

**Emodepsid –
Bestimmung des Resorptionsortes und
Formulierungskonzepte zur Verbesserung der
Bioverfügbarkeit**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Petra Lange
aus Leverkusen

Düsseldorf, Mai 2011

aus dem Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Peter Kleinebudde
Korreferent: Prof. Dr. Jörg Breitzkreutz

Tag der mündlichen Prüfung: 07. Juli 2011

Inhalt

1 Einleitung	1
1.1 Wirkstoff Emodepsid	1
1.2 Unterschiedliche Formulierkonzepte	2
1.3 Biopharmazeutische Charakterisierung.....	7
2 Ziel der Arbeit	12
3 Ergebnisse und Diskussion.....	13
3.1 Formulierungskonzepte.....	13
3.1.1 Lipidextrudate	13
3.1.2 Mikroemulsionen	14
3.1.2.1 Herstellung	14
3.1.2.2 Vergleich mit Ciclosporin	16
3.1.3 Copräzipitate mit Povidon.....	18
3.1.3.1 Lösungsmittelauswahl und Herstellung der Copräzipitate.....	18
3.1.3.2 Restgehalt der Copräzipitate an Lösungsmitteln.....	21
3.1.3.3 Freisetzung	23
3.1.3.3.1 Filtertest.....	28
3.1.3.3.1 Freisetzung in biorelevanten Medien	30
3.1.3.4 Minitabletten	32
3.1.4 Copräzipitate mit Soluplus	35
3.1.5 Mikronisieren des Wirkstoffs.....	37
3.1.6 Schmelzextrusion	42
3.1.7 Tablettenformulierungen der Formulierungskonzepte.....	46
3.2 Bioverfügbarkeitsstudien	50
3.2.1 Allgemeines.....	50
3.2.2 Bioverfügbarkeitsstudie bei der Bayer Animal Health GmbH, Monheim.....	50
3.2.3 Bioverfügbarkeitsstudie bei externem Forschungsinstitut	52
3.2.4 Vergleich der Bioverfügbarkeitsstudien.....	52
3.3. Biopharmazeutische Charakterisierung.....	57
3.3.1 Einleitung	57
3.3.2 Magnetic Active Agent Release System - MAARS-Studie	57
3.3.2.1 Vorbereitungen.....	57

3.3.2.2 Vorversuche	58
3.3.2.3 Hauptversuch.....	60
3.3.3 Ligations-Technik	69
3.3.4 Vergleich der beiden Techniken	70
4 Zusammenfassung.....	72
5 Summary	74
6 Experimenteller Teil.....	76
6.1 Materialien	76
6.1.1 Chemikalien	76
6.2 Herstellungsmethoden.....	79
6.2.1 Herstellung Mikroemulsionssysteme, Wassereinarbeitung	79
6.2.2 Herstellung Copräzipitate.....	80
6.2.3 Herstellung Minitabletten.....	80
6.2.4 Mahlen des Wirkstoffs, Suspensionskonzentrat.....	81
6.2.5 Extrusion	81
6.2.6 Tablettenherstellung	82
6.3 Bioverfügbarkeitsstudien	82
6.3.1 Bioverfügbarkeitsstudie bei der Bayer Animal Health GmbH, Monheim.....	82
6.3.2 Bioverfügbarkeitsstudie bei externem Forschungsinstitut	83
6.4 Arzneistofffreisetzung.....	83
6.4.1 Freisetzung Copräzipitate.....	83
6.4.2 Freisetzung Tabletten	84
6.4.3 Freisetzung in biorelevantem Medium.....	84
6.5 Analytische Methoden.....	85
6.5.1 Bestimmung der Löslichkeit von Emodepsid in Ölen und Wachsen.....	85
6.5.2 Bestimmung der Löslichkeit von Emodepsid in unterschiedlichen Lösungsmitteln	86
6.5.3 Überprüfung des amorphen Zustandes des Copräzipiates	86
6.5.4 Filtertest.....	86
6.5.5 Schütt- und Stampfvolumen.....	86
6.5.6 Siebanalyse.....	86
6.5.7 Böschungswinkel	89
6.5.8 Friabilität	89
6.5.9 Bruchfestigkeit von Tabletten	89
6.5.10 Gleichförmigkeit der Masse	89

6.5.11 Zerfall und Zerfall modifiziert nach Kleinebudde	88
6.5.12 Viskositätsbestimmung	88
6.5.13 HPLC-Methoden	88
6.5.13.1 Freisetzungsmethode	88
6.5.13.2 Gehaltsbestimmungsmethode.....	89
6.5.14 GC-Methode.....	89
6.5.15 HPLC/MS/MS-Methode	90
6.5.16 Laserdiffraktometrie-Methode	91
6.5.17 Dynamische Differenzkalorimetrie	92
6.5.18 Röntgendiffraktometrie	92
6.5.19 Wasserbestimmung nach Karl-Fischer.....	93
6.5.20 Stabilitätsuntersuchungen, Klimakammern	93
6.5.21 Röntgenaufnahmen.....	93
6.5.22 Berechnung des Ähnlichkeitsfaktors.....	93
7 Literatur.....	95
8 Danksagung.....	103

Das Fehlen einer besonderen Kennzeichnung oder eines entsprechenden Hinweises auf ein Warenzeichen, ein Gebrauchsmuster oder einen Patentschutz lässt nicht den Schluss zu, dass über die in der Arbeit angegebenen Dinge frei verfügt werden kann.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
AUC	Area Under the Curve (Fläche unter der Kurve)
BCS	Biopharmaceutical Classification System
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Zentimeter
CMC	kritische Mizellenkonzentration
C_{\max}	Konzentrationsmaximum
d	Tag
d. h.	das heißt
dest.	destillata
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DSC	Differential Scanning Calorimetry (Dynamische Differenzkalorimetrie)
FaSSIF	Fasted State Simulated Intestinal Fluid
FeSSIF	Fed State Simulated Intestinal Fluid
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
GI-Trakt	Gastrointestinal-Trakt
h	Stunde
HF	high-frequency (Hochfrequenz)
HO-221	N-[[[4-(5-Bromo-2-pyrimidinyl)-3-chlorophenyl]amino]carbonyl]- 2-nitrobenzamid
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
IPA	Isopropanol (Isopropylalkohol)
i.v.	intravenös
k. d. F.	keine dominante Frequenz
kg	Kilogramm
l	Liter

LC-MS	Liquid Chromatography–Mass Spectrometry (Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung)
LM	Lösungsmittel
log P	Dekadischer Logarithmus des Oktanol-Wasser-Verteilungs- koeffizienten
m	Meter
MAARS	Magnetic Active Agent Release System
mEq	Milliäquivalent
mg	Milligramm
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
MW	arithmetischer Mittelwert
N	Newton
n	Anzahl der Messwerte
Q _r	Summenhäufigkeit
PEG	Polyethylenglykol
Ph. Eur.	Pharmacopoea Europaea (Europäisches Arzneibuch)
PVP	Polyvinylpyrrolidon
PVP-VA	Polyvinylpyrrolidon-Vinylacetat-Copolymer
rF	relative Luftfeuchtigkeit
RSD	Relative Standard Deviation (relative Standardabweichung)
s	Sekunde
SMEDDS	Self-Micro-Emulsifying-Drug-Delivery-System
SQUID	Superconducting Quantum Interference Device
Tab.	Tabelle
T _g	Glasübergangstemperatur
t _{max}	Zeit, an der die Konzentration eines Arzneistoffs im Blut maximal ist
U/min	Umdrehungen pro Minute
US	Ultraschall
USP	United States Pharmacopeia (Amerikanisches Arzneibuch)
XRD	x-ray diffraction (Röntgendiffraktometrie)

1 Einleitung

1.1 Wirkstoff Emodepsid

Es wird geschätzt, dass 40 % oder mehr der neu synthetisierten Wirkstoffe schwer löslich sind, mit steigender Tendenz (Lipinski 2002). Aufgrund dieser schlechten Wasserlöslichkeit sind die Löslichkeit oder die Permeabilität des Arzneistoffs durch die Zellmembran die limitierenden Faktoren für die Bioverfügbarkeit. Auch der Wirkstoff Emodepsid (Abb. 1), ein cyclisches Oktadepsipeptid, ist schlecht löslich und schlecht permeabel. Er lässt sich in die Kategorie 4 des Biopharmazeutischen Klassifizierungssystems (BCS) einordnen (Kasim 2004). Die Wasserlöslichkeit dieses Arzneistoffs liegt über einem pH-Bereich von 4 bis 10 bei 5 bis 7 mg/l. Damit zählt Emodepsid mit einer Löslichkeit $< 0,1$ mg/ml nach USP34-NF 29 (2011) zu den praktisch unlöslichen oder nicht löslichen Substanzen. Die absolute Bioverfügbarkeit nach oraler Gabe kann aufgrund fehlender i.v.-Daten nicht bestimmt werden. Die erwarteten Werte liegen zwischen 50 und 60 %.

Die Vorstufe des Wirkstoffes ist die Substanz PF 1022A, ein Produkt aus dem Sekundärstoffwechsel des Pilzes *Mycella sterilia*. Diese besteht aus vier N-Methyl-L-Leucinen, zwei D-Milchsäuren und zwei D-Phenylmilchsäuren, die ein zyklisches Oktadepsipeptid mit alternierender L-D-L-Konfiguration bilden. Bei Emodepsid, dem semisynthetischen Derivat von PF 1022A, ist an beiden D-Polymilchsäuren ein Morpholinring in Para-Position angehängt (Harder 2006).

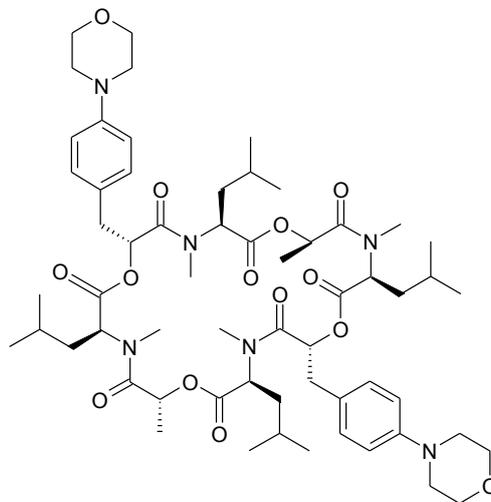


Abb. 1. Struktur von Emodepsid

Emodepsid ist ein Anthelmintikum und wirkt gegen Nematoden bei Geflügel, Mäusen, Ratten, Hunden, Katzen, Schafen, Rindern und Pferden. Bereits die Vorstufe PF1022A zeigt im Hund Wirksamkeit gegen den Hakenwurm *Ancylostoma caninum* (Samson-Himmelstjerna 2000). Dabei bindet der Wirkstoff spezifisch an den N-terminalen Bereich des präsynaptischen Latrophilin-Rezeptors, wodurch eine Signalübertragung durch Aktivierung eines Gαq-Proteins und Phospholipase C-β getriggert wird. Es kommt zu einer Erhöhung des intrazellulären Diacylglycerin-Spiegels, welcher UNC-13 und Synaptobrevin, zwei wichtige Proteine der präsynaptischen Vesikelfunktion, aktiviert. Dies wiederum führt zur Freisetzung eines inhibitorischen Neurotransmitters. So kommt es zu einer Lähmung der Pharynx und der somatischen Muskulatur, was schließlich zum Tod der Nematoden führt (Harder 2005).

Emodepsid kristallisiert in vier verschiedenen Modifikationen, die folgende Schmelzpunkte besitzen: Modifikation I: 191,9 °C, Modifikation II: 182,4 °C, Modifikation III: 157,8 °C und Modifikation IV: 145,0 °C. Modifikation I ist überraschenderweise die mit der höchsten Bioverfügbarkeit und damit der größten Wirksamkeit. Zu erwarten wäre, dass die Löslichkeit und die damit verbundene Bioverfügbarkeit mit zunehmender thermodynamischer Stabilität der kristallinen Form sinken. In dem auf dem Markt befindlichen Arzneimittel liegen über 99 % des Wirkstoffs in Modifikation I vor (Kalbe 2002).

Das Molekulargewicht von Emodepsid beträgt 1119,42 Gramm pro Mol (g/mol) und der Logarithmus des Oktanol-Wasserkoeffizienten (log P) 4,9. Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit kann der negative dekadische Logarithmus der Säurekonstante (pK_s-Wert) experimentell nicht bestimmt werden. Er wird aber aufgrund der basischen Aminogruppen und der Anilinstrukturen auf 5-6 geschätzt (Bay 44-4400 2007).

Der Wirkstoff zeigt die für lipophile Arzneistoffe typischen starken Plasmaspiegelschwankungen und besitzt eine relativ geringe therapeutische Breite. Die Dosierung beim Hund beträgt 1 mg pro kg Körpergewicht.

1.2 Unterschiedliche Formulierkonzepte

Um die Plasmaspiegelschwankungen von lipophilen Substanzen einzudämmen und die Bioverfügbarkeit zu erhöhen, existieren unterschiedliche Möglichkeiten. Tab. 1 zeigt verschiedene Formulierungen und chemische Ansätze zur Verbesserung der Löslichkeit oder zur Erhöhung der Auflösungsgeschwindigkeit (Leuner 2000).

Tab. 1. Ansätze zur Löslichkeitsverbesserung und Erhöhung der Auflösungsgeschwindigkeit

Physikalische Modifikation	Chemische Modifikation
Partikelgröße: Mikronisierung, Mikroemulsion, Nanosuspension	
Modifikation der Kristallform: Polymorphie, Pseudopolymorphie (inklusive Solvat), amorphe Substanz	lösliche Prodrugs
Komplexe/Solubilisation: Verwendung von Tensiden, Verwendung von Cyclodextrin, hydrophobe Substanzen	Salze
Dispersion in Trägersubstanzen: eutektisches Gemisch, feste Dispersion, feste Lösung	

Im Folgenden soll auf die in dieser Arbeit verwendeten Systeme näher eingegangen werden. Das Konzept der festen Dispersionen eignet sich besonders für Substanzen, deren Löslichkeit den limitierenden Faktor der Resorption darstellt (Chiou 1971). Ein Beispiel für eine feste Dispersion ist die Wirkstoffeinbettung in eine Fettmatrix, beispielsweise durch Extrusion. Die Lipidgrundlage kann die Gallensaftsekretion und die Permeabilität der Darmwand steigern und die Metabolisierung von Arzneistoffen verlangsamen (Porter 2007, Chakraborty 2009). Dabei werden kurzkettige Fettsäuren direkt aus dem Darmlumen resorbiert und über die Pfortader in die Leber transportiert. Langkettige Fettsäuren werden nach der Resorption in der Darmmukosa wieder in Triglyceride umgewandelt und gelangen mit Hilfe der Chylomikronen in das Lymphsystem. Es ist zu erwarten, dass auch Emodepsid zu einem nicht unerheblichen Maß über die Lymphe aufgenommen wird. Als Richtwert gilt, dass die lymphatische Resorption bei den Wirkstoffen relevant ist, die einen $\log P > 5$ und eine Löslichkeit in langkettigen Triglyceriden von $> 50 \text{ mg/g}$ besitzen (Charman 1986).

Ein weiteres Beispiel für eine solche Dispersion sind Mikroemulsionen. Diese sind optisch isotrope, klare Dispersionen von zwei nicht mischbaren Flüssigkeiten, die sich spontan bilden und thermodynamisch stabil sind (Eccleston 1992). Das Präkonzentrat der Mikroemulsion ist ein sogenanntes SMEDDS, ein Self-Micro-Emulsifying-Drug-Delivery-System. SMEDDS setzen sich aus einer Mischung aus Öl, Tensid und Cotensid zusammen (Charman 1992). Die eigentliche Mikroemulsion bildet sich erst im wässrigen Milieu des Gastrointestinaltraktes (GI-Traktes) aus. Durch den Zusatz hydrophiler Polymere lässt sich eine hohe Wirkstoffbeladung erreichen. Generell sind für die Ausbildung einer Mikroemulsion Arzneistoffe mit einem $\log P$ -Wert zwischen 2 und 4 am besten geeignet (Thi 2009). Die Löslichkeit des Wirkstoffes in der Grundlage ist Voraussetzung für die Herstellung einer Mikroemulsion. Besonders schwierig zu verarbeiten sind Arzneistoffe, die sich sowohl in wässrigen als auch in lipophilen Lösungsmitteln schlecht lösen. Als Richtwert gilt eine mindestens 10 %-ige Löslichkeit in dem SMEDDS-Medium. Ölige Formulierungen sind

geeignet für Wirkstoffe mit einem $\log P > 4$ (Pouton 2000). Bei verschiedenen Wirkstoffen konnte mit diesem Formulierungskonzept die Bioverfügbarkeit gesteigert werden, bei Silymarin um das 3,6 fache (Woo 2007), bei Halofantrin um das 6-8 fache (Khoo 1998) und bei Biphenyl-dimethyl-dicarboxylat sogar von mehr als das 12 fache (Chi 1999). Diese Steigerung ist möglich, wenn die Löslichkeit des Arzneistoffs den limitierenden Faktor in der Bioverfügbarkeit darstellt. Eine ideale Formulierung hält den Wirkstoff während der Magen-Darm-Passage in Lösung, so dass er molekulardispers vorliegt.

Allgemein können Wirkstoffe in festen Dispersionen amorph, molekulardispers oder kristallin sein. Die Herstellung kann durch Lösen oder Schmelzen erfolgen. Breitenbach (2003) unterteilt die festen Dispersionen in 1- und 2-Phasen-Systeme (Tab. 2).

Tab. 2. Unterteilung der festen Dispersionen nach Breitenbach (2003)

1 Phase	2 Phasen
Mischung/Komplex Formulierung gläserne feste Lösung feste Lösung	Glassuspension eutektisches Gemisch amorphes Präzipitat feste Kristallsuspension

Das Copräzipitat kann sowohl 1- als auch ein 2-phasig sein. Es wird hergestellt, indem Wirkstoff und Trägerkomponente gelöst werden und das Lösungsmittel anschließend wieder abgezogen wird. Dabei liegt die amorphe Form eines Wirkstoffs entweder in einem amorphen oder kristallinen Träger- bzw. Hilfsstoff vor. Copräzipitate sind seit den 70er Jahren ein anerkanntes Verfahren, um die Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen zu erhöhen. Bereits 1965 entwickelten Tachibana und Nakamura die ersten Copräzipitate, in dem sie β -Carotin mit verschiedenen wasserlöslichen Polymeren in unterschiedlichen Lösungsmitteln lösten und das Lösungsmittel wieder abzogen (Tachibana 1965). Der amorphe Zustand des Copräzipitates ist metastabil. Bei der Lagerung kann es zur Rekristallisation kommen. Diese Eigenschaft besteht unabhängig vom Molekulargewicht des Polymers und ist alleine vom Anteil des Polymers abhängig. Bei Indometacin konnte die Rekristallisation durch den Zusatz von Polyvinylpyrrolidon (PVP) verhindert werden (Matsumoto 1999). Khoo (2000) konnte mit Hilfe des wasserlöslichen Polymers Polyethylenglykol 6000 die absolute Bioverfügbarkeit von Halofantrin beim Hund um das 7-fache steigern. Für Carbamazepin konnte mit Hilfe von PVP-30 die Bioverfügbarkeit im Vergleich zur kristallinen Substanz vervierfacht werden (Sethia 2004).

Simonelli (1969) untersuchte die Lösungseigenschaften von Sulfathiazol mit PVP unterschiedlicher Molekulargewichte im Verhältnis 1:2 und konnte zeigen, dass die Freisetzungsgeschwindigkeit mit sinkendem Molekulargewicht des Polymers zunimmt.

Zusätzlich stellte er fest, dass eine Erhöhung des PVP-Anteils zu einer schnelleren Wirkstofffreisetzung führt. Ab einem Anteil $> 90\%$ PVP ist die Freisetzungsgeschwindigkeit gleichbleibend. Auch die Wasserlöslichkeit von Glibenclamid konnte in Form eines Copräzipitates erhöht werden. Hier erreichen PVP-Anteile von $\geq 80\%$ die höchste Löslichkeit (Iwata 1996). Die Löslichkeit, als auch die Lösungsgeschwindigkeit können durch den PVP-Anteil gesteuert werden. El-Arini (1998) hat mit PVP-30 und Praziquantel, einem Anthelmintikum gegen *Plathelminthes*, den Plattwürmern, ein Copräzipitat hergestellt und konnte durch den Polymerzusatz eine Kinetik nahezu nullter Ordnung erreichen. Dieser Wirkstoff ist von besonderem Interesse, da er aufgrund seines synergistischen Wirkspektrums mit Emodepsid kombiniert wird.

Eine Möglichkeit eine gläserne feste Lösung herzustellen, ist die Schmelzextrusion. Hier kann der Arzneistoff molekulardispers in einem amorphen oder kristallinen Hilfsstoff vorliegen. In der Regel wird der Wirkstoff oberhalb der Glasübergangstemperatur (T_g) des Polymers in dessen Matrix gelöst. Bei ausreichender Löslichkeit im erweichten Trägermaterial kann auch unterhalb der T_g extrudiert werden. Bei unzureichender Löslichkeit liegt der Wirkstoff teilweise noch kristallin vor (Forster 2000). Als Hilfsstoffe für die Schmelzextrusion eignen sich Substanzen mit thermoplastischen Eigenschaften, die in Wasser löslich oder quellbar sind. Die Interaktion zwischen Polymer und Wirkstoff kann auf Wasserstoffbrückenbindungen, ionischen Wechselwirkungen oder Van-der-Waals-Kräften beruhen. Beispielsweise beruht die Wechselwirkung zwischen Indometacin und PVP auf Wasserstoffbrückenbindungen. Die Carbonylgruppen und/oder C-N-Gruppen des Pyrrolidinrings des Polymers fungieren hierbei als Protonenakzeptoren und die Wasserstoffatome des Wirkstoffs als Donatoren (Taylor 1997). Sowohl mit PVP als auch mit Polyvinylpyrrolidon-Vinylacetat-Copolymer (PVP-VA) lassen sich feste Dispersionen herstellen (Corrigan 1985, Shamblin 1999). PVP-VA hat den Vorteil, dass es mit 98 °C eine niedrigere Glasübergangstemperatur als PVP-17 (130 °C) und PVP-25 (155 °C) besitzt. Die T_g von PVP-12 beträgt 93 °C und liegt damit in einem ähnlichen Bereich wie das PVP-VA. Da die Extrusionstemperatur in der Regel oberhalb der T_g des Polymers liegt, darf die T_g des Polymers nicht zu hoch sein, damit es nicht zu einer Zersetzung des Wirkstoffs kommt. Andererseits darf sie auch nicht zu niedrig sein, da dies die Lagerstabilität beeinflussen kann. Bei einer T_g , die um 50 °C höher als die Lagertemperatur ist, kann davon ausgegangen werden, dass der amorphe Zustand lagerstabil ist (Yoshioka 1995).

Eine weitere physikalische Möglichkeit die Bioverfügbarkeit von schwer löslichen Arzneistoffen zu erhöhen, liegt in der Mikronisierung des Wirkstoffs durch Mahlen. Dieser Prozess kann in Trocken- und Nassmahlverfahren unterschieden werden. Zu den Nassmühlen zählen die Kolloid- und die Rührwerkskugelmühle, zu der wiederum die Perlmühle zuzuordnen ist. Bei diesem Mühlentyp, der aus einem zylindrischen Mahlbehälter und einem Rührwerkzeug aus einer mit mehreren Scheiben besetzten Rotationsachse besteht, erfolgt die Zerkleinerung des Mahlgutes durch Scher- und Reibkräfte, die die Scheiben zwischen den Mahlkörpern erzeugen. Während des Mahlens kann durch die richtige Auswahl des Dispergiermittels die Agglomeration der Pulverpartikel verhindert werden. Die Effektivität der Zerkleinerung in Bezug auf die Bioverfügbarkeitserhöhung konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden. Sowohl für Estradiol, als auch für N-[[[4-(5-Bromo-2-pyrimidinylloxy)-3-chlorophenyl]amino]carbonyl]-2-nitrobenzamid (HO-221) konnte durch eine Verkleinerung der Partikel um den Faktor 10 die Fläche unter der Kurve (AUC) verdoppelt werden (Englund 1981, Kondo 1993). Allerdings ist der Einfluss auf die Bioverfügbarkeit wirkstoffabhängig. Bei dem schwerlöslichen Wirkstoff LAB687 hatte das Mikronisieren keinen Einfluss auf die AUC und die C_{max} . (Dannenfelser 2004). Wichtig ist es, beim Nassmahlen ein Dispergiermittel auszuwählen, in dem der Arzneistoff sehr schlecht löslich ist, damit sich vor allem die kleinen Partikel nicht in der Grundlage lösen. Falls es sich um eine lipophile Grundlage handelt, kann die Bioverfügbarkeit zusätzlich durch das ölige Medium gesteigert werden, wenn die lymphatische Resorption angeregt wird. Allerdings werden dafür große Mengen Lipide benötigt, beim Menschen 2-3 g prä- und 7 g postprandial (Persson 2006).

Plasmaspiegelschwankungen von Retardarzneiformen können durch multipartikuläre Darreichungsformen wie Minitabletten oder Pellets reduziert werden. Diese gelangen gleichmäßig vom Magen in den Darm und werden nicht, wie monolithische Arzneiformen, vom Pylorus zurückgehalten. (Graffner 1986, De Brabander 2000). Als kritische Größe gilt ein Durchmesser von 4 mm beim Hund und ab 7 mm beim Menschen (Coupe 1991). Partikel dieser Größe und größer verlassen den Magen nur in der Phase III-Motilität (Itoh 1986). In dieser Phase, die nur im nüchternen Zustand vorkommt, werden sie von sogenannten Putzwellen (Housekeeper Waves) vom Magen in den Dünndarm überführt. Beim Hund findet sie etwa alle 106 Minuten statt und dauert ca. 19 Minuten (Dressman 1986, Russel 1985). Darüber hinaus können multipartikuläre Darreichungsformen die Bioverfügbarkeit erhöhen (Hovi 1983) und die Tag-zu-Tag-Variation (Sandberg 1993) und den Nahrungsmiteleinfluss auf die Plasmaspiegel reduzieren (Midha 1993). Minitabletten haben gegenüber Pellets den

Vorteil einer einheitlicheren Größe und gleichmäßigeren Oberfläche mit niedrigerer Porosität, was dazu führt, dass bei einem möglichen Überziehen der Tabletten weniger Material benötigt wird (Munday 1994). Bei einer genügend guten Fließfähigkeit des Materials ist eine Direkttablettierung möglich (Flemming 1996). Somit lassen sich Minitabletten schneller und einfacher herstellen als Pellets. Allerdings wird ein spezielles Tablettierwerkzeug benötigt, welches aufgrund der geringen Größe von Matrize und Stempel mechanisch empfindlich ist. Ein weiterer Vorteil von multipartikulären Systemen besteht in der Möglichkeit sie auf das Futter aufzustreuen. Somit kann eine zwanghafte Applikation des Arzneistoffs am Tier vermieden werden.

1.3 Biopharmazeutische Charakterisierung

Eine grundlegende Voraussetzung, Plasmaspiegelschwankungen von Arzneistoffen zu minimieren, ist das Wissen um den Ort der Resorption. Es gibt Arzneistoffe, wie Bicalutamid, die im gesamten Intestinaltrakt resorbiert werden (Goa 1998), und solche, die ein sogenanntes Resorptionsfenster aufweisen. Hier sind Vitamin C (Yung 1982) und Riboflavin als Beispiele (Klausner 2002) zu nennen. Wichtig ist die Kenntnis des Resorptionsortes auch für Arzneistoffe, die lokal im Magen-Darm-Trakt wirken. Der Wirkstoff kann dort entweder gezielt aus der Arzneiform freigesetzt werden oder er wird an dem Aufnahmefenster vorbeigeführt, um hohe Konzentrationsmaxima und Flächen unter der Kurve (AUCs) und damit verbundene Nebenwirkungen zu vermeiden.

Zur Bestimmung des Resorptionsortes existieren in vivo unterschiedliche Methoden (Tab. 3).

Tab. 3. Unterschiedliche Möglichkeiten zur Bestimmung des Resorptionsortes

Ussing-Kammer Ligations-Technik Kapselsysteme: InteliSite-Kapsel, Telematic-Kapsel, HF-Kapsel, Enterion-Kapsel, SQUID-Magnetfeldsensorik, MAARS
--

Die Ussing-Kammer wurde anhand von Froschhaut entwickelt (Ussing 1951). Dabei können sowohl unterschiedliche Darmepithelabschnitte als auch Teile des Magens in eine von Hans Ussing entwickelte Kammer eingespannt und die durch das Epithel transportierte Wirkstoffmenge gemessen werden (Leithner 2011). Unmittelbar nach dem Töten des Tieres wird der entsprechende Magen- oder Darmabschnitt entnommen und die Epithelschicht mit der *Lamina propria mucosae*, der Bindegewebsschicht, von der Muskelschicht vorsichtig

abgezogen. Eine Bestimmung durch die komplette Darmschleimhaut ist aufgrund ihrer Dicke nicht möglich. Generell kann der Ionentransport über mehrere Stunden nach Entnahme des Gewebes gemessen werden, da die Eigenschaft des Stofftransportes der Schleimhaut über eine gewisse Zeit aufrechterhalten wird.

Eine weitere Möglichkeit, den Resorptionsort von Substanzen zu bestimmen, ist die Ligations-Technik. Dabei wird das Tier zunächst mit Thiopental anästhesiert, der Bauchraum geöffnet, ein Darmabschnitt, entweder Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum, Colon oder Rectum, abgebunden, der Wirkstoff injiziert und in regelmäßigen Zeitabständen über drei Stunden Blutproben entnommen. Im Anschluss werden die Fäden wieder entfernt und das Hautgewebe vernäht. In der postoperativen Phase wird der Hund mit Schmerzmitteln und Antibiotika behandelt um Entzündungen zu vermeiden (Gatne 2011). Diese Methode wurde im Rahmen dieser Dissertation das erste Mal am Hund angewandt. Zuvor hat sie sich mit einem anderen Wirkstoff in Hühnern und Schweinen bewährt.

Eine alternative Methode den Resorptionsort zu bestimmen, ist die Verwendung von wirkstoffgefüllten Kapseln, die sich durch unterschiedliche Mechanismen von außen öffnen lassen. Im Laufe der Jahre wurden für diese Art von Studien unterschiedliche Kapselsysteme entwickelt (Wilding 2000, Wilding 2003). Die IntelliSite-Kapsel wird elektronisch gesteuert. Zur Stromversorgung ist bei dieser und der Telematic-Kapsel eine Batterie innerhalb der Kapsel notwendig. Bei der Hochfrequenz (HF)- und der Telematik-Kapsel findet eine Umwandlung von elektromagnetischer Strahlung in Wärmeenergie statt. Diese Kapseln lassen sich im Körper mit röntgenographischen und szintigraphischen Methoden lokalisieren. Bei der IntelliSite-Kapsel ist eine reproduzierbare Wirkstofffreigabe bisher nicht möglich (Mummaneni 1999). Auch bei der Enterion-Kapsel, bei welcher der Wirkstoff mit Hilfe eines aktiven Federmechanismus freigegeben wird, erfolgt die Lokalisation der Kapsel mittels Szintigraphie über ein Radionukleotid. Diese Kapsel kam bei der Entwicklung von Arzneiformen mit den Wirkstoffen Faropenem-Daloxat und Oseltamivir zum Einsatz (Sorbera 2002, Oo 2003). Aufgrund des komplexen Aufbaus der Kapseln ist neben der Strahlenbelastung die Größe der limitierende Faktor bei der Anwendung im Kleintier.

Ein Verfahren, welches auf Magnetismus beruht, ist die Superconducting Quantum Interference Device (SQUID)-Magnetfeldsensorik. Hier wird magnetisches Eisenoxid (Magnetit) in Tabletten eingearbeitet und aufmagnetisiert. Da der magnetische Dipol nur eine geringe remanente Magnetisierung aufweist, werden teure, hoch empfindliche Magnetfeldsensoren, die mit flüssigem Helium gekühlt werden müssen, und eine spezielle

magnetische Abschirmkammer benötigt. All diese Gegebenheiten führen zu einem aufwendigen und kostenintensiven Verfahren (Weitschies 1997, 2001, 2005).

Ein anderes magnetisches System ist das Magnetic Active Agent Release System, genannt MAARS. Die bei diesem Verfahren verwendete Kapsel besteht aus 7 Einzelteilen aus einer Eisen-Chrom-Cobalt-Legierung, beschichtet mit Parylen N (Poly-rapa-Xylylen). Parylen N ist ein durch die behördliche Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelzulassungsbehörde der Vereinigten Staaten (FDA) zertifiziertes, biokompatibles Beschichtungsmaterial (Abb. 2). Dieser Überzug schützt das Kapselmateriale vor Korrosion. Die Einzelteile der Kapsel werden zusammengesetzt, aufmagnetisiert und können in diesem aufmagnetisierten Zustand auf ihrem Weg durch den GI-Trakt verfolgt werden.

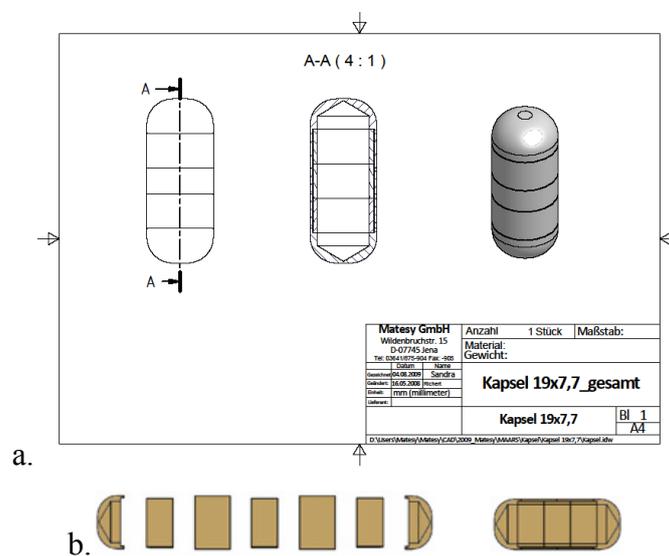


Abb. 2. a. Konstruktionszeichnung der MAARS-Kapsel, b. Schema der Kapsel: Einzelteile und zusammengefügte Kapsel

Wenn sich die Kapsel an ihrem Bestimmungsort befindet, kann sie durch ein abklingendes, alternierendes Magnetfeld eines elektrischen Schwingkreises, bestehend aus Kondensatorbatterie und Spule, von außen geöffnet werden (Abb. 3).



Abb. 3. Entmagnetisierungseinheit

Für das Abklingen der magnetischen Feldstärke sind die intrinsischen, elektrischen Verluste verantwortlich. Als Folge ziehen sich die einzelnen Kapsel­elemente nicht mehr an und geben den Wirkstoff frei (Richert 2003). Allgemein muss die Kapsel so konstruiert sein, dass sie zum einen die mechanischen Kräfte des Transportes übersteht und zum anderen leicht zu öffnen ist. Beim Hund und beim Menschen liegen die Kräfte, die im Dünndarm auf die Kapsel einwirken, zwischen 0,8-1,2 N (Kamba 2002). Beim Hund betragen sie im Magen 3,2 N und beim Menschen maximal 1,9 N (Kamba 2001). Die benötigte Haftkraft zwischen den einzelnen Kapselteilen wird erreicht, indem der magnetische Fluss beim Aufmagnetisieren eingeschlossen wird. Allerdings darf nicht das komplette Magnetfeld eingeschlossen werden, da es ansonsten kein Streufeld mehr gibt, über das die Kapsel lokalisiert werden kann (Abb. 4).

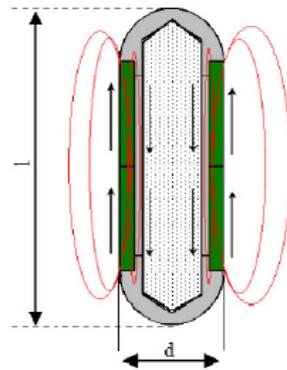


Abb. 4. Schematische Darstellung der magnetischen Flüsse einer aufmagnetisierten Kapsel (grün = hartmagnetisches Material, grau = weichmagnetisches Material), d = Durchmesser

Daher muss ein Kompromiss zwischen hoher Haftkraft und hinreichend großem Streufeld gefunden werden. Die Kapsel kann während ihres Transportes durch den Magen-Darm-Trakt innerhalb der magnetischen Feldsensoren aufgrund ihres magnetischen Feldes verfolgt werden. Die Lage der Kapsel ergibt sich aus sechs Freiheitsgraden: den kartesischen Koordinaten, zwei Winkeln für die Orientierung und dem magnetischen Moment (Richert 2005). Neben dieser 3D-Lokalisation, lässt sich die Kapsel auch anhand unterschiedlicher Muskelkontraktionsfrequenzen in den verschiedenen Bereichen des Gastrointestinaltraktes den einzelnen Darmabschnitten zuordnen (Hocke 2009). Für den Hund sind folgende Frequenzen für die peristaltischen Wellen bekannt (Engelhardt 2005) (Tab. 4).

Tab. 4. Gastrointestinale Abschnitte und deren peristaltische Wellen

Abschnitt des GI-Traktes	Maximale Frequenz [Kontraktionen/Zeit]
Magen	5,2/min
Dünndarm:	
Duodenum	15,8-17,8/min
Jejunum	17,0-17,7/min
Ileum	13,3–13,8/min
Dickdarm	0,1/h (Riesenkontraktionen)

Das Verfahren der MAARS-Kapsel wurde am Menschen entwickelt. Eine Übertragung auf das Tier muss aufgrund der meist horizontal ausgerichteten Darmachse individuell überprüft werden. Bei der Spezies Schwein lässt sich diese Technik beispielsweise nicht anwenden, da die Kapsel im Magen verbleibt (Stallmann 2008). Am Hund wurde dieses System im Rahmen dieser Arbeit das erste Mal angewendet.

2 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Arzneizubereitungen des Wirkstoffes Emodepsid zu entwickeln, die eine höhere Bioverfügbarkeit aufweisen als eine einfache Lösung. Gleichzeitig sollen nach Möglichkeit die Plasmaspiegelschwankungen des Arzneistoffs minimiert werden. Zu diesem Zweck werden folgende Formulierkonzepte getestet und deren Machbarkeit überprüft: Mikroemulsionen, Schmelzextrudate, Copräzipitate und Mikronisieren des Wirkstoffs. Die erwartete Bioverfügbarkeitserhöhung beruht auf unterschiedlichen Konzepten. Zum einen wird die Lösungsgeschwindigkeit des Wirkstoffs erhöht und zum anderen der Wirkstoff beim Transport durch den Magen-Darm-Trakt länger in Lösung gehalten.

