



Cornelia M. Keck  
Rainer H. Müller



# Moderne Pharmazeutische Technologie



Lehrbuch für Studierende  
& Nachschlagewerk für Apotheker in Offizin und Forschung

## Vorwort

Das Wissen wächst zunehmend schneller und die Erscheinungsfrequenz von traditionellen Lehrbüchern kann mit dem schnellen Wissensfortschritt immer weniger mithalten.

Aus dieser Erkenntnis wurden von R.H. Müller und G.E. Hildebrand im Jahr 1997 die „Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen“ herausgegeben. Das damalige Konzept war, neue Arzneiformen, die in den traditionellen Büchern der Pharmazeutischen Technologie nicht oder nicht ausreichend Berücksichtigung finden, abzuhandeln. Um eine schnelle Realisierung zu erreichen, wurde das Werk als Multiautorenbuch konzipiert. Dies garantierte gleichzeitig Kapitel auf hohem Niveau, da jeweils die Experten auf den jeweiligen Gebieten die Kapitel geschrieben haben.

Die letzte Auflage der „Modernen Arzneiformen“ erschien vor 10 Jahren – inzwischen hat sich die Welt mit dem Ausbau des Internets dramatisch gewandelt. Wissen wird immer schneller verfügbar gemacht, z.B. mit Wikipedia. Um auch in der Pharmazie mit der Zeit zu gehen, wurde mit der „Modernen Pharmazeutischen Technologie“ ein Internet-Lehrbuch geschaffen, quasi die Wikipedia der Pharmazie – ebenso für kostenlosen „Download“ von Studierenden, Pharmazeuten und Apothekern.

Das Konzept des Multiautorenbuchs wurde beibehalten – nun aber mit der Möglichkeit die Kapitel nach Bedarf jedes Jahr zu aktualisieren. Es erscheint mindestens eine überarbeitete Internet-Ausgabe pro Jahr (i.d.R. zu Semesterbeginn).

Wie bei Wikipedia ist jeder Hochschullehrer und Pharmazeut – aber auch Apotheker aus der Praxis und fortgeschrittene Studierende - eingeladen, Kapitel beizutragen, die er für eine zukunftsorientierte pharmazeutische Ausbildung auf hohem, aktuellem Niveau für wichtig hält. Wie bei den „Modernen Arzneiformen“ sollen die Kapitel Wissen möglichst kondensiert vermitteln, d.h. schnell zu lesende kurze Kapitel mit prägnanten, veranschaulichenden Abbildungen sind bevorzugt (Länge natürlich auch abhängig von Thematik).

Zusätzlich wurde der Inhalt dem gewachsenen Bedarf an Wissen angepasst. Es werden nicht nur neue Arzneiformen abgehandelt, sondern auch aktuelle pharmazeutisch-technologische Verfahren & analytische Methoden sowie moderne Hilfsstoffe. In speziellen Kapiteln werden theoretische Inhalte abgehandelt, die in den traditionellen Lehrbüchern nicht oder zu knapp enthalten sind. Es werden auch mehr „traditionelle“ Kapitel aufgenommen wie Kapseln, die den aktuellen Wissensstand mit neuesten Entwicklungen widerspiegeln.

Diese 1. Auflage enthält ein vorläufiges Inhaltsverzeichnis, ein Teil der Kapitel wurde bereits fertig gestellt (fett gedruckt), und dient als Vorlage für weitere Kapitel von Pharmazeuten, die zu diesem Buch beitragen möchten (Zusendung bitte bis zum 31.3.09, nanoteam@gmx.com). Weitere Kapitel werden dann zu Beginn des SS 2009 ins Netz gesetzt.

Das Internet-Lehrbuch ermöglicht es, zu Semesterbeginn jeweils den aktuellen Wissensstand abzurufen, und zwar maßgeschneidert auf die jeweiligen Bedürfnisse durch gezielten down load bestimmter Kapitel oder des gesamten Lehrbuches.

Am Schluss unser ausdrücklicher Dank an alle Autoren, die zu diesem Buch beigetragen haben.

**Berlin, 25. Januar 2009**

***Cornelia M. Keck  
& Rainer H. Müller***

# Inhaltsverzeichnis

<b>Teil 1: Arzneiformen und moderne Arzneimittel</b>		Seite
<b>1.1.</b>	<b>Bioabbaubare in-situ Systeme</b> Martin Körber	2
<b>1.2.</b>	<b>Delivery Systeme für die perorale Applikation von Peptiden</b> Hans E. Junginger	8
<b>1.3.</b>	<b>Innovative Impfstoff-Entwicklung</b> Barbara Baudner & Derek O'Hagan	15
<b>1.4.</b>	<b>Hartkapseln</b> Sven Stegemann	24
<b>1.5.</b>	<b>Lipidnanopartikel (SLN, NLC) zur optimierten Arzneistoffapplikation</b> in Vorbereitung	
<b>1.6.</b>	<b>Nanokristalle zur Formulierung schwer löslicher Wirkstoffe</b> in Vorbereitung	
<b>1.7.</b>	<b>Polymermikropartikel</b> Stefan Scheler	35
<b>1.8.</b>	<b>Weichkapseln</b> Sven Stegemann	43
<b>Teil 2: Hilfsstoffe</b>		
<b>2.1.</b>	<b>Cyclodextrine &amp; -derivate</b> in Vorbereitung	
<b>2.2.</b>	<b>Moderne Eudragite</b> in Vorbereitung	
<b>Teil 3: Analytische Methoden</b>		
<b>3.1.</b>	<b>Laserdiffraktometrie</b> Cornelia M. Keck	50
<b>3.2.</b>	<b>Photonenkorrelationsspektroskopie</b> Cornelia M. Keck & Rainer H. Müller	56
<b>3.3.</b>	<b>Proteinanalytik mit 2-D PAGE</b> Mirko Jansch & Cornelia M. Keck	62
<b>3.4.</b>	<b>Röntgendiffraktometrie</b> Lothar Schwabe	67
<b>3.5.</b>	<b>Thermoanalyse</b> Lothar Schwabe	73
<b>3.6.</b>	<b>X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS)</b> Gerold Lukowski	78



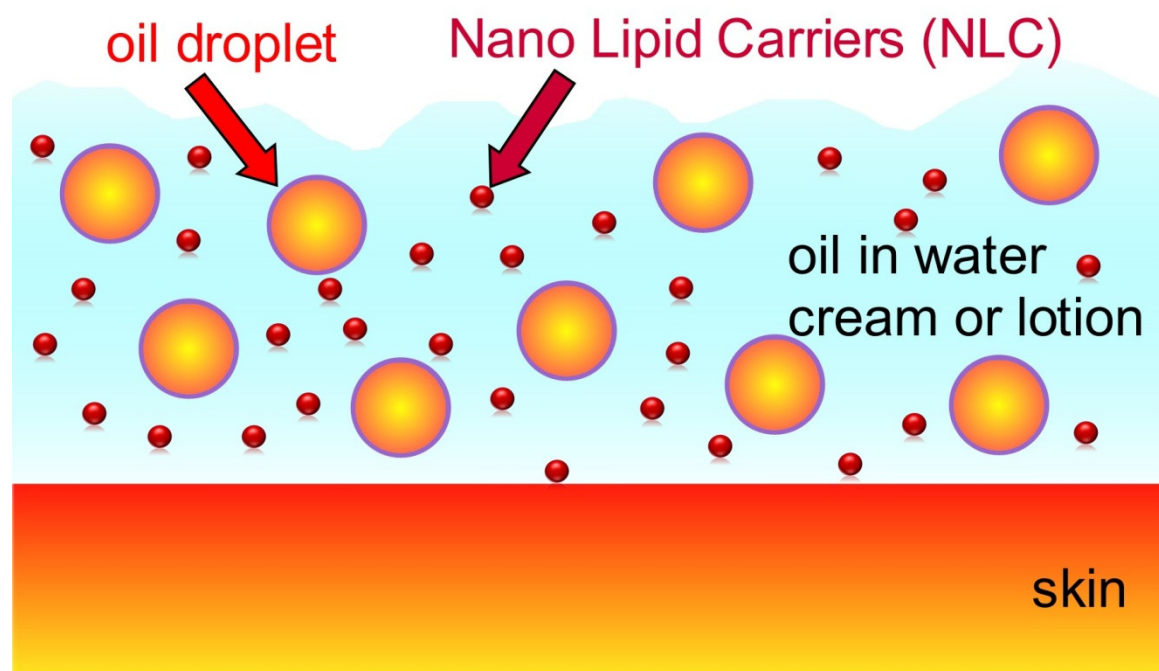
## Teil 4: Pharmazeutisch-technologische Verfahren

<b>4.1.</b>	<b>Bestimmung der Hautfeuchtigkeit, Hautelastizität und des Transepidermalen Wasserverlusts (TEWL)</b>	84
	Jana Pardeike & Rainer H. Müller	
<b>4.2.</b>	<b>Isoliert perfundiertes Rindereuter zur Untersuchung der dermalen Penetration und Resorption</b>	88
	Rolf Petersen & Manfred Kietzmann	
<b>4.3.</b>	<b>HET-CAM Test</b>	91
	Jana Pardeike & Rainer H. Müller	
<b>4.4.</b>	<b>Methoden zur Untersuchung transdermaler therapeutischer Systeme</b>	94
	Michael Dittgen & Sandra Wiedersberg	
<b>4.5.</b>	<b>Nanonisierung von pharmazeutischen Wirkstoffen mit Rührwerkskugelmühlen</b>	100
	Szymon Kobierski & Cormelia Keck	
<b>4.6.</b>	<b>Rekonstruierte humane Epidermis für die In-vitro-Bestimmung der perkutanen Absorption</b>	104
	Alexander Vuia	
<b>4.7.</b>	<b>Tape Stripping Test</b>	110
	Jana Pardeike & Rainer H. Müller	

## Teil 5: Theorie

<b>5.1.</b>	<b>Hochdruckhomogenisation</b>	
	in Vorbereitung	
<b>5.2.</b>	<b>Statische Mischer</b>	
	in Vorbereitung	
<b>5.3.</b>	<b>Sättigungslöslichkeit, Lösungsgeschwindigkeit &amp; Bioverfügbarkeit</b>	
	in Vorbereitung	
<b>5.4.</b>	<b>Zetapotential</b>	
	in Vorbereitung	

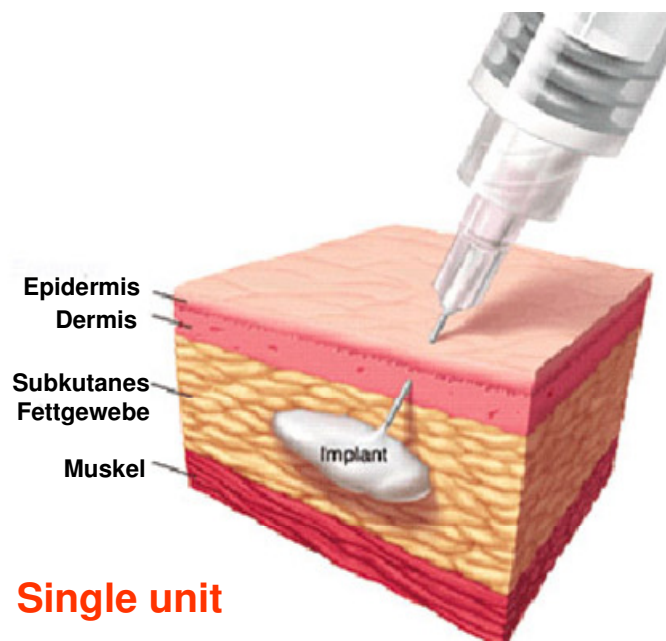
# Teil 1: Arzneiformen & moderne Arzneimittel



## 1. Einleitung

Konventionelle bioabbaubare Implantate (Profact<sup>®</sup> Depot, Zoladex<sup>®</sup>) sind meist durch Schmelzextrusion oder -verpressung hergestellte zylinderförmige Polymerstäbchen mit eingebettetem Wirkstoff. Erhöhte Prozesstemperaturen während der Extrusion können thermolabilen Arzneistoffen schaden. Bei niedrig dosierten Wirkstoffen kann es zu einer inhomogenen Verteilung und damit zu Schwankungen des Gehaltes der Arzneiform kommen. Ferner sind die zur Implantation notwendigen chirurgischen Eingriffe oder die Injektion durch große Hohladeln bei Patienten nicht beliebt.

Bioabbaubare Mikropartikel (Enantone<sup>®</sup> Depot, Decapeptyl<sup>®</sup> Depot) können dagegen leichter injiziert werden und sind daher von Patienten gegenüber Implantaten bevorzugt. Die zur Herstellung verwendeten Mikroverkapselungsmethoden sind allerdings meist komplexe, mehrstufige Verfahren, die schwierig vom Labor- auf den Produktionsmaßstab zu übertragen sind. Im Gegensatz zu den konventionellen bioabbaubaren Implantaten und Mikropartikeln, stellen in-situ Systeme flüssige Formulierungen dar, die aufgrund der Verfestigung eines geeigneten bioabbaubaren, meist polymeren Trägermaterials im Körper ein halbfestes oder festes Depot (*Single Unit*) bilden (Abb. 1). Während dieser Aushärtung kommt es zur Einbettung des gelösten oder dispergierten Arzneistoffs in die Polymermatrix, von der aus der Wirkstoff verzögert freigesetzt wird. Entsprechend dem in die Depotbildung involvierten Mechanismus zur Verfestigung, werden in-situ Implantate in sechs Kategorien unterschieden [1].



## Single unit

Abb. 1: Schematische Darstellung der subkutanen Injektion eines in-situ Implantats

## 2. In-situ Implantate

### 2.1 Thermoplastische Pasten

Thermoplastische Pasten basieren auf Polymeren, welche, auf Temperaturen zwischen 37°C und 60°C erwärmt, ihre Viskosität durch das mit der Injektion verbundene Abkühlen auf Körpertemperatur stark erhöhen und so ein halbfestes-festes in-situ Implantat bilden.

Bei der Auswahl des Polymeren spielt die Erweichungstemperatur eine wichtige Rolle. Idealerweise ist diese nahe der Körpertemperatur um Schmerz oder das Risiko von Gewebeschädigung zu minimieren. Niedermolekulare Poly(orthoester) besitzen beispielsweise niedrige Erweichungstemperaturen von 35-45°C, wohingegen Polylaktid-co-glykolide auf Temperaturen von etwa 60°C erwärmt werden müssten, um eine ausreichend niedrige Viskosität aufzuweisen [2, 3]. Im Gegensatz zu den Polylaktid-co-glykoliden sind Polyorthoester allerdings nicht zur parenteralen Applikation zugelassen.

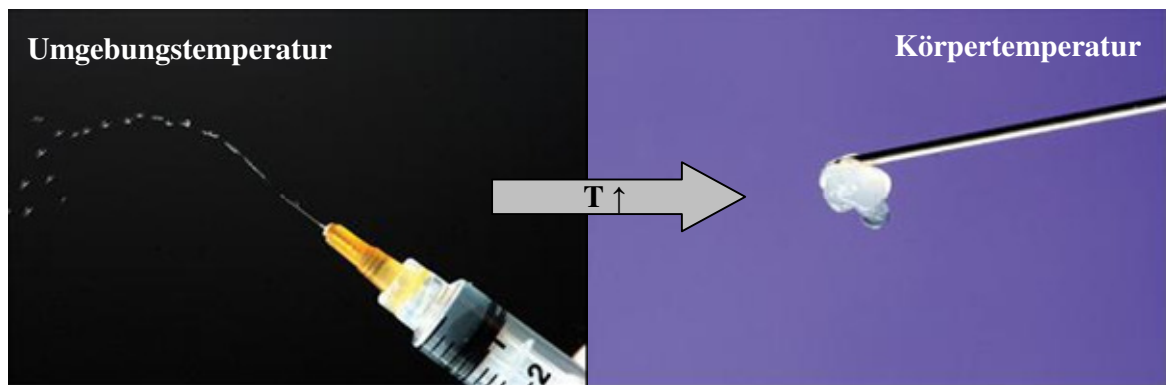
### 2.2 In-situ quervernetzte Implantate

Arzneistoffdepots können auch durch eine Quervernetzung des Polymeren in-situ gebildet werden. Die Quervernetzung kann durch kovalente Bindungen (z.B. durch radikalische Reaktion unter Initiation durch Hitze- oder UV-Anregung erzeugt werden) oder durch nicht-kovalent Interaktion (z.B. ionogen) erfolgen.

Die radikalische Polymernetzungen birgt allerdings ein erhöhtes Toxizitätsrisiko, da das umliegenden Gewebe durch die chemische Reaktion in Mitleidenschaft gezogen werden kann [4]. Die ionogene in-situ Quervernetzung (z.B. Alginate / Calcium oder Chitosan / Phosphat) scheitert meistens an unzureichenden physiologischen Konzentrationen der für die Gelierung verantwortlichen Gegenionen [5]. Eine andere Methode der physikalischen Polymerquervernetzung ist die Verwendung von Blockcopolymeren aus PLA oder PLGA und PEG. Diese bilden nach Kontakt mit Körperflüssigkeiten ein bioabbaubares Hydrogel. Trotz scheinbarer Biokompatibilität [6] sind diese Copolymere nicht für die parenterale Anwendungen zugelassen.

### 2.3 Thermogelierende Polymerlösungen

Polymere, die einen thermoreversiblen Sol/Gel-Übergang zeigen und bei Erwärmung die Viskosität erhöhen, können ebenfalls als Trägermaterial für die in-situ Implantatbildung verwendet werden. Blockcopolymere vom Typ Polyethylenoxid-Polypropylenoxid-Polyethylenoxid (Poloxamere) sind ein Beispiel. Ebenso bieten wässrige Lösungen von ABA-Triblockcopolymeren aus PLA oder PLGA (A) und PEG (B) thermogelierende Eigenschaften (ReGel<sup>®</sup>, Protherics PLC, Großbritannien). Diese Formulierungen sind niedrigviskos unter 15°C und dadurch mittels einer kleinen Nadel injizierbar. Durch die Erwärmung auf Körpertemperatur tritt dann ein schneller Sol/Gel Übergang statt und führt zur Depotbildung (Abb. 2).



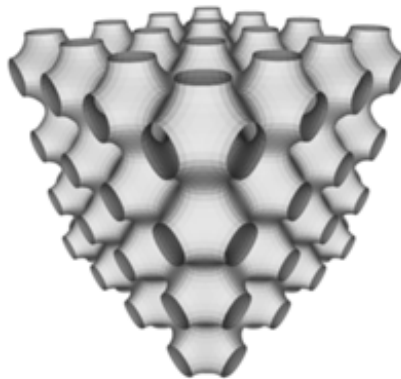
**Abb. 2:** Prinzip der Viskositätserhöhung durch Thermogelierung

#### 2.4 pH-induzierte *in-situ* Implantatbildung

Ein Sol/Gel- Übergang einer wässrigen Polymerlösung kann auch durch die Änderung des pH hervorgerufen werden. Zum Beispiel Chitosan ein zähflüssiges Gel, wenn eine ursprünglich saure Lösung des Polymers durch Kontakt mit Körperflüssigkeiten neutralisiert wird.

#### 2.5 *In-situ* kubische Phasen

Kubische Phasen sind flüssig-kristalline Phasen auf Basis amphiphiler Glyceride, wie z. B. Glycerolmonooleat oder Glycerolmonolinoleat, welche sich in Kontakt mit Wasser spontan bilden. Dabei entstehen individuelle Partikel (Kuben), die bikohärente Systeme aus Lipiddoppelschichten und Wasser darstellen und von zähflüssiger Konsistenz sind (Abb. 3). Arzneistoffe können nach der Bildung der kubischen Phasen sowohl in der wässrigen Phase, als auch in den Lipiddoppelschichten inkorporiert vorliegen.



**Abb. 3:** Kubische Phase mit „primitiver“ Oberfläche (P-surface)

#### 2.6 Lösemittelabhängige *in-situ* Implantatbildung

Die erfolgreichste Strategie zur *in-situ* Bildung von Arzneistoffdepots ist die Verfestigung oder Präzipitation von bioabbaubaren Trägern aufgrund des Kontakts zwischen organischen Lösungen des wasserunlöslichen Trägermaterials in biokompatiblen organischen Lösemitteln und wässrigen Körperflüssigkeiten. Ob es bei der *in-situ* Bildung des Depots lediglich zu einer Viskositätserhöhung infolge des Wegdiffundierens des viskositätserniedrigenden Lösemittels oder zur Präzipitation des Trägermaterials kommt hängt von der Art des Trägermaterials, sowie von den Affinitäten zwischen Träger, Lösemittel und Wasser ab.

Die in-situ Implantatbildung mit Lösungen von Sucrose-acetat-iso-butyrat in organischen Lösemitteln (SABER® Technologie) basiert auf einer reinen Viskositätserhöhung, da es sich bei dem Ester selbst um eine zähflüssige Substanz handelt. Dahingegen kommt es im Fall von wasserunlöslichen Polymeren wie PLA oder PLGA zu einer mehr oder weniger raschen Präzipitation nach Injektion. Die Geschwindigkeit der Präzipitation, die für die Morphologie des resultierenden Implantats von entscheidender Bedeutung ist, hängt dabei von der Wahl des Lösemittels ab. Die Präzipitation ist langsam, wenn das Polymerlösemittel nicht mit Wasser mischbar ist (Alzamer® Technologie), bzw. schnell, wenn wassermischbare Lösemittel (Atrigel® Technologie) verwendet werden. As Folge einer schnellen Polymerpräzipitation ist die Porosität der resultierenden Implantate erhöht, was in den meisten Fällen mit einer beschleunigten Freisetzungskinetik in Zusammenhang steht [7].

Die einzigen bislang als Arzneimittel zugelassenen in-situ Formulierungen basieren auf der Atrigel® Technologie, mit dem biokompatible wassermischbare N-methyl-2-pyrrolidon als Lösemittel. Mit Eligard® wird der GnRH-Superagonist Leuprorelinacetat nach subkutaner Injektion über 1-6 Monate verzögert freigesetzt. Atridox® ermöglicht es, kleine Doxycyclinhyclat Depots in Zahntaschen zu instillieren, um zum Beispiel bei starker Parodontitis eine lokale Antibiose vorzunehmen. Ein Problem mit in-situ Implantaten, die auf wassermischbaren Lösungsmitteln basieren, sind hohe initiale Freisetzungen nach Kontakt mit dem wässrigen Milieu, wodurch sich die Anwendbarkeit des Systems wahrscheinlich eher auf Arzneistoffe mit breiterem therapeutischem Fenster beschränkt bleiben wird.

#### **Vorteile von in-situ Systemen gegenüber herkömmlichen Mikropartikeln:**

- Verwendung biokompatibler Lösemittel
- Einfache und kostengünstigere Herstellung
- Einfache Fertigung erlaubt unkompliziertes Scale-Up vom Labor- in den Produktionsmaßstab
- Maximale Verkapselungseffizienzen und Produktausbeuten
- Endsterilisierung durch einfache Filtration im Gegensatz zu aufwendiger aseptische Herstellung oder Sterilisierung durch energiereiche Gammabestrahlung (Risiko für Abbaureaktionen)
- Einfache Applikation durch medizinisches Personal ohne zusätzlichen Rekonstitutionsschritt
- Weniger schmerzhaftere Injektion durch kleinere Injektionsnadeln (Patientenakzeptanz)

#### **Nachteile der in-situ Implantate:**

- Keine Kontrolle über Implantatform nach der Injektion und damit geringere Reproduzierbarkeit der Freisetzungskinetik
- Schmerzvollere Injektion von hochviskosen Formulierungen durch größere Injektionsnadeln
- Unerwünschte, zu rasche Wirkstofffreigabe („Burst“) vor der Verfestigung der Trägermatrix
- Potentielle Gewebeschädigung durch hohe Temperaturen, reaktive Formulierungsbestandteile (Quervernetzung), extreme pH-Werte oder hohe Lösemittelkonzentrationen

### **3. In-situ Mikropartikel**

Bioabbaubare in-situ Mikropartikel sind eine Weiterentwicklung der in-situ Implantate [8]. Die in-situ Mikropartikel bilden sich, ähnlich der lösemittelabhängigen in-situ Implantatbildung, durch Polymerpräzipitation aufgrund des Wegdiffundierens des Lösemittels und/oder dem Einstrom wässriger Gewebsflüssigkeiten nach subkutaner oder intramuskulärer Injektion (Abb. 4).

## Emulsionströpfchen



Injektion



## Mikropartikel

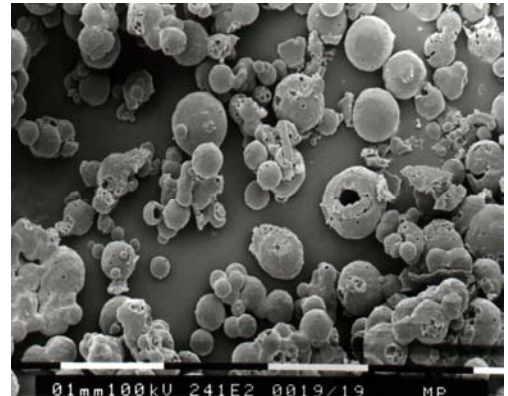
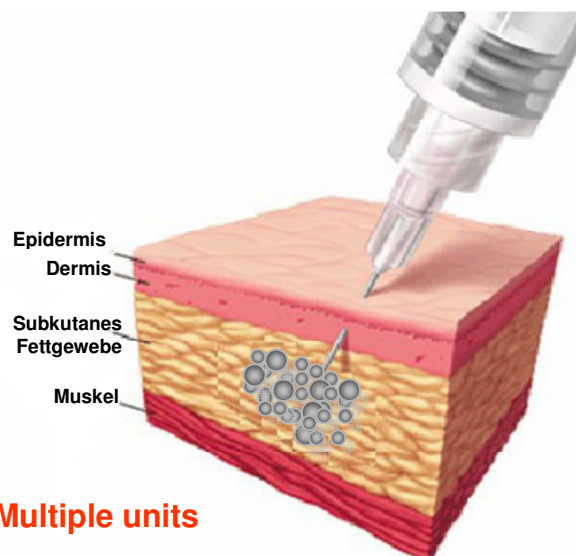


Abb. 4: Mikroskopische (links) und rasterelektronenmikroskopische Aufnahme (rechts) einer in-situ Mikropartikelemulsion und der resultierenden Mikropartikel



Multiple units

Abb. 5: Schematische Darstellung der subkutanen Injektion einer in-situ Mikropartikelemulsion

Im Gegensatz zu den in-situ Implantaten, entsteht eine Vielzahl von kleineren Depoteinheiten (*Multiple Units*, Abb. 5), deren Freisetzungseigenschaften unabhängig von der Form ist, welche die Formulierung nach der Injektion annimmt. Die in-situ Mikropartikelemulsion besteht aus einer arzneistoffhaltigen Polymerlösung (innere Phase) und einer stabilisatorhaltigen, äußeren Phase auf Öl- oder Wasserbasis. Im Vergleich zu den hochviskosen in-situ Implantaten, kann die Injizierbarkeit des Systems durch eine niedrigere Viskosität der äußeren Phase verbessert werden, da die viskose Polymerlösung, als dispergierte Phase die Injektionsnadel ungehindert passieren kann. Des Weiteren kann durch die Wahl einer geeigneten äußeren Phase eine hohe initiale Freisetzung verhindert werden (z.B. ölige Phase und hydrophiler Arzneistoff).



## 5. Literatur

1. D. Chitkara et al., Biodegradable injectable in situ depot-forming drug delivery systems, *Macromol. Biosci.* 6(2006). pp. 977-990.
2. M. van de Weert et al., Semisolid, Self-catalyzed Poly(Ortho Ester)s as Controlled-Release Systemes: Protein Release and Protein Stability Issues, *J. Pharm. Sci.* 91(2002b). pp. 1065-1074.
3. A. Hatefi, B. Amsden, Biodegradable injectable in situ forming drug delivery systems, *J. Control. Release* 80(2002). pp. 9-28.
4. S.J. de Jong et al., Physically crosslinked dextran hydrogels by stereocomplex formation of lactic acid oligomers: degradation and protein release behavior, *J. Control. Release* 71(2001). pp. 261-275.
5. C.B. Packhaeuser et al., In situ forming parenteral drug delivery systems: an overview, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58(2004). pp. 445-455.
6. M. Luck et al., Plasma protein adsorption on biodegradable microspheres consisting of poly(D,L-lactide-co-glycolide), poly(L-lactide) or ABA triblock copolymers containing poly(oxyethylene). Influence of production method and polymer composition, *Journal of Controlled Release.* 55(2-3), (1998). pp. 107-20.
7. K.J. Brodbeck et al., Phase inversion dynamics of PLGA solutions related to drug delivery Part II. The role of solution thermodynamics and bath-side mass transfer, *J. Control. Release* 62(1999). pp. 333-344.
8. H. Kranz, R. Bodmeier, A novel in situ forming drug delivery system for controlled parenteral drug delivery, *Int. J. Pharm.* 332(2007). pp. 107-114.

## 1. Einleitung

Delivery Systeme für die perorale Applikation von Peptiden gehören für viele Wissenschaftler auch heute noch immer in den Bereich der Phantasie oder des „wishful thinkings“. Dies ist nicht verwunderlich, da der Dünndarm des Menschen als solches kein Absorptionsorgan für solche Moleküle darstellt, die sehr hydrophil sind, ein hohes Molekulargewicht besitzen und weder in der sauren Magenflüssigkeit noch im Darmmilieu, wo sie enzymatisch abgebaut werden, stabil sind. Nach dem biopharmazeutischen Klassifizierungssystem gehören Peptide zur Klasse 3, die definitionsgemäß durch gute Wasserlöslichkeit, aber schlechte Membranpermeation gekennzeichnet ist. Entwickelt man Delivery Systeme zur peroralen Applikation von Peptiden oder anderen hochmolekularen hydrophilen Arzneistoffen wie z. B. das Low Molecular Weight Heparin (LMWH), so ist im Allgemeinen die Freisetzung (Delivery) kein Problem, jedoch die Absorption des Makromoleküls durch die Enterocytenmembran. Folglich reicht es nicht aus, für diese Substanzklasse ein einfaches Delivery System zu entwickeln, sondern dieses muss neben der gewünschten Freisetzungseigenschaft des Wirkstoffmoleküls auch mit der Absorptionsmembran in Wechselwirkung treten und die Permeation des freigesetzten intakten Wirkstoffmoleküls ermöglichen. Dies ist in der Regel nicht einfach und so scheitern die meisten der publizierten Arzneiabgabesysteme an dieser technologischen Forderung oder aber an der Physiologie und den Dimensionen des Magen-Darm Traktes beim Menschen, während bestimmte Erfolge bei kleineren Tieren wie Ratten möglich erscheinen. Im Folgenden sollen kurz die vielversprechendsten Ansätze vorgestellt und kommentiert werden.

## 2. Das ELIGEN® System

Das ELIGEN® System wurde von der Firma Emisphere [1] entwickelt und ist wohl als das am weitest entwickelte System anzuschauen. Es beruht auf dem Prinzip, dass bestimmte, von Emisphere entwickelte kleine Moleküle (sogenannte Chaperone oder Kindermädchen Moleküle), welche die Eigenschaft haben mit einem Peptid außerhalb der Absorptionsmembran einen Komplex zu bilden. Der Komplex ist im Magen-Darm Trakt des Menschen stabil und er vermag die physikalischen Eigenschaften des Peptids so zu verändern (vor allem Erhöhung der Lipophilie des Komplexes), dass beim Kontakt dieses Komplexes mit der Membran des Dünndarms dieser intakt durch die Membran permeiert. Da die intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den Chaperone-Molekülen und dem Peptid nur schwach sind, dissoziieren diese wieder von dem Peptidmolekül ab, sobald dieses die Blutbahn erreicht hat und von dort aus weiter seine pharmakologische Eigenschaften ausüben kann. Der vorgeschlagene Mechanismus der Peptidpermeation durch Enterozyten ist in Abb. 1 dargestellt und von der Website von Emisphere entnommen [1]. Emisphere verwendet als sein Chaperone Molekül vor allem Natrium *N*[8-(2-hydroxybenzoyl(amino)caprylat (SNAC) [2,3], das keine grenzflächenaktive und

(membran)toxischen Eigenschaften haben soll und das aus Hitze Schock Proteinen (heat shock proteins) isoliert wurde. In eigener Entwicklung und vor allem auch in Zusammenarbeit mit der Firma Novartis befinden sich verschiedene Peptide und auch LMWH in den Phasen I und II der klinischen Erprobung (Abb. 2).

## Proposed Delivery Agent Mechanism

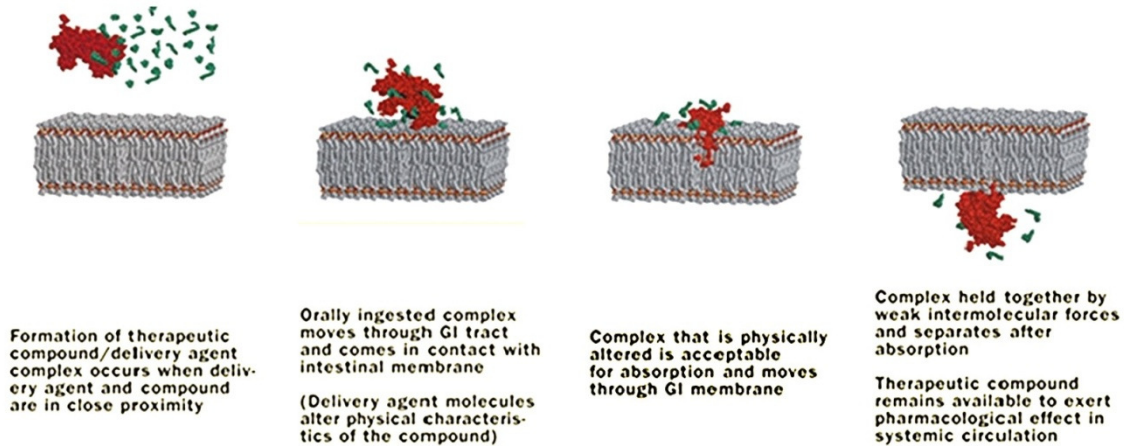


Abb. 1: Schematische Darstellung der Wirkung von Chaperone-Molekülen für den Transport von Peptiden durch die Darmmembran

product pipeline

Product Candidates Using The eligen <sup>®</sup> Technology			
Therapeutic Areas	Development Program	Partner	Status
Cardiovascular	<a href="#">Oral Heparin</a>	Self-developed	Phase III
	Oral LMWH	Undisclosed	Phase I
Bone Related Disease	<a href="#">Oral Salmon Calcitonin</a>	<a href="#">Novartis Pharma AG</a> <sup>1</sup>	Phase II
	Oral Recombinant Parathyroid Hormone 1-34	<a href="#">Novartis Pharma AG</a>	Phase I
Diabetes	<a href="#">Oral Insulin</a>	Self-developed	Phase II
	Oral GLP	Self-developed	Phase I
Asthma/Allergies	<a href="#">Oral Cromolyn Sodium</a>	Self-developed	Phase I
Growth Disorders	<a href="#">Oral Recombinant Human Growth Hormone</a>	<a href="#">Novartis Pharma AG</a>	Phase I
Anti-Viral	<a href="#">Oral Acyclovir</a>	Undisclosed	Phase I
Obesity	<a href="#">Oral PYY<sub>3-36</sub></a>	Self-developed	Phase I
Oncology	<a href="#">Oral Gallium</a>	<a href="#">Genta, Inc.</a>	Preclinical
Other	<a href="#">Feasibility Projects</a>	Undisclosed	Preclinical

<sup>1</sup> Novartis has obtained FDA and EMEA agreement to conduct Phase III trials.

Abb. 2: Wirkstoffmoleküle und Stand der Phase I und II in der klinischen Forschung finanziert durch Emisphere und Novartis ([www.emisphere.com](http://www.emisphere.com))

### 3. Mukoadhesive Delivery Systeme

Der gedankliche Ansatz für diese Peptid Delivery Systeme kann durch die folgenden Schritte erläutert werden:

- Verwendung von geeigneten polymeren Mikro- oder Nanopartikeln, die im sauren Milieu des Magens schrumpfen und dadurch das hydrophile Makromolekül einschließen und vor Zersetzung schützen.
- Im Milieu des Dünndarms quellen diese Polymere und lassen das Peptid Wirkstoffmolekül freikommen.
- Da die gewählten Polymere auch mukoadhesive Eigenschaften haben, d.h. mit ihren freien Resten in die Mukusschicht des Darmepithels eindringen, haften sie für eine bestimmte Zeitspanne an der Mukusschicht der Darmwand.
- Weiterhin haben die Polymere auch positiv geladene Gruppen (z. B. durch Verwendung von Trimethyl-Chitosan). Diese treten in Wechselwirkung mit den negativ geladenen Zuckerresten der Glycocalix und können dadurch lokal (d.h. dort, wo sich das Delivery System befindet) die sogenannten „Tight Junctions“ reversibel öffnen und dadurch wassergefüllte Kanäle durch die Membran bilden (parazellulärer Transport).
- Schließlich können an die Mikro- oder Nanopartikel auch noch Enzyminhibitoren gekoppelt werden, die ebenfalls nur lokal wirken und das Peptid vor Zersetzung schützen sollen.

Peppas und Mitarbeiter haben an diesem eleganten Verfahren gearbeitet [4]. Das von ihnen entwickelte Prinzip ist in Abb. 3 schematisch dargestellt.

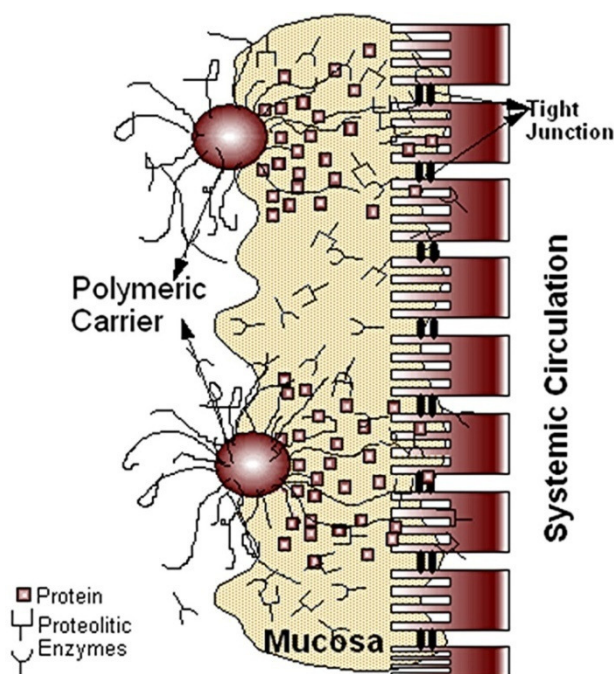


Abb. 3: Schematische Darstellung der Wechselwirkungen eines polymeren mukoadhesiven Mikropartikels mit der Mukusschicht des Darmepithels durch Interpenetration der freien Polymer-Ketten mit den Mukusglycoproteinen. Gleichzeitig erfolgt die lokale Freisetzung von proteolytischen Enzymen und geeigneten anderen (polymeren) Substanzen, die in der Lage sind, die Tight - Junctions reversibel zu öffnen. Danach erfolgt die Freisetzung des Proteins/Peptids, das über einen parazellulären Transport in die Blutbahn gelangt. Allerdings funktioniert ein solches Peptid Delivery System nur bei kleineren Tieren wie Ratten in vivo, da beim Menschen die mukoadhesive Außenschicht des Mikro-Partikels durch lösliche Mucine im Darmlumen passiviert wird und somit das Mikropartikel nicht mehr an der Darm-Wand haften kann und dann nicht mehr seine gewünschten Eigenschaften besitzt (Abbildung modifiziert nach Peppas).

Jedoch scheint diese Mikro/Nano Delivery Technologie in vivo nur bei kleineren Tieren wie der Ratte, aber nicht beim Menschen zu signifikanten Blutspiegeln der eingearbeiteten Peptide zu führen. Grund dafür ist wahrscheinlich der hohe Anteil von der von der Darmwand abgelösten

Mucine (die Mukusschicht wird alle 2 -6 Stunden im Darm erneuert), die die mukoadhesiven Eigenschaften der Mikro- und Nanopartikel passivieren und somit ein Anhaften der Partikel an der Darmschleimhaut nicht stattfindet. Dieses Anhaften ist jedoch absolut notwendig, da sonst nicht die Tight-Junctions geöffnet werden und der Peptid- Wirkstoff im Darmlumen enzymatisch abgebaut wird.

#### **4. Peptid Delivery Systeme auf der Basis von superporösen Hydrogelen**

Es schien daher notwendig zu sein, ein orales Peptid Delivery System zu entwickeln, das diese Nachteile der vorzeitigen Passivierung der mukoadhesiven Eigenschaften durch lösliche Mucine im Darmlumen verhindert, d.h., das Peptid Delivery System sollte direkt an die Darmwand gebracht werden, bevor eine solche Passivierung eintritt. Eine Möglichkeit dazu bieten die sogenannten superporösen Hydrogele, die in der Lage sind, abhängig von ihrer chemischen Struktur und dem Vernetzungsgrad der Polymerketten bis auf das zweihundertfache ihres Ausgangsvolumen im trockenen Zustand quellen zu können. Damit kann eine vorübergehende mechanische Fixierung eines Peptid Delivery Systems an der Darmwand erreicht werden. Solche superporösen Hydrogele können aus einfachen Monomeren wie Acrylsäure und Acrylamid mit geeigneten Quervernetzern durch Radikalpolymerisation erhalten werden. Der Trick bei der Synthese ist, dass an deren Ende die Entwicklung von Kohlendioxid initiiert wird, wodurch diese superporösen Hydrogele erhalten werden können [5]. Durch geeignete Zusatzstoffe kann der Quellungsgrad und auch die mechanische Festigkeit dieser Hydrogele je nach Bedarf modifiziert werden. Ein solches Peptid Delivery System ist folgendermaßen aufgebaut und sollte die folgenden Eigenschaften haben (Abb. 4):

- Der Körper des Delivery Systems besteht aus superporösem Hydrogel (Conveyor System), in dem sich das Peptid (in einem eigenen Delivery System) entweder außen (core outside system) (Abb.4) oder innerhalb des superporösen Hydrogels (core inside system) befindet. Das gesamte Delivery System befindet sich in einer Gelatine kapsel (Größe 000), die magensaftresistent überzogen ist.
- Erreicht das Peptid Delivery System den Dünndarm, löst sich der magensaftresistente Überzug und die Gelatine kapsel in den Darmflüssigkeiten auf und das superporöse Hydrogel (Conveyor System) beginnt sehr schnell zu quellen. Dabei saugt es lokal die Darmflüssigkeit auf (Reduzierung der enzymatischen Aktivität) und wird mechanisch an der Darmwand fixiert. Durch die Flüssigkeitsabsorption in das Hydrogel werden gleichzeitig die Tight-Junctions geöffnet.
- Das eigentliche Peptid Delivery System ist nun in der Lage, das Peptid direkt an die Darmwand abzugeben.
- Nach etwas 1 Stunde ist das superporöse Hydrogel so stark gequollen, dass seine Festigkeit so schwach wird, dass es von der Darmperistaltik von Absorptionsort entfernt wird und gleichzeitig in kleine Partikel abgebrochen und in dieser Form ausgeschieden wird.

Mehr Information über diese Peptid Delivery Systeme kann aus der folgenden Literatur entnommen werden [6-7].

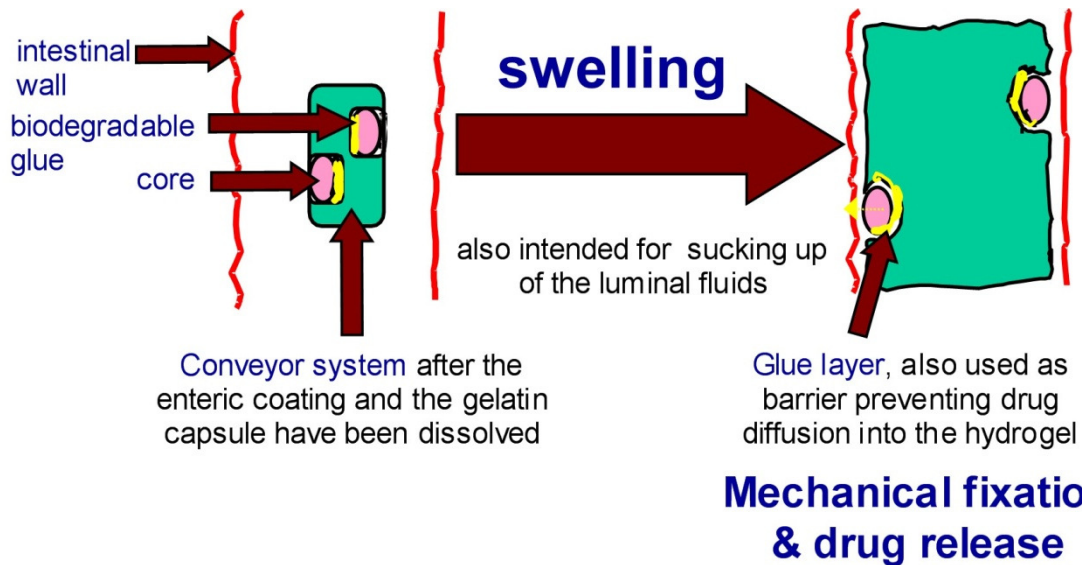
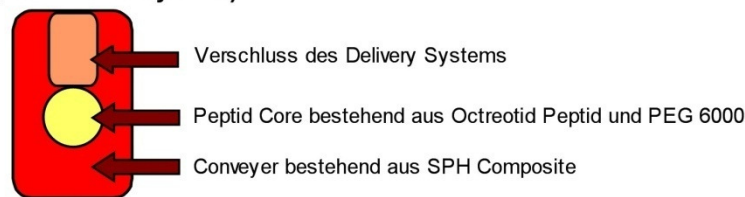


Abb. 4: Schematische Darstellung eines Peptid Delivery Systems auf der Basis von superporösen Hydrogelen. Der Körper des Delivery Systems (Conveyor System) besteht aus superporösem Hydrogel (linke Seite der Abbildung), bei der aus Gründen der Übersichtlichkeit die Gelatinekapselform mit magensaftresistentem Überzug weggelassen wurde. Das gequollene Hydrogel (rechte Seite der Abbildung) presst das Peptid Delivery System an die Darmwand, sodass der Peptidwirkstoff absorbiert werden kann.

Für das "core outside System" wurde als Trägermaterial aufgrund seiner hohen Quellbarkeit das superporöse Hydrogel (SPH) verwendet. Die verschiedenen verwendeten Formulierungen werden in Abb. 5 vorgestellt. Für das "core inside System" wurde für den Verschluss ebenfalls das SPH verwendet, während für das Conveyorsystem das SPH Composite (Zusatz von Verstärkermaterial) mit seiner höheren Stabilität verwendet wurde.

