



Entwicklung und Charakterisierung filmförmiger Zubereitungen zur oromukosalen Anwendung von Peptiden

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Sandra Lindert

aus Saarbrücken

Düsseldorf, Juli 2016

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. Jörg Breitzkreutz

Korreferent: Prof. Dr. Dr. h.c. Peter Kleinebudde

Tag der mündlichen Prüfung: 05.09.2016

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Ziele der Arbeit	1
1.1	Einleitung	1
1.2	Ziele der Arbeit	5
2	Allgemeiner Teil.....	6
2.1	Einleitung	6
2.2	Die Mundhöhle als Applikationsort.....	6
2.3	Filmförmige Zubereitungen zur oromukosalen Anwendung.....	8
2.3.1	Definitionen.....	8
2.3.2	Einschichtfilme.....	9
2.3.3	Mehrschichtfilme.....	10
2.4	Herstellung filmförmiger Zubereitungen.....	13
2.4.1	Gießverfahren.....	13
2.4.2	Schmelzextrusion.....	13
2.4.3	Weitere Herstellungsverfahren	13
2.4.4	Besondere Herstellungsaspekte bei Mehrschichtfilmen	14
2.5	Charakterisierung filmförmiger Zubereitungen zur oromukosalen Anwendung	16
2.5.1	Allgemeines	16
2.5.2	Morphologie- und Festphasencharakterisierung.....	16
2.5.3	Freisetzung.....	17
2.5.4	Permeation.....	17
2.5.5	Mukoadhäsion und <i>in-vitro</i> -Verweilzeit	18
2.5.6	Mechanische Eigenschaften.....	19
2.5.7	Sonstige Charakterisierungsmethoden.....	19
3	Ergebnisse und Diskussion	20
3.1	Modellpeptide.....	20
3.1.1	Einleitung.....	20
3.1.2	Stresstests.....	22
3.1.2.1	Beidseitig geschütztes Modellpeptid (Cbz-MP).....	22
3.1.2.2	Einseitig geschütztes Modellpeptid (NH ₂ -MP).....	23
3.1.3	Formulierungsentwicklung	24
3.1.4	Charakterisierung der Filme	26
3.1.4.1	Morphologie der Filme	26

3.1.4.2	Stabilitätsuntersuchungen.....	30
3.1.5	Zusammenfassung.....	33
3.2	Desmopressinacetat.....	35
3.2.1	Einleitung.....	35
3.2.2	Rationale Formulierungsentwicklung.....	37
3.2.3	Einschichtfilme.....	41
3.2.3.1	Formulierungsentwicklung und Herstellung der Einschichtfilme...41	
3.2.3.2	Morphologie.....	43
3.2.3.3	Gehaltsbestimmung.....	44
3.2.3.4	Lagerstabilität.....	45
3.2.3.5	Zusammenfassung.....	50
3.2.4	Dreischichtfilme.....	51
3.2.4.1	Formulierungsentwicklung und Herstellung der Dreischichtfilme..51	
3.2.4.2	Morphologie.....	54
3.2.4.3	Mechanische Eigenschaften.....	56
3.2.4.4	Zerfall.....	59
3.2.4.5	Gehaltsbestimmung.....	59
3.2.4.6	Lagerstabilität nach ICH.....	61
3.2.4.7	Zusammenfassung.....	69
3.2.5	Interaktion von Desmopressinacetat mit Polyacrylsäure.....	70
3.2.5.1	Einleitung und Problematik.....	70
3.2.5.2	Konzentrationsreihen.....	71
3.2.5.3	Freisetzungsuntersuchungen.....	75
3.2.5.4	Zusammenfassung.....	78
3.2.6	Mukoadhäsionsuntersuchungen.....	79
3.2.6.1	Einleitung.....	79
3.2.6.2	Texturprofilanalyse von Gelatinegelen und Schweinemukosa.....80	
3.2.6.3	Untersuchungen an unterschiedlichen Schleimhautgeweben des Schweins und an Schleimhautersatzmaterialien.....82	
3.2.6.4	Vergleich unterschiedlicher mukoadhäsiver Polymerschichten.....87	
3.2.6.5	Zusammenfassung.....	93
3.2.7	<i>Ex-vivo</i> -Permeations- und Freisetzungsuntersuchungen.....	94
3.2.7.1	Einleitung.....	94
3.2.7.2	Methodenentwicklung zur <i>ex-vivo</i> -Permeationsuntersuchung.....94	
3.2.7.3	Permeationsuntersuchungen an verschiedenen Schleimhautgeweben.....98	
3.2.7.4	Permeations- und Freisetzungsuntersuchungen.....	100
3.2.7.5	Permeations- und Freisetzungsuntersuchungen der Dreischichtfilme unter Verwendung von Permeationsverbesserern.....110	
3.2.7.6	Zusammenfassung.....	120
3.2.7.7	Ausblick.....	121

4	Zusammenfassung	122
5	Summary	125
6	Experimenteller Teil.....	128
6.1	Materialien	128
6.2	Methoden.....	132
6.2.1	Polymerlösungen	132
6.2.1.1	Herstellung der Polymerlösungen.....	132
6.2.1.2	Berechnung der Peptidfraktion	132
6.2.1.3	Dynamische Viskosität der Polymerlösungen.....	132
6.2.1.4	pH-Wert der Polymerlösungen.....	133
6.2.2	Herstellung der Einsichtfilme	133
6.2.3	Herstellung der Dreischichtfilme.....	133
6.2.4	Morphologie der Filme.....	134
6.2.4.1	Dicke.....	134
6.2.4.2	Masse.....	134
6.2.4.3	Visuelle Beurteilung	134
6.2.4.4	Fotografie	134
6.2.4.5	Polarisationsmikroskopie.....	134
6.2.4.6	Rasterelektronenmikroskopie.....	134
6.2.5	Röntgendiffraktometrie	135
6.2.6	Karl-Fischer Titration.....	135
6.2.7	Gehaltsbestimmung.....	135
6.2.7.1	Allgemein.....	135
6.2.7.2	Beidseitig geschütztes Modellpeptid (Cbz-MP).....	136
6.2.7.3	Einseitig geschütztes Modellpeptid (NH ₂ -MP).....	137
6.2.7.4	Desmopressinacetat	138
6.2.8	Stabilitätsuntersuchungen.....	141
6.2.8.1	Stresstests der Modellpeptide.....	141
6.2.8.2	Stabilitätsuntersuchungen der Einsichtfilme	141
6.2.8.3	Stabilitätsuntersuchungen der Ein- und Dreischichtfilme	141
6.2.9	Präparation der Schweinemukosa	142
6.2.9.1	Allgemein.....	142
6.2.9.2	Präparation der Schweinewangen.....	142
6.2.9.3	Präparation der Schweinzungen.....	142
6.2.9.4	Präparation der Schweinspeiseröhren.....	143
6.2.10	Mukoadhäsion	143
6.2.10.1	Schweinemukosa.....	143
6.2.10.2	Gelatinegele – Texturprofilanalyse.....	143
6.2.10.3	Mucinpresslinge	145
6.2.10.4	Mukoadhäsionsprüfung mittels Texture Analysers.....	145

6.2.11	Freisetzung.....	146
6.2.11.1	Methode des modifizierten rotierenden Zylinders	146
6.2.11.2	Stempel-und-Filter-Methode	147
6.2.12	<i>Ex-vivo</i> -Permeationsuntersuchungen	148
6.2.12.1	Aufbau der <i>ex-vivo</i> -Permeationsmessungen	148
6.2.12.2	Integritätstest der Schweinemukosa.....	150
6.2.13	Durchstoßkraft.....	151
6.2.14	Zerfall.....	151
6.2.14.1	Diarahmenmethode.....	151
6.2.14.2	Petrischalenmethode	152
6.2.14.3	Modifizierter Zerfallstester nach Ph. Eur.....	152
7	Anhang.....	153
8	Literaturverzeichnis	156
9	Danksagung.....	175

Abkürzungsverzeichnis

A	Fläche
ADH	Antidiuretisches Hormon
ADI	Acceptable daily intake
aPMMA	Eudragit® E
AS	Abdeckschicht
AUC	Fläche unter der Kurve
AV	Akzeptanzwert
BV	Bioverfügbarkeit
c	Konzentration
Cbz	Benzyloxycarbonylschutzgruppe
Cbz-MP	Modellpeptid Cbz-Ala-Phe-Gly-OEt
Chito	Chitosan
CHMP	Committee for Medicinal Products for Human Use
CMC	Carmellose Natrium
Desmopressin	Desmopressinacetat
DIN	Deutsches Institut für Normung
EC	Ethylcellulose
EMA	European Medicines Agency
F	Formulierung
FLD	Fluoreszenzdetektion
Fl	Flux
F _{max}	Maximalkraft
GIT	Gastrointestinaltrakt
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPC	Hyprolose, Hydroxypropylcellulose
HPMC	Hypromellose, Hydroxypropylmethylcellulose

HPMCAS	Hydroxypropylmethylcelluloseacetate succinat
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
K _P	Scheinbarer Permeabilitätskoeffizient
KI	Konfidenzintervall
LM	Lösungsmittel
MG	Molekulargewicht
MS	Mukoadhäsive Schicht
MW	Mittelwert
NH ₂ -MP	Modellpeptid NH ₂ -Ala-Phe-Gly-OEt
NRF	Neues Rezeptur-Formularium
p	Druck
PA	Carbomer, Polyacrylsäure
PDE	Permitted daily exposure
Ph. Eur.	Europäisches Arzneibuch
PVP	Povidon, Polyvinylpyrrolidon
qPMMA	Eudragit® RS
R	Korrelationskoeffizient
REM	Rasterelektronenmikroskopie
r.F.	Relative Feuchte
s	Standardabweichung
SDS	Natriumlaurylsulfat
t	Zeit
USP	United States Pharmacopeia
UV	UV/VIS Detektion
V	Volumen
Wasser dest.	Destilliertes Wasser
WS	Wirkstoffschicht

1 Einleitung und Ziele der Arbeit

1.1 Einleitung

In den letzten Jahren ist ein starker Anstieg an zugelassenen Arzneistoffen mit Peptid- oder Proteinstruktur zu verzeichnen. Im Zuge der Weiterentwicklung biotechnologischer Möglichkeiten und des wachsenden Bedarfs an wirksamen Arzneistoffen im Bereich der Therapie von Tumoren, Autoimmunerkrankungen oder Infektionen wird dieser Verlauf auch in Zukunft immer deutlicher werden [1, 2]. Unter pharmazeutisch-technologischen Gesichtspunkten betrachtet birgt diese Arzneistoffgruppe jedoch einige Schwierigkeiten. Auf Grund der ungünstigen physikochemischen Eigenschaften von Peptiden und Proteinen ist die Applikation meist mit Komplikationen behaftet. Peptidische Arzneistoffe sind häufig große Moleküle mit einem hohen Molekulargewicht (MG). Es ist bekannt, dass die Diffusion durch epitheliale Zellen direkt von Molekülgröße und MG beeinflusst wird und die Bioverfügbarkeit (BV) mit steigendem MG (> 700 Da) sinkt [3]. Dies wird zudem durch die hydrophilen Eigenschaften und der damit verbundenen verminderten para- und transzellulären Diffusion durch Biomembranen im Körper verstärkt. Des Weiteren zeigen Peptide und Proteine Instabilitäten in wässrigen Lösungen, wie beispielsweise den Flüssigkeiten des Gastrointestinaltrakts (GIT), da diese eine Vielzahl an digestiven Enzymen enthalten, die zu proteolytischen Abbaureaktionen der peptidischen Strukturen führen [4]. Letztendlich resultieren all diese Faktoren (hohes MG, Hydrophilie und Degradation in gastrointestinalen Flüssigkeiten) in einer geringen und teils stark schwankenden oralen BV. Folglich kann ein Großteil der pharmakologisch verwendeten Peptide nur über den parenteralen Weg appliziert werden [5]. Durch eine parenterale Applikation kann die Therapietreue des Patienten allerdings stark vermindert werden, da eine nicht-invasive Anwendung von Arzneimitteln meist bevorzugt wird. Des Weiteren wird die Flexibilität des Patienten vor allem in der parenteralen Therapie chronischer Krankheiten stark eingeschränkt. Ein weiterer Nachteil besteht in den höheren Produktions- und Lagerungskosten eines sterilen, parenteralen Produkts im Vergleich zu herkömmlichen, nicht sterilen Arzneiformen. Folglich besteht ein wachsendes Interesse an geeigneten, alternativen Routen zur parenteralen Applikation von Peptiden und Proteinen [6, 7].

Die rektale, vaginale und okulare Applikation würde zwar den GIT und damit verbundene Degradationsprozesse umgehen, bietet aber hinsichtlich einer verbesserten Therapietreue des Patienten keine Vorteile und kann sogar zu einer Verschlechterung führen [8, 9]. Die nasale Schleimhaut ist dagegen durch eine gute

Permeabilität gekennzeichnet und die nasale Applikation führte in der Vergangenheit bereits für einige Peptidarzneistoffe zu einer Verbesserung der BV. Peptidische Arzneistoffe wie das Buserelin (Profact®), Gonadorelin (Kryptocur®) und Desmopressin (Minirin®) sind als Nasenspray im Handel. Nachteile der nasalen Applikation bestehen in der starken Irritation der Nasenschleimhaut, in der durch die chronische Anwendung hervorgerufenen irreversiblen Störung der Zilientätigkeit sowie in inter- und intraindividuellen Schwankungen der Schleimhautbeschaffenheit und folglich auch in Schwankungen der nasalen Permeabilität [8].

Die orotransmukosale Anwendung bietet dahingegen einige Vorteile gegenüber den bereits genannten Applikationsorten. Die Permeabilität der oralen Schleimhaut liegt zwischen derjenigen der dermalen Epidermis und der der intestinalen Mukosa [10]. Die Mundhöhle weist geeignete enzymatische Bedingungen auf und ist auf Grund der guten Gefäßversorgung ein adäquater Resorptionsort für peptidische Wirkstoffe [11, 12]. Die schnelle Erholung nach mechanischem, chemischem oder physikalischem Stress sowie die Abwesenheit von immunaktiven Langerhans-Zellen macht die orale Mukosa toleranter gegenüber potentiellen externen Allergenen [13]. Durch die orotransmukosale Permeation wird der GIT sowie der First-Pass-Metabolismus umgangen und mögliche Abbaureaktionen durch pH-Wert-, Enzym- oder Elektrolyteinflüsse während der Darmpassage vermindert oder sogar verhindert. Im Hinblick auf das Ziel der Verbesserung der Therapietreue ist anzumerken, dass die Mundhöhle seitens des Patienten gut zu erreichen ist, wodurch die Flexibilität der Medikation verbessert wird [14-16]. Das Potential der orotransmukosalen Peptidapplikation wurde bereits früh erkannt und für einige Peptidmoleküle in der Literatur beschrieben. Allerdings wurde in vielen Fällen nur mit Arzneistofflösungen gearbeitet, um die prinzipielle Eignung dieser Applikationsart zu testen [17-25]. Eine finale Arzneiform wurde in diesen Fällen nicht entwickelt. Trotz der problematischen physikochemischen Eigenschaften der Peptidmoleküle konnte, teils unter Verwendung von Permeationsverbesserern, eine hinreichende orotransmukosale Permeation erreicht werden.

Eine geeignete Arzneiform zur systemischen, orotransmukosalen Applikation von Peptiden oder Proteinen sollte einige elementare Anforderungen erfüllen. Dazu gehört zum einen, dass die Arzneiform für eine ausreichend lange Zeit an der Mukosa, an der sie angewendet werden soll, adhäriert, damit ein Abschlucken der Arzneiform verhindert wird. Die Arzneiform sollte demnach geeignete mukoadhäsive Eigenschaften besitzen. Zum anderen sollte sichergestellt werden, dass das Peptid unidirektional nur in Richtung der Mukosa freigesetzt wird, um den Anteil an Wirkstoff, der nach Abschlucken über den gastrointestinalen Weg verloren gehen kann, gering zu halten [26]. Um eine möglichst effiziente transmukosale Permeation zu erreichen, ist es außerdem von Vorteil, wenn das zu permeierende Peptid molekulardispers verteilt in der Arzneiform vorliegt und sich nicht erst in der geringen Menge an oromukosal verfügbarem Speichel lösen muss. Eine Vielzahl an

flüssigen, halbfesten und festen Arzneiformen zur oromukosalen Anwendung ist verfügbar und in der Literatur beschrieben [27]. Flüssige und halb feste Zubereitungen verbleiben nur für kurze Zeit am Applikationsort und setzen den Arzneistoff zudem in alle Richtung der Mundhöhle frei, was zu einem hohen Verlust an Wirkstoff und demnach zu einer reduzierten BV führen kann. Feste Arzneiformen, wie beispielsweise Tabletten, können je nach Zubereitung mukoadhäsive Eigenschaften und je nach Technologie ein unidirektionales Freisetzungverhalten zeigen. Allerdings liegt der Wirkstoff hier in den meisten Fällen nicht molekulardispers verteilt vor. Als besonders vielversprechende Arzneiform, die alle zuvor genannten Anforderungen an oromukosale Arzneizubereitungen erfüllt, gilt eine mukoadhäsive, filmförmige Zubereitung. In den meisten Fällen, je nach Stoffeigenschaften und Arzneistoffbeladung der Filme, liegt der Wirkstoff im Film molekulardispers verteilt vor. Außerdem bietet das flexible Produktdesign von Mehrschichtfilmen viele Möglichkeiten einer maßgeschneiderten Wirkstoffliberation, um den zuvor beschriebenen Anforderungen gerecht zu werden.

Neben Tabletten [28-31] und halbfesten Zubereitungen [32, 33] wurden auch bereits wenige Daten zu filmförmigen Zubereitungen für die oromukosale Peptidapplikation veröffentlicht. Tabelle 1.1 beinhaltet eine Übersicht zu filmförmige Zubereitungen mit Peptiden, die in der Literatur beschrieben wurden.

Tabelle 1.1: Literaturübersicht zu filmförmigen Zubereitungen mit Peptiden

Filmtyp	Peptid/Protein	Literatur
Einschichtfilm	Protirelin	[34]
	Insulin	[35, 36]
	Lysozym	[37]
Zweischichtfilm	Protirelin	[38]
	Calcitonin & Plasmid DNA	[39, 40]
	Serumalbumin*	[41]
Vierschichtfilm	Protirelin & Oxytocin	[42, 43]
	Insulin*	[44]

*Herstellungsprozess beruht hauptsächlich auf der Gefriertrocknung

Die Forschung auf dem Gebiet der filmförmigen Zubereitungen zur oromukosalen Anwendung von Peptiden beschränkt sich auf wenige Peptidmoleküle, von denen auch nur Protirelin, Insulin, Oxytocin und Calcitonin pharmakologisch verwendet werden. Demnach war Gegenstand dieser Arbeit, Moleküle mit Peptidstruktur in filmförmige Zubereitungen einzuarbeiten und hinsichtlich Peptidstabilität und anderen Produkteigenschaften zu charakterisieren. Hierzu sollten sowohl zwei

pharmakologisch inaktive Modellpeptide als auch ein pharmakologisch aktives Peptidhormon, das hauptsächlich in der Pädiatrie Verwendung findet, eingesetzt werden.

Modellpeptide

Im Rahmen der Formulierungsentwicklung von Arzneiformen können peptidische Stoffe aufgrund ihrer Hydrolyseempfindlichkeit zu Problemen führen. Demnach nimmt die Stabilität des Wirkstoffs während des Herstellungsprozesses und bei Lagerung des hergestellten Produkts einen wichtigen Stellenwert ein. Auf Grund der eingeschränkten Datenlage in dem Bereich der orotransmukosalen Peptidapplikation mittels filmförmiger Zubereitungen wurden innerhalb dieser Arbeit zunächst zwei Modelltripeptide verwendet. Eine Beschreibung der verwendeten Peptide findet in Abschnitt 3.1.1 statt. Dieses Vorgehen sollte dazu dienen, den Herstellungsprozess und damit verbundene kritische Prozess- und Produktattribute hinsichtlich Produktqualität und vor allem Peptidstabilität kennen zu lernen und möglichst für weitere Versuche an pharmakologisch aktiven Peptiden zu definieren.

Desmopressinacetat

Desmopressinacetat (Desmopressin) ist ein Nonapeptid und wird zur Therapie des zentralen Diabetes Insipidus und der hormonbedingten Enuresis Nocturna bei Kindern jeder Altersstufe [45, 46], einschließlich Neonaten [47], sowie auch bei Erwachsenen eingesetzt [48]. Eine genaue Beschreibung der Eigenschaften von Desmopressin wird in Abschnitt 3.2.1 vorgenommen. Die Möglichkeit der pädiatrischen Anwendung über einen breiten Altersbereich erfordert eine sichere und kindgerechte Arzneiform in geeigneten Dosisstärken für jede Altersgruppe. So wurde Desmopressin in die „Inventory of paediatric therapeutic needs“ aufgenommen [49]. Diese Liste wird von der „European Medicines Agency“ (EMA) veröffentlicht und wurde zuletzt im August 2015 aktualisiert. Sie beinhaltet Therapiefelder mit dringendem Handlungsbedarf und pädiatrisch verwendete Arzneistoffe, für welche ein Bedarf an Daten zur Wirksamkeit und Unbedenklichkeit sowie an altersgerechten Arzneiformen besteht. Die „Inventory of paediatric needs“ ist in verschiedene Therapiefelder unterteilt. Desmopressin wird als Peptidhormon in der Kategorie Endokrinologie gelistet. Auf Grund der problematischen Peptidstruktur und der geringen Dosierung im Mikrogrammbereich können intra- und interindividuelle Fluktuationen der BV insbesondere bei Kindern zu schwerwiegenden Nebenwirkungen führen, was das Bedürfnis nach einer sicher anzuwendenden und kindgerechten Arzneiform zusätzlich bestärkt.

Innerhalb der vorliegenden Arbeit sollte sich dieser Problem- bzw. Fragestellung angenommen werden. Auf Basis der Vorversuche zu den Modellpeptiden sollten kindgerechte, filmförmige Zubereitungen für das Peptidhormon Desmopressin entwickelt und *in-vitro* bzw. *ex-vivo* analysiert werden.

1.2 Ziele der Arbeit

Die Zielsetzung dieser Arbeit bestand in der Entwicklung und Charakterisierung filmförmiger, oromukosaler Arzneizubereitungen als alternative Applikationsformen für Peptidmoleküle. Pharmakologisch inaktive Modelltripeptide sollten dazu genutzt werden, kritische Produkt- und Prozessattribute hinsichtlich der Stabilität und Qualität zu erkennen und dies im weiteren Verlauf auf das pharmakologisch aktive Peptid Desmopressin zu transferieren.

Ziel war es, eine kindgerechte, filmförmige Zubereitung zur orotransmukosalen Anwendung von Desmopressin zu entwickeln und hinsichtlich der speziellen Anforderungen einer solchen Arzneiform zu charakterisieren. Es sollten mehrschichtige Filmzubereitungen entwickelt werden, die eine unidirektionale, orotransmukosale Permeation ermöglichen. Als wichtiges Qualitätsmerkmal wurde die Lagerstabilität von Desmopressin in den filmförmigen Zubereitungen untersucht. Weiterhin sollten die mechanischen Eigenschaften, die orale Mukoadhäsion, die Desmopressinfreisetzung sowie die orotransmukosale Permeation der entwickelten Filme charakterisiert werden.

Dazu sollten *in-vitro*-Charakterisierungsmethoden zur Bestimmung und Beurteilung des unidirektionalen Freisetzungsverhaltens niedrig dosierter, oromukosaler Mehrschichtfilme sowie der mukoadhäsiven Eigenschaften entwickelt werden. Weiterhin bestand ein wichtiger Teil dieser Arbeit in der Etablierung von Methoden zur Bestimmung der transmukosalen *ex-vivo*-Permeation von oromukosalen Filmen.

2 Allgemeiner Teil

2.1 Einleitung

Im folgenden Kapitel wird die Arzneiform „mukoadhäsiver oromukosaler Film“ vorgestellt, wobei ein besonderes Augenmerk auf die Herstellung, Anforderungen und Charakterisierungsmethoden mehrschichtiger Filme gelegt werden soll. Außerdem wird die oromukosale Route, die sowohl Applikationsort zur lokalen als auch zur systemischen Arzneimitteltherapie darstellen kann, näher beleuchtet und deren Wichtigkeit für die systemische orotransmukosale Applikation bestimmter Arzneistoffgruppen herausgestellt.

2.2 Die Mundhöhle als Applikationsort

Innerhalb der letzten Jahre zeigte sich vor allem im Zuge der wachsenden Anzahl an neu zugelassenen Arzneistoffmolekülen mit hohem MG ein wachsendes Interesse an alternativen Applikationsorten zur lokalen und systemischen Arzneistofftherapie. Die Mundhöhle als Applikationsort weist gegenüber der traditionellen oralen Route zahlreiche Vorteile auf. In anatomischer und physiologischer Hinsicht bietet die Mundhöhle auf Grund der guten Versorgung durch vaskuläre und lymphatische Gefäßsysteme optimale Bedingungen für die Applikation und Resorption von Arzneistoffen. Des Weiteren ist die orale Mukosa durch eine schnelle Erholung nach Stresseinflüssen gekennzeichnet, wodurch sie toleranter gegenüber potentiellen Allergenen ist [12]. Durch die orotransmukosale Absorption wird der Arzneistoff über die Jugularvene und in zweiter Instanz über die obere Hohlvene vom Körper aufgenommen, wodurch der GIT und demnach auch der intestinale und hepatische First-Pass-Metabolismus umgangen werden [9]. Dieser Absorptionsweg kann vor allem für Arzneistoffe mit geringer oraler BV eine wichtige Rolle spielen. Auf Grund der guten Erreichbarkeit der Mundhöhle stößt die oromukosale Applikation auf breite Akzeptanz seitens der Patienten, was zur Erhöhung der Compliance und somit auch der Therapieadhärenz führen kann [11, 50].

Man unterscheidet innerhalb der Mundhöhle im Wesentlichen zwischen der bukkalen (Wangentasche), sublingualen (Unterseite der Zunge), palatalen (Gaumen) und gingivalen (Zahnfleisch) Applikation (vgl. Abbildung 2.1), wobei der bukkale und der sublinguale Applikationsweg am häufigsten beschrieben wird. Dies liegt vornehmlich an der Beschaffenheit und Zusammensetzung der Mukosa. Im Gegensatz zur palatalen und gingivalen Region ist die bukkale und sublinguale Schleimhaut nicht keratinisiert, flexibler und leichter permeabel [50, 51]. Die

Permeabilität der oralen Mundschleimhaut nimmt in der Reihenfolge palatal/gingival – bukkal – sublingual zu [52, 53].

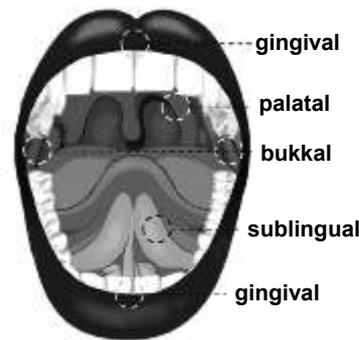


Abbildung 2.1: Applikationsorte innerhalb der Mundhöhle; modifiziert nach Borges et al. [54]

Aber auch die sublinguale und die bukkale Mukosa weisen Unterschiede hinsichtlich der Permeabilität auf. Tabelle 2.1 fasst die wichtigsten Unterschiede zwischen bukkaler und sublingualer Mukosa zusammen. Im Allgemeinen ist die Sublingualschleimhaut permeabler als die Wangenschleimhaut, weshalb sich die sublinguale Mukosa vornehmlich zur systemischen und die bukkale Schleimhaut gleichermaßen zur lokalen und systemischen Anwendung eignen.

Tabelle 2.1: Vergleich von bukkaler und sublingualer Mukosa [55]

	Bukkal	Sublingual
Eigenschaften	500-800 μm Dicke	100-200 μm Dicke
	40-50 Zellschichten	8-12 Zellschichten
	Moderate Gefäßversorgung	Starke Gefäßversorgung
Fläche	Erwachsene: 50 cm^2	Erwachsene: 27 cm^2
	Kinder (5 Jahre): 30 cm^2	Kinder (5 Jahre): 16 cm^2
Anwendung	Systemisch und lokal	Systemisch

In physiologischer Hinsicht spielen weitere Parameter eine Rolle für die oromukosale Permeabilität. Die epithelialen Zellen der oralen Mukosa sind mit einer 40 – 300 μm dünnen Schicht Mukus beschichtet [56], der hauptsächlich aus Wasser und negativ geladenen, hochmolekularen Glycoproteinen, die auch als Mucin bezeichnet werden, besteht [57]. Bei physiologischem pH-Wert in der Mundhöhle kann der Mukus eine gelartige Schicht ausbilden, die zum einen als Barriere für die orotransmukosale Permeation fungiert, aber zum anderen eine essentielle Funktion in der Ausbildung von mukoadhäsiven Bindungen einnimmt [58]. Neben dem Mukusfilm nimmt auch die Speichelzusammensetzung bzw. der Speichelfluss einen Einfluss auf die Permeabilität in der Mundhöhle. Die Flussrate des Speichels beträgt je nach

Zustand (z.B. Nahrungsaufnahme – oder krankheitsbedingt) etwa 0,2-0,8 ml/min [59, 60]. Durch den Speichelfluss kann ein Abschlucken von Wirkstoff- oder Arzneiformanteilen induziert werden, wodurch es zu einer starken Reduktion der BV kommen kann. Diesen Effekt nennt man auch „Speichelauswascheffekt“. Trotz der vorteilhaften enzymatischen Bedingungen der Mundhöhle im Vergleich zum GIT enthält der Speichel digestive, proteolytische Enzyme, die die Stabilität des Wirkstoffes negativ beeinflussen können [61], was wiederum eine verringerte BV zur Folge haben kann. Andererseits ist der Speichel wichtig für die Resorption von Stoffen, da so eine wässrige Umgebung geschaffen wird, die eine Freisetzung aus der Arzneiform erst ermöglicht [55].

2.3 Filmförmige Zubereitungen zur oromukosalen Anwendung

2.3.1 Definitionen

Eine Vielzahl an Arzneiformen zur oromukosalen Anwendung ist kommerziell erhältlich oder in der Literatur beschrieben. Dazu gehören sowohl flüssige und halbfeste Arzneiformen wie Lösungen, Suspension, Gele, Salben oder Cremes zur Anwendung in der Mundhöhle als auch verschiedene feste Arzneiformen wie Lutschtabletten, Granulate, orodispersible Tabletten oder Filme sowie mukoadhäsive Arzneiformen, wozu auch die mukoadhäsiven, oromukosalen Filme gehören [27]. Hinsichtlich der Compliance ist anzumerken, dass filmförmige Zubereitungen zur oromukosalen Anwendung auf Grund des verbesserten Mundgefühls durch die erhöhte Flexibilität gegenüber mukoadhäsiven Tabletten bevorzugt werden, was somit einen wichtigen Aspekt hinsichtlich der Therapietreue des Patienten darstellt [62, 63].

Im Allgemeinen gehören filmförmige Zubereitungen zur oromukosalen Anwendung zur Monographie „Zubereitungen zur Anwendung in der Mundhöhle“ des europäischen Arzneibuchs (Ph. Eur. 8.7). Dazu gehören laut Ph. Eur. die „Schmelzfilme“ (engl. „orodispersible films“), welche ein- oder mehrschichtig aufgebaut sein können und sich im Mund schnell verteilen sollen. Da der Verteilungsprozess im Mund nicht auf einem Schmelz-, sondern auf einem Lösungs- oder Zerfallsprozess beruht, ist der Begriff „Schmelzfilm“ in physikalischer Hinsicht irreführend und wird im Folgenden durch den Begriff „orodispersibel“ ersetzt. Das Ph. Eur. unterscheidet weiterhin in „Bukkalfime“, welche der Untermonographie „Mukoadhäsive Arzneiformen“ zugeordnet sind. Bukkalfilme können ebenfalls ein- oder mehrschichtig sein und sollen bei Kontakt mit Speichel ein Gel ausbilden, um an der bukkalen Schleimhaut anzuhaften. Eine optionale Auflösung des Films kann nach Ph. Eur. gegeben sein. Auf Grund der Terminologie ist der Applikationsort auf

die bukkale Schleimhaut beschränkt und würde demnach eine sublinguale und palatale Anwendung ausschließen. Aus diesem Grund wird im Folgenden der Begriff „Bukkalfilm“ durch den allgemeinen Begriff „oromukosaler Film“ ersetzt. Im Zuge der diskutierten Begriffsproblematik haben Preis et al. eine detailliertere Klassifizierung verschiedener Filmtypen unter Berücksichtigung der Verweilzeit im Mundraum vorgeschlagen [64].

Filmförmige Zubereitungen bestehen hauptsächlich aus einem oder mehreren, meist hydrophilen, filmbildenden Polymeren. Weiterhin können zusätzliche Hilfsstoffe wie Weichmacher, Verdickungsmittel, Geschmackskorrigenzien, Füllstoffe, Farbstoffe, Kosolvenzien, pH-Wert- und Mukoadhäsion-modifizierende Agenzien oder auch Permeationsverbesserer enthalten sein [65]. Hoffmann et al. veröffentlichten 2011 eine detaillierte Übersicht über Polymere und deren Eigenschaften in der Filmherstellung [65]. Als filmbildende Polymere finden meist Cellulosederivate, wie Hypromellose [66], Hyprollose [67], Hyetellose [38], Carmellose [68] oder Ethylcellulose [69] Verwendung. Außerdem wurden auch häufig Alginat [70], Pullulan [71], Polyacrylsäuren [72], Gelatine [73], Povidon [74], Polyvinylalkohole und verschiedene Chitosanderivate [75, 76] als Polymere beschrieben. Je nach angestrebter Funktion der Filme bzw. der Filmschichten können Polymere mit unterschiedlichen chemischen Zusammensetzungen oder MGs, pH-Wert-abhängiger oder -unabhängiger Wasserlöslichkeiten oder auch unterschiedlicher Permeabilitäten eingesetzt werden.

Die Definitionen nach Ph. Eur. besagen, dass sowohl orodispersible (Schmelzfilme) als auch oromukosale Filme (Bukkalfilme) aus einer oder mehreren Filmschichten aufgebaut sein können.

2.3.2 Einschichtfilme

Die in der Literatur beschriebenen Einschichtfilme können im Allgemeinen in zwei große Gruppen unterteilt werden. Diese bestehen aus den orodispersiblen, schnell oder verlängert freisetzenden Einschichtfilmen und den mukoadhäsiven schnell oder verlängert freisetzenden Einschichtfilmen.

Auf Grund des angestrebten schnellen Zerfalls der orodispersiblen Filme bestehen diese meist aus nur einer hydrophilen Polymerfilmschicht, aus der der Arzneistoff schnell freigesetzt werden soll. In den meisten Fällen wird der Hauptteil des Arzneistoffs abgeschluckt und nur ein geringerer Anteil über die orale Mundschleimhaut resorbiert. Hierbei stehen vor allem die auf den schnellen Zerfall zurückzuführende Erleichterung des Schluckvorgangs oder auch der diskreten Einnahme ohne Flüssigkeit im Vordergrund, um die Compliance seitens der pädiatrischen und geriatrischen Patientengruppen zu erhöhen [77, 78]. Andererseits wurden auch schnell zerfallende, orodispersible Filme mit verlängerter Freisetzung

beschrieben, welche ebenfalls nur aus einer Filmschicht bestehen [79]. Die genannten orodispersiblen Filme gehören zwar nach Ph. Eur. den „Arzneiformen zur Anwendung in der Mundhöhle“ an, allerdings steht hier die Mundhöhle nicht als Ort der Wirkung bzw. Arzneistoffabsorption im Vordergrund, sondern dient überwiegend als Ort der Applikation, da der Hauptteil des Wirkstoffs weiterhin über den GIT aufgenommen wird. Im Fall der mukoadhäsiven Einschichtfilme mit schneller [80, 81] oder verlängerter Freisetzung [82, 83] soll durch Erhöhung der Kontaktzeit zwischen Arzneiform und oraler Schleimhaut eine Absorption des Arzneistoffs durch die Schleimhaut ermöglicht werden. Ein schneller Zerfall ist hier nicht gewünscht, wobei das Freisetzungsprofil an die Eigenschaften des verwendeten Wirkstoffs angepasst wird. Eine gesteuerte Freisetzung in Richtung Mundhöhle, z.B. bei lokalen Erkrankungen im Mund-Rachenraum oder in Richtung Mukosa, z.B. bei lokalen Schleimhautläsionen sowie zur systemischen, orotransmukosalen Arzneistoffapplikation ist mit einem einschichtigen mukoadhäsiven Film ohne weitere Barrierefunktionen allerdings nur bedingt möglich.

