet für dieses Protein betrachtet werden. Mannitol zeigte eine Tendenz, die Proteinstruktur zu stabilisieren, allerdings müsste dieses Ergebnis durch wiederholte Herstellungen verifiziert werden.

Die mithilfe des Cyclohalers generierten relativen Feinpartikelfractionen wurden, wenn überhaupt, zum Negativen beeinflusst, allerdings erst bei Hilfsstoffkonzentrationen über 10%. Diese führten zu einer verstärkten Auto-Adhäsion der Pulver und erschwerten die Desagglomeration im Inhalator. HPMC bewirkte zudem eine erhöhte Adhäsion des Pulvers an Kapsel und Inhalator, was den Wirkstoffrückstand beträchtlich erhöhte und die absoluten FPF erniedrigte. L-Leucin konnte durch eine Hydrophobisierung der Partikeloberfläche diese Rückstände leicht verringern, allerdings wurde die verschlechterte Desagglomeration dadurch nicht „ausgeglichen“. Betrachtet man die absoluten Feinpartikelfractionen, die ausschlaggebend sind für die Menge an Wirkstoff, die tatsächlich am Wirkort ankommt, so wurde durch keinen Hilfsstoff eine Verbesserung bewirkt. HPMC und L-Leucin verringerten die Feinpartikelfractionen, während diese mit dem Einsatz von Mannitol nicht beeinflusst wurde. Letzteres wäre demnach als Hilfsstoff geeignet, vor allem da es anscheinend die Stabilität des Insulins verbessern kann. Auch bei Verwendung eines Inhalators mit Klassierkammer als Desagglomerationseinheit (Twincer) stellte sich heraus, dass keiner der getesteten Hilfsstoffe einen positiven Einfluss auf das aerodynamische Verhalten der Pulver hatte. Vielmehr wurde durch die laser-

diffraktometrische Analyse deutlich, dass durch die Verwendung von HPMC als Hilfsstoff zwar kleinere Partikel entstehen, die auch adäquat desagglomeriert werden konnten, das aerodynamische Verhalten dieser Partikel ähnelte jedoch denen der anderen Chargen. Demnach muss HPMC zu einer höheren Dichte der Partikel beitragen. Die Lagerung bei unterschiedlichen relativen Luftfeuchten ergab einen negativen Einfluss der Feuchte auf die Feinpartikelfractionen der Pulver mit L-Leucin und Mannitol. Die Pulverchargen ohne Hilfsstoff und mit HPMC zeigten sich dahingehend unempfindlicher. Der Einsatz grober Laktosekristalle führte zu geringerer Pulverablagerung in der Klassierkammer sowie zu höheren absoluten Feinpartikelfractionen und ist daher für den Twincer zu empfehlen.

Die Verwendung der Laserdiffraktometrie zur Beurteilung inhalativ applizierbarer Formulierungen ist kritisch zu betrachten. Zwar können innerhalb kurzer Zeit viele Daten generiert werden, jedoch ist die Diskrepanz zwischen geometrischer und aerodynamischer Teilchengröße unbedingt zu beachten.

4.4 EINFLUSS UNTERSCHIEDLICHER LAGERUNGSBEDINGUNGEN AUF DIE AERODYNAMISCHEN PULVEREIGENSCHAFTEN

Hinsichtlich einer möglichen kommerziellen Nutzung sind nicht nur die Eigenschaften eines Pulvers direkt nach der Herstellung sondern auch nach einer gewissen Lagerungszeit von Interesse. Daher wurden zwei Insulinchargen unter verschiedenen Umgebungsbedingungen gelagert und in regelmäßigen Abständen bezüglich ihrer aerodynamischen Eigenschaften untersucht.

Von besonderem Interesse war hier der Einfluss der Präzipitation, daher unterschieden sich die Insulinchargen nur in diesem Punkt. Die Charge, die im Folgenden als „präzipitiert“ bezeichnet wird, wurde aus 1%iger Insulinlösung (pH 6,75) durch Präzipitation im Mikromischer mit Methanol in einem Nicht-Lösemittel/Lösemittel-Verhältnis von 3+4 und anschließender Sprühtrocknung hergestellt. Eine vergleichbare, nicht präzipitierte Charge entstand unter nahezu identischen Bedingungen. Allerdings wurde hier der pH-Wert der wässrigen Insulinlösung auf pH 7,5 eingestellt, so dass keine Präzipitation stattfand. Die Lagerungsbedingungen wurden an die ICH-Richtlinie für die Stabilitätsuntersuchung neuer Arzneistoffe und Produkte angelehnt (ICH, 2003). Diese empfiehlt für eine Langzeitlagerung die Bedingungen 25°C und 60% rF, sowie für eine beschleunigte Untersuchung 40°C und 75% rF. Die Insulinpulver wurden sowohl in einem offenen Glasgefäß als auch in PVC-Aluminiumblister in die jeweiligen Klimaschränke eingelagert (siehe Kapitel 3.2.1.4). Die Lagerungsdauer betrug maximal 24 Wochen.

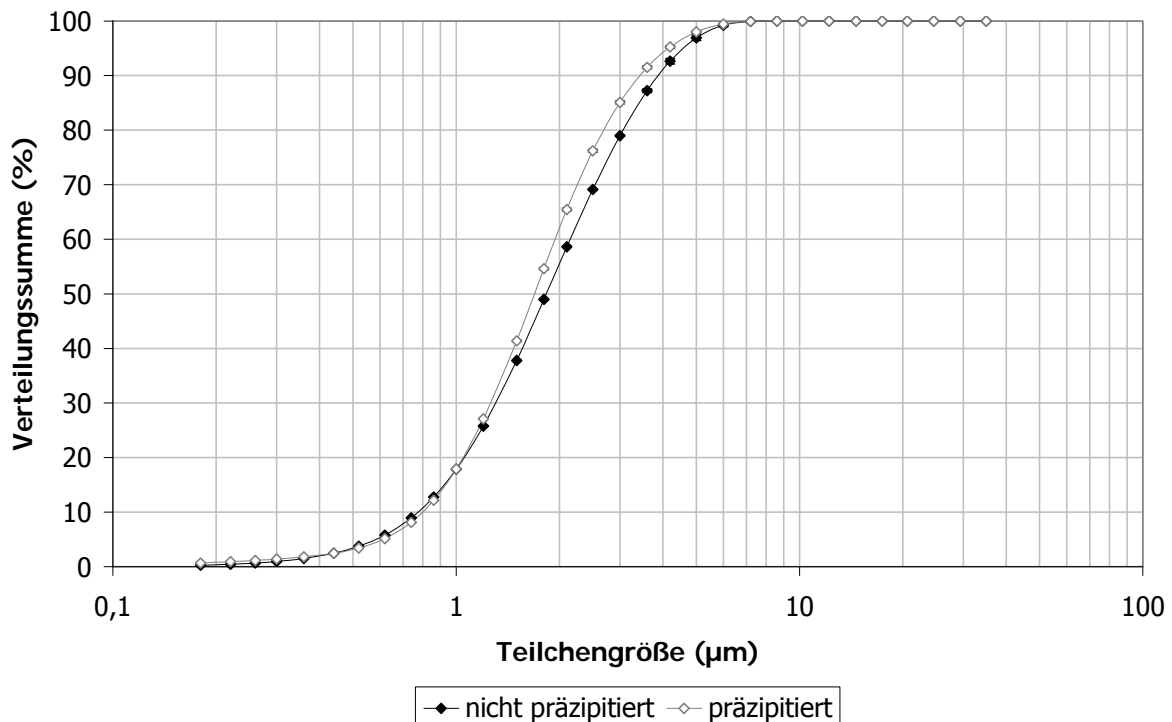


Abbildung 4.64: Teilchengrößenverteilung unterschiedlicher Insulinpulver; Laserdiffraktion Nassdispergierung; $n=3$ Messungen, Fehlerbalken = SD

Die untersuchten Chargen unterschieden sich in ihrer Teilchengröße kaum voneinander. Beide waren zu 98% kleiner als 5 μm und je 18% der Teilchen waren kleiner als 1 μm (Abbildung 4.64). Zwischen 1 und 5 μm kann man eine leichte Verschiebung der präzipitierten Teilchen zu geringeren Teilchengrößen erkennen, was in einem etwas niedrigeren x_{50} von $1,7 \mu\text{m} \pm 0,01 \mu\text{m}$ im Vergleich zur nicht präzipitierten Charge ($1,83 \mu\text{m} \pm 0,01 \mu\text{m}$) führt.

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der beiden Chargen weisen die bereits bekannten Charakteristika auf: gefaltete Strukturen und kollabierte Hohlkugeln bei aus Lösung sprühgetrockneten Partikeln, partikulär zusammengesetzte Strukturen bei aus Suspension sprühgetrockneten Partikeln (Abbildung 4.65).

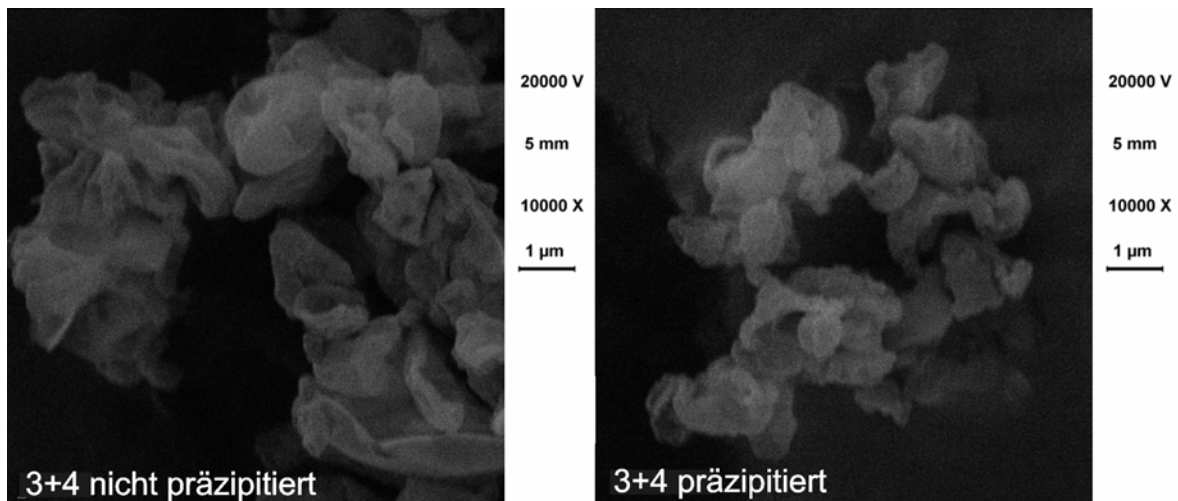


Abbildung 4.65: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen unterschiedlicher Insulinpulver; links: nicht präzipitiert, rechts: präzipitiert; 10000fache Vergrößerung

Vor der Einlagerung wurden beide Pulverchargen hinsichtlich ihres Wasseraufnahmevermögens abhängig von der Umgebungfeuchte mittels dynamischer Wasserdampfsorption untersucht (siehe Kapitel 3.2.2.9). In Abbildung 4.66 ist die Massenänderung der Chargen in Abhängigkeit der Messdauer und entsprechend eingestellter relativer Luftfeuchte dargestellt. Bei Feuchten von 80% bis 90% ist ein deutlicher Unterschied zwischen dem präzipitierten und dem nicht präzipitierten Pulver zu erkennen. Letzteres kann circa 10% mehr Wasser bezogen auf das Eigengewicht aufnehmen.

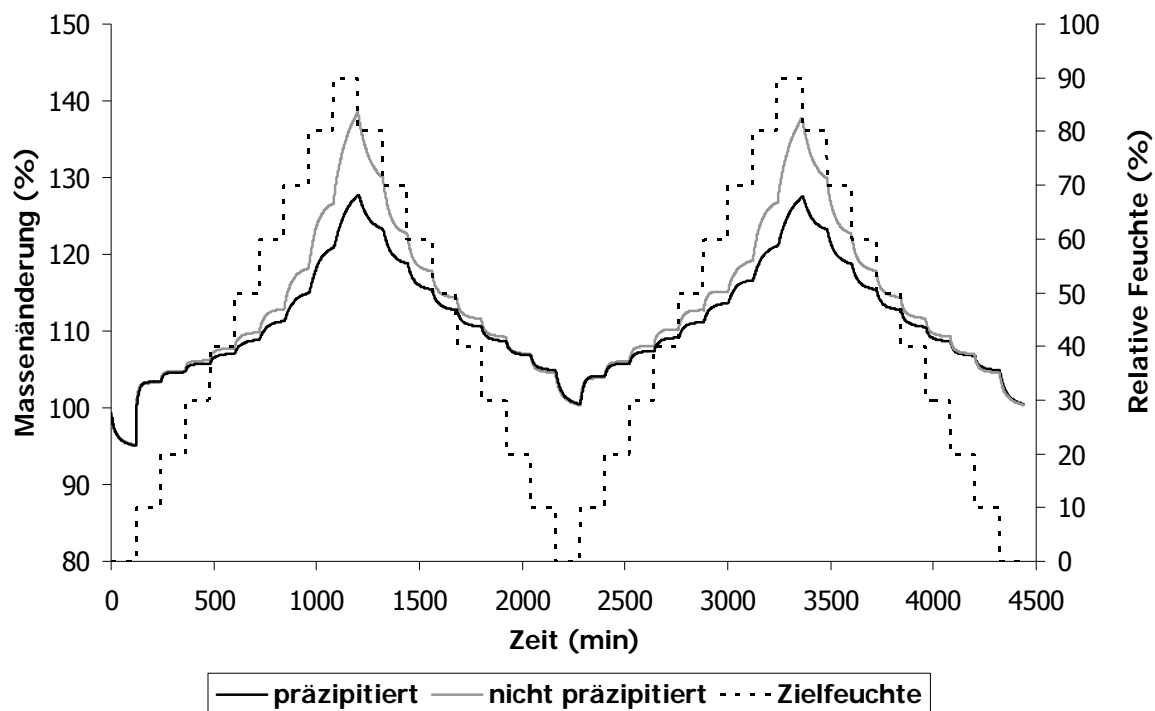


Abbildung 4.66: Massenänderung unterschiedlicher Insulinpulver bei verschiedenen relativen Luftfeuchten (DVS); $n=1$

Eine Erklärung für die höhere Wasseraufnahme liefert die Struktur der sprühgetrockneten Teilchen. Das Pulver aus dem Präzipitat besitzt eine wahre Dichte von $1,58 \text{ g/cm}^3 \pm 0,032 \text{ g/cm}^3$ und somit kompaktere Partikel als das aus Lösung sprühgetrocknete Insulin mit einer Dichte von $1,45 \text{ g/cm}^3 \pm 0,022 \text{ g/cm}^3$. Die poröseren Partikel der nicht präzipitierten Charge können über Kapillarkräfte mehr Wasser binden als die Partikel, die aus präzipitierten Nanoteilchen zusammengesetzt sind.

Mit beiden Pulverchargen sowie der Ausgangsware wurde eine Röntgenanalyse durchgeführt, um eine Vorstellung der Kristallinität zu erhalten. Die entsprechenden Versuchsergebnisse sind in Abbildung 4.67 dargestellt. Man kann für alle Chargen einen breiten Reflex bei 4 nm^{-1} erkennen (siehe Pfeil). Dieser wird durch den Probenhalter erzeugt und

ist somit ein Artefakt. Die Ausgangsware zeigt schwach ausgeprägte Reflexe und weist daher zumindest eine Teilkristallinität auf. Die aus Lösung und Suspension in einem Methanol-Wasser-Gemisch sprühgetrockneten Pulver zeigen jedoch keinerlei Reflexe, woraus geschlossen werden kann, dass rein amorphe Produkte entstanden sind. Dies ist von Vorteil, weil der amorphe gegenüber dem kristallinen Zustand die höhere chemische Stabilität besitzt (siehe Kapitel 2.3.1).

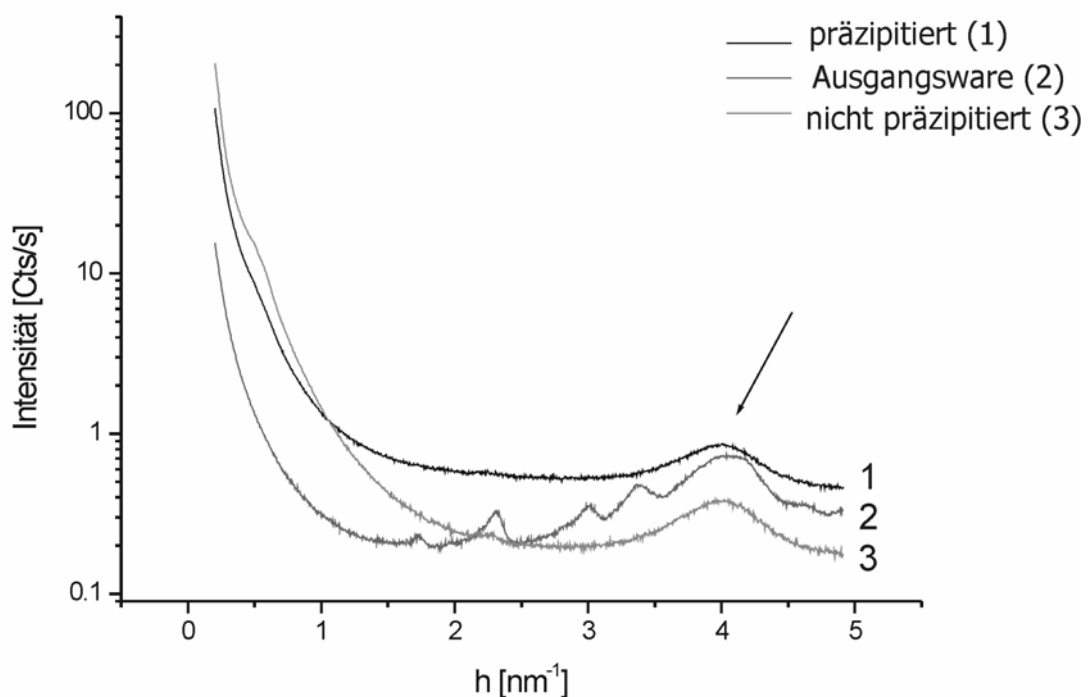


Abbildung 4.67: Kleinwinkelröntgenanalyse unterschiedlicher Insulinpulver; $n=1$

4.4.1 OFFENE LAGERUNG

Das offen gelagerte Pulver wurde maximal zwei Stunden vor der Impaktion in einer Dosis von 1 mg in HPMC-Kapseln gefüllt. Zusätzlich zur Untersuchung der aerodynamischen Eigenschaften wurde die Restfeuchte der Pulver mittels Thermogravimetrie bestimmt (Abbildung 4.68).

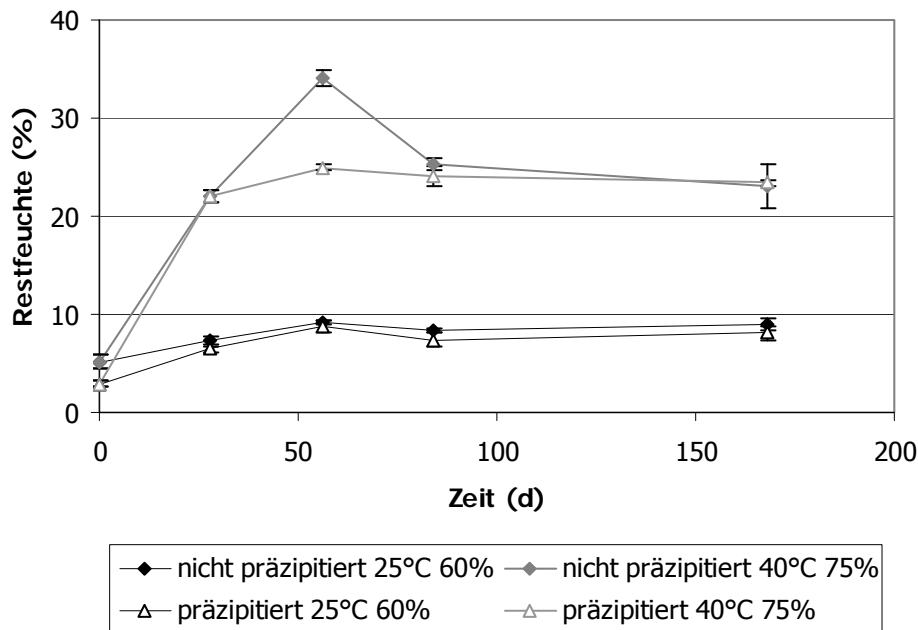


Abbildung 4.68: Restfeuchte unterschiedlicher Insulinpulver nach offener Lagerung im Klimaschrank; $n=3$ Messungen, Fehlerbalken = SD

Bezüglich der Restfeuchte der Pulver lassen sich kaum Unterschiede zwischen den Chargen erkennen. Nach Lagerung bei 25°C und 60% rF erreichten beide Chargen eine Restfeuchte von circa 9%. Direkt nach der Herstellung betrug diese noch 4% bis 5%, es fand demnach nur eine geringe Feuchtigkeitsaufnahme des Pulvers statt. Nach Lagerung bei 40°C und 75% rF wurden durchschnittlich 24% Restfeuchte ermittelt. Hier schwankten die Werte teilweise sehr stark, was auf eine ungleichmäßige Durchfeuchtung des Pulvers schließen lässt. Während an die oberen Schichten bereits viel Wasser adsorbiert wird, kommen die tiefer liegenden Pulverareale nicht so stark mit der feuchten Luft in Kontakt. Diesem Effekt wurde durch ein Gefäß mit großer Bodenfläche zur großflächigen Ausbreitung des Pulvers und durch Durchmischung während der Probenzüge vorgebeugt, allerdings kam es trotz allem zu Schwankungen. Die nach 56 Tagen für die nicht präzipitierte Charge

gemessene Restfeuchte von 34% kann als Ausreißer betrachtet werden. Dieser ist vermutlich durch mangelhafte Durchmischung vor der Probenahme entstanden. Eine bevorzugte Wasseranlagerung an die nicht präzipitierte Charge, wie es die DVS-Untersuchungen vermuten ließen, konnte nicht beobachtet werden. Ein Vergleich der verwendeten Messverfahren ist jedoch kritisch zu betrachten, da es sich bei der DVS-Messung um eine viel empfindlichere Untersuchung handelt und die Lagerung mit manuellem Probenzug stärker fehlerbelastet ist.

Da die Lagerung bei 25°C und 60% rF nur eine geringe Feuchtezunahme hervorrief, wird auch bezüglich der aerodynamischen Eigenschaften nur ein geringer Lagerungseinfluss erwartet.

