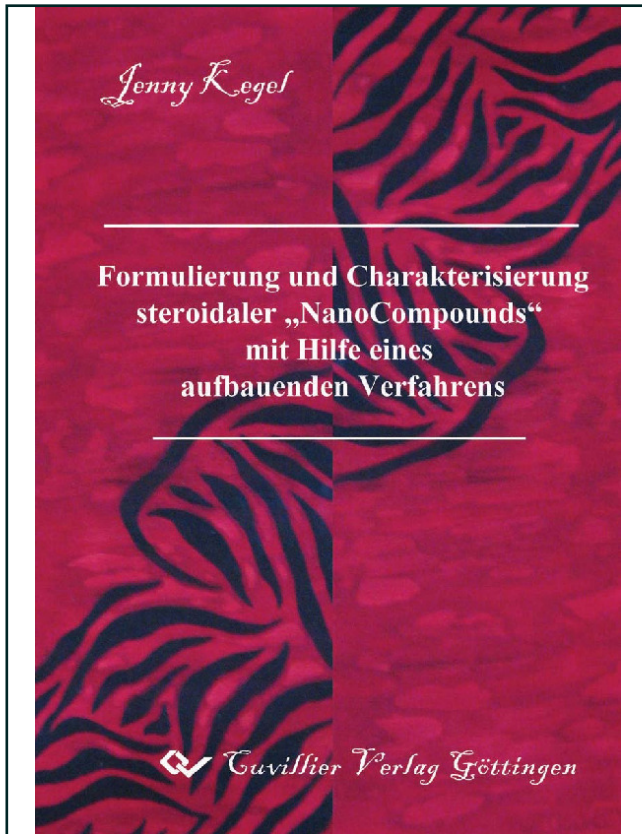




Jenny Kegel (Autor)

**Formulierung und Charakterisierung steroidaler  
'NanoCompounds' mit Hilfe eines aufbauenden  
Verfahrens**



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/2060>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentzsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,  
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>

---

# 1 Einleitung und Zielsetzung

---

## 1.1 Einleitung

Seit jeher beruhen alle biologischen Systeme auf dem funktionellen Zusammenspiel von Nanostrukturen. Im Laufe der Evolution entstanden Nanostrukturen durch Selbstorganisation aus einfachen biologischen Bausteinen. Biologische Systeme können also als Vorbild für künstliche Nanostrukturen [Pfaff und Reynders, 1999] oder sogar als Template für den Aufbau nanostrukturierter Materialien dienen.

Intensive Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der Nanotechnologie haben in den vergangenen Jahren zu bedeutenden Fortschritten bei der Erzeugung und Charakterisierung von Strukturen im Nanometermaßstab geführt. Auf dem Gebiet der Physik und der Werkstoffwissenschaften werden häufig lithographische Methoden angewandt [Merhari et al., 2002], um immer kleinere Strukturen zu erzeugen. Dagegen versuchen Chemiker, ausgehend von Molekülen durch den Aufbau supramolekularer Verbindungen Nanostrukturen zu schaffen. Jenes ist zum Beispiel bei der Herstellung von Farbpigmenten bereits etabliert [Pfaff, 1997; Pfaff und Reynders, 1999]. Ziel der Nanotechnologie ist es, durch die gezielte Anordnung einzelner Atome oder Moleküle neuartige Substanzen zu schaffen, da nanostrukturierte Materialien häufig völlig veränderte Eigenschaften im Vergleich zu den Eigenschaften derselben Verbindung bzw. desselben Elements in makroskopischer Größe aufweisen [Kind, 1999]. Somit können aus bereits existierenden Materialien Substanzen entwickelt werden, deren Eigenschaften je nach Einsatzgebiet gezielt verbessert werden können. Insbesondere durch „Life-Cycle-Management“ können neue Produkte, die eine verbesserte Qualität und Leistung aufweisen, schnell, kostengünstig und zielgerichtet, basierend auf bereits bestehenden Produkten entwickelt werden.

Auch in der galenischen Pharmazie wird seit den 90er Jahren versucht, neue potentielle Arzneistoffe oder bereits existierende Substanzen durch „Nanonisierung“ dem menschlichen Organismus durch Verbesserung ihrer Löslichkeitseigenschaften besser bioverfügbar zu machen. Dies betrifft vor allem Substanzen, deren therapeutisches Potential aufgrund ihrer schwer wasserlöslichen Eigenschaft stark begrenzt ist.