Ferner soll ein geeignetes Konzept entwickelt werden, den Resorptionsort von Arzneistoffen direkt im Hund zu bestimmen. Dabei wird eine invasive gegen eine nicht-invasive Methode getestet. Als Modellarzneistoff dient wiederum Emodepsid.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Formulierungskonzepte

3.1.1 Lipidextrudate

Ein Anzeichen, ob ein Wirkstoff über die Lymphe resorbiert wird und Fett die Aufnahme begünstigt, ist ein höherer Blutspiegel nach Verabreichen des Arzneistoffs nach fettreicher Nahrung. Für den Wirkstoff Emodepsid ist dieser Nahrungsmiteleinfluss bekannt. Der log P-Wert dieses beträgt 4,9. Aus der Literatur ist bekannt, dass ab einem log P-Wert von 4,7 lymphatische Resorption stattfindet und ab einem Wert von 5 eine zentrale Rolle spielt (Charman 1986). Darüber hinaus sollte die Löslichkeit in langkettigen Triglyceriden > 50 mg/g sein. Um zu überprüfen, ob Emodepsid dieses Kriterium erfüllt, wird die Löslichkeit in verschiedenen Ölen und Wachsen bestimmt (6.5.1). Sie beträgt in Rizinusöl 3,4 mg/g, in Neutralöl (Miglyol 812) etwa 1,5 mg/g und in allen anderen getesteten Substanzen weniger als 1 mg/g (Abb. 5). Die Löslichkeit in Paraffin lässt sich aufgrund unzureichender Benetzung des Wirkstoffs nicht bestimmen.

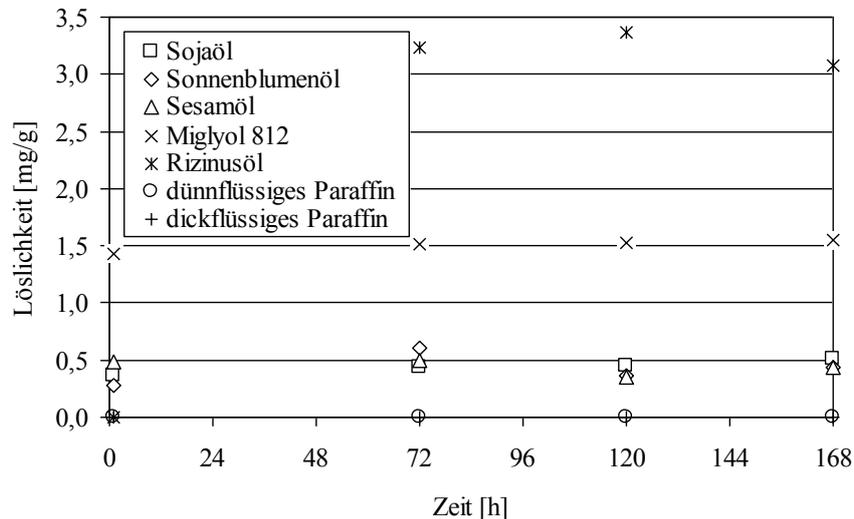


Abb. 5. Löslichkeit von Emodepsid in verschiedenen lipophilen Flüssigkeiten bei 25 °C, n = 3, MW

Aufgrund der schlechten Löslichkeit in den getesteten lipophilen Grundlagen wird das Konzept der Lipidextrusion, trotz erster erfolgreicher Extrusionsversuche, verworfen.

3.1.2 Mikroemulsionen

3.1.2.1 Herstellung

Es ist bekannt, dass Mikroemulsionen die Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen erhöhen kann (Woo 2007, Chi 1999). Um zu überprüfen, ob sich auch mit Emodepsid Formulierungen dieser Art herstellen lassen, wird zunächst die Löslichkeit in unterschiedlichen Lösungsmitteln (LM) (Tab. 5) bestimmt (6.2.1). Allgemein gilt die Regel, dass sie in der Grundlage mindestens 10 % betragen sollte.

Tab. 5. Löslichkeit von Emodepsid und Ciclosporin in verschiedenen Lösungsmitteln bei 25 °C

Lösungsmittel	Emodepsid-Löslichkeit [%]	Ciclosporin-Löslichkeit [%]
Benzylalkohol	5,01	-
Benzylbenzoat	4,52	-
n-Butanol	0,88	-
Capryol 90	0,87	2,52
Cremophor EL	0,49	2,57
N, N-Dimethylamin	2,53	13,79
Erdnussöl	0,12	1,87
Ethanol 96 %	3,71	19,82
Ethyloleat	0,07	-
Glycerin	0,00*	2,62
Isopropylmonostearat	0,08	4,56
Labrasol	0,01	2,15
Linolsäure	1,00	2,49
Maiskeimöl	0,06	1,90
Miglyol 810	0,17	-
N-Methylpyrrolidon	5,68	20,33
Ölsäure	0,56	2,21
Olivenöl	0,07	0,99
PEG 200	0,36	2,62
PEG 300	0,33	1,95
PEG 400	0,00	2,30
Propylenglycol	0,36	1,83
Rizinusöl	0,26	1,40
Sesamöl	0,06	0,99
Sojabohnenöl	0,06	1,03
Solutol HS 15	0,15	-
Span 80	0,46	2,66
Tetraethylenglycol	0,32	3,93
α-Tocopherol	0,30	3,13
Tween 20	0,41	0,96
Tween 60	0,24	0,94
Tween 80	0,52	0,88
Tween 85	0,43	1,25
Weizenkeimöl	0,07	1,97

* verursacht durch eine unzureichende Benetzung des Materials

Bei Betrachtung der Löslichkeiten fällt auf, dass Emodepsid in den ausgewählten Substanzen schlecht bis sehr schlecht löslich ist. Dennoch werden aus den LM mit der höchsten Löslichkeit Mikroemulsionen hergestellt, da nicht auszuschließen ist, dass der Wirkstoff in Lösungsmittelgemischen besser löslich ist als in den Einzelkomponenten. Als lipophile Komponente werden Linolsäure und Ölsäure ausgewählt, da sich Emodepsid hier am besten löst. Tween 20, Tween 80, Propylenglycol, Cremophor EL, PEG 200, Span 85, Span 20, Tween 85, Ethanol und α -Tocopherol werden als Tenside und Cotenside verwendet und zusammen mit dem Öl kombiniert. Bei den klaren bzw. leicht opaleszierenden Mischungen werden zunächst steigende Mengen Wasser eingearbeitet (6.2.1). Auf Grundlage dieser Ergebnisse werden Phasendiagramme erstellt. In Abb. 6 sind zwei ternäre Systeme dargestellt, in die sich mehr Wasser einarbeiten lässt, als sich LM in der Vorlage befindet. An jedem der eingetragenen Punkte liegt, unabhängig von der Farbe, ein klares System vor.

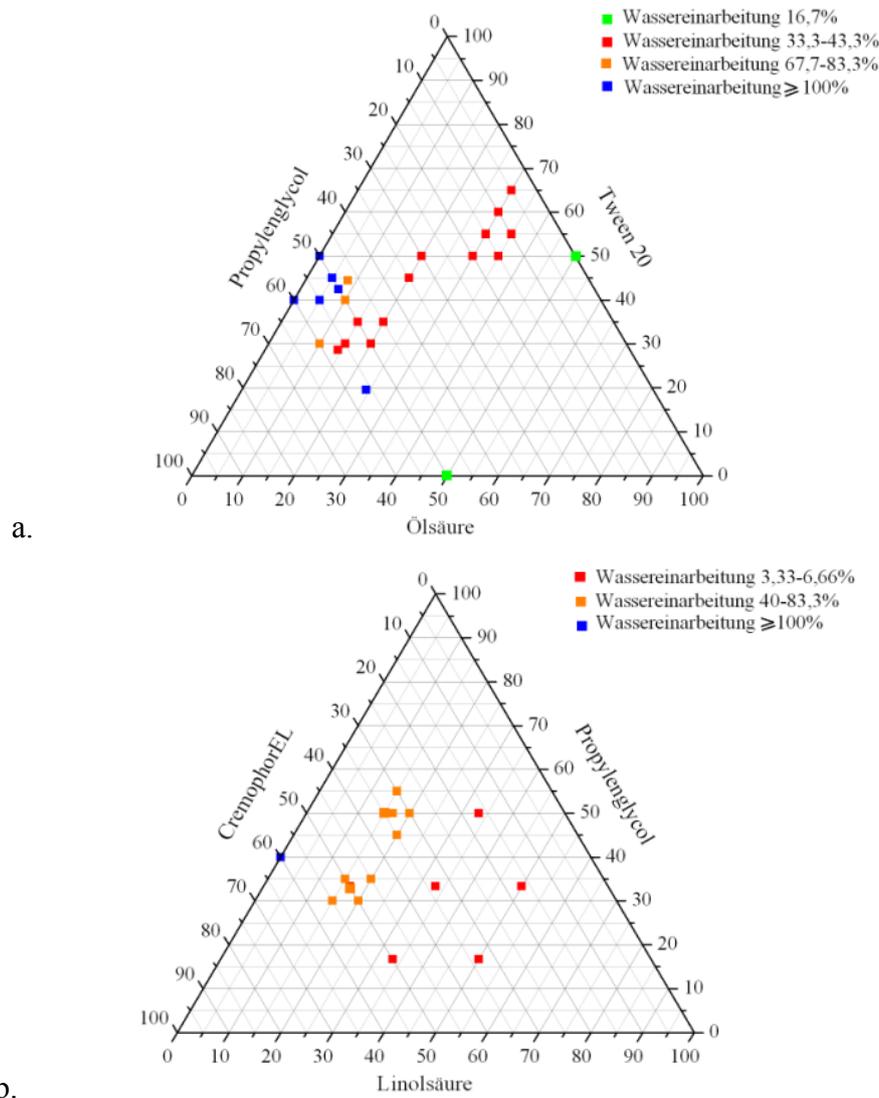


Abb. 6. Phasendiagramme zweier Mikroemulsionsformulierungen: Zusammensetzung a. Ölsäure, Propylenglycol, Tween 20, b. Linolsäure, Cremophor EL, Propylenglycol und deren Wasseraufnahmevermögen

Bei den Mischungen mit Ölsäure steigt die Wassereinarbeitungskapazität mit der Zunahme des Tween 20- und der Abnahme des Ölsäureanteils. Bei der Kombination mit Linolsäure lässt sich umso mehr Wasser einarbeiten, je hydrophiler das System ist. Generell ist die Einarbeitung von Wasser wichtig, da sich erst im Körper, in Kontakt mit Wasser, eine Mikroemulsion ausbildet. Verabreicht wird ein Mikroemulsionspräkonzentrat, bestehend aus einem Öl, einem Tensid und einem Cotensid.

Von den Mischungen, in die sich mehr als 100 % Wasser einarbeiten lassen, wird, ungeachtet, ob es sich durch den hohen Tensidanteil oder der ausgeprägten Hydrophilie nach Definition noch um eine Mikroemulsion handelt, die Löslichkeit von Emodepsid bestimmt. Die maximale Löslichkeit bei einer Kombination aus Ölsäure, Tween 20 und Propylenglycol beträgt 5 g/l, also 0,5 %. Dieser Wert liegt deutlich unter den geforderten 10 %. Auch andere, vergleichbare Systeme, zeigen keine größere Löslichkeit. Somit ist das Herstellen einer Mikroemulsion mit den getesteten Bestandteilen mit einer ausreichenden Wirkstoffbeladung nicht möglich.

Darüber hinaus soll versucht werden, ob sich aus Komponenten, die sich in der Vergangenheit für das Ausbilden von Mikroemulsionen bewährt haben, Präkonzentrate herstellen lassen (firmeninterne Daten). Zu diesem Zweck werden die LM Miglyol 810, Cremophor EL, n-Butanol, Benzylalkohol, Rizinusöl, Ethyloleat, Benzylbenzoat und Solutol HS 15 miteinander kombiniert. Allerdings ist es auch mit diesen Komponenten nicht möglich, Mikroemulsionen mit einer ausreichenden Wirkstoffkonzentration herzustellen. Die maximale Löslichkeit von Emodepsid wird in der Mischung aus Cremophor EL, n-Butanol, Benzylalkohol und Ethyloleat gemessen (6.5.2) und beträgt 0,8 %. Für die Einzelkomponenten gelten die in Tab. 5 aufgezeigten Werte.

Von den getesteten Substanzen löst sich Emodepsid am besten in Benzylalkohol. Dieser Alkohol ist zwar als Konservierungs-, Lösungs- und Desinfektionsmittel in Arzneimitteln zugelassen, allerdings unterliegt er einer Tageshöchstmengenbeschränkung von 5 mg/kg Körpergewicht beim Menschen und gilt als Allergen (FAO/WHO 2005).

3.1.2.2 Vergleich mit Ciclosporin

Eine Mikroemulsionspräkonzentratformulierung mit einer Arzneimittelzulassung ist das Präparat Sandimmun der Firma Novartis. Dieses wird in Deutschland und Luxemburg als Sandimmun Optoral und im europäischen Ausland sowie weltweit als Sandimmun Neoral vertrieben. Es enthält unter anderem als LM Ethanol, Propylenglykol und α -Tocopherol (Fachinformation Sandimmun 2010). Meinzer konnte 1995 zeigen, dass das Präkonzentrat, im

Vergleich zum kristallinen Wirkstoff und einer öligen Wirkstoffformulierung, eine höhere Bioverfügbarkeit, bei gleichzeitig geringerer Variabilität und geringerem Nahrungsmiteleinfluss, hat.

Aufgrund der molekularen Ähnlichkeit von Emodepsid und Ciclosporin - beides sind zyklische Peptide mit ähnlichem Molekulargewicht und ähnlichem pKs-Wert - wird versucht, das beim Ciclosporin erfolgreich angewendete Konzept auf Emodepsid zu übertragen.

Ciclosporin selbst ist ein zyklisches Peptid, bestehend aus 12 Aminosäuren und wird aus den Schlauchpilzen *Tolyocladium inflatum* und *Cylindrocarpon lucidum* gewonnen. Das Molekulargewicht beträgt 1.202,6 g/mol (Sicherheitsdatenblatt Ciclosporin 2010), der pKs-Wert liegt bei 6,9 und der log P-Wert bei 2,9. Der Wirkstoff fällt, wie auch Emodepsid, in die BCS-Kategorie 4. Allerdings ist er in den Lösungsmitteln, aus denen das Fertigarzneimittel Sandimmun Optoral zusammengesetzt ist, deutlich besser löslich (Tab. 5). Das gleiche gilt auch für die Löslichkeit in den anderen getesteten LM. Dies erklärt, warum sich eine Mikroemulsion mit Ciclosporin, aber nicht mit dem Emodepsid, herstellen lässt.

3.1.3 Copräzipitate mit Povidon

3.1.3.1 Lösungsmittelauswahl und Herstellung der Copräzipitate

Das Konzept der Copräzipitate ist ein bewährtes Verfahren, die Bioverfügbarkeit von schlecht löslichen Arzneistoffen zu erhöhen. Allgemein werden Copräzipitate hergestellt, indem Wirkstoff und Polymer in einem organischen Lösungsmittel gelöst werden und das LM anschließend unter Verdampfung wieder entfernt wird (6.2.2). Als Polymer wird Polyvinylpyrrolidon-25 (PVP-25) ausgewählt und als LM dient zum einen Ethanol und zum anderen eine 1:1-Mischung von Aceton und Isopropanol (IPA). Die Löslichkeit von Emodepsid beträgt in Isopropanol < 0,1 % und in Aceton etwa 10 %. Das PVP wiederum ist in Isopropanol > 10 % löslich und in Aceton < 10 % (Kolter 2010).

Beim Trocknen des Copräzipitates im Trockenschrank ist es wichtig, die Temperatur schrittweise zu erhöhen. Durch das angelegte Vakuum, etwa 20 mbar, ist der Siedepunkt von Aceton und Isopropanol erniedrigt. Das LM muss langsam verdampft werden, damit es von der Vakuumpumpe abgezogen werden kann und nicht an den Scheiben des Trockenschrankes kondensiert. Während des Verdampfens wird der Ansatz zunächst zähflüssig, bevor sich mit der Zeit auf dem Blech eine voluminöse schaumige Masse bildet.

Die Copräzipitate werden röntgenographisch (6.5.18) (Abb. 7) und thermoanalytisch (6.5.17) (Tab. 6) untersucht, um zu überprüfen, ob der Wirkstoff in einem amorphen Zustand vorliegt. Bei beiden Messverfahren zeigen sich für das Emodepsid-PVP-25-Coprazipitat mit einem Wirkstoff/Polymer-Verhältnis von 1:1 und Ethanol als LM kristalline Anteile. Da das mit Aceton/Isopropanol hergestellte Coprazipitat bei gleichem Wirkstoff/Polymer-Verhältnis vollständig amorph vorliegt, wird das Aceton-Isopropanol-Gemisch als LM ausgewählt. Trotz des vollständig amorphen Zustands des 1:1 Coprazipitates wird das Verhältnis von Wirkstoff zu Polymer für nachfolgende Chargen von 1:1 auf 1:3 erhöht.

Tab. 6. Verschiedene Wirkstoff-Polymer-Zusammensetzungen, verwendetes LM und XRD bzw. DSC

Emodepsid-PVP-25	Lösungsmittel	XRD	DSC
		Kristalle: ja/nein	Kristalle: ja/nein
1:1	Ethanol	ja	ja
1:3	Ethanol	nein	nein
1:5	Ethanol	nein	nein
1:1	Aceton/IPA	nein	nein
1:2	Aceton/IPA	nein	nein
1:3	Aceton/IPA	nein	nein
1:4	Aceton/IPA	nein	nein
1:5	Aceton/IPA	nein	nein

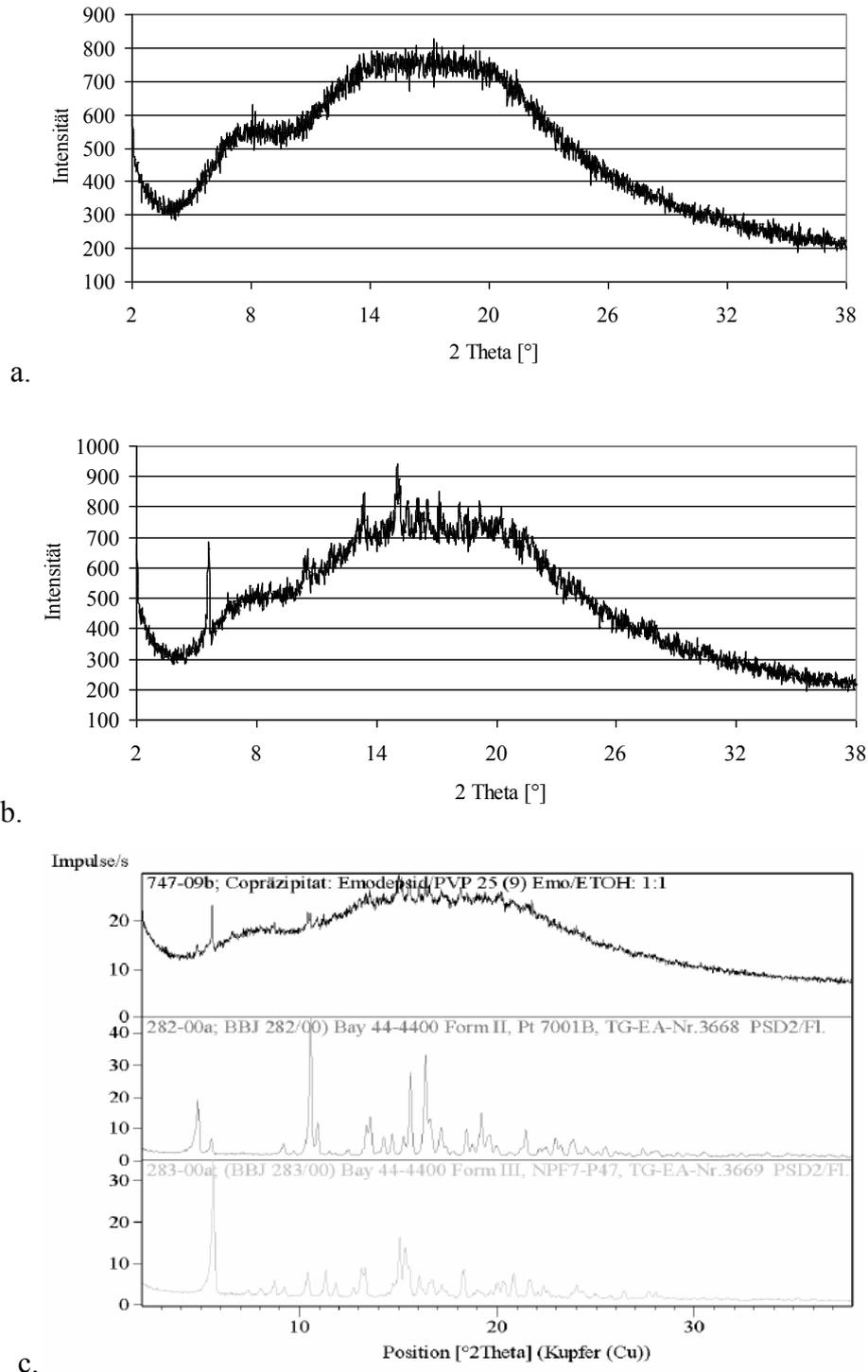


Abb. 7. Röntgendiffraktogramme vom a. Emodepsid-PVP-25-Coprazipitat 1:1, LM: Aceton/Isopropanol, b. Emodepsid-PVP-25-Coprazipitat 1:1, LM: Ethanol; c. Emodepsid-PVP-25-Coprazipitat, LM: Ethanol (schwarz), Emodepsid Modifikation II (dunkelgrau), Emodepsid Modifikation III (hellgrau)

Wird das Röntgendiffraktogramm des Ethanol-Coprazipitates mit Emodepsid-Diffraktogrammen elektronisch vorliegenden Polymorphen übereinander gelegt, lassen sich die kristallinen Anteile den Modifikationen II und III von Emodepsid zuordnen. Dabei handelt es sich nicht um die thermodynamisch stabilsten Modifikationen.

Um zu überprüfen, ob das 1:3-Copräzipitat auch unter großem Energieeintrag weiterhin amorph ist, wird es 15 min lang gemörsert (6.5.3). Da in der DSC-Messung der Copräzipitatkurven kein Schmelzpeak zu erkennen ist, kann davon ausgegangen werden, dass das Emodepsid auch unter dieser Beanspruchung in einem amorphen Zustand vorliegt (Abb. 8).

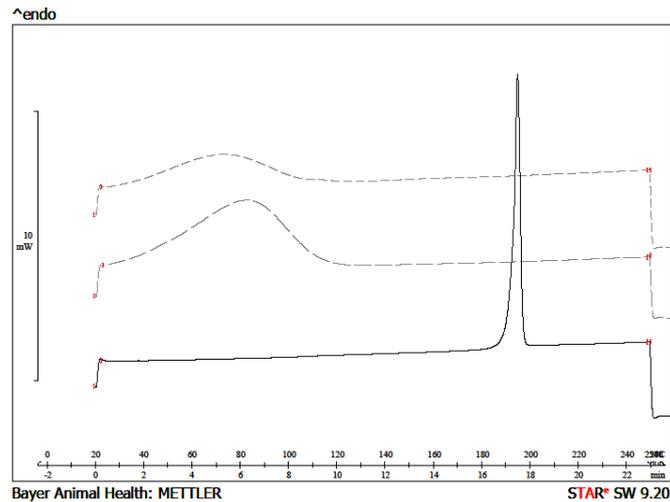


Abb. 8. Thermogramm von kristallinem Emodepsid (schwarz —), Emodepsid-PVP-12-Copräzipitat 1:3 (grau - -) und 15 min lang gemörsertem Emodepsid-PVP-12-Copräzipitat (grau - · -)

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sich erfolgreich Copräzipitate mit PVP-25 als Polymer herstellen lassen, werden Versuche mit kürzerkettigen PVPs durchgeführt. Zur Anwendung kommen PVP-12 und PVP-17. PVP-12 besitzt ein Molekulargewicht von 2.000-3.000 g/mol, PVP-17 von 7.000-11.000 g/mol und PVP-25 von 28.000-34.000 g/mol. Die Herstellung verläuft bei allen ausgewählten Polymeren unproblematisch. Auch eine Vergrößerung des Ansatzes auf 200 g Feststoffeinwaage ist problemlos möglich.

Tab. 7 liefert einen Überblick über die hergestellten Chargen.

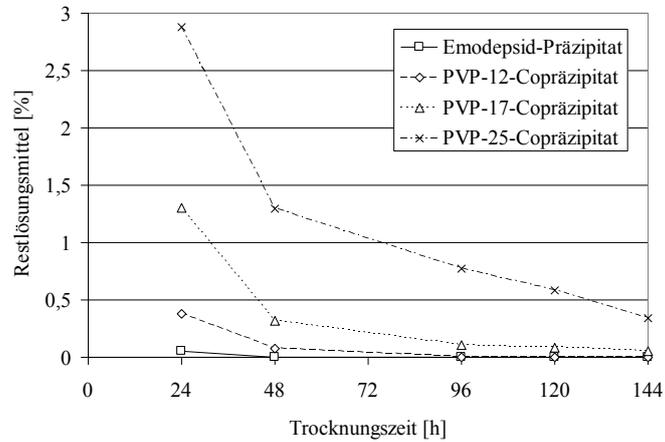
Tab. 7. Hergestellte Copräzipitatchargen, deren Zusammensetzungen und Ansatzgrößen

Bezeichnung	Polymer	Verhältnis WS:Polymer	Einwaage Feststoff	LM	LM-Menge
090327-01	PVP-25	1:1, 1:3, 1:5		Ethanol	125 g
-02	PVP-25	1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5	20 g	Aceton/IPA	200 g
090428	PVP-25	1:3	20 g	Aceton/IPA	50 g/150 g
090526	PVP-25	1:3	20 g	Aceton/IPA	50 g/150 g
090617-01	PVP-25	1:3			
-02	PVP-12	1:3			
-03	PVP-17	1:3	80 g	Aceton/IPA	200 g/ 600 g
-04	-	1:0			
090720-01	PVP-12	1:3	200 g	Aceton/IPA	250 g/250 g
-02	PVP-12	1:3	200 g	Aceton/IPA	200 g/200 g
091026	PVP-12	1:3	200 g	Aceton/IPA	200 g/200 g
100617	Soluplus	1:3	100 g	Aceton/IPA	100 g/100 g
100625-01	PEG 6000,	1:3			
-02	Cremophor EL PVP-12	1:3			
-03	PVP-12, Soluplus	1:3	50 g	Aceton/IPA	200 g/200 g
-04	Soluplus, Cremophor EL	1:3			
100726-01	PVP-12	1:3	100 g	Aceton/IPA	
-02	Soluplus	1:3	100 g	Aceton/IPA	200 g/200 g
100825	PVP-12	1:3	200 g	Aceton/IPA	200 g/200 g

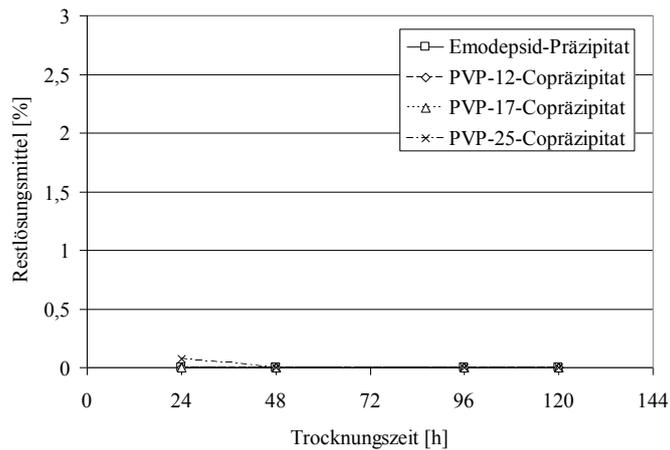
3.1.3.2 Restgehalt der Copräzipitate an Lösungsmitteln

Die Restlösungsmittelmenge von Aceton und Isopropanol kann mit Hilfe der Gaschromatographie (GC) bestimmt werden (6.5.14). Bei diesem Analysenverfahren werden gasförmige, unzerstört verdampfbare Komponenten aufgetrennt und über die Fläche des erhaltenen Peaks der Gehalt der Substanzen bestimmt. Die Menge des Lösungsmittels, die während des Trocknungsvorgangs noch vorhanden ist, korreliert mit der Kettenlänge des Polymers. Je größer dessen molare Masse, umso größer ist die Restlösungsmittelmenge zu einem definierten Zeitpunkt (Abb. 9). Dies lässt sich durch die zunehmende Viskosität der Lösung bei zunehmender Kettenlänge des Polymers erklären. Hierbei wird die Diffusion des LM aus dem Polymer erschwert. Bei Isopropanol ist dieser Sachverhalt deutlich zu erkennen. Es ist anzunehmen, dass auch bei Aceton diese Abhängigkeit existiert, allerdings lässt sie sich hier nicht beobachten, da es flüchtiger ist und die Acetonmenge bereits nach 24 h Trocknungszeit nur noch im marginalen Bereich liegt. Wird anstelle eines Copräzipitates ein Präzipitat hergestellt, also der reine Wirkstoff aus einer Lösung ausgefällt, sinkt die Menge an

Restlösungsmittel, da das LM hauptsächlich am Polymer und nicht am Wirkstoff haftet. Damit der Wirkstoff vollständig amorph vorliegt, wird allerdings ein gewisser Anteil an Polymer benötigt. Das reine Präzipitat liegt teilweise kristallin in Modifikation II vor (Abb. 10). Somit ist das Präzipitat für eine Weiterverarbeitung nicht geeignet.



a.



b.

Abb. 9. Anteil des Restlösungsmittel an a. Isopropanol und b. Aceton in Abhängigkeit von der Trocknungszeit am Beispiel der Charge 090817, n = 3, MW.

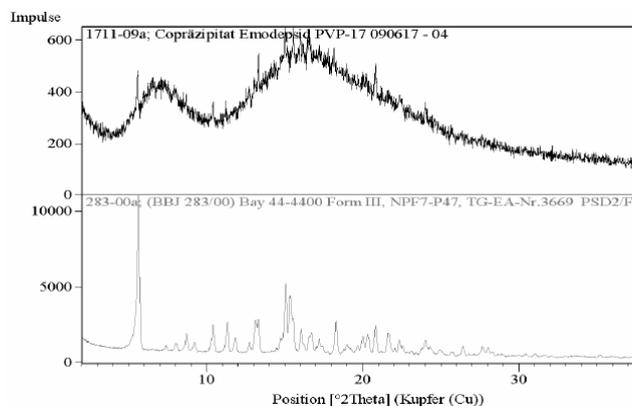


Abb. 10. Röntgendiffraktogramm vom Emodepsid-Präzipitat (oben) und im Vergleich Modifikation II von kristallinem Emodepsid (unten)

3.1.3.3 Freisetzung

Die von Simonelli (1969) beschriebene Abhängigkeit der Lösungsgeschwindigkeit von Carbamazepin vom Molekulargewicht des Polymers kann auch für Emodepsid gezeigt werden. Als Freisetzungsmedium wird ein McIlvaine-Puffer pH = 3 mit 0,05 % Natriumdodecylsulfat ausgewählt. Bei den ersten Versuchen wird zunächst mit 0,001 % Natriumdodecylsulfat gearbeitet. Das entspricht in etwa der halben kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) von Natriumdodecylsulfat, da diese bei pH = 3 eine CMC von 0,008 mol/l beträgt, was bei einem Molekulargewicht von 288,4 g/mol einer Einwaage von 23,072 mg/l entspricht (Rahman 1983). Allerdings führen Freisetzungen mit so einer geringen Konzentration an Natriumdodecylsulfat zu einer unzureichenden Benetzung des Wirkstoffs. Das führt wiederum dazu, dass sich nach 6 h maximal 3 % des Emodepsids (Abb. 11) aus dem Copräzipitat lösen. Diese Fraktion entspricht näherungsweise der löslichen Menge im Volumen des Glasgefäßes. Aufgrund dieser Tatsache ist eine Bestimmung der Freisetzung mit solch einer niedrigen Tensidkonzentration ungeeignet.

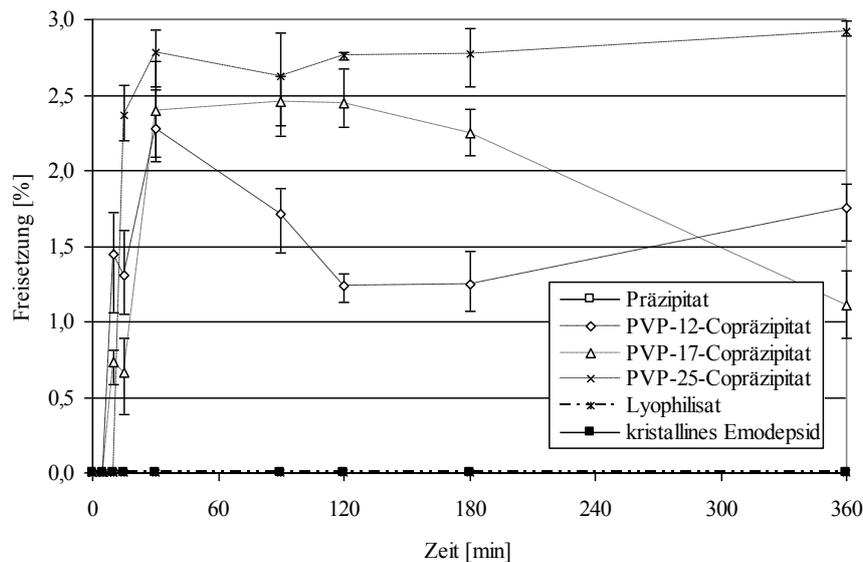


Abb. 11. Wirkstofffreisetzung aus verschiedenen PVP-Copräzipitaten, einem Präzipitat, einem Lyophilisat und kristallinem Wirkstoff; $n = 3$, $MW \pm$ Spannweite; McIlvaine Puffer mit 0,001 % Natriumdodecylsulfat (6.4.1)

Generell kann die Löslichkeit von Arzneistoffen durch den Zusatz von Tensiden zum Freisetzungsmedium erhöht und beschleunigt werden, da der Wirkstoff besser benetzt und die Solubilisierung durch den Einschluss der Substanz in Mizellen gesteigert wird (Humberstone 1996, Galia 1998).

Für zukünftige Freisetzungen wird eine Natriumdodecylsulfatkonzentration von 0,05 % gewählt. Bei einer deutlich höheren Konzentration an Tensid lassen sich keine Unterschiede

mehr in der Lösungsgeschwindigkeit des Wirkstoffes zwischen verschiedenen Copräzipitaten erkennen. Aus Abb. 12 lässt sich ablesen, dass die Lösungsgeschwindigkeit mit Abnahme der Kettenlänge des Polymers steigt, wie auch bereits Simonelli 1969 beobachten konnte. Dies liegt in der unterschiedlich stark ausgeprägten Diffusionsbarriere des Polymers begründet.

Die Freisetzungsgeschwindigkeit von Emodepsid aus dem Präzipitat und aus dem PVP-25-Copräzipitat liegt in einem ähnlichen Bereich. Hier scheint sich der Effekt der besseren Benetzung durch das Polymer und die fehlende Diffusionsschicht aufzuheben.

Zusätzlich wird zu den Copräzipitaten auch die Freisetzung aus einem Lyophilisat und die des kristallinen Wirkstoffes bestimmt. Die Löslichkeit von kristallinem Emodepsid beträgt bei gleicher Einwaage in Bezug auf die Wirkstoffmenge nach 8 Stunden (h) 15 %. In absoluten Mengen wurden 50 mg in 900 ml Freisetzungsmidium eingewogen. Daher liegt die 15 %-ige Löslichkeit nahe an der Löslichkeitsgrenze von 8,2 mg/l (n = 3, RSD = 3,07 %) (6.5.13.2). Durch die Umwandlung vom kristallinen in den amorphen Zustand lässt sich eine deutlich höhere Löslichkeit, nämlich 57,3 mg/l (n = 3, RSD = 2,16 %), erreichen.

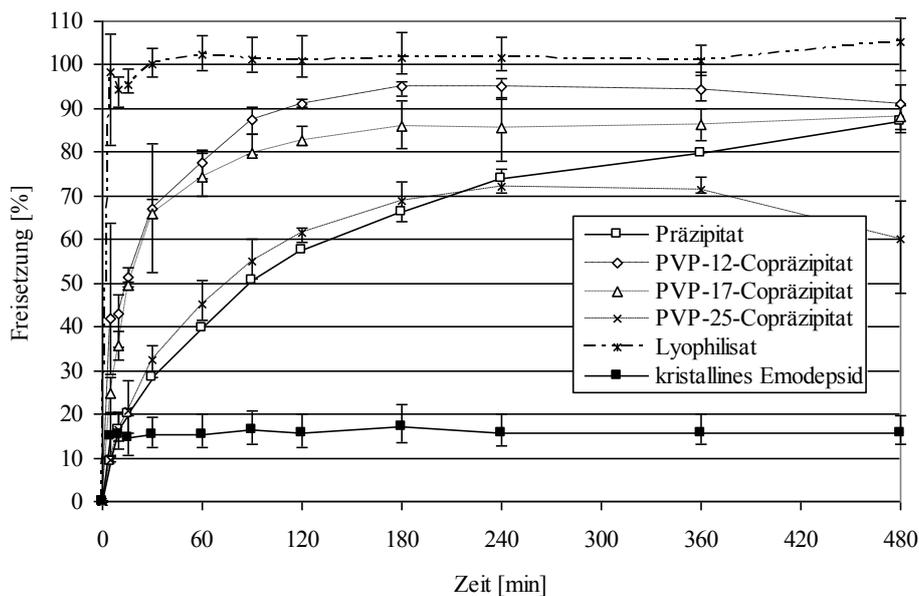


Abb. 12. Wirkstofffreisetzung aus verschiedenen PVP-Copräzipitaten, einem Präzipitat, einem Lyophilisat und kristallinem Wirkstoff; n = 3, MW ± Spannweite; McIlvaine Puffer mit 0,05 % Natriumdodecylsulfat

Das Lyophilisat setzt den Wirkstoff am schnellsten frei. Dies lässt sich durch den amorphen Zustand in Kombination mit einer extrem große Oberfläche erklären. Allerdings führt diese auch zu einem großen Schüttvolumen (Tab. 8), was eine Weiterverarbeitung unmöglich macht.