2.3.3 Mehrschichtfilme

Im Zusammenhang mit der oromukosalen Applikation stellen mehrschichtige, filmförmige Zubereitungen auf Grund ihres flexiblen, schichtenförmigen Aufbaus eine besonders vielversprechende Arzneiform für die maßgeschneiderte Arzneistoffliberation dar. In der Literatur sind, neben wenigen orodispersiblen Mehrschichtfilmen, verschiedene mukoadhäsive Mehrschichtfilmtypen beschrieben, welche in drei Klassen eingeteilt werden [56]. Dieses Klassifizierungssystem basiert auf der Zusammensetzung und den Freisetzungs- bzw. Löslichkeitseigenschaften der Filmschichten und erlaubt Aussagen über die Richtung der Arzneistofffreisetzung:

1. Der erste Mehrschichtfilmtyp besteht aus einer löslichen Arzneistoffmatrix, die von einer mukoadhäsiven Filmschicht als Kontaktfläche zwischen Mukosa und Arzneiform überzogen wurde. Der Arzneistoff wird hier, ähnlich wie bei herkömmlichen festen oralen Arzneiformen wie z.B. Lutschtabletten aus der Matrix in die gesamte Mundhöhle freigegeben. Demnach eignet sich dieser Mehrschichtfilmtyp für die lokale Therapie des Mund-Rachenbereichs, wie es beispielsweise bei oralen Kandidosen üblich sein kann [84].
2. Im Falle des zweiten Mehrschichtfilmtyps wird eine wasserunlösliche Filmschicht, auch Abdeckschicht genannt, verwendet, um die Arzneistoffschicht gegenüber der Mundhöhle abzuschirmen und eine unidirektionale Arzneistofffreisetzung in Richtung der angestrebten Applikationsoberfläche an der oralen Mukosa zu gewährleisten. Nach der Anwendung verbleibt die unlösliche Abdeckschicht in der Mundhöhle und kann entweder vom Patienten entnommen oder abgeschluckt werden. Hierbei ist sowohl eine lokale Anwendung an der Mundschleimhaut, beispielsweise

bei Läsionen zur Wundheilung oder lokalen Therapie eines oralen Karzinoms [85], als auch eine systemische Anwendung durch transmukosale Permeation des Wirkstoffs möglich [86].

- Die Eigenschaften und Anwendungsgebiete des dritten Mehrschichtfilmtyps sind mit denen des zuvor beschriebenen Typs vergleichbar. Der einzige Unterschied besteht darin, dass eine lösliche Abdeckschicht verwendet wird, welche nach der Anwendung nicht mehr entfernt werden muss [70, 87]. Auf Grund der löslichen Abdeckschicht ist die Dauer der Anwendung allerdings vergleichsweise kürzer und die Freisetzung nur anfangs unidirektional.

Durch die beschriebene flexible Technologie der Mehrschichtfilme kann im Vergleich zu Einschichtfilmen eine maßgeschneiderte und auf die Anwendungsfläche beschränkte Arzneistofffreisetzung ermöglicht werden, um den Anforderungen einer geeigneten lokalen oder systemischen, d.h. orotransmukosalen, Arzneimitteltherapie zu entsprechen.

Lokale Anwendung

Erkrankungen im Mund-Rachenraum benötigen oft eine sichere, präzise und lokal begrenzte Behandlung ohne unerwünschte Effekte, die durch systemische Wirksamkeit durch Abschluck- oder Speichelauswaschprozesse ausgelöst werden. In diesem Zusammenhang wurden Mehrschichtfilme als besonders vielversprechende Arzneiformen beschrieben. Vor allem für die Indikationsgebiete Oralkarzinome [68, 85], oropharyngeale Infektionen [84, 88, 89], Entzündungen sowie zur Anästhesie [87, 90, 91] wurden die Vorteile der Mehrschichtfilme zur lokalen Therapie erkannt. Abbildung 2.2 zeigt eine Übersicht über die Verteilung der Indikationsgebiete zur lokalen oder systemischen Therapie. Die Behandlung lokaler oropharyngealer Infektionen nimmt dabei den größten Stellenwert ein (Abbildung 2.2 A).

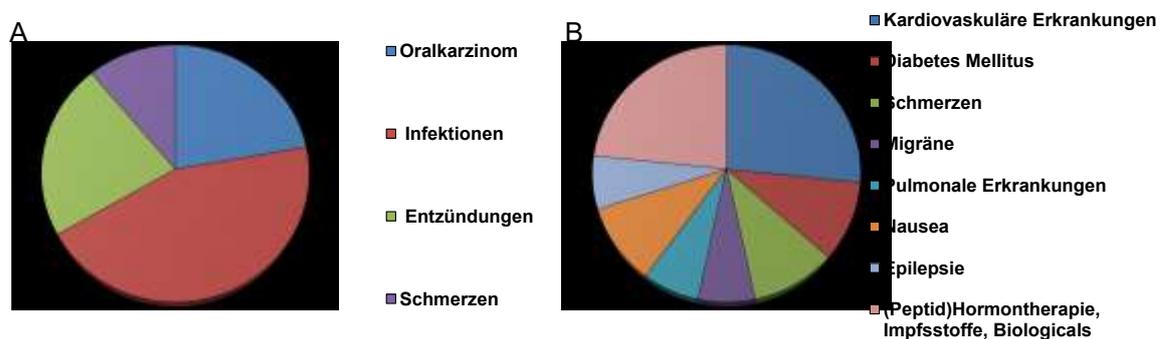


Abbildung 2.2: Literaturübersicht zu Mehrschichtfilmen in der lokalen (A) und systemischen (B) Therapie verschiedener Indikationsgebiete

Fast alle der in diesem Zusammenhang beschriebenen Filmzubereitungen sind aus einer mukoadhäsiven Wirkstoffschicht und einer protektiven Abdeckschicht aufgebaut. Desai et al. entwickelten beispielsweise einen Dreischichtfilm für den Arzneistoff Fenretinid, welcher unter anderem in der Therapie von Oralkarzinomen

verwendet wird und durch eine niedrige BV bei gleichzeitig hoher Toxizität gekennzeichnet ist [85]. Um eine sichere und auf die Applikationsfläche begrenzte Arzneistofftherapie zu gewährleisten, wurde eine kommerziell erhältliche wasserunlösliche Folie (Tegaderm™) als Abdeckschicht verwendet. Zusätzlich wurde die Wirkstoffschicht durch eine ringförmige mukoadhäsive Schicht umrandet und somit von umgebendem gesundem Gewebe abgeschirmt.

Systemische orotransmukosale Anwendung

Eine ideale oromukosale Arzneiform zur systemischen, transmukosalen Arzneistoffapplikation sollte folgende Qualitätsattribute aufweisen [26].

- Die Arzneiform sollte für eine geeignete Zeit an der Applikationsstelle verbleiben.
- Die Arzneiform soll durch unidirektionale Arzneistofffreisetzung eine gastrointestinale Absorption vermeiden.
- Die Arzneiform soll den Arzneistoff über eine angemessene Zeit freisetzen.

In diesem Zusammenhang wurden für eine Vielzahl an Arzneistoffen, die in verschiedenen Indikationsgebieten Verwendung finden, Mehrschichtfilme entwickelt (vgl. Abbildung 2.2 B). Arzneistoffe für die Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen aus der Gruppe der Betablocker [69, 86, 92], Calciumantagonisten [69, 93, 94], Nitrate [95] oder auch Statine [96] können auf Grund des hohen und zudem stark ausgeprägten First-Pass-Metabolismus von einer orotransmukosalen Applikation profitieren. Mukoadhäsive Mehrschichtfilme, die eine verlängerte Verweilzeit an der oralen Mukosa sowie eine unidirektionale Freisetzung in Richtung Mukosa ermöglichen, werden dazu an vielen Stellen in der Literatur als vorteilhaft bewertet. Zur Therapie von Durchbruchschmerzen (Breakyl®, Onsolis®) und zur basalen Schmerztherapie (Belbuca™) sowie zur Behandlung der Opioid-Abhängigkeit (Bunavail®) sind bereits Zweischichtfilme mit Fentanylcitrat und Buprenorphinhydrochlorid auf dem europäischen und amerikanischen Markt erhältlich. Die hier verwendete BEMA-Technologie (BioErodibleMucoAdhesive, BioDelivery Sciences International) beruht auf einem Zweischichtsystem bestehend aus einer mukoadhäsiven Wirkstoffschicht und einer löslichen Abdeckschicht [97].

Weiterhin werden in der Literatur verschiedene Mehrschichtfilme für Arzneistoffe beschrieben, die zur Therapie von Diabetes Mellitus [44, 98-100], Schmerzen [101], Migräne [73, 102], pulmonalen Erkrankungen [103, 104], Nausea [75, 105, 106], Epilepsie [72, 107] sowie in der Therapie von Hormonerkrankungen oder zur Immunisierung [38-40, 42-44, 100, 108, 109] eingesetzt werden. Vor allem die letzten beiden Indikationsgebiete spielen in der orotransmukosalen Applikation eine besondere Rolle, da der Großteil der in diesem Bereich eingesetzten Arzneistoffe eine Peptid- oder Proteinstruktur aufweist. Um die damit verbundene Sensitivität gegenüber proteolytischen Enzymen und starken Schwankungen der

Umgebungsbedingungen wie z.B. pH-Wert oder Elektrolytkonzentration zu umgehen, wurden für die Peptidhormone Protirelin [38, 42], Oxytocin [43, 108] und Calcitonin [39] mehrschichtige, filmförmige Zubereitungen entwickelt und *in-vivo* im Tier hinsichtlich pharmakokinetischer Parameter untersucht. In allen Fällen konnten hohe Plasmaspiegel innerhalb der therapeutischen Fenster erreicht werden.

2.4 Herstellung filmförmiger Zubereitungen

2.4.1 Gießverfahren

Filmförmige Zubereitungen können mittels verschiedener Methoden hergestellt werden. Das Gießverfahren ist das am häufigsten verwendete Verfahren zur Herstellung von filmförmigen Arzneiformen. Bei dieser Methode wird der Arzneistoff in einem geeigneten Lösungsmittel (LM) gelöst oder suspendiert, ggf. mit Weichmachern versetzt, um nach Zugabe eines oder mehrerer filmbildender Polymere eine viskose Polymerdispersion zu erhalten. Diese kann anschließend auf einer glatten Oberfläche mit Hilfe einer Rakel ausgezogen (Solvent-Casting Methode) [110, 111] oder in Glasschalen [73, 81] bzw. Teflon-beschichteten Schalen ausgegossen werden [68, 112]. Im Labormaßstab erfolgt die Trocknung des Polymerfilms meist bei Raumtemperatur [77, 113], wohingegen im Produktionsmaßstab Trocknungstunnel zur kontrollierten und beschleunigten Trocknung Verwendung finden [65].

2.4.2 Schmelzextrusion

Die Schmelzextrusion stellt einen lösungsmittelfreien Prozess zur Herstellung von Filmen dar. Dazu werden Wirkstoff und Hilfsstoffe gemischt, geschmolzen bzw. über den Glasübergang erhitzt und anschließend durch eine Schlitzdüse zu einem laminaren Extrudat gepresst und abgekühlt [82, 114]. Filme, die durch Schmelzextrusion hergestellt wurden, weisen auf Grund fehlender Lösungsmittel- und Verdampfung eine höhere Dichte auf und eignen sich somit besonders für eine verlängerte Arzneistofffreisetzung oder die Herstellung impermeabler Abdeckschichten für eine unidirektionale Wirkstofffreisetzung. Weiterhin kann diese Herstellungsmethode zur Löslichkeitsverbesserung schwer löslicher Arzneistoffe genutzt werden, um die Arzneistoffbeladung zu erhöhen.

2.4.3 Weitere Herstellungsverfahren

Zu den alternativen, seltener verwendeten Herstellungsverfahren filmförmiger Zubereitungen gehört das Rollen [115] oder Versprühen [116] von Lösungen oder Suspensionen geeigneter Viskosität auf eine plane Oberfläche oder andere

Trägermaterialien mit anschließendem Trocknungsschritt. Auch die Gefriertrocknung zur Herstellung von porösen Filmen oder Filmschichten wurde bereits beschrieben, da diese Methode als ein besonders schonendes Trocknungsverfahren für sensible Moleküle, wie beispielsweise Peptide oder Proteine gilt [41, 99, 100]. In wenigen Fällen wurden Ein- oder Mehrschichtfilme durch Kompression der Hilfsstoffe hergestellt [72]. Durch den Einsatz der Elektrosponning-Technologie wurde versucht, die Arzneistoffbeladung schlecht löslicher Arzneistoffe zu erhöhen [84, 117]. Das Bedrucken von arzneistofffreien Basisfilmen mit arzneistoffhaltigen Drucktinten stellt eine weitere, vielversprechende Herstellungs- bzw. Beladungsmethode von oromukosalen Filmen dar [66]. Als Drucktechniken kommen vor allem Flexographie-Druck und Ink-Jet-Druck zur Anwendung [118]. Neben der Möglichkeit der patientenindividuellen Dosierung kann diese Herstellungstechnologie vor allem hinsichtlich der Formulierungsentwicklung im Zusammenhang mit neuen Arzneistoffen zur lokalen oder systemischen oromukosalen Anwendung viele Vorteile bieten. Ist eine Standardfilmezubereitung gefunden, welche einschichtig als orodispersibler Film oder auch mehrschichtig als mukoadhäsiver Film zur transmukosalen Arzneistoffapplikation aufgebaut sein könnten, wäre lediglich eine Optimierung der arzneistoffhaltigen Drucktinte und der Druckprozesse notwendig.

2.4.4 Besondere Herstellungsaspekte bei Mehrschichtfilmen

Die unterschiedlichen Schichten der Mehrschichtfilme werden ebenfalls mit den oben dargestellten Methoden hergestellt. Allerdings können hier zwei weitere allgemeine Methoden zur Zusammenführung der einzelnen Schichten unterschieden werden. Die beiden Varianten werden in diesem Kapitel auf Grund des Prozessablaufs als „sequentielle Methode“- und „additive Methode“ bezeichnet.

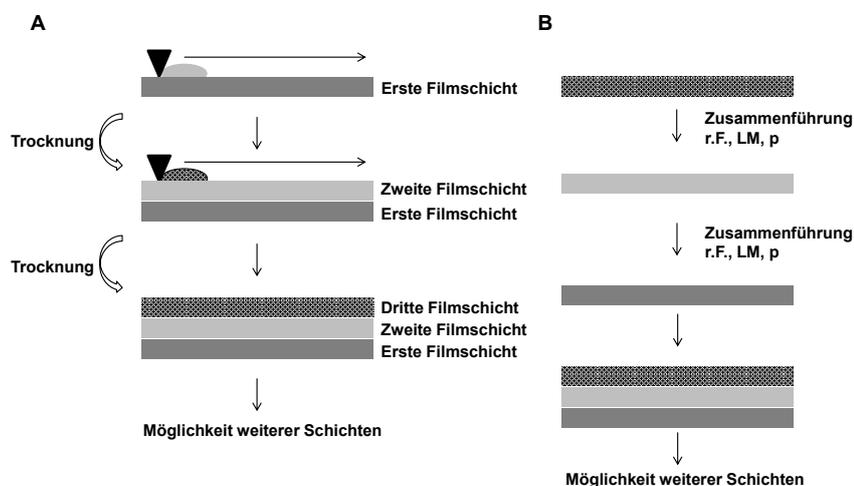


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der Herstellung eines Dreischichtfilms unter Verwendung der „sequentiellen Methode“ am Beispiel der „Double casting“ Methode (A) und „additiven Methode“ (B); r.F. (relative Feuchte); LM (Lösungsmittel); p (Druck)

Abbildung 2.3 zeigt eine schematische Darstellung der beiden Methoden. Bei der „**sequentiellen Methode**“ werden die einzelnen Filmschichten nacheinander oder direkt übereinander in einem Prozess hergestellt. Ein zusätzlicher Assemblierungsschritt wird demnach nicht benötigt. Diese Methode ist am weitesten verbreitet und unter dem Namen „Double casting-Methode“ bekannt [119]. Diese Methodenbezeichnung bezieht allerdings streng genommen nur die Mehrschichtfilme ein, die mittels Gießverfahren hergestellt wurden. Unter Verwendung dieser Methode wird zunächst die erste Filmschicht ausgezogen oder ausgegossen und nach einer geeigneten Trocknungsperiode wird die Polymerdispersion für die zweite Filmschicht direkt auf die erste Filmschicht gegeben und getrocknet (vgl. Abbildung 2.3 A). Neben dem Gießverfahren können an dieser Stelle auch weitere, in Abschnitt 2.4 beschriebene Herstellungsverfahren angewendet werden [69, 99, 116]. Unter Verwendung der „sequentiellen Methode“ können formulierungsbezogene Parameter wie die Eignung der Polymere und Lösungsmittel, aber auch prozessbezogene Parameter wie Trocknungszeit und -temperatur eine wichtige Rolle spielen, um homogene Mehrschichtfilme mit getrennt voneinander vorliegenden Filmschichten zu gewährleisten. Hinsichtlich des Gieß- bzw. Ausziehverfahrens mittels Rakel wurde außerdem die Viskosität der Polymerdispersion als kritisches Produktattribut bewertet und sollte innerhalb der Formulierungs- und Prozessentwicklung untersucht werden [120]. Scherkräfte während des Ausziehvorgangs können das Spreitverhalten der Polymerdispersion auf der Filmschicht beeinflussen und somit eine wichtige Rolle innerhalb des Ausziehprozesses spielen.

Hinsichtlich des Scaling-ups bietet die „sequentielle Methode“ gegenüber der „additiven Methode“ den Vorteil, dass der Prozess einfacher auf Großchargen im Industriemaßstab zu adaptieren ist. Die Mutterrolle, bestehend aus der ersten Filmschicht und der Intermediärfolie, kann am Ende des Herstellungsvorgangs der ersten Filmschicht wieder aufgerollt werden und steht somit als Ausgangsfolie für den Herstellungsschritt der zweiten Filmschicht zur Verfügung.

Bei der „**additiven Methode**“ werden die einzelnen Filmschichten separat in zwei oder mehreren, getrennt voneinander ablaufenden Teilprozessen hergestellt und innerhalb eines anschließenden Prozesses vereinigt (vgl. Abbildung 2.3 B). Die Zusammenführung der zuvor hergestellten Filme kann unter Verwendung von Druck und/oder eines geeigneten Lösungsmittels oder Adhäsivmaterialien zwischen den Filmschichten erfolgen [119]. Außerdem wurde in diesem Zusammenhang eine Methode beschrieben, bei der die Filme aufeinander gelegt und anschließend feuchter Luft ausgesetzt wurden, um das Zusammenkleben der Schichten zu erzielen [91]. Die bisher beschriebenen Methoden zur Zusammenführung der Filmschichten beruhen demnach größtenteils auf einem Anlösen der Filmschichten unter Verwendung eines Lösungsmittels, welches im einfachsten Fall Wasser aus der Umgebungsluft sein kann.

Der Vorteil der „additiven Methode“ liegt in dem flexiblen Produktdesign durch Verwendung von Filmschichten unterschiedlicher Größen und Formen, um eine für die jeweiligen Ansprüche maßgeschneiderte Arzneiform zu entwickeln.

2.5 Charakterisierung filmförmiger Zubereitungen zur oromukosalen Anwendung

2.5.1 Allgemeines

Die Monographie „Zubereitungen zur Anwendung in der Mundhöhle“ des Ph. Eur. beinhaltet zwar Hinweise auf notwendige Qualitätsattribute hinsichtlich mechanischer Stabilität und Freisetungsverhalten filmförmiger Zubereitungen. Charakterisierungsmethoden oder Spezifikationen werden allerdings nicht beschrieben. Die Literatur bietet dagegen eine Fülle an Charakterisierungsmethoden, welche meist sowohl für ein- oder mehrschichtige als auch für orodispersible oder oromukosale Filme angewendet werden können. Mehrere kürzlich veröffentlichte Übersichtsartikel haben sich mit der Charakterisierung orodispersibler und bukkaler Einschichtfilme beschäftigt [14, 110, 121, 122]. Im Folgenden wird das Augenmerk allerdings auf die Anforderungen und die daraus resultierenden Charakterisierungsmethoden der oromukosalen Mehrschichtfilme gelegt.

2.5.2 Morphologie- und Festphasencharakterisierung

Zur Charakterisierung der Morphologie der Filme können neben der Bestimmung von Filmmasse und -dicke bildgebende Methoden wie die Rasterelektronenmikroskopie (REM) oder die Polarisationsmikroskopie genutzt werden [123, 124]. Mit diesen Methoden können Aussagen über die Beschaffenheit der Filmoberfläche und das Vorhandensein von Wirkstoffkristallen getroffen werden. Neben der Polarisationsmikroskopie kann außerdem die Röntgendiffraktometrie zur Charakterisierung der Festphaseneigenschaften der Filme genutzt werden [111]. Mittels REM ist es weiterhin möglich, durch Querschnittsanalysen zu untersuchen, ob die Filmschichten getrennt voneinander vorliegen oder ob ein Übergang zwischen den Grenzschichten stattgefunden hat. Dies ist ein besonders wichtiger Aspekt innerhalb der sequentiellen Herstellungstechnologie (vgl. Abschnitt 2.4.4). Wenn es zu Vermischungsprozessen zwischen Wirkstoff- und Abdeckschicht gekommen ist, könnte der Wirkstoff in die unlösliche Abdeckschicht diffundieren, was in veränderten Freisetzungsprofilen und/oder reduzierter BV resultieren kann.

2.5.3 Freisetzung

Oromukosale Mehrschichtfilme sind meist dazu bestimmt, den Arzneistoff kontrolliert in die Zielrichtung freizusetzen. Demnach sollten Freisetzungsmethoden verwendet werden, die eine unidirektionale Wirkstofffreisetzung gewährleisten. Dazu wurden in der Literatur verschiedenen Methoden beschrieben, die auf Grund ihres Aufbaus in zwei Hauptgruppen unterteilt werden können: Ein- und Zwei-Kammer-Freisetzungssysteme. Die Ein-Kammer-Systeme basieren gewöhnlich auf Blattrührerapparaturen ähnlich dem Aufbau mittels Extraktionszelle oder Freisetzungsscheibe [93, 103] sowie Durchflusszellen [98, 125] gemäß Ph. Eur. und USP. Die Filme können, mit ihrer Freisetzungsseite zum Medium gerichtet, entweder direkt auf den Gefäßboden oder an eine Glasplatte angeheftet werden. Sowohl Wirkstofffreisetzung als auch die Probennahme finden demnach in der gleichen Kammer statt. Biorelevante Bedingungen, wie Speichelfluss, niedrige Freisetzungsvolumina oder mechanische Beanspruchung durch Zunge oder Zähne werden hier nicht berücksichtigt, sodass sich diese Methoden eher zur Qualitätskontrolle von Mehrschichtfilmen eignen.

Innerhalb eines Zwei-Kammer-Freisetzungssystems finden Wirkstofffreisetzung und Probennahme in zwei Bereichen statt, die von einer geeigneten Membran getrennt werden. Dazu wurden in der Vergangenheit vertikale oder horizontale Diffusionszellen verwendet, um die Freisetzung aus Mehrschichtfilmen zur lokalen oder systemischen Therapie zu untersuchen [43, 75, 89, 126]. Das verringerte Volumen des Freisetzungsmediums auf der Donorseite wird den biorelevanten Konditionen in der Mundhöhle gerecht. Krampe et al. erweiterten diesen Ansatz durch Entwicklung einer Methode, die zusätzlich den mechanischen Einfluss der Zunge und den Speichelfluss als Stressfaktoren während der Freisetzung berücksichtigt [127].

2.5.4 Permeation

Hinsichtlich einer angestrebten systemischen Wirkstoffapplikation können *ex-vivo*-Permeationsstudien erste Hinweise auf das *in-vivo*-Permeationsvermögen des im Film enthaltenen Arzneistoffs liefern. Meistens werden hierzu Permeationszellen verwendet, in die tierisches Schleimhautgewebe eingespannt wird. Im Allgemeinen kann man zwischen vertikalen (Franz Diffusionszelltyp) und horizontalen (Ussing-Kammer-Typ) Permeationszellen unterscheiden [128]. Ein kürzlich in der Patentliteratur beschriebener vertikaler Permeationszellaufbau ermöglicht auch während des automatischen Probenzugs hoher Volumina permanenten Kontakt zwischen Mukosa und Akzeptormedium [129]. Dadurch wird vermieden, dass die Mukosa durch partielle Austrocknung porös wird, was zu falsch erhöhten Permeabilitätswerten führen kann. Bedingt durch die im Vergleich zu anderen tierischen Schleimhautgeweben hohe Ähnlichkeit zur menschlichen Mukosa, wird

Schweinemukosa am häufigsten in der Forschung verwendet [128, 130, 131]. Neben tierischem Gewebe können auch epitheliale Zellkulturen wie beispielsweise TR 124 Zellkulturen [132] oder kommerziell verfügbare Zellkulturmodelle wie EpiOral™ [133] verwendet werden. Zur Permeationsmessung werden die Filme mit der Wirkstoffschicht oder der mukoadhäsiven Seite auf das Mukosagewebe gelegt, um eine Wirkstofffreigabe aus der Donorkammer durch das Gewebe in die Akzeptorkammer zu erzielen.

2.5.5 Mukoadhäsion und *in-vitro*-Verweilzeit

Oromukosale Filme zur systemischen oder lokalen Wirkung in der Mundhöhle sollen nach der Applikation für einen geeigneten Zeitraum an der Mukosaoberfläche verbleiben. Adäquate Interaktionen zwischen Film und der mucinhaltigen Oberfläche der Mukosa sind demnach unabdingbar. Trotz der Zugehörigkeit zur Monographie „Mukoadhäsive Zubereitungen“ werden vom Ph. Eur. keinerlei Angaben zur Testung dieser Eigenschaft geboten. In der Literatur wurden einige Methoden zur Bestimmung der mukoadhäsiven Eigenschaften veröffentlicht. Ein kürzlich publizierter Übersichtsartikel beinhaltet eine detaillierte Beschreibung und Bewertung der verfügbaren Methoden auf dem Gebiet der Mukoadhäsion [134]. Zu den am meisten verwendeten Geräten gehören der Texture Analyser, die modifizierte Waage und das Tensiometer, welche auf dem gemeinsamen Messprinzip beruhen, dass der Film bzw. die Arzneiform zunächst mit dem Mukosamaterial in Kontakt gebracht wird [135-137]. Anschließend werden die Kraft und die Arbeit gemessen, die benötigt werden, um den Film wieder von der Mukosaoberfläche zu trennen. Oszillationsrheologische Untersuchungen können ebenfalls zur Bestimmung der Mukoadhäsion von Filmen bzw. den darin verarbeiteten Polymeren herangezogen werden [138].

Bei *in-vitro*-Verweilzeitmessungen spielt nicht nur die Stärke der mukoadhäsiven Bindung eine Rolle, sondern auch der Zerfall und die Löslichkeitscharakteristika der Filme. Zur Bestimmung der *in-vitro*-Verweilzeit kann der Film im einfachsten Fall auf einer Glasoberfläche angebracht werden, welche die negativ geladene Oberfläche der Mucinschicht imitieren soll. Anschließend wird die Glasplatte mit dem Film beispielsweise durch Rühren in Wasser oder künstlichem Speichel mechanischer Beanspruchung ausgesetzt und die Zeit bestimmt, bis sich der Film von der Glasplatte gelöst bzw. aufgelöst hat [109, 139]. Kockisch et al. entwickelten ein dynamisches Verweilzeittestsystem mit Speiseröhrenschleimhaut vom Schwein und zusätzlicher Berücksichtigung von Faktoren wie Speichelfluss und Temperatur sowie relativer Feuchte in der Mundhöhle [140].

2.5.6 Mechanische Eigenschaften

Geeignete mechanische Eigenschaften filmförmiger Zubereitungen sind von essentieller Bedeutung für die Produktion und die spätere Anwendung durch den Patienten. Hierzu müssen die Filme eine geeignete Bruchfestigkeit bei gleichzeitig moderater Elastizität und geringer Sprödigkeit aufweisen [141, 142]. Insbesondere Mehrschichtfilme können bedingt durch die vergleichsweise höhere Dicke zu höheren Bruchfestigkeiten führen, was eine Verringerung der Flexibilität bedeuten kann. Verschiedene Methoden zur Bestimmung der mechanischen Eigenschaften sind in der Literatur beschrieben. So kann der Bruch nach Falten der Filme getestet werden, indem die Filme so lange an der gleichen Stelle gefaltet werden, bis sie brechen [103, 143]. Außerdem kann ein Zug-Prüfgerät oder ein Texture Analyser verwendet werden, um die Kraft und die Strecke zu messen, die benötigt wird, um den Film während eines Zugvorgangs an einer definierten Stelle auseinanderzureißen [41, 144, 145]. Zur Messung der Durchstoßkraft wird der Film waagrecht in einen Probenhalter eingespannt und dann werden ebenfalls Kraft und Strecke gemessen, bis der Film durchstoßen wurde [146].

2.5.7 Sonstige Charakterisierungsmethoden

Der Quellungsindex kann als Surrogat für das Freisetzungs- oder Mukoadhäsionsvermögen von Mehrschichtfilmen dienen und wird als Massenzuwachs nach Kontakt mit Wasser oder (künstlichem) Speichel berechnet [105, 147]. Auf Grund des zum Teil langen Kontakts mit der Mundschleimhaut und der Tatsache, dass die meisten hier verwendeten mukoadhäsiven Polymere saure Eigenschaften besitzen, kann der pH-Wert an der Oberfläche des Filmes von Interesse sein [58, 148, 149]. Des Weiteren können wirkstoffhaltige Filme auf Gleichförmigkeit des Gehaltes durch Berechnung des Akzeptanzwerts nach 2.9.40 Ph. Eur. geprüft werden. Auch Stabilitätstests unter verschiedenen Bedingungen wie beispielsweise in humanem Speichel [150], im Primärpackmittel oder bei unterschiedlichen Umgebungs- und Stressbedingungen (Temperatur und Feuchte) können von Interesse sein [151]. Da Mehrschichtfilme zur lokalen und systemischen oromukosalen Therapie meist mindestens aus einer nicht löslichen Abdeckschicht bestehen, spielt die Zerfallszeit eine untergeordnete Rolle. In der Formulierungsentwicklungsphase eines Mehrschichtfilms können allerdings unter anderem Zerfallstests genutzt werden, um beispielsweise Formulierungs- oder Prozessvariablen hinsichtlich der angestrebten Arzneiform zu bewerten.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Modellpeptide

3.1.1 Einleitung

Bisher wurden nur wenige Untersuchungen zu filmförmigen Zubereitungen mit Peptiden veröffentlicht. Es sind kaum Daten vorhanden, die die Anforderungen und Eigenschaften zum erfolgreichen Einarbeiten von Peptidmolekülen in Filmzubereitungen im Detail diskutieren. Zudem sind diese Wirkstoffe auf Grund ihrer aufwendigen Synthese- und Aufreinigungsschritte teuer. Aus diesen Gründen wurden innerhalb der vorliegenden Arbeit Vorversuche mit zwei pharmakologisch inaktiven Modellpeptiden, die vom Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie zur Verfügung gestellt wurden, konzipiert. Hierdurch sollten Rückschlüsse auf kritische Prozess- und Produktattribute sowie eventuelle Anforderungen an das Peptidmolekül selbst abgeleitet werden. Diese Erkenntnisse sollten anschließend zur erfolgreichen Einarbeitung eines pharmakologisch aktiven Peptids in filmförmige Zubereitungen genutzt werden.

Es wurde ein Tripeptid mit der Aminosäuresequenz Alanin-Phenylalanin-Glycin (Ala-Phe-Gly) gewählt, da diese Aminosäuren in Teilsequenzen vieler pharmakologisch aktiver Peptide vorkommen. Dazu wurde im Vorfeld ein Screening der Aminosäuresequenzen von pharmakologisch aktiven Peptiden durchgeführt, um eine möglichst reale Modellverbindung zu finden. Das Tripeptid wurde zum einen als beidseitig geschütztes Molekül (Cbz-MP) mit einer Ethyl- und einer Carbamat-Schutzgruppe verwendet, um möglichst ideale Ausgangsbedingungen hinsichtlich der Stabilität zu schaffen. Zum anderen wurde die Schutzgruppe am N-terminalen Ende entfernt, um das Tripeptid mit freier Aminogruppe zu erhalten (NH₂-MP).

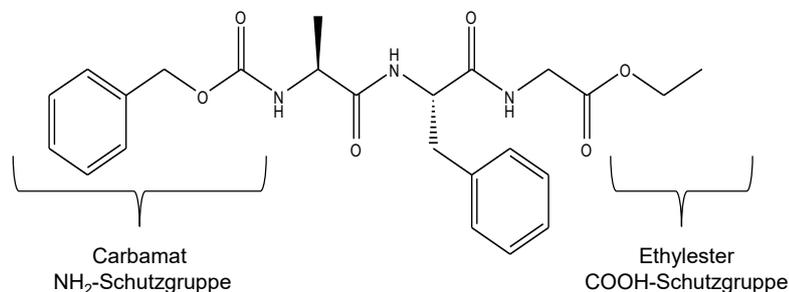


Abbildung 3.1: Strukturformel von Modellpeptid Cbz-MP; Markierung der Schutzgruppen am N-terminalen Ende (Carbamat) und C-terminalen Ende (Ethylester)

Die Strukturformel des beidseitig geschützten Modellpeptids Cbz-MP ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Das N-terminale Ende wurde als Carbamat mit einer

Benzyloxycarbonylgruppe und das C-terminale Ende als Ester mit einer Ethylgruppe geschützt. Es liegt demnach weder eine freie Aminofunktion noch eine freie Carboxylfunktion für weitere Reaktionen vor. Die Strukturformel des einseitig geschützten Modellpeptids NH₂-MP ist in Abbildung 3.2 dargestellt. Die Schutzgruppe am N-terminalen Ende wurde abgespalten, sodass eine freie Aminofunktion entstanden ist.

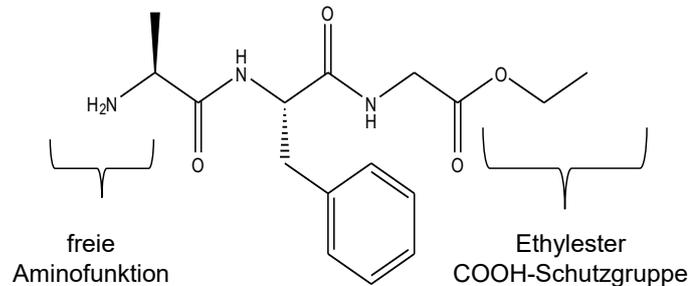


Abbildung 3.2: Strukturformel von Modellpeptid NH₂-MP; Markierung der freien Aminofunktion am N-terminalen Ende und der Schutzgruppe am C-terminalen Ende (Ethylester)

Diese Modellpeptide sollten dazu dienen, pharmakologisch aktive Peptide zu repräsentieren. Demnach wurde ein „best case“ und ein „worst case“ Modellpeptid synthetisiert, in filmförmige Zubereitungen eingearbeitet und analysiert. Der Fokus wurde dabei vor allem auf die Stabilität der Peptide unter verschiedenen Bedingungen (pH-Wert, Lösungsmittel, Temperatur, Polymere und Wassergehalt) gelegt. Da die meisten auf dem Markt befindlichen pharmakologisch aktiven Peptide zu den hoch potenten, niedrig dosierten (Mikrogrammbereich) Arzneistoffen gehören, sollte darüber hinaus die Gleichförmigkeit des Gehalts einzeldosierter Arzneiformen nach Ph. Eur. überprüft werden.