In Abb. 6 sind die bei einer in vivo Studie mit Schweinen mit einem mittleren Gewicht von 25 kg erhaltenen Blutspiegel wiedergegeben [7]. Als eine der verwendeten Formulierungen wurde die core outside Formulierung mit Trimethyl-Chitosan als zusätzliches Polymer zur Öffnung der

**A Peptid Delivery System mit dem Peptid Core im Conveyor (core inside system)**

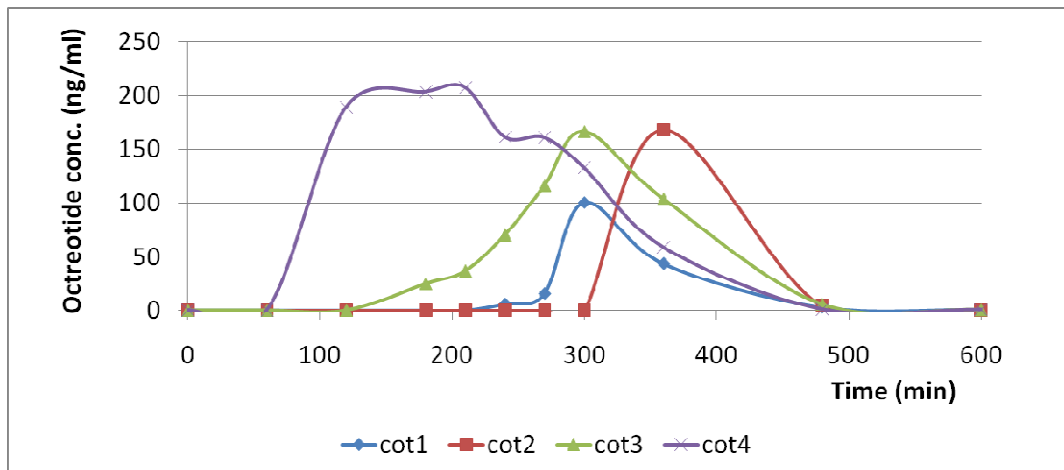


**B Peptid Delivery System mit dem Peptid Core außen am Conveyor (core outside system)**



Abb. 5: Schematische Darstellung der verschiedenen Peptid Delivery Systeme auf der Basis von SPH und die verschiedenen Core Formulierungen für das Peptid Octreotid





**Abb. 6:** Blut-Plasma Profile von Octreotid in 4 Schweinen nach der peroralen Applikation einer 000 Gelatine Kapsel mit magensaftresistentem Überzug mit einer Dosis von 15 mg Octreotid per Schwein. Die cot Formulierung bedeutet core outside mit Trimethyl-Chitosan als positiv geladenes Polymer zur verstärkten Öffnung der Tight Junctions

Tight Junctions gewählt (siehe Abb. 5). Zu beachten sind vor allem die unterschiedlichen Verweilzeiten der Kapsel im Magen der Schweine. Mit diesem Peptid Delivery System konnte für Octreotid eine absolute Bioverfügbarkeit von 21% erreicht werden [7]. Szintigraphische Studien mit diesem Abgabesystem am Menschen zeigten, dass die 000 Kapseln eine Magenverweilzeit von 0.5 – 2 Stunden hatten und dass nach der Magenpassage das System für etwa 1 Stunde im Dünndarm fixiert war, bevor es ausgeschieden wurde [8]. Obwohl dieses entwickelte Peptid Delivery System für den Peptidwirkstoff Octreotid alle Voraussetzungen für ein Delivery System erfüllt, ist seine Herstellung im großtechnischen Maßstab nicht realisierbar. Daher muss nach Systemen gesucht werden, die ebenso wirksam, aber einfacher in der Herstellung sind.

## 5. Literatur

1. [www.emisphere.com](http://www.emisphere.com)
2. Hees, S., Rotshildm V. and Hoffman, A. Investigation of the enhancing mechanism of sodium *N*-[8-(2-hydroxybenzoyl)amino]caprylate effect on the intestinal permeability of polar molecules utilizing a voltage clamp method. *Eur J Pharm Sci*, 2005, 25: p. 307-312.
3. Gonze, M. D., Manford, J. D., Baughman, R. A. et al. Orally administered heparin for preventing deep venous thrombosis. *Am J Surg*, 1998, 176: p. 176-178.
4. Peppas, N. A. and Huang, Y. Nanoscale technology of mucoadhesive interactions. *Adv Drug Del Rev*, 2004, 56: p. 1675- 1687.
5. Dorkoosh, F. A., Brussee, J., Verhoef, J.C. et al. Preparation and NMR characterization of superporous hydrogels (SPH) and SPH Composites. *Polymer*, 2000, 41: p. 8213-8220.
6. Dorkoosh, F.A., Verhoef, J.C., Borchard, G. et al. Development and characterization of a novel peroral peptide drug delivery system. *J Control Release*, 2001, 71: p 307-318.
7. Dorkoosh, F.A., Verhoef, J.C., Verheijden J.H.M. et al. Peroral absorption of octreotide in pigs formulated in delivery systems on the basis of superporous hydrogel polymers. *Pharm Res*, 2002, 19: p. 1532-1536.



8. Dorkoosh, F.A., Stokkel M.P.M., Blok, D. et al. Feasibility study of the retention of superporous hydrogel composite polymer in the intestinal tract in man using scintigraphy. *J Control Release*. 2004, 99: p. 199-206.

### 1. Traditionelle Vakzinologie

Laut Weltgesundheitsorganisation zählen Impfungen zu den effektivsten und kostengünstigsten Strategien zur Bekämpfung und der Kontrolle von Infektionskrankheiten. Im Hinblick auf die unmittelbaren Auswirkungen auf die öffentliche Gesundheit, stehen Impfstoffe an zweiter Stelle hinter der Gewährleistung einer sauberen Wasserversorgung. Der Impfstoff dient zur spezifischen Aktivierung des Immunsystems hinsichtlich eines bestimmten Erregers bzw. einer Erregergruppe. Aus Sicht der Immunologie wirken konventionelle Impfstoffe alle nach dem gleichen Prinzip: Die durch die Immunisierung angeregten B-Lymphozyten produzieren Antikörper, welche verhindern, daß die Erreger den Wirtsorganismus schädigen. Sie blockieren die Anheftung des Erregers an Wirtszellen, so daß der Erreger nicht mehr in die Zelle eindringen kann, um dort seine schädliche Wirkung zu entfalten. Ziel einer jeden Impfung ist ein lang anhaltender Schutz vor der jeweiligen Krankheit, der je nach Erreger zwischen einigen Jahren bis lebenslang anhalten kann.

Seit mehr als einem Jahrhundert werden Impfstoffe nach den so genannten Prinzipien von Pasteur entwickelt, d.h. der Isolierung, Inaktivierung und Injektion der Infektionserreger einer ansteckenden Krankheit. Alle zurzeit verfügbaren Impfstoffe basieren auf abgetöteten oder abgeschwächten Mikroorganismen oder gereinigten Untereinheiten derselben, wie z.B. durch chemische Behandlung entgiftete Toxine oder gereinigte Antigene wie Proteine oder konjugierte Polysaccharide. Die nach den Prinzipien von Pasteur hergestellten Impfstoffe erlauben die Kontrolle und, in manchen Fällen, die Ausrottung vieler wichtiger Infektionskrankheiten. Trotz dieser Erfolge hat diese Strategie auch Grenzen: Sie ist nicht nur langwierig, sondern führt auch in Fällen von fehlenden immun-dominanten und ausreichend protektiven Antigenen und bei nicht kultivierbaren Mikroorganismen nicht zum Ziel. Die Entwicklung von Impfstoffen gegen diese Erreger kann nur mit Hilfe der modernen Immunologie und Molekularbiologie gelingen.

### 2. In silico Impfstoff-Entwicklung

In den letzten zehn Jahren haben innovative genomische Ansätze die Impfstoff-Forschung und -Entwicklung revolutioniert (Abb. 1) [1]. Seit der Veröffentlichung der ersten kompletten Genomsequenz eines Mikroorganismus im Jahr 1995 stieg die Zahl der Fortschritte auf genomischer Ebene exponentiell. Bis heute wurden mehr als 300 Bakterienarten sequenziert und analysiert, einschließlich wichtiger menschlicher Krankheitserreger. Die Suche nach protektiven Antigenen ist in ein neues Stadium eingetreten. Mit der Erstellung der Genomkarten der wichtigsten Krankheitserreger liegen deren Baupläne offen dar. Neue Technologien ermöglichen die immer schnellere DNA-Sequenzierung und tragen somit zu einem stetigen Wachstum und der Verbreitung neuer genetischer Daten und Erkenntnisse bei. Computergestützte und experimentelle Untersuchungen des Erbgutes ermöglichten einen bedeutenden Fortschritt im Verständnis der Physiologie und Pathogenität vieler Mikroorganismen und erlaubten neue

Einblicke in die Evolution von Genomen. Die Übertragung dieser Technologien auf virale, bakterielle und parasitäre Erreger ist nicht nur aus wissenschaftlicher Sicht interessant, sondern birgt auch ein erhebliches Potenzial für die Entwicklung neuer Diagnostika, Therapeutika und Impfstoffe.

Der gentechnische Ansatz, Impfstoffe ausgehend von genetischer Information anstelle der üblichen Kultivierung der verantwortlichen Mikroorganismen zu entwickeln, wurde „Reverse Vakzinologie“ genannt. Dieser Ansatz eröffnet neue Möglichkeiten in der Impfstoff-Entwicklung gegen Krankheitserreger, für die eine Anwendung der Prinzipien von Pasteur nicht zum Ziel führte. Ein so genannter „Pan-genomischer“ Ansatz, d.h. die Ausweitung genetischer Studien auf mehrere repräsentative Vertreter derselben Art erwies sich darüber hinaus als sehr wirkungsvoll bei der Entwicklung neuer Impfstoffe, da somit durch Genvariationen auftretende Probleme überwunden werden können.

Des weiteren erscheint das noch junge Feld der „Strukturellen Vakzinologie“, d.h. die Anwendung strukturbiochemischer Methoden und Erkenntnisse in der Vakzinologie, Lösungsansätze zu ermöglichen, wo anderen Strategien scheiterten: Die durch strukturbiochemische Studien gewonnene atomare Auflösung von Antigenstrukturen fördert das rationale Design Impfstoff-Geeigneter Epitope (Abb. 1).

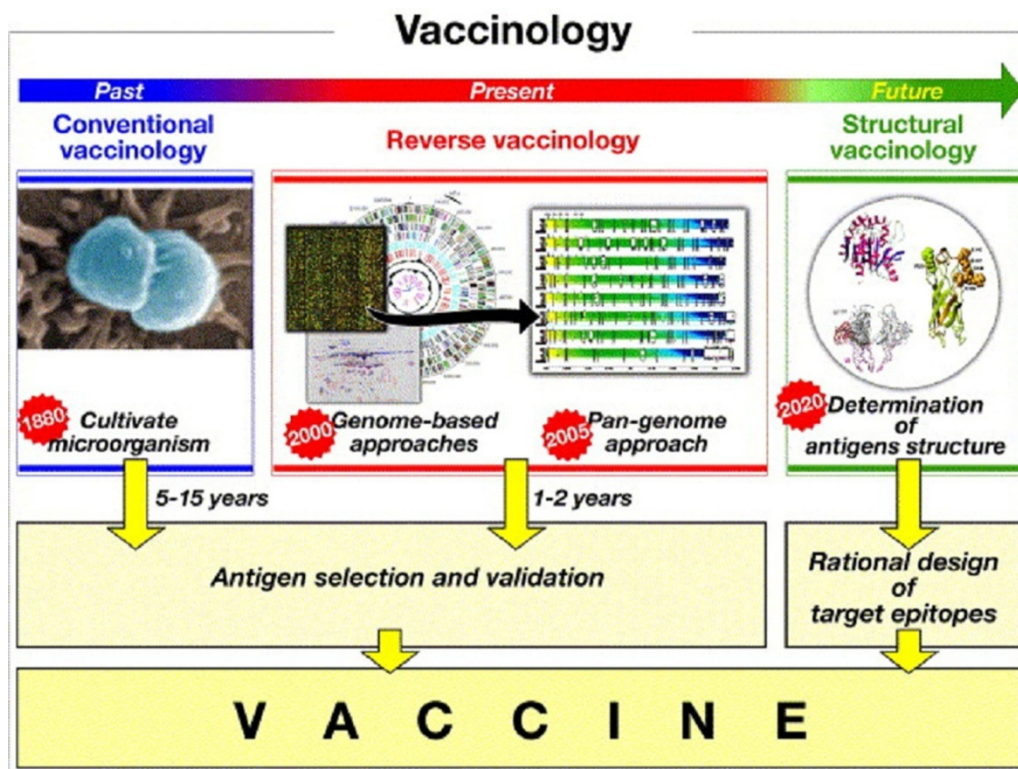


Abb. 1: Ansätze in der Impfstoffentwicklung

### 3. Zellkulturtechnologie für Grippeimpfstoffe

Seit Jahren stehen verschiedene Influenza - Impfstoffe zur Verfügung und im Lauf der Zeit wurden sie bei hoher Wirksamkeit immer verträglicher (Abb. 2).

Die Zellkulturtechnologie ist ein Herstellungsprozess, der ohne Hühnereier auskommt. Dieser neue Prozess ist eine bedeutende Innovation in der Grippeimpfstoffherstellung, denn seit über 50 Jahren werden die Grippeviren auf Hühnereiern vermehrt. Bei der Zellkulturtechnologie hingegen

wird für die Virusvermehrung anstelle der bisher verwendeten Hühnereier eine spezielle Zelllinie genutzt. Die sogenannte MDCK Zelllinie (Madin Darby Canine Kidney) wurde 1958 erstmals aus der Niere eines gesunden Hundes (Cocker Spaniel) gewonnen. Diese Zelllinie wurde erforscht und charakterisiert – sie eignet sich besonders gut für die Vermehrung von Grippeviren zur Impfstoffproduktion. Das innovative Verfahren stellt eine Weltneuheit bei der Gripeschutzimpfung dar. Es überwindet erstmals die systembedingten Nachteile der Ei-basierten Produktion, die eine flexible, dem Bedarf angepasste Impfstoffproduktion erschweren [2]. Die Zellkulturtechnologie braucht keine Hühnereier und ist deshalb flexibler und damit ggf. schneller: Lange Vorlaufzeiten wie bei der konventionellen Grippeimpfstoffproduktion auf Ei-Basis entfallen. Bisher müssen Millionen von speziellen Hühnereiern für den jährlichen Grippeimpfstoff mit einem Vorlauf von bis zu einem Jahr bestellt werden, um dann zum richtigen Zeitpunkt eingesetzt werden zu können. Die Zellen für die Grippeimpfstoffproduktion auf Zellkultur-Basis sind hingegen stets vorrätig. Sie werden tiefgefroren gelagert und können jederzeit bei Bedarf in der benötigten Menge kurzfristig aufgetaut und vermehrt werden. Mit der Impfstoffproduktion kann daher zu jedem gewünschten Zeitpunkt begonnen werden. Im Fall eines unerwartet hohen Bedarfs oder auch wenn unvorhergesehen neue Virusstämme vermehrt zirkulieren, kann kurzfristiger ein entsprechender Impfstoff bereitgestellt werden.

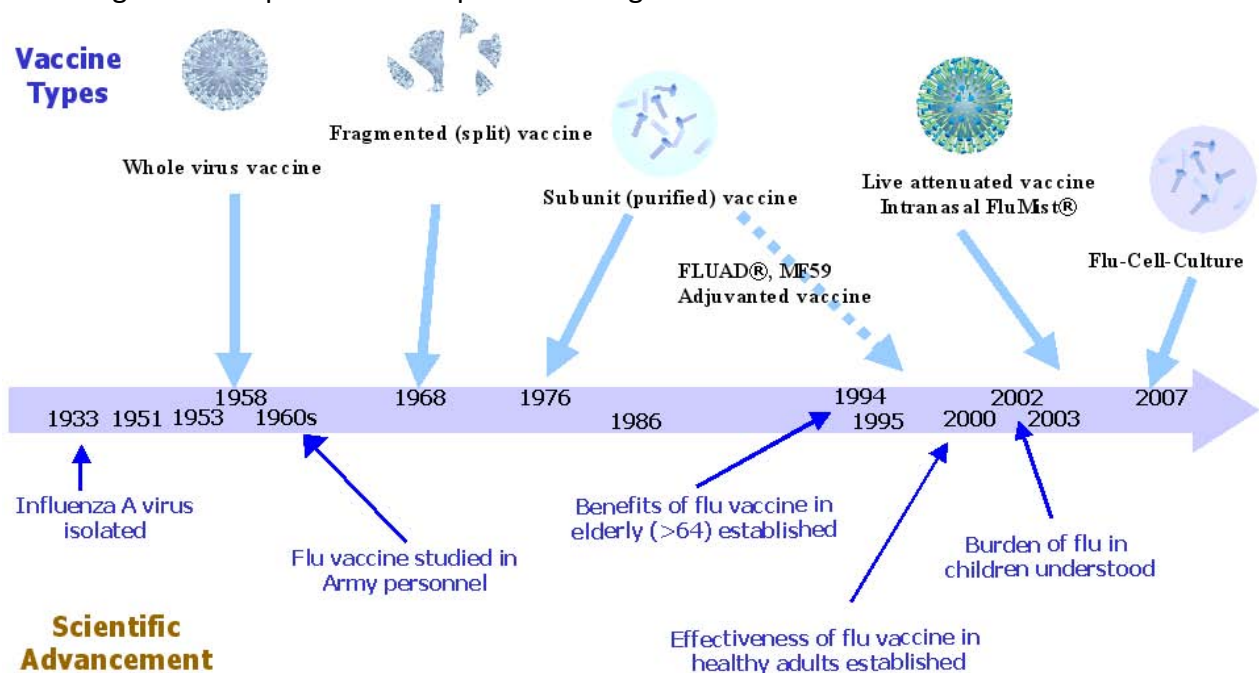


Abb. 2: Grippeimpfstoffe und deren Entwicklung

Der Zellkultur-Produktionsprozess stellt ein geschlossenes, standardisiertes System mit definierten Ausgangsmaterialien dar: Die Eigenschaften der Zelllinie, die in einem chemisch definierten Medium wächst, sind genau bekannt. Die speziell weiterentwickelten MDCK Zellen wachsen ohne Zusatz von Serum oder Proteinen und unter definierten Bedingungen (z.B. pH-Wert, Temperatur etc.). Aufgrund des geschlossenen, kontrollierten Produktionsverfahrens kommt der fertige Grippeimpfstoff ohne Zusatz von Antibiotika aus. Da die Herstellung der Zellkultur-Influenzavakzine vollkommen unabhängig vom Hühnerei ist, enthält der neue Impfstoff keinerlei Spuren von Hühnereiweiß. Deshalb können sich mit dem Zellkulturimpfstoff auch Menschen mit

Hühnereiweißallergie vor Grippe schützen. Er ist außerdem frei von Stabilisatoren, Konservierungsmitteln und Formaldehyd.

Auch im Falle der Zirkulation von Viren, die für Geflügel gefährlich sind, könnten die Hühnerbestände zur Gewinnung der benötigten Eier nur eingeschränkt oder gar nicht verfügbar sein. Kein Huhn – kein Ei – kein Impfstoff, das ist die einfache Gleichung bei der konventionellen Grippeimpfstoffproduktion auf Hühnerei- Basis. Die Zelllinie ist hingegen auch bei unerwarteten Anforderungen einsatzbereit.

Die Impfstoffproduktion-Produktion mittels Zellkultur in 5 Stufen (Abb.3)[2]:

**1. Zellvermehrung:** Die verwendete MDCK Zelllinie wurde für die Produktion von Grippeimpfstoff optimiert und bereits mit zahlreichen Virenvarianten getestet. Sie hat sich als besonders geeignet für die Produktion von Grippeimpfstoffen erwiesen, denn sie wächst in Suspension, das heißt, die Zellen benötigen keine Oberfläche zur Vermehrung. Das Suspensionsvolumen kann über weitere Medienzugabe expandiert werden, was die industrielle Produktion des Impfstoffes sehr vereinfacht. Die Zellen lagern in flüssigem Stickstoff. Zum Start der Produktion wird eine kleine Ampulle (1 ml) mit Zellen aufgetaut und in mehreren Schritten bis zu einem Volumen von mehr als 1.000 Litern in Fermentern (Edelstahlkesseln) vermehrt, das entspricht einer millionenfachen Volumensteigerung. In jedem Stadium erhalten die Zellen die optimale Umgebung für ihr Wachstum – was die Temperatur, den pH-Wert und die Nährlösung angeht. Die stufenweise



Abb. 3: Grippeimpfstoffproduktion

Vermehrung der Zellen innerhalb eines geschlossenen Systems wird unablässig mit Hilfe eines Computersystems überwacht, das alle Daten automatisch prüft und jeden Schritt genau dokumentiert. Dieses innovative Herstellungsverfahren bietet Impfstoffproduktion mit höchster Reinheit und bedeutet höchste Sicherheit für Mitarbeiter und Umwelt.

**2. Virusvermehrung:** Haben die Zellen nach den Expansionsschritten im Endvolumen ihre optimale Wachstumsdichte erreicht, werden über ein geschlossenes Rohrsystem die Influenzaviren zur Infektion der Zellen hinzugegeben. Die Viren benötigen mehrere Tage zur Vermehrung innerhalb der Zellen. Während dieses Vervielfältigungsvorganges stirbt ein großer Teil der Zellen ab und die Viren werden in das Medium freigesetzt.

**3. Aufreinigung:** Der erste Schritt einer langen Reihe von Aufreinigungsmaßnahmen ist eine sogenannte Separation, bei der die virushaltige Lösung von den Zellresten getrennt wird. Über eine Chromatographie-Säule wird das Virus anschließend von der



Medienlösung getrennt und das Volumen reduziert.

**4. Inaktivierung und Spaltung:** Die Viren werden zunächst durch einen chemischen Prozess inaktiviert. Danach erfolgt die Virusspaltung. Für den späteren Grippeimpfstoff werden nur die Oberflächenmoleküle der Influenzaviren - Hämagglutinin und Neuraminidase - benötigt. Nach weiteren Reinigungs- und Konzentrierungsschritten bleibt zum Schluss das Antigenkonzentrat eines Virusstammes übrig. Da in den saisonalen Grippeimpfstoffen drei Virusstämme enthalten sind, muss der Produktionsprozess entsprechend drei Mal durchgeführt werden.

**5. Mischen, Abfüllen und Freigabe:** Produktions- begleitend und zum Abschluss der Produktion finden fortlaufend zahlreiche Qualitätskontrollen statt. Am Ende des Prozesses wird der Impfstoff gemischt, abgefüllt und verpackt. Die endgültige Freigabe erfolgt durch die europäische Zulassungsbehörde (EMA) (Abb. 3)

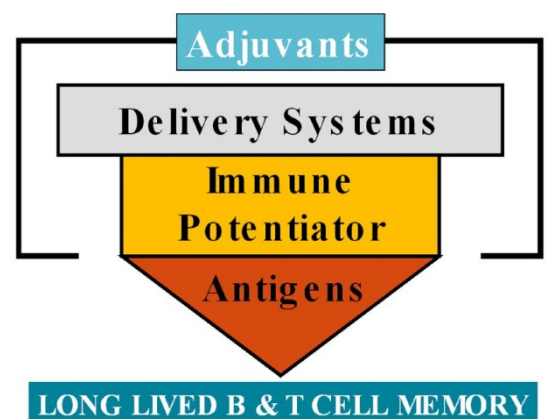
Die neue Produktionstechnologie gewinnt besondere Bedeutung im Hinblick auf die zunehmende Gefahr einer weltweiten Grippe-Pandemie. Eine schnelle Produktion großer Mengen eines geeigneten Impfstoffes ist in diesem Fall unabdingbar. Aufgrund kürzerer Vorlaufzeiten und größerer Flexibilität ermöglicht die neue Technologie eine schnellere und sicherere Impfstoffproduktion, die unabhängig von der Verfügbarkeit großer Mengen kontrollierter Hühnereier ist.

#### 4. Neuartige Impfstoff-Adjuvanzien und mukosale Impfung

Neuartige Impfstoffe, welche z.B. auf rekombinanten Proteinen basieren, sind einerseits sicherer als traditionelle Impfstoffe aber zugleich auch weniger immunogen. Daraus resultiert die dringende Notwendigkeit neue und wirksamere Hilfsstoffe, sogenannte Adjuvanzien, d.h. „Immunpotentiators“ und „Delivery Systems“ zu entwickeln. Die geringere Immunogenität von Protein- und Peptidimpfstoffen kann durch geeignete Adjuvanzien verbessert werden, und es ist es möglich mit entsprechenden Antigen-Adjuvanz-Kombinationen komplexe Immunreaktionen hervorzurufen.

Auf der Basis neuer immunologischer Einsichten wie zum Beispiel der Erkenntnis, daß eine Aktivierung des angeborenen (innate) Immunsystems Antigen-spezifische Immunantworten initiiert, verstärkt und leitet, wurden neue Adjuvanzien gefunden und entwickelt. Darüber hinaus führte die Identifizierung einzelner Zelltypen, spezifischer Rezeptoren und Signalwege, welche an der Aktivierung des Innate-Immunsystems beteiligt sind, zu einer Vielzahl neuartiger Angriffspunkte und Zielstrukturen, die bei der Entwicklung neuer Adjuvanzien ausnutzt werden können.

Innovative Impfstoffe basieren heutzutage auf bis zu drei Hauptbestandteilen: Einem Antigen, gegen welches die adaptive Immunantwort, d.h. eine Antigen-spezifischen Immunantwort, entwickelt wird. Einem Immun-potentiator, der zur einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems führt und einem



**Abb. 4:** Hauptbestandteile innovativer Impfstoffe

Delivery System, welches sowohl das Antigen als auch den Immun-potentiator an den gewünschten Angriffspunkt manövriert (Abb. 4)[3].

Eine Reihe potenter immun-stimulierender Moleküle, die z.B. aus bakteriellen Zellen oder Pflanzen gewonnen wurden, sind intensiv auf ihre Brauchbarkeit als Adjuvanzien getestet worden. Leider zeigten jedoch viele dieser Moleküle eine erhebliche Toxizität, sowohl in vorklinischen Tiermodellen als auch in klinischen Studien im Menschen.

Ein alternativer Ansatz besteht in der Entwicklung spezieller Antigen Delivery Systeme welche ähnliche Dimensionen wie natürlich vorkommende Pathogene aufweisen. Durch geeignete Delivery Systems „Verpackungen“ kann auch gewährleistet werden, daß das Antigen langsam freigesetzt wird und so über einen längeren Zeitraum die Immunisierung kontinuierlich stattfindet. Zu den Adjuvanzien, welche eine langsame Antigenfreisetzung ermöglichen, gehören Liposomen, Squalen und langsam biologisch abbaubare Mikroverpackungen, in die das Antigen eingeschlossen wird.

In Versuchen zeigten Delivery Systems, wie Emulsionen und Mikropartikel, eine Steigerung von sowohl humoraler als auch zellulär-vermittelter Immunantworten. Darüber hinaus weisen einige von ihnen auch eine akzeptable Toxizität auf, wie in einer Reihe von klinischen Studien gezeigt werden konnte.

Das Adjuvanz MF59, eine Wasser in Öl Emulsion, welche im Influenza-Impfstoff Flud<sup>®</sup> verwendet wird, wurde erstmals 1997 in Italien zugelassen. Heute ist Flud<sup>®</sup> in mehr als 20 Ländern registriert und über 30 Mio. Menschen wurden mit dem Adjuvanz-haltigen Impfstoff geimpft. Die Zulassung von Flud<sup>®</sup> und damit von MF59 ist die erste Zulassung eines neuartigen Adjuvanz für den Einsatz im Menschen nach der Registrierung unlöslicher Aluminium-Salze vor über 70 Jahren[4].

In Kombination mit zahlreichen Antigen-Klassen (rekombinante Protein-Antigene, isolierte virale Membran-Antigene, bakterielle Toxine, Protein-Zucker-Konjugate, Peptide usw.) und in verschiedenen Spezies konnte für MF59 eine starke adjuvante Wirkung nachgewiesen werden. MF59 ist besonders effektiv was die Induktion hoher Antikörpertiter betrifft, einschließlich funktioneller Titer wie neutralisierender, bakterizider und opsonophagozytischer Titer und ist für die meisten Antigene wirkungsvoller als Aluminium.

Von besonderer Bedeutung sind Adjuvanzien und Impfstoffformulierungen, die zur Entwicklung mukosaler Impfstoffe beitragen. Die Mehrzahl aller Infektionen beginnen auf mukosaler Ebene, was zu der Hypothese führte, daß eine geeignete mukosale Immunantwort (IgA) gegen derartige Pathogene zu einer besseren Abwehr beiträgt. Die mukosale Immunisierung (z.B. nasal oder oral) erscheint daher zweckmäßigsten für eine erfolgreiche Impfung gegen mukosale Pathogene. Ein weiterer Vorteil mukosaler Immunisierung besteht darin, daß sowohl eine systemische als auch eine mukosale Immunantwort induziert wird, während die systemische Immunisierung meist nur zu systemischer Immunität führt. Die Patienten „Compliance“ könnte gesteigert werden und das Risiko, Krankheiten durch unsachgemäßen Gebrauch von Spritzen zu übertragen, könnte verringert werden.

Leider zeigen jedoch die meisten klinisch relevanten Impfstoffkandidaten nach mukosaler Verabreichung nur schwache Immunantworten und haben darüber hinaus oft nicht die Fähigkeit biologische/mukosale Barrieren zu überwinden.



Die richtige Verpackung dieser Impfstoffkandidaten mittels geeigneter Adjuvanzien, wie der oben genannten Delivery Systems, ist daher ein wesentlicher Bestandteil in der mukosalen Impfstoff-Forschung. Ergänzend zu den Delivery Systems können auch mukosale Adjuvanzien, wie genetisch modifizierte und damit verträglicher gemachte bakterielle Toxine eingesetzt werden.

Toxine, wie z.B. das „heat-labile“ Enterotoxin (LT) von *Escherichia coli* und das Cholera-Toxin (CT) von *Vibrio cholerae* zählen zu den stärksten bekannten mukosalen Adjuvanzien. Sie sind dazu befähigt die mukosale Immunantwort gegen Antigene zu verbessern. Beide bestehen aus zwei Untereinheiten, nämlich der enzymatisch aktiven A-Untereinheit und der zellrezeptor-bindenden B-Untereinheit. Als Zellrezeptor dient das Gangliosid GM1, welches z.B. auf intestinalen Epithelzellen exprimiert wird (Abb. 5).

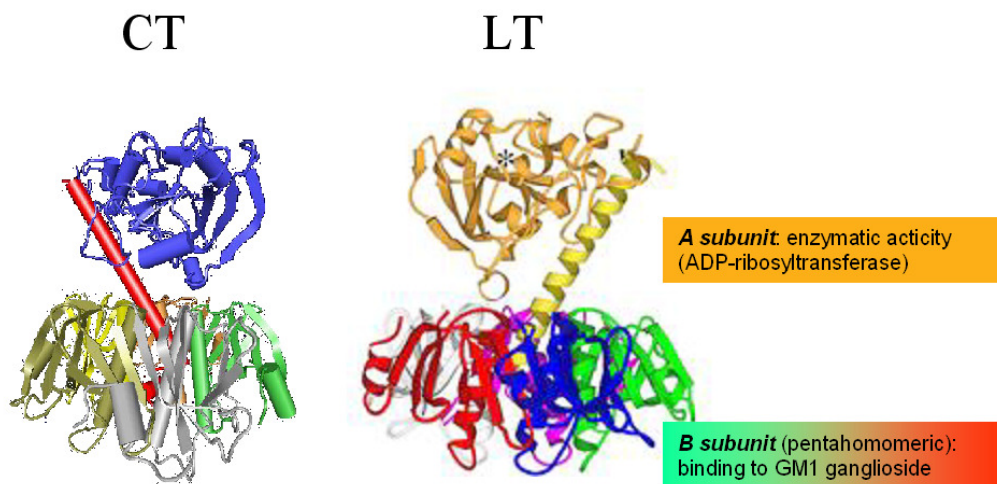


Abb. 5: Bakterielle Toxine von *Escherichia coli* (LT) und *Vibrio cholerae* (CT)

Da jedoch bei einer Anwendung als Impfstoff-Adjuvanz sowohl LT als auch CT unerwünschte Nebenwirkungen wie Durchfall oder Cholera auslösen würden, eignen sie sich in ihrer „Wildtyp“ Form nicht zur Applikation im Menschen. Genetische Modifizierungen führten zu Mutanten mit verringerter Toxizität unter Beibehaltung ihrer adjuvanten Wirkung (Abb. 6) [5].

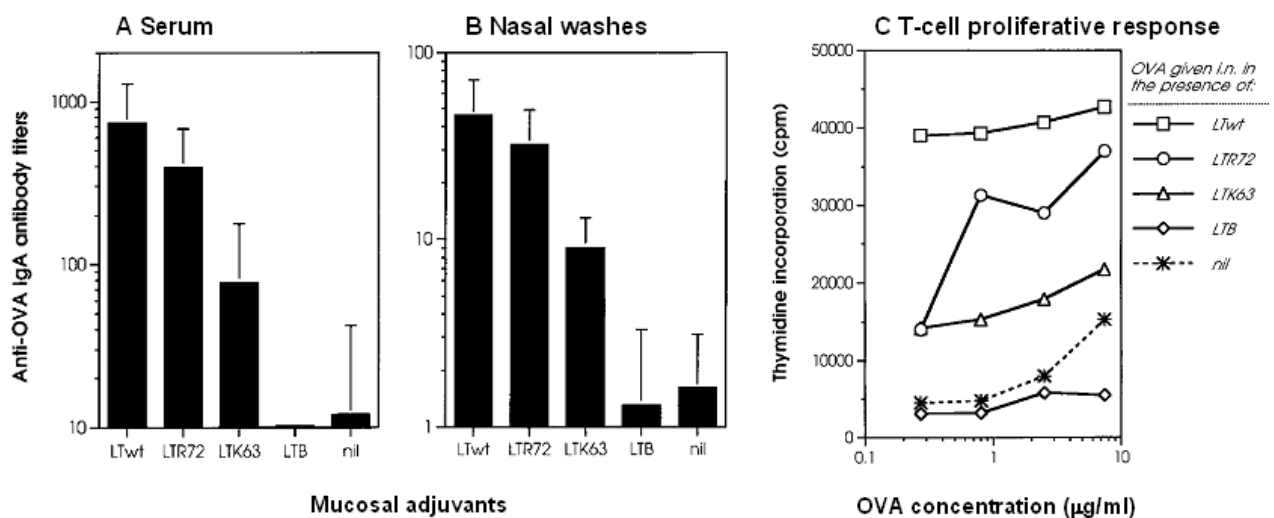


Abb. 6: IgA immune responses to OVA in sera (A) and in nasal washes (B) of mice immunized intranasally three times with OVA alone or OVA in combination with wild-type LT, LTR72, LTK63, and rLTB. Results are shown as mean titers and error bars indicate the standard deviation from the mean titer. T cell proliferative response (C) to OVA. T

cell proliferative response to OVA in spleen cells from mice immunized intranasally for two times with OVA alone or OVA in combination with wild-type LT, LTR72, LTK63, and rLTB

Präklinische Toxizitätsstudien und klinische Studien im Menschen im Rahmen einer intranasalen Influenza-Impfstoff Studie, weisen auf die Unbedenklichkeit einer LT Toxin Mutante (LTK63) hin. Zusätzliche Studien in Tiermodellen zeigten, daß die Kombination eines bio-adhesiven Delivery Systems mit dem Adjuvanz LTK63 einen synergistischen Effekt hat und zu einer weiteren Steigerung der Antigen-spezifischen Immunantwort nach nasaler Applikation führt (Abb. 7)[6]. Bio-adhesive Delivery Systems wirken vor allem über die Förderung der Wechselwirkung und der Verlängerung des Kontakts zwischen Antigen und Adjuvanz mit mukosalen Epithelzellen.

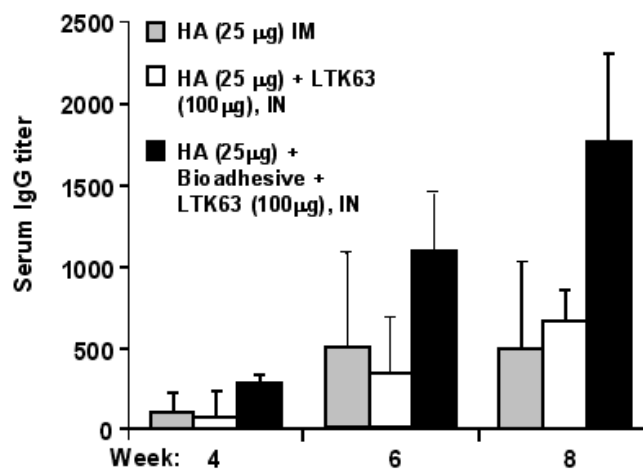


Abb. 7: Die Kombination eines bio-adhesiven Delivery Systems mit dem Adjuvanz LTK63 (schwarze Balken) zeigt einen synergistischen Effekt und führt zur Steigerung der Antigen-spezifischen Immunantwort nach nasaler Applikation (gemessen als Serum IgG Titer).

## 5. Schlussfolgerung

Fortschritte im Verständnis des Immunsystems helfen bei der Entwicklung besserer Impfstoffe. Dies in Kombination mit der Verbesserung pharmazeutischer Technologien und der Formulierung geeigneter immun-stimulierender Moleküle und Delivery Systems ermöglicht es, immer bessere Impfstoffe für den weltweiten Bedarf herzustellen. Der Einsatz neuartiger Adjuvanzen könnte daher auch die Anwendung von Impfstoffen im therapeutischen Bereich ermöglichen, und somit zusätzlich zur Ausrottung von Infektionskrankheiten, Fortschritte bei der Bekämpfung von Krebs erzielen oder zur Verbesserung von Autoimmunkrankheiten beitragen.

## 7. Literatur

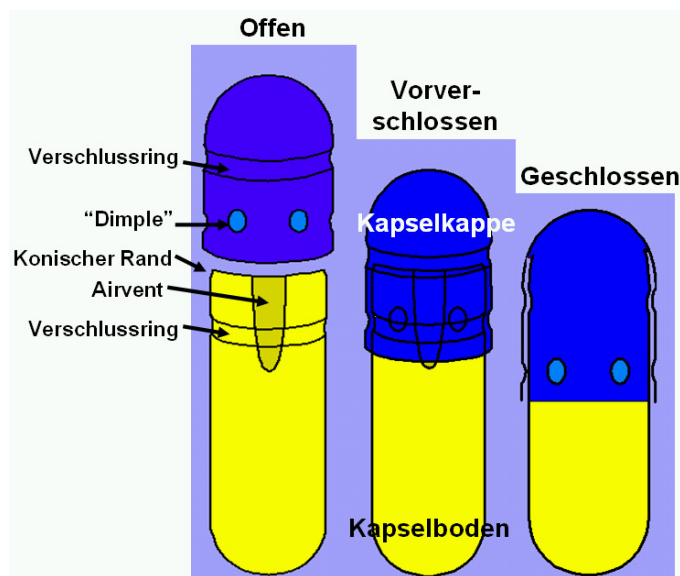
1. Serruto, D. and R. Rappuoli, *Post-genomic vaccine development*. FEBS Lett, 2006. **580**(12): p. 2985-92.
2. *Flu Cell Culture Technology: The Next Frontier*. 2006, Novartis AG [www.novartisvaccines.com/pipeline/flu\\_culture.shtml](http://www.novartisvaccines.com/pipeline/flu_culture.shtml)
3. O'Hagan, D.T. and N.M. Valiante, *Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants*. Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(9): p. 727-35.
4. O'Hagan, D.T., *MF59 is a safe and potent vaccine adjuvant that enhances protection against influenza virus infection*. Expert Rev Vaccines, 2007. **6**(5): p. 699–710.

5. Giuliani, M.M., et al., *Mucosal adjuvanticity and immunogenicity of LTR72, a novel mutant of Escherichia coli heat-labile enterotoxin with partial knockout of ADP-ribosyltransferase activity*. J Exp Med, 1998. **187**(7): p. 1123-32.
6. Singh, M., M. Briones, and D.T. O'Hagan, *A novel bioadhesive intranasal delivery system for inactivated influenza vaccines*. J Control Release, 2001. **70**(3): p. 267-76.

**1. Grundlagen**

Hartkapseln (auch Steckkapseln oder ‚two piece capsules‘ genannt) gehören neben den Tabletten zur weit verbreitetsten oralen Darreichungsform. Durch ihre hohe Flexibilität eignen sie sich besonders für moderne Formulierungen zur gesteuerten Arzneimittelfreisetzung auch Drug Delivery Systems genannt. Im Jahre 2007 wurden weltweit etwas 370 Milliarden Hartkapseln hergestellt.

Hartkapseln bestehen aus vorgeformten Zylindern, die jeweils an einem Ende hemisphärisch abgeschlossen sind. Durch die in ihrem Durchmesser etwas breitere Kapselkappe lassen sich Kapselkappe und Kapselboden mit ihren jeweiligen offenen Enden einfach ineinander schieben und durch einen Verschlussring miteinander verschließen. Um den Ansprüchen der zunehmenden großtechnischen Hochleistungsabfüllmaschinen gerecht zu werden, wurden weitere Eigenschaften hinzugefügt. Kleine punktförmige Einbuchtungen („Dimple“) unterhalb des Verschlussringes der Kapselkappe stellen einen Vorverschluss dar, der das separieren von Kapselkappe und Kapselboden während des Transportes oder vor dem Befüllungsschritt verhindert. Um das schnelle Verschließen der Kapseln sicherzustellen, wurden ‚Airvents‘ eingefügt, bei denen es sich um Abflachungen oder kleine Kanäle im oberen Bereich des Kapselbodens handelt, der den schnellen Luftaustritt sicherstellt. Ebenso wurde die Kapselwand am offenen Ende des Kapselbodens konisch nach innen gestaltet, um das direkte aufeinander treffen der beiden Kapselwände beim Verschließen zu verhindern (Abb. 1).

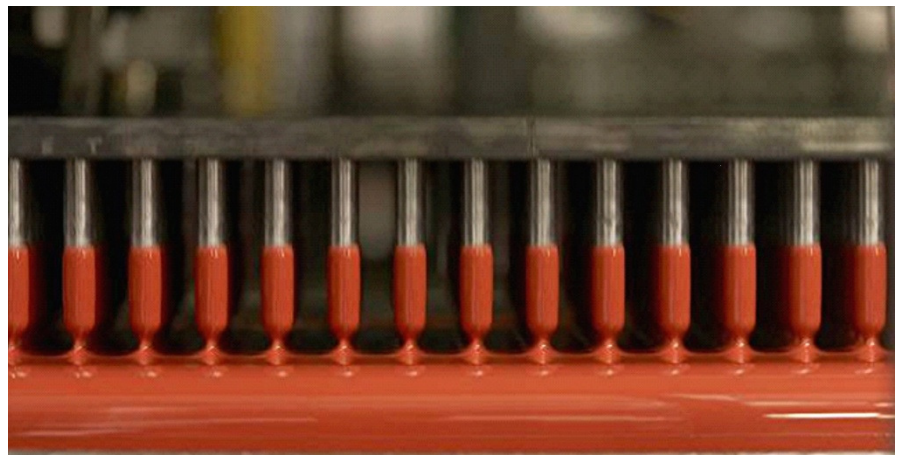


**Abb. 1:** Design Charakteristika von Hartkapseln: Die Kapseln werden im vorverschlossene Zustand geliefert.

Hartkapseln werden aus Gelatine hergestellt oder anderen Materialien wie Hydroxypropylmethylcellulose) HPMC haben in den letzten Jahren vermehrt Eingang in die pharmazeutische Entwicklung gefunden. Hartkapseln können entweder farblos oder farbig sein bzw. transparent oder opak. Farbige Kapseln erhält man durch Hinzufügen von Farbstoffen zu einer Standardgelatinelösung, wird auch noch Titandioxid hinzugefügt, entstehen opake Kapseln, bzw. wird nur Titandioxid genommen, erhält man weiße Kapseln.

Die Herstellung von Hartkapseln erfolgt nach dem Colton-Verfahren, bei dem Tauchstifte, in die das Kapseldesign eingepreßt ist, in die wässrige Gelatine- oder Polymerlösung, die mit Titandioxid und/oder Farbstoffen versetzt sein können, eintauchen um diese mit einem dünnen Film zu überziehen, der abschließend erstarrt und getrocknet wird (Abb. 2).

Die so geformten Kapselhüllen werden von den Tauchstiften abgezogen, auf die entsprechende Länge geschnitten und vorverschlossen. Nach der Herstellung können Kapseln zur besseren Identifizierung bedruckt werden. Dies erfolgt beim Hersteller auf



separaten Bedruckungs-  
maschinen (Abb. 3).

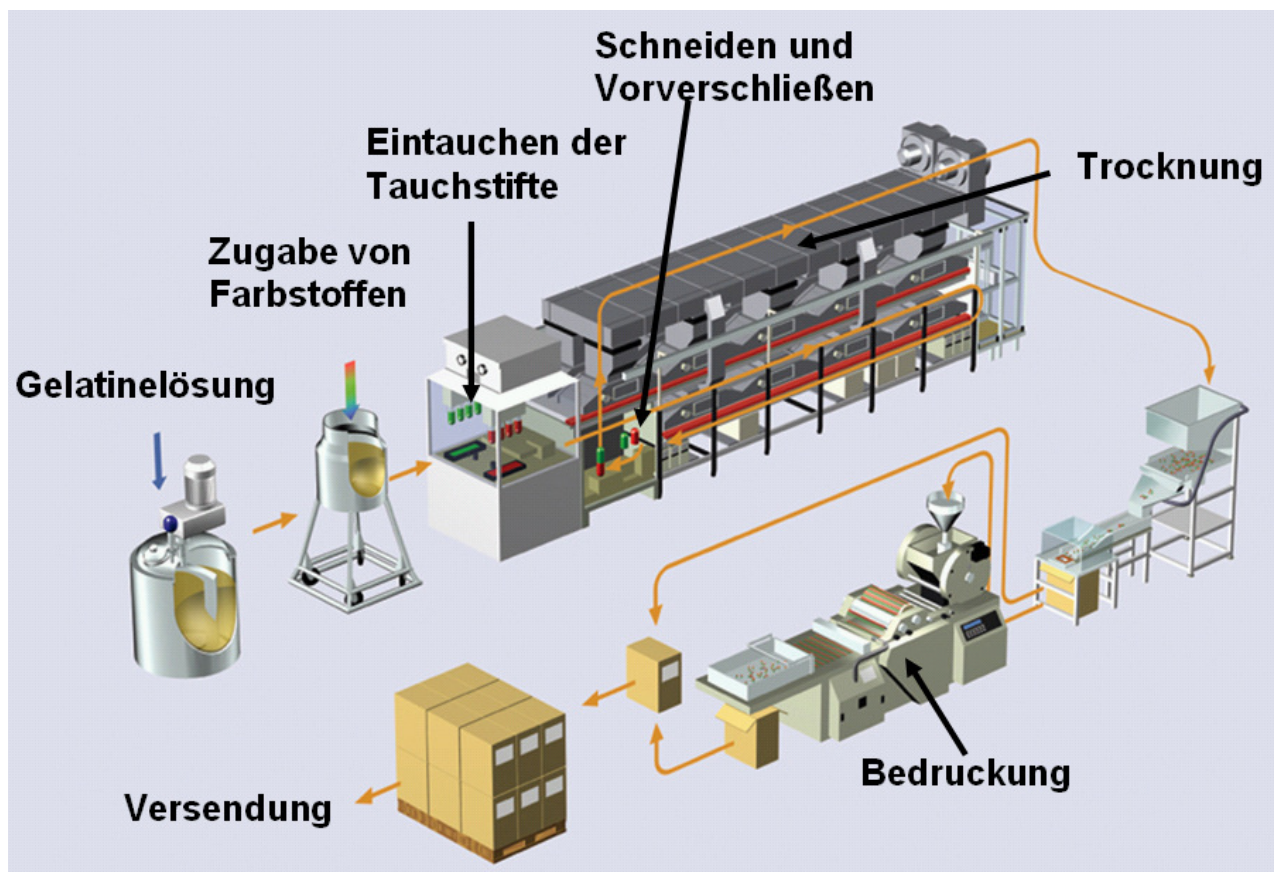
**Abb. 2: Tauchstifte nach Eintauchen in eine Gelatinelösung**

Arzneibuchmonographien für Kapseln finden sich in allen anerkannten Arzneibüchern, die von Inhalt her nur unwesentlich variieren. In den meisten Monographien werden Kapseln in Weichkapseln und Hartkapseln unterschieden. Weitere Unterscheidungen werden etwa im Amerikanischen Arzneibuch gemacht, wenn zwischen Kapseln und Kapseln mit verzögerter Freisetzung unterschieden wird, wobei in den meisten Fällen die Freisetzung über Granulate oder Pellets gesteuert wird, sowie eine Monographie ‚Gastroresistente Kapseln‘ im Europäischen Arzneibuch.

