

Entwicklung einer Apparatur zur *in vitro* Testung der Wirkstofffreisetzung aus kolloidalen Arzneistoffträgern

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14 für Biochemie, Chemie und Pharmazie

der Johann Wolfgang Goethe - Universität

in Frankfurt am Main

Vorgelegt von

Christine Janas

aus Herne

Frankfurt am Main, 2019

(D 30)

Vom Fachbereich 14 für Biochemie, Chemie und Pharmazie der
Johann Wolfgang Goethe - Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:	Prof. Dr. Clemens Glaubitz
1. Gutachter:	Prof. Dr. Jennifer Dressman
2. Gutachter:	Prof. Dr. Matthias G. Wacker
Datum der Disputation:	19. Dezember 2019

**Für meine Familie,
die mich so weit gebracht hat.**

Es ist der Reiz des Lebens,
dass man nicht alles für selbstverständlich hält,
sondern noch bereit ist, sich zu wundern.

Loriot

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde unter Leitung von Frau Prof. Dr. Jennifer Dressman und Herrn Prof. Dr. Matthias Wacker am Institut für Pharmazeutische Technologie der Johann Wolfgang Goethe - Universität angefertigt.

Sowohl in fachlich wissenschaftlicher als auch in professioneller Hinsicht haben mich Jennifer Dressman und Matthias Wacker in meiner Zeit am Institut nachhaltig geprägt und gelenkt. Ihnen beiden gilt mein größter Dank - für die Chance, die sie mir geboten und das Vertrauen, welches sie mir geschenkt haben. Ich weiß die konstruktive und kollegiale Arbeitsatmosphäre, die mir im Institut zu Teil wurde, zu schätzen.

Ich bedanke mich außerdem herzlich für die intensive Unterstützung durch Herrn Markus van Tankeren und sein Team in der Werkstatt. Durch sein persönliches Engagement und seine Expertise wurde die Anfertigung diverser Prototypen möglich und wir konnten die Weiterentwicklung der Apparatur und die Machbarkeit neuer Ideen diskutieren und erproben.

Es gibt darüber hinaus viele andere, die zum Gelingen meiner Doktorarbeit auf fachlicher Ebene beigetragen haben. Ich möchte mich bedanken bei Samir Haddouchi von SPS Pharma Services in Orleans für die Ermöglichung der Freisetzungsexperimente am A4D, bei Frau Dr. Li Kirsamer für die mathematischen Berechnungen, bei Dr. Mukul Ashtikar für den Vorschlag der Gold-NP-Methode, bei Marc-Phillip Mast für die Unterstützung im Wahlpflichtfach, bei Carlo Angioni am Institut für Klinische Pharmakologie für die von ihm durchgeführten Messungen, bei Herrn Dr. Arno Wiehe, Herrn Dr. Volker Albrecht und Frau Dr. Susanna Gräfe für die Bereitstellung des Photosensibilisators und bei Herrn Björn Fähler, Herrn Dirk Beilke und der Pharma Test Apparatebau AG für die industrielle Weiterentwicklung der Freisetzungssapparatur.

Ein besonderes Dankeschön gilt auch den Mitarbeitern und ehemaligen Kollegen am Institut, allen voran meiner sehr geschätzten und treuen Laborpartnerin Susanne Beyer sowie Gerlinde Plöger, Simone Hansmann, Ina Rosenberger, Aaron Ruff, Julian Rosenberger, Cord Andreas, Laura Jablonka, Lisa Nothnagel, Mukul Ashtikar, Manuela Thurn, Fabian Jung, Elisabeth Herbert, Edmund Kostewicz, Andreas Koczvara, Christian Wagner, Mark Berlin, Sebastian Gaca, Miriam Dadpavar, Martin Hofsäß, Kalpa Nagarsekar, Hannelore Berger, Sylvia Niederdorf, Harald Kaufmann

und allen weiteren Institutsmitgliedern. Eure fachliche und teils auch tatkräftige Unterstützung, die durch euch geschöpfte Motivation sowie die große Kollegialität waren für mich von unschätzbarem Wert. Ich habe von euch viel gelernt und die Zeit mit euch sehr genossen.

Ich bedanke mich ebenfalls bei Herrn Prof. Dr. Jörg Kreuter, dessen Expertise ich während meines Studiums und in den ersten Jahren meiner Institutszugehörigkeit ebenfalls erfahren durfte.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an Tobias Schümmer für seine Korrekturen, seine Expertise und seine stets freundlichen Erinnerungen.

Mir ist bewusst, dass es ganz besondere Menschen gibt, ohne die das Gelingen dieser Dissertation undenkbar gewesen wäre. Menschen, die mir zunächst den Weg in das Pharmaziestudium ermöglicht haben. Menschen, die immer an mich geglaubt haben, die mir Abwesenheit und Zeitmangel verziehen haben und mich gelegentlich an wesentliche Prioritäten im Leben zu erinnern versuchen. Danke Mama und Papa. Danke an meinen wundervollen Mann Jacek und meine großartige Schwester Stefanie.

Melsungen, der 01. Dezember 2019

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung	11
1.1. Ziele der Arbeit.....	11
1.2. Einordnung kolloidaler Arzneiformen.....	12
1.2.1. Nanomaterialien im Verständnis der Behörden	12
1.2.2. Neue Therapieoptionen mittels wirkstoffbeladener Nanopartikel.....	12
1.2.3. Herstellung von polymeren Nanopartikeln	15
1.2.4. Wirkstofffreisetzung aus kolloidalen Arzneiformen im Kontext der zulassungsrelevanten Produktcharakterisierung	16
1.3. Dialyse-Methoden in der pharmazeutischen Forschung	17
1.3.1. Das Prinzip der Dialyse	17
1.4. Wirkstofffreisetzung aus kolloidalen Arzneistoffträgern	20
1.4.1. Anwendungsgebiete von Freisetzungstests pharmazeutischer Zubereitungen.....	20
1.4.2. Methoden für die Wirkstofffreisetzung aus kolloidalen Arzneiträgern	20
1.4.3. Medien für die Wirkstofffreisetzung aus kolloidalen Arzneiformen.....	27
1.4.4. Mathematische Auswertung von Freisetzungsdaten	29
1.5. Die verwendeten Modellarzneistoffe	30
2. Materialien und Methoden	34
2.1. Chemikalien	34
2.2. Geräte und Verbrauchsmaterialien	36
2.3. Mobile Phasen und Säulen für die HPLC und SEC.....	38
2.4. Freisetzungsmedien.....	39
2.5. Weitere Lösungsmittel.....	40
2.6. Analytik von Blutplasma und Serum.....	40
2.6.1. Proteingehalt	41
2.6.2. pH-Wert	42
2.6.3. Osmolalität.....	42

2.7.	Physiko-chemische Charakterisierung der Wirkstoffe	42
2.7.1.	Quantifizierung von mTHPC mittels HPLC-Analytik.....	42
2.7.2.	Photosensibilität von mTHPC	43
2.7.3.	Löslichkeit von mTHPC in Freisetzungsmitteln	44
2.7.4.	Quantifizierung von Flurbiprofen mittels HPLC und LC-MS/MS	45
2.7.5.	Löslichkeit von Flurbiprofen in Freisetzungsmitteln	46
2.7.6.	Stabilität von Flurbiprofen	47
2.7.7.	Quantifizierung von BSA.....	47
2.8.	Herstellung und Charakterisierung von Arzneizubereitungen	48
2.8.1.	Referenzformulierungen für die Freisetzung von mTHPC	48
2.8.2.	Herstellung mTHPC-beladener PLGA Nanopartikel	49
2.8.3.	Flurbiprofen-beladene PLA und PLGA Nanopartikel	51
2.8.4.	Flurbiprofen-beladene Eudragit® Nanopartikel	52
2.8.5.	Gefriertrocknung von Nanopartikeln	52
2.8.6.	Partikelgrößenbestimmung und Zetapotential	53
2.8.7.	Gravimetrische Bestimmung des Partikelgehaltes	54
2.8.8.	Flurbiprofengehalt der Nanopartikelsuspension	54
2.9.	Wirkstofffreisetzung mittels Dialysesack	55
2.10.	Der Dispersion Releaser	57
2.10.1.	Wirkstofffreisetzung mittels Dispersion Releaser Version 1	58
2.10.2.	Wirkstofffreisetzung mittels Dispersion Releaser Version 2.....	60
2.10.3.	Wirkstofffreisetzung mittels Dispersion Releaser Version 3.....	63
2.10.4.	Überprüfung des Dispersion Releasers auf Dichtigkeit.....	64
2.11.	Wirkstofffreisetzung mittels A4D in der Durchflusszelle	66
2.12.	Mathematische Auswertung der Freisetzungsprofile des DR V2	68
3.	Ergebnisse und Diskussion.....	75
3.1.	Charakterisierung der Wirkstoffe	75
3.1.1.	Photosensibilität von mTHPC	75

3.1.2.	Thermodynamische Löslichkeit von mTHPC	76
3.1.3.	Wiederfindung von mTHPC aus FBS-haltigen Proben	77
3.1.4.	Thermodynamische Löslichkeit von Flurbiprofen.....	78
3.1.5.	Stabilität von Flurbiprofen und Wiederfindung	78
3.2.	Charakterisierung der nanopartikulären Arzneiträger.....	79
3.2.1.	mTHPC-beladene PLGA Nanopartikel	79
3.2.2.	mTHPC-beladene PLGA Nanopartikel mit Chitosan-Überzug.....	82
3.2.3.	Flurbiprofen-beladene Nanopartikel.....	85
3.3.	Plasmaanalytik und Auswahl der Freisetzungsmethoden	89
3.4.	Freisetzungsexperimente mittels Dialysesack.....	91
3.5.	Permeationsexperimente im Dispersion Releaser: Entwicklung eines geeigneten Setups und Selektion der Medien.....	93
3.5.1.	Permeation von mTHPC im DR V1: Einfluss der FBS-Konzentration auf die Freisetzung von Foscan.....	93
3.5.2.	Permeation von Flurbiprofen im DR V2	96
3.5.3.	Permeation von mTHPC: DR V1 vs. DR V3	103
3.5.4.	Untersuchung des DR auf Dichtigkeit: Die BSA-Methode	105
3.5.5.	Überprüfung des DR auf Dichtigkeit: Die Methode mit Gold-Nanopartikeln.....	108
3.6.	Wirkstofffreisetzung aus polymeren Nanopartikeln im DR	112
3.6.1.	Freisetzung von mTHPC aus PLGA Nanopartikeln im DR V1	112
3.6.2.	Freisetzung von Flurbiprofen aus Nanopartikeln im DR V2	115
3.6.3.	Mathematische Interpretation von Freisetzungsprofilen	119
3.7.	Wirkstofffreisetzung von mTHPC im A4D.....	124
3.7.1.	Freisetzung von mTHPC aus der Referenzformulierung Foscan in 10% und 50% FBS.....	124
3.7.2.	Freisetzung von mTHPC aus der Referenzformulierung Temodextrin in 50% FBS.....	127

3.7.3. Freisetzung von mTHPC aus PLGA Nanopartikeln	128
4. Zusammenfassung und Ausblick	133
5. Anhang	136
5.1. Abkürzungsverzeichnis	136
5.2. Literaturverzeichnis	137
5.3. Abbildungsverzeichnis.....	142
5.4. Tabellenverzeichnis.....	144
6. Curriculum Vitae	147
7. Veröffentlichungen und Patente.....	150

1. Einführung

1.1. Ziele der Arbeit

Für die Wirkstofffreisetzung aus kolloidalen Arzneiträgern wie polymeren Nanopartikeln, Liposomen oder polymeren Mizellen hat sich bis zum heutigen Tag keine standardisierte Apparatur etablieren können [1]. Viele Hürden haben dazu beigetragen, dass oftmals vorhandene Technologien adaptiert werden oder experimentelle Methoden Anwendung finden, welchen es an einheitlichen Versuchsbedingungen mangelt. So werden beispielsweise die Methoden Blattrührer oder Drehkörnchen des Europäischen Arzneibuches (Ph. Eur.) mit Filtration mittels feinsten Spritzenvorsatzfilter (Porengröße maximal $0,1\ \mu\text{m}$) oder Zentrifugation kombiniert, um die gelöste von der kolloidalen Komponente des Arzneistoffes zu separieren. Diese Trennverfahren eignen sich jedoch nicht für liposomale Systeme, bzw. Zubereitungen derer beider Phasen flüssig sind. Darüber hinaus ist die Zentrifugation als Trennmethode zeitaufwändig und ein weiteres unerwünschtes Auflösen des Wirkstoffes während der Zentrifugation ist nicht auszuschließen. Ein modifiziertes Drehkörnchen, welches mit einer Dialysemembran versehen wurde, ist in der Literatur beschrieben [2], findet allerdings keine weit verbreitete Anwendung [3, 4]. Dahingegen hat ein Dialyse-Adapter (A4D) für die Durchflusszelle (Apparatur 4 des Ph. Eur.) es bereits in die kommerzielle Produktion geschafft [5, 6]. Ein flächendeckender Einsatz ist allerdings auch für diese Apparatur bislang ausgeblieben und so wird dieses Produkt nicht mehr vermarktet. Das entsprechende US-Patent gilt auf Grund der nicht bezahlten Jahresgebühr seit Januar 2017 als erloschen [7].

Mit diesem Hintergrund wurde der Dispersion Releaser als eine neuartige Möglichkeit, die Freisetzung von Arzneistoffen aus einem sehr breiten Spektrum an kolloidalen Arzneiformen zu testen, entwickelt. Der Dispersion Releaser und seine Anwendung wurden bereits im Jahr 2013 in Deutschland (DE 102013015522 (A1)) und im Folgejahr durch die PCT-Anmeldung (WO 2015039749 (A1)) auch in Europa (EP 3047267 (A1)) zum Patent angemeldet [8]. Über die Gerätekonstruktion hinaus war es Ziel der Dissertation, ein geeignetes Freisetzungsmedium zu etablieren, welches möglichst einfach und sicher ist und sich an die physiologischen Bedingungen nach Applikation der Arzneiform in den Blutkreislauf annähert. Zelluläre

Blutbestandteile, welche *in vivo* mit der Arzneiform wechselwirken können, sollten in diesem *in vitro* Setup nicht berücksichtigt werden.

1.2. Einordnung kolloidaler Arzneiformen

1.2.1. Nanomaterialien im Verständnis der Behörden

Im Sinn der europäischen Kommission werden Nanomaterialien als solche Stoffe klassifiziert, welche auf natürliche, beabsichtigte und auch unbeabsichtigte Weise Partikel enthalten, deren numerische Partikelgrößenverteilung eine über 50%-ige Fraktion an Partikeln im Maßstab von 10 bis 100 nm aufweist [9]. Dabei genügt es, wenn zumindest eine externe Dimension der Partikel in diesem Größenbereich liegt. In bestimmten Fällen, insbesondere bei Verdacht auf ein gesteigertes Sicherheitsrisiko, kann es außerdem genügen, wenn bereits eine geringere Partikelfraktion in diesen Größenbereich fällt (1-50%). Im Gegensatz dazu definiert die amerikanische Zulassungsbehörde explizit solche Produkte als Nanomaterialien, deren Herstellprozess auf Partikelgrößen oder innere Oberflächen im Bereich von 10 bis 100 nm abzielt. Zusätzlich fallen laut FDA auch solche Materialien unter diese Definition, deren Größe zwar auf den Bereich bis zu 1.000 nm eingestellt wurde, die aber dennoch physiko-chemische oder biologische Eigenschaften aufweisen, welche mit denen der Partikel im Bereich 10 bis 100 nm assoziiert werden [10]. Diese Definitionen treffen auch auf die im Rahmen dieser Doktorarbeit hergestellten kolloidalen Arzneiträger zu, sodass diese als Nanomaterialien angesehen werden.

1.2.2. Neue Therapieoptionen mittels wirkstoffbeladener Nanopartikel

Die gezielte Entwicklung und Anwendung kolloidaler Arzneiformen hat das Potential, die Resorption und Bioverfügbarkeit schwer löslicher Arzneistoffe zu verbessern und Körperregionen -wie beispielsweise das zentrale Nervensystem- zu erreichen [11, 12], welche andernfalls für viele Wirkstoffe nach systemischer Applikation nicht zugänglich sind. Darüber hinaus können diese Arzneiträger, die nach der Definition in Absatz 1.2.1 den Nanomaterialien zuzuordnen sind, passiv oder aktiv Wirkstoffe in Organen oder

tumorösen Geweben anreichern, um unerwünschte Arzneimittelwirkungen zu reduzieren [13]. Zu den berühmtesten Vertretern bereits zugelassener kolloidaler Arzneiformen gehören Abraxane[®], Caelyx[®], AmBisome[®] und Lipidil 145 One[®]. Abraxane[®] (Celgene) ist albumin-gebundenes Paclitaxel und wurde 2008 zugelassen. Es wird zur Therapie des metastasierenden Mammakarzinoms, des metastasierenden Adenokarzinoms des Pankreas sowie dem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom eingesetzt [14]. Caelyx[®] (Janssen-Cilag, US Handelsmarke: Doxil[®]) ist seit 1996 auf dem deutschen Markt verfügbar [15]. Es wird unter anderem eingesetzt zur Therapie des Mammakarzinoms bei Patientinnen mit erhöhtem kardialen Risiko. Durch die Einbettung des kardiotoxischen Doxorubicins in pegylierte Liposomen soll die Zirkulationsdauer des liposomalen Wirkstoffs und dessen passive Anreicherung im Tumorgewebe gesteigert und die Konzentration an freiem Doxorubicin im Blut gesenkt werden. Die sogenannte Pegylierung bewirkt das α -(2-[1,2-distearoyl-sn-glycero(3)phospho-oxy]ethylcarbamoyl)- ω -methoxypoly(oxy-ethylen)-40, welches als Natriumsalz eingesetzt wird und durch die Polyethylenglycolketten auf der Außenseite der Phospholipiddoppelmembran die Pharmakokinetik und Erkennung durch Oponine im Blutplasma modifiziert. Weitere Inhaltsstoffe des Caelyx[®] sind vollhydriertes Phosphatidylcholin aus Soja und Cholesterol. Bei AmBisome[®] (Gilead) handelt es sich um lyophilisiertes liposomales Amphotericin B zur Therapie systemischer Mykosen. AmBisome[®] ist seit 1996 in Deutschland und seit 1997 in den USA zugelassen. Die Liposomen bestehen aus hydriertem (3-sn-Phosphatidyl)cholin (Soja), Distearoylphosphatidylglycerol und Cholesterol [16]. Einige der liposomalen Arzneiformen sind trotz abgelaufenem Patentschutz bis heute in nur wenigen Regionen als generische Zubereitung verfügbar. Dies belegt eine komplexe Herstellung, Charakterisierung und Zulassung dieser Arzneiformklasse.

Mit Lipidil 145 One[®] wurde im Jahr 2004 von Mylan eine besonders schnell freisetzende orale Arzneiform auf dem deutschen Markt eingeführt, welche den Wirkstoff Fenofibrat als nanoskalige Wirkstoffkristalle enthält. Fenofibrat ist indiziert bei schwerer Hypertriglyceridämie. Der Wirkstoff ist stark lipophil (BCS Klasse II¹). Im Vergleich zum nicht nanonisierten Wirkstoff in Lipidil[®] 200 mg und Lipidil-TER[®] 160 mg konnte die Resorption verbessert werden, sodass die maximale

¹ BCS Klasse nach dem „*Biopharmaceutical Classification System*“, Klassifizierung von Arzneistoffen an Hand deren Löslichkeit in wässrigen Medien sowie der Permeabilität durch Membranen, BCS-Klasse 2: geringe Löslichkeit in wässrigen Medien und gute Permeabilitätseigenschaften durch Membranen.

Plasmakonzentration bereits nach 2-4 Stunden im Vergleich zu 4-5 Stunden für den nicht nanonisierten Wirkstoff im Blut messbar ist. Bei vergleichbarer „*Area under the curve*“ (AUC) wird darüber hinaus die Resorption des Fenofibrats im Gastrointestinaltrakt nicht von der Nahrungsaufnahme beeinflusst [17], wie es für den nicht nanonisierten Wirkstoff der Fall ist. Dieses Beispiel soll einen weiteren Einsatzort kolloidaler Arzneiformen im Kontrast zu den hoch komplexen parenteralen Arzneiformen der zuvor genannten Wirkstoffe repräsentieren.

Insbesondere in der Forschung und Entwicklung sind kolloidale Arzneimittel von großem Interesse und diese neuartigen Arzneisysteme müssen auf ihre Wirksamkeit, Sicherheit und Unbedenklichkeit hin überprüft werden. Von großem Interesse sind dabei vor allem klassische Liposomen, pegylierte Liposomen, polymere Nanopartikel natürlichen (Albumin) und synthetischen (zum Beispiel PLA, PLGA) Ursprungs, Lipidnanopartikel [18, 19] aus wasserunlöslichen Triglyceriden und polymere Mizellen [20], welche aus amphiphilen synthetischen Polymeren (zum Beispiel PEG-PLA) gebildet werden. Ein weiteres Beispiel für Nanopartikel aus Block-Copolymeren ist die von Bind Therapeutics entwickelte AccurinTM Technologie, ein PLA-PEG Copolymer, welches durch Ionenpaarung eine verbesserte Arzneistoffbindung und verlangsamte Freisetzung für AZD2811 zeigen konnte [21].

Dabei stellen die Gewebeverträglichkeit und die Elimination bzw. Bioabbaubarkeit der Materialien zwei der Hauptkriterien für die Auswahl eines geeigneten kolloidalen Trägers dar. Die Biodegradierung der synthetischen Polymere PLA und PLGA kann beispielsweise durch die Modifikation ihrer Molekülgröße, dem Monomerenverhältnis und der Endgruppe (freie Säure oder Ester) kontrolliert und variiert werden [22, 23]. Der Abbau von Nanopartikeln aus Albumin hingegen lässt sich auf molekularer Ebene weniger beeinflussen, da die Spaltung der Peptidbindungen im Albumin abhängig von pH-Wert und enzymatischer Aktivität *in vivo* ist. Während der Partikelherstellung kann die Stabilität dieser Partikel jedoch durch die Menge des eingesetzten Quervernetzungsreagenzes beeinflusst werden [24]. Als Vorteil bei der Verwendung von Albumin als kolloidalem Träger erweist sich seine äußerst gute Verträglichkeit *in vivo* und die Kapazität mittels der funktionellen Seitengruppen der Aminosäuren nicht-kovalente und auch kovalente Bindungen mit Arzneistoffen oder Antikörpern einzugehen, um so die Bindung des Wirkstoffs an seinen Träger zu verbessern oder

die Partikel mittels Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen in seinem Zielorgan anzureichern [25-27].

1.2.3. Herstellung von polymeren Nanopartikeln

Die Herstellung von polymeren Nanopartikeln erfolgt spezifisch entsprechend der Eigenschaften von Trägermaterial und Arzneistoff. Geht die Partikelherstellung vom Polymer aus, so ist die Löslichkeit von Polymer und Arzneistoff in wässrigen und organischen Lösungsmitteln der erste Indikator, welcher die Auswahl der Herstellmethode beeinflusst. Diverse Partikeleigenschaften wie die Partikelgröße und Morphologie sowie die Arzneistoffbeladung lassen sich durch Wahl der Herstellmethode und durch den gezielten Einsatz von Hilfsstoffen und Lösungsmitteln variieren [28]. Nanopartikel aus humanem Serumalbumin oder Gelatine lassen sich durch Desolvatisierung aus wässrigen Lösungen herstellen. Dazu wird das Makromolekül zunächst in Wasser oder einer wässrigen Arzneistofflösung gelöst. Durch Zugabe eines mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittels wird die Löslichkeit für das natürliche Polymer schrittweise gesenkt, bis sich kolloidale Präzipitate ausbilden. Hitzedenaturierung oder Quervernetzung der Aminogruppen mit beispielsweise Glutaraldehyd stabilisieren die Partikel, sodass sie nach einem Aufreinigungsschritt wieder in Wasser aufgenommen werden können, ohne dass sich die Partikelmatrix erneut auflöst. Der pH-Wert in der wässrigen Lösung, die Geschwindigkeit, mit der das Nicht-Lösemittel hinzugegeben wird, die Menge an Quervernetzungsreagenz oder die Dauer und Temperatur bei durchgeführter Hitzedenaturierung beeinflussen die physiko-chemischen Charakteristika wie Partikelgröße, Partikelgrößenverteilung, Stabilität und Aufnahmekapazität für Wirkstoffe [24, 29]. Die gezielte Wirkstoffanreicherung in Zielzellen durch die kovalente Bindung von Arzneistoffen oder Antikörpern über sogenannte Spacer an die funktionellen Gruppen der HSA Nanopartikel konnte bereits in der Zellkultur gezeigt werden [25, 27]. Auch Nanopartikel aus nicht wasserlöslichen Polymeren wie das Polymethacrylat können mittels Desolvatisierung hergestellt werden. Dazu wird das Polymer, in diesem Fall Eudragit® RS 100, in einem organischen mit Wasser mischbaren Lösungsmittel wie Aceton oder Ethanol gelöst und anschließend durch Wasserzugabe präzipitiert [30].

Neben diesen Methoden findet zur Herstellung polymerer Nanopartikel außerdem die Emulsions-Diffusions-Methode Anwendung [28, 30-33]. Diese Methode eignet sich beispielsweise für die Herstellung von Nanopartikeln aus den beiden wasserunlöslichen Polymeren Polymilchsäure (PLA) und Polymilch-co-glycolsäure (PLGA). Die Lösung des Polymers in einem organischen und nicht mit Wasser mischbaren Lösungsmittel wie Ethylacetat oder Dichlormethan wird in eine wässrige Stabilisatorlösung gegeben. Durch Verwendung eines Dispergierwerkzeugs entsteht eine feine Emulsion, aus der unter konstantem Rühren, meist über mehrere Stunden, die Evaporation des organischen Lösungsmittels erfolgt. Die Partikel härten somit in der inneren Phase der Emulsion aus und der während der Herstellung in die organische oder wässrige Phase gegebene Wirkstoff kann so in die Partikelmatrix eingebettet werden. Es liegt dabei in der Herstellmethode und den Eigenschaften der Polymere PLA und PLGA begründet, dass die Einbettung hydrophober im Vergleich zu hydrophilen Wirkstoffen für diese Polymere begünstigt ist [34-36].

1.2.4. Wirkstofffreisetzung aus kolloidalen Arzneiformen im Kontext der zulassungsrelevanten Produktcharakterisierung

Dass die Wirkstofffreisetzung zur Charakterisierung und Differenzierung kolloidaler Arzneiformen im Bereich der Forschung und Entwicklung ein viel genutztes -wenn auch nicht standardisiertes- Instrument darstellt, wird aus vielen Publikationen ersichtlich. In Publikationen soll zumeist gezeigt werden, dass der Wirkstoff innerhalb einer definierten Zeit vollständig aus seinem Träger freigegeben wird oder aber über einen längeren Zeitraum konstant freigesetzt wird.

Seitens der europäischen und US-amerikanischen Zulassungsbehörden gibt es jedoch bis heute keine finale Richtlinie, die zum einen die Durchführung von Freisetzungsforschungen für sämtliche kolloidale Arzneiformen fordert und darüber hinaus Vorgaben zur Versuchsdurchführung und Definition von Produktspezifikationen im Allgemeinen beinhaltet. Dies liegt vor allem daran, dass es bislang nur sehr wenige zugelassene kolloidale Arzneiformen auf dem Markt gibt und somit die Erfahrung zur Sicherheit und Unbedenklichkeit dieser Arzneiformen noch begrenzt ist. Eine vorläufige Richtlinie der FDA zu liposomalen Arzneiträgern [37]

fordert zwar die Freisetzungsprüfung für den liposomal gebundenen Wirkstoff, gibt jedoch keine Empfehlung für die zu verwendende Apparatur. Als FreisetzungsmEDIUM sollen laut dieser Richtlinie nach Möglichkeit biorelevante Medien eingesetzt werden.

Während die Untersuchung auf Wirkstofffreisetzung für perorale Arzneiformen zur Standardcharakterisierung zählt, hat sich dieser Test für kolloidale Arzneiträger noch nicht derart manifestieren können. Es ist jedoch eindeutig, dass jede Arzneiform, die den Arzneistoff als feste, ungelöste Komponente enthält, auf die Freisetzung hin überprüft werden muss [38]. Dabei ist jedoch auch wichtig, dass es häufig nicht möglich ist, die *in vitro* erhobenen Freisetzungsdaten auf die Wirkstofffreisetzung *in vivo* zu korrelieren [39]. Neben der Wirkstofffreisetzung herrscht aktuell weiterhin keine Klarheit darüber, in welchen Grenzen Produktspezifikationen für kolloidale Arzneiträger definiert werden sollten und welche weiteren physiko-chemischen Charakteristika und Messmethoden zu deren Bestimmung für die Zulassung dieser Arzneiformen gefordert sind. Zwar gelten für die Zulassung kolloidaler Arzneiformen die gleichen allgemeinen Anforderungen wie auch für andere Arzneiformen, dennoch ist insbesondere der US-amerikanischen Zulassungsbehörde bewusst, dass darüber hinaus spezifische Anforderungen definiert werden müssen [40].

1.3. Dialyse-Methoden in der pharmazeutischen Forschung

1.3.1. Das Prinzip der Dialyse

Das Wort Dialyse kommt aus dem Griechischen und steht für das Loslösen und Trennen von Teilchen. Nach dem Prinzip der Dialyse können gelöste Teilchen, welche auf Grund der Brown'schen Molekularbewegung in Lösung frei diffundieren, eine Dialysemembran entlang eines Konzentrationsgefälles passieren. Es handelt sich dabei um eine semipermeable Membran, welche aus natürlichen, halb-synthetischen oder synthetischen Materialien bestehen kann. Die Diffusion gelöster Teilchen folgt der Gesetzmäßigkeit des Fick'schen Diffusionsgesetzes. Das Fick'sche Diffusionsgesetz (siehe Gleichung 1) beschreibt die Konzentrationsänderung einer Substanz in Abhängigkeit von der Zeit. Diese ist proportional zur Oberfläche (A) und zur Differenz der Konzentrationen der Substanz in der Donor- und Akzeptorkammer (C_d und C_a). Die

Diffusion verhält sich antiproportional zur Dicke der Diffusionsschicht bzw. Dialysemembran (h). K_m geht als Diffusionskonstante und V_a als Volumen der Akzeptorkammer in die Gleichung mit ein, K_m ist Stoff- und Temperaturabhängig.

$$\frac{dC_a}{dt} = \left[\frac{k_m \cdot A}{h \cdot V_a} \right] * [C_d(t) - C_a(t)] \quad (1)$$

Die Porengröße einer Dialysemembran, angegeben als „*Molecular Weight Cut-Off*“ (MWCO) in Dalton, bestimmt, welche Moleküle durch die Membran diffundieren und welche von ihr zurückgehalten werden. Darüber hinaus können auch die physikochemischen Eigenschaften des Membranmaterials die Permeabilität für gelöste Stoffe beeinflussen. Der MWCO gibt die minimale Molekülgröße eines gelösten Stoffes in Dalton an, der mit einer Effektivität von 90% in einem vorgegebenen Zeitintervall und bei definierter Temperatur (17 Stunden und 37 °C für die Membranen von Spectrum Laboratories) auf der Donorseite verbleiben [41]. Membranen mit definiertem MWCO sind insbesondere im Bereich von 1 kDa und 100 kDa kommerziell erhältlich, aber auch darüber hinaus.

Dialysebasierte Testsysteme können beispielsweise für die Bestimmung der Plasma-Eiweißbindung von Wirkstoffen sowie zur Charakterisierung des Freisetzungsverhaltens von Wirkstoffen aus kolloidalen Arzneiformen verwendet werden. Während Freisetzungsuntersuchungen in Abschnitt 1.4.2 diskutiert werden, sollen im Folgenden zunächst weitere Anwendungen der Dialyse in der pharmazeutischen Forschung und Entwicklung dargestellt werden.

Dialyseschläuche und Dialysekassetten werden unter anderem für die Aufreinigung und Weiterverarbeitung von Proteinen eingesetzt. Dabei wird die Diffusion von Elektrolyten und Puffersalzen sowie weiteren niedermolekularen Verbindungen entlang ihres Konzentrationsgradienten ausgenutzt, um zwischen den beiden Kompartimenten der Dialysezelle ein Konzentrationsgleichgewicht herzustellen. Der mehrmalige Austausch des Mediums in der Akzeptorkammer führt dabei zu einer effektiven Entsalzung bzw. Aufreinigung der Zubereitung in der Donorkammer. Im darauffolgenden Arbeitsschritt kann dann die Proteinlösung in einer neuen Puffer- oder Elektrolytlösung wieder aufgenommen werden [41].

Nach demselben Prinzip wird beispielsweise auch der Restmonomer-Gehalt in Polymeren im Anschluss an deren Herstellprozess reduziert. Darüber hinaus kann der Anteil an freiem, nicht liposomal gebundenen Wirkstoff im Anschluss an die Herstellung von Liposomen mittels Dialyse (ggf. im Durchfluss) reduziert werden.

Die Dialyse findet darüber hinaus bedeutende Anwendung in der medizinischen Diagnostik und Therapie. Bei der Mikrodialyse wird eine Sonde, die hinter einer semipermeablen Membran die Akzeptorkammer enthält, zur Konzentrationsbestimmung von ausgewählten indikativen Substanzen im menschlichen Gewebe verwendet. Diese Methode wird beispielsweise angewendet, um nach einer Hirnverletzung oder nach einem Schlaganfall den Zustand des menschlichen Gehirns und das Ausmaß der Schädigung besser analysieren zu können [42]. In präklinischen Studien dient diese Methode darüber hinaus in diversen Modellen wie dem Schlaganfallmodell zur Konzentrationsbestimmung potentiell prognosebestimmender Substanzen [43].

Zur Reinigung des Blutes niereninsuffizienter Patienten kann die Hämodialyse eingesetzt werden. Das heparinisierte Vollblut durchläuft das Dialysegerät entlang einer semipermeablen Membran. Die Flüssigkeit in der Akzeptorkammer kann dabei Elektrolyte oder Glukose enthalten, um diese Stoffe dem Patientenblut zuzuführen, oder sie diesem in nicht zu hohem Maße zu entfernen. Darüber hinaus kann dem Patienten durch den osmotischen Effekt überschüssiges Wasser entzogen werden. Die nach dem aktuellen Stand der Technik durchgeführte Blutreinigung stellt zwar eine sehr belastende und zeitaufwändige Behandlung für den Patienten dar, ersetzt aber auf diese Weise die lebensnotwendige Nierenfunktion. Eine weitere Methode der Dialyse für niereninsuffiziente Patienten stellt die Bauchfelldialyse dar. Bei diesem Verfahren wird meist über Nacht eine Dialysierlösung in den intraperitonealen Bereich des Patienten injiziert. Die Dialyse erfolgt dabei durch die natürliche Membran des Bauchfelles hindurch.

1.4. Wirkstofffreisetzung aus kolloidalen Arzneistoffträgern

1.4.1. Anwendungsgebiete von Freisetzungstests pharmazeutischer Zubereitungen

Die Bestimmung der Wirkstofffreisetzung aus Arzneiformen erfolgt im Lebenszyklus eines Arzneimittels von Entwicklung über die Zulassung bis hin zu den regelmäßigen Untersuchungen der Qualitätskontrolle und den sogenannten „*post-approval changes*“. Die Messung der Wirkstofffreisetzung während der Arzneiformentwicklung verfolgt in der Regel das primäre Ziel, eine gewünschte Freisetzungskinetik wie die unverzügliche, die verzögerte oder verlängerte Freisetzung zu überprüfen und einzustellen. In physiologischen Medien durchgeführt kann aus den *in vitro* generierten Freisetzungsdaten darüber hinaus durch mathematische Verfahren wie das „*physiologically based pharmacokinetic modelling*“ („*PBPK modelling*“) ein potentiell Plasmaprofil des Wirkstoffs ermittelt werden. Diese Methodik erfordert allerdings genaueste Kenntnisse über die Eigenschaften des Arzneistoffs sowie dessen Resorptions- und Verteilungsvorgänge im menschlichen Körper [44].

Für die Zulassung einer Arzneiform werden auch deren Freisetzungseigenschaften durch die Spezifikationen festgeschrieben. Während es für bezugnehmende Zulassungen von schnell freisetzenden oralen Arzneiformen einheitliche Vorgaben der Zulassungsbehörde gibt, zu welchem Prozentsatz der enthaltene Wirkstoff innerhalb einer vorgegebenen Zeit freigesetzt sein muss [45], ist es für retardierte Arzneiformen notwendig und auch sinnvoll, dass diese Spezifikationen vom Hersteller eigens definiert werden. Diese Spezifikationen gilt es dann im Rahmen der Qualitätskontrolle und bei Änderungen im Herstellprozess einzuhalten.

1.4.2. Methoden für die Wirkstofffreisetzung aus kolloidalen Arzneiträgern

Für die Bestimmung der Wirkstofffreisetzung aus kolloidalen Arzneiträgern kommen diverse in der Literatur beschriebene Verfahren zum Einsatz. Dabei zeigt sich, dass insbesondere die dialysebasierten Testsysteme bevorzugt ausgewählt werden, da diese die Trennung von kolloidalem Träger und gelöstem Wirkstoff erheblich

erleichtern. Typisch für dialysebasierte Methoden ist jedoch die Problematik, dass die verwendete Membran die gemessene Freisetzungsrates limitieren kann [46]. Häufig dienen daher auch klassische „*Sample & Separate*“ - Methoden der Bestimmung der Wirkstofffreisetzung, wobei die Trennung der gelösten Arzneistoffkomponente von der kolloidalen Fraktion durch Zentrifugation oder Filtration den kritischen Schritt im Versuchsaufbau darstellt.

„*Sample & Separate*“ - Methode

Bei der „*Sample & Separate*“ - Methode wird die kolloidale Arzneiform zu der gewünschten Menge an Freisetzungsmittel gegeben. Als Gefäß dienen dabei entweder standardisierte Vessel der Freisetzungsvorrichtung 2 nach Ph. Eur. oder kleinere Gefäße wie Bechergläser oder Caps aus Kunststoff. Die Einhaltung der notwendigen Agitation, welche Agglomeration verhindern und optimale Freisetzungsbedingungen herstellen kann, ist abhängig vom Maßstab und verwendeten Gefäß und dabei häufig nicht immer ausreichend [1]. Darüber hinaus kann auch die Einstellung der Temperatur auf $37 \pm 0,5$ °C nicht mit allen Testsystemen erreicht werden. Werden während der Probenaufbereitung Filter verwendet, können sich die Poren zum einen mit der kolloidalen Arzneiform zusetzen, und zum anderen kann der Arzneistoff an die Filtermaterialien adsorbiert werden. Des Weiteren können je nach Porengröße kleinere Partikelfractionen die Filtermembran gegebenenfalls passieren und zu einem falschen Ergebnis führen. Wird die Zentrifugation als Trennverfahren eingesetzt, so besteht auch in diesem Fall die Möglichkeit eines verfälschten Ergebnisses, wenn in Abhängigkeit von Dichte und dynamischer Viskosität des Mediums sehr kleine Partikel nur mit einer sehr niedrigen Geschwindigkeit sedimentieren und somit bei zu geringer Zentrifugationsdauer im Überstand mitbestimmt werden.

Generell eignet sich die *Sample & Separate* Methode nicht für die Testung der Wirkstofffreisetzung aus liposomalen Arzneiformen, da diese weder durch Filtration noch durch Zentrifugation von der gelösten Komponente separiert werden können, ohne die Integrität der Liposomen zu beschädigen.

Dialysesack

Unter allen Dialysemethoden wird als häufigste die statische Dialyse im Dialysesack beschrieben [47-51]. Dazu wird ein Stück Dialyseschlauch abgeschnitten, an einem

Ende mit einer Klemme verschlossen und die Probe hinein pipettiert. Vor dem Verschließen müssen vorhandene Luftblasen entfernt werden. Der Dialysesack kann dann in ein Gefäß mit Freisetzungsmedium wie ein Becherglas oder ein Vessel der Apparatur 2 nach Ph. Eur. eingebracht werden. Da in vielen Fällen jedoch keine standardisierte Apparatur für den Dialysesack verwendet wird, ist zum einen die Agitation mittels Magnetrührer üblich und zum anderen oftmals keine Temperaturkontrolle gegeben. Bei Verwendung der Apparatur 2 nach Ph. Eur. ist es außerdem möglich, dass der Dialysesack vom Blattrührer beschädigt oder geöffnet wird.

Alternativ zum Dialysesack, dessen Länge und damit die Aufnahmekapazität für die Probe und die Austauschfläche den Versuchsbedingungen angepasst werden können, kann auch auf vormontierte und kommerziell erhältliche Dialysekammern zurückgegriffen werden. Diese können dann mittels Styroporring schwimmend im Becherglas oder, wie bei Kumar et al. beschrieben, an die Deckel der Blattrührer-Apparatur montiert werden (siehe Abbildung 1) [52].



Abbildung 1: Dialysesack modifiziert nach Kumar et al., verwendet im Rahmen der Doktorarbeit mit Genehmigung des Elsevier-Verlages, Originalbeschriftung: „Fig. 1. Sotax® USP II adapted to hold the dialysis sacs. Top part of each vessel is attached with the plastic adapter to hold the dialysis sacs.“ [52]

Reverse Dialyse

Die Wirkstofffreisetzung mittels reverser Dialyse kann generell unter den gleichen apparativen Voraussetzungen durchgeführt werden, wie unter Verwendung des klassischen Dialysesacks. Im Gegensatz zur klassischen Dialyse wird jedoch die Probe in das im Hinblick auf das Volumen überlegene Kompartiment gegeben. Einer

oder mehrere (limitiert in der Anzahl durch die Größe des Gefäßes) Dialysesäcke gefüllt mit wirkstofffreiem Medium dienen dabei als Akzeptorkammern [50, 53]. Durch die Umkehr des Volumenverhältnisses von Donor- zu Akzeptorkammer wird mittels reverser Dialyse angestrebt, sich den Bedingungen *in vivo* ein Stück anzunähern [53]. Die Löslichkeit und das begrenzte Volumen der Donorkammer können die Wirkstofffreisetzung im klassischen Dialyseverfahren negativ beeinflussen. Dieser Faktor kann mittels reverser Dialyse eliminiert werden. Allerdings verläuft die Diffusion des gelösten Wirkstoffs durch die Dialysemembran bei gleicher Probenmenge in der reversen Dialyse langsamer, da nach Fick'schem Diffusionsgesetz das Konzentrationsgefälle zwischen Donor- und Akzeptorkompartiment geschwindigkeitsbestimmend ist und der Wirkstoff im Fall der reversen Dialyse in deutlich größerem Volumen verteilt bzw. gelöst ist.

Dialyse-basierte Wirkstofffreisetzung in der Durchflusszelle

Die Durchflusszelle nach Ph. Eur. (Freisetzungsapparatur 4) besteht aus einer temperierten Probenzelle, welche kontinuierlich im offenen oder geschlossenen Kreislauf mit vorgeheizten Freisetzungsmedium durchspült wird. Dabei ist die Freisetzungsrates des Wirkstoffs neben der Löslichkeit im Medium auch direkt von der Fließgeschwindigkeit des Freisetzungsmediums abhängig. Die Durchflusszelle wird vor allem für schwer lösliche Arzneistoffe oder langsam freisetzende Präparate eingesetzt. Die Arzneiform und deren unlösliche Komponenten können dabei auch nach erfolgtem Zerfall in Abhängigkeit von der Partikelgröße durch die Filtermembran in der Zelle zurückgehalten werden. Typischerweise werden Filter mit einer Porengröße von 0,45 µm eingesetzt, da feinere Filtermembranen oder verstopfte Poren zu einem Druckanstieg im System führen können. Es ist daher naheliegend, dass die Standard-Durchflusszelle nicht oder nur sehr eingeschränkt für die Freisetzungsuntersuchung kolloidaler Arzneiformen geeignet ist [1]. Bereits vor einigen Jahren wurde ein Adapter zur Dialyse (A4D) für die Durchflusszelle entwickelt und war bis vor kurzem kommerziell von der Firma Sotax erhältlich [5]. Der A4D stellt einen hohlen Käfig dar, welcher mit einer Dialysemembran überzogen wird, um so die Donorkammer auszubilden (siehe Abbildung 2). Nach Montage in die Durchflusszelle kann die Wirkstofffreisetzung von diversen kolloidalen Arzneiformen untersucht werden, wobei das maximale Volumen an Arzneiform in der Donorkammer auf 1 mL limitiert ist und die Probe keiner Agitation unterliegt. Ein Probenzug aus der

Donorkammer ist während der gesamten Versuchsdauer nicht möglich. Positiv zu bewerten ist der A4D im Bezug auf das Verhältnis von Volumen der Donorkammer zu Membranoberfläche [5, 48, 54, 55]. Dieser ursprüngliche A4D ist jedoch zurzeit nicht mehr verfügbar. Der Einsatz des sogenannten Float-A-Lyzer's der Firma Spectrum Labs (Los Angeles, USA) kann als Alternative zum A4D in der Durchflusszelle erwogen werden.