Da die Herstellung oromukosaler Filme mit einem Lösungs- bzw. Dispergierschritt in Wasser enthaltenen Medien einhergeht und zudem ein gewisser Anteil an Restwasser im fertigen Produkt verbleibt, können hydrolytische Reaktionen sowohl während der Herstellung als auch bei der Lagerung begünstigt werden. Daher sind einige Faktoren hinsichtlich der Stabilität der Peptide zu beachten. Der pH-Wert der Polymerlösung sowie der des hergestellten Films während der Lagerung kann einen Einfluss auf die Stabilität des Peptids haben und sollte demnach im Bereich des Stabilitäts-Optimums des jeweiligen Peptids liegen. Durch das hohe MG und der damit oft verbundenen hohen Anzahl an funktionellen Gruppen können Polymer-Peptid-Interaktionen stattfinden, die die Stabilität des Peptides herabsetzen können.

3.1.2 Stresstests

3.1.2.1 Beidseitig geschütztes Modellpeptid (Cbz-MP)

Auf Grund der Tatsache, dass es sich bei den verwendeten Tripeptiden um pharmakologisch inaktive Modellmoleküle handelt, standen keine Daten hinsichtlich Stabilitätsoptima für pH-Wert, Temperatur oder Lösungsmittel zur Verfügung, weshalb entsprechende Stresstests durchgeführt wurden (vgl. Abschnitt 6.2.8.1). Dazu wurden wässrige Lösungen von Cbz-MP und NH₂-MP bei verschiedenen pH-Werten und Temperaturen über 96 h bzw. 72 h gerührt und der zeitabhängige Verlauf der Peptidkonzentration mittels HPLC-Analytik (vgl. Abschnitt 6.2.7.2 und 6.2.7.3) bestimmt.

In Abbildung 3.3 A ist die Konzentration bezogen auf den Sollgehalt an Cbz-MP in wässrigen Medien unterschiedlicher pH-Werte dargestellt. Im sauren Milieu (pH 3-6) blieb Cbz-MP bei Raumbedingungen (25 °C/60 % r.F.) stabil. Es waren nach 3 Tagen keine signifikanten Veränderungen in der Peptidkonzentration zu beobachten. Im alkalischen Milieu (pH 8-10) nahm dagegen die Konzentration über 96 h stetig ab, was sich durch das Auftreten von zusätzlichen Peaks im Chromatogramm bestätigen ließ.

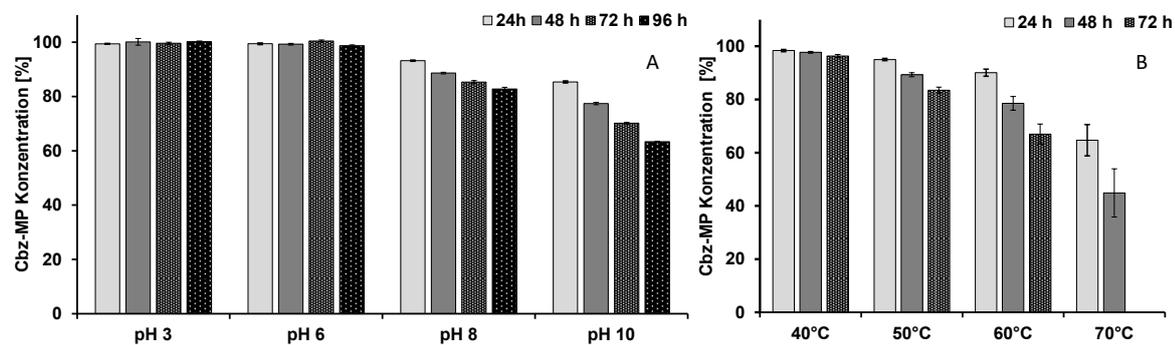


Abbildung 3.3: Konzentrations-Zeitverlauf von Cbz-MP bezogen auf den Sollgehalt unter Stressbedingungen bei verschiedenen pH-Werten bei Raumbedingungen (25 °C/60 % r.F.) (A) und bei erhöhten Temperaturen in Wasser bei pH 7 (B); MW \pm KI ($\alpha=0,05$); n=6

Als ein wichtiger Aspekt während der Trocknung von oromukosalen Filme wurde die Sensitivität gegenüber der Temperatur getestet. Lösungen von Cbz-MP wurden dazu bei 40, 60 und 70 °C für 72 h gelagert (Abbildung 3.3 B). Cbz-MP blieb bei pH 6 über 72 h bei einer Temperatur von 40 °C stabil. Ab einer Temperatur von 50 °C kam es zu einem teils drastischen Abfall der Peptidkonzentration. Bei 70 °C Versuchstemperatur sank die Konzentration nach 72 h unter die Bestimmungsgrenze. Mögliche Ursachen für die Instabilität des Cbz-MPs können in hydrolytischen Abbaureaktionen liegen, welche durch hohe Werte für die Temperatur oder den pH-Wert begünstigt werden. Es ist sowohl eine Esterhydrolyse am N- als auch am C-terminalen Ende denkbar. Der Mechanismus der Zersetzung

lag nicht im Fokus der vorliegenden Arbeit und wurde daher nicht weiter untersucht.

3.1.2.2 Einseitig geschütztes Modellpeptid (NH₂-MP)

Abbildung 3.4 zeigt den Konzentrationszeitverlauf von NH₂-MP in wässrigen Puffermedien verschiedener pH-Werte. Die Konzentration an NH₂-MP wurde auf den Sollgehalt der Lösung bezogen, sodass die teilweise oberhalb 100 % liegenden Initialwerte bei pH 3 mit einem möglichen Analytikfehler erklärt werden könnten.

Ähnlich wie bei dem beidseitig geschützten Modellpeptid Cbz-MP zeigt sich ein Abbau ab einem pH-Wert von 8, wobei dieser im Vergleich zu Cbz-MP noch stärker ausgeprägt ist.

Hinsichtlich des Einflussfaktors Temperatur zeigte sich in wässriger Lösung bereits nach 24 h bei 40 °C ein kompletter Abbau des NH₂-MPs. Dieser vollständige Abbau ist mit den Moleküleigenschaften zu erklären. Auf Grund der freien Aminofunktion (vgl. Abbildung 3.2) liegt der pH-Wert einer wässrigen, nicht gepufferten Lösung der Konzentration 0,3 mg/ml bei 9,2. Die in diesem pH-Wertbereich beobachtete Instabilität kann durch Temperaturerhöhung weiter verstärkt werden und demnach zum kompletten Abbau des Moleküls führen. Folglich kann im Fall des NH₂-MPs im Allgemeinen von einer Instabilität im wässrigen Milieu ausgegangen werden kann.

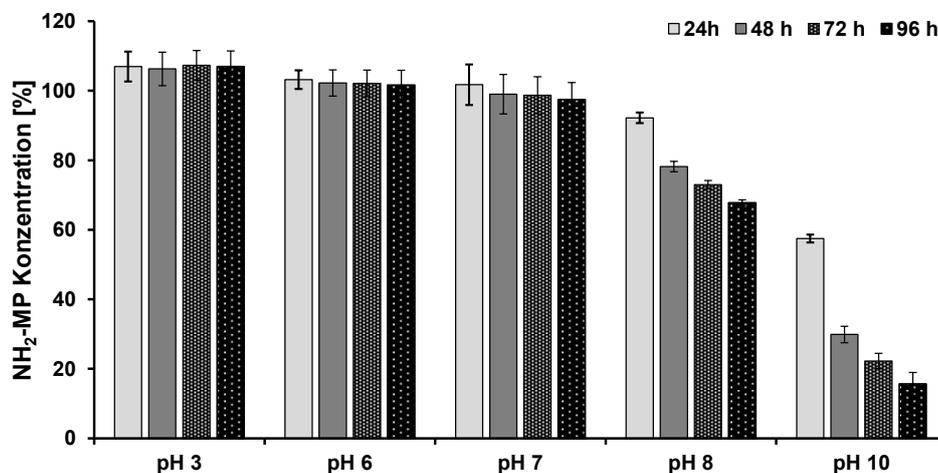


Abbildung 3.4: Konzentrations-Zeitverlauf von NH₂-MP bezogen auf den Sollgehalt unter Stressbedingungen bei verschiedenen pH-Werten bei Raumbedingungen (25 °C/60 % r.F.); MW ± KI ($\alpha=0,05$); n=6

Vorversuche zu den beiden verwendeten Modellpeptiden zeigten eine pH-Wert-abhängige Instabilität beider Moleküle in basischen Medien. Zudem zeigte bereits eine geringe Temperaturerhöhung in beiden Fällen einen mitunter erheblichen Einfluss auf die Stabilität im wässrigen Milieu. Aus diesem Grund wurden zur weiteren Formulierungsentwicklung der oromukosalen Filme stets ein optimaler pH-

Wert-Bereich zwischen 3-7 angestrebt sowie alle Herstellungsschritte der Filme und deren Lagerung bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.1.3 Formulierungsentwicklung

Neben pH-Wert- und Temperaturoptimum sind Informationen zu geeigneten Lösungsmitteln notwendig, um einen adäquaten Herstellungsprozess oromukosaler Filme mit der hier verwendeten Methode zu gewährleisten. Im Zuge der Formulierungsentwicklung wurden daher verschiedenen Lösungsmittel auf deren Eignung zur Filmherstellung getestet. Zusätzlich zu den bereits genannten Stabilitätsaspekten spielt hier auch die Löslichkeit der verwendeten Substanzen eine wichtige Rolle. Dazu wurden die in Tabelle 3.1 aufgeführten Medien visuell auf deren Eignung als Lösungsmittel einer zuvor festgelegten Peptidkonzentration von 3,5 mg/ml sowie hinsichtlich der Peptidstabilität (Rühren über 72 h; HPLC-Untersuchung) bewertet. Außerdem wurden die Medien im Allgemeinen hinsichtlich des möglichen Einsatzes zur Herstellung oromukosaler Filme bewertet (Einordnung nach Ph. Eur. Monographie 5.4 Lösungsmittel-Rückstände [152]). Die Ergebnisse des Lösungsmittelscreenings sind in Tabelle 3.1 dargestellt.

Tabelle 3.1: Eignung verschiedener Lösungsmittel zu Filmherstellung mit Cbz- und NH₂-MP

Lösungsmittel	Cbz- MP	NH ₂ - MP	Eignung zur Filmherstellung	Grenzkonzentration nach Ph. Eur. [152]
Wasser	Nein	Nein	Ja	-
Ethanol	Ja	Ja	(Ja)* LM Klasse 3	5000 ppm
Wasser/Ethanol 30/70 (v/v)	Ja	Ja	(Ja)* LM Klasse 3	5000 ppm (Ethanol)
Acetonitril	Ja	Ja	Nein** LM Klasse 2	410 ppm
Methanol	Ja	Ja	Nein** LM Klasse 2	3000 ppm
Isopropanol	Ja	Ja	(Ja)* LM Klasse 3	5000 ppm
Aceton	Ja	Ja	(Ja)* LM Klasse 3	5000 ppm

*Eingeschränkte Eignung bei Lösungsmittel (LM) der Klasse 3: Restlösemittelanalytik notwendig, falls zu Gebrauch am Menschen bestimmt; Lösungsmittel-Rückstände von höchstens 50 mg pro Tag erlaubt; **Keine Eignung zur Filmherstellung bei LM der Klasse 2: LM, die in der Anwendung zu begrenzen sind [152].

Wasser eignete sich aus den zuvor diskutierten Instabilitätsgründen nicht für NH₂-MP und auf Grund der geringen Löslichkeit von Cbz-MP in Wasser (praktisch unlöslich in Wasser; selbst ermittelte Löslichkeit lag bei 4 mg/l) ebenfalls nicht für

das beidseitig geschützte Modellpeptid. Alle anderen organischen Lösungsmittel eigneten sich zwar als Lösungsmittel für die Modellpeptide, sind aber aus Toxizitätsgründen nicht bzw. nur mit Einschränkungen zur Filmherstellung geeignet. Aus diesen Gründen wurde die Wasser-Ethanol-Mischung 30/70 (v/v) als Dispersionsmittel zur Filmherstellung gewählt. Als filmbildende Polymere wurden die Cellulosederivate HPMC und HPC verwendet, da diese zu den meist verwendeten Polymeren zur Herstellung oraler Filme gehören. HPMCAS, welches üblicherweise als magensaftresistenter Überzug oder Matrixbestandteil von Tabletten Verwendung findet, wurde auf Grund seiner sauren Eigenschaften als weiteres filmbildendes, auf Cellulose basierendes Polymer herangezogen. Des Weiteren wurde Carbomer (Polyacrylsäure, PA) als anionisches und Chitosan (Chito) als kationisches Polymer eingesetzt. Im Hinblick auf die Übertragung dieser Vorversuche auf ein pharmakologisch aktives Peptid wurden PA und Chitosan nicht nur wegen ihrer pH-Wert-regulierenden Eigenschaften ausgewählt, sondern auch basierend auf der Tatsache, dass sie im Zusammenhang mit der oralen Peptidapplikation oft als mukoadhäsions- und permeationsfördernde Agenzien beschrieben wurden [153-156]. Chitosan wurde dazu zuvor in 0,1 M Salzsäure gelöst und im gequollenen Zustand zu dem filmbildenden Polymer gegeben. Falls notwendig wurde Glycerol 85 % als Weichmacher eingesetzt. Die detaillierte Zusammensetzung der verwendeten Filmzubereitungen für Cbz-MP und NH₂-MP sowie die resultierenden pH-Werte der Polymerlösungen sind in Tabelle 3.2 aufgelistet.

Tabelle 3.2: Zusammensetzung und pH-Werte der Cbz- und NH₂-MP Formulierungen

Formulierung	Anteil		Polymer	Anteil		pH-Wert-Regulator	Anteil	Glycerol	pH-Wert	
	Cbz-	NH ₂		[%]	[%]				[%]	[%]
1	10	0,22	HPMC	15,0	-	-	3,0	8,3	8,3	
2	11	0,22	HPMC	14,0	PA	0,25	2,5	5,5	6,0	
3	12	0,22	HPMC	14,0	Chito	0,25	2,5	6,2	6,3	
4	13	0,22	HPC	13,0	-	-	-	7,5	7,2	
5	14	0,22	HPC	12,0	PA	0,25	-	6,2	6,0	
6	15	0,22	HPC	12,0	Chito	0,25	-	5,7	6,0	
7	16	0,22	HPMCAS	18,0	-	-	3,5	3,5	4,9	
8	17	0,22	HPMCAS	17,0	PA	0,25	3,0	3,9	4,8	
9	18	0,22	HPMCAS	17,0	Chito	0,25	3,0	4,1	4,5	

HPMC: Pharmacoat® 606; HPC: Klucel® JXF PH; Chito: Chitosan Hydrochlorid; 85 % deacetyliert; gelöst in Salzsäure 0,1 M; PA: Carbopol® 974P NF

Für beide Modellpeptide wurden die gleichen Formulierungen (F) mit einer Beladung von 0,5 mg Peptid/6 cm² Film gewählt (Cbz-MP: F 1-9; NH₂-MP: F 10-18). Die Berechnung der Peptideinwaage erfolgte mittels Formel 6.1. Lediglich F1 und F10, bestehend aus HPMC ohne pH-Wert-regulierende Polymere, lagen außerhalb des günstigen pH-Wert-Bereichs. Die Filme wurden mit der in Abschnitt 6.2.2 beschriebenen Methode hergestellt. Die Nassfilmdicke betrug 500 µm.

3.1.4 Charakterisierung der Filme

3.1.4.1 Morphologie der Filme

Die Filmzubereitungen mit Cbz-MP und NH₂-MP wurden sowohl direkt nach der Herstellung als auch nach 3-monatiger Lagerung unter kontrollierten Bedingungen bei 21 °C und 45 % r.F. (vgl. Abschnitt 6.2.8.2) hinsichtlich ihrer morphologischen Eigenschaften, der Gleichförmigkeit des Peptidgehalts sowie der Peptidstabilität untersucht. Die beiden Modellpeptide werden im Folgenden getrennt diskutiert.

In Abbildung 3.5 A sind die Ergebnisse der Massen- und in Abbildung 3.5 B die Ergebnisse der Dickenbestimmung der Filme mit **Cbz-MP** vor (gefüllte Säulen) und nach der Lagerung (schraffierte Säulen) dargestellt (vgl. Abschnitt 6.2.4.1 und 6.2.4.2). Die Filme mit HPMC als filmbildendes Polymer sind in hellgrau, die mit HPC in dunkelgrau und die mit HPMCAS in schwarz dargestellt. Im Allgemeinen kann man auf Grund der geringen Streuung der Massen und Dicken von homogenen Filmzubereitungen ausgehen. Wie zu erwarten, ist mit steigendem Polymeranteil in der Reihenfolge HPC (13-12 %) < HPMC (14-15 %) < HPMCAS (17-18 %) ein signifikanter Anstieg ($p < 0,05$) der Trockenfilmmassen und -dicken zu erkennen. Nach 3-monatiger Lagerung waren keine Änderungen in den Trockenfilmmassen zu verzeichnen. Im Gegensatz dazu zeigten F3, F7 und F9 eine Abnahme der Dicke bei gleichbleibender Masse, was auf eine Dehnung der Filme hindeutet, obwohl sie während der Lagerung keinerlei mechanischer Beanspruchung unterlagen. Ein möglicher Grund könnte in der weiteren Verarbeitung der Filme liegen, da sie nach der Lagerung teilweise in dem Gefäß, in dem sie gelagert wurden, festklebten und durch leichtes Ziehen abgelöst werden mussten, wodurch möglicherweise eine Dehnung der Filme verursacht wurde.

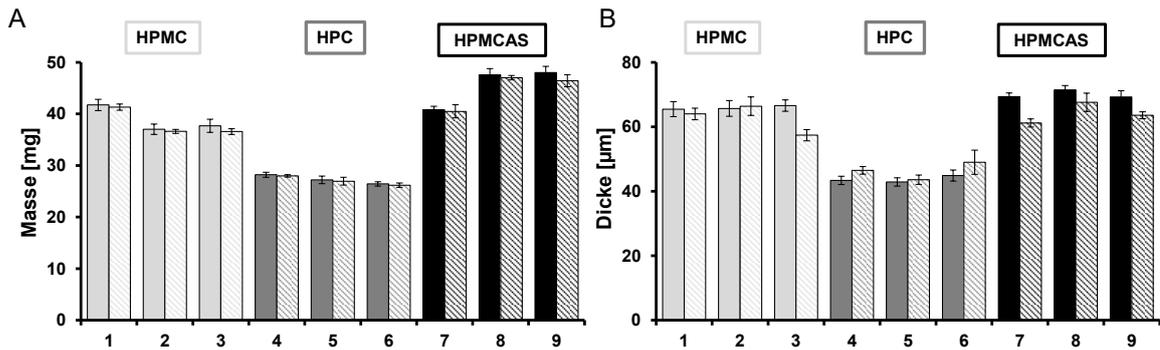


Abbildung 3.5: Masse (A) und Dicke (B) der Filme mit Cbz-MP; nach der Herstellung (gefüllte Säulen) und nach 3-monatiger Lagerung bei 21 °C, 45 % r.F. (schraffierte Säulen); MW \pm KI; ($\alpha=0,05$); n=10

Die obere Reihe von Abbildung 3.6 zeigt polarisationsmikroskopische Aufnahmen (vgl. Abschnitt 6.2.4.5) und die untere Reihe Fotografien der Filme mit Cbz-MP nach Herstellung und Trocknung am Beispiel von HPMC (1a+b), HPC (4a+b) und HPMCAS (7a+b).

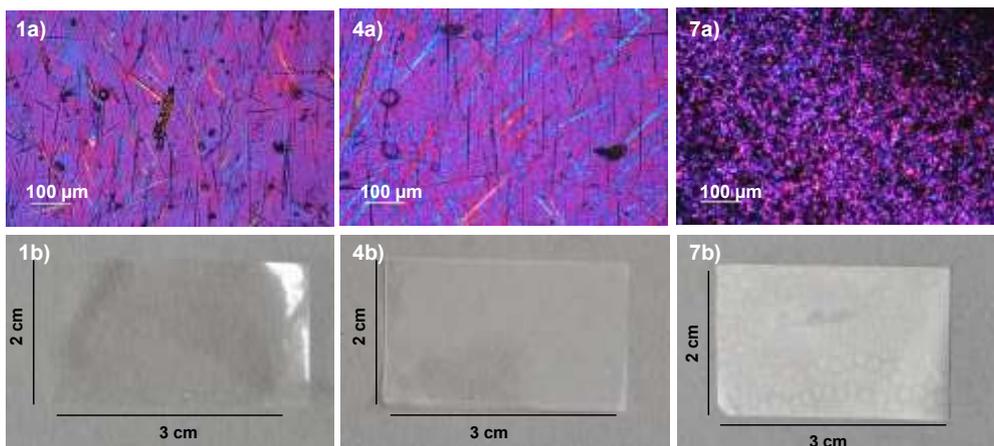


Abbildung 3.6: Polarisationsmikroskopische Aufnahmen (obere Reihe) und Fotografien (untere Reihe) der Filme mit Cbz-MP mit HPMC (1a+b), HPC (4a+b) und HPMCAS (7a+b) vor der Lagerung bei 21 °C und 45 % r.F.

Auf Grund der geringen Wasserlöslichkeit des Cbz-MPs bildeten sich nach der Trocknung und der damit verbundenen Entfernung des Lösungsmittels nadelförmige Kristalle in allen Filmen mit HPMC und HPC als filmbildende Polymere. Eine Aussage über eine mögliche Kristallbildung in den HPMCAS-Filmen war mittels Polarisationsmikroskopie nicht möglich, da die Filme ein milchig-trübes Aussehen aufwiesen (vgl. Abbildung 3.6, 7b). Im Allgemeinen war das Aussehen dieser Filme eher inhomogen mit einem schlierenförmigen Muster auf der Filmoberfläche. Die HPMC- und HPC-Filme wurden bei der visuellen Bewertung als klar und homogen bewertet. Um genauere Aussagen über die Kristallinität der HPMCAS-Filme treffen zu können, wurden daher röntgendiffraktometrische Messungen (vgl. Abschnitt 6.2.5) durchgeführt (Abbildung 3.7). Cbz-MP als Ausgangsstoff zeigt das

typische Beugungsmuster eines kristallinen Stoffes mit scharfen Peaks. Die Diffraktogramme der Filme sind von dem für amorphe Substanzen charakteristischen Halo dominiert, wobei in den Filmen mit HPMC und HPC (beispielhaft an F1 und F4) Peaks kleiner Intensitäten vorhanden sind. Somit konnte die Kristallisation des Peptids auch mittels Röntgendiffraktometrie nachgewiesen werden. Die HPMCAS-Filme zeigten lediglich das charakteristische Halo. Somit kann auf Basis der Untersuchungen mittels Polarisationsmikroskopie und Röntgendiffraktometrie darauf zurückgeschlossen werden, dass Cbz-MP in den HPMC- und HPC- Filmen zu nadelförmigen Kristallen ausfällt. In HPMCAS-Filmen scheint es jedoch molekular dispergiert vorzuliegen.

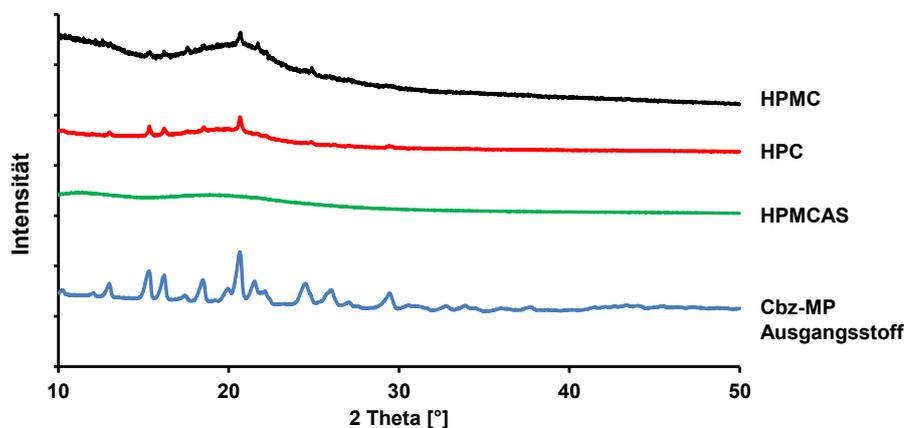


Abbildung 3.7: Röntgendiffraktogramme von Cbz-MP als Ausgangsstoff und in Filmen mit HPMC (F1), HPC(F4) und HPMCAS (F7)

In Abbildung 3.8 A sind die Ergebnisse der Massen- und in Abbildung 3.8 B die Ergebnisse der Dickenbestimmung der Filme mit $\text{NH}_2\text{-MP}$ vor (gefüllte Säulen) und nach der Lagerung (schraffierte Säulen) dargestellt. Auch hier war ein signifikanter ($p < 0,05$) Anstieg in den Trockenfilmmassen und -dicken mit steigendem Polymeranteil zu beobachten. Die Lagerung bei 21 °C und 45 % r.F. für 3 Monate hatte keinen Einfluss auf die Masse und mit Ausnahme von F13 und 14 auch keinen Einfluss auf die Dicke der Filme. Die Dicke von F13 und 14 war bei gleichbleibender Masse nach Lagerung geringer, was wiederum für eine Dehnung der Filme nach der Auslagerung während der Weiterverarbeitung spricht.

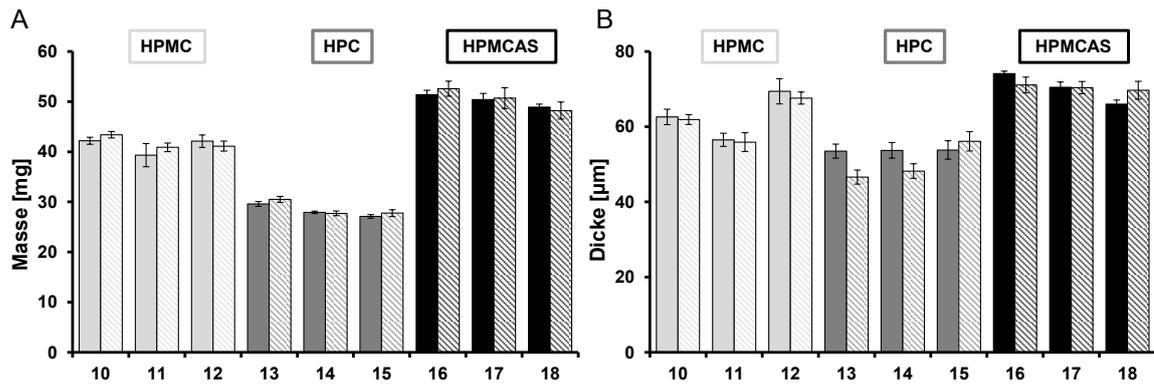


Abbildung 3.8: Masse (A) und Dicke (B) der Filme mit $\text{NH}_2\text{-MP}$; nach der Herstellung (gefüllte Säulen) und nach 3-monatiger Lagerung bei $21\text{ }^\circ\text{C}$, 45 % r.F. (schraffierte Säulen); $\text{MW} \pm \text{KI}$; ($\alpha=0,05$); $n=10$

Die obere Reihe von Abbildung 3.9 zeigt polarisationsmikroskopische Aufnahmen und die untere Reihe Kameraaufnahmen der Filme mit $\text{NH}_2\text{-MP}$ nach Herstellung und Trocknung am Beispiel von HPMC (10a+b), HPC (13a+b) und HPMCAS (16a+b). Bei der visuellen Bewertung der Filme wurden diese als homogen bewertet. Die Filme mit HPMC und HPC waren klar und die Filme mit HPMCAS hatten auch hier eine milchig-trübe Erscheinung, was wiederum zu vergleichbaren polarisationsmikroskopischen Aufnahmen führte, wie sie bereits bei Cbz-MP diskutiert wurden (vgl. Abbildung 3.9, 16a+b). HPMC- und HPC-Filme mit $\text{NH}_2\text{-TP}$ zeigten keine Kristallbildung im Polarisationsmikroskop. Dies war angesichts der besseren Wasserlöslichkeit auch zu erwarten. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass das einseitig geschützte Modellpeptid in allen Filmformulierungen in gelöster Form vorlag.

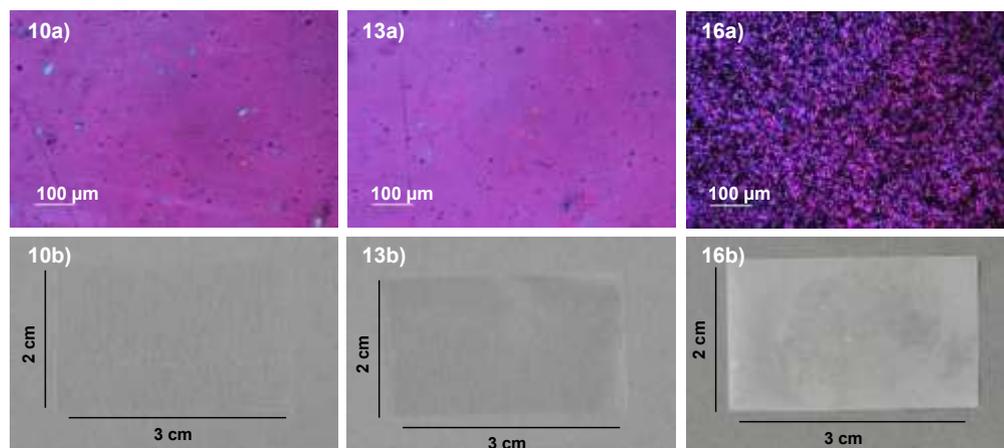


Abbildung 3.9: Polarisationsmikroskopische Aufnahmen (obere Reihe) und Fotografien (untere Reihe) der Filme mit $\text{NH}_2\text{-MP}$ mit HPMC (10a+b), HPC (13a+b) und HPMCAS (16a+b)

3.1.4.2 Stabilitätsuntersuchungen

Die Modellpeptide Cbz-MP und NH₂-MP wurden hinsichtlich ihrer Stabilität im Film analysiert, indem der Gehalt der Filme sowie das Auftreten von Abbauprodukten mittels HPLC vor und nach Lagerung untersucht wurden (vgl. Abschnitt 6.2.7.2 und 6.2.7.3). Außerdem wurde die Gleichförmigkeit des Gehalts nach Ph. Eur. 2.9.40 durch Berechnung des Akzeptanzwertes (AV) bestimmt (vgl. Abschnitt 6.2.7.1).

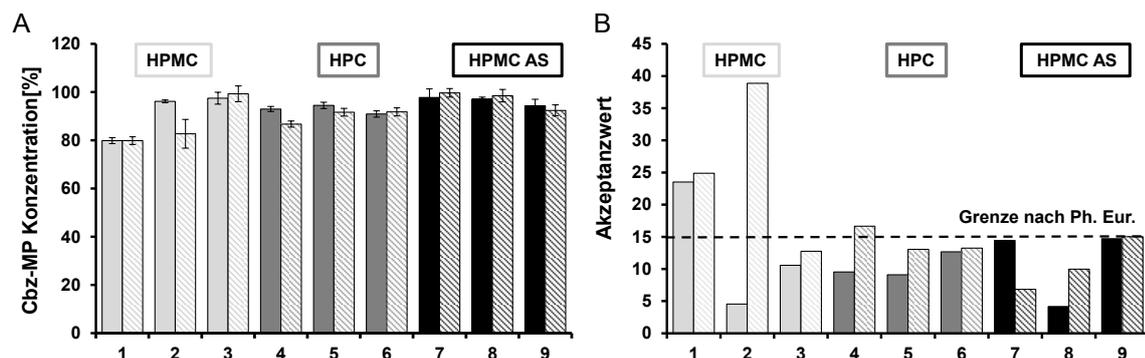


Abbildung 3.10: Cbz-MP Konzentration bezogen auf den Sollwert (A) und AV nach Ph. Eur. 2.9.40 der oromukosalen Filme; gestrichelte Linie stellt das Akzeptanzkriterium der ersten Prüfstufe nach Ph. Eur. 2.9.40 dar (B); nach der Herstellung (gefüllte Säulen) und nach 3-monatiger Lagerung bei 21 °C, 45 % r.F. (schraffierte Säulen); MW \pm KI ($\alpha=0,05$); n=10

In Abbildung 3.10 A ist die Konzentration an **Cbz-MP** in den verschiedenen Filmzubereitungen vor (gefüllte Säulen) und nach (schraffierte Säulen) Lagerung abgebildet. Abbildung 3.10 B zeigt die entsprechenden Berechnungen der AVs. Mit Ausnahme des HPMC-Filmes ohne pH-Wert-regulierende Polymere (F1) wiesen alle Filmzubereitungen nach der Herstellung einen Gehalt an Cbz-MP von annähernd 100 % auf und es waren keine Abbauprodukte in den Chromatogrammen zu erkennen. Dieses Ergebnis spiegelte sich auch in der Gleichförmigkeit des Gehalts der Filme vor der Lagerung wider. Diese wurde für alle Filmzubereitungen mit Ausnahme von F1 erfüllt (AV<15). F1 resultierte hingegen in einer deutlichen Instabilität des Peptids, was sich sowohl in einem niedrigeren Gehalt und Abbauprodukten im HPLC Chromatogramm als auch einem hohen AV (23,5) äußerte. Die Begründung dieser Instabilität lag dabei in dem inadäquaten pH-Wert der Polymerlösungen, welcher über 8 (vgl. Tabelle 3.2) und damit außerhalb der zuvor definierten pH-Wert-Grenzen lag (vgl. Abschnitt 3.1.2). Infolge dessen können pH-Wert-induzierte, hydrolytische Abbaureaktionen während der Herstellung des Filmes ablaufen. Die Tatsache, dass nach der Lagerung von F1 kein weiterer Abfall der Peptidkonzentration mehr zu verzeichnen war, lässt darauf schließen, dass die hydrolytischen Abbaureaktionen ausschließlich während des Herstellungsprozesses stattfanden und Cbz-MP nach der Trocknung im Film stabil ist. Nach Ende des Lagerungszeitraums zeigten lediglich F2 und F4 eine Abnahme der Peptidkonzentration im Film und eine Zunahme des AVs über die zulässige Grenze

der ersten Prüfstufe des Ph. Eur. hinaus. Allerdings konnten keine Abbauprodukte im Chromatogramm nachgewiesen werden. Eine mögliche Begründung könnte darin liegen, dass die entstandenen Abbauprodukte kein UV-detektierbares Chromophor aufwiesen und demnach nicht mittels der verwendeten HPLC-Methode nachgewiesen werden konnten. Eine Verifikation wäre in weiteren Versuchen notwendig, um einen analytischen Fehler auszuschließen.