Hartgelatinekapseln bestehen aus Gelatine, den Farbstoffen und Wasser. Weichmacher oder andere Zusätze entfallen bei Hartgelatinekapseln, da das absorbierte und zum Teil chemisch gebundene Wasser in der Gelatine kapsel als Weichmacher fungiert. Deshalb sollten die Lagerbedingen von Hartgelatinekapseln zwischen 15-25°C und 35-65 %rF liegen. Unter diesen Bedingungen haben die Hartgelatinekapseln einen Wassergehalt von 13 – 16 %, der ihnen die ausreichende mechanische Flexibilität verleiht. Werden Hartgelatinekapseln außerhalb dieser Bedingungen gelagert, neigen sie bei weiterem Wasserverlust zu Verspröden und damit brüchig zu werden, oder bei weiterer Feuchtigkeitsaufnahme klebrig zu werden und sich zu verformen. Hartgelatinekapseln lösen sich schnell in wässrigen Lösungen bei 37°C so dass bereits nach 2 Minuten der Inhalt freigesetzt wird. Aldehyde (speziell Formaldehyd), die unter Umständen als Verunreinigung in Hilfsstoffen vorkommen, können zu Quervernetzungen der Gelatinketten führen und die Löslichkeit der Kapseln erheblich herabsetzen. Diese als chemisches Cross-linking bezeichnete Quervernetzung ist irreversible und wird auch nicht durch Magenenzyme (Pepsin,



Pankreatin) aufgelöst und unterscheidet sich damit von der als Stress-Crosslinking bezeichneten Quervernetzung, die bei gleichzeitiger längerer Lagerung bei hohen Temperaturen und hoher Feuchtigkeit entsteht. Hierbei handelt es sich um Quervernetzungen zwischen den Gelatineketten, die von den Enzymen des Magens leicht gespalten werden können und das Auflösen der Kapseln in vivo deshalb nicht beeinträchtigen. Es sollte an dieser Stelle darauf hingewiesen sein, dass das Stress-Crosslinking einfach und effektiv durch Auswahl eines feuchtigkeitsundurchlässigen Packmaterials verhindert werden kann und somit kein Problem für die Arzneimittelqualität darstellt.



**Abb. 3: Herstellungsprozess von Hartkapseln einschließlich Bedruckung.**

Kapseln werden in verschiedenen, genormten Größen angeboten [1]. Die Größen sind durch Zahlen wiedergegeben, wobei 000 die größte Kapsel für humane Arzneimittel darstellt und dann über die Größen 00, 0, 1 bis 5 zur Kleinsten gelangt (Abb. 4). Um das Angebot an Abfüllvolumina zu erweitern, wurden im Laufe der Jahre durch Verlängerung des Kapselbodens einzelner Größen sogenannte „elongated“ Größen entwickelt (z.B. 0el, 1el u.a.) Des Weiteren wurden die Hartkapseln hinsichtlich des Designs weiterentwickelt um den zunehmenden Anforderungen gerecht zu werden. Heute stehen deshalb spezielle Hartkapseln für flüssige Formulierungen (z.B. Licaps™), Kapseln für Doppelblindstudien (DBcaps™) und für Tierversuche mit Nagetieren (PCcaps™, Abb. 4) zur Verfügung.





## **2. Hartkapseln in der präklinischen und frühen klinischen Phase**

In der präklinischen und frühen klinischen Phase spielen Hartkapseln aufgrund ihrer Einfachheit und Effektivität eine entscheidende Rolle. Zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung, wenn es um den so genannten Proof-of-Concept geht, also der Bestätigung der Wirksamkeit des neuen Arzneimittels in der angestrebten Indikation, ist zumeist nur eine sehr geringe Menge des neuen Arzneistoffes vorhanden, sodass größere Entwicklungsarbeiten (z.B. Hilfsstoffkompatibilität und –stabilität) auf ein Mindestmaß reduziert werden sollten. Ist die Löslichkeit des Arzneistoffes in Wasser und seine Bioverfügbarkeit ausreichend, füllt man mittels einer Präzisionsabfüllmaschine (z.B. Xelodose™) den reinen Arzneistoff in eine Hartkapsel. Sollten lösungsverbessernde Maßnahmen notwendig sein, kann dies über einfache Pulverformulierungen mit oder ohne Granulierung geschehen. Hierzu sind lediglich wenige Hilfsstoffe erforderlich, wie etwa Zerfallsbeschleuniger (z.B. 2.0 % Croscarmellose, 3.0 %), Benetzungsmittel (z.B. 0.5% Natriumlaurylsulfat, 1.0 % Tween 80), Gleitmittel (z.B. 0.5% Siliziumdioxid) und Fließregulierungsmittel (z.B. 0.5% Magnesiumstearat). Im Falle sehr schwerlöslicher Arzneistoffe müssen gezielt verschiedene Modifikationen des Arzneistoffes und verschiedene Formulierungsansätze entwickelt werden [4]. Beispielsweise kann der Arzneistoff in einem einfachen Lösungsvermittler (z.B. Sesamöl oder Tween 80™) gelöst und in eine Hartkapsel mittels einer Abfüll- und Verschweißmaschine (z.B. CFS 1200™) gefüllt werden.

## **3. Hartkapseln in der späten klinischen und kommerziellen Phase**

In der Regel beginnt erst nach dem Proof-of-Concept die Entwicklung der kommerziellen Formulierung, die bis zum Eintritt in die klinische Phase III stehen sollte. Die physiko-chemischen und biopharmazeutischen Charakteristika des Arzneistoffes bestimmen hierbei den einzuschlagenden Formulierungsweg.

In der Regel wird versucht die Formulierung und den Herstellungsprozess so einfach wie möglich zu halten um die maximale Prozessrobustheit zu erhalten; um die größtmögliche Flexibilität hinsichtlich der Rohstoffversorgung (Arzneistoff und Hilfsstoffe) sowie der Herstellungsbetriebe zu haben. Da einfache Hartkapselformulierungen, die häufig bereits in der präklinischen und frühen klinischen Phase zum Einsatz kommen, robuste und leicht in den industriellen Maßstab überführbare Formulierungen darstellen, lassen sich diese meist schneller entwickeln als alternative Formulierungen, vor allem auch vor dem Hintergrund, dass eine spätere Bioäquivalenz mit der frühen klinischen Formulierung entfällt.

Für komplizierte Arzneistoffe, z.B. Arzneistoffe mit geringer Bioverfügbarkeit oder inter- und intra-individuellen Schwankungen werden häufig verschiedene parallele Formulierungsansätze verfolgt. Partikelgrößenverkleinerungen etwa durch Solid Lipid Nanopartikel (SLN), selbstemulgierende Systeme wie Self-(Micro)-Emulsifying Drug Delivery Systems (SEDDS oder SMEDDS) oder Feste Dispersionen die den Arzneistoff in einer amorphen Form stabilisieren sollen, gehören heute zum festen Repertoire der Entwickler [4, 11, 12]. Um diese Systeme in eine feste Darreichungsform zu überführen müssen sie entweder zu Tabletten komprimiert werden oder einfach in Kapseln gefüllt werden. Um die zunehmende Komplexität und Festlegung auf bestimmte Dosierungen bei der Tablettierung zu vermeiden werden diese zunehmend in Hartkapseln gefüllt.

Im anschließenden Scaling-up Prozess müssen die Formulierungen und deren Verarbeitung zu festen oralen Darreichungsformen in einen großtechnischen Maßstab überführt werden. Zur Abfüllung von Hartgelatinekapseln mit festen und flüssigen Formulierungen werden die Kapseln erst ausgerichtet, so dass sich der Kapselboden nach unten und die Kapselkappe nach oben orientiert, dann geöffnet, befüllt, verschlossen und ausgeworfen (Abb. 6).

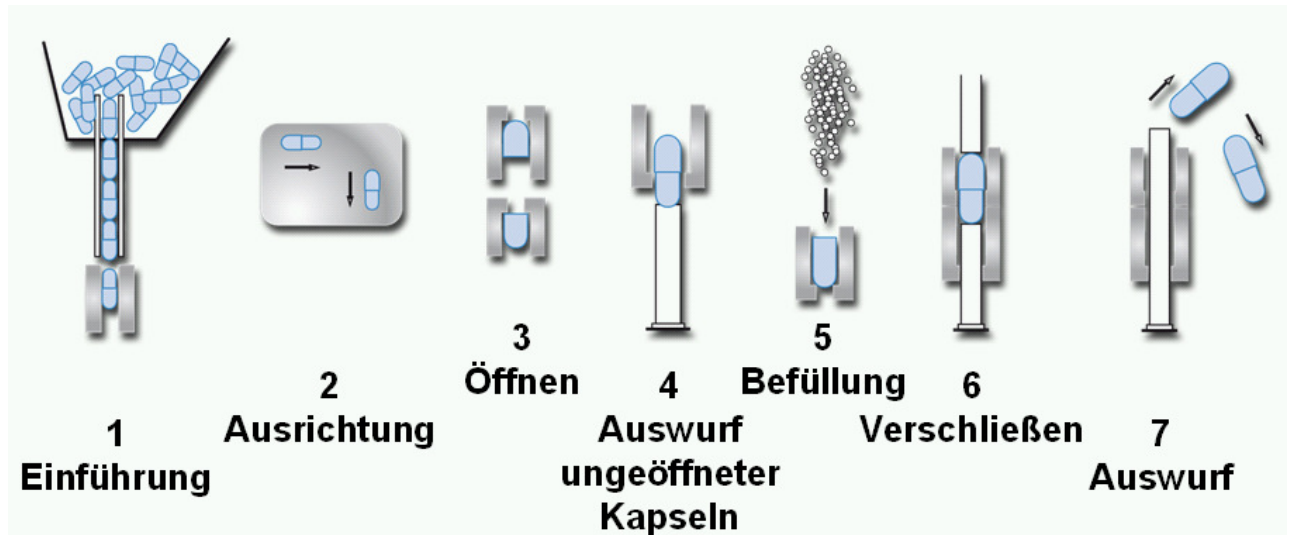


Abb. 6: Schematische Darstellung der Abfüllung von Hartkapseln

Eventuell nicht geöffnete Kapseln werden vor der Befüllung ausgeworfen. Sollen verschiedene Formulierungen in eine Kapsel gefüllt werden, findet dies auf zusätzlichen Abfüllstationen statt. Bei der Befüllung von Hartkapseln mit flüssigen oder halbfesten Formulierungen, erfolgt in einem weiteren Schritt die Versiegelung der Kapseln. Dies kann entweder durch eine Banderolierung geschehen oder durch ein „Verschweißen“ von Kapselboden und Kappe mittels einer hydroalkoholischen Lösung (LEMS™ Verfahren, Abb. 7). Hierzu wird die Lösung zwischen Kappe und Boden gesprüht und durch kapillare Kräfte im Zwischenraum verteilt. Die Gelatine löst sich leicht an, wodurch die Glastransitionstemperatur der Gelatine so stark sinkt, dass sie durch eine kurze Erwärmung in einem Luftstrom überschritten werden kann und die Gelatine von Kappe und Boden verschmelzen.

In der klinischen Phase III wird nicht nur die Wirksamkeit des neuen Arzneistoffes geprüft, sondern auch die Wirksamkeit mit anderen bereits zugelassenen Medikamenten innerhalb der gleichen Indikation verglichen. Diese so genannten Vergleichsstudien erfordern allerdings, dass weder der Arzt, noch der Patient weiß, welche Medikation er erhält, die Studie also „doppeltblind“ durchgeführt wird. Zur Verblindung der verschiedenen Medikationen wird häufig die einfache Verkapselung gewählt. Um allerdings das potentielle Öffnen der Kapseln zum Zwecke der Identifizierung der Medikation durch den Arzt oder Patienten zu vermeiden und um auch größere Tabletten und Kapseln effizient zu verkapseln, hat sich in den letzten Jahren eine spezielle Kapsel für klinische Studien durchgesetzt (z.B. DBcaps™). Diese Kapseln sind durch einen größeren Durchmesser und eine tief nach unten gezogene Kapselkappe geprägt, die ein Wiederöffnen praktisch unmöglich macht.

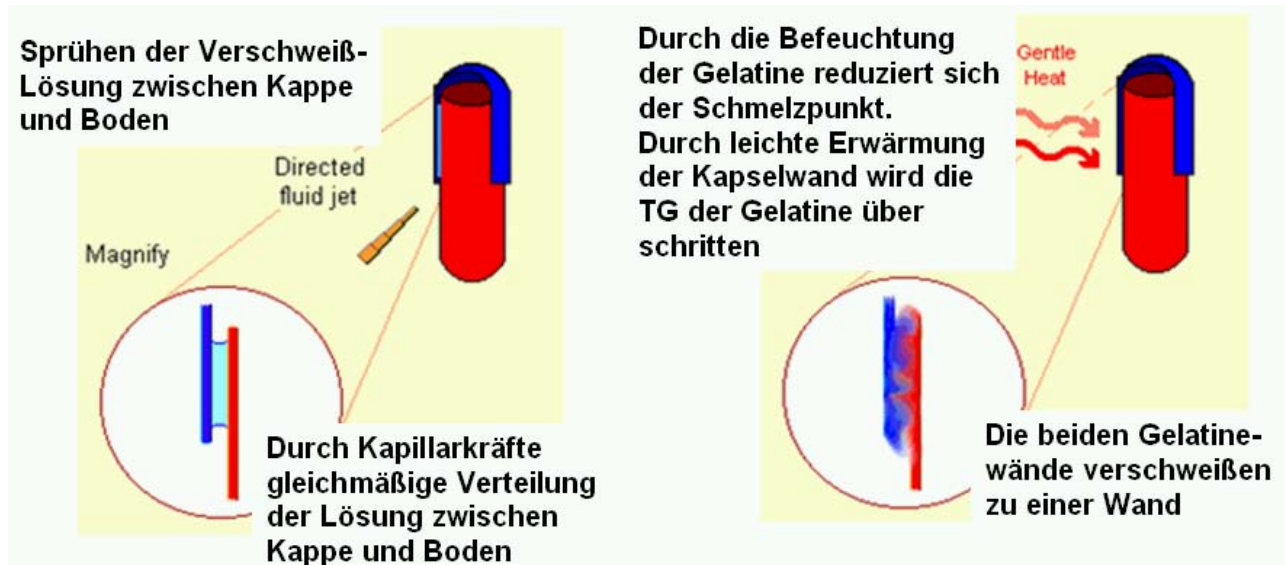


Abb. 7: Verschweißen von Hartkapseln mit hydroalkoholischer Lösung (LEMS™ Verfahren)

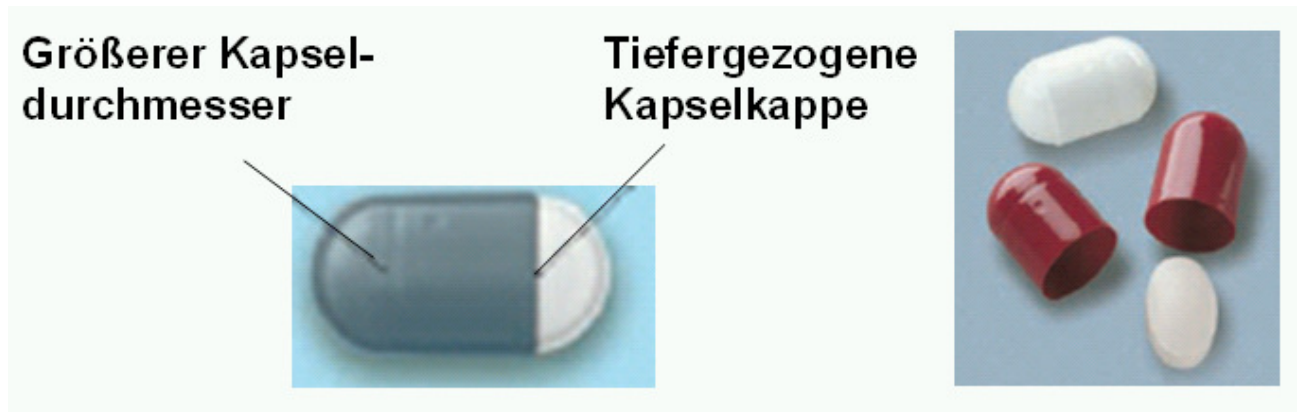


Abb. 8: Kapseln zur Verblindung klinischer Studien (z.B. DBcaps™)

#### 4. Hartkapseln für Inhalation

Eine spezielle Darreichungsform stellt die Kapsel für die Inhalation dar. Hierzu werden die Kapseln mit einer Einzeldosis befüllt, wobei die Dosis lediglich im Mikrogrammbereich liegt. Zur Anwendung werden die Kapseln in einen Inhalator gegeben. Bei der Aktivierung des Inhalators werden die Kapseln an beiden Enden durchstochen, sodass durch die sich ergebenden Löcher beim Einatmen durch den Inhalator die Pulvermischung, bei der es sich zumeist um auf Laktose aufgetragenen Arzneistoff handelt, aus der Kapsel getragen wird. Im Applikator wird die Pulvermischung über einen Zyklon fein dispergiert und gelangt so in den alveolaren Bereich der Lunge.

Hartkapseln für Inhalationspräparate (z.B. Spiriva™, Abb. 9) entsprechen denen für orale Formen. Allerdings muss sichergestellt werden, dass in einem Gram Kapseln nicht mehr als 200 TAMC (TAMC = Total Aerobic Microbial Counts, ausgedrückt in CFU/g oder CFU/ml (CFU = Colony Forming Units)) und 20 TYMC (TYMC = Total Yeast and Mould Counts, ebenfalls als CFU/g oder CFU/ml ausgedrückt), vorhanden sind. Desweiteren muss auch die Abwesenheit von

Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa und von bile-tolerant gram-negativen Bakterien gewährleistet werden.



Abb. 9: SPIRIVA™ als Beispiel für Inhalationskapseln

### 5. Abfüllung von Hartkapseln

Zur Abfüllung von Hartkapseln stehen heute hauptsächlich zwei großtechnische Verfahren zur Verfügung, die Dosierscheibenmethode und die Dosierstempelverfahren [5-8].

Bei der Dosierscheibenmethode (Abb. 10, links) wird die Füllmenge über die Dosierscheibe bestimmt. Durch fünfmaliges Stampfen wird ein vorverdichteter Pulverformling (Pulver-plug) erhalten, der beim sechsten Mal in den Kapselboden überführt wird. Wie auch beim Dosierstempelverfahren, wird beim Dosierscheibenverfahren die Pulvermischung lediglich mit ca. 20 N Druck komprimiert und ist damit weit vom Kompressionsdruck bei Tabletten von ca.  $3 \times 10^4$  N entfernt. Der so geformte Pulver-plug dient somit nur der sauberen Überführung in die Kapsel, zerfällt allerdings bei leichter mechanischer Beanspruchung wieder in seine Einzelbestandteile.

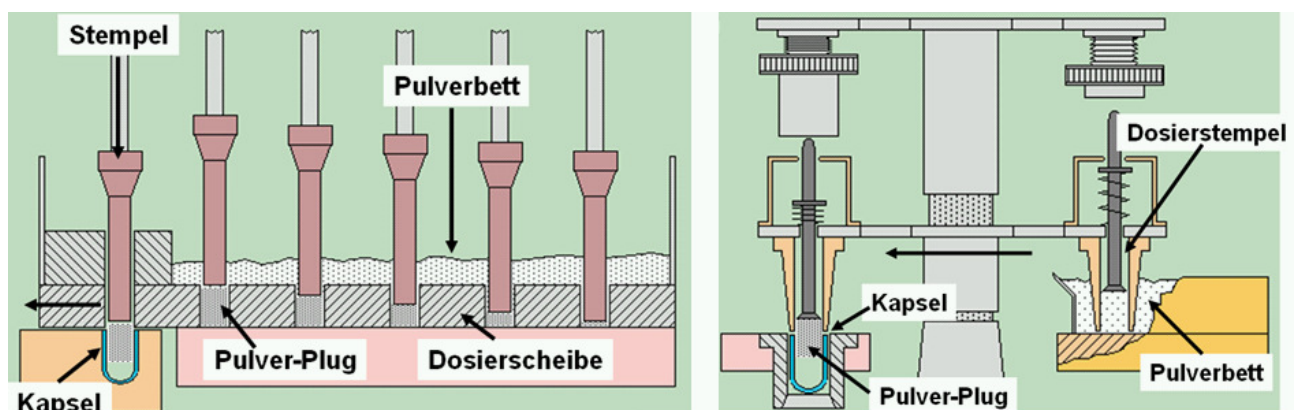


Abb. 10: links: Dosierscheiben- oder Stopfverfahren, rechts: Dosierstempel- oder Dosierrohrverfahren

Beim Dosierstempelverfahren (Abb. 10, rechts) taucht der Dosierstempel in ein Pulverbett ein, wobei das Pulver durch einen weiteren Druck des Stempels innerhalb des Dosierers vorverdichtet wird (Pulver-plug). Der Dosierer wird anschließend aus dem Pulverbett herausgezogen und zum



Kapselboden gefahren, wo der Pulver-plug durch einen erneuten Stoss des Stempels aus dem Dosierer in den Kapselboden geschoben wird. Die Füllmenge wird beim Dosierstempelverfahren durch die Höhe des Pulverbettes gesteuert.

Ein weiteres Verfahren ist die Füllschnecke. Hierbei wird aus einem Pulverbett über eine Schnecke durch dessen Drehung Pulver in einen Kapselboden überführt (Abb. 11). Zur Abfüllung von Pellets oder Minitabletten, werden auch Dosierkammer- oder Dosierstempelverfahren verwendet. Beim Dosierkammerverfahren wird durch das Verschieben von Trennscheiben die Dosierkammer geöffnet in die das Produkt fließt. Anschließend verschließt die Trennscheibe die Dosierkammer vom Produkt und gleichzeitig öffnet sich die Trennscheibe am Boden der Dosierkammer, sodass das Produkt in die Kapseln fließt (Abb. 12, links).

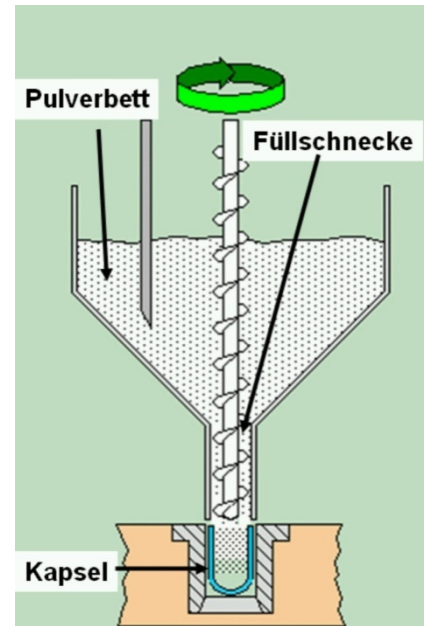


Abb. 11: Füllschnecken- oder Spindel-dosierverfahren

Stempel unter das Produkt, sodass das Produkt einfließen kann. Der Dosierstempel fährt aus dem Produkt und kann durch Absenkung sein Volumen vergrößern und unter ein zweites Produkt fahren und es aufnehmen. Am Ende senkt sich der Dosierstempel so tief, dass das Produkt über ein seitliches Dosierröhrchen in die Kapsel überführt werden kann. Das Trennscheiben- und Dosierstempelverfahren stellt ein volumetrisches Abfüllverfahren dar, das vor allem bei multipartikulären, freisetzungsgesteuerten Drug Delivery Systemen Anwendung findet.

Zur Abfüllung von flüssigen und halbfesten Zubereitungen kommen spezielle Dosierpumpen zum Einsatz. Diese arbeiten nach einem „Spritzenprinzip“ indem Kolben das Produkt aus dem Vorratsbehälter in eine Dosierkammer ziehen. Nach Absenken der Füllnadel, wird der Zugang zum Produktbehälter unterbrochen und der Ausgang zur Füllnadel geöffnet, so dass der Kolben das Produkt nun direkt in die Kapsel füllt.

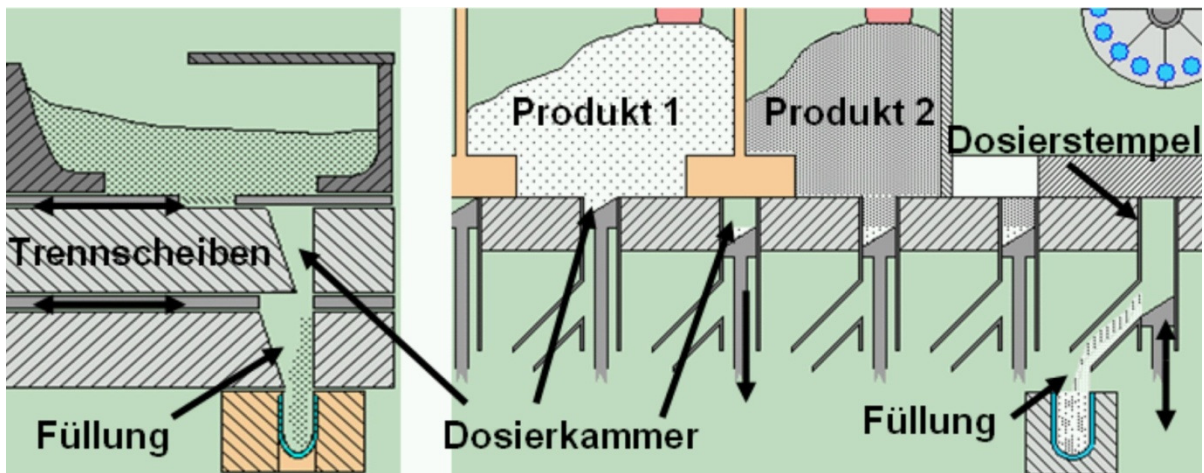


Abb. 12: links: Trennscheibenverfahren, rechts: Dosierstempelverfahren

## 6. Hartkapseln als Darreichungsform

Bei der Entwicklung von Arzneimitteln steht die Wirksamkeit, Sicherheit und Qualität im Vordergrund. Während die Wirksamkeit hauptsächlich eine Eigenschaft des Wirkstoffes ist, wird die Sicherheit und Qualität stark durch die Darreichungsform beeinflusst. Durch gezielte und verzögerte Freisetzung des Arzneistoffes durch Multipartikuläre Systeme (überzogene Pellets, Pellets mit verschiedener Freisetzung, etc) kann der Plasmaspiegel sehr konstant im therapeutischen Bereich gehalten werden und verhindert dadurch Nebenwirkungen aufgrund zu hoher Plasmaspiegel bzw das Absinken unter den therapeutischen Plasmaspiegel und damit die Unwirksamkeit des Arzneimittels. Allerdings hat die Forschung der letzten Jahre gezeigt, dass sich die Patienten hinsichtlich ihrer ADME erheblich voneinander unterscheiden und deshalb zukünftig mehrere individuelle Dosierungen zur Verfügung stehen müssen. Dies gilt vor allem für geriatrische Patienten (> 65 Jahre), die aufgrund unserer demoskopischen Entwicklung den größten Teil der Arzneimittelanwender im Jahre 2020 darstellen werden.

Für diese Patientengruppe kommen zahlreiche andere Faktoren hinzu, die eine Herausforderung an die Arzneimittel-Compliance stellen. Patienten > 65 Jahre leiden zunehmend an audiovisuellen und kognitiven Defiziten sowie nachlassenden motorischen Fähigkeiten. Um diesen Faktoren Rechnung zu tragen, sollte die Darreichungsform der Zukunft, leicht und eindeutig identifizierbar sein, in verschiedenen Dosierungen zur Verfügung stehen. Durch den gezielten Einsatz verschieden freisetzender Pellet, bzw Pellets mit verschiedenen Arzneistoffen sollte die Arzneimitteltherapie so überschaubar und einfach gestaltet werden, so dass sie auch für geriatrische Patienten unabhängig durchführbar ist. Kapseln werden in diesem Bereich mit Sicherheit eine entscheidende Rolle spielen, da sie die größtmögliche Flexibilität eines Drug Delivery Systems aufweisen, das verschiedene Pellet, Granulate, Pulver, Flüssigkeiten und diese in Kombination aufnehmen können. Durch die Verwendung intensiver Farbkombinationen zuzüglich informationstragender Aufdrucke lassen sie sich leicht identifizierbar und unterscheidbar gestalten [9, 10].

## 7. Literatur

1. <http://www.capsugel.com/>
2. Stegemann S.; Hartgelatine kapseln – Aktueller Stand und Perspektiven. PZ Prisma 5; 1, 42-56 (1998)
3. Pharmaceutical Capsules. Eds: Podczec F. & Jones B. Pharmaceutical Press (2004)
4. Stegemann S et al.; When poor solubility becomes an issue: From early stage to proof of concept. Eur J Pharm Sci 31, 249-261 (2007)
5. <http://www.hoefliger.de/>
6. <http://pa.bosch.com/deu/branche/2585.asp>

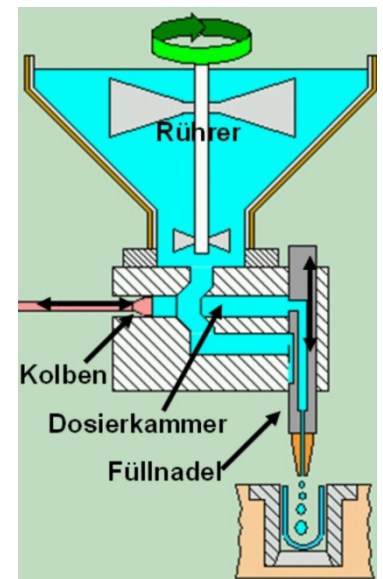


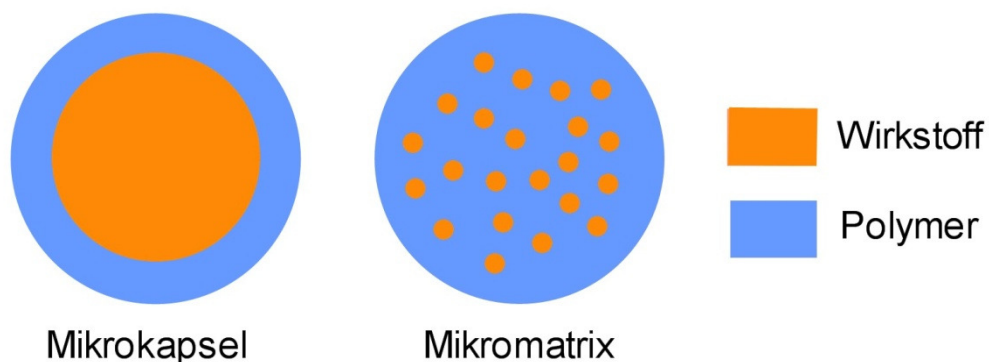
Abb. 13: Abfüllung flüssiger und halbfester Formulierungen mittels Dosierpumpen



7. [[http://www.ima.it/Capsule-Filling-Capsule-Fillers-For-Medium-Production\\_11c49f.asp](http://www.ima.it/Capsule-Filling-Capsule-Fillers-For-Medium-Production_11c49f.asp)
8. [http://www.mg2.it/Portale/FrontEnd/Home/Default.aspx?channel\\_id=40&entry\\_id=26](http://www.mg2.it/Portale/FrontEnd/Home/Default.aspx?channel_id=40&entry_id=26)
9. Stegemann S.; Colored Capsules – A contribution to drug safety. Pharm Ind 67, 9, 1088-1095 (2005)
10. Schmierer T. et al; Vorteile von Kapseln hinsichtlich Patientenwahrnehmung und Compliance. Pharm Ind 70, 8, 938-942 (2008)
11. Pharmaceutical Preformulation and Formulation. Ed. Mark Gibson. CRC Press (2004)
12. Oral Lipid-Based Formulations Ed. David Hauss. Informa Healthcare (2007)

**1. Definition**

Gemäß eines Definitionsentwurfs der IUPAC umfasst der Begriff Polymermikropartikel (engl.: polymer microparticle) alle Polymerpartikel, ungeachtet ihrer Gestalt, deren Äquivalentdurchmesser im Größenordnungsbereich von 0,1 bis 100  $\mu\text{m}$  liegt. Dabei bezieht sich der Unterbegriff „Polymermikrosphärule“ (engl.: polymer microsphere) auf sphärisch geformte Polymermikropartikel, während der Ausdruck „Polymermikrokapsel“ (engl.: polymer microcapsule) solche Partikel beschreibt, bei denen eine äußere Polymerschicht einen flüssigen, gasförmigen oder festen Kern umhüllt [1]. Partikel, in denen der Wirkstoff gleichmäßig, mehr oder weniger fein im Polymer verteilt vorliegt, bezeichnet man auch als „Mikomatrices“ (Abb. 1) [2].



**Abb. 1: Wirkstoffverteilung in Mikrokapseln und Mikromatrices**

Im pharmazeutischen Bereich finden Mikropartikel (in diesem Zusammenhang wird der Begriff häufig auch für Partikel bis 1000  $\mu\text{m}$  verwendet) verbreitete Anwendung als Arzneistoff-trägersysteme für die orale, parenterale, pulmonale oder nasale Applikation. Mikrokapseln werden z.B. eingesetzt, um Flüssigkeiten, wie z.B. ätherische Öle oder ölige Vitamine, in rieselfähige Pulver zu überführen. Als parenterale Depotformen erfahren Mikrosphärulen aus bioabbaubaren Polymeren eine immer breitere Anwendung für eine steigende Anzahl von Wirkstoffen, insbesondere solche peptidischer Natur.

**2. Bioabbaubare Polymere**

Aufgrund ihrer hervorragenden Biokompatibilität, werden in den heute arzneimittelrechtlich zugelassenen mikropartikulären Depotpräparaten ausschließlich die bioabbaubaren Polyester Polymilchsäure (= Poly(lactic acid) = PLA), Copolymerisate aus Milch- und Glycolsäure (Poly(lactic-co-glycolic acid) = PLGA) (Abb.2) sowie ein sternförmig verzweigtes Polymer, in dem PLGA-Ketten an ein zentrales Glukosemolekül gebunden sind, verwendet [3]. Die Esterbindungen dieser Polymere werden bereits bei Körpertemperatur und physiologischem pH-Wert (7,4) hydrolytisch gespalten bis die oligomeren Fragmente in Lösung gehen. Die Endprodukte dieses Abbaus sind

Milchsäure und Glycolsäure, die in den auftretenden Konzentrationen keinerlei toxisches Potenzial besitzen. Als bioabbaubares Matrixmaterial für Implantate ist auch ein Polyanhydrid (Polifeprosan 20) in Verwendung. Der Einsatz anderer Materialien, wie Polyorthoester, Polyethylencarbonat, Proteine und Polysaccharide (z.B. Chitosan) wurde bislang nur experimentell untersucht.

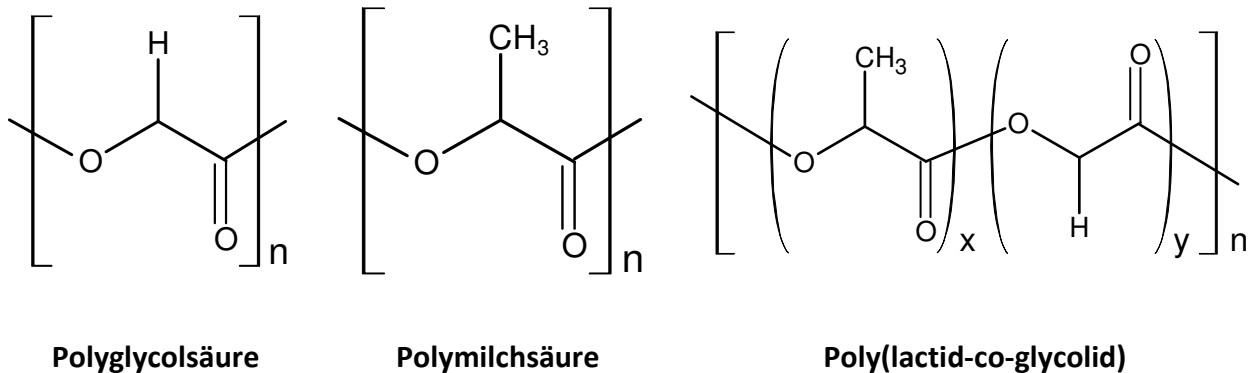


Abb. 2: Bioabbaubare Polyester

### 3. Herstellungsmethoden

Die allermeisten Verfahren zur Herstellung von Polymermikropartikeln sind Abwandlungen folgender drei Techniken:

- Lösungsmittlextraktion / -evaporation
- Phasenseparation (Koazervation)
- Sprühtrocknung

#### Lösungsmittlextraktion / -evaporation:

Bei den Lösungsmittlextraktions/-evaporationsverfahren werden Emulsionströpfchen einer organischen Lösung des Polymers, in die der Arzneistoff auf verschiedene Weise eingeschlossen sein kann, in eine Flüssigkeit eingebracht, in der das organische Lösungsmittel der dispersen Phase zumindest in gewissem Umfang löslich ist und dadurch aus den Tröpfchen extrahiert wird. Je nach seinen Eigenschaften, kann der Wirkstoff entweder gemeinsam mit dem Polymer (u.U. unter Einsatz eines Cosolvens) in der dispersen Phase gelöst oder in fein pulverisierter Form in dieser dispergiert werden. Ebenso können wässrige Wirkstofflösungen in der dispersen Phase emulgiert werden, wodurch sich mit der kontinuierlichen, äußeren Phase eine Dopplemulsion bildet. In Abhängigkeit von der gewählten Methode und dem Typ der äußeren Phase, ist die Bildung von Mikrospärulen somit aus O/W-, O/O-, S/O/W-, S/O/O-, W/O/W- oder W/O/O-Emulsionen möglich (Abb. 3) [4,5]. Zur Stabilisierung dieser Emulsionen wird sehr häufig Polyvinylalkohol (PVA) verwendet, doch ist auch der Einsatz anderer oberflächenaktiver oder viskositätserhöhender Substanzen, wie Sorbitanester, Polysorbate, Polyvinylpyrrolidon, Gelatine oder Albumin beschrieben worden.

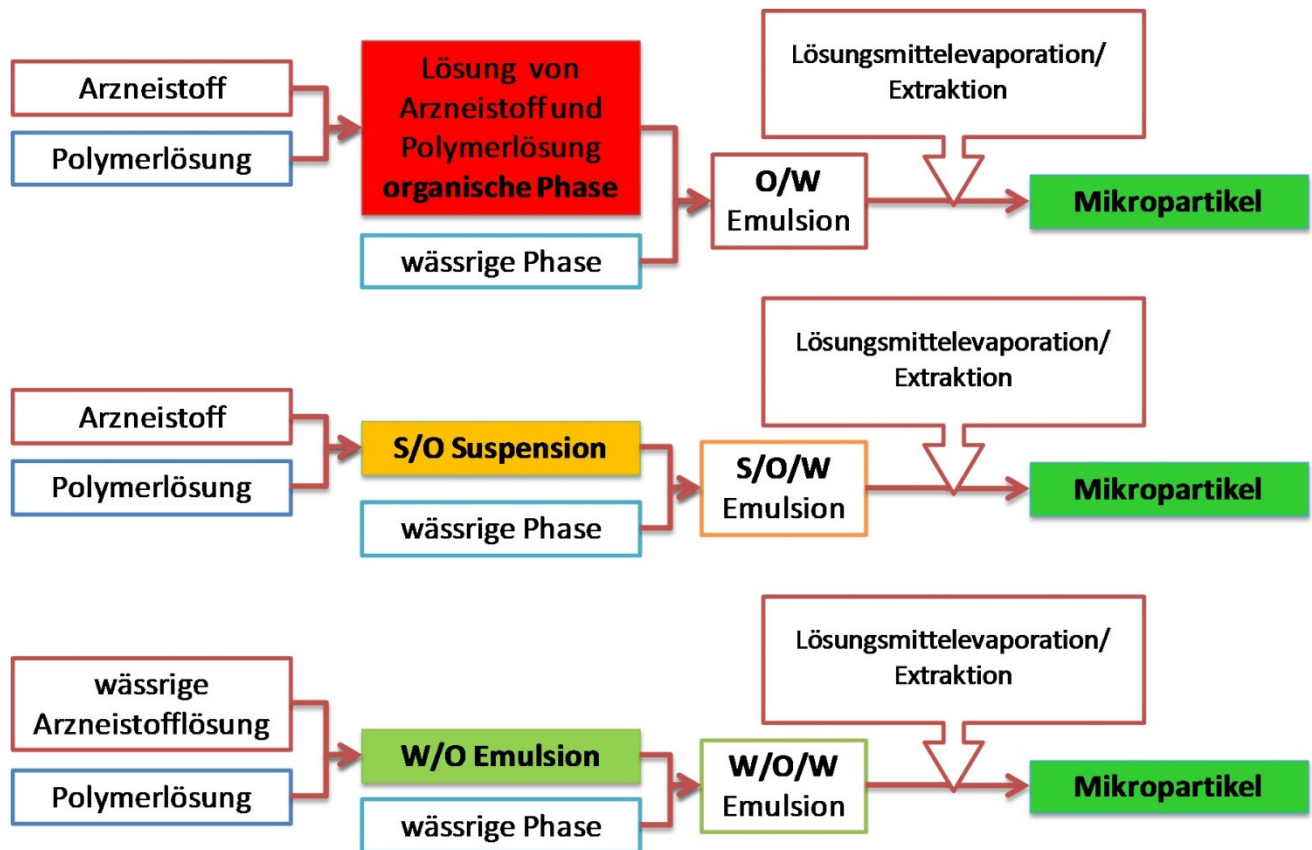
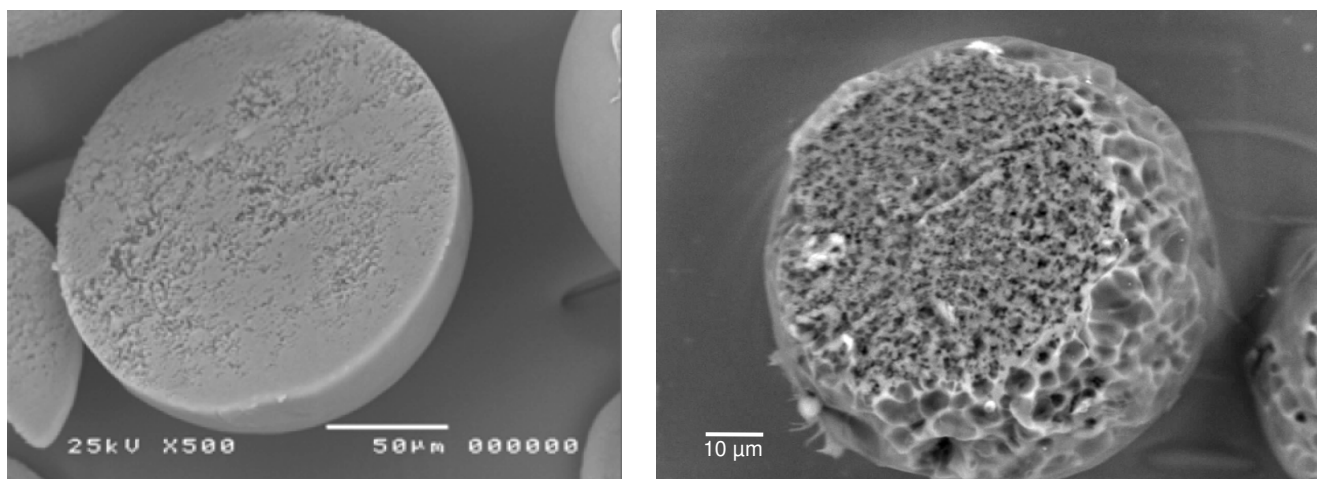


Abb. 3: Herstellung von Polymermikropartikeln durch Lösungsmittelextraktion/-evaporation (Bei Ersatz der wässrigen Phase durch eine zweite, nicht mischbare organische Phase entstehen entsprechend O/O-, S/O/O- bzw. W/O/O-Emulsionen)

Die Tröpfchenbildung erfolgt mit Hilfe von Rührwerkzeugen oder statischen Mischern. Dieser Prozessschritt bestimmt maßgeblich die mittlere Partikelgröße und die Partikelgrößenverteilung des jeweiligen Endproduktes. Im einfachsten Fall wird die äußere Phase in einem Mischgefäß vorgelegt und bei ausreichender Rührgeschwindigkeit die arzneistoffhaltige Polymerlösung zugegeben. Auch die umgekehrte Vorgehensweise, also die Zugabe der äußeren Phase in die gerührte Polymerlösung ist beschrieben worden, wobei in diesem Fall die Tröpfchenbildung unter Phaseninversion erfolgt. Statische Mischer bestehen aus Röhren mit eingebauten Strömungshindernissen, welche den Flüssigkeitsstrom wiederholt teilen und unter Erzeugung von Turbulenzen wiedervereinen. Für die Produktion im größeren Maßstab sind statische Mischprozesse ökonomischer, robuster und besser zu steuern. Liegt der Arzneistoff in suspensierter Form vor, werden häufig kontinuierlich arbeitende Turbinenmischer eingesetzt, da statische Mischer durch den Feststoffanteil leicht verstopfen können. Im experimentellen Maßstab wurden darüber hinaus zahlreiche Methoden erprobt, bei denen die Tröpfchenbildung mittels Extrusion (z.B. durch Membranen oder Shirasu Porous Glass) erfolgt.

Durch Entzug des Polymer-Lösungsmittels werden die gebildeten Tröpfchen ausgehärtet und in Mikrosphärulen überführt. Bei ausreichender Löslichkeit des verwendeten Lösungsmittels in der äußeren Phase oder bei deren ausreichend hohem Überschuss erfolgt der Lösungsmittelentzug aus den Emulsionströpfchen allein durch einen Extraktionsprozess. Wenn das Verteilungsgleichgewicht jedoch nicht genügend weit auf der Seite des Extraktionsmittels liegt,

muss der Vorgang durch kontinuierlichen Entzug des Polymer-Lösungsmittels, z.B. durch Evaporation oder Dialyse, unterstützt werden. Im Hinblick auf eine hohe Einschlusseffizienz werden vorzugsweise solche Extraktionsflüssigkeiten als äußere Phase verwendet, in denen der Arzneistoff nicht oder nur schwerlöslich ist. Für hydrophobe Wirkstoffe sind dies wässrige Lösungen, während für wasserlösliche Substanzen stark lipophile Flüssigkeiten (z.B. Hexan oder Paraffinöl) eingesetzt werden können, die mit dem Polymer-Lösungsmittel nicht mischbar sind. Da sich deren Reste jedoch häufig nur schwer aus den Produkten entfernen lassen, verwendet man vielfach auch im Falle hydrophiler Arzneistoffe wässrige Extraktionslösungen und bremst den Wirkstoffverlust während der Extraktion durch eine hohe Polymerkonzentration, die zu einer raschen Viskositätssteigerung der erstarrenden Tröpfchenmatrix führt. Die Geschwindigkeit des Lösungsmittelentzugs ist ein wesentlicher Einflussfaktor, der genutzt werden kann, um die innere Struktur und mit dieser das Wirkstofffreisetzungverhalten der Mikropartikel gezielt zu steuern (Abb. 4). Nach dem Extraktions-/Evaporationsprozess werden die entstandenen Mikropartikel abfiltriert oder abzentrifugiert, gewaschen und unter materialschonenden Bedingungen getrocknet.



**Abb. 4: PLGA-Mikropartikel mit herstellungsbedingt unterschiedlicher Poren- und Oberflächenstruktur (Schnittflächen in rasterelektronenmikroskopischer Darstellung)**

### **Phasenseparation**

Beim Phasenseparationsverfahren wird der Arzneistoff in wässriger Lösung oder als mikronisierte Festsubstanz in einer organischen Polymerlösung (z.B. Dichlormethan, Ethylacetat, Acetonitril) emulgiert bzw. suspendiert. Durch Zugabe eines Phasentrennmittels, zumeist Silikonöl, kommt es zur Koazervation des Polymers. Darunter versteht man die Auftrennung einer makromolekularen Lösung in zwei miteinander nicht mischbare Flüssigkeiten, eine dichte, polymerreiche Koazervatphase und eine zweite Phase, die hauptsächlich aus dem Lösungsmittel besteht. Durch Adsorption des Koazervates an die Oberfläche der wässrigen Tröpfchen bzw. der festen Wirkstoffpartikel, werden diese von einer zunächst noch sehr weichen Polymerhülle überzogen. Durch Auswaschen des Phasentrennmittels durch ein Nicht-Lösungsmittel für das Polymer, z.B. Hexan oder Heptan, wird die Hülle gehärtet, wonach die entstandenen Mikrokapseln abgetrennt werden können.

