universität wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„In-vitro Charakterisierung von Hydrogelen mit mizellarem und mikronisiertem Triamcinolonacetonid“

verfasst von

Silvia Christine Weis

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt:	A 449
Studienrichtung lt. Studienblatt:	Diplomstudium Pharmazie
Betreut von:	Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor

DANKE…

Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor für die Bereitstellung des interessanten Diplomarbeitsthemas, die ausgezeichnete Betreuung während der gesamten Zeit, die positive Bestärkung, auch wenn die Ergebnisse einmal nicht wie gewünscht ausfielen, sowie für die schnelle Korrektur.

Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Michael Wirth für die hervorragende Unterstützung, sowie dafür, dass er mein Interesse für die Arbeit an unserem Institut überhaupt erst geweckt hat.

Mag. Elisabeth Engleder für die liebevolle Betreuung und die geduldige Beantwortung meiner unzähligen Fragen. Darüber hinaus für die vielen anregenden Gespräche und aufmunternden Worte, sowohl in fachlichen als auch persönlichen Angelegenheiten.

Clara, Yan, Lukas, Sophie, Michi und der gesamten Arbeitsgruppe für die herzliche Aufnahme und das angenehme, humorvolle Arbeitsklima, sowie viele lustige, gesellige Stunden am Institut und auch außerhalb der Arbeitszeiten.

Julia, dafür, dass sie mir bereitwillig ihr Wissen weitergegeben hat, um mir den Einstieg in die praktische Arbeit so einfach wie möglich zu machen.

Allen Freunden und Familienmitgliedern, die für den notwendigen Ausgleich sorgten und meine Studienzeit unvergesslich machen.

…sowie **meinem Papa**, dem ich viel zu verdanken habe und der seine Hand stets schützend über mich hält.

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG und PROBLEMSTELLUNG ..... - 7 -

2 GRUNDLAGEN ..... - 10 -

2.1 Thermoreversible Hydrogele ..... - 10 -

2.2 Glukokortikoide ..... - 11 -

2.2.1 Triamcinolonacetonid ..... - 12 -

3 MATERIALIEN ..... - 13 -

4 METHODEN ..... - 14 -

4.1 Quantifizierung von Triamcinolonacetonid ..... - 14 -

4.2 Größenbestimmung ..... - 15 -

4.2.1 Laserbeugung ..... - 15 -

4.2.2 Dynamic Light Scattering ..... - 16 -

4.2.2.1 Partikelgröße ..... - 16 -

4.2.2.2 Polydispersitätsindex ..... - 17 -

4.3 Verfahren zur Reduktion der Partikelgröße von mikronisiertem Triamcinolonacetonid ..... - 18 -

4.3.1 Zerkleinerung mittels Luftstrahlmühle ..... - 18 -

4.3.2 Hochdruckhomogenisation ..... - 19 -

4.3.3 Zerkleinerung mit Hilfe von Ultraschall ..... - 21 -

4.3.4 Mikronisierung durch Präzipitation ..... - 22 -

4.3.5 Herstellung von Triamcinolonacetonid-Mizellen mittels „thin-layer-method“ ..... - 23 -

4.4 Stabilitätsprüfung ..... - 23 -

4.5 In-vitro Freisetzungsmodell ..... - 24 -

4.5.1 Herstellung der Hydrogele ..... - 24 -

4.5.2 Sättigungskonzentration und Lösungsgeschwindigkeit ..... - 24 -

4.5.3 In-vitro Freisetzungsstudien ..... - 25 -

4.6 Rheologie ..... - 26 -

4.6.1 Amplituden-Sweep ..... - 26 -

4.6.2 Frequenz-Sweep ..... - 27 -

4.6.3 Temperaturrampe ..... - 27 -

4.6.4 Oszillations – Rotations – Oszillations Test ..... - 27 -

5 ERGEBNISSE und DISKUSSION ..... - 29 -

5.1 Verfahren zur Reduktion der Partikelgröße von mikronisiertem Triamcinolonacetonid ..... - 29 -

5.1.1 Zerkleinerung mittels Luftstrahlmühle ..... - 29 -

5.1.2 Hochdruckhomogenisation ..... - 30 -

5.1.3 Zerkleinerung mit Hilfe von Ultraschall ..... - 31 -

5.1.4 Mikronisierung durch Präzipitation ..... - 33 -

5.1.5 Herstellung von Triamcinolonacetonid-Mizellen mittels „thin-layer-method“ ..... - 37 -

5.1.6 Langzeit-Stabilität der Mizellen ..... - 40 -

5.2 Stabilitätsprüfung der Triamcinolonacetonid Partikel ..... - 42 -

5.3 In-vitro Freisetzungsstudien ..... - 43 -

5.3.1 Sättigungskonzentration und Lösungsgeschwindigkeit ..... - 43 -

5.3.2 In-vitro Freisetzungsstudien ..... - 45 -

5.4 Rheologie ..... - 48 -

5.4.1 Amplituden-Sweep ..... - 48 -

5.4.2 Frequenz-Sweep ..... - 49 -

5.4.3 Temperaturprogramme ..... - 49 -

5.4.4 Oszillations – Rotations – Oszillations Test ..... - 50 -

6 ZUSAMMENFASSUNG ..... - 53 -

7 SUMMARY ..... - 55 -

8 LITERATURVERZEICHNIS ..... - 57 -

9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS ..... - 59 -

10 LEBENSLAUF ..... - 61 -

1 EINLEITUNG und PROBLEMSTELLUNG

Heutzutage nehmen Gehörverlust sowie Erkrankungen und Einschränkungen des Gehörs durch hohe Lärmpegel und andere Umweltfaktoren stetig zu. Nicht nur exogene Faktoren oder ototoxische Pharmaka besitzen ein schädigendes Potential für dieses Sinnesorgan, sondern auch genetische Defekte können eine Fehlfunktion des Hörsinnes verursachen. Angeborene Schwerhörigkeit oder Taubheit kann auf nicht funktionsfähigen Haarzellen im Innenohr beruhen, aber auch eine Fehlübertragung des Schalls über die Knochenbrücke im Mittelohr oder eine mangelnde Funktion der Hörnerven können die Ursache darstellen. Haarzellen befinden sich im Innenohr am eigentlichen Hörorgan – dem Corti Organ. Diese sind dafür verantwortlich, Schallwellen, die auf die Ohrmuschel treffen und anschließend über die Knochenbrücke des Mittelohrs an das flüssigkeitsgefüllte Innenohr weitergeleitet werden, in elektrische Impulse umzuwandeln, um schließlich den Hörnerv zu erregen [2]. Bei nicht-funktionsfähigen Haarzellen kann durch Implantation von Elektroden [2] direkt in die Cochlea die Funktion der Haarzellen teilweise ersetzt und eine angeborene Innenohrschwerhörigkeit ausgeglichen werden. Den Eintritt der Elektroden in die Cochlea ermöglicht das mit einer Membran verschlossene runde Fenster, welches zusätzlich zum ovalen Fenster einen permeablen Übergang vom Mittel- zum Innenohr bildet [6]. Eine andere Methode, bei welcher die Elektrode durch die knöcherne Kapsel in die Schnecke eingebracht wird, ist die Cochleostomie. Bei beiden Methoden kommt es jedoch am Eintrittsort zu Fremdkörperreaktionen und Entzündungen, welche zurzeit systemisch mit Glukokortikoiden therapiert werden. Auf Grund anatomischer Gegebenheit der geringen Durchblutung der Cochlea sind die Erfolge dieser herkömmlichen Pharmakotherapie limitiert, da therapeutisch relevante Wirkstoffspiegel in der Innenohrflüssigkeit, der Perilymphe, kaum erzielt werden können. Zusätzlich werden bei systemischer Behandlung meist über einen längeren Zeitraum hohe Wirkstoffdosen verabreicht, die mit zahlreichen Nebenwirkungen verbunden sind. Aus diesen Gründen könnte eine lokale Therapie - direkt im Mittelohr („intratympanal“) - Verbesserungen ergeben und auch zu einer erhöhten Verträglichkeit für die Patienten führen. Der Erfolg einer lokalen, intratympanalen

Therapie kann jedoch durch die Ohrtrompete eingeschränkt werden, die direkt unterhalb des runden Fensters einmündet und durch die intratympanal verabreichte Lösungen und Suspensionen rasch abfließen können. Dies führt zu einer geringen Kontaktzeit des Wirkstoffes mit der Rund-Fenstermembran und damit auch zu einer kurzzeitigen Diffusion des Glukokortikoids durch die Membran. Daher sind für eine optimale, über Tage anhaltende Wirkung eine längere Verweildauer des Wirkstoffes an der Rund-Fenstermembran sowie ein Vermeiden des Wirkstoffverlustes durch die Eustachische Röhre notwendig. Um therapeutisch relevante Wirkstoffspiegel im Innenohr zu erreichen und anatomischen Gegebenheiten Rechnung zu tragen, sind Glukokortikoid-haltige thermoreversible Hydrogele, die bei Raumtemperatur flüssig sind und bei Körpertemperatur ein Gel bilden, eine vielversprechende Alternative. Bei Einsatz solcher Hydrogele ist es notwendig, die Konzentration so zu wählen, dass die Gelbildung innerhalb kürzester Zeit nach Applikation erfolgt [2], um einerseits die Anästhesiedauer während der Cochlea Implantation zu verkürzen und andererseits bei ambulanter Applikation eine allzu lange unbequeme Seitenlagerung des Patienten bis zur Gelbildung vermeiden zu können. In einer früheren Arbeit [2] erwies sich eine Formulierung aus 20% Poloxamer 407 (POX 407) in PBS als ideal, um die Voraussetzungen von rascher Gelbildung und Applizierbarkeit bei Raumtemperatur zu gewährleisten.

Therapeutisch relevante Wirkstoffkonzentrationen im Innenohr werden allerdings nicht nur durch eine verlängerte Verweildauer des Wirkstoffes an der Rund-Fenstermembran sondern auch durch erhöhte Diffusion des Wirkstoffes durch die Membran erreicht. Aus der Literatur ist bekannt [3], dass Partikel mit einem Durchmesser <150 nm die Rund-Fenstermembran permeiren können.

Das Glukokortikoid Triamcinolonacetonid (TAAc) wurde in der vorherigen Arbeit [2] bereits in thermoreversible, auf POX 407 basierende Hydrogele eingebaut und rheologisch charakterisiert. Zusätzlich wurden die Otokompatibilität von TAAc sowie dessen otoprotektive Effekte, die zum Erhalt des Restgehörs führen, nachgewiesen [9].

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die weitere Optimierung aber auch die Erhöhung der TAAc-Verfügbarkeit aus Hydrogelen zur intratympanalen Applikation. Ausgehend von bereits bekannten Parametern sollte die Partikelgröße von TAAc mit unterschiedlichen Methoden reduziert und die

Auswirkung auf die Gelbildung untersucht werden. Weiters soll an Hand von in-vitro Freisetzungsstudien der Einfluss der Partikelgröße auf Löslichkeit, Sättigungskonzentration und Diffusionsrate evaluiert werden. Zusätzlich soll TAAc in POX 407-Mizellen eingebaut werden, um eine möglichst kleine und mit dem Hydrogel verträgliche Transportform des Glukokortikoids zu erzielen.

2 GRUNDLAGEN

2.1 Thermoreversible Hydrogele

Hydrogele auf Basis des physiologisch verträglichen und von der FDA zugelassenen POX 407 erwiesen sich bereits in früheren Untersuchungen als geeignetes System zur lokalen intratympanalen Applikation [5]. Bei dem eingesetzten POX 407 handelt es sich um ein Tri-Block-Copolymer, das aus einem zentralen hydrophoben Polypropylenoxid-Teil sowie zwei endständigen hydrophilen Polyethylenoxid-Ketten Anteilen besteht. Bei niedrigen Temperaturen liegt POX 407 in Form von Monomeren vor, die jedoch bei Erwärmung durch Dehydratation der hydrophoben Strukturen kumulieren und Mizellen bilden. Bei weiterer Erwärmung aggregieren die Mizellen und es bildet sich eine kubische Gelstruktur. Dieser Übergang wird durch den Gelbildungspunkt beschrieben, jenen Zeitpunkt, zu dem die Flüssigkeit geliert [1].

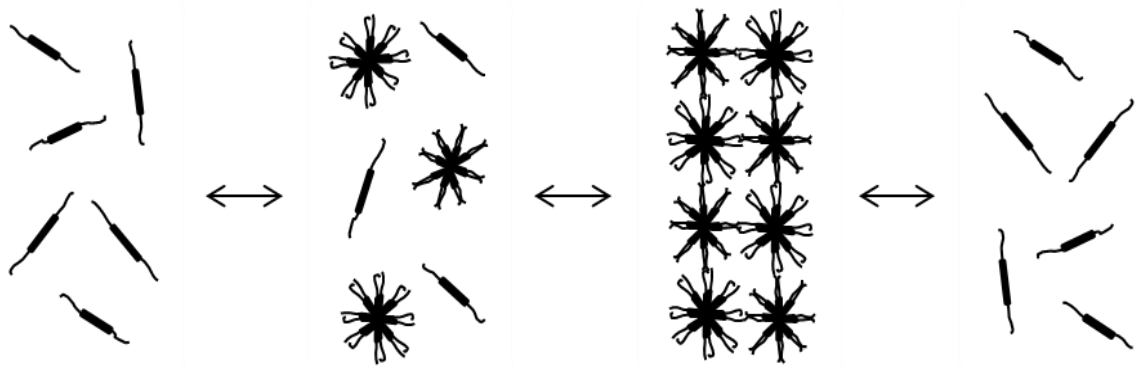

***Abb. 1**: Schematische Darstellung der Thermoreversibilität eines POX 407 Hydrogels. Zunächst kommt es durch Temperaturerhöhung zur Kumulation der Monomere zu Mizellen, dann zur Ausbildung der geordneten Gelstruktur, welche sich bei erneuter Abkühlung wieder vollständig auflöst (rechts).*

Der Vorteil dieser thermoreversiblen Gelbildung besteht darin, dass das spätere Hydrogel im flüssigen Zustand einfach appliziert werden kann und erst an der Rund-Fenstermembran das Gel entsteht. Somit kann ein Abfließen des Wirkstoffes durch die Eustachische Röhre verhindert und die Verweildauer des

Wirkstoffes an der Rund-Fenstermembran verlängert werden. Da die gebildeten Mizellen einen hydrophoben Kern und eine hydrophile Außenhülle besitzen, können zusätzlich in den hydrophoben Kern lipophile Wirkstoffe eingelagert werden. Dies kann zu einer erhöhten Löslichkeit sowie Diffusionsrate von hydrophoben Wirkstoffen durch die Rund-Fenstermembran beitragen.
Um eine Verabreichbarkeit des Hydrogels bei Raumtemperatur sowie eine relativ kurze Gelbildungszeit bei 37°C zu gewährleisten, wurde die POX 407 Konzentration mit 20% festgelegt [2].