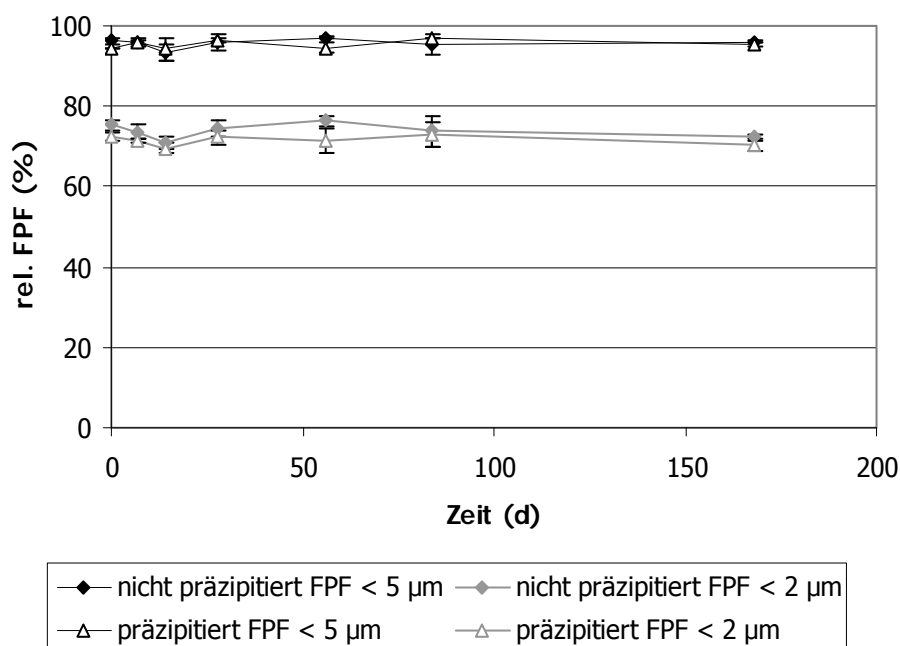


Abbildung 4.69: Relative Feinpartikelfractionen unterschiedlicher Insulinpulver nach offener Lagerung im Klimaschrank bei 25°C und 60% rF; n=3 Messungen, Fehlerbalken = SD

Betrachtet man die relativen Feinpartikelfractionen der beiden Pulverchargen über eine Zeit von 24 Wochen (Abbildung 4.69), so

bestätigt sich diese Annahme. Zwar sind leichte messbedingte Schwankungen zu erkennen, jedoch änderten sich innerhalb des untersuchten Zeitraumes die relativen Feinpartikelfractionen unter 5 μm und unter 2 μm nicht signifikant.

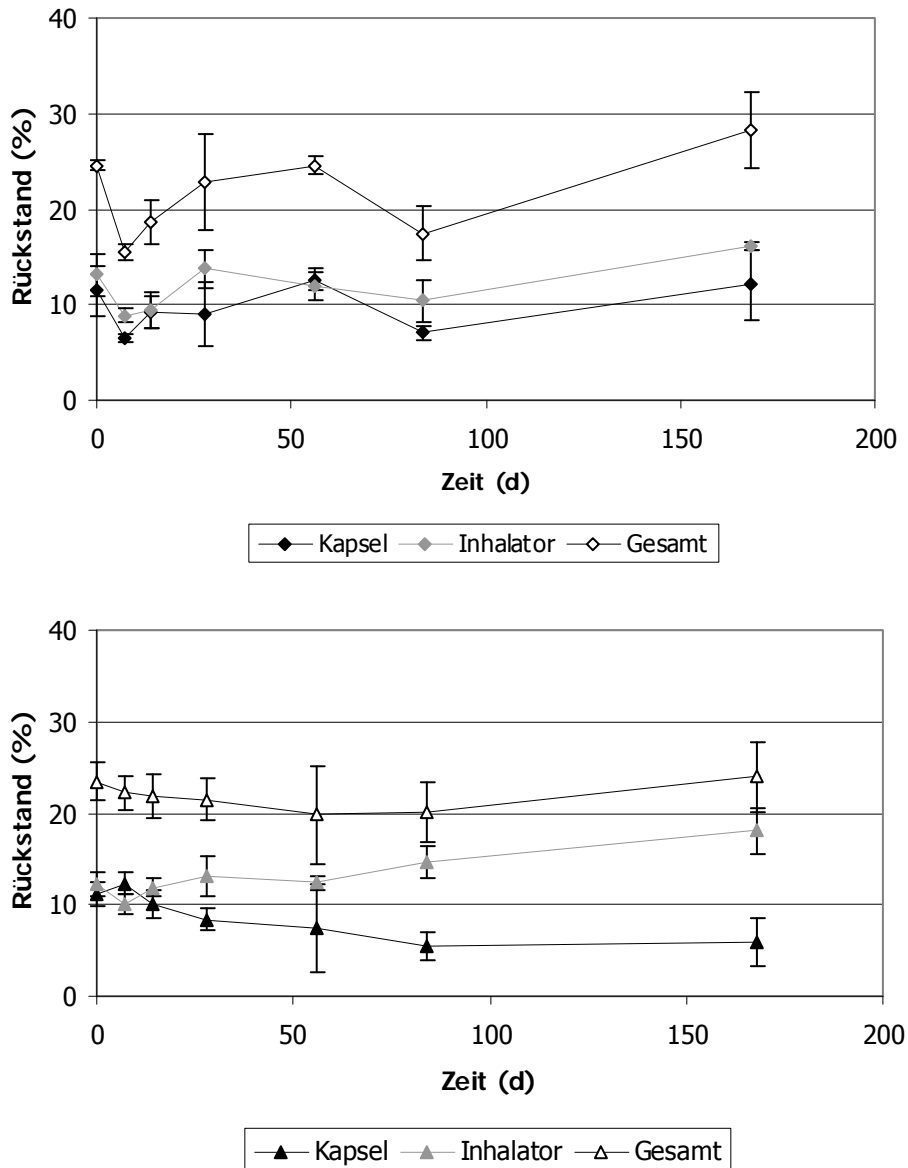


Abbildung 4.70: Rückstände nach der Impaktor-Analyse nach offener Lagerung im Klimaschrank bei 25°C und 60% rF, oben: nicht präzipitiert, unten: präzipitiert; n=3 Messungen, Fehlerbalken = SD

Auch auf die Rückstände in Kapsel und Inhalator nach der Inhalation hatte die beschriebene Lagerung keinen Einfluss. In Abbildung 4.70 sind zur besseren Vergleichbarkeit die Gesamtrückstände als Summe der Kapsel- und Inhalatorrückstände dargestellt, die für beide Chargen zwischen 20% und 25% schwankten.

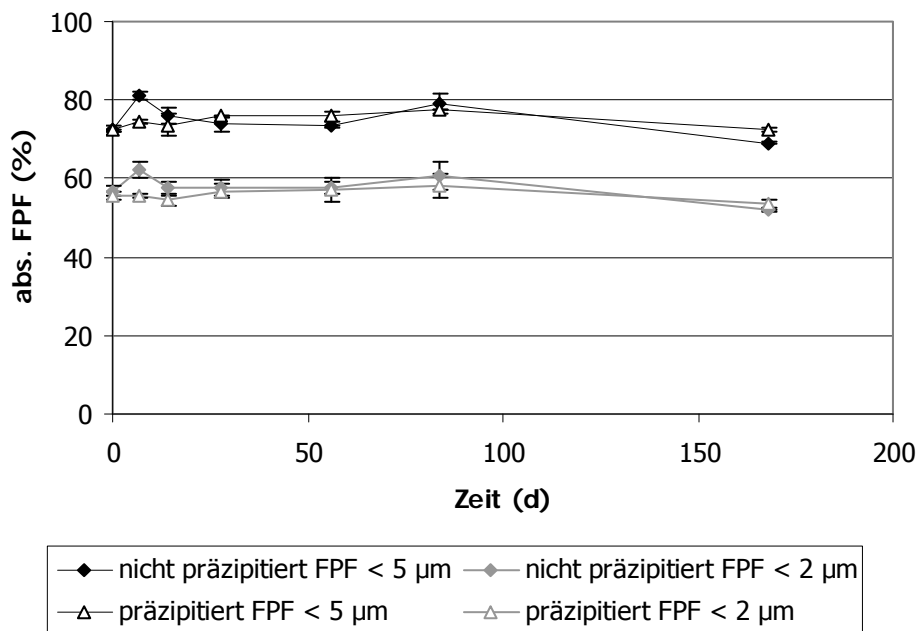


Abbildung 4.71: Absolute Feinpartikelfractionen unterschiedlicher Insulinpulver nach offener Lagerung im Klimaschrank bei 25°C und 60% rF; n=3 Messungen, Fehlerbalken = SD

Aus Abbildung 4.71 kann man den Einfluss der Rückstände auf die absoluten Feinpartikelfractionen erkennen. Messbedingt kam es für die nicht präzipitierte Charge bei der Untersuchung nach 168 Tagen zu einem im Vergleich zur vorangegangenen Untersuchung um circa 10% erhöhten Gesamtrückstand. Dies schlägt sich direkt in einer um circa 9% verringerten absoluten Feinpartikelfraktion nieder.

Die Eigenschaften der Teilchen verändern sich erwartungsgemäß mit steigendem Feuchtegehalt. Bereits nach einer Woche offener Lagerung bei 40°C und 75% rF fallen die relativen Feinpartikelfraktionen deutlich ab (Abbildung 4.72).

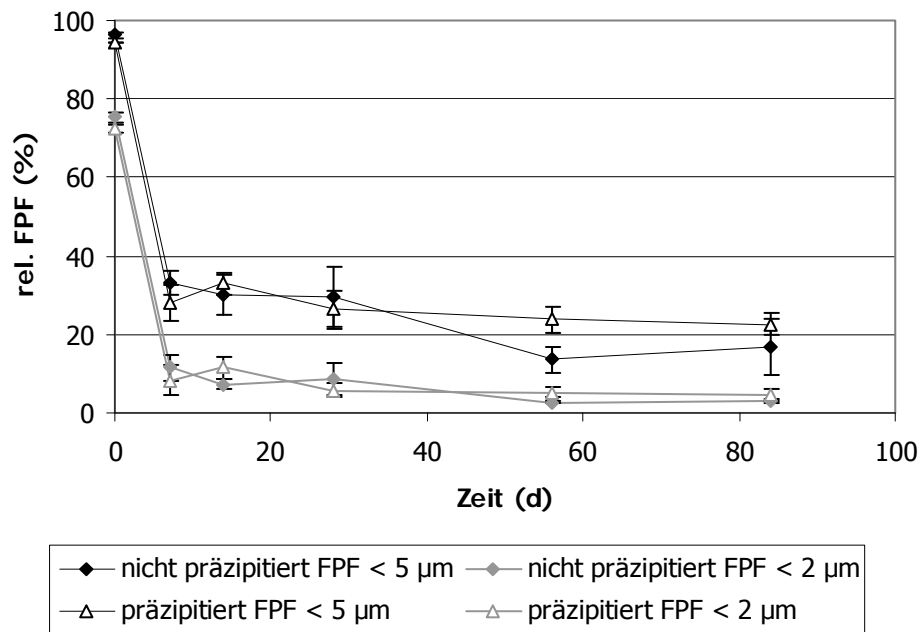


Abbildung 4.72: Relative Feinpartikelfraktionen unterschiedlicher Insulinpulver nach offener Lagerung im Klimaschrank bei 40°C und 75% rF; $n=3$ Messungen, Fehlerbalken = SD

Nur noch circa 30% der Teilchen, die in den Impaktor gelangen, sind aerodynamisch betrachtet kleiner als 5 µm und 10% sind kleiner als 2 µm. Im Laufe der Lagerungsdauer von 12 Wochen sinken die relativen Feinpartikelfraktionen weiter auf 20% (rel. FPF < 5 µm) und 5% (rel. FPF < 2 µm). Aufgrund der großen Schwankungen sind keine Unterschiede zwischen den beiden getesteten Chargen zu erkennen. Bei der Lagerung unter diesen extremen Bedingungen scheinen sich die Partikeleigenschaften stark zu verändern. Durch den hohen Feuchtegehalt steigt die Kohäsion der Teilchen, da die durch die

Flüssigkeit induzierten Kapillarkräfte weit stärker sind als die im trockenen Pulver vorkommenden Kohäsionskräfte. Bei Betrachtung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der Partikel nach einer zwölfwöchigen offenen Lagerung bei 40°C und 75% rF (Abbildung 4.73) wird deutlich, dass es auch zu einem Partikelwachstum kommt. Im Gegensatz zu den Partikeln vor der Lagerung sind deutliche Veränderungen zu erkennen. Die Oberfläche der Teilchen ist durch Wasseranlagerungen angelöst worden. Durch partielles Verdunsten des Wassers kommt es zu Umlösevorgängen und dadurch zur Entstehung neuer Feststoffbrücken. Diese geben den Partikeln auf den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen den Anschein, als seien sie verschmolzen. Die bestehenden Agglomerate werden so verfestigt und vergrößern sich. Die nanopartikulären Strukturen sind nicht mehr zu erkennen. Bei einer aerodynamischen Analyse werden somit größere Partikel und entsprechend geringere Feinpartikelfraktionen gemessen.

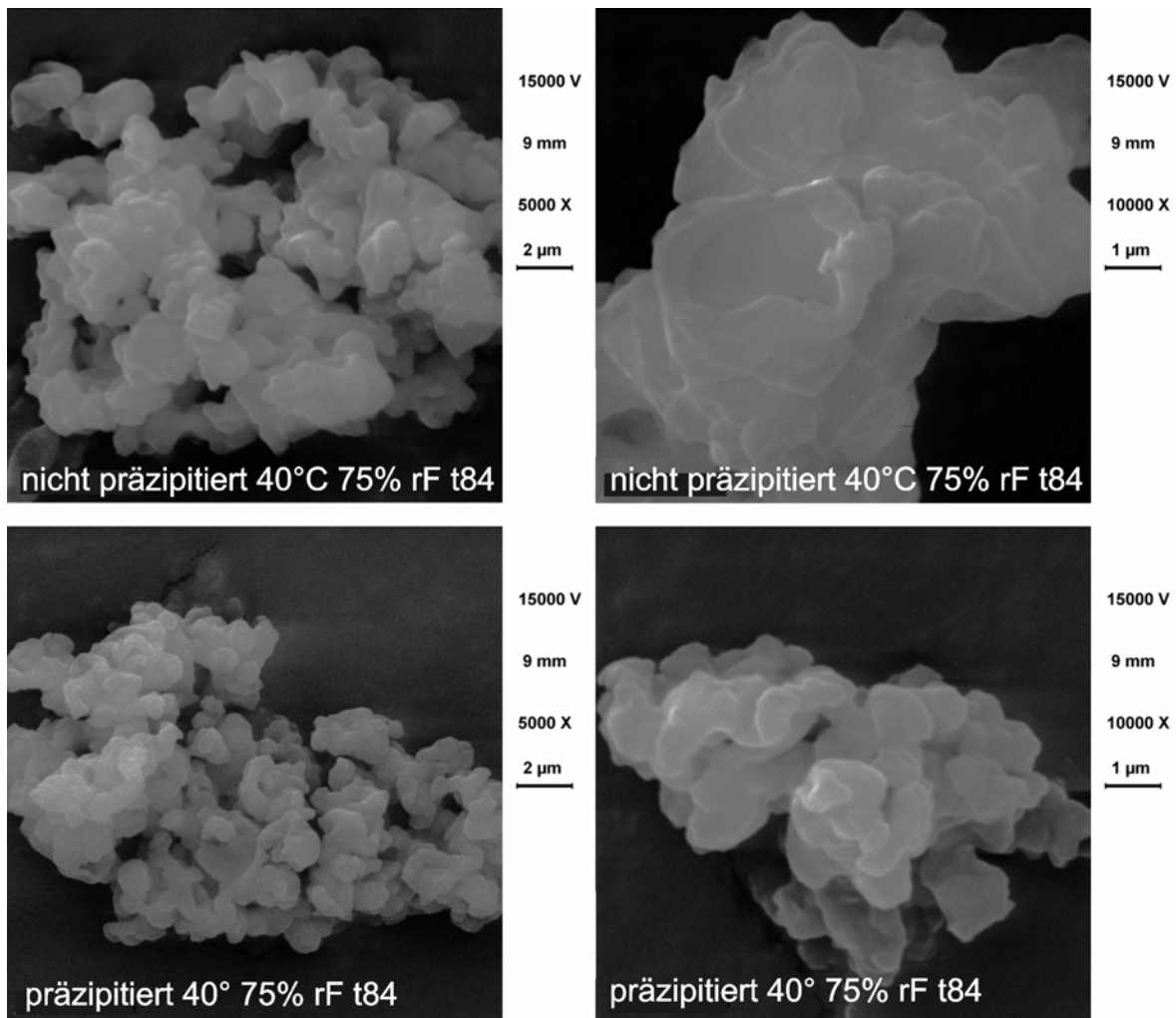


Abbildung 4.73: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen nach offener Lagerung bei 40°C und 75% rF; oben: nicht präzipitiert, unten: präzipitiert; links: 5000fache Vergrößerung, rechts: 10000fache Vergrößerung

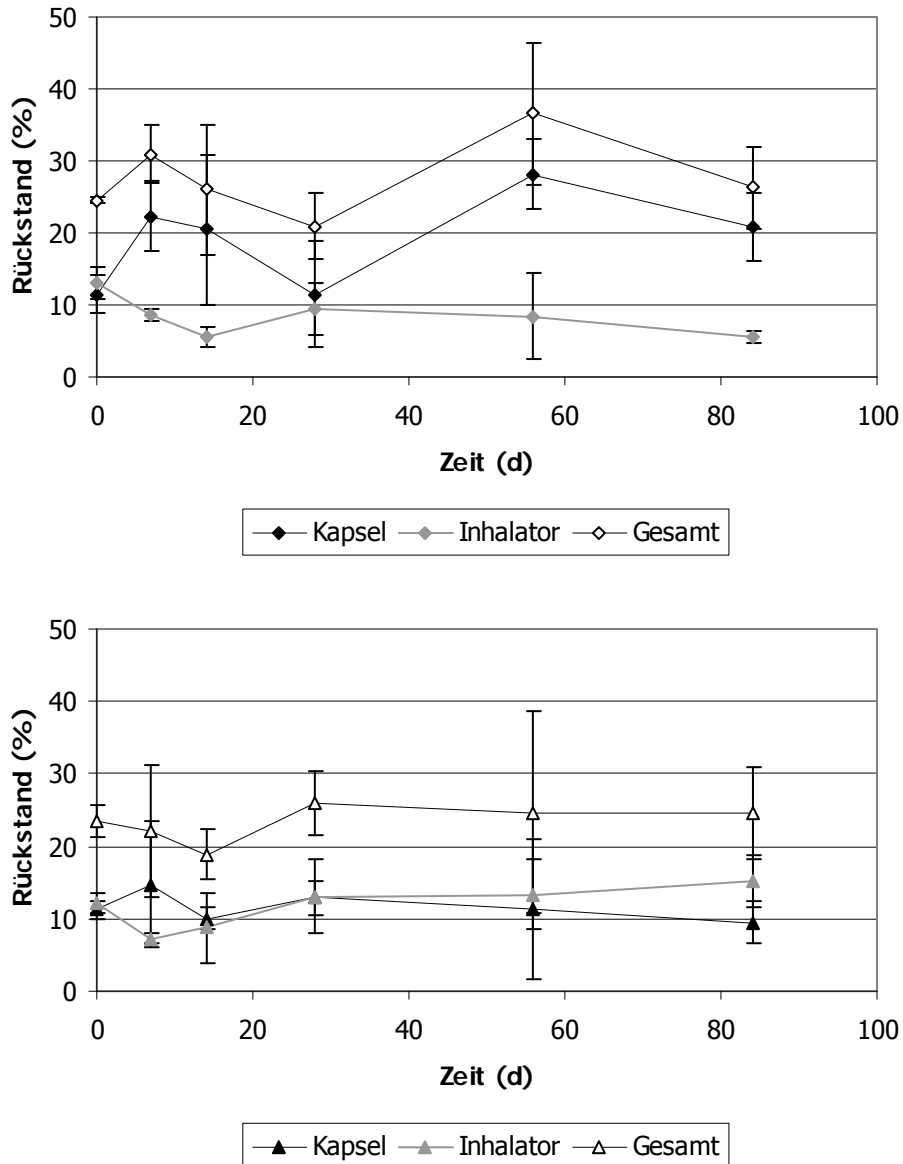


Abbildung 4.74: Rückstände nach der Impaktor-Analyse nach offener Lagerung im Klimaschrank bei 40°C und 75% rF, oben: nicht präzipitiert, unten: präzipitiert; n=3 Messungen, Fehlerbalken = SD

Für die Rückstände in Kapsel und Inhalator sind keine Änderungen erkennbar (Abbildung 4.74). Der Gesamtrückstand steigt zwar bis auf 35% für die nicht präzipitierte Charge, jedoch mit sehr hoher Standardabweichung, die auf das ungleichmäßig durchfeuchtete Pulver zurückzuführen sein kann. Nach 12 Wochen Lagerung unterscheidet sich

der Gesamtrückstand nicht signifikant von dem vor der Lagerung ermittelten Rückstand. Da weder über die Dauer der Lagerung noch zwischen den Chargen ein signifikanter Einfluss auf die Rückstände ermittelt werden konnte, unterscheiden sich auch die absoluten Feinpartikelfractionen nur hinsichtlich der Kurvenlage von den relativen Feinpartikelfractionen (Abbildung 4.75).

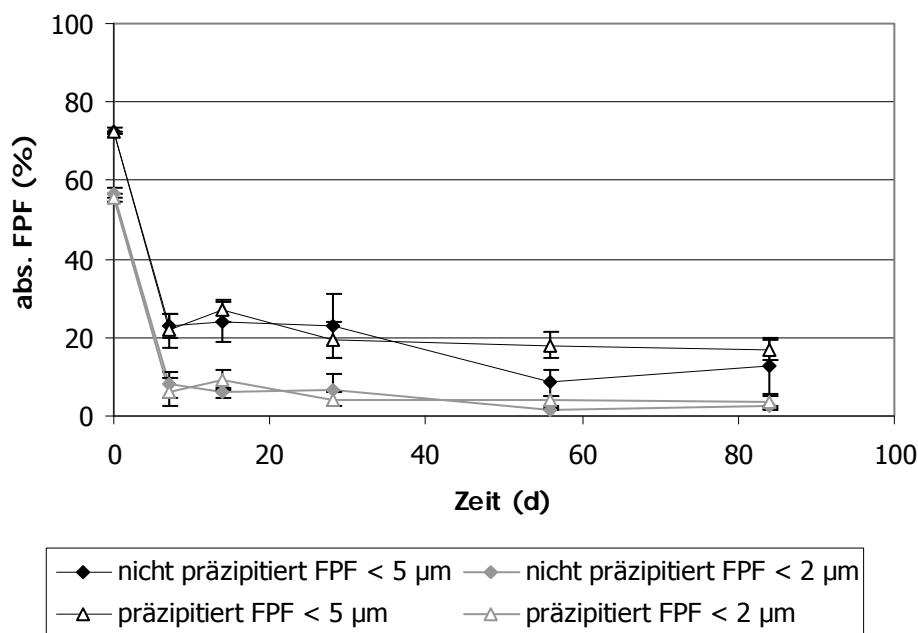


Abbildung 4.75: Absolute Feinpartikelfractionen unterschiedlicher Insulinpulver nach offener Lagerung im Klimaschrank bei 40°C und 75% rF; n=3 Messungen, Fehlerbalken = SD

4.4.2 DIFFERENZIERUNG DER PULVER MITTELS LASERDIFFRAKTION

Zur Beurteilung, bei welcher Umgebungsfeuchte ein negativer Einfluss auf die aerodynamischen Eigenschaften der Insulinpulver zu beobachten ist, wurden diese über zwei Wochen offen in unterschiedlichen Exsikkatoren gelagert (23%, 53% und 85% rF). Anschließend wurden die Pulver in Kapseln abgefüllt und in Kombination mit dem Cyclohaler im Inhaler-Modul laserdiffraktometrisch vermessen. Es wurden je zwei

Pulverchargen pro Herstellungsart (präzipitiert und nicht präzipitiert) produziert und diese dreifach vermessen, so dass je sechs Messwerte zur Beurteilung herangezogen werden konnten.