## Sprühtrocknung

Beim Sprühtrocknungsverfahren wird eine gemeinsame Lösung von Wirkstoff und Polymer in einem organischen Lösungsmittel oder eine Suspension bzw. Emulsion des Wirkstoffs in der organischen Polymerlösung in einen heißen Luftstrom hinein zerstäubt. Da die Zerstäubung im Gleichstrom erfolgt, gelangen die Tröpfchen im Zustand ihres höchsten Lösungsmittelgehalts in die heißeste Zone des Prozesses und erlangen in Sekundenbruchteilen durch Verdampfung des Lösungsmittels an der Tröpfchenoberfläche eine feste Polymerhülle. Die dabei auftretende Verdunstungskälte und die kurze Dauer der Temperatureinwirkung schützen die Partikel in gewissem Umfang vor allzu hoher Temperaturbelastung. Stromabwärts entweicht das Polymer-Lösungsmittel auch weitgehend aus den inneren Schichten, wobei, je nach Typ und Zusammensetzung der versprühten Flüssigkeit und der Prozessführung, Hohlkugeln im Sinne von Mikrokapselformen oder hochporöse, sphärische Mikromatrices entstehen können. Das trockene Produkt wird durch einen Zyklon aus dem Luftstrom abgetrennt. Sprühtrocknungsprozesse lassen sich leicht in den Produktionsmaßstab übertragen und können auch in dieser Größenordnung aseptisch betrieben werden.

Eine Abwandlung dieser Technik (spray freezing into vapor over liquid) besteht darin, eine organische Polymerlösung (PLGA/Dichlormethan) mit dispergiertem Wirkstoff, z.B. einem Protein, in ein Nicht-Lösungsmittel (Ethanol), zu sprühen [6,7]. Dieses Nicht-Lösungsmittel ist auf eine Temperatur unterhalb des Gefrierpunktes der Wirkstoff/Polymer-Mischung gekühlt und mit flüssigem Stickstoff überschichtet. Wenn anschließend der Stickstoff verdampft, schmilzt das Nicht-Lösungsmittel und extrahiert dabei das Polymer-Lösungsmittel aus den gebildeten Mikropartikeln (Abb. 5). Dieses Verfahren vermeidet sowohl eine Temperaturbelastung des Wirkstoffs als auch dessen Kontakt mit Wasser. Die Technik wurde zur Einbettung eines Somatropin-Zink-Komplexes in PLGA-Mikrosphärulen angewandt, wodurch ein einmonatiger Depoteffekt erzielt werden konnte.

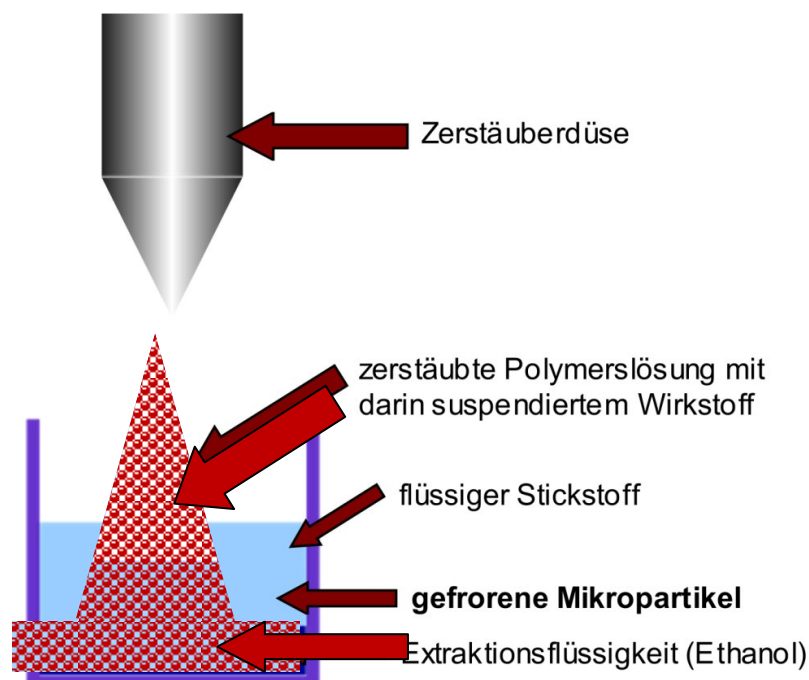


Abb. 5: Spray freezing into vapor over liquid



#### **4. Wirkstofffreigabe-Verhalten**

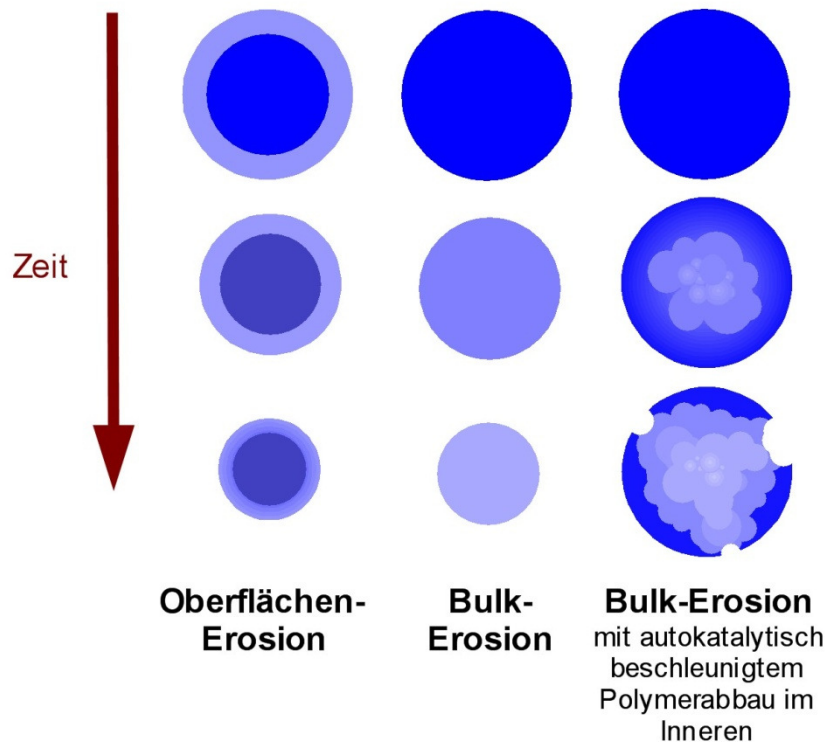
Die Freigabe von eingebetteten Wirkstoffen aus bioabbaubaren Matrices resultiert aus einem komplexen Zusammenspiel von Diffusions- und Erosionsprozessen. Ein reiner Diffusionsmechanismus liegt zugrunde, wenn im Zuge eines initialen Bursts ein in oberflächennahen Schichten lokalisierter Wirkstoffanteil innerhalb von wenigen Minuten oder Stunden in das Freisetzungsmedium entlassen wird. Hingegen ist die matrixkontrollierte Wirkstofffreisetzung aus den inneren Bereichen der Partikel eine Folge des Polymerabbaus, der als Oberflächen- oder Bulk-Erosion ablaufen kann (Abb. 6) [8,9]. Während reines PLA aufgrund seiner hydrophoben Molekülstruktur nur eine geringe Wasseraufnahme zeigt, weist das hydrophilere PGA aufgrund seiner hohen Kristallinität (46-52 %) ebenfalls nur eine schlechte Hydratisierbarkeit auf. PLGA-Copolymere mit einem Glycolidanteil von weniger als 70 % liegen hingegen in amorpher Form vor und können infolgedessen gut hydratisiert werden.

#### **Bulk-Erosion**

Selbst bei größeren Partikeln erfolgt in diesem Fall die vollständige Hydratisierung bis in den Kernbereich hinein rascher als die Polymerhydrolyse. Diese beginnt daher in allen Schichten des Partikels nahezu gleichzeitig. Im Zuge des hydrolytischen Abbaus entstehen Spaltprodukte mit sauren Endgruppen, die mit abnehmender Kettenlänge wasserlöslich werden, an Diffusionsvermögen gewinnen und in steigendem Maße die Hydrolyse weiterer Estergruppen katalytisch beschleunigen können. Je dichter und weniger porös die Polymermatrix ist, desto weniger leicht diffundieren einerseits die sauren Hydrolyseprodukte nach außen ab und desto weniger puffernde Basenmoleküle dringen andererseits aus dem umgebenden Medium in den Kern eines Partikels ein. Dort kann sich infolgedessen ein saurer pH-Wert ausbilden, der die Erosion des Partikels beschleunigt und von innen nach außen voranschreiten lässt. Mit kürzer werdenden Polymerketten sinkt die Glasübergangstemperatur des Polymers. Unterschreitet diese die Umgebungstemperatur am Ort des Partikel-Depots (im Regelfall 37 °C Körpertemperatur), steigt die Beweglichkeit der Molekülketten und mit dieser die Flüssigkeitsdiffusion in der Polymermatrix sprunghaft an, was die Wirkstofffreisetzung drastisch beschleunigt.

#### **Oberflächen-Erosion**

Oberflächenerosion tritt insbesondere bei Polyanhydriden und Polyorthoestern auf. Bei diesen Polymeren erfolgt die hydrolytische Spaltung rascher als die Diffusion von Wasser in die Matrix. Die Erosion erfolgt nur in den bereits hydratisierten Schichten und schreitet somit von außen nach innen voran. Beim Polyethylencarbonat wird ebenfalls eine Oberflächenerosion beschrieben, die hier allerdings auf einem enzymatischen Abbau beruht. Aufgrund ihrer Molekülgröße vermögen Enzyme nicht in eine gequollene Polymermatrix einzudringen, wodurch sie nur an der Partikeloberfläche wirksam werden können.



**Abb. 6: Arten des Bioabbaus von Mikropartikeln**

## 5. Zusammenfassung

Mikropartikuläre Darreichungsformen haben heute einen festen Platz in der modernen Pharmakotherapie. Insbesondere wurde mit den bioabbaubaren, parenteralen Depotformulierungen eine Plattformtechnologie geschaffen, die sich für die Applikation einer Vielzahl von nieder- und hochmolekularen Substanzen eignet, hohe Wirkstoffbeladungen zulässt (Wirkstoffgehalte von bis zu 40 % in kommerziell verfügbaren Produkten) und mit der sich ein weites Spektrum unterschiedlicher Wirkstofffreigabeprofile mit Applikationsintervallen von 2 Wochen bis 4 Monaten realisieren lässt. Nicht nur die Möglichkeit einer zuverlässigeren Therapie bei mangelnder Compliance sondern vielfach auch die geringeren Nebenwirkungsraten infolge gleichmäßigerer Wirkstoffspiegel haben sich als entscheidende Vorteile dieser Darreichungsform erwiesen.

## 6. Literatur

1. IUPAC, Division IV (Polymer), Project 2002-017-1-400 - Polymerization processes and polymers in dispersed systems
2. Burgess, D.J. and A.J. Hickey, Microsphere Technology and Application, in Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Marcel Dekker Inc. New York, S. 1783-1794, 2002.
3. Brannon-Peppas, L. and M. Vert, Polylactic and Polyglycolic Acids as Drug Delivery Carriers, in Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology, D.L. Wise, Marcel Dekker Inc., New York. S. 99-130, 2000.
4. Hincal, A.A. and S. Çaliş, Microsphere Preparation by Solvent Evaporation Method, in Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology, D.L. Wise, Marcel Dekker Inc., New York. S. 329-343, 2000.

5. Birnbaum, D.T. and L. Brannon-Peppas, Microparticle Drug Delivery Systems, in Drug Delivery Systems in Cancer Therapy, D.M. Brown, Humana Press Inc. Totowa, NJ, USA. S. 117-135, 2004.
6. Cleland, J.L. and Jones, A.J.S., Stable formulations of recombinant human growth hormone and interferon- $\gamma$  for microencapsulation in biodegradable polymers. Pharm. Res. 13, 1462-1473, 1996.
7. Johnson, O.L., Jaworowicz, W., Cleland, J.L., Bailey, L., Charnis, M., Duenas, E., Wu, C., Shepard, D., Magil, S., Last, T., Jones, A.J.S., Putney, S.D., Characterization and encapsulation of human growth hormone into biodegradable microspheres. Pharm. Res. 14, 730-735, 1997.
8. Husmann, M., S. Schenderlein, M. Lück, H. Lindner, P. Kleinebudde, Polymer erosion in PLGA microparticles produced by phase separation method, International Journal of Pharmaceutics, 242, 277-280, 2002.
9. von Burkersroda, F., L. Scheld, A. Göpferich, Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion, Biomaterials, 23, 4221-4231, 2002.

## 1. Grundlagen

Weichkapseln (auch soft gelatin capsules oder SGC genannt), gehören neben den Tabletten und Hartkapseln mit ca. 5 % Marktanteil zur drittgrößten Gruppe oraler Darreichungsformen. Im Gegensatz zu Tabletten und Hartkapseln werden Weichkapseln fast ausschließlich mit flüssigen oder halbfesten Füllgütern gefüllt.

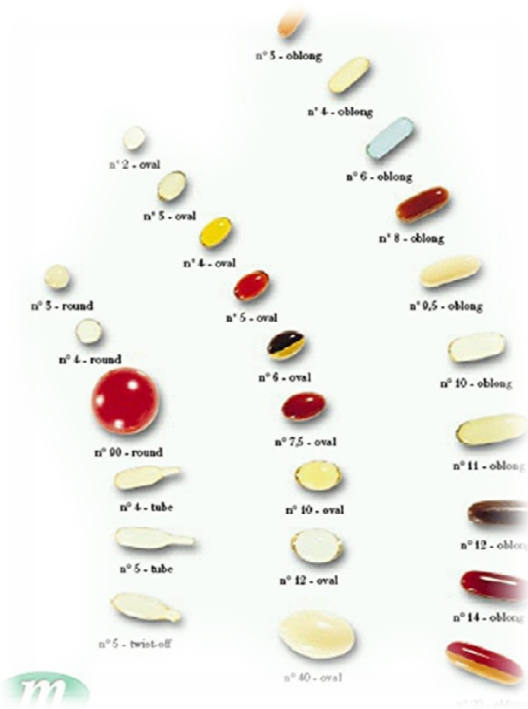
Weichkapseln unterscheiden sich vollkommen von Hartkapseln und sollten deshalb als eine ganz eigene Darreichungsform betrachtet werden. Weichkapseln bestehen bis auf ganz wenige Ausnahmen im Nahrungsergänzungsbereich aus Gelatine als Grundpolymer. Neben der Gelatine, benötigen Weichkapseln noch Weichmacher wie Glycerol oder Sorbitol in höheren Anteilen sowie Wasser. In der Regel beträgt der Weichmachergehalt 20-30% der Hüllenformulierung, bei einem Gelatinegehalt von 40 – 45 % und einem Wassergehalt von 30 – 35 %. Nach der anschließenden Trocknung beträgt der Wassergehalt der fertigen Weichgelatinekapsel aber nur noch ca. 7 – 8 %. Des Weiteren können den Kapselhüllen auch Farbstoffe hinzugefügt werden, um sie opak und/oder ein- oder zweifarbig zu gestalten.



**Abb. 1: Beispiel von Formwalzen für die großtechnische Herstellung von Weichkapseln**

Im Gegensatz zu Hartkapseln handelt es sich bei Weichkapseln nicht um vorgefertigte Kapseln, sondern um Kapseln, die in einem Fertigungsschritt mit der Befüllung entstehen.

Die Form und Gestalt wird dabei von den Formwalzen (Abb. 1) bestimmt und kann in vielfältiger Weise gestaltet werden. Dennoch haben sich über die Zeit einige Grundformen als Standardformen in unterschiedlichen Größen herauskristallisiert. Dazu zählen die runden Formen, die ovalen und oblong-Formen (Abb. 2). Ihre Größen sind in Zahlen angegeben, wobei die Zahl die Anzahl der „minims“ angibt. 1 minim entspricht dabei 0.0616 ml und ist eine Richtgröße für die maximale Befüllungskapazität der entsprechenden Weichkapsel. Eine Kapsel der Größe Oval 4 hat damit das gleiche maximale Füllvolumen wie eine Kapsel der Größe Rund 4 oder Oblong 4. Alle drei Kapseln haben damit ein maximales Volumen von  $4 \times 0.0616$  ml oder 0.2464 ml.

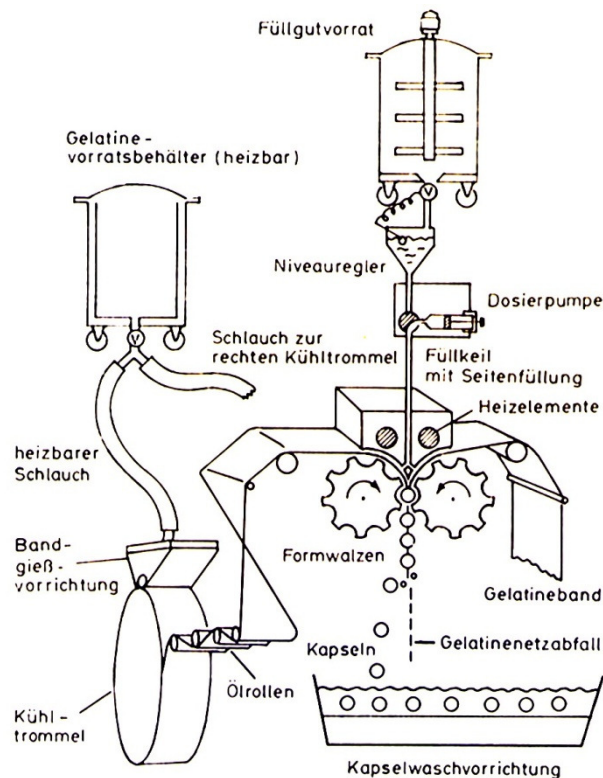


**Abb. 2: gängige Formen und Größen für Weichkapseln**

Weichkapseln finden auch als Einzeldosisbehältnisse für topische Arzneiformen Anwendung. Hierzu werden so genannte Twist-off Kapseln verwendet, die an einem Ende eine ca. 5 mm lange, abgeflachte Ausbuchtung haben, die durch drehen wie ein Verschluss entfernt werden kann um den Inhalt durch das entstehende Loch durch leichten Druck auf die Kapsel freizugeben.

## 2. Herstellung

Die Herstellung von Weichkapseln erfolgt hauptsächlich mit dem Rotary-Die Verfahren [1-3] (Abb. 3). Dabei handelt es sich um zwei gegeneinander rotierende Formwalzen, die den Kapseln die

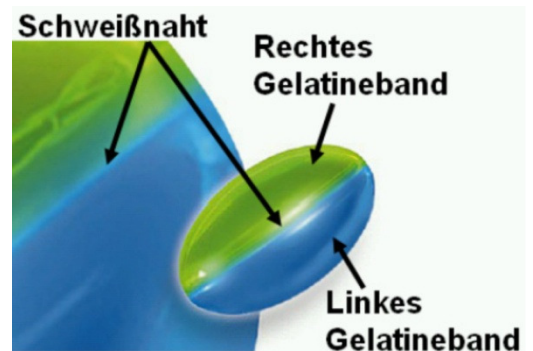


**Abb. 3: Herstellungsschema von Weichkapseln nach dem Rotary-Die Verfahren**

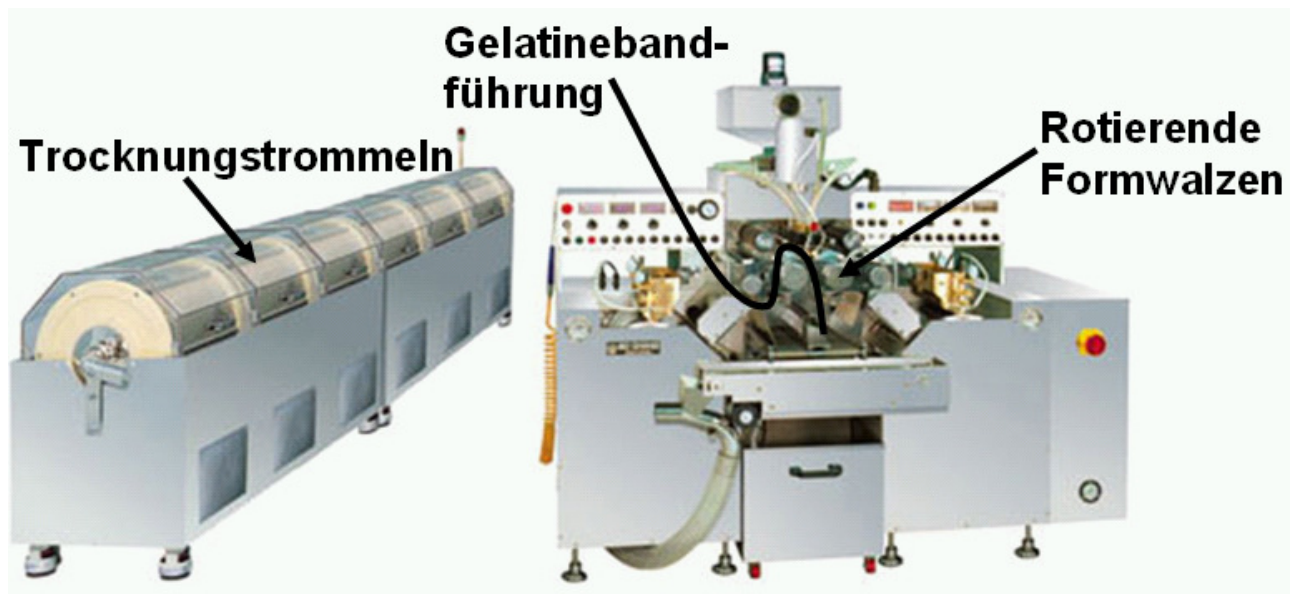
Form geben und gleichzeitig die beiden Gelatinebänder an den Kapselrändern verschweißen. Abb. 4 zeigt die eine solche Weichkapsel mit der typischen Schweißnaht. Für die Herstellung von Weichgelatine-kapseln, werden in zwei separaten Behältern die Gelatine-Weichmacherlösungen bereitgestellt aus denen zwei breite Gelatinebänder geformt und zwischen die Formwalzen geführt werden. Das abzufüllende Produkt wird in einem separaten Behälter ebenfalls vorbereitet und über Pumpen zwischen die Gelatinebänder und die gegenläufigen Formwalzen gepumpt, wobei die Formwalzen zeitgleich die Ränder zu Kapseln verschweißen [4] (Abb. 3, schematischer Aufbau, Abb. 5, großtechnische Herstellung). Die so geformten und befüllten Kapseln werden unterhalb der Formwalzen ausgestoßen und über Förderbänder in Trocknungstrommeln überführt. Da die Kapselwände zu diesem Zeitpunkt noch einen hohen Wasseranteil enthalten (ca. 30 – 35 %) sind die Kapseln zu diesem Zeitpunkt äußerst weich und dehnbar, woher der Ausdruck ‚Weichgelatine-kapsel‘ stammt. In den Trocknungstrommeln erfolgt die erste Trocknung der Weichkapseln, so dass sie am Ende formstabil sind und auf Bleche zur Hordentrocknung gelegt werden können. Die Kapseln werden anschließend bei 22°C +/- 2°C und 20-30% rF für wenige Tage bis zu 4 Wochen auf ihre Endfeuchte von ca. 7 – 8 % Wasser getrocknet. Am Ende der Herstellung werden die Kapseln einer 100% visuellen Kontrolle unterzogen, um eventuelle undichte Kapseln (leaking capsules) auszusortieren.

Form geben und gleichzeitig die beiden Gelatinebänder an den Kapselrändern verschweißen. Abb. 4 zeigt die eine solche Weichkapsel mit der typischen Schweißnaht.

Für die Herstellung von Weichgelatine-kapseln, werden in zwei separaten Behältern die Gelatine-Weichmacherlösungen bereitgestellt aus denen zwei breite Gelatinebänder geformt und zwischen die Formwalzen geführt werden. Das abzufüllende Produkt wird in einem separaten Behälter ebenfalls vorbereitet und über Pumpen zwischen die Gelatinebänder und die gegenläufigen Formwalzen gepumpt, wobei die Formwalzen zeitgleich die Ränder zu Kapseln verschweißen [4] (Abb. 3, schematischer Aufbau, Abb. 5, großtechnische Herstellung). Die so geformten und befüllten Kapseln werden unterhalb der Formwalzen ausgestoßen und über Förderbänder in Trocknungstrommeln überführt. Da die Kapselwände zu diesem



**Abb. 4: Weichgelatine-kapseln mit der typischen Schweißnaht in der Ansicht**



**Abb. 3: Weichkapselmaschine für die großtechnische Herstellung**

Arzneibuchmonographien für Kapseln finden sich in allen anerkannten Arzneibüchern, die von Inhalt her nur unwesentlich variieren. In den meisten Monographien werden Kapseln in Weichkapseln und Hartkapseln unterschieden. Weitere Unterscheidungen werden etwa im Amerikanischen Arzneibuch gemacht, wenn zwischen Kapseln und Kapseln mit verzögerter Freisetzung unterschieden wird, sowie eine Monographie ‚Gastroresistente Kapseln‘ im Europäischen Arzneibuch. Hierzu können Weichkapseln mit entsprechenden Filmüberzügen überzogen werden. Wie auch schon im Kapitel Hartkapseln angemerkt, kann die Gelatine als Polymer in Kapseln durch die Anwesenheit von Aldehyden (speziell Formaldehyd) die unter Umständen aus Verunreinigungen der Hilfsstoffen stammen, quervernetzt werden (gelatin cross-linking) [5]. Diese als chemisches Cross-linking bezeichnete Quervernetzung ist irreversibel und wird auch nicht durch Magenenzyme (Pepsin, Pankreatin) aufgelöst und unterscheidet sich damit von der als Stress-Crosslinking bezeichneten Quervernetzung, die bei gleichzeitiger längerer Lagerung bei hohen Temperaturen und hoher Feuchtigkeit entsteht. Hierbei handelt es sich um Quervernetzungen zwischen den Gelatineketten, die von den Enzymen des Magens leicht gespalten werden können und das Auflösen der Kapseln in vivo deshalb nicht beeinträchtigen. Es sollte an dieser Stelle darauf hingewiesen sein, dass das Stress-Crosslinking einfach und effektiv durch Auswahl eines feuchtigkeitsundurchlässigen Packmaterials verhindert werden kann und somit kein Problem für die Arzneimittelqualität darstellt.

### **3. Weichkapseln in der präklinischen und frühen klinischen Phase**

Die Entwicklung von Weichkapseln gestaltet sich in der Regel schwieriger als die von Hartkapseln, da neben der Formulierung auch noch eine Kapselhülle entwickelt werden muss. Dies geschieht zumeist bei spezialisierten Lohnherstellern, die über langjährige Erfahrung verfügen [5].

Die Kapselwandformulierung hängt entscheidend von der verwendeten Formulierung selbst ab. Während einfache ölige Formulierungen mit relativ standardisierten Kapselwandformulierungen hergestellt werden können, sind amphiphile oder hydrophile Formulierungen weitaus komplexer, da sie zu Interaktionen mit der Kapselwand führen können. So kann zum Beispiel Glycerol als



Bestandteil der Kapselwand in die Formulierung übertreten, bzw. Hilfsstoffe oder der Arzneistoff der Formulierung in die Kapselwand übergehen. Dieses Risiko besteht vor allem im Zeitraum unmittelbar nach der Verkapselung und während der Trocknungsphase. Ebenso ist zu berücksichtigen, dass während der Trocknungsphase eventuelle flüchtige Hilfsstoffe der Formulierung (z.B. Ethanol) ebenfalls evaporieren können und die ursprünglichen Eigenschaften der Formulierung somit verändern.

Weichkapseln werden in der präklinischen und frühen klinischen Phase vor allem dann verwendet, wenn Löslichkeitsprobleme des Arzneistoffes vorliegen, die durch flüssige Formulierungen behoben werden können. Niedermolekulare Polyethylenglykole (z.B. PEG 400) etwa zählen zu den einfachen Standardlösungsvermittlern die häufig mit Weichkapseln Verwendung finden, soweit sich der Arzneistoff ausreichend darin löst.

Allerdings ist in dieser Phase der Entwicklung zu berücksichtigen, dass zumeist nur sehr wenig Wirkstoff vorliegt (mg bis g-Bereich), sodass die Verwendung großtechnischer Maschinen entfällt. Im Fall von Weichkapseln wurden deshalb kleinere Maschinen entwickelt, bzw. Formwalzen, die nur eine Kapselreihe enthalten (Abb. 6).



**Abb. 4: Beispiel von Formwalzen für den Entwicklungsmaßstab von Weichkapseln**

#### **4. Weichkapseln in der späten klinischen und kommerziellen Phase**

Weichkapseln finden ausschließlich Anwendung bei flüssigen und halbfesten Systemen. Bei den halbfesten Systemen handelt es sich in erster Linie um pastöse Füllgüter oder Systeme, deren Viskosität bei Temperaturen unterhalb von 35°C ausreichend ist, um sie über die Pumpen in die Kapseln abzufüllen. Bei Formulierungen die oberhalb von 35°C abgefüllt werden müssen, wie etwa höhermolekulare Polyethylenglykole oder Polyoxylglyceride, sind Hartkapseln vorzuziehen, die mit bis zu 70°C abgefüllt werden können.

Die kommerzielle Herstellung von Weichkapseln stellt spezielle Ansprüche an einen Herstellbetrieb sowie ein spezielles Know-how, das in der Regel nicht in die Routineproduktion von pharmazeutischen Unternehmen passt. Deshalb findet die Herstellung vorwiegend bei Lohnherstellern statt, die sich auf die Herstellung von Weichkapseln spezialisiert haben und diese dadurch effizienter herstellen können.

Da sich das Herstellverfahren von einem kleinen zu einem großen Maßstab kaum ändert, stellt das so genannte „Scaling-up“ kein Problem dar. Wie auch bei flüssig befüllten Hartkapseln, gilt die Aufmerksamkeit der Homogenität und der Stabilität der Formulierung im Ansatzkessel selbst um etwa bei Suspensionen das Präzipitieren des Arzneistoffes zu verhindern. Die Stabilität der Formulierung und deren Hilfsstoffe können unter Umständen durch eine längere Expositionszeit gegenüber dem Labormaßstab hinsichtlich Sauerstoffexposition oder Temperaturexposition bei heißen Schmelzen beeinträchtigt sein. Im Besonderen sei hier auf die Autoxidation von ungesättigten Fettsäuren und Polyethylenglykolen hingewiesen, die allerdings durch einfache Stickstoffbegasung des Vorratsbehälters verhindert werden können.

Produkte in Weichgelatinekapselform sind vor allem Arzneistoffe, die Probleme hinsichtlich ihrer oralen Bioverfügbarkeit (z.B. Saquinavir, Cyclosporin A) haben oder die extrem niedrig dosiert sind (z.B. Calcitriol mit einer Dosis von 0,25 µg). Produkte für topische Anwendungen in Weichkapselform finden z.B. Anwendung in der Behandlung von Augeninfektionen wie etwa das Dexamethason-Produkt Sterdex™.

### **5. Weichkapselform als Darreichungsform**

Aufgrund der zumeist notwendigen Lohnentwicklung und Lohnherstellung haben die Weichkapselformen im ethischen pharmazeutischen Bereich etwas an Attraktivität verloren und sind in den letzten Jahren vorwiegend bei Arzneimitteln zur Behandlung von HIV-Infektionen zum Einsatz gekommen. Anders verhält es sich hier im OTC-Markt, indem Innovationen schneller und Lebenszyklen kürzer sind. Hier sind in den vergangenen Jahren sehr erfolgreich flüssige Formulierungen von Ibuprofen, Diclofenac und Naproxen in Weichgelatinekapselform in den Markt eingeführt worden. Dieser Trend könnte sich auch in den kommenden Jahren fortsetzen, da dem OTC-Markt durch die Einsparungen im Gesundheitswesen mehr und mehr an Bedeutung zukommen wird.

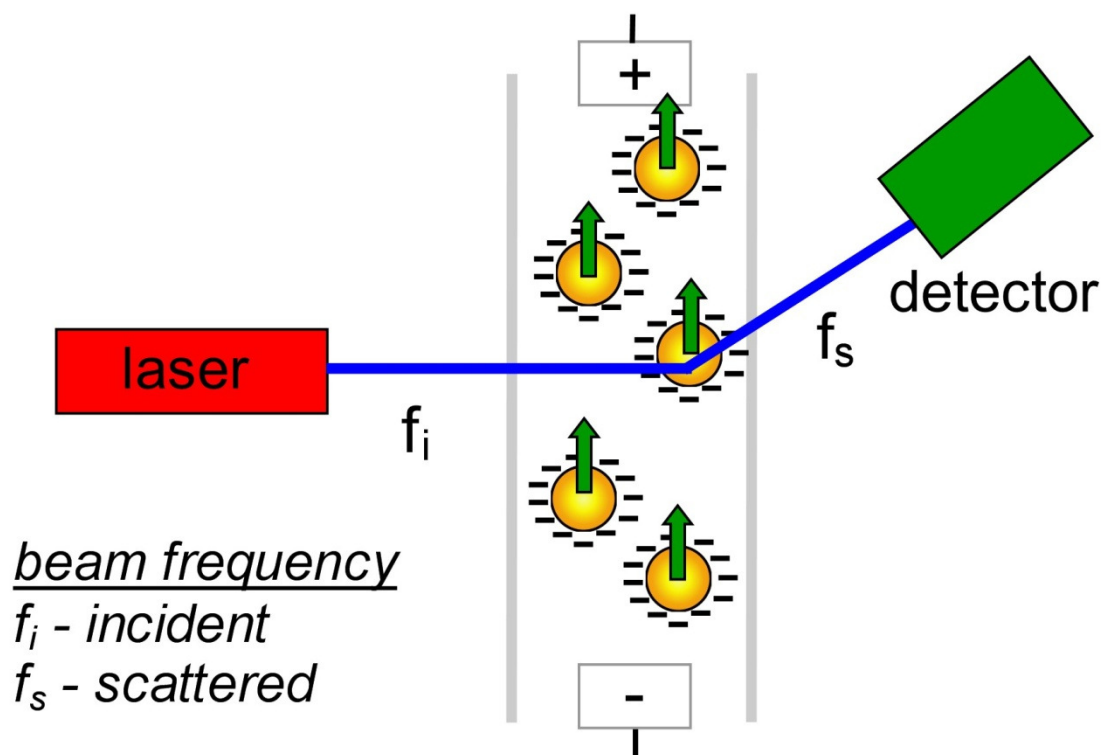
### **6. Literatur**

1. [www.rpscherer.de](http://www.rpscherer.de)
2. [www.swisscaps.com](http://www.swisscaps.com)
3. [www.capsugel.com](http://www.capsugel.com)
4. Die Kapsel. W. Fahrig & U. Hofer. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH (1983)
5. Pharmaceutical Preformulation and Formulation. Ed. Mark Gibson. CRC Press (2004)
6. Oral Lipid-Based Formulations Ed. David Hauss. Informa Healthcare (2007)

# Teil 2: Hilfsstoffe

in Vorbereitung

# Teil 3: Analytische Methoden



## 1. Einleitung

Zur Bestimmung der Partikelgröße in der Pharmazeutischen Industrie und Forschung gehört die Laserdiffraktometrie zu den wichtigsten und am häufigsten eingesetzten Methoden überhaupt. Viele andere Methoden können entweder nur feste Partikel oder nur flüssige Systeme analysieren, selten ist es möglich auch die Partikelgröße in halbfesten Systemen zu bestimmen. Im Gegensatz dazu kann man mittels Laserdiffraktometrie fast jedes System vermessen. Mit Hilfe dieser Methode können feste, flüssige und neuerdings auch halbfeste Systeme vermessen werden: d.h.:

- Emulsionen
- Suspensionen
- Pulver
- Puder
- Aerosole
- Cremes
- Salben

Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist der enorm große Messbereich, welcher von einigen Nanometern bis hin zu mehreren Millimetern reicht. Es können also:

- Nanopartikel
- Mikropartikel
- Makropartikel
- oder Mischungen aus diesen Systemen

vermessen werden. Die Messungen sind schnell und die Instrumente (Laserdiffraktometer) sind einfach zu bedienen. Kurzum, Laserdiffraktometrie ist eine „Allround-Methode“ zur Bestimmung der Partikelgröße und ist demzufolge in fast jedem Labor anzutreffen.

## 2. Theorie der Laserdiffraktometrie

Der Begriff Laserdiffraktometrie setzt sich aus dem Kunstwort „laser“ und dem englischen Wort „diffraction“ zusammen.

Laser (**L**ight **A**mplification by **S**timulated **E**mission of **R**adiation) bedeutet Lichtverstärkung durch induzierte Emission. Laserlicht entsteht also nicht durch spontane Emission (Aussendung) von Photonen, wie es bei einer normalen Glühlampe der Fall ist, sondern wird induziert. Die emittierten Photonen haben alle die gleiche Wellenlänge, sodass Laserlicht immer monochromatisch ist und gleichzeitig sehr viel intensiver als Licht aus einer herkömmlichen

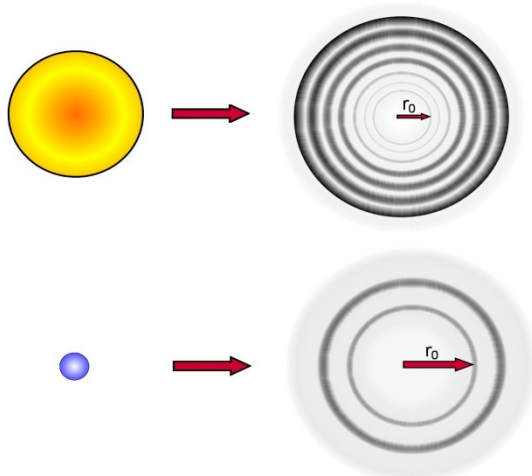
Lichtquelle. Diese beiden Merkmale sind für das Licht, welches für die Laserdiffraktometrie benötigt wird, essentiell. Laser können aus verschiedenen Materialien bestehen, die Wahl des verwendeten Materials ist entscheidend für die Wellenlänge, die emittiert wird. Für Laserdiffraktometer werden meistens Helium-Neon Laser mit einer Wellenlänge von 632,8nm eingesetzt.

Diffraction (engl.) bedeutet auf deutsch Beugung, sodass Laserdiffraktometrie auch als Lichtbeugungsanalyse bezeichnet werden kann. Als Beugung bezeichnet man allgemein die Ablenkung von Wellen an einem Hindernis. Da es im Prinzip egal ist, ob es sich dabei um Lichtwellen, elektromagnetische Wellen oder Wasser- und Schallwellen handelt (der Effekt ist immer gleich), kann man das Prinzip der Lichtbeugung auch einfach anhand von Wasserwellen, die sich jeder leicht vorstellen kann, erklären. Als Hindernis, als Voraussetzung für die Beugung, soll ein einfacher Stein dienen.

Wirft man diesen Stein nun auf eine Wasseroberfläche, kann man beobachten, dass sich an der Stelle, wo der Stein die Wasseroberfläche berührt hat, kreisförmige Wellen bilden. Die Höhe der Wellen nimmt dabei von innen nach außen ab und auch der Abstand zwischen den Wellenbergen wird immer größer (siehe Abb. 1). Stellt man sich nun weiter vor, dass man einen großen und einen kleinen Stein hintereinander ins Wasser wirft, wird man sehen, dass der große Stein ein anderes



**Abb. 1:** Prinzip der Beugung am Beispiel eines Steines, der auf eine Wasseroberfläche trifft; dabei entstehen sich kreisförmig ausbreitende Wellenfronten



**Abb. 2:** Vergleich der Beugungsmuster eines großen Partikels (oben) und eines kleinen Partikels (unten); große Partikel haben geringe Abstände ( $r_0$ ) zwischen den entstehenden Wellenfronten als kleinere.

„Beugungsmuster“ hervorbringt, als der kleine Stein. Die Wellen, die der große Stein hervorruft, werden sehr hoch sein und die Abstände zwischen den Wellenbergen klein im Gegensatz zum kleinen Stein. Bezieht man nun dieses Prinzip auf Partikel auf welche Licht trifft, so passiert praktisch genau dasselbe. Je nach Partikelgröße kommt es nach der Beleuchtung der Partikel zu einem Beugungsmuster mit hohen Wellenbergen und engen Abständen (große Partikel) oder zu kleinen Wellenbergen mit größeren Abständen (kleine Partikel) – siehe Abb. 2.

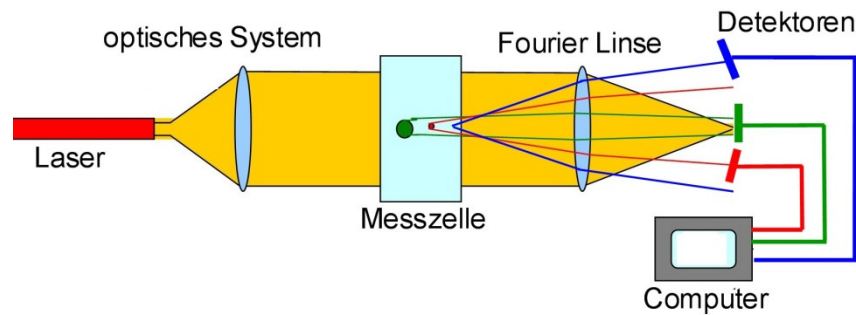
Die Wellenfronten werden als Fraunhofersche Beugungsringe bezeichnet und die Abstände zwischen den Wellenfronten werden als Beugungswinkel bezeichnet. Laserdiffraktometrie nutzt also die Tatsache, dass die Größe des Beugungswinkels umgekehrt proportional zur Größe des Partikels ist.

### 3. Aufbau eines Laserdiffraktometers

Der Aufbau eines Laserdiffraktometers ist relativ einfach, da ja lediglich die Beugungsringe, die durch die Bestrahlung der Partikel entstehen detektiert werden und dann mittels einer Software



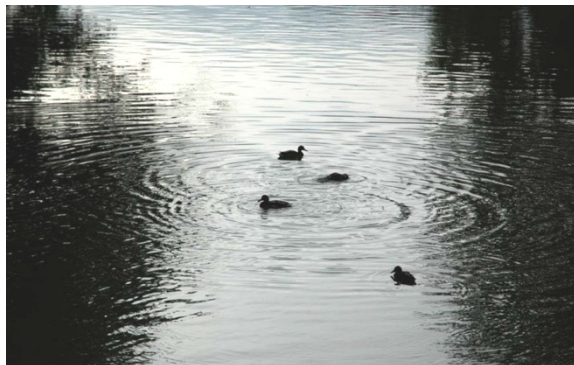
ausgewertet werden müssen. Daher besteht ein Laserdiffraktometer aus Lichtquelle (Laser), einem Linsensystem, um den schmalen Laserstrahl so aufzuweiten, dass die gesamte Probe beleuchtet werden kann, der Messzelle, in der sich die Probe befindet, einer Fourierlinse, die die Strahlen bündelt und einem Detektorsystem. Die detektierten Beugungsmuster werden dann mittels Software und PC zur Berechnung der Partikelgröße herangezogen (Abb. 3)[1].



**Abb. 3:** schematischer Aufbau eines Laserdiffraktometers (modifiziert nach [1])

#### 4. Berechnung der Partikelgröße

Im Gegensatz zum relativ simplen Aufbau des Gerätes ist die Berechnung der Partikelgröße relativ kompliziert. Das liegt daran, dass nicht davon ausgegangen werden kann, dass sich nur eine einzige Partikelgröße in der Probe befindet. Liegen nämlich unterschiedliche Partikelgrößen vor, dann kommt es also einer Überlagerung der verschiedenen Beugungsmustern, was allgemein als Interferenz bezeichnet wird. Auf dem Detektorsystem werden also nicht einzelne



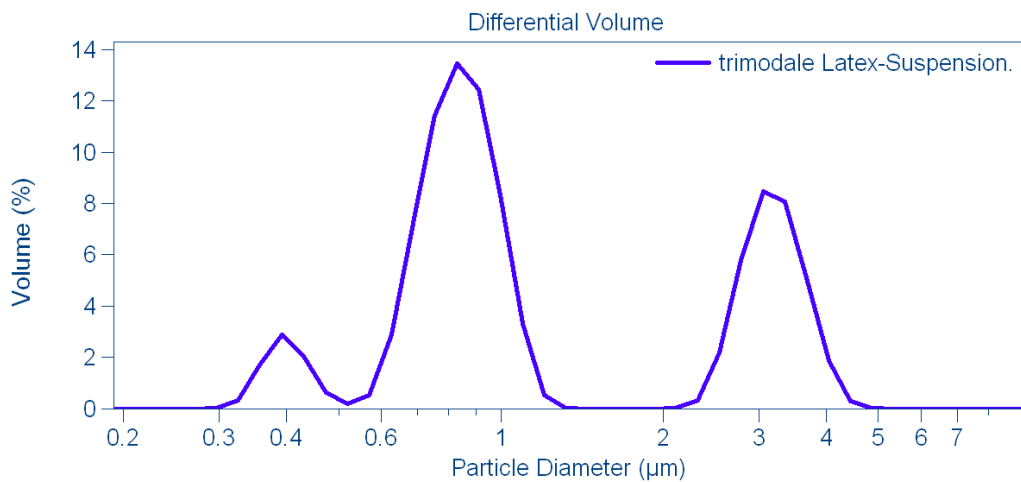
**Abb. 4:** Überlagerung von Beugungsmustern wird als Interferenz bezeichnet, dargestellt mit Enten auf dem Dresdner Carolasee.

Beugungsmuster, sondern komplexe Interferenzmuster detektiert. Die Software rechnet daher über einen komplizierten Algorithmus mit mehr als 20 Unbekannten die Partikelgröße quasi „rückwärts“ aus. Dazu werden mögliche Partikelgrößen in den Algorithmus eingesetzt und daraus errechnet, welches Interferenzmuster sich daraus ergeben würde. Das errechnete Ergebnis wird dann mit dem tatsächlich gemessenen Ergebnis verglichen. Es wird solange gerechnet, bis sich errechnetes Ergebnis und gemessenes Ergebnis bestmöglich decken.

#### 5. Messwerte

Die Messergebnisse werden als Verteilungskurve angegeben, das hat den Vorteil, dass man nicht nur eine Aussage über die mittlere Partikelgröße erhält, sondern auch Informationen über die kleinsten und vor allem die größten Partikel in der Probe erhält. Weiterhin ist es möglich zu erkennen ob es sich um eine einzige Partikelpopulation handelt (monomodale Verteilung) oder um

mehrere Partikelpopulationen (multimodal). In Abb. 5 ist eine solche Verteilung graphisch dargestellt.



**Abb. 5: Trimodale Latex-Suspension, mit Partikelpopulationen bei 400nm, 850nm und 3µm.**

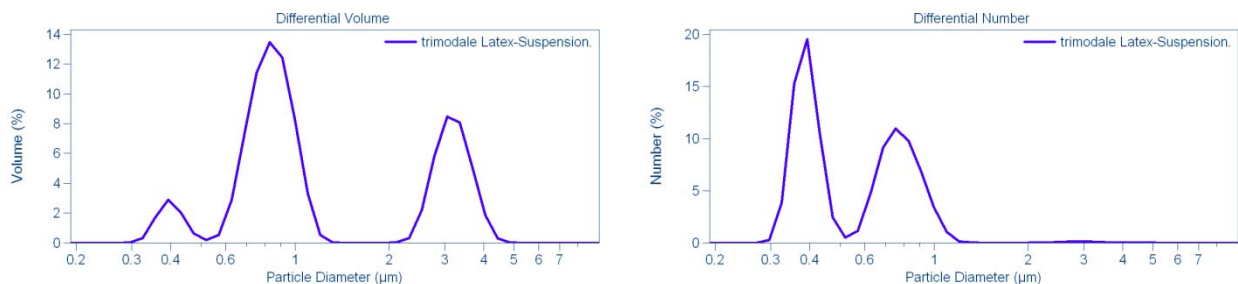
Alternativ zur graphischen Darstellung wie in Abb. 5 wird ein Messergebnis anhand mehrerer Durchmesser angegeben. Der D50 gibt dabei die mittlere Partikelgröße an. D50 bedeutet, dass 50% der Partikel kleiner sind als der angegebene Wert. Weitere wichtige Parameter sind demzufolge der D10, als Maß für die kleinsten Partikel, sowie D90, D95, D99 und D100 für die größeren Partikel in der Probe. Je enger D10 und D100 zusammenliegen, desto enger ist die Partikelgrößenverteilung. In Tab. 1 sind die korrespondierenden Werte für die oben gezeigte Messung aufgelistet.