2.2 Glukokortikoide

Die Arzneimittelgruppe der Glukokortikoide leitet sich strukturell von den Hormonen der Nebenniere ab, welche im Körper vielfältige physiologische Wirkungen besitzen. Bei der Therapie mit diesen Steroidhormonen wird zwischen Substitutionstherapie bei Nebennierenrinden-Insuffizienz und Pharmakotherapie unterschieden [4, 7, 8]. Bei der Pharmakotherapie werden Glukokortikoide als Antiallergika, Antipholgistika oder Immunsuppressiva eingesetzt, wobei bei der Behandlung von Innenohrerkrankungen oder Traumata nach Cochlea Implantation die letzten beiden Wirkungen von besonderer Bedeutung sind. Während im Rahmen einer Substitutionstherapie in erster Linie das physiologische Hormon Hydrocortison zum Einsatz kommt, werden im Rahmen einer Pharmakotherapie vorwiegend partialsynthetische Abwandlungen der natürlichen Hormone eingesetzt. Durch partielle Veränderungen der chemischen Struktur kann eine deutliche Steigerung der Wirksamkeit erreicht werden [4, 7, 8].
Für Glukokortikoide existiert ein spezifischer Rezeptor, der in allen Zellen des Organismus vorhanden ist. Daher kann durch chemische Modifikation die erwünschte Wirkung der aktiven Verbindung nur bedingt von den unerwünschten Nebenwirkungen entkoppelt werden. Diese nehmen mit steigender Dosis und Dauer der Therapie zu, weshalb das oberste Ziel sein muss, die Behandlungsdauer zu verkürzen und die Dosierung zu reduzieren. Typische Nebenwirkungen von Glukokortikoiden lassen sich unter dem Begriff des Cushing-Syndroms zusammenfassen. Hierbei kommt es zu Störungen des Kohlenhydrat-, Fett- und Eiweißstoffwechsels, Entgleisen des Wasser- und

Elektrolythaushaltes, Kreislaufproblemen sowie psychischen Störungen. Die resultierenden Symptome sind Gewichtszunahme, Hypertonie, Hyperglykämie bis zu Manifestation eines Diabetes Mellitus, Osteoporose, Thrombosen und Embolien, charakteristische Gesichtsrötung sowie seltener Augenschäden wie Glaukom und Katarakt. In Anbetracht dieser Nebenwirkungen sollte für eine Therapie am Innenohr, das wie schon erwähnt nur gering durchblutet ist und somit lange systemische Therapiedauer sowie hohe Wirkstoffdosen erfordert, alternativ eine lokale Therapie zur Verfügung stehen [4, 7, 8].

2.2.1 Triamcinolonacetonid

TAAc ist ein halogeniertes Glukokortikoid-Derivat mit mittellanger Wirkdauer, bei dem durch Einführung verschiedener Substituenten am Steroidgrundgerüst eine deutliche Wirkungssteigerung gegenüber dem natürlich vorkommenden Vertreter Cortisol erreicht werden konnte. Die Bindungsaffinität zum Glukokortikoidrezeptor konnte im Vergleich zu Cortisol um das 16-fache gesteigert werden und seine glukokortikoide Potenz ist sechsmal höher [7, 8].

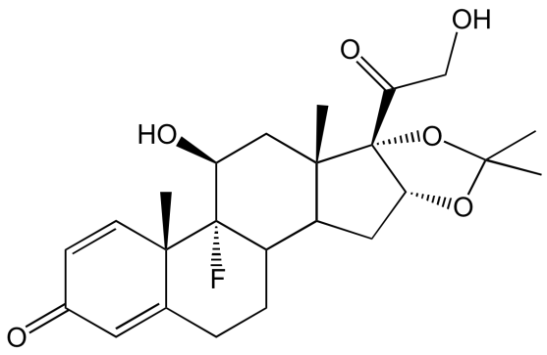

Abb. 2: *Strukturformel von Triamcinolonacetonid.*

TAAc kann in der Therapie von Innenohrerkrankungen eingesetzt werden, da es otoprotektiv wirkt und dadurch Haarzellen, die noch funktionsfähig sind, nicht beeinflusst. In einer Studie an Meerschweinchen konnte ein ototoxischer Effekt bei intratympanaler Applikation von TAAc ausgeschlossen werden [9].

3 MATERIALIEN

Triamcinolonacetonid mikronisiert (TAAc)

Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate Buffered Saline, PBS), 10 mM pH 7,4

KH_2PO_4	0,26 g
Na_2HPO_4 * 2 H_2O	1,44 g
NaCl	8,71 g
Aqua dest.	ad 1000,00 ml

Poloxamer 407 (Pluronic® F-127 Prill, Kolliphor® P-407, POX 407)

Artifizielle Perilymphe (AP)

NaCl	1370 mM	80,06 g
KCl	50 mM	3,73 g
$CaCl_2$	20 mM	2,23 g
$MgCl_2$ * 6 H_2O	10 mM	2,03 g
$NaHCO_3$	10 mM	0,84 g
Aqua bidest.		ad 1000,00 ml

Wässrige Ammoniumacetat-Lösung (NH_4Ac-H_2O) 2mM pH 3,0

NH_4-Acetat	0,15 g
Aqua bidest.	ad 1000,00 ml

Auf pH 3,0 gestellt mit konzentrierter Ameisensäure.

Acetonitril (ACN)

Ethylacetat (EtAc)

Aceton

4 METHODEN

4.1 Quantifizierung von Triamcinolonacetonid

Die Quantifizierung von TAAc erfolgte mittels HPLC-DAD (High Performance Liquid Chromatography; Diode Array Detector). Das verwendete Agilent 1100 System (Agilent Technologies, Palo Alto, USA), besteht aus Vakuum-Entgaser, quartärer Pumpe, einem Autosampler, einem auf 25°C thermostatisierten Säulen-Ofen sowie einem Dioden Array Detektor (DAD) und wird durch die Agilent ChemStation Software [2] gesteuert. Ein Aliquot der Probelösung von 20 µl wird durch eine Chromatographie-Säule (Acclaim® 120 C18 2,1 mm x 150 mm, 3 µm, Thermo Fisher Scientific, Wien, Österreich) aufgetrennt und anschließend TAAc bei einer Absorption von 240 nm detektiert. Als mobile Phase wird eine Mischung aus Acetonitril (60 %, V/V; ACN) und einer 2mM wässrigen Ammoniumacetat-Lösung (40%, V/V; NH_4Ac-H_2O) verwendet. Bei einer Flussrate von 0,5 ml/Min und einer Retentionszeit des TAAc von 1,25 Minuten beträgt die Analysendauer 5 Minuten. Die Detektionsgrenze der Methode (LLOD; Lower Limit of Detection) wurde mit 0,1 µg/ml und die Quantifizierungsgrenze (LLOQ; Lower Limit of Quantification) bei 1 µg/ml bestimmt.

Es wurde nach dieser Methode eine Eichgerade für TAAc im Bereich von 1-100 µg/ml in mobiler Phase (Abb. 3) erstellt. Das Bestimmtheitsmaß (R) beträgt 1.

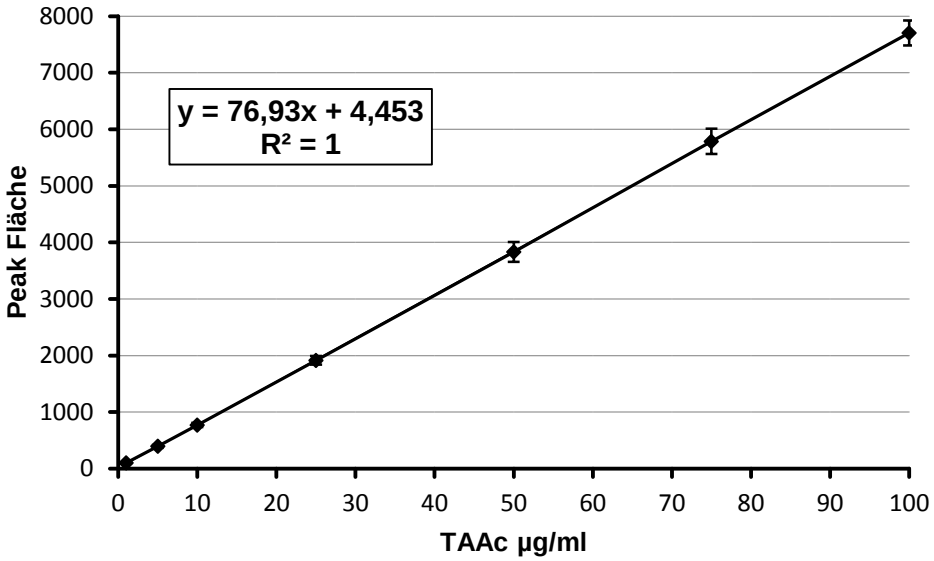

Abb. 3: *Eichgerade TAAc in ACN/NH_4-Ac-H_2O (60+40, V/V).*

4.2 Größenbestimmung

Im Rahmen dieser Arbeit war die unterschiedliche Größe der eingesetzten Wirkstoffpartikel von zentraler Bedeutung. Die Bestimmung der durchschnittlichen Korngröße von verwendeten TAAc-Chargen erfolgte in Abhängigkeit des erwarteten Durchmessers durch zwei unterschiedliche Methoden.

4.2.1 Laserbeugung

Größere Partikel wurden mit einem Laserbeugungs-Partikelgrößenmessgerät (Mastersizer 3000, Malvern Instruments LTD., Worcestershire, UK) analysiert, dessen Messbereich 200 nm bis 3200 µm umfasst.

Die Probelösung wird in der **Probendispergiereinheit** mit einem geeigneten Lösungsmittel gemischt und für eine reproduzierbare Analyse die Partikel-Konzentration an Hand der Trübungsintensität („obscuration“) eingestellt. Zusätzliches Rühren sowie der Einsatz von Ultraschall gewährleisten eine stabile Dispergierung im Analysenmedium, das in der Folge in den optischen Messbereich gelangt. Zur Analyse von Aerosolen kann eine Trockendispergiereinheit verwendet werden.

Nach der Dispergierung durchläuft die Probe die **optische Bank,** in der sich die eigentliche Messzelle befindet. Ein die Probelösung querender Laserstrahl wird durch das Auftreffen auf die Partikel gestreut und die Intensität der in verschiedene Winkel gestreuten Lichtstrahlen durch Detektoren analysiert.
Das Messsystem wird durch die **Geräte-Software** (Mastersizer 3000, Version 2.01) gesteuert, wodurch auch die Beugungsdaten berechnet werden. Anhand der Intensität des Streulichtes und des erzeugten Beugungsmusters wird die Partikelgrößenverteilung berechnet [11, 12].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Proben in Aqua dest. gemessen und in der Dispergiereinheit kontinuierlich bei 1600 Upm gerührt. Die Messungen erfolgten bei 25°C und es wurden jeweils fünf Bestimmungen durchgeführt. Die eingebrachten Probensuspensionen wurden unmittelbar vor der Bestimmung 10 Minuten im Ultraschallbad (Bandelin SONOREX^{TM} Digital 10 P, Bandelin Electronics, Berlin, Deutschland) bei Raumtemperatur homogenisiert.

4.2.2 Dynamic Light Scattering

Partikel im Nanometer-Bereich wurden mittels Zetasizer (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments LTD., Worcestershire, UK) durch dynamische Licht Streuung (DLS) analysiert. Zusätzlich ermöglicht der Nano ZS auch die Bestimmung des Zetapotentials und des Molekulargewichts, jedoch waren für diese Arbeit nur die Bestimmung der Größe und des Polydispersitätsindexes (PDI) relevant. Der Messbereich des Nano ZS für den Partikeldurchmesser liegt bei 0,3 nm – 10 µm [13, 14].

4.2.2.1 Partikelgröße

Die Messung der Partikelgröße mittels DLS basiert auf der Brown‘schen Molekularbewegung von Partikeln. Diese beschreibt jene zufällige Bewegung von Partikeln, die durch das Zusammenstoßen mit Lösungsmittelmolekülen entstehen. Wird die Probe mit einem Laser bestrahlt und trifft dieser auf einen Partikel, so tritt eine Streuung des Lichtstrahles auf. Bei gleichzeitiger

Bestrahlung von mehreren Partikeln kommt es zu Interferenzen, das heißt die Streulichtwellen werden verstärkt, abgeschwächt oder gelöscht. Kleine Partikel besitzen eine raschere Brown´sche Molekularbewegung, wodurch eine schnellere zeitliche Änderung der Interferenzen auftritt als bei größeren. Bei letzteren wird sich durch die geringe Positionsänderung das Interferenzbild weniger von jenem der vorangegangenen Messung unterscheiden. Ein Korrelator vergleicht die zeitliche Änderung der Streulichtintensitäten und über eine Korrelationsfunktion und die Stokes-Einstein-Gleichung wird daraus der Partikeldurchmesser berechnet.

Auf Grund der beschriebenen Grundlagen der DLS sind Viskosität der Probe und Temperatur Parameter, die das Messergebnis beeinflussen. Eine erhöhte Viskosität bewirkt eine langsamere Bewegung der Partikel, sodass ein größerer Partikeldurchmesser vorgetäuscht wird. Die Temperatur ist deshalb ein bedeutsamer Parameter, da sowohl die Brown'sche Bewegung als auch die Viskosität von ihr abhängig sind. Die Detektion des Streulichtes kann in verschiedenen Winkeln erfolgen, im Falle des Nano ZS beträgt der Streuwinkel 173° [13, 15, 16].

4.2.2.2 Polydispersitätsindex

Der Polydispersitätsindex (PDI) ist ein Maß für die Größenverteilung der Teilchen in einer Suspension. Ein Wert von 0 beschreibt eine monodisperse Probe bei der im Idealfall alle Partikel gleich groß sind. Ein PDI von 0,1 – 0,2 charakterisiert eine polydisperse Suspension mit einer relativ engen Partikelgrößenverteilung. Je höher der Wert, desto breiter ist die Verteilung, wobei bei Werten über 0,5 eine für praktische Anwendungen zu breite polydisperse Verteilung vorliegt [13, 15, 16].

Alle Messungen im Rahmen dieser Arbeit erfolgten in Einweg-Kunststoffküvetten aus Polymethylmethacrylat, die durch ihre nach unten hin verjüngte Form das Messen von kleinen Volumina ermöglichen. Die Bestimmungen wurden bei 25°C nach einer Ausgleichszeit von 2 Minuten durchgeführt. Wenn nicht anders angeführt, wurden die Proben in wässrigem Medium mit 0,1% POX 407 zur Stabilisierung gemessen.

4.3 Verfahren zur Reduktion der Partikelgröße von mikronisiertem Triamcinolonacetonid

Um den Einfluss der Partikelgröße auf die Löslichkeit von TAAc zu untersuchen sollte durch verschiedene Methoden der Partikeldurchmesser des Wirkstoffes verringert werden. In allen Verfahren wurde als Ausgangsmaterial TAAc in mikronisierter Form eingesetzt. Dessen durchschnittliche Korngröße betrug 180 µm und wurde zuvor mit dem Mastersizer bestimmt.