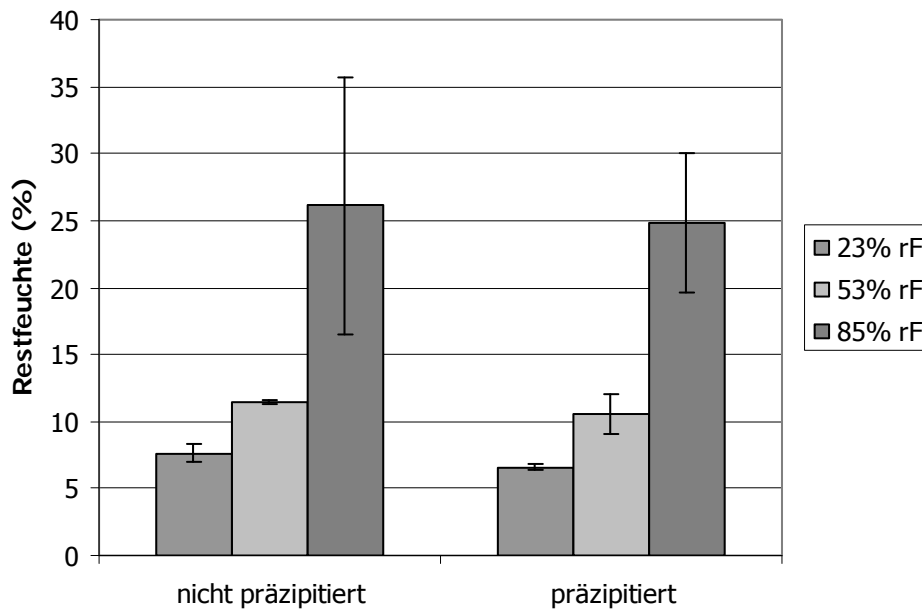


Abbildung 4.76: Restfeuchte unterschiedlicher Insulinpulver nach zweiwöchiger Lagerung bei verschiedenen relativen Luftfeuchten, $n=2$ Chargen, je 3 Messungen, Fehlerbalken = SD

Vor der laserdiffraktometrischen Analyse wurden die jeweiligen Restfeuchten der unterschiedlich gelagerten Pulver bestimmt (Abbildung 4.76). Hier zeigen sich den DVS-Untersuchungen (Abbildung 4.66) ähnliche Ergebnisse. Die Feuchtigkeitsaufnahme der Pulver steigt zwischen 23% und 53% relativer Lagerungsfeuchte nur gering an, während sich die Restfeuchte der Pulver von 53% auf 85% relativer Lagerungsfeuchte mehr als verdoppelt. Die großen Standardabweichungen der Restfeuchten der bei 85% rF gelagerten Pulver sprechen für eine ungleichmäßige Durchfeuchtung.

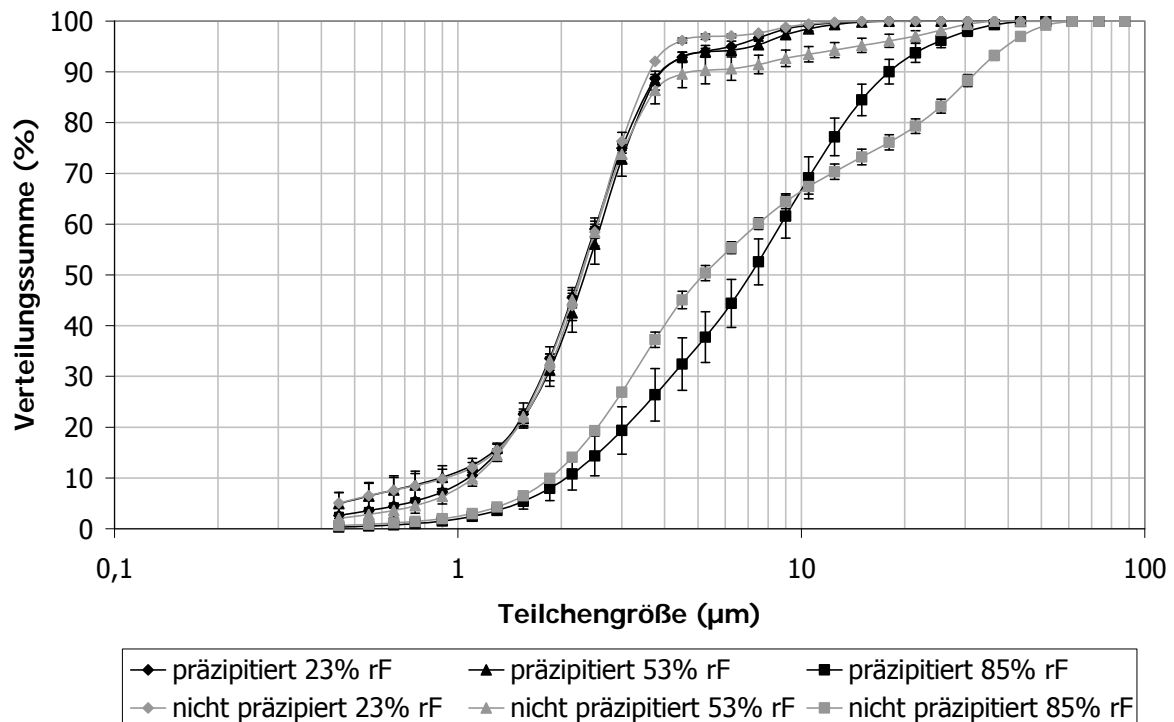


Abbildung 4.77: Teilchengrößenverteilung unterschiedlicher Insulinpulver nach zweiwöchiger Lagerung bei verschiedenen relativen Luftfeuchten; Laserdiffraktion Inhaler-Modul; $n=2$ Chargen, je 3 Messungen, Fehlerbalken = SD

Diese Ergebnisse spiegeln sich auch in den laserdiffraktometrisch ermittelten Teilchengrößenverteilungen wider (Abbildung 4.77). Bei einer Lagerungsfeuchte von 85% waren deutlich größere Partikel detektierbar, als bei niedrigeren Feuchten. Die unterschiedlichen Chargen unterschieden sich bei Lagerungsfeuchten von 23% und 53% bis $3,5 \mu\text{m}$ kaum voneinander. Oberhalb dieser Teilchengröße zeigte sich eine höhere Feuchteempfindlichkeit der nicht präzipitierten Charge, die bei einer Feuchte von 53% deutlich mehr Partikel zwischen 4 und $20 \mu\text{m}$ besaß, als bei einer Lagerungsfeuchte von 23%. Bei der präzipitierten Charge zeigten sich keine Unterschiede im unteren Feuchtebereich. Dies deckt sich mit Ergebnissen aus der Literatur, die besagen, dass unter

einer Lagerungsfeuchte von 50% rF die Restfeuchte in Proteinpulvern keinen Einfluss auf die aerodynamischen Eigenschaften des Pulvers hat (Maa und Nguyen, 1998) und somit einen Vorteil für durch Präzipitation hergestellte Produkte darstellt.

4.4.3 LAGERUNG IM BLISTER

Um die Verwendung eines Fertigproduktes zu simulieren, wurden mit Pulver befüllte Kapseln verblistert und die Blister eingelagert. Der direkte Kontakt des Pulvers mit der feuchten Außenluft wurde somit vermieden. Dabei wurde ein abgeschwächter Effekt auf die aerodynamischen Eigenschaften erwartet, bei dem eventuell zwischen den Chargen differenziert werden kann, da es sich hier nicht mehr um die zuvor getesteten Extrembedingungen handelt, bei denen keine Unterschiede in den Feinpartikelfraktionen zu erkennen waren. Um bei dieser Lagerungsart den ungünstigsten Fall vorzugeben, wurde eine PVC-Folie ohne zusätzliche Beschichtung mit niedriger Barrierefunktion gegenüber Wasserdampf ($3,1 \text{ g}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ bei 38°C und 90% rF) gewählt. Die Deckfolie bestand aus Aluminium.

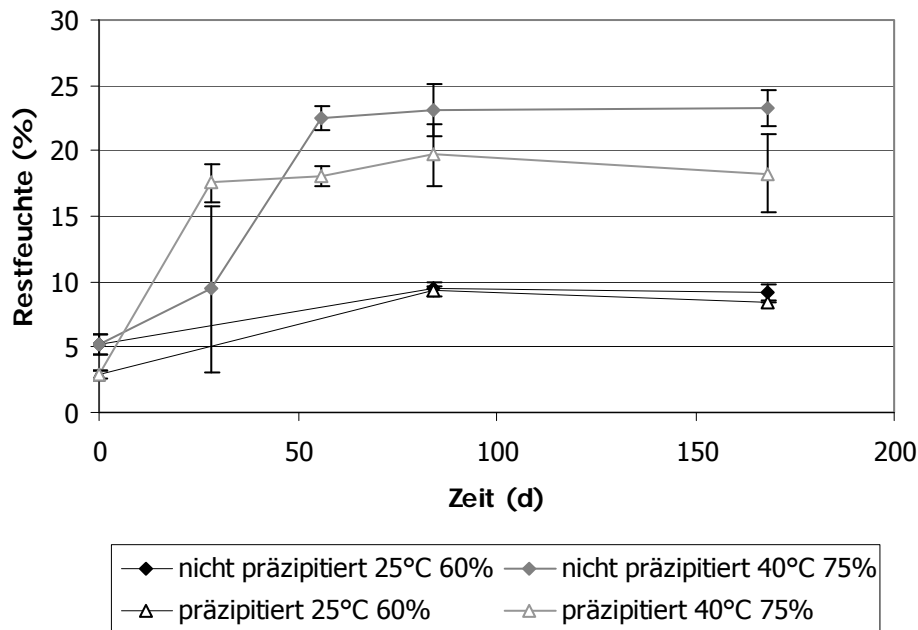


Abbildung 4.78: Restfeuchte unterschiedlicher Insulinpulver nach Lagerung im PVC-Aluminiumblister im Klimaschrank; $n=3$ Messungen, Fehlerbalken = SD

Ein Effekt der Verblisterung kann bei Betrachtung der Restfeuchte bei unterschiedlicher Lagerungsdauer registriert werden (Abbildung 4.78). Bei Lagerungsbedingungen von 25°C und 60% rF steigt die Restfeuchte der Insulinpulver im Blister auf circa 9% an, dies ist äquivalent zur offenen Lagerung bei gleichen Bedingungen. In der 40°C/75%-Umgebung erreichen die Pulver jedoch eine maximale Restfeuchte von 23%. Der Anstieg auf diese Feuchte dauert im Vergleich zur offenen Lagerung deutlich länger. Die Feuchte des präzipitierten Pulvers beläuft sich nur auf maximal 20% und liegt weitgehend unter der des nicht präzipitierten Pulvers.

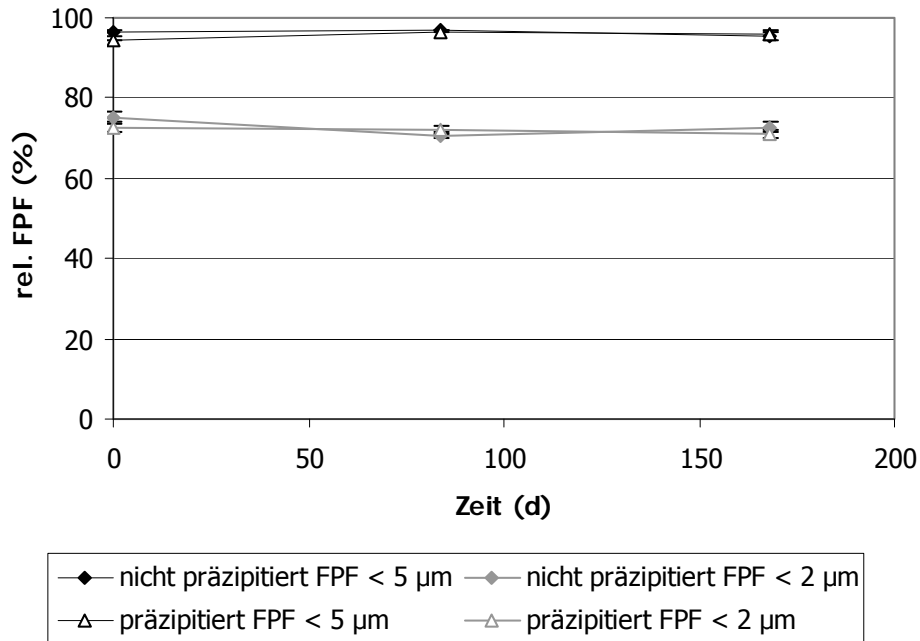


Abbildung 4.79: Relative Feinpartikelfractionen unterschiedlicher Insulinpulver nach Lagerung im PVC-Aluminiumblister im Klimaschrank bei 25°C und 60% rF; n=3 Messungen, Fehlerbalken = SD

Da von vornherein erwartet wurde, dass die Lagerung bei 25°C und 60% rF kaum Einfluss auf die aerodynamischen Eigenschaften der Pulver hat, wurden im Fall der Einlagerung im Blister weniger Messpunkte festgelegt. Anhand der relativen Feinpartikelfractionen (Abbildung 4.79) ist zu erkennen, dass die Vermutung zutrifft. Weder auf die Feinpartikelfraction unter 5 µm noch unter 2 µm zeigte die Lagerung einen sichtbaren Effekt.

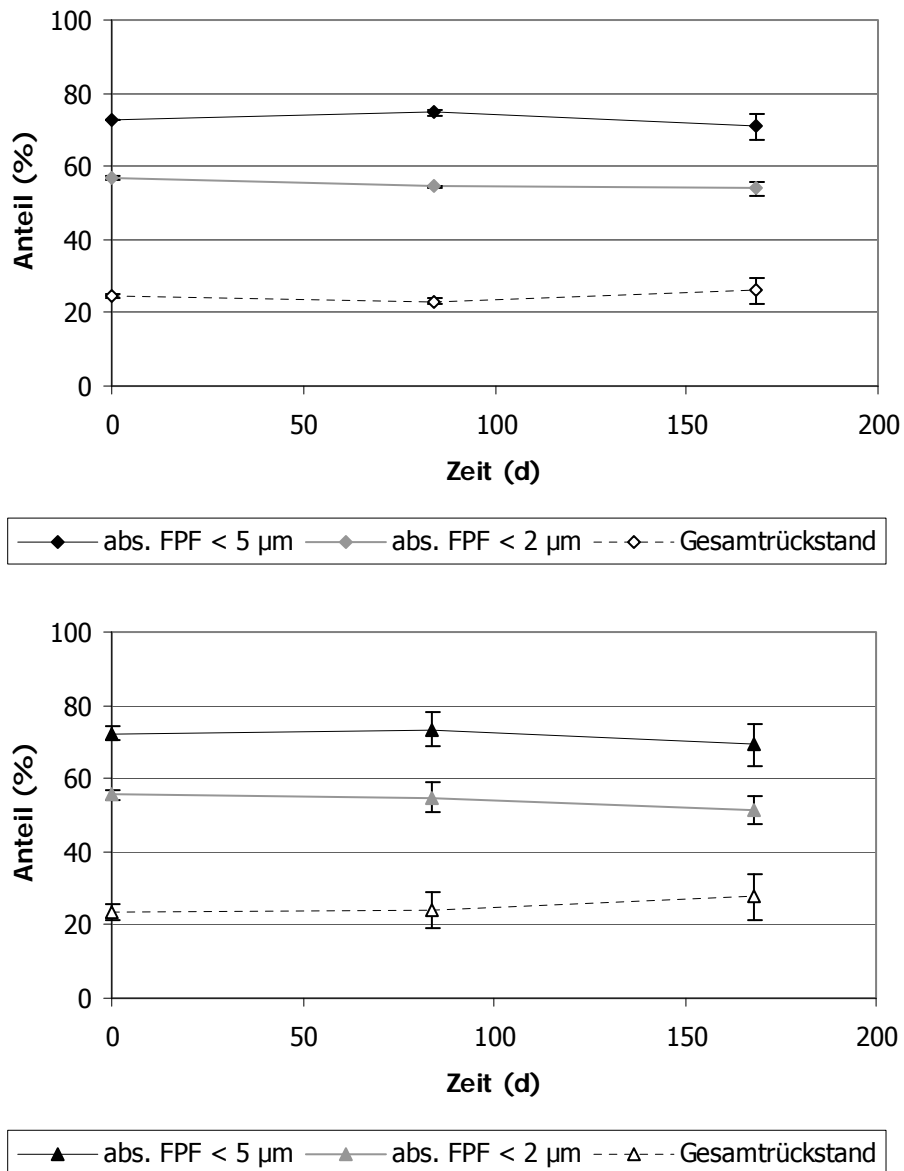


Abbildung 4.80: Absolute Feinpartikelfraktionen und Gesamtrückstände nach der Impaktor-Analyse unterschiedlicher Insulinpulver, oben: nicht präzipitiert, unten: präzipitiert; Lagerung im PVC-Aluminiumblister im Klimaschrank bei 25°C und 60% rF; n=3 Messungen, Fehlerbalken = SD

Ebenso wenig wurde der Rückstand in Kapsel und Inhalator von der Lagerungsdauer unter diesen Bedingungen beeinflusst, weshalb sich auch die absoluten Feinpartikelfraktionen über die Zeit nicht signifikant änderten (Abbildung 4.80).

Erfolgte die Lagerung allerdings bei 40°C und 75% rF, so konnten bereits nach 4 Wochen sehr deutliche Effekte ermittelt werden, die für ein Fertigarzneimittel nicht akzeptabel wären. Daher wurden für beide Pulverchargen zusätzlich befüllte Kapseln in Aluminium-Aluminiumblistern bei 40°C und 75% rF über 2 Wochen gelagert. Aluminiumfolie bietet eine 100%ige Wasserdampfbarriere (Lind, 2004). Die einzige Schwachstelle ist dabei die Verbindungsnaht. Bei Verwendung dieses Vollaluminiumblisters wird eine Abschwächung, wenn nicht sogar Aufhebung des Umgebungseinflusses erwartet.

Die relativen Feinpartikelfraktionen beider Chargen sinken bereits nach vierwöchiger Lagerung im PVC-Aluminiumblister stark ab (Abbildung 4.81). Jedoch ist dieser Effekt nicht so stark ausgeprägt wie bei offener Lagerung. Die nicht präzipitierte Charge zeigt dabei größere Schwankungen über die Zeit, während die präzipitierte Charge nach 4 Wochen auf einen Wert abfällt, der in der folgenden Zeit konstant bleibt.

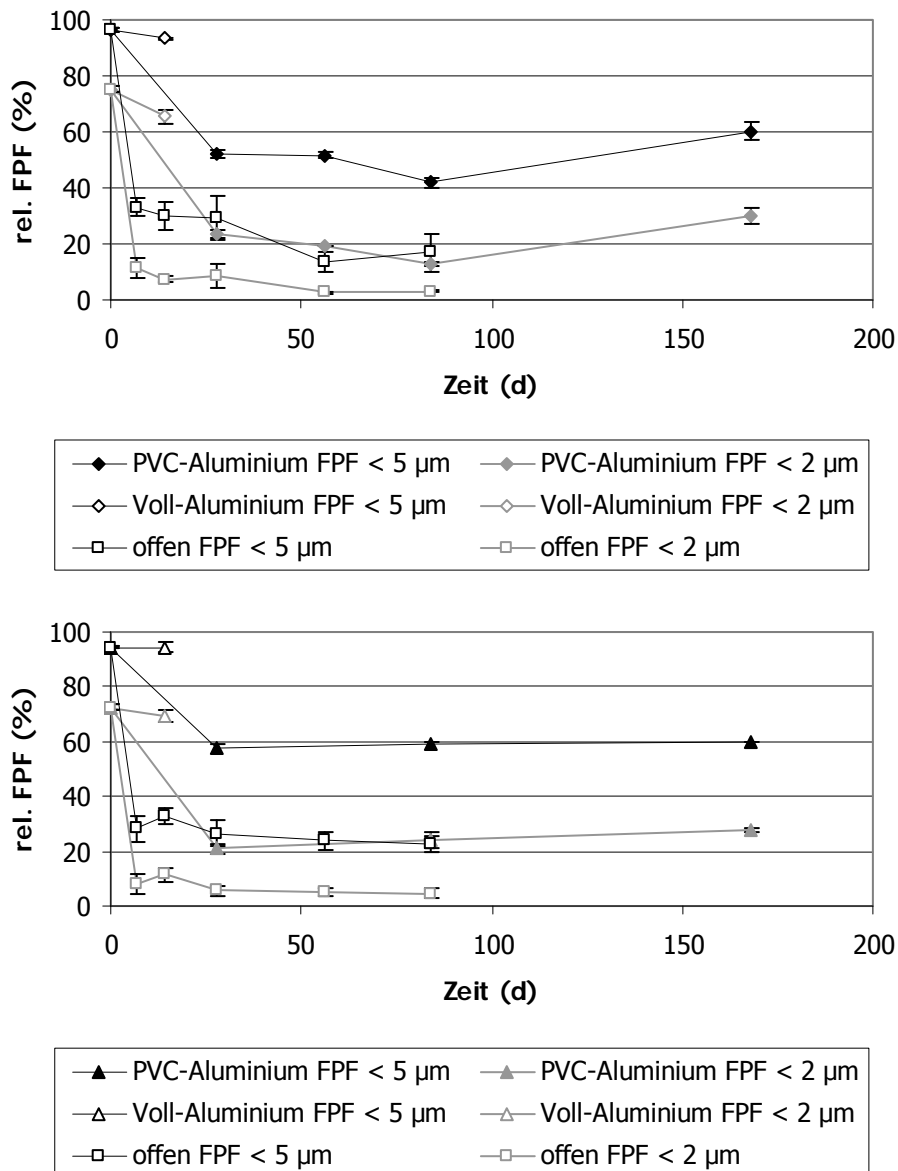


Abbildung 4.81: Relative Feinpartikelfraktionen unterschiedlicher Insulinpulver, oben: nicht präzipitiert, unten: präzipitiert; Lagerung bei 40°C und 75% rF; n=3 Messungen, Fehlerbalken = SD

Auch die Rückstände in Kapsel und Inhalator nach der Impaktor-Analyse sind für die Charge der aus Lösung sprühgetrockneten Partikel unregelmäßiger und im Gesamtausmaß circa 10% höher als die der präzipitierten Charge (Abbildung 4.82). Auch dieses Ergebnis deutet

darauf hin, dass die nicht präzipitierte Charge stärker von den Umgebungsbedingungen beeinflusst wird.