**Tab. 1: Partikelgrößenverteilung (volumetrisch und numerisch) der Latex-Mischung aus Abb. 5, der jeweilige Durchmesser gibt jeweils die Prozentzahl der Partikel an, die kleiner als der angegebene Wert sind (z.B. D50 – 50% der Partikel sind kleiner als 0.915µm)**

Durchmesser	D10	D50	D90	D95	D99	D100
Partikeldurchmesser in µm (volumetrisch)	0.633	0.915	3.412	3.671	4.096	5.111
Partikeldurchmesser in µm (numerisch)	0.355	0.464	0.892	0.955	1.107	5.111

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich können die ermittelten Ergebnisse können als volumetrische Durchmesser (D(v)) oder aber auch als numerische Durchmesser (D(n)) angegeben werden [2]. Wird ein numerischer Durchmesser angegeben, dann bedeutet das, dass sich die Partikelgröße auf die Anzahl der Partikel bezieht, dagegen bezieht sich ein volumetrischer Durchmesser auf das Volumen der Partikel. Welcher Durchmesser von Interesse ist kommt immer auf den Zweck der Messung an. Ist der Messende daran interessiert zu wissen wie viele kleine Partikel im System vorhanden sind, dann wird er die numerische Angabe bevorzugen, will er aber wissen, wie die Masse der Substanz auf die Partikel verteilt ist, dann ist ein volumetrischer Durchmesser sinnvoll. Als Beispiel: in einer Probe sind 1000 Partikel mit einer Größe von 1µm enthalten und nur ein Partikel mit einer Größe von 10µm. Bei der numerischen Auswertung, wo die Anzahl der

jeweiligen Partikel betrachtet wird, ist das numerische Verhältnis also 1000:1 und das große Partikel entspricht 0,1% der gesamten Verteilung ( $D(n)_{10}$ - $D(n)_{99}$  wären klein und lediglich  $D(n)_{100}$  wäre groß). Betrachtet man die gleiche Verteilung volumetrisch ist das Volumenverhältnis 1000 Partikel a  $1\mu\text{m}$  zu 1 Partikel  $10\mu\text{m}$  aber 1:1, da der Radius mit der 3. Potenz in die Volumenberechnung einfließt. Bei dieser Auswertung wäre also schon der D50 groß. Den Unterschied kann man auch bei der trimodalen Latex-Mischung aus Abb. 5 eindeutig erkennen. Die volumetrische Auswertung zeigt eine trimodale Verteilung, mit Partikelpopulationen bei  $400\text{nm}$ ,  $800\text{nm}$  und  $3\mu\text{m}$ , dabei ist der Peak bei  $800\text{nm}$  am höchsten, die gleiche Probe zeigt als numerische Verteilung lediglich eine bimodale Verteilung, da der peak bei  $3\mu\text{m}$  nicht mehr da ist, der zuvor kleinste Peak bei  $400\text{nm}$  ist nun der größte.



**Abb. 6: Vergleich der Messergebnisse zwischen volumetrischer (links) und numerischer (rechts) Auswertung**

Der am häufigsten verwendete Durchmesser ist der volumetrische Durchmesser, da es in der Regel wichtiger ist zu wissen, ob sich große Partikel neben kleinen Partikeln im System befinden oder nicht (z.B. parenterale Fettemulsionen, wo die Präsenz von großen Tropfen, wegen sonst drohender Kappilarblockade, unbedingt ausgeschlossen werden muss).

## 6. Laserdiffraktometer auf dem Markt

Am Ende des Kapitels sollen noch die wichtigsten Hersteller von Laserdiffraktometern aufgelistet werden. Je nach Hersteller haben die Geräte verschiedene Messbereiche, sodass der Anwender je nach Bedarf das passende Gerät auswählen kann. Tab. 1 gibt einen Überblick über die wichtigsten Geräte auf dem Markt, ihre Hersteller und die jeweiligen Messbereiche der Geräte.

**Tab. 2 Übersicht einiger auf dem Markt befindlicher Laserdiffraktometer, Hersteller und Messbereiche**

Hersteller	Name des Instruments	Messbereich
Cilas	Cilas 1180	0.04-2500 $\mu\text{m}$
Sympathec	Helos BF/Vario	0.1 $\mu\text{m}$ -8750 $\mu\text{m}$
Malvern	Mastersizer 2000	0.02-2000 $\mu\text{m}$
Fritsch	Analysette 22"NanoTec"	0.1-1000 $\mu\text{m}$
Beckman-Coulter	LS 13320	0.04-2000 $\mu\text{m}$
Horiba	LA-920	0.02-2000 $\mu\text{m}$

## 7. Literatur

1. R.H. Müller, R. Schuhmann, Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis. Band 38, ed. A. Paperback, 1996, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH. Stuttgart.
2. A. Rawle, Basic Principles of particle size analysis Technical Paper Malvern Instruments, [www.malvern.co.uk](http://www.malvern.co.uk).

## 1. Grundlegendes & geschichtlicher Hintergrund

Die Photonenkorrelationspektroskopie (PCS) oder auch dynamische Lichtstreuung ist ein hochauflösendes Laserstreulichtverfahren zur Bestimmung der Partikelgröße sehr kleiner Partikel. Der Meßbereich liegt zwischen ca. 3 nm bis 3  $\mu\text{m}$ , größere Partikel, wie z.B. Mikropartikel, können mit dieser Methode also nicht vermessen werden. Die ersten Geräte erschienen Ende der 1970er Jahre auf dem Markt, Pionier auf diesem Gebiet war die englische Firma Malvern Instruments. Innerhalb von nur etwas mehr als 10 Jahren entwickelte sich die PCS zu einem Standardmeßverfahren und ist heutzutage in jedem guten technologischen Labor vertreten.

Wie so viele Dinge ist die PCS ein Abfallprodukt der Militärtechnik, stammend aus dem Royal Signal and Radar Establishment in Großbritannien. Beim Radar hat man das Problem über einem immer vorhandenen Grundrauschen das Signal eines fliegenden Flugzeuges und seine Geschwindigkeit herauszufiltern und genau dieses Prinzip liegt der PCS zugrunde. Auch hier soll die Geschwindigkeit von Teilchen über dem Grundrauschen ermittelt werden. Dazu werden bei der PCS Laserlichtstrahlen in eine Dispersion von Partikeln gesendet. Das von den sich bewegenden (diffundierenden) Partikeln zurück gestreute Licht wird dann über dem allgemeinen Grundrauschen anderer Lichtintensitäten detektiert und daraus über einen mathematischen Prozeß die Partikelgeschwindigkeit (Diffusionsgeschwindigkeit) ermittelt. Aus der Partikelgeschwindigkeit kann man die Diffusionskonstante  $D$ , und daraus über die Einstein-Gleichung die Partikelgröße berechnen (Abb. 1).

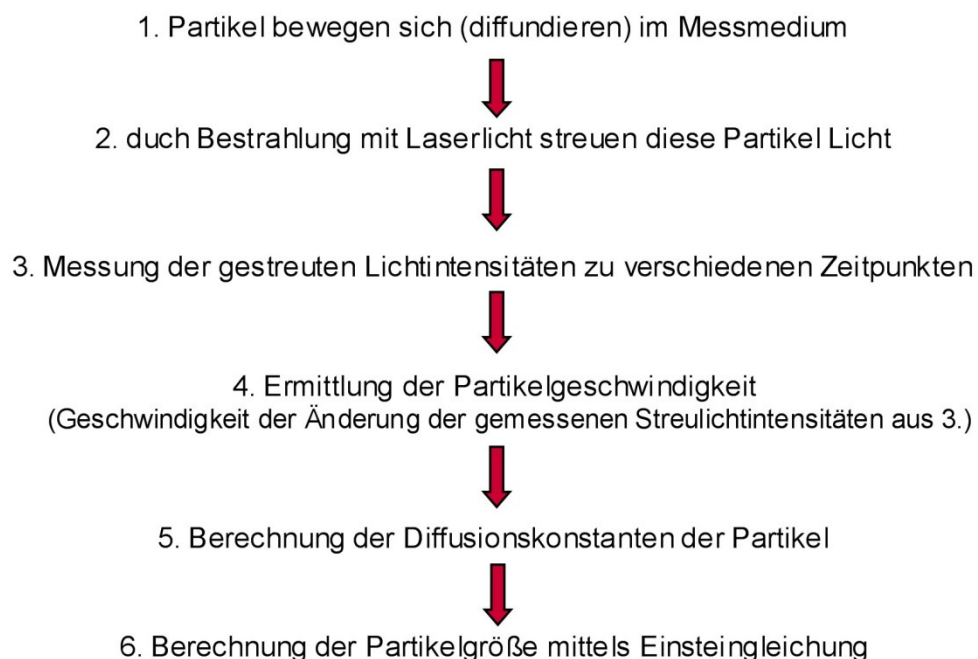


Abb. 1: Prinzip der Partikelgrößenbestimmung mittels PCS

Wichtig ist, dass die Partikelgröße nicht direkt gemessen wird, sondern indirekt ermittelt wird. Die PCS ist eigentlich ein Meßverfahren zur Ermittlung von Partikel- und Strömungsgeschwindigkeiten. Sie wird z.B. auch eingesetzt zur Ermittlung von Strömungsgeschwindigkeiten in Flüssigkeiten (die dann natürlich lichtstreuende Partikel enthalten müssen).

## 2. Meßaufbau

Der Meßaufbau ist sehr einfach (Abb. 2). Ein Laser erzeugt einen Lichtstrahl, der durch die Dispersion (Suspension oder Emulsion) geht. Das von den Partikeln erzeugte Streulicht wird unter einem Winkel von in der Regel  $90^\circ$  mit einem Photomultiplier oder einer Photodiode detektiert. Es ist auch die Detektion unter anderen Winkeln möglich, da ein Teilchen Streulicht über den vollen  $360^\circ$  Bereich aussendet. Es gibt auch PCS-Geräte, die die Dispersion unter mehreren Winkeln vermessen, und daraus präziser Partikelgröße und insbesondere Partikelgrößenverteilung ermitteln können. Das Meßsignal (detektierte Anzahl der Photonen) wird dann an einen Korrelator, verbunden mit einem Computer, zur Auswertung weitergeleitet.

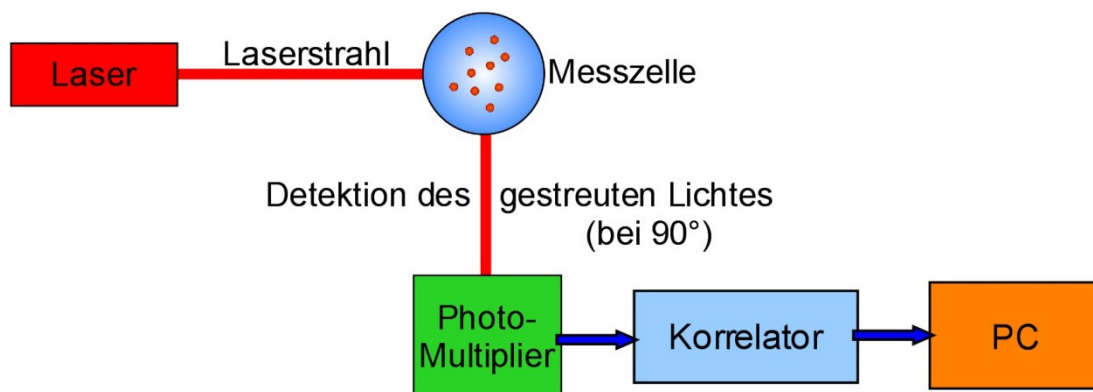


Abb. 2: Meßaufbau der PCS: Laser, runde oder viereckige Probenzelle mit Partikeln im Dispersionsmedium (meist Wasser), Streulicht detektiert mit Photomultiplier oder Photodiode und anschließender Aufarbeitung der Signale im Korrelator, verbunden mit PC (Abbildung modifiziert nach [1]).

## 3. Meßprinzip

Bei der PCS wird nicht die absolute gemessene Streulichtintensität ausgewertet, sondern die Schwankungsgeschwindigkeit der Streulichtintensität. Bei kleinen Teilchen schwankt die Intensität des gestreuten Lichtes schneller als bei großen Teilchen. Der Grund dafür ist, dass die Diffusionsgeschwindigkeit der kleinen Teilchen größer ist als die von großen Teilchen. Wie ist das zu erklären?

Die Diffusion von Partikeln ist auf die Brown'sche Molekularbewegung der Moleküle des die Partikel umgebenden Dispersionsmediums zurückzuführen. Die Moleküle des Dispersionsmediums stoßen die Partikel an und übertragen ihre kinetische Energie auf die Partikel, was zur Bewegung (Diffusion) der Partikel führt. Bei Übertragung einer gleich großen Energie führt dies bei einem kleinen Partikel zu schnellerer Bewegung als bei einem großen (vergleichbar man stößt mit einem Queue beim Billard eine Billardkugel oder einen Basketball an).



Wieso führt schnellere Diffusion nun zu schnelleren Schwankungen der Streulichtintensität?  
 Dies erklären die Abbildungen 3-5. Wenn ein Laserstrahl auf ein Teilchen trifft, so geht von diesem Teilchen rundum über den gesamten Winkelbereich eine neue Lichtwelle aus (Abb. 3).

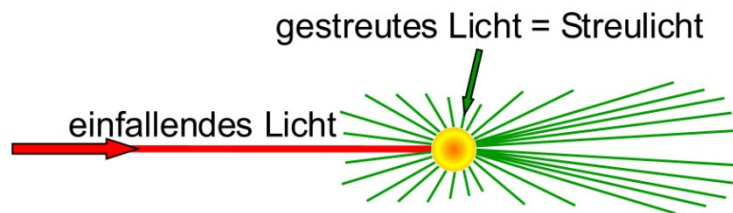


Abb. 3: Aussenden von neuen Lichtwellen von den Teilchen in der Dispersion (Abb. modifiziert nach [2]).

In der Probe sind viele Teilchen, das unter einem bestimmten Winkel (z.B. 90°) von der Photodiode detektierte Licht ist nun eine Überlagerung der Lichtwellen von diesen vielen Teilchen (Abb. 4). Bei der Überlagerung kommt es zu Interferenz, d.h. entweder zur Verstärkung oder zur Abschwächung der einzelnen Lichtstrahlen.

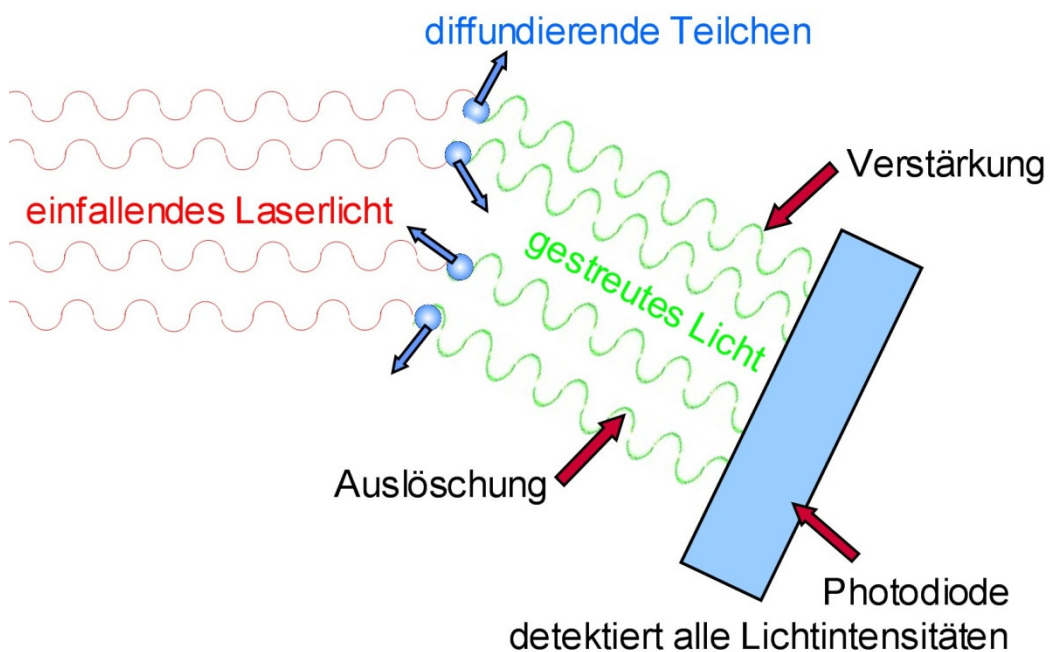
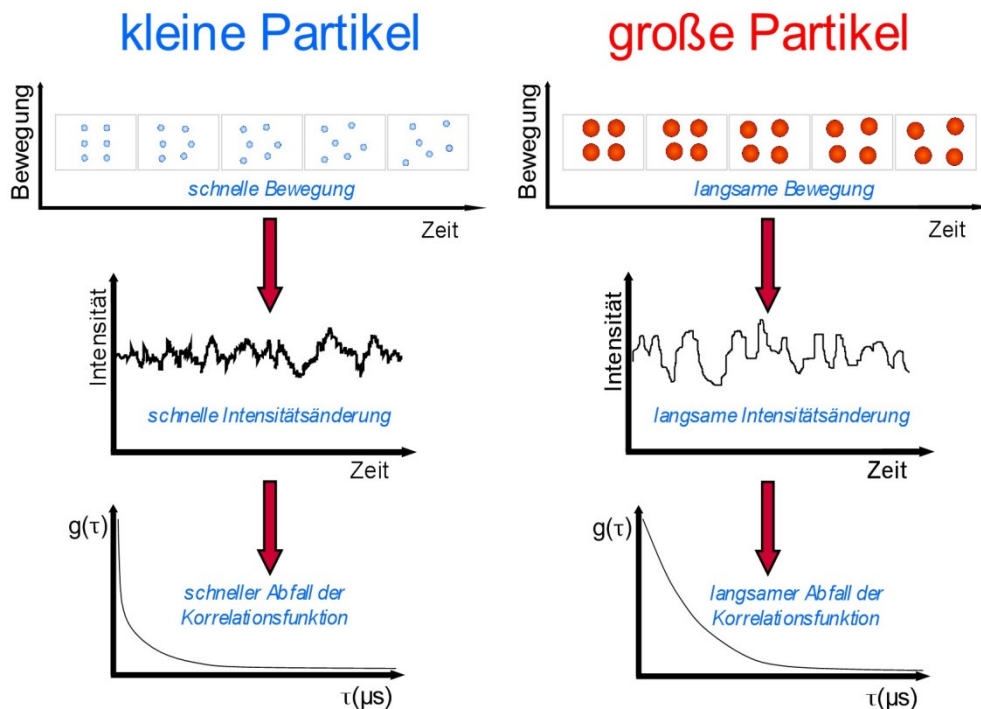


Abb. 4: Interferenz von Lichtstrahlen, ausgestrahlt von diffundierenden Partikeln in Richtung des Detektors Photodiode. Die Partikel diffundieren willkürlich in unterschiedliche Richtungen (blaue Pfeile), so dass sie bei der nächsten Intensitätsmessung unterschiedliche Positionen haben, was zu anderer Interferenz und gemessener Lichtintensität führt (Abb. modifiziert nach [3]).

Diffundieren Teilchen nun langsam (große Teilchen), so ist bei der nächsten Intensitätsmessung die Position nur sehr wenig unterschiedlich von der Ausgangsposition, die Interferenz ist ähnlich und man misst demzufolge eine wenig veränderte Streulichtintensität, Schwankungen treten nur langsam mit der Zeit auf. Diffundieren Teilchen sehr schnell, so sind sie an ganz anderen Orten, die Interferenz ist sehr stark unterschiedlich, entweder verstärkt oder abgeschwächt, so kommt es zu schnellen Änderungen / Schwankungen der Streulichtintensität bei kleinen Teilchen (Abb. 5).



**Abb. 5:** Schwankung der Streulichtintensität bei großen Teilchen (links oben und bei kleinen Teilchen rechts oben) führt zu langsamen bzw. schnellen Intensitätsschwankungen (Mitte) und daraus resultierend zu einer langsam oder schnell abfallenden Korrelationsfunktion  $g(\tau)$  als Funktion der Zeit ( $\mu\text{s}$ ) (unten).

#### 4. Auswertung der Streulichtsignale

Die PCS vermisst über bestimmte Zeiten (z.B. jeweils  $10 \mu\text{s}$ ) die Lichtintensität. Daraus wird dann eine sog. Korrelationsfunktion  $g(\tau)$  berechnet, die eine simple e-Funktion ist:

$$y = e^{-x} \qquad g(\tau) = e^{-2DK^2\tau}$$

$g(\tau)$  entspricht  $y$  und wird aus den gemessenen Intensitäten über einen Multiplikationsprozeß berechnet (darauf weiter einzugehen führt hier zu weit). Rechts von der Gleichung steht die bekannte Eulersche Zahl  $e$ , sowie der Streulichtvektor  $K$ , der aus der Wellenlänge des Laserlichtes und dem Streulicht (Detektions)winkel berechnet werden kann und auch die Meßzeit  $\tau$  (Tau) ist bekannt. Die einzige Unbekannte ist die Diffusionskonstante  $D$ , die nun aus der Gleichung berechnet werden kann.

Abb. 5 zeigt, dass für langsam diffundierende Partikel die Korrelationsfunktion langsam abfällt, für kleine schnell diffundierende Partikel fällt sie steiler ab. Der unterschiedliche Abfall entspricht einer niedrigen (große Partikel) bzw. hohen Diffusionskonstanten  $D$  (kleine Partikel).

Zur endgültigen Berechnung des Partikelradiuses verwendet man die Einstein-Gleichung:

$$D = \frac{K \cdot T}{6\pi r \eta} \qquad \text{aufgelöst nach:} \qquad r = \frac{K \cdot T}{D 6\pi \eta}$$

$K$  – Boltzmann Konstante

$T$  – absolute Temperatur in Kelvin

$\eta$  – Viskosität

$r$  – Partikelradius

Die Funktion  $g(\tau)$  wird durch Multiplikation von Streulichtintensitäten berechnet, wobei für eine on-line Auswertung die Multiplikation abgeschlossen sein muß, bevor der nächste Messwert kommt. Da  $\tau$  auch so kurz wie 50 ns sein kann, muß die Multiplikationsoperation in 50 ns abgeschlossen sein. Bei Einführung der PCS Ende der 1970er hatten die Computer noch keine so schnellen Rechenzeiten, so dass die Leistung von Malvern war, einen Multiplikator zu bauen, der eine Multiplikation in 50 ns durchführen konnte, der sog. Korrelator zu on-line Erstellung der Korrelationsfunktion. Heute haben die Computer bei der PCS nur noch eine Korrelatorkarte eingebaut.

Neben dem mittleren Partikelradius  $r$  ermittelt die PCS noch einen sog. Polydispersitätsindex (PI) als Maß für die Breite der Verteilung. Der PI ist Null bei monodispersen Partikeln, ca. 0,100-0,200 bei engen Verteilungen, 0,300 bei breiteren und ab 0,5 ist die Verteilung sehr breit.

## 5. Praktische Hinweise zur Messung

Es kann in jedem, dünnflüssigen (einige mPas) durchsichtigen Medium gemessen werden. Meist wird Wasser verwendet. Im Ggs. zum Coulter Counter ist keine Elektrolytlösung notwendig, so dass Aggregation aufgrund von Zetapotentialerniedrigung durch Elektrolyte vermieden wird.

Das Medium darf nicht zu viskos sein (z.B. Öle, 80-100 mPas), da dann die Korrelationsfunktion zu langsam abfällt und nicht mehr sauber ausgewertet werden kann (wird oft auch von Profis übersehen!).

Zur Messung muß die Dispersion in der Regel verdünnt werden, ca. 1-3  $\mu$ l auf 1 ml, so dass eine schwach bläulich tyndallisierende Dispersion entsteht. Es werden also nur sehr geringe Probenmengen benötigt.

Die Dispersion muß ausreichend verdünnt sein, damit ein Lichtstrahl nicht an mehreren Teilchen gestreut wird, bevor er detektiert wird. Dies führt zu stärker schwankenden Lichtintensitäten und täuscht kleinere Teilchen vor. Die Dispersion darf aber auch nicht zu stark verdünnt werden, da sonst kein klares Signal über dem Grundrauschen erhalten wird.

Verdünnen ist bei Emulsionen unkritisch. Werden jedoch Feststoffartikel verdünnt, so können sich diese beim Verdünnen beginnen aufzulösen! Dies kann auch bei sehr schwer löslichen Feststoffen auftreten, da die Verdünnung sehr stark ist. In solchen Fällen empfiehlt es sich in mit Feststoff gesättigter wässriger Lösung/Dispersionsmedium zu messen.

Die Messungen sind sehr schnell, z.B. 10 Messungen an einer Probe in 5 Minuten, woraus der Mittelwert berechnet wird. Somit ist die PCS auch für den Durchsatz großer Probenmengen geeignet, ein wichtiger Punkt in der pharmazeutischen Industrie.

## 6. Neueste Entwicklungen – Rückwärtsstreuung

Seit ihrer Einführungen gab es bei der PCS viele Verbesserungen, der erste 1-bit Korrelator entspricht der Tin Lizzy von Ford, die heutigen Instrumente entsprechen eher dem Ferrari von Michael Schumacher in der Formel 1.

Um die Auflösung von Feststoffpartikeln zu verhindern gibt es nun PCS-Geräte, die nicht mehr in Seitwärtsstreuung sondern in Rückwärtsstreuung messen (z.B. Nanosizer ZS. Malvern Instruments). Die Probe muß nicht mehr verdünnt werden, man misst in der Originalkonzentration

(bis zu 30% Feststoffgehalt). Der Laserstrahl wird von den im Außenbereich der Probe befindlichen Partikeln reflektiert und dann über die Korrelationsfunktion ausgewertet.

## 7. Literatur

1. Müller, R.H., Schuhmann, R., *Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis*. Band 38, ed. APVPaperback, 1996. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
2. Horiba-Instruments, *Theory And Techniques Of Light Scattering, Presentation (800) 446-7422*, 2004.
3. Malvern-Instruments, *Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes*, DLS - Technical Note MRK656-01.

### 1. Grundlegendes & geschichtlicher Hintergrund

Die **2-dimensionale Polyacrylamid Gelelektrophorese**, kurz 2D-PAGE oder 2DE, wurde 1975 gleichzeitig, aber unabhängig voneinander, von Klose und O'Farrel entwickelt [1, 2]. Sie dient zur Auftrennung komplexer Proteingemische in die enthaltenen Einzelproteine. Nach der Trennung können dann die einzelnen Proteine identifiziert werden.

Die Identifizierung von Proteinmischungen spielt eine wichtige Rolle in der Proteomforschung, in der Biochemie und in der Molekularbiologie.

In der Pharmazie wird die 2D-Page zur Entwicklung von Arzneistoff-Carriern zum spezifischen Drug Targeting eingesetzt. Drug Targeting bedeutet einen Wirkstoff zu einem bestimmten Wirkort oder -organ zu transportieren. Dadurch wird die therapeutische Effizienz eines Medikamentes erhöht, da der Arzneistoff nur dorthin transportiert wird, wo er auch tatsächlich wirken soll und zusätzlich werden unerwünschte Nebenwirkungen minimiert. Drug Targeting ist somit das große Ziel in der Pharmazie.

Ein Grund, warum dieses Ziel so schwer realisierbar ist, ist die Tatsache, dass intravenös injizierte Partikel innerhalb kurzer Zeit als körperfremd erkannt werden und von Zellen des mononukleären phagozytären Systems (MPS), vor allem von der Leber (Kupfersche Sternzellen) und der Milz aufgenommen werden. Ursache für die Phagozytose ist die Adsorption von im Blut enthaltenen Blutplasmaproteinen, die sofort nach Injektion auf den Partikeln adsorbieren.

Welche Plasmaproteine und wieviel davon auf der Partikeloberfläche adsorbieren hängt von den physiko-chemischen Eigenschaften der Partikel ab. Somit kann man die Adsorption von Blutplasmaproteinen steuern, indem man die physiko-chemischen Eigenschaften der Partikel gezielt verändert.

Prinzipiell unterscheidet man:

1. Plasmaproteine, die die Phagozytose verstärken (Opsonine, z.B. Immunglobulin G (IgG) und die Komponenten des Komplementsystems)
2. Plasmaproteine, die eine Phagozytose verhindern (Dysopsonine, z.B. Albumin und Immunglobulin A (IgA))
3. Plasmaproteine, die den wirkstoffspezifischen Transport vermitteln

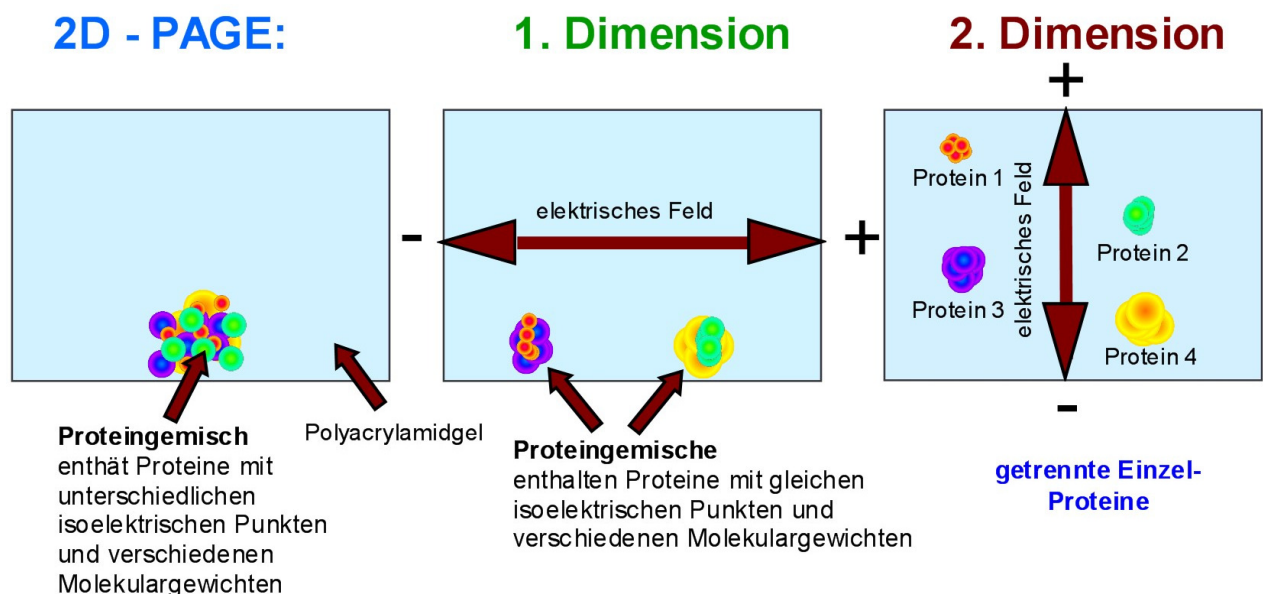
Ziel der Forschung ist es daher Plasmaproteine, die den wirkstoffspezifischen Transport vermitteln zu identifizieren. Die 2D-PAGE ist, wie oben erwähnt, in der Lage komplexe Proteingemische aufzutrennen und stellt damit eine ideale Technik dar, um Proteinadsorptionsmuster aufzuklären. Sie ermöglicht die Identifizierung von Plasmaproteinen, die den Wirkstofftransport vermitteln, indem Partikel untersucht werden, von denen man weiß, dass sie in der Lage sind einen Wirkstoff zu einem speziellen Wirkort zu transportieren. Die optimalen physiko-chemischen Eigenschaften von Partikeln kann man wiederum ermitteln, indem man die Proteinadsorptionsmuster verschiedener Partikel charakterisiert und die Partikel identifiziert, die eine optimale Adsorption der Targeting vermittelnden Blutplasmaproteine aufweisen. Hierzu werden die Partikel mit

Blutplasma inkubiert. Das jeweils resultierende Proteinabsorptionsmuster wird mittels 2D-PAGE identifiziert.

## 2. Prinzip der 2D-PAGE

Das Prinzip einer Gelelektrophorese ist immer die Trennung von Molekülen, die sich entweder in ihrer Ladung oder ihrem Molekulargewicht unterscheiden. Die zu trennenden Moleküle werden auf ein Gel aufgebracht und durch Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die Moleküle durch das Gel. Die zurückgelegte Wegstrecke ist jeweils abhängig von der Ladung bzw. dem Molekulargewicht. Das bedeutet positiv geladene Moleküle wandern zur negativen Kathode und negativ geladene Moleküle wandern zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit und demzufolge die zurückgelegte Wegstrecke pro Zeit ist auch abhängig vom Molekulargewicht. Daher wandern kleine, stark geladene Moleküle am schnellsten und schwachgeladene, große Moleküle am langsamsten.

Die zwei-dimensionale Gelelektrophorese unterscheidet sich vom klassischen Ablauf der Elektrophorese, da die Trennung der Moleküle in zwei separaten Elektrophorese-Schritten (zwei Dimensionen) durchgeführt wird. Im ersten Schritt, der sogenannten ersten Dimension, werden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) getrennt im zweiten Schritt (2. Dimension) werden sie dann nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Dazu wird das elektrische Feld senkrecht zur Laufrichtung der 1. Dimension angelegt. Zuletzt werden die Proteine durch Färbung sichtbar gemacht. Abb. 1 verdeutlicht den Ablauf.



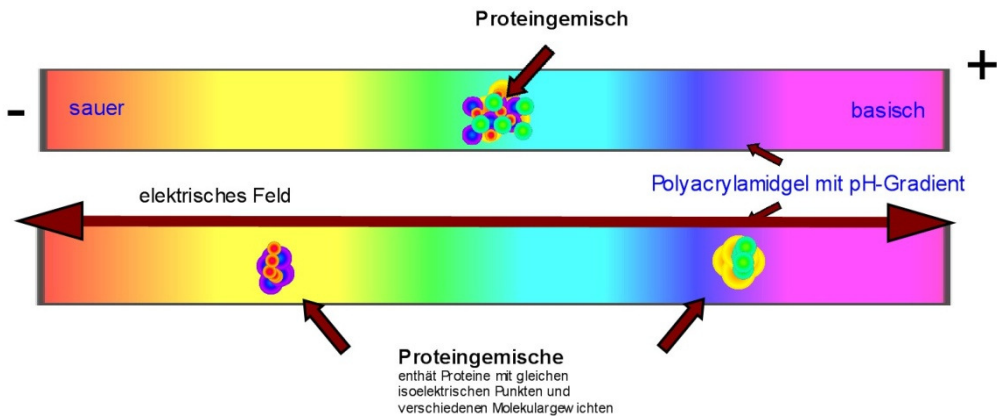
**Abb. 1: Prinzip der 2D-PAGE - nach Auftragen des Proteingemisches (links) erfolgt elektrophoretische Trennung nach dem isoelektrischen Punkt (1. Dimension, Mitte), in der 2. Dimension (rechts) erfolgt elektrophoretische Trennung nach Molekülmasse senkrecht zur Laufbahn der 1. Dimension.**

### 3. Erste Dimension: Auftrennung nach isoelektrischem Punkt

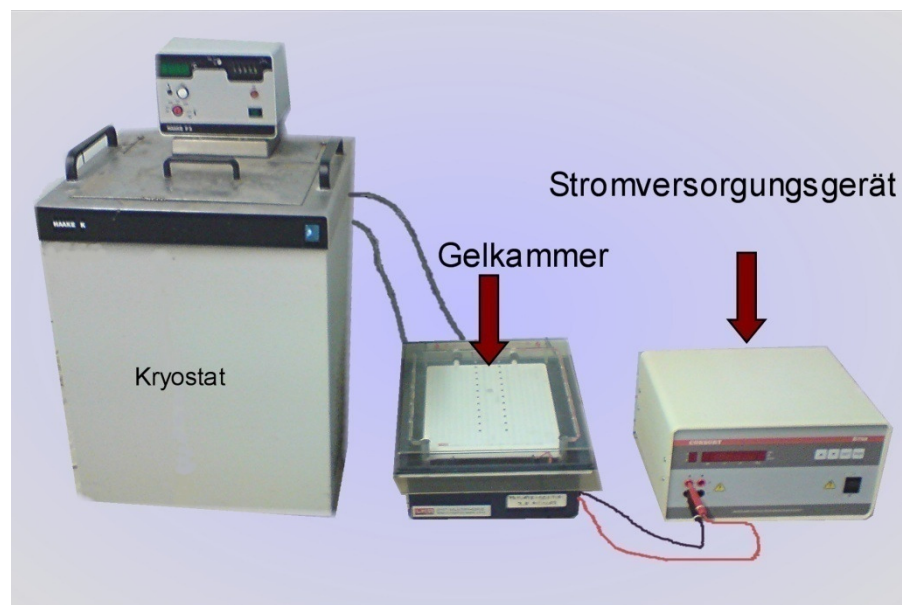
Hierzu wird ein Polyacrylamidgel mit einem pH-Gradient von sauer bis basisch hergestellt worauf das zu untersuchende Proteingemisch aufgetragen wird. Danach wird ein elektrisches Feld angelegt und die Proteine beginnen aufgrund ihrer Ladung zu wandern. Da Proteine Zwitterionen sind besitzen sie einen isoelektrischen Punkt. Das bedeutet, dass bei einem bestimmten pH-Wert



das Proteinmolekül nach außen eine neutrale Ladung besitzt, da sich die Ladungen im Molekül gegenseitig aufheben. Erreicht also ein Protein auf dem Gel den Bereich mit dem pH-Wert seines  $pI$  wird es nach außen neutral und verbleibt somit an dieser Stelle des Gels. Diesen Vorgang bezeichnet man als „isoelektrische Fokussierung“ (IEF). Abbildung 2 zeigt den Ablauf der 1. Dimension und Abbildung 3 zeigt die dazu benötigten Geräte.



**Abb. 2:** Ablauf der 1. Dimension - die Proteine werden auf das Gel aufgetragen (oben); durch Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die Proteine bis sie den pH-Wert ihres isoelektrischen Punktes erreichen (unten).



**Abb. 3:** Geräte für die IEF – Kryostat (links), Gelkammer (Mitte), Stromversorgungsgerät (rechts).

#### 4. Zweite Dimension: Auftrennung nach Molekulargewicht

Nach abgeschlossener Fokussierung müssen die IPG-Streifen auf die bevorstehende zweite Dimension vorbereitet werden. Dieser Vorgang nennt sich Äquilibration. Zunächst wird den Proteinen Natriumlaurylsulfat (engl. sodium lauryl sulfate, SDS) zugesetzt. Dieses maskiert die Eigenladung der Proteine und verursacht so eine hohe negative Nettoladung des Proteins. Zudem verändert dieses Detergens die native Konformation des Proteins, so dass alle Proteine eine mehr oder weniger ähnliche Konformation im Gel aufweisen.

So behandelt lassen sich die IPG-Streifen auf SDS-Gele transferieren. Diese sind im Allgemeinen Gele aus dem vernetzten Polymer Polyacrylamid, weshalb die zweite Dimension auch SDS-

Polyacrylamid-Gelelektrophorese, kurz SDS-PAGE, genannt wird. Dieses Polymer wirkt wie ein Sieb: es verlangsamt Proteine, die in einem elektrischen Feld wandern in etwa proportional zu ihrer molekularen Masse. Gestoppt wird die Elektrophorese, wenn die kleinen, schnell im Gel wandernden Proteine das Ende des Gels erreicht haben. Sichtbar gemacht wird dies durch Zusatz eines Farbstoffes, wie zum Beispiel Bromphenolblau. Damit die Proteine nun an exakt dieser Stelle über die Zeit konstant verbleiben, müssen sie fixiert werden. Dazu werden üblicherweise Methanol oder Ethanol und Essigsäure eingesetzt, welche die getrennten Proteine denaturieren und in der Gelmatrix fixieren. Eingeführt wurde die SDS-PAGE 1967 von Shapiro, Vinuela et al. Abbildung 4 zeigt die Geräte der 2. Dimension.

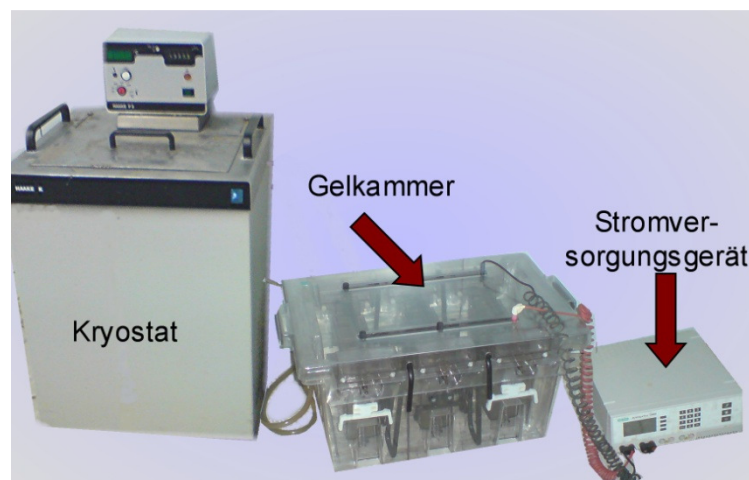


Abb. 4: Geräte für die SDS-PAGE – Kryostat (links), Gelkammer (Mitte), Stromversorgungsgerät (rechts).

### 5. Färbung und Auswertung

Um die aufgetrennten Proteine sichtbar zu machen stehen verschiedene Methoden zur Wahl. Je nach Methode gibt es dazu ein spezielles Färbeprogramm mit verschiedenen Schritten die eingehalten werden müssen. Bei den verschiedenen Methoden unterscheidet man zwischen Absorptionsfarbstoffen, wie Coomassie-Brilliant-Blau oder Silberfärbung und Fluoreszenzfarbstoffen, wie zum Beispiel SyproRuby. Jede dieser Methoden hat Vor- und Nachteile bezüglich Sensitivität, Störanfälligkeit, Zeitaufwand, etc.

Im Folgenden werden die gefärbten Gele dann mittels Imaging-Geräten digitalisiert. Mit Hilfe von Referenzgelen lassen sich danach die Spots einzelnen Proteingruppen zuweisen. Abbildung 5 zeigt ein so erhaltenes Gel.

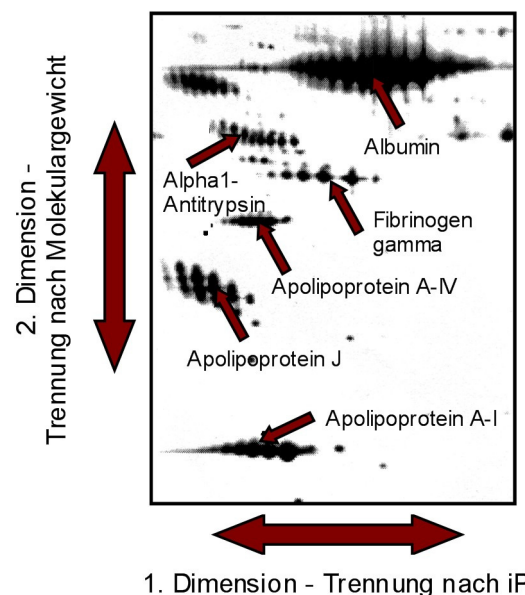


Abb. 5: Gel mit aufgetrennten Proteinspots, die anhand von Referenzgelen identifiziert werden können.

## 6. State of the Art

Mit Hilfe der 2D-PAGE konnte 1998 gezeigt werden, dass Polysorbat 80 zur Adsorption von Apolipoprotein E führt [3]. Zuvor wurde von Kreuter et. al in einer Reihe erfolgreicher in-vivo-Studien gezeigt, dass Polybutylcyanoacrylat (PBCA)-Nanopartikel die Bluthirnschranke (BHS) passieren können, wenn sie mit Polysorbat 80 stabilisiert werden [4].

Aus diesen Erkenntnissen ergab sich die bahnbrechende Möglichkeit Arzneistoffe über die Blut-Hirnschranke zu transportieren. Durch die Identifizierung von Apo E, also Targeting-vermittelndes Protein, ist es nun möglich weitere Substanzen und Partikeleigenschaften zu ermitteln, die zur vermehrten Adsorption von Apo E führen und somit hocheffizient in der Lage sind Arzneistoffe ins Gehirn zu targeten. In der Zukunft sollen nun auch andere Proteine erforscht werden, die in der Lage sind Arzneistoffe spezifisch in andere Organe oder Gewebe zu transportieren.

## 7. Literatur

1. J. Klose, Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals, *Humangenetik* 26(3), (1975). pp. 231-43.
2. P.H. O'Farrell, High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins, *J Biol Chem* 250(10), (1975). pp. 4007-21.
3. R.H. Müller et al., Medicament excipient particles for tissue-specific application of a medicament. United States Patent 6,288,040, 2001. PharmaSol GmbH.
4. R. Alyautdin, Gothier, D., Petrov, V., Kharkevich, D., Kreuter, J., Analgesic activity of the hexapeptide dalargin adsorbed on the surface of polysorbate 80-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 41 (1995). pp. 44-48.

## 1. Einleitung

Die Eigenschaft der Röntgenstrahlen, unterschiedliche Materialien zu durchdringen und dabei mehr oder weniger stark abgeschwächt zu werden, hat zu den bekannten bildgebenden Anwendungen in der Medizin und Technik geführt. Neben dieser „Durchleuchtungstechnik“ kann jedoch auch die Beugung von Röntgenstrahlen analytisch genutzt werden. Die Röntgenbeugung durch Strukturen eines Probenmaterials kann wertvolle Informationen über dessen inneren Aufbau liefern.

Diese als „Röntgendiffraktometrie“ bezeichnete Methode wird unter anderem zur Charakterisierung und Feinstrukturuntersuchung von Substanzen und Zubereitungen angewandt. Sie geht auf eine Entdeckung von Max von Laue (1912) zurück. In seiner Versuchsanordnung lenkte ein Kristall einen Röntgenstrahl in unterschiedliche Richtungen ab, so dass dieser auf einer Fotoplatte ein Beugungsmuster hinterließ. Hierdurch war zugleich der Wellencharakter der von Conrad Röntgen entdeckten „X-Strahlen“ bewiesen [1].

## 2. Eigenschaften und Erzeugung von Röntgenstrahlen

Röntgenstrahlen haben mit dem Licht gemeinsam, dass sie elektromagnetische Wellen darstellen, die sich geradlinig ausbreiten, und gleichzeitig aus Photonen bestehend aufgefasst werden können. Aufgrund ihrer viel kürzeren Wellenlänge sind Röntgenstrahlen allerdings erheblich energiereicher als das sichtbare oder ultraviolette Licht.

Eigenschaften von Röntgenstrahlen
- Wellenlängenbereich ca. 0,01 - 10 nm
- Durchdringungsvermögen (materialabhängig)
- Durch Linsen und magnetische Felder nicht ablenkbar
- Keine Interferenz mit gewöhnlichen Beugungsgittern

In einer Röntgenröhre werden die an der Glühkathode austretenden Elektronen durch eine zwischen Kathode und Anode angelegte Hochspannung (in der Röntgendiffraktometrie oft im Bereich von ca. 20 bis 60 kV) beschleunigt. Die Elektronen prallen auf die Anode, wobei Röntgenstrahlung aufgrund zweier unterschiedlicher Mechanismen erzeugt wird:

1. Die beschleunigten Elektronen werden in der Nähe von Atomkernen des Anodenmaterials abgebremst und geben dabei einen Teil ihrer Energie als so genannte Bremsstrahlung ab, die das kontinuierliche Röntgenspektrum liefert.

2. Auftreffende Elektronen schlagen aus den K-Schalen der Anodenmetall-Atome Elektronen heraus, so dass in dieser Lücken entstehen, die durch Elektronen der L-Schale oder darüberliegender Schalen ersetzt werden. Bei diesem Übergang wird jeweils ein Photon emittiert, dessen Energie im Bereich der Röntgenstrahlung liegt. Dieser zweite Mechanismus liefert das charakteristische Röntgenspektrum oder Linienspektrum, dessen Peak-Lage vom Anodenmaterial (z.B. Kupfer oder Wolfram) abhängig ist und das kontinuierliche (Brems-)Spektrum überlagert. Für röntgendiffraktometrische Untersuchungen wird eine bestimmte Wellenlänge aus dem Linienspektrum herausfiltriert (monochromatische Röntgenstrahlung).