4.3.1 Zerkleinerung mittels Luftstrahlmühle

TAAc wurde im Rahmen dieser Arbeit mit einer Luftstrahlmühle (Jet Mill, Abb. 4) zerkleinert. Diese Methode wird in der pharmazeutischen Technologie häufig zur Feinst-Zerkleinerung von Arzneistoffen eingesetzt. Das Prinzip der Jet Mill beruht auf Trockenzerkleinerung (Mahlen), wobei die Zerkleinerung durch Aufprall und Reibung erfolgt und Feinheitsgrade von 500 nm bis 1 µm erzielbar sind. Das Mahlgut wird durch zwei entgegengesetzte Luftströme in die Mühle eingebracht, wobei durch das Aufeinanderprallen der Partikel eine Zerkleinerung bewirkt wird. Anschließend werden kleinere von größeren Partikel durch Zentrifugalkraft getrennt und das feinst gemahlene Gut in der Mitte durch querströmende Luft ausgetragen [17, 18].

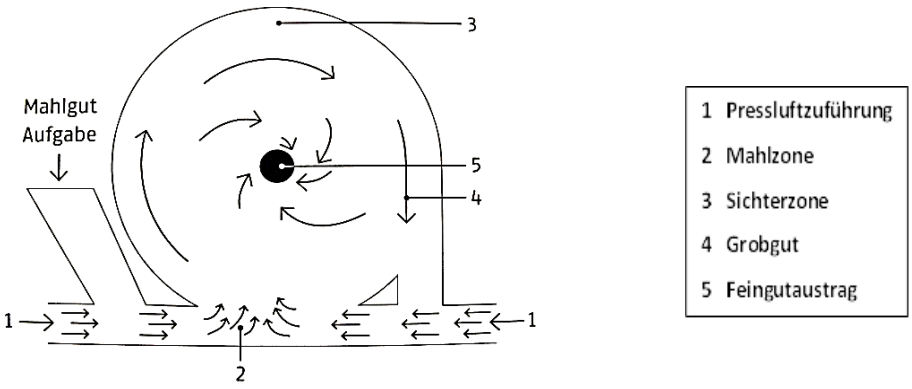

Abb. 4: *Schematische Darstellung einer Luftstrahlmühle (Quelle: Pharmazeutische Technologie [18] Abb. 5.1. Seite 176).*

Unmittelbar nach dem Mahlvorgang wurde die Partikelgröße des zerkleinerten Wirkstoffes mit dem Zetasizer bestimmt und in weiterer Folge zur Überprüfung der Stabilität die durchschnittliche Korngröße der erhaltenen Chargen sowie des mikronisierten Arzneistoffes mit dem Mastersizer nach definierten Lagerungszeiten bestimmt.

4.3.2 Hochdruckhomogenisation

Um eine weitere Zerkleinerung sowie eine möglichst homogene Partikelgrößenverteilung zu erreichen, wurde TAAc einer Hochdruckhomogenisation unterzogen.

Unter Homogenisieren versteht man allgemein eine Mischoperation, bei der es gleichzeitig zur intensiven Durchmischung aller Komponenten sowie zu einer Zerkleinerung der Einzelpartikel kommt. Bei der Hochdruckhomogenisation wird zusätzlich Druck angewendet, wobei durch auftretende Scherkräfte und Drucksprünge eine weitere signifikante Zerkleinerung erreicht wird. Der Hochdruckhomogenisator besteht aus einer Hochdruck-Kolbenpumpe und einem nachgeschalteten Entspannungsventil (Abb. 5). Letzteres besteht aus einem festen Ventilsitz und einem verstellbaren Ventil, sodass die Spaltverhältnisse frei wählbar sind. Der Produktaustritt wird durch einen äußeren Prallring begrenzt. Die Pumpe presst das Produkt mit Druck durch das Homogenisierungsventil, alternativ kann es auch durch eine Membran gedrückt werden.

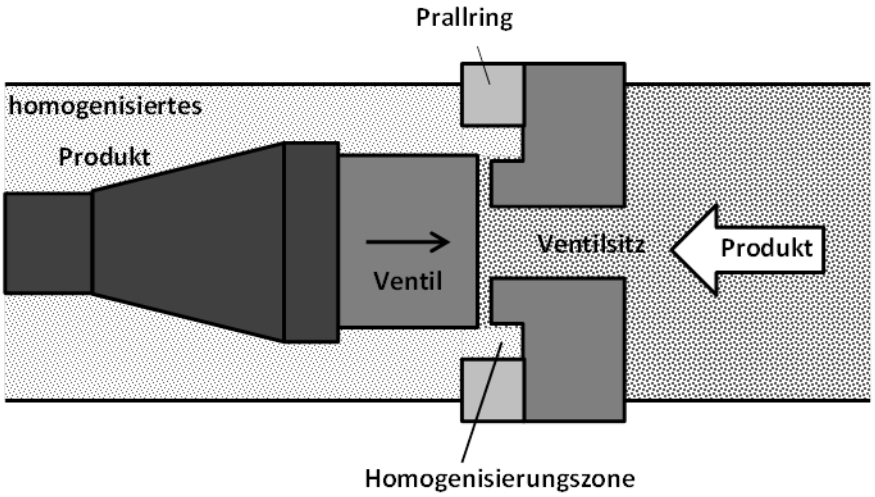

Abb. 5: *Schematische Darstellung des Homogenisierungsventils eines Hochdruckhomogenisators im Querschnitt. Die zu homogenisierende Suspension wird von rechts nach links durch das Ventil gepresst, das verstellbare Ventil übt Gegendruck aus.*

Die Zerkleinerung im Homogenisierungsspalt beruht zum einen auf einwirkenden Prall- und Scherkräften und zum anderen auf Kavitation im Entspannungsraum nach dem Ventilspalt. Darunter versteht man die Bildung von Dampfblasen beim Eintritt in den druckentspannten Raum beziehungsweise das anschließende Implodieren und Zerplatzen der Bläschen. Im Homogenisierungsventilspalt entstehen durch die starke Absenkung des Druckes an den zahlreich vorhandenen Kavitationskeimen Gasblasen, da hier der Dampfdruck der kontinuierlichen Phase der eingebrachten Probe unterschritten wird. Steigt in der Folge der Druck wieder, so kommt es zur Implosion und die Blasen fallen in sich zusammen. Dabei setzen diese energiereiche Stoßwellen frei, welche hauptsächlich für die Zerkleinerung verantwortlich gemacht werden. Diese Energie wird genutzt, um neue Grenzflächen zu erzeugen. Daher kann das Ausmaß der Zerkleinerung durch gezielte Regelung der Kavitation, die Intensität und Dauer des Blasenwachstums sowie den Ort der Implosion betrifft, beeinflusst werden.

Es besteht eine Vielzahl von Einflussgrößen auf den Wirkungsgrad der Homogenisation. So sind einerseits die Produkteigenschaften wie Viskosität, Dichte oder Ausgangspartikelgröße sowie andererseits der Aufbau des

Homogenisierungsventils wie Durchmesser, Einlassradius, Ventillänge und Spaltbreite sowie Prozessparameter (Homogenisierungsdruck, Temperatur, Anzahl der Passagen,…) von Bedeutung [18, 19, 20, 21].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Suspensionen von TAAc in wässrigen POX 407-Lösungen in bis zu acht Zyklen unter Drücken von 2 – 6 bar durch einen Homogenisator (EmulsiFlex® - C3, Avestin, Mannheim, Deutschland) geleitet. Nach jedem Zyklus wurde die Teilchengröße im Mastersizer beziehungsweise Zetasizer bestimmt und die Probe so lange durch den Homogenisator geleitet, bis die Partikelgröße konstant blieb.
Dies wurde mit Suspensionen von mikronisiertem TAAc in 5% wässriger POX 407-Lösung und von bereits gemahlenem Wirkstoff in Wasser, sowie in 1%, 2% und 5% wässrigen POX 407-Lösungen durchgeführt. Alle verwendeten Suspensionen enthielten 0,5 mg TAAc/ml oder 1,0 mg TAAc/ml. Der POX 407-Zusatz diente zur Stabilisierung der Suspensionen.

4.3.3 Zerkleinerung mit Hilfe von Ultraschall

Als weitere Methode zur Zerkleinerung der Wirkstoffpartikel wurde Ultraschall angewandt. Suspensionen von TAAc in wässrigen POX 407-Lösungen wurden mit einer Sonotrode (Ultraschallstab Sonoplus HD 70, Spitze MS 73, Bandelin Electronics, Berlin, Deutschland) bei einer Intensität von 40% bei Raumtemperatur beschallt. In kurzen Zeitabständen wurden währenddessen Proben gezogen und nach Verdünnen mit wässriger POX 407-Lösung im Zetasizer die Partikelgrößen bestimmt. Der Vorgang wurde jeweils so oft wiederholt, bis der Partikeldurchmesser ein Minimum erreichte. Sowohl Proben ohne Vorbehandlung als auch durch Hochdruck homogenisierte wurden beschallt.
Die Wirkstoffsuspensionen enthielten gemahlenes TAAc in einer Konzentration von 0,5 mg/ml 0,1% wässrige POX 407-Lösung und wurden vor der Ultraschall-Behandlung 1:20 mit einer 0,1% wässrigen POX 407-Lösung auf ein Endvolumen von 5,0 ml verdünnt.

4.3.4 Mikronisierung durch Präzipitation

Eine weitere Methode, um den Partikeldurchmesser von TAAc zu reduzieren, besteht in einer Mikrofällung. Dabei wird der gelöste Wirkstoff durch langsames Abdampfen des Lösungsmittels in wässriger POX 407-Lösung ausgefällt.

Dazu wurde zunächst die Löslichkeit von TAAc in verschiedenen flüchtigen organischen Lösungsmitteln bestimmt. Letztlich wurden Ethylacetat wegen seiner biologischen Verträglichkeit in Spuren und Aceton wegen seiner guten Lösungseigenschaften für den Wirkstoff gewählt.

Zunächst wurden im Ultraschallbad Lösungen von 2,5 mg TAAc/ml beziehungsweise 5,0 mg TAAc/ml jeweiligem Lösungsmittel hergestellt. In einer Kristallisierschale wurde die jeweilige wässrige POX 407-Lösung vorgelegt und durch einen Magnetrührer in Bewegung gehalten. Die Wirkstofflösung wurde mit einer Tropfgeschwindigkeit von etwa 10 ml/Min zugesetzt und mit einer Sonotrode beschallt. Dies erfolgte bei Raumtemperatur und unterschiedlichen Schall-Intensitäten von 40% bis 80%. Unter konstantem Rühren wurde dann bei Raumtemperatur das Lösungsmittel langsam abgedampft, um die Wirkstoffpartikel in der wässrigen POX 407-Lösung gezielt auszufällen. Die Größe dieser Teilchen wurde im Zetasizer bestimmt und bei ausgewählten Proben deren Stabilität untersucht, indem diese bei Raumtemperatur gelagert und nach einigen Tagen erneut die Partikelgröße bestimmt wurde.

Neben den Lösungsmitteln und Wirkstoffkonzentration wurden auch die Ansatzverhältnisse variiert. Zusätzlich wurde der Einfluss unterschiedlich konzentrierter wässriger POX 407-Lösungen im Bereich von 0,1 – 10,0% sowie einer Erhöhung der Temperatur auf 50°C untersucht. Als Vergleich diente ein Mikronisat von TAAc aus Wasser.

4.3.5 Herstellung von Triamcinolonacetonid-Mizellen mittels „thin-layer-method“

Um eine weitere Verkleinerung der Wirkstoffpartikel und damit eine Vergrößerung ihrer spezifischen Oberfläche zu erreichen, sollte TAAc in mizellare Strukturen eingebaut werden.
Gemeinsam mit dem Tensid POX 407 wurde der Wirkstoff in Ethylacetat gelöst und die Lösung am Rotavapor unter vermindertem Druck langsam und vollständig abgedampft, so dass sich ein dünner trockener Film („thin-layer“) an der Glaswand im bildete. Dieser wurde anschließend mit warmen Wasser (37°C) und dem Einsatz einer Sonotrode (Intensität 40%; 3 Min) redispergiert. Um den unverkapselten Anteil von TAAc abzutrennen wurde die Probe anschließend bei 5000 Upm und 37°C fünf Minuten zentrifugiert (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und der Überstand in ein neues Gefäß überführt.

Die erhaltenen Überstände und Rückstände wurden lyophilisiert (Gefriertrockner ALPHA 1-4, Christ, Osterode, Deutschland; Vakuumpumpe Duo 005 M, Pfeiffer Vacuum, Asslar, Deutschland) und jeweils vor und nach der Gefriertrocknung die Größe der Mizellen mittels Zetasizer sowie deren Wirkstoffgehalt mit HPLC-DAD bestimmt. Die Stabilität der Mizellen in 0,1% wässriger POX 407-Lösung bei 4°C, Raumtemperatur und 37°C wurde über mehrere Wochen untersucht.
Diese Methode wurde auch mit verschiedenen molaren Ansatzverhältnissen von TAAc zu POX 407 durchgeführt.

4.4 Stabilitätsprüfung

Da der lipophile Wirkstoff TAAc bei längerer Lagerung Aggregate bildet, wurde nach einer geeigneten Methode gesucht, die Partikel in wässriger POX 407-Lösung zu stabilisieren.

Dazu wurden gemahlene TAAc-Wirkstoffpartikel zunächst in einer Konzentration von 1 mg/ml in Wasser mit unterschiedlichen Konzentrationen von POX 407 suspendiert und unter Hochdruck in jeweils drei Zyklen homogenisiert. Um die Partikel weiter zu zerkleinern, wurden die Proben in Intervallen von jeweils 20 Sekunden hochfrequenter Schwingung durch den Ultraschallstab

(40% Intensität) ausgesetzt. Die Stabilitätskontrolle erfolgte durch Bestimmung der Partikelgröße im Zetasizer über einen Zeitraum von 12 Tagen. Als Blindwert dienten eine 0,1% beziehungsweise 1% wässerige POX 407-Lösung.

4.5 In-vitro Freisetzungsmodell

4.5.1 Herstellung der Hydrogele

Die verwendeten thermoreversiblen Formulierungen wurden durch Lösen von POX 407 in 10mM phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) pH 7,4 hergestellt und vor Verwendung mindestens 12 Stunden bei 4°C gelagert.
Wirkstoff-haltige Suspensionen wurden durch homogene Verteilung von TAAc-Chargen mit unterschiedlicher Partikelgröße in POX 407/PBS durch Dispergieren am Vortex bereitet und vor der Anwendung ebenfalls mindestens 12 Stunden bei 4°C gelagert. Da es bei dieser Temperatur zur Sedimentation des Wirkstoffes kommt, wurden die flüssigen Hydrogele unmittelbar vor der Verwendung erneut homogenisiert.