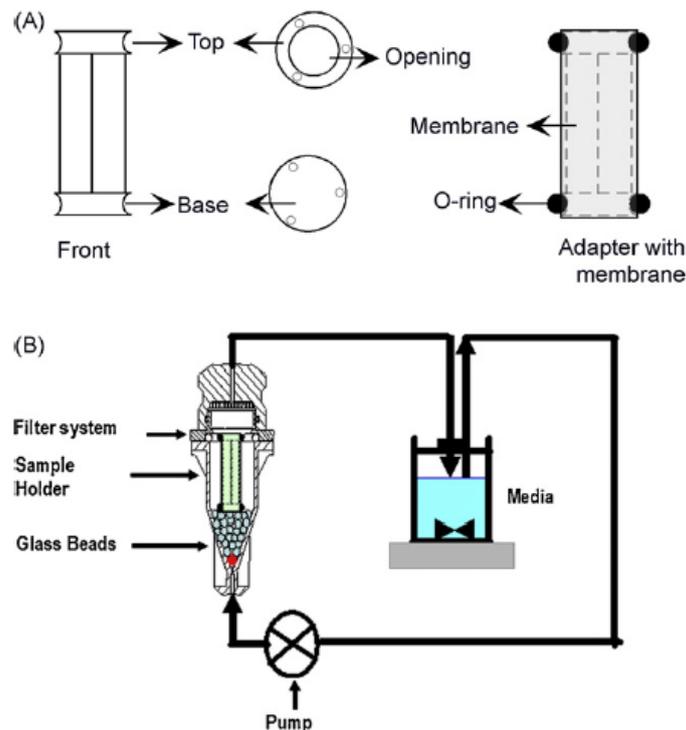


Abbildung 2: A4D in der Durchflusszelle nach Bhardwaj & Burgess, verwendet im Rahmen der Doktorarbeit mit Genehmigung des Elsevier-Verlages, Originalbeschriftung: „Fig. 1. (A) Schematic of the dialysis adapter design. (Left) the front of the dialysis adapter, (middle) top and bottom parts, (right) adapter with dialysis membrane sealed with O-rings. (B) The placement of the adapter in USP apparatus 4 [5].“

Ein weniger standardisiertes, aber im Aufbau dem A4D ähnliches System zur Wirkstofffreisetzung aus Lipidnanopartikeln, wurde von De Andrade et al. beschrieben [47]. Dabei wird ein mit Probe gefüllter Dialysesack in die Apparatur eingebracht und über zwei peristaltische Pumpen der Zu- und Abfluss des Freisetzungsmediums im offenen Kreislauf (Zufluss zur Probenzelle stets mit frischem Medium), wie in Abbildung 3 dargestellt, ermöglicht. Die Quelle beschreibt eine Temperaturgenauigkeit

von 37 ± 2 °C und kann somit die Anforderungen des Ph. Eur. mit einer Genauigkeit von $\pm 0,5$ °C nicht einhalten.

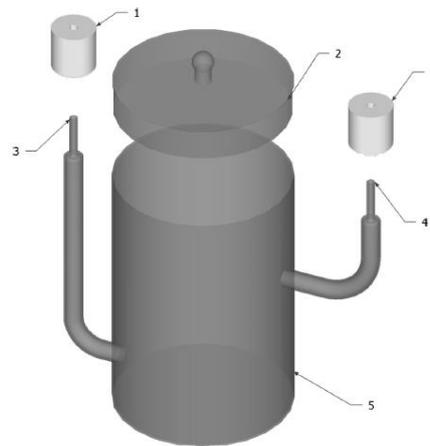


Abbildung 3: Durchflussapparatur nach De Andrade et al., verwendet im Rahmen der Doktorarbeit mit Genehmigung des Springer Nature-Verlages, Originalbeschriftung: „Fig. 1. Design of the proposed release device: 1 rubber seals, 2 glass lid, 3 release medium outlet, 4 release medium inlet, and 5 release device“ [47]

Weitere dialysebasierte Systeme

Von Abdel-Mottaleb et al. wurde eine modifizierte Apparatur 1 nach Ph. Eur. (Drehkörbchen), wie sie in Abbildung 4 dargestellt ist, beschrieben [2].

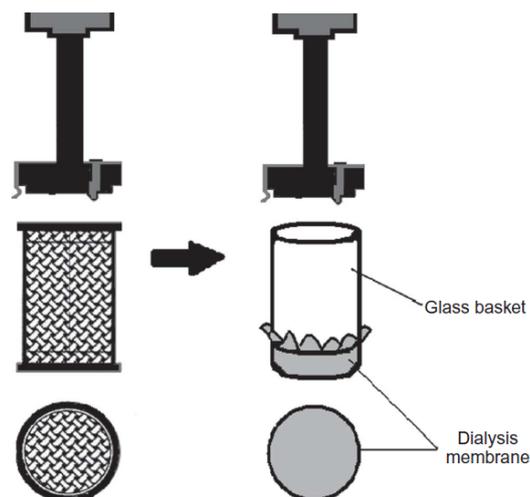


Abbildung 4: Modifizierte Drehkörbchen-Apparatur nach Abdel-Mottaleb et al., verwendet im Rahmen der Doktorarbeit mit Genehmigung von Taylor & Francis, Originalbeschriftung: „Figure 1. Design of the glass baskets (right) compared to conventional baskets (left).“ [2]

Diese modifizierte Apparatur profitiert von der Nutzung der durch die Arzneibuchapparatur eingestellten und konstanten Temperaturbedingungen und die exakte Rührgeschwindigkeit im Drehkorbchen. Das Standard-Drehkorbchen wird dabei durch einen hohlen Glaszylinder ersetzt. Dazu wird eine Dialysemembran als Austauschfläche und Verschluss am unteren Ende des Glaszylinders befestigt. Eine ähnliche Apparatur wurde auch von Gao et al. für Freisetzungsexperimente aus Nanopartikeln genutzt [3].

Auf Basis dieser vorliegenden Informationen zu Freisetzungsuntersuchungen kolloidaler Arzneiformen wird die Notwendigkeit ersichtlich, dass eine diesen Methoden überlegene Apparatur nicht verfügbar ist. So soll die im Rahmen dieser Doktorarbeit entwickelte Apparatur diese Lücke schließen.

Auswahl einer geeigneten Dialysemembran

Für die Auswahl einer geeigneten Dialysemembran müssen das Membranmaterial, der MWCO und der innere Durchmesser des Dialyseschlauches berücksichtigt werden. Während der innere Durchmesser von der verwendeten Apparatur vorgegeben wird, muss das Membranmaterial und der MWCO auf den Arzneistoff und gegebenenfalls auch auf die Zusammensetzung des Mediums abgestimmt werden. Zur Auswahl stehen beispielsweise Membranen aus regenerierter Cellulose und Cellulose-Acetat mit Molekularausschlussgrößen zwischen 1 kDa und 50 kDa. Spezielle Membranen gibt es auch mit Molekularausschlussgrößen von 100 kDa und größer. Als Orientierungswert für die Auswahl eines geeigneten MWCO zur Retention von Molekülen im Dialyseschlauch gilt, dass der MWCO etwa halb so groß sein muss wie das Molekulargewicht der Substanz [41]. Dahingegen gibt es einen solchen Richtwert (Verhältnis aus Molekulargewicht des Analyten zu MWCO der Membran) für die freie Diffusion von Molekülen durch die Dialysemembran nicht [56]. Abdel-Mottaleb et al. konnte für die Freisetzung von Ibuprofen (MW: 206,3 Da) im Dialyseexperiment keine signifikanten Unterschiede zwischen drei Membranen mit den Molekularausschlussgrößen von 12-14 kDa, 15-25 kDa und 50 kDa feststellen [2]. Unberücksichtigt bleibt in dieser Versuchsreihe jedoch die Membrandicke, die je nach Hersteller und Herstellmethode variieren kann und nach dem Fick'schen Diffusionsgesetz Einfluss auf die Diffusionsrate nimmt. Unumstritten ist, umso größer der MWCO der Membran, desto weniger wird die freie Diffusion durch die Poren der Membran gehindert. Für die nachfolgend beschriebenen Freisetzungsexperimente

wurden zwei Dialysemembranen mit dem MWCO von 50 kDa verwendet. So sollte sichergestellt werden, dass beim Wechsel des Arzneistoffs und zur Vergleichbarkeit der Profile kein Austausch der Membran notwendig ist. Wird beispielsweise von einer Substanz mit einem Molekulargewicht von 200 Da auf eine Substanz mit 1000 Da gewechselt, so vervielfacht sich das Molekulargewicht um den Faktor 5. Je höher dann der MWCO gewählt wird, desto geringer ist die relative Änderung des Verhältnisses von Molekulargewicht des Arzneistoffes zum MWCO der Membran. Ein zu großer MWCO sollte jedoch ebenfalls vermieden werden, da die Permeation kleinster Partikelgrößenfraktionen durch die Membran hindurch vermieden werden muss. So wurde der MWCO von 50 kDa als Kompromiss und obere Grenze identifiziert.

1.4.3. Medien für die Wirkstofffreisetzung aus kolloidalen Arzneiformen

Die Wahl eines geeigneten Freisetzungsmediums für kolloidale, parenterale Arzneiformen sollte generell unter Berücksichtigung der physiologischen oder pathophysiologischen Bedingungen am Applikations- sowie Wirkort erfolgen. Darunter fallen der pH-Wert und die Pufferkapazität, die Osmolalität sowie die Anwesenheit und Konzentration von makromolekularen Plasmabestandteilen wie Plasmaproteinen, welche den Arzneistoff binden oder an die Oberfläche von Kolloiden adsorbieren können [57-59]. Darüber hinaus gelten der Löslichkeit und Stabilität des Arzneistoffes im Freisetzungsmedium besondere Aufmerksamkeit. Auch die verwendete Freisetzungsapparatur oder Detektionsmethode für den Wirkstoff beeinflussen die Auswahl des Mediums [1] und limitieren den Einsatz bestimmter Zusatzstoffe im Freisetzungsmedium, wie beispielsweise der Zusatz von Plasmaproteinen.

Bei all der Komplexität erweist sich ein isotonischer 10 mM Phosphatpuffer eingestellt auf pH 7,4 als stabiles und proteinfreies Medium, welches sich den Bedingungen von humanem Blutplasma im Hinblick auf pH, Pufferkapazität und Osmolalität annähert. Der physiologische pH-Wert und die Pufferkapazität des Blutes werden durch das Zusammenspiel von Kohlensäure-Bicarbonatsystem, Hämoglobin, Plasmaproteinen und Phosphat geprägt. Der Phosphatpuffer stellt somit eine stark vereinfachte Zusammensetzung dar, welche jedoch auf Grund ihres niedermolekularen Charakters, ihrer Stabilität und der Abwesenheit von volatilen Bestandteilen den weiteren

Komponenten des physiologischen Blutpuffers als Freisetzungsmittel für viele Zwecke überlegen ist.

Die Pufferkapazität eines Puffersystems ist immer dann entscheidend, wenn der Wirkstoff basische oder saure Funktionen aufweist, welche beim Auflösen Protonen verbrauchen oder abgeben. Ist die Pufferkapazität zu gering, so sinkt durch Verschiebung des pH-Wertes bei zunehmender Auflösung des sauren oder basischen Wirkstoffs dessen Löslichkeit im Freisetzungsmittel ab. Vergleicht man die parenteralen Applikationsorte, so ist die Pufferkapazität vor allem dann von Relevanz, wenn sich die Arzneiform in einem kleinen Flüssigkeitsvolumen befindet, wie beispielsweise nach subkutaner oder intramuskulärer Injektion. Einfache in der Literatur beschriebene Puffersysteme zur Freisetzungstestung kolloidaler parenteraler Formulierungen sind somit ein Phosphatpuffer bei pH 7,4 in unterschiedlicher und teilweise nicht dokumentierter Molarität [2, 3, 60-62], ein Phosphatpuffer bei pH 7,5 [63], ein 10 mM HEPES-Puffer bei pH 7,4 [5] sowie ein Acetatpuffer bei pH 4,0 [3].

Durch Herabsetzen der Löslichkeit kann die Einhaltung von „*sink conditions*“ bei geringer Arzneistofflöslichkeit gefährdet werden. Unter „*sink conditions*“ laufen Freisetzungsexperimente unter nahezu optimalen Bedingungen ab. Das bedeutet, dass die maximale Wirkstoffkonzentration im Vessel um den Faktor drei unterhalb der Sättigungslöslichkeit liegt.

Ist die Löslichkeit des zu untersuchenden Arzneistoffes oder die Benetzbarkeit der Arzneiform nicht ausreichend hoch, kann diese durch Zusatz von Tensiden wie Polysorbat [64, 65] angehoben werden. Andere lösungsvermittelnde Komponenten wie Cyclodextrine [33, 66] beeinflussen die Löslichkeit von Arzneistoffen, nicht aber deren Benetzbarkeit.

Während sich biorelevante Freisetzungsmittel für die Bestimmung der Wirkstofffreisetzung aus peroralen Arzneiformen etabliert haben und bereits mehrere Generationen bzw. Versionen von künstlichen Magen- und Darmsäften für biopharmazeutische Untersuchungen entwickelt wurden [67-69], werden biorelevante parenterale Freisetzungsmittel für kolloidale Arzneiformen bis heute nur vereinzelt eingesetzt. Was unter biorelevant zu verstehen ist, gilt es dabei zunächst zu definieren. So kann die Imitation der Blutzirkulation mit anschließender gesteuerter Freisetzung eines liposomalen Wirkstoffs am Wirkort beispielsweise durch Tenside von den

Autoren als biorelevant kategorisiert werden [70, 71]. Andererseits ist unter biorelevant neben dem physiologischem pH-Wert, der Pufferkapazität und der Osmolalität vor allem der Zusatz von Plasmaproteinen in Form von humanem oder bovinem Serumalbumin oder die Zugabe von humanem oder fetalem Kälberserum zu verstehen [72]. Serumproteine sind bekannt dafür, dass sie auf kolloidalen Strukturen wie Nanopartikeln eine sogenannte „*protein corona*“ ausbilden, welche die Erkennung der Partikel durch das retikulohistiozytäre System begünstigt. Es ist beschrieben worden, dass durch die „*protein corona*“ die Verteilung der Partikel *in vivo* sowie die Effektivität des Targetings beeinflusst wird [57-59]. Es ist aber auch davon auszugehen, dass die Freisetzung von Wirkstoffen durch die so erfolgte Veränderung der Nanopartikeloberfläche sowie durch Löslichkeitseffekte verändert wird. Ein *in vitro* durchgeführtes Freisetzungsexperiment spiegelt bei adäquater Medienzusammensetzung idealerweise die Freisetzung *in vivo* wider und die Übertragbarkeit der Resultate könnte durch den Einsatz von biorelevanten Freisetzungsmedien erleichtert werden [50, 73]. Die FDA fordert darüber hinaus für die Bestimmung der Wirkstofffreisetzung von Wirkstoffen aus Liposomen den bevorzugten Einsatz von biorelevanten Medien, ohne deren Zusammensetzung genauer zu beschreiben [37].

1.4.4. Mathematische Auswertung von Freisetzungsdaten

Die Wirkstofffreisetzung aus mikropartikulären und kolloidalen Arzneiträgern unterliegt im Wesentlichen den Mechanismen der Diffusion aus der Arzneiform, der Desorption adsorbierten Wirkstoffs an der Partikeloberfläche, sowie der Freigabe durch Erosion der Partikelmatrix. Die Wirkstofffreigabe dieser Arzneiformen wird somit von vielen Faktoren wie den verwendeten Trägermaterialien, dem Herstellprozess, dem Freisetzungsmedium und dem Arzneistoff selbst beeinflusst.

Insbesondere wenn Freisetzungsdaten für nanopartikuläre Formulierungen mittels Dialysemethoden erhoben werden, kann das Freisetzungsprofil auf Grund der Membrankinetik nicht ohne mathematische Aufarbeitung die tatsächliche Freisetzung des Wirkstoffs aus der Arzneiform darstellen. Es besteht also die Notwendigkeit, geeignete mathematische Modelle für die Wirkstofffreigabe aus kolloidalen

Arzneiträgern zu entwickeln, denn nur wenige Modelle sind in der Literatur bereits beschrieben worden [1, 74, 75]. Diesen Modellen liegen unterschiedliche mechanistische Überlegungen zu Grunde. Diese beinhalten Diffusions-, Desorptions- und Erosionsvorgänge, welche die Wirkstofffreisetzung beeinflussen. Die mathematischen Modelle, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit von Relevanz sind, werden in Absatz 2.12 näher erläutert. Eines der mathematischen Modelle, welches zunächst die Membrankinetik des reinen Wirkstoffes berücksichtigt, um anschließend auf Basis der gemessenen Freisetzung in der Akzeptorkammer auf die freigesetzte Menge an Arzneistoff in der Donorkammer rückzuschließen, wurde von Dr. Li Kirsamer (geb. Xie) im Rahmen ihrer Dissertation erarbeitet [66] und für die Auswertung einiger Freisetzungsprofile in der vorliegenden Arbeit angewendet.

1.5. Die verwendeten Modellarzneistoffe

Entscheidend für die Auswahl der beiden verwendeten Modellarzneistoffe mTHPC (5,10,15,20-Tetrakis(3-hydroxyphenyl)-chlorin, Temoporfin) und Flurbiprofen war zunächst die Eignung der Arzneistoffe zur Einbettung in lipophile kolloidale Träger. Lipophile Trägersysteme wurden ausgewählt, um für die vorliegende Versuchsreihe Formulierungen zu erhalten, deren Auflösungs- und Freigabeeigenschaften trotz der kolloidalen Größe möglichst verlangsamt ausgeprägt sind. Eine gewisse Lipophilie ist für die Einbettung der Arzneistoffe in die ausgewählten Polymere somit notwendig. Darüber hinaus stellt auch das Herstellverfahren Anforderungen an die Löslichkeit der Arzneistoffe in den verwendeten (meist organischen) Lösungsmitteln. Ein Partikelsystem aus mTHPC und PLGA wurde bereits beschrieben [31] und konnte nach initialer Optimierung des Herstellprotokolls für die Versuchsreihe der vorliegenden Arbeit ausgewählt werden. Mit Flurbiprofen fiel die Wahl auf einen weiteren schwer wasserlöslichen Modellarzneistoff. Im Gegensatz zu mTHPC, welches sich in wässrigen Medien nur durch den Zusatz von Lösungsvermittlern wie Cyclodextrinen ausreichend löst, weist Flurbiprofen eine pH-abhängige und dabei ausreichende Löslichkeit auf.

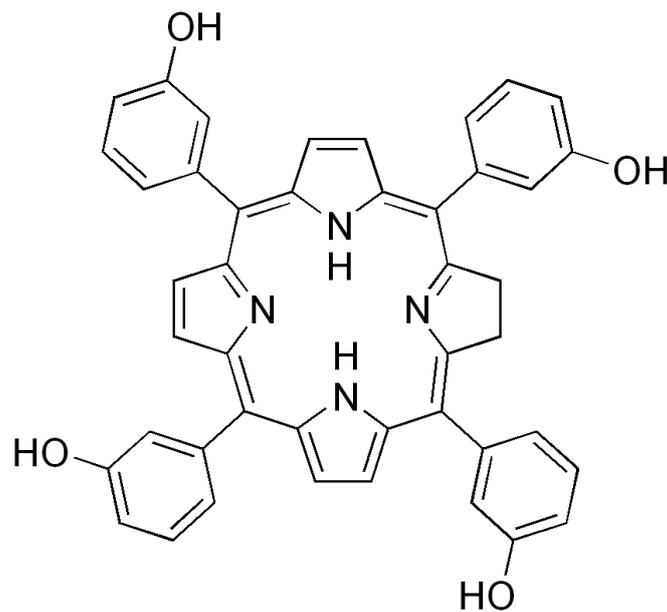
Temoporfin / mTHPC

Abbildung 5: Strukturformel von mTHPC [76]

Meso-tetrahydroxyphenylchlorin (mTHPC), oder auch Temoporfin genannt, ist der Wirkstoff des Fertigarzneimittels Foscan[®], welches zur palliativen Therapie von Patienten mit fortgeschrittenem Plattenepithelkarzinom im Kopf- und Halsbereich seit 2001 in Europa zugelassen ist. Wie alle Photosensitizer mit Porphyrin-Grundgerüst ist auch mTHPC in wässrigen Medien praktisch unlöslich. Daher enthält das Fertigarzneimittel Foscan den Wirkstoff als organische Lösung in einer Mischung aus Ethanol und Propylenglykol. Das Medikament muss unter lokaler Anästhesie langsam intravenös appliziert werden, wobei die Präzipitation des Wirkstoffs nach Applikation in den Blutkreislauf durch die niedrige Löslichkeit von mTHPC im Blutplasma nicht ausgeschlossen werden kann. So wird die maximale Plasmakonzentration nicht unmittelbar nach Applikation, sondern erst 2 bis 4 Stunden nach der Injektion gemessen. Um den Wirkmechanismus zu aktivieren muss das tumoröse Gewebe innerhalb eines Zeitfensters von 90 bis 110 Stunden nach der Arzneimittelapplikation mit einem Laser (Wellenlänge 652 nm) bestrahlt werden. Durch die Bestrahlung des mTHPCs wird reaktiver Singulett-Sauerstoff gebildet, der selektiv jene Zellen und Gewebe in die Apoptose führt, welche dem Laserstrahl zuvor ausgesetzt wurden. Eine generelle Photosensibilisierung ist auf Grund des therapeutischen Prinzips eine klinisch relevante unerwünschte Arzneimittelwirkung und die Haut muss noch Wochen

nach der Applikation vor Sonnenbestrahlung geschützt werden [77]. Das Molekulargewicht von mTHPC beträgt 680,8 Da.

Flurbiprofen

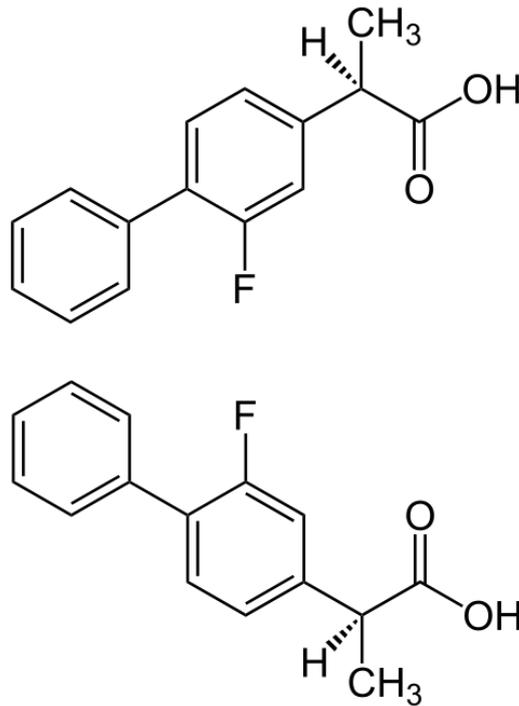


Abbildung 6: Strukturformel von racemischem Flurbiprofen [78]

Flurbiprofen ist eine schwache Säure aus der Klasse der Nicht-steroidalen Antirheumatika und weist ein Molekulargewicht von 302,3 Da auf. Der errechnete pK_s -Wert (ChemAxon) der Carbonsäurefunktion beträgt 4,42 [79]. Der Wirkstoff ist in wässrigen Lösungen schwer löslich und weist auf Grund seines sauren Charakters eine pH-Wert-abhängige Löslichkeit auf. Auf Grund seines antientzündlichen Wirkmechanismus, der auf der Hemmung der Cyclooxygenasen 1 und 2 beruht, wird der Wirkstoff in Deutschland in Form von Lutschpastillen zur Behandlung von Halsschmerzen im Rahmen der Selbstmedikation eingesetzt. Weitere Flurbiprofen-haltige Präparate sind in Deutschland nicht verfügbar. In Amerika wird Flurbiprofen unter anderem in Form von Tabletten zu 100 mg Wirkstoff je Einzeldosis zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis und Osteoarthritis eingesetzt [80].

Neben der Wirkung auf die Cyclooxygenase weist das R-Enantiomer von Flurbiprofen noch weitere pharmakologische Wirkungen auf. Aus diesem Grund wird aktuell die perorale Gabe von R-Flurbiprofen zur Therapie von Alzheimer [63] und anderen zentralnervösen und degenerativen Krankheiten wie der Multiplen Sklerose untersucht [81].

2. Materialien und Methoden

2.1. Chemikalien

Tabelle 1: Chemikalien

Name	Hersteller / Lieferant
Acetonitril, „LiChrosolv® Reag. Ph Eur“	Merck, Darmstadt, Deutschland
Chitosan, Poly(D-glucosamine) Deacetylated Chitin	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland (Best.-Nr. 448869; Lot: MKBG3334V)
Ethanol 96% (v/v)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylacetat, wasserfrei (99,8%)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland (Lot: S50684-198)
Eudragit® RS 100	Evonik Röhm GmbH, Darmstadt, Deutschland (Lot: E100108020)
FBS Gold	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland (Lot: A15111-1629, A15112-0062)
FBS „optimized“	Biowest, Nuaille, Frankreich (Lot: S10536, S1810)
Flurbiprofen, Racemat (99%)	Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA (Lot: 102966)
Glutaraldehyd (25%)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Gold-Nanopartikel, 50 nm	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland (Best.-Nr. 753645; Lot: MKBW5581V)
Humanes Serumalbumin	Fraktion V, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kleptose HP Parenteral (HP-β-cyclodextrin)	Roquette, Pas-de-Calais, Frankreich (Lot: E0007)
Kupfersulfat (CuSO ₂ x 5 H ₂ O)	VWR, Darmstadt, Deutschland
Methyl-β-cyclodextrin	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland (Best.-Nr. 332615; mittleres MW: 1310 Da; Lot: STBD2275V, STBC2412V, STBC7393V)

mTHPC (Temoporfin, 5,10,15,20-Tetrakis(3- hydroxyphenyl)-chlorin)	mTHPC wurde kostenlos zur Verfügung gestellt von: Biolitec AG, Jena, Deutschland
Natriumazid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumcitrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ x 2 H ₂ O)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriummonohydrogen- phosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Penicillin Streptomycin Konzentrat (PenStrep)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland (Best.-Nr. 4333; Lot: SLBG0034V)
Pluronic F-68	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland (Lot: 8N009192)
Poly-L-milchsäure, Resomer [®] L 206 S	Evonik Industries, Darmstadt, Deutschland
Poly-D,L-milch-co-glycolsäure (50/50), Resomer [®] RG 502 H	Böhringer Ingelheim, Ingelheim, Deutschland (Lot: 1037187)
Polyvinylalkohol	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland (Best.-Nr. P8136)
Propylenglycol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trehalose (für Biochemie)	Merck, Darmstadt, Deutschland (Lot: K44502516)
Trifluoressigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.2. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Eingesetzte Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät / Artikel	Typenbezeichnung, Hersteller
Dialysemembran aus regenerierter Cellulose	Spectra Por 6, RC, 50 kDa, 28 mm flat width, Spectrum Labs, Los Angeles, USA
Dialysemembran aus Celluloseacetat	Spectra Por 7, CA, 50 kDa, 12 und 28 mm flat width, Spectrum Labs, Los Angeles, USA
Dispergierwerkzeug	Ultra-Turrax®, T25N, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Feinwaage	NewClassic MF, Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Freisetzungstester: Apparatur 2 nach Ph. Eur.	DT 6R und DT 700, Erweka, Heusenstamm, Deutschland
Freisetzungstester Apparatur 4 nach Ph. Eur.	CE7 smart, CP7 Piston Pump, Closed loop, Autosampler, Sotax, Aesch, Schweiz
Gefriertrockner	Epsilon 2-4 LSC, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland
HPLC Anlage 1	Interface (D-6000A), Pumpe (L-6220), Diodenarray-Detektor (L 4500), Autosampler (AS 2000A), Merck Hitachi, Darmstadt, Deutschland
HPLC Anlage 2	Chromaster, VWR Hitachi, Pumpe (5160), Autosampler (5260), Säulenofen (5360), Fluoreszenz-detektor (5440), Diodenarraydetektor (5430), VWR, Darmstadt, Deutschland
HPLC Anlage 3	Waters Alliance, Separation module (2695), Diodenarray-Detektor (996), kein Säulenofen, Waters, Milford, Massachusetts, USA
HPLC Anlage 4	Chromaster, VWR Hitachi, Pumpe (5160), Autosampler (5260), Säulenofen (5360), UV-VIS-Detektor (5420), VWR, Darmstadt, Deutschland
HPLC Trennsäule Wirkstoffe	Gemini NX C18, 250*4,6 mm, 110 A, Security Guard Cartridges Gemini-NX C18, 4

	* 3,0 mm, Phenomenex Inc., Aschaffenburg, Deutschland
HPLC Trennsäule zur Größenausschlusschromatographie	Biosep SEC S-3000 (5 µm, 300*7,8 mm), Phenomenex Inc., Aschaffenburg, Deutschland
Massenspektrometer	Triple quadrupole 5500 QTRAP mass spectrometer, AB Sciex, Darmstadt, Deutschland HPLC Pumpe (Agilent Nr. 1200) und Entgaser, Agilent, Waldbronn, Deutschland HTC Pal Autosampler, Chromtech, Idstein, Deutschland Stickstoffgenerator NGM 22-LC/MS, cmc Instruments, Eschborn, Germany
Osmometer	Osmometer Automatic, Knauer, Berlin, Deutschland
Peristaltische Pumpe	Ismatec, Zürich, Schweiz
pH-Meter	T766 Calimatic®, Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Photonenkorrelationsspektroskop (PCS)	Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instruments GmbH, Herrenberg, Deutschland
Spektrophotometer	U-3000, Hitachi, Tokyo, Japan
Spritzenvorsatzfilter	PTFE, 0,45 µm: VWR, Darmstadt, Deutschland Celluloseacetat, 0,2 µm: Whatman®, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK
Thermomixer	Thermomixer Comfort, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ultrafeinwaage	XP2U, Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Ultraschallbad	Sonorex Super, Bandelin, Berlin, Deutschland
UV-Spektrometer	U-3000 Spectrophotometer, Hitachi, Tokyo, Japan
Vortexer	Vortex Genie 2, Scientific Industries, New York, USA

Zentrifugen	5417 und 5430 R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
-------------	---

2.3. Mobile Phasen und Säulen für die HPLC und SEC

Mobile Phase für die Quantifizierung von mTHPC und Flurbiprofen:

Trifluoressigsäure 0,1% in Milli-Q-Wasser / Acetonitril 42,5% / 57,5%

HPLC-Säule:

Gemini NX-C18 RP, 5µm, 250*4,6mm, Phenomenex Inc., Aschaffenburg, Deutschland

Das Fließmittel wurde vor Verwendung 30 Minuten im Ultraschallbad entgast.

Mobile Phase für die Größenausschlusschromatographie

Für die Quantifizierung von Albumin mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) wurde der folgende Phosphatpuffer mit verdünnter Salzsäure und Natronlauge auf pH 6,8 eingestellt:

NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	7,56 g
Na ₂ HPO ₄	2,79 g
NaCl	35,06 g
NaN ₃	1,0 g
Milli-Q Wasser	ad 2,0 L

Der Puffer wurde vor Verwendung durch eine Fritte (0,45 µm) filtriert und mittels reduziertem Druck für 30 Minuten entgast.

SEC-Säule:

Biosep SEC S-3000, 5 µm, 300*7,8 mm, Phenomenex Inc., Aschaffenburg, Deutschland

2.4. Freisetzungsmedien

Als Basis für alle Freisetzungsmedien dienten zwei physiologische Phosphatpuffer PBS pH 7,4 und PBS pH 7,2. Dabei weist der Phosphatpuffer mit pH 7,4 in einer Konzentration von 10 mM eine ähnliche Pufferkapazität wie menschliches Blutplasma auf und sollte bevorzugt verwendet werden. Dies ist wie bereits erläutert (siehe 1.4.3) insbesondere für saure und basische Wirkstoffe und deren vom pH-Wert abhängige Löslichkeit relevant. Der albuminhaltige Phosphatpuffer pH 7,2 wurde für einige Freisetzungsversuche mit Flurbiprofen verwendet, um einen im Ph. Eur. gelisteten Puffer in die Untersuchungen mit einzubeziehen.

Tabelle 3: Puffersysteme für Freisetzungsmedien

Inhaltsstoff	PBS pH 7,4	PBS pH 7,2 albuminhaltig R und R1
Na ₂ HPO ₄	1,173 g/L	4,262 g/L (entspr. 5,344 g/L als Dihydrat)
NaH ₂ PO ₄	0,236 g/L	/
NaCl	8,175 g/L	7,6 g/L
KCl	0,224 g/L	/
Albumin	/	10 g/L (R) und 1 g/L (R1)

Die Zusammensetzung der Freisetzungsmedien für die Wirkstofffreisetzungsforschung von mTHPC sind Tabelle 4 zu entnehmen. Basis dieser Freisetzungsmedien ist der 10 mM Phosphatpuffer pH 7,4. Der Zusatz des Konzentrats PenStrep diente der Vermeidung mikrobiellen Wachstums. Methyl- β -cyclodextrin erhöht die Löslichkeit von mTHPC im Freisetzungsmedium und somit der Annäherung an „*sink conditions*“ während der Freisetzungsexperimente [82]. FBS wurde zur Annäherung an die physiologische Umgebung zugesetzt.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Freisetzungsmidien für den Wirkstoff mTHPC

Zusammensetzung	0% FBS	10% FBS	50% FBS	90% FBS
Methyl- β -cyclodextrin	1,00 g	1,00 g	1,00 g	1,00 g
FBS	0 g	100,0 g	500,0 g	900,0 g
Penicillin-Streptomycin Konzentrat	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL
PBS	989,0 g	889,0 g	489,0 g	89,0 g

2.5. Weitere Lösungsmittel

Zur Herstellung der Referenzformulierung Foscan wurden 1,0 mg des Wirkstoffs mTHPC in 1,0 mL des folgenden Lösungsmittelgemischs gelöst:

Propylenglycol + Ethanol 96% (v/v) = 5,6076 g + 3,7601 g

2.6. Analytik von Blutplasma und Serum

Vom Deutschen Blutspendedienst wurden die folgenden humanen Plasmaproben (HP) bezogen und auf ihre Zusammensetzung und diverse physiko-chemische Parameter hin untersucht:

Charge der Probe HP1: 276 704 11 128 468 01
 Charge der Probe HP2: 276 704 11 128 474 02
 Charge der Probe HP3: 276 704 11 128 548 08
 Charge der Probe HP4: 276 704 11 274 410 04
 Charge der Probe HP5: 276 705 11 418 415 04
 Charge der Probe HP6: 276 705 11 418 459 00

2.6.1. Proteingehalt

Der Proteingehalt der Plasmen wurde mittels UV-Absorptionsmessung nach einer Methode des Ph. Eur. (Gesamtproteinbestimmung nach Ph. Eur, 2.5.33, Methode 5) bestimmt [83]. Dieser Bestimmung liegt die Biuret-Reaktion zu Grunde. Dabei kann durch Komplexbildung zwischen Plasmaproteinen und zweiwertigen Kupferionen die Absorption von UV-Licht der Wellenlänge 545 nm zur Quantifizierung genutzt werden. Für die Messung wurden die Plasmen zunächst im Verhältnis 1/10 (v/v) mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl gelöst in vollentsalztem Wasser) verdünnt. Als Referenz- und Standardlösungen dienten Lösungen von humanem Serumalbumin (HSA) in physiologischer Kochsalzlösung im Konzentrationsbereich 1 bis 5 mg/mL. Die Verwendung von reinem HSA im Vergleich zur komplexen Proteinzusammensetzung des Plasmas stellt eine Vereinfachung dar und berücksichtigt nicht die spezifisch starke Ausprägung des Kupferkomplexes mit den einzelnen Proteinspezies des natürlichen Mediums. Da es in diesem Versuch um den Vergleich der Plasmen untereinander und mit den bovinen Proben geht, wurde diese Vereinfachung für diesen Zweck gewählt.

Das Biuret-Reagenz wird hergestellt, indem 3,46 g Kupfersulfat ($\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$) in 10 mL heißem Milli-Q-Wasser aufgelöst und mit einer Lösung aus 34,6 g Natriumcitrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \times 2 \text{H}_2\text{O}$) und 20,0 g wasserfreiem Natriumcarbonat (Na_2CO_3) in 80 mL Milli-Q-Wasser gemischt werden. Anschließend wird die Mischung mit Milli-Q-Wasser auf 200,0 mL aufgefüllt.

Zur Proteinbestimmung werden 0,5 mL Probe oder Referenzlösung mit 0,5 mL Natriumhydroxidlösung (60 g/L) und 0,2 mL Biuret-Reagenz versetzt. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (21 °C, 650 Upm) im Thermomix wird die Absorption der Test- und Referenzlösungen gegen die Blindprobe im UV-Meter bei einer Wellenlänge von 545 nm gemessen. Die Absorption der Probe und der Proteingehalt verhalten sich im gewählten Bereich proportional zueinander.

2.6.2. pH-Wert

Der pH-Wert wurde unter Verwendung des pH-Meters T766 Calimatic® nach erfolgter 2-Punkt-Kalibrierung (pH 7 und 10) bestimmt. Zur Regenerierung nach Vermessung proteinhaltiger Lösungen wurde der pH-Sensor für 30 Minuten in Elektrodenreiniger (HCl-saure Pepsinlösung) eingelegt.

2.6.3. Osmolalität

Die Messung der Osmolalität erfolgte über die Bestimmung der Gefrierpunktserniedrigung. Das Osmometer wurde dazu mit Wasser für Injektionszwecke auf 0 mOsmol/kg und mit einer vom Hersteller gelieferten Standardlösung auf 400 mOsmol/kg kalibriert. Zur Bestimmung wurden 50 µL verwendet und jede Messung wurde mindestens zweimal wiederholt.

2.7. Physiko-chemische Charakterisierung der Wirkstoffe

2.7.1. Quantifizierung von mTHPC mittels HPLC-Analytik

Tabelle 5 fasst die für mTHPC verwendeten HPLC-Methoden zusammen.

Tabelle 5: HPLC-Anlagen für die Gehaltsbestimmung von mTHPC

	Methode 1	Methode 2	Methode 3
Anlagentyp	Anlage 1	Anlage 2	Anlage 3
Software	HSM	D-2000 Elite	Empower 3
Messwellenlänge	DAD: 420 nm	DAD: 420 nm Fluoreszenzdetektor: 654 nm (Emission), 410 nm (Exzitation)	UV: 420 nm
Temperatur	Kein Säulenofen vorhanden	30 °C	Kein Säulenofen vorhanden
Injektionsvolumen	40 µL	40 – 80 µL	100 µL

Flussrate	1 mL/min	1 mL/min	1 mL/min
Trennsäule	Gemini NX C18	Gemini NX C18	Gemini NX C18
Verwendung	Vorversuche	Hauptversuche	A4D Freisetzung

Die Gehaltsbestimmung von mTHPC aus proteinhaltigen, bzw. FBS-haltigen Medien erfolgte durch Fällung mit einem Fällungsreagenz aus Triflouressigsäure in Acetonitril (0,1%, v/v). Dazu wurden 200 µL Probe mit 400 µL Fällungsreagenz versetzt, für 30 Sekunden auf dem Vortexer homogenisiert und im Thermomix für 10 Minuten (20 °C, 650 Upm) inkubiert, um eine vollständige Fällung der enthaltenen Proteine zu gewährleisten. Anschließend werden die Proben zur Abtrennung des Sediments zentrifugiert (20.800 rcf, 20 °C, 10 Minuten, Zentrifuge 5430 R). Die Überstände werden in Micro-Inserts in HPLC-Vials pipettiert und der Gehalt wird mittels HPLC-Analytik bestimmt.

Die Wiederfindung dieser Quantifizierungsmethode wurde an Hand von Proben in Freisetzungsmedium mit 50% FBS überprüft. Eine Lösung von 10 µg/mL mTHPC in Ethanol diente als Stammlösung, welche entsprechend zu Endkonzentrationen von 0,05 bis 1,0 µg/mL mit dem Freisetzungsmedium verdünnt wurde.

2.7.2. Photosensibilität von mTHPC

Da sich Photosensitizer ihrem Wirkmechanismus nach bei Bestrahlung mit einer definierten Wellenlänge unter Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies zersetzen können und nicht alle Arbeiten unter vollständigem Lichtausschluss durchgeführt werden konnten, wurde die Stabilität von mTHPC im Tageslicht bestimmt. Dazu wurde eine Lösung von 0,8 µg/mL mTHPC in Fließmittel hergestellt und in 10 HPLC Vials zu je 1 mL abgefüllt. Ein Vial wurde initial zur Gehaltsbestimmung verwendet. Jeweils drei Vials wurden für die Gehaltsbestimmung nach Lagerung unter Exposition von UV-Licht (auf der Fensterbank bei Raumtemperatur), unter Lichtschutz (mit Aluminiumfolie ummantelt bei Raumtemperatur) sowie im Kühlschrank (4-8 °C, lichtgeschützt) aufbewahrt und an den Tagen 2, 3 und 4 erneut gemessen.

2.7.3. Löslichkeit von mTHPC in Freisetzungsmedien

Der Wirkstoff mTHPC ist in wässrigen Medien äußerst schlecht löslich. Eine ausreichende Arzneistofflöslichkeit im Freisetzungsmedium ist jedoch die Voraussetzung für eine reproduzierbare Wirkstofffreigabe aus der Arzneiform. Unter optimalen Bedingungen liegt die finale, also maximale Wirkstoffkonzentration im Vessel bei Freisetzungsuntersuchungen um den Faktor drei unterhalb der Sättigungslöslichkeit. Es herrschen dann „*sink conditions*“. Dem Freisetzungsmedium wurde Methyl- β -cyclodextrin zugefügt, um die Löslichkeit von mTHPC anzuheben ohne aber, wie es für andere, häufig verwendete amphiphile Zusatzstoffe wie Natriumlaurylsulfat typisch ist, die Oberflächenspannung zu beeinflussen. Die thermodynamische Löslichkeit von mTHPC wurde in den Freisetzungsmedien mit 0%, 10%, 50% und 90% FBS jeweils mit und ohne den Zusatzstoff Methyl- β -cyclodextrin bei 37 °C bestimmt. Die Zusammensetzung der Freisetzungsmedien aus FBS, Methyl- β -cyclodextrin, Penicillin Streptomycin Konzentrat und Phosphatpuffer pH 7,4 ist in Tabelle 4 beschrieben. Es wurde eine Spatelspitze Wirkstoff in einem 5 mL Glasfläschchen mit 2 mL Medium versetzt, auf dem Vortexer homogenisiert und für 24 Stunden bei 37 °C auf dem Plattformschüttler unter Lichtschutz inkubiert. Anschließend wurden die Proben in 2 mL Eppendorf-Caps überführt und zur Separation des ungelösten mTHPCs 20 Minuten zentrifugiert (20.800 rcf, 37 °C, Zentrifuge 5430 R). Die Zentrifugation erfolgte bei 37 °C, um keine temperaturbedingte Präzipitation herbeizuführen. Die Überstände wurden mit einer Spritze aufgenommen und zur effizienten Abtrennung ungelösten Wirkstoffs zusätzlich durch einen Spritzenvorsatzfilter (PTFE, 0,45 μ m) filtriert, wobei der erste mL zur Absättigung der Filtermembran verworfen wurde. 200 μ L der Probe werden mit 400 μ L 0,1%-iger Trifluoressigsäure in Acetonitril versetzt. Proteinfreie Proben können direkt in HPLC-Vials pipettiert und zur Messung in der HPLC Anlage platziert werden. Proteinhaltige Proben hingegen bilden nach Zusatz dieses Fällungsreagenzes ein Präzipitat. Durch 10-minütige Inkubation im Thermomix (20 °C, 650 Upm) soll sichergestellt werden, dass die gesamte Proteinmenge präzipitiert ist und der Wirkstoff vollständig im Überstand gelöst vorliegt. Die Wiederfindung des Wirkstoffs nach dieser Prozedur wurde durch die Verwendung einer bekannten Konzentration ebenfalls überprüft. Durch Zentrifugation (20.800 rcf, 20 °C, 10 Minuten, Zentrifuge 5430 R) wurde das

Sediment abgetrennt, bevor der Wirkstoffgehalt mittels HPLC bestimmt werden konnte. Die Bestimmung der Löslichkeit erfolgte durch vierfache Messung.