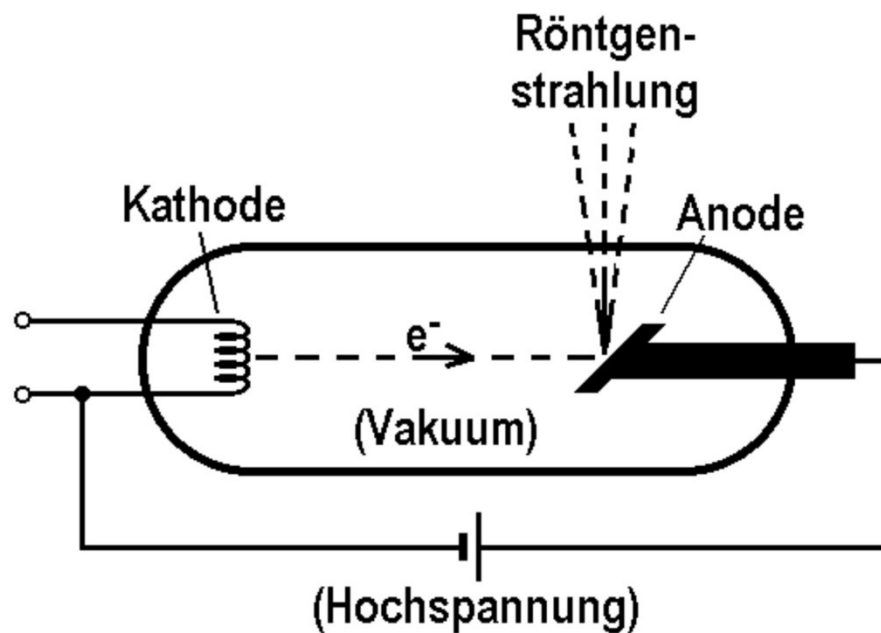


Abb. 1: Röntgenröhre, schematisch

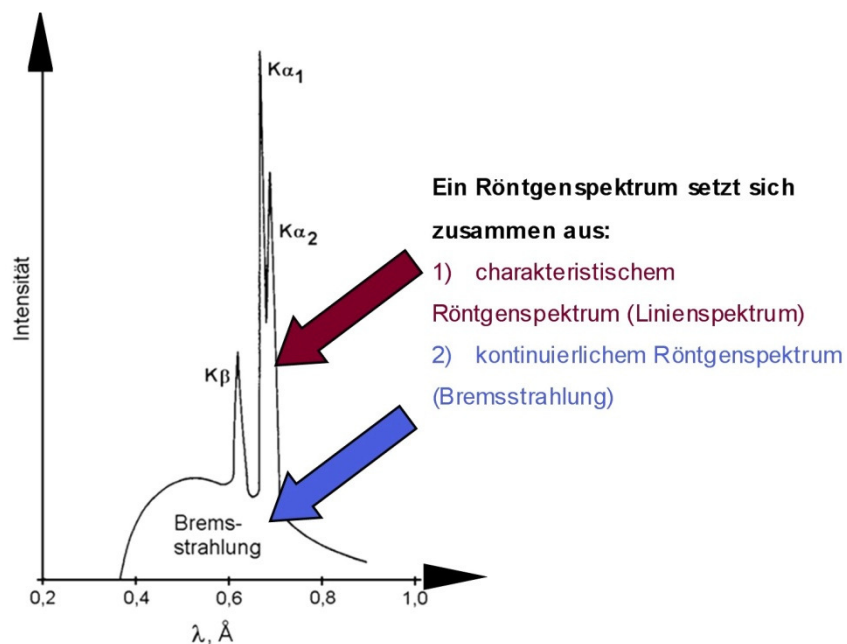


Abb. 2: Beispiel eines Röntgenspektrums (modifiziert nach [2])

### 3. Beugung von Röntgenstrahlen, Braggsches Gesetz

Die Wellenlänge von Röntgenstrahlen liegt im Bereich von Atom- bis Molekülgröße. Kristalle, die ein dreidimensionales Gitter aus Atomen oder Molekülen darstellen, wirken somit auf Röntgenstrahlen wie eine Vielzahl von in parallelen Ebenen angeordneten Beugungsgittern. Die ebenen, parallelen Schichten aus Atomen oder Molekülen werden als Netzebenen bezeichnet.

Die Atome in einem Kristall werden durch den auftreffenden Röntgenstrahl zu Schwingungen angeregt und strahlen dabei selbst Wellenfronten gleicher Wellenlänge (Sekundärstrahlung) ab. Diese Wellen der Sekundärstrahlung interferieren miteinander. Sie legen je nach Entstehungsort und Geometrie des Kristallgitters unterschiedlich lange Wege zurück („Gangunterschied“), so dass parallele Strahlen durch Phasenverschiebung gegeneinander eine Verstärkung oder Abschwächung ihrer Intensität erfahren können.

Die Bedingungen, unter denen eine Interferenz im Sinne einer maximalen Verstärkung (Schwingen paralleler Sekundärwellen in Phase) auftreten kann, wird durch das Braggsche Gesetz beschrieben:

$$n \cdot \lambda = 2 d \sin \theta$$

$n$  = ganze Zahl,  $d$  = Netzebenenabstand,  $\theta$  = Einfallswinkel des Primärstrahls

Dies bedeutet, es tritt eine maximale Verstärkung (Intensitätsmaximum) auf, wenn  $2 d \sin \theta$  einem ganzzahligen Vielfachen der Wellenlänge entspricht.

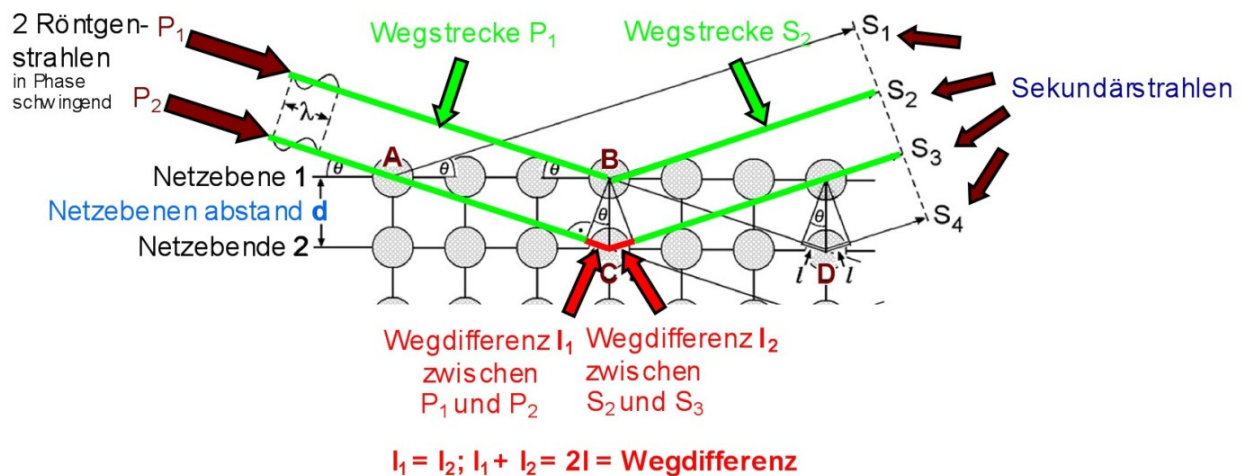


Abb. 3: Prinzip der Röntgendiffraktometrie (modifiziert nach [2])

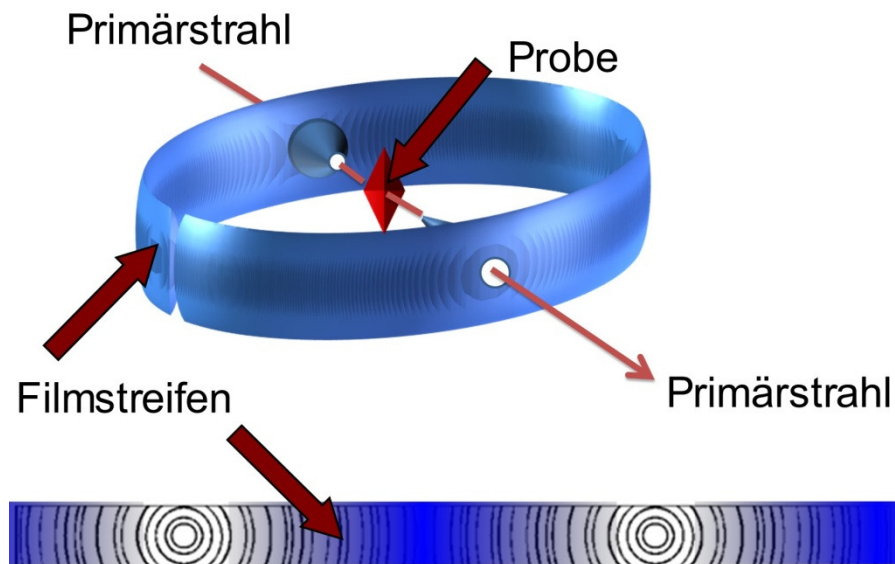
In der Abbildung 3 sind zwei in Phase schwingende, unter dem Winkel  $\theta$  einfallende Röntgenstrahlen dargestellt, die in den Punkten A und B an der obersten Netzebene 1 gebeugt werden. Gleichzeitig werden die eindringenden Strahlen auch an der Netzebene 2 in den Punkten C und D gebeugt. Es werden nachfolgend nur die Sekundärstrahlen betrachtet, die unter gleichem Winkel  $\theta$  (wie bei einer Reflexion) abgelenkt werden. Der in der tieferen Netzebene 2 in Punkt C gebeugte Strahl legt einen um die Strecke  $2l$  längeren Weg bis zum Punkt  $S_3$  zurück als der an Netzebene 1 in B gebeugte Strahl bis zum Punkt  $S_2$ , wobei  $l = d \cdot \sin \theta$  ist. Entspricht  $2l (= 2 d \cdot \sin \theta)$  der Wellenlänge  $\lambda$ , treffen die Sekundärstrahlen in  $S_2$  und  $S_3$  mit einer Wellenlänge



Gangunterschied, d.h. in gleicher Phase auf und interferieren im Sinne einer Intensitätsverstärkung.

In einer Pulverprobe liegen kristalline Teilchen räumlich ungeordnet vor, somit können Beugungen an einer Vielzahl unterschiedlichster Netzebenen auftreten (in der Abbildung oben könnte z.B. bei veränderter Lage auch eine Netzebene durch B und D, die nächste durch A und C verlaufen, was einen kleineren Netzebenenabstand bedeuten würde).

Bei Auftreffen des Primärstrahls auf eine Pulverprobe wird somit eine große Anzahl konzentrischer Beugungskegel unterschiedlicher Winkel erzeugt, die auf einem großflächigen Film ein Bild zahlreicher konzentrischer Kreise mit dem Primärstrahl im Zentrum ergeben würde. In der Debye-Scherrer-Kamera wird ein ringförmig um die Probe herum angeordneter Filmstreifen verwendet, dessen Schwärzung photometriert wird, um die Höhe der Intensitätsmaxima und ihre Winkellage zu bestimmen.



**Abb. 4:** Schematischer Aufbau Debye Scherrer Kamera (oben) und korrespondierende Aufnahme (unten) (modifiziert nach [2])

Häufig wird an Stelle eines Films zur Detektion der Intensitätsmaxima ein Zählrohr eingesetzt, das eine Kreisbahn um die Probe herum abfahren kann (Goniometer-Verfahren).

Bei der Röntgendiffraktometrie werden Weit- und Kleinwinkelbeugung unterschieden:

	Netzebenenabstände	Beugungswinkel
Röntgen-Weitwinkelbeugung (= Wide angle X-ray diffractometry, WAXD)	0,1 - 2 nm	2 - 50°
Röntgen-Kleinwinkelbeugung (= Small angle X-ray diffractometry, SAXD)	2 - 50 nm	< 2°

#### 4. Anwendungszwecke der Röntgendiffraktometrie

- Strukturaufklärung (Verteilung von Elektronendichten, Lage von Atomen bzw. Molekülen; hierzu sind Einkristall-Untersuchungen erforderlich)
- Identifizierung von Substanzen (das Röntgendiffraktogramm als „Fingerabdruck“ einer Substanz)
- Identifizierung unterschiedliche polymorpher Formen einer Substanz
- Unterscheidung zwischen der amorphen und kristallinen Form eines Feststoffs

Während kristalline Feststoffe charakteristische Beugungs-Intensitätsmaxima zeigen (in den Röntgendiffraktogrammen - Intensität gegen den Winkel  $2\theta$  - als Peaks erkennbar), zeigen amorphe Stoffe nur eine diffuse Streuung („Halo“), was im Röntgendiffraktogramm als flacher, breiter Berg erkennbar ist.

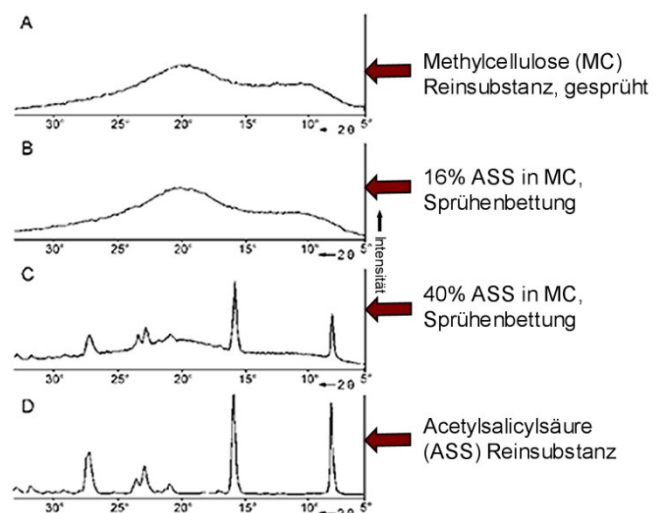
##### 4.1 Anwendungsbeispiele aus der pharmazeutischen Technologie:

Die vierteilige Abbildung zeigt unter A ein Diffraktogramm reiner sprühgetrockneter Methylcellulose ohne, unter D das der reinen Acetylsalicylsäure (ASS) mit deutlichen Kristallinitätspeaks.

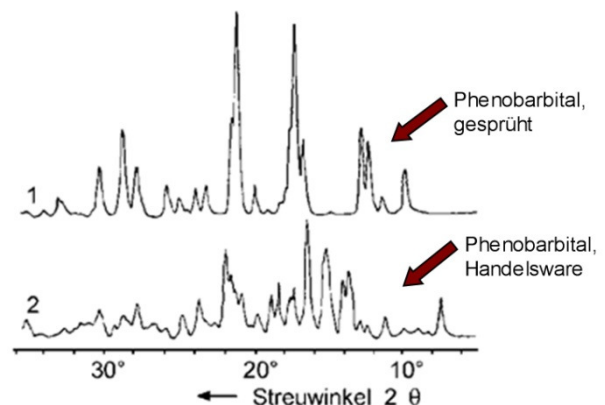
Eine Sprüheinbettung mit 16 % ASS in Methylcellulose weist keine Peaks auf, während eine mit 40 % ASS deutliche Peaks des Wirkstoffs zeigt.

Der 16-%ige ASS-Anteil liegt demnach amorph, in Form einzelner ASS-Moleküle im Hilfsstoff dispergiert vor, ein 40-%iger ASS-Anteil ist dafür jedoch zu hoch, er ist in Form von Kristallen in der Methylcellulose dispergiert.

Die nebenstehende Abbildung zeigt im Vergleich die Röntgendiffraktogramme von Phenobarbital-Handelsware und einem Sprühprodukt des Phenobarbitals. Da Phenobarbital Polymorphie zeigt, also in unterschiedlichen Kristallmodifikationen auftreten kann, ist aus den deutlich differierenden Röntgendiffraktogrammen zu schließen, dass es sich bei den beiden Produkten um zwei unterschiedliche Modifikationen handelt.



**Abb. 5: Röntgendiffraktometrie dient zur Bestimmung ob eine Substanz amorph oder kristallin vorliegt (modifiziert nach [3]).**



**Abb. 6: Röntgendiffraktometrie dient zur Bestimmung ob eine Substanz in verschiedenen polymorphen Modifikationen auftritt (modifiziert nach [4]).**

## 5. Literatur

1. L. Spieß et al., Moderne Röntgenbeugung, 2005, B. G. Teubner Verlag. Wiesbaden.
2. H. Kirschner, Einführung in die Röntgenfeinstrukturanalyse, 1980, Vieweg-Verlag. Wiesbaden.
3. H.E. Junginger, Acta Pharmaceutica Technologica 23 (1977). pp. 225.
4. D. Schenk, Acta Pharmacia Technologica 25 (1979). pp. 241

## 1. Einleitung

Mit dem Begriff „Thermoanalyse“ oder „Thermische Analyse“ (TA) werden Verfahren bezeichnet, mit denen temperaturbedingte Änderungen von Eigenschaften eines Probenmaterials oder thermisch ausgelöste Ereignisse in einer Probe untersucht werden. Zu diesem Zweck wird die Probe allgemein einem kontrollierten Temperaturprogramm unterworfen. Dies bedeutet, dass die Veränderung der Temperatur in Abhängigkeit von der Zeit festgelegt und gesteuert wird (Beispiel: lineares Aufheizen mit einer Rate von 5 K/min bis 250 °C).

Thermoanalytische Verfahren sind in der Charakterisierung von Substanzen (auch von technisch verwendeten Werkstoffen) sowie der Untersuchung von chemischen und physikalischen Vorgängen etabliert [1]. Für pharmazeutisch-technologische Fragestellungen sind besonders die Verfahren zur Untersuchung thermisch verursachter Enthalpie- und Massenänderungen von Bedeutung. Thermoanalytische Methoden werden im Europäischen Arzneibuch beschrieben [2].

## 2. Thermoanalytische Verfahren

Als thermoanalytische Verfahren seien - ohne Anspruch auf Vollständigkeit – genannt:

1. *Untersuchung energetischer (endothermer oder exothermer) Veränderungen:*
  - Differentialthermoanalyse (oder Differenzthermoanalyse), DTA
  - Differenzkalorimetrie („Differential Scanning Calorimetry“, DSC), auch als Dynamische Differenzkalorimetrie (DDK) bezeichnet
2. *Untersuchung von Massenänderungen:*
  - Thermogravimetrie (TG, auch Thermogravimetrische Analyse, TGA)
3. *Untersuchung von Längenausdehnungen, Deformationen:*
  - Thermodilatometrie
  - Thermomechanische Analyse (TMA, mit mechanischer Belastung)
4. *Untersuchung von freigesetzten flüchtigen Bestandteilen:*
  - Emissionsgasanalyse, Evolved Gas Analysis (EGA, gekoppelt mit TG)
5. *Untersuchung optischer Eigenschaften oder des mikroskopischen Aussehens:*
  - Thermooptische Analyse (TOA)

## 3. Exotherme und endotherme Vorgänge

In Reinstoffen wie auch in Stoffgemischen (also auch in pharmazeutischen Zubereitungen) können chemische oder physikalische Vorgänge thermisch ausgelöst werden, die entweder exotherm oder endotherm verlaufen.

- *Beispiele für exotherme Vorgänge:*

Oxidationsprozesse, Kristallisation, polymorphe Umwandlung zu energieärmeren Kristallmodifikationen

- *Beispiele für endotherme Vorgänge:*

Schmelzen, Verdampfen, Sublimieren, polymorphe Umwandlung zu energiereicheren Kristallmodifikationen (im Fall der Enantiotropie).

#### 4. Differentialthermoanalyse (DTA)

Zielgröße ist hierbei eine auftretende Temperaturdifferenz zwischen der in einem kleinen Tiegel befindlichen Probe und dem i.a. leeren Referenztiegel, während das Temperaturprogramm abläuft. Tritt bei einer bestimmten Aufheiztemperatur eine Temperaturabweichung der Probe nach oben gegenüber dem Referenztiegel auf, lässt dies auf einen exothermen Vorgang in der Probe schließen, eine negative Temperaturabweichung dagegen auf einen endothermen Vorgang.

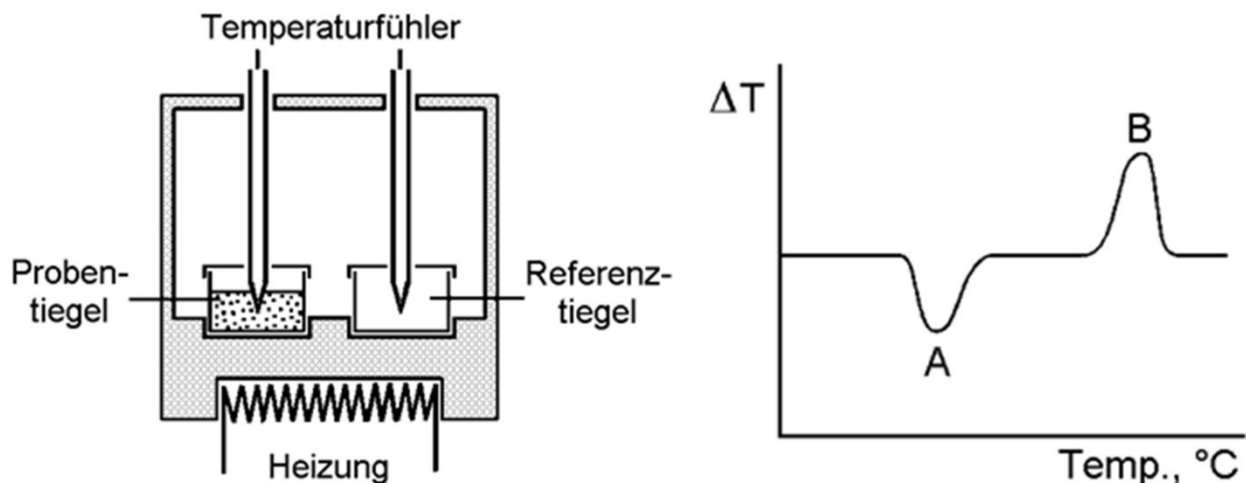


Abb. 1: DTA; links: schematischer Aufbau, rechts: DTA-Thermogramm, A = endotherm, B = exotherm

#### 5. Differenzkalorimetrie (DSC, DDK)

Im Gegensatz zur DTA wird bei der DSC die bei thermisch ausgelösten endo- oder exothermen Vorgängen übertragene Wärmemenge, ausgedrückt als Enthalpieänderung  $\Delta H$ , gemessen. Dies kann mit zwei unterschiedlichen Prinzipien realisiert werden, die als Dynamische Wärmestrom-Differenzkalorimetrie (DWDK) bzw. als Dynamische Leistungs-Differenzkalorimetrie (DLDK) bezeichnet werden.

Bei der DWDK werden durch Messung der Temperaturen im Bereich der Heizquelle und des Proben- sowie Referenztiegels Unterschiede im Wärmefluss (Wärmestrom) detektiert (Abb. 2.).

DLDK-Geräte verfügen über zwei getrennte Öfen mit elektronisch geregelten Heizungen für den Proben- und Referenztiegel. Die Temperaturdifferenz beider Tiegel wird während des Temperaturprogramms auf  $\Delta T = 0$  gehalten. Dies bedeutet, dass bei einem endothermen Vorgang im Proben-tiegel die Heizleistung für diesen erhöht, bei einem exothermen Vorgang heruntergeregelt wird. Über die Veränderung der Heizleistung kann die bei dem Vorgang aufgetretene Enthalpieänderung der Probe erfasst werden. Rechnerisch erfolgt dies durch Integration der Peakfläche (Abb. 3).

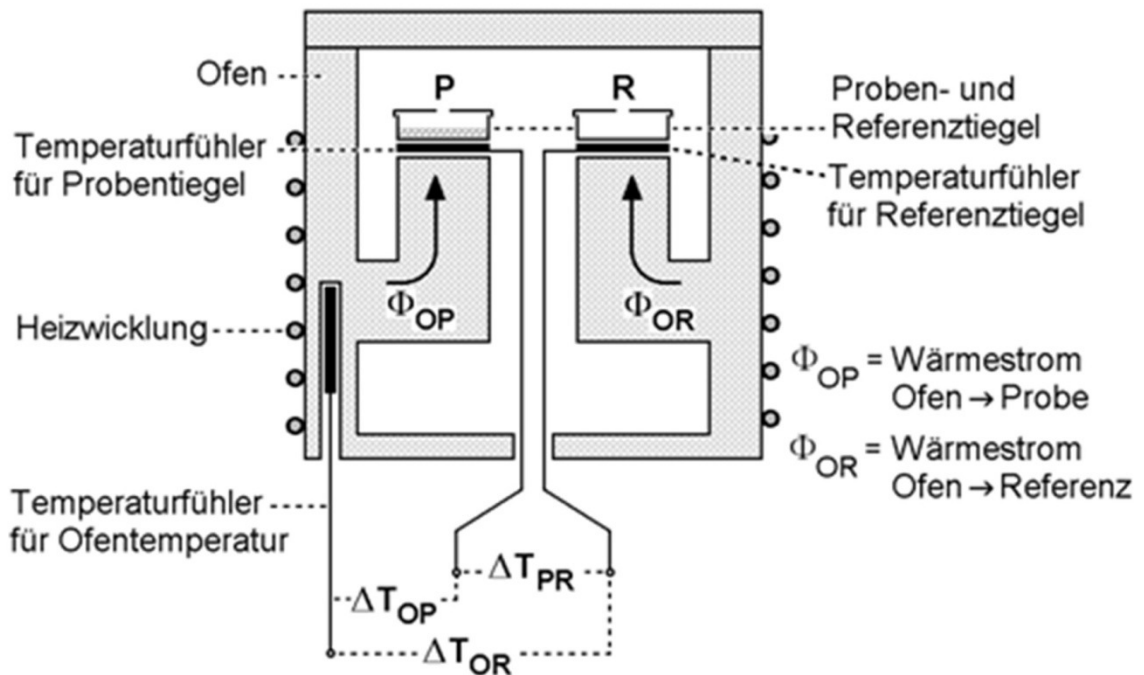


Abb. 2: Dynamische Wärmestrom-Differenzkalorimetrie (DWDK), schematisch

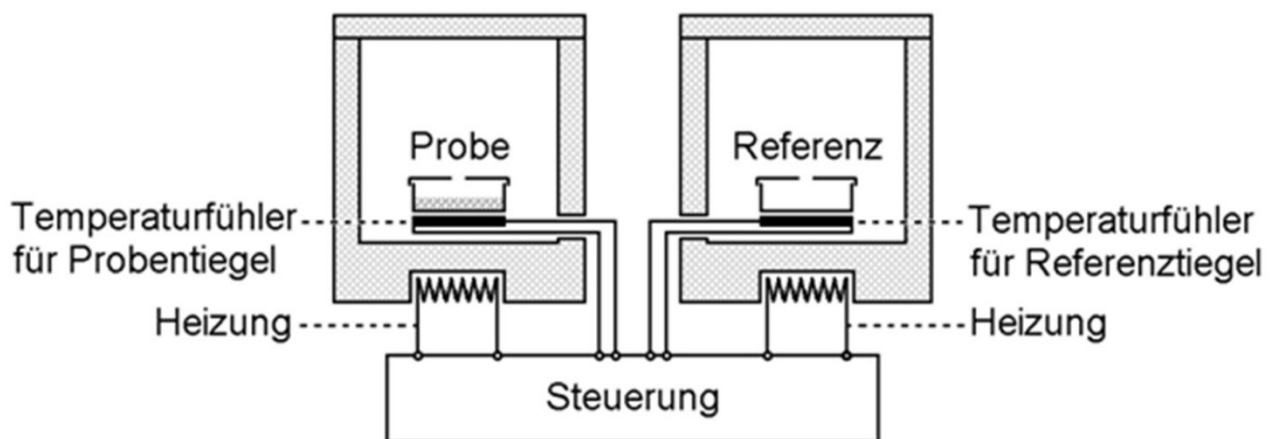
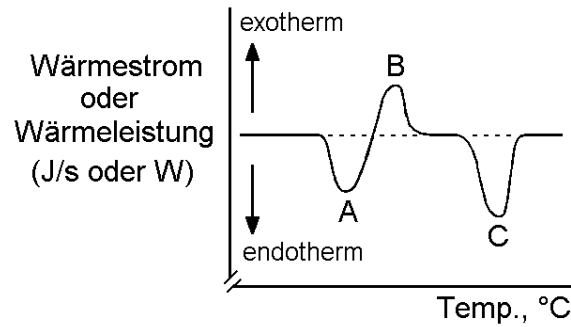


Abb. 3: Dynamische Leistungs-Differenzkalorimetrie (DLDK), schematisch

In der Pharmazeutischen Technologie werden mittels DSC unter anderem z.B. Glasübergangstemperaturen, Phasenumwandlungen amorph-kristallin oder Phasenübergänge polymorpher Substanzen untersucht. Eine weitere typische Fragestellung besteht darin, ob ein Wirkstoff in einer Zubereitung, z.B. einem mit einem zusätzlichen Hilfsstoff gebildeten Lyophilisat oder Sprühtrocknungsprodukt, in amorpher oder noch in kristalliner Form vorliegt. Kristalline Substanzen sind durch einen scharfen Schmelzpeak charakterisiert. Temperaturlage, Breite und Höhe des Schmelzpeaks lassen auch Rückschlüsse auf den Reinheitsgrad einer Substanz zu. Sollen energetische Veränderungen, die auch mit Massenänderungen einhergehen (z.B. Verdunsten, Verdampfen, Sublimieren), untersucht werden, werden zusätzlich thermogravimetrische Untersuchungen durchgeführt (Beispiel Abb. 4.).





Polymorphie: A = Schmelzen der metastabilen Modifikation II,  
 B = Auskristallisieren der stabilen Modifikation I,  
 C = Schmelzen von Modifikation I.

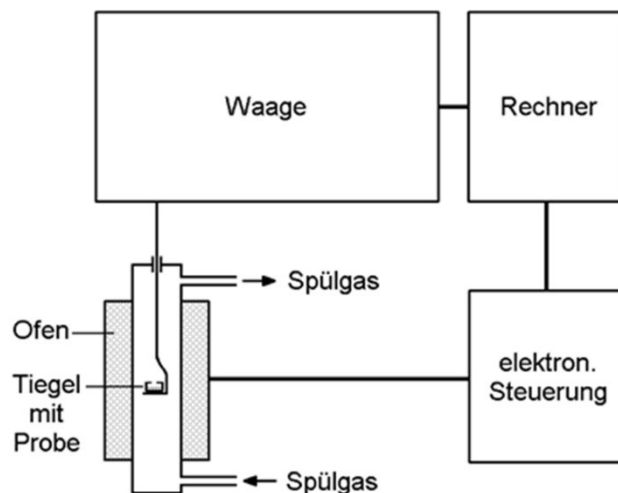
**Abb. 4:** Bei der dargestellten Messung lag als Ausgangsmaterial Modifikation II vor. Hätte Modifikation I vorgelegen, wäre nur der Schmelzpeak C aufgetreten.

## 6. Thermogravimetrie

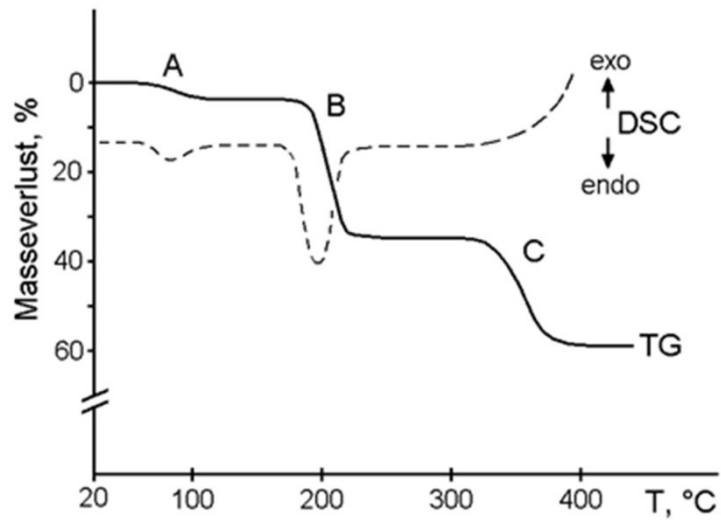
Mittels Thermogravimetrie werden temperaturabhängige Massenänderungen einer Probe untersucht. Der Probentiegel steht dabei in dem zylindrischen Ofen auf einer kleinen Waagschale, die über das Wägestänge mit der elektronischen Mikrowaage verbunden ist (Abb. 5).

Die Probe wird auch bei dieser Methode einem Temperaturprogramm, meist einer linearen Aufheizung, unterworfen. Durch den Ofen können Spülgase (Inert- oder Reaktionsgase) geleitet werden.

Die Thermogravimetrie lässt z.B. erkennen, in welchen Temperaturbereichen flüchtige Substanzen entweichen und wie hoch deren Masse und somit ihr Anteil an der Einwaage ist. Auf diese Weise kann unter anderem oberflächlich an einen Feststoff adsorbiertes Wasser von fester gebundenem Kapillarwasser und dieses wiederum von noch fester gebundenem Kristallwasser unterschieden oder thermisch ausgelöste Zersetzungsvorgänge untersucht werden (Abb. 6).



**Abb. 5:** Thermogravimetrie (TG), Prinzipskizze



**Abb. 6:** korrespondierende TG/DSC Kurven schematisch: A=Verdunstung, B=Kristallwasserverlust, C=Zersetzung und Bildung flüchtiger Produkte

## 7. Literatur

1. W. Hemminger, H. Cammenga, Methoden der Thermischen Analyse, 1989, Springer Verlag. Berlin.
2. Thermoanalyse. Europäisches Arzneibuch, 6. Ausgabe 2008, Deutscher Apotheker Verlag: Stuttgart. 71-74.

## 1. Einführung

Die Röntgen Photoelektronenspektroskopie (*engl. X-ray Photoelectron Spectroscopy, XPS*) häufig auch als Electron Spectroscopy for Chemical Analysis (ESCA) bezeichnet ist ein Verfahren zur Oberflächenanalyse, bei der die quantitative Zusammensetzung der obersten Atomlagen einer Oberfläche für alle Elemente mit Ausnahme von Wasserstoff und Helium bestimmt werden kann. Außerdem kann man Informationen über die chemische Struktur aus den Bindungszuständen der Atome erhalten [1]. Die XPS wurde erstmalig vom schwedischen Wissenschaftler Kai Siegbahn am Beispiel von NaCl beschrieben, der dafür 1981 den Nobelpreis erhielt.

## 2. Messaufbau

Als Röntgenquellen werden in Laboranlagen Röhren mit Aluminiumanode oder Magnesiumanode verwendet, die die Photonen mit der Energie von 1486,6 eV (Al  $K\alpha$ ) bzw. 1253,6 eV (Mg  $K\alpha$ ) emittieren. Darüber hinaus verwendet man auch hochenergetische Röntgenquellen aus Synchrotron-Beschleunigern für besonders hohe Auflösungen. Mit Hilfe eines Monochromators wird die Strahlung der gewünschten Energie auf die Probe fokussiert (Abb. 1). Nach Einstrahlung auf der Probe erfolgt eine Emission der Photoelektronen, die durch eine elektrostatische Optik in einen hemispärischen Energieanalysator weitergeleitet werden. Am Ausgang des Energieanalysators befindet sich ein Photoelektronenmultiplier, der die Intensität der ankommenden Elektronen misst. Neben diesen grundlegenden Bestandteilen der XPS weisen verschiedene Geräte zusätzliche Einrichtungen auf. Zur Verbesserung des Messsignals und damit der Erhöhung der Empfindlichkeit wird ein Elektromagnet hinter der Probe befestigt, der eine zusätzliche Fokussierung der emittierten Elektronen gestattet.

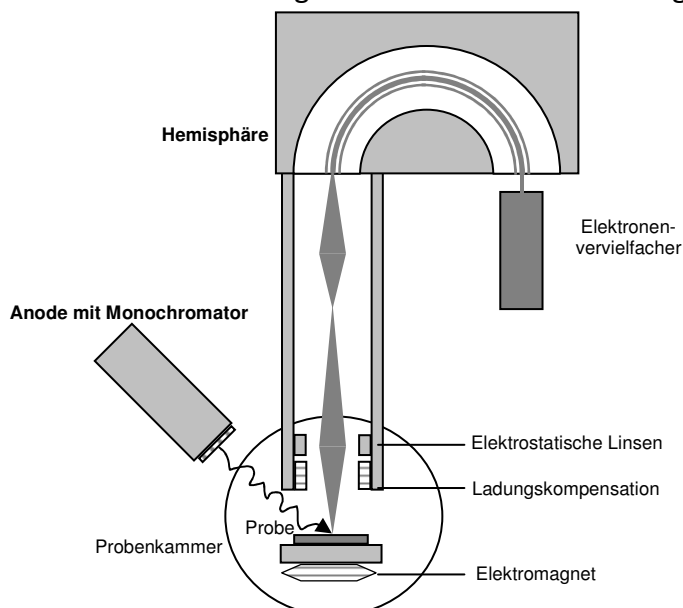


Abb. 1: Prinzipieller Messaufbau einer XPS-Anlage

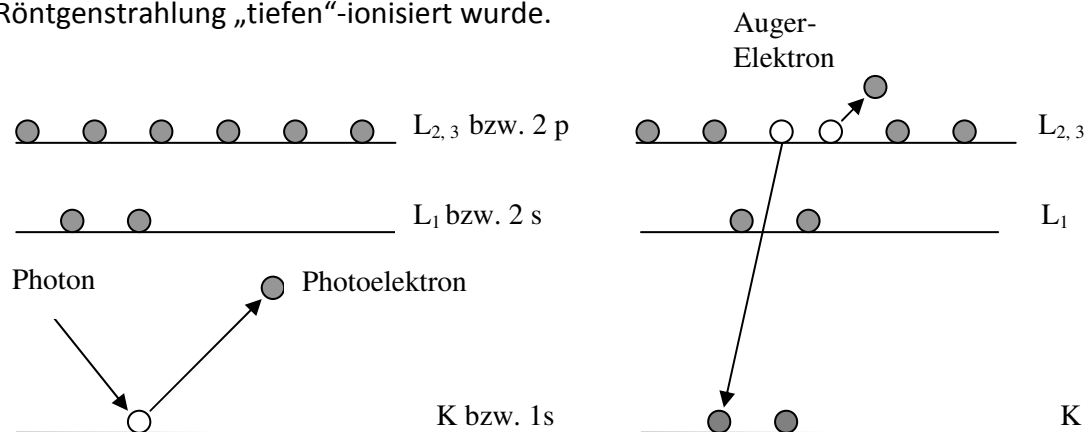
Zur Untersuchung isolierender Proben ist eine Ladungskompensation notwendig, die durch ein Filament realisiert wird, das die Oberfläche der Probe mit niederenergetischen Elektronen überflutet. Da die Messungen im Ultrahochvakuum durchgeführt werden, können nur trockene Proben (einschließlich Pulvern) untersucht werden.

### 3. Messprinzip

Wird ein Festkörper einer Röntgenstrahlung der Energie  $h\nu$  ausgesetzt, so sind zwei verschiedene Wechselwirkungen möglich (Abb. 2):

1. Die energieärmere Röntgenstrahlung wird im Festkörper absorbiert und anschließend erfolgt eine Emission mittels Röntgenfluoreszenz.
2. Die Röntgenstrahlung ist energiereich genug, um ein kernnahes Elektron aus dem Atomverband herauszuschlagen. In diesem Fall kommt es zum direkten Austritt eines Photoelektrons (XPS-Prozeß) und es fällt ein Elektron aus einer energetisch höheren Lage in das entstandene Loch zurück. Durch Abgabe dieser Energie wird ein drittes Elektron, das sogenannte Auger-Elektron, aus dem Atomverband herausgelöst.

Beide Elektronen, sowohl das "XPS-Elektron" als auch das "Auger-Elektron", werden bezüglich ihrer kinetischen Energie analysiert. Aus diesen Daten ermittelt man nach Vergleich mit tabellierten Werten, welches Elektronenenergieniveau/Schale, z.B. 2s, 2p durch die Röntgenstrahlung „tiefen“-ionisiert wurde.



**Abb. 2: Energiediagramm des XPS-Prozesses (links): ein Photon verursacht die Aussendung eines Photoelektrons aus der 1s Schale Auger Prozeß (rechts): Der Relaxationsprozeß führt zur Aussendung eines KLL-Elektrons**

Die kinetische Energie  $E_k$  der Elektronen ergibt sich aus der Differenz von Photonenenergie und Bindungsenergie  $E_b$ .

$$E_k = h\nu - E_b$$

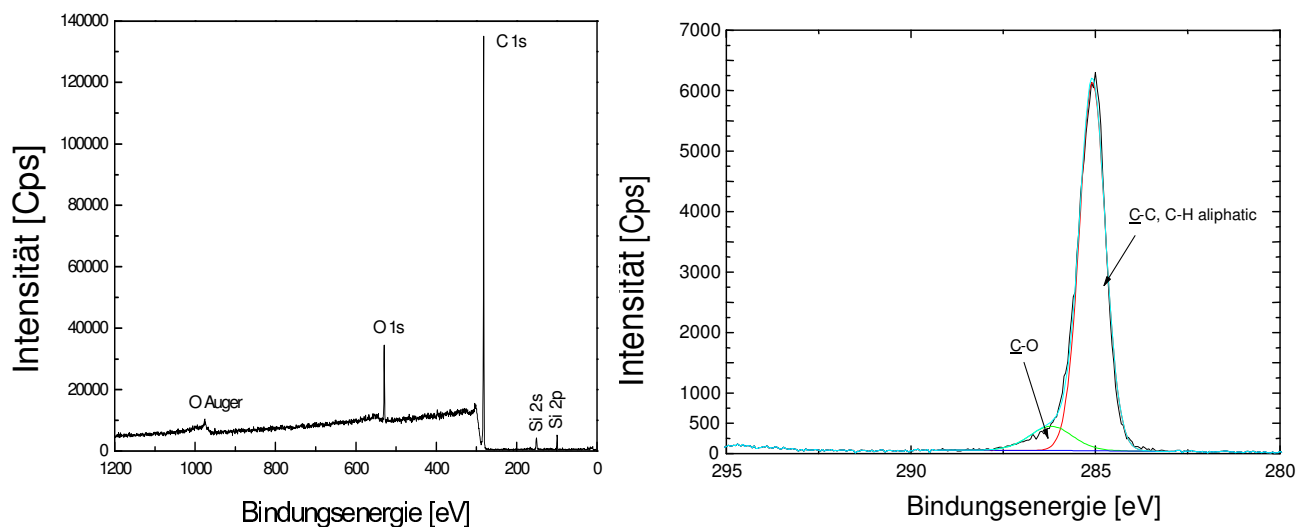
Da für jedes Element eine bestimmte Bindungsenergie charakteristisch ist, kann die XPS zur Identifizierung und quantitativen Bestimmung von Elementen in der Oberfläche verwendet

werden. Die Spektren sind ein Hinweis auf den Ursprungsort der Elektronen: C1s bedeutet, dass die ermittelten Elektronen aus dem 1s-Orbital des Kohlenstoffs stammen.

Die emittierten Elektronen können sich nur einige Nanometer in der festen Materie bewegen bis sie absorbiert werden. Daher ist die XPS nur für die Untersuchung von Oberflächen geeignet. Die Informationstiefe der XPS-Messungen wird durch die mittlere freie Weglänge  $\lambda_e$  der Photoelektronen im Festkörper (einige nm) bestimmt und ist unabhängig von der wesentlich größeren Eindringtiefe der Röntgenstrahlung.

#### 4. Auswertung des XPS-Spektrums

Im XPS-Spektrum wird die Anzahl der Elektronen in Abhängigkeit von der Bindungsenergie (oder kinetischen Energie) aus einem festen Energieintervall dargestellt (Abb. 3).



**Abb. 3:** XPS-Spektrum (Widescan) einer Polyethylenoberfläche mit den typischen Peaks der Elemente (links) und zugehöriger hochauflöser C1s-Peak(rechts)

Elektronen, die ohne Energieverlust durch Stöße die Festkörperoberfläche verlassen, besitzen die für ein Element charakteristische kinetische Energie und tragen zu einem scharfen Peak bei. Elektronen, die auf ihrem Weg durch den Festkörper durch Absorptionsprozesse Energie verlieren, erhöhen das Niveau des Untergrundes (Rauschen) bei Bindungsenergien größer als die Peak-Energie. Zur exakten Bestimmung der tatsächlichen Peakpositionen und damit die Zuordnung zu den einzelnen Elementen ist eine genaue Kalibrierung der Energieachse notwendig. Das XPS-Spektrum beginnt mit der Identifizierung der Peaks der Elemente C und O, die auf fast jeder Probe auftreten. Danach werden die stärksten Peaks und die zugehörigen Nebenpeaks identifiziert. Aus den energetischen Lagen der gemessenen Peaks ist eine Zuordnung zu den Elementen an der Schichtoberfläche möglich. Hierzu werden die gemessenen Peaklagen mit Referenzmessungen aus der Literatur verglichen, welche für fast alle Elemente vorliegen [2-4]. In den meisten modernen kommerziellen XPS-Geräten steht eine Software zur Peakidentifizierung zur Verfügung. Neben der Elementidentifizierung kann häufig auch der chemische Bindungszustand nachgewiesen werden. Voraussetzung hierfür ist, dass die beteiligten Elemente unterschiedliche Elektronegativitäten haben. Ist dies der Fall, so führt eine chemische Bindung zu einer

Verschiebung der beteiligten Elektronenbindungsenergien. Dies hat eine Verschiebung des zugehörigen XPS-Peaks zur Folge, die als *chemical shift* bezeichnet wird. Eine quantitative Analyse der Schichtzusammensetzung ist über die Peak-Flächen bzw. die Peak-Höhe möglich. Aufgrund der elementabhängigen Wahrscheinlichkeit für die Emission eines Sekundärelektrons müssen die Peak-Flächen mit Hilfe von tabellierten Sensitivitätsfaktoren (*ASF*) normiert werden.

## 5. Spezielle Entwicklungen

### 1. Schichtprofil

Informationen über die Schichtzusammensetzung besonders deren tiefere Schichten können mit XPS auf unterschiedliche Arten detektiert werden:

-Variiert man den Winkel zwischen der Probennormale und dem Detektor, so erhält man bei konstanter mittlerer freier Wegelänge  $\lambda_e$  unterschiedliche Informationstiefen. So kann im Bereich der Schichtoberfläche bis zu einer Tiefe von ca.  $3 \lambda_e$  ein zerstörungsfreies Tiefenprofil der Schichtzusammensetzung aufgenommen werden (ARXPS).

Durch den Einsatz von Ionenstrahlen (Sputtern) wird das Material von der Oberfläche abgetragen. Dadurch gelangen tiefer gelegene Schichten an die Oberfläche. Durch Wiederholung der Messung während des Abtragens ist ein Tiefenprofil bis in den Sub-Mikrometerbereich möglich.

### 2. Erhöhung der chemischen Selektivität mittels Derivatisierung

In organischen Materialien können funktionelle Gruppen Kohlenstoff im gleichen Bindungszustand enthalten. Diese Gruppen können im C1s-Spektrum nicht unterschieden werden. Beispiele dafür sind C-OH, C-O-C, und C-O-C(O) (Ester). Zur Bestimmung der funktionellen Gruppen werden Derivatisierungsreaktionen durchgeführt. Dazu wird selektiv eine bestimmte funktionelle Gruppe mit einem Label (kurzkettige Verbindung), das ein Element (typischerweise Fluor oder Brom) enthält, markiert, das in der zu untersuchenden Oberfläche nicht vorhanden ist. Dadurch wird die Bestimmung der funktionellen Gruppe auf eine Elementaranalyse zurückgeführt, die durch die XPS mit hoher Genauigkeit durchgeführt werden kann.