Für in-vitro Freisetzungsstudien sowie deren nähere Charakterisierung wurden Wirkstoff-haltige Hydrogele mit mikronisiertem TAAc sowie mit gemahlenem TAAc hergestellt. Um die kleinstmögliche Partikelgröße zu erreichen, wurden Gele mit bereits zerkleinertem Wirkstoff unmittelbar nach dem Homogenisieren am Vortex zusätzlich zehn Minuten bei 4°C und 100% Intensität im Ultraschallbad homogenisiert.

4.5.2 Sättigungskonzentration und Lösungsgeschwindigkeit

Sowohl die Sättigungskonzentration als auch die Lösungsgeschwindigkeit sowie der Einfluss von POX 407 als Lösungsvermittler auf diese beiden Parameter wurde von zwei, durch Freisetzungsstudien charakterisierten TAAc-Chargen untersucht.

Dazu wurden jeweils 1,0 mg TAAc der beiden Partikelchargen in Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit jeweils 1,0 ml AP überschichtet und für eine optimale Durchmischung auf dem „End-over-End“-Mischer inkubiert. Nach Ablauf von zuvor festgelegten Zeitspannen wurden die Probengefäße bei 14 000 UpM fünf Minuten zentrifugiert (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland), um den ungelösten Anteil von TAAc abzutrennen. Die Überstände wurden abgehoben und der Wirkstoffgehalt bestimmt.

Die Versuche wurden bei Raumtemperatur von 23°C und Körpertemperatur von 37°C durchgeführt. Der Wirkstoffgehalt wurde nach 5, 30 und 60 Minuten in Dreifachbestimmungen mittels HPLC-DAD bestimmt. Um den Einfluss von POX 407 als Lösungsvermittler zu untersuchen wurde der Versuch analog wiederholt, wobei jedoch AP mit 5% POX 407 als Lösungsmittel eingesetzt wurde.

4.5.3 In-vitro Freisetzungsstudien

Um die Freisetzung von TAAc aus Hydrogelen zu untersuchen wurde ein geeignetes Membranmodell entwickelt. Es wurden 24-well-Mikrotiterplatten sowie Filter Einsätze (ThinCert™ – 24 Well, Porendurchmesser 0,4 µm, 12,57% Porenfläche, translucent, PET Membrane Ro Trac®; Greiner Bio-One®, Kremsmünster, Österreich) verwendet.

Die Membran aus Polyethylenterephtalat wurde bei Raumtemperatur 30 Minuten lang mit artifizieller Perilymphe (AP) vorbefeuchtet. Danach wurden apikal jeweils 100 µl Probe im kalten flüssigen Zustand aufgetragen und die 24-well-Platten zur Verfestigung des Gels 25 Minuten bei 37°C inkubiert. Basolateral dienten jeweils 300 µl AP als Akzeptormedium, sodass die Membran auf der Flüssigkeit Luftblasen-frei auflag. Nach Inkubation bei 37°C unter keimarmen Bedingungen wurde zu festgelegten Zeitpunkten die Akzeptorphase entnommen, die basolaterale Kammer mit 300 µl einer Mischung Acetonitril/Wasser (60+40, V/V) gespült und der Wirkstoffgehalt in den vereinten Fraktionen mittels HPLC-DAD

analysiert. Das entnommene Volumen wurde durch frisches Akzeptormedium ersetzt [2].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Freisetzung von TAAc aus vier unterschiedlichen Gelen untersucht. Als Grundlage diente ein Gel aus 20% POX 407 in PBS, in das 6% beziehungsweise 30% TAAc eingearbeitet wurden. Verglichen wurden die Freisetzungsprofile aus Gelen mit mikronisiertem TAAc mit einer mittleren Partikelgröße von 180 µm und aus solchen mit gemahlenem TAAc mit einer mittleren Partikelgröße von 3 µm. Die Freisetzungsstudien wurden als Langzeitstudien über einen Zeitraum von 4 Wochen durchgeführt und insbesondere die initiale Freisetzung während der ersten 24 Stunden genau untersucht.

4.6 Rheologie

Um den Einfluss des Fließverhaltens auf die Freisetzung erfassen zu können wurde das rheologische Verhalten der verwendeten Wirkstoff-haltigen Hydrogele untersucht. Mittels Rheometer (Modular Compact Rheometer MCR 302; CP50-1-SN27364; 50mm/1°; Anton Paar, Graz, Österreich) mit einem Kegel-Platte-Messsystem und einem Messspalt von 0,101 mm wurden die Studien im Oszillationsmodus durchgeführt. Das Probenvolumen betrug 600 µl und die Versuche wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt.

4.6.1 Amplituden-Sweep

Um den linear-viskoelastischen (LVE-) Bereich [10] der Proben zu definieren und die Deformation γ für alle weiteren Versuche festzulegen wurden Amplitudensweeps bei einer konstanten Kreisfrequenz (ω) von 3 rad/Sek und einer Temperatur von 37°C durchgeführt. Die Amplitude der Deformation γ wurde im Bereich von 0,001% bis 100% variiert.

4.6.2 Frequenz-Sweep

Die Stabilität der Hydrogele, vor allem in Ruhe, wurde mittels Frequenzsweep bei 37°C und konstanter Deformation γ von 0,1% für 6% TAAc- und 0,01% für 30% TAAc-Hydrogele beurteilt. Die Kreisfrequenz (ω) wurde von 100 bis 0,01 rad/Sek variiert.

4.6.3 Temperaturrampe

Zur Bestimmung der Sol/Gel Übergangstemperatur wurde eine Temperatur-Rampe mit konstanter Deformation γ von 0,1% (6% TAAc-Hydrogele) beziehungsweise 0,01% (30% TAAc-Hydrogele) und einer Kreisfrequenz ω von 3 rad/Sek durchgeführt. Die Proben wurden bei einer linearen Heizrate von 1°C pro Minute von 4°C auf 42°C erwärmt, um so die Lagerungstemperatur, den Sol/Gel Punkt und die anschließende Erwärmung bis in den Fieberbereich zu imitieren.
Zusätzlich wurden bei 37°C und den oben genannten Messkonstanten weitere 21 Messpunkte ermittelt, um insbesondere die Stabilität der Gele bei Körpertemperatur zu beurteilen.
Die Temperaturprogramme wurden in einer Probenkammer durchgeführt, um einen Einfluss der Umgebungstemperatur auszuschließen.

4.6.4 Oszillations – Rotations – Oszillations Test

Ein Oszillations-Rotations-Oszillations (ORO) Test wurde mit denselben Oszillations-Einstellungen für Deformation γ und Kreisfrequenz ω wie unter 4.6.3. beschrieben durchgeführt. Im ersten Oszillations-Abschnitt wurden die Proben 200 Sekunden lang bei 4°C bewegt und anschließend mit einer Aufheizrate von 0,2°C pro Minute auf 10°C erwärmt. Im anschließenden Rotationsmodus wurden die noch flüssigen Hydrogele bei 10°C 30 Sekunden lang einer Scherrate von 5000 s^{-1} ausgesetzt, um die bei einer in-vivo Applikation auftretende hohe Scherbelastung in der Injektionsnadel zu imitieren. Im dritten Oszillationsabschnitt wurden die

Gele auf 37°C erwärmt (0,2°C/Sek) und abschließend weitere 120 Sekunden lang zusätzliche Messpunkte bei 37°C generiert.

5 ERGEBNISSE und DISKUSSION

5.1 Verfahren zur Reduktion der Partikelgröße von mikronisiertem Triamcinolonacetonid

Ziel der Zerkleinerung von Wirkstoffpartikeln ist es, durch Vergrößerung der massenbezogenen, spezifischen Oberfläche die Löslichkeit und folglich auch die Freisetzungsrate von TAAc aus dem Hydrogel zu erhöhen. Zusätzlich könnte eine höhere Sättigungskonzentration und Lösungsgeschwindigkeit erreicht werden, die in-vivo ein rasches Anfluten des Wirkstoffes sowie höhere Arzneistoffkonzentrationen in der Perilymphe erwarten lassen.

5.1.1 Zerkleinerung mittels Luftstrahlmühle

Um eine kleinere Partikelgröße zu erzielen, wurde mikronisiertes TAAc mit einer Luftstrahlmühle gemahlen, wodurch eine Partikelgröße von durchschnittlich 0,7 µm erreicht werden konnte. Die Pulver-Partikel wurden anschließend bei Raumtemperatur gelagert und deren Größe nach definierten Zeitabständen überprüft. Bereits nach 24 Stunden stieg die Größe auf 1,3 µm, was eventuell auf der Bildung von Aggregaten der TAAc-Partikel beruht. Um dies zu Überprüfen wurde nach mehreren Wochen eine Größenbestimmung mit dem Mastersizer durchgeführt, wodurch mit einem Ergebnis eines durchschnittlichen Partikeldurchmessers von 3 µm, die angenommene Aggregatbildung verdeutlicht wurde. Trotzdem konnte insgesamt eine Verkleinerung der mikronisierten TAAc-Chargen von ursprünglich 180 µm auf durchschnittlich 3 µm erreicht werden. Der Einsatz dieser 3µm TAAc-Charge lässt eine höhere Freisetzungsrate und Lösungsgeschwindigkeit sowie möglicherweise auch eine höhere Sättigungskonzentration erwarten.

5.1.2 Hochdruckhomogenisation

Mit dieser Methode soll die Polydispersität der mittels Luftdruckmahlung zerkleinerten Partikel verringert und eine weitere Größenreduktion erreicht werden.

In einem ersten Versuch wurde eine Suspension des gemahlenen Wirkstoffes in Aqua dest. (1 mg/ml) bei einem Druck von 2 bar durch den Hochdruckhomogenisator geleitet. Die Intensität der einzelnen Pumpstöße lag bei durchschnittlich 600 bar. Die Größenbestimmung mit dem Mastersizer ergab nach sechs Zyklen eine konstante durchschnittliche Partikelgröße von 530 nm, jedoch einen über dem Grenzwert (0,5) liegenden PDI von 0,58.

Folglich wurden Suspensionen mit gleicher TAAc-Konzentration in 1%, 2% und 5% wässrigen POX 407 Lösungen hochdruckhomogenisiert, wobei die Ergebnisse nach drei Zyklen nicht zufriedenstellend waren. Die Partikel waren durchschnittlich 1224 nm (1% POX 407), 1161 nm (2% POX 407) beziehungsweise 1774 nm (5% POX 407) groß. Ein niedrigerer PDI von 0,09 beziehungsweise 0,26 konnte allerdings nur bei 1% und 2% POX 407 erzielt werden, jener der 5%igen POX 407-Suspension lag bei 0,64.

Um den Einfluss des Pumpdruckes auf die Partikelgröße zu evaluieren, wurden Versuche mit mikronisiertem TAAc (180 µm) in einer Konzentration von 1 mg/ml wässriger 5% POX 407-Lösung durchgeführt und der Druck schrittweise auf 6 bar erhöht. Mit einer Intensität der Pumpstöße von durchschnittlich 12500 bar konnten die TAAc-Partikel auf 22,10 ± 0,55 µm verkleinert werden. Anschließend wurden die homogenisierten Partikel unmittelbar vor der Größenbestimmung eine Minute lang im Ultraschallbad beschallt (Intensität 100%), wodurch eine weitere, aber nur kurzfristige Verkleinerung auf 4,75 ± 0,03 µm erreicht werden konnte. Dennoch waren einige größere TAAc-Teilchen zu finden. Ein zusätzliches Problem bei der Größenmessung ergibt sich aus dem hohen Volumen der Probendispergiereinheit, die eine hohe Verdünnung der Tensidlösung mit Aqua dest. erfordert, wodurch auf Grund fehlender Stabilisierung die Teilchen agglomerieren. Eine Stabilisierung durch Zusatz von POX 407 führt jedoch durch das kontinuierliche Rühren zur Schaumbildung und folglich zur Bildung von

Luftblasen, die das Ergebnis verfälschen. Dieser Effekt tritt bereits bei einer geringen POX 407-Konzentration von nur 0,1% auf.
Bei der Partikelgrößenbestimmung mittels DLS mit statischer Messzelle kann die Tensid-Lösung problemlos verwendet werden, sodass hier die verschiedenen wässrigen POX 407-Lösungen zur Verdünnung eingesetzt wurden.

5.1.3 Zerkleinerung mit Hilfe von Ultraschall

Die Methode der Zerkleinerung durch hohe Energie mit Ultraschall wurde im Rahmen dieser Arbeit in erster Linie in Kombination mit anderen Verfahren angewandt.

Ein erster Vorversuch wurde mit einer Suspension von gemahlenem und bereits unter Druck homogenisiertem TAAc in 5% wässriger POX 407-Lösung (1 mg/ml) durchgeführt. Es wurden 5 ml einer wässrigen 1:20 Verdünnung und einem daraus folgendem Tensidanteil von 0,25% mit einer Intensität von 40% bei Raumtemperatur 20 Sekunden beschallt. Nach dreimaliger Wiederholung des Zyklus lag die Partikelgröße bei einem mittleren Durchmesser von 909 nm und einem PDI von 0,51. Ein weiteres Beschallen der Probe zeigte keinen weiteren Effekt auf die Partikelzerkleinerung.
Zur weiteren Reduktion der Partikelgröße des gemahlenen Wirkstoffes wurde eine Suspension von TAAc (0,5 mg/ml) in 0,1% wässriger POX 407-Lösung, sowie eine unter Druck homogenisierte Probe 20 Sekunden mit der Sonotrode behandelt. Die Größe der Wirkstoffpartikel in einer 0,1% POX 407-Lösung konnte auf diese Weise von 2539 nm (PDI 0,97) um 53% auf 1184 nm (PDI 0,65) reduziert werden. Bei der zuvor homogenisierten Probe konnte eine Verminderung der Partikelgröße um 48% von 1971 nm (PDI 0,90) auf 1028 nm (PDI 0,62) erzielt werden.
Um eine möglichst kleine Partikelgröße in der TAAc Suspension zu erreichen, wurde in der Folge die Beschallungsdauer mit 30 beziehungsweise 60 Sekunden sowie das Intervall des eingesetzten Ultraschalls variiert.