Tab. 8. Schüttvolumen verschiedener Emodepsid-Formulierungen

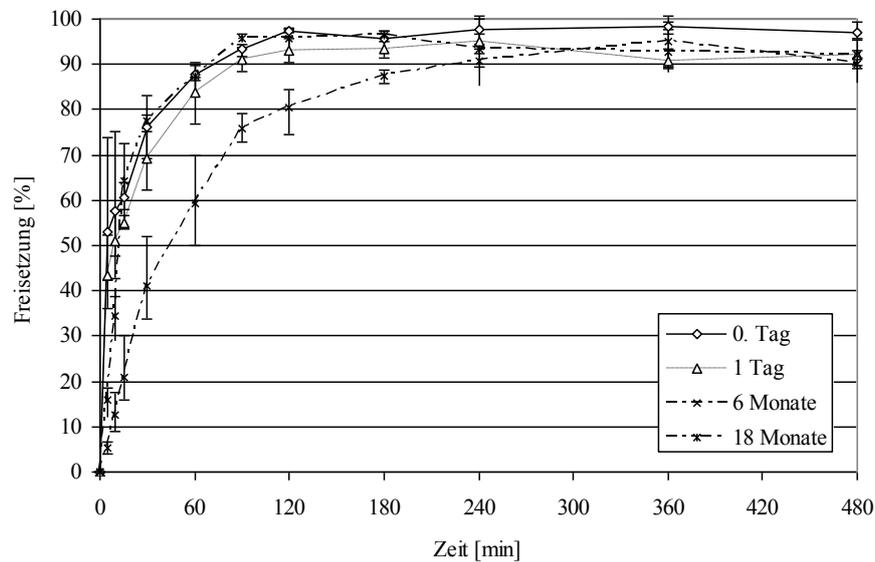
Emodepsid-Präparat	Schüttvolumen [ml/g]
Präzipitat	3,0
PVP-12-Copräzipitat	2,8
PVP-17-Copräzipitat	2,4
PVP-25-Copräzipitat	2,0
Lyophilisat	50,2
kristallines Emodepsid	5,6

Der Mindergehalt, welcher sich in einigen Freisetzungskurven, vor allem der PVP-25-Copräzipitatkurven, beobachten lässt, kann anhand der Löslichkeitsgrenze erklärt werden. Die eingewogene Wirkstoffmenge liegt nahe an der maximalen Löslichkeit, bzw. übersteigt beim kristallinen Wirkstoff diese sogar. Um Sink-Bedingungen gewährleisten zu können, wird bei nachfolgenden Freisetzungen die Einwaage bezogen auf den Wirkstoff auf 10 bis 12,5 mg/l reduziert. Von Sink-Bedingungen allgemein kann gesprochen werden, wenn die Konzentration der zu lösenden Substanz im Lösungsmittel deutlich kleiner ist als die Sättigungskonzentration der zu lösenden Substanz (< 30 %).

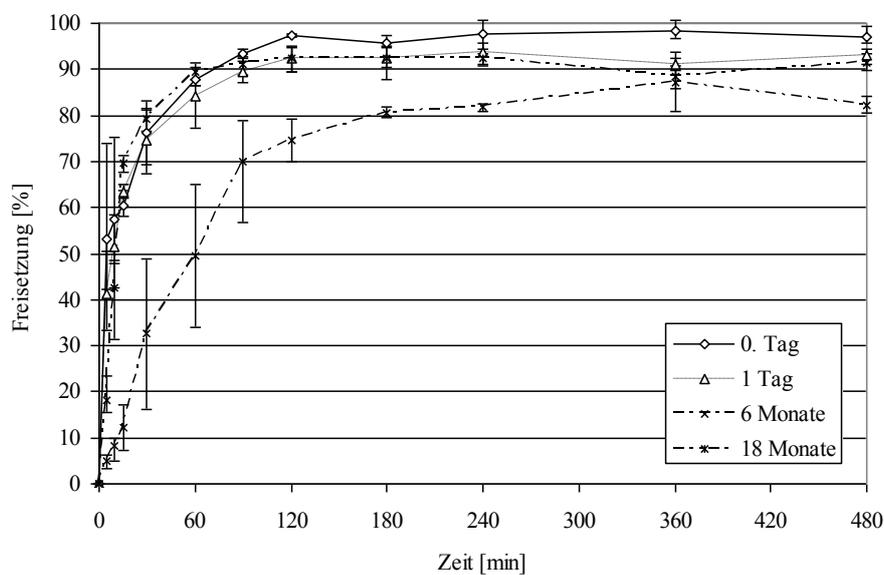
Zusätzlich zu der höheren Lösungsgeschwindigkeit aufgrund der Verwendung kürzerer Polymerketten lässt sie sich auch durch eine Erhöhung des PVP-Anteils im Copräzipitat weiter steigern (Iwata 1996). Allerdings wird darauf verzichtet, das 1:3 Verhältnis von Wirkstoff zu Polymer weiter in Richtung des Polymers zu verschieben, da sich so nicht nur das Gewicht des Copräzipitates, sondern damit bei der Weiterverarbeitung zu Tabletten das Tablettengewicht erhöht. Durch die gesteigerte Löslichkeit des amorphen im Vergleich zu kristallinem Emodepsid kann erwartet werden, dass dieses System auch im tierischen Organismus besser gelöst wird und die Bioverfügbarkeit somit erhöht ist. Die Tatsache, dass die Verbindungen über eine Dauer von 8 h in Lösung gehalten werden und nicht auskristallisieren, legt die Vermutung nah, dass der amorphe Wirkstoff während der Resorption im Körper ebenfalls in Lösung gehalten wird. Die außergewöhnlich hohe Rührgeschwindigkeit bei den Freisetzungsforschungen ist notwendig, um ein Aufschwimmen des Copräzipitates bzw. Lyophilisates zu verhindern und somit eine vollständige Benetzung der Substanzen zu gewährleisten. Ein Arbeiten mit einem mit Filterpapier ausgekleidetem Körbchen ist nicht möglich, da sich in diesem System luftgefüllte Hohlräume, sogenannte Trockennester bilden.

Um zu beobachten, wie sich das Freisetzungsverhalten über die Zeit verändert, wird das Copräzipitat bei unterschiedlichen Lagerbedingungen eingelagert. Dabei erfolgt die Stabilitätsuntersuchung unter Berücksichtigung der International Conference on Harmonisation (ICH) Leitlinie Q1A (2002). Die Einlagerung erfolgt einmal als

Langzeiteinlagerung und einmal als beschleunigte Einlagerung unter Stressbedingungen (6.5.20). Von den eingelagerten Proben werden nach 1 und 7 Tagen und nach 6 und 18 Monaten Freisetzungsforschungen (6.4.1, 6.5.13.1) (Abb. 13) durchgeföhrt und der amorphe Zustand des Copräzipitates mittels DSC-Messungen (6.5.17) überprüft (Abb. 14).



a.



b.

Abb. 13. Wirkstofffreisetzung aus eingelagerten Emodepsid-PVP-12-Copräzipitaten 1:3; a. bei 25 °C/60 % rF, b. bei 40 °C/75 % rF, n = 3, MW ± Spannweite

Bei den Freisetzungsforschungen fällt auf, dass die Freisetzungsgeschwindigkeit der 6-Monatswerte deutlich verlangsamt ist. Allerdings geben die für 18 Monate eingelagerten Proben den Wirkstoff wieder deutlich schneller frei. Aufgrund dieser Tatsache ist nicht nachzuvollziehen, warum die 6 Monatswerte so stark von den anderen abweichen. Eine mögliche Erklärung ist ein stärkeres Verkleben der Probe mit zunehmender Wasseraufnahme.

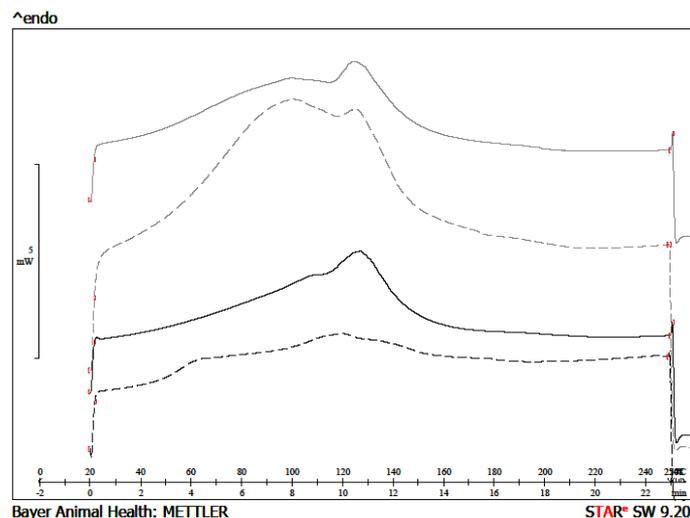


Abb. 14. Thermogramm von 25 °C/60 % rF (grau) und 40 °C/75 % rF (schwarz) eingelagerten Proben; 6 Monate (—), 18 Monate (---)

Der Wassergehalt dieser Proben liegt in einem ähnlichen Bereich wie die 18-Monatswerte und ist keine Erklärung für die verlangsamte Freisetzung der 6-Monatswerte. Bei den 25 °C/60 % rF eingelagerten Proben stellt sich ein Gleichgewicht im Wassergehalt nach spätestens 6 Monaten ein und bei 40 °C/75 % rF eingelagerten Proben bereits nach einer Woche (Tab. 9).

Tab. 9. Wassergehalt der eingelagerten Copräzipitate 091026-01, n = 3, MW

Einlagerungsdauer	Wassergehalt [%]	
	25 °C/60 % rF	40 °C/75 % rF
0 Tage	1,9	1,9
1 Tag	4,9	8,2
3 Tage	8,3	18,1
7 Tage	11,9	20,8
6 Monate	14,5	19,6
18 Monate	14,1	20,4

Die Freisetzungskurven des 091026-01-Copräzipitates und der für 24 Stunden eingelagerten Probe sind als äquivalent anzusehen (6.5.22). Alle anderen Messzeitpunkte sind zueinander nicht äquivalent (Tab. 10).

Tab. 10. f_2 -Werte zu verschiedenen Einlagerungszeitpunkten

Einlagerungsbedingungen	0–1 Tag	1 Tag–6 Monate	6–18 Monate	0–18 Monate
25 °C/60 % rF	61,4	33,1	36,6	45,5
40 °C/75 % rF	62,8	29,5	32,5	43,4

Beim Vergleich der Ausgangskurve mit der 18-Monatskurve überraschen die relativ kleinen f_2 -Werte von 45,5 bzw. 43,4. Augenscheinlich sind die Kurven wenig verschieden. Allerdings weichen sie in den ersten 10 min deutlich voneinander ab. Dies erklärt den geringen f_2 -Wert (Abb. 15). Die große Abweichung in den ersten Minuten lässt sich durch die ausgebildete Diffusionsbarriere des Polymers bei der Einlagerung erklären, da die Partikel durch ihre hygroskopischen Eigenschaften miteinander verkleben.

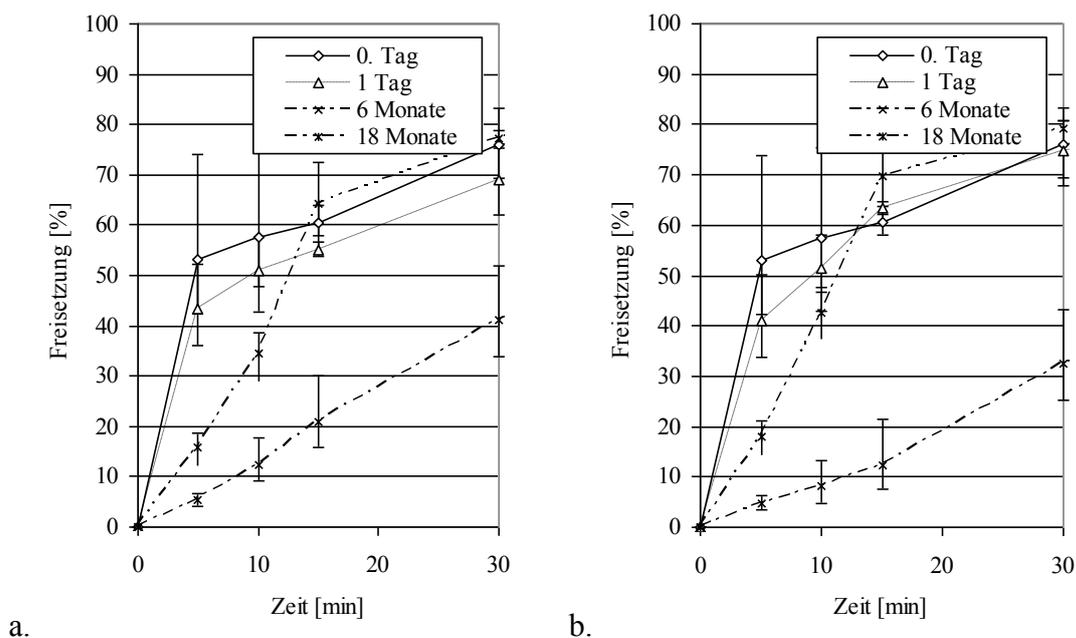


Abb. 15. Ausschnitt aus der Wirkstofffreisetzung aus eingelagertem Emodepsid-PVP-12-Copräzipitat 1:3; a. bei 25 °C/60 % rF, b. bei 40 °C/75 % rF, n = 3, MW ± Spannweite

3.1.3.3.1 Filtertest

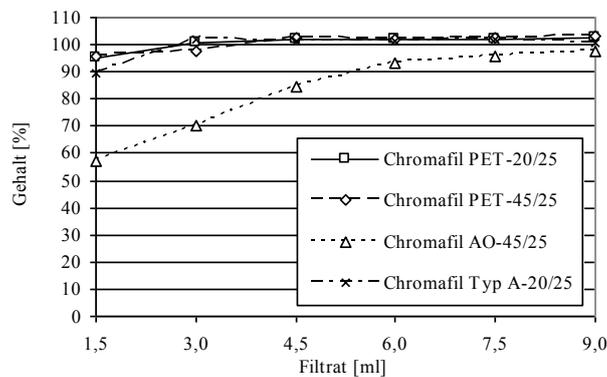
Die Proben der Freisetzungsforschungen werden manuell gezogen. Dazu wird jeweils 1 ml Medium, welches Emodepsid enthält, zu den vorher festgelegten Zeitpunkten mit einer Spritze aufgezogen und filtriert. Als Filtermaterialien stehen unterschiedliche Materialien zur Verfügung (Tab. 11). Wichtig dabei ist, einen Filter zu finden, an dem kein Wirkstoff adsorbiert (6.5.4).

Teilweise ist nach der Filtration von 1,5 ml ein deutlicher Mindergehalt von Emodepsid in der Probe zu beobachten. Bei dem Millex-GV-Filter beträgt die Konzentration 30 % des Ausgangswertes, bei anderen Filtern, wie beim Minisart Air beträgt sie 84 %. Auch der Chromafil Typ A 20/25-Filter, der laut Herstellerangaben für wässrige Lösungen geeignet ist, benötigt etwa 3 ml bis alle Cellulosefasern mit Emodepsid abgesättigt sind (Abb. 16).

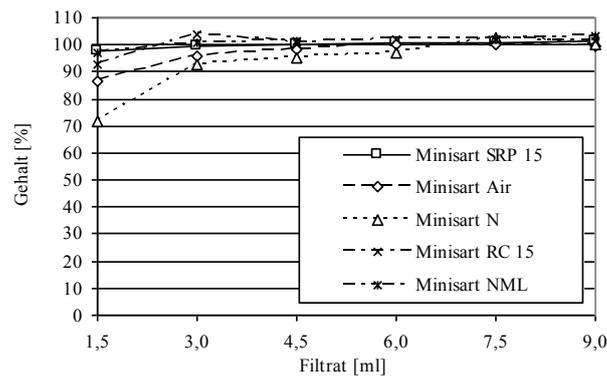
Tab. 11. Getestete Filtermaterialien

Filtermaterial	Eignung	Filter, Porengröße
Polyethylenterephthalat	polare und unpolare Lösungen	Chromafil [®] PET-20/25, 0,2 µm Chromafil [®] PET-45/25, 0,45 µm
Polyamid	mittelpolare Lösungen	Chromafil [®] AO-45/25, 0,45 µm
Cellulosemischester	wässrige Lösungsmittel	Chromafil [®] Typ A-20/25, 0,2 µm
Polytetrafluorethylen (PTFE)	lösungsmittel- und säure-resistent	Minisart [®] SRP 15, 0,45 µm
		Minisart [®] Air, 0,2 µm
Celluloseacetat		Minisart [®] N, 0,2 µm
		Minisart [®] NML, 0,8 µm
regenerierte Cellulose	organische Lösungsmittel	Minisart [®] RC 15, 0,45 µm
Polyethersulfon	wässrige und aggressive Lösungen	Acrodisc [®] , 0,45 µm
		Acrodisc [®] , 0,8 µm
Polypropylen (hydrophilisiertes)		GHP Acrodisc [®] , 0,45 µm
Borosilikatglas		Acrodisc [®] , 1 µm
Polyvinylidenfluorid		Millex [®] -GV, 0,22 µm
hochmolekulares Polyethylen		Ansaugfilter

Dies zeigt, dass die Filterauswahl nicht trivial ist. Für die Freisetzungsversuche wird der Chromafil PET-45/25 Filter mit einer Porengröße von 0,45 µm ausgewählt. Der Filter, der als Ansaugfilter deklariert ist, entspricht dem, der bei einer Freisetzungsapparatur mit automatischer Probenziehung zum Einsatz kommt.



a.



b.

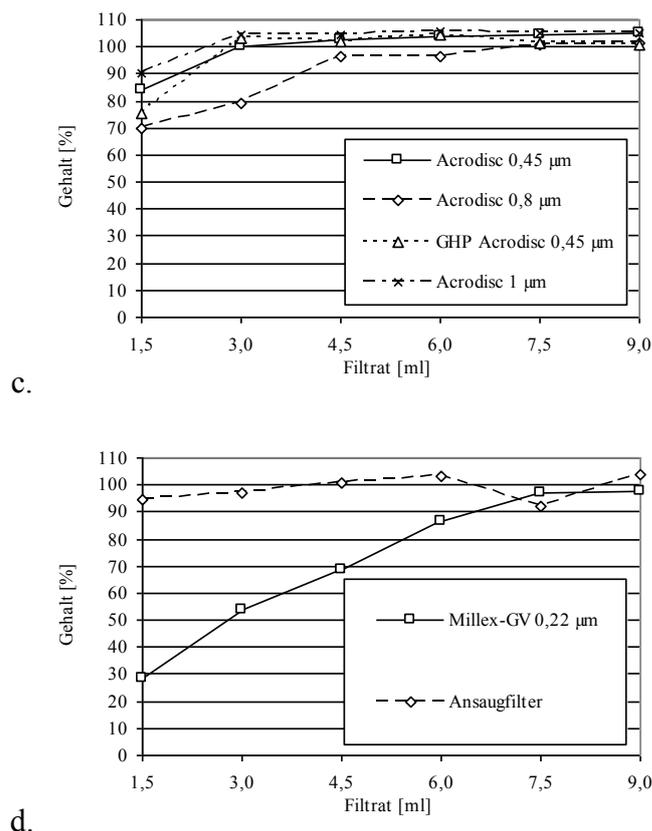


Abb. 16. Gehalt des Filtrats abhängig von der filtrierten Menge an Freisetzungsmedium durch a. verschiedene Chromafil-Filter, b. verschiedene Minisart-Filter, c. verschiedene Acrodisc-Filter, d. Millex-GV- und Ansaugfilter

3.1.3.3.2 Freisetzung in biorelevanten Medien

Neben dem McIlvaine-Puffer als Freisetzungsmedium werden auch Freisetzungen in biorelevanten Medien, also in künstlichen Darmsäften, nüchtern: Fasted State Simulated Intestinal Fluid (FaSSIF) und postprandial: Fed State Simulated Intestinal Fluid (FeSSIF) durchgeführt (6.4.3). Der Hauptunterschied zwischen FaSSIF und FeSSIF besteht in den unterschiedlichen Konzentrationen an Gallensalzen und Phospholipiden. Das FaSSIF-Medium enthält 3 mM Natriumtaurocholat und 0,75 mM Phospholipide und das FeSSIF-Medium 15 mM bzw. 3,75 mM (Porter 2001, Marques 2004). Die Löslichkeit von Emodepsid in FaSSIF beträgt 14,8 mg/l und in FeSSIF 16,7 mg/l. Da der Wirkstoff in diesen Medien praktisch unlöslich ist, ist es kaum möglich, unter Sink-Bedingungen zu arbeiten, da die Einwaage zu gering und die Einflussgröße von Messungenauigkeiten zu groß wäre. Beispielsweise führt eine Einwaage von 5 mg Wirkstoff, was einer Copräzipitateinwaage von 20 mg entspricht, in 500 ml FaSSIF bzw. FeSSIF zu einer 50 %-igen Freisetzung des Wirkstoffs nach 8 h.

Die zu entwickelnde Arzneiform ist für die Anwendung am Hund gedacht. Für diese Spezies gibt es keine speziellen FaSSIF- oder FeSSIF-Medien. Allerdings unterscheidet sich beim Hund vor allem die Gallensekretion deutlich von der des Menschen. Sie ist etwa viermal so hoch (Tab. 12).

Tab. 12. Gallensekretion des Hundes im Vergleich zum Menschen (Dressman 1991)

Gallensekretion [mEq/l]	Hund	Mensch
Gallenfluss [ml/h]	10	1,5-15,4
Na ⁺	141-230	132-165
K ⁺	4,5-11,9	4,2-5,6
Ca ²⁺	3,1-13,8	1,2-4,8
Mg ²⁺	2,3-2,5	1,4-3,0
Cl ⁻	31-107	196-126
HCO ₃ ⁻	14-61	17-55
Gallensäure [mm]	16-187	3-45

Aufgrund dieser Tatsache wird die Natriumtaurocholatmenge im FeSSIF-Medium vervierfacht und erneut eine Freisetzungsuntersuchung (6.5.13.1) durchgeführt (Abb. 17). Die Löslichkeit von Emodepsid liegt mit hier 61,7 mg/l in diesem Medium deutlich über der in dem üblichen FeSSIF-Medium. Daher kann hier bei einer Einwaage von 20 mg Copräzipitat in 500 ml Freisetzungsmedium unter Sink-Bedingungen gearbeitet und eine 100 %ige Freisetzung des Wirkstoffs erreicht werden. Die Beobachtung, dass die Löslichkeit abhängig von der Gallensalzkonzentration ist, ist auch für andere Arzneistoffe bekannt (Humberstone 1996). Aus den Freisetzungen in biorelevanten Medien mit niedriger und hoher Natriumtaurocholatkonzentration lassen sich Rückschlüsse auf das Verhalten des Wirkstoffes in vivo ziehen. Eine postprandiale Verabreichung des Wirkstoffes in vivo führt zu einer höheren Bioverfügbarkeit gegenüber dem nüchternen Zustand.

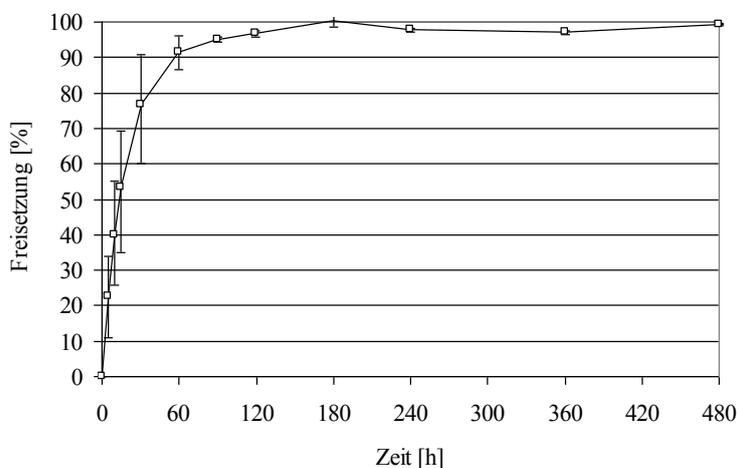


Abb. 17. Wirkstofffreisetzung 091026-Coprazipitat in FeSSIF-Medium mit 4facher Natriumtaurocholat-konzentration, n = 3, MW ± Spannweite

3.1.3.4 Minitabletten

Mit der Copräzipitat-Charge 090720-01 werden Minitabletten entwickelt. Anhand dieser und der 090720-02-Charge soll aufgezeigt werden, welche Inprozesskontrollen bei der Herstellung sowohl des Copräzipitates als auch der späteren Tabletten durchgeführt werden. Der Ansatz der Minitabletten wird gewählt, da diese Arzneiform einfach dem Futter untergemischt werden kann und so leicht zu applizieren ist. Darüberhinaus verteilt sich der Wirkstoff durch die kleinere Partikelgröße gleichmäßiger im Magen-Darm-Trakt und kann auf diese Weise Plasmaspiegelschwankungen minimieren (Graffner 1986, De Brabander 2000). Da sich im Laufe dieser Arbeit herausgestellt hat, dass der Wirkstoff Emodepsid hauptsächlich im oberen Dünndarm resorbiert wird, wurde dieses Konzept verworfen und schnell zerfallende, monolithische Darreichungsformen entwickelt. Dennoch wird das Konzept der Minitabletten der Vollständigkeit halber aufgeführt.

Bei den Chargen handelt es sich um 200 g Ansätze von Emodepsid-PVP-12-Copräzipitaten mit einem Wirkstoff/Hilfsstoffverhältnis von 1:3. In der Siebanalyse (6.5.6) fällt auf, dass die beiden Chargen in der Größenverteilung der Partikel unterschiedlich sind (Abb. 18).

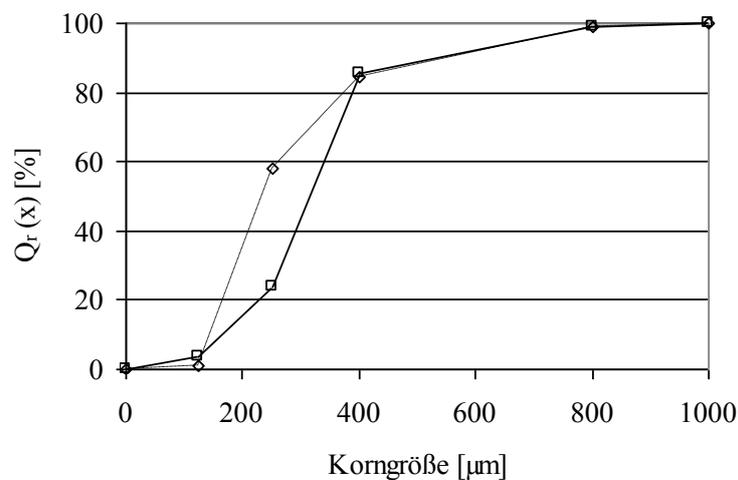


Abb. 18. Summenhäufigkeitskurve der Copräzipitat-Chargen -01 (—□—) und -02 (—◇—), aufgetragen ist der Anteil der Partikel, die durch das Sieb gehen, gegen die Teilchengröße bzw. Maschenweite des Siebes

Bei beiden Chargen haben > 80 % der Partikel eine Größe von 125–400 µm, wobei die Charge -01 im Bereich von 125–400 µm kleinere Partikel aufweist als Charge -02.

In Freisetzungsversuchen (Abb. 19) ist die Freisetzungsgeschwindigkeit der -01-Charge aufgrund der größeren spezifischen Oberfläche erhöht. Dies kann auch in den hieraus hergestellten Tabletten Auswirkungen auf die Freisetzungsgeschwindigkeit haben. Allerdings liegt der f_2 -Wert der beiden Proben bei 58,8. Damit sind beide Kurven als äquivalent anzusehen (6.5.22).

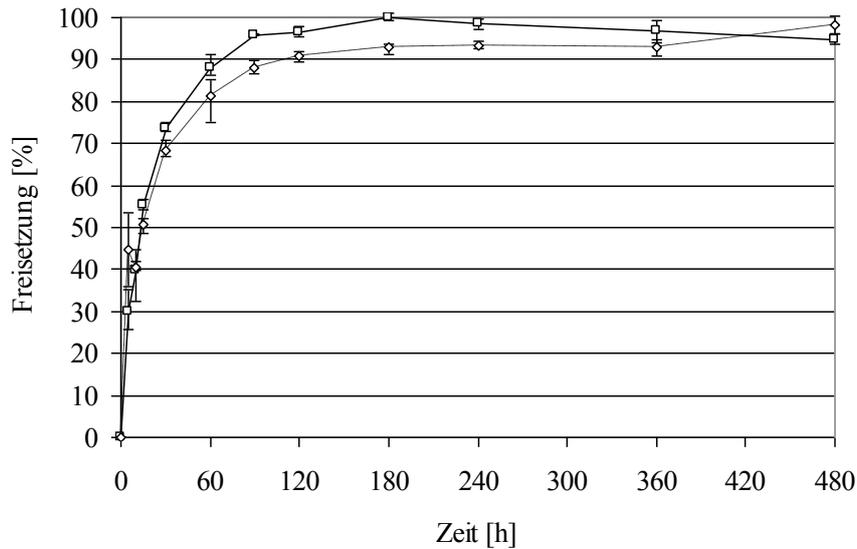


Abb. 19. Wirkstofffreisetzung der Copräzipitat-Chargen-01 (□) und -02 (◇), n = 3, MW ± Spannweite

Der Hausner-Faktor beträgt 1,22 für Charge -01 und 1,24 für Charge -02 (6.5.5). Dieser Wert gibt Auskunft über die Dosiergenauigkeit von Pulvern und sollte möglichst nah an 1 sein. Die beiden gemessenen Werte liegen nach Definition des Ph Eur. in einem zufriedenstellenden Bereich (1,19-1,25).

Die Fließfähigkeit nach Ph. Eur. 2.9.16 kann nicht bestimmt werden, da das Pulver von alleine nicht vollständig durch den Rieseltrichter fließt. Allerdings kann der Schüttwinkel, als weitere Kenngröße für die Fließfähigkeit, bestimmt werden. Je größer der Böschungswinkel des Pulvers ist, desto schlechter ist die Fließfähigkeit. Für Charge -01 beträgt der Wert $43,3^\circ$ (n = 3, RSD: 0,57 %) und für Charge -02 $44,4^\circ$ (n = 3, RSD: 3,71 %). Beide Chargen haben nach Arzneibuch mäßige Fließeigenschaften (6.5.7)

Der Wirkstoffgehalt der Charge -01 liegt bei 24,5 % und der Charge -02 bei 24,8 % (6.5.13.2). Aus dem -01-Copräzipitat werden Minitabletten hergestellt (6.2.3) und Inprozesskontrollen nach Arzneibuch durchgeführt. Die Ergebnisse der Inprozesskontrollen sind in Tab. 13. aufgeführt und entsprechen den Anforderungen des Arzneibuchs.

Tab. 13. Ergebnis der Inprozesskontrollen der Minitabletten

	Tbl mit Magnesiumstearat	Tbl mit Magnesiumstearat und Aerosil	Tbl mit Magnesiumstearat, Aerosil und Ac-Di-Sol
Abrieb [%]	0,37	0,46	0,32
Zerfall [min]	9	8	3

Tabletten mit einem Gewicht ≤ 40 mg werden nach Arzneibuch keiner Prüfung auf die Gleichförmigkeit der Masse unterzogen, sondern einer Prüfung auf die Gleichförmigkeit des

Gehaltes. Da der Gehalt des Copräzipitates bekannt ist, und die Tabletten aus bis zu 99 % aus dem Copräzipitat bestehen, wird auf eine Gehaltsbestimmung der Minitabletten verzichtet. Die Zerfallszeit reduziert sich durch den Zusatz des Sprengmittels von 9 auf 3 min. Dieser Unterschied lässt sich auch in Abb. 20 erkennen. Das Bild a. zeigt die Freisetzung nach einer Minute und Bild b. nach 60 Minuten. Im linken Glasgefäß befinden sich jeweils Minitabletten ohne und im rechten Gefäß mit Sprengmittel.

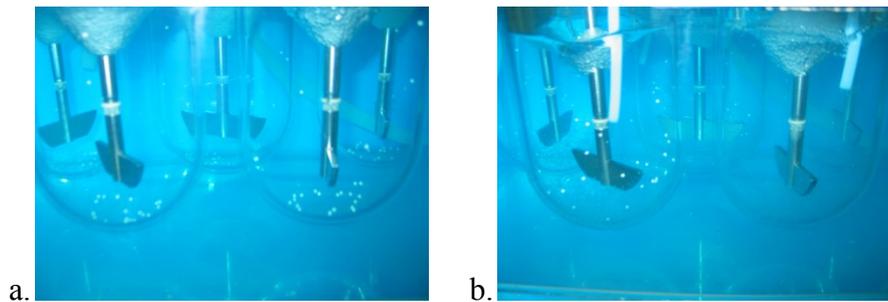


Abb. 20. Freisetzungsuntersuchung von Minitabletten nach a. 1 min und b. 60 min; im linken der beiden Glasgefäße im Vordergrund befinden sich Minitabletten ohne und im rechten Minitabletten mit Sprengmittel.

Der Zusatz des Sprengmittels führt zu einer Erhöhung der Freisetzungsgeschwindigkeit. Die Ansätze mit Aerosil- und Magnesiumstearatzusatz erreichen keine 100 %ige Freisetzung der Wirkstoffmenge (Abb. 21). Das Konzept der Minitabletten wird aufgrund des ermittelten Resorptionsortes von Emodepsid verworfen (3.3). Daher wurde dieser technologische Ansatz nicht weiter verfolgt. Abschließende DSC- (6.5.17) (Abb. 22) und XRD-Messungen (6.5.18) der nach 6 Monaten eingelagerten Minitabletten (6.5.20) zeigen, dass der Wirkstoff in amorpher Form vorliegt.

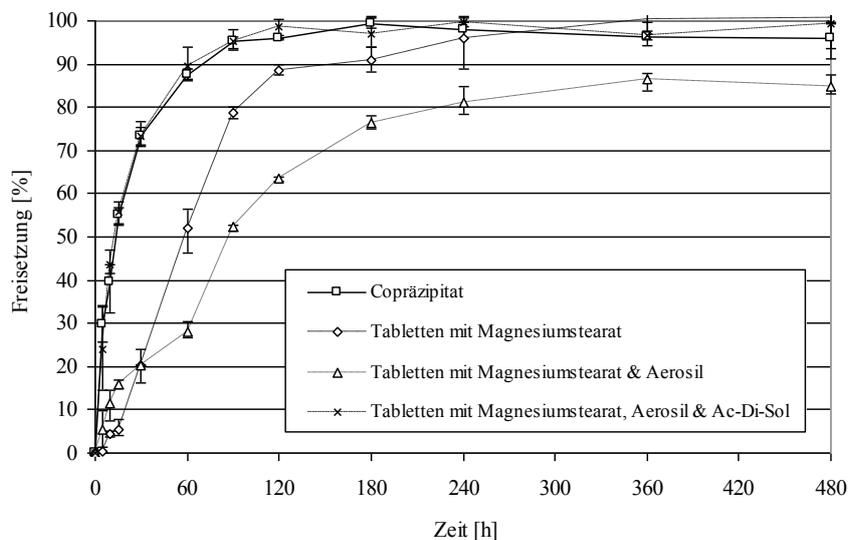


Abb. 21. Wirkstofffreisetzung aus dem Copräzipitat und aus Minitabletten unterschiedlicher Zusammensetzung, n = 3, MW ± Spannweite

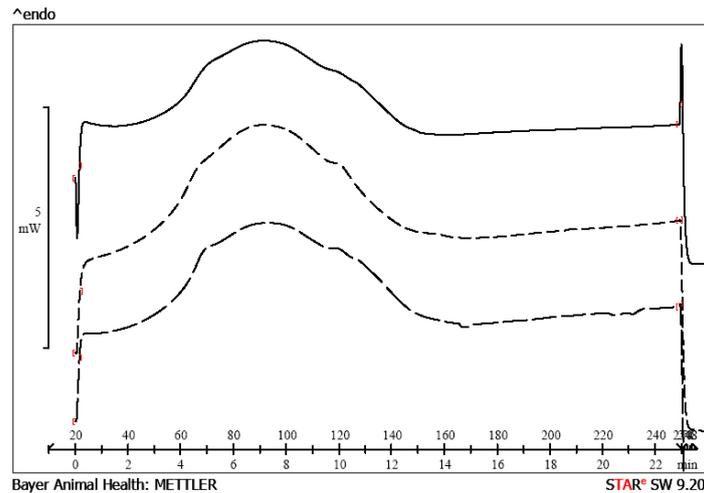


Abb. 22. Thermogramm von Minitabletten (—), Minitabletten 6 Monate eingelagert bei 25 °C/ 60 % rF (- -), Minitabletten eingelagert bei 40 °C/75 % rF (- · -)

3.1.4 Copräzipitate mit Soluplus

Neben PVP-Coprazipitaten werden auch Coprazipitate mit Soluplus als Polymer hergestellt (Tab. 7). Soluplus ist ein seit 2009 von der Firma BASF vermarktetes Polyvinylcaprolactam-Polyvinylacetat-Polyethylenglycol-Copolymer mit einem Molekulargewicht von ~ 118000 g/mol. Es wird eingesetzt für feste Lösungen, als Binder, als Löslichkeitsvermittler und zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit von schlecht löslichen Substanzen (Kolter 2010). Für die Herstellung der Soluplus-Coprazipitate wird die Herstellungsvorschrift des 1:3 Emodepsid-PVP-12-Coprazipitates auf Soluplus übertragen. Auch die Menge an Lösungsmitteln wird beibehalten, obwohl sich Soluplus in Aceton und Isopropanol besser löst als PVP. Da das LM im Laufe des Herstellungsprozesses verdampft, hat die eingesetzte Menge keinen Einfluss auf das erhaltene Coprazipitat. Die Menge an Isopropanol bei der Restlösungsmittelbestimmung ist geringer als beim PVP-12 Coprazipitat (Abb. 23). Die Hafteigenschaften des Lösungsmittels gegenüber dem neuen Polymer sind geringer ausgeprägt. Auf eine Darstellung der Aceton-Werte wird verzichtet, da sie marginal ausfallen.