Mehr als 40% der NCE's (New Chemical Entities) [Patravale et al., 2004] werden aufgrund dieser Eigenschaft bereits in frühen Forschungs- und Entwicklungsphasen ausgeschlossen, da nicht genügend Informationen über ihr therapeutisches Potential oder über toxische Nebeneffekte erhalten werden können [Lipinski, 2000; Lipinski, 2002]. Bereits im Handel befindliche Wirkstoffe müssen aufgrund ihrer schweren Wasserlöslichkeit in sehr hohen Dosen verabreicht werden, was das Risiko starker Nebenwirkungen mit sich zieht [Couvreux et al., 1995].

Traditionelle Verfahren zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit schwer wasserlöslicher Substanzen wie die Mikronisierung [Buchmann et al., 1996; Müller et al., 2003; Rasenack et al., 2003; Steckel et al., 2003], die Verwendung von Lösungsmittelgemischen [Yalkowski und Roseman, 1981] oder Permeationsenhancern [Aungst, 1993; Aungst, 2000], der Einsatz von Tensiden zur Solubilisierung [Bauer, 1990; Florence und Attwood, 1981; Grant und Brittain, 1995] und ölicher Lösungen [Aungst, 1993] sind in ihrer Anwendung und ihrem Nutzen begrenzt. Die Mikronisierung zum Beispiel erhöht zwar die Bioverfügbarkeit, aber oftmals nicht in dem Maße, dass hieraus ein ausreichender Blutplasmaspiegel resultiert, der für eine erfolgreiche therapeutische Wirkung vorausgesetzt wird. Auch eine intravenöse Applikation des mikronisierten Arzneistoffs scheidet aufgrund des hohen Anteils an Mikropartikeln  $> 5\mu\text{m}$  aus.

Neuere Ansätze wie Liposomen [Schwendener und Schott, 1996], polymere Nanopartikel [Horn und Rieger, 2001], Emulsionen [Floyd, 1999; Nakano, 2000], Mikroemulsionen [Lawrence und Ries, 2000], Solid Lipid Nanoparticles (SLN<sup>®</sup>) [Serajuddin, 1999; Leuner und Dressman, 2000; Breitenbach, 2002] und Cyclodextrinkomplexe [Loftsson und Brewster, 1996; Stella und Rajewski, 1997; Akers, 2002] besitzen ein gutes Potential zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit und sind in einigen Fällen erfolgreich. Allerdings sind sie stark arzneistoffspezifisch und somit in ihrer Anwendung, auch aufgrund von Sicherheitsaspekten, begrenzt. So bringen zum Beispiel Cyclodextrin-Einschlussverbindungen zwar eine erhöhte Löslichkeit für schwerlösliche Arzneistoffe mit sich [Uekama et al., 1987; Sharma et al., 1997], da aber strukturelle Voraussetzungen erfüllt sein müssen, sind diese nur auf eine geringe Anzahl von Arzneistoffen anwendbar. Des Weiteren führen viele Einschlussverbindungen nach ihrer Verwendung zu hämolytischen Nebenwirkungen [Yoshida et al., 1988].

Nanopartikuläre Abgabesysteme wie polymere Nanopartikel, Nanokapseln, SLN<sup>®</sup>, Nanogele und nanopartikuläre Wirkstoffe haben die Möglichkeit biologische Barrieren zu überwinden, ihre Gewebetoleranz zu erhöhen, die Möglichkeit einer verbesserten zellulären Aufnahme und eines verbesserten Transportes. Durch die Modifizierung ihrer Oberflächen kann zusätzlich eine zielgerichtete Abgabe des Arzneistoffes erreicht werden, z.B. im Gehirn, in der Leber oder in Tumoren [Kreuter, 2001; Moghimi et al., 2001; Nishioka und Yoshino, 2001]. Diese kolloidalen Systeme besitzen außerdem ein hohes Potential, Probleme der oralen Bioverfügbarkeit, starker interindividueller Unterschiede und suboptimaler therapeutischer Erfolge, vor allem bei der Abgabe schwer wasserlöslicher Wirkstoffe zu überwinden und die therapeutische und pharmakokinetische Leistung dieser Substanzen zu erhöhen [Mader und Mehnert, 2001; Merisko-Liversidge et al., 2003].