Ultraschallexposition (Sekunden)		Partikeldurchmesser		PDI
Intervalle	**gesamt**	**nm**	**%**	
		2539,0	100,00	0,97
Probe A:				
30	**30**	988,7	38,94	0,61
30 + 30	**60**	752,5	29,64	0,68
30 + 30 + 30	**90**	639,7	25,19	0,54
30 + 30 + 30 + 30	**120**	751,8	29,61	0,65
Probe B:				
60	**60**	901,0	35,49	0,72
60 + 30	**90**	882,2	34,75	0,74
60 + 30 +30	**120**	737,9	29,06	0,61
60 + 30 + 30 + 30	**150**	976,1	38,44	0,74

Tab. 1: *Reduktion des durchschnittlichen Partikeldurchmessers von TAAc in einer 0,1%igen wässrigen POX 407-Lösung (0,5 mg/ml) durch Ultraschallbehandlung mit der Sonotrode (Intensität 40%, Raumtemperatur).*

Wie aus Tab. 1 ersichtlich ist, wurde in beiden Fällen der kleinste Partikeldurchmesser durch drei Beschallungszyklen, bei Probe A nach 90 und bei Probe B nach 120 Sekunden erreicht. Jedoch wurde nach einer initialen Beschallung von 30 Sekunden mit einer Reduktion der Teilchengröße um 74,8% das beste Ergebnis erzielt. Wurden beide Proben anschließend wieder beschallt, konnte ein Anstieg des Partikeldurchmessers um 4,4% (Probe A) beziehungsweise 9,3% (Probe B) beobachtet werden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sowie eine Abnahme des PDI konnten nicht reproduziert beziehungsweise erreicht werden. Dies lässt darauf schließen, dass viele verschiedene Parameter Einfluss auf den Grad der Zerkleinerung ausüben und eine große Zufallsvariation nicht vermeidbar ist.

5.1.4 Mikronisierung durch Präzipitation

Die Herstellung von mikronisierten TAAc-Partikeln durch Präzipitation wurde mit Konzentrationen von 2,5 mg/ml als auch 5 mg/ml und mit Ethylacetat (Tab. 2) sowie Aceton (Tab. 3) als Lösungsmittel durchgeführt.

Bei Verwendung von Ethylacetat als Lösungsmittel (Tab. 2) wurde mit einer 0,1%igen POX 407-Lösung verglichen mit 10% POX 407 ein um 1/18 geringerer Partikeldurchmesser erzielt. Zusätzlich waren diese Partikel über einen Zeitraum von 8 Tagen stabil. Partikel, die mit einer 1%igen POX 407-Lösung hergestellt wurden, wurden auf Grund ihrer ähnlichen Größe wie eine reine POX 407-Lösung (11 nm) nicht als TAAc Partikel bewertet. Um den relativ breiten PDI zu reduzieren, wurde in den folgenden Versuchen Aceton als Lösungsmittel verwendet.

Wie die in Tab. 3 angegebenen Ergebnisse der Fällung aus Aceton zeigen, wurden unterschiedliche POX 407-Konzentrationen eingesetzt, wobei mit einer 0,9% POX 407-Lösung der kleinste durchschnittliche Partikeldurchmesser von 26 nm erreicht wurde, der jedoch nicht reproduziert werden konnte. Aus diesem Grund wurde auch keine Stabilitätsprüfung durchgeführt.

Um die Methode weiter zu optimieren, wurden zusätzliche Ansätze untersucht, wobei einerseits das Lösungsmittel bei Raumtemperatur und andererseits bei 50°C evaporiert wurde. Jedoch konnte durch die letzte Methode, sowie durch den Einsatz der Sonotrode (80%) keine Partikelgrößenreduktion oder Reproduzierbarkeit erreicht werden.

TAAc-Lösung			POX 407-Lösung		Ansatzverhältnis	Mittlerer		Stabilität		
TAAc (mg/ml)	TAAc (mg)	LM (ml)	POX 407 (%)	ml	(LM + POX 407-Lösung)	Partikeldurchmesser (nm)	PDI	Zeit (Tage)	Partikeldurchmesser (nm)	PDI
2,5	25	10	10	20	1 + 2	**2161 ± 525**	**1**	1	(2719)	0,96
								8	1879 ± 635	0,87
			0,1	20	1 + 2	**118 ± 9**	**0,49**	6	119 ± 5	0,4
								8	104 ± 3	0,5
			1	10	1 + 1	**11 ± 1**	**0,42**			
5	25	5	1	10	1 + 2	**14 ± 6**	**0,34**			
5	100	20	0,1	40	1 + 2	**169 ± 70**	**0,24**	3	24 ± 18	0,22
2,5	100	40	0,1	40	1 + 1	**174 ± 51**	**0,29**	15	(906)	0,85

Tab. 2: *Mikrofällung von TAAc aus Ethylacetat. Ausreißer wurden nicht berücksichtigt.*

TAAc-Lösung			POX 407-Lösung		Ansatzverhältnis	Mittlerer		Zusätzliche
TAAc (mg/ml)	TAAc (mg)	LM (ml)	POX 407 (%)	ml	(LM + POX 407-Lösung)	Partikeldurchmesser (nm)	PDI	Behandlung
5	100	20	0,1	40	1 + 2	**197 ± 42**	**0,33**	
2,5	100	40	0,1	40	1 + 1	**61 ± 41**	**0,55**	
5	25	5	1	40	1 + 8	**9 ± 0**	**0,33**	
2,5	25	10	1	10	1 + 1	**11 ± 1**	**0,42**	
5	25	5	1	10	1 + 2	**35 ± 3**	**0,31**	
5	750	150	0,1	87,5	150 + 87,5	**66 ± 29**	**0,42**	
5	37,5	7,5	0	5	7,5 + 5	**>10000**	**1**	
			0,1			**879 ± 86**	**0,79**	
			0,5			**302 ± 44**	**0,41**	
			0,7			**79 ± 22**	**0,65**	
			0,8			**86 ± 37**	**0,5**	
			0,9			**26 ± 3**	**0,79**	
			1			**116 ± 21**	**0,45**	
			2			**390 ± 114**	**0,5**	
			5			**2946 ± 231**	**1**	

5	150	30	0,9	20	3 + 2	**4369 ± 1120**	**0,71**	
2,5	37,5	15		5	3 + 1	**646 ± 382** **678 ± 149**	**0,79** **0,7**	LM abgedampft bei Raumtemperatur LM abgedampft bei 50°C
2,5	25	10		20	1 + 2	**1450 ± 445** **(5077)**	**0,96** **1**	LM abgedampft bei Raumtemperatur LM abgedampft bei 50°C
2,5	750	300		100	3 + 1	**1433 ± 349**	**0,94**	Ultraschall 80%
2,5	24	9,6		16	9,6 + 16	**3415 ± 263**	**0,95**	Ultraschall 80%

Tab. 3: *Mikrofällung von TAAc aus Aceton. Ausreißer wurden nicht berücksichtigt.*

5.1.5 Herstellung von Triamcinolonacetonid-Mizellen mittels „thin-layer-method“

Der Einbau von TAAc in mizellare Strukturen erfolgte nach der in Kapitel 4.3.5. beschriebenen Methode unter Verwendung der molaren Verhältnisse von 1+0,18, 1+0,36 und 1+1,78 (TAAc + POX 407). Mit dieser Methode konnte mit zunehmendem Verhältnis von TAAc zu POX 407 eine bis zu 10-fache Verkleinerung der im Überstand enthaltenen Mizellen erreicht werden (Tab. 4). Dies kann dadurch erklärt werden, dass hier pro Wirkstoffmolekül mehr POX 407-Moleküle für die Mizell-Bildung zur Verfügung stehen und somit das lipophile TAAc leichter verkapselt werden kann. Jedoch ist in den meisten Fällen die Polydispersität sehr hoch (Tab. 4). Nach der Gefriertrocknung war die Partikelgröße aller Chargen gleich und stieg um bis zu 650%. Die ursprüngliche Partikelgröße konnte jedoch durch 10 Minuten Redispergierung im Ultraschallbad (100%) annähernd wieder erreicht werden.

Die Größenbestimmung des unverkapselten Anteiles von TAAc ergab erwartungsgemäß sehr hohe Werte bis in den einstelligen Mikrometer-Bereich bei sehr hoher Polydispersität. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass die Partikel von ausgefallenem TAAc umso größer waren, je kleiner die Mizellen im Überstand waren.

	zusätzliche Behandlung	Ansatzverhätnis TAAc + POX 407 (mol)	Partikeldurchmesser (nm)	PDI
TAAc-Mizellen		**1 + 0,18**	315,68 ± 34,01	0,54
		1 + 0,36	80,49 ± 40,77	0,74
		1 + 1,78	32,98 ± 12,27	0,54
TAAc-Mizellen (lyophilisiert)		**1 + 0,18**	226,17 ± 9,31	0,47
		1 + 0,36	218,77 ± 99,16	0,42
		1 + 1,78	213,89 ± 87,08	0,34
TAAc-Mizellen (lyophilisiert)	**10 Minuten Ultraschallbad 100%**	**1 + 0,18**	150,05 ± 4,05	0,46
		1 + 0,36	122,26 ± 37,05	0,53
		1 + 1,78	96,80 ± 23,53	0,34
Rückstand (unverkapselter Anteil, lyophilisiert)		**1 + 0,18**	1729,50 ± 202,58	0,85
		1 + 0,36	3936,00 ± 174,59	0,77
		1 + 1,78	5139,50 ± 187,80	0,75

Tab. 4: *Größenbestimmung von TAAc-Mizellen unmittelbar nach Herstellung, Lyophilisation und Redispergierung (Mittelwerte aus 10 Bestimmungen; Ausreißer wurden nicht berücksichtigt).*

Der TAAc-Gehalt der Mizellen als auch die Wirkstoffmenge im Rückstand wurde mit HPLC-DAD bestimmt (Tab. 5). Diese Bestimmung ergab, dass mit steigender POX 407-Menge der Anteil an mizellarem TAAc zunimmt, wobei jedoch in allen Fällen die Hauptmenge des Wirkstoffes im Rückstand detektiert wurde.

Ansatzverhältnis TAAc + POX 407 (mol)	**Verkapselter (mizellarer) Anteil**		**TAAc gesamt (µg)**	**Wiederfindungsrate TAAc (%)**
	µg TAAc	**%**		
1 + 0,18	143,06	**3,56**	4020,50	85,99
1 + 0,36	591,48	**16,08**	3677,31	78,57
1 + 1,78	588,34	**17,22**	3417,57	74,82
	unverkapselter Anteil			
	µg TAAc	**%**		
1 + 0,18	3877,44	**96,44**		
1 + 0,36	3085,83	**83,92**		
1 + 1,78	2829,23	**82,78**		

Tab. 5: *TAAc-Gehalt von Mizellen und den entsprechenden Rückständen.*

Die Gehaltsbestimmung der Lyophilisate (Tab. 6) ergab ähnliche Ergebnisse wie vor der Lyophilisation, wobei bei einem Verhältnis von 1+0,36 um 13% weniger TAAc als bei 1+1,78 vorlag. Jedoch konnten, bezogen auf TAAc/mg Lyophilisat, keine Grenzen der maximalen Einbaurate bestimmt werden.

Ansatzverhältnis TAAc + POX 407 (mol)	Verkapselter (mizellarer) Anteil an TAAc			TAAc gesamt (µg)	Wiederfindung TAAc gesamt (%)
	µg/mg	µg	%		
1 + 0,18	3,13	66,45	**1,82**	3649,12	78,05
1 + 0,36	3,13	119,66	**3,28**	3651,31	78,02
1 + 1,78	3,01	516,43	**15,66**	3297,55	72,18
	unverkapselter Anteil an TAAc				
	µg/mg	**µg**	**%**		
1 + 0,18	709,44	3582,67	**98,18**		
1 + 0,36	878,52	3531,65	**96,72**		
1 + 1,78	374,31	2781,12	**84,34**		

Tab. 6: *TAAc-Gehalt der Lyophilisate von Mizellen und den entsprechenden Rückständen.*

5.1.6 Langzeit-Stabilität der Mizellen

Zur Untersuchung der Langzeit-Stabilität wurden die kleinsten Mizellen, die nach dem molaren Ansatzverhältnis 1+1,78 TAAc/POX 407 hergestellt wurden, mit wässriger 0,1% POX 407-Lösung 1:10 verdünnt. Da die Mizellen in der so entstandenen Dispersion eine durchschnittliche Größe von 196 nm aufwiesen, wurde diese drei Minuten mit der Sonotrode (40% Intensität, Raumtemperatur) beschallt. Mit einer Größe von rund 30 nm konnte die ursprüngliche Größe der Mizellen durch diese Ultraschallbehandlung wieder erreicht werden.

Wie aus Abb. 6 ersichtlich, ist die Stabilität der Mizellen über 10 Wochen nur durch Lagerung bei 37°C gewährleistet. Bei 4°C Lagerungstemperatur zeigt sich eine große Variation der Durchmesser und auch bei Raumtemperatur kommt es zu einer Zunahme der Größe der Mizellen, die sich am Ende der Untersuchung mit rund 200 nm fast versiebenfacht hatte.

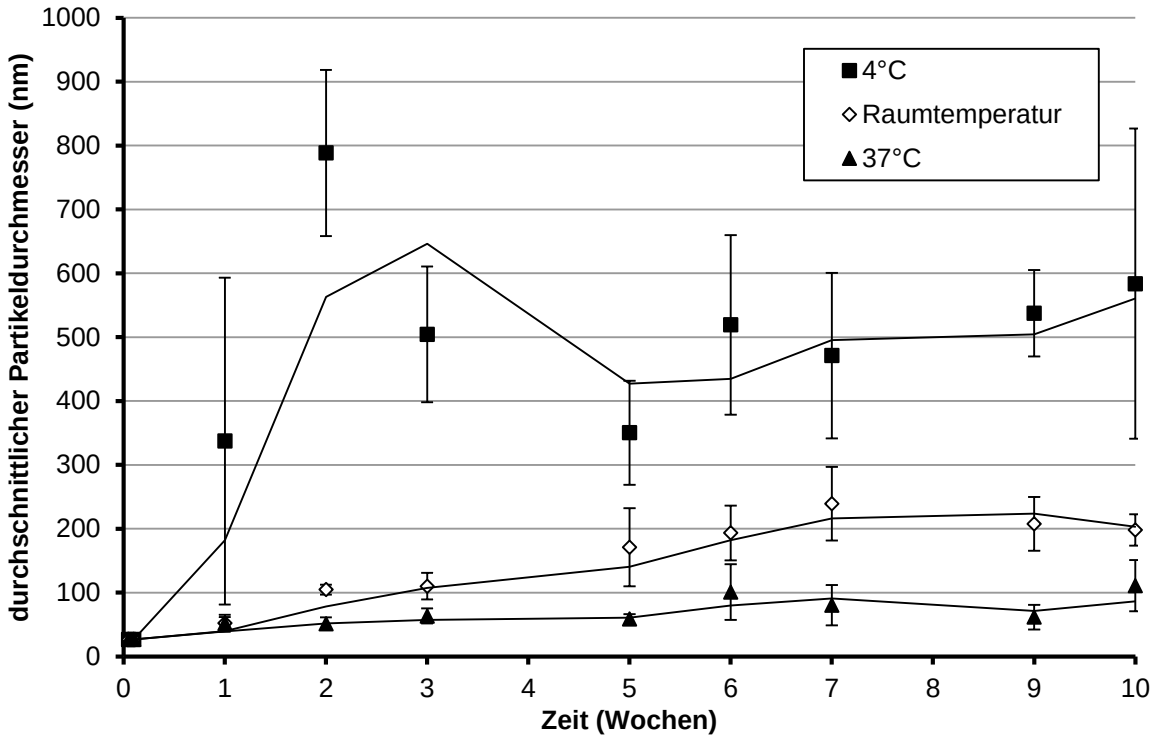

Abb. 6: *Stabilität von TAAc-Mizellen (Ansatzverhältnis 1+1,78; TAAc + POX 407) in 0,1% POX 407-Lösung bei verschiedenen Temperaturen über einen Zeitraum von 10 Wochen.*

Diese Unterschiede sind durch zwei Parameter, die kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) und die kritische Mizellbildungstemperatur (CMT), erklärbar. Die CMC ist jene Konzentration, ab der das Tensid Mizellen bildet, analog dazu ist die CMT jene Temperatur, ab der bei einer definierten Tensid-Konzentration Mizellen gebildet werden [22].