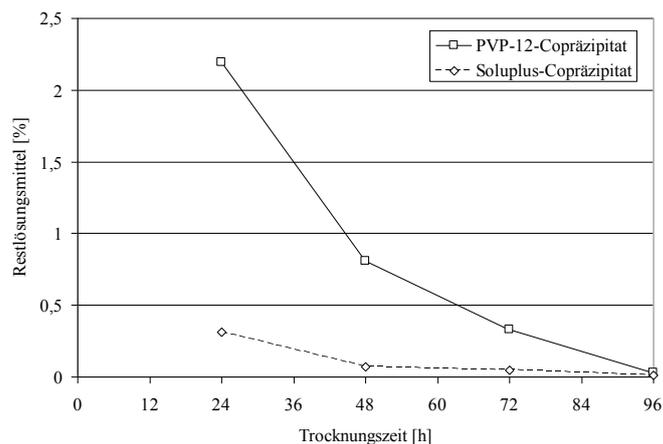


Abb. 23. Vergleich der Restlösungsmittelmenge von Isopropanol aus dem PVP-12-Coprecipitat 100726-01 und Soluplus-Coprecipitat 100726-02, n = 3, MW

Die Löslichkeit des Soluplus-Coprecipitates im wässrigen LM kann nicht bestimmt werden, da sich die in der Lösung ausgebildeten Assoziate weder abfiltrieren noch abzentrifugieren lassen. Somit ist auch eine Gehaltsbestimmung im McIlvaine Puffer pH = 3 mit 0,05 % Natriumdodecylsulfat nicht möglich. Darüber hinaus ist zu beachten, dass ein 1:1 Emodepsid-Soluplus-Coprecipitat in der DSC-Untersuchung (6.5.17) kristalline Anteile aufweist, so dass hier für einen vollständigen amorphen Zustand das Wirkstoff-Polymer-Verhältnis in Richtung des Polymers verschoben werden muss.

Die Freisetzungskurve des Soluplus-Coprecipitates ist äquivalent zu verschiedenen PVP-12-Kurven (Abb. 24). Die f_2 -Werte (6.5.22) liegen für die Chargen 100726-01 und -02 bei 77,6, für die Chargen 100726-02 und 100825-01 bei 74,5 und für die beiden PVP-12-Chargen bei 75,8.

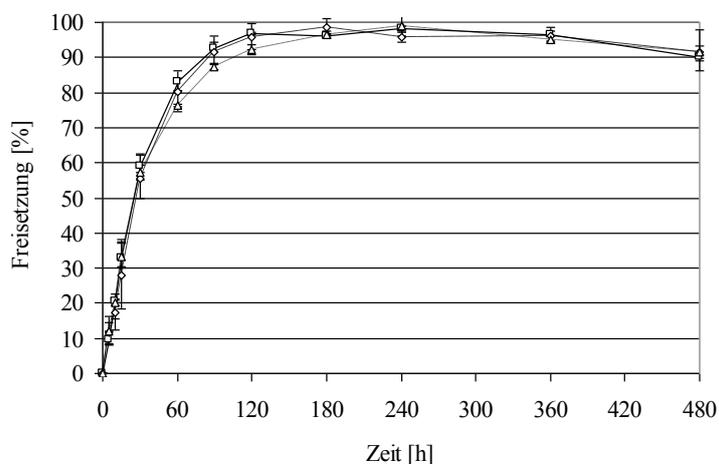


Abb. 24. Wirkstofffreisetzung aus dem Soluplus-Coprecipitat 100726-01 (—□—) und den PVP-12-Coprecipitaten (—◇—) 100726-01 und 100825-01 (—Δ—), n = 3, MW ± Spannweite

Die Teilchengröße der Copräzipitatpartikel hat einen Einfluss auf die Freisetzungsgeschwindigkeit. Die Partikel der 100726-01-Charge sind tendenziell kleiner als die der 100825-01-Charge (Abb. 25) (6.5.6). Dies führt in der Freisetzung zu einer leicht erhöhten Geschwindigkeit. Allerdings weichen diese Kurven um weniger als 5 % voneinander ab und sind daher als äquivalent anzusehen.

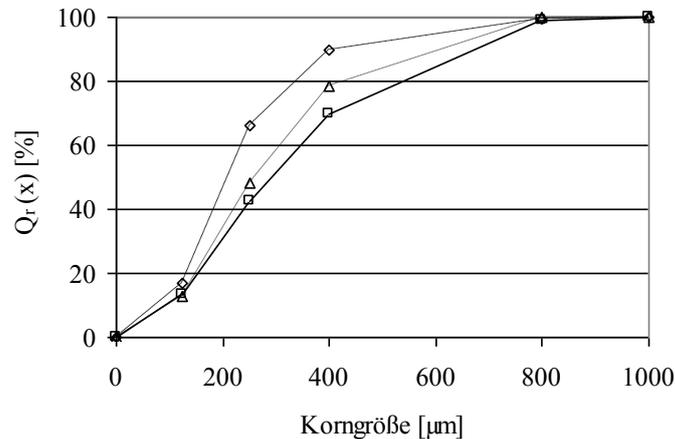


Abb. 25. Summenhäufigkeitskurve vom Soluplus-Coprazipitat 100726-01 (—□—) und den PVP-12-Coprazipitaten (—◇—) 100726-01 und 100825-01 (—△—); aufgetragen ist der Anteil der Partikel, die durch das Sieb gehen, gegen die Teilchengröße bzw. Maschenweite des Siebes

Generell wird für die Versuche immer das gesamte Copräzipitat verwendet und keine bestimmte Siebfraktion. Hintergrund dessen ist die Annahme, dass in einer späteren Produktion der Mahlschritt deutlich reproduzierbarer ist und es damit zu einer gleichmäßigeren Teilchengrößenverteilung kommt. Somit kann dann auf den Prozess des Klassierens verzichtet und ein Prozessschritt eingespart werden.

Eine Herstellung von Soluplus-Coprazipitaten ist problemlos möglich und besitzt im Vergleich zu PVP-Coprazipitaten den Vorteil der geringeren Restlösungsmittelmenge und der Möglichkeit, Lösungsmittel einzusparen. Demgegenüber steht der Nachteil der stärkeren Kristallisationsneigung und die Assoziatbildung im wässrigen Medium.

3.1.5 Mikronisieren des Wirkstoffs

Die Partikelgröße des gemahlene Wirkstoffs sollte so klein wie möglich sein. Emodepsid wird in Sonnenblumenöl dispergiert und in einer Perlmühle gemahlen (6.2.4). Als Vehikel wird Sonnenblumenöl ausgewählt, da sich der Wirkstoff in dieser Grundlage zum einen schlecht löst und zum anderen Emodepsid aus lipophilen Grundlagen eine höhere Bioverfügbarkeit zeigt. Die schlechte Löslichkeit ist wichtig, da sich vor allem kleinere Partikel ansonsten lösen können. Die höhere Bioverfügbarkeit des Wirkstoffs in dieser

lipophilen Grundlage, im Vergleich zu einer schnell zerfallenden Tablettenformulierung, konnte in verschiedenen Studien nachgewiesen werden. Auf die Studiendaten konnte bayerintern zugegriffen werden. Darüber hinaus unterliegt die Bioverfügbarkeit von Emodepsid einem Nahrungsmiteleinfluss, so dass es postprandial verabreicht zu höheren Plasmaspiegeln kommt als präprandial. Da die Zerkleinerung umso erfolgreicher ist, je höher der Feststoffanteil ist, wird versucht, diesen so hoch wie möglich zu wählen. Eine Beladung bis zu 25 % ist möglich. Ein Feststoffanteil über diesen Wert hinaus führt dazu, dass das System zu viskos wird und sich nicht mehr vermahlen lässt.

In einem anderen Vorversuch wird die Zeit der Mahlung festgelegt. Dazu werden das Suspensionskonzentrat für 6 h gemahlen, zu bestimmten Zeitpunkten Proben gezogen und diese Proben mittels Laserdiffraktometrie (6.5.16) vermessen (Abb. 26). Es zeigt sich, dass sich nach 50 min kontinuierlichem Mahlen die Partikelgröße konstant bleibt.

Für die Hauptversuche wird die Suspension 90 min gemahlen. Um zu verdeutlichen, wie eine Größenverteilung der Partikel aussieht, ist in Abb. 27 das Ergebnis der Teilchengrößenbestimmung zu unterschiedlichen Mahlzeitpunkten dargestellt. Es fällt auf, dass die ersten 10 min des Mahlvorgangs den größten Effekt auf die Partikelgrößenreduktion haben.

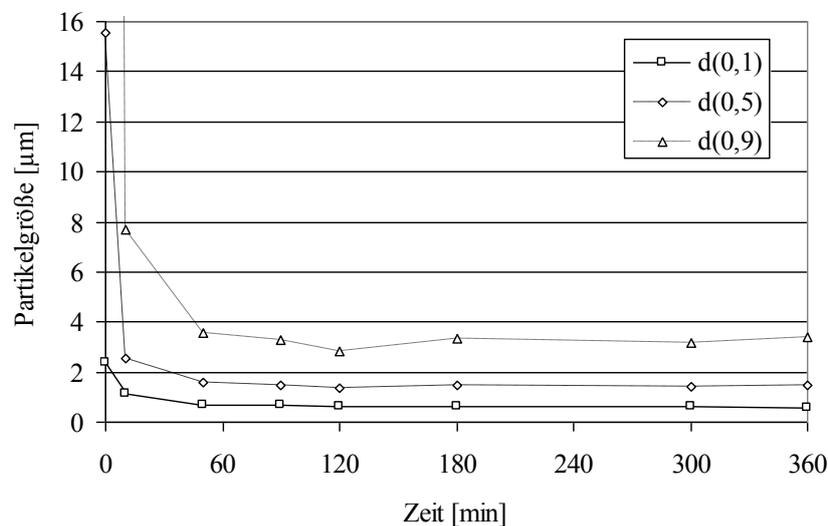


Abb. 26. Partikelgröße in Abhängigkeit der Mahlzeit; $d(0,9)$ = 90 % des Wirkstoffs sind kleiner als die gemessene Teilchengröße

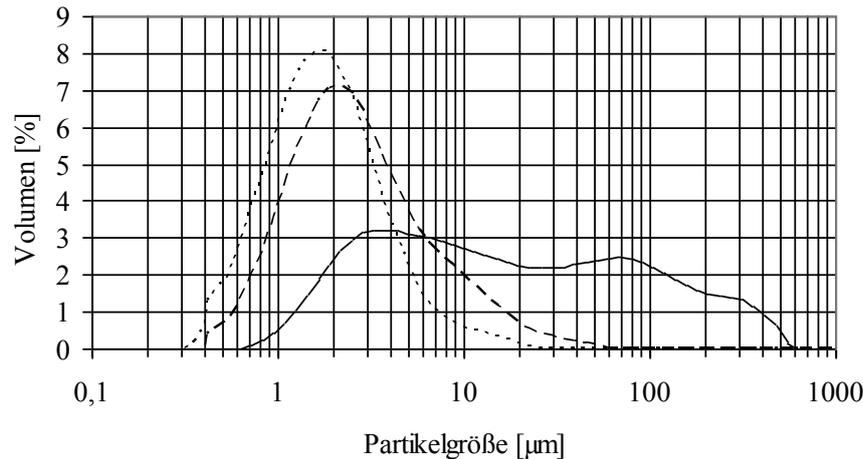


Abb. 27. Teilchengrößenverteilung einer 25 %-igen Emodepsid-Suspension nach 0 min (—), 10 min (---) und 90 min (- · -) mahlen

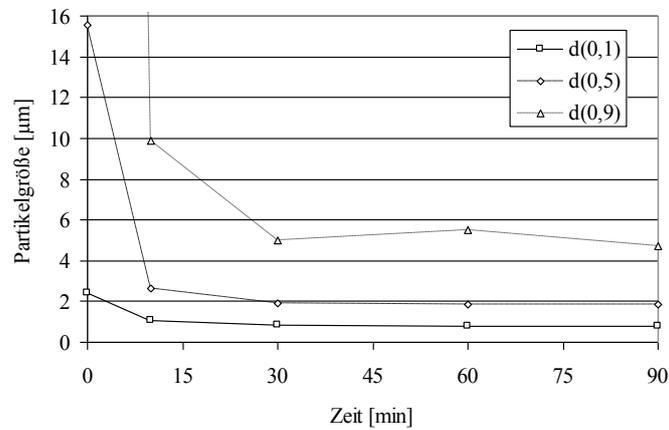
Neben diesen Vorversuchen wird das Partikelwachstum während der Lagerung überprüft. Zu diesem Zweck wird die Partikelgröße nach 7 Tagen erneut gemessen. Es fällt auf, dass sich die Werte verdreifachen (Tab. 14). Nach diesen Messungen wird die Probe 2 min mit Ultraschall (US) behandelt, um mögliche Agglomerate zu trennen und anschließend erneut vermessen. Da sich die Werte trotz US-Einwirkung nicht ändern, ist die Größenzunahme nicht auf ein einfaches Zusammenballen der Partikel, sondern auf Partikelwachstum zurückzuführen.

Tab. 14: Partikelgrößen zu verschiedenen Zeitpunkten mit und ohne Ultraschalleinwirkung

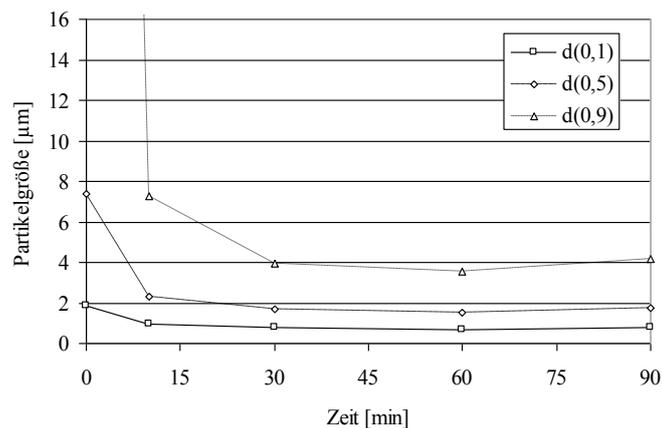
	Tag 0 ohne US	Tag 0 mit US	Tag 7 ohne US	Tag 7 mit US
d(0,1)	0,59	0,46	1,57	1,32
d(0,5)	1,34	1,32	3,92	3,34
d(0,9)	2,81	3,34	12,34	12,23

Generell gilt, dass die Gefahr des Partikelwachstums umso größer ist, je kleiner die Partikel sind, da mit abnehmender Partikelgröße die Oberfläche zunimmt und damit die Oberflächenenergie steigt. Durch den Zusatz von Tensiden ist es möglich, diese freie Oberflächenenergie zu minimieren (Park 2007). Es ist bekannt, dass die Tensidmoleküle an die Oberfläche von Kristallen adsorbieren und somit das Kristallwachstum kontrollieren können. Eine Grundvoraussetzung für diese Eigenschaft ist der Einsatz von Tensiden oberhalb ihrer kritischen Mizellenbildungskonzentration (Jun 2006). Hermeling konnte 2009 zeigen, dass ein Zusatz von Tween 80, Lutrol F 68 oder Texapon in einer Konzentration von 0,5 % das Partikelwachstum von Nanopartikeln verhindern kann. Da das Tensid im Dispergiermittel löslich sein muss und als lipophiles Vehikel Sonnenblumenöl vorliegt,

werden Tween 85 (Polyoxyethylensorbitantrioleat) und Span 20 (Polyoxyethylen(20)sorbitanmonolaurat) als Tenside ausgewählt. Diese werden jeweils in einer Konzentration von 1 % zugesetzt. Während des Mahlens wird zu verschiedenen Zeitpunkten die Teilchengröße bestimmt (Abb. 28). Dabei nehmen die Größenverteilungen ähnliche Werte an.



a.

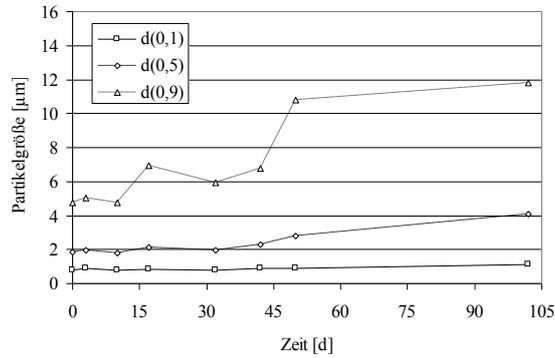


b.

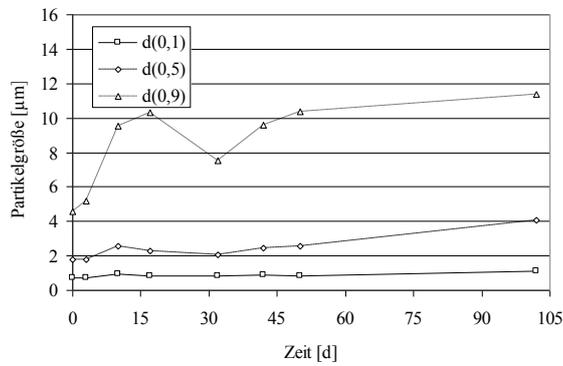
Abb. 28. Teilchengröße während des Mahlens, a. Suspensionskonzentrat mit 1 % Tween 85, b. Suspensionskonzentrat mit 1 % Span 20

Die Proben werden über einen Zeitraum von 102 Tagen auf ihr Partikelwachstum hin überprüft (Abb. 29). Es fällt auf, dass die Partikel der mit Tween 85 % stabilisierten Proben über die ersten 14 Tage kaum wachsen. Bei Span 20 lässt sich das Wachstum nur über einen Zeitraum von 7 Tagen eindämmen. Nach etwa 40 Tagen kommt es bei den Tween-Proben eindeutig zu einem Partikelwachstum auf Kosten der kleinen Teilchen, zu beobachten an der kontinuierlichen Zunahme der d(0,5)-Werte. Die entstandenen Agglomerate lassen sich bei allen Proben weitestgehend durch das Einwirken von Ultraschall zerstören (Abb. 28 b., d.). Aufgrund der Tatsache, dass die Tenside das Partikelwachstum nur in den ersten Tagen erfolgreich verhindern können – Vergleich Abb. 29 mit dem 7 Tagewert aus Tab. 14 - werden die gemahlten Proben noch am gleichen Tag zu Tabletten weiterverarbeitet. Dennoch wird

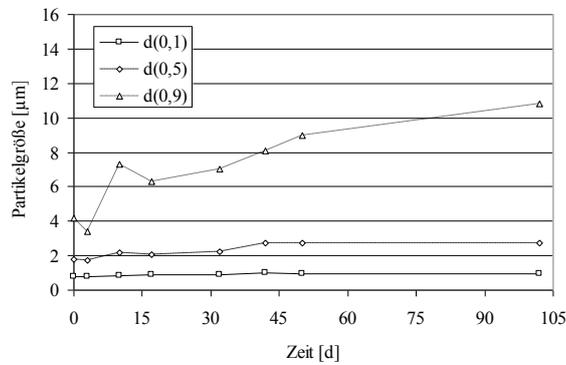
Tween 85 als Stabilisator zu der Rezeptur hinzugefügt, da sich dieser Zusatz aufgrund der benetzenden Eigenschaften positiv auf die Freisetzungsgeschwindigkeit auswirken kann.



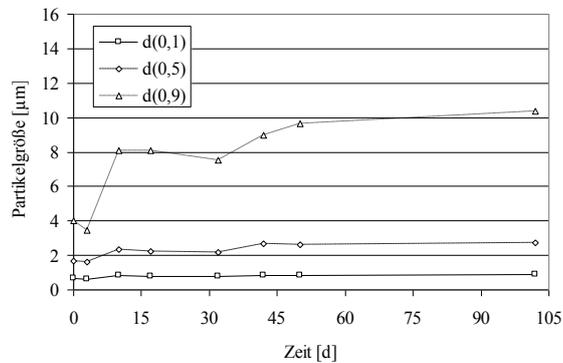
a.



b.



c.



d.

Abb. 29. Partikelgrößenwachstum im Laufe der Lagerung, a. Suspensionskonzentrat mit 1 % Tween 85, b. Suspensionskonzentrat mit 1 % Tween 85 nach 2 min US, c. Suspensionskonzentrat mit 1 % Span 20, d. Suspensionskonzentrat mit 1 % Span 20 nach 2 min US

3.1.6 Schmelzextrusion

Eine weitere Möglichkeit, den Wirkstoff in einen amorphen Zustand zu überführen, ist das Verfahren der Schmelzextrusion. Hierbei kann der Arzneistoff molekulardispers in einem amorphen Träger vorliegen. Dabei wird der Arzneistoff in der Schmelze der Trägermatrix gelöst. Dieses Verfahren wird gewählt, um weitere Möglichkeiten aufzuzeigen, den Wirkstoff in einen amorphen Zustand zu überführen. Weiterhin sollen Austauschpolymere mit ähnlichen Materialeigenschaften wie das Polyvinylcaprolactam-Polyvinylacetat-Polyethylenglycol-Copolymer gefunden werden. Dieses setzt sich aus 13 Teilen Polyethylenglykol 6000, 57 Teilen Vinylcaprolactam und 30 Teilen Vinylacetat zusammen. Sowohl dieses Copolymer mit Handelsnamen Soluplus, als auch die Vinylcaprolactamkomponente sind als Arzneimittelhilfsstoffe in einer der gängigen Pharmakopoen nicht monographiert.

Zunächst werden verschiedene Mischungen aus den Einzelkomponenten des Copolymers und verwandten Polymeren, wie dem Kollidon VA 64 und einem Vinylpyrrolidon-Vinylacetat-Copolymer, hergestellt. Das Polyethylenglykol wird gegen Cremophor EL (Macrogolglycerol-Ricinoleat) und Cremophor RH (Macrogolglycerol-Hydroxystearat) ausgetauscht. Die einzelnen Bestandteile werden in ein Becherglas eingewogen und auf einer Heizplatte aufgeschmolzen (Tab. 15). Anschließend werden mittels DSC die Glasübergangstemperaturen und für die Kombinationen mit PEG die Schmelzpunkte bestimmt.

Tab. 15. Zusammensetzung verschiedener Polymermischungen, die ermittelten Glasübergangstemperaturen und (sofern vorhanden) die Schmelzpunkte

30 Teile	57 Teile	13 Teile	Tg [°C]	Schmelzpunkt [°C]
Polyvinylacetat	PVP-12	PEG 6000	98	60
Polyvinylacetat	PVP-17	PEG 6000	122	62
Polyvinylacetat	PVP-25	PEG 6000	149	59
Polyvinylacetat	PVP-90	PEG 6000	94	58
Polyvinylacetat	PVP-12	Cremophor EL	96	-
Polyvinylacetat	PVP-12	Cremophor RH 40	94	-
Polyvinylacetat	PVP-17	Cremophor RH 40	122	-
PEG 6000	PVP-12	Cremophor EL	93	58
	Kollidon VA 64	PEG 6000	105	61
	Kollidon VA 64	Cremophor EL	96	-
	Kollidon VA 64	Cremophor RH	100	-

In Soluplus sind die einzelnen Bestandteile kovalent miteinander verknüpft, wohingegen es sich bei den nachgestellten Systemen lediglich um physikalische Mischungen handelt.

Kollidon VA 64 ist ein bewährter Extrudierhilfsstoff. Darüber hinaus liegt die Glasübergangstemperatur niedrig genug, um die Stabilität des Wirkstoffs nicht zu sehr zu

beanspruchen, aber hoch genug, um der Kristallisation in der Matrix während der Lagerung vorzubeugen. Das Cremophor soll die Polyethylenkomponente ersetzen. Für den Extruderversuch wird daher eine Mischung aus Kollidon VA 64 und Cremophor ausgewählt. Die Entscheidung für Cremophor EL und gegen Cremophor RH 40 fällt aufgrund der Viskositäten. Cremophor RH 40 ist pastös und führt beim Extrudieren zu Problemen bei der Pulverdosierung. Auch eine Flüssigdosierung ist aufgrund der Viskosität nicht möglich. Es besitzt thixotrope Eigenschaften. Bei einer Schergeschwindigkeit von 50 s^{-1} beträgt die Viskosität $14.880 \text{ mPa}\cdot\text{s}$, bei 100 s^{-1} $8.710 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ und bei 150 s^{-1} $6.731 \text{ mPa}\cdot\text{s}$. Für Cremophor EL werden in einem Bereich zwischen 1 und 150 s^{-1} Werte von $782 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ gemessen (6.5.12). Es verhält sich wie eine Newtonsche Flüssigkeit. Die Fließfähigkeit von Cremophor EL ist ausreichend, um über die Flüssigdosierung zudosiert werden zu können. Die Mischung aus 87 Teilen Kollidon VA 64 und 13 Teilen Cremophor EL wird mit unterschiedlichen Mengen an Wirkstoff beladen, um zu überprüfen, bis zu welcher Menge Arzneistoff dieser noch vollständig amorph vorliegt. Diese Beladung reicht in 5 %-Schritten von 10-30 %. In der DSC zeigt sich, dass ab einer Wirkstoffbeladung von $\geq 25 \%$ kristalline Anteile in der Schmelze vorhanden sind (Abb. 30).

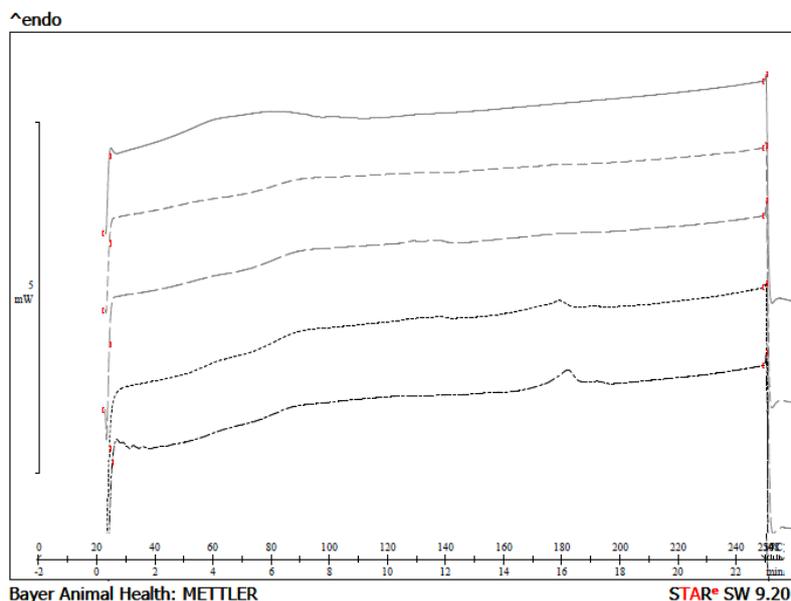


Abb. 30. Thermogramm von Kollidon VA 64-Cremophor EL-Mischungen mit unterschiedlicher Wirkstoffbeladung; 10 % (grau —), 15 % (grau - -), 20 % (grau - · -), 25 % (schwarz ···), 30 % (schwarz - · -)

Aufgrund dieses Ergebnisses wird die Extrusion mit einer 20 %igen Wirkstoffbeladung durchgeführt.

Das Mischen des Ausgangsmaterials erfolgt zunächst in einem Röhrenmischer (6.2.5), bevor es dann über eine Pulverdosiereinheit in den Extruder überführt wird. Abb. 31 zeigt die

schematische Darstellung eines Extruders (Thommes 2006). Bei der Extrusion wird ein gleichläufiger Zweischnckenextruder verwendet, wobei das Zudosieren von flüssigen Komponenten und das Extrudieren selbst in einem Arbeitsschritt ablaufen. Dies wird ermöglicht durch fördernde, verdichtende, mischende und knetende Schneckenelemente (Thiele 2003). Extrusion allgemein ist definiert als das Fließen einer verformbaren plastischen Masse durch eine Öffnung definierter Größe unter Druckaufwendung (Kleinebudde 1997).

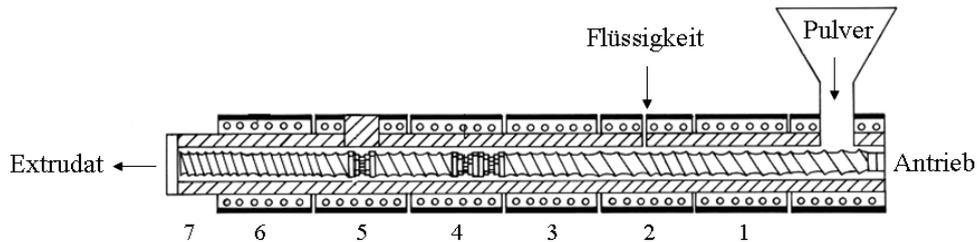


Abb. 31. Modell eines Zweischnckenextruders mit Düsenplatte, Temperiereinheiten, Zylinder und Schnecke

Während des Extrudierprozesses werden 4 verschiedene Chargen mit unterschiedlichen Temperaturprogrammen hergestellt. Zur Überprüfung des amorphen Zustands werden sowohl XRD- (6.5.18) als auch DSC-Messungen (6.5.17) durchgeführt. Im Röntgendiffraktogramm scheinen alle Proben im amorphen Zustand vorzuliegen. Allerdings zeigt sich in der DSC-Messung, dass in den Chargen -03 und -04 kristalline Anteile in dem Extrudat vorhanden sind (Abb. 32). Diese Menge ist so gering, dass sie in der XRD-Messung im Signalrauschen untergeht. Die Detektionsgrenze in Röntgendiffraktometrie-messungen ist für jede Substanz unterschiedlich. Für Emodepsid liegt sie bei etwa 5 % (Erfahrungswert Bayer).

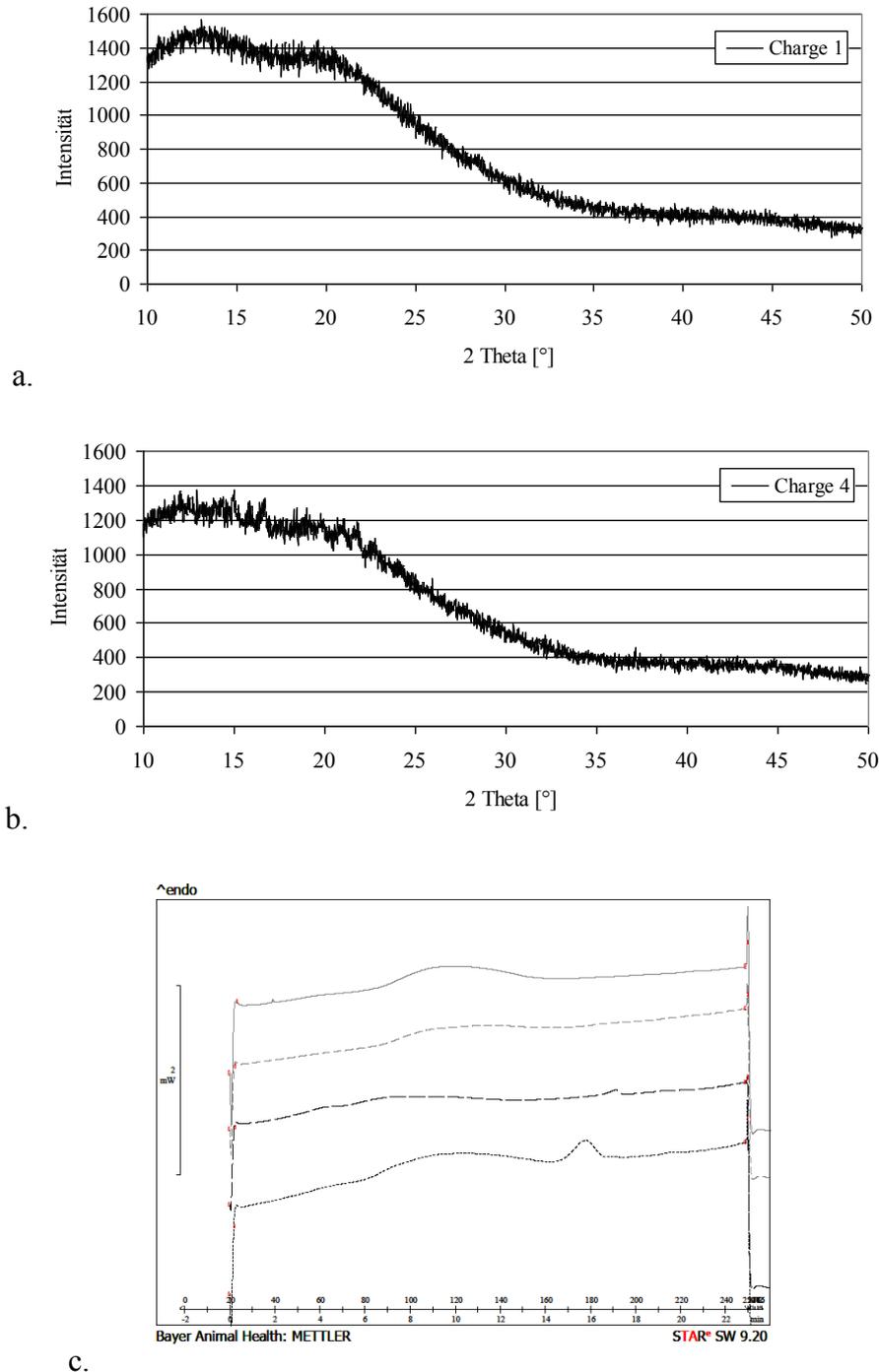


Abb. 32. XRD-Messung der Extrudatchargen a. 1 und b. 4 und c. Thermogramm der Chargen 1(grau —), 2 (grau - -), 3 (schwarz --) und 4 (schwarz "")

Überraschenderweise zeigen Charge 3 und 4 kristalline Anteile. Charge 2 liegt vollständig amorph vor, obwohl bei ihr die Extrudiertemperatur am geringsten ist. Generell steigt die Lösungsgeschwindigkeit mit zunehmender Temperatur und somit sind weniger kristalline Anteile zu erwarten. Diesem Befund wird nicht all zu viel Beachtung geschenkt, da es sich um einen einmalig durchgeführten Versuch handelt. Für die Weiterverarbeitung zu Tabletten wird Charge 1 verwendet.

3.1.7 Tablettenformulierungen der Formulierungskonzepte

Aus den funktionierenden Systemen, also dem Copräzipitat mit PVP-12, dem Copräzipitat mit Soluplus, dem mikronisierten Wirkstoff und dem Schmelzextrudat, werden für Bioverfügbarkeitsuntersuchungen Tablettenformulierungen entwickelt (6.2.6). Hierfür werden bereits existente Tablettenrezepturen verwendet. Diese setzen sich aus dem Trägerstoff Vivapur Typ 14 (mikrokristalline Cellulose), den Sprengmitteln Polyplasdone XL 10 (Crospovidon) und Ac-Di-Sol (Croscarmellose-Natrium), dem Benetzungsmittel Texapon (Natriumdodecylsulfat), dem Fließregulierungsmittel Aerosil 200 (hochdisperses Siliciumdioxid) und dem Schmiermittel Magnesiumstearat (Tab. 16) zusammen. Die Suspensionskonzentrattablettenmischung enthält zusätzlich Avicel PH 101 (mikrokristalline Cellulose). Dieses wird benötigt, um das Sonnenblumenöl zu immobilisieren. Wahrscheinlich ist bei dieser Formulierung die Verwendung einer mikrokristallinen Cellulose ausreichend, da lediglich der Hersteller ein anderer ist, allerdings soll die bestehende Rezeptur nicht verändert werden. Die Sprengmittel unterscheiden sich zwar in ihren Eigenschaften, aber auch hier ist davon auszugehen, dass die Verwendung einer Sorte ausreichend ist.

Tab. 16. Verschiedene Tablettenformulierungen bezogen auf 10 mg Emodepsid

Einsatzstoff [mg]	Emodepsid- PVP-12- Copräzipitat	Emodepsid- Soluplus- Copräzipitat	mikronisiertes Emodepsid	Schmelzextrudat
Emodepsid-System (Charge)	40 (100726-01)	40 (100726-02)	40 (110117-01)	50 (110216-01)
Avicel PH 101	-	-	150	-
Vivapur Typ 14	60	60	120	60
Ac-Di-Sol	40	40	100	40
Polyplasdone XL 10	40	40	100	40
Texapon K 12	1,5	1,5	3	1,5
Aerosil 200	3	3	10	3
Magnesiumstearat	3	3	6	3

Die Tablettenformulierungen werden in einer Bioverfügbarkeitsstudie mit einer 10 %igen Emodepsid-Solketal (1,2-O-Isopropylidenglycerin)-Lösung verglichen. Zu diesem Zweck wird die entsprechende Wirkstoffmenge in Solketal gelöst und der Gehalt dieser Lösung bestimmt (6.5.13.2). Bevor die Tabletten verabreicht werden, wird in Freisetzunguntersuchungen überprüft, ob sie den Kriterien des europäischen Arzneibuchs für schnell freisetzende Tabletten genügen. In Abb. 33 sind die Freisetzungen dargestellt.

Die Bioverfügbarkeitsstudien der PVP-12-Copräzipitat- und Suspensionskonzentrattabletten werden extern durchgeführt. Daher kann nicht für jeden Hund eine individuelle Tablette nach seinem aktuellen Gewicht angefertigt werden. Um allerdings eine möglichst genaue

Dosierung des Wirkstoffs zu gewährleisten, werden Tabletten mit 10 mg, 12 mg, 14 mg und 16 mg Wirkstoff und einer Teilerbe hergestellt. Die Freisetzungsuntersuchungen und Gehaltsbestimmungen dieser beiden Formulierungen erfolgen für jedes Tablettengewicht. In den Freisetzungen sind sowohl die Suspensionskonzentrat-, als auch die PVP-12-Copräzipitat-Tabletten zueinander äquivalent (Tab. 17).

Tab. 17. Vergleich der f_2 -Werte unterschiedlicher Tablettengewichte und unterschiedlicher Chargen zueinander

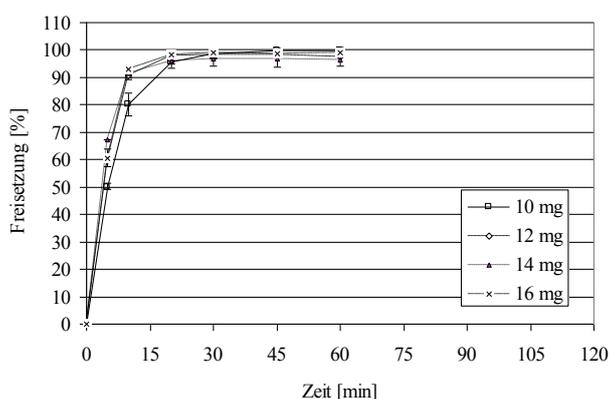
	10 mg/ 12 mg	10 mg/ 14 mg	10 mg/ 16 mg	12 mg/ 14 mg	12 mg/ 16 mg	14 mg/ 16 mg
PVP-12-Copräzipitat-Tablette						
Suspensionskonzentrat-Tablette Charge -01	60,2	60,9	64,5	75,7	51,5	56,1
Suspensionskonzentrat-Tablette Charge -02	81,7	77,9	71,9	71,3	63,7	79,5

	10 mg	12 mg	14 mg	16 mg
Suspensionskonzentrat-Tabletten Charge 01/Charge -02	57,9	46,9	45,5	56,2

Die Schmelzextrudat- und Soluplus-Copräzipitat-Tabletten werden intern getestet. Dabei werden die Tablettengewichte und damit die Dosierung individuell an jeden einzelnen Hund angepasst. Zu Analysezwecken werden von diesen Tablettenmischungen Tabletten mit einem Wirkstoffgehalt von 10 mg produziert und analysiert.