Trotz des immensen Potentials nanopartikulärer Systeme zur Arzneistoffabgabe ist ihre Kommerzialisierung durch Schwierigkeiten im „Scale-Up“, enorme Produktionskosten und schwer erfüllbare behördliche Anforderungen limitiert [Mader und Mehnert, 2001]. Dies trägt dazu bei, dass gegenwärtig vor allem die Formulierung reiner nanopartikulärer Substanzen, anstelle der auf Carrier basierenden nanopartikulären Systeme, im Focus der pharmazeutischen Forschung und Entwicklung steht [Date und Patravale, 2004; Patravale et al., 2004]. Bereits angewandte Top-Down-Technologien wie die Nassmahlung (NanoCrystals<sup>®</sup>Technology) [Liversidge et al., 1992], und Hochdruckhomogenisation (DissoCubes<sup>®</sup>Technology) [Müller et al., 1999] werden bereits im großen Maßstab zur Herstellung nanopartikulärer Substanzen eingesetzt. Der problematische Einsatz der Nassmahlung ist vor allem durch die Kontamination von Mahlkörpern durch Abrieb (Zirkonoxid oder Siliciumoxid) gegeben [Buchmann et al., 1996], die in Wirkstoffformulierungen oft unerwünscht oder nicht zu tolerieren ist. Darüber hinaus werden Substanzen hohen Temperaturen ausgesetzt, die während eines Mahlprozesses auftreten.

Die Anwendung der Hochdruckhomogenisation bedarf einiger vorbereitender Schritte: die Mikronisierung des Wirkstoffes auf eine Partikelgröße  $<25\mu\text{m}$  zur Vermeidung der Verstopfung des Homogenisationsspaltens sowie die Herstellung einer Prä suspension mit Hilfe von hochtourigen Mischern. Zusätzlich werden die Substanzen durch hohen Druck von ca. 1500bar und einer hohen Zahl an Herstellungszyklen ( $>15$ ) beansprucht.

Zur Formulierung nanopartikulärer Substanzen mit enger Größenverteilung sind diese Mahlprozesse allerdings prinzipiell ungeeignet, da es mit abnehmender Partikelgröße zunehmend schwieriger wird, die eingebrachte mechanische Energie über Scher- und Kavitationskräfte [Peters, 1996] für die Partikelzerkleinerung zu nutzen, ohne gleichzeitig eine Partikelagglomeration zu induzieren [Mollet und Grubenmann, 2000; Lagaly et al., 1997]. Da sich alternative Technologien wie Fällungsverfahren noch weitgehend im Entwicklungsstadium befinden, finden Mahlprozesse trotz der genannten Nachteile eine breite Anwendung [Liversidge und Cundy, 1995; Müller und Böhm, 1998a; Müller und Hildebrand, 1998b].

Fällungsverfahren könnten aber nach Überlegungen von Horn und Rieger [Horn und Rieger, 2001] bei geeigneter Prozessführung nicht nur die Herstellung extrem eng verteilter Dispersionen ermöglichen, sondern auch eine kontinuierliche und in den Verfahrensparametern gut steuerbare Produktionsweise erlauben. Diese verfahrenstechnischen Vorteile lassen Fällungsverfahren auch aus ökonomischer Sicht als besonders attraktiv erscheinen. Die Herstellung von nanodispersen Wirkstoffen mittels Fällungsverfahren kann durch Emulgier-Verdampfungsverfahren aus lipophiler Lösung [Kläui und Münzel, 1965; Kläui und Bauernfeind, 1981] oder durch Fällungsverfahren aus hydrophiler Lösung erfolgen. Über letzteres Verfahren wurde in der wissenschaftlichen Literatur bisher wenig berichtet [Gassmann et al., 1994; Horn und Lüddecke, 1996; Sucker, 1998; Joguet und Matijevic, 2002]. Demgegenüber liegt allerdings bereits ein umfangreiches Schrifttum über Fällungsprozesse zur Herstellung anorganischer Nanopartikel vor [Matijevic, 1994; Lagaly et al., 1997; Meisel, 1997; Peng et al., 1998; Pelster und Simon, 1999; Sugimoto, 2000]. Auch überkritische Flüssigkeiten wurden zur Herstellung mikro- bis nanodisperser organischer Systeme eingesetzt [Tom und DeBenedetti, 1991; Shekunov und York, 2000]. Diese Verfahren sind allerdings aufgrund der geringen Löslichkeit von Arzneistoffen und Tensiden in überkritischen Flüssigkeiten und der erheblichen Beanspruchung der Substanzen durch den Einsatz hoher Drücke und Temperaturen nur begrenzt einsetzbar. Zur Fällung aus hydrophiler Lösung werden im Labormaßstab Verfahren beschrieben, bei denen die Lösungsphase durch Eintropfen oder Eindüsen in die gerührte wässrige Tensidlösung eingebracht wird [Gassmann et al., 1994; Sucker, 1998].