Im Allgemeinen sinkt die CMC in wässrigen Systemen mit steigender Temperatur. Bei 4°C wird die CMT unterschritten, wodurch die gebildeten Mizellen wieder dissoziieren und die Tensidmoleküle in Form von ungeordneten Monomeren vorliegen. Dieser Effekt ist schon nach einer Woche ersichtlich. Ähnlich dazu können die Ergebnisse bei Raumtemperatur interpretiert werden, wobei hier der Effekt des Auflösens der Mizellen erst nach 5 Wochen auftritt. Die CMT dürfte unterhalb von 37°C bei gleichzeitigem Überschreiten der CMC des Tensids liegen, sodass bei dieser Temperatur die TAAc-Mizellen stabil sind [22].

5.2 Stabilitätsprüfung der Triamcinolonacetonid Partikel

Obwohl durch eine Reduktion der Partikelgröße die Oberfläche vergrößert wird und damit die Lösungsgeschwindigkeit steigt, kann insbesondere bei lipophilen Wirkstoffen die geringe Benetzbarkeit mit Wasser zu einer Reaggregation führen. Deshalb ist es wichtig, kleine Partikel durch Tensid-Zusatz zu stabilisieren, damit diese über längere Zeit ihre ursprüngliche Größe behalten beziehungsweise nur minimal verändern.

Um eine optimale Stabilisierung zu erreichen wurde POX 407 in Konzentrationen von 0,1% und 1% eingesetzt. Zunächst wurde gemahlenes TAAc (1 mg/ml) in den Tensid-Lösungen suspendiert und durch den Hochdruckhomogenisator geleitet. Die dadurch erzielte Größe von 1240 nm konnte durch den Einsatz der Sonotrode auf 653 nm (0,1% POX 407) beziehungsweise 710 nm (1% POX 407) verkleinert werden. Zur Überprüfung der Stabilität wurde die Größe im Abstand von 60 Minuten über einen Zeitraum von fünf Stunden analysiert. In beiden Lösungen kam es bereits in diesem Zeitraum zur Aggregation, wobei die Partikelgröße durch Einsatz von Ultraschall auf 728 ± 69 nm (0,1% POX 407) und auf 770 ± 85 nm (1% POX 407) reduziert werden konnten. Zur Überprüfung der Langzeitstabilität wurden die Suspensionen 12 Tage bei Raumtemperatur gelagert und erneut deren Größe bestimmt. Wiederum war es zur Bildung von Aggregaten gekommen (3940 nm in 0,1% wässriger POX 407 beziehungsweise 2182 nm in 1% wässriger POX 407), die durch Ultraschall wieder getrennt werden konnten. Obwohl die Aggregat-Bildung in einer Suspension mit 0,1% wässriger POX 407 ausgeprägter war, konnte in dieser die kleinere Teilchengröße von 791 nm im Vergleich zu 855 nm in der 1% Suspension erreicht werden.
Durch den Einsatz noch geringerer (0,01%) POX 407 Mengen konnte keine geeignete Partikelgröße (922 ± 19 nm) erreicht werden und auch die Stabilität war nicht gesichert. Daher wurde in allen weiteren Untersuchungen eine 0,1% wässrige POX 407-Lösung zur Stabilisation eingesetzt.

5.3 In-vitro Freisetzungsstudien

Für eine optimale Beurteilung der Freisetzungsprofile wurden Sättigungskonzentration sowie Lösungsgeschwindigkeit von TAAc nach der in Kapitel 4.5.2. beschriebenen Methode bestimmt. Anschließend wurde das Freisetzungsprofil von unterschiedlichen TAAc-Hydrogelen erstellt (4.5.3.).

5.3.1 Sättigungskonzentration und Lösungsgeschwindigkeit

Ausgehend von der Annahme, dass die Gelstruktur vollständig aufgelöst werden kann und die AP theoretisch eine maximale Konzentration von 6,67% POX 407 enthalten kann, wurde zur Bestimmung der Sättigungskonzentration und Lösungsgeschwindigkeit von TAAc eine 5% wässrige POX 407-Lösung gewählt. Zusätzlich wird angenommen, dass durch höhere Konzentrationen des Tensids in der Perilymphe eine höhere Solubilisierung von TAAc erreicht wird, wodurch auch ein höherer Gehalt an TAAc erwartet werden kann.

Wie aus Tab. 7 ersichtlich ist, hat die Temperatur einen großen Einfluss auf das Lösungsverhalten von TAAc. Generell liegen bei 37°C signifikant größere Mengen an gelöstem TAAc vor, wobei in der AP bis zu 20% und in AP mit 5% POX 407 bis zu 60% mehr TAAc gelöst wurden.

TAAc	Medium	Inkubation (Minuten)	TAAc (µg/ml)	
			23 °C	37 °C
mikronisiert	AP	5	11,20 ± 1,70	19,02 ± 8,40
		30	9,45 ± 0,43	11,90 ± 1,46
		60	9,43 ± 0,28	12,07 ± 0,31
	5% POX 407 / AP	5	99,00 ± 0,91	124,50 ± 2,70
		30	94,31 ± 2,39	141,07 ± 0,77
		60	93,08 ± 0,28	139,89 ± 1,66
gemahlen	AP	5	8,89 ± 0,13	11,61 ± 0,36
		30	9,79 ± 0,22	10,38 ± 1,12
		60	8,83 ± 0,23	11,61 ± 0,48
	5% POX 407 / AP	5	90,46 ± 4,35	116,06 ± 2,04
		30	92,67 ± 3,42	147,15 ± 2,79
		60	93,50 ± 0,25	147,89 ± 2,19

Tab. 7: *Sättigungslöslichkeiten von TAAc in Abhängigkeit von Partikelgröße, Lösungsmittel und Temperatur.*

Ebenso hatte der Zusatz von POX 407 als Lösungsvermittler einen erheblichen Einfluss auf die Sättigungslöslichkeit wodurch bei 23°C jeweils die zehnfachen Mengen und bei 37°C 12-13 mal höhere Mengen an TAAc in gelöster Form vorlagen.

Darüber hinaus konnte durch eine geringere Partikelgröße bei 37°C und durch Tensid-Zusatz von 5% eine höhere Sättigungskonzentration sowie Lösungsgeschwindigkeit erreicht werden (Abb. 7). Bei allen anderen Proben war das vorgelegte Lösungsmittel bereits nach 5 Minuten gesättigt.

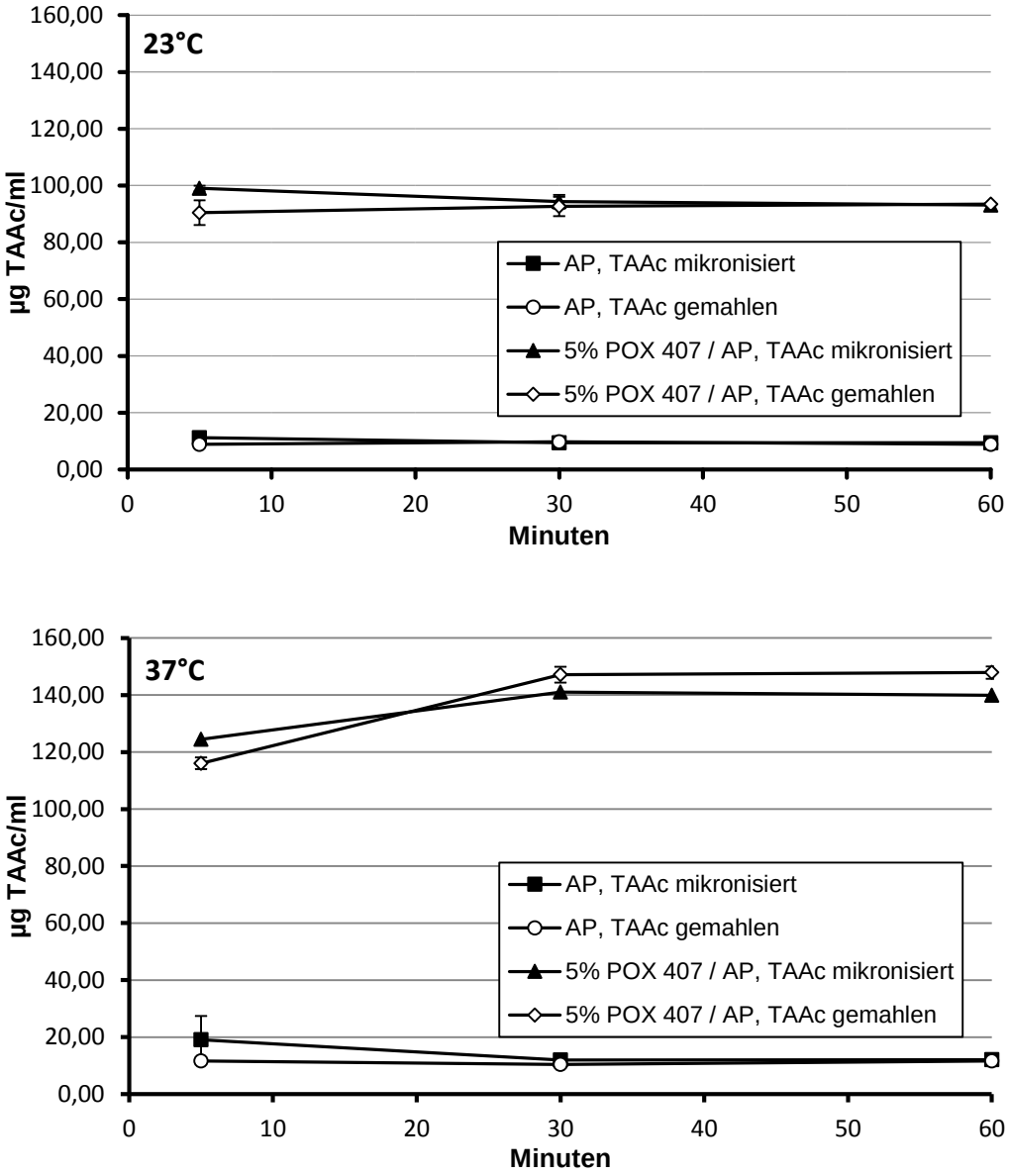

Abb. 7: *Sättigungslöslichkeit und Lösungsgeschwindigkeit von TAAc in artifizieller Perilymphe ohne/mit Tensidzusatz bei 23°C (oben) und bei 37°C (unten).*

5.3.2 In-vitro Freisetzungsstudien

Aus Abb. 8 geht der ausgeprägte Einfluss der Partikelgröße von TAAc auf die initiale Wirkstofffreisetzung hervor. In den ersten 24 Stunden wurden aus Gelen mit gemahlenem TAAc (3 µm) generell größere Mengen Wirkstoff freigesetzt als aus jenen mit mikronisiertem TAAc (180 µm). Zusätzlich wurde aus Hydrogelen mit 30% TAAc innerhalb der ersten 24 Stunden die doppelte Wirkstoffmenge

freigesetzt, die einer Gesamtfreisetzung von 0,18 ± 0,01% aus Hydrogelen mit mikronisiertem beziehungsweise 0,33 ± 0,02% aus Hydrogelen mit gemahlenem TAAc entspricht. Aus Hydrogelen mit 6% Steroidgehalt wurden innerhalb von 24 Stunden bei mikronisiertem TAAc 0,87 ± 0,05% beziehungsweise bei gemahlenem 1,03 ± 0,03% der Gesamtmenge an TAAc freigesetzt. Somit konnte der erwünschte Effekt der Löslichkeitsverbesserung durch die weitere Partikelverkleinerung von mikronisiertem TAAc nachgewiesen werden. Die insgesamt geringen Freisetzungsraten weisen bereits auf eine Annäherung an die Sättigungskonzentration von TAAc im Akzeptorkompartiment hin.

Darüber hinaus wurde klar ersichtlich, dass primär die Partikelgröße die Wirkstofffreisetzung beeinflußt, während die Wirkstoffkonzentration im Hydrogel eine untergeordnete Rolle hat, da aus Hydrogelen mit mikronisiertem 6% oder 30% TAAc nach 24 Stunden annähernd gleiche Wirkstoffmengen freigesetzt wurden. Bei der kleineren Partikelgröße wurde jedoch bei höherem Kortikoidgehalt auch die 1,6-fache Menge an Wirkstoff freigesetzt.