## 6. Anwendungen

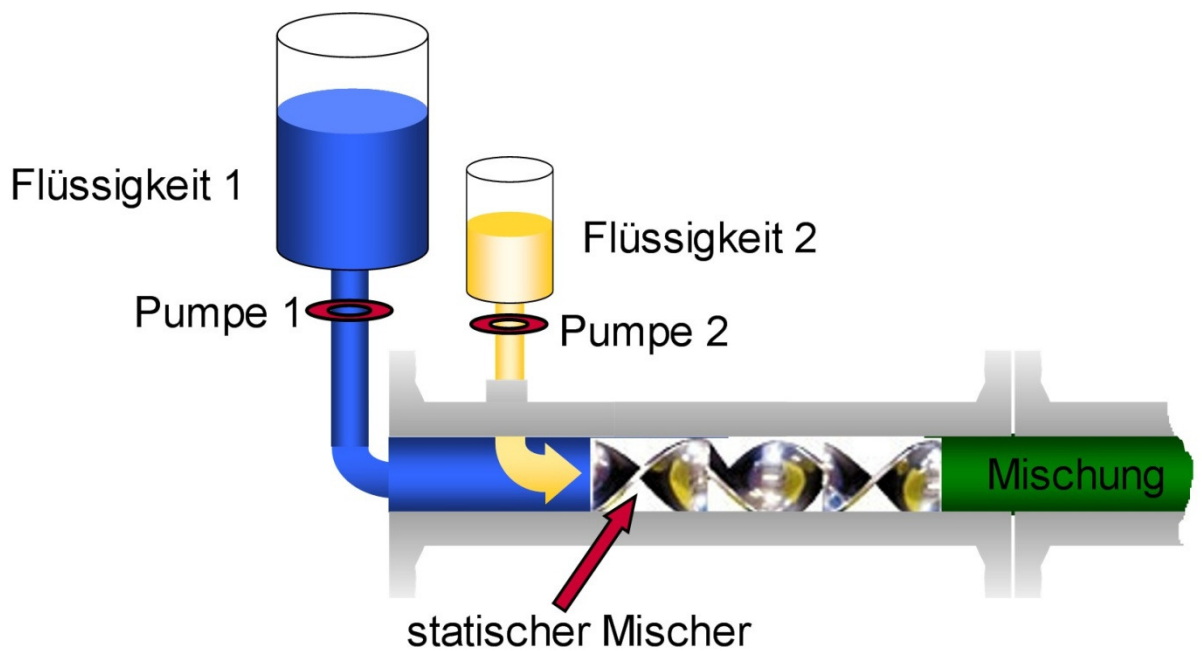
Die XPS wird zur Charakterisierung reaktiver Wechselwirkungen an Grenzflächen, zum Nachweis von Oberflächenreaktionen (z. B. Oxidation), zur Aufklärung von Gas-Feststoff-Reaktionen an Oberflächen im Bereich der Katalyse, zu Untersuchungen zum Aufbau molekular dünner Schichten, zur Untersuchung von Feststoff-Feststoff-Reaktionen beim reaktiven Reibverschleiß, zur Detektion von Fremdstoffen auf Materialoberflächen (Schadensfallanalyse), zur Charakterisierung von biologischen Substraten (z. B. Haut) bei tiefen Temperaturen (Kryo-XPS), sowie zur Analyse von Anreicherungen chemischer Verbindungen an Grenzflächen genutzt. Neuere Entwicklungen beschäftigen sich mit der abbildenden Photoelektronenspektroskopie (*Imaging-XPS*) und der *Small-Spot-Photoelektronenspektroskopie*, die Auflösungen bis in den Nanometerbereich erreichen (NanoESCA)[6].



## 7. Literatur

1. Briggs, D. and Grant J. T., *Surface Analysis by Auger and X-ray Photon Spectroscopy*. ed., IM Publication and Surface Spectra Limited, 2003. Manchester, UK.
2. Sabbatini, L. and Zambonin, P. G., *Surface Characterization of Advanced Polymers*. ed. by VCH, 1993.
3. Beamson G. and Briggs D., *High resolution XPS of organic polymers*. The Scienta ESAC300 database, Wiley & Sons Ltd, 1992. Chichester, UK.
4. Moulder; J. F. and Chastain, J., *Handbook of x-ray photoelectron spectroscopy : a reference book of standard spectra for identification and interpretation of XPS data*. Eden Prairie, Minn. : Physical Electronics Division, 1992. Perkin-Elmer Corp.
5. Seah M.P. and Briggs, D., *Practical Surface Analysis by Auger and X-ray Photoelectron Spectroscopy*. ed., Wiley & Sons, 1983. Chichester, UK.
6. Renault, O., Barrett N., Bailly, A., Zagonel, L., F. Mariolle, D., Cezar, J. C., Brookes, N, Winkler, K., Krömker, B., Funnemann D., *Energy-filtered XPEEM with NanoESCA using synchrotron and laboratory X-ray sources: Principles and first demonstrated results* Surface Science 2007.601(20): p. 4663-4774.

# Teil 4: Pharmazeutisch- technologische Verfahren



# Bestimmung der Hautfeuchtigkeit, Hautelastizität und des transepidermalen Wasserverlusts (TEWL)

Jana Pardeike & Rainer Müller, Freie Universität Berlin

## 1. Hintergrund

Zur Bestimmung der Effektivität und Wirksamkeit von dermal zu applizierenden Arzneizubereitungen, kosmetischen Produkten und Rohstoffen sind die Bestimmung der Hautfeuchtigkeit, Hautelastizität und des transepidermalen Wasserverlusts (TEWL) weit verbreitete Methoden.

## 2. Bestimmung der Hautfeuchtigkeit

Zur Bestimmung der Hautfeuchtigkeit stehen die folgenden Methoden zur Verfügung: Infrarotspektroskopie, Resonanzfrequenzmessung, Nukleare Magnetische Resonanzmessung, Messung der Desquamation, Impedanzmessung und kapazitive Messung z.B. mit dem Corneometer (Courage und Khazaka Electronic GmbH, Köln). Im Folgenden wird das Messprinzip mit dem Corneometer (Abb. 1) näher erläutert [1, 2]. Der Messfühler des Corneometers enthält einen Messkondensator. Wird der Messkopf auf die Haut gedrückt, gelangt die Hornschicht in den Streubereich des Kondensatorfeldes. Dabei macht man sich die relativ hohe Dielektrizitätskonstante von Wasser ( $\epsilon=80,1$  bei  $20^{\circ}\text{C}$  bzw.  $\epsilon=78$  bei  $32^{\circ}\text{C}$ ) zunutze, die sich von der Dielektrizitätskonstante der meisten anderen Stoffe deutlich unterscheidet (meistens  $<7$ ). Man bestimmt im Prinzip die Dielektrizitätskonstante der Haut, die umso größer ist, je mehr Wasser (= Hautfeuchtigkeit) vorhanden ist. In Abhängigkeit vom Wassergehalt kommt es zu unterschiedlichen Kapazitätsänderungen. Die Kapazitätsänderung des Messkondensators wird vom Gerät in einen digitalen Messwert umgewandelt, der dem Feuchtigkeitsgehalt der Haut proportional ist. In Abb. 2 ist das Ergebnis einer sechswöchigen in vivo Studie dargestellt. Hier wurde die Erhöhung der Hautfeuchtigkeit zweier kosmetischer Produkte mit Hilfe der Corneometermessung verglichen. Bei den Produkten handelt es sich um zwei Coenzym Q10-haltige Cremes, die sich nur durch das Vorhandensein bzw. Nichtvorhandensein von Nanostrukturierten Lipid Carriern (NLC) unterscheiden. Hierbei sieht man, dass bereits nach 7 Tagen die Hautfeuchtigkeit durch das Auftragen der Cremes deutlich ansteigt. Die Hautfeuchtigkeit steigt bei der Applikation von NLC-haltiger Coenzym Q10 Creme über den gesamten Studienzeitraum weiter an, während bei der NLC-freien Coenzym Q10 Creme die Hautfeuchtigkeit nicht weiter ansteigt sondern sich auf einen konstanten Wert einstellt.

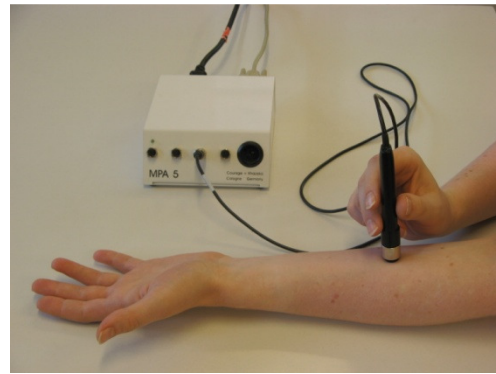


Abb.1: Corneometer CM 825 angeschlossen an einen Multi Probe Adapter (Courage und Khazaka Electronic GmbH, Köln) (links). Messung der Hautfeuchtigkeit am Unterarm einer Probandin (rechts).

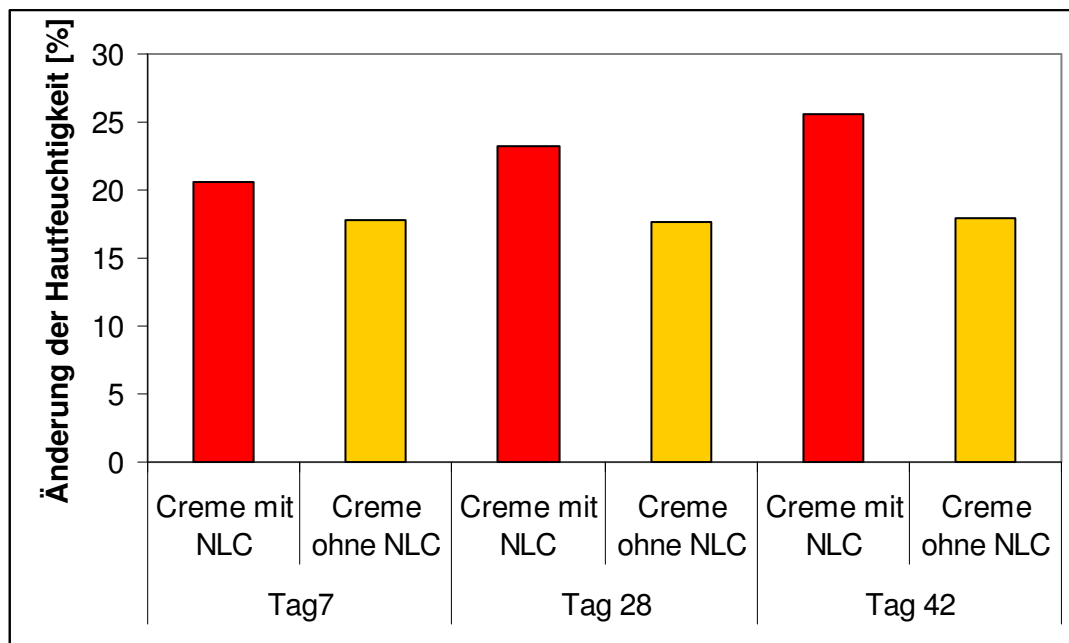


Abb 2: Erhöhung der Hautfeuchtigkeit nach Applikation von NLC-haltiger Coenzym Q10 Creme und NLC-freier Coenzym Q10 Creme [3].

### 3. Bestimmung der Hautelastizität

Die Haut besitzt elastische und plastische Eigenschaften, die je nach Zustand der Haut und Hautareal unterschiedlich stark ausgeprägt sind. Die Bestimmung der Hautelastizität kann mit Torsionsmethoden, Ziehversuchen, einachsigen Scherbelastungen, dynamischen Zugbelastungen und Saugmethoden, z.B. mit dem Cutometer (Courage und Khazaka Electronic GmbH, Köln) erfolgen.

Das Messprinzip des Cutometers beruht darauf, dass im zylindrischen Messkopf ein Unterdruck erzeugt wird, wodurch einige Millimeter der obersten Hautschichten der zu messende Hautstelle in die Öffnung der Messsonde gezogen werden (Abb. 3) [2, 4]. Die Eindringtiefe wird durch ein optisches Messsystem erfasst. Das optische Messsystem besteht aus einem infraroten Lichtsender und einem Lichtempfänger sowie zwei gegenüberliegenden Glasprismen, die das Licht vom Sender zum Empfänger leiten. Das optische System misst die Abnahme der Lichtintensität in Abhängigkeit von der Einsaughöhe der Haut. Die Einsaughöhe ist proportional zur Hautelastizität. Nach Ablauf der Messzeit wird der Unterdruck abgeschaltet und die Haut kann in ihre ursprüngliche Form

zurückkehren, wobei die Schnelligkeit der Rückbildung ebenfalls messtechnisch erfasst wird. Je elastischer eine Haut ist, umso schneller lässt sie sich einziehen und umso schneller kehrt sie in die ursprüngliche Form zurück. Aus dem bei der Messung aufgenommenen Kurvenverlauf lässt sich die viskoelastische Beschaffenheit der Haut bewerten (Abb. 4).

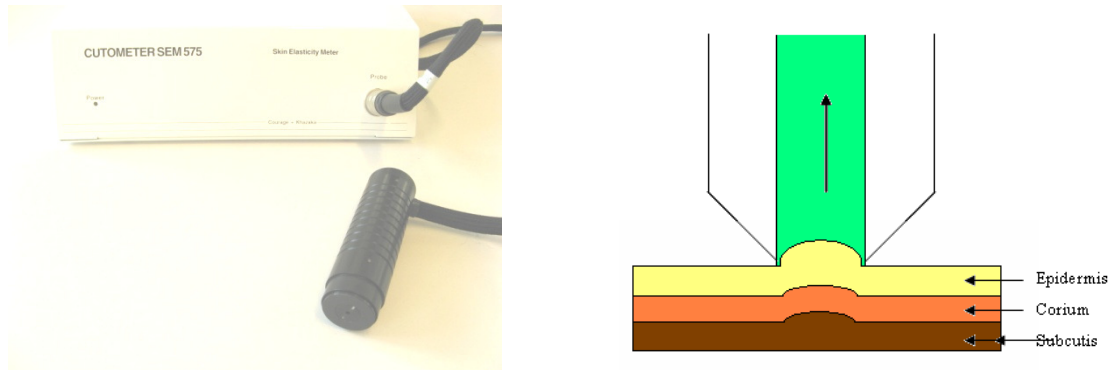


Abb. 3: Cutometer SEM 575 (Courage und Khazaka Electronic GmbH, Köln) (links) und schematischer Querschnitt durch den zylindrischen Messkopf eines Cutometers (rechts).

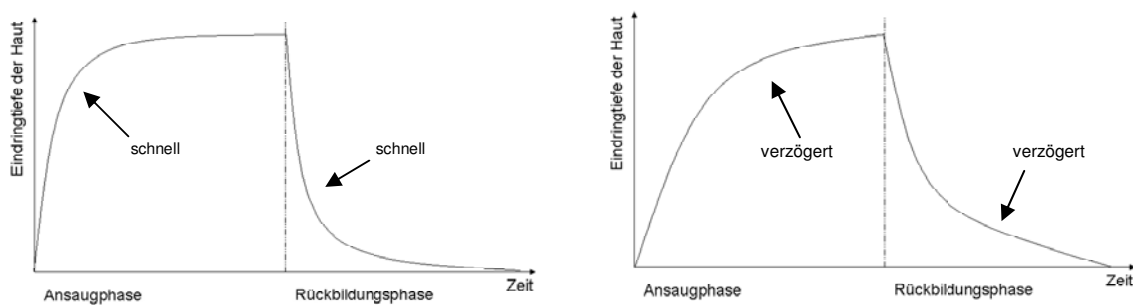


Abb. 4: Kurvenverlauf bei der Elastizitätsmessung bestehend aus Ansaugphase unter Vakuum und Rückbildungsphase nach Aufheben des Vakuums, gezeigt für elastische junge Haut (links) und unelastische Haut (rechts).

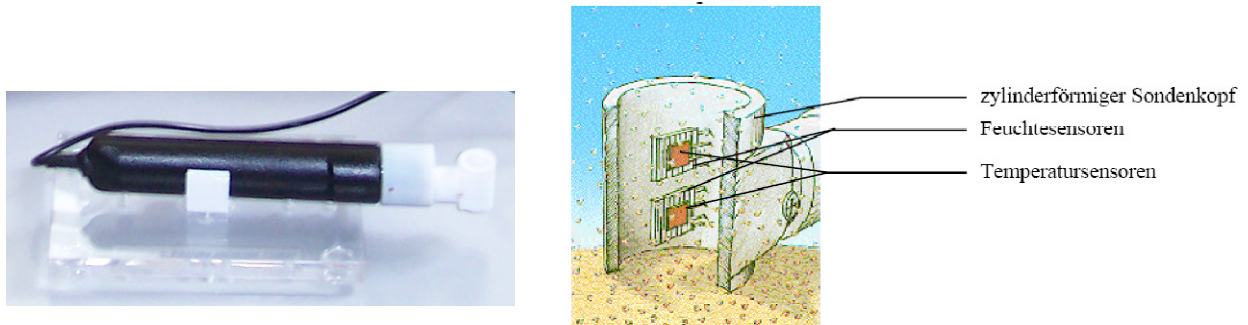
#### 4. Bestimmung des transepidermalen Wasserverlusts (TEWL)

Über die Haut kann Wasser auf zwei Wegen abgegeben werden, durch Schwitzen und durch passive Diffusion. Der Vorgang der passiven Diffusion durch die Haut wird als transepidermaler Wasserverlust bezeichnet. Der TEWL ist stark von der Intaktheit des Stratum corneums abhängig. Somit ist der TEWL ein Wert mit dem der Hautzustand charakterisiert und auch z. B. die Effizienz von kosmetischen Produkten bewertet werden kann.

Die Bestimmung der Evaporation von Wasser durch die Haut kann mit unventilierten Kammern, ventilierten Kammern und über die Bestimmung des Dampfdruckgradienten z.B. mit dem Tewameter (Courage und Khazaka Electronic GmbH, Köln) erfolgen.

Im Folgenden wird das Messprinzip des Tewameters näher erläutert [2]. Das Messprinzip beruht auf dem Fick'schen Diffusionsgesetz. Im Inneren der zylindrischen Messsonde des Tewameters befinden sich zwei Sondenpaare, die sich im unterschiedlichen Abstand zu der Haut befinden (Abb. 5). Diese Sonden messen die Temperatur und relative Feuchte. Das von der Hautoberfläche verdunstende Wasser wird von den Sonden registriert und der Partialdruck des Wasserdampfes in

zwei Ebenen gemessen. Das Gefälle des Partialdrucks zwischen den beiden Sonden ist dem Verdunstungsgrad direkt proportional, so dass der TEWL in  $\text{g}/\text{m}^2 \text{ h}$  berechnet werden kann.



**Abb. 5: Tewameter (Courage und Khazaka Electronic GmbH, Köln) (links) und schematischer Querschnitt durch ein Tewameter (rechts) (Abbildung aus Firmeninformation von Courage und Khazaka Electronic GmbH, Köln).**

## 5. Literatur

1. E. Berardesca, EEMCO guidance for the assessment of the stratum corneum hydration: electrical methods, *Skin Research and Technology*, 1997, Vol. 3: p. 126-132
2. Firmeninformation der Firma Courage und Khazaka Electronic GmbH
3. <http://www.courage-khazaka.de/>
4. J. Pardeike, R.H. Müller, In vivo skin hydration properties of a coenzyme Q10 containing cream with nanostructured lipid carriers (NLC), Annual Meeting of the American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS), San Antonio, USA, 2006
5. S. Gutt, Rheologische in vivo-Untersuchungen an der menschlichen Haut mit nicht invasiven Verfahren, PhD thesis, 1998, Universität Hamburg

## Isoliert perfundiertes Rindereuter zur Untersuchung der dermalen Penetration und Resorption

Rolf D. Petersen<sup>1</sup> & Manfred Kietzman<sup>2</sup>, <sup>1</sup>PharmaSol GmbH, <sup>2</sup>Tierärztliche Hochschule Hannover

### 1. Bedeutung alternativer Testmodelle zur Vermeidung von in vivo Studien an Tier und Mensch

Kenntnisse über Absorption und dermale Penetration chemischer Substanzen nach Kontakt mit menschlicher Haut werden zwingend für pharmakologische und toxikologische Forschung benötigt. Aus ethischer Sicht sind in vivo Studien an Tier und Mensch, wenn möglich, zu vermeiden. Mit dem isoliert perfundierten Rindereuter steht ein leistungsfähiges und aussagekräftiges in vitro Modell zu diesem Zweck zur Verfügung [1]. Rindereuter fallen als unbehandelter Abfall in Schlachthäusern an.

### 2. Experimenteller Aufbau des Eutermodells

Das Euter als Mammagewebe repräsentiert idealtypisch eine Säugetierhaut, an der Barriereigenschaften der Hornschicht und der Stoffwechsel vergleichbar der lebenden Haut aufrecht erhalten werden können. Hierzu wird das Organ von frisch geschlachteten Kühen entnommen. Nach sofortigem Transport in das Labor werden die zu- und abführenden Blutgefäße kanüliert und mit einer oxygenierten Tyrodelösung (nach ihrem Erfinder *Maurice Vejux Tyrode* benannte physiologische Elektrolytlösung, die mit Sauerstoff angereichert wurde) perfundiert.

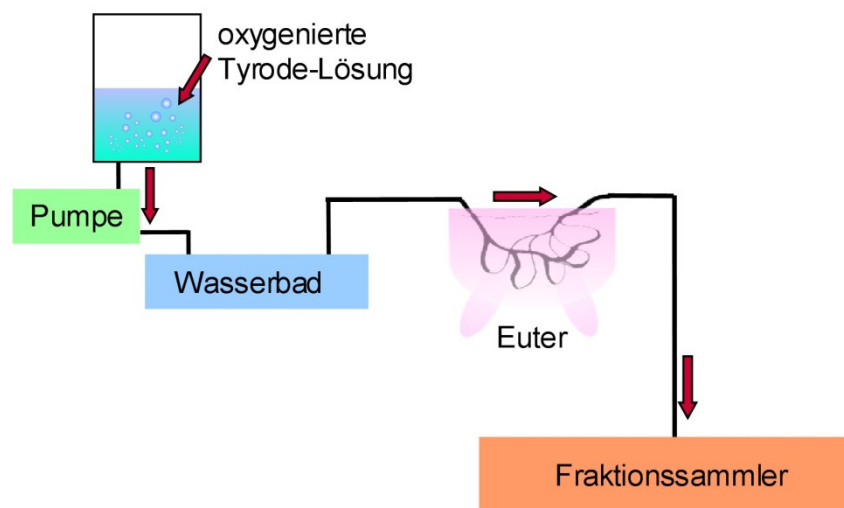


Abb. 1: isoliertes perfundiertes Rindereuter, schematische Darstellung des Testmodells (nach [2])

Ein kontrollierter Perfusatfluss erhält die Vitalität des Gewebes für 6 bis 8 Stunden und wird durch Bestimmung des Glucoseverbrauchs, der Lactatbildung und der



Lactatdehydragenasefreisetzung überwacht. Nach topischer Applikation der Testsubstanz kann zeitabhängig die Eindringtiefe in die Haut nach Biopsatentnahme bestimmt oder nach perkutaner Penetration das Zielmolekül im Perfusat qualifiziert werden. In einer Vielzahl von Studien hat diese in vitro Modell eine hohe Korrelation zur in vivo Situation gezeigt.

### 3. Perkutane Absorption von Betamethason in unterschiedlichen galenischen Darreichungsformen

Jeweils 2 g einer Betamethason-haltigen Lotion, Crème und Salbe wurden jeweils auf 100 cm<sup>2</sup> Euterhaut appliziert. Die Formulierungen enthielten jeweils 1,28 mg Betamethason-17.21-dipropionate. Zu bestimmten Zeiten nach der Applikation wurden Perfusatproben gesammelt und mittels HPLC analysiert. Weiterhin wurde durch künstliche Schädigung der Barrierefunktionen der Hornschicht mittels Aceton vor der Applikation der Testpräparate gezeigt, dass sich die Absorptionsrate des Glucocorticoids signifikant erhöht [3]. Tabelle 1 zeigt die absorbierten Gesamtmengen für die drei Formulierungen.

**Tab. 1: Gesamtmenge Betamethason-17.21-dipropionat im Perfusat nach Applikation in unterschiedlichen Darreichungsformen**

Testpräparat	Unbehandelte Euterhaut	Aceton-vorbehandelte Euterhaut
Salbe	1323 ± 321ng	2733 ± 366ng
Creme	1078 ± 858ng	1892 ± 619ng
Lotion	767 ± 173ng	991 ± 99ng

Die folgenden graphischen Darstellungen zeigen die absorbierte Menge des Glucocorticoids (kumuliert) als Funktion der Zeit nach jeweiliger Applikation (Abb 2). Die Salbe zeigt dabei die schnellste Absorption (Plateau nach ca. 180min. erreicht) und auch die höchste absorbierte Menge (Abb 2 - links). Die Creme zeigt die am stärksten verzögerte Absorption, liegt aber in der abschließenden Gesamtmenge nach 240 min oberhalb der Lotion. Die Entfernung des schützenden Lipidfilms des stratum corneums (Behandlung mit Aceton) führt zur Absorptionssteigerung für alle drei Formulierungen (Abb 2 - rechts). Die Ergebnisse der Studie verdeutlichen die Bedeutung galenischer Formulierungen für die Glucocorticoid-Absorption der Haut sowie den Einfluss der Intaktheit der Hautbarriere des Stratum corneums. Vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich der biologischen Äquivalenz topisch applizierten Glucocorticoids wurden mittels der Tesaabriss-Methode (Tape stripping) an menschlicher Haut gefunden [4].

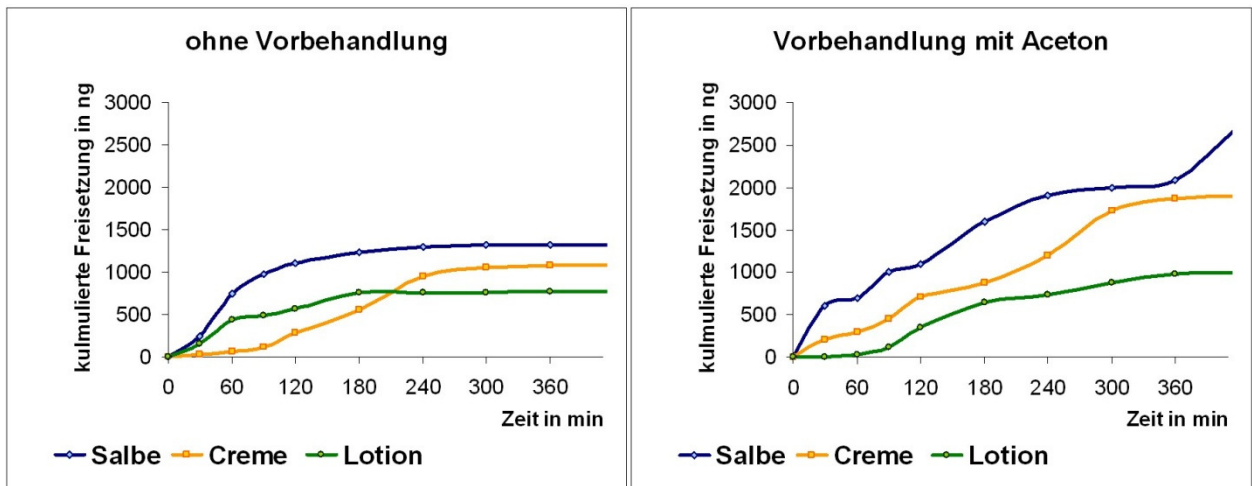


Abb. 2: Kumulierte Freisetzungskurven von Betamethason-17,21-dipropionat als Funktion der Zeit, jeweils appliziert auf 100 cm<sup>2</sup> Euterhaut, links aufgetragen auf unbehandelte Haut, rechts: aufgetragen auf mit Aceton vorbehandelte Haut

#### 4. Literatur

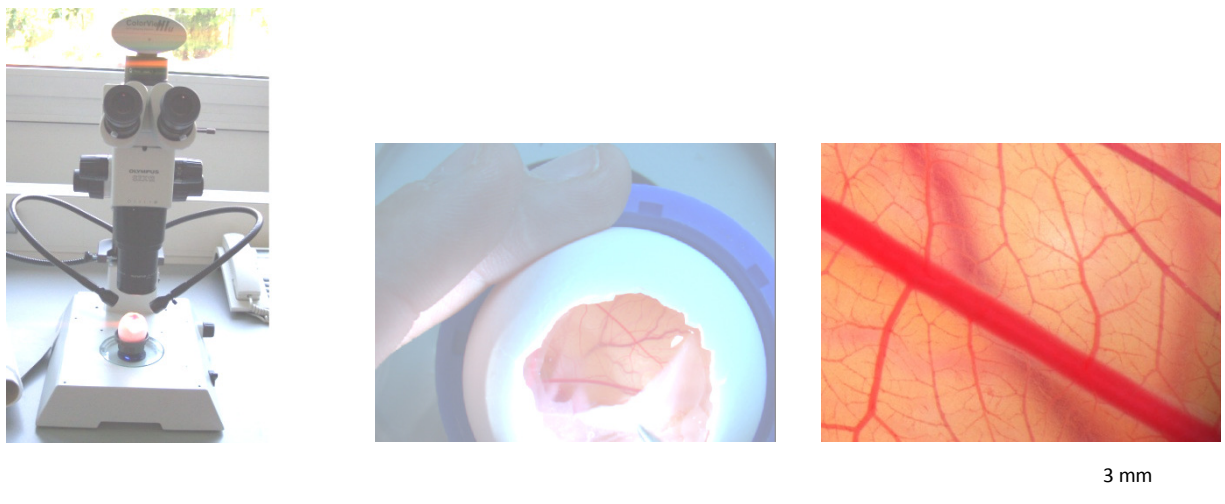
1. Kietzmann, M., et al., *The isolated perfused bovine udder as an in vitro model of percutaneous drug absorption. Skin viability and percutaneous absorption of dexamethasone, benzoyl peroxide, and etofenamate.* J Pharmacol Toxicol Methods, 1993. **30**(2): p. 75-84.
2. Kietzmann, M. and W. Löscher, *Die Verwendung von Schlachttierorganen zur Prüfung von Arzneimitteln: Eignung des Rindereuters zur Untersuchung von hautwirksamen Stoffen.* Deutsche Tierärztliche Wochenschrift, 1993. **2**: p. 54-57.
3. Kietzmann, M. and B. Blume, *Percutaneous Absorption of Betamethasone from Different Formulations Using the Isolated Perfused Bovine Udder.* In Vitro Toxicol., 1997. **10**(1): p. 11-15.
4. Pershing, L.K., et al., *Variability and correlation of chromameter and tape-stripping methods with the visual skin blanching assay in the quantitative assessment of topical 0.05% betamethasone dipropionate bioavailability in humans.* International Journal of Pharmaceutics, 1992. **86**(2-3): p. 201-210.

### 1. Grundlegendes

Die Abkürzung HET-CAM steht für hens egg test-chorio-allantoic membrane. 1985 wurde dieser Test von Lüpke als Alternative zum Irritationstest am Kaninchenaugew entwickelt [1]. Neue dermal zu applizierende Arzneizubereitungen, kosmetische Produkte und Chemikalien können mit Hilfe des HET-CAM Tests auf ihr Potential, Reizungen am Auge hervorzurufen, untersucht werden. Hierzu wird die zu testende Formulierung/Substanz direkt mit der Chorion-Allantois-Membran (CAM) eines befruchteten und neun Tage bebrüteten Hühnereis in Berührung gebracht und das zeitabhängige Auftreten von Hämorrhagie, Gefäßlysis und Koagulation (Gerinnung des Blutes) erfasst, wobei das zeitliche Auftreten der Reaktion mit der Stärke des Reizpotentials korreliert [2-5].

### 2. Durchführung

Für den HET-CAM Test werden befruchtete Eier der Hühnerrasse White Leghorn verwendet. Die Eier werden neun Tage bei  $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  und einer relativen Luftfeuchtigkeit von  $62,5\pm 7,5\%$  unter regelmäßigem Drehen bebrütet. Am neunten Tag werden die Eier mit einer Lampe durchleuchtet und die Luftblase markiert. Nicht befruchtete Eier werden verworfen. Entlang der Markierung werden die Eier geöffnet und die Eimembran mit physiologischer Kochsalzlösung befeuchtet. Die Eimembran wird abgezogen, das Ei unter ein Binokular gestellt und so ausgerichtet, dass die CAM und die Blutgefäße gut zu sehen sind (Abb.1).



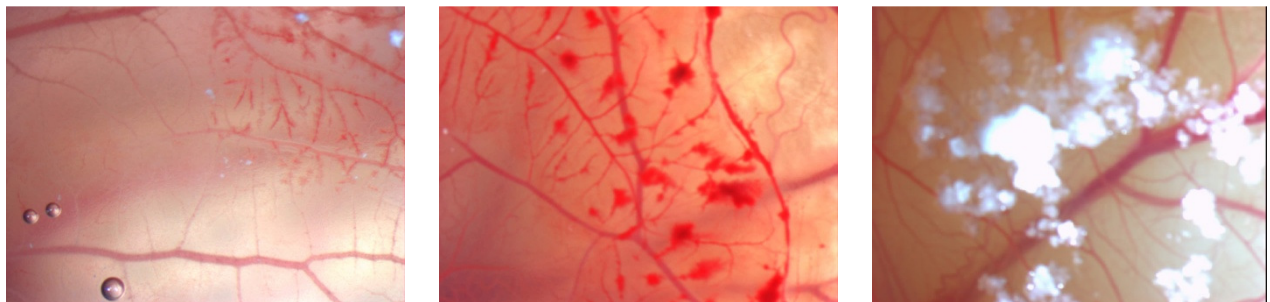
**Abb. 1:** Binokular zur Durchführung des HET-CAM Tests (links), geöffnetes Ei bei dem die Eimembran abgezogen wird (Mitte) und Bild einer unbehandelten CAM in 63-facher Vergrößerung (rechts).

Zu testende Formulierungen/Substanzen werden auf die CAM aufgetragen und das Auftreten von Hämorrhagie, Gefäßlysis und Koagulation (Abb. 2) im Vergleich zu Standards nach einem Punktesystem bewertet. Zur Bestimmung des Irritationspotentials stehen die drei nachfolgenden Methoden zur Verfügung:

**1. Reaktions-Zeit-Methode:** Die CAM wird über 5 min nach Applikation der Testsubstanz beobachtet und der Zeitpunkt des Auftretens von Hämorrhagie, Gefäßlysis und Koagulation bestimmt. Diese Methode ist nur für transparente Materialien geeignet.

**2. Irritations-Grenzwert:** Die höchste Konzentration der Testsubstanz, bei der Hämorrhagie, Gefäßlysis oder Koagulation erst nach einer fünfminütigen Kontaktzeit auftritt, wird bestimmt. Diese Methode eignet sich nur für transparente Materialien.

**3. Endpunktbestimmung:** Die CAM wird für eine bestimmte Zeit z.B. 30 s oder 5 min mit der Testsubstanz in Berührung gebracht und nach vorsichtigem Entfernen der Testsubstanz beurteilt. Diese Methode eignet sich auch für undurchsichtige Proben und Feststoffe.



**Abb. 2:** Gefäßlysis und Hämorrhagie 5 min nach Applikation von 1% des Tensids Natriumlaurylsulfat (links), Koagulation 5 min nach Applikation von 0,3% NaOH (Mitte) und Bild der CAM nach Applikation der pulverförmigen Substanz PX-18 (rechts) in 63-facher Vergrößerung [6].

### 3. Vor- und Nachteile

Vorteile des HET-CAM Tests bei der Ermittlung des Augenirritationspotentials sind eine einfache und schnelle Durchführbarkeit, die hohe Empfindlichkeit des Tests sowie ein relativ geringer Kostenaufwand für die Durchführung.

Einer der Hauptnachteile des Tests ist die subjektive Ermittlung des Testergebnisses. Dieser Nachteil kann z.T. durch den Einsatz von positiven Standards und einem anhand der Standards entwickelten Bewertungsschemas vermindert werden. Der HET-CAM Test kann nicht eingesetzt werden zum Testen von Substanzen mit einem pharmakologischen Effekt auf Blutgefäße, färbenden Substanzen, die die CAM irreversibel verfärben und adhäsive, undurchsichtige Substanzen, die sich nicht von der CAM entfernen lassen.

Des Weiteren stellt sich die Frage, ob der HET-CAM Test zu den Tierversuchen zählt. Für den HET-CAM Test werden befruchtete Hühnereier am Tag neun der Embryogenese verwendet. Zu diesem Zeitpunkt sind das Nervengewebe und das Schmerzempfinden noch nicht entwickelt. Zurzeit wird der HET-CAM Test als grenzwertig betrachtet. Er wird eingesetzt, um die Anzahl der an Säugetieren durchgeführten Versuche und die damit verbundenen Qualen zu reduzieren [7].

#### 4. Literatur

1. N. P. Lüpke, Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential, Food Chem Toxicol 1985, 23(2): p. 287–291
2. HET-CAM Test INVITTOX n° 47, ECVAM DB-ALM., 1992, p. 1-8
3. HET-CAM Test – Test protocol used in Phase II of the German Validation Study for Replacement of the Draize Eye Test. BGA-ZEBET, 1991, p.1-8
4. The hen's egg-chorioallantoic membrane test (HET-CAM test) for the assessment of the eye irritation potential of chemical substances, ZEBET, 2001: p. 1-7
5. The Hen's Egg Test on the Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) INCITTOX n°96. ECVAM DB-ALM, 1994: p. 1-18.
6. J. Pardeike; Nanosuspensions and nanostructured lipid carriers for dermal application, PhD-Thesis, Free University Berlin, 2008
7. M. Liebsch, H. Spielmann, Currently available in vitro methods used in the regulatory toxicology, Toxicology Letters, 2002, 127: p. 127-134

# Methoden zur Untersuchung transdermaler therapeutischer Systeme

Michael Dittgen<sup>1</sup> & Sandra Wiedersberg, <sup>1</sup>Arabic European University

## 1. Grundlegendes & Hintergrund

Transdermale therapeutische Systeme (**TTS**) sollen auf der Haut kleben, den enthaltenen Wirkstoff freigegeben und diesen durch die Haut hindurch systemisch zur Verfügung stellen. Dabei soll die Haut möglichst wenig irritiert werden. Dementsprechend sind System-spezifische Untersuchungsmethoden darauf gerichtet,

- das Kleben,
- die Wirkstofffreisetzung,
- den Hautdurchgang (die Permeation) und
- die Irritation der Haut

festzustellen.

Methoden zur Untersuchung des Wirkstoffs, dessen Stabilität sowie der Stabilität des **TTS** (z.B. Gehalt, Wirkstoffabbau) sollen hier nicht dargestellt werden.

## 2. Methoden zur Untersuchung des Klebens (Adhäsion)

Mit den Methoden zur Untersuchung des Klebens wird versucht, folgende Eigenschaften eines **TTS** zu erfassen:

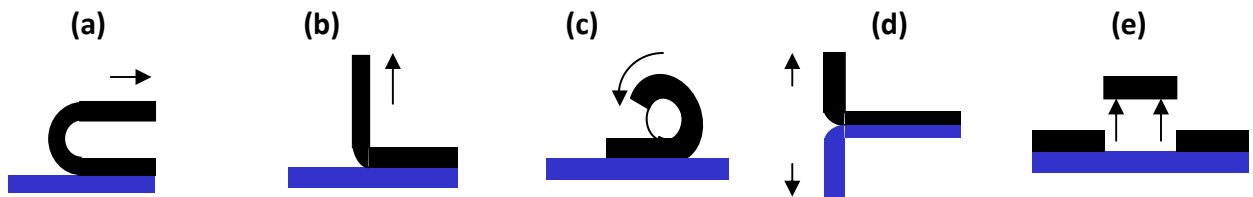
- Bindungen zu einer festen Oberfläche einzugehen (Sofortklebrigkeit, „tack“),
- dem Fließen unter Belastung zu widerstehen (Kriechwiderstand, „creep resistance“),
- dem Abziehen von einer Oberfläche zu widerstehen (Haftfestigkeit, „peel adhesion“)

Die Sofortklebrigkeit von **TTS** kann mit dem sogenannten Rolling-Ball-Tack-Test ermittelt werden. Hierbei lässt man eine Kugel über eine schiefe Ebene auf die waagrecht angeordnete Probe laufen. Die von der Kugel auf der klebenden Oberfläche der Probe zurück gelegte Wegstrecke ist der Sofortklebrigkeit umgekehrt proportional.

Zur Untersuchung des Kriechwiderstandes („creep resistance test“ oder „shear adhesion test“) wird die Probe mit einer genormten Oberfläche in parallelen Kontakt gebracht und danach von dieser Oberfläche abgezogen. Dabei wird die Zeit gemessen, die vergeht, um die Probe entweder mit konstanter Geschwindigkeit (dynamische Methode) oder mit einer definierten Gewichtskraft (statische Methode) von der Oberfläche abzuziehen.

Die Methoden zur Messung der Haftfestigkeit („peel adhesion test“) unterscheiden sich vor allem in der geometrischen Anordnung der Probe zum Substrat (Abb. 1). Die Kraft (Schälkraft), die benötigt wird um einen zuvor definiert angedrückten Streifen des **TTS** von einer Oberfläche mit konstanter Geschwindigkeit (dynamische Methode) oder mit einer definierten Gewichtskraft

(statische Methode) abzuziehen, wird gemessen. Übliche Oberflächen sind polierter Edelstahl, Glas oder Bakelit.



**Abb. 1:** Geometrische Anordnung der Probe (schwarz) zur Oberfläche (blau) bei dem 180°-Schältest (a); dem 90°-Schältest (b); dem Trommelschältest c); dem T-Schältest (d); dem Abhebetest (e) (Abbildung modifiziert nach [1]).

Vorstehende Methoden werden sowohl zur Qualitätskontrolle des Fertigarzneimittels als auch während der Entwicklung zur vergleichenden Beurteilung der Klebeeigenschaften von **TTS** verwendet.

Leider hat sich in mehreren Untersuchungen des Klebens von **TTS** herausgestellt, dass keine der in-vitro Messmethoden und auch nicht die Kombination der Ergebnisse mehrerer Methoden die Vorhersage der Hauthaftung unter realen Bedingungen ermöglicht [2].

### 3. Methoden zur Untersuchung der Wirkstofffreisetzung

Zur Untersuchung der Wirkstofffreisetzung existieren USP/PhEur Arzneibuchmethoden:

- „Paddle over disk method“ (USP apparatus 5 / PhEur 2.9.4.1)
- „Rotating cylinder method“ (USP apparatus 6 / PhEur 2.9.4.3)
- „Reciprocating disk method“ (USP apparatus 7)
- „Paddle over extraction cell method“ (PhEur 2.9.4.2)

Diese Methoden unterscheiden sich hauptsächlich in der Anordnung der Probe im Medium. Das Medium ist meist eine Pufferlösung, in der die Arzneistoffkonzentration zu definierten Zeitpunkten bestimmt wird.

Die Wirkstofffreisetzung aus einem **TTS** ist in den meisten Fällen nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die transdermale Aufnahme des Arzneistoffs. Daher dienen in-vitro Freisetzungsforschungen von **TTS** vorzugsweise der Qualitätskontrolle und der Beurteilung der Chargenhomogenität. Des Weiteren können die Ergebnisse genutzt werden, um z.B.

- indirekt die (verfügbare) Wirkstoffkonzentration der Systeme zu bestimmen,
- in der Entwicklung von **TTS** die Matriceigenschaften einzustellen,
- im Markt befindliche **TTS** zu vergleichen.

### 4. Methoden zur Untersuchung der Permeation

Zur Untersuchung der Permeation werden in-vitro Modelle verwendet, die aus zwei separaten Kompartimenten bestehen, wie die Diffusionszelle nach Franz (Abb. 2). Das Donorkompartiment stellt das **TTS** dar und das Akzeptorkompartiment enthält eine Pufferlösung. Beide Kompartimente sind durch eine Membran getrennt.



Als Membran können menschliche Haut, tierische Häute oder künstliche Trennschichten verwendet werden. Die Membran muss bezüglich des Stoffdurchgangs nicht zwingend der menschlichen Haut entsprechen. Vielmehr sollte sie in ihren Eigenschaften reproduzierbar sein und so eine verlässliche Einschätzung der Permeation der in den TTS enthaltenen Wirkstoffe ermöglichen.

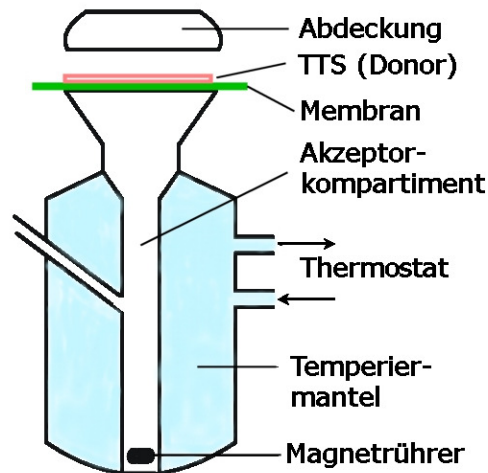


Abb. 2: Diffusionszelle nach Franz (Abbildung modifiziert nach [3]).

Zur Untersuchung der Permeation wird die zu festgelegten Zeitpunkten je Flächeneinheit permeierte Wirkstoffmenge im Akzeptorkompartiment bestimmt und kumulativ in Abhängigkeit von der Zeit als „Permeationsprofil“ dargestellt (Abb. 3).

Wenn sich nach einer anfänglichen Verzögerungszeit ("lag time",  $t_{lag}$ ) ein Gleichgewicht eingestellt hat, ist der Flux durch die Haut konstant. Der Flux ( $J$ ) kann aus dem 1. Fick'schen Diffusionsgesetz (Gl. 1) abgeleitet werden und entspricht dem Anstieg des linearen Bereiches des Permeationsprofils.

$$J = \frac{dm}{A dt} = \frac{D \cdot VK}{h} \cdot \Delta c \quad \text{(Gleichung 1)}$$

D	Diffusionskoeffizient des Wirkstoffs in der Membran	[cm <sup>2</sup> /s]
VK	Verteilungskoeffizient des Wirkstoffs Membran/TTS	
h	Diffusionsweg	[cm]
$\Delta c$	Konzentrationsgradient Donor / Akzeptor	[mg/cm <sup>3</sup> ]
A	für die Diffusion wirksame Fläche	[cm <sup>2</sup> ]

Gl. 1 basiert auf der Annahme, dass die Membran eine homogene Diffusionsbarriere darstellt und dass im Akzeptor "Sink" - Bedingungen herrschen. Bei schlecht wasserlöslichen Arzneistoffen können der Pufferlösung im Akzeptorkompartiment lösungsvermittelnde Substanzen wie Alkohol, Glycole oder Cyclodextrine zugesetzt werden, um "Sink" - Bedingungen zu gewährleisten.

Der Flux durch die Haut (Gl. 1) kann durch verschiedene Faktoren, die von den Eigenschaften des Wirkstoffs, der Haut und des **TTS** abhängen, beeinflusst werden. Diese Faktoren können einzeln oder in Kombination wirken. Dazu zählen z.B.

- Dicke der Barriere (Stratum Corneum), bedingt den Diffusionsweg;
- Wechselwirkungen von **TTS**-Bestandteilen, z.B. Penetrationsverstärkern, mit der Membran, wodurch sich  $VK$  und/oder  $D$  ändern können;
- Metabolismus des Wirkstoffs in der Haut, wodurch sich das Konzentrationsgefälle erhöhen kann.

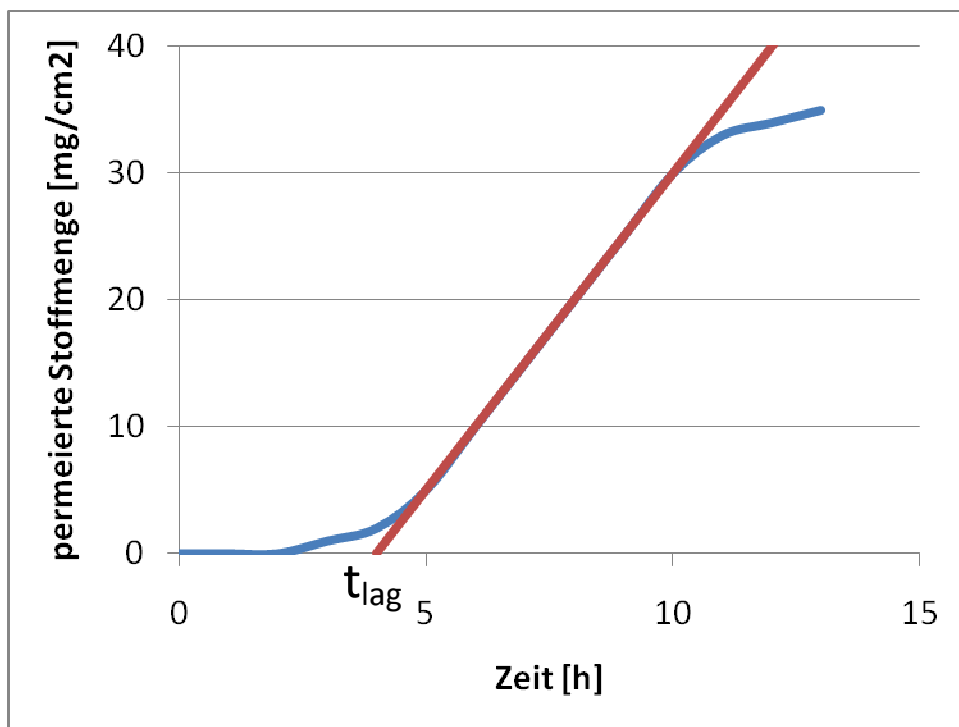


Abb. 3: Permeationsprofil

Aus dem Flux und der Wirkstoffkonzentration auf der Seite des Donorkompartiments kann nach Gl. 2 ein Permeabilitätskoeffizient  $K_p$  kalkuliert werden.

$$K_p = \frac{J}{C_{\text{Donor}}}$$

Gleichung 2

$J$  Flux

$[\text{mg}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}]$

$C_{\text{Donor}}$  Konzentration im Donor

$[\text{mg}/\text{cm}^3]$

$K_p$  kann herangezogen werden, um Einflüsse der Formulierung des **TTS** (Vehikel, Penetrationsverstärker) auf die Permeabilität der Haut zu vergleichen.