2.7.4. Quantifizierung von Flurbiprofen mittels HPLC und LC-MS/MS

Die Arzneistoffkonzentration von Flurbiprofen in proteinfreien Proben wurde mittels HPLC bestimmt. Alle Proben wurden dazu mit einer Mischung aus Acetonitril und 0,1% (m/v) Trifluoressigsäure im Verhältnis 1/2 (200 μ L Probe + 400 μ L Lösungsmittel) verdünnt und nach angemessener Homogenisierung bei 20.800 rcf und 20 °C für 10 Minuten (Zentrifuge 5430 R) zentrifugiert. Vom Überstand wurden dann 80 μ L in die Chromaster HPLC Anlage 2 eingespritzt. Für diesen Aufarbeitungsschritt und die anschließende HPLC-Messung wurde die Wiederfindung des Flurbiprofens für die Konzentrationen 0,3 μ g/mL, 1,5 μ g/mL und 3,0 μ g/mL durchgeführt.

Die Proben der Freisetzungsexperimente wurden vor Verdünnung zur Entfernung von Schwebeteilchen oder partikulären Bestandteilen zentrifugiert (20.800 rcf, 20 °C, 10 Minuten, Zentrifuge 5430 R).

Tabelle 6: Analytik und Quantifizierung von Flurbiprofen

	HPLC	LC-MS/MS
Anlagentyp	Anlage 2	Massenspektrometer, Turbo-V-source (negative ESI mode, -4500V, 500 °C)
Software	D-2000 Elite	Analyst Software V1.6.2 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)
Detektion	DAD: 247 nm	Multiple reaction monitoring (MRM), Massenübergang (m/z) 243,0 zu 199,0 Da für Flurbiprofen und (m/z) 253,0 zu 197,0 Da für den internen Standard
Temperatur	30 °C	20 °C
Injektionsvolumen	80 μ L	20 μ L

Mobile Phase	42.5% (w/w) Trifluoressigsäure (0.1%,v/v) in Wasser und 57.5% (w/w) Acetonitril	Acetonitril / Wasser (70:30, v/v) mit 0.1% (v/v) Ameisensäure
Flussrate	1 mL/min	0,6 mL/min
Trennsäule	Gemini NX C18, 250*4,6 mm, 110 A, Security Guard Cartridges Gemini-NX C18, 4 * 3,0 mm, Phenomenex Inc., Aschaffenburg, Deutschland	Chiralpak AD-RH, 150 x 4.6 mm, 5 µm (Chiral Technologies, Illkirch Cedex, France) mit entsprechender Vorsäule
Verwendung	Proteinfreie Proben	Proteinhaltige Proben

Die Konzentrationsbestimmung von Flurbiprofen aus proteinhaltigen Medien wurde mittels LC-MS/MS (liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry) von Carlo Angioni am Institut für Klinische Pharmakologie (Goethe Universität Frankfurt, Deutschland) bestimmt. Der Arzneistoff wurde von den Plasmaproteinen des Mediums getrennt, indem 50 µL der Probe mit 250 µL Acetonitril und 50 µL der Lösung des internen Standards (Flurbiprofen-d5 2500 ng/mL in Acetonitril) versetzt wurden. Nach Mischen und Zentrifugieren (20.100 rcf, 3 Minuten, Zentrifuge 5424) wurde ein Volumen von 20 µL des Überstandes in die LC-MS/MS Anlage eingespritzt. Die Proben wurden im Autosampler bei 6 °C gekühlt.

2.7.5. Löslichkeit von Flurbiprofen in Freisetzungsmitteln

Zur Bestimmung der Löslichkeit in Freisetzungsmitteln wurden ca. 100 mg Flurbiprofen in einem 5 mL Glasfläschchen mit 2 mL Medium versetzt, auf dem Vortexer homogenisiert und für 24 Stunden bei 37 °C auf dem Plattformschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Proben in 2 mL Eppendorf-Caps überführt und zur Separation des ungelösten Flurbiprofens 20 Minuten zentrifugiert (20.800 rcf, Zentrifuge 5430 R). Die Zentrifugation erfolgte bei 37 °C, um keine temperaturbedingte Präzipitation herbeizuführen. Die Überstände wurden mit einer Spritze aufgenommen und durch einen Spritzenvorsatzfilter (PTFE, 0,45 µm) filtriert, wobei der erste mL zur Absättigung des Filters verworfen wurde. Für die Quantifizierung mittels HPLC wurden

anschließend 20 μL der Probe mit 980 μL mobiler Phase versetzt. Die Konzentrationsbestimmung aus proteinhaltigen Proben erfolgte mittels LC-MS/MS wie in Abschnitt 2.7.4 beschrieben. Für jedes Medium wurde die Löslichkeit dreimal bestimmt.

2.7.6. Stabilität von Flurbiprofen

Die Stabilität von Flurbiprofen im Freisetzungsmedium Phosphatpuffer pH 7,4 mit 1% Penicillin-Streptomycin-Konzentrat wurde ermittelt, indem der Wirkstoff in Freisetzungsmedium zu einer Soll-Konzentration von 100 und 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gelöst wurde. Nach Bestimmung der Konzentration zum Zeitpunkt $t = 0$ Stunden mittels HPLC-Analytik wurden die Lösungen bei 37 °C im Thermomix inkubiert (550 Upm) und deren Konzentration nach 24 Stunden erneut gemessen. Die Proben wurden 1/5 (200 μL Probe plus 800 μL) mit mobiler Phase verdünnt und mittels HPLC-Analytik, wie in Abschnitt 2.7.4 beschrieben, quantifiziert.

2.7.7. Quantifizierung von BSA

Die Gehaltsbestimmung von wässrigen BSA-Lösungen erfolgte mittels Größenausschlusschromatographie. Dazu wurde die HPLC Anlage 4 verwendet. Eine Biosep SEC S-3000 inklusive Vorsäule diente als stationäre Phase. Als mobile Phase war bereits ein frisch filtrierter Phosphatpuffer pH 6,8, welcher zur Entkeimung mit Natriumazid versetzt wurde (siehe Abschnitt 2.3), etabliert. Das Injektionsvolumen betrug 50 μL . Standardlösungen zu 20, 50, 100, 200 und 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSA wurden zur Kalibrierung verwendet. Die Detektionswellenlänge betrug 280 nm.

2.8. Herstellung und Charakterisierung von Arzneizubereitungen

2.8.1. Referenzformulierungen für die Freisetzung von mTHPC

Foscan

Als Referenzformulierung wurde eine Lösung des Wirkstoffes in einem Gemisch aus Ethanol und Propylenglycol (376 mg Ethanol + 560 mg Propylenglycol pro Milliliter) gemäß dem Fertigarzneimittel Foscan eingesetzt. In diesem Lösungsmittel liegt der Wirkstoff mTHPC in einer Konzentration von 1 mg/mL gelöst vor. Diese Konzentration wurde für die Freisetzungsuntersuchungen im Dispersion Releaser eingesetzt. Für die Freisetzungsversuche im A4D musste die Referenzformulierung hingegen aufkonzentriert werden, um die maximal zulässige Menge an organischem Lösungsmittel in der Dialysekammer einhalten zu können. Die verwendete Dialysemembran ist nur mit verdünnten organischen Lösungsmitteln kompatibel. Daher wurde die Referenzformulierung Foscan in diesem Fall in einer Konzentration von 2 mg/ml eingesetzt.

Temodextrin

Um den Einfluss des organischen Lösungsmittels auf das Freisetzungsprofil ausschließen zu können, wurde für ausgewählte Medien das Freisetzungsprofil der eigens entwickelten und gefriergetrockneten Zubereitung Temodextrin bestimmt. Temodextrin ist ein wasserlöslicher Komplex aus mTHPC und Hydroxypropyl- β -cyclodextrin. Dabei wird ein 10-facher molarer Überschuss des Cyclodextrins eingesetzt.

Die Herstellung des so genannten Temodextrins erfolgte durch Mischen einer Lösung von 1 mg/mL mTHPC in Ethanol (70%, v/v) mit einer wässrigen Hydroxypropyl- β -cyclodextrin-Lösung im Verhältnis 1:1 (v/v). Für den 10-fachen molaren Überschuss des Cyclodextrins wurde unter Berücksichtigung seiner mittleren molaren Masse (1472,47 g/mol) und des Trocknungsverlustes (3,2%, m/m) eine Lösung von 223,47 mg in 10,0 mL Milli-Q-Wasser hergestellt. Nach 5-stündiger Inkubation von Wirkstoff und Cyclodextrin auf der Schüttelplatte bei Raumtemperatur und unter

Lichtschutz erfolgte die Gefriertrocknung ohne weitere Zusatzstoffe über 55 Stunden. Eingefroren wurden die Proben durch Kühlung der Stellplatte auf -50 °C für 8 Stunden. Anschließend erfolgte die Haupttrocknung bei -10 °C und 0,04 mbar über 25 Stunden. Dem schloss sich die 10-stündige Sekundärtrocknung bei +10 °C und 0,001 mbar an.

Für die Freisetzungsversuche wird das gefriergetrocknete Temodextrin (0,5 mg/Vial) in 0,5 mL FreisetzungsmEDIUM zu einer Lösung von 1 mg/mL gelöst. Die Arzneistoffkonzentration entspricht dabei der Konzentration der Referenzformulierung Foscan.

2.8.2. Herstellung mTHPC-beladener PLGA Nanopartikel

mTHPC-beladene PLGA Nanopartikel wurden nach der Emulsions-Diffusions-Verdampfungsmethode hergestellt. Die Methode wurde bereits zuvor von Prof. K. Langer zum Patent angemeldet (WO2011071970, EP 2509633 A2 und A4) und in der Literatur beschrieben [31]. Jedoch wurde das Herstellverfahren im Hinblick auf die Wirkstoffbeladung und die Aufreinigung der Nanopartikel modifiziert. Dies sollte die Freisetzungskinetik dahingehend beeinflussen, dass ein höherer Anteil des Wirkstoffs potentiell in der Partikelmatrix inkorporiert vorliegt, um den für Nanopartikel üblichen „burst release“ [34] minimieren zu können.

Dazu wurden 500 mg PLGA und 25 mg mTHPC in 5 mL Ethylacetat in einem 50 mL Zentrifugenröhrchen gelöst und nach Zusatz von 10 mL wässriger PVA-Lösung (1%, m/m) mittels Ultra-Turrax (14.000-15.000 Upm) homogenisiert. Nach 15 Minuten wurde die Emulsion in einen Erlenmeyerkolben mit 40 mL PVA-Lösung (1%, m/m) überführt und zur Verdampfung des organischen Lösungsmittels über Nacht (~17 Stunden) offen auf der Magnetrührplatte unter dem Abzug gerührt (550 Upm). Am nächsten Tag wurden die Nanopartikel nach Überprüfung der Partikelgröße in Eppendorf-Caps zu je 1,5 mL aliquotiert. Es erfolgte eine 7-malige Aufreinigung. Die Partikel werden dazu zunächst zentrifugiert (16.100 rcf, 8 Minuten, Zentrifuge 5417) und anschließend in 1,5 mL wässriger PVA-Lösung (1%, m/m) unter Verwendung des Vortexers und des Ultraschallbades redispergiert. Nach dem siebten Zentrifugationsschritt wurden die Partikel in Milli-Q-Wasser anstelle der PVA-Lösung

aufgenommen, um überschüssiges PVA, welches nicht an die Partikel gebunden ist, zu entfernen. Die Nanopartikel wurden physiko-chemisch charakterisiert (beschrieben in den Abschnitten 2.8.6 und 2.8.7) und bis zur Gefriertrocknung im Kühlschrank gelagert.

Um die Oberflächen- und Freisetzungseigenschaften dieser Partikelspezies weiter zu modifizieren, wurde die Partikeloberfläche einiger Chargen mit Chitosan modifiziert. So sollte ein dünner Überzug auf die Partikel aufgetragen werden. Da auf Grund der entgegengesetzten Ladungen der Polymere PLGA und Chitosan eine Anlagerung begünstigt ist, wurde dieses natürliche Polymer ausgewählt. Die Auswahl des Chitosans wurde auch durch zwei Publikationen beeinflusst [60, 84]. Hierin wird beschrieben, wie das natürliche Polymer Chitosan ebenfalls zur Modifikation der Oberflächeneigenschaften von PLGA Nanopartikeln genutzt werden kann. Für den vorliegenden Fall wurde die Methodik allerdings abgewandelt und auf die Partikeleigenschaften der mTHPC-Partikel angepasst. Dazu wurden die Nanopartikel nach dem oben beschriebenen siebten Aufreinigungsschritt in einer 1%-igen (m/v) Lösung aus Chitosan in Essigsäure (1%, v/v) redispergiert und über Nacht (~17 Stunden) im Thermomix bei 20 °C und 750 Upm inkubiert. Anschließend wurden die Partikel durch Zentrifugation (20.800 rcf, 20 °C, 25 Minuten, Zentrifuge 5430 R) von der überschüssigen Chitosanlösung abgetrennt. Auf Grund der hohen Viskosität und dem Kompromiss aus effizienter Abtrennung und Redispergierbarkeit ging allerdings eine kleine Fraktion von Nanopartikeln mit dem Überstand verloren. Die Partikel werden in Milli-Q-Wasser redispergiert und vereint. 5 mL Nanopartikelsuspension werden mit 155,32 µL 8%-iger (v/v) Glutaraldehydlösung versetzt und nach 3-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur (Magnetührplatte) nochmals mit Milli-Q-Wasser aufgereinigt, um überschüssigen Glutaraldehyd zu entfernen. Die Menge an Glutaraldehyd wurde auf Basis mehrerer Annahmen festgelegt. Wurden beim „Überziehen“ mit Chitosan 1% der Chitosan-Menge an die Partikel gebunden, so sollte die verwendete Menge an Glutaraldehyd die vorhandenen Aminogruppen zu 100% vernetzen können. Die Quervernetzung der Aminogruppen des Chitosans mit Glutaraldehyd erfolgte zur Verdichtung des Chitosannetzwerkes und zur Erhöhung der Stabilität während Lagerung und Gefriertrocknung. Die fertigen

Nanopartikel wurden physiko-chemisch charakterisiert (beschrieben in den Abschnitten 2.8.6 und 2.8.7) und bis zur Gefriertrocknung im Kühlschrank gelagert.

Alle zur Partikelherstellung eingesetzten wässrigen Medien wurden vor Verwendung durch einen Spritzenvorsatzfilter (Celluloseacetat, 0,22 µm) filtriert, um Schwebstoffe zu entfernen.

2.8.3. Flurbiprofen-beladene PLA und PLGA Nanopartikel

Die Herstellung Flurbiprofen-beladener PLA und PLGA Nanopartikel erfolgte ebenfalls nach der Emulsions-Diffusions-Verdampfungs-Methode. Die Nanopartikel wurden hierbei ähnlich einer von Meister et al. beschriebenen Methode hergestellt [63]. Dazu wurden 200 mg Polymer und 2 mg Flurbiprofen in 4 mL Dichlormethan in einem 50 mL Zentrifugenröhrchen gelöst. Nach Zugabe von 12 mL 1%-iger (m/v) wässriger PVA-Lösung wurde die Emulsion für 15 Minuten bei ca. 17.000 Upm im Eisbad mittels Ultra-Turrax® homogenisiert. Anschließend wurde die homogenisierte Emulsion in einen Erlenmeyerkolben mit 12 mL 1%-iger (m/v) PVA-Lösung überführt und über Nacht offen unter dem Abzug gerührt (550 Upm), um die Verdampfung des organischen Lösungsmittels zu ermöglichen.

Alle zur Partikelherstellung eingesetzten wässrigen Medien wurden vor Verwendung durch einen Spritzenvorsatzfilter (Celluloseacetat, 0,22 µm) filtriert, um Schwebstoffe zu entfernen.

Die Nanopartikel wurden nach Evaporation des Dichlormethans einmal aufgereinigt, um die Stabilisatorkonzentration nach erfolgter Partikelbildung zu reduzieren. Dazu wurden je 2 mL Nanopartikelsuspension in ein Cap pipettiert und bei 16.100 Upm und 20 °C für 8 Minuten abzentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets in je 1,0 ml Milli-Q-Wasser unter Anwendung von Ultraschall (~10 Minuten) redispergiert und bis zur Weiterverarbeitung oder Gefriertrocknung im Kühlschrank gelagert.

2.8.4. Flurbiprofen-beladene Eudragit® Nanopartikel

Für die Herstellung Flurbiprofen-beladener Eudragit® Nanopartikel wurde eine Lösung aus 150 mg/mL Eudragit® RS 100 und 15 mg/mL Flurbiprofen in Ethanol 96% (v/v) hergestellt und zur Entfernung von Schwebeteilchen filtriert (PTFE, 0,45 µm). 1 mL dieser Lösung wurde in ein Schnappdeckelgläschen mit Magnetrührfisch gegeben und auf der Rührplatte (550 Upm) platziert. Mit einer Pumpe wurde anschließend die wässrige Stabilisatorlösung zur kontrollierten Desolvatisierung des Polymers hinzugegeben (12 mL/Minute). Eine Lösung von 0,01% (m/v) Pluronic F-68 in Milli-Q-Wasser diente hierbei als Stabilisator. Nach einer Stunde wurden die Nanopartikel aufgenommen und durch einmaliges Abzentrifugieren (16.100 Upm, 8 Minuten, Zentrifuge 5417) und Redispergieren in der gleichen Menge Milli-Q-Wasser aufgereinigt und bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert. Die Methode wurde bereits von Beyer et al. beschrieben [30]. Die Gefriertrocknung der Eudragit® Nanopartikel konnte unter Verwendung der etablierten Methoden nicht realisiert werden.

2.8.5. Gefriertrocknung von Nanopartikeln

Zur Erhöhung der Lagerstabilität und zur Ermöglichung der Aufnahme der getrockneten Nanopartikel im Freisetzungsmittel wurden die Partikelsuspensionen mittels Gefriertrocknung getrocknet. Die Suspensionen wurden dazu mit einem Gerüstbildner versetzt. Nicht überzogene mTHPC-Partikel wurden mit 10%-iger (m/v) steril filtrierter Mannitollösung zu einer Endkonzentration von 3% (m/v) Mannitol in der zu gefriertrocknenden Suspension versetzt. Da sich gezeigt hat, dass sich Mannitol nicht für die Gefriertrocknung von mit Chitosan überzogenen Partikeln eignet, wurde für diese Partikel Mannitol gegen Trehalose ausgetauscht. Die Endkonzentration in der Nanopartikelsuspension betrug dabei 5% (m/v) Trehalose. Flurbiprofen-beladene PLA Nanopartikel wurden ebenfalls nach Mischen im Verhältnis 1/1 (v/v) mit 10%-iger (m/v) Trehaloselösung gefriergetrocknet. Für die Trocknung wurden die Partikelsuspensionen in Gefriertrocknungsvials aus Röhrenglas überführt, wobei die Vialgröße entsprechend dem enthaltenen Volumen angepasst wurde.

Die Gefriertrocknung erfolge nach einem bekannten Protokoll [85] über eine Dauer von 51 Stunden. Die Proben wurden bei -60 °C eingefroren und anschließend langsam auf -10 °C zur Haupttrocknung erwärmt. Während der 30-stündigen Haupttrocknung wurde ein Vakuum von 0,006 mbar angelegt. Nach der Primärtrocknung erfolgte die Sekundärtrocknung bei 20 °C über 10 Stunden ebenfalls bei einem Druck von 0,006 mbar.

2.8.6. Partikelgrößenbestimmung und Zetapotential

Die Bestimmung von Partikelgröße, Polydispersitätsindex und Zetapotential der Nanopartikel erfolgte im Zetasizer Nano ZS. Das Gerät bestimmt die Partikelgröße mittels Photonenkorrelationsspektroskopie im 173 ° Winkel zum einfallenden Laser (633 nm, 4 mW). So wird der hydrodynamische Durchmesser von sphärischen Partikeln ermittelt, welche die gleiche zeitabhängige Intensitätsänderung im Streulichtmuster (dynamische Lichtstreuung) wie die Partikel der Probe aufweisen. Nicht-sphärische Partikel werden bei dieser Methode somit als sphärische Partikel betrachtet, was je nach Partikelmorphologie zu Verfälschungen führen kann. Da die Bewegung von Partikeln mit Größen im nm-Bereich dem Prinzip der Brown'schen Molekularbewegung folgt und diese abhängig von der Viskosität der Probe und der Dichte der Teilchen ist, ist die Messung zum einen von der Temperatur abhängig, und zum anderen insbesondere für Partikel höherer Dichte und damit einhergehender begünstigter Sedimentation im Messbereich nach oben hin eingeschränkt.

Das Zetapotential wird im Zetasizer Nano ZS nach dem Prinzip der Mikroelektrophorese bestimmt. Dazu wird ein elektrisches Feld zwischen den beiden Platten eines Kondensators, der sich in der Küvette befindet (Dip-Cell), angelegt und die Mobilität der Teilchen, welche von ihrer Größe und Ladung abhängt, bestimmt.

Gemessen wurde bei 25 °C. Die verwendete Methode berücksichtigt eine Equilibrierzeit von 2 Minuten vor jeder Messung, um Konvektionsströme zu vermeiden.

Zur Messung werden 20 µL Probe in ca. 1 mL frisch filtriertes Milli-Q-Wasser (Celluloseacetat-Filter, 0,22 µm) gegeben und nach Eintauchen der Dip-Cell in die Einmalküvette im Gerät platziert. Partikelgröße, PDI und Zetapotential können so in

einer programmierten Messung bestimmt werden. Jede Probe wurde mindestens dreimal separat verdünnt und gemessen.

Zur Bestimmung der Partikelgröße vor und nach Beendigung der Freisetzungsexperimente, die im A4D durchgeführt wurden, mussten die Proben bis zu Messung eingefroren (-20°C) werden. Die aufgetauten Proben wurden dann nach Homogenisierung unter Anwendung von Ultraschall (1-2 Minuten) ebenfalls vermessen.

2.8.7. Gravimetrische Bestimmung des Partikelgehaltes

Der Partikelgehalt wurde mittels Gravimetrie bestimmt. 50,0 µL Nanopartikelsuspension wurden dazu in einen tarierten Aluminiumtiegel pipettiert und für 2 Stunden im Trockenschrank bei 80 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Nach 30-minütigem Abkühlen im Exsikkator kann die Trockenmasse auf der Ultrafeinwaage ausgewogen werden.

2.8.8. Flurbiprofengehalt der Nanopartikelsuspension

Zur Bestimmung des Wirkstoffgehalts der Nanopartikelsuspensionen wurden 10 bis 20 µL Probe zu 1000 µL mit Fließmittel oder Acetonitril verdünnt. Durch 2-minütiges Homogenisieren sollte der gesamte enthaltene Wirkstoff in Lösung gehen. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten bei 20.800 rcf zur Abtrennung ungelöster Bestandteile zentrifugiert. Der Überstand wurde in HPLC-Vials überführt und anschließend gemäß der in Kapitel 2.7.1 beschriebenen Methode quantifiziert. Das Injektionsvolumen betrug 40 µL.

2.9. Wirkstofffreisetzung mittels Dialysesack

Wirkstofffreisetzung von mTHPC im Dialysesack

Die Wirkstofffreisetzung von mTHPC aus den beiden Referenzformulierungen Foscan und Temodextrin wurde im Freisetzungsmedium mit 50% FBS durchgeführt. Die Freisetzung beider Formulierungen wurde dabei sowohl für die Celluloseacetatmembran als auch für die Dialysiermembran aus regenerierter Cellulose bestimmt. Dazu wurden die Minivessel (Erweka) zunächst mit 250 g Freisetzungsmedium befüllt und diese zum Vorwärmen auf $37 \pm 0,5$ °C in die Freisetzungsapparatur (Erweka DT 6R) eingebracht. Eine Rührgeschwindigkeit von 75 Upm wurde für die Minipaddle eingestellt. Die Dialysiermembranen wurden zu Stücken zu je 8 cm zurechtgeschnitten, abgespült und für ca. 15 Minuten in vollentsalztem Wasser eingelegt, um die Lagerlösung aus 0,5% Natriumazid und enthaltenes Glycerol zu entfernen. Anschließend wurden die Membranschläuche an der einen Seite mit einer Klemme versehen, mit Freisetzungsmedium und 600 µL Foscan oder 626 µL Temodextrin (entsprechend 600 µg mTHPC) befüllt und mit einer zweiten Klemme verschlossen. Die Menge an Freisetzungsmedium innerhalb des Dialysesacks wurde für ein Gesamtvolumen von 4 mL im Inneren des Dialysesacks berechnet. Durch den Anteil organischen Lösungsmittels war darauf zu achten, dass zunächst das Freisetzungsmedium und erst im Anschluss daran die Probe in den Dialysesack eingefüllt wird. Die Dialysesäcke werden in die Vessel eingebracht und der Versuch gestartet. Dabei muss kontrolliert werden, dass die Membran nicht vom sich drehenden Paddle berührt wird und dennoch vollständig von Freisetzungsmedium benetzt bleibt. Schematisch ist dies in Abbildung 7 zu sehen. Der Probenzug von 0,5 mL erfolgt nach 15 und 30 Minuten, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 und 24 Stunden und das entnommene Volumen wird jeweils mit frischem Medium ersetzt. Von den Proben werden 200 µL entnommen und mit 400 µL Trifluoressigsäure (0,1%, v/v) in Acetonitril zur Fällung der Proteine versetzt. Diese Probenaufbereitung ist in Abschnitt 2.7.1 beschrieben.



Abbildung 7: Darstellung der Wirkstofffreisetzung mittels Dialysesack im Minivessel mit Minipaddle, Dialysiermembran aus regenerierter Cellulose

Permeationsexperimente von Flurbiprofen

248 g frisch entgastes Freisetzungsmittel wurden in Minivessel (Erweka) gefüllt und in den Freisetzungstester zum Vorwärmen auf $37 \pm 0,5$ °C eingebracht. Die Minipaddel wurden montiert und auf eine Drehgeschwindigkeit von 75 Upm eingestellt. Die Dialysiermembran wurde zu 8 cm Stücken zurechtgeschnitten und gemäß den Herstellerangaben zunächst gespült und für 15 Minuten in entsalztem Wasser eingelegt. Anschließend muss ein Ende des Schlauches mit einer Klemme geschlossen werden bevor die Testformulierung eingefüllt und der Schlauch durch eine weitere Klemme verschlossen werden kann. Die so vorbereiteten Dialysesäcke wurden dann zum Start des Freisetzungsexperiments an den Abdeckungen der Vessel befestigt und in das Freisetzungsmittel eingehängt. Hierbei war darauf zu achten, dass die Membran vollständig von Medium benetzt bleibt und das Paddel beim Rühren

nicht gegen die Membran schlägt. Daher konnte das Volumen an Freisetzungsmittel nicht weiter reduziert werden.

In einen Dialysesack wurden 2 mL Formulierung oder ein Gesamtvolumen von 2 mL bestehend aus Arzneistoffzubereitung und Freisetzungsmittel eingefüllt. Die Länge der für den Stoffaustausch zur Verfügung stehenden Membran betrug zwischen 4,5 und 6 cm, wobei es auf Grund der Handhabung nicht möglich war, die Größe der Austauschfläche darüber hinaus in einen engeren Bereich zu fixieren. Daher wurden die Längen jeweils nach Abschluss des Versuches gemessen und dokumentiert.

2.10. Der Dispersion Releaser

Der Dispersion Releaser entstand aus der Idee, eine standardisierte bzw. standardisierbare Apparatur zur *in vitro* Freisetzungsforschung von kolloidalen Arzneiträgern zu entwickeln. In der Entwicklungsphase wurden die folgenden Kriterien für die Konstruktion der Apparatur festgelegt:

- Dialyse-basierte Freisetzungsvorrichtung mit konstanter Membranoberfläche
- Einbau in eine der bestehenden Arzneibuchapparaturen, bevorzugt die weitverbreitetste Blattrührvorrichtung (Apparatur 2 nach Ph. Eur.)
- Möglichkeit des Probenzuges aus Donor- und Akzeptorkammer auch während des laufenden Experiments
- Minimale Wasserverdunstung während langer Versuchszeiten
- Einfache und anwenderfreundliche Handhabung
- Verwendung unterschiedlicher Dialysemembranen im Hinblick auf Porengröße und Membranmaterial
- Agitation in Donor- und Akzeptorkammer
- Kompatibilität mit diversen kolloidalen Arzneiformen wie beispielsweise Nanopartikeln, Liposomen und Polymermizellen.

Nicht alle Kriterien konnten bereits mit der ersten Version des Dispersion Releasers realisiert werden. Es stellte vor allem eine große Herausforderung dar, die Dichtigkeit der Donorkammern sicherzustellen. Daher wird im Folgenden auf die unterschiedlichen Charakteristika der Apparaturen eingegangen.

Für alle Versionen gilt, dass zunächst die Minivessel der Firma Erweka mit 136 g Freisetzungsmittel befüllt werden. Das Nennvolumen der Donorkammern beträgt 4 mL, wobei es sich herausstellte, dass die Zellen maximal mit 3,8 mL befüllt werden sollten, um ein Überlaufen zu verhindern. In den Donorkammern befindet sich ein kleines Paddle, welches von der Freisetzungsapparatur angetrieben wird und am unteren Ende mit Magneten versehen ist. Durch diese Magnete kann der Drehimpuls an einen ebenfalls magnetischen Rührer, welcher sich in der Akzeptorkammer befindet, weitergegeben werden. Der Inhalt beider Kammern kann somit konstant gerührt werden.

2.10.1. Wirkstofffreisetzung mittels Dispersion Releaser Version 1

Der Dispersion Releaser Version 1 (DR V1) wurde vollständig aus Polyoxymethylen (POM, Delrin®) gefertigt. Der Werkstoff ist ein hochkristalliner Thermoplast, der sich durch seine hohe mechanische Belastbarkeit und Stabilität auszeichnet. Die Donorkammer des DR V1 besteht aus einem Käfig, über den die Dialysemembran aus regenerierter Cellulose gezogen wird.

Die Dialysemembranen aus regenerierter Cellulose wurden mit vollentsalztem Wasser zunächst gereinigt und anschließend für 10 Minuten in frisches vollentsalztes Wasser eingelegt, um Rückstände der Lagerlösung zu entfernen. Dieses Vorgehen war für alle Versionen des DR gleich.

Da der Verschlussmechanismus im DR V1 noch nicht optimiert war, musste die Membran zunächst trocknen, bevor die angefeuchteten Verschlusskappen montiert werden konnten. Die Kammern wurden anschließend über Nacht in Milli-Q-Wasser rehydriert. Die untere Verschlusskappe weist im Boden ein kleines Loch auf, durch das beim Verschließen der Donorkammer ein am Boden der Donorkammer befestigter Stift eintaucht. So konnte verhindert werden, dass sich die untere Verschlusskappe während des Freisetzungstests löst oder um die eigene Achse dreht. Im DR V1 wurde die Permeation von mTHPC in unterschiedlichen Freisetzungsmitteln sowie die Wirkstofffreisetzung von mTHPC aus kolloidalen Arzneiträgern untersucht. Alle Freisetzungsversuche im DR V1 wurden unter Lichtschutz durchgeführt, um den

Abbau des Wirkstoffs mTHPC während der Freisetzung zu verhindern. Als Standardbedingungen galt eine Temperatur im Vessel von $37 \pm 0,5$ °C und eine Rührgeschwindigkeit von 75 Upm. Proben von 0,5 mL wurden nach 15 und 30 Minuten, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 und 24 Stunden entnommen und jeweils mit frischem Medium ersetzt.



Abbildung 8: DR V1 im Minivessel der Firma Erweka

2.10.2. Wirkstofffreisetzung mittels Dispersion Releaser Version 2

Für den DR V2 wurde der Durchmesser der Donorkammer minimal reduziert, um eine einfachere und trocknungsfreie Montage der Dialysiermembran aus regenerierter Cellulose zu ermöglichen. Die Membran kann nun leicht über das Gehäuse geschoben und mittels O-Ringen fixiert und abgedichtet werden, wie in Abbildung 9 dargestellt ist.

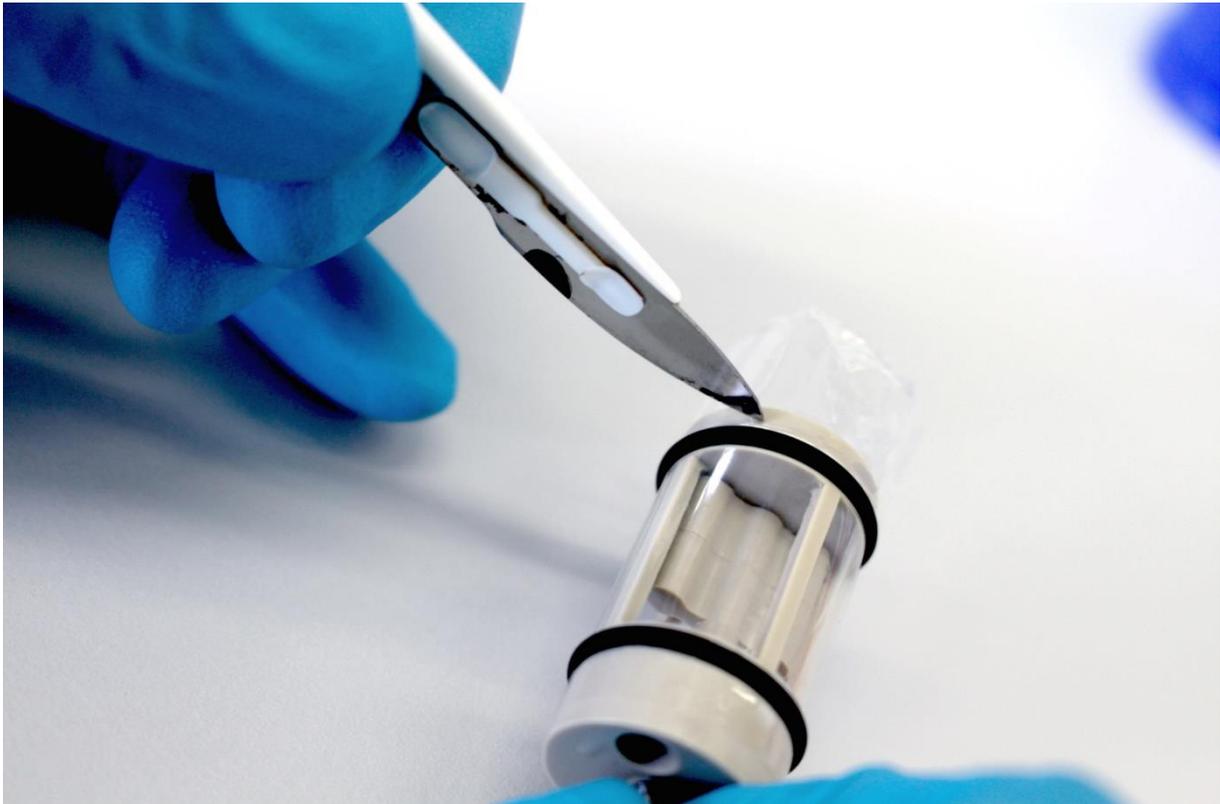


Abbildung 9: DR V2, Montage der Dialysemembran und Verschluss mittels O-Ringen (bereitgestellt von AG Wacker, Institut für Pharmazeutische Technologie, Goethe Universität, Frankfurt)

Die untere Verschlusskappe konnte bei dieser Version entfallen. Die obere Verschlusskappe ist mit einem Schlitz versehen, um bei der Montage der Donorkammer in die Halterung einen festen Halt zu gewährleisten (Fixierung mittels Schraube). Abbildung 10 zeigt den DR V2 montiert in Minivessel des Freisetzungstesters.



Abbildung 10: DR V2 im Freisetzungstester Erweka DT 700

Der Verschlussmechanismus dieser Version wies allerdings auch nach Modifizierung der Maße des O-Rings (Stärke, Durchmesser) und der Tiefe der Nut keine ausreichende Dichtigkeit bei Verwendung einer Membran aus Celluloseacetat auf.

Für die Herstellung des DR V2 wurde das Material Delrin gegen ungefärbtes Polyetheretherketon (PEEK) ausgetauscht. PEEK ist ein hochschmelzender Thermoplast, welcher äußerst inert und in den meisten organischen und anorganischen Lösungsmitteln stabil ist. So sollen adsorptive Effekte mit Wirk- und Hilfsstoffen vermieden und die Reinigung mit Alkohol bedenkenlos ermöglicht werden. Andere pharmazeutische Testapparaturen wie der A4D wurden ebenfalls aus PEEK gefertigt.

Der DR V2 sollte nach einem behördlich verfassten Protokoll validiert werden. Die Methodvalidierung gilt im Allgemeinen dem Beweis, dass die eingesetzte Methode für den entsprechenden Verwendungszweck geeignet ist. Zwei Richtlinien für die Durchführung der Validierung von Labormethoden hat -neben anderen- die amerikanische Zulassungsbehörde veröffentlicht [86, 87]. Diese Richtlinien sind jedoch nicht speziell für die Validierung von Freisetzungsmethoden ausgelegt und auf diese nur begrenzt anwendbar. Ebenfalls nur eine limitierte Anwendbarkeit gilt für die

im Amerikanischen Arzneibuch in Kapitel <1092> „The Dissolution Procedure: Development and Validation“ beschriebene Validierungsmethode für Freisetzungsforschungen unter Verwendung der im Arzneibuch gelisteten Apparaturen [88]. Dennoch konnten aus diesen drei genannten Dokumenten notwendige und sinnvolle Aspekte abgeleitet werden. Dazu zählen die Korrektheit der Ergebnisse, die Wiederholbarkeit zwischen Versuchstagen und Analytisten, die Reproduzierbarkeit sowie die Robustheit im Hinblick beispielsweise auf die Temperatur und Rührgeschwindigkeit. Da jedoch einige Parameter klassischer Validierungsprotokolle nicht für unseren Versuchsaufbau anwendbar waren, entspricht der im Folgenden geschilderte Versuchsaufbau keiner vollständigen Validierung im behördlichen Sinn und wird daher mit Evaluierung betitelt. Unter anderem wurde in unserem Versuchsaufbau keine Freisetzung einer Placebo-Arzneiform getestet, da bereits bekannt war, dass sowohl die HPLC- als auch die MS-Methode selektiv den Wirkstoff Flurbiprofen detektiert und nicht von den anderen Zusatzstoffen beeinträchtigt wird. Andere Bausteine wurden hingegen zum Evaluierungsplan ergänzt, da keines der oben erwähnten Dokumente beispielsweise eine Prüfung auf Dichtigkeit vorsieht, diese aber als grundlegend notwendig zur Bewertung der Apparatur angesehen wird.

Der DR V2 wurde somit nach einem umfangreichen Protokoll evaluiert. Zu diesem Zweck wurde die Permeation des Modellarzneistoffs Flurbiprofen unter verschiedenen Bedingungen sowie seine Freisetzung aus polymeren Nanopartikeln getestet. Unter Standardbedingungen betrug die Temperatur im Vessel $37 \pm 0,5$ °C, die Rührgeschwindigkeit 75 Upm und als Freisetzungsmittel diente ein 10 mM Phosphatpuffer pH 7,4 versetzt mit 1% Penicillin-Streptomycin-Konzentrat. Eine Übersicht über alle Freisetzungsversuche mit Flurbiprofen im DR V2 sowie über die zum Vergleich im Dialysesack durchgeführten Experimente ist in Tabelle 7 dargestellt. Für Untersuchungen im DR V2 wurden im Fall der PLA und PLGA Nanopartikel 3,2 mL redispergierte Nanopartikelsuspension und im Fall der Eudragit Nanopartikel 1,0 mL Suspension eingesetzt. Im Dialysesack wurde eine Probe von 2,0 mL eingesetzt. Proben von 0,5 mL wurden nach 15 und 30 Minuten, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 22 und 24 Stunden entnommen und jeweils mit frischem Medium ersetzt.

Tabelle 7: Übersicht über Freisetzungsexperimente mit Flurbiprofen zur Evaluierung des DR V2

Test	Setup	Medium	Temperatur	Upm
Permeabilität (Standard)	DR	PBS pH 7.4	37 °C	75
Permeabilität (Wiederholung)	DR	PBS pH 7.4	37 °C	75
Robustheit Temperatur	DR	PBS pH 7.4	50 °C	75
Robustheit Upm	DR	PBS pH 7.4	37 °C	50
Robustheit Medium	DR	PBS pH 7.2 +10 g/L BSA	37 °C	75
Robustheit Medium	DR	PBS pH 7.2 +1 g/L BSA	37 °C	75
PLA NP 1	DR	PBS pH 7.4	37 °C	75
PLA NP 2	DR	PBS pH 7.4	37 °C	75
Eudragit® NP	DR	PBS pH 7.4	37 °C	75
PLGA NP	DR	PBS pH 7.4	37 °C	75
Permeabilität DB	DB	PBS pH 7.4	37 °C	75
PLA NP 2	DB	PBS pH 7.4	37 °C	75

2.10.3. Wirkstofffreisetzung mittels Dispersion Releaser Version 3

Eine letzte Modifikation durch erneute Anpassung des Durchmessers der Donorzelle sowie die Einführung einer optimierten und mit einem O-Ring versehenen unteren Verschlusskappe führte zur vorerst letzten Version: Der DR V3. Dieser kann nun auch mit Dialysemembranen aus Celluloseacetat verwendet werden. Der Einsatz unterschiedlicher Membranmaterialien ermöglicht den Einsatz des Dispersion Releasers für die Wirkstofffreisetzung von Wirkstoffen unterschiedlicher physikochemischer Eigenschaften. Im DR V3 wurde die Permeation von mTHPC in unterschiedlichen Freisetzungsmedien untersucht und mit den Daten im DR V1 verglichen. Auch alle Freisetzungversuche im DR V3 wurden unter Lichtschutz durchgeführt. Die Probennahme erfolgte wie für den DR V1 beschrieben.

2.10.4. Überprüfung des Dispersion Releasers auf Dichtigkeit

Die Dichtigkeit des Dispersion Releasers wurde parallel zur Weiterentwicklung der Apparatur optimiert. Nach mehreren Korrekturen an den ersten Prototypen ließen die ersten Freisetzungsvorversuche im DR V1 keinen Verdacht mehr auf eine Undichtigkeit aufkommen, denn durch Optimierung der unteren Verschlusskappe (ein einrastender Stift, wie in Abschnitt 2.10.1 beschrieben) konnten die für die Prototypen zuvor beobachteten Unregelmäßigkeiten behoben werden. Im Fall einer Undichtigkeit hätte die Freisetzung der Referenzformulierung Foscan deutlich beschleunigt ausfallen müssen. In Vorversuchen im DR V1 wurde darüber hinaus die Donorkammer in mehreren Untersuchungen mit FBS-freiem Medium befüllt. Nach Beendigung des Freisetzungstests wurde die Donorkammer auf die Anwesenheit von Proteinen hin untersucht. Da die Akzeptorkammer in diesen Untersuchungen stets FBS-haltiges Medium enthielt, hätten im Falle einer Undichtigkeit die Proben der Donorkammer einen positiven Nachweis auf Proteine (Fällung mit TFA 0,1% (v/v) in ACN) zeigen müssen. Diese Vorversuche werden jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht dargestellt, da eine systematische Untersuchung des DR V1 auf Dichtigkeit nicht durchgeführt wurde.