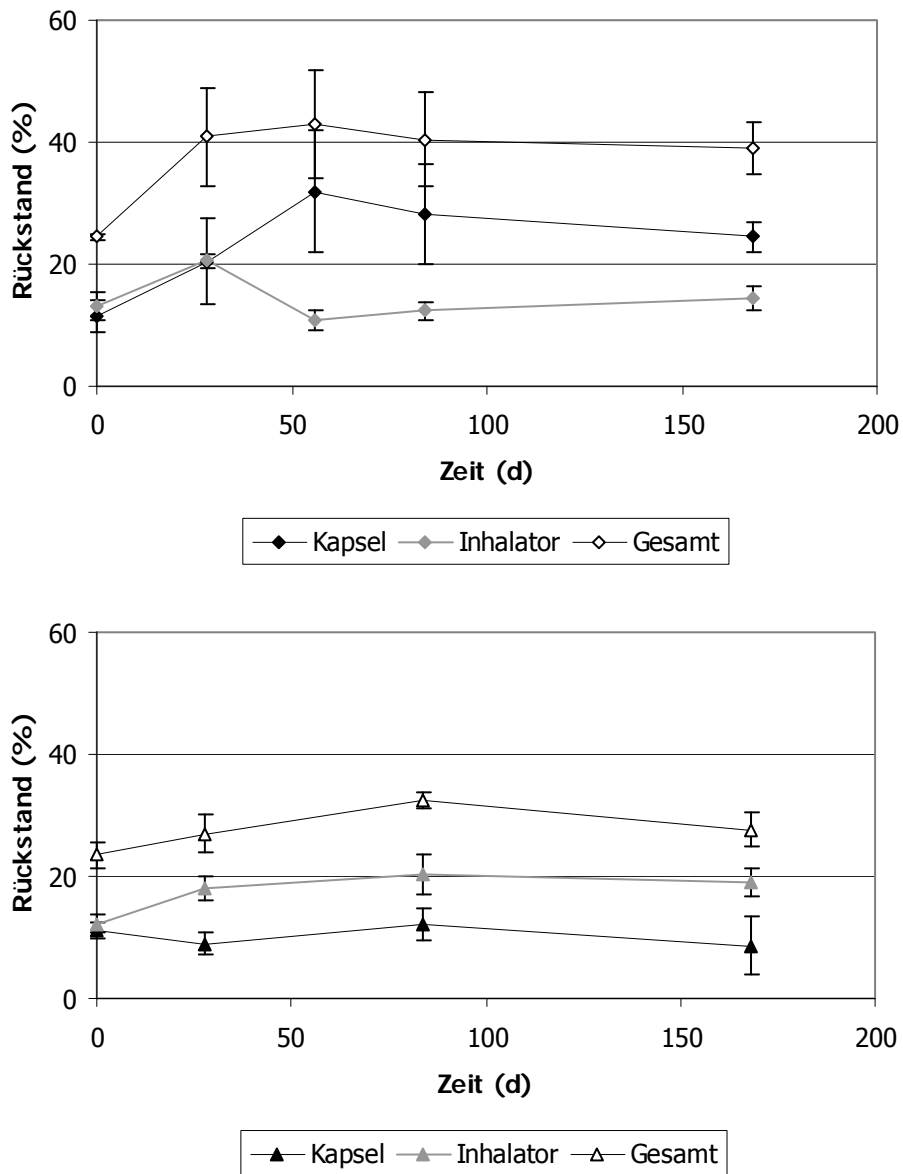


Abbildung 4.82: Rückstände unterschiedlicher Insulinpulver nach der Impaktor-Analyse in Kapsel und Inhalator, oben: nicht präzipitiert, unten: präzipitiert; Lagerung im PVC-Aluminiumblister bei 40°C und 75% rF; n=3 Messungen, Fehlerbalken = SD

Durch die mithilfe von Barrieren verminderte Belastung der Pulver mit Feuchtigkeit scheint es möglich zu sein, die beiden Chargen zu

differenzieren. Das aus Lösung sprühgetrocknete Pulver reagiert empfindlicher auf die Umgebungsbedingungen. Durch seine porösere Struktur kommen mehr Insulinmoleküle an der Partikeloberfläche in Kontakt mit adsorbiertem Wasser und können in Lösung gehen. Die angelösten Partikel haften untereinander mithilfe von Kapillarkräften aneinander und an der Kapselwand. Diese Bindungen werden durch neu gebildete Feststoffbrücken stabilisiert. Dies passiert auch bei den aus Suspension getrockneten Partikeln, jedoch nicht in einem solchen Umfang und solcher Schwankungsbreite.

Der erhöhte Rückstand der nicht präzipitierten Charge schlägt sich auch in der absoluten Feinpartikelfraktion nieder (Abbildung 4.83). Diese schwankt für Teilchen unter 5 μm bei der nicht präzipitierten Charge zwischen 25% und 38% während sie sich bei der präzipitierten Charge nach vierwöchiger Lagerung zwischen 40% und 43% bewegt. Die absoluten Feinpartikelfraktionen unter 2 μm verhalten sich ähnlich, betragen allerdings durchschnittlich 20% weniger.

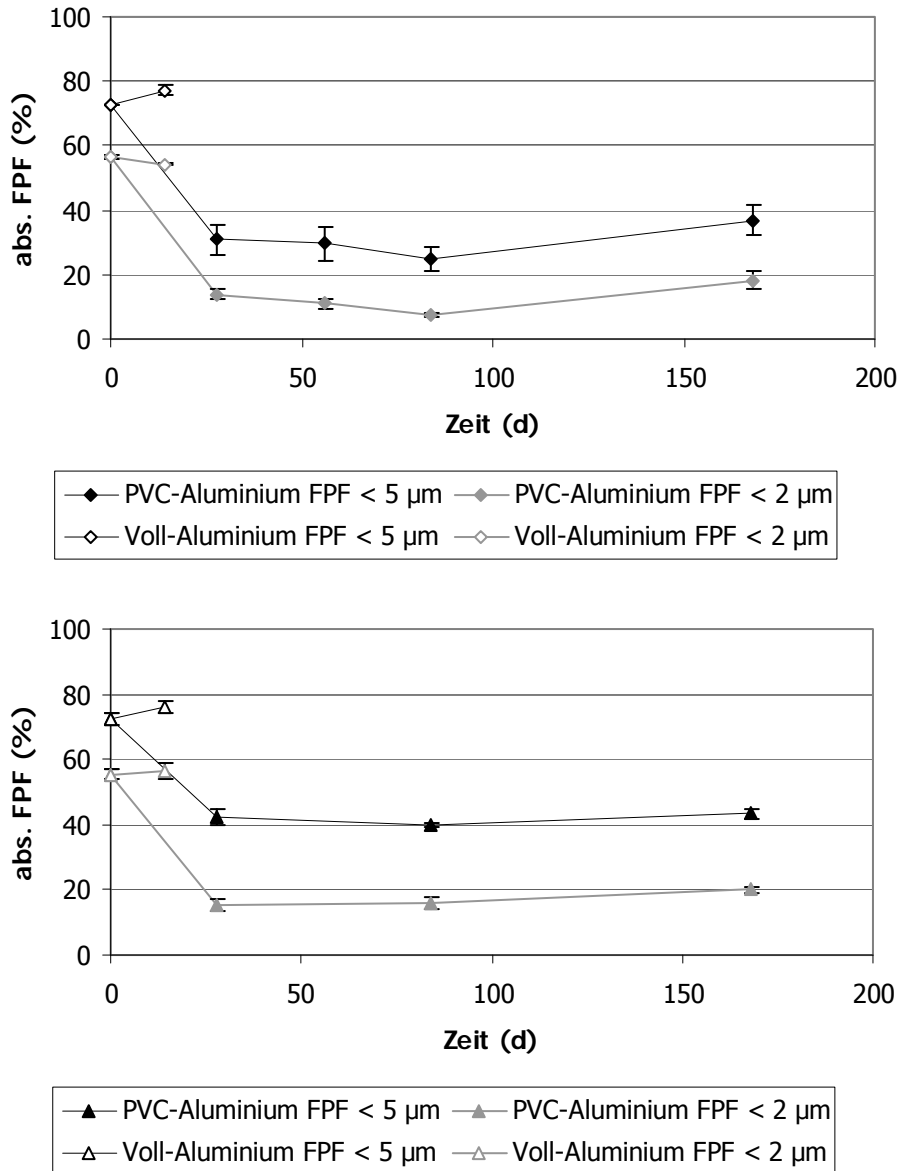


Abbildung 4.83: Absolute Feinpartikelfractionen unterschiedlicher Insulinpulver, oben: nicht präzipitiert, links: präzipitiert; Lagerung im PVC- oder Aluminium-Aluminiumblister bei 40°C und 75% rF; n=3 Messungen, Fehlerbalken = SD

Trotz hoher Umgebungsfeuchte wurde das Insulinpulver weniger beeinflusst als bei offener Lagerung oder Verwendung eines PVC-Aluminiumblisters. Damit erzielte die Verwendung eines Aluminium-Aluminiumblisters den gewünschten Effekt. Trotzdem verringerten sich

die relativen Feinpartikelfraktionen der nicht präzipitierten Charge signifikant, die der präzipitierten Charge dagegen nicht (Abbildung 4.81). Auch hier konnte demnach zwischen den beiden Chargen differenziert werden, denn die präzipitierte Charge stellte sich als die feuchtigkeitsunempfindlichere heraus. Durch die leicht verringerten Rückstände in Kapsel und Inhalator (Abbildung 4.84) wurden die verringerte relative Feinpartikelfraktion jedoch ausgeglichen und bei Betrachtung der absoluten Feinpartikelfraktionen waren keine signifikanten Einflüsse zu beobachten (Abbildung 4.83). Eine länger andauernde Lagerung wurde im Aluminium-Aluminiumblister nicht durchgeführt, jedoch kann schon nach der getesteten Zeit darauf geschlossen werden, dass die Barriere trotz alleiniger Verwendung von Aluminiumfolie den Wasserdampf nicht zu 100% abhalten kann. Es sind allerdings sehr viel geringere Einflüsse zu erwarten, als bei Lagerung im PVC-Aluminiumblister, die durch z.B. Verwendung eines Trockenmittels minimiert werden könnten.

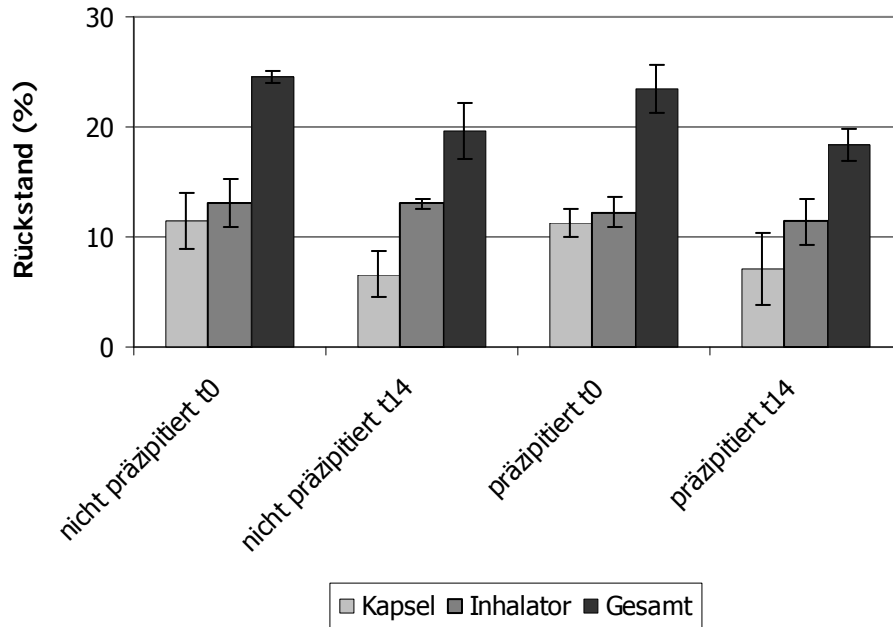


Abbildung 4.84: Rückstände unterschiedlicher Insulinpulver nach der Impaktor-Analyse, Lagerung: 14 Tage im Aluminiumblister bei 40°C und 75% rF; t0 = direkt nach Herstellung, t14 = 14 Tage Lagerung; n=3 Messungen, Fehlerbalken = SD

4.4.4 EINFLUSS DER UMGEBUNGSFEUCHTE AUF DIE IMPAKTOR-ANALYSE

Um die Feuchteempfindlichkeit der Pulver weiter zu differenzieren, wurde die Umgebungsfeuchte während der Impaktor-Analyse als Einflussfaktor untersucht. Es wurden je zwei Pulverchargen pro Herstellungsart (präzipitiert und nicht präzipitiert) produziert und diese dreifach in Kombination mit dem Cyclohaler im Impaktor vermessen. Die Messungen fanden in einem klimatisierten Raum bei 23°C und 23%, 53% oder 85% rF statt. Zuvor wurden die Pulver bei 8% rF im Exsikkator gelagert und kurz vor der Messung in Kapseln zu 1 mg abgefüllt.

Schon bei Betrachtung der relativen Feinpartikelfraktion unter 5 µm sind deutliche Unterschiede zwischen den Herstellungsmethoden zu erkennen (Abbildung 4.85). Während die FPF der nicht präzipitierten Charge

bereits bei einer Umgebungsfeuchte von 53% rF gegenüber der Messung bei 23% rF abfiel, blieb sie bei der präzipitierten Charge zunächst unbeeinflusst. Dort unterschied sich nur die Messung bei 85% hoch signifikant ($p < 0,001$) von den anderen Luftfeuchten. Bei der nicht präzipitierten Charge trat der gegenteilige Fall ein, hier bestanden Unterschiede zwischen der Messung bei 23% rF und den anderen Luftfeuchten. Dementsprechend differierten auch die Messungen bei 53% beider Chargen stark voneinander. Die absoluten Feinpartikelfraktionen unter 5 μm bleiben unbeeinflusst, da sie stark vom Rückstand in Kapsel und Inhalator abhängig sind. Diese zeigten allerdings in dem getesteten Luftfeuchtebereich keine Abhängigkeit (Abbildung 4.86).

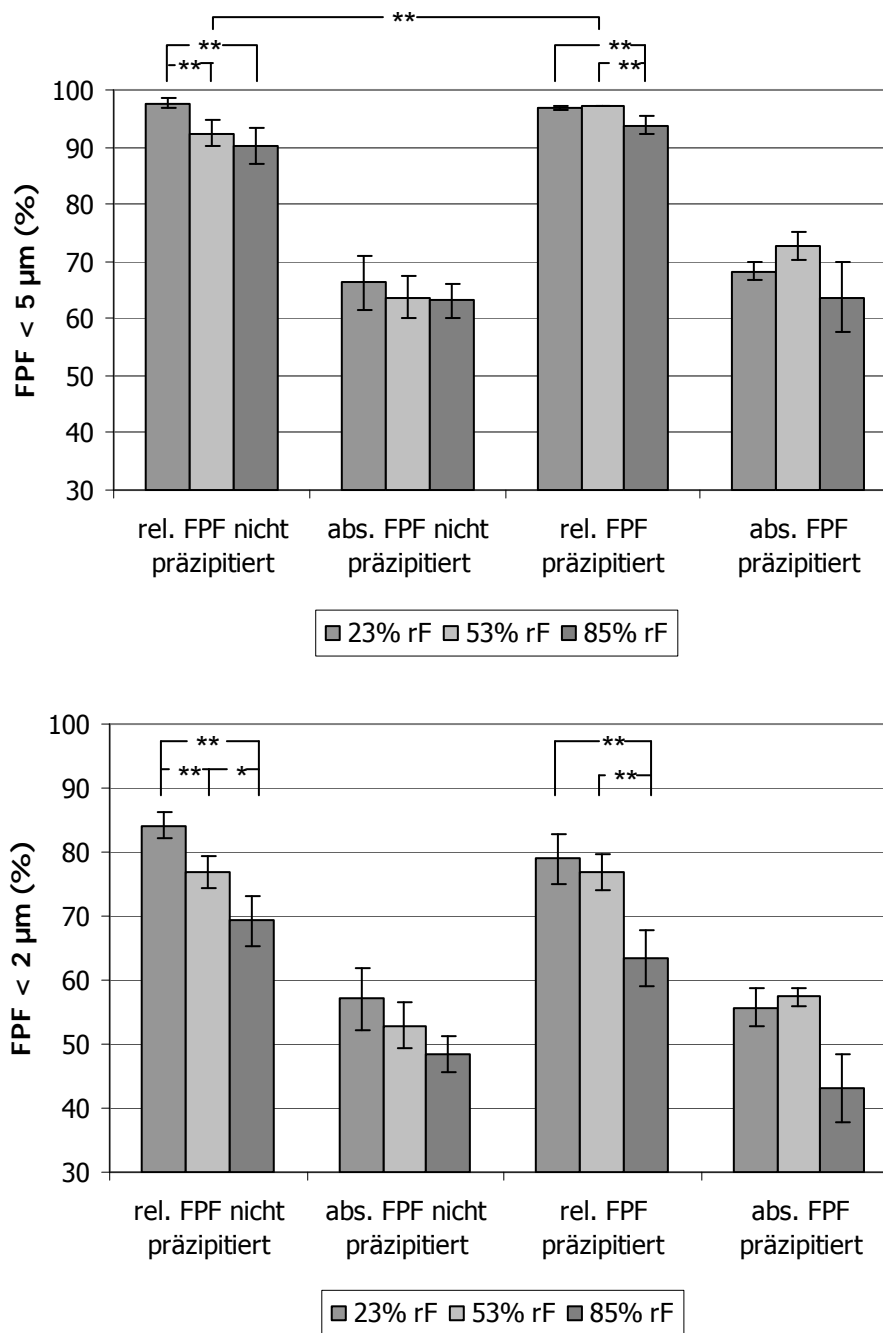


Abbildung 4.85: Feinpartikelfractionen unterschiedlicher Insulinpulver bei verschiedenen Messbedingungen (23°C, relative Luftfeuchte variabel); n=2 Chargen, je 3 Messungen, Fehlerbalken = SD

Die Feinpartikelfractionen < 2 µm verhielten sich ähnlich der FPF < 5 µm. Zusätzlich zu den zuvor beschriebenen Unterschieden fiel hier die relative FPF der nicht präzipitierten Charge bei 85% rF im

Vergleich zur Messung bei 53% rF deutlich ab. Auch bei der präzipitierten Charge war nun eine Feuchteabhängigkeit zu erkennen und die relativen FPF beider Chargen bei 53% rF unterschieden sich nicht mehr. Im Gegensatz zur FPF < 5 µm ist hier auch bei den absoluten Werten ein Einfluss der Luftfeuchte zu erkennen. Bei einer relativen Luftfeuchte von 85% wurden deutlich geringere absolute Feinpartikelfractionen ermittelt, als bei 23% rF.

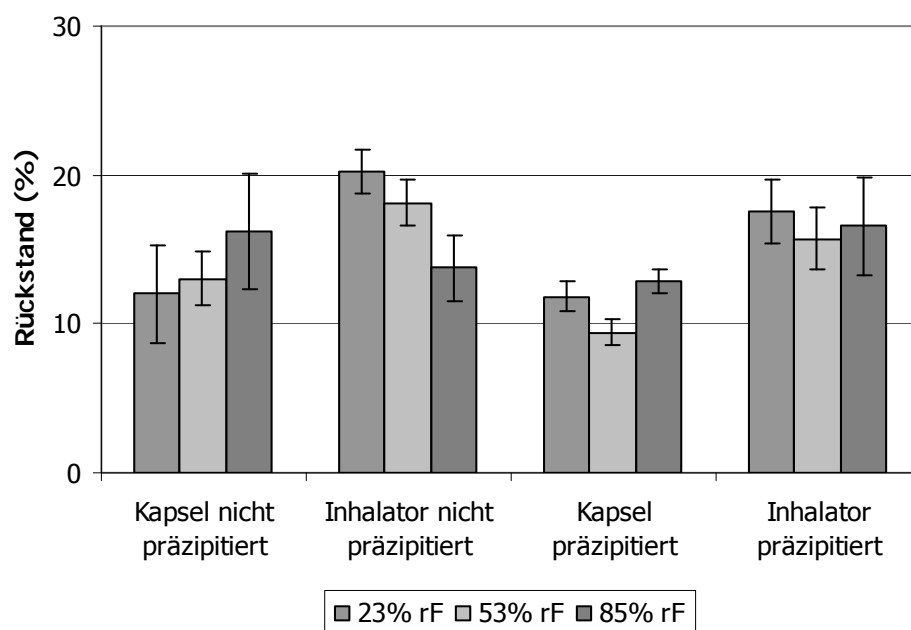


Abbildung 4.86: Rückstände in Kapsel und Inhalator nach der Impaktor-Analyse bei verschiedenen Messbedingungen (23°C, relative Luftfeuchte variabel); n=2 Chargen, je 3 Messungen, Fehlerbalken = SD

Die Luftfeuchte scheint damit auf die Teilchen unter 2 µm einen größeren Einfluss zu besitzen. Da diese eine größere volumenspezifische Oberfläche besitzen, als Partikel mit einem mittleren Durchmesser von 2 bis 5 µm, bieten sie dem Wasserdampf in der Umgebungsluft auch eine breitere Angriffsfläche. Entsprechend große Areale werden mit einer

Adsorptionsschicht aus Wassermolekülen bedeckt und können miteinander interagieren.