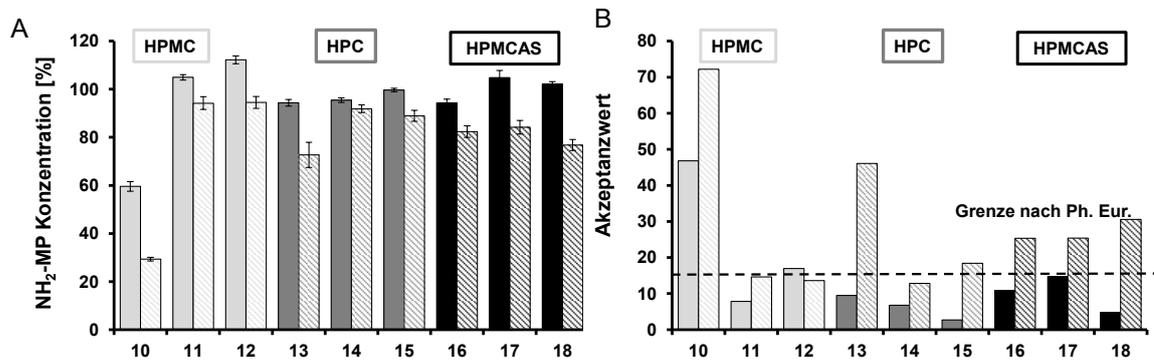


Abbildung 3.11: NH₂-MP Konzentration bezogen auf den Sollwert (A) und AV nach Ph. Eur. 2.9.40 der oromukosalen Filme; gestrichelte Linie stellt das Akzeptanzkriterium der ersten Prüfstufe nach Ph. Eur. 2.9.40 dar (B); nach der Herstellung (gefüllte Säulen) und nach 3-monatiger Lagerung bei 21 °C, 45 % r.F. (schraffierte Säulen); MW ± KI ($\alpha=0,05$); n=10

In Abbildung 3.11 A ist die Konzentration an **NH₂-MP** in den verschiedenen Filmzubereitungen vor (gefüllte Säulen) und nach (schraffierte Säulen) Lagerung abgebildet. Abbildung 3.11 B zeigt die entsprechenden AV-Ergebnisse. Auch im Fall des NH₂-MPs war eine Instabilität des Peptids in den HPMC-Formulierungen ohne pH-Wert-Regulatoren zu beobachten. In Analogie zu der in Vorversuchen beobachteten stärker ausgeprägten pH-Wert-Sensibilität im Vergleich zu Cbz-MP war auch der Gehalt des Films signifikant niedriger (~60 %, $p<0,05$) im Vergleich zum beidseitig geschützten Modellpeptid (~80 %). Alle anderen Filmzubereitungen zeigten zunächst keine Hinweise auf Instabilitäten des NH₂-MPs und bis auf F12 war die Gleichförmigkeit des Gehalts gemäß Ph. Eur. gegeben. F12 überschreitet die AV-Grenze auf Grund des zu hohen Gehalts der Filme, was zunächst vernachlässigt wurde, da eine Verbesserung der Gleichförmigkeit im Zuge von Formulierungs- oder Prozessoptimierungen hätte erzielt werden können. Nach der Lagerung der Filme zeigte sich mit Ausnahme von F14 in allen Formulierungen eine signifikante ($p<0,05$) Abnahme des Peptidgehalts, angezeigt durch Peaks von Abbauprodukten in den HPLC-Chromatogrammen sowie erhöhten AVs. Obwohl eine pH-Wert-Anpassung vorgenommen wurde (vgl. Tabelle 3.2), konnte NH₂-MP über einen Zeitraum von 3 Monaten nicht stabilisiert werden. Ein möglicher Erklärungsansatz könnte in der labilen Eigenschaft des NH₂-MPs in wässrigen Medien liegen. Oromukosale Filme enthalten auch nach der Trocknung noch einen Restanteil an Wasser, der unter anderem für die elastischen Eigenschaften der Filme sorgt. Der Restwasseranteil kann je nach Art und Menge der verwendeten Hilfsstoffe sowie

Lagerungsbedingungen variieren. Um einen Eindruck über den Einfluss des Restwassers in den Filmen auf die Peptidstabilität zu bekommen, wurde der Wassergehalt der Filme mit $\text{NH}_2\text{-MP}$ bestimmt. In der Literatur werden meist der Trocknungsverlust und die Karl-Fischer-Titration als Methoden beschrieben [157]. Da die hergestellten Filme auf Wasser/Ethanol Mischung beruhten, wurde auf die Karl-Fischer-Titration zurückgegriffen (vgl. Abschnitt 6.2.6). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.3 dargestellt.

Tabelle 3.3: Wassergehalt der Filmzubereitungen mit $\text{NH}_2\text{-MP}$; $\text{MW} \pm \text{s}$, $n=3$

Formulierung	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Wassergehalt	6,0	5,7	6,4	3,5	3,8	4,2	5,9	5,4	6
$\pm \text{s}$ [%]	$\pm 0,1$	$\pm 0,2$	$\pm 0,7$	$\pm 0,1$	$\pm 0,4$	$\pm 0,1$	$\pm 0,8$	$\pm 0,1$	$\pm 0,5$

Die Methode eignete sich zwar zur Bestimmung des Wassergehaltes der Filme, allerdings lösten sich nicht alle Filme gleich schnell in dem Hydranal-Methanol Arbeitsmedium auf, was eventuell einen Einfluss auf den Verbrauch an hinzutitrierten Medium haben könnte. Trotz dieser Fehlermöglichkeit wurden die erhaltenen Werte zur Auswertung herangezogen. Wie zu erwarten, enthielten die Filme auf HPMC- und diejenigen auf HPMCAS-Basis (F10-12 und 16-18) mit Glycerol 85 % als Weichmacher mehr Restwasser als die HPC-Filme, in denen kein Weichmacher eingearbeitet wurde. Möglicherweise könnte darin die Begründung liegen, warum F15 nach der Lagerung keinen weiteren Abfall in der $\text{NH}_2\text{-MP}$ -Konzentration zeigte, was allerdings der Instabilität des Peptids in den anderen HPC-Filmen widersprechen würde. Generell sind die gemessenen Restwassermengen in den HPC- und HPMC-Filmen vergleichbar mit Literaturwerten [146]. Hinsichtlich des Restwassergehalts der HPMCAS-Filme stehen in der Literatur keine Vergleichswerte zur Verfügung. Der Wassergehalt der Filme steht somit in keiner direkten linearen Korrelation zu dem gemessenen Abfall der Peptidkonzentration in den Filmen nach der Lagerung ($R=0,42$, Daten nicht gezeigt).

Die Instabilität des $\text{NH}_2\text{-MPs}$ in den getesteten Filmzubereitungen kann demnach nicht auf einen einzigen Einflussfaktor zurückgeführt werden und scheint die Folge eines Zusammenspiels mehrerer Faktoren zu sein, die alle auf die freie Aminogruppe des Peptids zurückgeführt werden können. Gemäß den Erwartungen zeigte das beidseitig geschützte Peptid eine höhere Stabilität in den Filmzubereitungen, was zum einen an der Molekülstruktur selbst (weniger freie funktionelle Gruppen) und zum anderen an der damit verbundenen schlechteren Wasserlöslichkeit liegen kann. Nach der Trocknung lag Cbz-MP ungelöst oder nur teilweise gelöst vor, wodurch hydrolytische Abbaureaktionen nur vermindert stattfinden konnten, was hinsichtlich der chemischen Stabilität sicherlich von Vorteil ist, allerdings im

Hinblick auf das Ziel dieser Arbeit, der orotransmukosalen Applikation pharmakologisch aktiver Peptide, negativ zu bewerten ist.

3.1.5 Zusammenfassung

In diesem Teil der Arbeit wurden im Rahmen von Vorversuchen zwei Modellpeptide für die Entwicklung oromukosaler Filme eingesetzt, um Rückschlüsse auf kritische Produkt- und Prozessattribute für die weitere Verwendung eines pharmakologisch aktiven Peptids zu ziehen. Niedrig dosierte, oromukosale, peptidhaltige Filme konnten erfolgreich hergestellt werden. Die meisten Filmzubereitungen entsprachen trotz Dosierung im Mikrogrammbereich den Anforderungen des Ph. Eur. in Monographie 2.9.40 (Gleichförmigkeit des Gehalts einzeldosierter Arzneiformen).

Auf Grund der Molekülstruktur der Peptide wurden Unterschiede in der chemischen Stabilität der Peptide erwartet, die sich vor allem in Einlagerungsstudien der Filme bestätigt haben. NH₂-MP zeigte über die Lagerungsperiode einen stärkeren Abbau im Vergleich zu Cbz-MP. Der dafür verantwortliche Einflussfaktor konnte nicht eindeutig identifiziert werden, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Instabilität in einem Zusammenspiel aus mehreren Faktoren lag.

Zudem konnte gezeigt werden, dass der pH-Wert der Polymerlösungen einen großen Einfluss auf die Stabilität der Peptide hat und somit als eines der kritischsten Produktattribute bewertet werden kann. In Folge dessen eignete sich HPMC ohne pH-Wert-regulierende Zusätze nicht als filmbildendes Polymer und führte bereits nach der Herstellung zu starken Abbaureaktionen beider Peptide. HPMCAS führte zu milchig-trüben, inhomogen aussehenden Filmen, weshalb das Polymer aus rein optischen Gründen weniger zur Herstellung oromukosaler Filme geeignet ist. HPC kann demnach als das am besten geeignete filmbildende Polymer innerhalb dieser Vorversuche eingestuft werden. Es weist im Wässrigen einen neutralen pH-Wert auf, führte zu homogenen Filmen und ist auf Grund seiner Lösungs- und Quellungsfähigkeit in Wasser und organischen Lösungsmitteln flexibel einsetzbar.

Aus den Vorversuchen zu den Modellpeptiden kann nun geschlussfolgert werden, dass sowohl die Zubereitung als auch das Peptidmolekül selbst einige Anforderungen erfüllen müssen, um zur Entwicklung eines Films zur orotransmukosalen Applikation geeignet zu sein.

Hinsichtlich des Peptids sollten bestimmte Strukturmerkmale wie freie, stark basische oder saure funktionelle Gruppen vermieden werden oder nur als korrespondierendes Salz eingesetzt werden, um selbstinduzierten, pH-Wert-abhängigen Instabilitäten entgegenzuwirken. Zudem sollte das Peptid eine ausreichende Löslichkeit in Wasser aufweisen, damit es auch nach dem Trocknen molekulardispers verteilt im Film vorliegt, um eine orotransmukosale Permeation zu

ermöglichen oder zu verbessern. Wie am Beispiel des NH₂-MPs gezeigt wurde, ist dabei eine stark ausgeprägte Hydrolyse unbedingt zu vermeiden.

Im Hinblick auf die Formulierungsentwicklung spielt der pH-Wert der Polymerlösung und der des hergestellten Filmprodukts eine entscheidende Rolle für die Langzeitstabilität der Peptide und muss somit bereits bei der Auswahl der Hilfsstoffe berücksichtigt werden.

3.2 Desmopressinacetat

3.2.1 Einleitung

Auf Basis der in Kapitel 3.1 vorgestellten Ergebnisse sollte ein geeignetes pharmakologisch aktives Peptid ausgewählt werden, welches den zuvor dargestellten Anforderungen hinsichtlich Molekülstruktur, Wasserlöslichkeit und Stabilität entsprechen sollte. Nach einer ausgiebigen Fach- und Patentliteraturrecherche wurde das Nonapeptid Desmopressinacetat (Desmopressin, vgl. Abbildung 3.12) ausgewählt, dessen Eigenschaften im Folgenden näher erläutert werden.

Desmopressin hemmt die Wasserrückresorption in der Niere. Es wird in der Therapie des zentralen Diabetes Insipidus, traumatisch bedingter Polyurie und Polydipsie sowie zur Behandlung der Enuresis nocturna (nächtliches Bettnässen) bei Kindern und Erwachsenen eingesetzt [45, 46, 48, 158]. Desmopressin (1-desamino-8-D-Arginin-vasopressin) ist ein synthetisches Analogon des im Körper natürlich vorkommenden Hormons Vasopressin (antidiuretisches Hormon, ADH), welches über V_1 - (vaskulär), V_2 - (renal) und V_3 - Rezeptoren (hypophysär) vasokonstriktorisch und antidiuretisch wirkt [159]. Auf Grund der Änderungen der Molekülstruktur im Vergleich zu ADH ist Desmopressin V_2 -Rezeptor spezifisch wirksam und weist eine etwa zehnfach potentere und längere Wirkung auf [160]. Abbildung 3.12 zeigt die Strukturformel von Desmopressin in der pharmakologisch verwendeten, wasserlöslichen Salzform der Essigsäure. Die stark basische Guanidinfunktion des Argininrests liegt demnach protoniert vor, was den zuvor in Abschnitt 3.1.5 definierten Anforderungen hinsichtlich Stabilität und Wasserlöslichkeit entspricht.

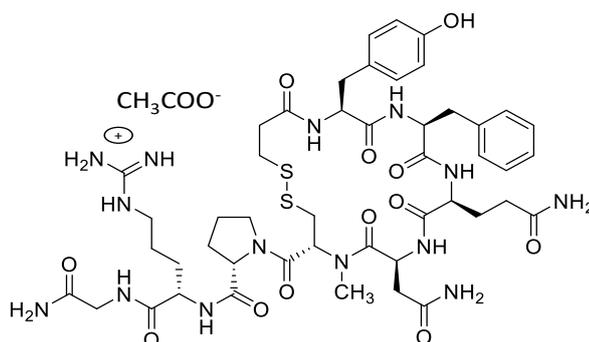


Abbildung 3.12: Strukturformel von Desmopressinacetat

Desmopressin ist als Nasenspray (z.B. Desmospray[®], Medice), orale Tablette (z.B. Minirin[®], Ferring) und Lyophylisat (Minirin[®] Lyophylisat zum Einnehmen, Ferring) zur sublingualen Applikation kommerziell auf dem Markt erhältlich. Eine orale, filmförmige Zubereitung ist bisher weder auf dem Markt noch in der Literatur beschrieben worden. Die Dosierungen der Marktprodukte liegen zwischen 10 μ g

(nasale Applikation, entspricht einem Sprühstoß) und 270 µg (sublinguale Applikation) Desmopressin pro Einzeldosis. Auf Grund der Peptidstruktur und der damit verbundenen Sensitivität gegenüber proteolytischen Enzymen im Körper weist Desmopressin eine geringe BV auf. Die nasale BV schwankt zwischen 5-10 %, die orale BV zwischen 0,08-0,16 % und die sublinguale BV liegt bei 0,26 % [161, 162]. Der nasale Applikationsweg zeigt demnach die höchste BV, aber auch gleichzeitig die größten inter- und intraindividuellen Schwankungen in der Menge an bioverfügbarem Desmopressin im Vergleich zur oralen Gabe. Das führte dazu, dass die Zulassung der auf dem Markt befindlichen Desmopressin-haltigen Nasensprays für die Indikation der Enuresis nocturna bei Kindern und Erwachsenen zurückgezogen wurde. Schwankende BVs können unter Umständen zu einer vermehrten Wasserrückresorption und der damit oft verbundenen Hyponatriämie führen, welche vermehrt bei Kindern auftritt und sich in schweren Krampfanfällen und neurologischen Ausfallerscheinungen äußern kann [163]. Die gegenüber der Tablette verbesserte BV des Lyophilisats ist wahrscheinlich mit einer teilweisen oropharyngealen, d.h. im Mund-, Rachen- und Speiseröhrenbereich stattfindenden Absorption des Wirkstoffs während der sublingualen Applikation zu erklären [164]. Nach einer Statistik von van Kerrebroeck und Norgaard [158] sind über 80 % der bekannten Hyponatriämiefälle nach Desmopressingabe auf die nasale, 19 % auf die orale und nur ca. 1 % auf die sublinguale Gabe zurückzuführen. De Guchteneaere zeigte außerdem eine Verbesserung der antidiuretischen Wirksamkeit nach sublingualer Gabe im Vergleich zur oralen Tablette auf Grund verringerter Nahrungsmittelinterferenz [165]. Zudem konnte in der Literatur in einigen Studien eine verbesserte Therapietreue bei Applikation des Lyophilisats gezeigt werden [166-168]. Da es sich allerdings um eine orodispersible Arzneiform handelt, die innerhalb weniger Sekunden im Mund zerfällt, wird ein Teil des Arzneistoffs abgeschluckt und demnach einer oromukosalen Absorption entzogen. Um eine sicherere, kindgerechte Arzneiform zu gewährleisten, sollten in dieser Arbeit die Vorteile der oromukosalen Applikation aufgegriffen und durch die Entwicklung einer mukoadhäsiven, filmförmigen Arzneiform erweitert werden. Durch Verlängerung der Kontaktzeit des Films an der Mundschleimhaut des pädiatrischen oder adulten Patienten kann möglicherweise die Permeation des Wirkstoffs begünstigt werden und damit der abgeschluckte Anteil an Desmopressin, der möglicherweise zu Nahrungsmittelinteraktionen führen kann, vermindert werden.

In dieser Arbeit sollten erstmalig für die Pädiatrie geeignete, filmförmige Zubereitungen für das Peptidhormon Desmopressin entwickelt und hinsichtlich der morphologischen Eigenschaften, Peptidstabilität, mukoadhäsiver Eigenschaften, Freisetzungverhalten und orotransmukosaler *ex-vivo*-Permeation untersucht werden.

3.2.2 Rationale Formulierungsentwicklung

Der Formulierungsentwicklung der in dieser Arbeit hergestellten Ein- und Mehrschichtfilme mit Desmopressin lag eine ausführliche Analyse der Hilfsstoffauswahl auf Basis von wissenschaftlichen Daten und regulatorischen Vorgaben zu Grunde.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine kindgerechte, filmförmige Zubereitung für die orotransmukosale Applikation von Desmopressin zu entwickeln. In der Formulierungsentwicklung pädiatrischer Arzneiformen muss die Unbedenklichkeit der verwendeten Hilfsstoffe sichergestellt werden. In diesem Zusammenhang veröffentlichte die EMA im Jahr 2014 die Richtlinie „Guideline on pharmaceutical development of medicines for paediatric use“ (EMA/CHMP/QWP/80880/2012 Rev.2). In der Richtlinie wird ein Flussdiagramm zur Verfügung gestellt, anhand dessen Hilfsstoffe für pädiatrische Arzneiformen bewertet und ausgewählt werden können [169]. Auf der Basis dieses Flussdiagramms sollte eine evidenzbasierte Auswahl pädiatrisch geeigneter Polymere, Lösungsmittel, Weichmacher und Permeationsverbesserer getroffen werden. Die höchste Evidenz bilden dabei Richtlinien und Beurteilungen des CHMP (Committee for Medicinal Products for Human Use) und der ICH (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use), welche allerdings für die wenigsten Hilfsstoffe verfügbar sind [170]. Somit wurde in dieser Arbeit auf der nächsten Evidenzstufe angesetzt, die sich mit der Frage beschäftigt, ob der Hilfsstoff bereits in zugelassenen Arzneimitteln zur Anwendung in der Zielpopulation enthalten ist. Dabei sollten Altersgruppe, Applikationsweg sowie Tageshöchstdosis berücksichtigt werden.

Neben der allgemeinen Anforderung zur pädiatrischen Eignung soll die Arzneiform und die Hilfsstoffauswahl noch weitere Kriterien erfüllen. Zum einen muss die Stabilität des Wirkstoffs sichergestellt werden, um Abbauprodukte mit teils unbekannter Toxizität zu vermeiden. Die Versuche mit den beiden Modellpeptiden haben im Vorfeld gezeigt, dass der pH-Wert der Polymerlösung ein kritisches Produktattribut darstellt. Desmopressin zeigt ein pH-Wert-abhängiges Stabilitätsoptimum bei pH 4-6. Idealerweise sollte der pH-Wert der Zubereitung bei 5 liegen [171]. Dies sollte bei der Auswahl der Hilfsstoffe, insbesondere der Polymere in der Filmmatrix, berücksichtigt werden. Außerdem sind hinreichende mukoadhäsive Eigenschaften gefordert, um die Verweilzeit an der oralen Schleimhaut zu erhöhen und eine orotransmukosale Permeation zu ermöglichen. Dadurch ist der Einsatz hydrophiler, mukoadhäsiver Polymere notwendig. Weiterhin soll die Desmopressinfreisetzung spezifisch in Richtung Mukosa ablaufen, damit ein Wirkstoffverlust über den gastrointestinalen Weg vermindert wird. Demnach muss unter Verwendung von wasserunlöslichen oder pH-Wert-abhängig löslichen Polymeren eine Barriere zur Mundhöhle geschaffen werden. Hinzu kommt,

dass eine zeitlich begrenzte, kontrollierte Applikation beim Kind gefordert wird. Eine unlösliche Abdeckschicht, die sich während der Therapie nicht auflöst, erlaubt es beispielsweise dem Elternteil oder der Betreuungsperson, die Arzneiform zu jeder Zeit zu entfernen und somit die Arzneistoffzufuhr zu beenden. Eine unlösliche Filmschicht kann weiterhin als Kontrollmechanismus dienen, um den Betreuungspersonen die Therapiesicherheit zu vermitteln, dass die Arzneiform auch über die Anwendung hinweg, beispielsweise über die Nacht, an der Applikationsstelle verblieben ist. Eine hinreichende mechanische Stabilität der Filme spielt ebenfalls eine wichtige Rolle und sollte innerhalb eines Hilfsstoffscreenings ein Kriterium sein. Hinsichtlich der pädiatrischen Anwendung stellte auch die Akzeptanz, welche vor allem durch den Geschmack und die Textur der Arzneiform bestimmt wird, einen wichtigen Punkt dar. Da erstmalig eine filmförmige Zubereitung für den Wirkstoff Desmopressinacetat entwickelt und die prinzipielle Möglichkeit einer orotransmukosalen Applikation gezeigt werden sollte, wurde an dieser Stelle auf Geschmacks- und Geruchskorrigenzen verzichtet. Die Zusammensetzung der Zubereitung sollte nicht kompliziert sein, um vor allem Stabilitätseinflüsse von Inhaltsstoffen von teils unbekannter chemischer Zusammensetzung gering zu halten.

Folglich wurde ein Hilfsstoffscreening durchgeführt, indem die Hilfsstoffe hinsichtlich ihrer Eignung zum Einsatz in der Pädiatrie sowie zur Filmherstellung bewertet wurden. Hierzu wurden zusätzlich der pH-Wert und die mukoadhäsiven Eigenschaften der Polymere betrachtet. In der Literatur zur Filmherstellung vorgeschlagene Polymere, Weichmacher, Permeationsverbesserer sowie Lösungsmittel wurden untersucht. Zur Bewertung der Eignung zur Filmherstellung wurden Polymerlösungen mit einer Viskosität möglichst zwischen 1 und 4 Pa*s hergestellt, der pH-Wert (vgl. Abschnitt 6.2.1.3 und 6.2.1.4) überprüft und die Eignung zur Filmherstellung anhand von Einschichtfilmen getestet (vgl. Abschnitt 6.2.2). Dies wurde trotz Anwendung in der Literatur als sinnvoll erachtet, da die Mehrheit der Filme in der Vergangenheit mittels Ausgießen hergestellt und nicht wie in dieser Arbeit ausgerakelt wurden. Zur Bewertung der mukoadhäsiven Eigenschaften und der pädiatrischen Eignung wurde eine Literaturrecherche betrieben. Tabelle 3.4 beinhaltet eine Übersicht der Ergebnisse, wobei ein Punktesystem angewendet wurde. Die Hilfsstoffe, die letztendlich ausgewählt wurden (fett markiert), werden im Folgenden erläutert.

Basierend auf diesen Voruntersuchungen wurden die Polymere **HPMC**, **HPC**, **Carboxymethylcellulose (CMC)**, **Povidon (PVP)**, **PA** und **Chitosan** als hydrophile und mukadhäsive Polymere ausgewählt. Bis auf Chitosan sind diese bereits in einer Vielzahl an Arzneimitteln für Kinder, wie beispielsweise diversen flüssigen Zubereitungen zur oralen Einnahme in der Gruppe der Antitussiva, Analgetika oder Antiemetika zugelassen und finden schon ab dem Säuglingsalter Verwendung. Außerdem wurden sie innerhalb der Lebensmittelgesetzgebung als

unbedenklich eingestuft und es wurde kein ADI-Wert (acceptable daily intake) festgelegt. Folglich werden sie als unbedenklich eingestuft. Chitosan ist bisher nur als Medizinprodukt bei Jugendlichen ab 16 Jahren zugelassen (Reduman Forte®). Auf Grund seiner ausgeprägten mukoadhäsiven und permeationsverbessernden Eigenschaften wurde es jedoch trotzdem in diese Studie aufgenommen. CMC, PA und Chitosan ergaben bereits bei niedrigen Konzentrationen hochviskose Lösungen. Eine zu hohe Viskosität kann das Ausrakeln der Polymerlösung und die Gleichförmigkeit des Gehalts der Filmes negativ beeinflussen [120]. Demnach eignen sich diese Polymere eher als mukoadhäsive Zusätze oder Schichten und weniger als Wirkstoffmatrix (vgl. Abschnitt 3.2.4.1). **Ethylcellulose (EC)** wurde als nicht wasserlösliches Polymer ausgewählt. Da in Fachinformationen zu zugelassenen Arzneimitteln keine Mengenangaben gemacht werden und kein ADI-Wert für EC verfügbar ist, kann keine Aussage über eine unbedenkliche Menge getroffen werden. EC soll in der zu entwickelnden Arzneiform als unlösliche Abdeckschicht eingesetzt werden, die nach der Therapie entnommen wird. Daher wurde auch EC als unbedenklich eingestuft. Der pH-Wert lag bei dem Großteil der Polymere außerhalb des pH-Wert-Optimums von Desmopressin. Aus diesem Grund muss eine Anpassung des pH-Werts vorgenommen werden (vgl. Abschnitt 3.2.3). **Glycerol**, (langkettige) **Fettsäuren** und **Propylenglykol** als Weichmacher bzw. Permeationsverbesserer können als unbedenklich eingestuft werden. Auch hier sind keine ADI-Werte festgelegt. Hinsichtlich Propylenglykol sollten allerdings alters- (bei Kindern < 4 Jahren problematisch) und konzentrationsabhängige Unterschiede des Metabolismus beachtet werden [172]. **Ethanol** ist Bestandteil vieler flüssiger Arzneimittel für Kinder. Ethanol wird als Klasse 3 Lösungsmittel mit niedriger Toxizität eingeordnet [152]. Der PDE-Wert (permitted daily exposure) von < 50 mg wird bei den hier entwickelten Filmen, deren Gesamtgewicht meist unterhalb dieser Grenze liegt, nicht überschritten. Die inhomogene Gruppe der Permeationsverbesserer ist in der Pädiatrie am wenigsten verbreitet. **Menthol**(derivate) und **Natriumlaurylsulfat (SDS)** werden oft als Aroma bzw. Antiklebemittel verwendet. Trotz der Anwendung von Menthol in zahlreichen pädiatrisch zugelassenen Arzneimitteln sollte vor allem im Säuglingsalter das Risiko des Bronchospasmus beachtet werden. Gallensalze sind hingegen nur in wenigen parenteralen Produkten zugelassen. Im Verlauf dieser Arbeit wurden sie im Zuge von Permeationsversuchen trotzdem als niedrigdosierte Permeationsverbesserer eingesetzt.

Tabelle 3.4: Bewertung von Polymeren, Weichmachern, Permeationsverbesserern und Lösungsmitteln hinsichtlich der Eignung zur Filmherstellung und der pädiatrischen Anwendung [169]

	Hilfsstoff	Pädiatrische Eignung (Altersgruppe)	Filmherstellung/ Einarbeitbarkeit in Filme	Mukoadhäsive Eigenschaften	pH- Wert
wasserlösliche, wasserunlösliche & pH-Wert-abhängig lösliche Polymere	HPMC	✓ (Säuglinge)	✓	✓	✗
	HPC	✓ (Säuglinge)	✓	✓	✗
	CMC	✓ (Säuglinge)	* hohe Viskosität	✓	✗
	PVP	✓ (Säuglinge)	✓	✓	✗
	PA	✓ (Säuglinge)	* hohe Viskosität	✓	✗
	Chitosan	* (Jugendliche) Medizinprodukt	* hohe Viskosität	✓	✓
	Macrogole/Poly- ethylenoxide	* MG abhängig (Säuglinge)	* instabile Filme	* mäßig	✗
	Polyvinylalkohol	(✓) (Schulkinder)	✓	* mäßig	✗
	EC	(✓) (Kleinkinder)	✓	✗	✗
	aPMMA & qPMMA	* (Säuglinge) Toxizität [172]	* mäßige Filmbildung	✓	✗
Polyvinylacetat	* (Schulkinder) Kaugummimasse	✗	✗	✗	
HPMCAS	(✓) (Schulkinder)	* inhomogene Filme	✗	✓	
Weichmacher, Permeationsverbesserer & Lösungsmittel	Glycerol	✓ (Säuglinge)	✓	-	-
	Triethylcitrat	✓ (Säuglinge)	* selten	-	-
	Propylen- glykol	* (Säuglinge) altersspezifisch [172]	✓	-	-
	SDS	(✓) (Säuglinge)	✓	-	-
	Gallensalze	✗	✓	-	-
	Fettsäuren	✓	✓	-	-
	(Levo)Menthol	(✓) (Säuglinge)	✓	-	-
Ethanol	✓ (Säuglinge)	✓	-	-	
Isopropanol	* (Säuglinge)	✓	-	-	

✓ geeignet; (✓) geeignet, aber Höchstdosis nicht definiert; * bedingt geeignet; ✗ nicht oder nur bei Gegenmaßnahmen geeignet, wie z.B. pH-Einstellung; - : keine Angabe

3.2.3 Einschichtfilme

3.2.3.1 Formulierungsentwicklung und Herstellung der Einschichtfilme

Innerhalb der Vorversuche zu den Modellpeptiden konnte der pH-Wert der Zubereitung als kritisches Qualitätsattribut identifiziert werden. Infolgedessen wurden für Desmopressin systematische Untersuchungen zum Einfluss verschiedener pH-regulatorischer Ansätze auf die morphologischen Eigenschaften der Einschichtfilme sowie die chemische Stabilität des Wirkstoffs bei Lagerung durchgeführt. Zerfallsuntersuchungen der Filme wurden an dieser Stelle bewusst nicht durchgeführt, da schnell zerfallende, einschichtige Filme nicht die Ziellarzneiform darstellten.

Basierend auf der Formulierungsentwicklungsstudie in Abschnitt 3.2.2 wurden die Polymere HPMC, HPC und PVP als Desmopressinmatrix ausgewählt. CMC, Chitosan und PA sollten im späteren Verlauf dieser Arbeit als mukoadhäsive Zusätze oder Schichten dienen. PVP zeigte in Anwesenheit von Pufferkomponenten zur pH-Einstellung ein schlechtes Spreitverhalten während des Rakelprozesses. Aus diesem Grund wurden im Folgenden nur die Polymere HPMC und HPC als Filmbildner verwendet. Die Zusammensetzung der Einschichtfilme zur Untersuchung des Einflusses verschiedener pH-Regulatoren ist in Tabelle 3.5 gezeigt.

Tabelle 3.5: Zusammensetzung der Einschichtfilme mit Desmopressin

Formulierung	Polymer	Desmopressin	Glycerol	pH-Regulator
Wasser-a				_*
Citro-a				Citronensäure 2 mM
Malein-a	HPMC			Maleinsäure 2 mM
Citrat-a	15,0 %	0,2 %	3,0 %	Citrat-Phosphat Puffer pH 5,5 <i>R</i>
HCl-a				Salzsäure 1N 0,2 %
PA-a				PA 0,2 %
Wasser-b				_*
Citro-b				Citronensäure 2 mM
Malein-b	HPC			Maleinsäure 2 mM
Citrat-b	15,0 %	0,2 %	-	Citrat-Phosphat Puffer pH 5,5 <i>R</i>
HCl-b				Salzsäure 1 N 0,2 %
PA-b				PA 0,2 %

*Wasser dest.; HPMC: Pharmacoat® 606; HPC: Klucel® ELF; PA: Carbopol® 974

Die Polymerkonzentrationen wurden so gewählt, dass vergleichbare Viskositäten resultierten. Bisher war es allerdings noch nicht möglich, einen optimalen Viskositätsbereich zu definieren, da weitere Faktoren wie Polymerart, Weichmacher oder Oberflächenspannung der Polymerlösungen einen Einfluss haben können [173]. Um die dynamische Viskosität als Einpunktmessung bei nur einer Scherrate messen zu können, wurden zwei wässrige HPMC- und HPC- Lösungen zunächst hinsichtlich des Fließverhaltens und des Thixotropie-Effekts charakterisiert, indem eine Scherrampe aufgenommen wurde (vgl. Abschnitt 6.2.1.3). Beide Polymerlösungen wiesen ein annähernd idealviskoses Fließverhalten ohne Thixotropie-Effekt auf, was in Abbildung 3.13 gezeigt wird. Die Bestimmung der dynamischen Viskosität wurde bezogen auf die Ausziehgeschwindigkeit und Nassfilmdicke bei einer Scherrate von 12 s^{-1} durchgeführt. Die dynamischen Viskositäten der Polymerlösungen lagen zwischen $1,5\text{-}1,8 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ und waren demnach vergleichbar.

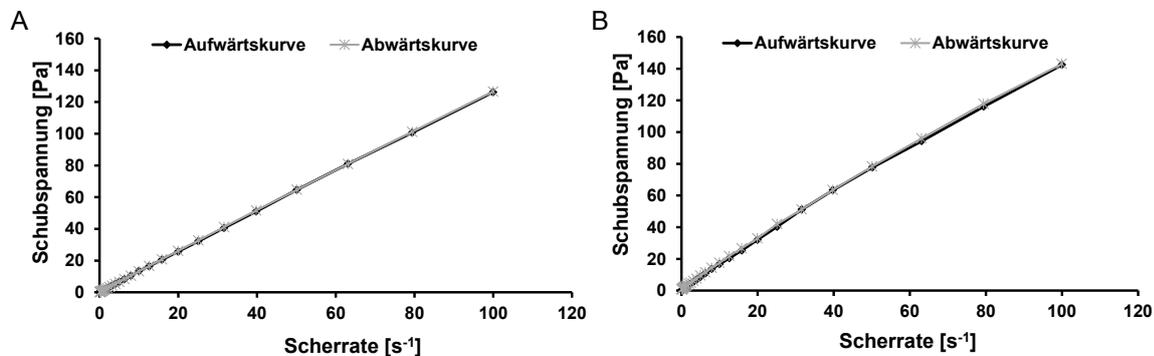


Abbildung 3.13: Rheogramm einer 15 %-igen HPMC (A) und HPC (B) Lösung

Das Stabilitätsoptimum von Desmopressin liegt bei pH 4-6. Idealerweise sollte der pH-Wert bei 5 liegen [171]. Dazu wurden verschiedene Maßnahmen zur pH-Regulation getestet (vgl. Tabelle 3.5). Die auf dem Markt erhältlichen Nasensprays dienen in diesem Zusammenhang als Orientierung. Citronensäure, Salzsäure und Citrat-Phosphatpuffer pH 5,5 sind in den kommerziell erhältlichen Nasensprays enthalten. Maleinsäure wurde in der Literatur als der Citronensäure überlegener, pH-Wert-Stabilisator bewertet [171]. PA als wasserlösliches, saures Polymer wurde als weiterer, speziell für die Herstellung filmförmiger Zubereitungen geeigneter pH-Regulator eingesetzt. Als Negativkontrolle galt ein pH-Regulator-freier, nur auf Wasser basierender Film. Die erforderliche Menge an pH-Regulator wurde durch Herstellung von Konzentrationsreihen empirisch ermittelt.

Um den Einfluss des pH-Regulators zu testen, wurden zunächst Einschichtfilme mit einer Nassfilmdicke von $500 \mu\text{m}$ hergestellt (vgl. Abschnitt 6.2.2). Weiterhin konnten so über polarisationsmikroskopische Aufnahmen Aussagen über das Vorhandensein von Puffersubstanzkristallen, die nach dem Trocknen ausfallen können, getroffen werden. Dies wäre bei Mehrschichtfilmen eventuell nur bedingt möglich. Da Desmopressin in einer Dosierung von $240 \mu\text{g}/3 \text{ cm}^2$ eingesetzt wurde,

gut wasserlöslich ist und zudem als gefriergetrocknetes Pulver bezogen wurde, ist das Vorhandensein von Kristallen nach der Filmtrocknung eher unwahrscheinlich.

3.2.3.2 Morphologie

In Abbildung 3.14 sind die Massen und Dicken der Einsichtfilme mit HPMC (A) und HPC (B) dargestellt (vgl. Abschnitt 6.2.4.1 und 6.2.4.2). Die HPMC-Filme zeigen geringe Streuungen in der Masse und der Dicke. Bis auf Zubereitung Citrat-a, welche eine höhere Pufferkonzentration aufweist, liegen alle Werte für Dicke und Masse in einem vergleichbaren Bereich.

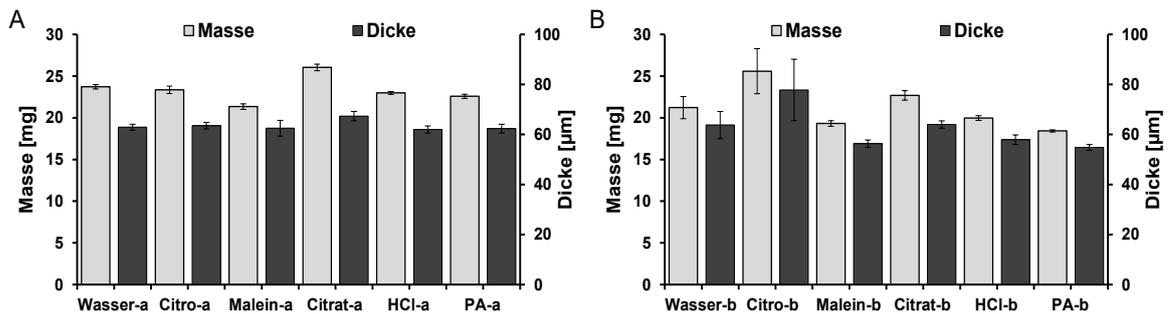


Abbildung 3.14: Masse und Dicke der Einsichtfilme (3 cm²) mit HPMC (A) und HPC (B); MW ± KI ($\alpha=0,05$); n=10

Bei den Filmen mit HPC als filmbildendes Polymer wurde bei Zubereitung Citro-b und Citrat-b ein Zusammenlaufen der Polymerlösung nach dem Ausziehprozess beobachtet. Dies spiegelte sich auch in den höheren Werten für Dicke und Masse sowie der höheren Streuung wieder. Alle anderen HPC-Einsichtfilme zeigten den gleichen Trend wie die HPMC-Zubereitungen. Insgesamt waren die HPC-Filme dünner und leichter als die vergleichbaren HPMC-Filme. Dies lässt sich durch den Weichmacheranteil in den HPMC-Zubereitungen erklären, wodurch zum einen mehr Feststoff und zum anderen mehr Restwasser enthalten sind.