Besser kontrollierte Fällungsbedingungen existieren bei Doppel-Jet-Verfahren, bei denen die Reaktionslösungen aus einem in die Tensidlösung eingetauchten Düsenpaar austreten und unter definiertem Strömungswinkel vermischt werden [Goia und Matijevic, 1998].

Diese Batch-Prozesse sind hydrodynamisch schwer kontrollierbar. Eine weitere Gruppe bilden Verfahren, bei denen die Wirkstofflösung und die wässrige Tensidlösung in einer Mischkammer [Horn, 1989; Horn und Lüddecke, 1996], einem statischen Mischer [Sucker, 1998] oder einem Y- oder T-Mischer [Kirwan und Orella, 1993; Mahajan und Kirwan, 1993] turbulent verwirbelt werden und die Partikelbildung in einem anschließenden Strömungsrohr erfolgt. Trotz des Potentials dieser Verfahren, die Partikelbildung über die Mischungsverhältnisse und/oder die Temperaturführung zu steuern, werden noch immer Mahlprozesse zur Herstellung nanopartikulärer Arzneistoffe bevorzugt eingesetzt.

## 1.2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Herstellung nanopartikulärer Arzneistoffe („NanoCompounds“), insbesondere steroidaler Substanzen, durch ein kontrolliertes und reproduzierbares Fällungsverfahren („Bottom-Up-Technologie“), das gleichzeitig eine Maßstabsvergrößerung von der Laboranlage bis zum kontinuierlichen Produktionsverfahren ermöglicht. Die Kontrollier- und Reduzierbarkeit eines Präzipitationsverfahrens könnte nach Überlegungen von Horn und Rieger [Horn und Rieger, 2001] durch die Realisierung nachstehender Bedingungen möglich sein:

1. Die Keimbildung sollte bei möglichst hoher Übersättigung erfolgen, um die Keimbildungsgeschwindigkeit zu maximieren.
2. Die Begrenzung des Partikelwachstums und die Einstellung einer engen Größenverteilung erfordern einen kontrollierten, raschen Abbau der Übersättigung im Anschluss an die Keimbildungsphase, gegebenenfalls unter dem Einfluss spezifischer Wachstumsinhibitoren.
3. Außerdem sollte die Agglomeration der Primärpartikel durch viskositätserhöhende Additive und/oder durch niedermolekulare Schutzkolloide mit hoher Grenzflächenaktivität verhindert oder gesteuert werden.

Ersteres könnte durch die geeignete Wahl eines mit Wasser vollständig mischbaren Lösungsmittels und durch eine möglichst effiziente Mischtechnik erreicht werden, die in dieser Arbeit durch eine Reaktionsführung in kleinsten Abmessungen verwirklicht werden soll. Im Hinblick auf die optimierte Vermischung zweier Phasen werden die Effizienz und das Potential eines Mikromischers der IMM GmbH Mainz untersucht, dessen Mischprinzip auf der Multilamination von Flüssigkeitslamellen und einer anschließenden Durchmischung durch Diffusion basiert. Mit Hilfe der Modellsubstanz Cholesterol werden relevante Formulierungsparameter identifiziert, die auf den Dispersitätsgrad (= Partikelgrößenverteilung, Verteilungsgrad) Einfluss nehmen.