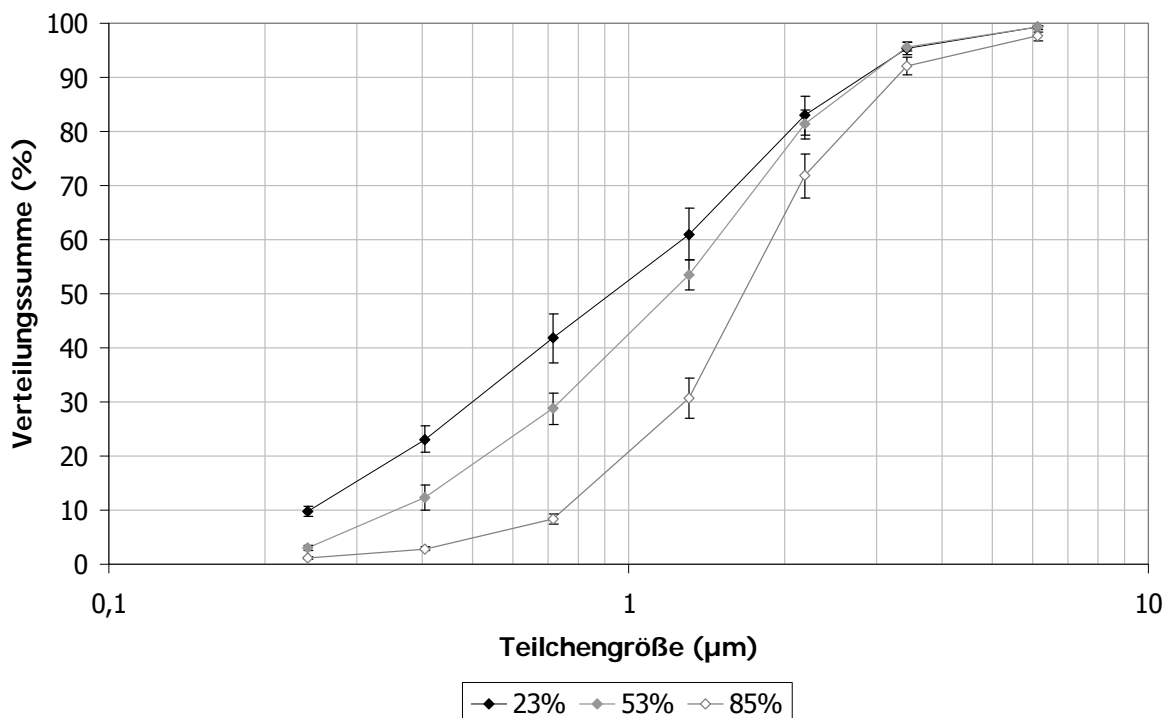
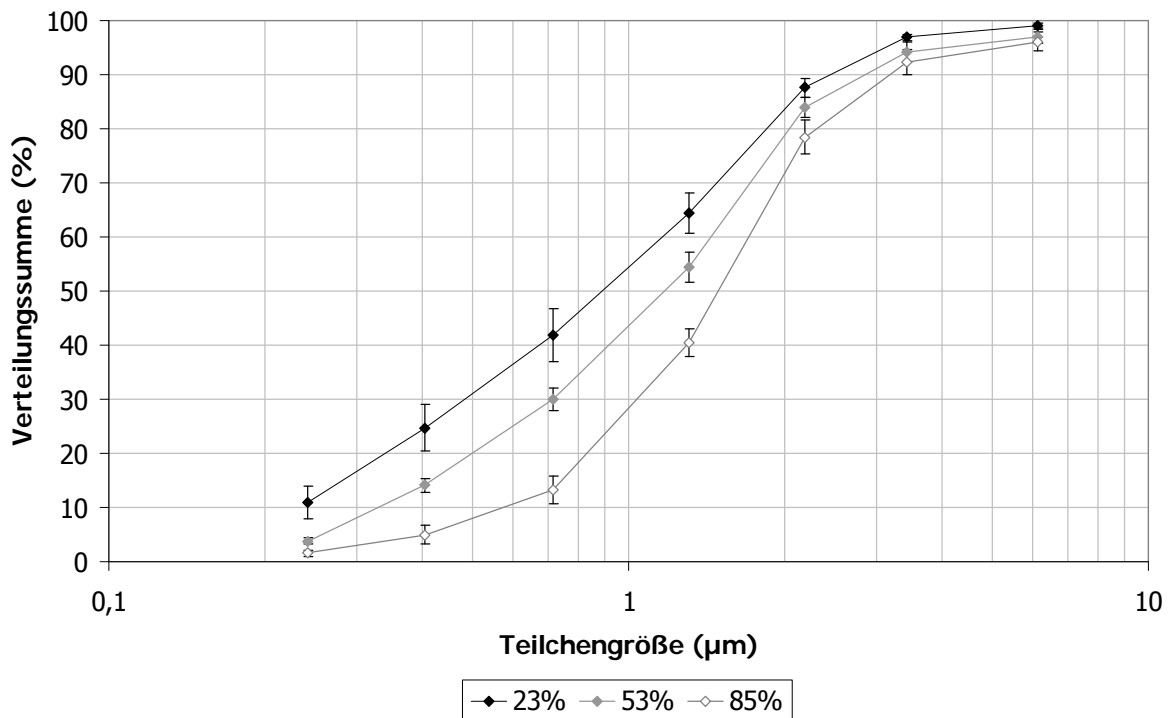


Abbildung 4.87: Aerodynamische Teilchengrößenverteilung bei unterschiedlichen Messbedingungen (23°C, relative Luftfeuchte variabel); Impaktor-Analyse; oben: nicht präzipitiert, unten: präzipitiert; n=2 Chargen, je 3 Messungen, Fehlerbalken = SD

Die Ergebnisse sprechen ebenfalls deutlich für eine höhere Empfindlichkeit der nicht präzipitierten Charge, welche bereits in Kapitel 4.4.3 diskutiert wurde. Anschaulich wird dies in Abbildung 4.87. Während sich die Verteilungskurven der nicht präzipitierten Charge bei verschiedenen Messbedingungen deutlich über den gesamten Teilchengrößenbereich unterscheiden, überschneiden sich die Kurven der Messfeuchten 23% und 53% rF bei der präzipitierten Charge ab einer Teilchengröße von circa 2,7 μm . In diesem Bereich sind daher zumindest für die präzipitierte Charge keine Fehldosierungen aufgrund der Umgebungsbedingungen zu erwarten.

4.4.5 ZUSAMMENFASSUNG

Die getesteten Pulverchargen unterschieden sich nur hinsichtlich des pH-Wertes der wässrigen Insulinlösung, der ausschlaggebend für eine mögliche Präzipitation ist. Durch den Vergleich von nicht präzipitiertem Insulin mit präzipitiertem Insulin sollte der Einfluss einer Präzipitation auf die aerodynamischen Eigenschaften des sprühgetrockneten Pulvers ermittelt werden. Dazu wurden die Pulverchargen unterschiedlichen Stressbedingungen ausgesetzt.

Es konnte gezeigt werden, dass über einen Zeitraum von 24 Wochen unter Lagerungsbedingungen von 25°C und 60% rF sowohl offen als auch im PVC-Aluminiumblister keinerlei Änderungen der aerodynamischen Pulvereigenschaften auftraten. Zwischen den Chargen konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Eine offene Lagerung bei 40°C und 75% rF führte zu einer starken Feuchtigkeitsaufnahme der Pulver, die infolge dessen agglomerierten und aggregierten. Die entstandenen Partikel ließen sich nicht vollständig

im Inhalator zerstäuben und zeigten dementsprechend niedrige Feinpartikelfraktionen. Unter diesen Extrembedingungen war ebenfalls keine Differenzierung der beiden Chargen möglich.

Eine Abstufung der Feuchtebelastung stellte die Lagerung im PVC-Aluminiumblister dar. Durch die Barriere einerseits und die geringere Pulverbettbewegung, die bei offener Lagerung und entsprechend regelmäßigem Probenzug aus dem verwendeten Gefäß verstärkt stattfand, agglomerierten die Pulverpartikel weniger stark. Hier konnte zwar auch eine Verringerung der Feinpartikelfraktionen beobachtet werden, jedoch nicht in dem Maße wie es nach offener Lagerung der Fall war. Ein Unterschied zwischen den Chargen war hinsichtlich einer geringeren Neigung der präzipitierten Partikel zur Ko- und Adhäsion nach der Lagerung im Vergleich zu den nicht präzipitierten Partikeln zu beobachten.

Eine Lagerung im Aluminium-Aluminiumblister erwies sich als optimal, denn obwohl das Packmittel keine 100%ige Wasserdampfbarriere darstellte, konnten bei Lagerbedingungen von 40°C und 75% rF nach zwei Wochen zumindest für die präzipitierten Partikel keine Veränderungen der aerodynamischen Eigenschaften festgestellt werden. Die nicht präzipitierte Charge zeigte einen leichten Abfall der relativen Feinpartikelfraktionen.

Die höhere Feuchteempfindlichkeit der nicht präzipitierten Charge konnte auch durch Lagerung und Vermessung bei Raumtemperatur und verschiedenen Luftfeuchten verifiziert werden. Laserdiffraktometrische Untersuchungen nach Lagerung der präzipitierten Charge zeigten im Gegensatz zur nicht präzipitierten Charge keine Unterschiede zwischen 23% und 53% rF. Eine Lagerung bei 85% rF führte bei beiden Chargen zu einer starken Verbreiterung der Teilchengrößenverteilung. Wurde die

Impaktor-Analyse mit identisch gelagerten Pulvern bei verschiedenen Umgebungsbedingungen durchgeführt, so zeigte sich ein ähnliches Ergebnis. Mit steigender relativer Luftfeuchte sanken die Feinpartikelfraktionen. Jedoch war dieser Effekt bei den präzipitierten Partikeln im Bereich von 23% bis 53% rF noch nicht zu beobachten, während die Luftfeuchte auf die nicht präzipitierten Partikel in diesem Bereich bereits einen signifikanten Einfluss hatte.

Diese Untersuchungen konnten zeigen, dass die Präzipitation einen positiven Effekt auf die Feuchteempfindlichkeit der produzierten Pulver hat. Vergleicht man den pulmonal systemisch verfügbaren Anteil präzipitierter Partikel mit dem aus Lösung sprühgetrockneter Pulver, so ist ersterer weniger von den Umgebungsbedingungen sowohl bei der Lagerung als auch bei der Anwendung abhängig.

4.5 UNTERSUCHUNG DER KOMBINATION AUS PULVERFORMULIERUNG UND INHALATOR

In den vorangehenden Kapiteln lag der Schwerpunkt auf der Optimierung der Pulverformulierung, dagegen wird hier der Einfluss des Inhalators näher betrachtet. Dafür wird die als optimal erachtete Insulinformulierung (präzipitiert mit Methanol im Verhältnis Nicht-Lösemittel zu Lösemittel 3+4, anschließend sprühgetrocknet) einerseits mit dem Handelsprodukt Exubera[®] verglichen und andererseits in unterschiedlichen Inhalatoren getestet.

4.5.1 VERGLEICH MIT DEM HANDELSPRODUKT

Exubera[®] war das weltweit erste, für den Markt zugelassene, Insulin zur Inhalation und diente daher als Orientierungspunkt bei der Optimierung der pulmonalen Diabetestherapie. Für eine Weiterentwicklung muss es das vorrangige Ziel sein, dieses Produkt hinsichtlich der Handhabung, Pulvereigenschaften und Wirtschaftlichkeit zu übertreffen. Die Pulverformulierung aus präzipitierten Insulinpartikeln wurde in Kombination mit dem Cyclohaler mit dem Exubera[®] verglichen. Um den Einfluss des Exubera[®]-Inhalators auf die Pulverdesagglomeration beurteilen zu können, wurde die Pulverformulierung des Handelsproduktes zusätzlich mit dem Cyclohaler aerodynamisch charakterisiert. Eine Aufstellung der getesteten Kombinationen findet sich in Tabelle 4.8.

Abbildung 4.88 zeigt die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Exubera[®]-Pulverformulierung. Man kann kollabierte Hohlkugeln erkennen, die auf eine Sprühtrocknung aus wässriger Lösung schließen

lassen. Die Partikel bestehen nur zu circa 60% aus Insulin, den restlichen Anteil macht ein Hilfsstoffgemisch aus (siehe Kapitel 3.1.7).

Tabelle 4.8: Aufstellung der getesteten Inhalator-Pulver-Kombinationen

| Bezeichnung | Inhalator | Pulverformulierung |
|---------------------------|----------------------|----------------------|
| Cyclohaler präzipitiert | Cyclohaler | präzipitiert 3+4 |
| Exubera original | Exubera [®] | Exubera [®] |
| Cyclohaler Exubera Pulver | Cyclohaler | Exubera [®] |

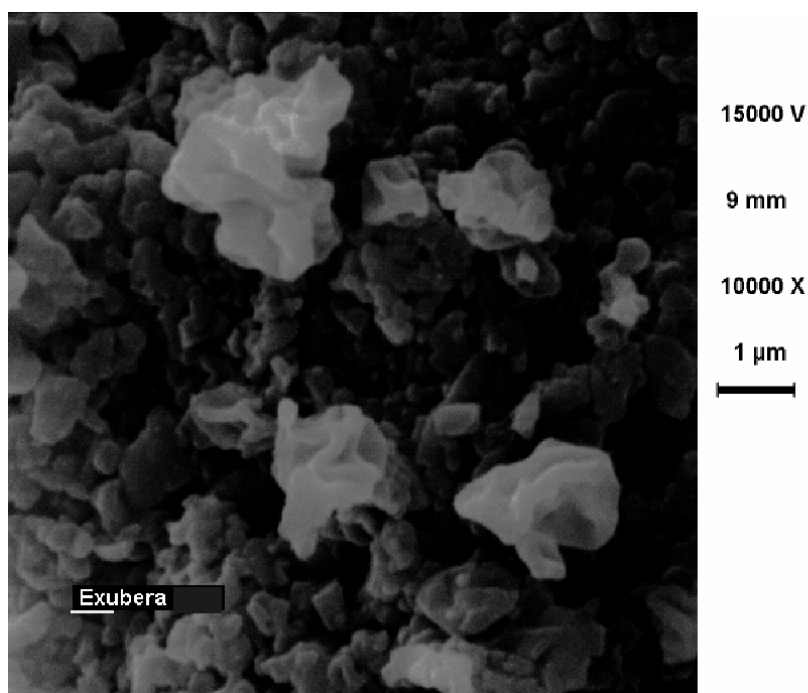


Abbildung 4.88: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Exubera[®]-Insulinformulierung; 10000fache Vergrößerung

Die mittlere geometrische Teilchengröße der Exubera[®]-Formulierung beträgt 2,72 µm und liegt damit circa 1 µm über der mittleren Partikelgröße der präzipitierten Charge (Abbildung 4.89). 91% aller Partikel sind kleiner als 5 µm, daher eignet sich dieses Pulver grundsätzlich zur pulmonalen Applikation.

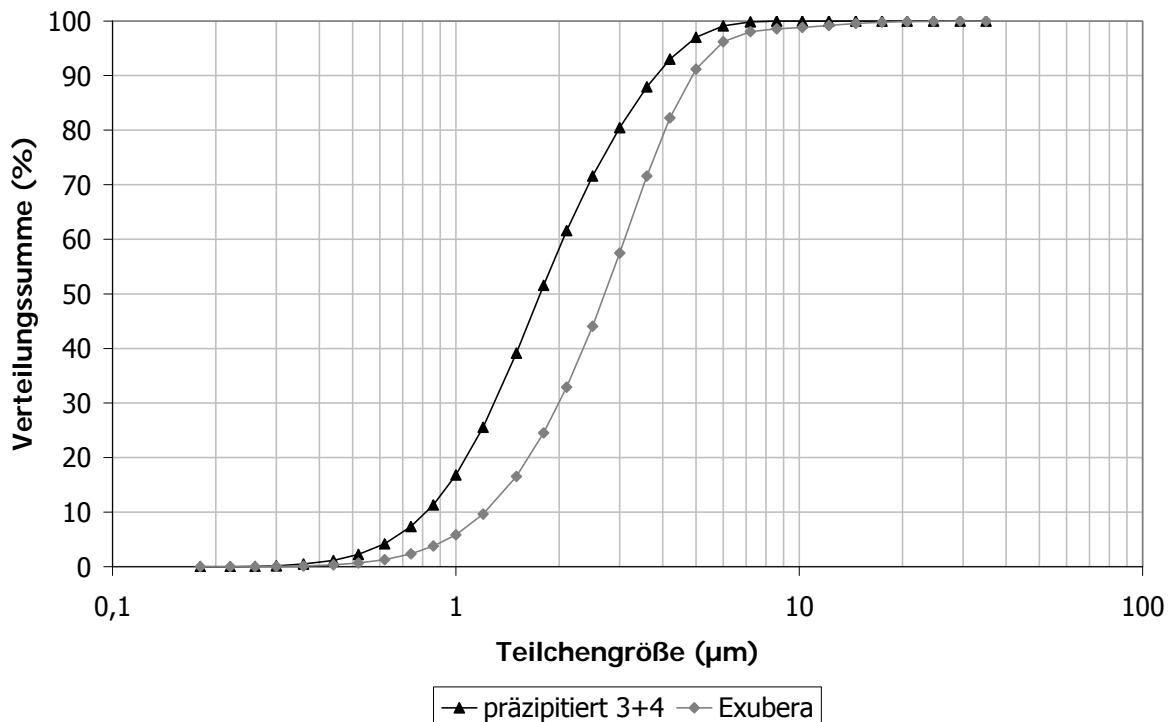


Abbildung 4.89: Teilchengrößenverteilung der Exubera[®]-Pulverformulierung im Vergleich zur Eigenformulierung (präzipitiert mit Methanol im Verhältnis Nicht-Lösemittel zu Lösemittel 3+4, anschließend sprühgetrocknet); Laserdiffraktion Nassdispergierung; n=3 Messungen, Fehlerbalken = SD

Abbildung 4.90 zeigt die relativen Feinpartikelfractionen der drei getesteten Kombinationen aus Inhalatoren und Pulverformulierungen in zwei Dosierungen: 1 und 3 mg. Die höchsten Feinpartikelfractionen im Cyclohaler wurden mit dem präzipitierten Insulin, gefolgt von der Exubera[®]-Formulierung gemessen. Dabei verhielten sich die relativen Feinpartikelfractionen unter 5 µm wie die relativen FPF unter 2 µm. Die mit Abstand geringsten relativen Feinpartikelfractionen < 5 µm von circa 63% erzeugte der Exubera[®]-Inhalator. Dabei unterschieden sich die relativen FPF aller drei Kombinationen signifikant voneinander. Die Wirkstoffdosis hatte im Cyclohaler keinen Einfluss auf die

Feinpartikelfractionen. Lediglich das Handelsprodukt zeigte leicht erniedrigte Werte bei Verwendung einer höheren Dosis, diese haben jedoch keine statistische Relevanz.

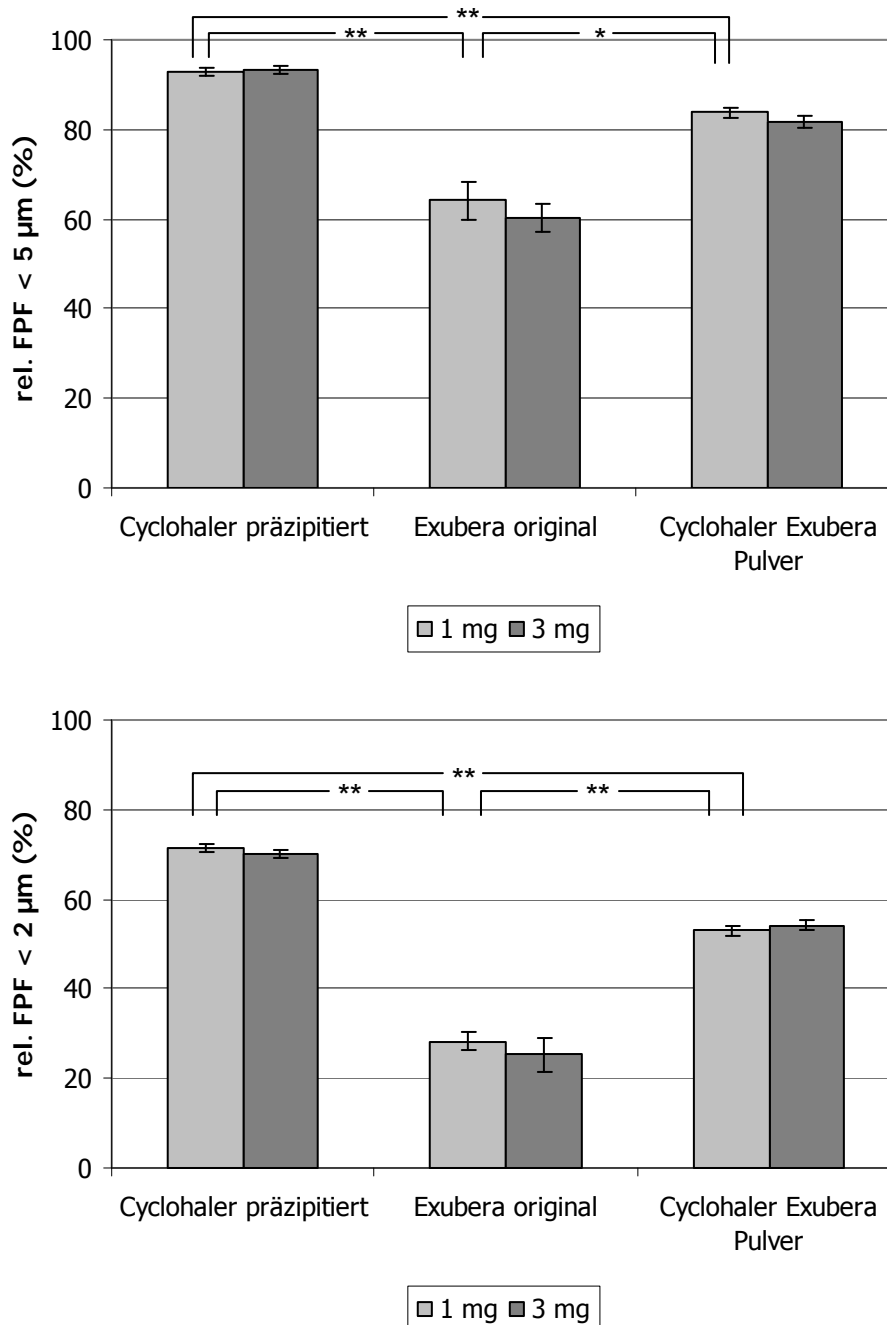


Abbildung 4.90: Relative Feinpartikelfractionen bei unterschiedlichen Dosierungen, Vergleich des Handelsproduktes mit einer präzipitierten Insulincharge im Cyclohaler und einer Kombination aus Handelsprodukt und Exubera®; Signifikanzen exemplarisch für 1 mg; n=3 Messungen, Fehlerbalken = SD

Das präzipitierte Pulver ist dem Handelspräparat deutlich überlegen, sofern beide in demselben Inhalator untersucht werden. Durch die kleinere Partikelgröße der präzipitierten Charge war dies bereits vor der Untersuchung zu erwarten. Die Untersuchungen zeigen allerdings auch, dass der Cyclohaler dem Exubera[®]-Inhalator überlegen ist. Bei Verwendung derselben Pulverformulierung erzeugt das Handelsprodukt im Vergleich circa 20% verringerte relative Feinpartikelfraktionen unter 5 µm und bis zu 25% verringerte relative FPF unter 2 µm.