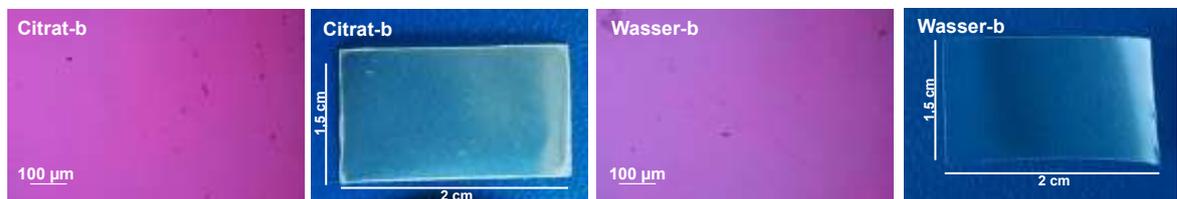


Abbildung 3.15: Polarisationsmikroskopische Aufnahmen und Fotografien der Einsichtfilme am Beispiel von Citrat-b (links) und Wasser-b (rechts)

Abbildung 3.15 zeigt polarisationsmikroskopische Aufnahmen und Fotografien der Einsichtfilme am Beispiel von Citrat-b und Wasser-b (vgl. Abschnitt 6.2.4.4 und 6.2.4.5). Die Einsichtfilme mit Citrat-Phosphatpuffer als pH-Regulator (Citrat-a und -b) wiesen ein leicht trübes Aussehen auf (links), wohingegen alle anderen Filme

transparent waren. Außerdem zeigten die Filme Citrat-a und -b eine hohe Brüchigkeit, was sich vor allem durch absplitternde Kanten beim Schneiden der Filme bemerkbar machte. Polarisationsmikroskopische Aufnahmen wiesen nicht auf eine Rekristallisation in den Filmen hin, was hier beispielhaft an Zubereitung Citrat-b, welche den höchsten Salzgehalt aufweist, und Wasser-b ohne Puffersalze belegt wurde.

3.2.3.3 Gehaltsbestimmung

Von allen Einsichtfilmen wurde eine Gehaltsbestimmung durchgeführt (vgl. Abschnitt 6.2.7.4, UV-Detektion), die Gleichförmigkeit einzeldosierter Arzneiformen gemäß 2.9.40 Ph. Eur. unter Berechnung des AVs zu bestimmen (vgl. Abschnitt 6.2.7.1). Die Ergebnisse des Desmopressingehalts der Einsichtfilme direkt nach der Herstellung sind in Abbildung 3.16 dargestellt.

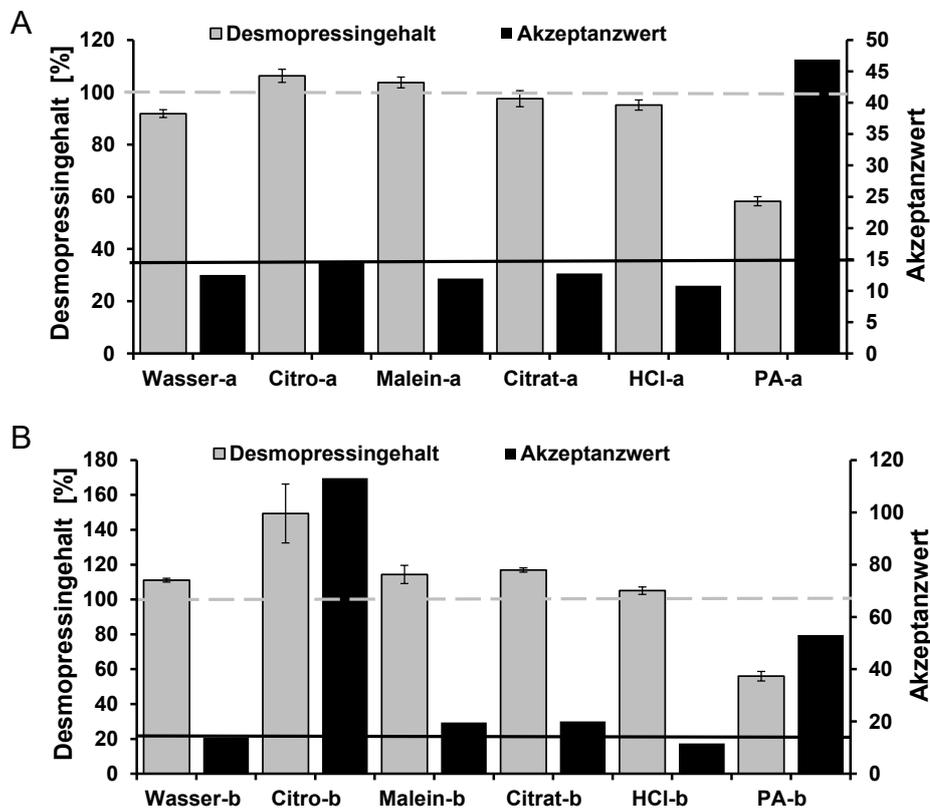


Abbildung 3.16: Desmopressingehalt der Einsichtfilme (3 cm²) mit HPMC (A) und HPC (B) [%] bezogen auf den Sollwert; Gehaltsgrenze=100 % (gestrichelte Linie); MW ± KI ($\alpha=0,05$); n=10 und AV gemäß Ph. Eur. 2.9.40; AV=15 nach erster Prüfvorschrift (durchgezogene Linie)

Hinsichtlich der Einsichtfilme mit HPMC als filmbildendes Polymer (Abbildung 3.16 A) konnte für Citronensäure, Maleinsäure und Citrat-Phosphatpuffer ein Gehalt von annähernd 100 % und ein AV < 15 erreicht werden, was den Anforderungen des Ph. Eur. entspricht. Der Einsichtfilm ohne pH-Regulator (Wasser-a) zeigte bereits nach der Herstellung einen niedrigen Desmopressingehalt

von 92 %. Auf Grund der niedrigen Streuung der Werte entsprach dieser Einschichtfilm jedoch der Monographie 2.9.40 (AV=12,5). Die HPMC- und HPC-Einschichtfilme, die PA als pH-Regulator enthielten, zeigten einen zu geringen Desmopressingehalt von nur etwa 60 %. Es wurde vermutet, dass sich während der Herstellung ein Polyelektrolytkomplex zwischen der Desmopressinbase und dem Polyacrylsäureanion bildet, der mit der verwendeten Analytikmethode nicht komplett quantifiziert werden kann. Eine detaillierte Diskussion dieser Thematik wird in Kapitel 3.2.5 vorgenommen.

Die Einschichtfilme mit HPC als filmbildendem Polymer und Puffersalzen (Citronensäure, Maleinsäure und Natriummonohydrogenphosphat) als pH-Regulatoren resultierten in Desmopressingehalten über 100 % und AVs außerhalb der Grenze des Ph. Eur. Für Citro-b und Citrat-b wurde dieses Ergebnis auf Grund des schlechten Spreitverhaltens dieser Zubereitungen auf der Intermediärfolie während der Filmherstellung erwartet. Bezieht man den Desmopressingehalt jedes einzelnen Films nicht auf den Sollgehalt, sondern auf das tatsächlich gemessene Filmgewicht, so erhält man einen Mittelwert (MW) von $107 \pm 13,54$ %, welcher immer noch hoch ist, aber deutlich näher am Sollgehalt liegt. Im Fall der Zubereitung mit Maleinsäure als pH-Regulator wurden keine Besonderheiten während des Ausrakelns festgestellt. Diese Ergebnisse lassen jedoch darauf schließen, dass das Spreitverhalten der HPC-Polymerlösungen von gelösten Puffersalzen negativ beeinflusst wird. Die Zubereitung HCl-b entsprach den Anforderungen. Im Gegensatz zu den HPMC-Filmen resultierte die pH-Regulator-freie Negativkontrolle in einem Desmopressingehalt von etwa 110 % und entsprach mit einem AV von 14 noch der Monographie 2.9.40. Im Allgemeinen zeigten die HPC-Einschichtfilme einen Desmopressingehalt über 100 %. Für beide Polymere wurde die gleiche Menge an Desmopressin eingewogen. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die Menge an benötigtem Wirkstoff für jedes Polymer bzw. für jede Zubereitung auf Grund der vielen Einflussfaktoren wie Feststoffanteil, Scherung während der Herstellung etc. neu ermittelt werden muss [174]. Folglich müsste am Ende der Formulierungsentwicklung die Einwaage an Wirkstoff für die finale Zubereitung erneut optimiert werden. Da es an diesem Punkt allerdings primär um die pH-abhängige Stabilität des Desmopressins in verschiedenen Matrices geht, wurde keine Optimierung der Einwaage vorgenommen.

3.2.3.4 Lagerstabilität

Da aus den Versuchen der Modellpeptide bekannt war, dass der pH-Wert eine wichtige Rolle innerhalb der Lagerstabilität von Peptiden in filmförmigen Zubereitungen spielt, wurden die hergestellten Einschichtfilme nach einer Einlagerungsperiode von 3 und 6 Monaten bei 21 °C und 45 % r.F. erneut hinsichtlich Masse und Dicke sowie Desmopressingehalt und Stabilität untersucht.

Dazu wurden die Einsichtfilme einzeln in offenen Glasgefäßen gelagert (vgl. Abschnitt 6.2.8.2).

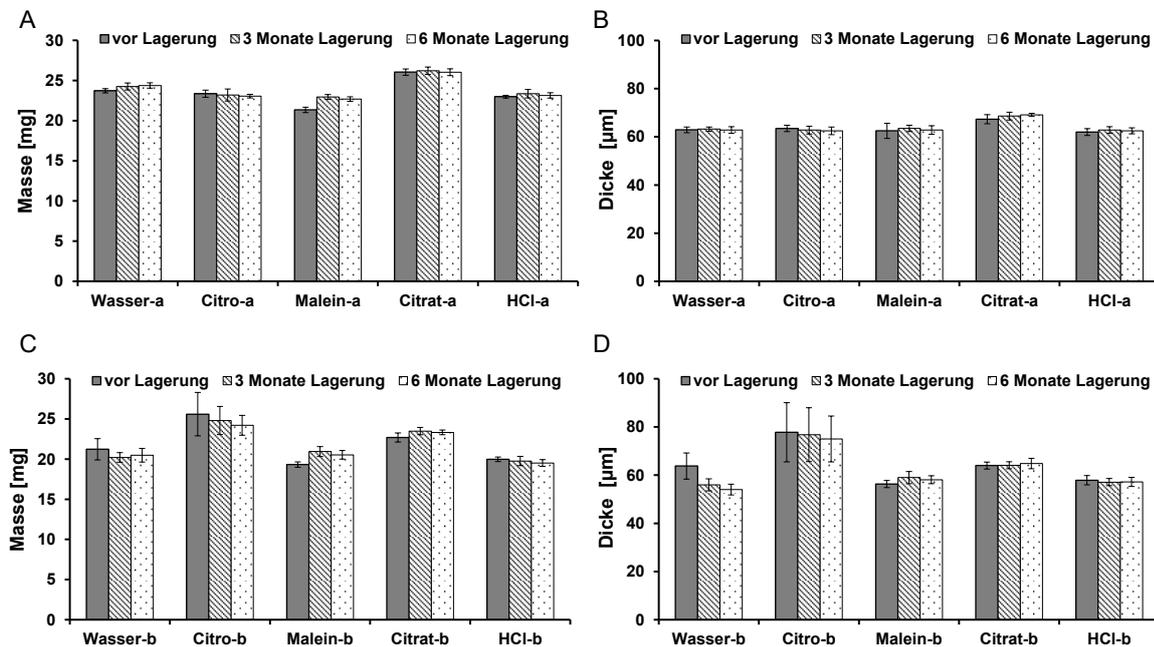


Abbildung 3.17: Masse und Dicke der Einsichtfilme (3 cm²) mit HPMC (A&B) und HPC (C&D) vor und nach 3 sowie 6 Monaten offener Lagerung bei 21 °C und 45 % r.F.;
MW ± KI ($\alpha=0,05$); n=10

Die Ergebnisse der Filmmassen und -dicken nach der Lagerung sind in Abbildung 3.17 dargestellt. Mit Ausnahme der Charge Malein-a waren keine lagerungsbedingten Veränderungen der Massen (Abbildung 3.17 A) und Dicken (Abbildung 3.17 B) der Einsichtfilme mit HPMC als Filmbildner zu verzeichnen. Das Gewicht der HPMC- und HPC-Filme, die Maleinsäure als pH-Regulator enthielten, nahm nach 3 Monaten Lagerung um 8-10 % zu, was für eine Feuchtigkeitsaufnahme spricht. Nach weiteren 3 Monaten Lagerung war keine weitere Erhöhung der Filmmassen mehr zu verzeichnen. Im Allgemeinen ist die Hygroskopizität von Maleinsäure nicht stark ausgeprägt, könnte aber dennoch die Gewichtszunahme der Filme hervorgerufen haben.

Bei den Filmen mit HPC als filmbildendem Polymer und Citronensäure, Citratpuffer sowie Salzsäure als pH-Regulatoren wurden ebenfalls keine Veränderungen in Masse (Abbildung 3.17 C) und Dicke (Abbildung 3.17 D) nach der Lagerung erkannt. Die Zubereitung Wasser-b zeigte eine leichte Filmdickenabnahme nach 3-monatiger Lagerung, die auf eine Dehnung der Filme hindeutet.

Polarisationsmikroskopische Untersuchungen zeigten keine Veränderungen oder das Vorhandensein von Kristallen in den Einsichtfilmen über die Lagerung von 3 bzw. 6 Monaten.

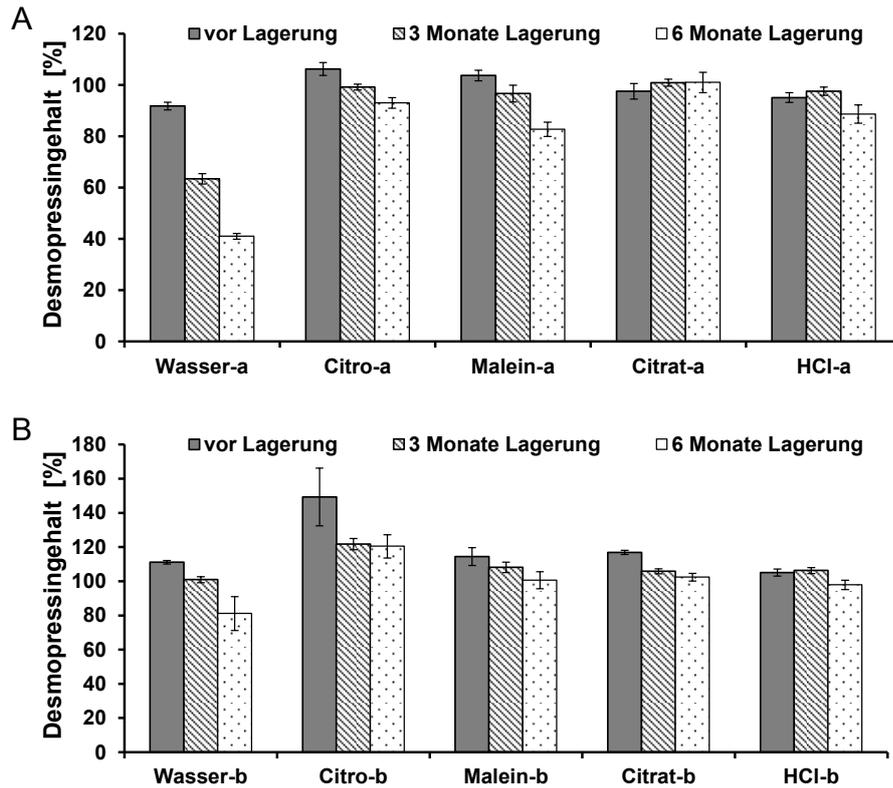


Abbildung 3.18: Desmopressingehalt der Einsichtfilme (3 cm²) mit HPMC (A) und HPC (B) [%] bezogen auf den Sollwert; vor und nach 3 sowie 6 Monaten offener Lagerung bei 21 °C und 45 % r.F.; MW ± KI ($\alpha=0,05$); n=10

Die Ergebnisse des Gehalts der Lagerungsstudie der offen gelagerten Einsichtfilme bei 21 °C und 45 % r.F. sind in Abbildung 3.18 dargestellt. Auf Grund des niedrigen Desmopressingehalts in den Filmen mit PA als pH-Regulator wurden diese nicht in die Lagerungsstudie mit aufgenommen. Ziel war es, auf der Basis von Lagerstabilitätsstudien einen geeigneten pH-Regulator sowie ein passendes Polymer zur Stabilisierung von Desmopressin zu finden.

Wie zu erwarten, zeigte sich für beide Polymere ein starker Abbau des Peptids in den Filmzubereitungen ohne pH-Regulator (Wasser-a und -b), wobei die Degradation in den HPMC-Filmen besonders stark ausgeprägt war. Der pH-Wert der Polymerlösungen lag bei 7-8. Abbauprodukte im HPLC-Chromatogramm bestätigten die Instabilität des Desmopressins in den Einsichtfilmen ohne pH-Anpassung (vgl. Abbildung 3.19).

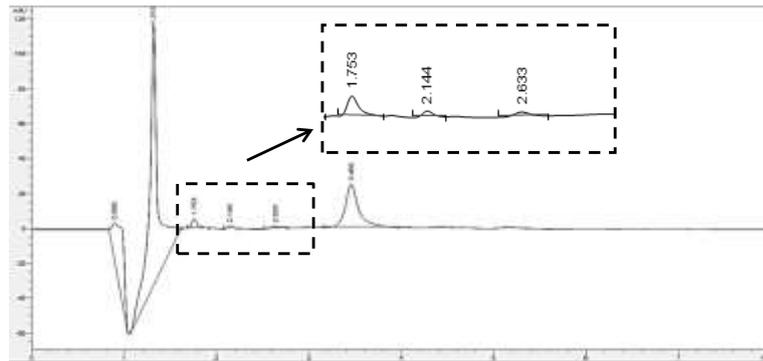


Abbildung 3.19: Abbauprodukte im HPLC-Chromatogramm mittels UV-Detektion am Beispiel von Zubereitung Wasser-a nach 6-monatiger Lagerung bei 23 °C und 45 % r.F.

Mit Ausnahme von Zubereitung Citrat-a zeigten sowohl die HPMC- als auch die HPC-Filme mit Puffersalzen als pH-Regulatoren eine ungenügende Lagerstabilität für Desmopressin. Eine mögliche Begründung kann in der erhöhten Salzkonzentration liegen. Nach dem Trocknen kommt es innerhalb des Films zu einer Aufkonzentrierung der Salze, was die Stabilität von Peptiden und Proteinen negativ beeinflussen kann. Andererseits scheint die höher konzentrierte Pufferlösung (Citrat-Phosphatpuffer) des Films Citrat-a keinen Einfluss auf die Lagerstabilität zu haben. Der Gehalt an Desmopressin bleibt über 6 Monate unverändert. Im Falle des HPC-Pendants hingegen ist nach 3 Monaten eine Abnahme der Desmopressinkonzentration um 13 % zu verzeichnen. Salzsäure hingegen eignete sich im Fall des HPCs am besten zur pH-Wert-Einstellung und zeigte erst nach 6 Monaten offener Lagerung eine leichte Abnahme der Peptidkonzentration von 7 %. Auf Grund der schlechten mechanischen Eigenschaften des Films Citrat-a und des bestehenden Risikos einer Puffersalz-induzierten Instabilität des Desmopressins wurde auch im Falle des HPMCs die Salzsäure als der am besten geeignete pH-Regulator bewertet.

Da HPMC in den Vorversuchen zu den Modellpeptiden bereits als problematisch hinsichtlich der pH-abhängigen Peptidstabilität bewertet wurde, wurden an dieser Stelle noch weitere Stabilitätsuntersuchungen durchgeführt. Zur Auswahl des Polymers wurden daher weiterhin HPMC- und HPC-Einschichtfilme auf Salzsäurebasis offen und zusätzlich versiegelt in Aluminiumsachets als Primärpackmittel bei zwei verschiedenen Bedingungen (21 °C/45 % r.F. und 45 °C/75 % r.F.) für 3 Monate eingelagert und auf Veränderungen in Masse und Dicke sowie Desmopressingehalt und Stabilität untersucht (vgl. 6.2.8.3).

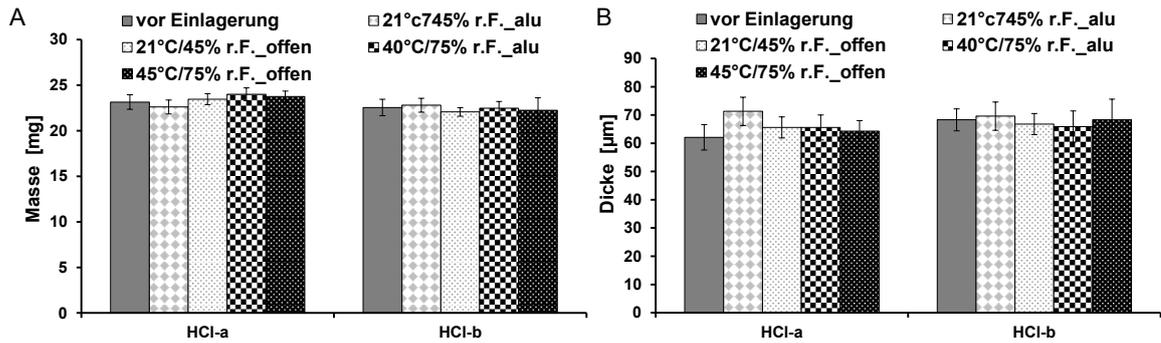


Abbildung 3.20: Massen (A) und Dicken (B) der Einschichtfilme (3 cm²) HCl-a und HCl-b vor und nach 3-monatiger Lagerung in Aluminiumsachets (alu) und offen in Glasgefäßen (offen) bei 21 °C/45 % r.F. und 45 °C/75 % r.F.; MW ± KI ($\alpha=0,05$); n=10

Ähnlich den Ergebnissen der Lagerungsstudie mit allen Einschichtfilmen waren auch hier nach 3-monatiger Lagerung keine Veränderungen in Masse oder Dicke zu verzeichnen (vgl. Abbildung 3.20).

Hinsichtlich des Desmopressingehalts ist anzumerken, dass beide Filme nach 3 Monaten bei 40 °C und 75 % r.F. sowohl offen als auch im Primärpackmittel gelagert eine deutliche Gehaltsabnahme zeigten (vgl. Abbildung 3.21). Die offen gelagerten HPMC-Einschichtfilme wiesen den geringsten Gehalt von nur etwa 10 % und einen im HPLC-Chromatogramm ersichtlichen starken Abbau auf. Im Allgemeinen resultierte HPC als filmbildendes Polymer in einer höheren Lagerstabilität, was auch die Ergebnisse, die mit den Modellpeptiden erhalten wurden, bestätigt und somit HPMC als filmbildendes Polymer für Desmopressin als wenig geeignet erscheinen lässt.

Folglich wurde HPC als geeigneter Filmbildner für die weitere Entwicklung einer pädiatrischen, filmförmigen Zubereitung zur orotransmukosalen Anwendung von Desmopressin ausgewählt.

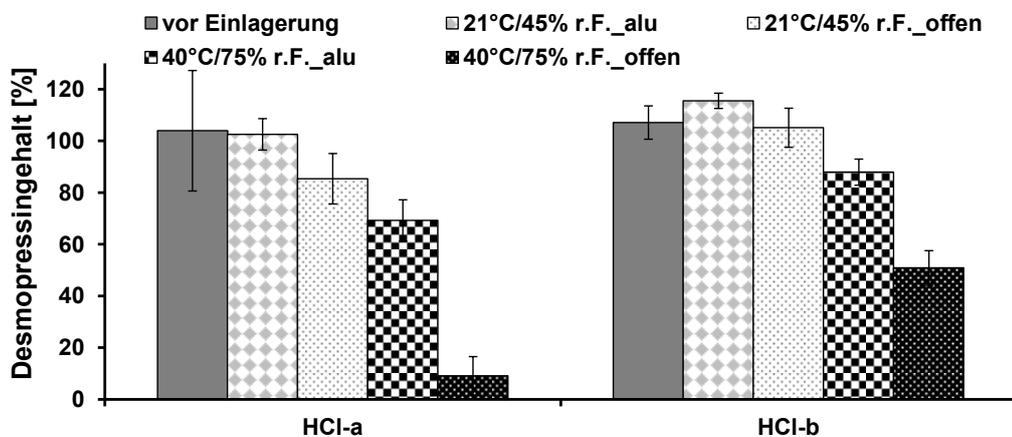


Abbildung 3.21: Desmopressingehalt der Einschichtfilme (3 cm²) HCl-a und HCl-b [%] bezogen auf den Sollwert; vor und nach 3-monatiger Lagerung in Aluminiumsachets (alu) und offen in Glasgefäßen (offen) bei 21 °C/45 % r.F. und 45 °C/75 % r.F.; MW ± KI ($\alpha=0,05$); n=10

3.2.3.5 Zusammenfassung

Ziel dieses Kapitels war die Herstellung einschichtiger Filme mit Desmopressinacetat. Dabei wurde der Fokus auf die pH-Wert abhängige Stabilität des Arzneistoffs gelegt, indem verschiedene pH-Regulatoren in die Filmzubereitungen eingearbeitet wurden, um einen pH-Wert von 5 einzustellen. Es wurden Puffersalze bzw. organische Säuren (Citronensäure, Maleinsäure und Natriummonohydrogenphosphat), anorganische Säuren (Salzsäure) und ein saures Polymer (Polyacrylsäure) zur pH-Einstellung sowie HPMC und HPC als filmbildende Polymere verwendet.

Die Polymerlösungen mit HPC und Puffersalzen als pH-Regulatoren eigneten sich nur bedingt zur Herstellung homogener und adäquater Filme, da die Polymerlösungen auf Grund ihres schlechten Spreitverhaltens auf der Intermediärfolie an den Rändern zusammen lief. Dadurch kam es zu Fehlodosierungen durch ungleichmäßig dicke Filme. Außerdem wurde eine Inkompatibilität zwischen Desmopressin und PA beobachtet, die später näher beschrieben wird.

Untersuchungen zur Lagerstabilität von Desmopressin in den Einschichtfilmen kamen zu dem Ergebnis, dass Salzsäure am besten zur pH-Einstellung geeignet ist. Puffersalze scheinen auf Grund der Aufkonzentrierung im Film bei der Trocknung einen negativen Einfluss auf die Stabilität des Desmopressins zu haben. Weiterhin konnten die Ergebnisse zu den Modellpeptiden hinsichtlich Eignung von HPMC zur Herstellung filmförmiger Zubereitungen für Peptide auch für Desmopressin bestätigt werden. HPMC zeigte auch hier eine deutlich schlechtere Lagerungsstabilität im Vergleich zu HPC.

Auf Basis der Ergebnisse dieses Teils der Arbeit wurden im Folgenden ausschließlich Mehrschichtfilme für die orotransmukosale Applikation von Desmopressin bei Kindern entwickelt, deren Wirkstoffmatrix aus dem filmbildenden Polymer HPC und Salzsäure als pH-regulierendem Agens bestehen.

3.2.4 Dreischichtfilme

3.2.4.1 Formulierungsentwicklung und Herstellung der Dreischichtfilme

Da Peptide sensibel gegenüber vielen Umgebungseinflüssen wie pH-Wert, Temperatur, Feuchtigkeit usw. sind, wurden zunächst Einschichtfilme hergestellt, um eine möglichst optimale Filmmatrix hinsichtlich der Wirkstoffstabilität zu gewährleisten. Im nächsten Schritt wurde sich den Anforderungen, die für die orotransmukosale Applikation wichtig sind, gewidmet. Um einen ausreichend langen Kontakt zwischen Film und Mukosa sicherzustellen, muss die Arzneiform hinreichende mukoadhäsive Eigenschaften aufweisen. Weiterhin soll ein Wirkstoffverlust über den GIT vermieden werden, wofür eine verlängerte, unidirektionale Peptidfreisetzung zur Mukosaseite von Vorteil ist. Um diesen Anforderungen gerecht zu werden, wurden mehrschichtige, filmförmige Zubereitungen entwickelt, die aus einer oberen mukoadhäsiven Schicht (MS), einer mittleren Wirkstoffschicht (WS) und einer unteren Abdeckschicht (AS) bestehen. Diese Dreischichtfilme wurden hinsichtlich morphologischer und mechanischer Eigenschaften sowie des Zerfalls untersucht. Weiterhin wurde der Gehalt sowie an einigen ausgewählten Zubereitungen auch die Lagerstabilität nach ICH getestet. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden außerdem die mukoadhäsiven Eigenschaften, das Freisetzungsverhalten und die *ex-vivo*-Permeation untersucht.

Die Rationale für den dreischichtigen Aufbau des Films (MS + WS statt WS mit mukoadhäsiven Zusätzen) lag zum einen in der bekannten Interaktion von Desmopressin mit einigen anionischen Polymeren (z.B. PA). Zum anderen kann unter Verwendung von nur einer mukoadhäsiven, wirkstoffhaltigen Schicht der Einsatz von Polymerkombinationen notwendig sein, wodurch unbekannte Einflussfaktoren die Stabilität des Desmopressins beeinträchtigen können. Um diese Aspekte zu umgehen, wurde eine zusätzliche MS implementiert.

Basierend auf der Formulierungsentwicklungsstudie in Abschnitt 3.2.2 wurden die Substanzen HPC, HPMC, PVP, Chitosan, PA und CMC als mukoadhäsive Polymere in der MS eingesetzt. EC wurde auf Grund seiner guten filmbildenden Eigenschaften ohne die Notwendigkeit weiterer Polymerzusätze als wasserunlösliches Polymer in der AS verwendet. Außerdem ist EC das am weitesten verbreitete Polymer in der Herstellung einer wasserunlöslichen Abdeckschicht (AS) in der Literatur [73, 100, 104]. HPC diente in den Filmzubereitungen weiterhin als Matrix für die WS. Demnach wurden innerhalb dieses Kapitels nur die Polymere der MS variiert. Die Zusammensetzung der WS und AS wurde konstant gehalten. Die Zusammensetzung der Filmschichten der einzelnen Formulierungen ist in Tabelle 3.6 aufgelistet.

Tabelle 3.6: Zusammensetzung der Polymerlösungen zur Herstellung der Filmschichten

Formulierung	MS		WS		AS	
HPC	HPC	15,0 %				
	Wasser	85,0 %				
HPMC	HPMC*	15,0 %				
	Glycerol	3,0 %				
	Wasser	82,0 %				
PVP	PVP	16,0 %				
	Glycerol	2,0 %				
	Wasser	82,0 %	Desmopressin	0,2 %	EC	16,0 %
Chito	Chito	2,5 %	HPC	15,0 %	Glycerol	3,5 %
	HPMC**	6,0 %	HCl 1N	0,2 %	Wasser	5,0 %
	Glycerol	2,0 %	Wasser	84,6 %	Ethanol	75,5 %
	HCl 0,1 N	89,5 %				
PA	PA	2,5 %				
	Glycerol	2,0 %				
	Wasser	95,5 %				
CMC	CMC	6,0 %				
	Glycerol	2,0 %				
	Wasser	92,0 %				

*Pharmacoat® 606; **Pharmacoat® 603; HPC: Klucel® ELF; PVP: Kollidon® 90; Chito: Chitosan 85 % deacetyliert; PA: Carbopol® 971P NF; CMC; Walocel® C2000 PA07; EC: Aqualon® N22; Ethanol: 99 %

Die untersuchten mukoadhäsiven Polymere unterscheiden sich nicht nur in ihrer chemischen Struktur, sondern auch in der Kettenlänge und dem MG. Es musste demnach empirisch ermittelt werden, welche Polymerkonzentration sich für das Ausziehen zu einem Film eignet. In der Herstellung filmförmiger Zubereitungen mittels Ausziehen einer Polymermasse mit einer Rakel muss ein Kompromiss zwischen Viskosität und Feststoffanteil gefunden werden. Bei einem Polymer mit hohem MG und gutem Quellvermögen (z.B. CMC, Walocel® C2000 PA07) darf die Konzentration des Polymers in der Lösung nicht zu hoch gewählt werden, da die Viskosität zu stark ansteigt und das Ausziehen erschwert. Es kann zur Aufstauung der Polymermasse vor der Rakel kommen, wodurch zu dünne, teilweise löchrige Filme entstehen. Andererseits kann die Polymerkonzentration auch nicht zu niedrig gewählt werden, da sonst der Feststoffanteil zu gering ist und ebenfalls dünne oder instabile Filme entstehen.

Auf Grund dieser Kompromissfindung wurden die mukoadhäsiven Polymere in unterschiedlichen Konzentrationen (vgl. Tabelle 3.6) und Viskositäten (vgl. Tabelle 3.7) eingesetzt, um möglichst optimale Bedingungen zur Filmherstellung zu erzielen. Da diese Polymerlösungen allerdings zur Bildung der MS dienen und keinen Einfluss auf die Wirkstoffverteilung im Film haben sollten, wurden die dynamische Viskositäten an dieser Stelle zwar bestimmt, die Unterschiede jedoch als unkritisch bewertet.

Zur Verbesserung der Auszieh- und Filmbildungsfähigkeit musste für Chitosan eine zusätzliche Erhöhung des Feststoffanteils durch Zugabe von niedrig molekularer HPMC vorgenommen werden. So konnte der zuvor beobachteten Bildung von Löchern im Film entgegengewirkt werden. Trotz des niedrigen Feststoffanteils im Fall der PA wurden hier keine Löcher beobachtet und es war kein Zusatz von HPMC notwendig.