Die Dichtigkeit des DR V2 wurde durch Bestimmung des Permeationsverhaltens von BSA aus einer Lösung ermittelt. Dazu wurden die Akzeptorkammern (Minivessel) zunächst mit 136 g proteinfreiem Medium (PBS pH 7,4) befüllt und zum Vorwärmen auf $37 \pm 0,5$ °C in den Freisetzungstester eingebracht. In die Donorkammern wurden anschließend 3,8 mL einer Lösung von 25 mg/mL BSA in PBS pH 7,4 pipettiert. Es werden nach 1, 2, 4, 8 und 24 Stunden Proben von je 1,0 mL genommen und das entnommene Volumen mit frischem Phosphatpuffer ersetzt. Die Gehaltsbestimmung erfolgt aus der unverdünnten Probe mittels Größenausschlusschromatographie entsprechend der Methodenbeschreibung in Abschnitt 2.7.7. BSA wurde ausgewählt, da es ein Molekulargewicht oberhalb dem MWCO der Dialysemembran aufweist, wodurch die Membran für BSA generell nicht permeabel sein sollte. Darüber hinaus hat der Hersteller die Prüfung der Dialysemembran aus regenerierter Cellulose ebenfalls mittels BSA durchgeführt. So sollen innerhalb eines Zeitraumes von 17 Stunden maximal 10% des eingesetzten bovinen Albumins durch die Membran hindurchdiffundieren (Quelle: Kommunikation mit Knut Kuss von Spectrum Labs). Eine

absolute Menge oder Konzentration von BSA in der Donorkammer wurde jedoch nicht kommuniziert. Die Menge von 100 mg je DR wurde festgelegt, da sich eine 10%-ige Freisetzung (entspricht einer Konzentration von $\sim 75 \mu\text{g/mL}$) noch sehr gut mittels Größenausschlusschromatographie bestimmen lässt. Ein weiterer Vorteil der BSA Methode ist, dass eine SEC-Methode für die Quantifizierung des Proteins anwendbar ist. Da zum Zeitpunkt 17 Stunden kein Probenzug möglich war, und der bekannte Referenzwert von 10% nach 17 Stunden nicht ohne weitere Kenntnis der Kinetik extrapoliert werden kann, wurde kein Referenzwert für 24 Stunden festgelegt.

Für den DR V3 erwies sich die für den DR V2 zuvor entwickelte Methode mit BSA jedoch als untauglich. Daher wurde ein von Dr. Mukul Ashtikar entwickeltes Verfahren eingesetzt, welches auf der Freisetzung von Gold-Nanopartikeln mit einer nominellen Partikelgröße von 50 nm beruht. Gold-Nanopartikel dieser Größenfraktion absorbieren UV-Licht bereits in sehr niedriger Konzentration. Die Wellenlänge des Absorptionsmaximums ist dabei abhängig von ihrer Partikelgröße (Charge MKBW5581V: Hydrodynamischer Durchmesser 58 nm, $\lambda_{\text{max}}=534 \text{ nm}$). Die Anwesenheit von Gold-Nanopartikeln in der Akzeptorkammer kann somit durch UV-Messungen erfolgen, wobei in dem eingesetzten Konzentrationsbereich nur eine qualitative Aussage möglich ist.

Dazu wurden die Minivessel zunächst mit 100 mL Wasser befüllt und mit einem 100 mL-Becherglas bestückt. Das Wasser im Inneren der Vessel dient dabei lediglich der Wärmeübertragung vom Wasserbad zum Dispersion Releaser. Das Becherglas enthielt 60 mL Milli-Q-Wasser als Akzeptormedium. So konnte das Volumen der Akzeptorkammer um mehr als die Hälfte im Vergleich zum Standardversuchsaufbau reduziert werden, damit die Messmethode eine ausreichende Sensitivität für das Signal der Nanopartikel aufweist. Die Donorkammern wurden mit je 3,8 mL Probe befüllt, welche zuvor durch Verdünnung von 7 mL Gold-Nanopartikeln mit 21 mL Milli-Q-Wasser hergestellt wurde. Der Test wurde gestartet und die Standardrührgeschwindigkeit der Paddle von 75 Upm eingestellt. Nach 1, 2, 3, 4, 6, 8 und 24 Stunden erfolgte der Probenzug von je 0,5 mL, wobei das entnommene Volumen jeweils durch Milli-Q-Wasser ersetzt wurde. Die entnommene Probe wurde zunächst mittels PCS und anschließend mittels UV-Analytik bestimmt. Der Zetasizer Nano ZS wurde dazu auf Gold-Nanopartikel umgestellt (Brechungsindex 3,320) und in einem manuellen Modus (4 Durchläufe, 20 Sekunden, 3 Messungen) betrieben. Im

UV-Meter wurde ein Absorptionsspektrum von 300 bis 700 nm aufgenommen. Nach 24 Stunden wurde die Membran mit einer Kanüle durchstoßen, um ein Auslaufen der Dispersion Releaser zu forcieren und somit die Messmethode durch eine Positivkontrolle zu verifizieren.

2.11. Wirkstofffreisetzung mittels A4D in der Durchflusszelle

Die Freisetzungsexperimente mittels A4D erfolgten in der Durchflusszelle, Apparatur 4 nach Ph. Eur., wie sie in Abbildung 11 zu sehen ist. Es wurden die Standardzellen zur Testung oraler Arzneiformen (innerer Durchmesser 20 mm) verwendet, in welche der sogenannte A4D eingesetzt werden kann. Der A4D ist ein Dialyseadapter, der für die Wirkstofffreisetzung nanoskaliger Arzneizubereitungen entwickelt wurde [5]. Außerdem besteht die Durchflusszelle aus einer Pumpe, die das Medium mit einem konstanten Fluss von 8 mL/min durch die Zellen befördert, einer Rührplatte, die im geschlossenen Modus das Medium durchmischt und vorwärmt, und einem Autosampler.



Abbildung 11: Durchflusszelle mit A4D

Zur Vorbereitung der Adapter wurden Membranstücke von ca. 10 cm Länge zurechtgeschnitten. Dieser Überschuss berücksichtigt den Mehrbedarf an Membran

für die Montageeinheit. Die Membranen wurden unter fließendem vollentsalztem Wasser von der Natriumazid-haltigen Lagerlösung gereinigt. Zur Entfernung von Glycerin, welches als Weichmacher in der Celluloseacetatmembran enthalten ist, wurden die Membranen für weitere 15 Minuten in vollentsalztem Wasser gelagert. Anschließend können die Membranen über die Adapter gezogen, mit O-Ringen fixiert und der Adapter an einem der beiden Enden zugeschraubt werden. Durch Befüllung mit Wasser wurde getestet, ob die Adapter dicht sind. Diese Praxis hat sich zuvor in den Laboren von SPS Pharma Services (Orleans, Frankreich), in denen die hier beschriebenen A4D Versuche durchgeführt wurden, als hilfreich erwiesen, da es erfahrungsgemäß bei mindestens einer von sechs Zellen initial zu Undichtigkeiten kommen könne. Bis zur Verwendung der Adapter lagern diese in vollentsalztem Wasser.

Die Freisetzungsm Medien wurden wie in Kapitel 1.4.3 beschrieben hergestellt und auf 37 °C vortemperiert. Während des Versuches wurden sie konstant gerührt und mittels Heizfunktion der Rührplatte auf ca. 32 °C gehalten, um eine Präzipitation des Wirkstoffs zu vermeiden. Die Durchflusszellen und die Probenkammern wurden auf 37 °C eingestellt.

Die präparierten Adapter wurden mit Probe und ggf. Medium zu einem konstanten maximalen Volumen von 1 mL pro Adapter befüllt und in die Freisetzungszellen der Apparatur eingebracht. Dies ist in Abbildung 12 dargestellt.



Abbildung 12: Befüllung der A4D und Position in der Durchflusszelle

Der Probenzug erfolgte durch den Autosampler in HPLC-Vials aus Braunglas. Es wurde nach 10, 20 und 30 Minuten sowie weiterhin nach 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14 und 18 Stunden jeweils eine Probe von 1 mL entnommen. Das entnommene Volumen wurde nicht ersetzt, da das gewählte Setup dies nicht zuließ. Während des Versuches

wurde die gesamte Apparatur mit einem schwarzen Tuch abgedeckt, um den Wirkstoff vor Licht zu schützen. Die Reinigung der Apparatur inklusive aller Schläuche erfolgte mit vollentsalztem Wasser und 15%-igem (v/v) Ethanol.

Vorbereitung der mTHPC-Formulierungen:

Die gefriergetrockneten Nanopartikel (entsprechend 370 µg mTHPC) wurden in 1,101 mL Freisetzungsmedium redispergiert, sodass die Wirkstoffkonzentration 336 µg/mL betrug und somit die gesamte notwendige Arzneistoffdosis in dem maximalen Füllvolumen der A4D Donorkammern von 1 mL enthalten war.

Die Referenzformulierung Foscan musste in einer Konzentration von 2 mg/mL eingesetzt werden, um die Menge an organischem Lösungsmittel zu reduzieren und die Kompatibilität mit der Dialysemembran sicherzustellen. Es wurden daher in jede Zelle 168 µL Foscan (2 mg/mL) und 832 µL Freisetzungsmedium pipettiert.

2.12. Mathematische Auswertung der Freisetzungsprofile des DR V2

Berechnung der Permeabilitätskonstanten k_M nach Xie et al.

Die Bestimmung der sogenannten Permeabilitätskonstanten k_M nach Xie et al. [66] erfolgte zur besseren Vergleichbarkeit der Freisetzungsprofile von Flurbiprofen aus den gelösten Zubereitungen. Dabei stellt k_M im eigentlichen Sinn eine Diffusionskonstante dar, da die Permeation durch die Membran insbesondere durch die Diffusion charakterisiert wird. Jedoch wurde die von den Autoren gewählte Nomenklatur der Permeabilitätskonstanten für die vorliegende Arbeit beibehalten. Mittels der Bestimmung von k_M unter verschiedenen Versuchsbedingungen sollten die Einflussfaktoren Temperatur, Rührgeschwindigkeit, die Medienkomposition und auch die Vergleichsapparatur Dialysesack mathematisch ausgewertet und verglichen werden. Die mathematischen Berechnungen wurden dabei von Frau Dr. Li Kirsamer (geb. Xie) durchgeführt. Die k_M -Werte wurden für jede einzelne Freisetzungszelle bestimmt, um anschließend den Mittelwert der 6 Apparaturen bilden zu können. Außerdem diente die Berechnung von k_M als Grundlage für die weitergehende Interpretation der Freisetzungsdaten aus den kolloidalen Trägern. Dazu wurde unter

Verwendung von MATHEMATICA® (Wolfram Research, Inc., Champaign, IL, USA) eine Regression durch die Datenpunkte erzeugt, welche dem Fick'schen Diffusionsgesetz folgt (siehe Gleichung 1). Die Gleichung berücksichtigt die Oberfläche (A) und Dicke der Dialysemembran (h), das Volumen der Akzeptorkammer (V_a) sowie die Konzentration von Flurbiprofen in der Akzeptor- und Donorkammer (C_a und C_d). A beträgt für den Dispersion Releaser 11,3 cm² und für den Dialysesack im Durchschnitt 26,6 cm². Die Volumina betragen im Falle des Dispersion Releasers $V_a = 136$ mL und im Fall des Dialysesacks $V_a = 248$ mL. Die Membrandicke wird mit 60 µm angenommen [89].

$$\frac{dC_a}{dt} = \left[\frac{k_m * A}{h * V_a} \right] * [C_d(t) - C_a(t)] \quad (1)$$

Subtrahiert man die Arzneistoffmenge zum Zeitpunkt t in der Akzeptorkammer von der initial eingesetzten Arzneistoffmenge (Q_0) und teilt durch das Volumen der Donorkammer, so erhält man gemäß Gleichung (2) die Konzentration an Flurbiprofen in der Donorkammer (C_d) zum entsprechenden Zeitpunkt. Dies setzt jedoch voraus, dass die gesamte Arzneistoffmenge in der Donorkammer gelöst vorliegt.

$$C_d(t) = \frac{[Q_0 - C_a(t) * V_a]}{V_d} \quad (2)$$

Gleichung (2) kann in das Diffusionsgesetz nach Gleichung (1) eingefügt werden. So kommt man auf Gleichung (3). Durch Lösen der Differentialgleichung resultiert Gleichung (4) wobei $Q_0/(V_a+V_d)$ die Konzentration von Flurbiprofen im Equilibrium darstellt. Durch Zusammenfassung mehrerer Parameter zur neuen Variablen k_T gemäß Gleichung (6) kann Gleichung (4) zu Gleichung (5) vereinfacht werden. Die neue Variable k_T ist definiert als totaler Diffusionskoeffizient und kann aus der Regression mittels MATHEMATICA® hergeleitet werden. Die Variable k_T wird dabei nur durch eine Unbekannte (k_M) beschrieben, sodass k_M aus k_T direkt bestimmt werden kann.

$$\frac{dC_a}{dt} = \left(\frac{k_m * A}{h * V_a} \right) * \left[\frac{Q_0 - C_a(t) * V_a}{V_d} - C_a(t) \right] \quad (3)$$

$$C_a(t) = \left[\frac{Q_0}{V_a + V_d} \right] \left\{ 1 - e^{-\frac{A * k_m * t * (V_a + V_d)}{h * V_a * V_d}} \right\} \quad (4)$$

$$C_a(t) = \left[\frac{Q_0}{V_a + V_d} \right] \{ 1 - e^{-k_T * t} \} \quad (5)$$

$$k_T = \frac{A \cdot k_m \cdot (V_a + V_d)}{h \cdot V_a \cdot V_d} \quad (6)$$

Mathematische Auswertung der Freisetzungprofile

Die Untersuchung der kinetischen Prozesse im Zusammenhang mit der Freigabe von Wirkstoffen aus ihrer Arzneiform ist essenziell für das Verständnis einer Arzneiform und der Faktoren, die die Freisetzung *in vivo* beeinflussen können [50]. Dies gilt für die Formulierungsentwicklung wie für die Qualitätskontrolle. Für die Auswertung der im Rahmen dieser Arbeit für Flurbiprofen erhobenen Freisetzungsdaten wurde ein mathematisches Modell angewendet, welches von Dr. Li Kirsamer entwickelt wurde [66]. Frau Kirsamer hat die mathematischen Berechnungen für diese Arbeit programmiert und durchgeführt. Dazu wurden mittels dem von Frau Kirsamer entwickelten „four-step“ Modell die Profile der gesamten freigesetzten Arzneistoffmenge ermittelt. Diese ergibt sich aus der Summe der freigesetzten Arzneistoffmenge in der Donorkammer und der Akzeptorkammer zum jeweiligen Zeitpunkt t . Die freigesetzte Arzneistoffmenge in der Akzeptorkammer wird aus dem Probenzug bestimmt und als kumulative Freisetzung dargestellt. Dabei wird die dem Vessel mit der Probe entnommene Arzneistoffmenge in der Freisetzung addiert. Andernfalls bliebe die Verdünnung, welche aus dem Austausch von Probe gegen frisches Medium resultiert, unberücksichtigt. Die freigesetzte Arzneistoffmenge in der Donorkammer muss im Gegensatz zur Akzeptorkammer mathematisch modelliert werden. Die mathematische Überlegung des „four-step“ Modells wird nachfolgend beschrieben.

Der erste Schritt des Modells beinhaltet die Berechnung von k_M , welche bereits im vorangegangenen Abschnitt dieses Kapitels 2.12 dargelegt wurde. Im zweiten Schritt des Modells wird die Konzentrationszunahme in der Akzeptorkammer zwischen den Datenpunkten des gemessenen Freisetzungssprofils gemäß Gleichung (7) in den gewählten Rahmenbedingungen als linear angesehen. Diese Annahme gilt allerdings nur, wenn die Datenpunkte in einem engen Abstand zueinander liegen und somit von einer Pseudolarität ausgegangen werden kann (Li Kirsamer, persönliche Kommunikation).

$$\frac{dC_a}{dt} \approx \frac{\Delta C_a}{\Delta t} = \left[\frac{k_m \cdot A}{h \cdot V_a} \right] * [C_a(t) - C_a(t)] \quad (7)$$

Im dritten Schritt des Modells kann nun nach Umstellung von Gleichung (7) in Gleichung (8) die freie Arzneistoffkonzentration in der Donorkammer zum Zeitpunkt t in Abhängigkeit von Konzentrationsänderung und Arzneistoffkonzentration in der Akzeptorkammer zum Zeitpunkt t berechnet werden:

$$C_d(t) = \left(\frac{\Delta C_a}{\Delta t} \right) * \frac{h * V_a}{k_m * A} + C_a(t) \quad (8)$$

Zuletzt (Schritt 4 von 4) wird durch Addition gemäß Gleichung (9) -unter der Voraussetzung konstanter Volumina in beiden Kompartimenten- die totale Konzentration (Q_t) an freiem Arzneistoff berechnet:

$$Q_t(t) = C_d(t) * V_d + C_a(t) * V_a \quad (9)$$

Die weitergehende Bewertung und Analyse der Freisetzungprofile von Flurbiprofen mittels der im Folgenden beschriebenen Modelle erfolgte an Hand der Profile der totalen freien Flurbiprofenkonzentration. Dabei wird in den Berechnungen zur Vereinfachung angenommen, dass die freie totale Wirkstoffkonzentration in beiden Kompartimenten von den Freisetzungseigenschaften des Arzneiträgers, nicht jedoch von der Membrankinetik abhängt. Hier wäre es wünschenswert gewesen, ein Modell zur Verfügung zu haben, welches diesen Einflussfaktor ausreichend in die Berechnungen einbezieht.

Interpretation der Freisetzungprofile

In vielen Fällen können Freisetzungprofile von Arzneistoffen aus kolloidalen Arzneiträgern mittels einer Kinetik 1. Ordnung ausreichend gut dargestellt werden [65, 74, 82, 90]. Es ist allerdings auch bekannt, dass dies nicht für alle Arzneiträger gilt [74], und so wurden zwei verschiedene experimentelle, in der Literatur beschriebene Modelle für die Auswertung der erhobenen Freisetzungdaten in Betracht gezogen: Das „*reciprocal powered time*“ („*rpt*“) Modell [74] und das „*three-parameter*“ Modell [75]. Beide Regressionen wurden hinsichtlich ihrer Abweichung in Form der Fehlerquadrate sowie hinsichtlich weiterer modellspezifischer Parameter verglichen.

Das „*rpt*“ Modell erklärt die Freisetzungsprozesse aus kolloidalen Arzneiträgern als eine Kombination aus Diffusions- und Auflösungsprozessen. Die Arzneistofffraktion, die von einer kolloidalen Arzneiform freigegeben wird (F), ist abhängig von der

Arzneistoffmenge, die bereits im Medium gelöst vorliegt (w) sowie von der Arzneistoffmenge, welche insgesamt noch aus der Arzneiform freigegeben werden kann (M). Die effektive Partikeloberfläche (A), der Diffusionskoeffizient (D) und die Länge des Diffusionsweges (h) beeinflussen die Freisetzungsrates direkt. Die Autoren haben eine zeitabhängige Variable (X) in die Gleichung mit aufgenommen, da sich die Freisetzungsrates durch Quellung oder Erosion während des Untersuchungszeitraumes ändern kann. Das „ rp^t “ Modell nach Barzegar-Jalali [74] ist in den Gleichungen (10) und (11) dargestellt.

$$F = \frac{w}{w+M} = \frac{\int_0^t \frac{D \cdot A \cdot X}{h} dt}{\int_0^t \frac{D \cdot A \cdot X}{h} dt + \int_t^\infty \frac{D \cdot A \cdot X}{h} dt} \quad (10)$$

Durch Zusammenfassung von mehreren Konstanten zu m und b konnte die Gleichung (10) von den Autoren zu Gleichung (11), einer Exponentialfunktion, vereinfacht werden [74].

$$F = \frac{t^b}{t^{b+m}} \quad (11)$$

Durch diese Vereinfachung und eine nicht tiefer reichende Analyse der ablaufenden Freisetzungprozesse durch die Autoren, scheint das „ rp^t “ Modell für eine mechanistische Untersuchung der Freisetzungprozesse weniger gut geeignet. Auf Grund der Einfachheit dieses Modells eignet es sich potentiell aber zum Vergleich von Freisetzungsdaten zwischen Formulierungen oder Chargen und wurde somit in die Bewertung mit einbezogen.

Ein weiteres Modell ist das sogenannte „*three-parameter*“ Modell, welches von der Arbeitsgruppe um Zeng entwickelt wurde [75]. Ursprünglich diente das Modell der Untersuchung verschiedener Einflüsse wie das Molekulargewicht des polymeren Trägers, die Partikelgröße und die Komposition des Freisetzungsmittels auf die Freisetzungsrates. Im Gegensatz zu den Grenzen des „ rp^t “ Modells liefert dieses Modell einige interessante Parameter zur Charakterisierung der Freisetzungsmechanismen.

Das Modell geht davon aus, dass in der initialen Freisetzungphase Diffusionsprozesse innerhalb und aus dem Arzneiträger heraus dominieren, während in der zweiten Phase der Freisetzung diese maßgeblich durch Wechselwirkungen zwischen Arzneistoff und Trägermaterial geprägt ist. Das Modell setzt ferner „*sink conditions*“ voraus. Das Ausmaß der Freisetzung ist dabei abhängig von der Zeit (t),

der mittleren Konzentration an Arzneistoff im Trägermaterial (c_N), der Partikeloberfläche (A) und dem Nanopartikelvolumen (V_N). Die Herleitung der relevanten Gleichungen ist wie auch im Fall des „*rpt*“ Modells von den Autoren der jeweiligen Publikation übernommen worden. Die Freisetzungsrates wird demnach durch Gleichung (12) beschrieben. Gleichung (13) beschreibt die Konstante k_S , die den Diffusionskoeffizienten (D), den Verteilungskoeffizienten (K) sowie die durch Diffusion zu überwindende Schichtdicke (h) beinhaltet.

$$\frac{dc}{dt} = -k_S * c_N \quad (12)$$

$$k_S = A * \frac{k_1}{V} = A * \frac{D * K}{h * V} \quad (13)$$

Da in diesem Modell in der zweiten Phase der Wirkstofffreisetzung zunehmend andere Prozesse als die Diffusion bestimmend für die Freigaberate sein sollen, werden die Freisetzungprofile genauer durch Gleichung (14) beschrieben. Gleichung (14) berücksichtigt neben der Diffusion in der initialen Phase (k_S) ebenfalls langsame Assoziations- (k_{on}) und Dissoziationsvorgänge (k_{off}) zwischen Wirkstoff und Arzneiträger der späteren Phase. Dabei ist M_t die zum Zeitpunkt t freigesetzte Masse an Arzneistoff und M_0 die gesamte Arzneistoffmenge im System.

$$\frac{M_t}{M_0} = \frac{k_{off}}{k_{on} + k_{off}} (1 - e^{-k_S * t}) + \frac{k_{on}}{k_{on} + k_{off}} (1 - e^{-k_{off} * t}) \quad (14)$$

Wie bereits erwähnt können aus dem Modell diverse Parameter abgeleitet werden, die zur Interpretation und zur Vergleichbarkeit zwischen Freisetzungprofilen beitragen können. So kann nach den Gleichungen (15) und (16) die Differenz der freien Enthalpie der gebundenen und ungebundenen Form des Arzneistoffs (ΔG) berechnet werden. Dafür benötigt werden laut den Autoren die Boltzmann Konstante (k_B), die absolute Temperatur (T) und die Konstanten k_{on} und k_{off} . Unberücksichtigt bleibt an dieser Stelle bei Zeng et al. die Avogadrokonstante (N_A), welche durch Multiplikation in den Term mit eingehen sollte, um die freie Enthalpie für 1 mol und nicht ein einzelnes Molekül anzugeben. Die Einheit von ΔG wäre dann J/mol.

$$\Delta G = -k_B * T * \ln \frac{k_{on}}{k_{off}} \quad (15)$$

Außerdem wird zur Berechnung von ΔG der initiale „*burst release*“ ($IniB$) aus dem Freisetzungprofil definiert und geht in Gleichung (16) mit ein.

$$\ln iB = \frac{1}{1 + e^{-\frac{\Delta G}{k_B T}}} \quad (16)$$

Anschließend kann die Freisetzungskonstante k_s sowie die Konstante k_{off} an Hand der Gleichungen (17) bis (19) berechnet werden. Dazu gehen die relative Freisetzungsrate der initialen Phase (reR , $t \approx 0$) und die Steigung der späten Phase λ_2 in die Berechnungen ein.

$$k_s = reR * (1 + e^{-\frac{\Delta G}{k_B T}}) \quad (17)$$

$$\ln\left(1 - \frac{M_t}{M_0}\right) = \ln\left(\frac{\lambda_1 * (\lambda_1 - k_s)}{(k_{on} + k_{off}) * (\lambda_1 - \lambda_2)} - \lambda_2 * t\right) \quad (18)$$

$$\lambda_{1,2} = \frac{k_s + k_{on} + k_{off} \pm \sqrt{(k_s + k_{on} + k_{off})^2 - 4 * k_s * k_{off}}}{2} \quad (19)$$

„Compartmental accumulation ratio“

Der Begriff der „*compartmental accumulation ratio*“ (CAR) wurde eingeführt, um eine grafische Darstellung der erfolgten Wirkstofffreigabe in der Donorkammer zu erhalten. Die CAR wird dabei für die Donorkammer (CAR_d) und die Akzeptorkammer (CAR_a) in einem Diagramm gegen die Zeit dargestellt und nach den Gleichungen (20) und (21) berechnet. Die Konzentration an Flurbiprofen im Equilibrium ($c(\infty)$) geht in die Gleichungen mit ein.

$$CAR_d = \frac{C_d(t)}{c(\infty)} \quad (20)$$

$$CAR_a = \frac{C_a(t)}{c(\infty)} \quad (21)$$

3. Ergebnisse und Diskussion

Die Aufgabenstellung der vorliegenden Dissertation, die Entwicklung einer Apparatur zur *in vitro* Testung der Wirkstofffreisetzung aus kolloidalen Arzneistoffträgern, stellte zunächst die Verfügbarkeit adäquater Test- und Referenzformulierungen in den Vordergrund. Es wurden verschiedene kolloidale Arzneisysteme mit den beiden Wirkstoffen Flurbiprofen und mTHPC ausgewählt und deren Herstellung dahingehend optimiert, dass ein möglichst großer Effekt auf die Freisetzungseigenschaften zu erwarten war.

3.1. Charakterisierung der Wirkstoffe

3.1.1. Photosensibilität von mTHPC

Voruntersuchungen zur Photosensibilität von mTHPC haben ergeben, dass Lösungen von mTHPC in HPLC-Fließmittel über zumindest 4 Tage stabil bleiben, wenn sie lichtgeschützt gelagert werden. So wurde der Wirkstoffgehalt bei lichtgeschützter Lagerung mittels HPLC Analytik täglich bis zum 4. Tag bestimmt. Am 4. Tag betrug der Wirkstoffgehalt noch 100,65% (4-8 °C) und 100,22% (RT). Die Lagertemperatur ist im untersuchten Zeitraum folglich von geringer Bedeutung. Unter Exposition von Tageslicht hat sich gezeigt, dass die hergestellten Proben bereits nach ca. 48 Stunden eine erhebliche Abnahme des Wirkstoffgehalts zeigen. Am dritten Tag beträgt der Wirkstoffgehalt noch 96,05% und am vierten Tag liegt er bei 89,10%. Es ist davon auszugehen, dass sich der Wirkstoff unter diesen Bedingungen zersetzt. Auf Grund der verwendeten Messmethode und Wellenlänge konnten allerdings keine Abbauprodukte im Chromatogramm dargestellt werden. Dies kann daran liegen, dass das Chromophor der Abbauprodukte UV-Licht bei 420 nm nicht mehr absorbiert und somit im Detektor kein Signal erzeugt. Wechselwirkungen wie beispielsweise die Ad- oder Absorption des Wirkstoffs in die Glasfläschchen oder den verwendeten Gummistopfen können als Ursache für die Gehaltsabnahme ausgeschlossen werden, da das Packmittel zwischen den einzelnen Proben nicht variiert wurde. Zwar wurde die Versuchsreihe nicht im Triplikat durchgeführt, so kann sie dennoch als Indikator dafür

verwendet werden, dass der Wirkstoff innerhalb der Minuten, die er bei Tageslicht verarbeitet und pipettiert wird, keinen Abbau zeigt. Freisetzungstests über mehrere Stunden wurden jedoch ausschließlich unter Lichtschutz durchgeführt.

3.1.2. Thermodynamische Löslichkeit von mTHPC

Die thermodynamische Löslichkeit von mTHPC in cyclodextrin-freien Freisetzungsmitteln bei 37 °C ist für die Freisetzungstudie und Laboranalytik mittels der beschriebenen HPLC-Methode nicht ausreichend. So lagen die Wirkstoffkonzentrationen dieser Proben unterhalb des niedrigsten verwendeten Standards und zum Teil nur knapp über der Quantifizierungsgrenze. Die Verwendung von Medien ohne Zusatz von Methyl- β -cyclodextrin mit einer Löslichkeit für mTHPC von unter 0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kam somit für die Verwendung zur Messung der Freigabekinetik aus kolloidalen Arzneiformen nicht in Frage. Nach Zusatz von Methyl- β -cyclodextrin konnten die in Tabelle 8 dargestellten Löslichkeiten gemessen werden. Korrigiert um den ermittelten Wirkstoffverlust durch Filteradsorption liegt die Löslichkeit von mTHPC für alle Medien zwischen 2,70 und 25,08 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Es ist deutlich zu sehen, dass mit steigendem FBS-Gehalt die Löslichkeit abnimmt. Dies ist möglicherweise auf Wechselwirkungen zwischen dem Wirkstoff oder dem Komplex aus Wirkstoff und Methyl- β -cyclodextrin mit den Proteinen oder weiteren Komponenten des Mediums zurückzuführen. Die thermodynamische Löslichkeit von mTHPC ist nicht in allen verwendeten Medien ausreichend, um „*sink conditions*“ bei einer maximalen Arzneistoffkonzentration von 2,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ im Vessel (336 μg / 140 mL) einzuhalten. Insbesondere bei der Testung schwer löslicher Substanzen kann die Einhaltung von „*sink conditions*“ problematisch sein, da ein Kompromiss gefunden werden muss zwischen der Einhaltung von „*sink conditions*“ durch Reduzierung der Wirkstoffmenge oder Erhöhung des Volumens oder durch Änderung der Zusammensetzung des Freisetzungsmittels und der Quantifizierungsgrenze der Laboranalytik. Daher musste im Fall von mTHPC auf die Einhaltung von „*sink conditions*“ verzichtet werden.

Tabelle 8: Thermodynamische Löslichkeit von mTHPC, n=3

Medium		Wirkstoffkonzentration nach 24 Stunden		Filteradsorption		Löslichkeit	pH- Wert
		Ø [µg/mL]	SD [µg/mL]	Ø [%]	SD [%]	Ø [µg/mL]	
0%	FBS +CD	23,86	2,76	4,87	0,99	25,08	7,46
10%	FBS +CD	4,39	1,05	3,79	0,68	4,56	7,56
50%	FBS +CD	3,06	0,74	4,46	0,21	3,20	8,05
90%	FBS +CD	2,65	0,95	2,01	0,37	2,70	7,99

3.1.3. Wiederfindung von mTHPC aus FBS-haltigen Proben

Bei der Wiederfindung von mTHPC aus FBS-haltigen Proben wurde über den Konzentrationsbereich von 0,1 µg/mL bis 3,0 µg/mL eine maximale Abweichung der Ist- von der Sollkonzentration von 3,70% in Freisetzungsmedium mit 50% FBS bestimmt (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Wiederfindung von mTHPC aus Freisetzungsmedium mit 50% FBS

Soll-Konzentration [µg/mL]	Ist-Konzentration [µg/mL]	Abweichung [%]
0,1	0,101	0,78
0,25	0,250	0,01
0,5	0,502	0,31
0,8	0,808	1,01
1,0	1,037	3,70

3.1.4. Thermodynamische Löslichkeit von Flurbiprofen

Die thermodynamische Löslichkeit von Flurbiprofen bei 37 °C in seinem Standard-Freisetzungsmedium (Phosphatpuffer pH 7,4 mit 1% Penicillin-Streptomycin-Konzentrat) liegt bei $1,683 \pm 0,009$ mg/mL. Aus der Literatur ist bekannt, dass der Wirkstoff Flurbiprofen laut Ph. Eur. als praktisch unlöslicher Arzneistoff eingestuft wird [83]. Bei pH 6,0 weist Flurbiprofen eine Löslichkeit von 0,4 mg/mL [91] auf. Da es sich bei Flurbiprofen um eine schwache Säure mit einem pK_a -Wert von 4,22 handelt [91], steigt mit steigendem pH-Wert auch die Löslichkeit an. Ziel dieser Untersuchung war es sicherzustellen, dass während der Freisetzungsuntersuchungen „*sink conditions*“ im Vessel herrschen, bzw. die Arzneistoffmenge im Vessel dahingehend anzupassen, dass diese Bedingungen erfüllt sind. Da für die Freisetzungsexperimente im DR meist 400 µg Flurbiprofen verwendet wurden, lag die maximale Konzentration im Vessel mit 2,857 µg/mL weit unterhalb der Sättigungslöslichkeit von $1,683 \pm 0,009$ mg/mL und „*sink conditions*“ wurden somit eingehalten.

Für die beiden albuminhaltigen Puffer wurde eine Löslichkeit von $4,331 \pm 0,06$ mg/mL (albuminhaltige Phosphat-Pufferlösung pH 7,2 R mit 10 g/L BSA) und $4,104 \pm 0,085$ mg/mL (albuminhaltige Phosphat-Pufferlösung pH 7,2 R1 mit 1 g/L BSA) bestimmt. Somit liegt die Löslichkeit von Flurbiprofen in albuminhaltigen Lösungen um mehr als das Doppelte oberhalb der Sättigungslöslichkeit in PBS pH 7,4, obwohl der pH-Wert der albuminhaltigen Puffer mit pH 7,2 etwas niedriger liegt. Diese Löslichkeitsverbesserung ist womöglich auf die hohe Plasmaeiweißbindung (~99%) von Flurbiprofen [77] und die daraus resultierende Solubilisierung durch das Albumin zurückzuführen.

3.1.5. Stabilität von Flurbiprofen und Wiederfindung

Die Untersuchung zur Stabilität von Flurbiprofen konnte zeigen, dass Flurbiprofen über den untersuchten Zeitraum von 24 Stunden bei 37 °C im Freisetzungsexperiment stabil bleibt. Von den beiden eingesetzten Konzentrationen von 100 µg/mL und 200 µg/mL konnten nach 24 Stunden noch $96,98 \pm 0,43\%$ (für 100 µg/mL) und $98,22 \pm 0,22\%$ (für 200 µg/mL) nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte gezeigt

werden, dass nach Verdünnung der Proben zur Quantifizierung mittels HPLC die Wiederfindung im Rahmen der von der USP in Kapitel <1092> geforderten 95-105% lag [88]. So wiesen die Proben mit den Soll-Konzentrationen von 0,3 µg/mL, 1,5 µg/mL und 3,0 µg/mL eine Wiederfindung von durchschnittlich $95,30 \pm 0,73\%$ auf.

3.2. Charakterisierung der nanopartikulären Arzneiträger

3.2.1. mTHPC-beladene PLGA Nanopartikel

Die Herstellung von mit mTHPC beladenen PLGA Nanopartikeln nach der Emulsions-Diffusions-Verdampfungsmethode lieferte im Hinblick auf Partikelgröße und Zetapotential reproduzierbare Partikel. Der Polydispersitätsindex der einzelnen Chargen liegt stets weit unterhalb der 0,3 und belegt somit jeweils eine monomodale Partikelgrößenverteilung. In Tabelle 10 sind die Ergebnisse der entsprechenden Messungen direkt nach Herstellung und Aufreinigung für die einzelnen Chargen aufgeführt.

Tabelle 10: Partikelgröße, Polydispersitätsindex und Zetapotential der mTHPC-beladenen PLGA Nanopartikel, n=3

Charge	Partikelgröße [nm]		PDI		Zetapotential [mV]	
	Ø	SD	Ø	SD	Ø	SD
Charge 1	220,50	1,00	0,054	0,030	-30,13	7,73
Charge 2	248,40	2,60	0,050	0,018	-27,53	8,16
Charge 3	269,03	2,36	0,020	0,013	-30,80	2,49
Charge 4	263,27	1,85	0,042	0,019	-23,27	1,22
Charge 5	254,67	0,48	0,034	0,017	-28,73	2,15

Im Gegensatz zu den in Tabelle 10 dargestellten Parametern wiesen die mTHPC-beladenen PLGA Nanopartikel im Bezug auf den Wirkstoffgehalt eine größere Abweichung zwischen den Chargen auf. Das Protokoll der Partikelherstellung weist einige kritische Schritte auf, die diese Streuung erklären können. So verbleibt nach

Homogenisierung mittels Ultra-Turrax stets eine kaum kontrollierbare Menge der Emulsion am Rührwerkzeug und wird somit nicht in den Erlenmeyerkolben überführt. Die Evaporation des organischen Lösungsmittels über Nacht konnte nicht unter kontrollierter Umgebungstemperatur erfolgen. So können die Laborbedingungen in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur die ungewollte Verdunstung von Wasser beeinflussen und somit eine Veränderung der Partikelkonzentration zur Folge haben. Beim mehrmaligen Aufreinigen vervielfacht sich außerdem die Möglichkeit der Verfälschung der Partikelkonzentration durch den jeweils erfolgenden Austausch des Dispergiermittels. Die Wirkstoffkonzentration in $\mu\text{g/mL}$ unterliegt aus denselben Gründen ebenfalls einer gewissen Schwankung. Außerdem kann die übergangsweise Lagerung der Nanopartikel in Kunststoffbehältnissen, deren Dauer nicht protokolliert wurde (Bsp. Wartezeiten während der Aufreinigung) zu adsorptiven Prozessen und somit zu einer Reduzierung der Wirkstoffkonzentration in den Nanopartikeln geführt haben.

Vergleicht man jedoch die Wirkstoffbeladung der Partikelchargen in $\mu\text{g/mg}$, so sind die Schwankungen deutlich geringer, da beispielsweise der Effekt der Wasserverdunstung entfällt. So liegt der Wirkstoffgehalt der einzelnen Chargen zwischen 17,886 und 23,628 $\mu\text{g/mg}$ bezogen auf die Partikelmasse ().

Des Weiteren wurde der Wirkstoffgehalt der Nanopartikelcharge 1 durch Auflösen in Ethanol bestimmt und betrug $114,62 \pm 2,81 \mu\text{g/mL}$ ($n=3$). Da dieser niedrige Wert die Vermutung aufkommen ließ, dass durch Lösen in Ethanol nicht der gesamte Wirkstoff wiedergefunden werden konnte, wurden die anschließend hergestellten Partikelchargen zur Bestimmung der Arzneistoffbeladung in Acetonitril anstelle des Ethanols gegeben. Da sich das Trägermaterial PLGA in Ethanol nicht löst und der Wirkstoff nicht vollständig aus den Partikeln extrahiert werden konnte, scheint Ethanol dem Acetonitril hier unterlegen zu sein. Der Grund mittels Auflösen bzw. Auswaschen des Wirkstoffs in Ethanol den Gehalt zu bestimmen lag in der Absicht, die HPLC-Säule nicht mit zu viel Polymer zu belasten und die Reinheit der Proben möglichst hoch zu halten.

Tabelle 11: Wirkstoffgehalt und gravimetrische Auswertung der mTHPC-beladenen PLGA Nanopartikel, n=3

Charge	Partikelgehalt [mg/mL]		mTHPC Gehalt [µg/mL]		mTHPC Gehalt [µg/mg]
	Ø	SD	Ø	SD	Ø
Charge 2	13,096	0,105	266,98	3,88	18,607
Charge 3	15,963	0,076	377,18	1,39	23,628
Charge 4	11,073	0,105	198,05	3,46	17,886
Charge 5	10,514	0,251	209,06	0,728	19,884

Nach der Gefriertrocknung wurden die Nanopartikel in Freisetzungsmittel wieder redispersiert und die Partikelgröße und das Zetapotential erneut ermittelt. Die Ergebnisse sind Tabelle 12 zu entnehmen.

Tabelle 12: Partikelgröße, Polydispersitätsindex und Zetapotential von mTHPC-beladenen PLGA Nanopartikeln nach Gefriertrocknung und Redispersieren, n=3

Charge und Medium	Partikelgröße [nm]		PDI		Zetapotential [mV]	
	Ø	SD	Ø	SD	Ø	SD
Charge 1 in 50% FBS	234,50	11,39	0,045	0,026	-4,16	0,17
Charge 2 in 10 % FBS	245,20	2,54	0,034	0,026	-3,27	0,50
in 50% FBS	242,67	1,80	0,050	0,006	-3,74	0,44
Charge 3 in 10% FBS	249,07	1,84	0,086	0,020	-4,11	0,35
in 50% FBS	243,07	2,95	0,102	0,005	-9,09	0,55
Charge 4 in 50% FBS	240,67	2,11	0,131	0,066	-6,15	0,46
Charge 5 in 10% FBS	239,50	1,90	0,056	0,028	-5,63	1,58
in 50% FBS	243,27	1,01	0,056	0,029	-5,85	0,91

Die Partikel waren im Hinblick auf ihre Partikelgröße und Polydispersität stabil, sodass sichergestellt werden konnte, dass die Gefriertrocknung und Redispersierung in

Medium diese Charakteristika der Nanopartikel nicht negativ beeinflusst. Lediglich in zwei der Proben stieg der PDI deutlich, jedoch aber nicht über die gesetzte Grenze von 0,3 an. Das Zetapotential war in plasmahaltigen Medien stets in Richtung ± 0 mV verschoben, was auf adsorptive Prozesse und den damit einhergehenden Ladungsausgleich an der Partikeloberfläche hindeutet.

3.2.2. mTHPC-beladene PLGA Nanopartikel mit Chitosan-Überzug

Für mTHPC-beladene PLGA Nanopartikel mit Chitosanüberzug wurden grundsätzlich größere Partikeldurchmesser und eine breitere Partikelgrößenverteilung mittels PCS bestimmt, als dies für die nicht überzogenen PLGA Nanopartikel der Fall war. Der mittels PCS bestimmte hydrodynamische Durchmesser wird hier maßgeblich durch das an der Partikeloberfläche angelagerte Chitosan bestimmt. Auch das Zetapotential der Partikel wurde durch Zugabe des positiv geladenen natürlichen Polymers deutlich angehoben. Das Zetapotential der PLGA Nanopartikel mit Chitosanüberzug liegt durchgehend im positiven Bereich. Chitosan-überzogene und nicht quervernetzte Nanopartikel haben ein Zetapotential von $53,13 \pm 5,09$ mV. Durch Quervernetzung sinkt das Zetapotential ab auf Werte zwischen 31 und 38 mV. Nanopartikel, die nach dem Überziehen und Quervernetzen mit Wasser aufgereinigt wurden, weisen neben einer reproduzierbaren Partikelgröße auch eine ausreichende Chitosanbindung auf, was durch das positive Zetapotential erkennbar ist (siehe Tabelle 13). Die positive Ladungsdichte dieser Partikel ist jedoch verglichen mit den nicht aufgereinigten Partikeln geringer, so liegt deren gemessenes Zetapotential zwischen 10 und 14 mV. Die Übersicht über die gemessenen Parameter zeigen Tabelle 13 und 14. Da die Partikelstabilität und Zirkulationsdauer *in vivo* von der Oberflächenbeschaffenheit der Partikel abhängig ist, rückt die Bestimmung und Kontrolle des Zetapotentials in den Fokus. Je höher die Netto-Oberflächenladung, bzw. das Zetapotential als Messgröße, desto geringer ist die Tendenz der Partikel zur Agglomeration, begründet durch elektrostatische Abstoßungsreaktionen. Trotz des hohen Zetapotentials der mit Chitosan überzogenen Partikel zeigten diese Partikel keine ausreichende Stabilität in plasmahaltigen Medien, wie Tabelle 15 zu entnehmen ist. Die Weiterentwicklung der Herstellmethode durch Quervernetzung des Chitosans konnte folglich die

Partikeleigenschaften und insbesondere die Stabilität der Partikel in plasmahaltigen Medien verbessern. Die reine adsorptive Bindung von Chitosan an die PLGA Nanopartikel führte zu einer kaum kontrollierbaren Partikelgröße und zu Agglomeration in den eingesetzten Medien.