Diese Ergebnisse sprechen für eine mangelhafte Desagglomeration im Exubera[®]-Inhalator. Zieht man die Rachendeposition zur Beurteilung heran (Abbildung 4.91), so bestätigt sich dies. Mit 27% bis 34% liegt der Anteil an Insulin, der bereits im Rachen impaktiert, nach Inhalation mit dem Exubera deutlich über denen der im Cyclohaler vermessenen Pulver. Die Desagglomeration wird im Exubera[®] nicht durch den Inhalationsluftstrom sondern mithilfe von Druckluft vollzogen. Der die Pulverformulierung enthaltende Blister wird von zwei Dornen angestochen und das Pulver zerstäubt. Dadurch gelangt das erzeugte Aerosol in einen geräteinternen Spacer und kann von dort inhaliert werden. Offensichtlich reicht dieser Luftstoß nicht aus, um das Pulver vollständig in seine Primärpartikel zu zerteilen. Hier wird auch die Dosisabhängigkeit der relativen Feinpartikelfraktion des Exubera[®] deutlich. Ist der Luftstoß für 1 µm Wirkstoff bereits nicht ausreichend, so genügt er noch weniger zur Zerstäubung der dreifachen Dosis. Wird die Pulverformulierung des Exubera[®] jedoch im Cyclohaler eingesetzt, so ist die Rachendeposition deutlich geringer ausgeprägt. Der Cyclohaler ist daher bezüglich des Desagglomerationsvermögens dem Exubera[®] überlegen.

Die Unterschiede der Pulverformulierungen zeigen sich erst bei Verwendung desselben Inhalators. Die Exubera[®]-Formulierung verursacht, auch wenn sie im Cyclohaler eingesetzt wird, eine wesentlich ausgeprägtere Rachendeposition als die präzipitierte Pulvercharge. Die Teilchengröße allein bietet nur eine unzureichende Erklärung für diese Beobachtung. Offensichtlich sind die Pulverpartikel der Exubera[®]-Formulierung kohäsiver und können nicht vollständig desagglomeriert werden.

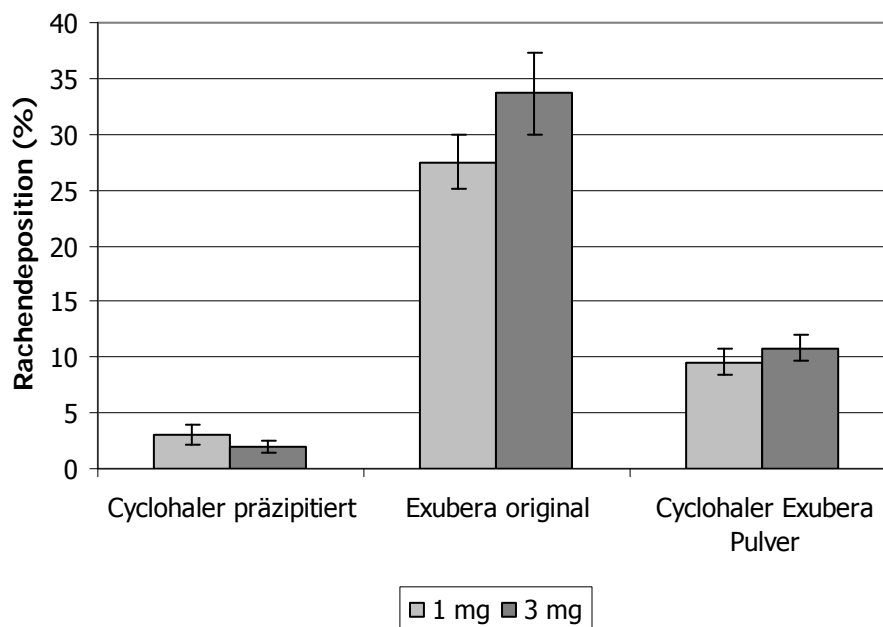


Abbildung 4.91: Rachendeposition nach der Impaktor-Analyse bei unterschiedlichen Dosierungen, Vergleich des Handelsproduktes mit einer präzipitierten Insulincharge im Cyclohaler und einer Kombination aus Handelsprodukt und Exubera[®]; n=3 Messungen, Fehlerbalken = SD

Die Wirkstoffrückstände in den Kapseln des Cyclohalers unterscheiden sich erwartungsgemäß deutlich von denen in den Blistern des Exubera[®] (Abbildung 4.92). Dies kommt durch den Mechanismus der Partikelzerstäubung im Exubera[®] zustande. Dabei lagern sich mehr als

20% des Insulinpulvers an den durch die Öffnung des Blisters nach innen gebogenen Blisterfragmenten an und können somit nicht inhaliert werden. Im Cyclohaler erfolgt die Kapselentleerung durch ein anderes Prinzip. Die angestochene Kapsel rotiert im Luftstrom und das Pulver wird mithilfe von Zentrifugalkräften in den Inhalator und somit in den Einatemstrom befördert. Dieses Prinzip ist weitaus effektiver, da so bei einer Dosis von 1 µm nur maximal 10% des Insulins in der Kapsel verbleiben. Zusätzlich ist der prozentuale Verlust bei einer höheren Dosis aufgrund der begrenzten Innenfläche der Kapsel niedriger. Es bleiben relativ unabhängig von der Insulinformulierung nur circa 100 µg des Insulins daran haften (siehe auch Kapitel 4.1.3.6).

Der Wirkstoffrückstand im Inhalator ist für den Exubera[®] bedingt durch die größere Innenoberfläche um 5 bis 7% erhöht, die Rückstände der unterschiedlichen Pulverformulierungen im Cyclohaler unterscheiden sich nicht.

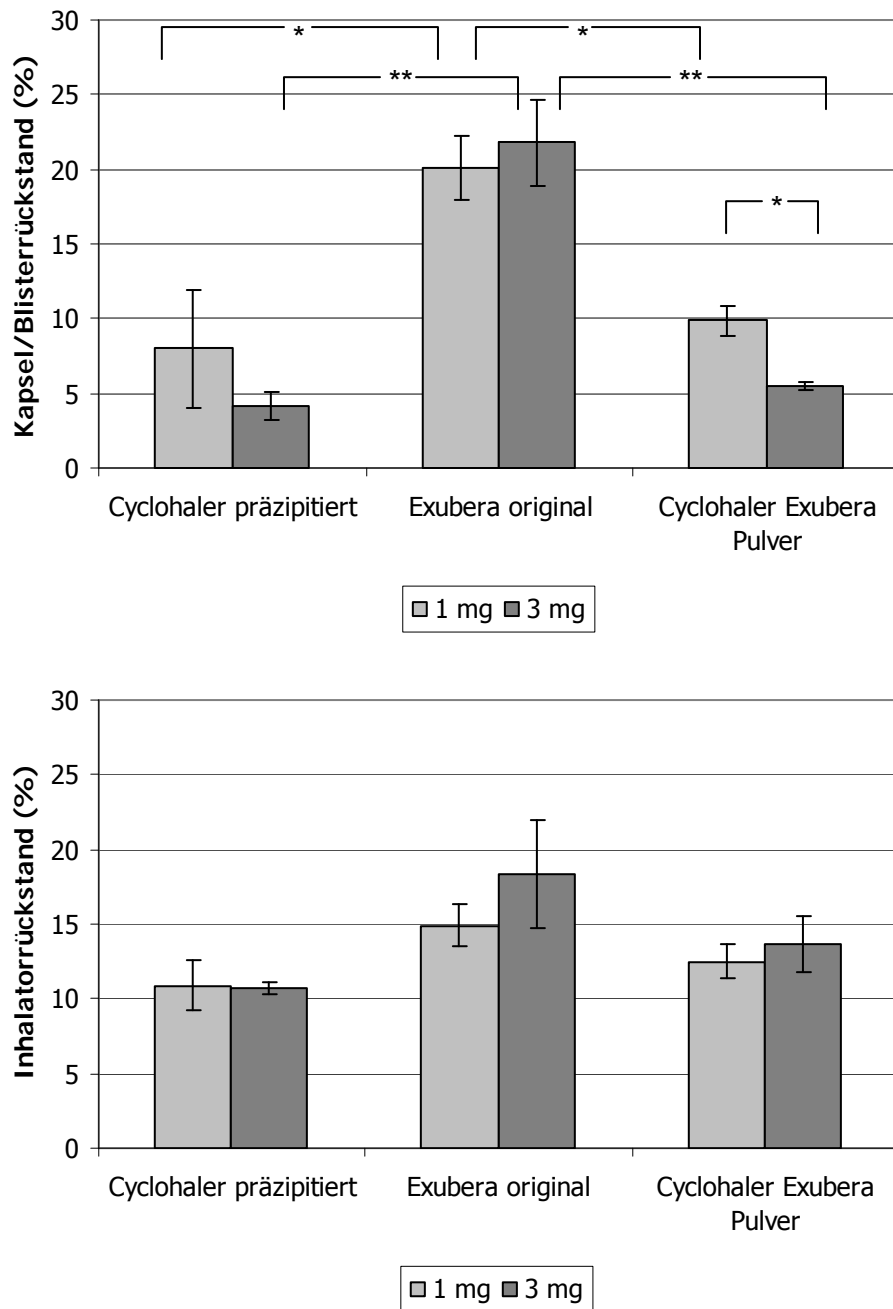


Abbildung 4.92: Rückstände nach der Impaktor-Analyse bei unterschiedlichen Dosierungen, Vergleich des Handelsproduktes mit einer präzipitierten Insulincharge im Cyclohaler und einer Kombination aus Handelsprodukt und Exubera®; n=3 Messungen, Fehlerbalken = SD

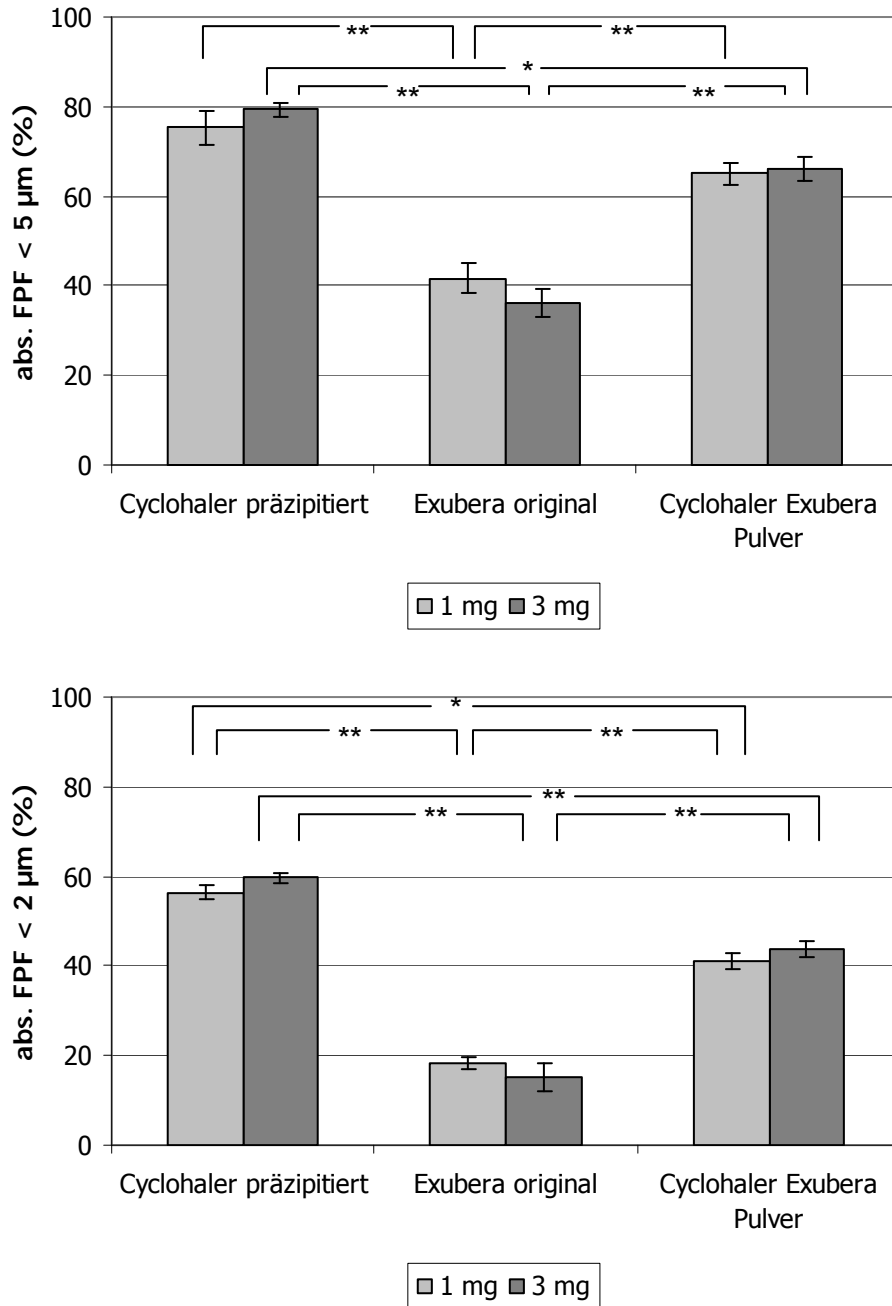


Abbildung 4.93: Absolute Feinpartikelfractionen bei unterschiedlichen Dosierungen, Vergleich des Handelsproduktes mit einer präzipitierten Insulincharge im Cyclohaler und einer Kombination aus Handelsprodukt und Exubera®; n=3 Messungen, Fehlerbalken = SD

Die bereits für die relativen Feinpartikelfractionen beobachteten Zusammenhänge lassen sich auch auf die absoluten

Feinpartikelfractionen übertragen (Abbildung 4.93). Die erhöhten Rückstände in Blister und Exubera[®]-Inhalator führen zu stark verringerten Feinpartikelfractionen. Der Anteil an systemisch verfügbarem Wirkstoff beträgt maximal noch 19%, wobei dieselbe Pulverformulierung - im Cyclohaler vermessen - circa 42% und die präzipitierte Insulincharge eine absolute Feinpartikelfraction von bis zu 60% erreicht.

Diese Untersuchungen zeigen, dass der in dieser Arbeit verwendete Cyclohaler dem Handelsprodukt hinsichtlich der abgegebenen Wirkstoffmenge und des Desagglomerationsvermögens überlegen ist. Das durch Präzipitation erzeugte Insulinpulver besitzt im Vergleich zur Exubera[®]-Formulierung kleinere Partikel mit niedrigerer Kohäsionstendenz. Bedingt durch diese Eigenschaften konnten mit dem selbst produzierten Pulver die mit Abstand höchsten Feinpartikelfractionen erzeugt werden.

4.5.2 VERGLEICH VERSCHIEDENER INHALATOREN

Um das Desagglomerationsverhalten der präzipitierten Pulvercharge näher zu betrachten, wurde diese in Kombination mit verschiedenen Inhalatoren untersucht. Dabei kamen der bislang verwendete Cyclohaler, sowie der Twincer mit und ohne Sweeper-Kristallen und ein Prototyp des Monohalers – einer Neuentwicklung - zum Einsatz. Die Desagglomeration sowohl im Twincer als auch im Monohaler beruht auf dem Prinzip der Klassierkammern, von denen der Monohaler eine und der Twincer zwei besitzt. In einem solchen zyklonartigen Aufbau kann das Pulver durch sehr starke Zentrifugalkräfte desagglomeriert werden (de Boer und Heijerman, 2006).

Die relativen Feinpartikelfractionen unter 5 µm der getesteten Inhalatoren unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Abbildung 4.94). Dies war für die Untersuchung des Twincers mit und ohne Sweeper-Kristallen bereits zu erwarten (siehe Kapitel 4.3.4.1). Auch der Einsatz nur einer Klassierkammer (Monohaler) im Vergleich zu zwei Kammern (Twincer) scheint ausreichend zu sein, um die getestete Wirkstoffdosis adäquat zu zerstäuben. Betrachtet man jedoch die relativen Feinpartikelfractionen unter 2 µm, so zeigt sich ein Vorteil des Cyclohalers im Vergleich zu den anderen Inhalatoren. Die relative FPF ist höher, was für eine stärkere Desagglomeration im Inhalator spricht. Twincer und Monohaler unterscheiden sich in diesem Punkt wiederum nicht voneinander.

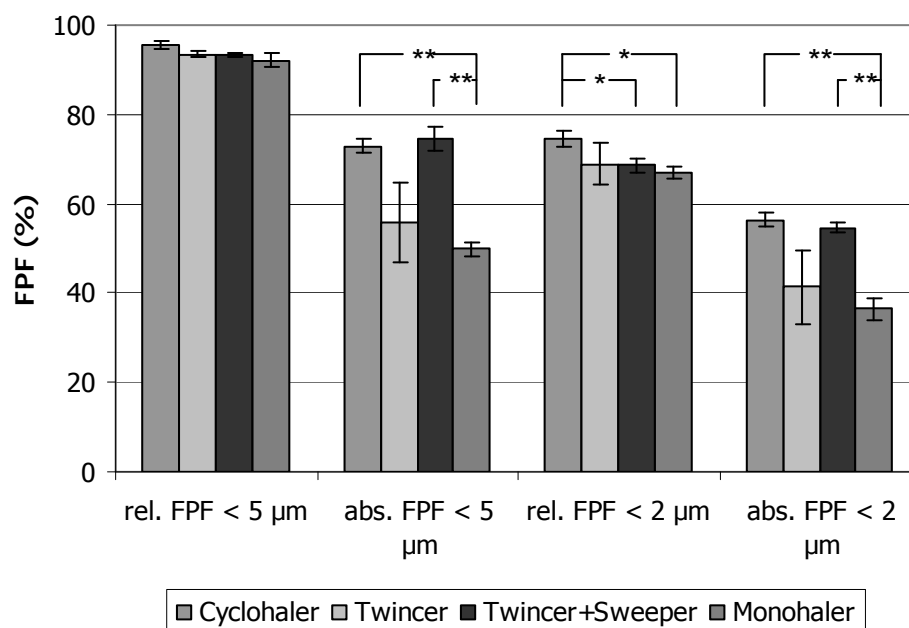


Abbildung 4.94: Feinpartikelfractionen einer präzipitierten Insulinpulvercharge mit unterschiedlichen Inhalatoren; $n=3$ Messungen, Fehlerbalken = SD

Das verbesserte Desagglomerationsvermögen des Cyclohalers wird auch bei Betrachtung der Rachendeposition deutlich (Abbildung 4.95). Diese ist am höchsten bei Verwendung des Monohalers, allerdings sind hier sehr hohe Schwankungen zu beobachten. Es handelte sich bei dem verwendeten Gerät um einen Prototypen, der bezüglich der Handhabung gewisse Mängel zeigte. Die niedrigste Rachendeposition mit circa 2,2% erzeugte der Cyclohaler. Dies ist ein Indikator für eine nahezu komplette Zerstäubung der Pulveragglomerate.

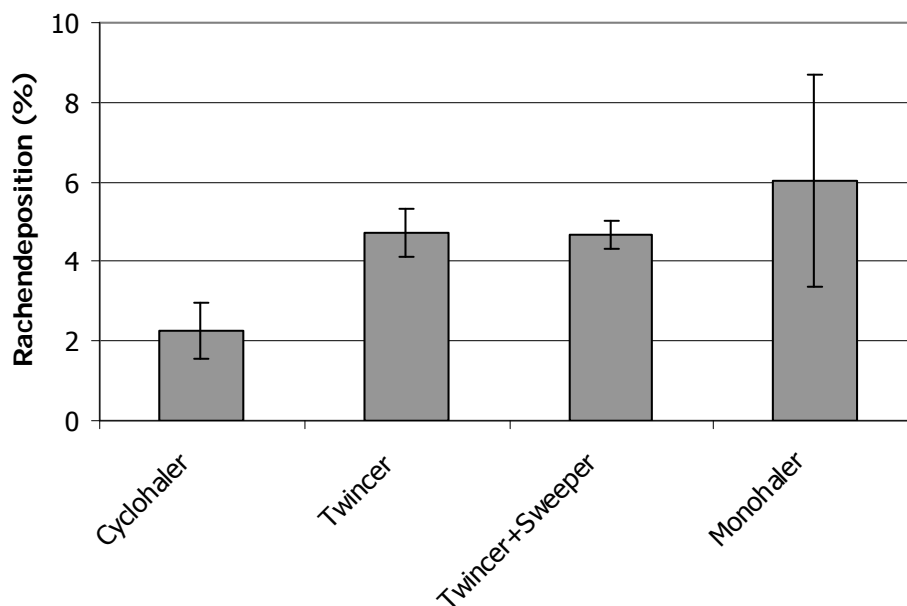


Abbildung 4.95: Rachendeposition nach der Impaktor-Analyse einer präzipitierten Insulinpulvercharge mit unterschiedlichen Inhalatoren; $n=3$ Messungen, Fehlerbalken = SD

Die absoluten Feinpartikelfractionen sind stark von den Rückständen in Inhalator und Kapsel bzw. Blister abhängig. Die Verwendung eines Blisters scheint im Gegensatz zur Kapsel von Vorteil zu sein, da weniger Pulver haften bleibt (Abbildung 4.96). Die Laboruntersuchungen wurden jedoch mit bereits geöffneten Blistern durchgeführt, daher kann nicht

abgeschätzt werden, wie sich eine Lagerung im geschlossenen Blister und die manuelle Öffnung desselben auf die Menge an anhaftendem Pulver auswirkt.

Die Verwendung einer Klassierkammer besitzt bezüglich der Rückstände im Inhalator deutliche Nachteile. Durch die Zentrifugalkräfte wird das Pulver nicht nur desagglomeriert sondern auch an die Wandung der Kammer gepresst. Dort lagert es sich bei beiden getesteten Inhalatoren vermehrt ab. Dies wirkt sich negativ auf die absoluten Feinpartikelfractionen aus, die im Vergleich zum Cyclohaler signifikant niedriger sind. Durch den Einsatz von Sweeper-Kristallen kann der Gesamtrückstand so stark verringert werden, dass er dem im Cyclohaler gleicht. Dementsprechend unterscheiden sich die absoluten Feinpartikelfractionen beider Inhalatoren nicht voneinander.