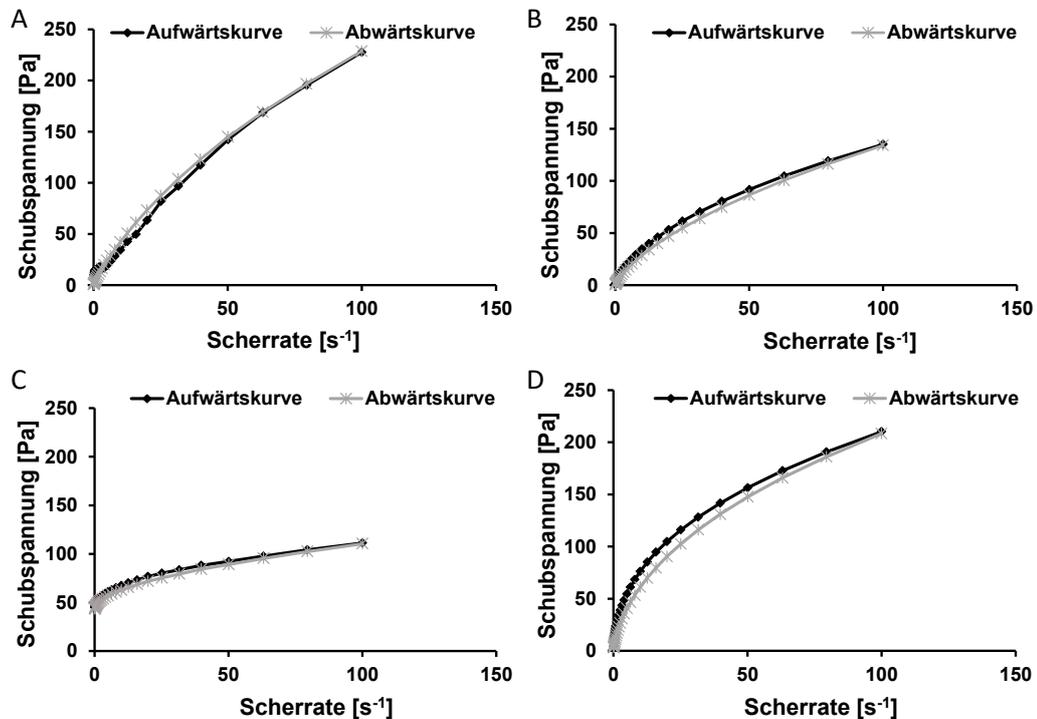


Abbildung 3.22: Rheogramme der Polymerlösungen zur Herstellung der MS (Tabelle 3.6); PVP (A); Chito (B); PA (C); CMC (D)

Tabelle 3.7: Viskositäten der Polymerlösungen zur Herstellung der MS; Scherrate 20 s^{-1} ; MW; $n=3$

MS	HPC	HPMC	PVP	Chito	PA	CMC
Viskosität [Pa*s]	0,9	1,5	2,1	2,5	3,6	4,8

Die Untersuchungen zum Fließverhalten der Polymerlösungen (vgl. Abschnitt 6.2.1.3) in Abbildung 3.22 bzw. Abbildung 3.13 B (vgl. Abschnitt 3.2.3.1) zeigen große Unterschiede zwischen den Polymeren. Während PVP (Abbildung 3.22 A),

HPC und HPMC (Abbildung 3.13 A und B) ein überwiegend idealviskoses Fließverhalten zeigen, wurde bei Chitosan (Abbildung 3.22 B) und CMC (Abbildung 3.22 D) ein pseudoplastisches Fließverhalten beobachtet. PA (Abbildung 3.22 C) verhielt sich plastisch wie ein Casson-Körper mit einer Fließgrenze von etwa 50 Pa. Außerdem kann bei CMC ein leichter Thixotropie-Effekt erkannt werden. Es ist bekannt, dass bei höherer Viskosität der Lösung oder höherem Anteil der dispersen Phase sich das idealviskose zu einem pseudoplastischen Fließverhalten verschieben kann [173]. Vergleicht man die erhaltenen Rheogramme (Abbildung 3.22) mit den gemessenen dynamischen Viskositäten bei 20 s^{-1} (Tabelle 3.7), so ist zu erkennen, dass die höher viskosen Polymerlösungen (Chitosan, PA und CMC) ein pseudoplastisches bzw. plastisches Fließverhalten zeigen und sich die Proben mit der niedrigeren Viskosität eher idealviskos verhalten (HPMC, HPC und PVP).

Nach Einstellung der geeigneten Viskosität wurden Dreischichtfilme hergestellt, indem zunächst die AS ($300 \mu\text{m}$ Nassfilmdicke) ausgezogen und getrocknet wurde. Anschließend wurden die WS ($500 \mu\text{m}$ Nassfilmdicke) und nach dem Trocknen die MS ($300 \mu\text{m}$ Nassfilmdicke) übereinander ausgezogen (vgl. Abschnitt 6.2.3).

3.2.4.2 Morphologie

In Abbildung 3.23 sind die Massen und Dicken der Dreischichtfilme dargestellt (vgl. Abschnitt 6.2.4.1 und 6.2.4.2). Es wurde eine Filmgröße von 3 cm^2 gewählt, da diese in der Literatur für die Anwendung als akzeptabel beschrieben wird [63]. Der Aspekt der Textur bzw. Palatibilität ist wichtig zu berücksichtigen, denn die Arzneiform verbleibt auf Grund der angestrebten orotransmukosalen Permeation des Desmopressins über einen längeren Zeitraum in der Mundhöhle.

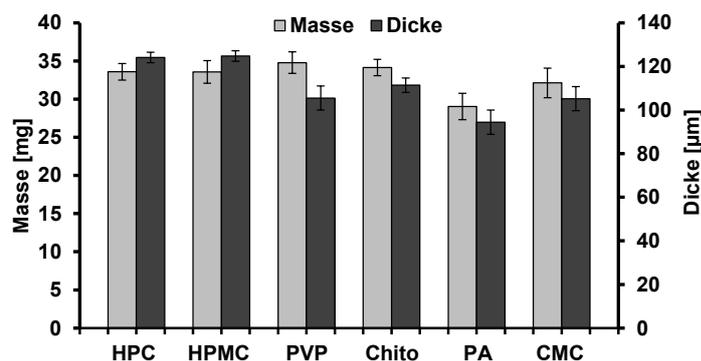


Abbildung 3.23: Masse und Dicke der Dreischichtfilme (3 cm^2) mit unterschiedlichen mukoadhäsiven Polymerschichten; $\text{MW} \pm \text{KI}$ ($\alpha=0,05$); $n=10$

Mit Ausnahme von Formulierung PA wiesen alle Filme eine vergleichbare Masse zwischen 33 und $35 \text{ mg}/3 \text{ cm}^2$ auf. Die geringere Masse und Dicke der PA-Filme kann mit dem niedrigeren Feststoffanteil der MS erklärt werden. Die Dreischichtfilme wiesen eine Dicke zwischen 95 und $120 \mu\text{m}$ auf und lagen somit

unter der in der Literatur angegebenen maximal tolerierten Akzeptanzgrenze von 350 μm [175]. Die Filme HPC und HPMC waren dicker als die anderen Zubereitungen. Eine mögliche Begründung kann in der niedrigeren Viskosität der beiden Lösungen liegen (vgl. Tabelle 3.7). Niedrig viskose Lösungen können nach dem Ausrakeln der Polymerlösung ein leichtes Zusammenlaufen zeigen. Visuelle Beurteilungen bestätigten dies zwar nicht, allerdings ist zu beachten, dass die Lösung nicht auf einer glatten Intermediärfolie, sondern auf der WS ausgezogen wurde, wodurch ein leichtes Zusammenlaufen schwieriger zu erkennen ist.

Die REM wurde als bildgebende Analysemethode herangezogen, um zu überprüfen, ob die Filmschichten getrennt voneinander vorliegen oder ob während des Herstellungs- und Trocknungsprozesses Übergänge zwischen den Filmschichten stattgefunden haben (vgl. Abschnitt 6.2.4.6). Dies kann besonders dann auftreten, wenn beide in Kontakt stehenden Polymere in den verwendeten Lösungsmitteln löslich sind oder der Trocknungsprozess der ersten Schicht beim Kontakt mit der nächsten Polymerlösung noch nicht abgeschlossen ist [119]. Die Filmschichten der in dieser Arbeit hergestellten filmförmigen Zubereitungen sollten nach Möglichkeit getrennt voneinander vorliegen, um die Wirkstoffdiffusion aus der mittleren WS in die untere AS auszuschließen. Außerdem sollte die Stabilität des Desmopressins durch in der MS befindliche Hilfsstoffe, wie beispielsweise PA, nicht beeinflusst werden.

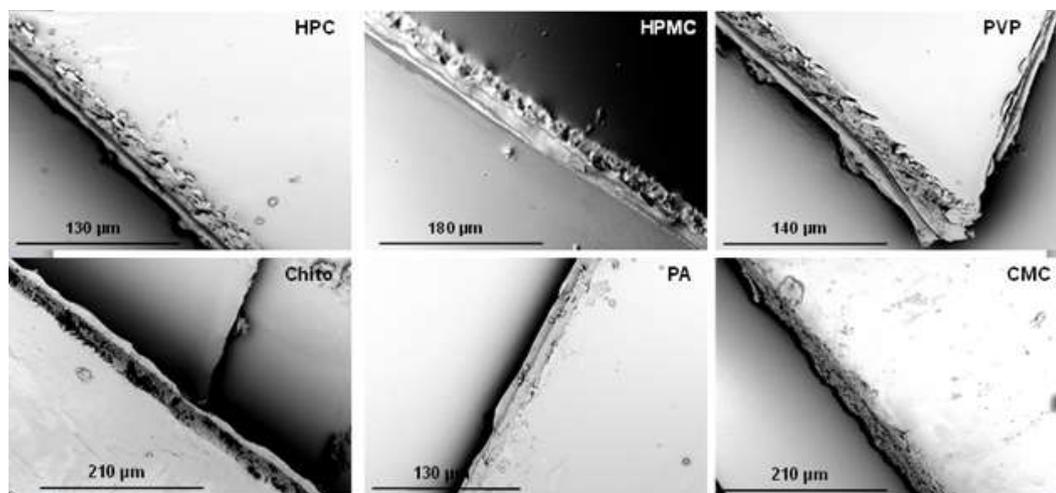


Abbildung 3.24: REM-Aufnahmen der Dreischichtfilme mit unterschiedlichen mukoadhäsiven Schichten

Demnach wurden REM-Aufnahmen von den Filmrändern angefertigt, die in Abbildung 3.24. dargestellt sind. Die Oberseite stellt dabei die obere Filmschicht (MS) dar. Bei den Filmen HPC, HPMC, PVP und Chitosan kann leicht zwischen den Filmschichten differenziert werden. Durch das Zerschneiden der Filme kann sich die Oberseite am Rand der Filme etwas nach oben wölben, wodurch die MS in der seitlichen Perspektive dick und porös erscheint. Diese Beobachtung wurde bei PVP

besonders deutlich. Bei den Filmen mit PA und CMC sind die Filmschichten nicht klar voneinander abzugrenzen. Auf Grund des geringen Feststoffanteils der Polymerlösungen mit PA und CMC wurde bereits beim Ausziehvorgang beobachtet, dass die Polymermassen zu viskos waren, um gleichmäßig unter der Rakel im Spalt herzulaufen. Angesichts der Fließgrenze der PA-Masse musste diese zu Beginn manuell vor der Rakel verteilt werden, bevor das automatische Ausziehen begonnen werden konnte. Das Resultat waren dünne Filme mit einer ungleichmäßigen Oberfläche.

3.2.4.3 Mechanische Eigenschaften

Die in dieser Arbeit entwickelten dreischichtigen filmförmigen Zubereitungen sollen die finale Arzneiform zur orotransmukosalen Applikation des Peptids Desmopressin darstellen. Geeignete mechanische Eigenschaften der Filme sind von essentieller Bedeutung. Beginnend beim Herstellungsprozess in der pharmazeutischen Industrie bis hin zur Anwendung durch den Patienten durchlaufen die Filme viele Schritte, an denen sie mechanischen Beanspruchungen ausgesetzt sind. Außerdem verlangt das Ph. Eur. eine ausreichende mechanische Festigkeit für filmförmige Zubereitungen. Angaben zu Grenzwerten oder Testmethoden werden allerdings nicht zur Verfügung gestellt. Die in der Literatur veröffentlichten Methoden zur Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften bedienen sich daher meist den standardisierten Testverfahren aus anderen industriellen Bereichen wie beispielsweise der DIN EN ISO Norm 14477 „Verpackung, Flexible Packstoffe – Bestimmung der Durchstoßfestigkeit“ des Deutschen Instituts für Normung [176, 177], die für die in dieser Arbeit verwendete Methode von Preis et al. modifiziert wurde [146]. Der Film wird waagrecht in einen Probenhalter eingespannt und mit einem Stempel durchstoßen, wobei Kraft und Weg aufgezeichnet werden (vgl. Abschnitt 6.2.13). Diese Methode wurde bisher nur für einschichtige, orodispersible Film genutzt und im Rahmen dieser Arbeit erstmals für mehrschichtige Filme angewendet. Die in der Literatur verwendeten Methoden zur mechanischen Charakterisierung von Mehrschichtfilmen beschränken sich auf Zugprüfungen [84, 88] oder Untersuchungen zum Faltungsverhalten der Mehrschichtfilme [99, 103], wodurch eine Vergleichbarkeit der Messergebnisse nur bedingt gegeben ist.

Laut Literatur sollen die mechanischen Eigenschaften filmförmiger Zubereitungen durch eine hohe Bruchspannung, eine hohe Dehnung und einen niedrigen Elastizitätsmodul charakterisiert sein [9, 62]. Generell ist ein Vergleich mit Literaturdaten nur bedingt möglich, da die mechanischen Eigenschaften zum einen von der Zubereitung (Restwassergehalt, Weichmacherzusatz oder Weichmachereigenschaften von Wirk- bzw. Hilfsstoff) und deren Lagerungs- bzw. Umgebungsbedingungen (Raumtemperatur und Feuchte) und zum anderen von der verwendeten Methode (Durchstoßfestigkeit oder Zugfestigkeit) abhängig sind. Die hier vermessenen Filme wurden vor der Messung unter kontrollierten Bedingungen

gelagert (21 °C/45 % r.F.). Zur Beurteilung der mechanischen Eigenschaften wurden die Durchstoßkraft, die maximale Dehnung bis zum Bruch, die Arbeit sowie die Steigung herangezogen (vgl. Abschnitt 6.2.13). Aus Vergleichsgründen wurde auch ein Einschichtfilm (HCl-b) vermessen. Alle Filme waren mit einem Anteil von 240 µg Desmopressin vergleichsweise niedrig dosiert. Ein Einfluss der Arzneistoffbeladung auf die mechanischen Eigenschaften des Films wurde damit ausgeschlossen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.25 und Abbildung 3.26 dargestellt.

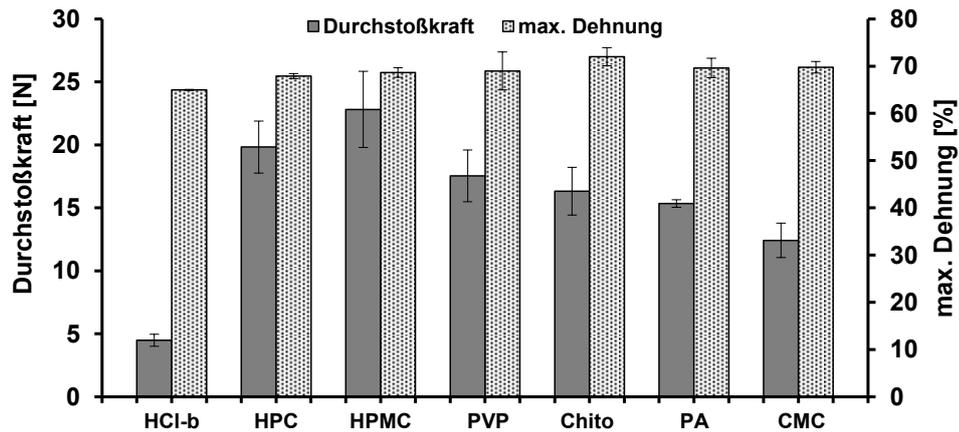


Abbildung 3.25: Durchstoßkraft und maximale Dehnung bis zum Bruch der Ein- und Dreischichtfilme; MW ± KI ($\alpha=0,05$); n=6

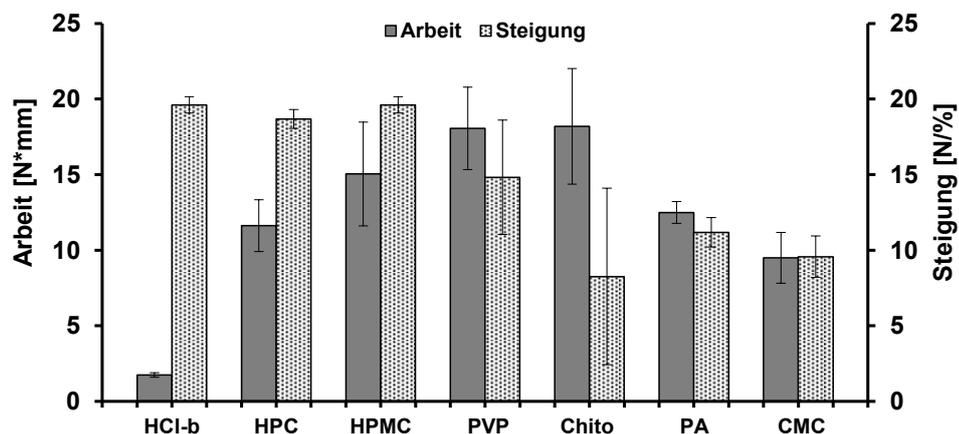


Abbildung 3.26: Arbeit und Steigung des linearen Abschnitts des Kraft-Weg Diagramms der Ein- und Dreischichtfilme; MW ± KI ($\alpha=0,05$); n=6

Der Einschichtfilm HCl-b zeigte auf Grund der geringsten Dicke (20 µm) die niedrigste Durchstoßkraft von 4,5 N (bzw. Durchstoßfestigkeit 0,3 N/mm²). Die Bruchkräfte der Dreischichtfilme lagen in einem Bereich zwischen 12 und 23 N (bzw. Durchstoßfestigkeit 0,7-1,3 N/mm²). Auf Grund der hohen Streuung waren kaum Unterschiede in den Durchstoßkräften der Dreischichtfilme zu verzeichnen.

PA und CMC zeigten tendenziell niedrigere Durchstoßkräfte, was wiederum mit den niedrigeren Filmdicken erklärt werden kann. Literaturdaten zu mechanischen Eigenschaften orodispersibler Einschichtfilme, die ebenfalls mit der hier verwendeten Methode untersucht wurden, zeigten, dass die gemessenen Durchstoßfestigkeiten von 0,7-1,3 N/mm² vergleichbar sind [146, 178]. Die maximale Dehnung war mit einem Wert von etwa 65 % bei allen Filmen ähnlich. Die meisten Literaturdaten liegen unterhalb der in der vorliegenden Arbeit gemessenen Werte. Im Allgemeinen ist eine hohe Dehnung der Filme erwünscht. Allerdings könnte eine zu starke Dehnung der Filme während des Ablösens von der Intermediärfolie zu einer Unterdosierung der Filme führen. Da während der weiteren Behandlung der Filme weder Probleme auftraten noch Unterdosierungen oder signifikante Gehaltsschwankungen auftraten, wurde die vergleichsweise hohe Dehnung als unkritisch bewertet. Die Arbeit, als Fläche unter der Kraft-Weg-Kurve dargestellt, zeigte teils hohe Streuungen bei den einzelnen Filmzubereitungen. Während der Messungen wurden bei einigen Dreischichtfilmen zwei Peaks im Kraftverlauf detektiert (vgl. Abbildung 3.27). Der zweite Kraftpeak könnte damit erklärt werden, dass bei dem Kraftmaximum noch nicht alle Schichten durchtrennt wurden und zur Durchtrennung der letzten Schichten bzw. des gesamten Films ein weiter leichter Kraftanstieg notwendig ist. Bei der nachträglichen visuellen Begutachtung der Filme konnten allerdings keine Anzeichen einer Schichtentrennung festgestellt werden. Durch einen zweiten Kraftanstieg erhöht sich die Fläche unter der Kurve. Es wird allerdings kein Einfluss auf die Durchstoßkraft, maximale Dehnung oder die Steigung genommen. Im Allgemeinen sind die gemessenen Wert für die Arbeit mit Literaturdaten, einschließlich Marktprodukten, vergleichbar [146, 178].

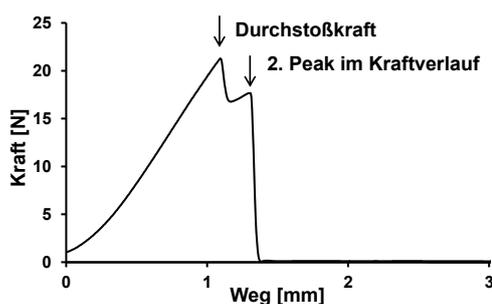


Abbildung 3.27: Kraft-Weg-Diagramm und Markierung der beiden Peaks im Kraftverlauf am Beispiel eines PVP-Dreischichtfilms

Die Steigung wurde als Maß für die Steifigkeit beschrieben [178]. Der Einschichtfilm und die Dreischichtfilme mit HPC, HPMC sowie PVP als mukoadhäsive Polymere wiesen eine höhere Steigung auf als die Filme mit PA, Chitosan und CMC. Die Filme mit Chitosan, PA und CMC als mukoadhäsive Polymere enthielten einen, auf die Feststofffraktion bezogen, höheren Weichmacheranteil (2 % Glycerol auf 8,5/2,5/6 % Feststoff, vgl. Tabelle 3.6) verglichen mit den Filmen mit HPC, PVP und HPMC (2/3 % Glycerol auf 15/16/15 % Feststoff, vgl. Tabelle 3.6). Glycerol

wirkt als äußerer Weichmacher, indem es die molekularen Wechselwirkungen der Polymerketten reduziert. Ein auf die Polymerfraktion bezogener höherer Glycerolanteil kann sich demnach auf die Anordnung der Polymerketten ausüben und somit die Steifigkeit der Filme beeinflussen. Zu erwähnen bleibt an dieser Stelle jedoch, dass der höhere Glycerolanteil keinen Einfluss auf die Dehnung, d.h. die Längenänderung der Filme, wohl aber auf die Durchstoßkraft zu haben scheint (vgl. Abbildung 3.25).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Dreischichtfilme hinsichtlich ihrer mechanischen Eigenschaften als gut geeignet zu bewerten sind. Die mechanische Charakterisierung der Durchstoßkraft, Dehnung, Arbeit und Steifigkeit ergab vergleichbare Ergebnisse zu Literaturdaten orodispersibler Filme, Marktprodukte eingeschlossen.

3.2.4.4 Zerfall

Dreischichtfilme wurden unter anderem mit der Intention entwickelt, nicht schnell im Mund zu zerfallen und den Wirkstoff über einen angemessenen Zeitraum über die orale Schleimhaut zur Absorption zu bringen. Die nicht wasserlösliche AS sollte demnach einem schnellen Zerfall entgegen wirken, was im Folgenden mit drei in der Literatur beschriebenen Methoden zur Bestimmung der Zerfallszeit orodispersibler Filme (vgl. Abschnitt 6.2.14) untersucht wurde [110, 113, 179].

Weder bei der Diarahmenmethode (vgl. Abschnitt 6.2.14.1) oder der Petrischalenmethode (vgl. Abschnitt 6.2.14.2 [110, 113]) noch unter Verwendung des modifizierten Zerfallstesters für Tabletten nach Preis et al. [179] (vgl. Abschnitt 6.2.14.3), der eine zusätzliche mechanische Beanspruchung der Probe bewirkt, wurde ein Zerfall der Dreischichtfilme innerhalb 20 min Messzeit detektiert. Die Dreischichtfilme wurden nach der Messzeit noch weiter im Messaufbau beobachtet und zeigten auch danach noch keinen Zerfall. Es wurden zusätzlich vergleichende Untersuchungen an dem Einschichtfilm HCl-b durchgeführt. Diese Untersuchungen ergaben einen für orodispersible Einschichtfilme typischen schnellen Zerfall (Tabelle 3.8).

Tabelle 3.8: Zerfallszeiten des Einschichtfilms HCl-b; MW \pm s; n=6

Diarahmenmethode	Petrischalenmethode	Modifizierter Zerfallstester
53 \pm 2,1 s	8,6 \pm 6,9 s	8,7 \pm 0,7 s

3.2.4.5 Gehaltsbestimmung

Die Ergebnisse der Gehaltsbestimmung und der Prüfung auf Gleichförmigkeit einzeldosierter Arzneiformen (vgl. Abschnitt 6.2.7.1 und 6.2.7.4, UV-Detektion) der Dreischichtfilme ist in Abbildung 3.28 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass, mit

Ausnahme der Formulierung PA, alle Dreischichtfilme einen Desmopressingehalt zwischen 93 und 100 % aufwiesen und den Anforderungen des Ph. Eur. entsprachen ($AV < 15$). Trotz des etwas niedrigeren Desmopressingehalts des PVP-Films von etwa 93 % entsprach dieser auf Grund geringer Gehaltsunterschiede der Monographie 2.9.40. Der Chitosan-Film lag mit einem AV von 14 nur leicht unterhalb der Grenze im ersten Prüfschritt. Sollte dieser Film als finale Zubereitung für die orotransmukosale Applikation von Desmopressin ausgewählt werden, wäre in weiteren Schritten eine Optimierung der Zubereitung hinsichtlich Gleichförmigkeit des Gehaltes von Nöten. Bei keiner der Zubereitungen waren Abbaureaktionen im HPLC-Chromatogramm ersichtlich. Der Dreischichtfilm mit PA als mukoadhäsives Polymer resultierte in einem zu niedrigen und stark schwankenden Gehalt ($AV > 15$). Bereits die Untersuchungen zu einschichtigen Desmopressinfilmen mit PA als pH-Regulator zeigten einen zu niedrigen Wirkstoffgehalt (vgl. Abbildung 3.16). Die Vermutung der Bildung eines nicht nachweisbaren Polyelektrolytkomplexes zwischen Desmopressin und PA wurde demnach weiterhin verstärkt und in Kapitel 3.2.5 näher erläutert.

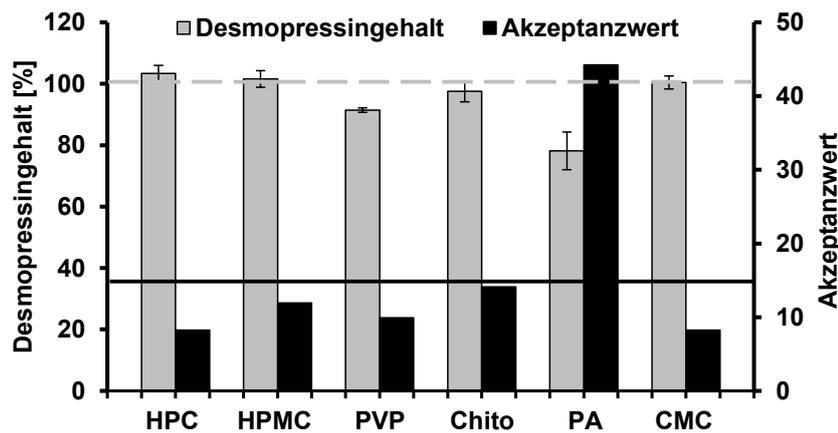


Abbildung 3.28: Desmopressingehalt der Dreischichtfilme mit unterschiedlichen mukoadhäsiven Polymerschichten (3 cm^2) [%] bezogen auf den Sollwert; Gehaltsgrenze (100 %; gestrichelte Linie); $MW \pm KI$ ($\alpha=0,05$); $n=10$ und AV gemäß Ph. Eur. 2.9.40; AV-Grenze (15; durchgezogene Linie)

Es wurden Dreischichtfilme mit verschiedenen mukoadhäsiven Schichten hergestellt, um diese im weiteren Verlauf hinsichtlich der mukoadhäsiven Eigenschaften zu charakterisieren. Die Literatur bietet eine Vielzahl an Möglichkeiten zur Bestimmung der Mukoadhäsion von halbfesten oder festen Zubereitungen. Vor allem im Bereich der verwendeten Mukosamaterialien bzw. der Ersatzmaterialien stößt man innerhalb der Literatur auf eine hohe Variabilität. Aus diesem Grund wurden innerhalb der Methodenentwicklung zur Bestimmung der mukoadhäsiven Eigenschaften der Dreischichtfilme verschiedene Materialien hinsichtlich ihrer Eignung getestet. Dies ist Bestandteil des ausführlichen Kapitels 3.2.6. Zur Erklärung des weiteren Vorgehens muss den Ergebnissen der Mukoadhäsionsstudien zu den Dreischichtfilmen an sublingualer Mukosa (Abbildung 3.46 und Abbildung

3.47) und Gelatinegel 10 % (vgl. Abbildung 3.48 und Abbildung 3.49) bereits an dieser Stelle vorweggegriffen werden. Auf der Basis dieser Studien wurde eine Auswahl an Dreischichtfilmen getroffen, die auf Grund ihrer am stärksten ausgebildeten mukoadhäsiven Eigenschaften für Lagerungsstudien nach ICH [180] herangezogen wurden. Folglich wurden die Dreischichtfilme mit PVP, Chitosan und PA als mukoadhäsive Polymerschichten in die Lagerungsstudie mitaufgenommen.

3.2.4.6 Lagerstabilität nach ICH

Zur Untersuchung der Lagerstabilität wurden demnach die Dreischichtfilme mit PVP, Chitosan und PA für 3 und 6 Monate offen in einem Glasbehälter und in Aluminiumsachets als Primärpackmittel bei 21 °C/45 % r.F. und 40 °C/75 % r.F. eingelagert. Es wurde eine an die Q1A-ICH Leitlinie angeglichene Lagerungsstudie durchgeführt [180]. Diese Leitlinie beinhaltet die für die Zulassung eines Arzneimittels notwendigen Stabilitätsprüfungen. Unter anderem wird eine Prüfung des Arzneimittels im Primärpackmittel unter Stressbedingungen (40 °C/75 % r.F.) über mindestens 6 Monate gefordert.

Trotz des niedrigen Desmopressingehalts der Filme mit PA wurden diese in die Lagerungsstudie mit aufgenommen, um zu testen, ob Desmopressin auf Grund der beobachteten Interaktion in der Anwesenheit von PA Unterschiede in der Lagerungsstabilität zeigt (vgl. Abschnitt 6.2.8.3). Anschließend wurden die Filme hinsichtlich Veränderungen der morphologischen Eigenschaften (Aussehen der Filme, Masse- und Dickenbestimmung, REM-Aufnahmen) sowie der Stabilität (Desmopressingehalt und Abbauprodukte im HPLC-Chromatogramm) untersucht. Die Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt und diskutiert.



Abbildung 3.29: Visuelle Bewertung der Dreischichtfilme (3 cm²) PVP, Chitosan und PA nach 3 Monaten Lagerung bei 21 °C/45 % r.F. in Aluminiumsachets und offen in Glasbehältern sowie bei 40 °C/75 % r.F. in Aluminiumsachets und offen in Glasbehältern (von links nach rechts)

Abbildung 3.29 zeigt die Veränderungen des Aussehens der Dreischichtfilme unter den unterschiedlichen Lagerungsbedingungen 21 °C/45 % r.F. im Aluminiumsachet und offen gelagert sowie 40 °C/75 % r.F. im Aluminiumsachet und offen gelagert (von links nach rechts). Allgemein konnte bei allen Dreischichtfilmen nach offener Lagerung unter beiden Bedingungen ein Zusammenrollen der Filme beobachtet werden, wohingegen die im Primärpackmittel gelagerten Filme diese Veränderung nicht zeigten. Filmförmige Zubereitungen werden auf Grund der hohen spezifischen Oberfläche von Umgebungsbedingungen wie Temperatur und relativer Feuchte beeinflusst. Bei der Lagerung in Aluminiumsachets werden die Filme unter

Ausschluss großer Luftmengen eingeschweißt, wodurch sie zum einen über die Lagerungszeit in Form gehalten werden und zum anderen fast kein Luftaustausch möglich ist. Die Raumfeuchte nimmt demnach einen weniger starken Einfluss auf die Filme im Vergleich zur offenen Lagerung. Um ein Zusammenrollen oder Verkleben der Filme während der offenen Lagerung zu vermeiden, wurden sie oft in Diarahmen eingespannt [173, 181]. Auf Grund der Größe der Dreischichtfilme von 3 cm² war das in diesem Fall nicht möglich. Die Dreischichtfilme, die bei 21 °C/45 % r.F. gelagert wurden, zeigten keine Veränderungen in Farbe oder Trübung. Die Lagerung im Aluminiumsachet bei 40 °C/75 % r.F. führte nur bei Chitosan zu einer leichten Gelbfärbung der Filme. Das Aussehen aller anderen Filme blieb unverändert. Die Löslichkeit von Chitosan ist pH-abhängig (pH < 6,5) [182]. Eine erhöhte Raumfeuchte könnte demnach Einfluss auf die Löslichkeit des Chitosans haben. Außerdem wurde für Chitosan eine Temperaturempfindlichkeit beschrieben, die ebenfalls für die Gelbfärbung der Filme verantwortlich sein kann [182]. Alle offen gelagerten Filme zeigten bei 40 °C/75 % r.F. eine Trübung, wodurch sie weißer oder im Fall des Chitosans gelber erschienen. Diese Beobachtung kann mit der höheren Luftfeuchte erklärt werden. Bei Kontakt mit Wasser kam es in der Abdeckschicht, bedingt durch die wasserunlösliche EC, zu einer stärker ausgeprägten Trübung.

Die Ergebnisse der Filmmassen und Dicken nach 3- und 6-monatiger Lagerung unter den beiden Bedingungen sind in Abbildung 3.30 dargestellt (vgl. Abschnitt 6.2.4.1 und 6.2.4.2). Die waagerechte gestrichelte Linie markiert das Gewicht bzw. die Filmdicke vor der Lagerung. Trotz der teils stark ausgeprägten Veränderung des äußeren Erscheinungsbildes der Dreischichtfilme waren nach der Lagerung bei keiner der Versuchsbedingungen Unterschiede in den Filmmassen und -dicken zu verzeichnen. Im Fall der Filme, die offen bei 40 °C/75 % r.F. gelagert wurden, war es nicht möglich, die Dicke zu bestimmen. Die Filme lagen in einem stark zusammengerollten Zustand vor und beim Versuch des Auseinanderfaltens zerbrachen sie. Um die Filme für die weitere Gehaltsbestimmung nicht zu zerstören, wurde daher auf eine Dickenbestimmung verzichtet. Die Filme wiesen demnach, entgegen den Erwartungen, eine höhere Sprödigkeit auf. Man würde davon ausgehen, dass die Filme Wasser aus der Umgebung aufnehmen und ein eher flexibleres Verhalten zeigen. Auf der anderen Seite kann es durch die höhere Temperatur zu einem Wasserverlust der Filme kommen, wodurch das brüchige Verhalten erklärt werden könnte. Da die Unterseite der Filme aus wasserunlöslicher EC besteht, die bei Wasseraufnahme eine Trübung zeigt (vgl. Abbildung 3.29), was auf eine Ausfällung oder das Vorhandensein von EC-Partikeln hindeutet, kann dies zum Herabsinken der Elastizität der Filme führen. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits für einschichtige Suspensionsfilme mit dem Wirkstoff Loperamid gemacht [173]. Auch hier wurde das brüchige Verhalten nach Lagerung bei 40 °C/75 % r.F. auf einen möglichen Wasserverlust bei hohen Temperaturen zurückgeführt.

REM-Aufnahmen (vgl. Abschnitt 6.2.4.6) der Dreischichtfilme nach 6-monatiger Lagerung unter beiden Bedingungen zeigten keine Veränderungen, die auf eine Vermischung der Schichten hindeuten (Ergebnisse nicht gezeigt). Demnach führen selbst hohe Raumfeuchten von 75 % r.F. zu keiner Veränderung der Schichtenstruktur der Filme.