Tabelle 13: Partikelgröße, Polydispersitätsindex und Zetapotential von mTHPC-beladenen und mit Chitosan überzogenen PLGA Nanopartikeln, n=3

Typ, Charge	Partikelgröße [nm]		PDI		Zetapotential [mV]	
	Ø	SD	Ø	SD	Ø	SD
Chitosan-Überzug						
Charge 6	325,90	2,93	0,182	0,016	53,13	5,09
Chitosan-Überzug + Quervernetzung						
Charge 7	347,03	2,74	0,180	0,006	38,43	1,25
Charge 8	308,53	2,81	0,138	0,005	31,47	1,39
Chitosan-Überzug + Quervernetzung + Aufreinigung						
Charge 9	260,30	2,60	0,062	0,012	10,01	0,44
Charge 10	260,37	2,83	0,114	0,011	14,23	0,99
Charge 11	277,37	3,45	0,084	0,020	10,80	0,08
Charge 12	260,77	2,27	0,133	0,021	10,56	0,96

Tabelle 14: Wirkstoffgehalt und gravimetrische Auswertung von mTHPC-beladenen und mit Chitosan überzogenen PLGA Nanopartikeln, n=3

Typ, Charge	Partikelgehalt [mg/mL]		mTHPC Gehalt [µg/mL]		mTHPC Gehalt [µg/mg]
	Ø	SD	Ø	SD	Ø
Chitosan-Überzug					
Charge 6	13,383	0,063	289,43	3,92	21,626
Chitosan-Überzug + Quervernetzung					
Charge 7	9,230	0,070	117,50	2,10	14,180
Charge 8	9,377	0,223	153,76	1,30	16,397

Chitosan-Überzug + Quervernetzung + Aufreinigung					
Charge 10	5,222	0,058	107,31	1,63	20,549
Charge 11	7,527	0,314	133,13	1,36	17,688
Charge 12	6,056	0,062	104,24	1,54	17,213

Von den oben genannten Chargen der mit Chitosan überzogenen PLGA Nanopartikel konnten nicht alle Chargen lyophilisiert werden. Das etablierte Protokoll, welches für die klassischen PLGA Nanopartikel mit mTHPC gute Trocknungsergebnisse erzielte, lieferte für diese Partikelspezies kein zufriedenstellendes Resultat. So ließ sich die Partikelcharge 7 nach der Gefrierdrying mit 3% (m/v) Mannitol weder in Wasser noch in Essigsäure (0,01%, v/v) redispersieren. Einige der folgenden Partikelchargen wurden daher nicht gefriergetrocknet. Erst nach erfolgreicher Methodenentwicklung und dem Wechsel von 3% (m/v) Mannitol zu 5% (m/v) Trehalose als Gerüstbildner, konnten die beiden Chargen 11 und 12 zur Erhöhung der Lagerstabilität erfolgreich lyophilisiert werden. Die physiko-chemischen Parameter der Chitosan-PLGA Nanopartikel in FBS-haltigen Medien sind in Tabelle 15 (nicht gefriergetrocknete Partikel) und Tabelle 16 (gefriergetrocknete Partikel) dokumentiert.

Tabelle 15: Partikelgröße, Polydispersitätsindex und Zetapotential von nicht gefriergetrockneten mit Chitosan überzogenen PLGA Nanopartikeln nach Mischen mit FBS-haltigen Medien, n=3

Typ, Charge und Medium	Partikelgröße [nm]		Polydispersitätsindex		Zetapotential [mV]	
	Ø	SD	Ø	SD	Ø	SD
Chitosan-Überzug						
Charge 6						
in 10% FBS	794,77	69,23	0,164	0,010	-4,20	0,82
in 50% FBS	256,73	5,55	0,200	0,002	-7,55	0,44
Chitosan-Überzug + Quervernetzung						
Charge 8						
in 10% FBS	404,53	3,79	0,191	0,081	-2,05	8,88
in 50% FBS	328,23	0,48	0,232	0,004	-14,97	3,27

Chitosan-Überzug + Quervernetzung + Aufreinigung						
Charge 10 in 10% FBS	255,43	5,97	0,123	0,036	-7,05	0,52
in 50% FBS	251,47	8,38	0,131	0,027	-9,28	2,18
Charge 11 in 50% FBS	269,73	8,84	0,104	0,010	-9,33	1,30

Tabelle 16: Partikelgröße, Polydispersitätsindex und Zetapotential von gefriergetrockneten mit Chitosan überzogenen PLGA Nanopartikeln nach Redispergieren in FBS-haltigen Medien, n=3

Typ, Charge und Medium	Partikelgröße [nm]		PDI		Zetapotential [mV]	
	Ø	SD	Ø	SD	Ø	SD
Chitosan-Überzug + Quervernetzung + Aufreinigung						
Charge 11 in 50% FBS	316,27	13,21	0,198	0,038	-7,83	0,73
Charge 12 in 10% FBS	388,53	6,64	0,280	0,045	-3,89	2,78
in 50% FBS	320,53	12,08	0,279	0,052	-13,80	0,59

3.2.3. Flurbiprofen-beladene Nanopartikel

Die mit Flurbiprofen beladenen Nanopartikel wurden hergestellt, um nach erfolgter physiko-chemischer Charakterisierung das Freisetzungverhalten der Modellschubstanz Flurbiprofen aus diesen Partikeln zu bestimmen. Mit Flurbiprofen beladene PLA Nanopartikel wiesen im Mittel eine Partikelgröße von ca. 270 nm auf. Die Partikelgrößenverteilung zeigte sich als monodispers und der Polydispersitätsindex von unter 0,1 weist auf eine sehr enge Partikelgrößenverteilung hin. Das Zetapotential dieser Partikel lag stets im zweistelligen negativen Bereich und betrug -16 bis -18 mV. Die Mittelwerte inklusive Standardabweichung dieser Parameter sind in Tabelle 17 aufgelistet. Da die PLGA Nanopartikel in einem sehr ähnlichen Verfahren hergestellt wurden, verwundert es nicht, dass sowohl die Partikelgröße als auch die Partikelgrößenverteilung nur geringfügig von den PLA Nanopartikeln abweicht. Das

Zetapotential von PLA und PLGA Nanopartikeln unterscheidet sich kaum voneinander, da dies zum einen vom Polymertyp (beides Polyhydroxycarbonsäuren), aber auch vom eingesetzten Stabilisator PVA maßgeblich beeinflusst wird. Das Zetapotential von Eudragit® RS 100 Nanopartikeln liegt mit ca. +50 mV deutlich im positiven Bereich und die Partikelgröße dieser Nanopartikel liegt mit ~180 nm um ca. 100 nm unterhalb der Partikelgröße der PLA und PLGA Nanopartikel. Das Herstellverfahren der Desolvatisierung mit den gewählten Lösungsmitteln, der Pumpgeschwindigkeit, dem Stabilisortyp und der Stabilisatorkonzentration, sowie das positiv geladene Polymer selber bewirken, dass sich die Parameter Partikelgröße, PDI und Zetapotential deutlich von denen der PLA und PLGA Nanopartikel unterscheiden.

Tabelle 17: Partikelgröße, Polydispersität und Zetapotential von Flurbiprofen-beladenen Nanopartikeln vor Gefriertrocknung, n=3

Typ, Charge	Partikelgröße [nm]		PDI		Zetapotential [mV]	
	Ø	SD	Ø	SD	Ø	SD
PLA NP 1	267,33	0,95	0,029	0,001	-17,83	0,21
PLA NP 2	271,87	1,72	0,041	0,025	-15,93	1,78
PLGA	273,63	0,93	0,083	0,019	-19,53	3,50
Eudragit®	185,87	1,25	0,089	0,017	47,53	1,99

In Tabelle 18 ist der Partikelgehalt als Ergebnis der gravimetrischen Auswertung und der Wirkstoffgehalt bezogen auf das Partikelvolumen und die Partikelmasse aufgetragen. Auffällig ist der deutlich höhere Wirkstoffgehalt der Eudragit® RS 100 Nanopartikel. Hier kommt zum Tragen, dass eine bereits etablierte Formulierung verwendet wurde [30], ohne diese zu modifizieren. Eudragit® RS 100 Nanopartikel dienen in den folgenden Experimenten als Referenz für eine schnell freisetzende Arzneiform, deren parenterale Anwendbarkeit nicht Ziel der Formulierungsentwicklung war. Das Polymer Eudragit® RS 100 wird unter anderem auf Grund der Stabilität *in vivo* (nicht bioabbaubar oder resorbierbar) nur für die orale Anwendung eingesetzt, insbesondere für retardierte perorale Arzneiformen.

Die unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften dieser Nanopartikel liegen somit zum einen in den unterschiedlichen Polymeren und Stabilisatoren, aber auch im

Herstellverfahren begründet. Dennoch kann an Hand der physiko-chemischen Parameter noch keine Prognose über das Freisetzungsverhalten dieser Partikel abgeleitet werden.

Tabelle 18: Partikel- und Flurbiprofen-Gehalt von PLA, PLGA und Eudragit® Nanopartikeln, n=3

Typ, Charge	Partikelgehalt [mg/mL]		Flurbiprofen Gehalt [µg/mL]		Flurbiprofen Gehalt [µg/mg]
	Ø	SD	Ø	SD	Ø
PLA NP 1	15,151	0,068	70,89	0,02	4,68
PLA NP 2	15,985	0,136	75,57	1,54	4,73
PLGA	17,789	0,142	114,14	0,73	6,42
Eudragit®	11,411	0,069	1252,78	10,16	109,78

Für die Freisetzungsexperimente wurden die PLA und PLGA Nanopartikel unter Zusatz von Trehalose lyophilisiert und unmittelbar vor Beginn der Freisetzungsversuche redispergiert. Der Inhalt mehrerer Vials wurde vereint, da die Nanopartikelmenge für 3 Vessel (entsprechend 1200 µg Flurbiprofen) für die Gefriertrocknung auf mehrere Vials verteilt werden musste, um die Vials nicht zu überfüllen. Auf diese Weise konnte eine optimale Trocknung gewährleistet werden. Außerdem wurde durch dieses Vorgehen sichergestellt, dass sich die Eigenschaften der Nanopartikel im Vergleich der einzelnen Vessel zu Versuchsbeginn gleichen. Nach Versuchsbeginn wurde die Arzneistoffkonzentration der Nanopartikelsuspensionen kontrolliert. Auf Grund der zeitlichen Verzögerung zwischen dem Redispergieren und dem Vorliegen der Ergebnisse, wurde beim Befüllen der Zellen von der Soll-Konzentration ausgegangen. Nach Ermittlung der tatsächlichen Partikelkonzentration ergeben sich die in Tabelle 19 dargestellten Mengen an Flurbiprofen im Freisetzungsexperiment. Diese wurden für die Berechnung der prozentualen Freisetzung jeweils als 100% angesehen. Dabei ist zu beachten, dass für die gleiche finale Arzneistoffkonzentration im Dispersion Releaser (DR) und im Dialysesack (DB) auf Grund unterschiedlicher Medienvolumina (DR 140 mL, DB 250 mL) und Füllmengen der Donorkammern, jeweils eigene Pipettierschemata resultierten. Die Zellen des DR wurden jeweils mit 3,2 mL Probe (Sollmenge 400 µg Flurbiprofen,

Sollkonzentration 125 µg/mL) befüllt, wobei die Dialysesäcke jeweils mit nur 2 mL Probe (Sollmenge 600 µg Flurbiprofen, Sollkonzentration 300 µg/mL) befüllt werden konnten. Von den Eudragit® Nanopartikeln wurde für die Freisetzungsuntersuchung eine Nanopartikelmenge von 1 mL (enthaltend 1252,78 µg Flurbiprofen) eingesetzt und das Volumen der Akzeptorkammer anschließend mit Freisetzungsmedium aufgefüllt.

Tabelle 19: Flurbiprofengehalt nach Gefriertrocknung und Redispergieren in Medium sowie die daraus resultierende Menge an Wirkstoff je Freisetzungsversuch, n=3

Typ, Charge	Flurbiprofen Gehalt nach Redispergieren [µg/mL]		Arzneistoffmenge im Vessel [µg]
	Ø	SD	
PLA NP 1	119,89	0,72	383,63
PLA NP 2 DR	111,60	2,24	357,12
PLA NP 2 DB	269,08	5,15	538,15
PLGA	110,75	1,17	387,63

Partikelgröße, Polydispersitätsindex und Zetapotential wurden nach Redispergieren der Nanopartikel in Freisetzungsmedium erneut bestimmt. Des Weiteren wurden diese Parameter bei Beendigung des jeweiligen Freisetzungsexperimentes bestimmt, um die Stabilität der Partikel unter Freisetzungsbedingungen sicherzustellen. Tabelle 20 enthält nur die Werte für PLA und PLGA Nanopartikel, da im Fall der Eudragit® Nanopartikel keine validen Daten erhoben werden konnten. Eudragit Nanopartikel agglomerierten unter den Bedingungen der Freisetzungsexperimente. Dieses Verhalten in salzhaltigen Pufferlösungen bei physiologischen pH-Werten konnte in anderen Experimenten noch weitere Male beobachtet werden und scheint ein spezifisches Phänomen der Flurbiprofen-beladenen Eudragit Nanopartikel zu sein (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Wacker, persönliche Kommunikation mit Dr. Susanne Beyer).

Tabelle 20: Partikelgröße, Polydispersität und Zetapotential von Flurbiprofen Nanopartikeln nach Redispergieren in Freisetzungsmedium zum Zeitpunkt t = 0 Stunden und nach Beendigung der Freisetzungsversuche, n=3

Typ, Charge	Partikelgröße [nm]		PDI		Zetapotential [mV]	
	Ø	SD	Ø	SD	Ø	SD
PLA NP 1 (DR)						
t = 0 Stunden	265,87	3,41	0,050	0,021	-0,66	0,12
t = 48 Stunden	279,57	3,13	0,030	0,010	-1,44	0,41
PLA NP 2 (DR)						
t = 0 Stunden	267,50	4,21	0,043	0,029	-0,85	0,26
t = 24 Stunden	263,33	3,34	0,040	0,028	-0,92	0,08
t = 48 Stunden	266,53	2,64	0,037	0,025	-1,94	0,04
PLA NP 2 (DB)						
t = 0 Stunden	277,20	2,78	0,040	0,013	-0,63	0,22
t = 48 Stunden	266,17	1,02	0,070	0,016	-0,90	0,06
PLGA						
t = 0 Stunden	267,10	3,57	0,069	0,025	-1,61	0,17
t = 24 Stunden	267,47	1,06	0,139	0,006	-2,65	0,44

3.3. Plasmaanalytik und Auswahl der Freisetzungsmedien

Der pH-Wert der humanen Plasmen liegt mit im Durchschnitt $7,41 \pm 0,06$ (n=6) bei allen Proben im physiologischen Bereich und damit unterhalb der Werte, welche für das fetale Kälberserum (FBS) bestimmt wurden (Tabelle 21). Die Werte des FBS liegen alle innerhalb der vom Hersteller angegebenen Spezifikationen mit pH 6,8-8,2 (FBS Gold, PAA) und pH 6,8-7,8 (FBS „optimized“, Biowest). Beim Vergleich der gemessenen Proteinmengen zeigt sich ebenfalls ein deutlicher Unterschied zwischen den humanen und den bovinen Proben. So liegt der Proteingehalt der bovinen Proben um ca. 20 mg/mL unter den Werten der humanen Plasmen, was auf den fetalen Ursprung des FBS zurückzuführen ist. Der Eiweißgehalt der eingesetzten humanen Plasmen lag im Durchschnitt bei $64,3 \pm 1,1$ mg/mL (n=6). Dieser Unterschied kann einen direkten Einfluss auf die Freisetzungsversuche und die Plasma-Eiweißbindung der verwendeten Wirkstoffe nehmen und muss bei der Übertragbarkeit der Resultate auf das Freisetzungsverhalten im humanen Medium berücksichtigt werden. Darüber hinaus muss berücksichtigt werden, dass Plasma und Serum auf unterschiedliche

Weise aus Vollblut gewonnen werden. Blutserum gewinnt man aus dem Überstand geronnener Blutproben und ist folglich frei von Gerinnungsfaktoren. Blutplasma hingegen wird durch Zentrifugation von vorbehandelten Blutproben (beispielsweise durch Zusatz von Citrat) gewonnen. So werden dem Blut zelluläre Bestandteile entfernt wobei die physiologischen Gerinnungsfaktoren dem Plasma erhalten bleiben. Es ist darüber hinaus festzuhalten, dass humanes Plasma auch beispielsweise zur Transfusion oder zur Gewinnung von Gerinnungsfaktoren verwendet wird. Diese Anwendungsbereiche lassen kaum Alternativen zu, sodass der Einsatz humaner Proben zur Durchführung von Screenings wie in dieser Versuchsreihe mit Bedacht erfolgen sollte. Das fetale Kälberserum stellt daher, insbesondere da es zur Freisetzung untersuchen aus kolloidalen Arzneiträgern nur verdünnt eingesetzt wurde, eine gute Alternative zu humanem Plasma dar.

Im Hinblick auf die Osmolalität weichen die bovinen Proben erwartungsgemäß kaum von den humanen Proben ab. Die Osmolalität der humanen Plasmen lag bei $299,0 \pm 2,1$ mOsmol/kg (n=6), die Osmolalitäten der bovinen Proben sind Tabelle 21 zu entnehmen.

Tabelle 21: pH-Werte, Osmolalitäten und Proteingehalt von bovinen Plasmen, Osmolalität und Proteingehalt n≥3, pH-Wert n=1

Plasma	pH-Wert	Osmolalität [mOsmol/kg]	Proteingehalt [mg/mL]
FBS Gold (PAA)	7,76	$317,0 \pm 5,4$	$40,5 \pm 0,0$
FBS (Biowest)	7,99	$287,7 \pm 12,5$	$42,9 \pm 0,2$

Die vorliegenden Messwerte zeigen, dass Serum tierischen Ursprungs als Alternative für die *in vitro* Tests der vorliegenden Dissertation geeignet sind. Keines der eingesetzten Freisetzungsmidien der folgenden Versuchsreihe enthielt Plasma menschlichen Ursprungs, da dies für die Entwicklung des Dispersion Releasers und die Definition eines geeigneten Setups für kolloidale Arzneiträger als nicht zweckmäßig eingestuft wurde. Dennoch sollte in weiterführenden Untersuchungen der Einsatz humaner Proben erwogen werden, um final eine mögliche andersgeartete Interaktion

zwischen verschiedenen Plasmatypen im Freisetzungsmedium und dem Prüfgegenstand ausschließen zu können.

3.4. Freisetzungsexperimente mittels Dialysesack

Im Dialysesack wurde das Freisetzungsverhalten von mTHPC unter Verwendung zweier unterschiedlicher Dialysemembranen untersucht. Beim Vergleich beider Membranmaterialien konnte gezeigt werden, dass die Freisetzungsrates des lipophilen Arzneistoffs mTHPC durch die Celluloseacetatmembran der Membran aus regenerierter Cellulose bei gleichem nominellen molekularen Größenausschluss (MWCO: 50 kDa) deutlich überlegen war. Dieser Unterschied weist darauf hin, dass die Membran aus regenerierter Cellulose eine deutlich höhere Resistenz für die Diffusion von mTHPC darstellt. Dabei stellen die Unterschiede in der Porengrößenverteilung, die Anzahl an Poren sowie die Dicke der Membranen maßgebliche Einflussfaktoren dar. Auch die physiko-chemischen Eigenschaften, insbesondere die Lipophilie von Wirkstoff und Membran, sind für die gemessene Differenz bestimmend. Dabei werden Unterschiede wie beispielsweise in der Porengrößenverteilung oder die unterschiedliche Dicke der Membranen vom Herstellprozess definiert und können somit nicht ohne den Wechsel des Herstellers oder des Herstellprozesses variiert werden.

Diese Untersuchung wurde in Freisetzungsmedium, welches 50% FBS enthielt, für die beiden Referenzformulierungen Foscan und Temodextrin durchgeführt. Temodextrin wurde zuvor eigens entwickelt und ist eine in Wasser lösliche lyophilisierte Formulierung von mTHPC. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 dargestellt. Die Freisetzungsprofile beider Referenzarzneiformen im jeweils gleichen Setup unterscheiden sich in den ersten Stunden nur minimal voneinander. In diesem Zeitabschnitt ist die Freisetzungsrates maximal und es wird eine freie Diffusion durch die Dialysemembran entlang des Konzentrationsgefälles angenommen. Um diese Hypothese zu prüfen müsste die Freisetzung des freien Wirkstoffs mit der Freisetzung beider Referenzformulierungen verglichen werden, was auf Grund der niedrigen Löslichkeit von mTHPC in wässrigen Medien schwierig ist. Bei ansteigender Konzentration in der Akzeptorkammer sinkt jedoch das Konzentrationsgefälle und die

Konzentration in der Akzeptorkammer nähert sich der Sättigungslöslichkeit. Es herrschen somit keine „sink conditions“ und so ist davon auszugehen, dass die Sättigungslöslichkeit das Freisetzungsprofil zusätzlich beeinflusst hat. Außerdem ist eine 100%-ige Freisetzung im Dialysesack auf Grund der schlechten Hydrodynamik und der fehlenden Agitation in der Donorkammer kaum möglich.

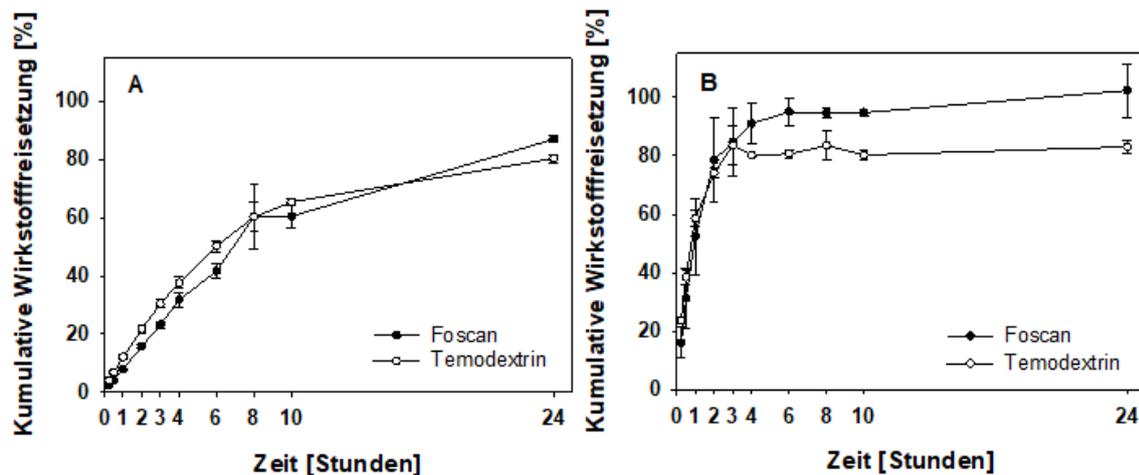


Abbildung 13: Wirkstofffreisetzung von mTHPC im Dialysesack, Dialysemembran aus (A) regenerierter Cellulose und (B) Celluloseacetat (n=3)

Da mTHPC aus beiden Referenzformulierungen deutlich schneller durch die Celluloseacetatmembran als durch die Membran aus regenerierter Cellulose diffundiert, sollte in nachfolgenden Freisetzungsuntersuchungen dieses Wirkstoffs aus kolloidalen Arzneiträgern bevorzugt die Membran aus Celluloseacetat eingesetzt werden. Da allerdings der Entwicklungsfortschritt der Freisetzungsapparatur Dispersion Releaser die Verwendung von Celluloseacetatmembranen zum damaligen Zeitpunkt noch nicht zuließ (DR V1), mussten die Freisetzungsuntersuchungen von mTHPC-haltigen Partikeln mittels der Membran aus regenerierter Cellulose durchgeführt werden.

3.5. Permeationsexperimente im Dispersion Releaser: Entwicklung eines geeigneten Setups und Selektion der Medien

3.5.1. Permeation von mTHPC im DR V1: Einfluss der FBS-Konzentration auf die Freisetzung von Foscan

Die ersten Freisetzungsexperimente erfolgten im DR V1, wie er in Abschnitt 2.10.1 beschrieben und in Abbildung 8 dargestellt ist. Der DR V1 konnte nur mit der Dialysemembran aus regenerierter Cellulose verwendet werden. Da außerdem sein Verschlussmechanismus noch nicht optimiert war, musste die Membran nach dem Überziehen über das Gehäuse kurz getrocknet werden. Nach dem Verschließen des DR konnte die Membran direkt wieder rehydriert werden. Die Zellen wurden jeweils abends hergerichtet, um eine ausreichende Befeuchtung und Quellung über Nacht in Milli-Q-Wasser zu ermöglichen. Auch wenn äußerlich kein Schaden und keine Veränderung an der Membran zu erkennen war, so wird vom Hersteller die Verwendung nach Trocknung nicht mehr empfohlen. Für unsere Versuchsreihe musste dieser Kompromiss eingegangen werden, da nur im trockenen Zustand das Verschließen möglich war. Dieser Kompromiss geschah des Weiteren in der Kenntnis, dass trockene Membranen aus regenerierter Cellulose kommerziell erhältlich sind und mit einer gewissen Robustheit assoziiert werden. Darüber hinaus wurde darauf geachtet, dass die Membranen nicht vollständig austrocknen. Dennoch ist es möglich, dass diese Prozedur einen Einfluss auf die Freisetzungsergebnisse hatte.

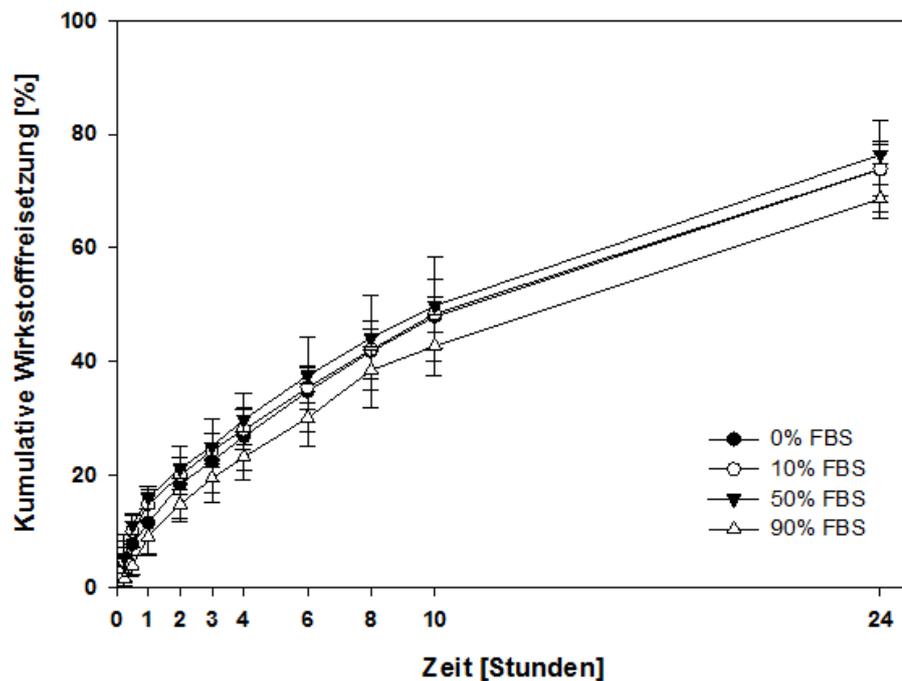


Abbildung 14: Permeation von mTHPC aus der Referenzformulierung Foscan im DR V1 in Freisetzungsmitteln mit 0%, 10%, 50% und 90% FBS (n=3)

Der Einfluss der FBS-Konzentration im Freisetzungsmitteln auf das Freisetzungverhalten von mTHPC wurde an Hand der Referenzformulierung Foscan ermittelt. Dabei zeigte sich, wie in Abbildung 14 zu sehen ist, kein proportionaler Zusammenhang zwischen der Freisetzungsrate und der Plasmamenge in den Medien. Auch in vergrößerter Darstellung (Abbildung 15) überlagern sich die Standardabweichungen und es kann keine Reihenfolge in der Freisetzungskinetik von 0% zu 90% abgeleitet werden. Die Vermutung, dass eine hohe FBS-Konzentration von 90% die Diffusion des Wirkstoffes bremst, konnte für diesen lipophilen Wirkstoff nicht belegt werden. Des Weiteren zeigt diese Untersuchung sehr deutlich, dass die Sensitivität in diesem Aufbau deutlich durch den Membrantyp eingeschränkt wird und dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Diffusion durch die Membran darstellt.

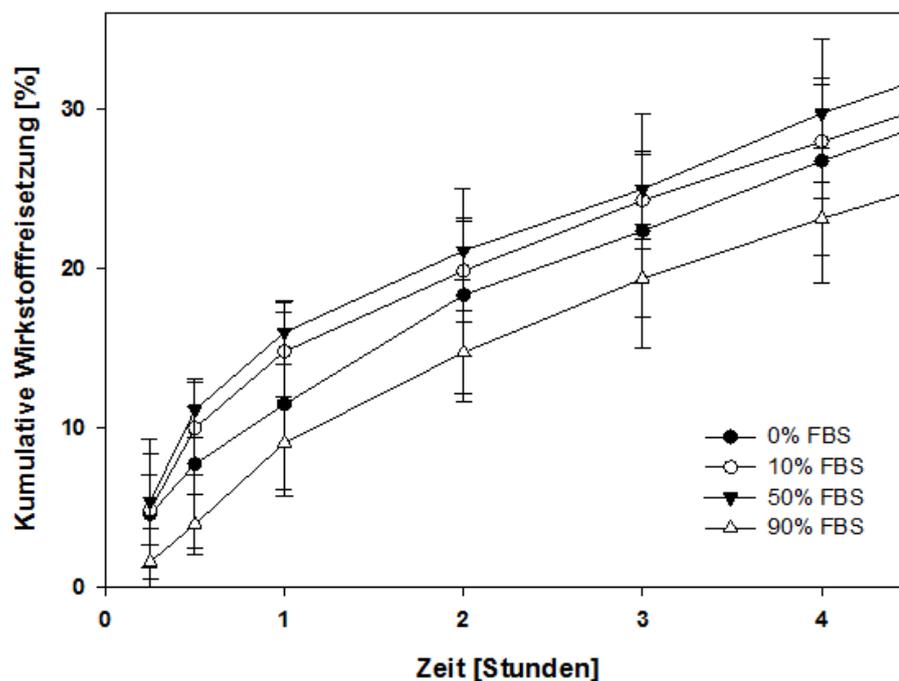


Abbildung 15: Permeation von mTHPC aus der Referenzformulierung Foscan im DR V1 in Freisetzungsmidien mit 0%, 10%, 50% und 90% FBS (n=3). Vergrößerte Darstellung der initialen Phase.

Außerdem weisen die Freisetzungsmidien bei gleicher Konzentration an Methyl- β -cyclodextrin eine mit zunehmender FBS-Konzentration sinkende Löslichkeit des Wirkstoffs auf (siehe Abschnitt 3.1.2), wodurch die maximale Konzentration im Vessel sich der Sättigungskonzentration weiter annähert und die Freisetzung somit beeinträchtigt. Es ist auf Grund dieser Resultate davon auszugehen, dass die eingesetzte Menge an Methyl- β -cyclodextrin dazu beiträgt, dass der Wirkstoff mTHPC bevorzugt in einem Komplex mit dem Cyclodextrin vorliegt, obwohl er generell eine hohe Plasmaeiweißbindung und Bindung zu HDL und LDL aufweist [92]. Dieser nachweisliche 1:2 Komplex [93] aus mTHPC und Methyl- β -cyclodextrin mit einem Molekulargewicht von ca. 3300 Da kann die Dialysemembran nahezu frei passieren, da das Molekulargewicht um mehr als den Faktor 10 unterhalb dem MWCO von 50 kDa liegt [41]. Liegt ein Wirkstoff hingegen überwiegend an die Proteine des Plasmas, wie zum Beispiel Albumin, gebunden vor, so ist es wahrscheinlich, dass die Freisetzungsrates deutlich stärker von der FBS-Konzentration bestimmt wird. Da bereits aus der Bestimmung der thermodynamischen Löslichkeit (siehe Abschnitt 3.1.2)

hervorging, dass mTHPC womöglich bevorzugt an das Cyclodextrin assoziiert vorliegt, ist dieses Ergebnis nicht überraschend.

Die pH-Werte der Medien in der Akzeptorkammer wurden nach Beendigung der Freisetzungsuntersuchungen bestimmt und sind in Tabelle 22 dargestellt. Beim Vergleich mit Tabelle 8 ist zu erkennen, dass insbesondere das Medium mit einem FBS-Anteil von 90% eine leichte pH-Wert-Erhöhung aufweist. Da sich mTHPC pH-unabhängig löst, sind die pH-Werte weniger für die Interpretation des Freisetzungsverhaltens von mTHPC als für die Bewertung der Stabilität der Freisetzungsmidien relevant.

Tabelle 22: pH-Werte der Medien in der Akzeptorkammer nach erfolgter Freisetzungsuntersuchung mit Foscan (nach 24 Stunden)

Freisetzungsmidium	Ø pH-Wert	SD
0% FBS	7,37	0,04
10% FBS	7,59	0,004
50% FBS	8,05	0,04
90% FBS	8,26	0,09

Die FBS-Konzentration von 90% (m/m) stellte sich insgesamt als unpraktikabel heraus. Insbesondere die schlechte Pipettierbarkeit und die große Menge an Präzipitat nach Proteinfällung während der Probenaufbereitung waren hier von Nachteil. Daher wurden die weiteren Versuche mit den FBS-Konzentrationen 10% und 50% fortgeführt.

3.5.2. Permeation von Flurbiprofen im DR V2

Das Permeationsverhalten von Flurbiprofen aus der arzneistoffhaltigen Lösung wurde für den DR V2 unter diversen Bedingungen bestimmt, um unter anderem die Robustheit und Vielseitigkeit der Apparatur zu ermitteln. Dazu erfolgte eine Evaluierung des DR V2 in Anlehnung an die für eine Validierung erforderlichen Untersuchungen und Dokumentationen, wie in Abschnitt 2.10.2 aufgeführt ist.

Die Standardbedingungen im Hinblick auf die Medienkomposition, die Temperatur, sowie die Rührgeschwindigkeit der Paddle wurden daher zunächst variiert. Mittels der Freisetzungsuntersuchungen, die in Abbildung 16 dargestellt sind, konnte gezeigt werden, dass bei Erhöhung der Temperatur die gemessene Permeationsrate leicht ansteigt, aber nach den gleichen Gesetzmäßigkeiten wie unter Standardbedingungen abzulaufen scheint. Eine Erhöhung der Temperatur, sogenannte „*Accelerated Conditions*“, kann beispielsweise bei Freisetzungsexperimenten von Retardarzneiformen interessant sein, da durch die beschleunigten Diffusionsvorgänge die Versuchsdauer gegebenenfalls reduziert werden kann. Es zeigte sich bei dieser Untersuchung nur ein minimaler Effekt auf die Permeationsrate von bereits gelöst vorliegendem Flurbiprofen. Dies zeigt sich auch beim Vergleich der berechneten Permeabilitätskonstanten (k_M , zur Berechnung siehe Abschnitt 2.12), die in Tabelle 23 angegeben sind. Eine weitere Temperaturerhöhung könnte die Permeation weiter beschleunigen. Allerdings wurde auf Grund der apparativen Voraussetzungen (Beheizbarkeit des Wasserbades) und zur Vermeidung einer zu starken Wasserverdunstung von einer weiteren Temperaturerhöhung in diesem Versuchsaufbau abgesehen. Zusätzlich weist auch die Membran ein Temperaturlimit auf, oberhalb welchem die Integrität der Membran vom Hersteller nicht mehr gewährleistet werden kann.

Sowohl für Freisetzungsversuche bei 37 °C als auch bei 50 °C wurde die Temperatur zur Sicherstellung konstanter Freisetzungsbedingungen aufgezeichnet. Der aus den Aufzeichnungen bestimmte Median liegt bei 37,12 °C (Spannweite 36,99 °C bis 37,21 °C) bzw. 49,8 °C (Spannweite 49,6 °C bis 49,9 °C). Somit wurde die Vorgabe, während des gesamten Versuches um nicht mehr als 0,5 °C von der Solltemperatur von 37,0 °C bzw. 50,0 °C abzuweichen, erfüllt.

Tabelle 23: Permeabilitätskonstanten (k_M -Werte) der Freisetzungsexperimente von Flurbiprofen (n=6)

Test	Mittelwert k_M [$\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$]	SD k_M [$\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$]
DR, 37 °C, 75 Upm (Standard)	$2,143 \times 10^{-3}$	$5,977 \times 10^{-5}$
DR, 37 °C, 75 Upm (Wiederholung)	$2,161 \times 10^{-3}$	$1,061 \times 10^{-4}$
DR, 50 °C, 75 Upm	$2,585 \times 10^{-3}$	$2,263 \times 10^{-4}$
DR, 37 °C, 50 Upm	$2,111 \times 10^{-3}$	$1,052 \times 10^{-4}$
DR, 37 °C, 75 Upm Medium mit 10 g/L BSA	$2,820 \times 10^{-4}$	$1,225 \times 10^{-5}$
DR, 37 °C, 75 Upm Medium mit 1 g/L BSA	$1,894 \times 10^{-3}$	$9,101 \times 10^{-5}$
DB, 37 °C, 75 Upm	$1,548 \times 10^{-3}$	$6,190 \times 10^{-4}$

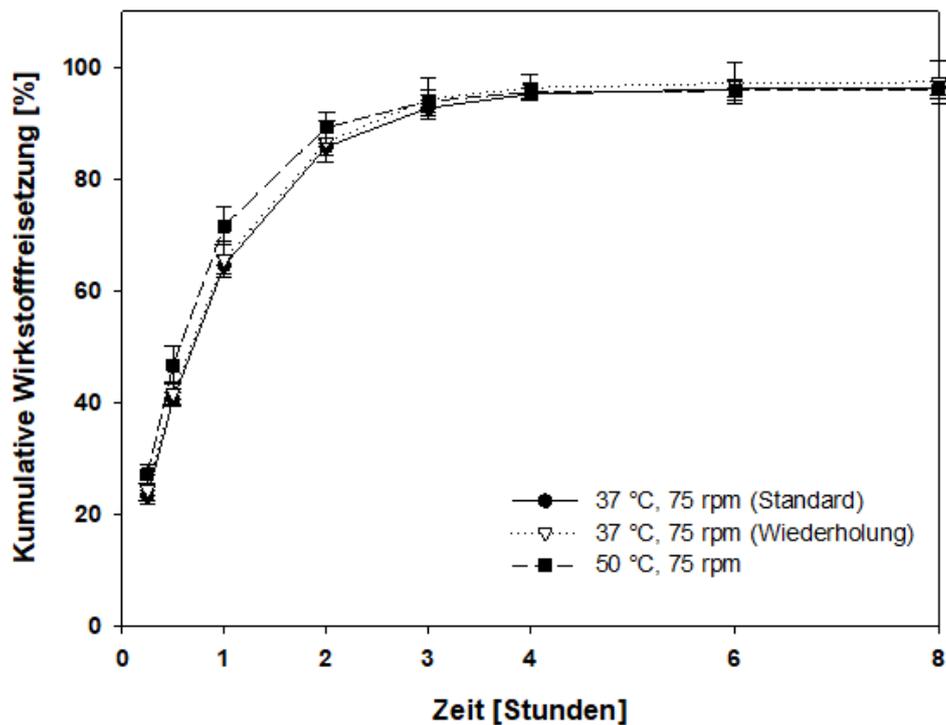


Abbildung 16: Permeation von Flurbiprofen im DR V2 bei Standardbedingungen und 50 °C

Die Wiederholbarkeit der Ergebnisse im DR V2 ist ebenfalls in Abbildung 16 dargestellt. Der Wechsel auf einen anderen Freisetzungstester (DT 700, Erweka) kann somit problemlos vollzogen werden.

Durch die Variation der Rührgeschwindigkeit wurde demonstriert, dass im Bereich von 50 bis 75 Upm die Permeationsrate von Flurbiprofen unbeeinflusst bleibt (Abbildung 17). Beide Rührgeschwindigkeiten sind für die Blattrührerapparatur nach Ph. Eur. typisch. Dieses Ergebnis zeigt, dass bereits bei 50 Upm eine ausreichende Hydrodynamik im Inneren der Freisetzungszellen herrscht und die Permeation somit nicht durch ein Konzentrationsgefälle innerhalb der Donorkammer behindert wird. Die Sicherstellung einer ausreichenden Hydrodynamik kann, wie aus der Literatur bekannt ist, bei der Entwicklung neuer *in vitro* Testsysteme zur Freisetzungsuntersuchung aus kolloidalen Trägern kritisch sein [2].

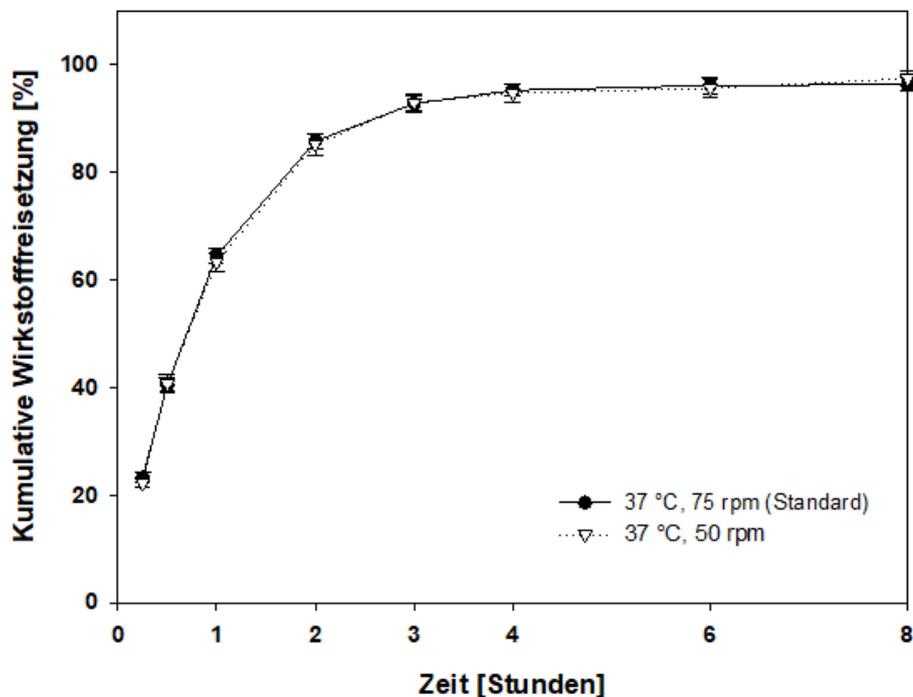


Abbildung 17: Permeation von Flurbiprofen im DR V2 bei Standardbedingungen und 50 Upm

In künftigen Freisetzungsuntersuchungen der Forschungsgruppe soll der Dispersion Releaser überwiegend mit physiologischen Medien oder mit Medien, deren Zusammensetzung der physiologischen Umgebung wie Blutplasma angepasst ist, eingesetzt werden. Daher wurde die Freisetzungsrates von Flurbiprofen in Phosphatpuffer pH 7,4 mit der Freisetzungsrates in albuminhaltigen Phosphatpuffern verglichen. Als Vergleichsmedien dienten PBS pH 7,2 mit 1 g/L und 10 g/L Albumin. In dieser Versuchsreihe wurde bewusst auf den Zusatz von FBS zugunsten der im

Ph. Eur. gelisteten Puffersysteme verzichtet, um die Verwendbarkeit der bekannten Medien zu untersuchen. Unter Berücksichtigung des in Absatz 3.3 ermittelten Wertes des FBS liegt der Proteingehalt des Puffersystems mit 10 g/L Albumin etwa um den Faktor 2 unterhalb dem Medium mit 50% FBS, kalkuliert für Albumin als Hauptkomponente des Proteinspektrums. In PBS pH 7,4 sind nach 4 Stunden $95,17 \pm 1,11\%$ und in PBS pH 7,2 mit 1 g/L Albumin bereits $102,14 \pm 7,60\%$ der maximalen Freisetzung erreicht. Obwohl für Flurbiprofen eine Plasmaeiweißbindung von $\sim 99\%$ in der Literatur verzeichnet ist [77], deutet die Permeationsrate in diesem Vergleich nicht auf einen freisetzungshemmenden Einfluss des Albumins hin. Erst in PBS pH 7,2 mit 10 g/L Albumin ist der deutliche Einfluss zu sehen. So beträgt die Freisetzung in diesem Medium im gleichen Zeitraum von 4 Stunden nur $46,25 \pm 2,42\%$ und die Permeabilitätskonstante (k_M -Wert) liegt mit $2,820 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ um eine Zehnerpotenz unterhalb des k_M -Wertes unter Standardbedingungen. Es konnte festgestellt werden, dass die Beeinflussung der Wirkstoffpermeation durch die Dialysemembran auch bei einem Arzneistoff, welcher eine hohe Plasma-Eiweißbindung aufweist, erst bei höherer Proteinkonzentration im FreisetzungsmEDIUM beeinflusst wird.