Der Einsatz weiterer steroidaler Substanzen, deren Grundstruktur strukturell ähnlich ist, ermöglicht in Unabhängigkeit ihrer biopharmazeutischen Eigenschaften grundlegende Zusammenhänge zwischen deren physiko-chemischen Parametern Wasserlöslichkeit bzw. O/W-Verteilungskoeffizient und der Machbarkeit der Herstellung stabiler nanopartikulärer Substanzen aufzuzeigen. Resultierende Beziehungen könnten auf die Herstellung von Nanopartikeln strukturell anderer schwer wasserlöslicher Substanzen übertragen werden, besonders der der BCS-Klasse IV. Es werden Anwendungsmöglichkeiten nanopartikulärer Steroide (BCS-Klasse II) diskutiert, deren neu gewonnene Eigenschaften sowohl auf dem biopharmazeutischen als auch auf dem technologischen Wege zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit beitragen könnten.

Des Weiteren werden zur Einstellung einer engen Größenverteilung und der Verhinderung der Partikelagglomeration bereits bekannte Stabilisatoren und darüber hinaus neuartige Substanzen eingesetzt, die auf der Grundlage eines neuartigen Stabilisierungskonzeptes („Ähnlichkeitsprinzip“) zur Anwendung kommen. Das Konzept beruht auf der Erhöhung der Affinität eines amphiphilen Agens zur Grenzfläche, wobei die zu fällende Substanz Bestandteil des stabilisierenden Additivs ist.

Zur Charakterisierung der ‚NanoCompounds‘ werden sowohl bewährte Größenmessverfahren wie die Dynamische Lichtstreuung (*DLS*) und die Laserdiffraktometrie (*LD*) als auch eine neuartige Methode, die asymmetrische Fluss Feld-Fluss-Fraktionierung (*A4F*), gegenübergestellt. Zur Untermauerung der nicht abbildenden Größenmessverfahren und zur Charakterisierung der Partikelform werden elektronenmikroskopische Untersuchungen eingesetzt. Aussagen zum kristallinen und strukturellen Zustand werden durch den Einsatz röntgendiffraktometrischer und rheologischer Verfahren getroffen.

## 2 Theoretischer Hintergrund

---

### 2.1 Begriffsbestimmung ‚NanoCompounds‘ (‚NCs‘)

Ein viel versprechender Lösungsansatz zur Verbesserung der Lösungseigenschaften und der Bioverfügbarkeit praktisch wasserunlöslicher Stoffe ist deren Formulierung als nanopartikuläre Substanzen. Je nachdem, ob nanodisperse Systeme durch Zerkleinerung oder Ausfällung hergestellt werden, wird bisher zwischen drei verschiedenen Produktbezeichnungen unterschieden. Aus dem erstmals im Jahre 1992 von Liversidge angewandten Mahlverfahren, der so genannten NanoCrystals<sup>®</sup>-Technologie, gehen Partikel hervor, die als *Nanokristalle* bezeichnet werden [Liversidge et al., 1992]. Da hier nur ein geringer Teil der Partikelgrößen im Nanometerbereich liegt, ist der Begriff ‚Nano‘ in diesem Fall kaum gerechtfertigt. Nach R.H. Müller [Müller et al., 1999] werden als *Nanosuspensionen* stabilisierte nanopartikuläre Substanzen bezeichnet, die mittels Hochdruckhomogenisation, der sogenannten DissoCubes<sup>®</sup>-Technologie, hergestellt werden. Durch Ausfällung praktisch wasserunlöslicher Stoffe aus organischen Lösungen werden *Hydrosole* erhalten [Gassmann et al., 1994, Sucker, 1998]. Diese Bezeichnung wird sowohl auf nano- als auch auf mikro- oder höherpartikuläre Präzipitate angewendet.

An dieser Stelle wird der Begriff ‚*NanoCompounds‘ (‚NCs‘)* zur Bezeichnung reiner nanopartikulärer Systeme (10 bis 1000nm) ohne jegliche mikropartikuläre Kontamination eingeführt. Sie sind aus einem praktisch wasserunlöslichen Arzneistoff und den zugesetzten stabilisierenden Additiven zusammengesetzt (im wässrigen Milieu oder als Trocknungsprodukt). Die Bezeichnung ‚*NanoCompounds‘* wird hier unabhängig von der Herstellungsart, der Kristallinität, der Partikelform, des Aggregationszustandes und der stabilisierenden Additive dieser Systeme verwendet.