Alle Tabletten entsprechen den Kriterien für schnell freisetzende Darreichungsformen, da bei allen mehr als 75 % Wirkstoff innerhalb der ersten 45 min freigesetzt wird.

Es fällt auf, dass die Soluplus-Copräzipitat-Tablette ihren Wirkstoff, im Vergleich zu der PVP-12-Copräzipitat-Tablette deutlich langsamer freigibt (Abb. 33). Dies lässt sich durch die teilweise Rekristallisation des Wirkstoffs erklären (3.1.3).



a.

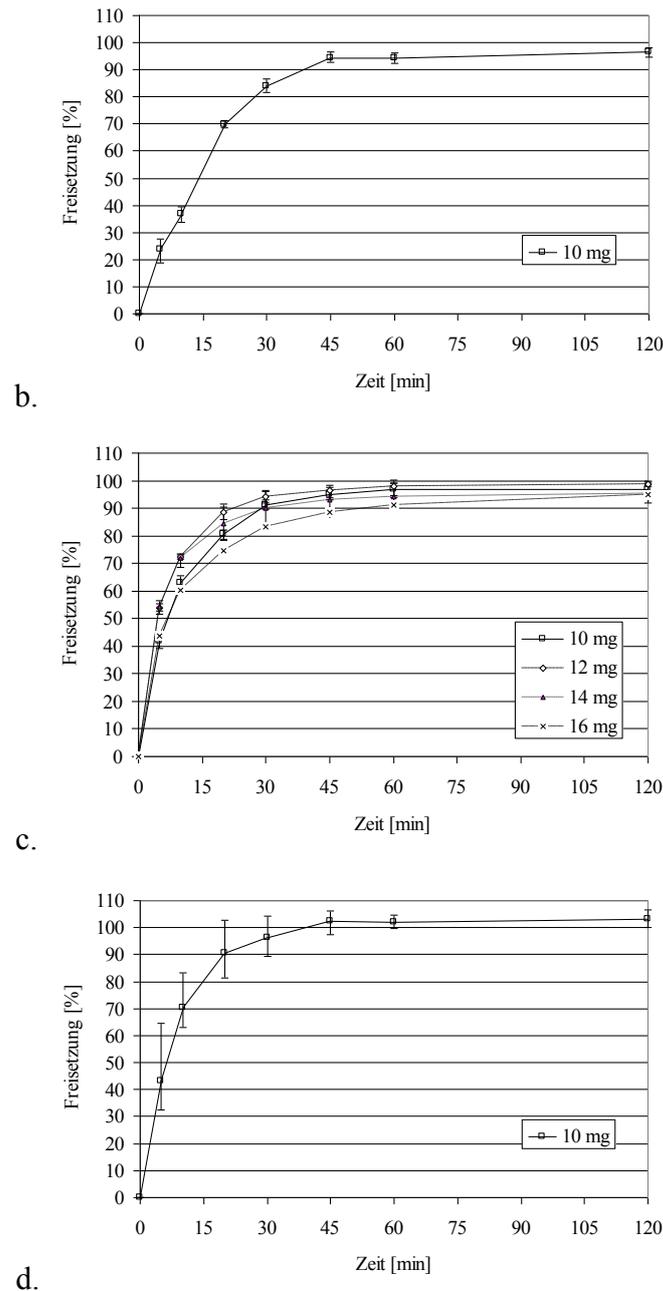


Abb. 33. Freisetzung der a. 10 mg, 12 mg, 14 mg und 16 mg PVP-12-Copräzipitat-Tabletten (n = 3), b. 10 mg Soluplus-Copräzipitat-Tabletten (n = 3), c. 10 mg, 12 mg, 14 mg, 16 mg Suspensionskonzentrat-Tabletten (Charge 02) (n = 3) und d. 10 mg Schmelzextrusions-Tabletten (n = 3)

Aufgrund des nicht reproduzierbaren Mahlvorgangs des Suspensionskonzentrates bezüglich der Teilchengröße, wird der Einfluss der unterschiedlichen Teilchengröße auf die Freisetzung der Tabletten überprüft. Zu diesem Zweck werden 2 Chargen von 2 unterschiedlichen Produktionstagen freigesetzt und miteinander verglichen.

Die Tabletten der Charge 100910-01 geben den Wirkstoff langsamer frei als die Tabletten der Charge 110117-01 (Abb. 34). Dies lässt sich durch die feinere Partikegröße des Copräzipitates erklären (Tab. 18). Bei gleichen Mahlbedingungen entstehen Partikel mit unterschiedlicher Größe, die sich vor allem im $d(0,9)$ -Wert unterscheiden. Werden die f_2 -

Werte der einzelnen Tablettengrößen innerhalb einer Charge untereinander verglichen, so sind sie äquivalent anzusehen (6.5.22), wohingegen bei einem Chargenvergleich der gleichen Tablettengrößen nur zwei von 4 Tablettengrößen äquivalent sind (Tab. 17).

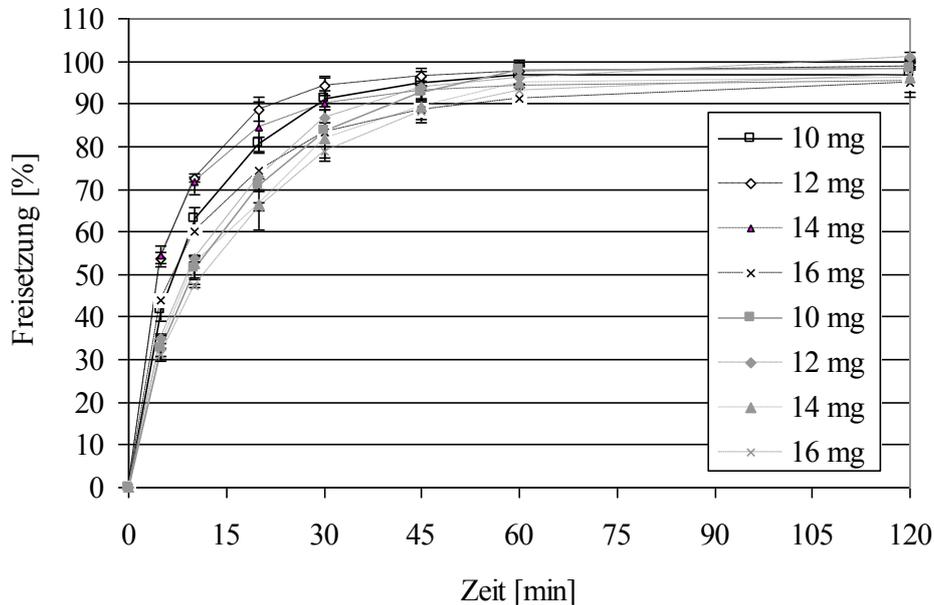


Abb. 34. Vergleich der Freisetzung von Suspensionskonzentrat-Tabletten, Charge 100910-01 (schwarz) und Charge 110117-01 (grau)

Tab. 18. Partikelgrößenbestimmung von gemahlenem Emodepsid [μm], am Tag des Mahlens vermessen

	100910-01	110117-01
d(0,1)	0,59	0,56
d(0,5)	1,34	1,20
d(0,9)	2,81	6,75

Der Prozess des Mahlens ist noch nicht reproduzierbar. Daher muss der Herstellungsschritt des Mahlens zukünftig weiter optimiert werden.

Der Gehalt der Tabletten wird mittels HPLC bestimmt (6.5.13.2). Dazu werden jeweils 10 Tabletten gemörsert und in 3fach Bestimmung untersucht (Tab. 19).

Tab. 19. Gehalt der unterschiedlichen Formulierungen bezogen auf die Dosierung [%], (RSD [%])

Gehalt	10 mg	12 mg	14 mg	16 mg
Soluplus-Copräzipitat	102,7 (3,2 %)			
Schmelzextrudat	97,6 (2,4 %)			
PVP-Copräzipitat	97,1 (2,6 %)	100,7 (1,6 %)	100,3 (1,6 %)	100,1 (2,6 %)
Suspensionskonzentrat	99,1 (2,7 %)	97,75 (3,8 %)	101,5 (2,1 %)	100,2 (1,9 %)

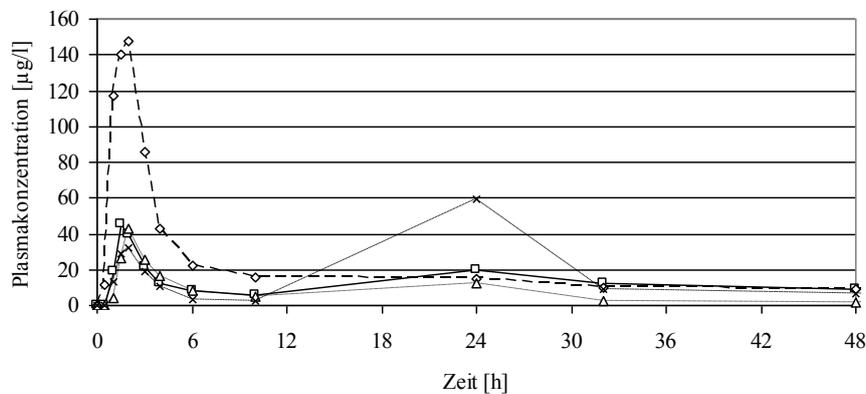
3.2 Bioverfügbarkeitsstudien

3.2.1 Allgemeines

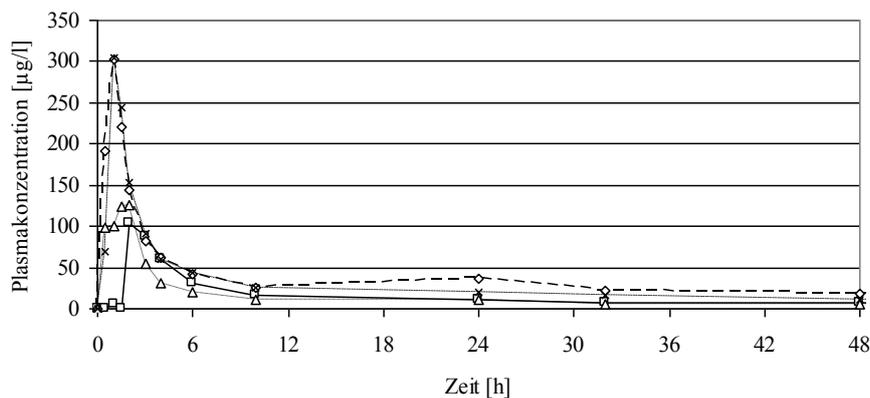
In Pharmakokinetikstudien sollen die Formulierungskonzepte in Bezug auf ihren Einfluss auf die Bioverfügbarkeit getestet werden. Zu diesem Zweck werden Hunden Tabletten mit einer Dosierung von 1 mg/kg Körpergewicht verabreicht. Ein Teil der Versuche wird intern bei der Bayer Animal Health GmbH, Monheim, Deutschland, durchgeführt und ein anderer Teil in einem externen Forschungsinstitut in Mumbai, Indien. In Monheim werden die Soluplus-Copräzipitat-, die Schmelzextrudat-Tabletten und die Emodepsid-Solketal-Lösung als Referenz und extern die PVP-Copräzipitat- und Schmelzextrudat-Tabletten getestet.

3.2.2 Bioverfügbarkeitsstudie bei der Bayer Animal Health GmbH, Monheim

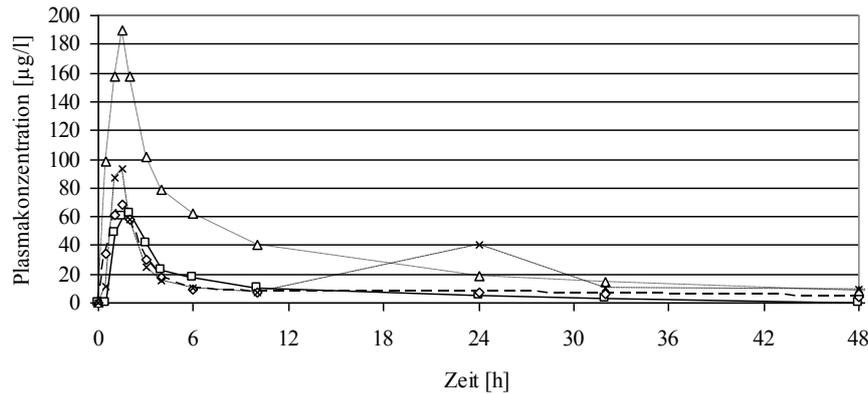
Für die Bestimmung der Bioverfügbarkeit der Formulierungen wird den Beagle-Hunden nach Verabreichung der Soluplus-Copräzipitat-, der Schmelzextrudat-Tabletten und der Solketal-Lösung Blut abgenommen (6.3.1) und der Wirkstoffgehalt im Blut bestimmt (6.5.15) (Abb. 35):



a.



b.



c.

Abb. 35. Plasmaspiegel der ersten 48 h nach Verabreichung von a. Soluplus-Coprazipitat-Tabletten, b. Schmelzextrudat-Tabletten und c. Solketal-Lösung

Die Schmelzextrudatformulierung zeigt mit Abstand die höchste Bioverfügbarkeit, während die Plasmakonzentrationen der Lösung und der Soluplus-Formulierung in einem ähnlichen Bereich liegen. Sowohl bei den Soluplus-Tabletten, als auch bei der Solketal-Lösung besitzt jeweils ein Hund einen dreimal so hohen C_{\max} -Wert wie die anderen drei Hunde. Bei der Schmelzextrudatformulierung zeigen zwei Hunde einen hohen und die anderen beiden Hunde einen niedrigeren C_{\max} -Wert (Tab. 20). Da bei allen Formulierungen Ausreißer vorhanden sind, werden sie in der Berechnung der jeweiligen Mittelwerte nicht eliminiert, sondern in die Rechnung mit einbezogen. Neben der C_{\max} -Konzentration werden der t_{\max} -Wert, die Halbwertszeit und die Flächen unter den Kurven von 0–24 h (AUC_{0-24}) und von 0 bis zum letzten Messwert (AUC_{last}) berechnet.

Tab. 20. Einzelwerte der berechneten Kinetikparameter nach Verabreichung der Soluplus- und Schmelzextrudat-Tabletten und der Solketal-Lösung

Formulierung mit	Hund	C_{\max} [µg/l]	t_{\max} [h]	$t_{1/2}$ [h]	AUC_{0-24} [µg·h/l]	AUC_{last} [µg·h/l]
Soluplus-Coprazipitat	1	42,5	2	30	252	457
	2	59,7	24	44	531	1150
	3	148,0	2	49	707	1293
	4	45,2	1,5	29	324	925
Schmelzextrudat	1	303	1	39	1248	2447
	2	305	1	29	1105	1785
	3	104	2	46	602	1079
	4	126	2	59	557	877
Solketal-Lösung	1	190,0	1,5	19	969	1417
	2	93,2	1,5	49	572	1255
	3	68,5	1,5	47	329	556
	4	62,2	2	13	367	400

3.2.3 Bioverfügbarkeitsstudie am externen Forschungsinstitut

Die Bioverfügbarkeitsstudie der PVP-12-Copräzipitat- und Suspensionskonzentrat-Tabletten erfolgt extern. Im Unterschied zu den intern getesteten Formulierungen werden diese Tabletten zehn Hunden verabreicht (6.3.2). Bis zum Ende dieser Arbeit liegen die Analyseergebnisse der Suspensionskonzentrat-Tabletten noch nicht vor, daher sind ausschließlich die Ergebnisse der PVP-Formulierung aufgeführt (Abb. 36).

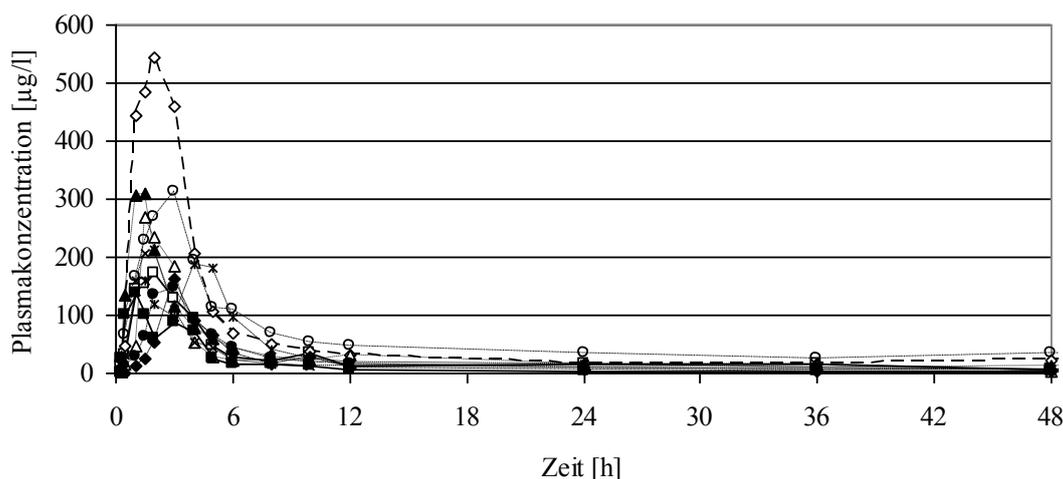


Abb. 36. Plasmaspiegel der ersten 48 h nach Verabreichung von PVP-12-Copräzipitat-Tabletten

Die C_{\max} -Werte liegen zwischen 139 und 543 $\mu\text{g/l}$. Auch bei diesen Formulierungen zeigt ein Hund besonders hohe Plasmaspiegel (Tab. 21).

Tab. 21. Einzelwerte der berechneten Kinetikparameter nach Verabreichung der PVP-12-Copräzipitat Tabletten

Formulierung mit	Hund	C_{\max} [$\mu\text{g/l}$]	t_{\max} [h]	$t_{1/2}$ [h]	AUC_{0-24} [$\mu\text{g}\cdot\text{h/l}$]	AUC_{last} [$\mu\text{g}\cdot\text{h/l}$]
PVP-12	1	172	2	33	895	1351
	2	146	3	54	759	1100
	3	543	2	53	2248	3217
	4	270	1,5	17	1037	1394
	5	214	2	41	820	1126
	6	314	3	54	1992	3320
	7	139	1	37	542	631
	8	164	3	37	629	803
	9	309	1,5	54	1139	1673
	10	189	4	27	1226	1577

3.2.4 Vergleich der Bioverfügbarkeitsstudien

Obwohl die Bedingungen nicht identisch sind, lassen sich die beiden Studien miteinander vergleichen, da viele Punkte zwar voneinander abweichen, wie die Rasse und die Anzahl der

Hunde, aber andere wichtige Punkte, wie die Dosierung, die Tierspezies Hund und die gleiche Analyse entsprechen. Da das Ergebnis der Tablettenformulierung mit dem Suspensionskonzentrat noch nicht vorliegt, werden hier nur die anderen Formulierungen untereinander verglichen (Abb. 37). Aufgrund der großen Streuungen, wie aus den Mittelwertskurven der einzelnen Formulierungen (3.2.2 und 3.2.3) ersichtlich, wird auf die Auftragung der Spannweiten oder Standardabweichungen verzichtet.

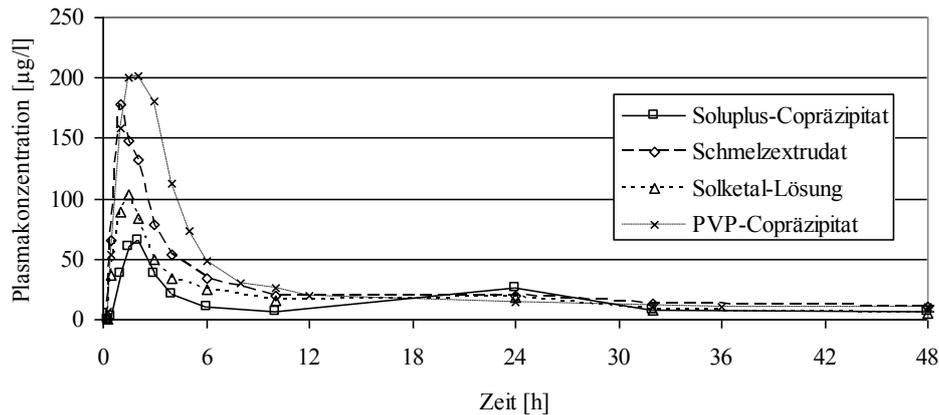


Abb. 37. Plasmaspiegel der Formulierungen im direkten Vergleich, $n = 4$ bzw. $n = 10$ (PVP-Coprazipitat), MW

Das PVP-Coprazipitat hat die höchste Bioverfügbarkeit. Dies wird an den AUC-Werten deutlich (Tab. 22).

Tab. 22. Mittelwerte der Pharmakokinetikdaten der Emodepsid-Formulierungen

MW	C_{\max} [µg/l]	t_{\max} [h]	$t_{1/2}$ [h]	AUC_{0-24} [µg·h/l]	AUC_{last} [µg·h/l]
Soluplus-Coprazipitat	64,2	2,0	37	418	891
Schmelzextrudat	186,5	1,4	42	825	1.426
Solketal-Lösung	103,5	1,6	28	508	793
PVP-Coprazipitat	246,0	2,3	41	1.129	1.619

Der C_{\max} -Wert der PVP-Formulierung ist fast viermal so hoch wie der des Soluplus-Coprazipitates, während die AUC_{last} knapp doppelt und die AUC_{0-24} fast dreimal so groß ist. Dieser große Unterschied zwischen den beiden Coprazipitatformulierungen ist nicht zu erwarten, auch wenn die Tablettenformulierung den Wirkstoff von allen Formulierungen am langsamsten freisetzt und der Hauptresorptionsort im oberen Dünndarmabschnitt liegt. Aufgrund dieser Tatsache werden die Tabletten, die das Soluplus als Polymer enthalten, genauer untersucht. In der DSC-Untersuchung (6.5.17) zeigt sich, dass das Emodepsid in der Tablette nicht mehr vollständig amorph, sondern teilweise kristallin vorliegt, wohingegen der Wirkstoff in dem Coprazipitat amorph ist (Abb. 38). Während der Verarbeitung kristallisiert

ein Teil des Wirkstoffes aus. Es kann angenommen werden, dass eine Soluplus-Copräzipitat-Tablette, in der der Wirkstoff vollständig amorph vorliegt, die Bioverfügbarkeit dieser Formulierung steigern kann. Zusätzlich kann bei diesen Tabletten versucht werden, die Formulierung dahingehend zu verändern, dass der Wirkstoff schneller freigegeben und damit eventuell die Bioverfügbarkeit erhöht wird.

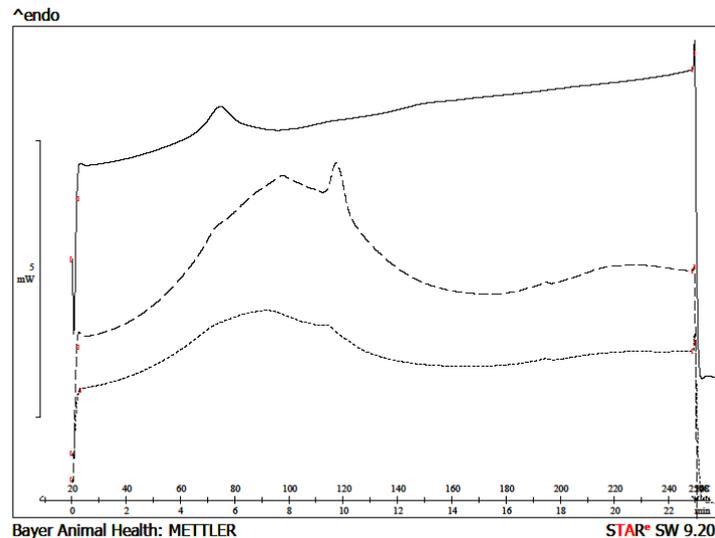


Abb. 38. Thermogramm von Soluplus-Copräzipitat (—), Soluplus-Tablettenmischung (---) und Soluplus-Tabletten (- -)

Die Daten der Suspensionskonzentrat-Tablette können bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht ausgewertet werden. Es kann erwartet werden, dass die Plasmaspiegel geringere Werte annehmen als die der Solketal-Lösung. Der Wirkstoff in der Suspensionskonzentrat-Tablette ist zwar zerkleinert, liegt aber größtenteils kristallin vor. Da sich bei den Soluplus-Tabletten die Bioverfügbarkeit bereits durch den kristallinen Anteil vermindert hat, ist anzunehmen, dass dieser Effekt hier noch stärker ausgeprägt ist. Die Bioverfügbarkeit scheint von dem Zustand des Wirkstoffes abhängig zu sein. Das vielversprechendste Konzept ist das Umwandeln des Wirkstoffes aus dem kristallinen in den amorphen Zustand.

Die Lösung zeigt im Vergleich zum Copräzipitat eine geringere Bioverfügbarkeit, da der Wirkstoff zwar im gelösten Zustand verabreicht wird, im Körper aber möglicherweise wieder ausfällt. Um dies zu untersuchen, werden 2 Tropfen der 10 %igen Emodespid-Solketal-Lösung in 3 ml Wasser gegeben. Der Wirkstoff fällt unmittelbar aus. Werden 2 Tropfen Solketal in Wasser gegeben, bilden sich Schlieren, bevor sich die Flüssigkeiten vollständig mischen (Abb. 39).

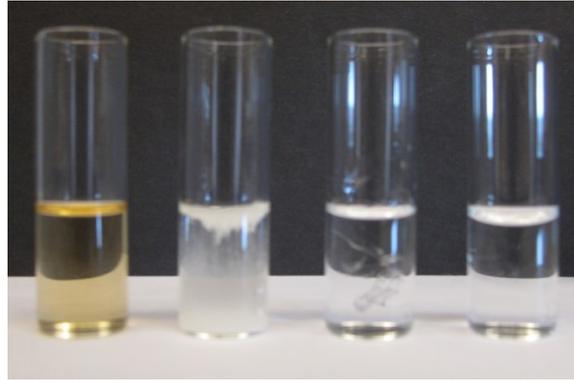


Abb. 39. 10 %ige Emodepsid-Solketal-Lösung, 2 Tropfen 10 %-ige Solketal-Lösung in Wasser, 2 Tropfen Solketal in Wasser, Wasser (von links nach rechts)

Bei den Polymerverbindungen ist zu erwarten, dass diese in-vivo länger in Lösung verbleiben, da sie aufgrund ihrer Viskosität unter anderem als Rekristallisationsverhinderer wirken.

Die Halbwertszeiten entsprechen den pharmakokinetischen Erwartungswerten für den Wirkstoff Emodepsid. Sie erreichen im Mittel Werte von 28 h für die Lösung bis 42 h für die Schmelzextrudat-Tablette. Auch die großen Schwankungen in der Halbwertszeit sind für Emodepsid bekannt.

Um eine Aussage über eine mögliche Verbesserung der Plasmaspiegelstreuung treffen zu können, werden die relativen Standardabweichungen der einzelnen Messzeitpunkte miteinander verglichen. Zu diesem Zweck sind in Tab. 23 die Mittelwerte und die relativen Standardabweichungen (RSD) aufgelistet.

Tendenziell ist die relative Standardabweichung der Werte der Schmelzextrudatformulierung kleiner als der der anderen Formulierungsansätze. Allerdings sollte bei dieser Bewertung der Fokus auf die Werte mit hoher Plasmaspiegelkonzentration gelegt werden, da es bei kleinen Werten sehr schnell zu großen relativen Standardabweichungen kommen kann. Darüber hinaus ist das Probandenkollektiv sehr klein, da es nur aus 4 bzw. 10 Hunden besteht. Daher lassen sich auch nur leichte Tendenzen abschätzen. Für eine Wertung sollten weitere Daten vorliegen.

Tab. 23. Mittelwerte [$\mu\text{g/l}$] und RSD [%] der Plasmaspiegel von Emodepsid nach der Verabreichung der verschiedenen Formulierungen

Zeit [h]	Soluplus-Coprazipitat		Schmelzextrudat		Lösung		PVP-Coprazipitat	
	MW	RSD	MW	RSD	MW	RSD	MW	RSD
0	0	-	0	-	0	-	0	-
0,25	-	-	-	-	-	-	6	125
0,5	3	200	90	88	36	67	54	82
1	38	138	178	84	89	76	159	83
1,5	60	89	148	76	103	74	200	67
2	66	84	132	17	84	139	201	70
3	38	84	78	21	50	111	180	65
4	20	73	53	28	34	84	112	53
5	-	-	-	-	-	-	73	65
6	10	78	34	33	25	69	48	67
8	-	-	-	-	-	-	30	60
10	7	84	20	37	16	73	26	50
12	-	-	-	-	-	-	20	64
24	27	83	19	63	18	77	14	61
32	8	51	13	58	8	83	11	63
48	7	53	10	59	5	86	11	92
72	6	19	7	55	3	99	8	100
96	3	76	5	62	1	110	-	-
168	0	-	0	-	0	-	-	-

Insgesamt gesehen lässt sich mit verschiedenen Formulierungskonzepten die Bioverfügbarkeit deutlich verbessern. Bei der Bioverfügbarkeit scheint zum einen die Freisetzungsgeschwindigkeit der Tabletten eine Rolle zu spielen, aber vor allem der Zustand des Wirkstoffs. Liegt der Wirkstoff amorph vor, ist es möglich, den C_{max} -Wert und die AUC deutlich zu erhöhen.

3.3. Biopharmazeutische Charakterisierung

3.3.1 Einleitung

Um den Resorptionsort von Emodepsid bestimmen zu können, werden zwei in vivo Verfahren miteinander verglichen. Zum einen ein Kapselsystem, die sogenannte MAARS-Technik, und zum anderen die Ligations-Technik.

3.3.2 Magnetic Active Agent Release System - MAARS-Studie

Mit Hilfe der MAARS-Technologie können zuvor aufmagnetisierte Kapseln auf ihrem Weg durch den Magen-Darm-Trakt verfolgt werden. Die zusätzliche Möglichkeit des Öffnens der Kapsel bietet die Möglichkeit, dass der Wirkstoff gezielt in einem Darmabschnitt oder auch im Magen freigesetzt werden kann.

3.3.2.1 Vorbereitungen

Eine hinreichende Voraussetzung für die Lokalisierung der Kapsel ist, dass sich der Proband, in diesem Fall der Hund, während der Messung möglichst ruhig verhält. Die Aufnahmen können zwischen wenigen Minuten und mehreren Stunden dauern. Um die Kapsel zu lokalisieren, ist ein kurzer Messzeitraum ausreichend, ist es das Ziel, eine ganze Passage aufzunehmen, verlängert sich dieser. Die Eigenbewegung des Hundes kann dazu führen, dass eine Frequenzuntersuchung nicht möglich ist, da die gemessenen Frequenzen von den Bewegungsartefakten überdeckt werden. Auch eine 3D-Messung ist nicht möglich, da das System nicht zwischen Bewegungen des Körpers und Bewegungen der Kapsel differenzieren kann. Damit sich die Hunde für eine solche Messung ruhig verhalten, werden sie über Wochen trainiert. Zum einen werden die Hunde auf einem Kissen zwischen den Platinen gebettet und zum anderen werden sie in eine Hängematte gestellt (Abb. 40).

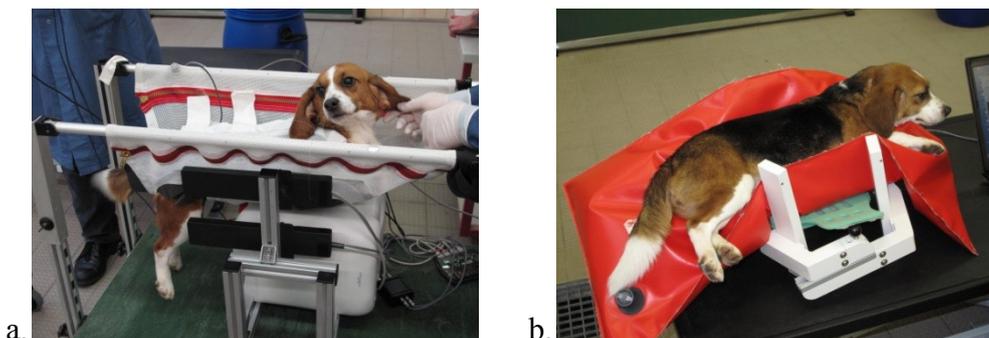


Abb. 40. a. Hängematten- bzw. b. Kissenkonstruktion, damit sich der Hund möglichst ruhig verhält. Die Platinen (a. schwarz, b. weiß) begrenzen den Messbereich.

Während des Versuchs zeigt sich, dass keines der beiden Systeme dem anderen überlegen ist, da manche Hunde das Liegen auf dem Kissen und andere wiederum das Stehen in der Hängematte bevorzugen. Als Belohnungssystem wird mit Leckerlis gearbeitet.

3.3.2.2 Vorversuche

Da die MAARS-Technologie zuvor noch nie am Hund angewandt wurde, werden zunächst Vorversuche durchgeführt, um zu überprüfen, ob sich die Kapsel im Hund lokalisieren lässt und sich die aus der Literatur bekannten Frequenzen (Tab. 4) nachweisen lassen.

Eine Lokalisierung der Kapsel im Hundekörper ist problemlos möglich. Allerdings zeigen sich trotz 16-stündiger Nüchternheit des Hundes, zum Zeitpunkt der Verabreichung der Kapsel, Magepassagezeiten von bis zu 32 h. Dies macht eine gezielte Öffnung in einem bestimmten Darmabschnitt unmöglich, da eine permanente Messung über diesen langen Zeitraum nicht durchführbar ist und so eventuell Passagen verpasst werden. Die Ursache dieser langen Magenentleerungszeit kann entweder in der Kapselgröße begründet sein oder in dem Leckerli, welches der Hund am Ende einer Messperiode, die unterschiedlich lang sein kann, bekommt. Im Vorversuch zeigt sich, dass die MAARS-Kapsel, mit einer Länge von 18 mm und einem Durchmesser von 8 mm, im Darm nicht frei drehbar ist, sondern immer gleich gerichtet weitertransportiert wird. Daher ist die Größe und das Gewicht der Kapsel, ~ 2,9 g durch die FeCoCr-Legierung, als Ursache für die lange Verweilzeit der Kapsel im Magen nicht auszuschließen. Bevor die Kinetikstudie gestartet werden kann, müssen daher weitere Versuche durchgeführt werden. Da dabei eine genauere Frequenzbestimmung nicht notwendig ist, wird für die Bestimmung der Magenpassagezeit in diesen Versuchen eine einfachere Methode entwickelt. Zu diesem Zweck werden handelsübliche Gelatinekapseln unterschiedlicher Größe mit Bariumsulfat und Edelstahlkernen gefüllt und durch Röntgenaufnahmen lokalisiert. Um ein Zerfallen der Kapseln bereits im Magen zu verhindern, werden diese mit Schellack überzogen. Es wird eine hochviskose Schellacklösung hergestellt, in die die Kapseln mehrfach eingetaucht werden.

Die Verwendung der Eisenkerne ist notwendig, da eine Füllung mit Bariumsulfat ein Kapselgewicht von 650 mg nicht übersteigt, die MAARS-Kapsel aber deutlich schwerer ist. Als Edelstahlkerne werden Rundedelstahlstücke mit einem Durchmesser von 6 mm, einer Länge von etwa 12 mm und einem Gewicht von etwa 3 g verwendet. Wichtig ist, dass die Enden der abgeschnittenen Stücke abgerundet sind, um die Darmschleimhaut des Hundes nicht zu verletzen.

Zusätzlich zu den Gelatinekapseln werden abschließend auch MAARS-Kapseln den Hunden verabreicht (Tab. 24).

Nachdem dem Hund jeweils eine Kapsel verabreicht wurde, wird alle 30 min ein Röntgenbild aufgenommen. Aufgrund des magensaftresistenten Überzugs kann die Zeit bestimmt werden, die die Kapsel im Magen verweilt, bevor sich die Kapselhülle im Dünndarm auflöst. Zur besseren Lokalisation wird bei den Kapseln mit den Eisenkernen der Hohlraum zwischen Kern und Kapsel zusätzlich mit Bariumsulfat gefüllt. Abb. 41 zeigt Röntgenaufnahmen 30 bzw. 60 min nach Kapselgabe. Nach 30 min befindet sich die Kapsel noch im Magen und nach 60 min bereits im vorderen Teil des Dünndarms.

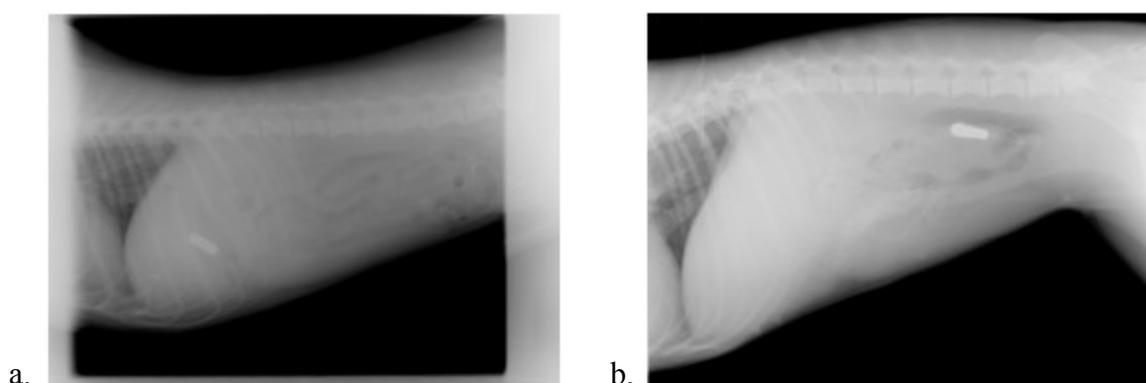


Abb. 41. Röntgenaufnahmen: a. 30 min und b. 60 min nach Kapselgabe

Tab. 24. Zeit, die verschiedene Kapselgrößen und -gewichte für ihre Magenpassage benötigen

Kapselgewicht [mg]	Kapselmaße [cm] (Länge/Durchmesser)	Magenpassagezeit [h]
~ 140	1,43/0,52	< 1
~ 500	2,16/0,75	< 1
~ 650	2,3/0,84	< 1
~ 2200	2,3/0,84	< 1
~ 3000	2,3/0,84	< 1
~ 3700	2,3/0,84	> 24*; > 24*
~ 3700	2,3/0,84	< 1,5; < 2; < 5; < 1; < 1,5
2896 (= MAARS-Kapsel)	1,8/0,8	< 1,5; < 1; < 2; < 0,5; < 1

* Hund gefüttert

Die Versuche werden in der Regel mit nüchternen Hunden durchgeführt. Dabei beträgt die maximale Magenpassagezeit 5 h. Dies ist auch der Fall, wenn die Kapseln deutlich größer und schwerer sind als die hinterher verwendeten MAARS-Kapseln. Sobald der Hund gefüttert ist, ist die Magenverweilzeit unkontrollierbar lang. Die Ursache der langen Magenverweilzeiten ist nicht in der Kapselgröße begründet, sondern an dem nicht nüchternen Zustand des Hundes durch die Belohnungsleckerlis. Schon ein einziges Leckerli scheint auszureichen, dass die

Putzwelle, mit der Partikel > 4 mm aus dem Magen abgegeben werden (Coupe 1991), ausbleibt. Aufgrund dieses Ergebnisses wird den Hunden im Hauptversuch zur Belohnung kein Leckerli verabreicht. Dies führt zu einer deutlichen Verkürzung der Magenverweilzeit auf maximal 6 h. Im Mittel beträgt sie etwa 3 h. Dieser Wert ist um 1 h größer als der aus der Literatur bekannte Wert, indem die Phase III-Motilität im nüchternen Stadium etwa alle 2 h eintritt (Dressman 1986, Itoh 1986).