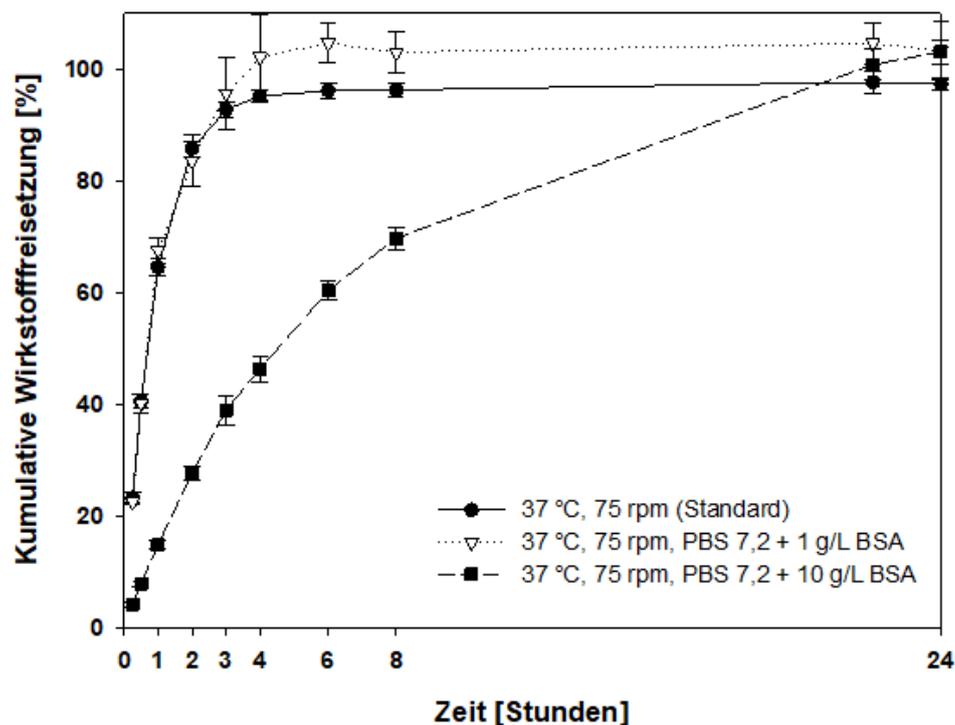


Abbildung 18: Permeation von Flurbiprofen im DR V2 bei Standardbedingungen und in Freisetzungsmitteln mit 1 g/L und 10 g/L BSA.

In einem weiteren Experiment konnte gezeigt werden, dass die Permeationsrate von Flurbiprofen aus Lösungen bei Erhöhung der Arzneistoffmenge von 400 µg auf 1200 µg annähernd konstant bleibt. Da auch für die höhere Arzneistoffmenge „sink conditions“ vorlagen, zeigte sich hier erwartungsgemäß kaum ein Unterschied in den Freisetzungprofilen der beiden Arzneistoffmengen (Abbildung 19). Aus den Ergebnissen lässt sich außerdem ableiten, dass die höhere Wirkstoffmenge zu Beginn in der Donorkammer zu einer maximalen Freisetzung näher an 100% führt.

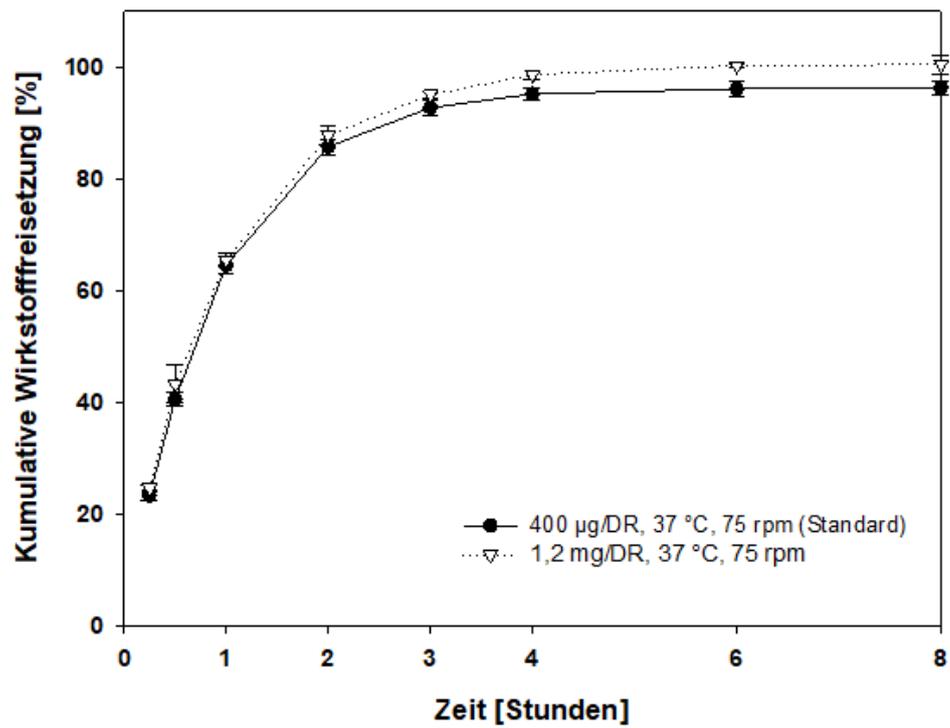


Abbildung 19: Permeation von Flurbiprofen im DR V2, 400 µg vs. 1200 µg pro Zelle

3.5.3. Permeation von mTHPC: DR V1 vs. DR V3

Mittels der dritten und vorerst letzten Version des Dispersion Releasers wurde es möglich, die Wirkstofffreisetzung auch unter Verwendung einer Dialysemembran aus Celluloseacetat zu untersuchen. Daher galt es, die zuvor bereits mit regenerierter Cellulose durchgeführte Untersuchung des Einflusses der FBS-Konzentration im Freisetzungsmedium auf das Permeationsverhalten von mTHPC aus der Referenzformulierung Foscan für die Celluloseacetatmembran zu wiederholen.

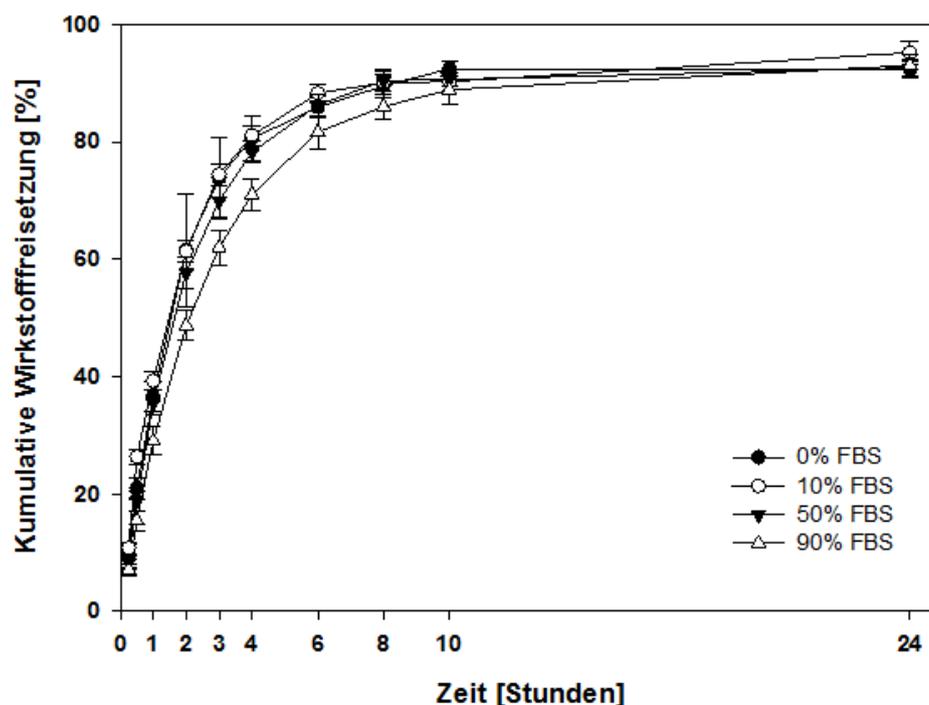


Abbildung 20: Permeation von mTHPC aus der Referenzformulierung Foscan im DR V3 in Freisetzungsmedien mit 0%, 10%, 50% und 90% FBS (n=6)

Beim Vergleich der Freisetzungsprofile von Foscan im DR V3 mit den Resultaten der Version 1 wird deutlich, dass die Membrankinetik der Celluloseacetatmembran, wie zuvor für den Dialysesack gezeigt (dargestellt in Abbildung 13), der Kinetik der Membran aus regenerierter Cellulose deutlich überlegen ist. Im Hinblick darauf kann die Entwicklung des Dispersion Releasers erst mit der Einführung der dritten Version als abgeschlossen betrachtet werden. Während sich gezeigt hat, dass für Freisetzungsversuche mit Flurbiprofen eine Membran aus regenerierter Cellulose

optimale Ergebnisse liefert (siehe Absätze 3.5.2 und 3.6.2), zeigt sich bei der Diffusion des lipophileren Arzneistoffes mTHPC im Komplex mit Methyl- β -cyclodextrin eine deutlich verlangsamte Membranpassage, welche die Interpretation von Freisetzungsdaten aus kolloidalen Arzneiträgern dieses Wirkstoffes erschwert. Daher sollte künftig für Freisetzungsversuche mit mTHPC der DR V3 mit einer Membran aus Celluloseacetat verwendet werden. Die Permeation von mTHPC durch die Membran verläuft in allen gewählten Medien zügig. Von einer Undichtigkeit kann insbesondere durch Vorliegen der Ergebnisse in Absatz 3.5.5 nicht ausgegangen werden.

Darüber hinaus zeigt die Medienkomposition, insbesondere der Gehalt an FBS in dieser Versuchsreihe nur einen sehr geringen Einfluss auf das Freisetzungsverhalten dieses Wirkstoffes. Dieser Effekt wurde bereits für die Membran aus regenerierter Cellulose für mTHPC beobachtet.

3.5.4. Untersuchung des DR auf Dichtigkeit: Die BSA-Methode

Für den Dispersion Releaser V2 konnte eine ausreichende Dichtigkeit mittels zweier Methoden demonstriert werden. Zunächst erfolgte dies an Hand der Bestimmung der Permeation von BSA durch die Membran, wie vom Hersteller empfohlen.

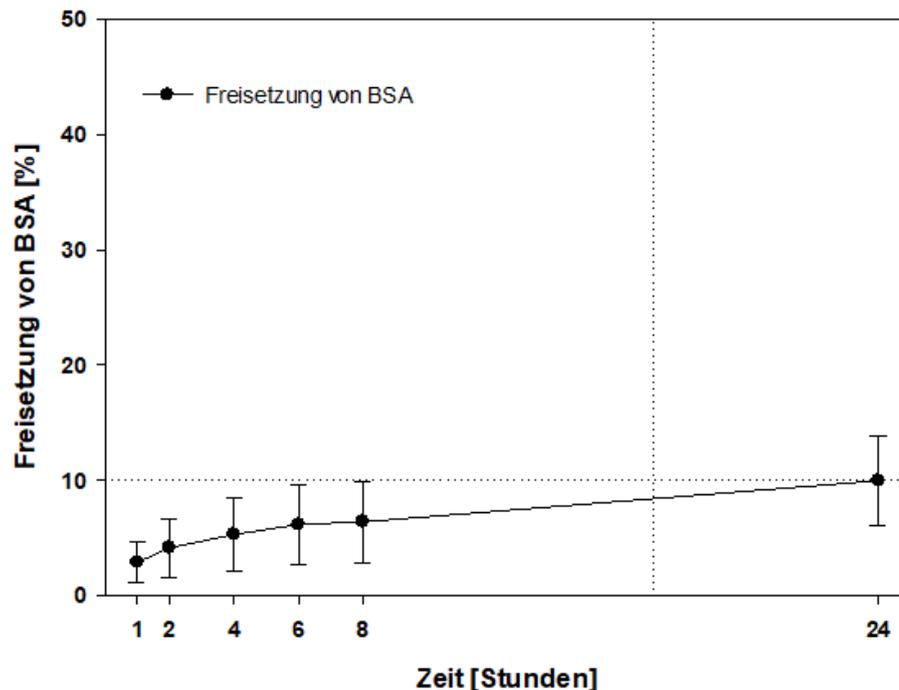


Abbildung 21: Durchschnittliche Freisetzung von BSA im DR V2 (n=6)

Im Durchschnitt aller 6 Exemplare des DR V2 wurden nach 24 Stunden $10,00 \pm 3,90\%$ der eingesetzten BSA Menge in der Akzeptorkammer wiedergefunden. Dies belegt, dass von der verwendeten Dialysemembran aus regenerierter Cellulose mit einem MWCO von 50 kDa $90 \pm 3,90\%$ des eingesetzten bovinen Albumins zurückgehalten werden. Das Freisetzungsprofil ist in Abbildung 21 dargestellt. Da es jedoch im Fall der Dichtigkeitsüberprüfung auf das Verhalten jedes einzelnen Dispersion Releasers ankommt, zeigt Abbildung 22 die Einzelprofile der 6 Vessel. Daraus wird deutlich, dass die Konzentration von BSA in der Akzeptorkammer kontinuierlich aber sehr flach ansteigt.

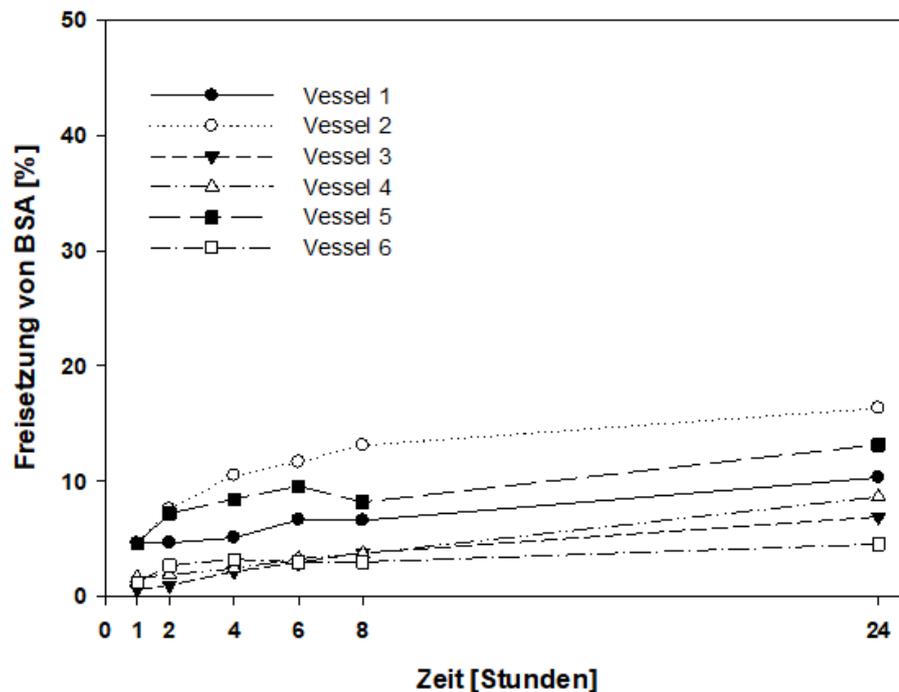


Abbildung 22: Freisetzung von BSA im DR V2, Darstellung der einzelnen Zellen

Für keine Zelle wurde eine Undichtigkeit festgestellt, auch wenn in zwei Einzelfällen die Werte etwas oberhalb des gesteckten Ziels von 10% (c/c) in 24 Stunden lagen (Referenzwert 10% (c/c) gilt jedoch für 17 Stunden). Im Falle einer Undichtigkeit hätte innerhalb weniger Stunden der Konzentrationsausgleich zwischen beiden Kompartimenten erfolgt sein müssen. Für Vessel 2 wurde nach 24 Stunden eine Permeation von 16,35% (c/c) und für Vessel 5 eine Permeation von 13,19% (c/c) der eingesetzten BSA-Menge ermittelt. Jede Zelle wurde nur einmal untersucht. Es besteht die Möglichkeit, dass sich die Ergebnisse bei einer anderen (niedrigeren) absoluten BSA-Menge unterscheiden würden. Die eingesetzte BSA Menge wurde frei gewählt. Es lagen neben der Spezifikation <10% in 17 h bei 37 °C keine weiteren Informationen über einen solchen Versuchsaufbau vor. Dennoch kann für diese beiden Zellen eine Undichtigkeit nicht 100%-ig ausgeschlossen werden. Daher wurde eine alternative Methode zur Überprüfung der Dichtigkeit mittels Gold-Nanopartikeln angewandt. Die Ergebnisse sind in Absatz 3.5.5 zu finden.

Die Dichtigkeit des DR V3 sollte ebenfalls mit der BSA-Methode überprüft werden, da diese Methode eine einfache Handhabung und etablierte Analytik ermöglichte. Jedoch konnte die Dichtigkeit des DR V3 mittels dieser Methodik nicht nachgewiesen werden. Überraschenderweise überwindet das Protein die Dialysemembran aus Celluloseacetat in einem derart hohen Ausmaß, dass nach 2 Stunden bereits in den meisten DR ~12% (c/c) der eingesetzten BSA-Menge in der Akzeptorkammer nachgewiesen wurde. Nach 24 Stunden waren im Durchschnitt der 6 Exemplare $69,96 \pm 5,0\%$ (c/c) der BSA-Menge, bezogen auf die maximale Konzentration von $714,3 \mu\text{g/mL}$ bei vollständigem Konzentrationsausgleich zwischen beiden Kammern, in der Akzeptorkammer nachzuweisen (siehe Abbildung 23). Diese Durchlässigkeit der Celluloseacetatmembran für BSA konnte im Versuchsaufbau des Dialysesackes beobachtet werden, wurde in diesem Setup jedoch zunächst fälschlicherweise einem Problem mit den Verschlussklemmen zugeschrieben.

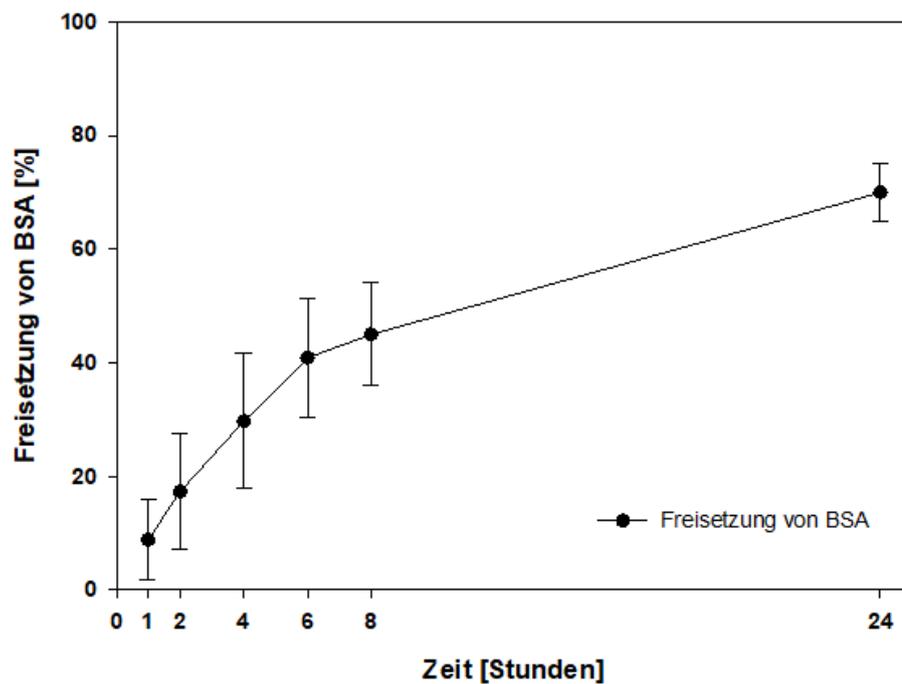


Abbildung 23. Permeationsverhalten von BSA im DR V3, mit einer Dialysemembran aus Celluloseacetat (n=6)

3.5.5. Überprüfung des DR auf Dichtigkeit: Die Methode mit Gold-Nanopartikeln

Da die Dichtigkeitsuntersuchung mittels Retention von BSA für die Membran aus regenerierter Cellulose nicht zufriedenstellend war und für die Celluloseacetatmembran geradezu unmöglich, wurde die Dichtigkeit ergänzend mittels der Permeation bzw. Retention von Gold-Nanopartikeln ermittelt. So kann die Permeation von partikulären Bestandteilen durch die Dialysemembran hindurch ausgeschlossen werden.

Denn obwohl der MWCO der ausgewählten Membran unterhalb des Molekulargewichts des eingesetzten Makromoleküls BSA lag, können - durch eine bestenfalls normalverteilte Porengröße der Membran (Informationen des Herstellers dazu liegen nicht vor) - auch Moleküle, deren Molekulargewicht oberhalb des MWCOs liegt, die Membran in einigen Fällen passieren. Hinzu kommt, dass die Form von Proteinen nur vereinfacht als kugelförmig angenommen werden kann. Außerdem kann die Tertiärstruktur von Proteinen einer gewissen Dynamik unterliegen, die ein partielles reversibles Entfalten und damit eine vorübergehende Änderung der dreidimensionalen Struktur erlaubt. So entstehende Unterschiede im Molekülradius -wenn auch minimal- können zu einem schwer vorherzusagenden Permeationsverhalten in diesem Versuchsaufbau führen.

Für den DR V2 wurde mittels der Gold-Nanopartikel-Methode folgendes beobachtet: Mit Ausnahme eines Ausreißers bzw. Messfehlers bei der Messung nach einer Stunde in Vessel 5, der womöglich durch eine verunreinigte Küvette oder Pipette zustande kam, belegen die Resultate eine einwandfreie Dichtigkeit. Die Membranen wurden nach 24 Stunden mit einer Kanüle angestochen, um eine Positiv-Kontrolle messen und mit den Daten der eigentlichen Testphase vergleichen zu können. In Abbildung 24 sind die Chromatogramme der einzelnen Vessel dargestellt. Aus dem Grund der Übersichtlichkeit enthalten die Chromatogramme die Kurven der Probennahmen nach drei und vier Stunden nicht, da sich die Kurven überlagern. Dabei zeigt keine der nach 1 bis 24 Stunden gemessenen Proben das für die Gold-Nanopartikel typische Chromatogramm. Alle Apparaturen des DR V2 sind somit für partikuläre Bestandteile > 50 nm undurchlässig.

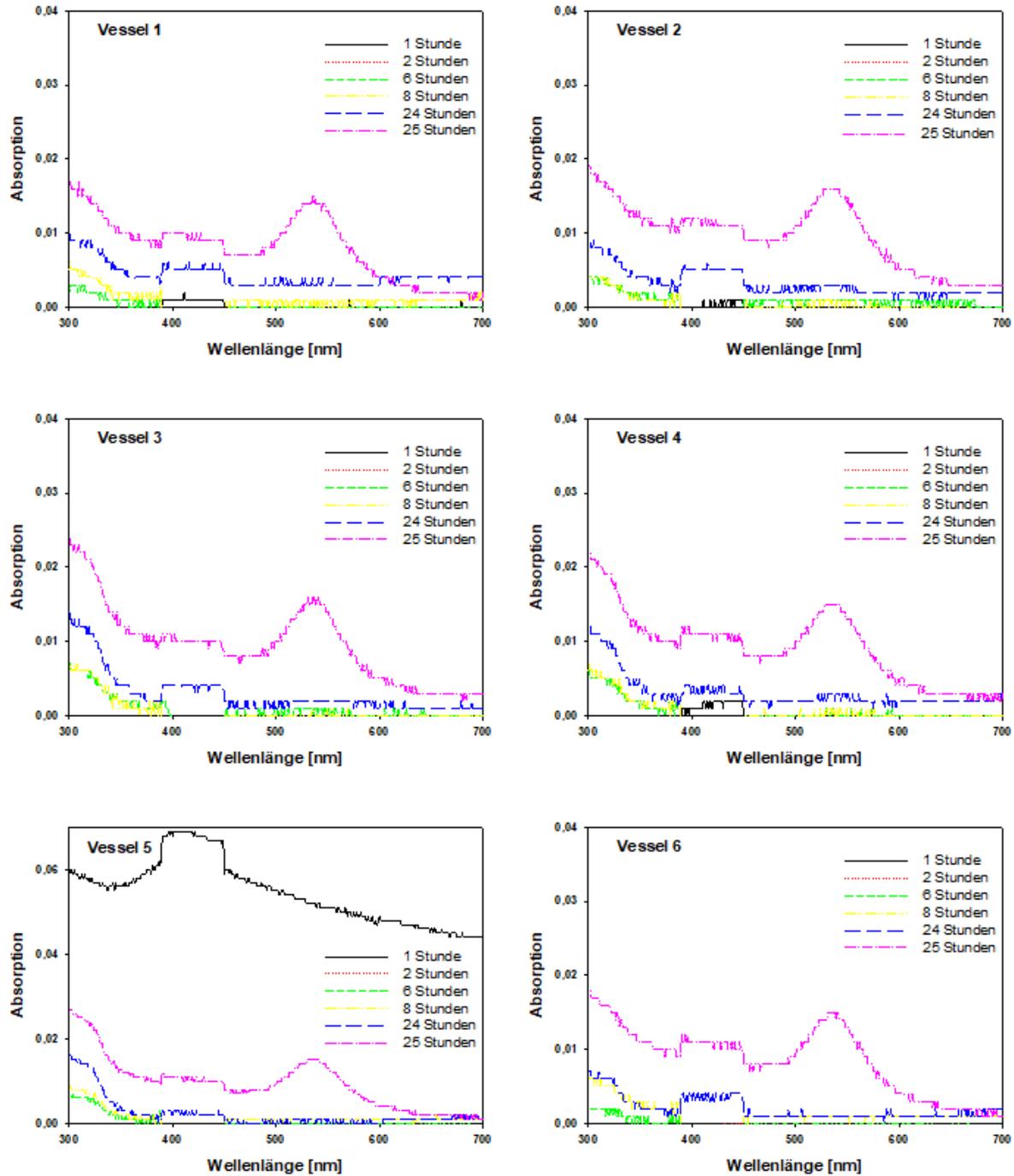


Abbildung 24: Test auf Dichtigkeit des DR V2 mittels Gold-Nanopartikeln, UV-Spektren

Für den DR V3 sind die UV-Spektren in Abbildung 25 dargestellt. Es ist den Chromatogrammen eindeutig zu entnehmen, dass die Apparaturen jeweils bis zum Zeitpunkt der Inzision in die Membran (nach der Probennahme 24 h) für die verwendeten Gold-Nanopartikel dicht waren. Das für die Gold-Nanopartikel typische Chromatogramm ist jeweils erst nach 25, 26 und 28 Stunden, also 1, 2 und 4 Stunden nach Inzision zu erkennen. Daraus kann geschlossen werden, dass auch der DR V3 für Nanopartikel mit einem Durchmesser ≥ 50 nm dicht ist. Es wurde nach dieser Methode keine separate Messreihe als Positivkontrolle durchgeführt, da die durch die Inzision imitierte Undichtigkeit nach 24 Stunden als Positivmessung genügte.

Die generelle Dichtigkeit des DR auch für Flüssigkeiten und gelöste Komponenten bleibt jedoch eine - wenn auch höchst wahrscheinliche - Annahme, da diese durch keinen bekannten Test zu 100% bewiesen werden kann. Es weist allerdings keines der hier dargestellten Freisetzungs- und Permeationsexperimente auf eine Undichtigkeit in einer der Zellen hin, eine sofortige Freisetzung der Testsubstanz in die Akzeptorkammer wäre in diesem Fall zu erwarten.

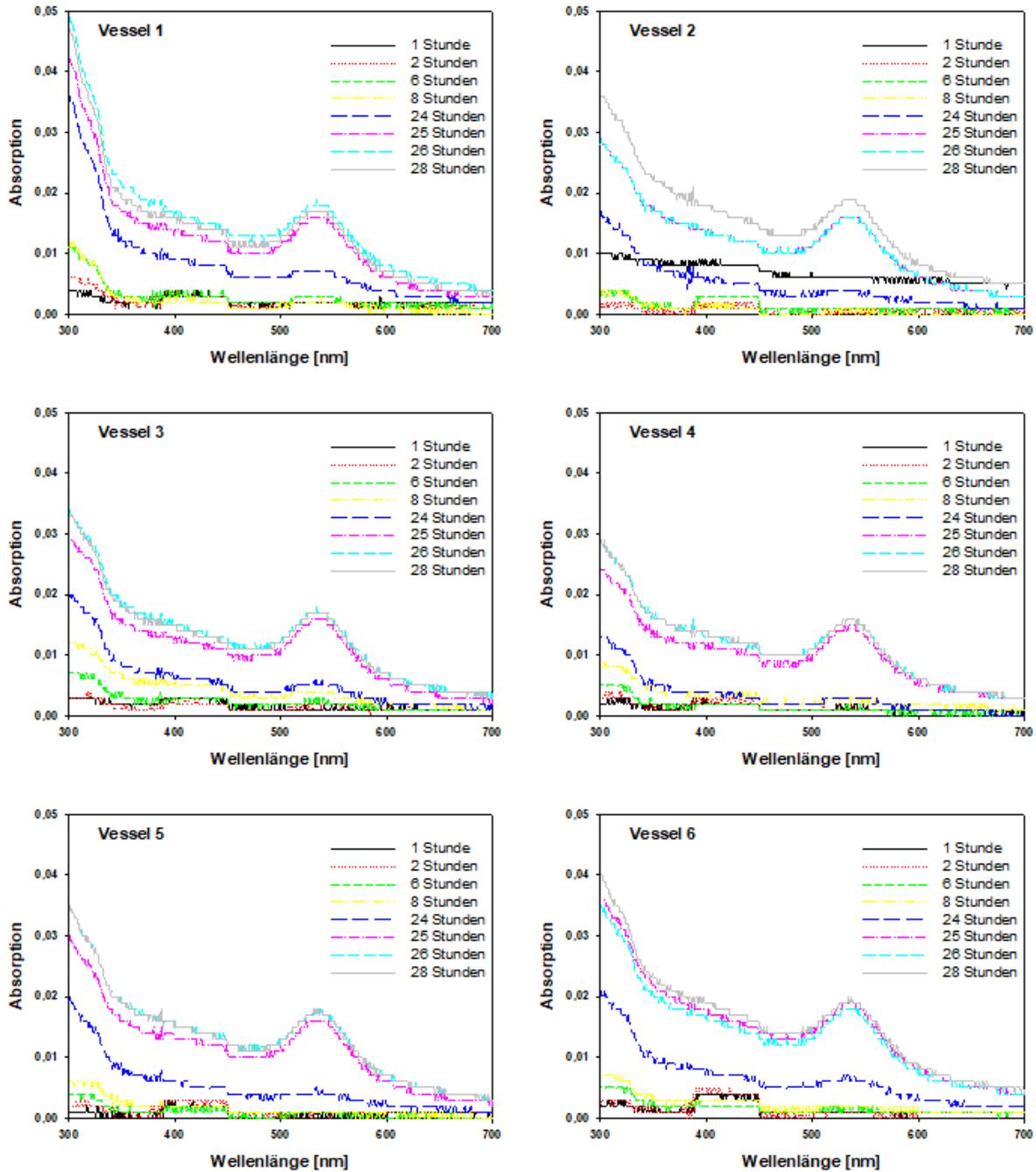


Abbildung 25: Test auf Dichtigkeit des DR V3 (Dialysemembran aus Celluloseacetat) mittels Gold-Nanopartikeln, UV-Spektren

3.6. Wirkstofffreisetzung aus polymeren Nanopartikeln im DR

3.6.1. Freisetzung von mTHPC aus PLGA Nanopartikeln im DR V1

An Hand der Untersuchung der Wirkstofffreisetzung wurde angestrebt, die Eignung der neu entwickelten Apparatur zu untersuchen, sowie parallel die Herstellung der mTHPC-beladenen PLGA Nanopartikel zu optimieren. Dabei galt es, die Freisetzungsgeschwindigkeit von mTHPC aus PLGA Nanopartikeln zu senken, um anschließend die Aussage treffen zu können, ob der DR zwischen zwei Formulierungen mit unterschiedlicher Freisetzungskinetik diskriminieren kann. Dabei widerspricht sich der Einsatz einer kolloidalen Arzneiform als verlängert freisetzender Arzneiträger zunächst einmal, da nanonisierte Wirkstoffe nach dem Gesetz von Noyes-Whitney [94] zu einer schnelleren Auflösung und damit zu einer verbesserten Bioverfügbarkeit beispielsweise in peroralen Arzneiformen eingesetzt werden können [95]. Demgegenüber darf der Wirkstoff einer kolloidalen Zubereitung, insofern er seinen Wirkort nach dem Prinzip des passiven Targetings erreichen soll, nicht verfrüht von seiner Trägermatrix freigegeben werden. Für die erforderliche und gewünschte Dauer der Retention des Wirkstoffs in und an der Partikelmatrix kann für die hier verwendete experimentelle Formulierung keine Aussage getroffen werden. Die Freisetzungseigenschaften von kolloidalen Arzneiformen sind stets eng gebunden an den Applikationsort, die gewünschte Wirkdauer, sowie das Gewebe oder Organ, in welchem das Arzneimittel seine Wirkung entfalten soll.

Während der Versuchsreihe wurden verschiedene Partikelchargen auf ihr Freisetzungsverhalten hin untersucht. Da nicht alle Formulierungen, insbesondere die mit Chitosan überzogenen und nicht quervernetzten PLGA Nanopartikel, eine ausreichende Stabilität über 24 Stunden im FreisetzungsmEDIUM bei 37 °C aufwiesen, werden hier nur die Freisetzungsprofile der stabilen Chargen dargestellt. Abbildung 26 zeigt die Freisetzungsprofile von mTHPC-PLGA Nanopartikeln (Charge 4) im Vergleich zur weiterentwickelten Formulierung mit einem Chitosan-Netzwerk auf der Partikeloberfläche (Charge 11) in FreisetzungsmEDIUM mit 50% FBS. Für beide Partikelchargen konnte mittels PCS nach dem Freisetzungstest die Stabilität nachgewiesen werden. Eine mittels PCS messbare Abnahme der Partikelgröße auf Grund von Partikelabbau war innerhalb des Zeitraumes von 24 Stunden nicht zu

erwarten. Die Abnahme der Partikelgröße im Falle der Chitosan-PLGA Nanopartikel kann damit erklärt werden, dass sich innerhalb des Untersuchungszeitraumes möglicherweise das Chitosan von den Partikeln löst, was zur Abnahme des hydrodynamischen Durchmessers der Partikel führt (siehe Tabelle 24). Der pH-Wert des Freisetzungsmediums lag am Ende des Experiments in beiden Versuchsreihen bei $\text{pH } 8,07 \pm 0,03$ (nicht überzogene Partikel) und bei $\text{pH } 8,25 \pm 0,10$ (mit Chitosan überzogene Partikel).

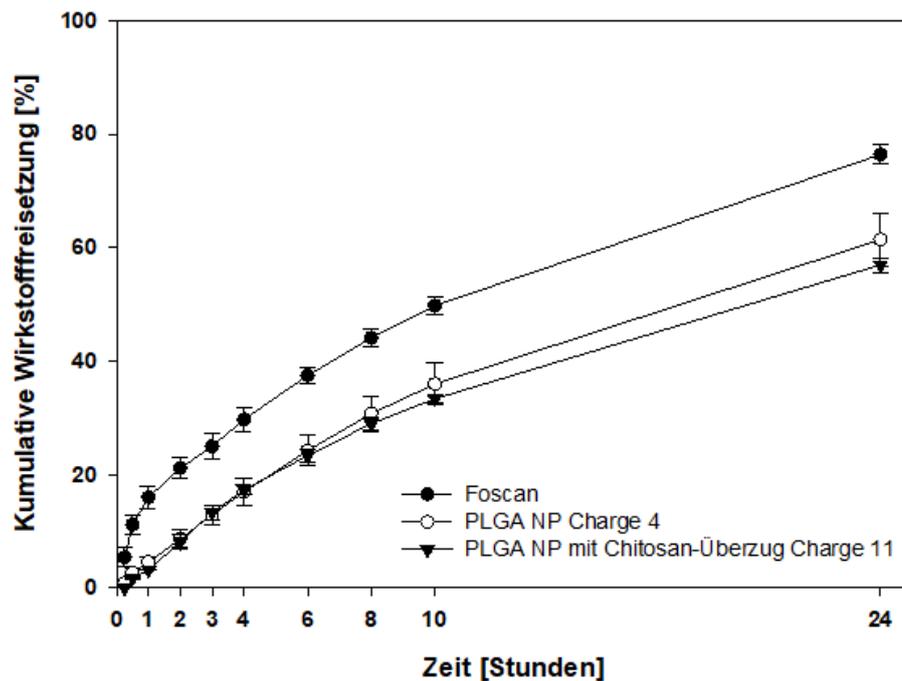


Abbildung 26: Wirkstofffreisetzung von mTHPC aus gefriergetrockneten PLGA Nanopartikeln ohne (Charge 4) und mit Chitosan-Überzug (Charge 11) in 50% FBS im DR V1 (n=3)

Tabelle 24: Partikelgrößenanalytik und Zetapotential vor und nach der Wirkstofffreisetzung in 50% FBS (n=3)

Typ, Charge	Partikelgröße [nm]		Polydispersitätsindex		Zetapotential [mV]	
	Ø	SD	Ø	SD	Ø	SD
Ohne Chitosan-Überzug						
Charge 4						
t = 0 Stunden	240,67	2,11	0,131	0,006	-6,15	0,46
t = 24 Stunden	259,70	1,72	0,174	0,021	-2,15	0,12
Chitosan-Überzug + Quervernetzung + Aufreinigung						
Charge 11						
t = 0 Stunden	316,27	13,21	0,198	0,038	-7,83	0,73
t = 24 Stunden	268,83	2,69	0,162	0,011	-2,68	0,37

Die Freisetzungsrates des Wirkstoffs konnte mittels beider kolloidaler Formulierungen reduziert werden. Allerdings vermögen es beide Partikelspezies nicht, die Freisetzung des Wirkstoffes mTHPC im gewählten Freisetzungsmittel in dem erwünschten Ausmaß zu verzögern. Diese Beobachtung konnte ebenfalls im A4D bestätigt werden, wie in Absatz 3.7.3 dargestellt ist.

Da mit den Freisetzungprofilen beider Partikelspezies keine zufriedenstellende Optimierung im Hinblick auf die verlängerte Wirkstofffreisetzung gezeigt werden konnte, wurde eine zusätzliche Reduktion der Arzneistoffbeladung von initial 5% (m/m, eingesetzte Masse mTHPC / Masse PLGA) auf 2,5% (m/m) und 0,5% (m/m) getestet. Leider konnten auch diese Formulierungen die Freisetzungsrates nicht weiter senken. Daher kann man schlussfolgern, dass diese nanopartikulären Formulierungen, das Testsystem des DR V1 oder aber die Kombination aus beiden nicht für den verwendeten Zweck geeignet ist. Naheliegend ist dabei Ersteres, da die Freisetzungprofile der getesteten Partikelspezies sich zwar kaum untereinander unterscheiden, aber dennoch eine geringere Freisetzungsrates als die Referenzformulierung Foscan aufwies. Folglich stellt die Inkorporierung von mTHPC in Polymilch-co-glycolsäure kein optimales Partikelsystem dar, wenngleich die Partikelherstellung zu reproduzierbaren Partikelchargen führte.

3.6.2. Freisetzung von Flurbiprofen aus Nanopartikeln im DR V2

Um zeigen zu können, dass die Wirkstofffreisetzung von Flurbiprofen aus schnell und langsam freisetzenden kolloidalen Arzneiformulierungen mittels DR V2 bestimmbar ist, wurden Flurbiprofen-beladene Nanopartikel aus PLA, PLGA und Eudragit® RS 100 hergestellt und auf ihr Freisetzungsverhalten hin untersucht. Dazu wurden, wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben, die lyophilisierten PLA und PLGA Nanopartikel zunächst in Freisetzungsmedium zu einer Soll-Konzentration von 125 µg/mL redispergiert. Davon wurden 3,2 mL je DR in die Akzeptorkammer pipettiert, mit Medium auf 3,8 mL aufgefüllt und anschließend das Freisetzungsexperiment gestartet. So sollte der Freisetzungstest mit einer maximalen Arzneistoffmenge von 400 µg pro Zelle durchgeführt werden. Da die ermittelten Konzentrationen und die daraus resultierende Menge an Flurbiprofen je Zelle jedoch etwas niedriger waren (siehe Tabelle 19 in Abschnitt 3.2.3), wurde die kumulative prozentuale Freisetzung auf die jeweils im Vessel enthaltene Arzneistoffmenge angepasst. Die Nanopartikel aus Eudragit® und PLGA setzten den Wirkstoff zu nahezu 100% innerhalb von 8 Stunden frei. Dabei unterscheidet sich das Freisetzungsprofil nur geringfügig von dem des reinen Arzneistoffs im gleichen Freisetzungsmedium (siehe Abbildung 27). Obwohl die Eudragit® Nanopartikel hier mit einer deutlich höheren Arzneistoffmenge eingesetzt wurden, kann dieser Mengenunterschied alleine die schnelle Freisetzung nicht begründen. Wie bereits in Abschnitt 3.5.2 diskutiert und in Abbildung 19 gezeigt, hat die Arzneistoffkonzentration in diesem Konzentrationsbereich nur einen minimalen Effekt auf das Freisetzungsverhalten. Das schnelle Freisetzungsverhalten aus Eudragit® und PLGA Nanopartikeln deutet auf eine schlechte Inkorporierung des Arzneistoffes in diesen beiden Partikelspezies hin. Die überwiegende Arzneistofffraktion liegt daher wahrscheinlich adsorbiert an die Partikeloberfläche der kolloidalen Träger oder von diesen separat präzipitiert vor. So kann die schnelle Freisetzung erklärt werden. Es besteht darüber hinaus die Möglichkeit, dass zwar eine Fraktion des Arzneistoffs in die Partikel inkorporiert vorliegt und somit leicht verzögert freigesetzt wird, jedoch eine weitere kolloidal präzipitierte Fraktion sich zu Beginn der Freisetzung unverzüglich auflöst und die verzögert freisetzende Komponente somit überdeckt. Um diesen Sachverhalt aufzuklären und die vorliegenden Wechselwirkungen zwischen Polymer und Arzneistoff zu eruieren, wären weiterführende Untersuchungen unter Einbezug anderer analytischer Verfahren

notwendig. Da bildgebende Verfahren wie die Elektronenmikroskopie nicht zwischen der Beschaffenheit der Materie unterscheiden, eignen sich diese für unsere Fragestellung nicht. Mittels Infrarot-Spektroskopie können Wechselwirkungen zwischen polymeren Trägern und Wirkstoffen aufgezeigt werden und die Röntgenstrukturanalyse ist in der Lage amorph und kristallinen Wirkstoff nach seinen Polymorphen zu charakterisieren. Zwar liefern diese und andere Methoden wichtige Hinweise auf die Charakteristik und die Reproduzierbarkeit der Freisetzung aus einer kolloidalen Arzneiform, jedoch ist am Ende selbstverständlich die Freigabe des Wirkstoffs *in vivo* entscheidend für den therapeutischen Erfolg.