## 2.2 Eigenschaften nanopartikulärer Substanzen

Die Formulierung nanodisperser Wirkstoffe ist bisher vorwiegend auf die Optimierung der Bioverfügbarkeit praktisch wasserunlöslicher Arzneistoffe begründet. Die Bioverfügbarkeit wird als die Geschwindigkeit und das Ausmaß bezeichnet, mit der der Wirkstoff aus der Zubereitung absorbiert wird oder am Wirkort vorliegt [Voigt, 2000]. Die Verbesserung der Bioverfügbarkeit kann durch die Erhöhung der apparenten Löslichkeit, der Lösungsgeschwindigkeit und vor allem bei oralen und peroralen Anwendungen durch die erhöhte Adhäsionsneigung der ‚NanoCompounds‘ an mukosalen Oberflächen im Gastrointestinaltrakt erreicht werden.

Des Weiteren weisen experimentelle Daten darauf hin, dass nanopartikuläre Substanzen über das GALT (Gut-Associated-Lymphoid-Tissue)-System absorbiert werden können [Mathiowitz et al., 2000]. Die Möglichkeit der Sterilfiltration nanodisperser Wirkstoffformulierungen (< 200nm) ohne thermische Belastung ist gegenüber mikropartikulären Substanzen ein weiterer Vorteil [Konan et al., 2000].

Die Erhöhung der apparenten Löslichkeit und der Lösungsgeschwindigkeit sowie die adhäsiven Eigenschaften nanopartikulärer Substanzen werden in den nachfolgenden Abschnitten näher erläutert.

### 2.2.1 Erhöhung der apparenten Löslichkeit

#### 2.2.1.1 Definition: Löslichkeit/ Sättigungslöslichkeit

Die Löslichkeit bzw. Sättigungslöslichkeit  $C_s$  eines Stoffes ist die maximale Stoffmenge  $n$ , die in einem Lösungsmittel bei einer bestimmten Temperatur gelöst werden kann [Bauer et al., 1999].

An der Löslichkeitsgrenze bildet sich zwischen den in Lösung gehenden Molekülen und den am ungelösten Substanzanteil rekristallisierenden Molekülen ein thermodynamisches Gleichgewicht aus. Das chemische Potential des reinen Feststoffes  $\mu_s(s)$  [J] ist dann gleich dem chemischen Potential  $\mu_s(l)$  [J] der gelösten Substanz [Atkins, 2001] (Gl. 2.1, 2.2).

$$\mu_S(s) = \mu_S(l) + RT \ln x_S \quad (\text{Gl. 2.1})$$

$$\text{mit} \quad \ln x_S = \frac{n_S}{n_{LM}} \quad (\text{Gl. 2.2})$$

$x_S$  Anteil des gelösten Stoffes

$n_S$  Stoffmenge des gelösten Stoffes [mol]

$n_{LM}$  Stoffmenge des Lösungsmittels [mol]

Die Löslichkeit eines Stoffes kann durch die Temperatur, den Druck, den pH-Wert des Lösungsmittels, die Partikelgröße und -form und die Polymorphie der gelösten Substanz beeinflusst werden.

Das Arzneibuch unterteilt die Löslichkeiten von Substanzen folgendermaßen (DAB 2005, USP XXVIII):

- sehr löslich = löslich in < 1 Teil Lösungsmittel (LM)
- leicht löslich = löslich in 1-10 Teilen LM
- löslich = löslich in 10-30 Teilen LM
- wenig löslich = löslich in 30-100 Teilen LM
- schwer löslich = löslich in 100-1.000 Teilen LM
- sehr schwer löslich = löslich in 1.000-10.000 Teilen LM
- praktisch unlöslich = löslich in > 10.000 Teilen LM

### 2.2.1.2 Abhängigkeit der Löslichkeit von der Partikelgröße und der

#### Grenzflächenenergie

Die Sättigungslöslichkeit  $C_s$  ist laut Definition eine temperaturabhängige Stoffkonstante [Atkins, 2001; Bauer et al., 1999], die einen thermodynamisch stabilen Zustand beschreibt.