3.3.2.3 Hauptversuch

Ziel des Versuches ist es, den Wirkstoff gezielt in einem bestimmten Darmabschnitt durch Öffnen der Kapseln freizugeben und anschließend die Resorption zu bestimmen. Die Lokalisierung der Kapsel erfolgt hier hauptsächlich über die gemessenen Kontraktionen (Tab. 25, Abb. 42).

Tab. 25. Gemessene Frequenzen und Geschwindigkeiten der Kapsel in den Magen-Darm-Abschnitten

Darmabschnitt	gemessene Frequenz [Kontraktionen/min]	Geschwindigkeit [cm/s]
Magen	5,4; 5,3; 5,9; 5,9; 5,7; 5,6; 5,7; 5,4; 5,9; 5,6; 5,8 5,6; 5,2	
Duodenum	17,6; 17,6; 18,4; 17,9; 19,7; 18,6; 18,3; 18,7	0,45; 0,35; 0,23; 0,27; 0,21; 0,13; 0,33
Jejunum	15,2; 15,1; 16,9; 16,0; 14,4; 15,2; 16,0; 16,0	0,10; 0,08; 0,2; 0,08; 0,08; 0,10; 0,09; 0,04
Ileum	12,5; 13,7; 13,6; 12,8; 13,0	0,04; 0,08
Colon	k. d. F.; k. d. F.; k. d. F.; k. d. F.*	

* keine dominante Frequenz

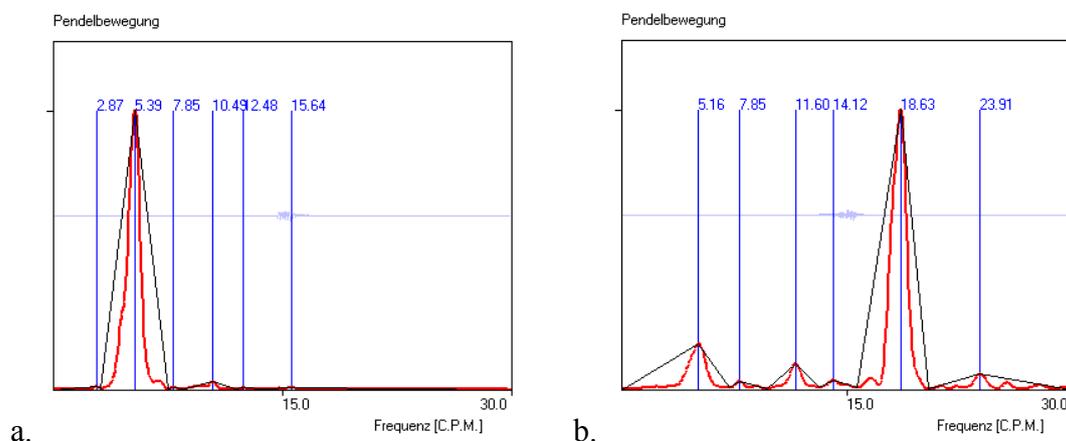


Abb. 42. Frequenzmuster aus a. dem Magen und b. dem Duodenum

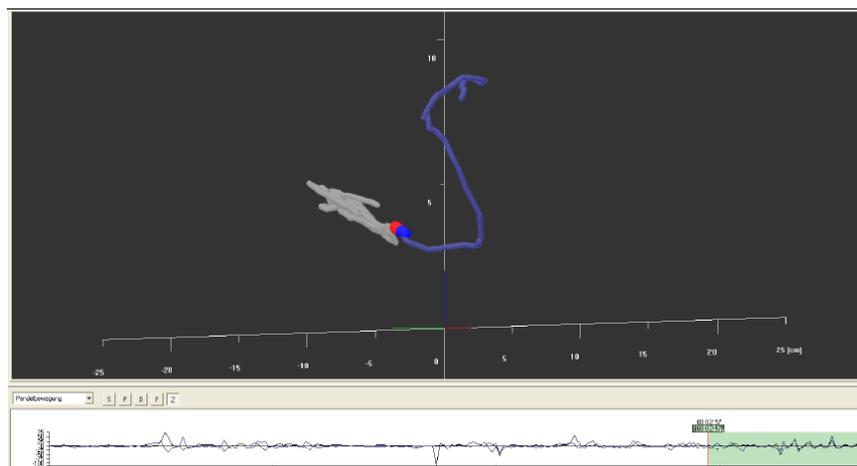
Diese Werte liegen in ähnlichen Bereichen wie die, die aus der Literatur bekannt sind (Tab. 26).

Tab. 26. Gemessene Frequenzen [Kontraktionen/min] im Vergleich zu Frequenzen aus der Literatur (Engelhardt 2005)

Darmabschnitt	gemessene Frequenz	Frequenz aus der Literatur
Magen	5,6	5,2
Duodenum	18,4	15,8–17,8
Jejunum	15,6	17,0–17,7
Ileum	13,1	13,3–13,8
Colon	keine dominante Frequenz. 0,1/h (Riesenkontraktionen)	

Die Geschwindigkeit, mit der sich die Kapsel in den Dünndarmabschnitten fortbewegt, ist mit Abstand im Duodenum am größten. Sie beträgt durchschnittlich fast 17 cm/min, was wiederum etwa 10 m/h entspricht. Im Jejunum hat die Kapsel eine Geschwindigkeit von 5,4 cm/min und im Ileum von 3,6 cm/min.

Neben der Lokalisation über die Frequenzmuster erfolgt dies auch über Echtzeit-3D-Aufnahmen. In der Abb. 43 ist zum einen der Weg dargestellt, den die Kapsel im Magen bzw. Duodenum zurücklegt und zum anderen die Pendelbewegung der Kapsel. Der grau markierte Bereich der Kapsel entspricht dem Weg im Magen und der blau markierte Bereich dem zurückgelegten Weg im Duodenum. Die grüne Markierung im unteren Teil der Abbildung entspricht von der Lokalisation her dem blau markierten Bereich aus dem oberen Teil der Abbildung. In diesem Bildausschnitt ist die Pendelbewegung [$^{\circ}$ Hz/s] dargestellt. Sie wird über die Winkeländerung des Magnetfeldes der Kapsel zu den Platinen gemessen.

**Abb. 43. 3D-Darstellung des von der Kapsel zurückgelegten Weges und der Pendelbewegung**

In Abb. 44 sind zum einen die jeweils aktuelle Signalstärke und zum anderen ein Frequenz-Zeit-Diagramm über die gesamte Messzeit von 3 min und 20 s aufgetragen. Durch die aufgetragene Signalstärke lassen sich Rückschlüsse über die Klarheit eines Signals ziehen.

Lässt sich eine hohe Amplitude erkennen, also ein hoher Wert, ist eine klare Frequenz zu erkennen. Die Auftragung korreliert mit dem Frequenz-Zeit-Diagrammes im unteren Teil der Abbildung. Deutlich ist hier bis etwa 1 min 40 s eine Frequenz von ~ 5 Kontraktionen/Minute zu erkennen. Die Kapsel befindet sich zu diesem Zeitpunkt noch im Magen. Anschließend lässt sich bis 3 min keine klare Frequenz zuordnen. Ab 3 min liegt die Frequenz dann bei ~ 17 Kontraktionen/min.

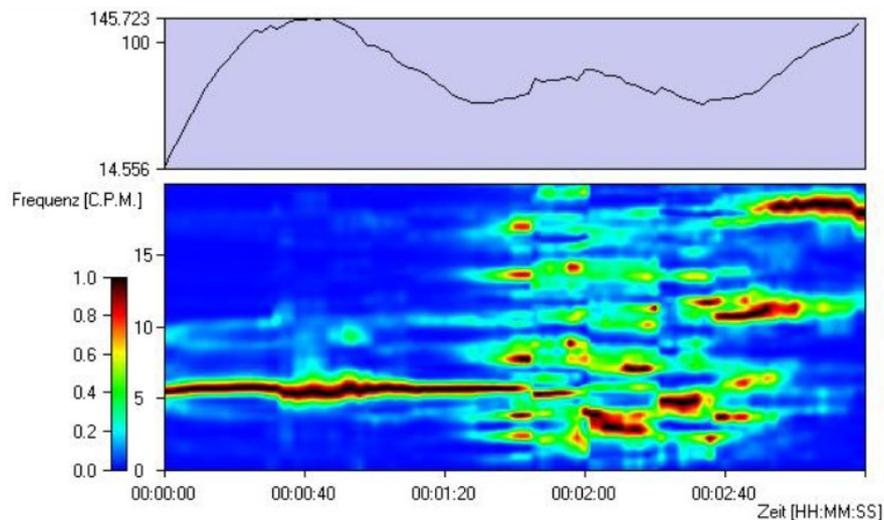


Abb. 44. Signalstärken- und Frequenz-Zeit-Diagramm

Abb. 45 zeigt eine Aufnahme des Jejunums über den Messzeitraum von 1 min und 40 s. Hier ist fast ausschließlich eine Frequenz von 15 Kontraktionen/min zu erkennen.

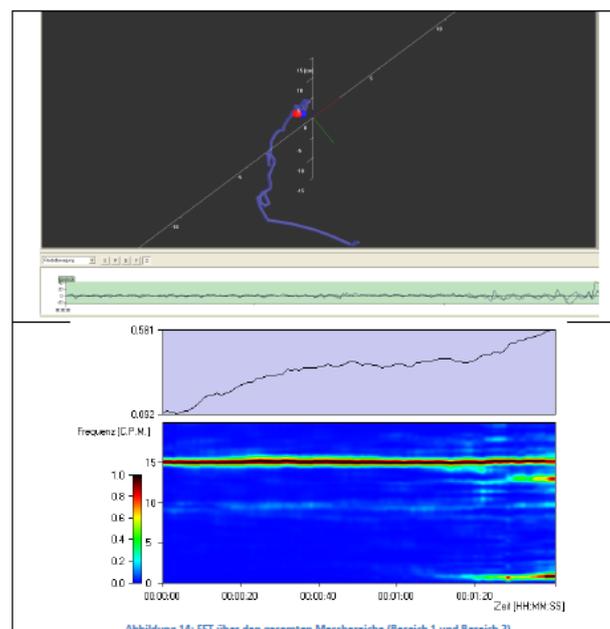


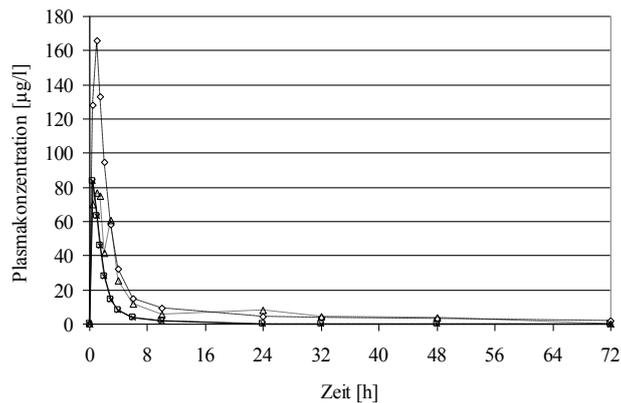
Abb. 45. Oben: 3-D-Aufnahme: Transport der Kapsel im Jejunum, unten: gemessene Frequenzen und die dazugehörigen Signalstärken

Befindet sich die Kapsel im gewünschten Darmabschnitt, wird sie durch das Anlegen eines abklingenden Wechsellmagnetfeldes entmagnetisiert, zerfällt in ihre Bestandteile und gibt so den Wirkstoff frei. Die Zeit, bis die Kapsel an ihrem Bestimmungsort ankommt, ist sehr unterschiedlich (Tab. 27).

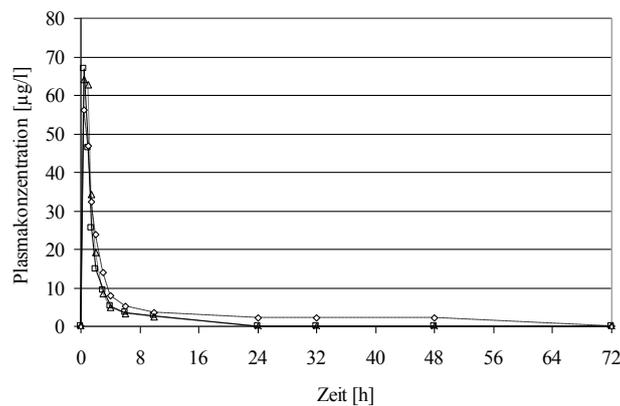
Tab. 27. Zeit, bis die Kapsel den entsprechenden Darmabschnitt erreicht hat (Werte auf 5 min gerundet)

Darmabschnitt	Ø Zeit	min-max
Duodenum (n = 4)	2 h 45 min	35 min–3 h 50 min
Jejunum (n = 3)	2 h 45 min	2 h 20 min–3 h 30 min
Ileum (n = 3)	4 h 10 min	5 h 5 min–6 h 20 min
Colon (n = 3)	5 h 30 min	2 h 20 min–7 h

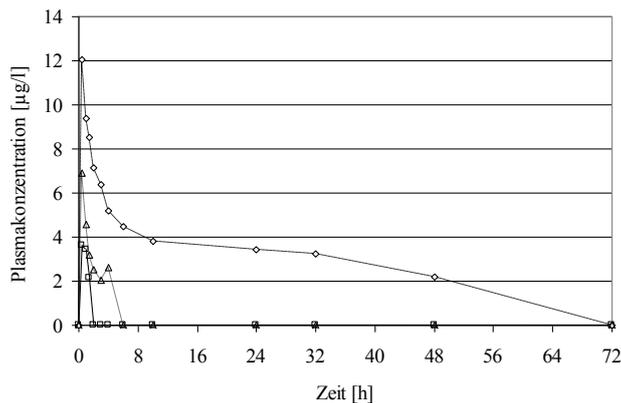
Nachdem die Kapsel geöffnet wird, wird eine Pharmakokinetikstudie durchgeführt. Dem Hund wird nach Öffnen der Kapsel in vorher festgelegten Zeitabständen Blut abgenommen, das Plasma abgetrennt und der Wirkstoffgehalt im Plasma bestimmt (Abb. 46). Die Einzelwerte sind in Tab. 28 dargestellt.



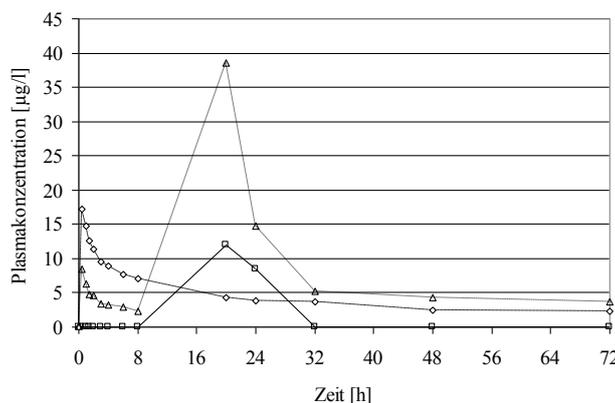
a.



b.



c.



d.

Abb. 46. Plasmaspiegel nach Wirkstoffapplikation im a. Duodenum (n = 4), b. Jejunum (n = 3), c. Ileum (n = 3) und d. Colon (n = 3)

Tab. 28. C_{max} , t_{max} und AUC_{last} -Werte nach Wirkstoffapplikation in die einzelnen Darmabschnitte

Darmabschnitt	Hund	C_{max} [µg/l]	t_{max} [h]	AUC_{last} [µg·h/l]
Duodenum	1	166,0	1	704
	2	279,0	0,5	672
	3	83,5	0,5	159
	4	76,9	1	492
Jejunum	1	66,9	0,5	114
	2	64,0	0,5	125
	3	56,1	0,5	228
Ileum	1	6,9	0,5	12,6
	2	3,6	0,5	4,1
	3	12,1	0,5	175
Colon	1	17,2	0,5	297
	2	38,6	20	636
	3	12,0	20	161

Es werden im Duodenum vier Kapseln freigesetzt und in den anderen Darmabschnitten jeweils drei. Dies hat unterschiedliche Gründe. Insgesamt mussten drei Hunde von der Messung ausgeschlossen werden. Bei zwei Hunden war aufgrund der Eigenbewegung der Hunde keine Messung möglich. Diese waren zu nervös und wurden daher im Laufe der

Messung ausgeschlossen. Der dritte Hund, dessen Kapselöffnung im Colon erfolgen sollte, wurde ausgeschlossen, da sich die Kapsel erst nach Stunden im Colon befunden hat und so eine Messung der ersten 8 h-Werte zeittechnisch nicht möglich war.

Die C_{\max} -Werte nach Öffnung der Kapsel im Duodenum sind doppelt so groß wie die nach Öffnung im Jejunum, 20mal so groß wie nach der Öffnung im Ileum und 4mal so groß wie nach der Öffnung im Colon. Die Fläche unter der Kurve ist nach Applikation der Kapsel im Colon im Vergleich zu den C_{\max} -Werten sehr groß (Tab. 29). Dies ist durch den extrem flachen Kurvenverlauf der hinteren Messzeitpunkte zu erklären. Allerdings ist zu bezweifeln, dass diese große Fläche von großer Relevanz ist. Der größte Anteil des Wirkstoffs wird bereits in den vorderen Darmabschnitten resorbiert und wird daher vermutlich das Colon nicht erreichen.

Tab. 29. Mittelwerte der Pharmakokinetikdaten der einzelnen Darmabschnitte

Darmabschnitt	C_{\max} [$\mu\text{g}/\text{l}$]	T_{\max} [h]	$t_{1/2}$ [h]	AUC_{last} [$\mu\text{g} \cdot \text{h} / \text{l}$]
Duodenum	131,3	1	29	439
Jejunum	62,2	0,5	13	148
Ileum	6,7	0,5	4	21
Colon	20,0	13,5	20	312

Insgesamt muss berücksichtigt werden, dass in der Resorptionskurve nach der Applikation im Duodenum auch die Aufnahme von Emodepsid in den nachfolgenden Abschnitten eine Rolle spielt. Würde die Kapsel im Rectum geöffnet, findet keine Resorption aus anderen Darmabschnitten statt. Allerdings wird auf eine Kapselöffnung im Rectum verzichtet, da dort voraussichtlich kaum Wirkstoff resorbiert wird. Dennoch lässt sich für Emodepsid die Aussage treffen, dass die vorderen Dünndarmabschnitte den Hauptresorptionsort darstellen.

Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist, dass die Kapsel undicht ist und einen Teil des Wirkstoffs, wenn auch einen geringeren, bereits vor Erreichen des entsprechenden Darmabschnittes freigibt. Bevor die Kinetikstudie durchgeführt wird, wird daher in einem weiteren Vorversuch einem Hund eine, mit einer wässrigen Methylenblau-Lösung gefüllte Kapsel verabreicht. Falls diese undicht ist, würde die Lösung den Hundeurin grün färben. Es konnte keine Grünfärbung des Urins festgestellt werden. Zusätzlich wird die ausgeschiedene Kapsel untersucht (Abb. 47).

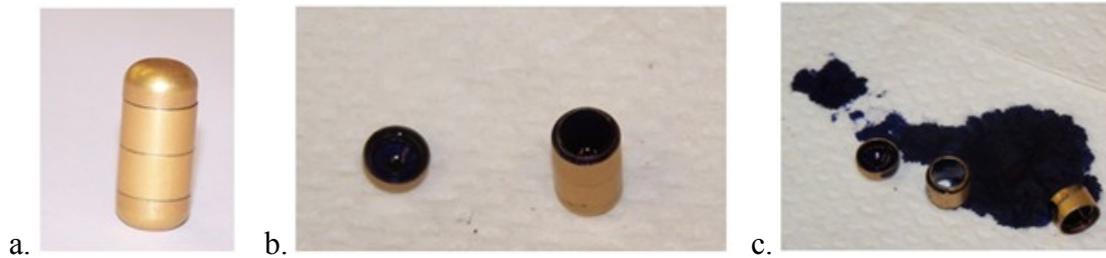


Abb. 47. a. gesäuberte, vom Hund ausgeschiedene, MAARS-Kapsel, b. geöffnete und c. entleerte Kapsel

In der Kinetikstudie wird eine 10 %-ige Emodepsid-Solketal-Lösung verwendet. Da Solketal eine geringere Dichte als Wasser besitzt und auch die Viskosität und die Oberflächenspannung eine andere ist, wird auch hier die Kapseldichtigkeit noch einmal geprüft, allerdings ausschließlich in einem *in vitro* Versuch. Eine mit Solketal gefüllte Kapsel, deren Ränder vor dem Aufmagnetisieren in Paraffin getaucht werden, wird in ein mit Wasser gefülltes Becherglas gegeben. Durch den Paraffinfilm wird versucht, die Kapillarkräfte zu minimieren. Innerhalb von 24 h kommt es zu keiner Verfärbung des Wassers.

In der Kinetikstudie werden 3, 4,5 und 6 h nach Verabreichung der Kapsel, also noch vor Öffnung der Kapsel, zusätzliche Blutproben entnommen, um zu überprüfen, ob die Kapsel dicht ist oder bereits Wirkstoff freisetzt, bevor sie ihren Zielort erreicht. Bei einem Teil der Proben kann Wirkstoff im Plasma gemessen werden. Das zeigt, dass durch die Kapillarkräfte wirkstoffhaltige Lösung nach außen dringt. Die gemessenen Werte, die zwischen 0 und 19,5 µg/l betragen, werden in der Kinetikberechnung nicht berücksichtigt.

Bei zukünftigen Messungen sollte entweder mit einer wässrigen Lösung oder mit einer Lösung höherer Viskosität und Oberflächenspannung gearbeitet und eine Dichtigkeitsprüfung *in vivo* mit der Zielflüssigkeit durchgeführt werden. Generell wurde hier mit einer Wirkstofflösung gearbeitet, da ein Auflösen von Pulver zu lange dauern würde und die Resorption aus diesen für den Wirkstoff Emodepsid im kristallinen Zustand zu schlecht ist.

Trotz der Tatsache, dass die Resorption in den hinteren Darmabschnitten bei einer Kapselöffnung im vorderen Bereich auch eine Rolle spielt und die Kapsel Undichtigkeiten aufweist, ist das System dennoch geeignet, den Resorptionsort von Emodepsid zu bestimmen, da sich die Aufnahmefähigkeit des Wirkstoffs in den einzelnen Darmabschnitten deutlich unterscheiden lässt. Die absoluten Werte sind sekundär, wichtig ist es, Tendenzen abschätzen zu können.

Die durchgeführten Versuche entsprechen den deutschen Tierschutzrichtlinien und der europäischen Richtlinie für das Halten von Tieren für Tierexperimente und anderen wissenschaftlichen Zwecken (Richtlinie 2007/526/EG).

3.3.3 Ligations-Technik

Die Ligations-Technik ist eine weitere Möglichkeit, den Resorptionsort von Arzneistoffen zu bestimmen. Am Hund wurde diese Technik vor Beginn der vorliegenden Untersuchung noch nicht durchgeführt (Gatne 2011).

Die Versuche wurden an 24 Hunden in Indien, am Bombay Veterinary College durchgeführt, mit jeweils 4 Hunden pro Darmabschnitt. Für die Analytik werden die Proben nach Deutschland geschickt und bei Bayer Animal Health, Monheim, analysiert. Zunächst wird der Hund mit 20 mg Thiopental/kg KG narkotisiert, anschließend die Bauchdecke geöffnet und der jeweilige Darmabschnitt abgeschnürt. In das abgeschnürte Segment werden 7,5 mg Emodepsid/kg KG injiziert, der Darmabschnitt wieder in den Korpus zurückgelegt und nach 15, 30, 60, 90, 120 und 180 min werden dem Hund Blutproben entnommen. Im Anschluss an die Blutentnahme werden die Schnüre entfernt und der Hund wieder zugenäht. In den darauffolgenden Tagen findet eine Nachsorge mit Antibiotika statt, um mögliche Infektionen zu verhindern (Abb. 48).

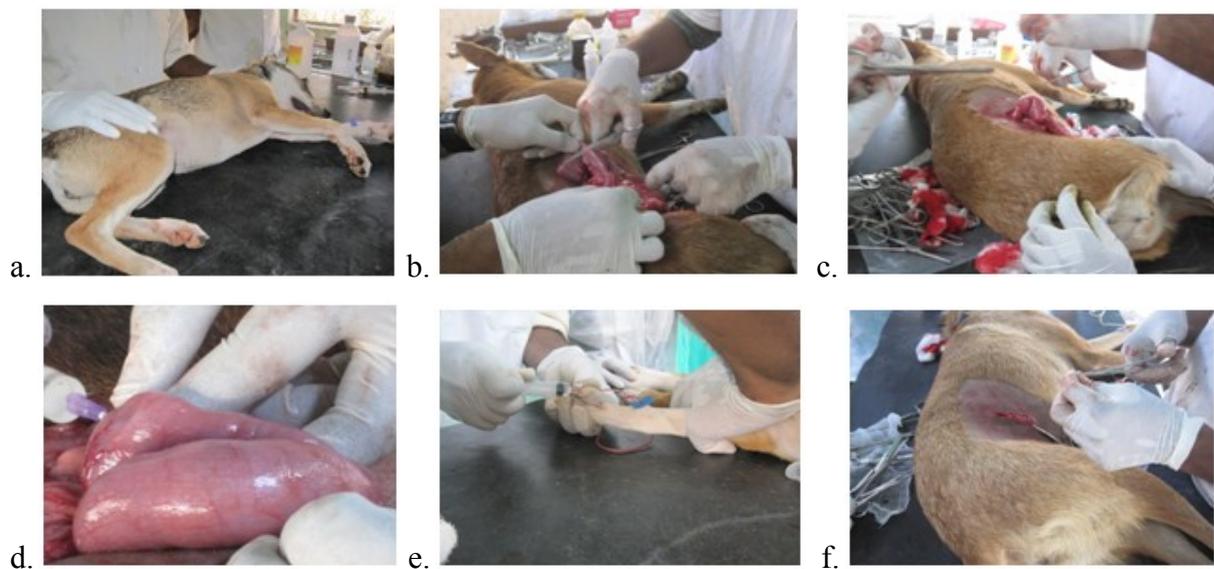


Abb. 48. a. narkotisierter Hund, b. und c. Abschnüren des Darmabschnitts, d. Wirkstoffinjektion, e. Blutentnahme, f. Vernähen des Hundes

Die Plasmaspiegel nach Injektion in den einzelnen Darmabschnitten sind in Abb. 49 dargestellt.

3 Ergebnisse und Diskussion

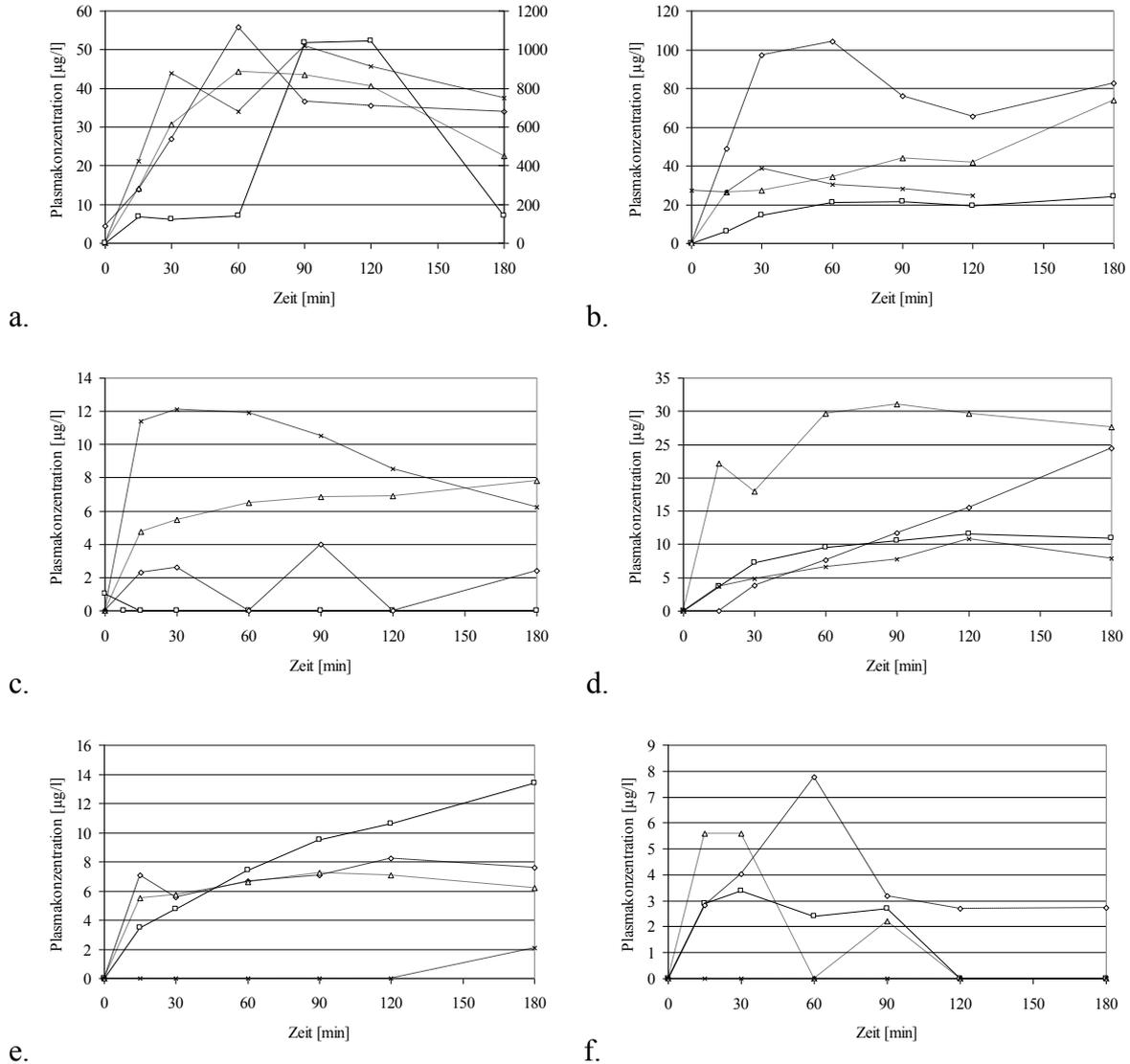


Abb. 49. Plasmaspiegel nach Injektion im a. Duodenum, b. Jejunum, c. Ileum, d. Caecum, e. Colon, f. Rectum; Hinweis zu a. -□- liegt auf der 2. y-Achse

Die Resorption von Emodepsid ist im Duodenum am größten. Allerdings gibt es in diesem Abschnitt einen Hund, dessen Konzentrationsmaximum $> 1000 \mu\text{g/l}$ ist, während die C_{max} -Werte der anderen Hunde in diesem Darmabschnitt zwischen 43,4 und 55,7 $\mu\text{g/l}$ liegen. Dieser Wert ist außergewöhnlich hoch. Hinzu kommt, dass dieser Hund nach Injektion des Wirkstoffs in das Duodenum zusätzlich den höchsten t_{max} -Wert hat. Generell wurde so ein hoher Wert noch nie für den Wirkstoff Emodepsid gemessen. Für die Berechnung des Mittelwertes (Tab. 31) wird dieser nicht berücksichtigt. Die niedrigste Resorption ist im Rectum (Tab. 30) zu beobachten.

Tab. 30. C_{\max} -, t_{\max} und AUC_{last} -Werte nach Wirkstoffinjektion in den Darmabschnitt

Darmabschnitt	Hund	C_{\max} [$\mu\text{g/l}$]	t_{\max} [h]	AUC_{last} [$\mu\text{g}\cdot\text{h/l}$]
Duodenum	1	1046,0	2	91545
	2	55,7	1	6238
	3	44,3	1	6035
	4	50,9	1,5	7029
Jejunum	1	24,0	3	3297
	2	104,0	1	13746
	3	73,9	3	7449
	4	38,7	1	5063
Ileum	1	-	-	-
	2	4,0	1,5	542
	3	7,8	3	1140
	4	12,1	0,5	1687
Caecum	1	11,6	2	1671
	2	24,4	3	2123
	3	31,1	1,5	4727
	4	10,8	2	1317
Colon	1	13,4	3	1546
	2	8,3	2	1242
	3	7,3	1,5	1132
	4	2,1	3	-
Rectum	1	3,4	0,5	232
	2	7,8	1	665
	3	5,6	0,5	360
	4	-	-	-

Tab. 31. C_{\max} -, t_{\max} und AUC_{last} -Werte nach Wirkstoffinjektion in die einzelnen Darmabschnitte

Darmabschnitt	C_{\max} [$\mu\text{g/l}$]	t_{\max} [h]	AUC_{last} [$\mu\text{g}\cdot\text{h/l}$]
Duodenum	50,3	1	6434
Jejunum	60,2	2	7389
Ileum	8,0	1,5	1123
Caecum	19,5	2	2460
Colon	7,8	2,5	1307
Rectum	5,6	0,5	419

Die Flächen unter den Kurven können nicht berechnet werden, da teilweise die maximale Plasmaspiegelkonzentration am Ende der Messzeit noch nicht erreicht ist und dies bei einer Berechnung zu invaliden Ergebnissen führt.

Die Versuche entsprechen der Richtlinie für den Gebrauch von Tierversuchen, für die Führung, für die Versorgung und den Gebrauch von Labortieren (National Institutes of Health 1996).

3.3.4 Vergleich der beiden Techniken

Eine Durchführung sowohl der MAARS- als auch der Ligations-Technik ist möglich. Beide Studien kommen zu dem Ergebnis, dass Emodepsid vor allem im vorderen Dünndarm resorbiert wird. Die MAARS-Technologie hat den Vorteil, dass sie nicht-invasiv ist. Daher ist keine Wundversorgung und Nachsorge der Hunde notwendig. Bei der Ligations-Technik handelt es sich um einen operativen Eingriff inklusive Sedierung bzw. Narkose der Hunde. Dabei hat die Anästhesie möglicherweise Einfluss auf die Resorption von Arzneistoffen. Eine Betäubung mit Phenobarbital führt beispielsweise zu einer verzögerten Magenentleerung, welche hier eine untergeordnete Rolle spielt, und zu einer verkürzten gastrointestinalen Transitzeit, in der die peristaltischen Reflexe blockiert werden (Holzer 1987). Auch für Thiopental konnte eine Hemmung der Dünndarmperistaltik nachgewiesen werden (Herbert 2002). Der Einfluss der Narkose kann möglicherweise dafür verantwortlich sein, dass bei einer 7,5-fachen Dosierung im Vergleich zur MAARS-Studie die Plasmaspiegel erniedrigt sind (Tab. 32).

Der Hauptgrund für die im Vergleich zur MAARS-Technik niedrigen Werte, liegt in der größeren Absorptionsfläche bei der MAARS-Technik. Da der Darmabschnitt bei der Ligations-Studie abgeschnürt ist, kann sich der Wirkstoff in dem Darmabschnitt nicht gut verteilen. Die Fläche der Resorption ist bei dieser Technik lokal begrenzt.

Tab. 32. Vergleich der C_{\max} -Werte von MAARS- und Ligations-Technik-Kinetikstudie

Darmabschnitt	C_{\max} [$\mu\text{g/l}$] MAARS-Technik	C_{\max} [$\mu\text{g/l}$] Ligations-Technik
Duodenum	131,3	50,3
Jejunum	62,2	60,2
Ileum	6,7	8,0
Caecum	-	19,5
Colon	20,0	7,8
Rectum	-	5,6

Ein zusätzlicher Nachteil der Ligations-Technik ist der relativ kurze Messzeitraum. Um den Darm nicht dauerhaft zu schädigen, sollte der Darm so kurz wie möglich, maximal für 3 h, abgetrennt sein. Allerdings zeigt sich in dieser Studie, dass vor allem im Caecum und Colon die Messzeit nicht ausreichend ist, da hier teilweise der C_{\max} -Wert noch nicht erreicht wird. Ein Nachteil der MAARS-Technologie hingegen ist, dass eine Wirkstofffreisetzung im Caecum nicht möglich ist. Auf der anderen Seite ist fraglich, ob die Resorption im Wurmfortsatz bei einer oralen Applikation von Tabletten überhaupt relevant ist. Ein weiterer Nachteil ist in der Tatsache begründet, dass sich die Resorptionsorte nicht getrennt voneinander betrachten lassen. Wenn eine Kapsel gezielt im Duodenum geöffnet wird, kann

eine Resorption des Arzneistoffs auch in den nachfolgenden Darmabschnitten nicht ausgeschlossen werden. Dennoch überwiegen die Vorteile der MAARS-Technologie, die aufgrund ihres nicht invasiven Charakters zu einer geringeren Belastung führt und damit ein geringeres Risiko für das Tier darstellt.

Daher ist sie insgesamt besser für eine Resorptionsortbestimmung geeignet als die Ligations-Technik.

4 Zusammenfassung

Emodepsid ist ein lipophiler Arzneistoff, der nach Verabreichung in Hunden zu großen Plasmaspiegelschwankungen führt. Durch unterschiedliche Konzepte wurde versucht, zu einheitlichen Plasmaspiegeln zu gelangen.

Dazu werden verschiedene Formulierkonzepte entwickelt und auf ihre Machbarkeit hin überprüft werden. Zusätzlich werden Pharmakokinetikstudien durchgeführt, um beurteilen zu können, ob die Formulierungen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit des Wirkstoffes Emodepsid haben. Da der Resorptionsort des Wurmmittels bisher unbekannt war, werden zwei in vivo Studien durchgeführt.

Wird ein Arzneistoff über das Lymphsystem resorbiert, kann eine Wirkstoffeinbettung in Lipiden die Wirkstoffaufnahme steigern. Allerdings erfüllt Emodepsid nicht alle aus der Literatur bekannten Stoffeigenschaften für eine lymphatische Resorption. Daher wird dieses Formulierkonzept verworfen.