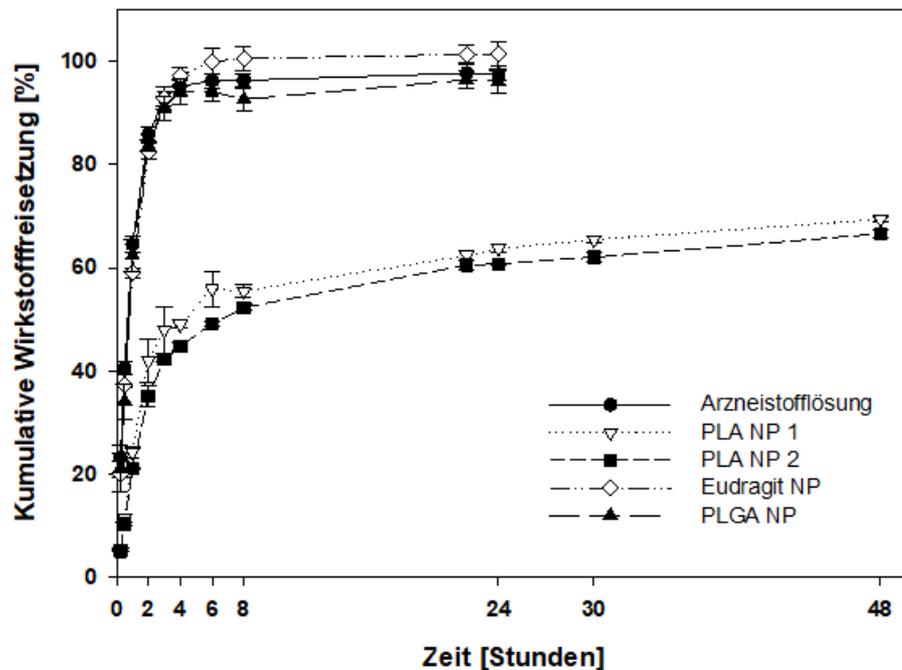


Abbildung 27: Wirkstofffreisetzung von Flurbiprofen aus polymeren Nanopartikeln im DR V2

Im Gegensatz zu Eudragit® und PLGA Nanopartikeln zeigten die Nanopartikel aus PLA nach einem initialen „burst release“ eine langsame und kontinuierliche Wirkstofffreisetzung auch über die verlängerte Versuchsdauer von 48 Stunden. Im Gegensatz zu den PLGA und Eudragit® Nanopartikeln ist hier im Falle der PLA Nanopartikel die Freisetzung des Wirkstoffs aus der Arzneiform und nicht die Diffusion durch die Dialysemembran der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Dass Flurbiprofen-beladene PLA Nanopartikel eine derart verzögerte Freisetzung zeigen, war aus den Freisetzungsdaten, welche für eine ähnliche Formulierung publiziert

wurden, nicht vorherzusagen [63]. Meister et al. stellte die Nanopartikel nach der gleichen Methodik, jedoch unter Verwendung einer 2%-igen PVA Stabilisatorlösung her und untersuchte das Freisetzungsverhalten durch Konzentrationsbestimmung in einem Phosphatpuffer pH 7,5 (1 mg Nanopartikel in 1 mL Puffer) nach Abzentrifugieren der partikulären Komponenten. Freisetzungsversuche nach diesem sogenannten „Sample & Separate“ Verfahren sind für Nanopartikel heutzutage noch üblich, da vielen Forschungsgruppen kein besser standardisiertes Verfahren wie das des A4D oder DR zur Verfügung steht. Man kann aus dem Vergleich unserer Freisetzungsdaten mit denen von Meister et al. ableiten, dass das Ergebnis einer Freisetzungsuntersuchung von kolloidalen Arzneiträgern auch elementar von der Auswahl der Freisetzungsapparatur abhängt.

Mathematische Auswertung der Freisetzungsprofile nach dem „four-step“ Modell

Durch Anwendung der mathematischen Berechnungen des „four-step“ Modells konnten die Profile der Wirkstofffreisetzung aus kolloidalen Arzneiformen im Dispersion Releaser bearbeitet werden. Daher lässt sich, wie in Abbildung 28 gezeigt, die totale freie Flurbiprofenkonzentration als Summe der Konzentrationen beider Kompartimente im Dialyse-Setup darstellen. Die in Abbildung 28 dargestellten Profile der totalen freien Flurbiprofenkonzentration weisen jedoch teilweise unsaubere Kurvenverläufe auf und bilden daher wahrscheinlich nicht das reale Freisetzungsverhalten ab. Diese können dadurch zustande kommen, dass die Datenpunkte der freien Flurbiprofenkonzentration in der Donorkammer aus einer mathematischen Approximation resultiert. In dieser dient die Freisetzungsrate zwischen zwei Datenpunkten gemessen für die Akzeptorkammer als Ausgangswert für die Berechnung der freien Wirkstoffkonzentration in der Donorkammer. Ungenauigkeiten in der Probennahme, der Gehaltsbestimmung oder auch der Verdünnungseffekt durch Mediumzugabe nach den erfolgten Probenzügen können hier außerdem Einfluss auf das Profil genommen haben. Aber insbesondere die für diesen Zweck recht langen Abstände zwischen den Probennahmen wirken sich negativ auf die Datenqualität aus. Frau Kirsamer hatte das Modell initial für Daten entwickelt, welche durch online-Messung zustande kamen.

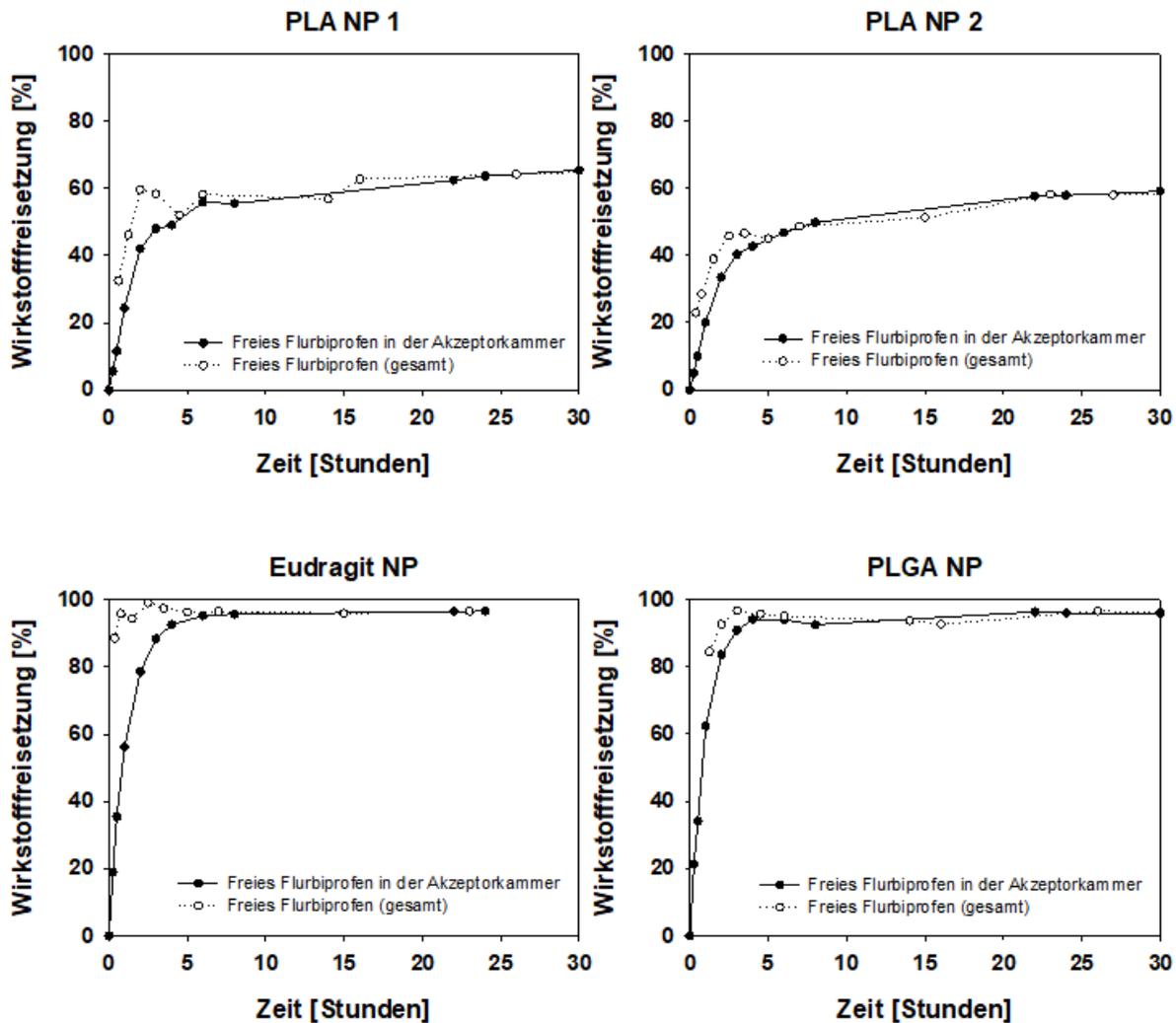


Abbildung 28: Mathematisch bearbeitete Freisetzungprofile von Flurbiprofen aus kolloidalen Arzneiformen im Dispersion Releaser

Aus Abbildung 28 lässt sich ableiten, dass die freie Arzneistoffkonzentration im Falle der Eudragit® Nanopartikel zu Versuchsbeginn bereits sehr hoch war, was auf eine schlechte Verkapselungseffizienz und einen nur sehr geringen nanopartikulär gebundenen Wirkstoffanteil hindeutet. Diese Tendenz lässt sich in der Darstellung der CAR noch eindeutiger zeigen. PLA Nanopartikel, die wie oben diskutiert in der klassischen Darstellungsweise von Freisetzungprofilen eine nach dem initialen „burst release“ einsetzende verzögerte Freisetzung zeigten, weisen einen Peak in der CAR_a auf. Dahingegen ist zum Zeitpunkt $t = 0$ Stunden die CAR_a von Eudragit® und PLGA Nanopartikeln maximal und sinkt im Verlaufe des Untersuchungszeitraumes stetig ab. Wie bereits diskutiert, wird diese Beobachtung durch nur geringe Wechselwirkungen zwischen Arzneistoff und Trägermaterial erklärt.

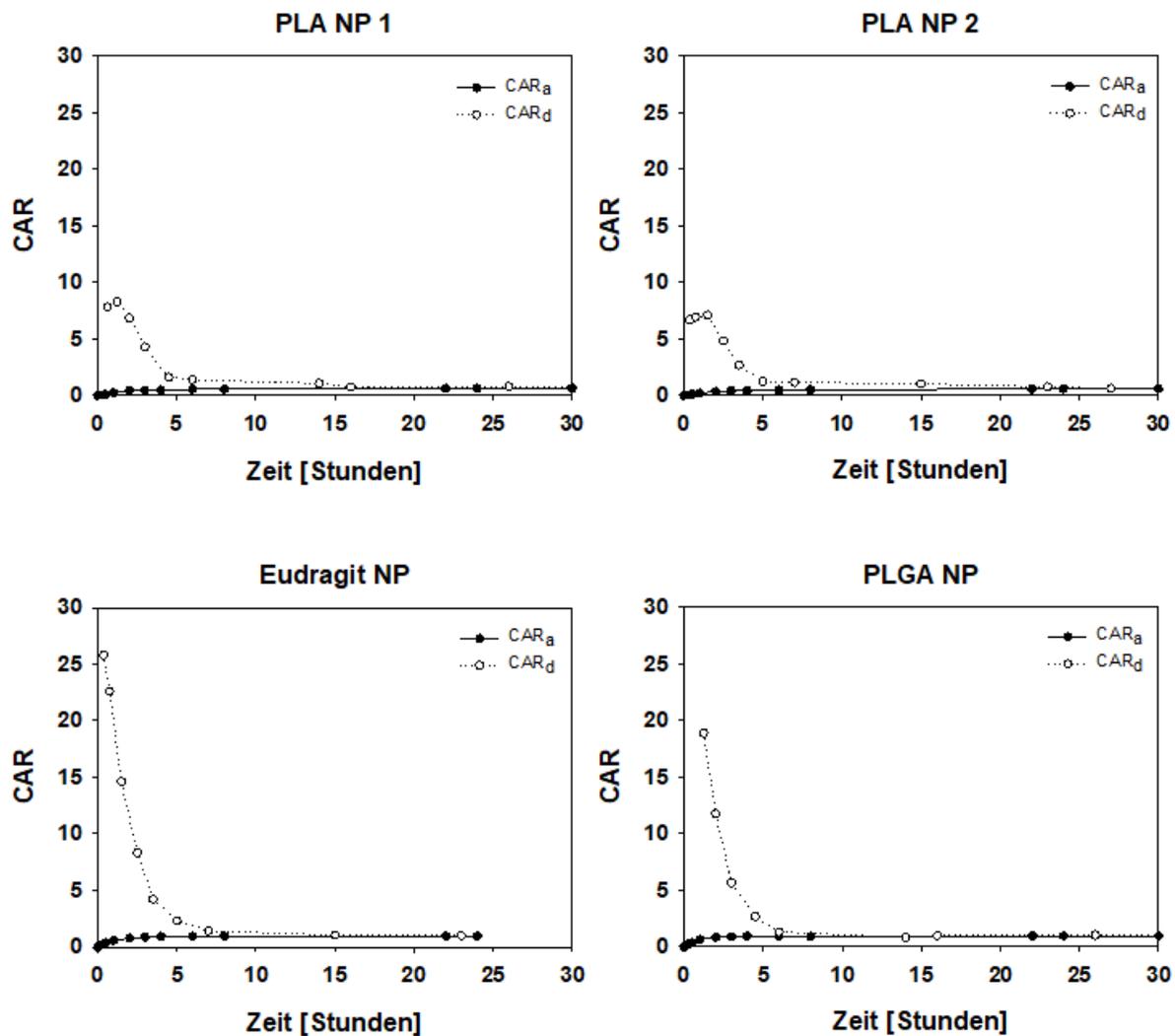


Abbildung 29: *Compartment accumulation ratio* für kolloidale Arzneiformen

3.6.3. Mathematische Interpretation von Freisetzungprofilen

Um die Freisetzungskinetik der kolloidalen Modellformulierungen zu untersuchen und so ein besseres Verständnis von den der Freisetzung zu Grunde liegenden Mechanismen zu erhalten, wurden die beiden aus der Literatur bekannten Modelle „*rp*“ Modell und „*three-parameter*“ Modell eingesetzt. Für beide Modelle wurden die spezifischen Parameter ausgewertet und die Regression der Profile mittels „*automated curve fitting*“ erstellt. Beide Modelle sind in der Lage, den Freisetzungsprozess gut abzubilden, was durch die Werte der Korrelationskoeffizienten (R^2) in Tabelle 25 und Tabelle 26 deutlich wird.

Mathematische Interpretation von Freisetzungprofilen nach dem „*rpt*“ Modell

Für das „*rpt*“ Modell wurden die beiden Parameter m und b für die untersuchten Modellformulierungen berechnet. Es handelt sich dabei lediglich um deskriptive Parameter, die zwar zu Vergleichszwecken zwischen Produkten verwendet werden können, die aber darüber hinaus keine biopharmazeutische Erkenntnis auf die Freisetzungsscharakteristik erlauben. Positiv zu bewerten ist jedoch, dass die Parameter m und b sich ohne größeren Aufwand aus der Regression nach Gleichung (11) ableiten lassen. Daher kann das „*rpt*“ Modell möglicherweise für den Zweck der Chargenreproduzierbarkeit bzw. in der Qualitätskontrolle durchaus von Nutzen sein. Auf Grund der hier verwendeten vergleichsweise kleinen Stichprobe können die ermittelten Werte für die beiden Parameter m und b (siehe Tabelle 25) nur eingeschränkt miteinander verglichen werden. Daher ist es naheliegend, dass die Festlegung von Kriterien für die Beurteilung von Äquivalenz oder Inäquivalenz zweier Produkte erst nach Messung höherer Probenzahlen möglich ist.

Tabelle 25: Parameter der Wirkstofffreisetzung für Freisetzungsexperimente im DR V2 mit kolloidalen Flurbiprofen-haltigen Formulierungen, analysiert nach dem „*rpt*“ Modell

Experiment	m	b	R^2
PLA NP 1	1,062	0,242	0,9893
PLA NP 2	1,967	0,310	0,9962
Eudragit® NP	0,064	0,459	0,9996
PLGA NP	0,0003	22,955	0,9961

Mathematische Interpretation von Freisetzungprofilen nach dem „*three-parameter*“ Modell

Im Gegensatz zum „*rpt*“ Modell ermöglicht das „*three-parameter*“ Modell ein tieferes Verständnis von der Freisetzungskinetik durch die Berechnung der kinetischen Parameter k_s und k_{off} sowie durch die Differenz der freien Enthalpie ΔG zwischen der ungebundenen und gebundenen Fraktion des Wirkstoffs. Dabei beschreibt k_s die Freisetzungsrates der initialen „*burst release*“ Phase und die Dissoziationskonstante k_{off}

beschreibt die Rate der Dissoziation von adsorptiv an den Träger gebundenem Wirkstoff. Insbesondere die beiden Parameter k_{off} und ΔG beschreiben die Stärke der Träger-Arzneistoff-Wechselwirkungen. Wie die Arbeitsgruppe um Zeng bereits festgestellt hat, ist ein hoher initialer „burst release“ mit einer schwachen Träger-Wirkstoff-Bindung assoziiert. Nach der Definition von ΔG nach Gleichung (15) liegt eine exergonische Reaktion in Bezug auf die Wirkstofffreisetzung vor, wenn ΔG positiv ist. Dies liegt daran, dass ΔG für die Assoziationskonstante definiert ist, da k_{on} im Zähler steht und somit nach der Definition in Gleichung (15) die Rückreaktion der Freigabe beschreibt. Für die Bewertung ist allerdings die Freisetzung vom Träger relevant. Daher konnte mathematisch nachgewiesen werden, dass die Partikelsysteme mit einer hohen initialen Wirkstofffreigabe, also die Eudragit und PLGA Nanopartikel, eine schwache Bindungskraft zwischen Trägermatrix und Arzneistoff aufweisen. Im Falle dieser Partikelsysteme ist daher die Bindung an den Träger eine endergonische Reaktion und die Werte für ΔG sind > 0 (Tabelle 26). Somit ist die Tendenz dieser beider Partikelsysteme, den Wirkstoff Flurbiprofen zu adsorbieren oder zu binden, geringer ausgeprägt als im Fall der PLA Nanopartikel. Für die PLA Nanopartikel ist die Bindung von Flurbiprofen an den kolloidalen Träger exergonisch. Dabei ergibt sich eine Änderung der freien Enthalpie bei der Bindung von Flurbiprofen an PLA Nanopartikel um $-292,68 \text{ J/mol}$ (PLA NP 1) bzw. $-390,23 \text{ J/mol}$ (PLA NP 2). Diese Werte ergeben sich aus den in Tabelle 26 angegebenen Werten für ΔG multipliziert mit der Avogardokonstante ($N_A = 6,02214 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$) und stellen im tradierten Sinne die freie Enthalpie dar. Im Vergleich dazu ist die Bindung von Flurbiprofen an Eudragit und PLGA Nanopartikel mit einer Erhöhung der freien Enthalpie um $8,49 \text{ kJ/mol}$ bzw. $6,68 \text{ kJ/mol}$ verbunden.

$$\text{iniB} = \frac{1}{1 + e^{-\frac{\Delta G}{k_B \cdot T}}} \quad (16)$$

Auf diese Weise können Formulierungen und unterschiedliche Trägermaterialien miteinander verglichen werden oder auch Auffälligkeiten in der Chargenreproduzierbarkeit aufgedeckt werden. Leider wird der Parameter ΔG gemäß Gleichung (16) nur aus der Fraktion berechnet, die nach initialem „burst release“ bereits freigesetzt ist (iniB). Diese Fraktion kann variiert werden um eine bessere Regression zu erhalten, wodurch der Wert für ΔG direkt beeinflussbar wird. Für die Festlegung von iniB sollte demnach eine automatische Methode gefunden werden, da

andernfalls diese Eingangsgröße zu empfindlich für weitere Interpretationen ist. An dieser Stelle offenbart sich leider eine Schwachstelle dieses Modells.

Tabelle 26: Parameter der Wirkstofffreisetzung für Freisetzungsexperimente im DR V2 mit kolloidalen Flurbiprofen-haltigen Formulierungen, analysiert nach dem „three-parameter“ Modell

Experiment	iniB	ΔG [J]	k_s [1/h]	k_{off} [1/h]	R^2
PLA NP 1	0,47	$-4,86 \times 10^{-22}$	3,617	0,0221	0,9948
PLA NP 2	0,46	$-6,48 \times 10^{-22}$	1,522	0,0094	0,9981
Eudragit® NP	0,97	$1,41 \times 10^{-20}$	4,639	0,0100	0,9989
PLGA NP	0,94	$1,11 \times 10^{-20}$	2,234	0,0238	0,9926

Alle übrigen Parameter des Modells wurden mittels „*automated curve fitting*“ festgelegt. Der die initiale Phase beschreibende kinetische Parameter k_s schwankte zwischen allen Formulierungen von 1,522 bis 4,639 1/h. Höhere Werte können dabei für einen schneller eintretenden initialen „*burst release*“ sprechen, ohne hierbei das Ausmaß der initialen Freisetzung (iniB) zu berücksichtigen. Wahre Tendenzen können aus dem vorliegenden Datensatz jedoch nicht ausgelesen werden und so bleibt die Notwendigkeit, dieses Modell auf weitere Formulierungen anzuwenden, um für die untersuchten Parameter Größenordnungen und Werte zu erhalten, die Klassifizierungen in beispielsweise schnell oder verzögert freisetzende Produkte zu erlauben. Ähnliches gilt auch für die Dissoziationskonstante k_{off} . Im Rahmen der Bewertung der Äquivalenz zweier Produkte kann es sinnvoll sein, k_{off} nur für diejenigen Produkte direkt zu vergleichen, welche bereits bei der Bewertung von ΔG und k_s als vergleichbar bzw. ähnlich aufgefallen sind. Zwar liegen die k_{off} -Werte der PLA Nanopartikel mit 0,0221 und 0,0094 1/h um mehr als den Faktor 2 auseinander, jedoch ist wie bereits erwähnt zum aktuellen Zeitpunkt nicht klar, wie sensitiv dieser Wert auf Schwankungen in der Formulierungszusammensetzung oder im Freisetzungsgeschehen reagiert.

Alle drei Parameter dieses Modells hängen sehr eng mit der Komposition der Formulierung, mit dem Herstellprozess und auch mit den Gegebenheiten der verwendeten Freisetzungsvorrichtung zusammen. Es besteht dringend der Bedarf, Freisetzungsdaten von kolloidalen Arzneiformen nicht nur zu messen und

darzustellen, sondern diese Daten auch mathematisch aufzuarbeiten und zu interpretieren, wie sich dies für perorale Arzneiformen bereits etabliert hat.

3.7. Wirkstofffreisetzung von mTHPC im A4D

Die Freisetzungsdaten von mTHPC-haltigen Zubereitungen im Dialyseadapter der Durchflusszelle wurden während eines zweiwöchigen Gastaufenthaltes bei SPS Pharma Services (Orleans, Frankreich) erhoben. Auf Grund des zeitlich gesetzten Rahmens konnten nicht alle Medien untersucht werden und die Freisetzungsdauer musste von 24 Stunden auf 18 Stunden herabgesetzt werden, um täglich ein neues Freisetzungsexperiment starten zu können.

3.7.1. Freisetzung von mTHPC aus der Referenzformulierung Foscan in 10% und 50% FBS

Als Referenz für die Freisetzungsuntersuchungen diente auch im Fall der Freisetzungsuntersuchungen im A4D das entsprechend der Marktformulierung hergestellte Foscan. Beim Vergleich der beiden Medien mit 10% und 50% FBS lässt sich kein Unterschied im Freisetzungsverhalten von mTHPC erkennen (Abbildung 30). Dieser Effekt konnte somit für alle Testsysteme, sowohl den Dialysesack, als auch den Dispersion Releaser und den hier untersuchten Dialyseadapter A4D in der Durchflusszelle beobachtet werden.

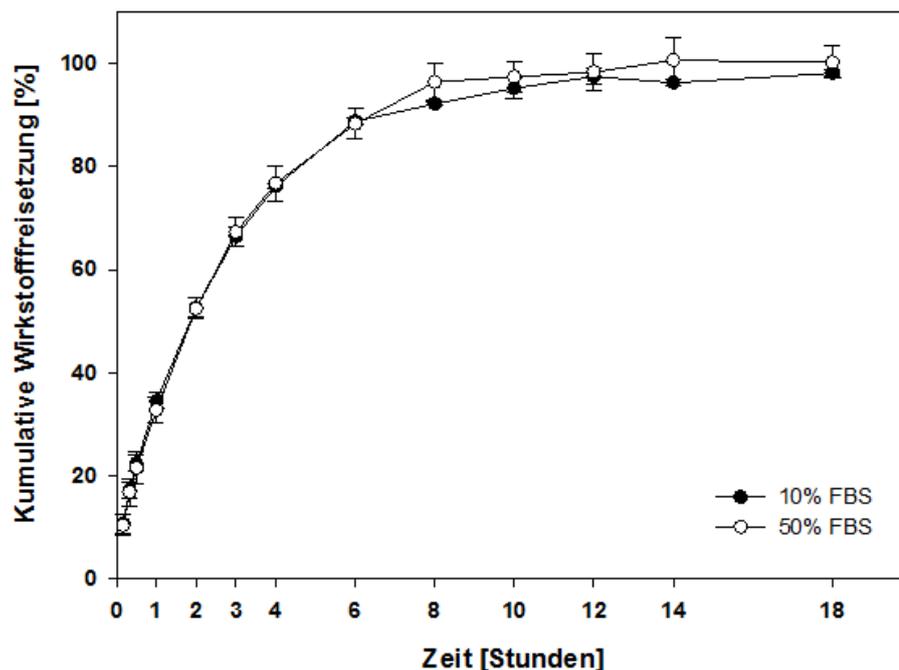


Abbildung 30: Wirkstofffreisetzung von mTHPC aus der Referenzformulierung Foscan im A4D (n=3)

Zum Vergleich der Resultate des A4D mit denen des DR V3 zeigt Abbildung 31 die Freisetzungprofile von Foscan jeweils in 10% und 50% FBS in beiden Apparaturen. Dabei ist zu erkennen, dass die Freisetzung von mTHPC durch eine Dialysemembran aus Celluloseacetat in beiden Apparaturen mit ähnlicher Rate erfolgt, wengleich eine mathematische Berechnung an dieser Stelle nicht stattgefunden hat. Insbesondere in der initialen Phase bis etwa zum Zeitpunkt der Probennahme nach 6 Stunden ist kein Unterschied erkennbar. Im späteren Verlauf wird deutlich, dass sich die Freisetzung von mTHPC mittels A4D einer 100%-igen Freisetzung stärker annähert als im DR V3. So sind zum Zeitpunkt der letzten Probennahme im A4D (nach 18 Stunden) in Medium mit 10% FBS $98,05 \pm 0,59\%$ und in Medium mit 50% FBS $100,18 \pm 3,13\%$ der Wirkstoffmenge freigesetzt worden. Die maximal freigesetzte Wirkstoffmenge am Ende der Freisetzungsversuche im DR V3 (nach 24 Stunden) war mit $95,18 \pm 1,93\%$ in 10% FBS und $92,57 \pm 1,53\%$ in 50% FBS jeweils mit den Werten des A4D vergleichbar. Darüber hinaus belegt der f_2 -Faktor mit Werten über 50 [96], berechnet für den Zeitraum von 0,5 bis 6 Stunden, die Ähnlichkeit der Freisetzungprofile in gleichem Medium.

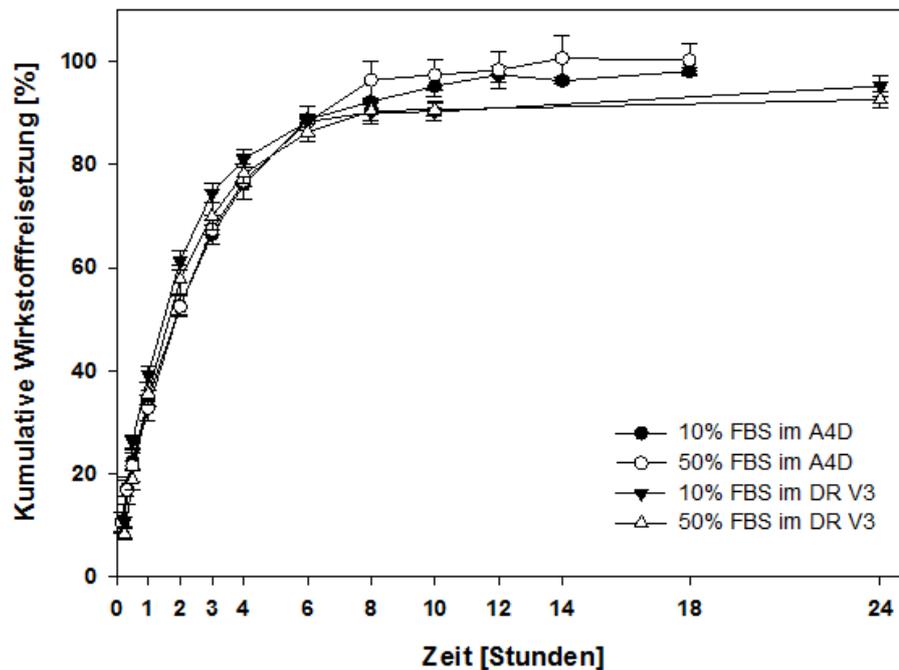


Abbildung 31: Wirkstofffreisetzung von mTHPC aus der Referenzformulierung Foscan im A4D (n=3) und im DR V3 (n=6)

Die Freisetzungsrates könnte im Aufbau der Durchflusszelle sogar durch ein offenes System (open loop) noch weiter forciert werden. Jedoch wurde von diesem Versuchsaufbau in unserem Falle abgesehen, da er zum einen die Vergleichbarkeit beider Apparaturen senkt, und zum anderen die Arzneistoffkonzentration in vielen Proben unterhalb der Quantifizierungsgrenze der HPLC-Analytik läge. Darüber hinaus nimmt der Medienverbrauch in einem offenen Versuchsaufbau der Durchflusszelle deutlich zu, da stets frisches Medium die Probenzelle durchfließt. Zusammenfassend kann jedoch festgehalten werden, dass sich der apparative Unterschied beider Modelle in den Ergebnissen zwar bemerkbar macht, jedoch beide Apparaturen qualitativ ähnlich gute Ergebnisse erzeugen konnten. Dies ist vor allem daher erstaunlich, da die Zellen des A4D im Bereich der Donorkammer Präzipitate aufwiesen. Diese sind womöglich auf eine Inkompatibilität der FBS haltigen Medien mit der Durchflussprozedur bzw. Peristaltik in der Durchflusszelle zurückzuführen. Dieses Phänomen zeigt die Abbildung 32. Handelt es sich bei den Präzipitaten um ausgefallene Serumbestandteile, so kann man nicht mehr von vergleichbaren Bedingungen in den Freisetzungsmedien beider Apparaturen ausgehen.



Abbildung 32: Zellen des A4D nach Beendigung der Freisetzungsuntersuchungen mit erkennbarem Präzipitat

3.7.2. Freisetzung von mTHPC aus der Referenzformulierung Temodextrin in 50% FBS

Der Einfluss des Lösungsmittelgemischs (Propylenglycol und Ethanol) auf die Freisetzung von mTHPC aus der Markt- und Referenzformulierung Foscan wurde kontrolliert. Die lösungsmittelfreie Referenzformulierung Temodextrin wurde daher auf ihr Freisetzungsverhalten hin untersucht. Temodextrin wurde zuvor eigens entwickelt und ist eine in Wasser lösliche lyophilisierte Formulierung von mTHPC. Zur Solubilisierung wurde der für die parenterale Anwendung zugelassene Hilfsstoff Hydroxypropyl- β -cyclodextrin eingesetzt.

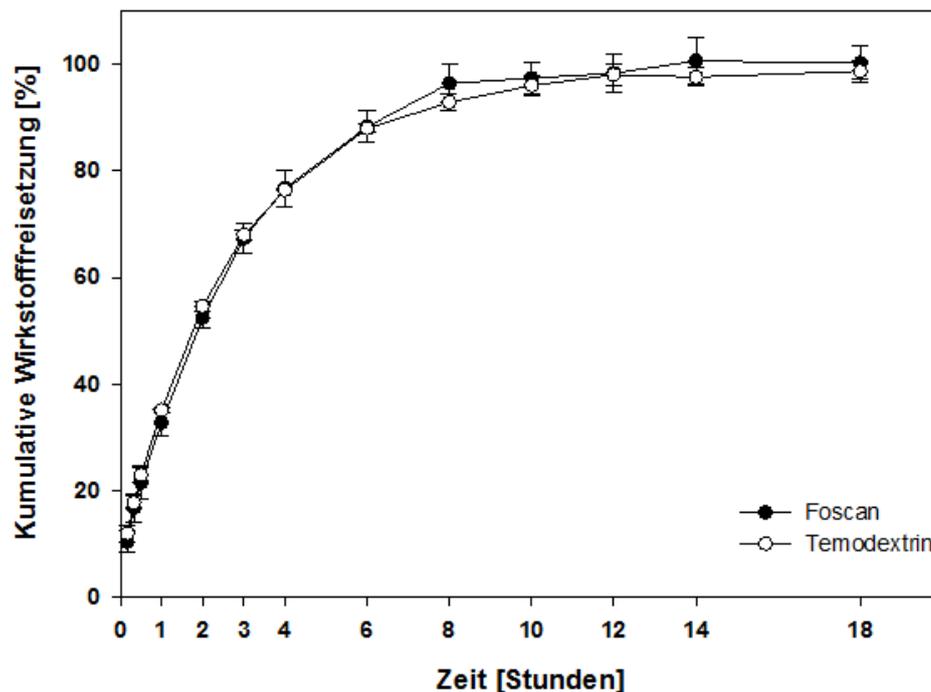


Abbildung 33: Wirkstofffreisetzung von mTHPC aus den Referenzformulierungen Foscan und Temodextrin im A4D in 50% FBS (n=3)

In Abbildung 33 wird deutlich, dass das Freisetzungsprofil beider Referenzformulierungen nahezu identisch ist. Ein Einfluss des Lösungsmittels auf die Membran oder das Permeationsverhalten von mTHPC kann daher als widerlegt angesehen werden. Da die Lösungsmittelkonzentration in der Donorkammer des DR bei Untersuchungen mit Foscan um den Faktor 2 unterhalb der Lösungsmittelkonzentration in der Donorkammer des A4D liegt, kann diese Schlussfolgerung auch auf Ergebnisse mit Foscan im DR V3 übertragen werden.

3.7.3. Freisetzung von mTHPC aus PLGA Nanopartikeln

Für die Freisetzungsuntersuchungen wurden zwei gefriergetrocknete Nanopartikelspezies verwendet, nicht überzogene PLGA Nanopartikel (Charge 5) und mit Chitosan überzogene und quervernetzte PLGA Nanopartikel (Charge 12). Unter Berücksichtigung des Nanopartikelgehaltes und des Zusatzes einer 20%-igen

Trehaloselösung vor Gefriertrocknung ergibt sich nach Redispergieren in 1,101 mL Freisetzungsmedium eine Gesamtkonzentration von 124,078 mg/mL und 234,417 mg/mL für die beiden Partikelspezies (siehe Tabelle 28). Die Arzneistoffkonzentration liegt in beiden Fällen bei 336 µg/mL (Tabelle 28). In der Berechnung der Gesamtkonzentration in mg/mL bleiben die im Plasma gelösten Komponenten unberücksichtigt, da die Berechnung dem Vergleich der Mengen je Dialyseadapter dient und beide Proben in dem gleichen Freisetzungsmedium redispergiert wurden. Wird der hohe Trehaloseanteil in der Formulierung abgezogen, so liegt die Gesamtmenge an Nanopartikeln je Dialyseadapter mit 16,903 mg für die nicht-überzogenen PLGA Nanopartikel und 19,521 mg für die mit Chitosan überzogenen PLGA Nanopartikel deutlich niedriger. Dieser Vereinfachung liegt die Annahme zu Grunde, dass Trehalose auf Grund des niedrigen Molekulargewichts durch die Dialysemembran frei diffundieren kann und somit die Donorkammer entlang des Konzentrationsgradienten verlässt. Ein Zusammenhang zwischen der Partikelmenge im Inneren der Dialysekammer und dem Freisetzungsverhalten von mTHPC konnte im Rahmen dieser Dissertation nicht eindeutig geklärt werden. Es ist möglich, dass zumindest eine bestimmte Größenfraktion der Nanopartikel, der eingesetzte Stabilisator PVA oder das Chitosan einen Einfluss auf die Permeabilität der Membran ausüben.

Tabelle 27: NP-Gehalt und Gefriertrocknung von PLGA Nanopartikeln zur Berechnung der Trockenmasse je Gefriertrocknungsvial

Typ, Charge	mTHPC-Gehalt [µg/mL]	Volumen je Vial, entspr. 370 µg mTHPC [mL]	Trockenmasse je Vial [mg]
Ohne Chitosan-Überzug			
Charge 5	209,06 ±0,73	1,770 mL NP + 0,590 mL Tre	136,610
Chitosan-Überzug + Quervernetzung + Aufreinigung			
Charge 12	104,24 ±1,54	3,549 mL NP + 1,183 mL Tre	258,093

Tabelle 28: Nanopartikelgehalt nach Redispergieren in 1,101 mL FreisetzungsmEDIUM zum Herstellen von Nanopartikelsuspensionen mit einem mTHPC-Gehalt von 336µg/mL

Typ, Charge	NP-Gehalt [mg/mL]	NP-Gehalt nach Redispergieren [mg/mL]	Gesamtkonzentration nach Redispergieren [mg/mL]
Ohne Chitosan-Überzug			
Charge 5	10,514 ±0,251	16,903	124,078
Chitosan-Überzug + Quervernetzung + Aufreinigung			
Charge 12	6,056 ±0,062	19,521	234,417

Die Profile, welche für das Freisetzungsverhalten dieser Partikelspezies bereits mittels DR V1 ermittelt wurden (siehe Abschnitt 3.6.1), wiesen nur geringe Unterschiede in der Freisetzungskinetik auf. Die mittels A4D in der Durchflusszelle ermittelten Freisetzungsprofile zeigen ein ähnliches Verhalten. Zwar zeigt sich im Vergleich zur Referenzformulierung eine verlangsamte Wirkstofffreisetzung im Medium mit 50 % FBS (Abbildung 34), die durch den Überzug aus Chitosan noch verstärkt wird, jedoch zeigt das Freisetzungsverhalten auch im A4D nicht den gewünschten Effekt, mittels dieser Arzneizubereitung eine längerfristige Bindung des Wirkstoffs an seinen kolloidalen Träger gewährleisten zu können.

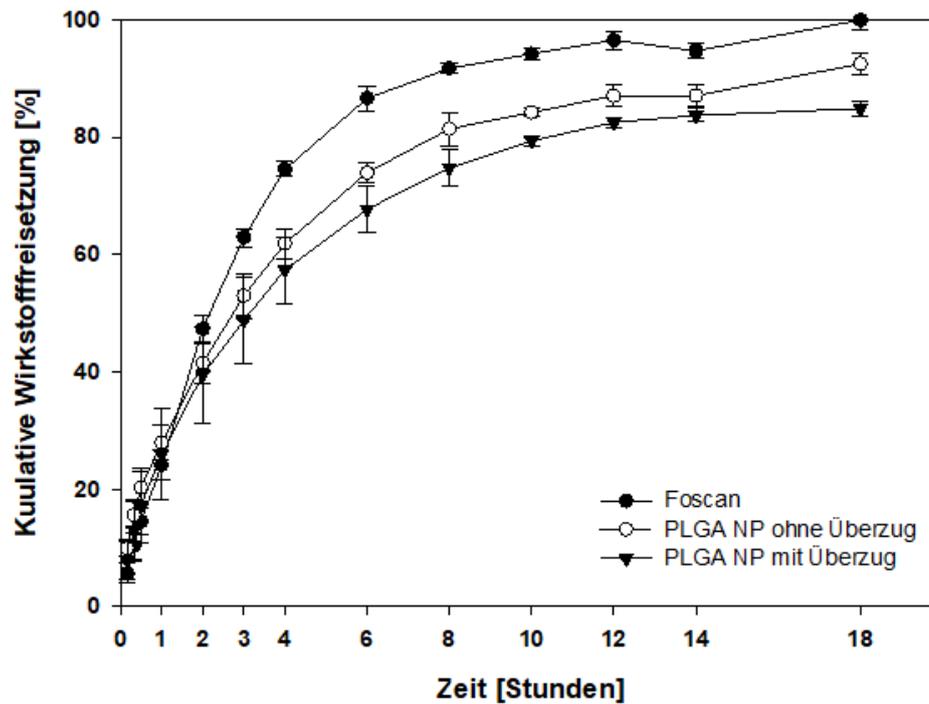


Abbildung 34: Wirkstofffreisetzung von mTHPC aus gefriergetrockneten PLGA Nanopartikeln ohne (Charge 5) und mit Chitosan-Überzug (Charge 12) im A4D in 50% FBS (n=3)

Zu Beginn und im Anschluss an die Freisetzungsexperimente wurden von den untersuchten Nanopartikeln die Partikelgröße, der Polydispersitätsindex sowie das Zetapotential bestimmt. Dazu mussten die Proben für den Transport nach Frankfurt eingefroren werden, da die Labore von SPS Pharma Services in Orleans über kein PCS Gerät verfügten. Insgesamt lässt sich jedoch eine ähnliche Tendenz und Aussage wie für die in Abschnitt 3.6.1 beschriebenen Nanopartikel 140127-A04 #2 und 140127-A04 #3a100B treffen. Die Partikelgröße der PLGA Nanopartikel ohne Überzug bleibt stabil, wohingegen die Partikelgröße der PLGA Nanopartikel mit Chitosan-Überzug jeweils im Laufe des Freisetzungsexperiments abnimmt. Dies deutet darauf hin, dass sich die Chitosanhülle der Partikel mit der Zeit von der Partikeloberfläche ablöst. Parallel dazu sinkt auch der Polydispersitätsindex (siehe Tabelle 29). Eine Verfälschung der Ergebnisse durch den erforderlichen Transport kann für diese Messung nicht ausgeschlossen werden.

Tabelle 29: Partikelgrößenanalytik und Zetapotential vor und nach der Wirkstofffreisetzung im A4D 50% FBS (n=3)

Charge	Partikelgröße [nm]		PDI		Zetapotential [mV]	
	Ø	SD	Ø	SD	Ø	SD
Ohne Chitosan-Überzug						
Charge 5						
t = 0 Stunden	243,27	1,01	0,056	0,029	-5,85	0,91
t = 18 Stunden	242,47	2,08	0,088	0,032	-7,29	0,86
Chitosan-Überzug + Quervernetzung + Aufreinigung						
Charge 12						
t = 0 Stunden	320,53	12,08	0,279	0,052	-13,80	0,59
t = 18 Stunden	253,53	7,29	0,106	0,051	-11,19	1,20

Abschließend kann auch die Wirkstofffreisetzung mittels A4D als eine prinzipiell reproduzierbare und standardisierbare Methode für die Freisetzungsuntersuchung aus kolloidalen Arzneiträgern klassifiziert werden. Je nach Partikelsystem können das Volumen der Donorkammer (1 mL), die fehlende Agitation innerhalb der Donorkammer, sowie die nicht vorhandene Möglichkeit, aus der Donorkammer Proben zu ziehen, zur eingeschränkten Anwendbarkeit für spezifische Arzneiformen und Wirkstoffe führen. Es würde außerdem weitergehender Untersuchungen bedürfen, um zu klären, ob der A4D den Einsatz von komplexen Medien, wie dem hier gewählten Medium mit 50% FBS erlaubt. Die Präzipitate, wie sie in Abbildung 32 zu sehen sind, lassen erahnen, dass sich Wechselwirkungen zwischen der Apparatur und dem Medium negativ auf die Freisetzungsuntersuchungen auswirken können.

4. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte die Entwicklung und Evaluierung einer neuen Apparatur zur Untersuchung der Freisetzungseigenschaften von kolloidalen Arzneiträgern erfolgreich umgesetzt werden. Verschiedene Prototypen und Versionen des Dispersion Releasers konnten entwickelt und mit Hilfe der Werkstatt des Fachbereiches 14 umgesetzt werden. Dabei ermöglicht die letzte Optimierung (Version 3) den Einsatz beider relevanter Dialysemembranen. Sowohl regenerierte Cellulose als auch Celluloseacetat konnten zur Freisetzungsuntersuchung eingesetzt werden. Vorteilhaft ist diese Optionalität vor allem, da auf diese Weise Partikelsysteme und Wirkstoffe mit unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften in der gleichen Apparatur auf das Freigabeverhalten untersucht werden können. Darüber hinaus hat der Dispersion Releaser das Potential, sich im Bereich der Freisetzungsuntersuchungen kolloidaler Arzneiträger über den Arbeitskreis von Prof. Dr. Wacker hinaus zu einem bevorzugten Testsystem zu entwickeln. In diesem speziellen Gebiet der Freisetzungsuntersuchung von kolloidalen Arzneiträgern wie Nanopartikeln oder Liposomen existiert bisher keine Apparatur, die als sogenannter Gold-Standard angesehen werden kann. Untersuchungen mittels der Durchflusszelle, dem A4D oder *Sample & Separate* Methoden im Labormaßstab unterliegen kaum standardisierbaren Bedingungen und diversen Limitierungen. Der Dispersion Releaser ist einfach zu handhaben und mit wenig Aufwand in die Freisetzungsapparatur 2 nach Ph. Eur. einzubauen. Zu den zahlreichen Vorteilen gehören außerdem die Kontrolle der Rührgeschwindigkeit sowie der Temperatur und der mögliche Probenzug in beiden Kompartimenten der Dialysezelle. Würden mehr Freisetzungsuntersuchungen von kolloidalen Arzneiträgern mit der gleichen, im besten Falle standardisierten, Apparatur durchgeführt, so würde dies die Vergleichbarkeit der Resultate erheblich verbessern.