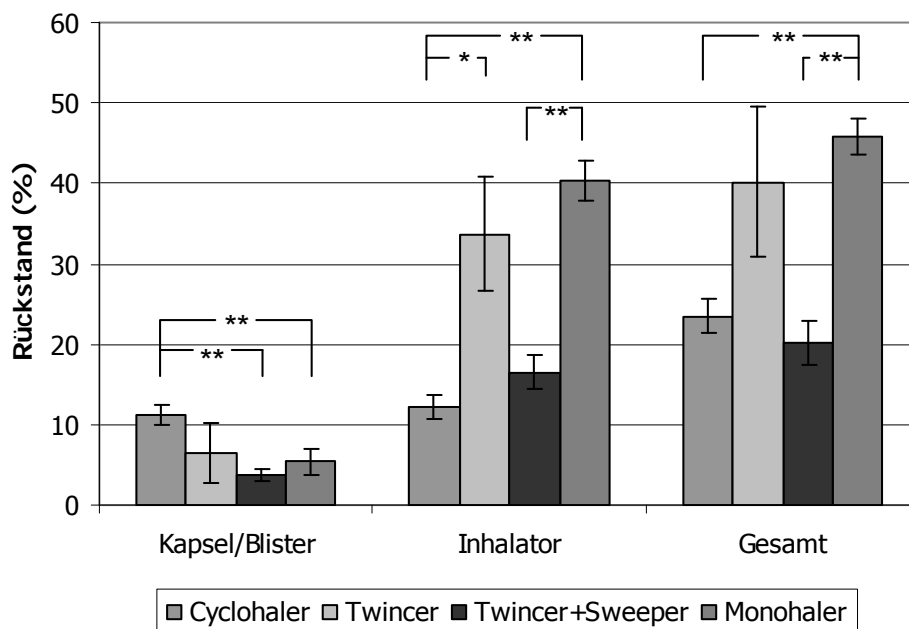


Abbildung 4.96: Rückstände nach der Impaktor-Analyse einer präzipitierten Insulinpulvercharge mit unterschiedlichen Inhalatoren; n=3 Messungen, Fehlerbalken = SD

Der Vergleich verschiedener Inhalatoren macht deutlich, dass das durch Präzipitation produzierte Insulinpulver unabhängig vom Desagglomerationsprinzip des Inhalators sehr gute aerodynamische Eigenschaften zeigt. Wird eine Klassierkammer verwendet, so ist allerdings sicherzustellen, dass die Wirkstoffrückstände im Inhalator möglichst minimiert werden. Dies kann durch den Zusatz grober Laktosekristalle, den sogenannten Sweeper-Kristallen, zur Pulvermischung geschehen. Generell konnten mit dem Cyclohaler und dem Twincer mehr als 50% der eingesetzten Dosis systemisch verfügbar gemacht werden, was als ein sehr gutes Ergebnis bewertet werden kann.

5 ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT

Trotz marktwirtschaftlicher Rückschläge bietet die inhalative Diabetestherapie langfristig eine Perspektive für die nadelfreie Insulinapplikation. Das Ziel dieser Arbeit war es daher, eine Insulinpulverformulierung zu entwickeln, die den Wirkstoff in Kombination mit einem kapselbasierten Inhalator durch Applikation in den tiefen Lungenbereichen optimal systemisch verfügbar macht. Mithilfe eines Präzipitationsverfahrens sollten Insulinpartikel produziert werden, die nach Trocknung gute aerodynamische Eigenschaften aufweisen.

Die Löslichkeit des Insulins in wässrigen Medien ist stark vom pH-Wert abhängig. Wird eine Präzipitation mit einem organischen Nicht-Lösemittel durchgeführt, so hat dieser einen entscheidenden Einfluss auf das Fällungsergebnis. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Insulin in wässriger Lösung (pH-Wert 6,75) mit einem Methanolanteil in der Mischung von 42,9% (m/m) zu Partikeln in einem Größenbereich von 100 bis 200 nm präzipitiert werden kann. Dabei werden die Insulinmoleküle dehydriert und reversibel denaturiert. Um eine schnelle und gleichmäßige Vermischung von Lösemittel und Nicht-Lösemittel zu gewährleisten, wurde mit einem Mikromischer gearbeitet. Die erhaltenen Suspensionen zeigten über einen Zeitraum von 14 Tagen ein nur geringfügiges Teilchenwachstum. Die Übertragbarkeit der Fällungsprozedur auf ein anderes Protein lässt darauf schließen, dass für diese Methode ein breites Anwendungsgebiet vorhanden ist.

Die Sprühtrocknung der durch Präzipitation produzierten Suspensionen resultierte in Partikelkollektiven in einem Teilchengrößenbereich von 0,5 bis 5 μm . Die Untersuchungen der aerodynamischen Pulvereigenschaften in Kombination mit dem Cyclohaler ergaben gute Desagglomerations-

eigenschaften und hohe Feinpartikelfraktionen der hergestellten Pulver. Es konnte gezeigt werden, dass das Verfahren der Präzipitation mit anschließender Sprühtrocknung Pulverchargen mit reproduzierbar guten aerodynamischen Eigenschaften hervorbringen kann.

Die Verwendung pulmonal gut verträglicher Hilfsstoffe als Additive zur Insulinpräzipitation ergab keine Verbesserung der aerodynamischen Pulvereigenschaften. Mithilfe von HPMC konnte zwar die geometrische Teilchengröße verringert werden, hinsichtlich des aerodynamischen Durchmessers unterschieden sich diese Teilchen jedoch nicht von den Pulverchargen ohne Hilfsstoff. Mannitol und L-Leucin beeinflussten die Teilchengröße nicht und führten zu erhöhter Feuchteempfindlichkeit der Pulver. Eine Aktivitätsbestimmung des Insulins nach der Fällung und Sprühtrocknung ergab nur geringe produktionsbedingte Aktivitätsverluste. Die Verwendung von Mannitol als Hilfsstoff scheint sich positiv auf die resultierende Aktivität auszuwirken, hier konnten keine Verluste beobachtet werden.

Ob eine Präzipitation nanopartikulärer Primärteilchen tatsächlich von Vorteil gegenüber einer Sprühtrocknung aus reiner Lösung ist, wurde durch eine Untersuchung der Feuchteempfindlichkeit entsprechender Insulinpulver festgestellt. Sowohl nach Lagerung über mehrere Wochen im Klimaschrank als auch bei Untersuchung des Einflusses der Umgebungsbedingungen während der Impaktor-Analyse konnte festgestellt werden, dass präzipitierte Pulver eine geringere Feuchteempfindlichkeit besitzen als aus Lösung sprühgetrocknete Produkte.

Im Vergleich zum Handelsprodukt konnten mit der im Rahmen dieser Arbeit optimierten Insulinformulierung höhere relative und absolute Feinpartikelfraktionen erzielt werden. Infolge dessen ist für die

präzipitierten Insulinpulver in Kombination mit dem Cyclohaler ein geringerer Wirkstoffeinsatz nötig, um denselben systemischen Effekt zu erzielen. Auch in anderen Inhalatoren, wie zum Beispiel im Twincer, zeigte das präzipitierte Insulin gute Desagglomerationseigenschaften. Die präzipitierten Formulierungen zeigen also unabhängig vom gewählten Inhalator immer ein sehr gutes aerodynamisches Verhalten. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Präzipitation von Proteinen im Nanometerbereich grundsätzlich möglich ist und entsprechende Vorteile bietet. Die mit der hier entwickelten Herstellungsmethode erzeugten Insulinpulver eignen sich sehr gut zur Inhalation, da sowohl Teilchengröße als auch Desagglomerationsvermögen dazu beitragen, mit einem einfachen Inhalator mehr als 50% der eingesetzten Dosis systemisch verfügbar zu machen.

6 ABSTRACT

The pulmonary therapy of diabetes is a promising attempt of needle-free insulin application. The aim of this study was to develop an optimised powder formulation transporting insulin into the deeper lungs to achieve a systemic availability. Insulin particles should be produced using a precipitation method followed by spray drying.

The solubility of insulin in aqueous solutions is highly dependant on the pH-value which has an important influence on the precipitation result if a precipitation with organic anti-solvent is performed. A precipitation of insulin out of an aqueous solution pH 6.75 with a methanol content of 42.9% (m/m) was found to generate particles between 100 and 200 nm. During this process, the insulin molecules get dehydrated and reversibly denatured. To secure a fast and uniform mixing of both liquids a micromixer was used. Concerning their particle size, the so produced suspensions were stable during a period of 14 days. The transferability of this precipitation method to another protein was checked and leads to the assumption that the developed process has broad applicability.

Spray drying of the produced suspensions led to particles in a size range of 0.5 to 5 μm with good deagglomeration properties and high fine particle fractions in combination with the Cyclohaler device. A positive effect of methanol in the spray drying liquid concerning the particle properties was observed and excellent reproducibility was shown.

The addition of stabilising excipients to the precipitation revealed no positive effect on the aerodynamic properties of the resulting particles. The use of HPMC led to geometrically smaller particles but with identical aerodynamic diameters as without excipient. Mannitol and L-leucine did not affect the particle size but increased the moisture sensitivity. The

estimation of insulin activity after precipitation and spray drying revealed no significant activity losses, but better stability for mannitol-based particles.

The benefit of a nanoparticulate precipitation was evaluated testing the moisture sensitivity of a precipitated and a non-precipitated (spray dried out of solution) insulin powder. The powders were on the one hand stored at different humidities, and on the other hand tested at different environmental conditions. The aerodynamic assessment revealed a lower moisture sensitivity of the precipitated products.

Compared to the marketed product Exubera[®], the precipitated powder formulation shows a higher relative and absolute fine particle fraction as well as lower device and capsule retention. Accordingly, a lower dose of the precipitated powder is necessary to achieve the same effect. Good deagglomeration of the precipitated powder could also be observed using the Twincer device indicating that the formulation shows a very good aerodynamic performance independent from the device.

The precipitation of insulin to particles in nanometer range is possible and offers several advantages. The established production method is able to gain powders that are suitable for inhalation concerning particle size and deagglomeration behaviour. With a simple device more than 50% of the dose can be made systemically available.

7 ANHANG

7.1 VERWENDETE SYMBOLE UND ABKÜRZUNGEN

| | |
|----------|---|
| CMIA | Chemilumineszenz-Mikropartikelimmunoassay |
| DPI | Dry Powder Inhaler |
| DSC | Differential Scanning Calorimetrie |
| DVS | Dynamic Vapour Sorption |
| EDC | Effective Cut-off Diameter |
| ELISA | Enzyme Linked Immunosorbent Assay |
| FDA | Food and Drug Administration (USA) |
| FPF | Feinpartikelfraktion |
| HELOS | Helium Neon Laser Optisches System |
| HPLC | High Pressure Liquid Chromatography |
| HPMC | Hydroxypropylmethylcellulose |
| ICH | International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use |
| IE | Internationale Einheiten |
| IEP | Isoelektrischer Punkt |
| Lsg. | Lösung |
| MMAD | Mass Median Aerodynamic Diameter |
| MOC | Microorifice Collector |
| NGI | Next Generation Pharmaceutical Impactor |
| PCS | Photon Correlation Spectroscopy |
| Ph. Eur. | Pharmakopoea Europaea |
| pMDI | pressurised Metered Dose Inhaler |

| | |
|-----------------|--|
| REM | Rasterelektronenmikroskopie |
| rF | Relative Feuchte |
| s.c. | subkutan |
| SD | Standard deviation |
| TGA | Thermogravimetrische Analyse |
| WHO | World Health Organisation |
| X ₅₀ | Partikeldurchmesser für 50% des Kollektivs |
| X ₉₀ | Partikeldurchmesser für 90% des Kollektivs |
| X ₉₉ | Partikeldurchmesser für 99% des Kollektivs |

7.2 LISTE DER VERWENDETEN SUBSTANZEN

| | |
|-------------------|--|
| Aceton | 99,5% Reinheit (HPLC-Qualität) J.T. Baker, Deventer, Niederlande |
| Acetonitril | 99,8% Reinheit (HPLC-Qualität) J.T. Baker, Deventer, Niederlande |
| Aqua bidestillata | frisch hergestellt aus hauseigener Anlage FinnAqua 75-E-4, FinnAqua, Helsinki, Finnland |
| Brij 35 | ICI Specialty Chemicals, Essen, Deutschland |
| Ethanol absolut | 99,8% Reinheit Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Glycerol | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| HCl | konzentrierte Salzsäure 36-38% J.T. Baker, Deventer, Niederlande |
| HPMC 50 | Hydroxypropylmethylcellulose, Metolose 60SH-50 Shin-Etsu Chemical Company, Tokio, Japan |
| HPMC-Kapseln | Größe 3 Qualicaps, Alcobendas, Spanien |
| Humaninsulin | 28,4 IE/mg Wanbang Biochemical Pharmaceutical Co., Xuzhou, China |

| | |
|--------------------------|---|
| Isopropanol | 99,8% Reinheit (HPLC-Qualität) AppliChem, Darmstadt, Deutschland |
| KH_2PO_4 | Kaliumdihydrogenphosphat Merck, Darmstadt, Deutschland |
| L-Leucin | Sigma Chemical Company, St. Louis, USA |
| Mannitol | Pearlitol 200 SD Roquette, Lestrem, Frankreich |
| Methanol | 99,8% Reinheit (HPLC-Qualität) J.T. Baker, Deventer, Niederlande |
| Miglyol 812 | Neutralöl Sasol Germany GmbH, Witten, Deutschland |
| NaOH | Natriumhydroxid Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Na_2SO_4 | Natriumsulfat Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Rinderserumalbumin | Albumin Fraction V Merck, Darmstadt, Deutschland |

8 Literaturverzeichnis

- Agu, R. U., Ugwoke, M. I., (2001), The lung as a route for systemic delivery of therapeutic proteins and peptides. *Resp. Res.*, 2.
- Amidi, M., Pellikaan, H. C., de Boer, A. H., (2008), Preparation and physicochemical characterization of supercritically dried insulin-loaded microparticles for pulmonary delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 68, 191-200.
- Anderson, P. J., (2001), Delivery options and devices for aerosolized therapeutics. *Chest*, 120(3 Suppl), 89S-93S.
- Banting, F., Best, C., Collip, J., Campbell, W., Fletcher, A., (1922), Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. *Can. Med. Assoc. J.* , 12, 141–146.
- Barisch, S., (2009), Einfluss von Kryoprotektoren auf Hydroxyethylstärkebasierte Hydrogele als Drug Delivery Systeme für die kontrollierte Freisetzung von Proteinen. Eberhard Karls Universität, Tübingen.
- Barnett, A. H., (2004), Exubera inhaled insulin: a review. *Int. J. Clin. Pract.*, 54, 394-401.
- Berard, V., Lesniewska, E., Andres, C., Pertuy, D., Laroche, C., Pourcelot, Y., (2002), Affinity scale between a carrier and a drug in DPI studied by atomic force microscopy. *Int. J. Pharm.*, 247, 127-137.
- Bergeron, L., Filobelo, L. F., Galkin, O., (2003), Thermodynamics of the Hydrophobicity in Crystallization of Insulin. *Biophys. J.*, 85, 3935-3942.
- Bhat, R., Timasheff, S. N., (1992), Steric exclusion is the principal source of the preferential hydration of proteins in the presence of polyethylene glycols. *Prot. Sci.*, 1(9), 1133-1143.
- Bocian, W., Sitkowski, J., Bednarek, E., (2008), Structure of human insulin monomer in water/acetonitrile solution. *J. Biomol. NMR*, 40, 55-64.

- Bosquillon, C., Lombry, C., (2001), Influence of formulation excipients and physical characteristics of inhalation dry powders on their aerosolization performance. *J. Contr. Rel.*, 70, 329-339.
- Bosquillon, C., Rouxhet, P., Ahimou, F., (2004), Aerosolization properties, surface composition and physical state of spray-dried protein powders. *J. Contr. Rel.*, 99, 357-367.
- Brain, J. D., (2005), Unlocking the opportunity of tight glycaemic control. Inhaled insulin: safety. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 7, 14-18.
- Brange, J., Havelund, S., Hougaard, P., (1992), Chemical Stability of Insulin. 2. Formation of Higher Molecular Weight Transformation Products during Storage of Pharmaceutical Preparations. *Pharm. Res.*, 9, 727-734.
- Bryant, C., Spencer, D. B., Miller, A., Bakaysa, D. L., McCune, K. S., Maple, S. R., Pekar, A. H., Brems, D. N., (1993), Acid stabilization of insulin. *Biochem.*, 32, 8075-8082.
- Carpenter, J.F., Crowe, J.H., (1988), The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes *Cryobiology*, 25, 244-255.
- Castellanos, A., Valverde, J.M., Pérez, A.T., (1999), Flow regimes in fine cohesive powders. *Phys. Rev. Letters*, 82(6), 1156-1159.
- Chandler, S. G., Illum, L., Thomas, N. W., (1991), Nasal absorption in rats. II, Effect of enhancers on insulin absorption and nasal histology. *Int. J. Pharm.*, 76(1-2), 61-70.
- Charlesworth, D. H., Marshall, W. R., (1960), Evaporation from drops containing dissolved solids. *AIChE J.*, 6, 9-23.
- Chew, N. Y. K., Chan, H.-K., (2002), The Role of Particle Properties in Pharmaceutical Powder Inhalation Formulations. *J. Aerosol Med.*, 15, 325-330.
- Chow, A. H. L., Tong, H. H. Y., Chattopadhyay, P., Shekunov, B.Y., (2007), Particle Engineering for Pulmonary Drug Delivery. *Pharm. Res.*, 24(3), 411-437.

- Crane, C.W., Luntz, G.R., (1968), Absorption of insulin from the human small intestine. *Diabetes*, 17(10), 625–627.
- Damgé, C., Pinto Reis, C., Maincent, P., (2008), Nanoparticle strategies for the oral delivery of insulin. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 5(1), 45-68.
- de Boer, A. H., Hagedoorn, P., Westerman, E. M., Le Brun, P. P. H., Heijerman, H. G. M., Frijlink, H. W., (2006a), Design and in vitro performance testing of multiple air classifier technology in a new disposable inhaler concept (Twincer®) for high powder doses. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 28, 171-178.
- de Boer, A.H., Gjaltema, D., Hagedoorn, P., Schaller, M., Witt, W., Frijlink, H.W., (2002a), Design and application of a new modular adapter for laser diffraction characterization of inhalation aerosols. *Int. J. Pharm.*, 249, 233-245.
- de Boer, A.H., Gjaltema, D., Hagedoorn, P., Frijlink, H.W. , (2002), Characterization of inhalation aerosols: a critical evaluation of cascade impactor analysis and laser diffraction technique. *Int. J. Pharm.*, 249, 219-231.
- de Boer, A.H., Hagedoorn, P., Westerman, E.M., Le Brun, P.P.H., Heijerman, H.G.M., Frijlink, H.W. , (2006), Design and in vitro performance testing of multiple air classifier technology in a new disposable inhaler concept (Twincer®) for high powder doses. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 28, 171-178.
- de Boer, A.H., Hagedoorn, P., Gjaltema, D., Goede, J., Frijlink, H.W., (2006b), Air classifier technology (ACT) in dry powder inhalation Part 3. Design and development of an air classifier family for the Novolizer® multi-dose dry powder inhaler. *Int. J. Pharm.*, 310, 72-80.
- de Boer, A.H., Hagedoorn, P., Gjaltema, D., Goede, J., Frijlink, H.W., (2006c), Air classifier technology (ACT) in dry powder inhalation Part 4. Performance of air classifier technology in the Novolizer® multi-dose dry powder inhaler. *Int. J. Pharm.*, 310, 81-89.

- de Boer, A.H., Le Brun, P.P.H., van der Woude, H.G., Hagedoorn, P., Heijerman, H.G.M., Frijlink, H.W., (2002b), Dry powder inhalation of antibiotics in cystic fibrosis therapy, part 1: development of a powder formulation with colistin sulfate for a special test inhaler with an air classifier as deagglomeration principle. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 54, 17-24.
- de Waard, H., Hinrichs, W. L. J., Frijlink, H. W., (2008), A novel bottom-up process to produce drug nanocrystals: Controlled crystallization during freeze-drying. *J. Contr. Rel.*, 128, 179-183.
- DeFronzo, R. A., Bergenstal, R. M., (2005), Efficacy of Inhaled Insulin in Patients With Type 2 Diabetes not Controlled With Diet and Exercise. *Diabetes Care*, 28, 1922-1928.
- Derewenda, U., Derewenda, Z., Dodson, G. G., (1989), Molecular structure of insulin: The insulin monomer and its assembly. *Brit. Med. Bull.*, 45, 4-18.
- Douroumis, D., Fahr, A., (2006), Nano- and microparticulate formulations of poorly water-soluble drugs by using a novel optimized technique. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 63, 173-175.
- Drejer, K., Vaag, A., Bech, K., Hansen, P., Sorensen, A.R., Mygind, N., (1992), Intranasal administration of insulin with phospholipid as absorption enhancer: pharmacokinetics in normal subjects. *Diabet. Med.*, 9(4), 335-340.
- Edsbäcker, S., Wollmer, P., Selroos, O., Borgström, L., (2007), Do airway clearance mechanisms influence the local and systemic effects of inhaled corticosteroids? *Pulm. Pharmacol. Ther.*, doi:10.1016/j.pupt.2007.08.005.
- Edwards, D. A., (2002), Delivery of Biological Agents by Aerosols. *AICHE J.*, 48 (1), 2-6.
- Elversson, J., Millqvist-Fureby, A., Alderborn, G., Elofsson, U., (2003), Droplet and Particle Size Relationship and Shell Thickness of Inhalable Lactose Particles during Spray Drying. *J. Pharm. Sci.*, 92(4), 900-910.