Eine Option, die Bioverfügbarkeit von schlecht löslichen Arzneistoffen zu steigern, ist die Verabreichung als Mikroemulsionspräkonzentrat, welches im Körper eine Mikroemulsion ausbildet. Allerdings lässt sich dieses Konzept aufgrund der schlechten Löslichkeit von Emodepsid in sämtlichen getesteten Vehikeln nicht umsetzen.

Eine weitere Möglichkeit, die Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen zu erhöhen, ist die Umwandlung des Wirkstoffes von dem kristallinen in den amorphen Zustand. Dies ist durch die Herstellung von Copräzipitaten möglich. Zu diesem Zweck wird der Arzneistoff zusammen mit einem Polymer in einem Lösungsmittel gelöst und das Lösungsmittel durch Verdampfen wieder entfernt. Anschließend liegt der Wirkstoff in amorpher Form vor. Zubereitungen mit Polyvinylpyrrolidon unterschiedlicher Molekulargewichte als auch mit Soluplus, einem Polyvinylcaprolactam-Polyvinylacetat-Polyethylenglycol-Copolymer, sind herzustellen und führen zu einer deutlichen Löslichkeitsverbesserung des Arzneistoffs. Als beste Zubereitung erwies sich Emodepsid mit PVP-12 bzw. Soluplus mit einem Wirkstoff-Polymer-Verhältnis von 1:3.

Auch das Mikronisieren des Arzneistoffs kann die Wirkstoffaufnahme verbessern. Die Wirkstoffkristalle wurden in einer Perlmühle zerkleinert. Da die Formulierung anfällig für Partikelwachstum ist, erfolgten Wirkstoffvermahlung und Weiterverarbeitung zu einer festen Arzneiform an einem Tag.

Mit Hilfe der Schmelzextrusion einer Mischung von Kollidon VA 64 und Cremophor EL lässt sich Emodepsid ebenfalls in einen amorphen Zustand überführen.

Ein PVP-12-, ein Soluplus-Copräzipitat, ein Schmelzextrudat und der mikronisierte Wirkstoff werden jeweils zu Tabletten weiterverarbeitet. Zu diesem Zweck werden Tablettenmischungen gewählt, die zur Direkttablettierung geeignet sind. Einzig mit dem mikronisierten Wirkstoff wird vor der Verpressung ein Granulat hergestellt.

Mit allen Tablettenformulierungen werden Pharmakokinetikstudien durchgeführt. Zum Vergleich wird einer Versuchsgruppe eine wirkstoffhaltige Solketal-Lösung verabreicht. Die Formulierungen mit dem PVP-12-Copräzipitat und dem Schmelzextrudat führen zu einer mehr als doppelt so hohen Bioverfügbarkeit, wie die zum Vergleich verabreichte Lösung. Das Soluplus-Copräzipitat führt nicht zu einer Verbesserung der Bioverfügbarkeit, was auf eine partielle Rekristallisierung von Emodepsid in der Tablettenmischung zurückzuführen ist. Die Formulierungen mit der höchsten Bioverfügbarkeit haben gleichzeitig die geringsten Plasmaspiegelschwankungen.

Im zweiten Teil der Arbeit wird der Resorptionsort von Emodepsid bestimmt. Es wird zum einen eine MAARS- und zum anderen eine Ligations-Studie durchgeführt.

Bei der MAARS-Studie, die erstmalig an der Spezies Hund durchgeführt wird, wird dem Versuchstier eine mit Wirkstofflösung gefüllte, aufmagnetisierte Kapsel verabreicht und im Magen-Darm-Trakt verfolgt. Befindet sich die Kapsel an dem gewünschten Freisetzungsort, wird die Kapsel von außen durch ein abklingendes Wechsellmagnetfeld geöffnet und gibt den Wirkstoff frei. Anschließend wird der Blutspiegel bestimmt.

Bei der Ligations-Technik wird dem sedierten Hund der jeweilige Darmabschnitt abgeschnürt, der Wirkstoff in den entsprechenden Abschnitt injiziert und ebenfalls eine Pharmakokinetikstudie durchgeführt.

Beide Studien führen zu vergleichbaren Ergebnissen. Das Duodenum und das Jejunum sind die Orte mit der höchsten Resorption. Im Ileum und Colon wird dagegen kaum noch Wirkstoff vom Körper aufgenommen.

Die Bioverfügbarkeit von Emodepsid im Hund lässt sich anhand verschiedener Formulierungskonzepte deutlich verbessern und die Plasmaspiegelschwankungen reduzieren.

Darüber hinaus werden Duodenum und Jejunum als Hauptresorptionsorte des Wirkstoffes Emodepsid sowohl mit Hilfe der MAARS- als auch mit der Ligations-Technik bestimmt.

5 Summary

Emodepside is a lipophilic drug, which led to huge fluctuations in the plasma levels of canines when administrated orally. Different formulation concepts were investigated to reduce the variations and enhance the bioavailability.

Different concepts for the pharmaceutical formulation of the active ingredient emodepside should be developed and be tested for feasibility. Pharmacokinetic studies have been conducted to check the influence of different formulation concepts on the bioavailability of the active ingredient. The site of resorption is unknown, so it has been determined by two independent in-vivo studies.

One potential possibility of increasing the bioavailability of a lipophilic active substance is to let the drug adsorbed through the lymphatic system by embedding the active agent in fat. However, emodepside does not fulfill the requirements for lymphatic resorption known from the literature. Hence, this concept was not pushed.

An option to enhance the bioavailability of poorly soluble drugs is to formulate it as a concentrate of a microemulsion which forms a microemulsion with the GIT-fluid. However, this concept also could not be implemented, because of the poor solubility of emodepside in all tested excipients.

A promising opportunity for increasing the bioavailability of a drug is by transforming the drug substance from its crystalline form into an amorphous state. This is possible by the development of coprecipitates. After dissolving the drug and a polymer in an organic solvent, vaporization of the solvent results in an amorphous active ingredient. Several coprecipitates with povidones of different molecular weights as well as with the new polyvinylcaprolactam-polyvinylacetat-polyethylenglycol-copolymer (Soluplus) were prepared. This approach led to a significant enhancement of the solubility of the drug. The final coprecipitate formulations of emodepside are chosen with PVP-12 and Soluplus, with a drug-polymer ratio of 1:3.

Furthermore, the micronization of a drug can also enhance the absorption of the agent in the GIT. For that, the Emodepsid crystals were crushed in a bead mill. As the system is prone to particle growth the comminution of the agent and further processing to a solid formulation, dosage forms have to take place on the same day.

A melt extrusion with a polymer can also form an amorphous state. Therefore it was tried using a mixture of Kollidon VA 64 and Cremophor EL.

The coprecipitates with PVP-12 and with Soluplus (prepared by using organic solvent), as well as the one with Kollidon VA 64 and Cremophor EL (prepared by melt extrusion) and the bead milled material were further processed into tablets. This was done by choosing tablet mixtures in each case, which are adequate for direct compression of tablets. A granulate as an intermediate state before tableting was only produced for the micronized drug, due to its fluid state.

Pharmacokinetic studies have been conducted for all tablet formulations. For comparison, a solution containing the active ingredient in solketal was also tested. The formulations with the PVP-12 coprecipitate and with the melt extrudate showed a two fold increase in bioavailability compared to the solketal solution. On the contrary, the Soluplus coprecipitate did not result in enhancement of bioavailability because of partly recrystallisation of emodepside in the tablet formulation. The formulations with the higher bioavailability showed the smaller fluctuations in the plasma levels.

The sites of absorption of emodepside have been determined. For this, a magnetic active agent release system study and a ligation study were done.

For the first time the MAARS technique was accomplished for dogs. Specially magnetized capsules filled with the active agent are administered to the laboratory animal. This can be tracked in the gastro-intestinal tract through the magnetic field. When the capsule reaches the desired location of release, it is opened from outside by demagnetizing it and by releasing the active agent. Afterwards, a pharmacokinetic study is done.

For the ligation technique, a specific gut section of the sedated dog is ligated, the agent is injected into the respective section and later a kinetic study is conducted.

Both studies led to comparable results. The duodenum and the jejunum are the locations from which emodepside is basically absorbed. In contrast from ileum and colon almost minor amount have been absorbed.

The bioavailability of emodepside in dogs can be improved with different formulation concepts and the large fluctuations in the plasma level can be reduced.

Moreover, the duodenum and jejunum are the major adsorption site for emodepside and can be identified by both techniques, the MAARS and the ligation technique.

6 Experimenteller Teil

6.1 Materialien

6.1.1 Chemikalien

Tab. 33. Im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Chemikalien mit genauer Bezeichnung und Herkunft

Substanz/ Handelsname	Abkürzung/ Synonym	Hersteller/ Lieferant	Chargen- bezeichnung	Einsatz
Ac-Di-Sol®	Croscarmellose-Natrium	FMC BioPolymer, Philadelphia, USA	BX02FNE	Tabletten
Aceton		Sigma Aldrich, Saint Louis, USA	diverse	Lösungsmittel Copräzipitat
Acetonitril	ACN	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA	diverse	Fließmittel
Aerosil® 200	hochdisperses Siliciumdioxid	Evonik, Hanau-Wolfgang, Deutschland	783549C	Tabletten
Avicel® PH 101	Mikrokristalline Cellulose	KVP Kiel, Deutschland	60752C	Tabletten
Benzylalkohol		Riedel-de Haen, Seelze, Deutschland	41870	Mikroemulsion
Benzylbenzoat		Merck, Darmstadt, Deutschland	S4827701819	Mikroemulsion
n-Butanol		Sigma Aldrich, Saint Louis, USA	92090	Mikroemulsion
Capryol®	Propylen-glycol Monocaprylat	Gattefosse, Weil am Rhein, Deutschland	101799	Mikroemulsion
Citronensäure-Monohydrat		VWR Prolabo, Darmstadt, Deutschland	10E180013	Freisetzungsmedium
Cremophor® EL	Macrogol-glycerol Ricinoleat 35	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA	BCBD5055V	Extrudat
Cremophor® RH 40	Macrogolglycerol Hydroxystearat 40	BASF, Ludwigshafen, Deutschland	83493924UO	Extrudat
Dimethylformamid	DMF	Roth, Karlsruhe, Deutschland	335857G26	Gaschromatographie
Dinatriumhydrogenphosphatmonohydrat		Merck, Darmstadt, Deutschland	F1340886445	Freisetzungsmedium
Dichlormethan	Methylenchlorid	Fluka, Buchs, Schweiz	SZBA1680	Freisetzungsmedium

Emodepsid, kristallin	Bay 44-4400	KVP, Kiel, Deutschland	60xB	Wirkstoff
Emodepsid, lyophilisiert	Bay-44-4400	Bayer Health Care, Leverkusen, Deutschland	1239/674-0	Vergleich zu Copräzipitat
Erdnussöl		Roth, Karlsruhe, Deutschland	128492754	Mikro- emulsion
Ethanol 96 %		Sigma Aldrich, Saint Louis, USA	diverse	Lösungsmittel
Ethyloleat		Merck, Darmstadt, Deutschland	S6034362 012	Mikro- emulsion
Hydranal- Solvent		Fluka, Buchs, Schweiz	8221D	Wasser- bestimmung
Hydranal- Titrant 5		Fluka, Buchs, Schweiz	SZBB0490	Wasser- bestimmung
Isopropanol	IPA	Merck, Darmstadt, Deutschland	diverse	Lösungsmittel Copräzipitate
Isopropyl- monostearat		Sigma Aldrich, Saint Louis, USA	9L002066	Mikro- emulsion
Kollidon® 12 PF	PVP-12, pyrogenfrei	BASF, Ludwigs- hafen, Deutschland	73949136WO	Copräzipitate
Kollidon® 17 PF	PVP-17	BASF, Ludwigs- hafen, Deutschland	31283047G0	Copräzipitate
Kollidon® 25	PVP-25	BASF, Ludwigs- hafen, Deutschland	15914088Q0	Copräzipitate
Kollidon® 90	PVP-90	BASF, Ludwigs- hafen, Deutschland	74874016KO	Schmelz- extrudat
Kollidon® VA 64	PVP-VA 64	BASF, Ludwigs- hafen, Deutschland	72347475L0	Schmelz- extrudat
Labrasol®	Propylene glycol monolaurate	Gattefosse, Weil am Rhein, Deutschland	112811	Mikro- emulsion
Linolsäure		Fluka, Buchs, Schweiz	1341272	Mikro- emulsion
Lipoid® E PC S	> 99 % Lecithin	Lipoid, Ludwigs- hafen, Deutschland	108060-3/910	Freisetzung- medium
Magnesium- stearat		KVP, Kiel, Deutschland	KP03WGC	Tabletten
Maiskeimöl		Roth, Karlsruhe, Deutschland	260159216	Mikro- emulsion
Methyl- pyrrolidon	NMP	Fluka, Buchs, Schweiz	1357878 54107216	Mikro- emulsion
Miglyol® 810	Neutralöl	SasolWax, Hamburg, Deutschland	040504	Mikro- emulsion
Miglyol® 812	Neutralöl	KVP, Kiel, Deutschland	KP0333K	Lipid- extrusion
Milli-Q® Wasser	Demineralli- siertes Wasser	eigene Herstellung	diverse	verschiedenes
Natriumchlorid	Kochsalz	Fluka, Buchs, Schweiz	1414436 54108P03	Freisetzung- medium

6 Experimenteller Teil

Natriumdihydrogenphosphat		Merck, Darmstadt, Deutschland	F1340886445	Freisetzungsmedium
Natriumtaurocholat		PCA S.p.A, Basaluzzo, Italien	2007100274	Freisetzungsmedium
N,N-Dimethylamin		Sigma Aldrich, Saint Louis, USA	1381164	Mikroemulsion
Ölsäure		Fluka, Buchs, Schweiz	1196120	Mikroemulsion
Olivenöl		Fluka, Buchs, Schweiz	BCBC9502	Mikroemulsion
Paraffin, dickflüssig		KVP, Kiel, Deutschland	KP02DWT10	Mikroemulsion
Paraffin, dünnflüssig		Roth, Karlsruhe, Deutschland	45791812	Mikroemulsion
Polyethylenglykol 200	Macrogol 200	Fluka, Buchs, Schweiz	396916/1	Mikroemulsion
Polyethylenglykol 300	Macrogol 300	Fluka, Buchs, Schweiz	1442546	Mikroemulsion
Polyethylenglykol 400	Macrogol 400	Baker, Phillipsburg, USA	0625801009	Mikroemulsion
Polyethylenglykol 6000	Macrogol 6000	Fluka, Buchs, Schweiz	1358496	Schmelzextrudat
Polypladone [®] XL 10	Crospovidon	ISP, Wayne, USA	784628 B	Tabletten
Polyvinylacetat	PVA	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA	7932703	Schmelzextrudat
Propylenglykol	PG	Fluka, Buchs, Schweiz	0001450481	Mikroemulsion
Rizinusöl		Sigma Aldrich, Saint Louis, USA	82340	Mikroemulsion
Sesamöl		Fluka, Buchs, Schweiz	1367639	Mikroemulsion
Sojabohnenöl		Roth, Karlsruhe, Deutschland	320214738	Mikroemulsion
Solketal [®]	1,2-O-Isopropylidenglycerin	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA	S90308	Lösung
Soluplus [®]	Polyvinylcaprolactam-Polyvinylacetat-Polyethylenglycol-Copolymer	BASF, Ludwigshafen, Deutschland	71013547G0	Copräzipitat
Solutol [®] HS 15	Macrogol 15 Hydroxystearat	BASF, Ludwigshafen, Deutschland	34240624UO	Mikroemulsion
Sonnenblumenöl		Henry Lamotte, Bremen, Deutschland	KP057SE	Suspensionskonzentrat
Span [®] 20	Sorbitanlaurat	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA	MKBF0455V	Suspensionskonzentrat

Span [®] 80	Sorbitanmonooleat	Merck, Darmstadt, Deutschland	S5405123 005	Mikroemulsion
Tetraethylen-glycol		Sigma Aldrich, Saint Louis, USA	BCBC1357	Mikroemulsion
Texapon [®] K 12	Natriumdodecylsulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland	S4169034	Tabletten
α -Tocopherol	Vitamin E	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA	063K0796	Mikroemulsion
Tween [®] 20	Polysorbat 20	Fluka, Buchs, Schweiz	1436540 51609P03	Mikroemulsion
Tween [®] 60	Polysorbat 60	Merck, Darmstadt, Deutschland	K35370176 629	Mikroemulsion
Tween [®] 80	Polysorbat 80	Merck, Darmstadt, Deutschland	S6092987026	Mikroemulsion
Tween [®] 85	Polysorbat 85	Fluka, Buchs, Schweiz	085K0056	Suspensionskonzentrat
Vivapur [®] Typ 14	Mikrokristalline Cellulose	JRS, Rosenberg, Deutschland	5601470409	Tabletten
Weizenkeimöl		Roth, Karlsruhe, Deutschland	219103627	Mikroemulsion

6.2 Herstellungsmethoden

6.2.1 Herstellung Mikroemulsionssysteme, Wassereinarbeitung

Als ölige Grundlagen werden zunächst Mischungen aus jeweils 3 Vehikeln hergestellt. Für eine grobe Abschätzung betragen die Mischungsverhältnisse der Substanzen zunächst 1:1:1, 1:2:3, 1:3:2, 2:1:3, 2:3:1, 3:1:2 und 3:2:1. Die 3 Komponenten werden in Tablettengläser pipettiert und geschüttelt, damit sich die Phasen schneller miteinander mischen. Das Gesamtvolumen beträgt 3 ml. Bei den Mischungen, bei denen keine Trübung zu erkennen ist, wird in 0,2 ml-Schritten versucht Wasser einzuarbeiten. Falls die Phasen beim Einarbeiten nicht direkt mischbar sind, wird auch das Tablettenglas nach jedem Schritt jeweils mit einem Stopfen verschlossen und das System geschüttelt. In den Bereichen, in denen sich am meisten Wasser einarbeiten lässt, werden die Konzentrationen der Vehikel zueinander leicht verändert und erneut Wasser hinzugefügt. Für die Gehaltsbestimmung wird mit dem Mikroemulsionspräkonzentrat eine gesättigte Lösung hergestellt, die 24 h bei 25 °C auf Variomag Telesystem-Magnetrührern (Thermo Scientific, Waltham, USA) rührt. Anschließend wird die Lösung filtriert und der Gehalt per HPLC (6.5.13.2) bestimmt.

6.2.2 Herstellung Copräzipitate

Der Wirkstoff Emodepsid und das jeweilige Polymer werden in Ethanol oder einem 1:1 Gemisch von Aceton und Isopropanol gelöst. Das Lösungsmittel Feststoffverhältnis beträgt 2:1, d. h. 2 g Lösungsmittelgemisch auf 1 g Feststoff. Nach dem Lösen wird die Flüssigkeit auf ein Edelstahlblech gegossen, wobei die Füllhöhe maximal 0,5 mm betragen sollte. Die Bleche werden in einen Vakuumtrockenschrank VDL 53 (Bender, Tuttlingen, Deutschland) gestellt und innerhalb von 6 h auf 80 °C hochgeheizt. Nach 24 h wird das Copräzipitat vom Blech abgekratzt, in einer Reibschale mit Hilfe eines Pistills gemörsert, durch ein 1 mm-Sieb gesiebt, wieder auf dem Blech verteilt und für weitere 4 Tage in den Trockenschrank gestellt, wobei alle 24 h jeweils eine Probe für die Restlösungsmittelbestimmung gezogen werden (Abb. 50). Von dem erhaltenen Copräzipitat werden Schütt- und Stampfvolumen (6.5.5) und die Teilchengröße (6.5.6) bestimmt und zur Überprüfung des amorphen Zustandes des Wirkstoffs röntgendiffraktometrische- (XRD-) (6.5.18) und DSC-Messungen (6.5.17) durchgeführt.



Abb. 50. a. gelöstes Emodepsid und PVP-12, b. 24 h getrocknetes Copräzipitat, d. gemörsertes Copräzipitat

6.2.3 Herstellung von Minitabletten

Aus dem Copräzipitat werden auf einer Ständerpresse SP 300 (Kilian, Köln, Deutschland) biplane Tabletten mit 2 mm Durchmesser und einer Presskraft von 5 kN gepresst. Dabei kommt ein Mehrfachwerkzeug mit 10 Stempeln zum Einsatz. Es werden Tabletten unterschiedlicher Zusammensetzung produziert. Zur besseren Fließfähigkeit wird generell 1 % Magnesiumstearat zu jeder Formulierung hinzugegeben. Darüber hinaus werden Tabletten mit einem Zusatz von 3 % Aerosil und Tabletten mit 3 % Aerosil und 4 % Ac-Di-Sol hergestellt. Die Inprozesskontrollen, wie Abrieb (6.5.8) und Gleichförmigkeit der Masse (6.5.10), entsprechen bei allen hergestellten Minitabletten den Anforderungen des Arzneibuchs Ph. Eur. 7.0. Der Zerfall wird mit einer Apparatur zur Bestimmung der Zerfallszeit, modifiziert nach Kleinebudde, gemessen (1997) (6.5.11).

6.2.4 Mahlen des Wirkstoffs, Suspensionskonzentrat

Der Arzneistoff wird mit einem Dispermat SL (Getzman, Reichshof, Deutschland) gemahlen. Als Perlen werden Zirkoniumoxid-Mahlperlen mit einem Durchmesser von 0,4-0,6 mm verwendet. Die 50 ml Mahlkammer wird mit 40 ml Mahlperlen gefüllt. Es wird eine kontinuierliche Produktzufuhr gewählt. Die Ansatzgröße einer 25 %igen Emodepsid-Sonnenblumenölsuspension beträgt 200 g. Bei Bedarf wird dem Suspensionskonzentrat 1 % Tensid zugesetzt. Die Mahlzeit beträgt 90 min, bei einer Rührscheibengeschwindigkeit von 10 m/s und einem Durchsatz von 0,4 kg/h.

6.2.5 Extrusion

Es werden 696 g Kollidon VA 64 und 200 g Emodepsid eingewogen und 10 min in einem Röhrenmischer Jel RRMini (J. Engelsmann AG, Ludwigshafen, Deutschland) gemischt. Die Pulvermischung wird mit Hilfe eines gravimetrischen Pulverdosierers KT20 (K-Tron Soder, Lenzhard, Schweiz) mit einer Dosierate von 33 g/min in einen gleichläufigen Zweischnellenextruder Mikro 27GL-28D (Leistritz, Nürnberg, Deutschland) zudosiert. Als Schneckenkonfiguration wird folgende gewählt (Abb. 51):

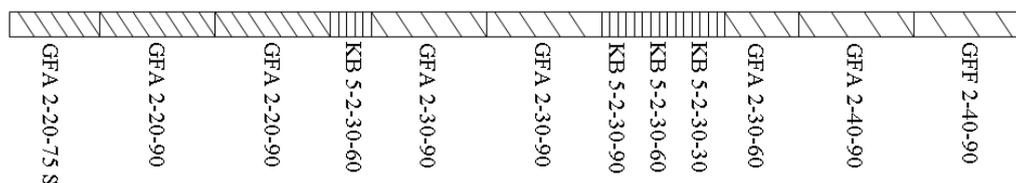


Abb. 51. Schneckenkonfiguration vom Rondenwerkzeug (rechts) Richtung Düsenplatte (links), Schneckenelement: GFA = gleichläufig, fördernd, auskämmend, KB = Knetblock, GFF = gleichläufig, fördernd, freigeschnitten, S = stumpf; bei GFA- und GFF-Elementen 1. Ziffer: Gangzahl, 2. Ziffer: Winkel [°], 3. Ziffer: Länge [mm]; bei den Knetblöcken: 1. Ziffer: Anzahl der Knetscheiben, 2. Ziffer: Gangzahl, 3. Ziffer: Länge [mm], 4. Ziffer: Winkel [°]

Cremophor EL wird im 2. Heizelement mit einer Flüssigdosierate von 3,83 g/min über eine Düse zudosiert. Die Schneckendrehzahl beträgt 50 U/min. Die Düsenplatte hat eine Bohrung mit 1 mm Durchmesser. Die Pulvermischung wird bei 4 verschiedenen Temperaturen extrudiert. Die Temperaturen der einzelnen Heizelemente sind in Tab. 34 aufgeführt.

Tab. 34. Temperatur (T) der Heizelemente 1-7 (Abb. 31)

Charge	1 T [°C]	2 T [°C]	3 T [°C]	4 T [°C]	5 T [°C]	6 T [°C]	7 T [°C]
1	20	120	120	180	180	180	180
2	20	120	120	160	160	160	160
3	20	120	120	170	170	170	170
4	20	120	120	160	160	160	180

Das Element der Pulverdosisierung wird nicht beheizt, um ein eventuelles Verkleben des Pulvers und damit ein Verstopfen dieses Elementes zu verhindern. Das Extrudat wird mit Hilfe eines Förderbandes von der Düsenplatte wegtransportiert, das abgekühlte Extrudat in einem Auffangbehälter gesammelt und mit Mörser und Pistill zerkleinert.

6.2.6 Tablettenherstellung

Als Tablettenmischungen wird eine Mischung ausgewählt, die zur Direkttablettierung geeignet ist (3.1.7). Bis auf Magnesiumstearat werden alle Tablettierhilfsstoffe in eine Braunglasflasche eingewogen und im Turbula Mischer (Willy A. Bachofen AG, Basel, Schweiz) 5 min gemischt. Im Anschluss wird das Schmiermittel Magnesiumstearat hinzugefügt und weitere 2 min gemischt. Bei den Tabletten, die aus dem Suspensionskonzentrat hergestellt werden, wird zunächst das Suspensionskonzentrat auf Avicel aufgezogen, bevor es anschließend ebenfalls mit den anderen Hilfsstoffen gemischt wird.

Die Tabletten werden mit einer Ständerpresse SP 300 (Kilian, Köln, Deutschland) mit einer Presskraft von 25 kN verpresst. Als Stempel werden Oblongformate mit 10*5 mm für Tablettengewichte bis 200 mg, 17*7 mm für Tablettengewichte \leq 700 mg und 18*8 mm für Tablettengewichte $>$ 700 mg, mit jeweils einer Teilerbe, ausgewählt. Die Inprozesskontrollen der Tabletten: Friabilität, Bruchfestigkeit, Gleichförmigkeit der Masse und Zerfall werden nach Arzneibuch durchgeführt.

6.3 Bioverfügbarkeitsstudien

6.3.1 Bioverfügbarkeitsstudie bei der Bayer Animal Health GmbH, Monheim

Die Studie wird als eine nicht verblindete Pharmakokinetikstudie im Paralleldesign gemäß den aktuellen GSP-Richtlinien (DFG 1998) durchgeführt. Die Verabreichung der Soluplus-Copräzipitat- und Schmelzextrudattabletten erfolgt dabei an jeweils 4 Hunden der Rasse Beagle. Zum Vergleich wird an weiteren 4 Hunden eine Emodepsid-Solketal-Lösung getestet. Die Dosierung entspricht bei allen Formulierungen der therapeutischen Dosis von 1 mg/kg KG. Drei Tage vor dem eigentlichen Versuchstag findet eine Einschlussuntersuchung statt, in der die Vitalfunktionen des Hundes überprüft werden, dem Hund Blut abgenommen und der Hund gewogen wird. Dabei liegt das Durchschnittsgewicht

bei 11,5 kg und reicht von 10,6-16,2 kg. Die Tabletten werden, individuell angepasst auf das Körpergewicht der Hunde, hergestellt.

Während der Studie werden die Hunde in mindestens 6 m² großen Einzelkäfigen gehalten, die jeden Tag gereinigt werden. Die Hunde werden jeden Morgen nach der Blutabnahme mit kommerziellem Hundefutter gefüttert. Am Versuchstag sind die Hunde nüchtern. Die letzte Fütterung erfolgte spätestens um 13 Uhr am Vortag. Die nächste Fütterung erfolgt frühestens 4 h nach Verabreichung der Testsubstanz. Trinkwasser steht dem Hund jederzeit und in unbegrenzter Menge zur Verfügung. Der Gesundheitszustand der Hunde während des Versuchs wird täglich beobachtet.

Nach Applikation der Arzneiform wird dem Hund nach 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48, 72, 96 und 168 h Blut abgenommen. Von dem gewonnenen Blut wird das Plasma abzentrifugiert und bis zur Gehaltsbestimmung tiefgefroren gelagert. Die Bestimmung der Plasmaspiegelkonzentrationen erfolgt via Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS/MS) (6.5.15).

6.3.2 Bioverfügbarkeitsstudie bei einem externen Forschungsinstitut

Die Bioverfügbarkeitsstudie der PVP-12-Copräzipitat- und Suspensionskonzentrattabletten erfolgt extern. Die Dosierung beträgt, wie in der internen Studie, 1 mg/kg KG. Jede Formulierung wird an 10 Hunden getestet. Über die Hunderasse ist nichts bekannt. Nachdem die Tabletten verabreicht werden, wird den Hunden nach 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 24, 36, 48 und 72 h Blut abgenommen. Das Plasma wird abgetrennt und die Proben im tiefgefrorenen Zustand zu Analyse Zwecken nach Deutschland geschickt. Der Gehalt wird, wie bei den intern getesteten Proben, mit HPLC-MS/MS bestimmt (6.5.15). Die Studie ist als cross-over-studie mit einer ausreichenden Wartezeit angelegt. Da die Analytikergebnisse bis zum Zeitpunkt des Beendens dieser Arbeit noch nicht vorlagen, sind ausschließlich die Ergebnisse der PVP-12-Copräzipitattabletten aufgeführt.

6.4 Arzneistofffreisetzung

6.4.1 Freisetzung Copräzipitate

Die Freisetzungsuntersuchungen der Copräzipitat- und Tablettenformulierungen erfolgen in einer Freisetzungsapparatur Sotax AT 7 smart (Sotax, Allschwil, Schweiz). Um ein Aufschwimmen des Copräzipitates zu verhindern und ein vollständiges Benetzen des

Materials zu gewährleisten, wird die Umdrehungsgeschwindigkeit der Blattrührapparatur auf 250 U/min eingestellt. Die Verwendung einer Drehkörbchenapparatur ist nicht möglich, da sich in dieser Trockennester bilden, die eine vollständige Benetzung des Materials verhindern. Als Freisetzungsmedium dient ein McIlvaine Puffer pH 3 (McIlvaine 1921) mit 0,05 % Natriumdodecylsulfat als Benetzungsmittel. Für die Herstellung werden 83,5 g Citronensäuremonohydrat 36,5 g Dinatriumhydrogenphosphat und 2,5 g Texapon in 5 l entmineralisiertem Wasser gelöst und der pH-Wert überprüft. Die Freisetzung wird bei 37 °C in 500 ml Freisetzungsmedium je Glasgefäß durchgeführt. Die Probenziehung erfolgt manuell mit Hilfe einer Spritze und anschließender Filtration durch einen Cromafil 45/25 Spritzenvorsatzfilter mit einer Porengröße von 45 µm. Der Emodepsidgehalt wird per HPLC mit UV-Detektor (6.5.13.2) bestimmt. Um zu überprüfen, ob das Copräzipitat über die Zeit gelöst bleibt und nicht wieder ausfällt, werden die Freisetzungen jeweils über 8 h durchgeführt. In der Regel werden pro Formulierung drei Freisetzungen durchgeführt und der Mittelwert und die Spannweite, bezogen auf die Gesamtmenge an Emodepsid in den Diagrammen aufgetragen. Die Wirkstoffeinwaage beträgt 12,5 mg.

6.4.2 Freisetzung Tabletten

Die Freisetzungsmethode der Tabletten wird mit einer Apparatur 2 (Blattrührerapparatur) gemäß Ph.Eur.2.9.3 durchgeführt. Das Puffermedium enthält 0,5 % Natriumdodecylsulfat und der Messzeitraum wird auf 2 h reduziert, da es sich um schnell freisetzende Tabletten handelt. Die Rührgeschwindigkeit beträgt 75 U/min und das Volumen 900 ml/Glasgefäß.

6.4.3 Freisetzung in biorelevanten Medien

Die biorelevanten Freisetzungsmethoden werden, wie in der Publikation von Marques (2004) beschrieben, hergestellt. Dafür wird zunächst eine Pufferlösung aus Natriumhydroxid (NaOH), Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) und Natriumchlorid (NaCl) hergestellt und der pH-Wert auf 6,5 eingestellt. Anschließend werden für 2 l FaSSIF-Medium 3,3 g Natriumtaurocholat gelöst und 11,8 ml einer 100 mg/ml Lecithin-Dichlormethan-Lösung hinzugefügt. Das Lösungsmittel wird unter Vakuum bei 40 °C in einem Rotationsverdampfer (Büchi, Rotavapor RE 111, Flawil, Schweiz) mit einer Membran-Vakuumpumpe MZ 2C/1,7 (Vacuubrand GmbH Co, Wertheim, Deutschland) entfernt, bis die Lösung leicht trüb und kein Geruch nach Dichlormethan mehr vorhanden ist. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird mit der Stammlösung auf 2 l aufgefüllt. Die Osmolarität

soll 270 mOsmol/kg betragen und wird mit einem Halbmikroosmometer bestimmt. Das FeSSIF-Medium wird auf ähnliche Weise hergestellt. Auch hier wird zunächst eine Stammlösung hergestellt. Diese besteht aus Natriumhydroxid, Eisessig und Natriumchlorid. Der pH-Wert wird auf 5,0 eingestellt. Anschließend werden 16,5 g Natriumtaurocholat in 500 ml des Mediums gelöst und 59,08 ml einer 100 mg/ml Lecithin-Dichlormethan-Lösung hinzugegeben. Das Lösungsmittel in der entstandenen Emulsion wird ebenfalls entfernt und die Lösung auf 2 l mit der Stammlösung aufgefüllt. Die Osmolarität dieses Mediums beträgt 670 mOsmol/kg (Tab.35).

Tab. 35. Zusammensetzung von FaSSIF und FeSSIF (Marques 2004)

	FaSSIF	FeSSIF
Natriumtaurocholat	3,00 mM	15,00 mM
Lecithin	0,75 mM	3,75 mM
NaOH	4,35 mM	101,01 mM
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	14,33 mM	-
NaCl	52,93 mM	203,18 mM
Eisessig	-	144,05 mM
gereinigtes Wasser	500,00 ml	1000,00 ml

Die Freisetzung wird in 900 ml FaSSIF bzw. 500 ml FeSSIF in einer Blattrührapparatur bei 250 U/min über einen Zeitraum von 8 h durchgeführt. Die Probenziehung erfolgt nach 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 360 und 480 min. Der Gehalt der Proben wird mit Hilfe der HPLC-UV gemäß bestimmt.

6.5 Analytische Methoden

6.5.1 Bestimmung der Löslichkeit von Emodepsid in Ölen und Wachsen

Für die Bestimmung der Löslichkeit in Soja-, Sonnenblumen-, Sesam-, Rizinus- und Neutralöl sowie dünn- und dickflüssigem Paraffin, werden in einem Becherglas 50 g der lipophilen Komponente vorgelegt, 1 g Emodepsid hinzugefügt und über 7 Tage bei Raumtemperatur (25 °C) mit einem Magnetrührer gerührt. Nach 1 h, 3, 5 und 7 Tagen wird jeweils 1 ml Probe gezogen, durch einen Cromafil 45/25 Spritzenvorsatzfilter filtriert und mit der Gehalt (6.5.13.2) jeweils dreimal bestimmt.

6.5.2 Bestimmung der Löslichkeit von Emodepsid in unterschiedlichen Lösungsmitteln

Bei der Löslichkeitsbestimmung werden jeweils 5 g Lösungsmittel und etwa 100 mg Emodepsid in ein Tablettenröhrchen eingewogen und über 24 h auf Variomag Telesystem-Magnetrührern bei Raumtemperatur (25 °C) gerührt. Anschließend wird die Probe filtriert und der Gehalt (6.5.13.2) per HPLC-UV bestimmt.

6.5.3 Überprüfung des amorphen Zustandes des Copräzipitates

Zur Überprüfung der Stabilität des amorphen Zustandes von Emodepsid wird das Copräzipitat mit einem Mörser und Pistill 15 min lang gemörsert. Nach dem Mörsern wird ein Teil des Pulvers in die DSC-Apperatur überführt und eine thermoanalytische Messung (6.5.17) durchgeführt.

6.5.4 Filtertest

Um zu überprüfen, welches Filtermaterial für den Wirkstoff in dem Freisetzungsmedium geeignet ist, werden 6 x 1,5 ml Emodepsid-Pufferlösung mit bekannter Wirkstoffkonzentration, also insgesamt 9 ml, durch die verschiedenen Filtermaterialien (Tab. 11) filtriert und der Gehalt per HPLC bestimmt (6.5.13.2).

6.5.5 Schütt- und Stampfvolumen

Das Schütt- und Stampfvolumen wird in Anlehnung an Ph.Eur. 2.9.15 mit einem Stampfvolumeter (SVM 202, Erweka, Heusenstamm, Deutschland) bestimmt. Hierzu werden 100 g Copräzipitat in einen Standzylinder eingefüllt, das Volumen abgelesen, der Zylinder auf das Stampfvolumeter gestellt und das Stampfvolumen nach 1250 Stampfbewegungen gemessen. Der Quotient aus Schütt- und Stampfvolumen stellt den Hausner-Faktor dar. Dieser Werte beträgt = 1 für ausgezeichnete und > 1,6 für ungenügend fließende Pulver.

6.5.6 Siebanalyse

Die Siebfraktionen werden, in Anlehnung an die Methode 2.9.12 des europäischen Arzneibuchs, mit einem Siebturm VE 100 (Retsch, Haan, Deutschland) und den Sieben mit Maschenweiten von 125, 250, 400 und 800 µm bestimmt. Dabei wird 5 min oszillierend mit

einer Amplitude von 0,4 mm gesiebt. Das Ergebnis der Siebanalyse wird anhand von Summenhäufigkeitskurven dargestellt. Dabei gilt:

$$Q_r(x) = \frac{\text{Menge aller Partikel} \leq x}{\text{Menge aller Partikel}} \quad (1)$$

Q_r = Summenhäufigkeit

x = Korngröße

6.5.7 Böschungswinkel

Der Schüttwinkel nach dem Abfließen des Pulvers wird mit einem Erweka GT Granulattester (Erweka, Heusenstamm, Deutschland) nach der Methode 2.9.36 des europäischen Arzneibuchs 7.0 bestimmt.

6.5.8 Friabilität

Der Abrieb wird nach der Ph.Eur. 7.0 Methode 2.9.7 in einem Erweka TA (Erweka, Heusenstamm, Deutschland) bestimmt. Bei den Minitabletten kommen allerdings keine 6,5 g zum Einsatz, wie vom Arzneibuch gefordert, sondern hier wird die Friabilität von 50 Tabletten bestimmt.