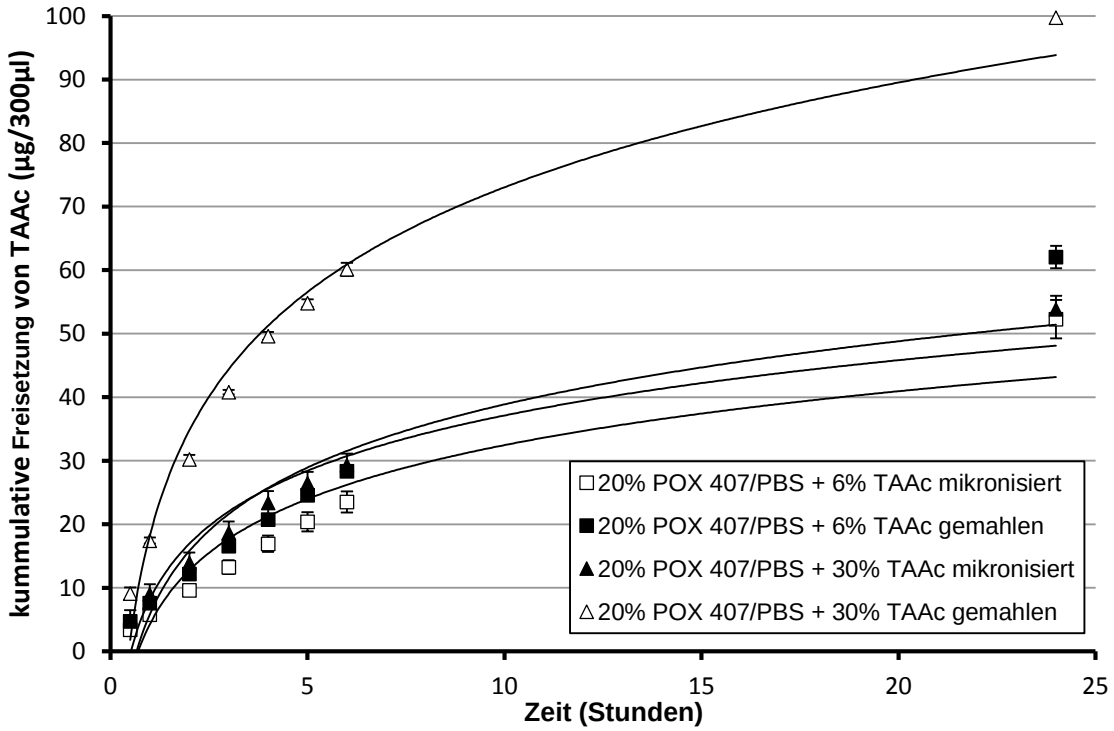

Abb. 8: *Initiale In-vitro Freisetzungsprofile verschiedener 20% POX 407/PBS Hydrogele mit 6% beziehungsweise 30% TAAc-Gehalt über einen Zeitraum von 24 Stunden.*

Zur Langzeituntersuchung wurde die Studie 28 Tage über die initiale Phase weitergeführt (Abb. 9). Über den gesamten Zeitraum konnte bei Hydrogelen mit 6% Wirkstoff der Trend der ersten 24 Stunden weiter beobachtet, und eine Gesamtfreisetzungsrate von 3,19 ± 0,07% TAAc bei Einsatz des Mikronisates beziehungsweise 3,89 ± 0,17% TAAc bei Verwendung von gemahlenem Wiorkstoff erreicht werden. Dies entspricht einer Gesamtmenge von freigesetztem Glukokortikoid von 191,20 ± 4,43 µg TAAc (Mikronisat) oder 233,56 ± 9,94 µg Wirkstoff im Falle von gemahlenem TAAc. Andererseits konnte bei Hydrogelen mit 30% TAAc bereits nach 5 Tagen eine geringfügig höhere Freisetzungsrate aus Hydrogelen mit mikronisierten Partikeln beobachtet werden, die auch nach 28 Tagen mit 395,00 ± 11,05 µg TAAc (1,32 ± 0,04%) eine 1,4-fach höhere Gesamtfreisetzung im Vergleich zu gemahlenem Wirkstoff mit 279,97 ± 9,13 µg (0,93 ± 0,03%) TAAc erreichte. Ein Grund für diese unerwartete Entwicklung ist aus dem Versuchsverlauf nicht ersichtlich, da sich hier vermutlich mehrere der oben bereits erwähnten Effekte in unterschiedlichem Ausmaß überlagern.

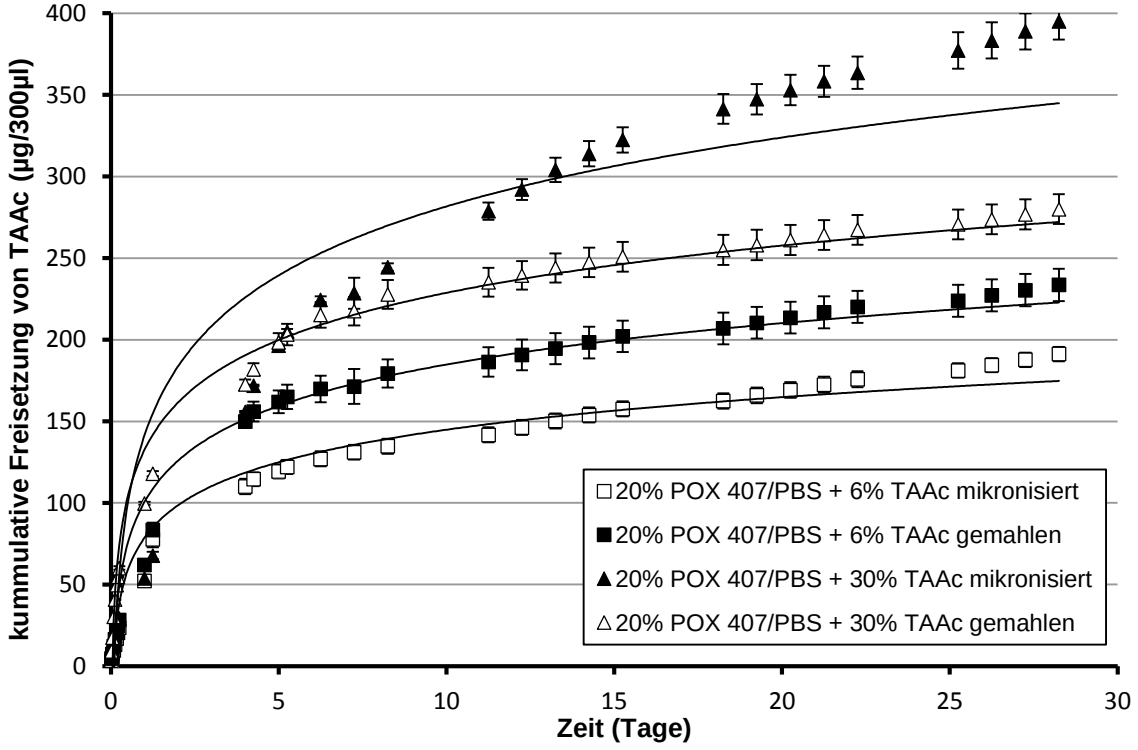

Abb. 9: *In-vitro Freisetzungsprofile verschiedener 20% POX 407/PBS Hydrogele mit 6% beziehungsweise 30% TAAc-Gehalt über einen Zeitraum von 28 Tagen.*

Zusätzlich ist aus Abb. 9 ersichtlich, dass die Gele eine wünschenswerte Freisetzungskinetik aufweisen. Durch ein rasches Anfluten des Wirkstoffes nach Applikation kann ein rascher Wirkungseintritt angenommen werden und die retardierte Freisetzung würde den Wirkstoffspiegel aufrechterhalten.

5.4 Rheologie

5.4.1 Amplituden-Sweep

Um weitere Versuche in laminarer Strömung und damit unter Erhaltung der inneren Struktur der Formulierungen durchführen zu können, werden von den eingesetzten Hydrogelen (siehe Kapitel 5.3.2.) das Speichermodul (G´) und das Verlustmodul (G´´) als Funktion der Schubspannung gemessen. Bei allen analysierten Hydrogelen zeigte sich der LVE-Bereich durch ein parallel verlaufendes Plateau von G´ und G´´. Wie in Tabelle 8 zusammengefasst, endet der LVE Bereich bei Hydrogelen mit 6% TAAc-Gehalt bei einer zehnfach höheren Deformation als bei Hydrogelen mit 30% Wirkstoffanteil. Der Nachgebpunkt, der durch die Abnahme von G´ angezeigt wird, bezeichnet jene Deformation, bei der bei allen Hydrogelen eine minimale, aber reversible Veränderung der Struktur auftritt. Der bei höherer Deformation liegende Fließpunkt, der durch den Schnittpunkt von G´ und G´´ definiert ist, weist ebenso bei allen Hydrogelen auf eine vollständige Destruktion der Gelstruktur hin. Ab diesem Zeitpunkt überwiegt G´´ und somit die viskosen Eigenschaften der Formulierung. Für alle weiteren Untersuchungen wird das Mittel des LVE-Bereiches als Deformation gewählt. Die Partikelgröße von TAAc zeigte keinen Einfluss auf den LVE-Bereich, jedoch wurde die mittlere Deformation für Hydrogele mit 6% TAAc mit 0,1% und bei 30% TAAc mit 0,01% festgelegt [2]. Geringere Werte der Deformation bei höherem Feststoffanteil sind darauf zurückzuführen, dass durch ein vermehrtes Vorhandensein von Partikeln das Hydrogel an Elastizität verliert und es somit zu einem früheren Gelstrukturverlust kommt.

5.4.2 Frequenz-Sweep

Die Formulierungen wurden im Frequenz-Test auf ihre Stabilität untersucht. Da die Hydrogele nach der Applikation an der Rund-Fenstermembran in Ruhe bleiben, wird in erster Linie der niedrige Frequenzbereich von 0,01 rad/Sek bis 1 rad/Sek bewertet. Da in diesem Bereich das Speichermodul G´ nahezu parallel zur x-Achse verläuft, kann von Stabilität der Hydrogele in Ruhe ausgegangen werden und auch bei einem hohen Feststoffanteil von 30% war die Formulierung in diesem Frequenzbereich stabil.

Weiters unterscheiden sich Gele mit Zusatz von 6% TAAc von jenen mit 30% Wirkstoffanteil stark in ihrer Gelfestigkeit, die durch das komplexe Schubmodul G* ausgedrückt wird. So weisen letztere bei 37°C ein 18-fach höheres komplexes Schubmodul gegenüber ersteren auf (Tab. 8).

Die Langzeitstabilität der Hydrogele ist gemeinsam mit der Gelstärke von besonderer Bedeutung. Letztere erhöht die Bioadhäsivität der Präparationen, welche eine lange Kontaktzeit mit der runden Fenstermembran gewährleistet.

5.4.3 Temperaturprogramme

Der Sol/Gel Übergang ($T_{Sol} \rightarrow T_{Gel}$) wird durch Temperaturanstieg bestimmt. Bei 4°C liegen alle Proben im flüssigen Zustand vor, der durch ein höheres Verlustmodul (G´´) als das Speichermodul (G´) charakterisiert ist. In diesem Zustand kann die durch die Auslenkung eingebrachte Energie von der Formulierung nicht aufgenommen werden und sie gibt diese in Form von Fließen ab. Wird die Temperatur erhöht kommt es zur Annäherung beider Kurven bis diese sich im Sol/Gel Punkt schneiden (G´=G´´). Die Probe liegt nun als plastisch verformbarer Feststoff vor. Gleichzeitig kommt es zu einem steilen Anstieg der Schubspannung, da die verfestigte Probe der Auslenkung einen stärkeren Widerstand entgegensetzt. Steigt die Temperatur weiter an wird die anfängliche Lage von Verlustmodul zu Speichermodul umgekehrt und G´ ist nun höher als G´´. Diese beiden Parameter bleiben dann unabhängig von der Temperatur konstant, womit die Gelstabilität bewiesen werden kann.

Die Menge von TAAc in der Zubereitung selbst hat keinen Einfluss auf den Sol/Gel Punkt, jedoch wurde der Gelbildungspunkt bei Hydrogelen mit

gemahlenem Wirkstoff um 4,17°C gesenkt. Das könnte dadurch erklärt werden, dass größere Partikel die inhärente Viskosität erhöhen, sodass die Gelbildung erst bei höheren Temperaturen einsetzt.

5.4.4 Oszillations – Rotations – Oszillations Test

Um die praktische Anwendbarkeit und den Einfluss von hohen Scherkräften, die bei der intratympanalen Injektion auftreten, zu simulieren, wird ein ORO-Test (Abb. 10) durchgeführt. Im ersten Oszillations-Abschnitt werden die Lagerbedingungen bei 4°C imitiert, wobei hier G´´>G´ ist und die verwendeten Formulierungen im flüssigen Zustand vorliegen. Im anschließenden Rotationsmodus werden die Präparationen hohem Scherstress ausgesetzt, wodurch die Viskosität der Probe sinkt. Zur Simulation der Situation an der Rund-Fenstermembran wird im zweiten Oszillations-Abschnitt die Inkubationstemperatur auf Körpertemperatur erhöht und die Formulierungen werden halbfest (G´>G´´). Danach bleiben G´ und G´´ konstant und verlaufen parallel zueinander.

Auf Grund dieser Studie ist gewährleistet, dass nach einer intratympanalen Injektion alle Formulierungen ein Gel bilden, auch wenn es zu einer geringfügigen Verschiebung der Gelbildungstemperatur auf 30,08°C kommt. Dies bedeutet eine Erhöhung der Gelbildungstemperatur durch mikronisierten Wirkstoff um +2,57°C beziehungsweise bei gemahlenen Partikeln um +7,23°C. Auf Grund der relativ raschen Gelbildung und der anschließenden konstanten Gelfestigkeit bei 37°C kann jedoch die Erhöhung der Gelbildungstemperatur vernachlässigt werden.

Versuchstyp		20% POX 407 in PBS + 6% TAAc mikronisiert	20% POX 407 in PBS + 30% TAAc mikronisiert	20% POX 407 in PBS + 6% TAAc gemahlen	20% POX 407 in PBS + 30% TAAc gemahlen
Amplituden-Sweep	**LVE-Bereich (% Deformation)**	0,001 → 0,6	0,001 → 0,04	0,001 → 0,6	0,001 → 0,04
	Nachgebpunkt (% Deformation)	0,6	0,04	0,6	0,04
	Fließpunkt (% Deformation)	6	1	6	1
Frequenz-Sweep	**Gelstabilität in niedrigem Frequenzbereich**	+	+	+	+
	Komplexes Schubmodul bei 37°C	7000	131000	8000	139000
Temperaturkurve 4 → 42°C	**Gelbildungspunkt (T_{Sol} → $T_{Gel,}$ °C)**	27,29 ± 0,69	27,23 ± 0,74	23,30 ± 0,42	22,89 ± 1,69
	Gelstabilität (37 - 42°C)	+	+	+	+
ORO	**Gelbildungspunkt (T_{Sol} → $T_{Gel,}$ °C)**	30,05 ± 0,78	29,60 ± 0,28	30,35 ± 0,35	30,30 ± 0,99
	±°C Gelbildungspunkt	+ 2,76	+ 2,37	+ 7,05	+ 7,41