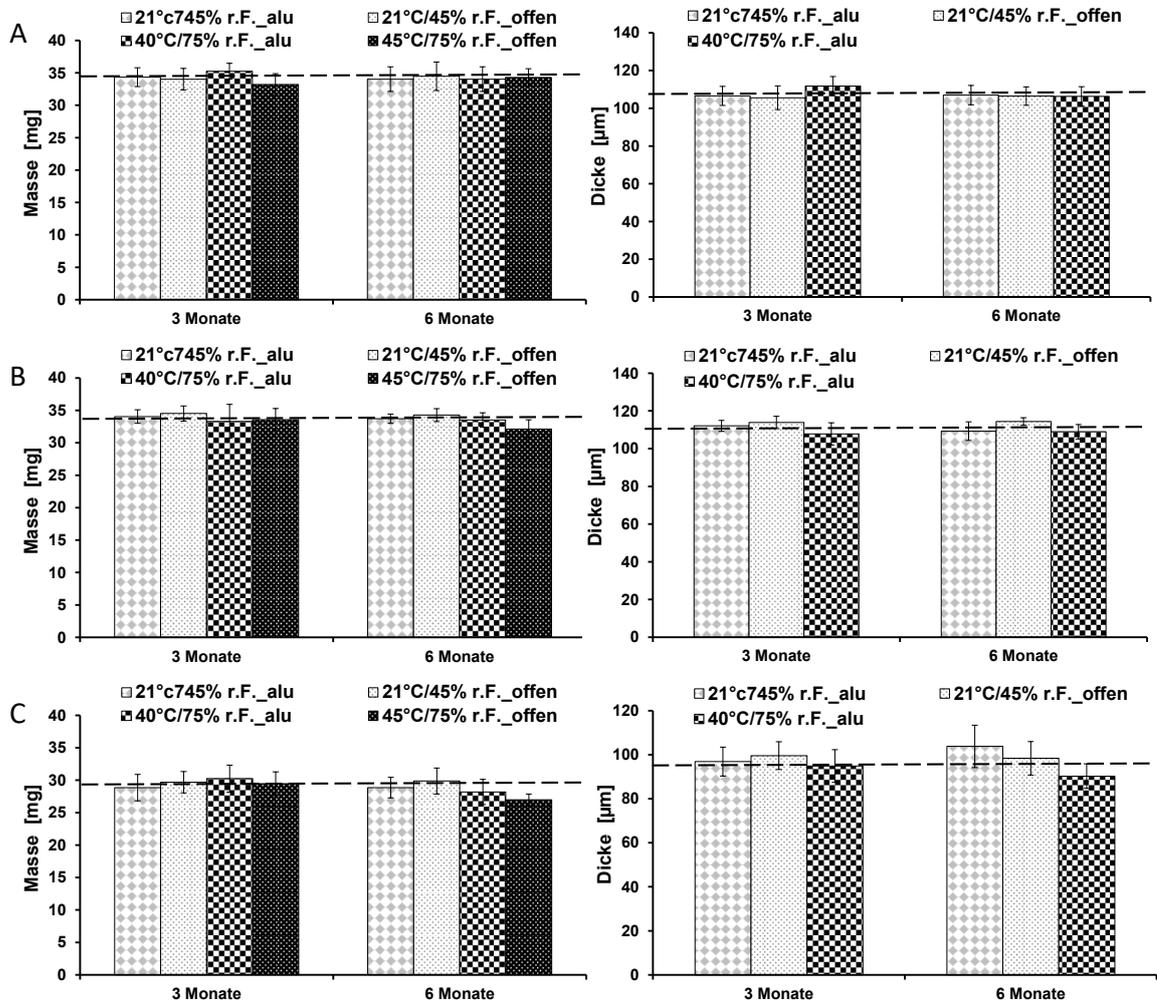


Abbildung 3.30: Massen und Dicken der Dreischichtfilme (3 cm²) „PVP“ (A), „Chito“ (B) und „PA“ (C) nach 3 und 6 Monaten Lagerung in Aluminiumsachets (alu) und offen in Glasgefäßen (offen) bei 21 °C/45 % r.F. und 45 °C/75 % r.F.; (- -) Masse bzw. Dicke vor der Lagerung; MW ± KI ($\alpha=0,05$); n=10

Die Ergebnisse der Lagerstabilität einschließlich des Desmopressingehalts und der beobachteten Abbauprodukte im HPLC-Chromatogramm sind in Abbildung 3.31, Abbildung 3.33 und Abbildung 3.34 dargestellt und werden im Folgenden getrennt für jede Formulierung diskutiert (vgl. Abschnitt 6.2.7.4, UV-Detektion). Die gestrichelten Linien in den Säulendiagrammen markieren jeweils den Ausgangsgehalt der Filme vor der Lagerung. Die gestrichelten Kästchen sollen die entstandenen Abbauprodukte im HPLC-Chromatogramm hervorheben. Begonnen wird mit PVP (Abbildung 3.31). Es ist zu erkennen, dass der PVP-Dreischichtfilm selbst bei offener Lagerung über einen Zeitraum von 6 Monaten bei 21 °C/45 % r.F.

keine Veränderungen der Konzentration zeigte. Auch die Untersuchung der HPLC-Chromatogramme bestätigte dies. Die Lagerung der Filme bei 40 °C/75 % r.F. zeigte hingegen bereits nach 3-monatiger Lagerung im Primärpackmittel einen reduzierten Desmopressingehalt von etwa 85 %, der nach weiteren 3 Monaten Lagerung eine weitere Abnahme auf 46 % zeigte. Die offene Lagerung resultierte in einem noch stärker ausgeprägten Abfall der Desmopressinkonzentration auf 34 % (3 Monate) bzw. 12 % (6 Monate). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Kombination aus erhöhter Temperatur und erhöhter Luftfeuchte (offene Lagerung 40 °C/75 % r.F.) einen stärkeren Einfluss auf die Lagerstabilität des Desmopressins über 6 Monate nimmt als die erhöhte Temperatur als alleiniger Stressfaktor (Primärpackmittel 21 °C/45 % r.F.). Law et al. untersuchten das Degradationsverhalten von Desmopressinlösungen bei 37 °C sowie 80 °C bei verschiedenen pH-Werten über 3 Tage [183]. Es zeigte sich bei 37 °C nur ein leichter Abbau, wohingegen die Lagerung bei 80 °C in einem starken Abbau resultierte. Der Abbau wurde durch eine Kinetik pseudo-erster Ordnung definiert.

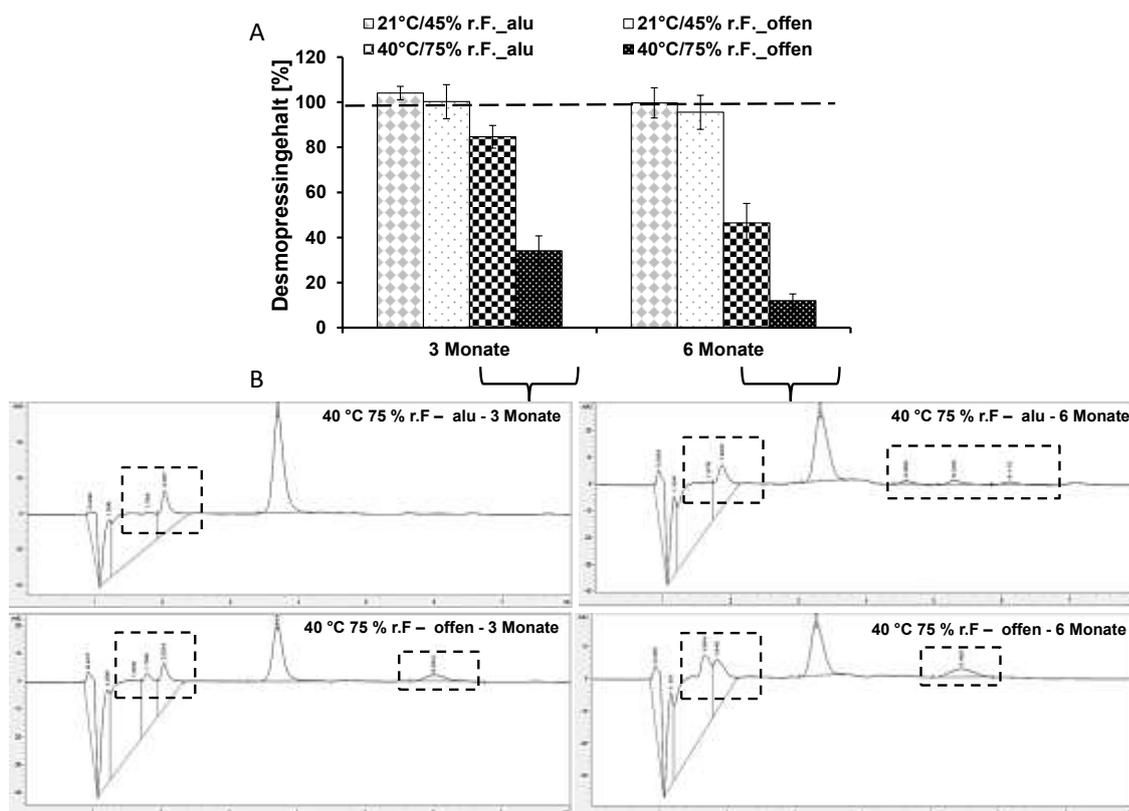


Abbildung 3.31: Lagerstabilität des Dreischichtfilms PVP (3 cm²) über 3 und 6 Monate in Aluminiumsachets (alu) und offen in Glasgefäßen (offen) bei 21 °C/45 % r.F. und 45 °C/75 % r.F.; Desmopressingehalt [%] bezogen auf den Sollwert; (- -) Gehalt vor der Lagerung; MW ± KI ($\alpha=0,05$); n=10 (A); Chromatogramme (UV) mit Abbaupeaks bei 40 °C/75 % r.F. (B)

Der beobachtete drastische Abfall des Desmopressingehalts bei 40 °C/75 % r.F. wurde in beiden Fällen (offen und im Primärpackmittel) durch das Auftreten von zusätzlichen Abbaupeaks im HPLC-Chromatogramm bestätigt (Abbildung 3.31 B).

Nach 3 Monaten Lagerung im Aluminiumsachet traten neue Verbindungen bei niedrigen Retentionszeiten auf (1,7 und 2 min), deren Fläche nach 6 Monaten weiter anstieg. Außerdem entstanden über die Lagerung weitere Abbauprodukte bei Retentionszeiten von etwa 4, 5 und 6 min. Die PVP-Filme, die offen gelagert wurden, wiesen ebenfalls Abbauprodukte bei Retentionszeiten zwischen 1,7 und 2 min auf. Außerdem ließ hier ein breiter Abbauppeak bei 5 min auf ein oder mehrere zusätzliche Abbauprodukte schließen. Auch hier nahm die Fläche der Peaks nach weiteren 3 Monaten Lagerung zu.

Die Literatur bietet nur wenige Daten zu Abbaureaktionen von Desmopressin. In den meisten Fällen beschränken sich die Stabilitätsuntersuchungen auf Gehaltsbestimmungen. Abbauprodukte werden hingegen kaum analysiert [183-185]. Im Allgemeinen beruhen chemische Abbaureaktionen von Peptiden und Proteinen auf β -Eliminations-, Desaminierungs-, Racemerisierungs-, Disulfidaustausch- und Oxidationsreaktionen [183, 186]. Es sind 5 Abbauprodukte des Desmopressins bekannt, die sich alle von dem Grundgerüst des Desmopressins ableiten [171]. Abbildung 3.32 zeigt anhand der Strukturformel des Desmopressins, welche funktionellen Gruppen betroffen sind (links) und welche Abbauprodukte dabei entstehen (rechts). Demnach beruht der Großteil der Abbaureaktionen des Desmopressins auf Desaminierungs- und Racemerisierungsreaktionen.

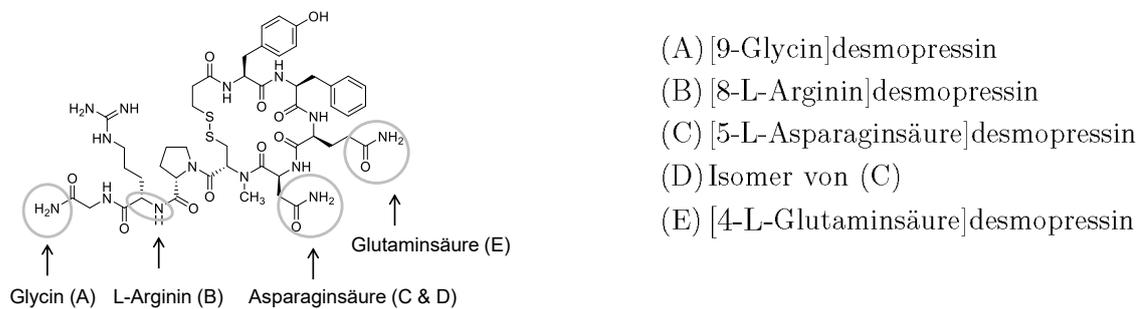


Abbildung 3.32: Abbauprodukte von Desmopressin

Auf Grund der wenigen publizierten Daten über Degradationsprozesse des Desmopressins war es nicht möglich, alle entstandenen Abbauprodukte zu identifizieren. Die chromatographischen Untersuchungen konnten allerdings Informationen über die Anzahl sowie eine grobe Einschätzung über die Menge an entstandenen Abbauprodukten liefern. So zeigt der PVP-Film nach 3 Monaten Lagerung lediglich Abbauprodukte, die bei niedrigeren Retentionszeiten eluieren und demnach weniger lange auf der Umkehrphasensäule verbleiben, was für hydrophilere Molekülstrukturen spricht. Innerhalb einer weiteren 3-monatigen Lagerungsperiode liefen weitere Abbaureaktionen ab, die zu Abbauprodukten höherer Retentionszeiten führten, was für lipophilere Moleküle sprechen würde. Scheidl et al. lagerten eine wässrige Desmopressinzubereitung für eine Zeit von 10 Monaten bei 50 °C ein und quantifizierten die in Abbildung 3.32 aufgeführten Abbauprodukte. Es wurden die

Abbauprodukte (D) zu 5 %, (E) zu 2,5 %, (A) zu 2 % und (C) zu 1,2 % nachgewiesen [171]. Eine Übertragung dieser Daten auf die hier erhaltenen Ergebnisse kann auf Grund unterschiedlicher Versuchsbedingungen allerdings nicht vorgenommen werden. Massenspektroskopische Untersuchungen könnten im Rahmen von Folgeuntersuchungen zur Aufklärung des Degradationsverhaltens von Desmopressin in den Filmzubereitungen herangezogen werden.

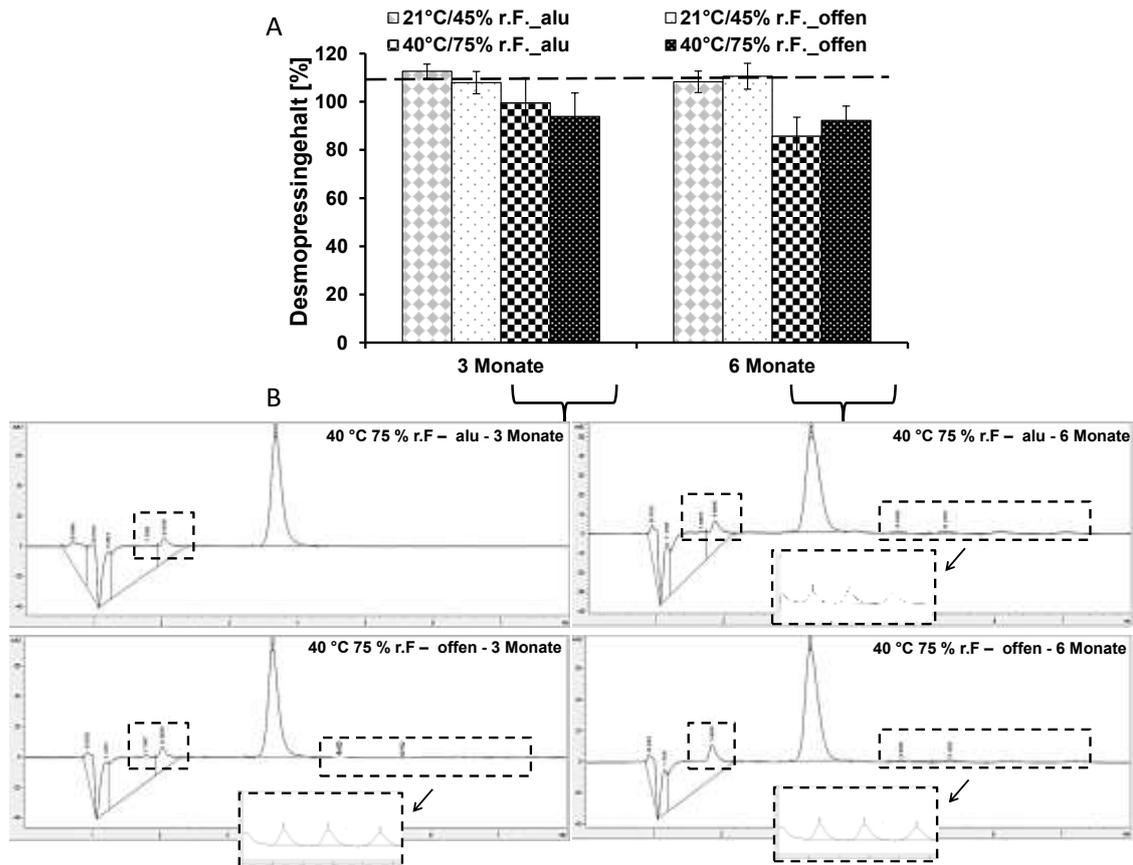


Abbildung 3.33: Lagerstabilität des Dreischichtfilms Chito (3 cm^2) über 3 und 6 Monate in Aluminiumsachets (alu) und offen in Glasgefäßen (offen) bei $21 \text{ }^\circ\text{C}/45 \text{ \% r.F.}$ und $45 \text{ }^\circ\text{C}/75 \text{ \% r.F.}$; Desmopressingehalt [%] bezogen auf den Sollwert; (- -) Gehalt vor der Lagerung; $\text{MW} \pm \text{KI}$ ($\alpha=0,05$); $n=10$; für $40^\circ\text{C}/75 \text{ \% r.F.}$ offen 6 Monate $n=6$; (A); Chromatogramme (UV) mit Abbauprodukten bei $40 \text{ }^\circ\text{C}/75 \text{ \% r.F.}$ (B)

Abbildung 3.33 stellt die Lagerstabilität des Dreischichtfilms mit Chitosan als MS dar. Vergleichbar zu den Ergebnissen des PVP-Films wurden auch hier keine Veränderungen der Desmopressinstabilität bei $21 \text{ }^\circ\text{C}/45 \text{ \% r.F.}$ festgestellt. Die Lagerung über 3 bzw. 6 Monate bei erhöhter Temperatur und Raumfeuchte resultierte in einer Abnahme des Desmopressingehalts um etwa 10 % (3 Monate) bzw. etwa 25 % (6 Monate). Verglichen mit dem PVP-Film, bei dem nach 6 Monaten ein Abbau von etwa 60 % (Primärpackmittel) bzw. etwa 90 % (offen) zu verzeichnen war, erwies sich der Chitosan-Film als deutlich stabiler. Außerdem zeigte die offene Lagerung im Gegensatz zu den PVP-Filmen keine weitere

Reduktion des Desmopressingehalts. An dieser Stelle muss jedoch angemerkt werden, dass bei 4 von 10 Filmen nach 6-monatiger Lagerung verbreiterte, teils deformierte Desmopressinpeaks im Chromatogramm beobachtet wurden. Diese wurden bei der Auswertung ausgeschlossen, um keine falsch hohen Desmopressinkonzentrationen zu erhalten. Gleichwohl kann im Fall des Chitosan-Films von einer deutlich höheren Lagerstabilität des Desmopressins ausgegangen werden. Eine mögliche Begründung für die verbesserte Stabilität kann in der schlechten Wasserlöslichkeit des Chitosans liegen. Es kann somit innerhalb der Arzneiform als Feuchtigkeitsbarriere für die mittlere Desmopressinfilmschicht dienen. Folglich kann Umgebungsfeuchte weder von oben („Chitosanbarriere“) noch von unten („Ethylcellulosebarriere“) hydrolytische Abbaureaktionen, wie beispielsweise die Desaminierung des Asparagins oder Glutamins, verursachen. Zur Überprüfung der Annahme, dass die erhöhte Lagerstabilität des Desmopressins bei 40 °C/75 % r.F. wirklich auf die schlechte Wasserlöslichkeit der Polymere zurückzuführen ist, wären in Folgeuntersuchungen Lagerstudien mit weiteren wasserunlöslichen Polymeren notwendig.

Auch beim Chitosan-Film waren Abbauprodukte im Chromatogramm ersichtlich (Abbildung 3.33. B). Es wurden Abbaupeaks bei vergleichbaren Retentionszeiten erhalten. Die Signalfächen waren allerdings geringer als bei den PVP-Filmen, was auch mit dem höheren Gehalt der Chitosan-Filme übereinstimmt. Wie bereits erwähnt konnte keine Identifizierung der Abbaupeaks vorgenommen werden.

In Abbildung 3.34 sind die Lagerstabilitätsergebnisse der Dreischichtfilme mit PA als MS dargestellt. Auch hier war eine hinreichende Lagerstabilität des Peptids bei 21 °C/45 % r.F. gegeben, wohingegen höhere Temperaturen und Luftfeuchten (40°C/75 % r.F.) wiederum zu einer Degradation des Desmopressins führten. Die PA-Filme zeigten ein vergleichbares Verhalten wie die PVP-Filme. Beide resultierten bei fortschreitender Lagerungszeit in einer Abnahme der Desmopressinkonzentration von bis zu 90 % (40°C/75 % r.F., offene Lagerung). PA und PVP sind wasserlösliche Polymere, die somit nicht in der Lage sind, die mittlere Desmopressinfilmschicht vor Luftfeuchtigkeit abzusichern, was hydrolytische Abbaureaktionen zur Folge haben kann. Hinsichtlich der diskutierten Bildung eines Polyelektrolytkomplexes zwischen PA und Desmopressin wurde kein Einfluss auf die Lagerstabilität festgestellt, da die PA-Filme weder eine vergleichsweise schlechte noch gute Lagerstabilität aufwiesen.

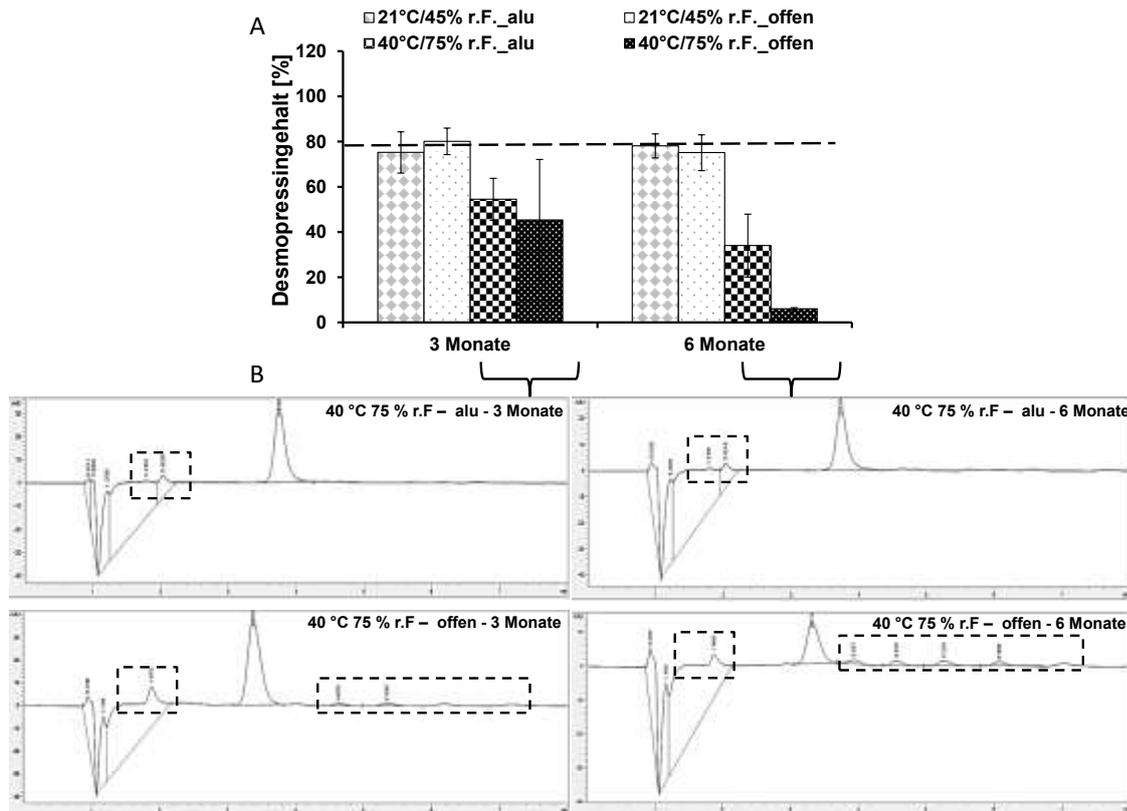


Abbildung 3.34: Lagerstabilität des Dreischichtfilms PA (3 cm²) über 3 und 6 Monate in Aluminiumsachets (alu) und offen in Glasgefäßen (offen) bei 21 °C/45 % r.F. und 45 °C/75 % r.F.; Desmopressingehalt [%] bezogen auf den Sollwert; (- -) Gehalt vor der Lagerung; MW ± KI ($\alpha=0,05$); n=10 (A); Chromatogramme (UV) mit Abbauprodukten bei 40 °C/75 % r.F. (B)

Die erhöhte Temperatur von 40 °C führte bei allen untersuchten Dreischichtfilmen zur Degradation des Desmopressin, was allerdings auf Grund der bekannten Hitzeempfindlichkeit anzunehmen war [183]. Es traten bei allen Filmzubereitungen, die bei 40 °C/75 % r.F. gelagert wurden, ähnliche Abbauprodukte auf, die eventuell auf hydrolytische Spaltungsreaktionen der Amidfunktionen des Glutamins und des Asparagins hindeuten. Der Anteil der entstandenen Abbauprodukte war allerdings im Fall des Chitosans deutlich geringer.

Auf Basis der hier durchgeführten Lagerungsstabilitätsstudie sollten die Dreischichtfilme im Primärpackmittel trocken, vor Licht geschützt bei Raumtemperatur aufbewahrt werden, was einem typischen Lagerungshinweis von auf dem Markt befindlichen oralen Filmzubereitungen entspricht.

3.2.4.7 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde die Entwicklung dreischichtiger, filmförmiger Zubereitungen mit Desmopressin beschrieben, die aus einer mukoadhäsiven, einer Wirkstoff- und einer wasserunlöslichen Abdeckschicht bestehen. Die Komposition der mukoadhäsiven Schicht wurde variiert und deren Einfluss auf die morphologischen und mechanischen Eigenschaften sowie die Desmopressinstabilität getestet. An ausgewählten Zubereitungen wurde außerdem die Lagerstabilität nach ICH evaluiert.

Morphologische Untersuchungen deuteten darauf hin, dass die Filmschichten getrennt voneinander vorlagen und keine Vermischungen mit der WS stattgefunden haben. Die Dreischichtfilme zeigten geeignete, mit Marktprodukten vergleichbare mechanische Eigenschaften.

Mit Ausnahme des PA-Dreischichtfilms entsprachen alle Zubereitungen der Ph. Eur. Monographie 2.9.40 hinsichtlich der Gleichförmigkeit des Gehalts. Die in Kapitel 3.2.3 beobachtete Interaktion zwischen PA und Desmopressin schien auch hier wiederum für den niedrigen Desmopressingehalt verantwortlich zu sein.

Lagerstabilitätsstudien nach ICH zeigten eine hinreichende Stabilität des Desmopressins in allen Dreischichtfilmen bei 21 °C/45 % r.F. Die Lagerung unter Stressbedingungen (40 °C/75 % r.F.) resultierte in allen Filmzubereitungen in einer Degradation des Peptids. Die Chitosan-Filme wiesen dabei allerdings eine deutlich höhere Lagerstabilität im Vergleich zu den PVP- und PA- Filmen auf. Diese Beobachtung wurde auf eine mögliche Barrierefunktion des Chitosans gegenüber Feuchtigkeit zurückgeführt, wodurch die für Desmopressin typischen hydrolytischen Desaminierungsreaktionen unterdrückt werden könnten.

Auf der Basis dieser Ergebnisse folgten nun zum einen weitere Untersuchungen, die die Inkompatibilität zwischen Desmopressin und PA näher beleuchten sollten. Zum anderen wurden die entwickelten und für stabil befundenen Dreischichtfilme weiteren Untersuchungen unterzogen, die zur Charakterisierung des Freisetzungsverhaltens und der *ex-vivo*-Permeation dienen.

3.2.5 Interaktion von Desmopressinacetat mit Polyacrylsäure

3.2.5.1 Einleitung und Problematik

Carbomer, chemisch als Polyacrylsäure (PA) bezeichnet, gilt als eines der Polymere mit den besten mukoadhäsiven Eigenschaften und wird im Zusammenhang mit der oralen oder transmukosalen Peptidapplikation oft als vielversprechender Hilfsstoff eingestuft [156, 187-189]. Weiterhin eignet sich PA im Fall des Desmopressinacetats (Desmopressin) auf Grund der sauren Eigenschaften nicht nur als mukoadhäsiver Zusatz (vgl. Abschnitt 3.2.4.1), sondern im Rahmen der vorgestellten Untersuchungen auch als pH-Regulator (vgl. Abschnitt 3.2.3.1). Allerdings wurde eine manifeste Interaktion zwischen Desmopressin und PA beobachtet. Sowohl die Einarbeitung von PA in die Desmopressinschicht (Abbildung 3.16) als auch die Verwendung als mukoadhäsive Schicht (MS) innerhalb der Entwicklung der Dreischichtfilme (Abbildung 3.28) resultierte in niedrigen Desmopressingehalten.

Während der Herstellung der Einsichtfilme in Kapitel 3.2.3 wurde eine Trübung der zuvor klaren, wässrigen Desmopressinlösung (Abbildung 3.35 A) bereits nach Zugabe von PA festgestellt (Abbildung 3.35 B), welche allerdings nach Zugabe des filmbildenden Polymers (HPMC/HPC) wieder verschwand (Abbildung 3.35 C). Somit konnte zunächst davon ausgegangen werden, dass alle Komponenten in gelöstem Zustand in der Polymerlösung vorlagen. Die hergestellten Filme hatten ein klares und homogenes Aussehen. Polarisationsmikroskopische Aufnahmen der Filme bestätigten die Abwesenheit von kristallinen Strukturen, was die Ausbildung eines unlöslichen, nicht kristallinen Komplexes im Film allerdings nicht ausschließt.

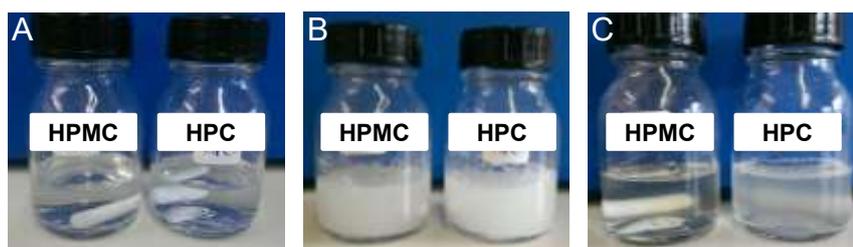


Abbildung 3.35: Herstellungsschritte der Polymerlösung von Formulierung PA-a und- b (vgl. Tabelle 3.5); Lösen von Desmopressin in Wasser (A); Zugabe von PA (B) und Zugabe des Polymers HPMC oder HPC (C)

Auf Grund des zu niedrigen Wirkstoffgehalts der Filme wurde angenommen, dass sich in wässriger Lösung ein schwerlöslicher Polyelektrolytkomplex zwischen der protonierten Guanidinstruktur des Desmopressins und den freien Säuregruppen der PA als Anion ausbildet, was einem Anionenaustausch zwischen Acetat und Polyacrylat entsprechen würde. Der mögliche Reaktionsablauf ist in Abbildung 3.36 gezeigt. Ein Acetatnachweis konnte nicht als Beweis herangezogen werden, da auf Grund von Dissoziationsvorgängen stets Acetat in der Lösung vorhanden ist und demnach in jedem Fall zu einem Positivnachweis führt.

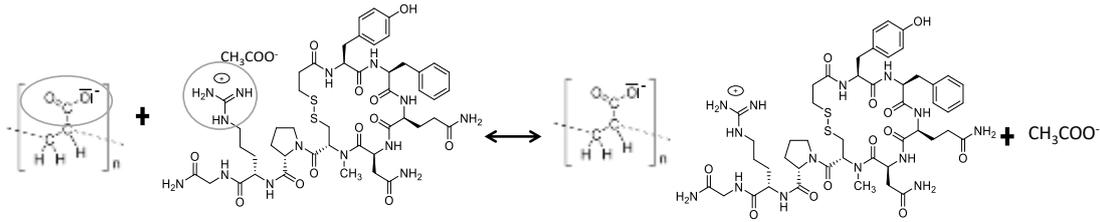


Abbildung 3.36: Mögliche Polyelektrolytkomplexbildung zwischen Desmopressinacetat und PA

Die Bildung eines Polyelektrolytkomplexes zwischen Arzneistoff und Polymer wurde bereits an einigen Stellen in der Literatur beschrieben [190-192]. In den meisten Fällen handelte es sich dabei allerdings um eine gezielte Maßnahme, um beispielsweise die Löslichkeit eines schlecht löslichen sauren oder basischen Arzneistoffs zu erhöhen und/oder die Freisetzung zu steuern. Die Arzneistoffe wurden dabei als freie Säuren oder Basen und nicht wie in dieser Arbeit als Salz eingesetzt. Um die Bildung eines Polyelektrolytkomplexes nachzuweisen, wurden in der Literatur spektroskopische Analysemethoden wie IR-, FTIR, oder Raman-Spektroskopie herangezogen, um Wirkstoff-Polymer-Interaktionen und die Ausbildung einer Salzbindung anhand charakteristischer Valenzschwingungen für ionische Bindungen zu zeigen [192]. Da in dieser Arbeit allerdings schon zu Beginn das Desmopressinsalz der Essigsäure (Desmopressinacetat) eingesetzt wurde, können diese Charakterisierungsmethoden hier nicht als Analyseverfahren herangezogen werden, da keine Veränderungen im Schwingungsmuster zu erwarten sind.

Da es sich bei der Bildung des Polyelektrolytkomplexes um eine Verdrängungsreaktion handelt, die gemäß des Massenwirkungsgesetzes bei einem Überschuss an Acetat wieder reversibel sein sollte, wurde dieser Ansatz als Nachweismethode der Ausbildung eines Polyelektrolytkomplexes genutzt.

3.2.5.2 Konzentrationsreihen

Es wurden Konzentrationsreihen von Desmopressin und PA zu verschiedenen Anteilen in Wasser und Acetatpuffer pH 4,5 (vgl. Tabelle 6.5) hergestellt. Der Puffer sollte dazu dienen, die mögliche Bildung des Polyelektrolytkomplexes zu verhindern, indem das im Überschuss vorhandene Acetat die Bildung des Präzipitats zurückdrängt und das Gleichgewicht auf die Seite des Desmopressinacetats verschiebt. Da es sich um eine Säure-Base-Reaktion handelt, wurde angenommen, dass der pH-Wert der Medien einen Einfluss auf die Reaktion hat. Der pH-Wert des Puffers (4,5) wurde demnach dem pH-Wert der wässrigen PA-Lösungen angepasst. Aus diesem Grund enthielten alle Lösungen 1 Teil PA und nur der Anteil an Desmopressin wurde zwischen 0,3; 0,5; 1; 2; und 3 Teilen variiert, da davon ausgegangen wurde, dass der Anteil an Desmopressin weniger Einfluss auf den pH-Wert nimmt. Die Polymerketten von PA weisen einen Anteil von 56-68 % freier Säuregruppen auf [193]. Es wurden zwei PA-Arten für die Versuche der Konzentrationsreihen verwendet: das kurzkettige Carbopol® 971P NF mit einer

Viskosität von 4000-11000 mPa*s (2 %-ige Lösung) und das langkettige 974P NF mit einer Viskosität von 29400-39400 mPa*s (2 %-ige Lösung). Die Konzentrationsreihen wurden abschließend hinsichtlich des pH-Werts (vgl. Abschnitt 6.2.1.4), Aussehens und Desmopressingehalts (vgl. Abschnitt 6.2.7.4, UV-Detektion) untersucht.

Die Ergebnisse zu Carbopol® 971P NF (71) sind in Abbildung 3.37 und zu Carbopol® 974P NF (74) in Abbildung 3.38 dargestellt. Die Fotos auf der linken Seite zeigen jeweils die Erscheinung der Lösungen bzw. Suspensionen mit steigendem Desmopressinanteil von links nach rechts. Für (74) in Abbildung 3.38 wurde im linken, unteren Teil außerdem die Veränderung der Lösungen mit 1, 2 und 3 Teilen Desmopressin über eine Standzeit von 3 Tagen und das dabei entstandene Präzipitat abgebildet, da dies im Fall des (74) besonders deutlich zu erkennen war. Die rechte Graphik beinhaltet jeweils die Korrelation des Desmopressingehalts in Abhängigkeit vom Desmopressinanteil der Probe.