6.5.9 Bruchfestigkeit von Tabletten

Die Bruchfestigkeit wird mit einem Härtetester 8M-Basic (Dr. Schleuniger Pharmatron, Solothurn, Schweiz) nach der Ph.Eur 2.9.8 bestimmt.

6.5.10 Gleichförmigkeit der Masse

Für die Bestimmung der Gleichförmigkeit der Masse werden 20 Tabletten gewogen und deren Durchschnittsgewicht ermittelt. Die 10 mg Tabletten, mit einem Gewicht von 187,5 mg, dürfen nach Ph. Eur. 2.9.5 nicht mehr als 7,5 % vom Durchschnittswert (Tablettengewicht zwischen 80 und 250 mg) und die Tabletten ab 250 mg nicht mehr als 5 % von der Durchschnittsmasse abweichen.

6.5.11 Zerfall und Zerfall modifiziert nach Kleinebudde

Als Zerfallstester kommt ein ZT3-Zerfallstester der Firma Erweka (Heusenstamm, Deutschland) zum Einsatz. Die Methode entspricht der Ph.Eur. Methode 2.9.1: Zerfallszeit von Tabletten und Kapseln. Für die Minitabletten kommt eine modifizierte Apparatur nach Kleinebudde (1997) zum Einsatz. Diese besteht aus zusätzlichen Plexiglashülsen (Höhe 21 mm, Innendurchmesser 10 mm), die oben und unten mit Sieben (Maschenweite 710 μm) verschlossen sind. Um ein Aufschwimmen der Hülsen zu verhindern, werden diese mit Metallhülsen beschwert.

6.5.12 Viskositätsbestimmung

Die Viskosität von Cremophor EL und RH wird mit Hilfe eines Rheometers RS 600 (Thermo Fisher, Waltham, USA) mit einem Platte-Platte-Messaufbau bei 25 °C bestimmt, wobei der Plattendurchmesser 35 mm beträgt. Die Schergeschwindigkeit wird zwischen 1 und 150 s^{-1} variiert und die Schubspannung bestimmt.

6.5.13 HPLC-Methoden

6.5.13.1 Freisetzungsmethode

Der Emodepsid-Gehalt an den unterschiedlichen Messzeitpunkten wird mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie an einer Agilent 1100 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) bestimmt. Dabei handelt es sich um eine neu entwickelte Methode. Als Säule wird hier eine Luna 3u C18(2) 100 A-Säule (Phenomex, Torrance, USA) verwendet. Sie ist eine Umkehrphasensäule, gefüllt mit 3 μm -Partikeln, und einer Porengröße von 100 Ångström. Als Fließmittel kommt ein Gemisch aus Acetonitril und Wasser angesäuert mit 0,3 g/l Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (pH 4,5) in einem isokratischen Verhältnis von 75:25, zum Einsatz. Die Flussrate beträgt 2 ml/min und die Laufzeit 7 min. Das Einspritzvolumen liegt zwischen 5 und 50 μl , die Säulentemperatur bei 40 °C und die Wellenlänge, bei der gemessen wird, bei 210 nm. Der Gehalt wird mit Hilfe eines externen Standards zwei verschiedener Konzentrationen bestimmt. Um zu überprüfen, ob diese Methode geeignet ist, wird die Linearität über einen Messbereich von 0,1 bis 100 mg/l überprüft. Die Methode ist angelehnt an eine bereits bestehende Freisetzungsmethode für Emodepsid.

6.5.13.2 Gehaltsbestimmungsmethode

Die Gehaltsbestimmung erfolgt ebenfalls mit Hilfe einer Agilent 1100 HPLC-Apparatur (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Als Säule wird eine LiChrospher 100-RP-18 (Merck, Darmstadt, Deutschland) mit einem Innendurchmesser von 4 mm, einer Länge von 125 mm und einer LichoCart 4-4-Vorsäule ausgewählt. Als Fließmittel wird ein ACN-Wasser-Gemisch mit folgendem Gradienten eingesetzt (Tab. 36):

Tab. 36. Gradient von ACN/Wasser bei der Gehaltsbestimmungsmethode

Laufzeit [min]	Anteil Acetonitril [%]
0	38
8	38
9	80
17	80
17,01	38
25	38

Die Fließgeschwindigkeit beträgt 1 ml/min, das Einspritzvolumen 5 µl, die Säulentemperatur 40 °C und die Detektionswellenlänge liegt bei 210 nm.

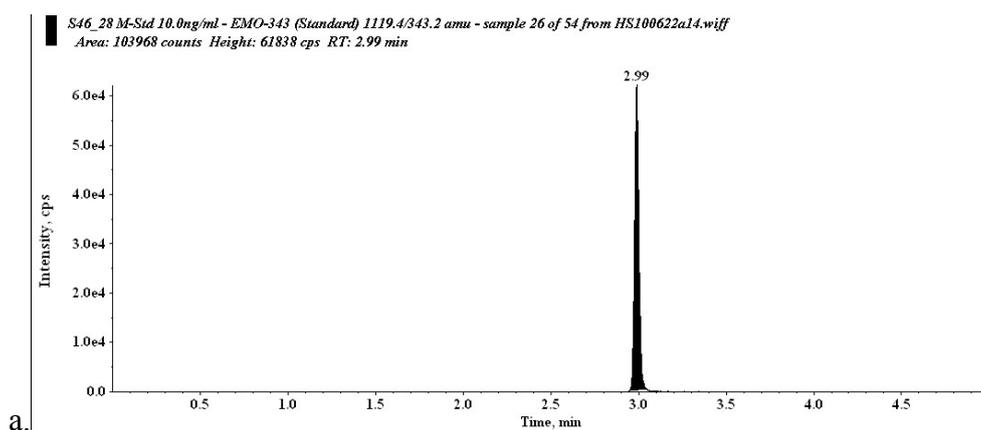
6.5.14 GC-Methode

Zur Bestimmung der Restlösungsmittel wird ein Gaschromatograph GC-6890/61530A (Hewlett Packard, Houston, USA) verwendet. Zur Bestimmung des Aceton- und Isopropanolgehalts wird eine Dampfraumanalysemethode verwendet. Das Verdampfen der Probe geschieht mit einem Headspace (Agilent 7694 Headspace Sampler, Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Hierbei werden 500 mg der zu analysierenden Probe in einer Septumflasche in Dimethylformamid gelöst, das Gefäß verschlossen und auf 80 °C aufgeheizt. Nachdem sich ein Gleichgewicht zwischen Probe und Dampfraum eingestellt hat, wird der Gehalt an Lösungsmitteln im Dampfraum bestimmt. Die Äquilibrierungszeit beträgt 60 min. Die verwendete Säule ist eine Zebron ZB-624 (Phenomenex SITZ, Torrance, USA) mit einem Durchmesser von 320 µm, einer Länge von 30 m und einer Filmdicke von 1,8 µm. Die Ofentemperatur beträgt initial 40 °C und maximal 260 °C. Die Laufzeit liegt bei 36 min. Der Gehalt der Proben wird, wie bei den beiden HPLC-Methoden auch, mit Hilfe eines externen Standards bestimmt.

6.5.15 HPLC/MS/MS-Methode

Die Bestimmung der Emodepsidkonzentration im Hundeplasma erfolgt mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Tandemmassenspektrometrischer-Detektion (HPLC/MS/MS), nachdem das Blutplasma mit Hilfe von ACN deproteiniert wurde. Da die Methode bisher unveröffentlicht ist, wird das Prinzip eingehend erläutert.

MS/MS beschreibt die Kombination von zwei Massensfiltern. Die Flüssigkeitschromatographie dient dabei zunächst der Auftrennung des Probenmaterials. Ein Teil des Eluenten wird dann von der HPLC in ein Triple-Quadrupol-Massenspektrometer überführt. Hier wird der Wirkstoff zunächst ionisiert. Im ersten Quadrupol findet eine Abtrennung des ionisierten Wirkstoffmoleküls anhand der Molekülmasse statt. Im zweiten Quadrupol werden die Ionen mit einem neutralen Trägergas, bei dieser Methode Stickstoff, beschossen und zerfallen dadurch in mindestens ein charakteristisches Fragment, dieses wird anschließend im dritten Quadrupol anhand der Molekülmasse detektiert. Die Detektion von Emodepsid erfolgt anhand folgender Ionen: Molekülion mit $m/z = 1.119$ für die Selektierung im ersten Quadrupol und Fragmentation mit $m/z = 343,2$ für das charakteristische Bruchstück im dritten Quadrupol. Die Quantifizierung von Emodepsid erfolgt mit Hilfe eines externen Standards. In Abb. 52 sind Chromatogramme eines Standards und einer Probe aufgezeigt. Die Retentionszeit von Emodepsid liegt bei ~ 3 min. Ein Vorteil dieser Methode ist eine hohe Selektivität, die es ermöglicht, Substanzen in komplexem Probenmaterial zu bestimmen, und eine hohe Sensitivität, die es ermöglicht, auch geringste Probenmengen zu quantifizieren. Die Nachweisgrenze der verwendeten Methode liegt bei $2 \mu\text{g/l}$.



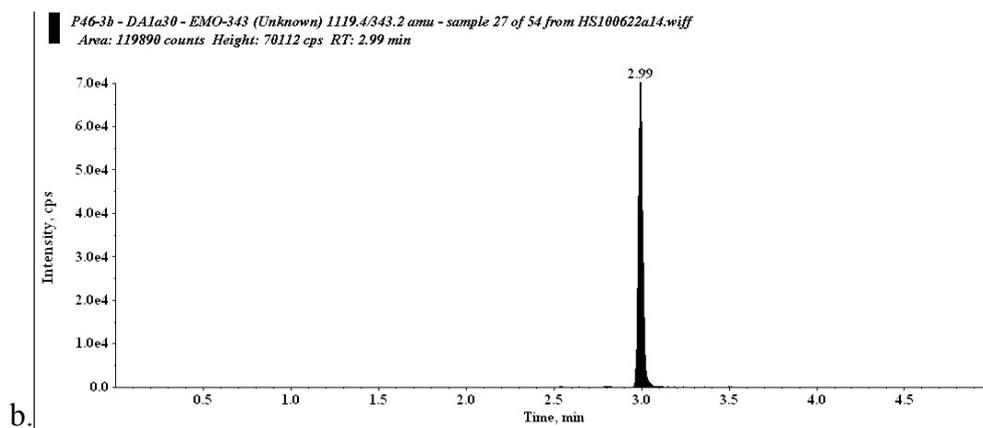


Abb. 52. HPLC/MS/MS-Chromatogramme von a. einem 10 µg/l-Standard und b. einer Probe

Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgt mittels des Programms WinNonlin, Version 5.2 (Pharsight Corporation, Mountain View, USA). Dabei werden unter anderem C_{\max} , t_{\max} , $t_{1/2}$, die AUC_{last} und $AUC_{0-24\text{ h}}$ und darüber hinaus noch die terminale Eliminationskonstante (λ_z), die $AUC_{0-\infty}$, das Verteilungsvolumen, die Gesamtkörperclearance der absorbierten Arzneistoffmenge und die mittlere Aufenthaltsdauer bestimmt, wobei im Ergebnisteil ausschließlich auf die 5 zuerst genannten Parameter näher eingegangen wird. Die Zeitpunkte für die Berechnung der Eliminationskonstante werden vom Studienleiter festgelegt und entsprechen den Blutentnahmezeitpunkten nach Erreichen des Konzentrationsmaximums. Zur Bewertung, wie stark die Einzelkurven von der linearisierten Kurve abweichen, wird zusätzlich der Korrelationskoeffizient berechnet. Die Eliminationshalbwertszeit errechnet sich mit Hilfe der Formel:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda_z} \quad (2)$$

$t_{1/2}$ = Eliminationshalbwertszeit

λ_z = Eliminationskonstante

6.5.16 Laserdiffraktometrie-Methode

Die Bestimmung der Partikelgröße des Suspensionskonzentrats erfolgt mit Hilfe eines Mastersizers 2000 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). Als Dispersionsmittel wird dünnflüssiges Paraffin verwendet. Die rote Lichtquelle ist ein Helium-Neon-Laser mit 633 nm und zur Messung des Feinbereichs eine Blaulichtdiode mit 450 nm. Diese ermöglicht eine Partikelgrößenbestimmung bis 20 nm (Malvern 1998). Als Methode kommt die Fraunhofer-Näherung zum Einsatz. Diese geht davon aus, dass die gemessenen Partikel

lichtundurchlässig sind und das Licht in einem engen Winkel streut. Daher ist sie vor allem für große Partikel geeignet und führt bei Partikeln im Submikronbereich zu Messungenauigkeiten. Bei Partikeln in diesem Bereich ist die Mie-Theorie geeignet. Allerdings müssen für deren Anwendung der Brechungsindex und die Absorption der dispergierten Teilchen bekannt sein. Da die Partikelgröße der Suspensionskonzentratproben im μm -Bereich liegt, kann die Fraunhofer-Methode angewendet werden. Die Messzeit beträgt 20 s. Die Lichtschwächungsgrenze, also der Anteil des Lichtes vom Analysenstrahl, um den der Laserstrahl durch Zugabe der Probe zum Dispergiermedium schwächer wird, beträgt 5-10 %. Die Messung erfolgt mit einer Umpumpgeschwindigkeit von 1750 U/min.

6.5.17 Dynamische Differenzkalorimetrie

Thermoanalytische Messungen werden mit Hilfe einer DSC 1 (Mettler Toledo GmbH, Greifensee, Schweiz) durchgeführt. 3-5 mg Partikelprobe werden in einen 40 μl Standardaluminiumtiegel eingewogen. Gemessen wird in einem offenen Tiegel. Dazu wird der Deckel des Tiegels vor dem Verschließen mit einer Nadel durchstoßen. In die gleiche Messkammer wird ein leerer Referenztiegel gestellt. Probe und Referenz werden mit einer Heizrate von 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ von 20 auf 250 $^{\circ}\text{C}$ 2mal aufgeheizt. Verändert sich die Probe durch Schmelzen, Verdampfen oder Glasübergänge kommt es zu einem Wärmeverbrauch oder es wird Wärme abgegeben. Diese endo- und exothermen Vorgänge führen zu einer Temperaturdifferenz zwischen Probe und Referenz. Dabei ist diese Differenz proportional zum Wärmestrom. Gegen das Temperatur-Zeit-Programm wird dieser [Watt] graphisch dargestellt. Das zweite Aufheizen dient zur Bestimmung der Glasübergangstemperatur. Die Messungen werden jeweils zweimal durchgeführt.

6.5.18 Röntgendiffraktometrie

Die Überprüfung des amorphen Zustands der Copräzipitate wird mit einem Pulverdiffraktometer X-Pert Pro (PANalytical, Almelo, Niederlande) unter Verwendung eines Kupferanodenstrahlers durchgeführt. Das Extrudat wird gemörsert und anschließend in einen Probenhalter mit einem Durchmesser von 16 mm überführt. Die Messung erfolgt in 0,0167 $^{\circ}$ -Schritten von 10 $^{\circ}$ bis 50 $^{\circ}$ (Einstrahlwinkel 2 θ) und einer Arbeitsspannung von 40 kV. Die Analyse der Copräzipitatformulierungen unterscheidet sich dahingehend, dass hier ein Messbereich von 2-38 $^{\circ}$ gewählt wird und die Schrittweite 0,013 $^{\circ}$ beträgt. Die Messzeit

beträgt hier 25 s/Schritt. Für den Wirkstoff Emodepsid ist bekannt, dass ein kristalliner Anteil von etwa 5 % vom Rauschen überdeckt wird.

6.5.19 Wasserbestimmung nach Karl-Fischer

Die Wassermenge der Proben wird mit einem Karl-Fischer-Titrator 720 KFS Titrino (Metrohm, Filderstadt, Deutschland) bestimmt. Als Auswertungssoftware dient die MetrohmTiNet, Version V 2.4. Die Feststoffprobe wird 5 min in Hydranal-Solvent gelöst. Das Solvent besteht hauptsächlich aus Schwefeldioxid in Ethanol und einem Amin. Die anschließende Titration findet mit Hydranal-Titrant 5 statt. Dies ist eine ethanolische Iodlösung mit eingestelltem Titer von $5 \pm 0,02$ mg H₂O/ml. Es wird eine 3fach-Bestimmung durchgeführt.

6.5.20 Stabilitätsuntersuchungen, Klimakammern

Die Proben für die Stabilitätsuntersuchungen, die nach ICH Q1A durchgeführt werden, werden in offenen Tablettengläschen bei 25 °C/60 % rF in einer Klimakammer (Viessmann, Allendorf, Deutschland) und bei 40 °C/75 % rF in einer Klimazelle C 15/24 (UKP GmbH, Mainz, Deutschland) eingelagert. Zu dem Messzeitpunkt wird jeweils ein Gläschen aus der Kammer ausgelagert und der Gehalt bzw. das Freisetungsverhalten per HPLC (6.5.13) bestimmt.

6.5.21 Röntgenaufnahmen

Für die Lokalisierung der Kapsel im Magen-Darm-Trakt von Beagle-Hunden wird alle 30 min eine Röntgenaufnahme mit einem Gierth HF200A full bridge inverter system, Anatomical Programins, Diagnostic X-Ray System (Collimax, Tokyo, Japan) aufgenommen. Es handelt sich dabei um ein digitales Röntgengerät, in dem die Röntgenbilder mit dem Programm Vet Ray Version 4.2. angezeigt werden.

6.5.22 Berechnung des Ähnlichkeitsfaktors

Der Ähnlichkeitsfaktor, auch f_2 -Wert genannt, ist ein Parameter der FDA zur Beurteilung von Freisetzungsprofilen (ICH 2002). Durch Gleichung 1 wird die freigesetzte Mengen des Wirkstoffs [%] zum Zeitpunkt t direkt miteinander verglichen:

$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n w_t (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} \cdot 100 \right\} \quad (3)$$

n = Anzahl der Datenpunkte

w = Gewichtungsfaktor

T = Freisetzungsdaten Probe

R = Freisetzungsdaten Referenz

t = Messzeitpunkt

Die Größe w_t steht für einen optionalen Gewichtungsfaktor (Moore 1996). In dieser Arbeit werden alle Werte gleich gewichtet, so dass auf die Verwendung dieses Faktors verzichtet wird. f_2 kann Werte zwischen 0 und 100 annehmen. Bei zwei absolut identischen Kurven beträgt er 100. Je mehr die Kurven voneinander abweichen, desto kleiner ist er. Die Freisetzungskurven werden als äquivalent angesehen, wenn sie nicht um mehr als 10 % voneinander abweichen. Dies entspricht einem Wert für den Ähnlichkeitsfaktor. Um diese Methode anwenden zu können, müssen mindestens drei Messzeitpunkte vorliegen und die RSD der Mittelwertskurven muss $< 15\%$ sein.

7 Literatur

Bay 44-4400 Chemical and physical properties of the ingredient T.03.02#0073 (2007)

Breitenbach J, Mägerlein M. Melt-extruded molecular dispersions. In *Pharmaceutical Extrusion Technology*. Marcel Dekker (2003) 245-260, New York

Chakraborty S, Shukla D, Mishra B, Singh S. Lipid- an emerging platform for oral delivery of drugs with poor bioavailability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 73 (2009) 1-15

Charman S, Charman W, Rogge M, Wilson T, Dutko F, Pouton C. Self-emulsifying systems: Formulation and biological evaluation of an investigative lipophilic compound. *Pharmaceutical Research* (1992) 87-94

Charman W, Stella V. Estimating the maximal potential for intestinal lymphatic transport of lipophilic drug molecules. *International Journal of Pharmaceutics* 34 (1986) 175-178

Chi S. Enhanced dissolution rate of biphenyl dimethyl dicarboxylate using SMEDDS. *Bulletin Technique Gattefosse* (1999) 75-80

Chiou L, Riegelmann S. Pharmaceutical applications of solid dispersion systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 60 (1971) 1281-1302

Corrigan O. Mechanismus of dissolution of fast release solid dispersion. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 11 (1985) 697-724

Coupe A, Davis S, Evans D, Wilding I. Correlation of the gastric emptying of nondisintegrating tablets with gastrointestinal motility. *Pharmaceutical Research* 8 (1991) 1281-1285

Dannenfelser R, He H, Joshi Y, Bateman S, Serajuddin A. Development of clinical dosage forms for a poorly water soluble drug I: Application of polyethylene glycol-polysorbate 80 solid dispersion carrier system. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 93 (2004) 1165-1175

De Brabander C, Vervaet C, Görtz J, Remon J, Berio J. Bioavailability of ibuprofen from matrix mini-tablets based on a mixture of starch and microcrystalline wax. *International Journal of Pharmacology* 208 (2000) 81-86

Deutsche Forschungsgemeinschaft Proposals for safeguarding Good Scientific Practice. Recommendations of the commission on professional self regulation in science (1998)

Dressman J. Comparison of canine and human gastrointestinal physiology. *Pharmaceutical Research* (1986) 123-131

Dressman J, Yamada K. Animal models for oral drug absorption. *Pharmaceutical Bioequivalence* (1991) 256-266

Eccleston G. Microemulsions. In *Encyclopedia of pharmaceutical technology*. Marcel Dekker (1992) 375-421, New York

El-Arini S, Leuenberger H. Dissolution properties of praziquantel-PVP systems. *Pharmaceutica Acta Helveticae* 73 (1998) 89-94

Engelhardt W, Breves G. *Physiologie der Haustiere* (2005) Enke-Verlag, Stuttgart

Englund D, Johansson E. Oral versus vaginal absorption of oestradiol in postmenopausal women. Effects of different particles sizes (1981) *Uppsala Journal of Medical Science* 86 (1981) 297-307

Fachinformation Sandimmun[®] Optoral Weichkapseln (2010) Novartis Pharma GmbH, Nürnberg

FAO/WHO Evaluation of certain food additives: Sixty-third report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives. WHO Technical Report Series 928 (2005)

Flemming J, Mielck J. Experimental Micro Tableting: Construction of an instrumented punch holder for an eccentric tableting machine. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 42 (1996) 212-214

Forster A, Hempenstall J, Rades T. Characterization of glass solutions of poorly water-soluble drugs produced by melt extrusion with hydrophilic amorphous polymers. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* (2000) 303-315

Galia E, Nicolaidis E, Hörter D, Löbenberg R, Reppas C, Dressman J. Evaluation of various dissolution media for predicting in vivo performance of class I and II drugs. *Pharmaceutical Research* 15 (1998) 698-705

Gatne M, Hamann H, Kanikanti V, Datta A. Technique to determine absorption of New Chemical Entity (NCE) in different parts and segments of gastrointestinal tract in dog by ligation method. *The Vets Communications* 7 (2011) 50-52

Goa K, Spencer C. Bicalutamide in advanced prostate cancer. *Drugs & Aging* (1998) 401-422

Graffner C, Josefsson K, Stockman O. Intra- and intersubject variation of erythromycin absorption from single-unit and multiple-unit enteric-coated products. *Biopharmaceutics & Drug Disposition* (1986) 163-171

Harder A. Emodepsid – Wirkmechanismus einer neuen, anthelmintisch wirksamen Verbindungsklasse. 22. Jahrestagung der DGP. Abstract Vortrag (2006)

Harder A, Holden-Dye L, Walker R, Wunderlich F. Mechanism of action of emodepside. *Parasitology Research* 97 (2005) S1-S10

Hermeling M, Weber A. Stofftransportprozesse in Blasensäulen und Stabilisierung von organischen Nanopartikeln mit verschiedenen Tensiden. *Chemie Ingenieur Technik*. 81 (2009) 785-789

Herbert M, Berg W, Kublik A, Ho P. Thio- und Oxybarbiturate hemmen die Dünndarmperistaltik. In vitro-Untersuchungen am Meerschweinchenileum. *Anaesthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie* 37 (2002) 721-726

Hocke M, Schöne U, Richert H, Görnert P, Keller J, Layer P, Stallmach A. Every slow wave impulse is associated with motor activity of the human stomach. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* (2009) G709-G716

Hovi T, Josefsson K, Renkonen O. Erythromycin absorption in healthy volunteers from single and multiple doses of enteric-coated pellets and tablets. *European Journal of Clinical Pharmacology* 25 (1983) 271-273

Humberstone A, Porter C, Charman W. A physicochemical basis for the effect of food on the absolute oral bioavailability of halofantrine. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 85 (1996) 526-529

International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical Human Use. Q1A (R2): Stability testing of new drug substances and products (2002)

Itoh T, Higuchi T, Gartner C, Caldwell L. Effect of particle size and food on gastric residence time of non-disintegrating solids in beagle dogs. *Journal of Pharmaceutical Pharmacology* (1986) 801-806

Iwata M, Ueda H. Dissolution properties of glibenclamide in combinations with polyvinylpyrrolidone. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 22 (1996) 1161-1165

Jun Y, Choi J, Cheon J. Formenkontrolle von Halbleiter- und Metalloxid-Nanokristallen durch nichthydrolytische Kolloidverfahren. *Angewandte Chemie* 118 (2006) 3492-3517

Kalbe J, Traeubel M, Harder A, Samson-Himmelstjerna G. Crystal modification of a cyclic depsipeptide having improved strength, Patent WO2002/066048 (2002)

Kamba M, Seta Y, Kussai A, Nishimura K. Comparison of the mechanical destructive force in the small intestine of dog and human. *International Journal of Pharmaceutics* (2002) 139-149

Kamba M, Seta Y, Kussai A, Nishimura K. Evaluation of the mechanical destructive force in the stomach of dog. *International Journal of Pharmaceutics* (2001) 209-217

Kasim N, Whitehouse M, Ramachandran C, Bermejo M, Lenneras H, Hussain A, Junginger H, Stavchansky S, Midha K, Shah v, Amidon G. Molecular properties of WHO Essential Drugs and provisional biopharmaceutical classification. *Molecular Pharmaceutics* 1 (2004) 85-96

Klausner E, Lavy E., Stepensky D, Friedman M, Hoffman A. Novel gastroretentive dosage forms: Evaluation of gastroretentivity and its effect on riboflavin absorption in dogs. *Pharmaceutical Research* 19 (2002) 1516-1523

Kleinebudde P. Pharmazeutische Pellets durch Extrudieren/Sphäronisieren Herstellung Eigenschaften Modifizieren. (1997) Habilitationsschrift Christian-Albrechts-Universität, Kiel
Kolter K, Karl M, Nalawade S, Rottmann N. Hot-melt extrusion with BASF Pharma polymers. *Extrusion Compendium* (2010)

Kondo N, Iwao T, Masuda H, Yamanouchi K, Ishihara Y, Yamada N, Haga T, Ogawa Y, Yokoyama K. Improved oral absorption of a poorly water-soluble drug, HO-221, by wet-bead milling producing particles in submicron region. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 41 (1993) 737-740

Khoo S, Humberstone A, Porter C, Edwards G, Charman W. Formulation design and bioavailability assessment of lipidic self-emulsifying formulations of halofantrine. *International Journal of Pharmaceutics* 167 (1998) 155-164

Khoo S, Porter C, Charman W. The formulation of halofantrine as either non-solubilising PEG 6000 or solubilising lipid based solid dispersions: Physical stability and absolute bioavailability assessment. *International Journal of Pharmaceutics* 205 (2000) 65-78

Leithner K, Grabovac V, Albrecht K, Hombach J, Klima G, Bernkop-Schnürch A. Permeation studies on freshly excised rat gastric mucosa: Influence of pH. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 37 (2011) 518-525

Leuner C, Dressman J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersion. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50 (2000) 47-60

Lipinski C. Poor aqueous solubility-an industry wide problem in drug discovery. *American Pharmaceutical Review* 5 (2002) 82-85

Malvern Instruments Operation Guide (1998), Herrenberg

Matsumoto T, Zografi G. Physical properties of solid molecular dispersion of indomethacin with poly(vinylpyrrolidone) and poly(vinylpyrrolidone-co-vinylacetate) in relation to indomethacin crystallization. *Pharmaceutical Research* 16 (1999) 1722-1728

McIlvaine T. A buffer solution for colorimetric comparison. *Journal of Biological Chemistry* (1921) 183-186

Meinzer A, Mueller E, Vonderscher J. Microemulsion – A suitable galenical approach for the absorption enhancement of low soluble compounds. *Bulletin Gattefosse* (1995) 21-26

Methode 00550/M003. Method for the HPLC/MS/MS determination of BAY 44-4400 and praziquantel in serum of cat and dog (2000)

Midha K, Blume H. Bio-International: Bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetics. International Conference of F.I.P. “Bio-International ’92”, F.I.P. Paperback, medpharm Scientific Publisher Stuttgart (1993) 133-140

Moore J, Flanner H. Mathematical comparison of dissolution profiles. *Pharmaceutical Technology* 6 (1996) 64-74

Mummaneni V, Doll W, Sandefer E, Page R, Ryo J, Digenis F, Kaul S. Gamma scintigraphic evaluation of the intestinal absorption of stavudine in healthy male volunteers using IntelSite capsule. *Pharmaceutical Science* (1999) S-608

Munday D. A comparison of the dissolution characteristics of theophylline from film coated granules and mini-tablets. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 20 (1994) 2369-2379

Oo C, Snell P, Barrett J, Dorr A, Liu B, Wilding I. Pharmacokinetics and delivery of the anti-influenza prodrug oseltamivir to the small intestine and colon using site-specific delivery capsules. *International Journal of Pharmaceutics* (2003) 297-299

Park J, Joo J, Kwon S, Jang Y, Hyeon T. Synthese monodisperser sphärischer Nanokristalle. *Angewandte Chemie* 119 (2007) 4714-4745

Persson E, Nilsson R, Hannsson G, Löfgren L, Libäck F, Knutson L, Abrahamsson B, Lennernäs H. A clinical single-pass perfusion investigation of the dynamic in vivo secretory

response to a dietary meal in human proximal small intestine. *Pharmaceutical Research* 23 (2006) 742-751

Pharmacopoea Europaea. *Europäisches Arzneibuch 7*. Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart (2011)

Porter C, Charman W. In vitro assessment of oral lipid based formulations. *Advanced Drug Delivery Reviews* 50 (2001) 127-147

Porter C, Trevaskis N, Charman W. Lipids and lipid-based formulations. Optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* 6 (2007) 231-248

Pouton C. Lipid formulations for oral administration of drugs: Non-emulsifying, self-emulsifying and 'self-microemulsifying' drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* (2000) S93-S98

Rahman A, Brown C. Effect of pH on the critical micelle concentration of sodium dodecyl sulphate. *Journal of Applied Polymer Science* 28 (1983) 1331-1334

Richert H. Entwicklung eines magnetischen 3-D-Monitoringsystems am Beispiel der nichtinvasiven Untersuchung des menschlichen Gastro-Intestinal-Traktes. (2003) Dissertation Friedrich-Schiller-Universität, Jena

Richert H, Surzhenko O, Wangemann S, Heinrich J, Görnert P. Development of a magnetic capsule as a drug release system for future applications in the human GI tract. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* (2005) 497-500

Russel J, Bass P. Canine gastric emptying of polycarbophil: An indigestible, particulate substance. *Gastroenterology* (1985) 307-312

Samson-Himmelstjerna G von, Harder A, Schnieder T, Kalbe J, Mencke N. In vivo activities of the new anthelmintic depsipeptide PF 1022A. *Parasitology Research* 86 (2000) 194-199

Sandberg A, Abrahamsson B, Svenheden A, Olofssen B, Bergstrand R. Steady-state bioavailability and day-to-day variability of a multiple-unit (CR/ZOK) and single-unit (OROS) delivery system of metoprolol after once-daily dosing. *Pharmaceutical Research* 10 (1993) 28-34

Sethia S, Squillante E. Solid dispersion of carbamazepine in PVP K30 by conventional solvent evaporation and supercritical methods. *International Journal of Pharmaceutics* 272 (2004) 1-10

Shamblin S, Zografis G. The effects of absorbed water on the properties of amorphous mixtures containing sucrose. *Pharmaceutical Research* 16 (1999) 1119-1124

Sicherheitsdatenblatt Ciclosporin. Caelo (02.08.2010)

Simonelli A, Mehta S, Higuchi W. Dissolution rates of high energy polyvinylpyrrolidone (PVP)-sulfathiazole coprecipitates. *Journal of Pharmaceutical Sciences* (1969) 538-548

Sorbera L, del Fresno M, Castañer R, Rabasseda X. Faropenem daloxate. *Drugs of the Future* (2002) 223-233

Stallmann A, Hippus H. Magnetische Kapselöffnung zur gezielten Wirkstofffreisetzung im menschlichen Dünndarm. *Klinischer Prüfplan* (2008) Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität, Jena

Taylor L, Zografi G. Spectroscopic characterization of interactions between PVP and indomethacin in amorphous molecular dispersions. *Pharmaceutical Research* 14 (1997) 1691-1698

Thiele W. Twin-screw extruder and screw design. *Pharmaceutical Extrusion Technology*, Marcel Dekker (2003), New York

Thi T, Speybroeck M van, Bariallaro V, Martens J, Annaert P, Augustijns P, Humbeeck J van, Vermant J, Mooter G van den. Formulate-ability of ten compounds with different physicochemical profiles in SMEDDS. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 38 (2009) 479-488

Thommes M. Systematische Untersuchungen zur Eignung von κ -Carrageenan als Pelletierhilfsstoff in der Feuchtextusion/ Sphäronisation. (2006) Dissertation Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

USP30 – NF 25. United States Pharmacopoeia and National Formulary (2007) Rockville, Massachusetts

Ussing H, Zerahn K. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physica Scandinavia* (1951) 110-127

Weitschies W, Karas M, Cordini D, Trahms L, Breikreutz J, Semmler W. Magnetic marker monitoring of disintegrating capsules. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* (2001) 411-416

Weitschies W, Kosch O., Mönnikes H, Trahms L. Magnetic marker monitoring: An application of biomagnetic measurement instrumentation and principles for the determination of the gastrointestinal behavior of magnetically marked solid dosage forms. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2005) 1210-1222

Weitschies W, Kötitz R, Cordini D, Trahms L. High-resolution monitoring of the gastrointestinal transit of a magnetically marked capsule. *Journal of Pharmaceutical Sciences* (1997) 1218-1222

Wilding I, Hirst P, Connor A. Development of a new engineering-based capsule for human drug absorption studies. *Pharmaceutical Science & Technology Today* 3 (2000) 385-392

Wilding I, Prior D. Remote controlled capsules in human drug absorption (HDA) studies. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 20 (2003) 405-431

Woo J, Kim T, Chi S. Formulation and biopharmaceutical evaluation of silymarin using SMEDDS. *Archives of Pharmacal Research* 30 (2007) 82-89

Yoshioka M, Hancock B, Zografi G. Crystallization of indomethacin from the amorphous state below and above its glass transition temperature. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 83 (1995) 1700-1705

Yung S, Mayersohn M, Robinson B. Ascorbic acid absorption in humans: A comparison among several dosage forms. *Journal of Pharmaceutical Sciences* (1982) 282-285

8 Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen einer Kooperation zwischen dem Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland und der Abteilung Research & Development, Chemistry & Formulation Technology der Bayer Animal Health GmbH, Leverkusen, Deutschland.

Herrn Prof. Dr. Peter Kleinebudde danke ich ganz herzlich für die Betreuung meiner Arbeit, die ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft und die vielen Anregungen, sowie die Aufnahme als externe Doktorandin in seinen Arbeitskreis.

Bei Herrn Prof. Dr. Jörg Breitreutz möchte ich mich für die Übernahme des Koreferates bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Venkata-Rangarao Kanikanti für die Überlassung des Themas, die Übernahme der Betreuung und seine Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. Hans-Jürgen Hamann danke ich für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Arbeit, die Bereitstellung der dafür benötigten Mittel und die vielen interessanten Ideen.

Meinen Kollegen Herrn Barthel Grofmeyer, Herrn Michael Äpfelbach und Herrn Marek Rygol danke ich für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe.

Bei den Kollegen der Formulierttechnologie bedanke ich mich ebenfalls für die freundliche Aufnahme, das angenehme Arbeitsklima und die immerwährende Hilfsbereitschaft.

Herrn Barthel Grofmeyer danke ich für die stete Hilfsbereitschaft und guten Ideen zu allem, was sich um feste Arzneiformen dreht, Frau Nicole Maler danke ich für die Einführung in die Perlmahlung, Frau Marion Krüger für die Einführung in die Laserdiffraktometrie und Frau Petra Ohage-Spitzlei für die Einführung am Rheometer.

Den Mitarbeitern der Abteilung Entwicklungsanalytik danke ich für die Aufnahme, die Bereitstellung der Geräte, die stete Hilfsbereitschaft und tatkräftige Unterstützung in allen

analytischen Fragestellungen. Insbesondere möchte ich Frau Edith Klein, Herrn Jürgen Jansen und Frau Gabriele Jannes für die Unterstützung bei der HPLC, Frau Christina-Nicoletta Buznosu und Frank Peters bei der GC, Frau Kirsten Muth und Harald Gleisner für die Einlagerungen, sowie deren Vorgesetzten Frau Dr. Elisabeth Feldhues, Herrn Hans-Rolf Tattera, Herrn Dr. Thomas Doege und Frau Dr. Martina Preu für die Akzeptanz meiner Arbeiten danken

Frau Dr. Sandra Mangold-Gehring, Frau Dr. Eva-Maria Krüdwagen, Frau Dr. Kristine Fraatz, Frau Dr. Gertraud Altreuther, Herrn Dr. Klemens Krieger, Frau Christiane Smetonat und Frau Angela Schulten danke ich für die Unterstützung und Durchführung der Tierversuche und für ihre Überzeugung mit den MAARS-Kapseln erfolgreich sein zu können.

Herrn Dr. Ralph Krebber und Franz-Jürgen Hoffend, Bayer Crop Science, danke ich für die stete Bereitschaft für HPLC/MS/MS-Analysen.

Herrn Thomas Felkel, Herrn Heribert Hamacher und Herrn Christian Hippler, Currenta Analytics, danke ich für die Aufnahme von Röntgendiffraktogrammen.

Herrn Jonathan Vaassen und Herrn Dr. Markus Thommes danke ich für die Unterstützung bei der Schmelzextrusion.

Der Teamassistentin Frau Elke Hirsch danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit bei der Unterstützung aller organisatorischen Dinge.

Frau Dr. Julia Baronsky-Probst, Frau Dr. Claudia Selbach und Herrn Alexander Müller danke ich für die herzliche Aufnahme in den Doktorandenkreis der Formulierttechnologie, die fachliche Unterstützung, die aufmunternden und mutmachenden Gespräche und deren Freundschaft.

Den Doktoranden des Instituts für Pharmazie und Biopharmazie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf danke ich für die freundliche Aufnahme in ihren Kreis.

Schließlich möchte ich meinen Freunden und meiner Familie danken, ohne deren Ermutigung, Hilfe und Unterstützung ich dieses Ziel nicht erreicht hätte.