Die präparierten Modellarzneiformen der beiden Arzneistoffe mTHPC und Flurbiprofen konnten die Funktionalität des Dispersion Releasers mittels der erhobenen Freisetzungsprofile belegen. Es konnten sowohl schnell als auch langsamer freisetzende kolloidale Formulierungen produziert und identifiziert werden. Als Standard-Freisetzungsmedium diente ein 10 mM Phosphatpuffer versetzt mit Natrium- und Kaliumchlorid bei pH 7,4. Dieser im Hinblick auf pH-Wert, Osmolalität und Pufferkapazität dem Blut angepasste Puffer lieferte reproduzierbare Freisetzungsprofile für alle untersuchten Partikelsysteme. Der Zusatz von

Plasmaproteinen erfolge durch Zufügen von FBS zu diesem Standardpuffersystem oder durch Verwendung des im Ph. Eur. gelisteten Phosphatpuffers pH 7,2 mit Rinderalbumin. Der Effekt der im Plasma natürlicherweise enthaltenen Komponenten, insbesondere der Plasmaproteine, auf das Freisetzungsprofil zeigt in dieser Arbeit, dass -wie erwartet- die Freisetzungseigenschaften in komplexen, bzw. physiologischen Medien deutlich von denen in einfachen Puffersystemen abweichen können. Die Anwesenheit von Plasmaproteinen führte zu einer veränderten Freisetzungsrates, sowohl im Falle von Flurbiprofen als auch im Falle von mTHPC. In Medien mit humanem Plasma wurden im Rahmen dieser Arbeit keine Freisetzungsuntersuchungen durchgeführt. Es wurde jedoch diskutiert, dass in einzelnen spezifischen Fragestellungen, beispielsweise in der Formulierungsentwicklung, die Verwendung humaner Proben als vorteilhaft erachtet wird. Für breit angesetzte Freisetzungsuntersuchungen ist die Verwendung von humanem Plasma zunächst jedoch nicht zu empfehlen. Künftige Freisetzungsuntersuchungen in Medien mit humanem Plasma können aber für die Bewertung der Vergleichbarkeit der Resultate in Medien mit humanen und tierischen Komponenten sinnvoll sein. Für mTHPC konnte außerdem der Zusatz von lösungsvermittelndem Methyl- β -cyclodextrin zum Freisetzungsmedium etabliert werden. Gegenüber üblicherweise eingesetzten Tensiden verändert dieses cyclische Zuckermolekül die Oberflächenspannung des Mediums und damit die Benetzbarkeit der Partikel nicht.

Die mittels Dispersion Releaser und Dialysesack erhobenen Freisetzungsdaten des Wirkstoffes Flurbiprofen wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Li Kirsamer einer mathematischen Auswertung unterzogen. Auf diese Weise konnte zunächst das Freisetzungsprofil beider Kompartimente der Dialyse dargestellt werden, wodurch weitere Erkenntnisse der Qualität des kolloidalen Trägers und seiner Eignung für den jeweiligen Arzneistoff abgeleitet werden können. Die Auswertung an Hand dieses Modells berücksichtigt zwar die Fraktion des freigesetzten Wirkstoffes in beiden Kompartimenten, ermittelt jedoch keine theoretische Freisetzungsrates, welche ohne Membrankinetik messbar wäre. Dies wäre in der Auswertung von Freisetzungsdaten ebenfalls von Interesse, konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht werden. Berechnungen wie diese können in weiterführenden Arbeiten möglicherweise dazu dienen, *in vitro* Freisetzungsdaten mit Plasmaprofilen zu korrelieren. So könnte

das für perorale Arzneiformen etablierte „*PBPK modelling*“ in der Zukunft auch die Prognose des *in vivo* Verhaltens kolloidaler Arzneiformen erlauben.

In nachfolgenden Untersuchungen sollte der Dispersion Releaser außerdem für die Freisetzungstestung anderer kolloidaler Arzneiformen, wie beispielsweise Liposomen oder polymere Mizellen, eingesetzt werden, um die Breite seiner prognostizierten Anwendbarkeit bestenfalls belegen zu können. Auch längere Versuchszeiten über mehrere Tage oder höhere Temperaturen während des Freisetzungstests, wie sie für retardierte Arzneiformen üblich sind, gilt es in der Zukunft zu eruieren.

Mit dem Erwerb der Rechte an dem Dispersion Releaser durch die Firma Pharma Test Apparatebau AG im Jahr 2016 wurde der Weg für eine mögliche breite und auch kommerzielle Nutzung der neuartigen Apparatur eingeleitet. Diese Transaktion und die andauernde Kooperation zwischen der Pharma Test Apparatebau AG und dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Wacker soll die erfolgreiche Beantwortung der Fragestellungen innerhalb der vorliegenden Arbeit mit dem Titel „Entwicklung einer Apparatur zur *in vitro* Testung der Wirkstofffreisetzung aus kolloidalen Arzneistoffträgern“ hervorheben.

5. Anhang

5.1. Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
BSA	Bovines Serumalbumin
CAR	„ <i>Compartment Accumulation Ratio</i> “
DB	Dialysis bag, Dialysesack
DR V1/V2/V3	Dispersion Releaser Version 1 / 2 / 3
FBS	Fetales Bovines Serum
HP	Humanes Plasma
iniB	Initialer „ <i>burst release</i> “
MW	Molekulargewicht
MWCO	Molekulargewichtsausschluss
mTHPC	5,10,15,20-Tetrakis(3-hydroxyphenyl)-chlorin, Temoporfin
NP	Nanopartikel
„ <i>PBPK modelling</i> “	„ <i>physiologically based pharmacokinetic modelling</i> “
PBS	Phosphatpuffer
PDI	Polydispersitätsindex
PenStrep	Penicillin Streptomycin
Ph. Eur.	Europäisches Arzneibuch
PLA	Polymilchsäure
PLGA	Polymilch-co-glycolsäure
PVA	Polyvinylalkohol

Rcf	Radien pro Minute
reR	Relative release
„rpt“	„reciprocal powered time“
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SEC	Größenausschlusschromatographie
TFA	Trifluoressigsäure
Upm	Umdrehungen pro Minute

5.2. Literaturverzeichnis

- [1] S. D'Souza, A Review of *In Vitro* Drug Release Test Methods for Nano-Sized Dosage Forms, *Advances in Pharmaceutics*, 2014 (2014) 12 Pages.
- [2] M. M. A. Abdel-Mottaleb, A. Lamprecht, Standardized in vitro drug release test for colloidal drug carriers using modified USP dissolution apparatus I, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 37 (2011) 178-184.
- [3] Y. Gao, J. Zuo, N. Bou-Chacra, J. Pinto Tde, S. D. Clas, R. B. Walker, R. Lobenberg, In vitro release kinetics of antituberculosis drugs from nanoparticles assessed using a modified dissolution apparatus, *BioMed Research International*, 2013 (2013) 9 Pages.
- [4] A. Sankhyan, P. K. Pawar, Metformin loaded non-ionic surfactant vesicles: optimization of formulation, effect of process variables and characterization, *Daru Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21 (2013) 7 Pages.
- [5] U. Bhardwaj, D. J. Burgess, A novel USP apparatus 4 based release testing method for dispersed systems, *International Journal of Pharmaceutics*, 388 (2010) 287-294.
- [6] D. Burgess, U. Bhardwaj, Dialysis adapter cell and method of release testing of a disperse dosage form, USPTO, US8318506 (B2) (03.02.2010).
- [7] Espacenet, Legal status of US8318506 (B2), <https://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/inpadoc?CC=US&NR=8318506B2&KC=B2&FT=D&ND=&date=20121127&DB=&locale=#>, (accessed 20.08.2017).
- [8] M. Wacker, C. Janas, Dialysis cell for an in vitro release test apparatus, use of the dialysis cell and in-vitro release test apparatus, EPO, EP 3047267 (A1) (17.09.2014).
- [9] Europäische Kommission, Commission Recommendation of 18 October 2011 on the definition of nonmaterial (2011/696/EU), Brüssel, 2011.
- [10] Office of the commissioner FDA, Guidance for Industry: Considering whether an FDA-regulated product involves the application of nanotechnology, Silver Spring, US, 2014.
- [11] A. Zensi, D. Begley, C. Pontikis, C. Legros, L. Mihoreanu, S. Wagner, C. Buchel, H. von Briesen, J. Kreuter, Albumin nanoparticles targeted with Apo E enter the CNS by transcytosis and are delivered to neurones, *Journal of Controlled Release*, 137 (2009) 78-86.
- [12] S. Wohlfart, A. S. Khalansky, S. Gelperina, D. Begley, J. Kreuter, Kinetics of transport of doxorubicin bound to nanoparticles across the blood-brain barrier, *Journal of Controlled Release*, 154 (2011) 103-107.

- [13] A. A. Gabizon, Stealth liposomes and tumor targeting: one step further in the quest for the magic bullet, *Clinical Cancer Research*, 7 (2001) 223-225.
- [14] Celgene, Fachinformation: Abraxane 2 mg/mL (Pulver zur Herstellung einer Infusionssuspension), Fachinfo-Service, (Stand 2016).
- [15] Janssen-Cilag, Fachinformation: Caelyx 2 mg/mL (Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung), Fachinfo-Service, (Stand 2017).
- [16] Gilead, Fachinformation: AmBisome 50 mg (Pulver zur Herstellung einer Infusionslösung), Fachinfo-Service, ((Stand 2016)).
- [17] Mylan, Fachinformation: Lipidil 145 One® 145 mg Filmtabletten, Fachinfo-Service, ((Stand 2017)).
- [18] R. H. Mueller, K. Maeder, S. Gohla, Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50 (2000) 161-177.
- [19] M. M. A. Abdel-Mottaleb, D. Neumann, A. Lamprecht, In vitro drug release mechanism from lipid nanocapsules (LNC), *International Journal of Pharmaceutics*, 390 (2010) 208-213.
- [20] Y. Lu, K. Park, Polymeric micelles and alternative nanonized delivery vehicles for poorly soluble drugs, *International Journal of Pharmaceutics*, 453 (2013) 198-214.
- [21] S. Ashton, Y. H. Song, J. Nolan, E. Cadogan, J. Murray, R. Odedra, J. Foster, P. A. Hall, S. Low, P. Taylor, R. Ellston, U. M. Polanska, J. Wilson, C. Howes, A. Smith, R. J. Goodwin, J. G. Swales, N. Strittmatter, Z. Takats, A. Nilsson, P. Andren, D. Trueman, M. Walker, C. L. Reimer, G. Troiano, D. Parsons, D. De Witt, M. Ashford, J. Hrkach, S. Zale, P. J. Jewsbury, S. T. Barry, Aurora kinase inhibitor nanoparticles target tumors with favorable therapeutic index in vivo, *Science Translational Medicine*, 8 (2016) 325ra317.
- [22] J. M. Anderson, M. S. Shive, Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 28 (1997) 5-24.
- [23] G. Mittal, D. K. Sahana, V. Bhardwaj, M. N. Ravi Kumar, Estradiol loaded PLGA nanoparticles for oral administration: effect of polymer molecular weight and copolymer composition on release behavior in vitro and in vivo, *Journal of Controlled Release*, 119 (2007) 77-85.
- [24] C. Weber, C. Coester, J. Kreuter, K. Langer, Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 194 (2000) 91-102.
- [25] S. Wagner, F. Rothweiler, M. G. Anhorn, D. Sauer, I. Riemann, E. C. Weiss, A. Katsen-Globa, M. Michaelis, J. Cinatl, Jr., D. Schwartz, J. Kreuter, H. von Briesen, K. Langer, Enhanced drug targeting by attachment of an anti alphav integrin antibody to doxorubicin loaded human serum albumin nanoparticles, *Biomaterials*, 31 (2010) 2388-2398.
- [26] I. Rosenberger, A. Strauss, S. Dobiasch, C. Weis, S. Szanyi, L. Gil-Iceta, E. Alonso, M. Gonzalez Esparza, V. Gomez-Vallejo, B. Szczupak, S. Plaza-Garcia, S. Mirzaei, L. L. Israel, S. Bianchessi, E. Scanziani, J. P. Lellouche, P. Knoll, J. Werner, K. Felix, L. Grenacher, T. Reese, J. Kreuter, M. Jimenez-Gonzalez, Targeted diagnostic magnetic nanoparticles for medical imaging of pancreatic cancer, *Journal of Controlled Release*, 214 (2015) 76-84.
- [27] M. G. Anhorn, S. Wagner, J. Kreuter, K. Langer, H. von Briesen, Specific targeting of HER2 overexpressing breast cancer cells with doxorubicin-loaded trastuzumab-modified human serum albumin nanoparticles, *Bioconjugate Chemistry*, 19 (2008) 2321-2331.
- [28] S. Gelperina, O. Maksimenko, A. Khalansky, L. Vanchugova, E. Shipulo, K. Abbasova, R. Berdiev, S. Wohlfart, N. Chepurnova, J. Kreuter, Drug delivery to the brain using surfactant-coated poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: influence of the formulation parameters, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 74 (2010) 157-163.
- [29] K. Langer, M. G. Anhorn, I. Steinhäuser, S. Dreis, D. Celebi, N. Schrickel, S. Faust, V. Vogel, Human serum albumin (HSA) nanoparticles: reproducibility of preparation process and kinetics of enzymatic degradation, *International Journal of Pharmaceutics*, 347 (2008) 109-117.
- [30] S. Beyer, A. Moosmann, A. S. Kahnt, T. Ulshofer, M. J. Parnham, N. Ferreiros, S. Wagner, M. G. Wacker, Drug Release and Targeting: the Versatility of Polymethacrylate Nanoparticles for Peroral Administration Revealed by Using an Optimized In Vitro-Toolbox, *Pharmaceutical Research*, 32 (2015) 3986-3998.

- [31] K. Loew, T. Knobloch, S. Wagner, A. Wiehe, A. Engel, K. Langer, H. Von Briesen, Comparison of intracellular accumulation and cytotoxicity of free mTHPC and mTHPC-loaded PLGA nanoparticles in human colon carcinoma cells, *Nanotechnology*, 22 (2011) 13 Pages.
- [32] J. Matsumoto, Y. Nakada, K. Sakurai, T. Nakamura, Y. Takahashi, Preparation of nanoparticles consisted of poly(L-lactide)-poly(ethylene glycol)-poly(L-lactide) and their evaluation in vitro, *International Journal of Pharmaceutics*, 185 (1999) 93-101.
- [33] M. Villa Nova, C. Janas, M. Schmidt, T. Ulshoefer, S. Graefe, S. Schiffmann, N. de Bruin, A. Wiehe, V. Albrecht, M. J. Parnham, M. L. Bruschi, M. G. Wacker, Nanocarriers for photodynamic therapy-rational formulation design and medium-scale manufacture, *International Journal of Pharmaceutics*, 491 (2015) 250-260.
- [34] F. Danhier, E. Ansorena, J. M. Silva, R. Coco, A. Le Breton, V. Preat, PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications, *Journal of Controlled Release*, 161 (2012) 505-522.
- [35] D. Klose, F. Siepmann, K. Elkhamz, J. Siepmann, PLGA-based drug delivery systems: Importance of the type of drug and device geometry, *International Journal of Pharmaceutics*, 354 (2008) 95-103.
- [36] C. Wischke, S. P. Schwendeman, Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 364 (2008) 298-327.
- [37] Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Guidance for Industry: Liposome Drug Products (Draft Guidance), U.S. Department of Health and Human Services, Silver Spring, US, 2015.
- [38] B. C. Clark, P. A. Dickinson, I. T. Pyrah, In Vitro / In Vivo Release from Injectable Dispersed Systems, in: D.J. Burgess (Ed.) *Injectable dispersed systems: Formulation Processing, and Performance*, Taylor & Francis, Boca Raton, US, 2005, pp. 125-157.
- [39] K. M. Tyner, P. Zou, X. Yang, H. Zhang, C. N. Cruz, S. L. Lee, Product quality for nanomaterials: Current U.S. experience and perspective, *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*, 7 (2015) 640-654.
- [40] B. S. Zolnik, N. Sadrieh, Regulatory perspective on the importance of ADME assessment of nanoscale material containing drugs, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61 (2009) 422-427.
- [41] Inc Spectrum Laboratories, Laboratory Dialysis: FAQ's, <http://www.spectrumlabs.com/lit/DialysisFAQ.pdf>, 2008 (accessed November 9).
- [42] C. Berger, C. Dohmen, M. H. Maurer, R. Graf, S. Schwab, Zerebrale Mikrodialyse beim Schlaganfall, *Der Nervenarzt*, 75 (2004) 113-123.
- [43] T. M. Schwarzkopf, K. A. Koch, J. Klein, Neurodegeneration after transient brain ischemia in aged mice: beneficial effects of bilobalide, *Brain Research*, 1529 (2013) 178-187.
- [44] S. Hansmann, A. Darwich, A. Margolskee, L. Aarons, J. Dressman, Forecasting oral absorption across biopharmaceutics classification system classes with physiologically based pharmacokinetic models, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 68 (2016) 1501-1515.
- [45] Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Guidance for Industry: Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms, U.S. Department of Health and Human Services, Silver Spring, US, 1997.
- [46] D. Heng, D. J. Cutler, H. K. Chan, J. Yun, J. A. Raper, What is a suitable dissolution method for drug nanoparticles?, *Pharmaceutical Research*, 25 (2008) 1696-1701.
- [47] D. F. de Andrade, C. Zuglianello, A. R. Pohlmann, S. S. Guterres, R. C. Beck, Assessing the In Vitro Drug Release from Lipid-Core Nanocapsules: a New Strategy Combining Dialysis Sac and a Continuous-Flow System, *AAPS PharmSciTech*, 16 (2015) 1409-1417.
- [48] U. Bhardwaj, D. J. Burgess, Physicochemical properties of extruded and non-extruded liposomes containing the hydrophobic drug dexamethasone, *International Journal of Pharmaceutics*, 388 (2010) 181-189.
- [49] C. Gido, P. Langguth, J. Kreuter, G. Winter, H. Woog, E. Mutschler, Conventional Versus Novel Conditions for the in-Vitro Dissolution Testing of Parenteral Slow-Release Formulations - Application to Doxepin Parenteral Dosage Forms, *Pharmazie*, 48 (1993) 764-769.
- [50] J. Shen, D. J. Burgess, In vitro dissolution testing strategies for nanoparticulate drug delivery systems: recent developments and challenges, *Drug Delivery and Translational Research*, 3 (2013) 409-415.

- [51] C. Janas, Z. Mostaphaoui, L. Schmiederer, J. Bauer, M.G. Wacker, Novel polymeric micelles for drug delivery: Material characterization and formulation screening, *International Journal of Pharmaceutics*, 509 (2016) 197-207.
- [52] S. Kumar, X. M. Xu, R. Gokhale, D. J. Burgess, Formulation parameters of crystalline nanosuspensions on spray drying processing: A DoE approach, *International Journal of Pharmaceutics*, 464 (2014) 34-45.
- [53] N. Chidambaram, D. J. Burgess, A novel in vitro release method for submicron sized dispersed systems, *AAPS PharmSci*, 1 (1999) 32-40.
- [54] J. M. Morais, D. J. Burgess, In vitro release testing methods for vitamin E nanoemulsions, *International Journal of Pharmaceutics*, 475 (2014) 393-400.
- [55] Z. M. Gao, B. Westenberger, Dissolution Testing of Acetaminophen Suspension Using Dialysis Adapter in Flow-Through Apparatus: A Technical Note, *AAPS PharmSciTech*, 13 (2012) 944-948.
- [56] S. S. D'Souza, P. P. DeLuca, Methods to assess in vitro drug release from injectable polymeric particulate systems, *Pharmaceutical Research*, 23 (2006) 460-474.
- [57] R. Gref, M. Luck, P. Quellec, M. Marchand, E. Dellacherie, S. Harnisch, T. Blunk, R. H. Muller, 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 18 (2000) 301-313.
- [58] M. Luck, B. R. Paulke, W. Schroder, T. Blunk, R. H. Muller, Analysis of plasma protein adsorption on polymeric nanoparticles with different surface characteristics, *Journal of Biomedical Materials Research*, 39 (1998) 478-485.
- [59] K. Sempf, T. Arrey, S. Gelperina, T. Schorge, B. Meyer, M. Karas, J. Kreuter, Adsorption of plasma proteins on uncoated PLGA nanoparticles, *Eur J Pharm Biopharm*, 85 (2013) 53-60.
- [60] L. Chronopoulou, M. Massimi, M. F. Giardi, C. Cametti, L. C. Devirgiliis, M. Dentini, C. Palocci, Chitosan-coated PLGA nanoparticles: a sustained drug release strategy for cell cultures, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 103 (2013) 310-317.
- [61] B. B. Jiang, L. Hu, C. Y. Gao, J. C. Shen, Ibuprofen-loaded nanoparticles prepared by a co-precipitation method and their release properties, *International Journal of Pharmaceutics*, 304 (2005) 220-230.
- [62] C. Rosado, C. Silva, C. P. Reis, Hydrocortisone-loaded poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for atopic dermatitis treatment, *Pharmaceutical Development and Technology*, 18 (2013) 710-718.
- [63] S. Meister, I. Zlatev, J. Stab, D. Docter, S. Baches, R. H. Stauber, M. Deutsch, R. Schmidt, S. Ropele, M. Windisch, K. Langer, S. Wagner, H. von Briesen, S. Weggen, C. U. Pietrzik, Nanoparticulate flurbiprofen reduces amyloid-beta(42) generation in an in vitro blood-brain barrier model, *Alzheimers Research & Therapy*, 5 (2013) 12 pages.
- [64] J. V. Andhariya, S. Choi, Y. Wang, Y. Zou, D. J. Burgess, J. Shen, Accelerated in vitro release testing method for naltrexone loaded PLGA microspheres, *International Journal of Pharmaceutics*, 520 (2017) 79-85.
- [65] B. Sterner, M. Harms, M. Weigandt, M. Windbergs, C. M. Lehr, Crystal suspensions of poorly soluble peptides for intra-articular application: A novel approach for biorelevant assessment of their in vitro release, *International Journal of Pharmaceutics*, 461 (2014) 46-53.
- [66] L. Xie, S. Beyer, V. Vogel, M. G. Wacker, W. Maentele, Assessing the drug release from nanoparticles: Overcoming the shortcomings of dialysis by using novel optical techniques and a mathematical model, *International Journal of Pharmaceutics*, 488 (2015) 108-119.
- [67] A. Fuchs, M. Leigh, B. Kloefer, J. B. Dressman, Advances in the design of fasted state simulating intestinal fluids: FaSSIF-V3, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 94 (2015) 229-240.
- [68] E. Galia, E. Nicolaidis, D. Horter, R. Lobenberg, C. Reppas, J. B. Dressman, Evaluation of various dissolution media for predicting in vivo performance of class I and II drugs, *Pharmaceutical Research*, 15 (1998) 698-705.
- [69] E. Jantratid, N. Janssen, C. Reppas, J. B. Dressman, Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: an update, *Pharmaceutical Research*, 25 (2008) 1663-1676.

- [70] M. Kastellorizios, J. Shen, D. Burgess, Biorelevant In Vitro Release Testing Strategies for Liposome Formulations, CRS Indian Chapter Newsletter, (January 2013) 9-16.
- [71] X. M. Xu, M. A. Khan, D. J. Burgess, A two-stage reverse dialysis in vitro dissolution testing method for passive targeted liposomes, *International Journal of Pharmaceutics*, 426 (2012) 211-218.
- [72] L. Mora, K. Y. Chumbimuni-Torres, C. Clawson, L. Hernandez, L. Zhang, J. Wang, Real-time electrochemical monitoring of drug release from therapeutic nanoparticles, *Journal of Controlled Release*, 140 (2009) 69-73.
- [73] D. Biswas, M. Halquist, Using Biorelevant in vitro models testing to characterize release of non oral dosage forms as another tool for safety, *Journal of Pharmacovigilance*, 4 (2016) 1-2.
- [74] M. Barzegar-Jalali, K. Adibkia, H. Valizadeh, M. R. S. Shadbad, A. Nokhodchi, Y. Omid, G. Mohammadi, S. H. Nezhadi, M. Hasan, Kinetic analysis of drug release from nanoparticles, *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 11 (2008) 167-177.
- [75] Like Zeng, Lingling An, Xiaoyi Wu, Modeling Drug-Carrier Interaction in the Drug Release from Nanocarriers, *Journal of Drug Delivery*, 2011 (2011) 15 pages.
- [76] Wikipedia, Temoporfin, <https://de.wikipedia.org/wiki/Temoporfin>, 2017 (accessed 11.10.2017).
- [77] Martindale: The Complete Drug Reference, 38th ed., A. Brayfield, London, Pharmaceutical Press (2014).
- [78] Wikipedia, Flurbiprofen, <https://de.wikipedia.org/wiki/Flurbiprofen>, 2016 (accessed 11.10.2017).
- [79] Drugbank, Flurbiprofen, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00712>, 2017 (accessed 11.10.2017).
- [80] Martindale, thirty-sixth ed., Sean C. Sweetman, London, Pharmaceutical Press (2009).
- [81] K. Schmitz, N. de Bruin, P. Bishay, J. Mannich, A. Haussler, C. Altmann, N. Ferreiros, J. Lotsch, A. Ultsch, M. J. Parnham, G. Geisslinger, I. Tegeder, R-flurbiprofen attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice, *EMBO Molecular Medicine*, 6 (2014) 1398-1422.
- [82] P. Saarinen-Savolainen, T. Jarvinen, H. Taipale, A. Urtti, Method for evaluating drug release from liposomes in sink conditions, *International Journal of Pharmaceutics*, 159 (1997) 27-33.
- [83] EDQM European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, *European Pharmacopeia*, 2014.
- [84] Y. Wang, P. Li, L. Kong, Chitosan-modified PLGA nanoparticles with versatile surface for improved drug delivery, *AAPS PharmSciTech*, 14 (2013) 585-592.
- [85] I. Rosenberger, C. Schmithals, J. Vandooren, S. Bianchessi, P. Milani, E. Locatelli, L. L. Israel, F. Hubner, M. Matteoli, J. P. Lellouche, M. C. Franchini, L. Passoni, E. Scanziani, G. Opdenakker, A. Piiper, J. Kreuter, Physico-chemical and toxicological characterization of iron-containing albumin nanoparticles as platforms for medical imaging, *Journal of Controlled Release*, 194 (2014) 130-137.
- [86] Center for Drug Evaluation and Research (CDER), *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation (Draft Guidance)*, U.S. Department of Health and Human Services, Silver Spring, US, 2013.
- [87] Center for Drug Evaluation and Research (CDER), *Guidance for Industry: Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics*, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Silver Spring, US, 2015.
- [88] United States Pharmacopeial Convention Council of Experts, *United States Pharmacopeia 35, <1092> The dissolution procedure: Development and validation*, United Book Press, Inc., Baltimore, MD, 2012.
- [89] Serva Electrophoresis, Serva Dialysis Tubing, http://www.serva.de/www_root/documents/Dialysis%20Tubing.pdf, (accessed 12.10.2017).
- [90] M. M. Nounou, L. K. El-Khordagui, N. A. Khalafallah, S. A. Khalil, In vitro release of hydrophilic and hydrophobic drugs from liposomal dispersions and gels, *Acta Pharmaceutica*, 56 (2006) 311-324.
- [91] J. B. Dressman, R. R. Berardi, G. H. Elta, T. M. Gray, P. A. Montgomery, H. S. Lau, K. L. Pelekoudas, G. J. Szpunar, J. G. Wagner, Absorption of flurbiprofen in the fed and fasted states, *Pharmaceutical Research*, 9 (1992) 901-907.
- [92] V. Reshetov, V. Zorin, A. Siupa, M-A. D'Hallewin, F. Guillemin, L. Bezdetsnaya, Interaction of Liposomal Formulations of Meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (Temoporfin) with Serum Proteins: Protein Binding and Liposome Destruction, *Photochemistry and Photobiology*, 88 (2012) 1256-1264.

[93] M-C. Desroches, A. Kasselouri, O. Bourdon, Chaminade P., J. Blais, P. Prognon, A direct sensitized fluorimetric determination of 5,10,15,20-tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin [m-THPC (Foscan)] in human plasma using a cyclodextrin inclusion complex, *The Analyst*, 126 (2001) 923-927.

[94] A. Noyes, W. Whitney, The rate of solution of solid substances in their own solutions, *Journal of the American Chemical Society*, 19 (1897) 930-934.

[95] Y. Shono, E. Jantratid, F. Kesisoglou, C. Reppas, J. B. Dressman, Forecasting in vivo oral absorption and food effect of micronized and nanosized aprepitant formulations in humans, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 76 (2010) 95-104.

[96] Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Guidance for Industry: Immediate Release Solid Oral Dosage Forms, Scale-Up and Postapproval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Controls, In Vitro Dissolution Testing, and In Vivo Bioequivalence Documentation, Silver Spring, US, 1995.

5.3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Dialysesack modifiziert nach Kumar et al., verwendet im Rahmen der Doktorarbeit mit Genehmigung des Elsevier-Verlages, Originalbeschriftung: „Fig. 1. Sotax® USP II adapted to hold the dialysis sacs. Top part of each vessel is attached with the plastic adapter to hold the dialysis sacs.“ [52]	22
Abbildung 2: A4D in der Durchflussszelle nach Bhardwaj & Burgess, verwendet im Rahmen der Doktorarbeit mit Genehmigung des Elsevier-Verlages, Originalbeschriftung: „Fig. 1. (A) Schematic of the dialysis adapter design. (Left) the front of the dialysis adapter, (middle) top and bottom parts, (right) adapter with dialysis membrane sealed with O-rings. (B) The placement of the adapter in USP apparatus 4 [5].“	24
Abbildung 3: Durchflussapparatur nach De Andrade et al., verwendet im Rahmen der Doktorarbeit mit Genehmigung des Springer Nature-Verlages, Originalbeschriftung: „Fig. 1. Design of the proposed release device: 1 rubber seals, 2 glass lid, 3 release medium outlet, 4 release medium inlet, and 5 release device“ [47]	25
Abbildung 4: Modifizierte Drehkörbchen-Apparatur nach Abdel-Mottaleb et al., verwendet im Rahmen der Doktorarbeit mit Genehmigung von Taylor & Francis, Originalbeschriftung: „Figure 1. Design of the glass baskets (right) compared to conventional baskets (left).“ [2]	25
Abbildung 5: Strukturformel von mTHPC [76]	31
Abbildung 6: Strukturformel von racemischem Flurbiprofen [78]	32
Abbildung 7: Darstellung der Wirkstofffreisetzung mittels Dialysesack im Minivessel mit Minipaddle, Dialysiermembran aus regenerierter Cellulose.....	56

Abbildung 8: DR V1 im Minivessel der Firma Erweka	59
Abbildung 9: DR V2, Montage der Dialysemembran und Verschluss mittels O-Ringen (bereitgestellt von AG Wacker, Institut für Pharmazeutische Technologie, Goethe Universität, Frankfurt)	60
Abbildung 10: DR V2 im Freisetzungstester Erweka DT 700	61
Abbildung 11: Durchflusszelle mit A4D.....	66
Abbildung 12: Befüllung der A4D und Position in der Durchflusszelle	67
Abbildung 13: Wirkstofffreisetzung von mTHPC im Dialysesack, Dialysemembran aus (A) regenerierter Cellulose und (B) Celluloseacetat (n=3)	92
Abbildung 14: Permeation von mTHPC aus der Referenzformulierung Foscan im DR V1 in Freisetzungsmitteln mit 0%, 10%, 50% und 90% FBS (n=3).....	94
Abbildung 15: Permeation von mTHPC aus der Referenzformulierung Foscan im DR V1 in Freisetzungsmitteln mit 0%, 10%, 50% und 90% FBS (n=3). Vergrößerte Darstellung der initialen Phase.	95
Abbildung 16: Permeation von Flurbiprofen im DR V2 bei Standardbedingungen und 50 °C	98
Abbildung 17: Permeation von Flurbiprofen im DR V2 bei Standardbedingungen und 50 Upm	99
Abbildung 18: Permeation von Flurbiprofen im DR V2 bei Standardbedingungen und in Freisetzungsmitteln mit 1 g/L und 10 g/L BSA.....	101
Abbildung 19: Permeation von Flurbiprofen im DR V2, 400 µg vs. 1200 µg pro Zelle	102
Abbildung 20: Permeation von mTHPC aus der Referenzformulierung Foscan im DR V3 in Freisetzungsmitteln mit 0%, 10%, 50% und 90% FBS (n=6).....	103
Abbildung 21: Durchschnittliche Freisetzung von BSA im DR V2 (n=6)	105
Abbildung 22: Freisetzung von BSA im DR V2, Darstellung der einzelnen Zellen..	106
Abbildung 23. Permeationsverhalten von BSA im DR V3, mit einer Dialysemembran aus Celluloseacetat (n=6).....	107
Abbildung 24: Test auf Dichtigkeit des DR V2 mittels Gold-Nanopartikeln, UV-Spektren	109
Abbildung 25: Test auf Dichtigkeit des DR V3 (Dialysemembran aus Celluloseacetat) mittels Gold-Nanopartikeln, UV-Spektren.....	111

Abbildung 26: Wirkstofffreisetzung von mTHPC aus gefriergetrockneten PLGA Nanopartikeln ohne (Charge 4) und mit Chitosan-Überzug (Charge 11) in 50% FBS im DR V1 (n=3)	113
Abbildung 27: Wirkstofffreisetzung von Flurbiprofen aus polymeren Nanopartikeln im DR V2.....	116
Abbildung 28: Mathematisch bearbeitete Freisetzungsprofile von Flurbiprofen aus kolloidalen Arzneiformen im Dispersion Releaser	118
Abbildung 29: <i>Compartment accumulation ratio</i> für kolloidale Arzneiformen.....	119
Abbildung 30: Wirkstofffreisetzung von mTHPC aus der Referenzformulierung Foscan im A4D (n=3)	125
Abbildung 31: Wirkstofffreisetzung von mTHPC aus der Referenzformulierung Foscan im A4D (n=3) und im DR V3 (n=6).....	126
Abbildung 32: Zellen des A4D nach Beendigung der Freisetzungsuntersuchungen mit erkennbarem Präzipitat.....	127
Abbildung 33: Wirkstofffreisetzung von mTHPC aus den Referenzformulierungen Foscan und Temodextrin im A4D in 50% FBS (n=3)	128
Abbildung 34: Wirkstofffreisetzung von mTHPC aus gefriergetrockneten PLGA Nanopartikeln ohne (Charge 5) und mit Chitosan-Überzug (Charge 12) im A4D in 50% FBS (n=3)	131

5.4. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien	34
Tabelle 2: Eingesetzte Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	36
Tabelle 3: Puffersysteme für Freisetzungsmedien.....	39
Tabelle 4: Zusammensetzung der Freisetzungsmedien für den Wirkstoff mTHPC ..	40
Tabelle 5: HPLC-Anlagen für die Gehaltsbestimmung von mTHPC.....	42
Tabelle 6: Analytik und Quantifizierung von Flurbiprofen	45
Tabelle 7: Übersicht über Freisetzungsexperimente mit Flurbiprofen zur Evaluierung des DR V2	63
Tabelle 8: Thermodynamische Löslichkeit von mTHPC, n=3	77
Tabelle 9: Wiederfindung von mTHPC aus Freisetzungsmedium mit 50% FBS.....	77

Tabelle 10: Partikelgröße, Polydispersitätsindex und Zetapotential der mTHPC-beladenen PLGA Nanopartikel, n=3	79
Tabelle 11: Wirkstoffgehalt und gravimetrische Auswertung der mTHPC-beladenen PLGA Nanopartikel, n=3	81
Tabelle 12: Partikelgröße, Polydispersitätsindex und Zetapotential von mTHPC-beladenen PLGA Nanopartikeln nach Gefriertrocknung und Redispergieren, n=3... ..	81
Tabelle 13: Partikelgröße, Polydispersitätsindex und Zetapotential von mTHPC-beladenen und mit Chitosan überzogenen PLGA Nanopartikeln, n=3.....	83
Tabelle 14: Wirkstoffgehalt und gravimetrische Auswertung von mTHPC-beladenen und mit Chitosan überzogenen PLGA Nanopartikeln, n=3	83
Tabelle 15: Partikelgröße, Polydispersitätsindex und Zetapotential von nicht gefriergetrockneten mit Chitosan überzogenen PLGA Nanopartikeln nach Mischen mit FBS-haltigen Medien, n=3	84
Tabelle 16: Partikelgröße, Polydispersitätsindex und Zetapotential von gefriergetrockneten mit Chitosan überzogenen PLGA Nanopartikeln nach Redispergieren in FBS-haltigen Medien, n=3	85
Tabelle 17: Partikelgröße, Polydispersität und Zetapotential von Flurbiprofen-beladenen Nanopartikeln vor Gefriertrocknung, n=3	86
Tabelle 18: Partikel- und Flurbiprofen-Gehalt von PLA, PLGA und Eudragit® Nanopartikeln, n=3	87
Tabelle 19: Flurbiprofengehalt nach Gefriertrocknung und Redispergieren in Medium sowie die daraus resultierende Menge an Wirkstoff je Freisetzungsversuch, n=3 ...	88
Tabelle 20: Partikelgröße, Polydispersität und Zetapotential von Flurbiprofen Nanopartikeln nach Redispergieren in FreisetzungsmEDIUM zum Zeitpunkt t = 0 Stunden und nach Beendigung der Freisetzungsversuche, n=3	89
Tabelle 21: pH-Werte, Osmolalitäten und Proteingehalt von bovinen Plasmen, Osmolalität und Proteingehalt n≥3, pH-Wert n=1	90
Tabelle 22: pH-Werte der Medien in der Akzeptorkammer nach erfolgter Freisetzungsuntersuchung mit Foscan (nach 24 Stunden).....	96
Tabelle 23: Permeabilitätskonstanten (k _M -Werte) der Freisetzungsexperimente von Flurbiprofen (n=6).....	98
Tabelle 24: Partikelgrößenanalytik und Zetapotential vor und nach der Wirkstofffreisetzung in 50% FBS (n=3).....	114

Tabelle 25: Parameter der Wirkstofffreisetzung für Freisetzungsexperimente im DR V2 mit kolloidalen Flurbiprofen-haltigen Formulierungen, analysiert nach dem „ <i>rpt</i> “ Modell	120
Tabelle 26: Parameter der Wirkstofffreisetzung für Freisetzungsexperimente im DR V2 mit kolloidalen Flurbiprofen-haltigen Formulierungen, analysiert nach dem “ <i>three-parameter</i> ” Modell	122
Tabelle 27: NP-Gehalt und Gefriertrocknung von PLGA Nanopartikeln zur Berechnung der Trockenmasse je Gefriertrocknungsvial	129
Tabelle 28: Nanopartikelgehalt nach Redispergieren in 1,101 mL Freisetzungsmidium zum Herstellen von Nanopartikelsuspensionen mit einem mTHPC-Gehalt von 336µg/mL	130
Tabelle 29: Partikelgrößenanalytik und Zetapotential vor und nach der Wirkstofffreisetzung im A4D 50% FBS (n=3)	132

6. Curriculum Vitae

Christine Janas, geb. Achtziger

Persönliche Daten

Geboren: Am 21.12.1986 in Herne

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Familienstand: Verheiratet

Beruflicher Werdegang

Seit 11/2016	Scientific Manager Product Ideas, Center of Excellence Pharmaceuticals, B.Braun Melsungen AG in Melsungen
12/2011 bis 10/2016	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazeutische Technologie der Goethe Universität in Frankfurt am Main
11/2010 bis 04/2011	Praktisches Jahr bei F. Hoffmann-La Roche Ltd in Basel (Schweiz), Tätigkeitsschwerpunkt war die amorphe Stabilisierung schwer löslicher Arzneistoffe, Forschungsprojekt zur Optimierung und Etablierung von Methoden in der Arzneiformentwicklung
06/2009 bis 10/2010 und 05/2011 bis 07/2016	Mitarbeiterin in der Columbus Apotheke in Oberursel als Nebentätigkeit während Studium und Promotion sowie im Praktischen Jahr

Studium

10/2006 bis 11/2011	Pharmaziestudium an der Goethe Universität in Frankfurt am Main
08/2008	1. Staatsexamen der Pharmazie Auszeichnung mit dem Dr. Petra Schöttler Ehrenpreis für das beste 1. Staatsexamen im Fach Pharmazie in Frankfurt
10/2010	2. Staatsexamen der Pharmazie
11/2010 bis 10/2011	Praktisches Jahr bei F. Hoffmann-La Roche Ltd in Basel und in der Columbus Apotheke in Oberursel
11/2011	3. Staatsexamen der Pharmazie und Approbation zur Apothekerin

Schulbildung

08/1997 bis 06/2006	Engelsburg-Gymnasium in Kassel, Abschluss: Abitur
08/1993 bis 07/1997	Besuch der Grundschule Mittelpunktschule in Calden

Lehrtätigkeiten während der Promotion

- Leitung der Praktikumsstation „Überzogene Arzneiformen“ im 6. Fachsemester Pharmazie
- Leitung der Praktikumsstation „Wirkstofffreisetzung“ mit den Schwerpunkten der Freisetzungsuntersuchung oraler Arzneiformen mittels Durchflusszelle sowie Permeabilitätsuntersuchungen topischer Arzneiformen mittels Franz-Zelle
- Praktikumsbetreuung im 2. Fachsemester Pharmazie: Arzneiformenlehre I (Propädeutikum)
- Betreuung von Studenten im Wahlpflichtfach und im Praktischen Jahr

Akademische Lehrer während Studium und Promotion

- Frau Prof. Dr. Dressman
- Herr Prof. Dr. Kreuter
- Herr Prof. Dr. Karas
- Herr Prof. Dr. Steinhilber
- Herr Prof. Dr. Dingermann
- Herr Prof. Dr. Schubert-Zsilavec
- Herr Prof. Dr. Stark
- Herr Prof. Dr. Ehlers
- Herr Prof. Dr. Marschalek
- Herr Prof. Dr. Klein
- Herr Prof. Dr. Müller
- Herr Prof. Dr. Eckert
- Herr Prof. Dr. Helmstädter
- Herr Prof. Dr. Mahler

7. Veröffentlichungen und Patente

- Artikel**
- C. Janas, M-P. Mast, L. Kirsamer, C. Angioni, F. Gao, W. Mäntele, J. Dressman, M. Wacker, The dispersion releaser technology is an effective method for testing drug release from nanosized drug carriers, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 115 (2017) 73-83.
- C. Janas, Z. Mostaphaoui, L. Schmiederer, J. Bauer, M. Wacker, Novel polymeric micelles for drug delivery: Material characterization and formulation screening, *International Journal of Pharmaceutics*, 509 (2016) 197-207.
- M. Villa Nova, C. Janas, M. Schmidt, T. Ulshoefer, S. Graefe, S. Schiffmann, N. de Bruin, A. Wiehe, V. Albrecht, M. J. Parnham, M. L. Bruschi, M. Wacker, Nanocarriers for photodynamic therapy-rational formulation design and medium-scale manufacture, *International Journal of Pharmaceutics*, 491 (2015) 250-260.
- C. M. Wallenwein, M. Villa Nova, C. Janas, L. Jablonka, G. F. Gao, M. Thurn, V. Albrecht, A. Wiehe, M. G. Wacker, A dialysis-based in vitro drug release assay to study dynamics of the drug-protein transfer of temoporfin liposomes, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 143 (2019) 44-50.
- Patent**
- M. Wacker, C. Janas, Dialysis cell for an in-vitro release test apparatus, use of the dialysis cell and in-vitro release test apparatus, EPO, EP 3 047 267 (A1) (PCT Anmeldung am 17.09.2014).
- Poster**
- C. Janas, J. Dressman, M. Wacker, Innovative Nanocarrier Systems for the Delivery of Temoporfin: *In Vitro* Selection and Formulation Refinement, AAPS – Annual Meeting and Exposition, 2013 (San Antonio, USA)
- Vortrag**
- C. Janas, The Dispersion Releaser: An Optimized Tool for Selection of Colloidal Dosage Forms during Development, GPEN, 2014 (Helsinki, Finnland)
- Buchkapitel**
- M. Wacker, C. Janas, F. Saba Ferreira, F. Pires Vieira, Manufacturing and Safety Guidelines for the Manufactured

Functional Nanomaterials, in Biomedical Applications of
Functionalized Nanomaterials, Elsevier, 1. Auflage, 2018