-
- Engelhardt, H., (1977), Hochdruckflüssigkeitschromatographie (Vol. 2). Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag.
- Feeley, J.C., York, P., Sumbly, B.S., (1998), Determination of surface properties and flow characteristics of salbutamol sulphate, before and after micronisation. *Int. J. Pharm.*, 172, 89-96.
- Freitas, R. A., (2005), What Is Nanomedicine? *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 1, 325-341.
- French, D. L., Edwards, D.A., Niven, R.W., (1996), The influence of formulation of emission, deaggregation and deposition of dry powders for inhalation. *J. Aerosol. Sci.*, 27, 769-783.
- Frijlink, H. W., de Boer, A. H., (2005), Trends in the technology-driven development of new inhalation devices. *Drug Discovery Today: Technologies*, 2, 47-57.
- Gänsslen, M., (1925), Über Inhalation von Insulin. *Klinische Wochenschrift*, 4, 71.
- Garg, S.K., Carmain, J.A., Braddy, K.C., Anderson, J.H., Vignati, L., Jennings, M.K., Chase, H.P., (1996), Pre-meal Insulin Analogue Insulin Lispro vs Humulin® R Insulin Treatment in Young Subjects with Type 1 Diabetes. *Diabet. Med.*, 13(1), 47-52.
- Gonda, I., (2000), The Ascent of Pulmonary Drug Delivery. *J. Pharm. Sci.*, 89, 940-945.
- Gonda, I. (2003). Targeting by Deposition. In Hickey, A. J. (Ed.), *Pharmaceutical Inhalation Aerosol Technology*, Second Edition: Informa Healthcare, USA.
- Gonda, I. (2007). Peptides and Proteins: Pulmonary Absorption. In *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* (pp. 2731-2738): Informa Healthcare USA.
- Gwinn, M. R., Vallyathan, V., (2006), Nanoparticles: Health Effects—Pros and Cons. *Environmental Health Perspectives*, 114.
- Hallé, J. P., Lambert, J., Lindmayer, I., Menassa, K., Coutu, F., Moghrabi, A., Legendre, L., Legault, C., Lalumière, G., (1986), Twice-daily

- mixed regular and NPH insulin injections with new jet injector versus conventional syringes: pharmacokinetics of insulin absorption. . *Diabetes Care*, 9(3), 279-282.
- Haverkamp, V., Ehrfeld, W., Gebauer, K., Hessel, V., Löwe, V., Richter, T., Wille, C., (1999), The potential of micromixers for contacting of disperse liquid phases. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 364, 617-624.
- Heinemann, L., Traut, T., Heise, T., (1997), Time-action profile of inhaled insulin. *Diabet. Med.*, 14(1), 63-72.
- Heller, S., Kozlovski, P., Kurtzhals, P., (2007), Insulin's 85th anniversary—An enduring medical miracle. *Diabet. Res. Clin. Pract.*, 78, 149–158.
- Hessel, V., Löwe, H., Schönfeld, F., (2005), Micromixers - a review on passive and active mixing principles. *Chem. Eng. Sci.*, 60, 2479-2501.
- Hickey, A.J., Martonen, T. B., Yang, Y., (1996), Theoretical relationship of lung deposition to the fine particle fraction of inhalation aerosols. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 71(3), 185-190.
- Hollander, P. A., Blonde, L., (2004), Efficacy and Safety of Inhaled Insulin (Exubera) Compared With Subcutaneous Insulin Therapy in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, 27, 2356-2362.
- Horn, D., Rieger, J. (2001). *Organische Nanopartikel in wässriger Phase - Theorie, Experiment und Anwendung. Angewandte Chemie*, 113, 4460-4492.
- Hrkach, J., Batycky, R., Chen, D., Deaver, D., Elbert, K., Johnston, L., Kovalesky, R.A., Nice, J., Schmitke, J., Stapleton, K., Edwards, D., (2000), AIR insulin: complete diabetes therapy via inhalation of fast-acting and slow-acting dry powder aerosols (Abstract). *Diabetes*, 49(1), A37.
- ICH. (2003). *Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2): International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.*

-
- Ikegami, K., Kawashima, Y., Takeuchi, H., (2002), Primary crystal growth during spherical agglomeration in liquid: designing an ideal dry powder inhalation system. *Powder Tech.*, 126, 266-274.
- Jacob, S., Shirwaikar, A. A., Srinivasan, K. K., Alex, J., Prabu, S. L., Mahalaxmi, R., Kumar, R., (2006), Stability of proteins in aqueous solution and solid state. *Indian J. Pharm. Sci.*, 68, 154-163.
- Jähnisch, K., Hessel, V., Löwe, H., Baerns, M., (2004), Chemie in Mikrostrukturreaktoren. *Angew. Chem.*, 116, 410-451.
- James, D. E., Jenkins, A. B., Kraegen, E. W., (1981), Insulin Precipitation in Artificial Infusion Devices. *Diabetologia*, 21, 554-557.
- Klappoth, W., (2001), Bioverfügbarkeit und metabolische Wirkung von inhalativ appliziertem Insulin/Natrium-Taurocholat. Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Kleinstreuer, C., Zhang, Z, Li Z., Roberts, W. L., Rojas, C., (2008), A new methodology for targeting drug-aerosols in the human respiratory system. *Int.J. Heat and Mass Transfer*, 51, 5578–5589.
- Klonoff, D. C., (1999), Inhaled Insulin. *Diabetes Technol. Ther.*, 1(3), 307-313.
- Kocbek, P., Baumgartner, S., Kristl, J., (2006), Preparation and evaluation of nanosuspensions for enhancing the dissolution of poorly soluble drugs. *Int. J. Pharm.*, 312(1-2), 179-186.
- Kromidas, S., (2006), HPLC richtig optimiert (Vol. 1). Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Kumar, V., Sharma, V. K., Kalonia, D. S., (2009), Effect of polyols on polyethylene glycol (PEG)-induced precipitation of proteins: Impact on solubility, stability and conformation. *Int. J. Pharm.*, 366, 38-43.
- Kwon, J.-H., Lee, B.-H., Lee, J.-J., Kim, C.-W., (2004), Insulin microcrystal suspension as a long-acting formulation for pulmonary delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 22, 107-116.
- Laube, B. L. , (2001), Treating diabetes with aerosolized insulin. *Chest*, 120, 99S–106S.
-

- Lee, H.-K., Kwon, J.-H., Park, S.-H., Kim, C.-W., (2006), Insulin microcrystals prepared by the seed zone method. *J. Crystal Growth*, 293, 447-451.
- Lind, B., (2004), Mehrwert gefragt - Komfort und Sicherheit bei pharmazeutische Primärverpackungen (Teil 2). *Pharma + Food*, 5, 22-24.
- Lippmann, M., Lee, D.H.K., Falk, H.L., Murphy, S.O. , Geiger, S.R. (Eds.). (1977). Regional deposition of particles in the human respiratory tract. In *Handbook of Physiology, Reaction to Environmental Agents*: American Physiological Society.
- Löffler, G., Petrides, P. E., (2003), *Biochemie & Pathobiochemie (Vol. 7)*: Springer.
- Lohrmann, M., (2005), *Adhäsionskräfte in interaktiven Mischungen für Pulverinhalatoren*. Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität.
- Lucas, P., Anderson, K., Potter, U.J., Staniforth, J.N., (1999), Enhancement of Small Particle Size Dry Powder Aerosol Formulations using an Ultra Low Density Additive. *Pharm. Res.*, 16(10), 1643-1647.
- Maa, Y.-F., Nguyen, P.-A., (1998), Effect of Spray Drying and Subsequent processing conditions on Residual Moisture Content and Physical/Biochemical Stability of Protein Inhalation Powders. *Pharm. Res.*, 15, 768-775.
- Maa, Y.-F., Nguyen, P.-A., Sweeney, T., (1999), Protein Inhalation Powders: Spray Drying vs Spray Freeze Drying. *Pharm. Res.*, 16, 249-254.
- Marple, V. A., Roberts, D. L., Romay, F. J., (2003), Next generation pharmaceutical impactor (a new impactor for pharmaceutical inhaler testing). Part I: Design. *J. Aerosol. Med.*, 16(3), 283-299.
- McElduff, A., Mather, L. E., Kam, P. C., Clauson, P., (2005), Influence of acute upper respiratory tract infection on the absorption of inhaled insulin using the AERx® insulin Diabetes Management System. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 59, 546-551.

- Merisko-Liversidge, E., McGurk, S. L., Liversidge, G. G., (2004), Insulin Nanoparticles: A Novel Formulation Approach for Poorly Water Soluble Zn-Insulin. *Pharm. Res.*, 21, 1545-1553.
- Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H.K., Schäfer-Korting, M., (2001), *Arzneimittelwirkungen* (Vol. 8): Wissenschaftliche Verlagsgemeinschaft mbH Stuttgart.
- Najafabadi, A. R., Gilani, K., (2004), 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, 97-108.
- Newhouse, M. T., (1999), Tennis anyone? The lungs as a new court for systemic therapy. *Can. Med. Assoc. J.*, 161(10), 1287-1288.
- Okamoto, H., Todo, H., Iida, K., Danjo, K., (2002), Dry Powders for Pulmonary Delivery of Peptides and Proteins. *KONA*, 20, 71-83.
- Pang, Y., Sakagami, M., Byron, P. R., (2007), Insulin Self-association: Effects on Lung Disposition Kinetics in the Airways of the Isolated Perfused Rat Lung (IPRL). *Pharm. Res.*, 24, 1636-1644.
- Parhofer, K. (2004). Was gibt es Neues in der Insulintherapie? *Münchener Medizinische Wochenschrift - Fortschritte der Medizin*, 12, 41-44.
- Park, S.-H., Kwon, J.-H., Lim, S.-H., (2007), Characterization of human insulin microcrystals and their absorption enhancement by protease inhibitors in rat lungs. *Int. J. Pharm.*, 339, 205-212.
- Patton, J. S., Bukar, J., Nagarajan, S., (1999), Inhaled insulin. *Adv. Drug. Del. Rev.*, 35, 235-247.
- Patton, J. S., Fishburn, C. S., Weers, J. G., (2004), The Lungs as a Portal of Entry for Systemic Drug Delivery. *Proc. Am. Thorac. Soc.*, 1, 338-344.
- Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe. (2006a). *Gebrauchsinformation EXUBERA®* (pp. 23).

- Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe. (2006b). Therapiealternative bei Diabetes mellitus - Keine Angst mehr vor "der Spritze". *Notfall & Hausarztmedizin*, 32, 352.
- Pichert, L., (2006), Wirkstoffkristallisate und proliposomal verkapselte Wirkstoffe aus überkritischer Gasphase. Christian-Albrechts-Universität, Kiel.
- Pikal, M. J., Rigsbee, D. R., (1997), The stability of insulin in crystalline and amorphous solids: observation of greater stability for the amorphous form. *Pharm. Res.*, 14(10), 1379-1387.
- Pinto Reis, C., Ribeiro, A. J., Houg, S., Veiga, F., Neufeld, R. J., (2007), Nanoparticulate delivery system for insulin: Design, characterization and in vitro/in vivo bioactivity. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 30, 392-397.
- Rabbani, N. R., Seville, P. C., (2005), The influence of formulation components on the Aerosolisation properties of spray-dried powders. *J. Contr. Rel.*, 110, 130-140.
- Rasenack, N., (2003), Optimierung physikochemischer Arzneistoffeigenschaften durch Verfahren zur kontrollierten Kristallisation. Christian-Albrechts-Universität, Kiel.
- Rasenack, N., Müller, B.W., (2004a), Micron-size drug particles: common and novel micronization techniques. *Pharm. Dev. Technol.*, 9, 1-13.
- Rasenack, N., Steckel, H., Müller, B. W., (2003), Micronization of Anti-Inflammatory Drugs for Pulmonary Delivery by a Controlled Crystallization Process. *J. Pharm. Sci.*, 92, 35-44.
- Rasenack, N., Steckel, H., Müller, B. W., (2004b), Preparation of microcrystals by in situ micronisation. *Powder Technology*, 143-144, 291-296.
- Rave, K., Heise, T., Pfützner, A., Boss, A. H., (2007), Coverage of Postprandial Blood Glucose Excursions With Inhaled Technosphere Insulin in Comparison to Subcutaneously Injected Regular Human Insulin in Subjects With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, 30, 2307/2308.

- Rave, K., Nosek, L., Heinemann, L., Gonzales, C., Ernest, C. S., Chien, J., Muchmor, D., (2004), Inhaled micronized crystalline human insulin using a dry powder inhaler: dose-response and time-action profiles. *Diabet. Med.*, 21, 763–768.
- Redeker, D. (2003). Zerkleinerung - Eine uralte Technologie und immer noch eine Herausforderung. *Chemie Ingenieur Technik*, 75, 1438-1442.
- Rehman, M., Kippax, P., York, P., (2003), Particle engineering for improved dispersion in dry powder inhalers. *Pharm. Tech. Eur.*, sept, 34-39.
- Rivero, A. T., Müller, B. W., (1999), Monomeric stabilization of insulin in solution. *Pharmazie*, 54, 603-610.
- Rosenstock, J., Bergenstal, R., DeFronzo, R.A., (2008), Efficacy and safety of Technosphere inhaled insulin compared with Technosphere powder placebo in insulin-naïve type 2 diabetes suboptimally controlled with oral agents. *Diabetes Care*, 31, 2177-2182.
- Sahyun, M., Goodell, M., Nixon, A., (1936), Factors influencing the stability of insulin. *J. Biolog. Chem.*, 685-691.
- Sarmiento, B., al., et, (2007), Oral bioavailability of insulin contained in polysaccharide nanoparticles. *Biomacromolecules*, 8(10), 3054-3060.
- Sasson, Y., Levy-Ruso, G., Toledano, O., Ishaaya, I., (2007), *Insecticides Design Using Advanced Technologies*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Schenk, R., Hessel, V., Werner, B., (2002), Micromixers as Tool for Powder Production. *Chemical Engineering Transactions*, 1, 909-914.
- Schenk, R., Hessel, V. (2004). Nanopowders Produced Using Microreactors. In Nalwa, H. S. (Ed.), *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology* (Vol. 7, pp. 287-296): American Scientific Publishers.

- Schenk, R., Hessel, V., Hofmann, C., (2004), Numbering-up of micro devices: a first liquid-flow splitting unit. *Chem. Eng. J.*, 101, 421-429.
- Scherließ, H., (2008), Wässrige Nanosuspensionen zur pulmonalen Applikation. Christian-Albrechts-Universität, Kiel.
- Schilling, R.J., Mitra, A.K., (1991), Degradation of insulin by trypsin and alpha-chymotrypsin. *Pharm. Res.* , 8(6), 721-727.
- Schmidt, P.C., Weyhing, K., (2005), Pulverinhalate aus der Nähe betrachtet. *DAZ*, 145(20), 68-75.
- Scholze, A., (2005), Angst vor Insulintherapie bei Typ-2-Diabetikern. Otto-Friedrich-Universität, Bamberg.
- Schöttle, I. A., (2006), Sprühgetrocknete Polylaktid, Poly(laktid-co-glykolid) Mikropartikel zur Steuerung der Freisetzung aus pulmonalen Arzneiformen. Universität Mainz, Mainz.
- Seville, P.C., Learoyd, T. P., Li, H.-Y., (2007), Amino acid-modified spray-dried powders with enhanced aerosolisation properties for pulmonary drug delivery. *Powder Technology*, 178, 40-50.
- Sham, J. O.-H., Zhang, Y., Finlay, W. H., Roa, W. H., Löbenberg, R., (2004), Formulation and characterization of spray-dried powders containing nanoparticles for aerosol delivery to the lung. *Int. J. Pharm.*, 269, 457–467.
- Shoyele, S. A., Slowey, A., (2006), Prospects of formulating proteins/peptides as aerosols for pulmonary drug delivery. *Int. J. Pharm.*, 314, 1-8.
- Sievers, R.E., Huang, E.T.S., Villa, J.A., Kawamoto, J.K., Evans, M.M., Brauer, P.R., (2001), Low-temperature manufacturing of fine pharmaceutical powders with supercritical fluid aerosolization in a Bubble Dryer®. *Pure Appl. Chem.* , 73(8), 1299-1303.
- Sievers, R.E., Huang, E.T.S., Villa, J.A., Engling, G., Brauer, P.R., (2003), Micronization of water-soluble or alcohol-soluble pharmaceuticals

- and model compounds with a low-temperature Bubble Dryer(r). *J. Supercrit. Fluids*, 26, 9-16.
- Simon, M., Kissel, T. (2001). Nicht-invasive Applikationsrouten für Insulin: Mehr Lebensqualität für Diabetiker? *Pharm. i. u. Z.*, 2, 136-141.
- Stahl, K., Claesson, M., Lilliehorn, P., Lindén, H., Bäckström, K., (2002), The effect of process variables on the degradation and physical properties of spray dried insulin intended for inhalation. *Int. J. Pharm.*, 233, 227-237.
- Steiner, S., Pfützner, A., Wilson, B. R., Harzer, O., Heinemann, L., Rave, K., (2002), Technosphere/Insulin - proof of concept study with a new insulin formulation for pulmonary delivery. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, 110, 17-21.
- Telko, M.J., Hickey, J.A., (2005), Dry Powder Inhaler Formulation. *Resp. Care*, 50(9), 1209-1227.
- Texter, J., (2001), Precipitation and Condensation of Organic Particles. *J. Disp. Sci*, 22(6), 499-527.
- Thippawong, J., Otulana, B., Clauson, P., Okikawa, J., Farr, S.J., (2002), Pulmonary insulin administration using the AERx® insulin diabetes system *Diabetes Technol. Ther.*, 4, 449-504.
- Timasheff, S.N., (1998), Control of protein stability and reactions by weakly interacting cosolvents: the simplicity of the complicated. *Advances in Protein Chemistry*, 51, 355-432.
- Todo, H., Okamoto, H., Iida, K., Danjo, K., (2004), Improvement of stability and absorbability of dry insulin powder for inhalation by powder-combination technique. *Int. J. Pharm.*, 271, 41-52.
- van Drooge, D.-J., Hinrichs, W. L. J., Dickhoff, B. H. J., Elli, M. N. A., Visser, M. R., Zijlstra, G. S., Frijlink, H. W., (2005), Spray freeze drying to produce a stable 9-tetrahydrocannabinol containing inulin-based solid dispersion powder suitable for inhalation. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 26, 231-240.

- Voigt, R., (2000), Pharmazeutische Technologie (Vol. 9): Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart.
- von Wichert, G., von Wichert, P., (2006), Möglichkeiten und Probleme der Applikation von systemisch wirksamen, höhermolekularen Wirkstoffen mittels Inhalation. Medizinische Klinik, 101, 718-723.
- Westermann, E.M., de Boer, A.H., Le Brun, P.P., Touw, D.J., Frijlink, H.W., Heijerman, H.G., (2007), Dry powder inhalation of colistin sulphomethate in healthy volunteers: A pilot study. Int. J. Pharm., 355(1-2), 41-45.
- Westmeier, R., (2008), Inhalative Kombinationspräparate durch Co-Präzipitation. Christian-Albrechts-Universität, Kiel.
- White, J. R., Campbell, R. K., (2001), Inhaled Insulin: An Overview. Clinical Diabetes, 19, 13-16.
- Wolf, B. (2005). Pharmazeutische Technologie - Pharmazeutisch-technologische Grundoperationen – 2. Zerkleinern, Mahlen Magdeburg.
- You, Y., Zhao, M., Liu, G., Tang, X., (2007), Physical characteristics and aerosolization performance of insulin dry powders for inhalation prepared by a spray drying method. J. Pharm. Pharmacol., 59(7), 927-934.
- Zhou, J., Kang, Z. M., Xie, Q. M., Liu, C., Lou, S. J., Chen, Y. Z., Jiang, C. L., (2003), Rapid nongenomic effects of glucocorticoids on allergic asthma reaction in the guinea pig. J. Endocrinol., 177(1), R1-4.

DANKSAGUNG

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Dr. h.c. B.W. Müller für die herzliche Aufnahme in den Arbeitskreis und die Freiheit, mein Promotionsthema nach meinen Wünschen gestalten zu können. Von seiner fachlichen Kompetenz und seiner Bereitschaft, das Institut auf dem neuesten technologischen Stand zu halten, konnte ich sehr profitieren.

Professor Dr. Steckel danke ich für die stets offene Tür und die konstruktive Auseinandersetzung mit meiner Arbeit, ebenso für das Korrekturlesen derselben.

Nach der Marktrücknahme des Exubera[®] war es nahezu unmöglich, Drittfirmen für die inhalative Insulinapplikation zu begeistern, so dass das Projekt mangels Rohstoff kurz vor dem Abbruch stand. Wir sind daher der Firma Rafarma (Lipetsk, Russland) und ihrem Direktor V. Ageev besonders dankbar, dass sie die Fortführung dieser Arbeit durch Zurverfügungstellen einer entsprechenden Insulinmenge ermöglicht hat.

Anne de Boer und Paul Haagedorn danke ich für die freundliche Aufnahme in Groningen und die kompetente Einführung in den Umgang mit dem Twincer und dem Inhaler-Modul. Thanks for kissing the cook!

Beim Eintritt in diesen Arbeitskreis war ich darauf gefasst, mit einigen Kollegen besser und mit anderen eher schlechter auszukommen, aber ich hätte niemals gedacht, dass ich zwei Menschen treffe, die zu so guten Freunden werden würden. Marieke und Christian, ich danke euch von Herzen für die vielen fröhlichen Stunden, die Aufmunterung in schlechten Zeiten, die ungezählten, gemeinsam vernichteten Tafeln Schokolade und einfach nur dafür, dass ihr da seid.

Durch eine glückliche Fügung stand mir Regina die ganze Promotionszeit über entweder als Laborkollegin, Korrekturleserin, bei fachlichen Fragestellungen aber auch für einen Klönschnack zwischendurch zur Verfügung, dankeschön! Mit Maren und Kiko verbindet mich die (teilweise) gemeinsam verbrachte Studienzeit und ich wünsche euch beiden für eure Arbeit alles Gute. Susanne hat sich nicht nur als gute Praktikumsbetreuungscollegin erwiesen sondern auch bei gemeinsamen Englischabenden nie den Humor verloren. Für die Zeit in den USA wünsche ich dir viel Glück – aber wer die englische Übersetzung von Backblech und Blumenkohl kennt, wird wohl keine Probleme haben! Janine danke ich für ihre unkomplizierte Art, mit der sie die Praktikumszeit für mich sehr erleichtert hat und den Arbeitskreis enorm bereichert. Jan sei gedankt für die schönen REM-Bilder.

Von den Altkollegen ist zunächst Steve zu nennen, der mich mit seinem Humor und Enthusiasmus für die Technologie begeistert hat. Vielen Dank dafür! Mit Thorsten habe ich viele vergnügliche Stunden an der Tablettenpresse zugebracht und auch sonst hat er mir sehr geholfen, mich hier einzuleben, danke. Ein Dank geht auch an Arne, der rechtzeitig vor dem Zusammenschreiben erkannt hat, dass ich hier an einer Datenverarbeitungsschildkröte arbeite und mir eine Hochleistungsmaschine besorgt hat☺. Tja, was soll ich zu Rüdi sagen? CoreIDRAW-Gott (auch unter Zeitdruck), immer auf dem neuesten kulturellen Stand, Wettrennen, wer wem die Tür aufhält, immer ein offenes Ohr und Original. Bleib so wie du bist!

Sven, du hattest es nicht immer leicht mit mir in dieser Zeit. Mit deinem unglaublichen Optimismus hast du mir sehr geholfen - vor allem in den Phasen, in denen ich selbst nicht mehr an mich geglaubt habe. Danke mein Schatz!

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern. Danke für eure Liebe, eure Unterstützung, euer Interesse an meiner Arbeit und dafür, dass ihr mir immer versichert habt, ich könne alles werden was ich wolle - selbst Zirkusdirektor.

LEBENS LAUF

NAME Claudia Klingler
GEBURTSDATUM 14.09.1981
GEBURTSORT Bad Segeberg
STAATSANGEHÖRIGKEIT deutsch

SCHULBILDUNG

1987-1991 Heinrich-Rantzau-Grundschule
Bad Segeberg
1991-2000 Städtisches Gymnasium Bad Segeberg
JUNI 2000 Abitur

STUDIUM

2000-2004 Studium der Pharmazie an der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
JULI 2002 1. Staatsexamen
NOVEMBER 2004 2. Staatsexamen

PRAKTISCHE AUSBILDUNG

DEZEMBER 2004 – MAI 2005 Lornsen-Apotheke, Kiel
JULI 2005 – DEZEMBER 2005 Anfertigung einer Diplomarbeit am
Institut für Pharmazeutische
Technologie und Biopharmazie der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
JANUAR 2006 3. Staatsexamen
Februar 2006 Diplom-Pharmazeutin, Titel der
Diplomarbeit: „Entwicklung einer
Dimethylfumarat-Retardtablette“
MÄRZ 2006 Approbation zur Apothekerin

PROMOTION

SEIT FEBRUAR 2006 am Institut für Pharmazeutische
Technologie und Biopharmazie der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Erklärung nach § 9 der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich gemäß § 9 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. Weiterhin habe ich 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.

Claudia Klingler