Sind sowohl Daten zur in-vitro Freisetzung als auch Daten für die in-vitro Permeation des Wirkstoffs durch die Haut bekannt, kann nach einer Methode von Guy und Hadgraft [4] kalkuliert werden, in welchem Maße das System und/oder die Haut die Geschwindigkeit der transdermalen Aufnahme des Wirkstoffs beeinflussen. Der aufgenommene Wirkstoffanteil, der durch das System limitiert ist ( $F_d$ ), kann dabei nach Gl. 3 berechnet werden. Der aufgenommene Wirkstoffanteil, der durch die Haut limitiert wird ( $F_s$ ), ergibt sich aus Gl. 4.

$$F_d = \frac{A_{T;tapp}}{A_{d;tapp}} \quad \text{Gleichung 3}$$

$$F_s = [1 - F_d] \quad \text{Gleichung 4}$$

Wobei  $A_{T;tapp}$  die permeierte Wirkstoffmenge durch die Haut in der vorgesehenen Applikationsdauer je  $\text{cm}^2$  **TTS** darstellt und  $A_{d;tapp}$  der freigesetzten Wirkstoffmenge in der vorgesehenen Applikationsdauer je  $\text{cm}^2$  **TTS** entspricht.

Bei Nicotin- **TTS** auf Polyacrylatbasis überwog die Geschwindigkeitskontrolle durch das System [5]. Hier stimmte bei einigen **TTS** auch die Rangfolge bei der Wirkstofffreisetzung mit der Rangfolge der Permeation des Wirkstoffs durch die Haut überein. Bei den meisten **TTS** überwiegt jedoch die Geschwindigkeitskontrolle durch die Haut.

## 5. Untersuchung der Irritation der Haut

Eine Hautirritation ist im Gegensatz zu einer allergischen Reaktion (Hautsensibilisierung) nicht immunologisch bedingt; sie kann bei Erstkontakt mit dem irritierenden Stoff infolge direkter Wechselwirkung mit den lebenden Hautzellen auftreten. Die Methoden, mit denen die von **TTS** ausgehende Hautirritation untersucht werden kann, sind vielfältig. Die Ursache dafür liegt wahrscheinlich auch darin, dass eine perfekte Untersuchungsmethode nicht existiert. Für die Entwicklung generischer **TTS** wird von der FDA empfohlen, eine kumulative Haut-Irritations-Studie und einen Allergisierungstest (modifizierter Draize Test) an Probanden in-vivo durchzuführen [6]. Zur Auswertung ist eine Punktwertung angegeben.

Im Rahmen der Entwicklung von **TTS** werden jedoch nicht selten analoge Haut-Irritations-Untersuchungen an lebenden Tieren (z.B. Kaninchen, Maus, Meerschweinchen, Ratte) durchgeführt. Hier muss man jedoch berücksichtigen, dass diese Modelle oft empfindlicher als der Mensch reagieren. Die Haut wird bei diesen Tests nicht nur visuell und histologisch beurteilt. Oft versucht man zusätzlich mit Messmethoden für die Hautdicke (Ultraschall), für die Hautrötung infolge verstärkter Durchblutung (Chromameter, Laser-Doppler-Bildanalyse) u.a., objektive Maßzahlen für eine irritative Hautveränderung zu bekommen.

Um die Zahl der Tierversuche zu reduzieren sind in-vitro Testsubstrate als Alternativen für diese Tests ausprobiert worden, wie die Membran befruchteter Eier, Keratin-Kollagen-Matrices, Mikroorganismen, Erythrozyten, rekonstruierte menschliche Haut und lebende Zellen in Unterwasserkultur (Fibroblasten, Keratinozyten).

In späteren Phasen der Entwicklung von **TTS**, in Pilotstudien oder in klinischen Prüfungen Phase I bis III kann die Irritation direkt am Menschen festgestellt und z.B. mittels folgender Punktwertung (Score) qualifiziert werden:

0 = keine Irritation;

1 = minimales Erythem, kaum erkennbar;

2 = definiertes Erythem, leicht zu erkennen; minimales Ödem, noch keine Pickel;

3 = Erythem und Pickel;

4 = definiertes Ödem;

5 = Erythem, Ödem, und Pickel;

6 = Bläschenausschlag;

7 = starke Reaktion, die über das Untersuchungsgebiet hinaus geht.

Im Falle von Bioäquivalenzstudien und klinischen Studien der Phase III werden oft die Berichte von Probanden über Irritationen gesammelt und prozentual zur Gesamtzahl untersuchter **TTS** angegeben.

## 6. Literatur

1. D. Satas, in D. Satas (Editor), *Handbook of Pressure Sensitive Adhesive Technology*, Van Nostrand Reinhold, New York, 1989, p. 61.
2. C. Fauth, S. Wiedersberg, R.H.H. Neubert and M. Dittgen, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 28 (2007) 1251.
3. T.J. Franz, *J. Invest. Dermatol.*, 64 (1975) 190.
4. R.H. Guy and J. Hadgraft, *Int. J. Pharm.*, 82 (1992) R1.
5. T. Pongjanyakul, S. Prakongpan and A. Priprem, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 29 (2003) 843.
6. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for Industry Skin Irritation and Sensitization Testing of Generic Transdermal Drug Products. 1999.

# Nasse Zerkleinerung von pharmazeutischen Wirkstoffen mit Rührwerkskugelmühlen

Szymon Kobierski & Cornelia M. Keck, Freie Universität Berlin

## 1. Bedeutung der Rührwerksmühle in Industrie und Wissenschaft

Rührwerkskugelmühlen werden in vielen Industriezweigen eingesetzt. Abhängig vom Kugelmateriale (Mahlkugeln) können Stoffe verschiedener Härte zermahlen werden – angefangen von Kakaopulver, Nüssen, Tintenpulver für Drucker, Kunststoffen, Keramik, Pigmenten bis hin zu Zellen (zwecks Freisetzung der Enzyme) und pharmazeutischen Wirkstoffen. Für Mahlkugeln (Mahlperlen) werden Stoffe verschiedener Eigenschaften und Härte verwendet, wie Keramik, Edelstahl, Achat, Aluminiumoxid, Titandioxid und schließlich mit Yttriumoxid stabilisiertes Zirkoniumoxid (YSZ - yttria stabilized zirconia), sowie speziell modifiziertes Polystyrol [1]. Die Kugelgröße reicht von 0,05 mm (50 µm) bis 120 mm und hat einen entscheidenden Einfluss auf die erzielte Partikelgröße.

## 2. Aufbau und Arbeitsprinzip

In einfachster Version besteht eine Kugelmühle aus einem rotierenden Mahlraum in den die Mahlkugeln und das zu zermahlende Gut in Form einer Suspension (in Regel wässriger) gefüllt werden. Durch Bewegen des Mahlraumes werden sowohl die Mahlperlen, als auch das zu mahlende Gut bewegt (Abb. 1, links). Um die Effektivität des Mahlens zu verbessern werden in den Mahlraum verschiedene Vorrichtungen (Rührwerke) eingebaut, wie z.B. rotierende Stifte oder Lochscheiben, man spricht dann von Rührwerkskugelmühlen (Abb. 1, rechts).

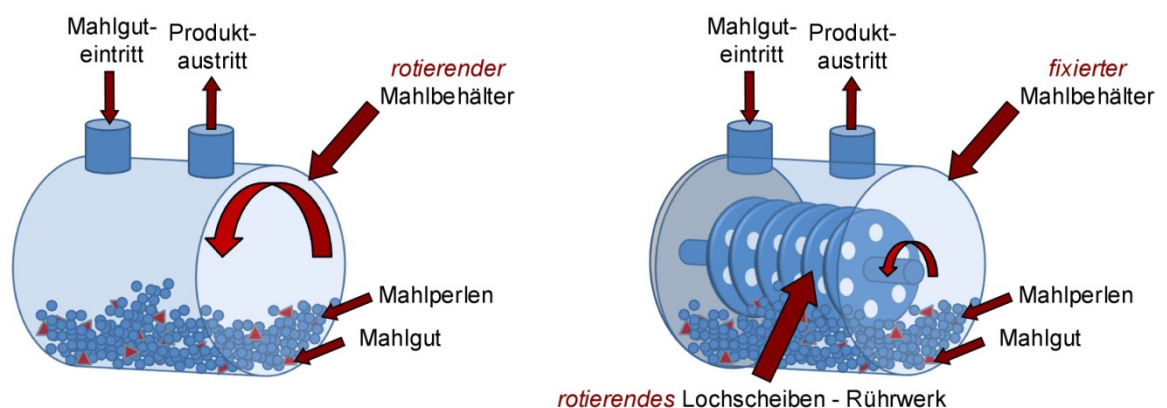
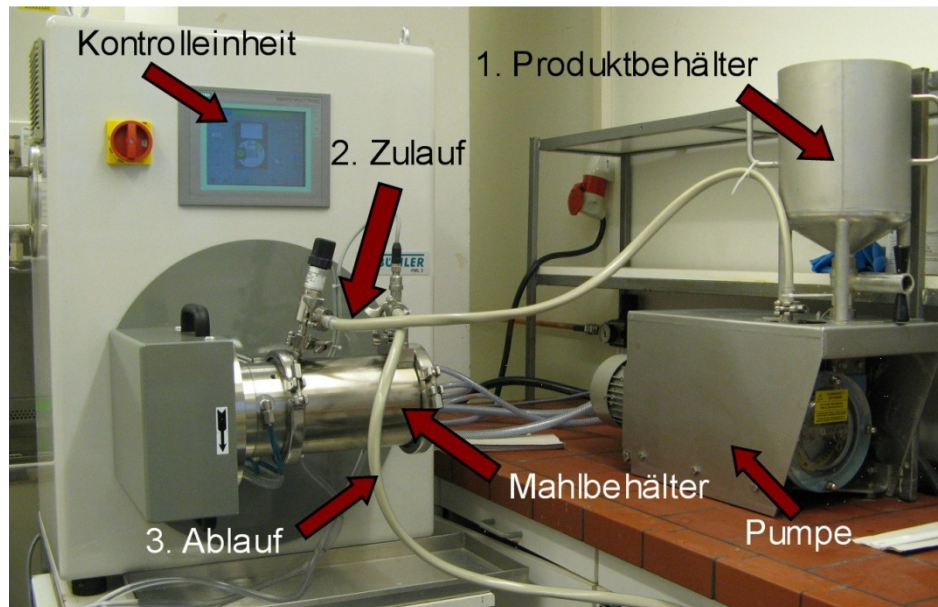


Abb. 1: Schematischer Aufbau einer Kugelmühle, mit rotierendem Mahlbehälter (links) und einer Rührwerkskugelmühle mit fixiertem Mahlbehälter und rotierendem Rührwerk (rechts).

Mit Rührwerkskugelmühlen kann sowohl diskontinuierlich (Mahlbehälter ist geschlossen, so genannter Batchmodus) als auch kontinuierlich (Passagenmodus) gearbeitet werden. Somit ist es möglich je nach Bedarf kleinere Ansätze für den Labormasstab mit dem diskontinuierlichen Modus

und größere Ansätze mit dem kontinuierlichen Modus herzustellen. Abb. 2 zeigt die PML-2 Mühle der Firma Bühler mit kontinuierlichem Aufsatz (Mahlraumvolumen 1 Liter).



**Abb. 2:** Mühle PML-2 der Firma Bühler mit kontinuierlichem Mahlbehälter. Das Mahlgut Produkt wird kontinuierlich mittels Pumpe aus dem Produktbehälter in den Mahlbehälter gepumpt und dort gemahlen. Nach der Passage wird das Produkt über den Ablauf ausgeführt. Die Einstellung der gewünschten Produktionsparameter (Pumpleistung, Umdrehungszahl des Rührwerkes) werden an der Kontrolleinheit (Touch Screen) eingestellt.

Zerkleinerung der Partikel erfolgt primär durch Reib- aber auch Prallkräfte, welche die sich bewegenden Kugeln auf das Mahlgut ausüben. Der Prozess ist hauptsächlich durch die Größe der Mahlperlen und den Energieeintrag (abhängig von Umdrehungszahl/min) steuerbar. Die Drehzahl ist meistens im breiten Spektrum einstellbar (z.B. 500-4500 U/min), bei Verwendung der kontinuierlichen Mahleinheit ist auch die Geschwindigkeit, mit der das Mahlgut den Mahlraum passiert regulierbar (Pumpenleistung) [2]. Das als Suspension vorliegende Gut muss stabilisiert werden (elektrostatisch oder sterisch) um Agglomeration bzw. Kristallbildung zu vermeiden. Die Produktionsparameter, aber auch die Art der Mahlperlen und das Mengenverhältnis von eingefüllten Mahlperlen und Mahlgut haben ebenfalls einen entscheidenden Einfluss auf die Qualität des Produktes. Den größten Einfluss hat jedoch die zu mahlende Substanz selber. Produkteigenschaften wie Härte, Kristallform, Ausgangsgröße und Dichte des Materials sind hierbei die einflussreichsten Parameter. Die jeweils optimalen Produktionsparameter für ein spezifisches Produkt müssen somit immer individuell für jede Substanz ermittelt werden.

### **3. Vorteile der Rührwerksmühlen und Probleme**

Rührwerkskugelmühlen können sowohl im Labor- wie im Industriemaßstab eingesetzt werden. Große Flexibilität bieten die Systeme, die eine Verwendung von sowohl diskontinuierlichen als auch kontinuierlichen Mahlräumen erlauben. Die im Rahmen von Laborversuchen (diskontinuierlicher Modus) erzielten Resultate können dann nach Umbau des Gerätes in den kontinuierlichen Modus direkt für den Industrie-Maßstab verwendet werden. Ein aufwendiges und teures Scaling-Up Verfahren (Überführen vom kleinen Labormasstab auf große Industrieanlagen) entfällt somit.

Die erzielte Partikelgröße des Produktes ist nicht nur von der Größe der Mahlperlen, sondern auch von der Verweildauer des Produktes im Mahlbehälter (längere Verweildauer bedeutet längere Mahlzeit und somit kleinere Partikel) abhängig. Die Verweildauer des Produktes im kontinuierlichen Mahlraum ist meistens zu kurz um die gewünschte Partikelgröße zu erzielen, da die Suspension kontinuierlich durch den Mahlbehälter gepumpt wird (vgl. Abb. 2). In solchen Fällen muss Produkt den Mahlraum mehrmals passieren um die gewünschte Partikelgröße zu erreichen. Abb. 3 zeigt die Verminderung der Partikelgröße als Funktion der Mahlpassagen. Die Partikelgröße wurde mittels Laserdiffraktometrie (LD) gemessen. Angegeben sind die volumenbezogenen Durchmesser 50%, und 95%. Der Durchmesser 50% (D50) kann als „Mittelwert“ der Teilchengrößenverteilung angesehen werden (50% der Partikel sind kleiner als der angegebene Wert in  $\mu\text{m}$ ). Der Durchmesser 95% (D95) ist primär ein Maß für noch verbleibende größere Partikel in der Suspension (D95=95% der Partikel sind kleiner als der angegebene Durchmesser in  $\mu\text{m}$ ). Der kleinste D50 ist bereits nach 5 Passagen erzielt. Weitere Passagen bis zum achten Durchlauf minimieren primär den Gehalt an verbleibenden größeren Kristallen bzw. Agglomeraten, der D95 sinkt weiter. Ab Passage 9 ergibt sich keine wesentliche Änderung mehr bei D50 und D95. Die Grenzdispersität ist erreicht (=maximal erreichbare kleinste Partikelgröße unter gegebenen Mahlbedingungen ist erreicht). Der Mahlvorgang ist beendet.

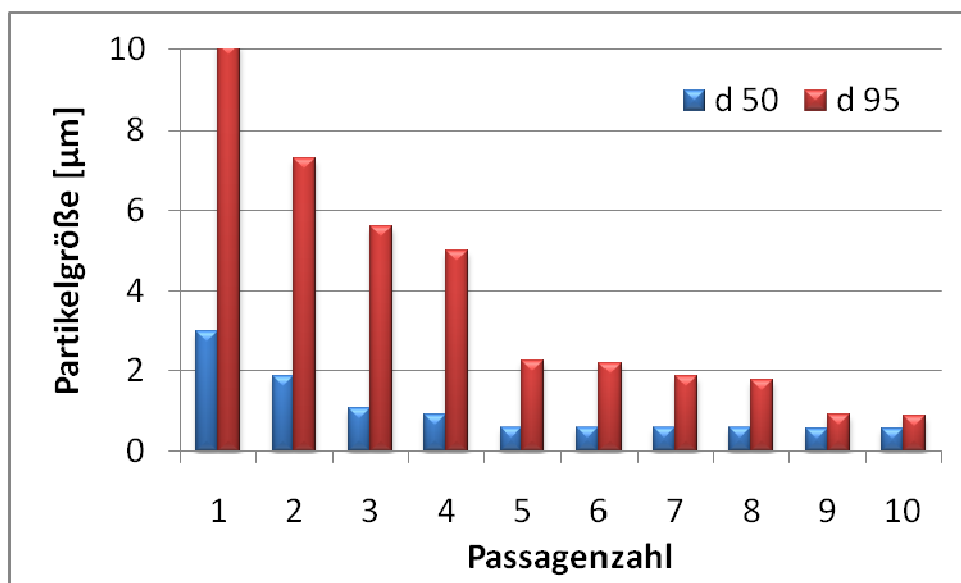


Abb. 3: Abhängigkeit der Partikelgröße des Flavonoids RMSK07 von Passagenzahl an der Rührwerksmühle Bühler PML-2.

Die wesentlichsten Probleme, die bei der Arbeit mit Rührwerksmühlen auftreten können sind:

- Abrieb der Mahlperlen und des Mahlraumes, besonders bei Stahl [3] (Schwermetalle im Produkt feststellbar), daher spielen die besonders harten YSZ-Kugeln in der Pharmazie die größte Rolle
- Mit Partikelgrößenverringern steigende Viskosität des Produktes, dadurch ggf. Verstopfen der Mühle (Blockierung des Abtrennsiebtes bzw. Abtrennspaltes für die Mahlperlen).
- Oft sehr lange Mahlzeit (hohe Anzahl an Passagen), die benötigt wird um die erwünschte Partikelgröße zu erreichen (Stunden bis 7 Tage)



#### 4. Verbreitung der Technologie in der Pharmazie

In der Pharmazie werden Rührwerkskugelmühlen meistens zur Produktion von Nanokristallen eingesetzt. Auf den Pharmazeutischen Markt befinden zurzeit sich 5 Produkte mit Nanokristallen (NanoCrystal® Technologie), die mit dieser Technologie hergestellt werden. Beispiele für Arzneimittel mit Nanokristallen sind Rapamune (Wirkstoff Sirolimus) und Emend (Wirkstoff Aprepitant) und Megace ES (Wirkstoff Megestrolacetat)[4].

#### 5. Literatur

1. I. van Quackenbush. Selecting Mill Medias, 2005. Quackenbush Company, Inc.
2. R. Stadler et al., Naßmahlung in Rührwerksmühlen, Chemical Engineering & Technology 62(11), (1990). pp. 907-915.
3. E. Merisko-Liversidge, Nanocrystals: Resolving Pharmaceutical Formulation Issues associated with poorly water-soluble Compounds. in Particles. 2002. Orlando: Marcel Dekker.
4. R.H. Müller, J.-U. Junghanns, Drug nanocrystals/nanosuspensions for the delivery of poorly soluble drugs, in: V.P. Torchilin (ed.), Nanoparticulates as Drug Carriers (1. 1.), Imperial College Press. London, 2006. pp. 307-328.

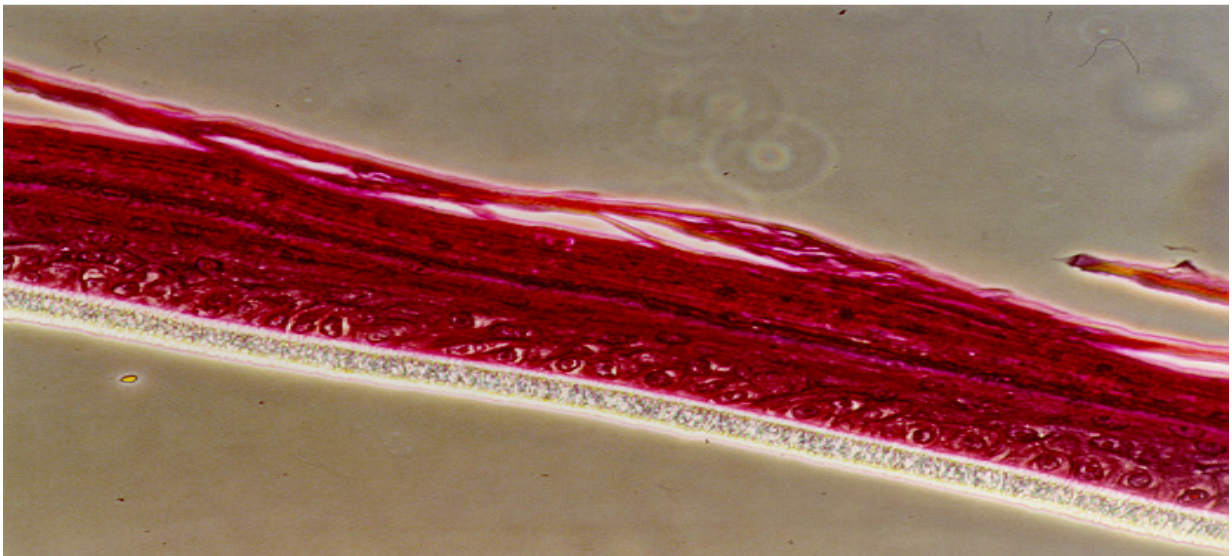
## Rekonstruierte humane Epidermis für die In-vitro-Bestimmung der perkutanen Absorption

Alexander Vuia

### 1. Einführung und Hintergründe

Rekonstruierte humane Epidermis (RHE), auch als „Kunsthäute“ oder „Hautmodelle“ bezeichnet, wird in vitro aus humanen Keratinozyten gewonnen. Zur Ausbildung eines mehrschichtigen Gewebes, bestehend aus den charakteristischen Epidermisschichten (Stratum basale, spinosum, granulosum und corneum sowie Basalmembran), ist bei der Kultivierung der Zellen im Medium (aufgebracht auf einer Stützmembran) der Kontakt mit der Luft (sog. Luft-Medium-Grenze) erforderlich. Die Dauer der Exposition beeinflusst dabei den Differenzierungsgrad der Zellschichten.

Die nach der Kultivierung gewonnene rekonstruierte humane Epidermis ist vollständig ausgebildet und zeigt morphologisch eine gute Übereinstimmung mit humaner Epidermis (Abb. 1). Dies gilt ebenso für die Expression wichtiger epidermaler Differenzierungsmarker (z. B. Keratin 1 und 10) als auch für das Vorhandensein hauttypischer Lipidklassen, beides essentiell für die Ausbildung einer kompetenten Barriere (1). Allerdings sind auch Unterschiede zur humanen Epidermis in der Feinstruktur (Anzahl der Zellschichten, -struktur und -organisation), der Lipidzusammensetzung sowie im Ausmaß der immunhistologischen Expression beschrieben (2, 3).



**Abbildung 1:** Histologischer Schnitt von rekonstruierter humaner Epidermis (SkinEthic<sup>®</sup>-Modell). Die vollständig ausgebildeten epidermalen Zellschichten, kultiviert auf einer Polycarbonat-Stützmembran (ohne Färbung), sind rot angefärbt.

## 2. Rekonstruierte humane Epidermis als Testhaut

Humane Haut gilt bei der Bestimmung der perkutanen Absorption in vitro als „Gold-Standard“, allerdings ist die Verfügbarkeit sehr begrenzt und deckt weder den Bedarf der Routinetesting in der Toxikologie noch in der Forschung. Tierische Häute, wie Ratten- und vor allem Schweinehaut werden daher häufig gemäß den aktuell geltenden europäischen Richtlinien für die Bestimmung der perkutanen Absorption in vitro alternativ als Testhäute eingesetzt (4, 5).

Mit rekonstruierter humaner Epidermis, die von verschiedenen Anbietern kommerziell verfügbar ist und bereits für In-vitro-Untersuchungen (z. B. Bestimmung der Phototoxizität) eingesetzt wird, ist für die In-vitro-Bestimmung der perkutanen Absorption eine weitere zusätzliche Alternative verfügbar. Das zeigen die Ergebnisse einer Validierungsstudie, durchgeführt im Rahmen eines Verbundprojektes mit Partnern aus Industrie und Universitäten, in der die perkutane Absorption anhand einer Substanzauswahl mit breitem physikochemischen Spektrum (Stoffe mit hoher Lipo- und Hydrophilie und hohem Molekulargewicht) an drei RHE-Modellen (EpiDerm™, SkinEthic® und EPIKSIN®) in Vergleich zu Human- und Schweinehaut (Referenzhäute) verglichen wurde. Zwar ist die perkutane Absorption bei den RHE-Modelle in der Regel höher als bei Human- und Schweinehaut (Abb. 2), doch konnte, auf Grundlage der abschließenden statistischen Auswertung, zwischen allen Testhäuten eine Korrelation gezeigt werden, die die Eignung von RHE als Testhaut belegt (6).

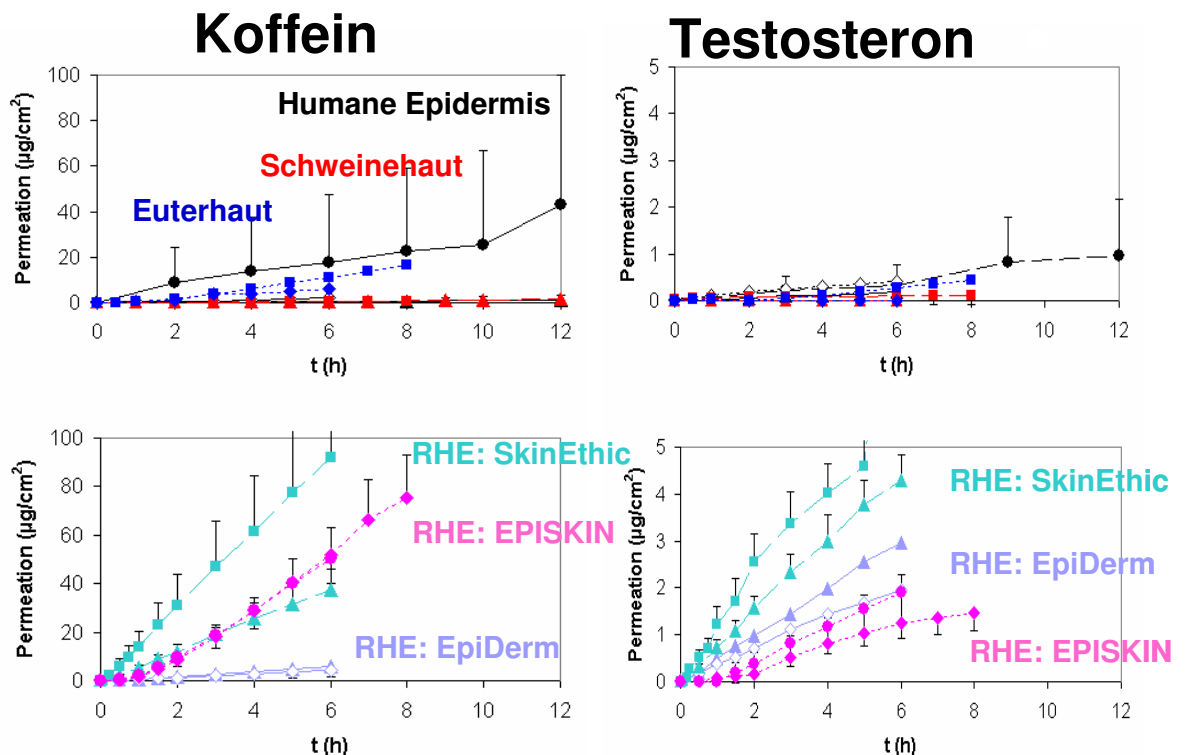


Abbildung 2: Ergebnisse aus einer Validierungsstudie mit RHE (7): Permeation von Koffein (0,1 %ige Lösung in PBS) und Testosteron (0,004%ige Lösung in PBS + 2 % Igepal® CA 630), getestet mit der Franz-Diffusionszelle an humaner Epidermis, Schweine- und Euterhaut sowie an drei RHE-Modellen (SkinEthic®, EpiDerm™ und EPIKSIN®). Als Akzeptormedium diente PBS.

Die hohen biologischen Streuungen bei humanen und tierischen Häuten erschweren die Gewinnung reproduzierbarer Daten. Daher empfiehlt sich beim Testen neuer Substanzen das Mitführen einer Referenzsubstanz, wodurch zusätzlich systematische Fehler bei der Versuchsdurchführung ausgeschlossen werden können. Hierfür eignen sich insbesondere Koffein und/oder Testosteron (4, 5, 6).

### 3. Experimentelle Durchführung

Die RHE-Modelle werden von den Herstellern zusammen mit Erhaltungsmedium (je nach Größe in 6- bzw. 12-Well-Platten) steril verpackt und gekühlt versendet (Abb. 3). Je nach experimenteller Fragestellung kann RHE mit unterschiedlichen Differenzierungsgrad der Epidermis bezogen werden. Die einzelnen rekonstruierten Häute befinden sich innerhalb eines Kunststoffrings (Insert) in den einzelnen Wells der Platten und sind mit der Hautunterseite (Stützmembran) im direkten Kontakt mit einem Agarose-Gel.

Vor Versuchsbeginn muss die RHE über mindestens 1 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert werden. Dazu werden die RHE-Inserts unter sterilen Bedingungen (z. B. an einer Sterilarbeitsbank) in das mitgelieferte Erhaltungsmedium überführt, das zuvor auf Raumtemperatur temperiert wurde. Nach erfolgter Inkubation muss die RHE sofort für den Versuch eingesetzt werden.



**Abbildung 3:** In den einzelnen Wells der 6-Well-Platte befindet sich die RHE (EpiDerm™) innerhalb eines Kunststoffrings. Die Unterseite der RHE-Inserts (Stützmembran) ist im Kontakt zu einem rötlich gefärbten Agarose-Gel (Well links unten, ohne RHE-Insert), das der Erhaltung der Häute für die Dauer des Transports dient.

Die perkutane Absorption in vitro mittels RHE ist z. B. mit der Franz-Diffusionszellen-Methode bestimmbar. Aber auch eine Durchführung des Versuchs direkt in den Inserts ist theoretisch möglich. Für den Versuch in der Franzzelle wird die RHE vorsichtig an den Seitenrändern der Inserts mit Hilfe eines Skalpellts herausgeschnitten und anschließend so mit einer Pinzette auf die Franzzelle zentriert, dass die Stratum-corneum-Seite nach oben zeigt (Abb. 4). Dabei ist darauf zu

achten, dass sich die RHE nicht von der Stützmembran löst oder sich nach Aufbringen der RHE auf die Franzelle im Kontakt mit dem Akzeptormedium Luftblasen unterhalb der Haut befinden.



**Abbildung 4:** Die RHE (EpiDerm™) wurde aus dem Insert herausgeschnitten und auf die Oberseite der Franzelle mit Hilfe einer Pinzette zentriert. Die Stratum-corneum-Seite hat Kontakt zur Luft (Donorseite), die Hautunterseite mit dem Akzeptormedium (rötlich gefärbt).

Das Akzeptormedium der Franzelle sowie das Trägermedium für die Testsubstanzen sollten so gewählt sein, dass die RHE dadurch nicht geschädigt wird. Isotonischer Phosphatpuffer (PBS, pH 7,4) dient daher häufig als Standardmedium, bei lipophilen Substanzen kann unter Berücksichtigung der Hautverträglichkeit ein Lösungsvermittler (z. B. Igepal® CA 630) verwendet werden.

Auf Grund der in der Regel höheren Permeabilität, sind Versuche mit RHE (Dauer bis zu 10 h) im Allgemeinen schneller durchführbar als mit Human- und Schweinehaut (Dauer bis zu 26 h). Darüber hinaus bietet RHE den Vorteil, dass die Wiederholbarkeit der Versuche an verschiedenen (oder gleichen) Chargen nicht limitiert ist.

#### **4. Auswertung**

Zur Auswertung von Permeationsuntersuchungen können verschiedene Endpunkte herangezogen werden, die einen Vergleich mit anderen Permeationsergebnissen ermöglichen:

**Scheinbarer Permeabilitätskoeffizient ( $P_{app}$ -Wert):** Da der Transport topisch applizierter Substanzen durch die Haut vorwiegend durch passive Diffusion erfolgt, kann von der Gültigkeit des 1. Fickschen Gesetzes ausgegangen werden. Nach dem 1. Fickschen Gesetz ist die Abnahme einer auf die Haut applizierten Substanz pro Zeiteinheit direkt proportional zum Diffusions- und Verteilungskoeffizienten sowie umgekehrt proportional zur Dicke der Membran. Der Flux (J) ist definiert als die transportierte Stoffmenge pro Zeiteinheit und Fläche. Zur Vereinfachung wird dabei von einer homogenen Hautbarriere ausgegangen.

Der scheinbare Permeabilitätskoeffizient ( $P_{app}$ - oder  $k_p$ -Wert) leitet sich direkt aus dem 1. Fickschen Gesetz ab und ist ein Maß für die Geschwindigkeit, mit der eine Substanz unter Steady-

State-Bedingungen permeiert. Der  $P_{app}$ -Wert charakterisiert sowohl die Permeabilität einer Membran als auch die Permeationseigenschaften einer Substanz. Bei den Bedingungen, wie sie bei Permeationsuntersuchungen mit der Franz-Diffusionszelle gelten, kann dieser wie folgt berechnet werden:

$$P_{app}(k_p) = \frac{V}{A \cdot c_i} \cdot \frac{dc_A}{dt}$$

$V$  : Akzeptorvolumen der Franzzelle [ $\text{cm}^3$ ]

$A$  : Fläche der Membran in Kontakt mit dem Akzeptormedium [ $\text{cm}^2$ ]

$c_i$  : Ausgangskonzentration der Substanz im Donormedium [ $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ]

$\frac{dc_A}{dt}$  : zunehmende Konzentration der Substanz im Akzeptormedium über die Zeit [ $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$ ]

$P_{app}$  : scheinbarer Permeabilitätskoeffizient [ $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ]

Um die Gültigkeit des 1. Fickschen Gesetzes sicherzustellen, dürfen für die Berechnung des  $P_{app}$ -Werts nur Messpunkte aus dem linearen Teil der Permeationskurve herangezogen werden (Abb. 5). Die Entnahmezeiten der einzelnen Messproben aus der Akzeptorkammer der Franzzelle sollten daher so gewählt werden, dass mindestens 6 Messwerte innerhalb des linearen Teils der Permeation vorliegen. Nur so ist eine valide Berechnung des  $P_{app}$ -Werts möglich. Um den linearen Bereich korrekt erfassen zu können, müssen Messwerte aus dem Bereich der lag-Zeit (s. u.) oder einer eventuell eingetretenen Sättigung des Akzeptormedium mit Testsubstanz (Abflachen der Permeationskurve) aus der Berechnung des  $P_{app}$ -Werts ausgeschlossen werden.

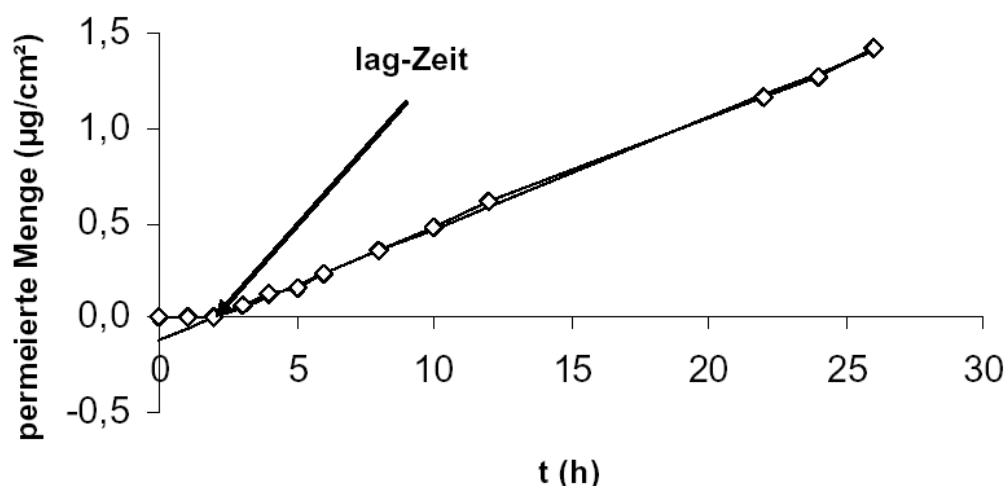


Abbildung 5: Grafische Auswertung eines Permeationsversuchs (Permeationskurve mit insgesamt 13 Messwerten). Dargestellt ist die permeierte Menge gegen die Zeit. Der lineare Bereich der Permeation (Steady-State) ist gekennzeichnet durch die schwarze Linie und bestimmt die Berechnung des  $P_{app}$ -Werts. Die lag-Zeit lässt sich grafisch aus dem Schnittpunkt mit der x-Achse ermitteln (ca. 2 h).

**Lag-Zeit:** Die Zeit die vergeht, bis eine lineare Permeation (d. h. Steady-State-Bedingungen) beginnt, wird als lag-Zeit bezeichnet. Sie wird bestimmt von dem Ausmaß und der Zeit der Aufsättigung der Haut mit der applizierten Substanz und kann je nach Hauttyp sehr schwanken. Bei RHE ist die lag-Zeit in der Regel sehr gering, bzw. nicht vorhanden. Bei der grafischen Darstellung der Permeation ergibt sich die lag-Zeit als Schnittpunkt der durch den linearen Teil der Kurve verlaufenden Geraden mit der x-Achse (Abb. 5).

## 5. Autor

Dr. Alexander Vuia

## 6. Literatur

1. Boelsma, E., et al., *Characterization and comparison of reconstructed skin models: morphological and immunohistochemical evaluation*. Acta Derm Venereol, 2000. **80**: p. 82-88.
2. Ponec, M., et al., *Characterization of reconstructed skin models*. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol, 2002. **15 Suppl 1**: p. 4-17.
3. Ponec, M., et al., *Lipid and ultrastructural characterization of reconstructed skin models*. Int J Pharm, 2000. **203**: p. 211-225.
4. OECD, *Test Guideline 428: Skin absorption: in vitro Method*. 2004. Adopted on 13<sup>th</sup> April 2004.
5. OECD, *Guidance Document No 28 for the conduct of skin absorption studies*. 2003. Adopted at 35<sup>th</sup> Joint Meeting August 2003.
6. Schäfer-Korting, M., et al., *Reconstructed Human Epidermis for Skin Absorption Testing: Results of the Validation*. Altern Lab Anim, 2008. **36**: p. 161-187.
7. Schäfer-Korting, M., et al., *Reconstructed Human Epidermis for Skin Absorption Testing: Results of the German Prevalidation Study*. Altern Lab Anim, 2006. **34**: p. 283-294.



## Tape Stripping Test

Jana Pardeike & Rainer Müller, Freie Universität Berlin

### 1. Grundlegendes

Das Stratum corneum (SC), die äußerste Schicht der Haut, ist die Hauptbarriere für die Penetration von Wirkstoffen. Vereinfacht kann man sich das SC wie eine Ziegelsteinmauer vorstellen, bei der die Ziegelsteine den Korneozyten und der Mörtel der interzellulären Lipidmatrix entspricht [1]. Die Dicke des SC beträgt 6 bis 15  $\mu\text{m}$  was etwa 14 bis 27 Lagen Korneozyten entspricht. Das SC an den Handflächen und den Fußsohlen ist wesentlich stärker als an anderen Körperteilen. Mit Hilfe des Tape Stripping Tests kann das Penetrationsverhalten von topisch applizierten Substanzen in bzw. durch das SC ermittelt werden [2, 3]. Hierfür werden nacheinander adhäsive Filme auf die Haut geklebt, abgezogen und die Substanzmenge pro Abriss bestimmt [4].

### 2. Durchführung

Substanzen (z.B. wirkstoffhaltige Cremes, Öle oder Emulsionen) werden in einer genau definierten Menge auf ein Testareal aufgetragen (Abb. 1A). Nach einer Einwirkzeit werden die Substanzen entfernt. Es werden adhäsive Filme (z.B. Tesa Film oder Scotch Tape) auf das Testareal geklebt und mit einem definierten Druck angedrückt (Abb. 1B). Ein gleichmäßiges andrücken kann z.B. durch das Verwenden von Gummirollern mit einem definierten Gewicht gewährleistet werden. Die adhäsiven Filme werden von der Haut abgezogen (Abb. 1C). An den Filmen haften nun sowohl Korneozyten und Bestandteile der Lipidmatrix als auch Anteile der in der jeweiligen Schicht vorhandenen applizierten Wirksubstanz (Abb. 1D). Durch Extraktion können die Substanzen von den Filmen mit anhaftenden Zellen getrennt und im Extrakt die Menge der Substanz quantifiziert werden.



A



B

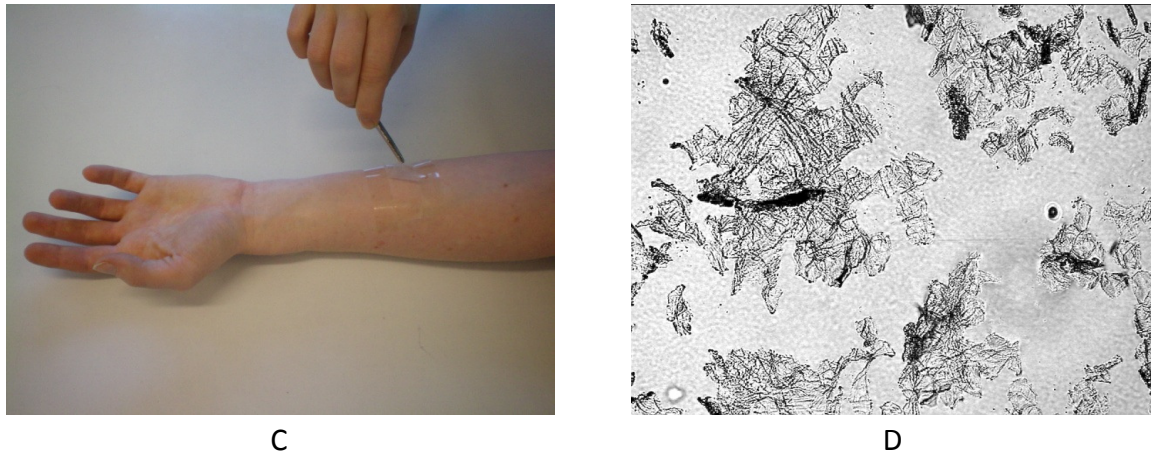


Abb. 1: (A) Markiertes Testareal auf dem Unterarm einer Probandin nach dem Auftragen einer Coenzym Q10-haltigen Creme, (B) Andrücken des adhäsiven Films mit Hilfe eines 1 kg-Gummirollers, (C) mit einer Pinzette wird der adhäsive Film abgezogen, (D) am 1. Film haftende Korneozyten mit 160-facher Vergrößerung.

### 3. Beispiel

In Abbildung 2 sind die Penetrationsprofile von Coenzym Q10 in das SC aus 3 verschiedenen Formulierungen dargestellt. Nach dem Einklimatisieren bei  $20\pm 1^\circ\text{C}$  und  $45\pm 5\%$  relativer Luftfeuchtigkeit für 30 Minuten wurden je 150 mg 0,5% Coenzym Q10-haltige NLC-Dispersion, Emulsion und dickflüssiges Paraffin auf ein  $10,4\text{ cm}^2$  großes Testfeld auf der Innenseite des Unterarms aufgetragen. An dem Test nahmen 5 Probandinnen teil. Nach 30 Minuten wurden die Formulierungen abgewaschen. Mit 9 Streifen Scotch Tape No. 90 wurde das SC abgezogen und die Menge Coenzym Q10 in den Streifen mittels HPLC bestimmt. Aus der Abbildung 2 wird der Einfluss der Formulierung auf das Penetrationsverhalten von Substanzen ersichtlich. In dem hier dargestellten Beispiel sieht man, dass aus NLC und Emulsion das Coenzym Q10 besser in das SC penetriert als aus dickflüssigem Paraffin. Die größte Menge Coenzym Q10 penetriert aus den NLC in das SC [5].

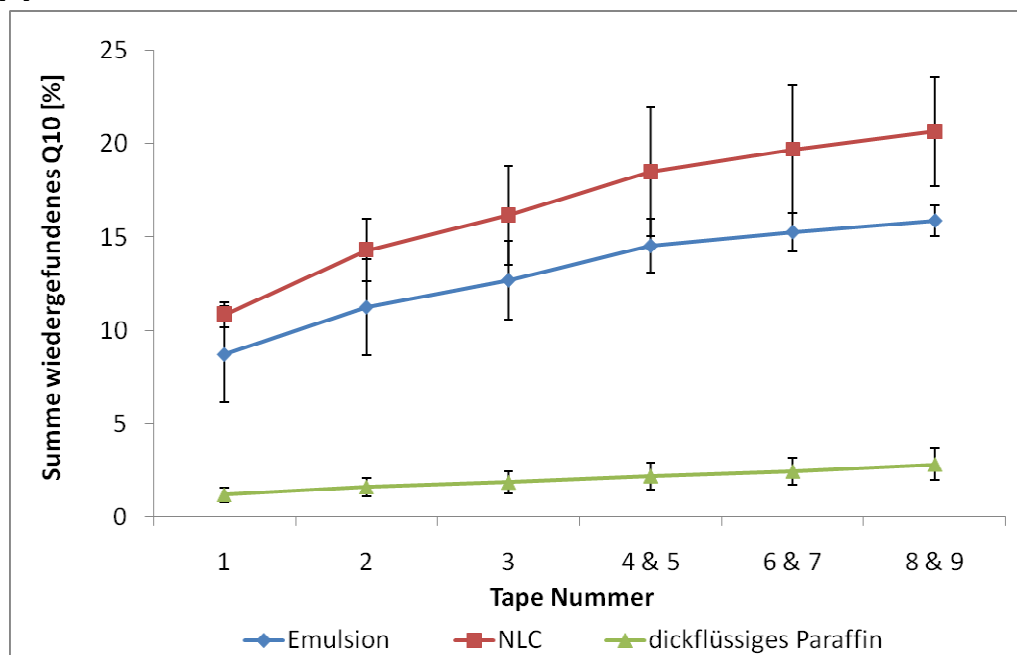


Abb 2: Mit Hilfe des Tape Stripping Tests ermittelte Penetrationsprofile von Coenzym Q10 aus NLC, Emulsion und dickflüssigem Paraffin ins SC.

### 3. Referenzen

1. L. Norlén, Molecular Skin Barrier Models and Some Central Problems for the Understanding of Skin Barrier Structure and Function, *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology* 16(2002). pp. 203-211.
2. S. Warmann et al., MDR1 modulators improve the chemotherapy response of human hepatoblastoma to doxorubicin in vitro, *Journal of Pediatric Surgery*. 37(11), (2002). pp. 1579-84.
3. H.-J. Weigmann, Lademann, J., Schanzer, S., Lindemann, U., von Pelchrzim, R., Schaefer, H., Sterry, W., Shah, V., Correlation of the Local Distribution of Topically Applied Substances Inside the Stratum corneum Determined by Tape-Stripping to Differences in Bioavailability, *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 14(2001). pp. 98-102.
4. H. Loffler, Dreher, F., Maibach, H. I., Stratum corneum adhesive tape stripping: influence of anatomical site, application pressure, duration and removal, *Br J Dermatol* 151(4), (2004). pp. 746-52.
5. J. Pardeike et al., Coenzyme Q10 Loaded NLC: in vitro release and in vivo skin penetration. in AAPS Annual Meeting & Exposition. 2007. San Diego CA.

# Teil 5: Theorie

in Vorbereitung