Tab. 8: *Zusammenfassung der Ergebnisse der rheologischen Analysen.*

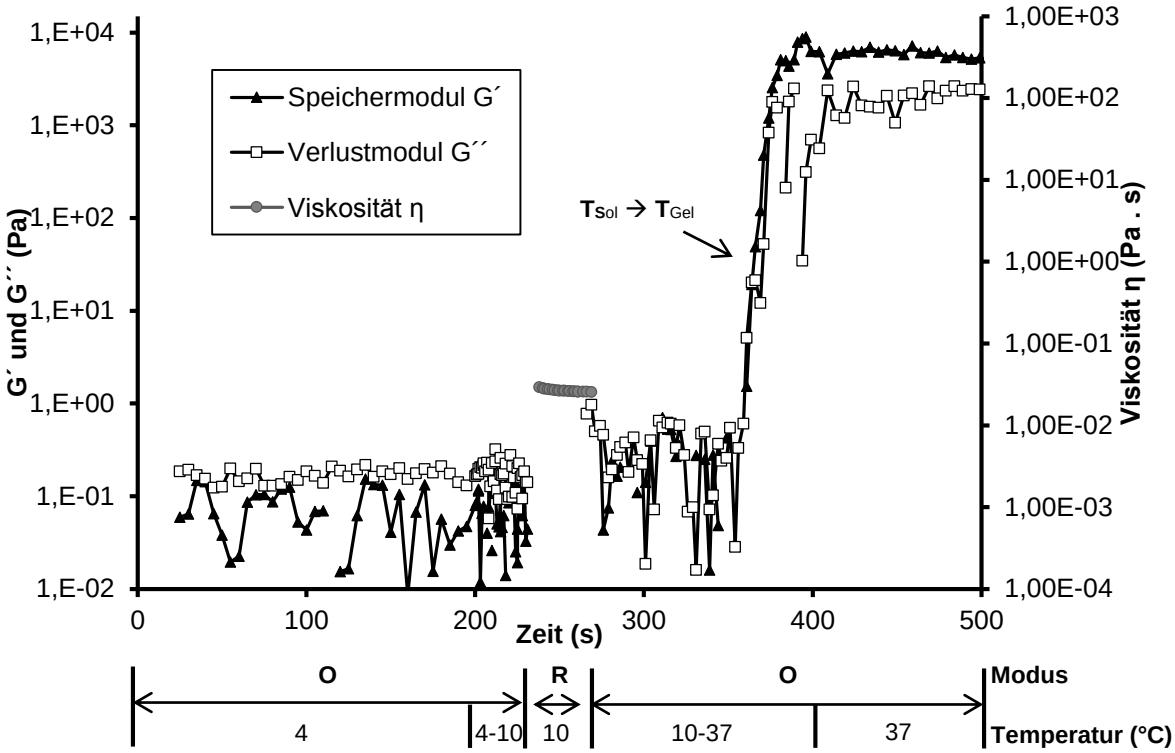

Abb. 10: *Oszillations-Rotations-Oszillations-Test (ORO) eines 20% POX 407/PBS Hydrogels mit 6% mikronisiertem TAAc.*

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die systemische Therapie von Innenohrerkrankungen ist aufgrund anatomischer Gegebenheiten meist wenig effektiv und oft mit zahlreichen Nebenwirkungen verbunden. Eine erfolgversprechende Alternative stellt die lokale intratympanale Therapie mit thermoreversiblen Hydrogelen dar, die flüssig appliziert werden können und bei Körpertemperatur ein Gel bilden. Dadurch kommt es zu einer längeren Verweildauer des Wirkstoffes am Diffusionsort, wodurch höhere Wirkstoffspiegel im Innenohr erwartet werden können. Gleichzeitig können die Dosis des Arzneistoffes und damit das Ausmaß der unerwünschten Nebenwirkungen verringert sowie die Dauer der Behandlung eventuell verkürzt werden. Als Grundlage für das Wirkstoff-haltige Gel wurde eine 20%ige Formulierung des gut verträglichen nicht-ionogenen Tensids Poloxamer 407 (POX 407) eingesetzt, in die unterschiedliche Mengen des otoprotektiv wirksamen Glukokortikoids Triamcinolonacetonid (TAAc) eingearbeitet wurden.

Das eingesetzte Hydrogel bildet Mizellen, die als Transportvehikel für lipophile Wirkstoffe fungieren. Als alternativer Weg, um die Löslichkeit von TAAc zu verbessern und die Diffusion zu erhöhen, sollte die Größe der Wirkstoffpartikel verringert werden. Es wurden verschiedene Verfahren angewandt, wobei im Rahmen dieser Arbeit mit einer Luftstrahlmühle gemahlene Partikelchargen für weitere Versuche eingesetzt wurden. Weiters wurden TAAc-Partikel unter Hochdruck homogenisiert, sowie durch Einsatz von Ultraschall beziehungsweise mittels Präzipitation mikronisiert. Zuletzt wurden mit einer einfachen Technik Wirkstoff-haltige Mizellen hergestellt. Erste Ergebnisse dieser neuen Formulierungen waren durchaus vielversprechend und weitere ausführliche Untersuchungen sind notwendig.

Es wurden schließlich Gele mit mikronisiertem sowie solche mit gemahlenem TAAc jeweils mit einem Gehalt von 6% sowie 30% hergestellt. Die beiden Partikelchargen unterschieden sich mit 180 µm beziehungsweise 3 µm in ihrer Größe um den Faktor 60, daher konnte eine deutliche Erhöhung der Freisetzungsrate erwartet werden. In umfangreichen Studien wurde gezeigt, dass

sowohl Sättigungskonzentration als auch Lösungsgeschwindigkeit durch eine Verkleinerung erhöht werden, wobei jedoch die Temperatur als auch Menge von POX 407 als Lösungsvermittler beide Parameter deutlich stärker beeinflussen. Es wurden über einen Zeitraum von vier Wochen in-vitro Freisetzungsprofile der verschieden Hydrogele erstellt. Aus jenen mit dem gemahlenem TAAc wurden zunächst deutlich höhere Wirkstoffmengen freigesetzt, allerdings wurde nach 28 Tagen aus einem Hydrogel mit 20% POX 407, das 30% mikronisiertes TAAc enthielt, die höchsten kumulative Freisetzung erzielt. Alle Gele zeigten jedoch mit einem raschen Anfluten des Wirkstoffes in den ersten Stunden und einer anschließenden verzögerten Freisetzung sehr gute Voraussetzungen für eine spätere in-vivo Anwendung.

Das Fließverhalten der Gele wurde in ausgedehnten rheologischen Analysen untersucht, wobei der Einfluss von Zerkleinerungsgrad und Konzentration der eingebrachten Wirkstoffpartikel im Vordergrund stand. Es zeigte sich, dass mit der eingebrachten Wirkstoffmenge auch die Gelfestigkeit steigt, was jedoch auf dessen Stabilität keinen Einfluss ausübt. Diese ist bei allen untersuchten Zubereitungen unter den erwarteten, für in-vivo relevanten Bedingungen gegeben. Es zeigten sich deutliche Unterschiede in den Gelbildungspunkten zwischen den Zubereitungen mit TAAc-Partikeln unterschiedlicher Größen. Eine Oszillations-Rotations-Oszillations (ORO) Studie, welche in-vitro die Lagerung, die in-vivo Applikation an der Rund-Fenstermembran, die Gelbildung und die Stabilität der Formulierung am Resorptionsort simuliert, lässt eine erfolgreiche Anwendbarkeit in-vivo erwarten.

Zusammenfassend konnte die Partikelgröße von TAAc erfolgreich verkleinert werden und entsprechende Hydrogele zeigten in-vitro vor allem in der initialen Phase eine erhöhte Wirkstofffreisetzung. Zusätzlich konnten erstmals TAAc-beladene Mizellen hergestellt werden, die eine vielversprechende Formulierung darstellen.

7 SUMMARY

Due to anatomic facts systemic therapy of inner ear diseases suffers from limited efficacy and is entailed with numerous side-effects. A promising alternative is local intratympanic administration of thermoreversible hydrogels. These formulations can be easily applied as a fluid at room temperature, but at body temperature a gel will be formed on the round window membrane. That causes prolonged contact of the API at the site of absorption, higher diffusion across the membrane and finally higher drug levels in the inner ear with additional contribution of micellar transport of entrapped API. At the same time the dosage of the drug, hence the extent of the side-effects as well as the duration of the therapy might be reduced. To reach this aim, the otoprotective glucocorticoid triamcinolone acetonide (TAAc) was incorporated at different concentrations in a formulation containing 20% of the well-tolerated and FDA approved poloxamer 407 (POX 407).

Additionally, to improve the solubility and the diffusion of TAAc through the round window membrane, the drug particles should be as small as possible. Among the different methods applied, merely particle charges prepared by jet milling were used for further tests. Furthermore, TAAc-particles were homogenized using high pressure and micronized by ultrasound or by precipitation. Finally drug-containing micelles were prepared using a simple and efficient technology. The initial outcomes of this method were quite encouraging and require further detailed research.

To assess the in-vitro release profile, gels containing 6% or 30% TAAc of 180 µm or 3 µm in diameter were prepared. Initially significantly higher amounts of the active were released from the formulation containing smaller TAAc particle. After 28 days, however, the cumulative TAAc release was lower in comparison to the hydrogel with 180 µm TAAc particles. The release profile of all hydrogels under investigation was characterized by an initial burst effect within the first hours followed by a delayed release phase, which is expected to meet the requirements for in-vivo administration. Comprehensive studies additionally revealed that the saturation concentration as well as the solubility of TAAc increased with

decreasing particle size. Nevertheless, the influence of temperature as well as POX 407 content as solubilizer is much more pronounced.

The rheological characteristics of the hydrogels were evaluated and revealed pronounced influence of size and concentration of the incorporated drug particles. Although the stiffness of the hydrogel increases with the drug content, the stability of the formulations is not affected and all the preparations were stable in the expected environmental conditions. Finally, oscillation-rotation-oscillation (ORO) tests were performed to simulate the in-vivo storage stability, the administration via a syringe at the site of absorption, the solidification at body temperature and finally the stiffness of the hydrogel at the site of absorption.

All in all, jet milling has been identified as a method well suited for down-sizing the TAAC-particles and the potential benefits of smaller particles for intratympanal formulations have been confirmed by different in-vitro studies. Moreover, TAAc-loaded micelles have been prepared for the first time, which represent another promising formulation for inner ear administration.

8 LITERATURVERZEICHNIS

[1] Dumortier G., Grossiord J.L., Agnely F., Chaumeil J.C.: A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. Pharmaceutical Research 2006; 23(12):2709-28

[2] Charakterisierung von Triamcinolonacetonid-hältigen Hydrogelen zur intratympanalen Applikation nach Cochlea-Implantation, Klobasa J., Diplomarbeit Universität Wien, 2013

[3] Zou J., Sood R., Ranjan S., Poe D., Abo Ramadan U., Pyykkö I., Kinnunen P.K.J.: Size-Dependent Passage of Liposome Nanocarriers with Preserved Posttransport Integrity across the Middle-Inner Ear Barriers in Rats. Otology & Neurotology 2012, 33: 666-673

[4] Werning C.: Medizin für Apotheker. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2008, 3. Auflage

[5] Piu, X. Wang, R. Fernandez, L. Dellamary, A. Harrop, Q. Ye, J. Sweet, R. Tapp, D.F. Dolan, R.A. Altschuler, J. Lichter, C. LeBel: OTO-104: A Sustained-Release Dexamethasone Hydrogel for the Treatment of Otic Disorders. Otology & Neurotology 2010, 32(1):171-9

[6] Probst R., Grevers G., Iro H.: Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde. Thieme-Verlag 2008, 3.Auflage

[7] Mutschler E., Geisslinger G., Kroemer H. K., Ruth P., Schäfer-Korting M.: Mutschler Arzneimittelwirkungen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2008, 9. Auflage

[8] Aktories K., Förstermann U., Hofmann F., Starke K.: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Elsevier-Verlag 2005, 9.Auflage

[9] Ye Q., Tillein J., Hartmann R., Gstoettner W, Kiefer J.: Application of a Corticosteroid (Triamcinolon) protects Inner Ear Function after Surgical Intervention. Ear & Hearing 2007, 28(3):361-9

[10] Mezger T.G.: Das Rheologie Handbuch. Vincentz Verlag 2012, 3. Auflage

[11] Mastersizer 3000 User Manual, Malvern Industries LTD., Worcestershire, UK

[12] http://www.malvern.com/labger/products/mastersizer/mastersizer3000/mastersizer3000.htm

[13] Zetaziser nano series- user manual, Malvern Instruments LTD., Worcestershire, UK, 2003

[14] http://www.malvern.de/LabGer/products/zetasizer/datasheet.htm

[15] Wirth M., Pharmazeutische Nanotechnologie – mit Partikeln zur Zelle, Vorlesung Univesität Wien

[16] Optimierung der Herstellung und Reinigung von PLGA-Nanopartikeln, Teichmann C., Diplomarbeit Universität Wien, 2010

[17] Nürnberg E., Surmann P.: Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis, 2, Methoden. Springer Verlag 1991, 5. Auflage

[18] Bauer, Frömming, Führer: Pharmazeutische Technologie, Mit Einführung in die Biopharmazie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 2012, 9. Auflage

[19] Bedienungsanleitung für den EmulsiFlex®-C3, Hochdruck-Homogenisator, Avestin Inc.

[20] S. Jahnke: Mechanischer Nasszellaufschluss mit Hochdruckhomogenisatoren, GEA Niro Soavi Deutschland, 2008

[21 A. Töpel: Chemie und Physik der Milch: Naturstoff, Rohstoff, Lebensmittel; Behr´s Verlag, 2008

[22] P. Alexandridis, B. Lindman: Amphiphilic Block Copolymers, Self-Assembly and Applications. Elsevier Sience B. V., 2000, 1. Auflage

9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACN	Acetonitril
AP	artifizielle Perilymphe
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
CMC	kritische Mizellbildungskonzentration
CMT	kritische Mizellbildungstemperatur
DAD	Diode Array Detector
DLS	dynamische Licht Streuung, Dynamic Light Scattering
EtAc	Ethylacetat
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LLOD	Lower Limit of Detection
LLOQ	Lower Limit of Quantification
LVE-Bereich	linear-viskoelastischer Bereich
NH_4Ac-H_2O	2mM wässrige Ammoniumacetat-Lösung pH 3,0
ORO	Oszillation-Rotation-Oszillation
PBS	10 mM Phosphatgepufferte Salzlösung pH 7,4
PDI	Polydispersitätsindex
POX 407	Poloxamer 407; Pluronic® F-127 Prill; Kolliphor® P-407
TAAc	Triamcinolonacetonid
UpM	Umdrehungen pro Minute

10 LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Name	**Silvia Christine Weis**
Geburtsdatum	22. Juli 1989
Geburtsort	Wien
Staatsangehörigkeit	Österreich

Ausbildung

Seit Okt. 2007	**Studium der Pharmazie an der Universität Wien**
Mai/Jun. 2007	Reifeprüfung mit ausgezeichnetem Erfolg
1999 – 2007	Allgemeinbildende höhere Schule Billrothstraße 26-30, 1190 Wien
1995 – 1999	Volksschule Kreindlgasse 24, 1190 Wien

Berufliche Erfahrung

Okt. 2012 – Feb. 2014	**Tutorin an der Universität Wien** in den Übungen „Industrielle Arzneimittelherstellung“
Jul. 2013	**Mitarbeiterin „Kinderuni Wien“** (Lehrveranstaltung „Medikamente selbst herstellen“)
Okt. 2012 – Jul. 2013	**Diplomarbeit** am Departement für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Universität Wien
Okt. 2012 – Jun. 2013	**Tutorin an der Universität Wien** in den Übungen „Anwendung von Zellkulturen in der Pharmazeutischen Technologie“
Okt. 2011 – Jun. 2012	**Tutorin an der Universität Wien** in den Übungen „Grundpraktikum für pharmazeutische Technologie“
Mai 2010 – Aug. 2010	**Mitarbeiterin** (geringfügig beschäftigt) „Apotheke zum heiligen Paulus“, 1120 Wien