Es ist zu erkennen, dass unter Verwendung des Acetatpuffers (obere Fotoreihen) sowohl bei (71) als auch bei (74) bei einem Anteil von 0,3/1 und 0,5/1 Desmopressin /PA klare, leicht opake Lösungen entstanden sind, wobei die (74)-Ansätze eine vergleichsweise stärker ausgeprägte Opaleszenz zeigten als die (71)-Pendants (die weißen Körper auf dem Boden des Glases sind Röhrelemente). Ab einem Verhältnis von 1/1 werden trübe, fein disperse Suspensionen erhalten. Das Verhältnis 3/1 Desmopressin/PA führte bei (74) zu einer Ausflockung bzw. zur Sedimentation des Präzipitats, was bei (71) nur leicht ausgeprägt war. Je nach Verhältnis von Desmopressin zu PA zeigt sich demnach ein unterschiedliches Verhalten in Acetatpuffer. Die Proben mit Wasser als Dispersionsmittel (untere Fotoreihen) waren deutlich trüber und zeigten eine stärkere Präzipitatbildung als die Acetatpufferproben. Außerdem konnte im Fall des niedrigsten Desmopressinanteils (0,3 Teile) ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden PA-Arten beobachtet werden. Die PA mit der höheren Viskosität (74) zeigte eine stärker ausgeprägte Trübung im Vergleich zu (71). Die Präzipitate der Ansätze mit 0,3 und 0,5 Teilen Desmopressin und 1 Teil PA für (74) und bzw. 0,5 Teile für (71) waren fein dispers innerhalb der Suspension verteilt, wohingegen eine Erhöhung des Desmopressinanteils wiederum zu einer Ausflockung bzw. Sedimentation des Präzipitats führte. Nach längerer Ruhezeit wurde der Überstand komplett klar und das Präzipitat befand sich auf dem Boden des Gefäßes (Abbildung 3.38, unten). Wie bereits erwähnt, war eine spektroskopische Analyse des Präzipitats nicht möglich, da keine eindeutigen Unterschiede in den charakteristischen Banden für Säurefunktionen oder ionische Bindungen zu erwarten waren.

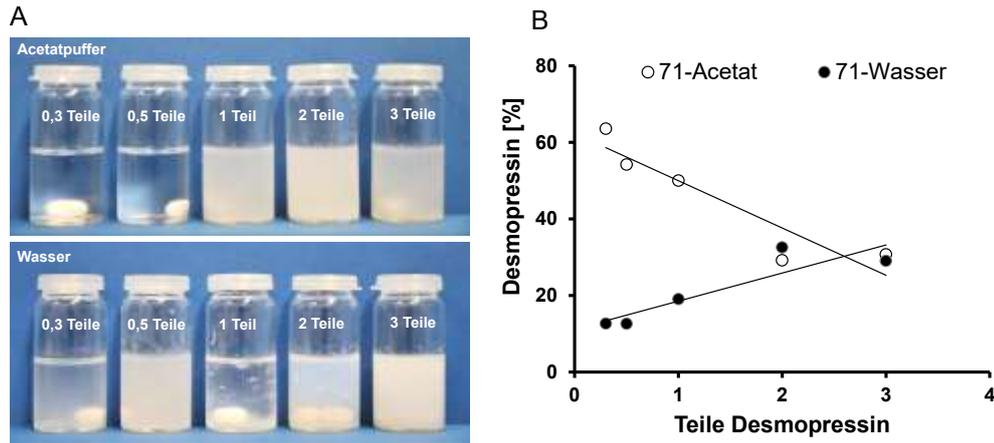


Abbildung 3.37: Fotos der Konzentrationsreihen mit Desmopressin und Carbopol® 971P NF in Acetatpuffer und Wasser (A); Desmopressingehalt in Abhängigkeit vom Anteil an Desmopressin auf 1 Teil Carbopol® 971P NF (71) in Acetatpuffer (Acetat) und Wasser; MW n=2 (B)

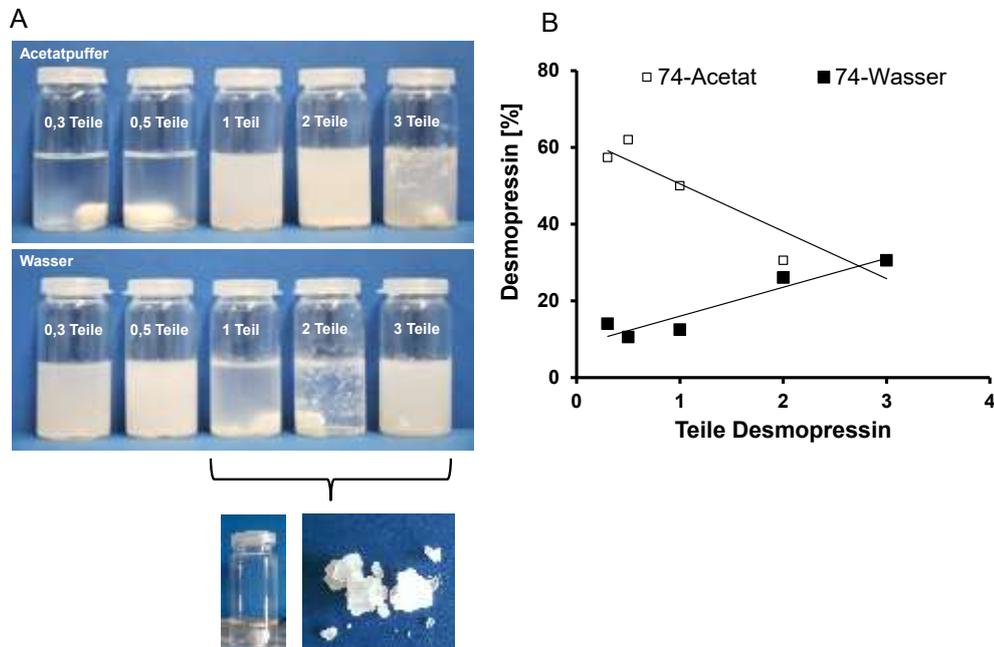


Abbildung 3.38: Fotos der Konzentrationsreihen mit Desmopressin und Carbopol® 974P NF in Acetatpuffer, in Wasser und der Niederschlag am Beispiel von Wasser-2 Teile (unten) (A); Desmopressingehalt in Abhängigkeit vom Anteil an Desmopressin auf 1 Teil Carbopol® 974P NF (74) in Wasser und Acetatpuffer (Acetat); MW; n=2 (B)

Betrachtet man sich die Desmopressinwiederfindung in den einzelnen Acetatpufferproben (rechte Abbildungen, nicht ausgefüllte Symbole), so ist bei beiden PA-Arten eine lineare Abnahme der Wiederfindung mit steigendem Anteil an Desmopressin zu verzeichnen ($R=0,936$ für 71-Acetate und $R=0,923$ für 74-Acetate). Nur zwischen den letzten beiden Punkten (2 und 3 Teile Desmopressin) zeigt sich keine weitere Abnahme. Der letzte Punkt (3 Teile) ist sogar deckungsgleich mit der Desmopressinkonzentration in Wasser. Die Desmopressinwiederfindung in Wasser zeigt das genau gegensätzliche Verhalten (rechte Abbildungen, ausgefüllte Symbole). Unter Verwendung von Wasser als

Dispersionsmittel nimmt die wiedergefundene Konzentration mit steigendem Desmopressinanteil in der Probe zu, wobei auch hier ein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Desmopressinanteil besteht ($R=0,923$ für 71-Wasser und $R=0,948$ für 74-Wasser). Insgesamt wurden allerdings nur maximal ca. 60 % in Acetatpuffer und ca. 30 % in Wasser nachgewiesen (Desmopressinanteil 0,3). Unterschiede zwischen den PA-Arten waren dabei trotz des unterschiedlichen Trübungsgrades der Dispersionen nicht zu verzeichnen, was möglicherweise an Unterschieden in der Partikelgröße oder des Zetapotentials der Proben liegen könnte.

Das gegensätzliche Verhalten in den beiden Dispersionsmitteln kann folgendermaßen erklärt werden. Acetationen im Puffer sind in der Lage, die Bildung des Polyelektrolytkomplexes zwischen Desmopressin und PA zurückzudrängen und zu Gunsten von Desmopressinacetat zu verschieben. Allerdings ist die Acetatkonzentration im Medium selbst bei einem Verhältnis von 0,3/1 Desmopressin/PA zu niedrig, um eine quantitative Verdrängung zu erzielen, sodass nur etwa 60 % an Desmopressinacetat nachgewiesen werden konnten. Bei steigendem Desmopressinanteil liegen mehr basische Guanidiningruppen vor, die mit den Säuregruppen der PA reagieren können. Dadurch verschiebt sich das Gleichgewicht immer weiter in Richtung des Polyelektrolytkomplexes und die Konzentration an Desmopressin nimmt ab. Ab einem Verhältnis von 2/1 (Desmopressin/PA) gleicht sich die Desmopressinkonzentration im Acetatpuffer an die des Wassers an. Die Acetationen des Puffers haben keinen Einfluss mehr auf die Gleichgewichtsreaktion. Nach Henderson-Hasselbach liegt das Verhältnis von Acetat zu Essigsäure bei einem pH-Wert von 4,5 bei 0,56/1 Salz/Säure, was in diesem Fall einer Konzentration von etwa 36 mM Acetat zu 64 mM Essigsäure entspricht. Ein Anteil von 2 Teilen Desmopressin entspricht einer 4,4 mM Lösung. Da das MG der PA nicht bekannt ist, kann an dieser Stelle keine Aussage über die Molarität der PA gemacht werden. Allerdings kann eine Spanne der Molarität der freien Carboxylgruppen berechnet werden, da diese laut Herstellerangaben zwischen 56 und 68 % liegen. Umgerechnet entspricht das einer Spanne von 30-38mM freier Carboxylgruppen in den hier hergestellten Ansätzen. Es wären demnach höhere Stoffmengen an Acetat notwendig, um die Lage des Gleichgewichts zu verschieben.

Im Fall des Wassers zeigte sich den Erwartungen entsprechend bei beiden PA-Arten eine Zunahme der Wiederfindung bei Erhöhung des Desmopressinanteils, da das Gleichgewicht zu Gunsten des Desmopressinacetats verschoben wird. Trotzdem werden bei Erhöhung des Anteils um 100 % (z.B. Erhöhung von 1 zu 2 Teilen Desmopressin bei (71)) nur 7 Prozentpunkte mehr Desmopressin nachgewiesen (von 12 % auf 19 %). In der Gesamtheit betrachtet entsteht demnach mehr Präzipitat, was auch die beobachtete Ausflockung erklären kann. Wenn sich mehr Desmopressinmoleküle an die PA-Polymerketten anlagern, kann das zu einer Änderung der räumlichen Struktur der Polymerketten führen. Im wässrigen Milieu

entknäulen sich die PA-Polymerketten nur leicht, was auch ohne Neutralisation zu einer Erhöhung der Viskosität führt. In der Anwesenheit von Desmopressin wurde hingegen keinerlei Quellung beobachtet, was ebenfalls für eine Polyelektrolytkomplexbildung sprechen kann, da das Desmopressin durch Interaktion mit den PA-Säuregruppen die Streckung der Polymerketten behindern kann. PA wurde bereits in zahlreichen Arbeiten, die sich mit der peroralen Peptidapplikation beschäftigt haben, verwendet. So entwickelten Ilan et al. orale Emulsionen mit Desmopressin und PA zur Verbesserung der oralen BV [188]. Lueßen et al. berichteten positive Effekte von PA als mukoadhäsives auf die Stabilität sowie intestinale *in-vivo*-Resorption für ein, dem Desmopressin ähnliches, Vasopressinderivat (DGAVP) sowie Buserelin [189, 194]. Beide weisen ein basisches Guanidinstrukturelement auf und wurden als entsprechende Acetatsalze verwendet. Eine Interaktion zwischen PA und den Peptiden wurde allerdings nicht beschrieben.

Um zu überprüfen, ob höhere Desmopressinanteile in beiden Fällen (Wasser und Acetatpuffer) zu einer Erhöhung des Desmopressingehalts führen und die Acetatpufferproben weiterhin vergleichbare Ergebnisse zu Wasser zeigen, wurden für (74) zusätzlich höhere Desmopressinkonzentrationen untersucht (vgl. Abbildung 3.39). Wie durch die vorherigen Ergebnisse zu erwarten, wurde sowohl bei Wasser als auch bei Acetatpuffer (ab 4,4 mM Desmopressin) mit steigender Molarität mehr Desmopressin nachgewiesen.

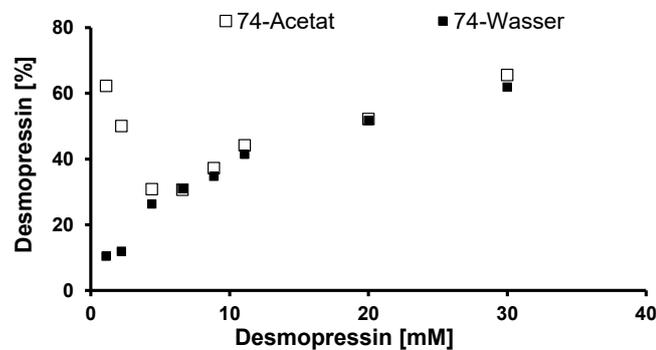


Abbildung 3.39: Desmopressinwiederfindung in Abhängigkeit vom Anteil an Desmopressin und Carbopol® 974P NF in Wasser und Acetatpuffer (Acetat); MW; n=2

3.2.5.3 Freisetzungsuntersuchungen

Anhand von Freisetzungsuntersuchungen (vgl. 6.2.11.1) sollte die Bildung des vermeintlichen Polyelektrolytkomplexes im wässrigen Medium überprüft werden. Dieses Verfahren wurde bereits zur Charakterisierung von Polyelektrolytkomplexen und deren Freisetzungsverhalten genutzt [190, 191]. Zur Untersuchung des Einflusses von Acetat im Medium wurde die Freisetzung zunächst in demineralisiertem Wasser durchgeführt, was weniger der Imitation der *in-vivo* Bedingungen sondern viel mehr dem Nachweis des Polyelektrolytkomplex dienen sollte. Anschließend wurde nach einer Zeit von 20 min 0,66 g Natriumacetat in das Medium gegeben. Diese Menge entspricht bei einem Volumen von 80 g

FreisetzungsmEDIUM einer 0,1 M Natriumacetatlösung, um einen Überschuss an Acetationen im FreisetzungsmEDIUM zu gewährleisten. Außerdem wurde Phosphatpuffer pH 6,8 in 400 mM und 40 mM Konzentration als FreisetzungsmEDIUM verwendet. Phosphatpuffer pH 6,8 findet in der Literatur oft als „künstlicher Speichel“ Verwendung [93, 195, 196]. Es wurden sowohl Einschichtfilme mit PA als auch ohne PA als Referenz untersucht (vgl. Tabelle 3.9).

Tabelle 3.9: Einschichtfilme für die Freisetzungsuntersuchungen

Einschichtfilm	Zusammensetzung
HPC+PA	Desmopressin 0,19 %; HPC 15 %; PA 0,2 %; Wasser dest. 84,61 %
HPC	Desmopressin 0,19 %; HPC 15 %; Wasser dest. 84,81 %

HPC: Klucel® ELF; PA: Carbopol® 974P NF

Abbildung 3.40 A enthält die Ergebnisse der Freisetzungsuntersuchungen in Wasser (nach Acetatzugabe), B in Phosphatpuffer pH 6,8 400 mM und C in Phosphatpuffer pH 6,8 40 mM. Wie zu erwarten zeigt die Zubereitung HPC+PA in Wasser (vgl. Abbildung 3.40 A) eine langsame und inhomogene Freisetzung mit teils starken Abweichungen und einer maximalen Desmopressinfreisetzung von nur etwa 30 % nach 60 min. Die Zugabe von Natriumacetat nach 20 min (HPC+PA-Wasser+Acetat) resultierte in einem rapiden und steilen Anstieg der Desmopressinfreisetzung auf über 90 %. Nach Acetatzugabe wurde somit eine vergleichbare maximale Freisetzung von Desmopressin in Wasser erreicht, wie es auch bei dem HPC-Film ohne PA als Referenz (HPC-Wasser) beobachtet wurde. Ähnliche Ergebnisse erzielten auch Jimenez-Kairuz et al. mit PA-Hydrogelen, die Lidocain oder Metoclopramid als Wirkstoffe enthielten. Dabei resultierte eine Natriumchloridzugabe in einem starken Freisetzungsanstieg [191, 197]. Die vergleichenden Untersuchungen in Phosphatpuffer pH 6,8 (Abbildung 3.40 B) ergaben ähnliche Freisetzungsprofile für HPC-Puffer und HPC+PA-Puffer. Eine Natriumacetatzugabe resultierte in keiner weiteren Erhöhung der Desmopressinfreisetzung. Freie Phosphatanionen im FreisetzungsmEDIUM können, ähnlich dem Acetat, ebenfalls als eine Art Anionenaustauscher fungieren und die Bildung eines Polyelektrolytkomplexes zurückdrängen. Außerdem muss erwähnt werden, dass im Fall des Wassers als FreisetzungsmEDIUM keine pH-Anpassung vorgenommen wurde. Nach 60 min Freisetzungszeit lag der pH-Wert des Wassers bei 5,6, wohingegen der des Phosphatpuffers keine Veränderung zeigte (pH 6,8). Höhere pH-Werte führen zu einem Verschieben des Dissoziationsgleichgewichts von Essigsäure zu Acetat, wodurch mehr freies Acetat vorliegt, was wiederum die Bildung des Komplexes zurückdrängen und zu einer höheren Freisetzung führen

kann. Im Allgemeinen wurde jedoch für beide Einschichtfilme eine relativ langsame Freisetzung von teilweise nur 80 % in Phosphatpuffer pH 6,8 erreicht.

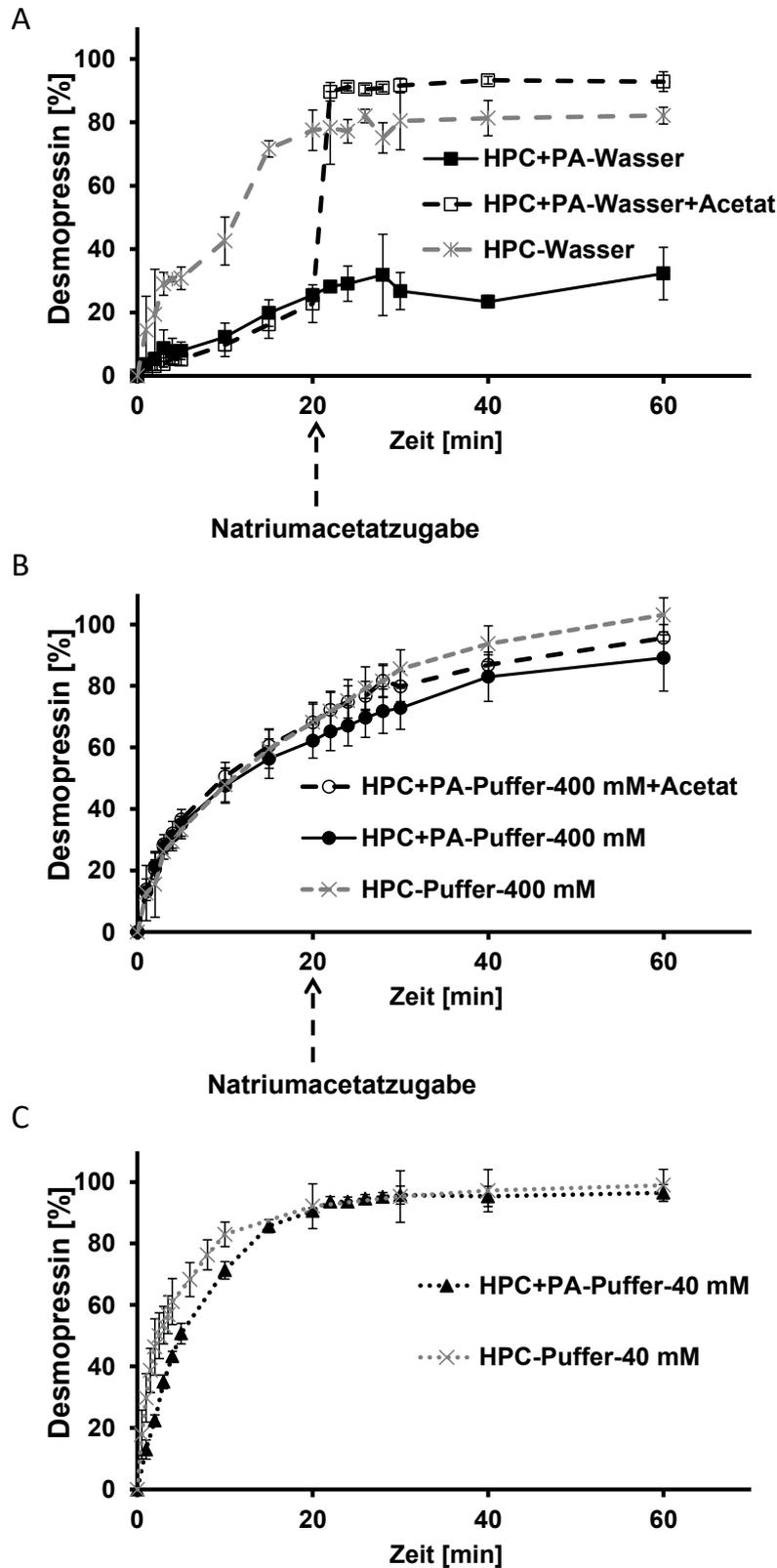


Abbildung 3.40: Freisetzungsprofile von Einschichtfilmen (30 cm^2) mit HPC & PA (HPC+PA) und ohne PA (HPC) in Wasser mit (+Acetat) und ohne Acetatzugabe (A), Phosphatpuffer pH 6,8 400 mM (B) und Phosphatpuffer pH 6,8 40 mM (C); $\text{MW} \pm \text{s}$; $n=3$

Untersuchungen in einem niedriger konzentrierten Puffer (40 mM) ergaben eine deutlich schnellere und höhere Freisetzung beider Einschichtfilme (Abbildung 3.40 C). Die langsamere und niedrigere Freisetzung in dem höher konzentrierten Phosphatpuffer kann durch einen Aussalzeffekt der HPC in Gegenwart höherer Konzentrationen anorganischer Salze erklärt werden. Laut Herstellerangaben können diese Inkompatibilitäten bereits ab einer Konzentration von 2 % an Natriummonohydrogenphosphat auftreten [198]. Die hier verwendete Konzentration (400 mM) lag bei 3,5 %. Eine Trübung bzw. Ausflockung der beiden untersuchten Filme während der Freisetzung bestätigte diese Annahme (vgl. Abbildung 3.41). Im Gegensatz zum Phosphatpuffer 40 mM zeigten die Filme nach Kontakt mit Phosphatpuffer 400 mM eine sofortige Trübung. Nach 60 min zerfiel der Film. Eine Auflösung blieb allerdings aus.

Folglich konnte auch anhand von Freisetzungsdaten belegt werden, dass Desmopressin und PA im wässrigen Milieu zu einem Polyelektrolytkomplex reagieren (vgl. Abbildung 3.36), dessen Bildung durch die Anwesenheit gelöster Anionen (Acetat oder Phosphat) beeinflusst wird.

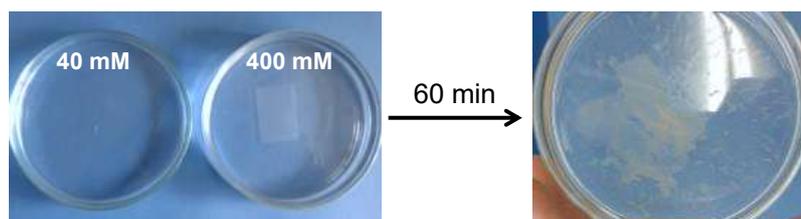


Abbildung 3.41: Aussalzen der HPC in 400 mM Phosphatpuffer pH 6,8

3.2.5.4 Zusammenfassung

Auf Grund der stark ausgeprägten mukoadhäsiven Eigenschaften wurde Polyacrylsäure (PA) in der Vergangenheit oft als Hilfsstoff in der peroralen Peptidapplikation verwendet. Innerhalb dieser Arbeit wurde allerdings eine manifeste Inkompatibilität zwischen PA und Desmopressinacetat (Desmopressin) unter Bildung eines Präzipitats festgestellt, was sich unter anderem in zu niedrigen freien Desmopressingehalten in den hergestellten Filmen äußerte. Die Vermutung, dass es sich hierbei um einen nicht wasserlöslichen Polyelektrolytkomplex zwischen den Säurefunktionen der PA und der basischen Guanidinstruktur des Desmopressins handelt, konnte anhand von Verdrängungsreaktionen bestätigt werden. Freisetzungsforschungen an Einschichtfilmen haben zudem gezeigt, dass eine Zugabe von Natriumacetat in das Freisetzungsmilieu zu einem rapiden und steilen Anstieg der Desmopressinfreisetzung führte.

3.2.6 Mukoadhäsionsuntersuchungen

3.2.6.1 Einleitung

Um die orotransmukosale Permeation des Desmopressins zu ermöglichen, ist eine ausreichend lange Kontaktzeit zwischen dem Dreischichtfilm und der Mundschleimhaut notwendig [199]. Folglich müssen hinreichende mukoadhäsive Eigenschaften der Arzneiform sichergestellt werden. Unter Mukoadhäsion versteht man den Kontakt zwischen einem Material und Mukus bzw. Mukosa [137]. Der Mechanismus der Interaktion zwischen Mukosa und dem mukoadhäsiven Material ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Im Allgemeinen kann der Mechanismus der Mukoadhäsion in zwei Schritte unterteilt werden: den Kontaktschritt, der auch als Benetzungsschritt bezeichnet werden kann, und den Konsolidierungsschritt, der die physikochemische Interaktion zwischen den Materialien darstellt und für die verlängerte Verweilzeit verantwortlich ist [137, 200]. Der Kontaktschritt spielt beispielsweise bei Arzneiformen eine Rolle, die über den oralen Weg appliziert werden und sich an die gastroenterale Mukosa anheften sollen. Im Fall der orotransmukosalen Applikation kommt dem Konsolidierungsschritt eine wichtigere Rolle zu, da der Kontakt zwischen Arzneiform und Mukosa vom Anwender selbst oder der Betreuungsperson hergestellt wird.

In der Monographie „Mukoadhäsive Zubereitungen“ des Ph. Eur. sind keine Methoden zur Bestimmung der Mukoadhäsion beschrieben. Zur Beurteilung der mukoadhäsiven Materialeigenschaften können zwei verschiedene Ansätze verfolgt werden. Zum einen kann über verschiedene Methoden, wie beispielsweise die Abziehmethode oder die Oszillationsrheologie, die Stärke der mukoadhäsiven Bindung bzw. der Interaktion zwischen Mukosamaterial und Probe bestimmt werden [138, 201]. Zum anderen können Verweilzeitmessungen der Probe an geeigneten Materialien (z.B. tierische Mukosa) herangezogen werden, um indirekt Informationen über die mukoadhäsiven Eigenschaften zu erhalten [8, 140]. Es muss allerdings beachtet werden, dass alle Methoden zu unterschiedlichen Ergebnissen mit teils starken Abweichungen führen [134], was nicht zuletzt durch die hohe Variabilität der verwendeten Mukosamaterialien bedingt ist. Verschiedene Mukosamaterialien tierischen Ursprungs sowie Mukosaersatzmaterialien wurden in der Literatur beschrieben [202]. Das am häufigsten genutzte tierische Schleimhautgewebe zur Beurteilung der oromukosalen Mukoadhäsion ist die Schweinewangenschleimhaut [94, 203, 204]. Auf Grund fehlender Standardisierungsmöglichkeiten von tierischem Material besteht allerdings ein wachsendes Interesse an Ersatzmaterialien für tierische Gewebe [202]. Dazu wurden bereits Gelatinegele [196], Presslinge aus Mucinpulver des Schweinemagens [205], gezüchtete intestinale Zellreihen [206] und synthetische Mukosamaterialien [207], beispielsweise basierend auf Hydroxyethylmethacrylat, genutzt.

Innerhalb dieser Arbeit wurden unterschiedliche tierische Schleimhautgewebe und Ersatzmaterialien untersucht. Da für das Lyophilisat eine oropharyngeale Permeation von Desmopressin angenommen wird [164], wurden bukkale (Wange), sublinguale (Zungenunterseite) und ösophageale (Speiseröhre) Schleimhäute des Schweines als tierische *ex-vivo*-Modellmaterialien verwendet (vgl. Abschnitt 6.2.10.1). Außerdem wurden Gelatinegele und Presslinge aus Mucinpulver des Schweinemagens als Mukosaersatzmaterialien getestet (vgl. Abschnitt 6.2.10.2 und 6.2.10.3). In der Literatur sind unterschiedliche Vorgehensweisen hinsichtlich der Vorbehandlung der Mukosamaterialien bzw. der zu testenden Proben vertreten. Aus diesem Grund wurde im Zuge der Testung zusätzlich der Einfluss einer vorherigen Benetzung mit einer Dispersion aus Mucin des Schweinemagens und Phosphatpuffer (pH 6,8) evaluiert. Auf Basis dieser Untersuchungen zur Methodenentwicklung wurde sowohl ein Schweineschleimhautgewebe als *ex-vivo*-Modellmaterial als auch ein Schleimhautersatzmaterial für die Charakterisierung der mukoadhäsiven Eigenschaften der Dreischichtfilme mit Desmopressin gewählt. Die Testmethode zur Bestimmung der Mukoadhäsion basierte auf der Abziehmethode zur Bestimmung der Adhäsionskraft (vgl. Abschnitt 6.2.10.4) [199].

3.2.6.2 Texturprofilanalyse von Gelatinegelen und Schweinemukosa

An einigen Stellen in der Literatur wurden im Zusammenhang mit der hier verwendeten Abziehmethode Gelatinegele als Mukosaersatzmaterial beschrieben [41, 134, 196]. Gelatine soll auf Grund der methioninreichen, kollagenartigen Struktur geeignet sein, die orale Mukosa zu imitieren [196]. Die in der Literatur am häufigsten gewählte Konzentration der Gelatinegele lag bei 6,67 %, welche wahrscheinlich der Methode der Bloom-Wert-Bestimmung zugrunde liegt. Eine Begründung für diese Auswahl wird allerdings nicht angegeben. Im Rahmen von Vorversuchen wurde bereits eine Abhängigkeit der mukoadhäsiven Eigenschaften von der Dicke bzw. Festigkeit des Mukosamaterials festgestellt, da diese einen Einfluss auf die Elastizität des Materials nimmt. Um möglichst vergleichbare Verhältnisse zwischen Gelatine als Ersatzmaterial und Schweinemukosa zu gewährleisten, wurde daher im Vorfeld eine Texturprofilanalyse von Gelatinegelen verschiedener Konzentrationen durchgeführt und mit dem Texturprofil sublingualer Mukosa verglichen (vgl. Abschnitt 6.2.10.2). Texturprofilanalysen finden Verwendung zur Charakterisierung halbfester Zubereitungen wie Gele, Salben oder Cremes [205, 208]. Die Probe durchläuft während der Messung zwei Kompressionszyklen, in denen sie bis zu einem zuvor festgelegten Grenzwert (z.B. 15 % Deformation, vgl. Tabelle 6.8) deformiert wird. Dabei ist darauf zu achten, dass die Proben vergleichbare Dicken aufweisen, da das Texturprofil von der Dicke des Materials beeinflusst werden kann. Aus den generierten Kraft-Zeit Diagrammen (vgl. Abbildung 6.8) können die Härte, die Klebrigkeit, die Kohäsivität und die Elastizität des Materials bestimmt werden.

Die Ergebnisse der Texturprofilanalyse unterschiedlich konzentrierter Gelatinegele (2,5 - 20 %) sind in Abbildung 3.42 dargestellt. Wie zu erwarten, stieg die Härte, bestimmt als Maximalkraft der ersten Kompression, mit steigender Konzentration der Gelatinegele an (Abbildung 3.42 A). Die Härte der sublingualen Mukosa war mit $0,44 \pm 0,03$ N ähnlich der Härte des 10 %-igen Gelatinegels ($0,40 \pm 0,01$ N). Mit Ausnahme des 20 %-igen Gelatinegels zeigten alle Gele eine vergleichbare Klebrigkeit wie die sublinguale Schweinemukosa (Abbildung 3.42 B). Die Kohäsivität ist ein Maß für die Verformung des Materials. Liegt der Wert für die Kohäsivität nahe bei 1, wie es bei allen Gelatinegelen sowie der Mukosa der Fall war, hat keine irreversible Verformung der Probe während der ersten Kompression stattgefunden (Abbildung 3.42 C). Dies würde für ein rein elastisches Verhalten sprechen. Die Elastizität gibt die Rückdehnung des Materials nach der Deformation an (Abbildung 3.42 D). Verhält sich die Probe zu 100 % elastisch, wäre ein Wert von etwa 0,5 zu erwarten (vgl. auch Abbildung 6.8). Mit Ausnahme des 2,5 %-igen Gelatinegels, das ein rein elastisches Verhalten aufwies, zeigten alle anderen Gelatinegele sowie die Mukosa ein viskoelastisches Verformungsverhalten, da die Ergebnisse der Kohäsivität ergaben, dass keine plastische Verformung stattgefunden hat. Ein rein elastisches Verhalten ist anhand dieser Ergebnisse jedoch ebenfalls auszuschließen, was auf eine zeitabhängige elastische Rückdehnung hindeuten kann.

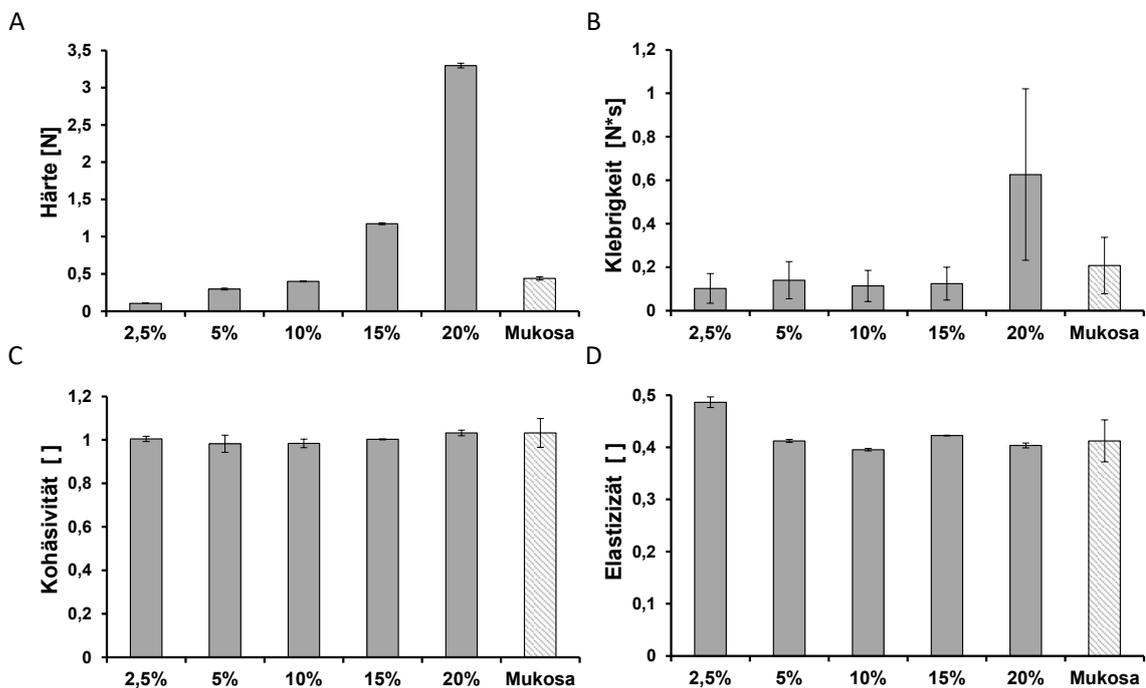


Abbildung 3.42: Texturprofilanalyse der Gelatinegele (2,5–20 %); Härte (A); Klebrigkeit (B); Kohäsivität (C); Elastizität (D); quergestrichelte Säule: Schweinezungenmukosa als Referenzwert; MW \pm KI ($\alpha=0,05$); n=6

Basierend auf den Ergebnissen der Texturprofilanalyse wurde für folgende Mukoadhäsionsuntersuchungen das 10 %-ige Gelatinegel herangezogen. Es muss

allerdings beachtet werden, dass die Ergebnisse dieser Studie auf Referenzwerten beruhen, die mit präparierten Schweinemukosastücken erhoben werden, die von nur einer Schweinezunge stammten. Tierisches Material zeigt bedingt durch eine Vielzahl an Faktoren, wie beispielsweise die Präparation oder interindividuelle Schwankungen der Schleimhautbeschaffenheit, eine hohe Variabilität. Die Texturprofilanalyse sollte allerdings in erster Linie zur Auswahl der Gelatinekonzentration des Gels dienen.

3.2.6.3 Untersuchungen an unterschiedlichen Schleimhautgeweben des Schweins und an Schleimhautersatzmaterialien

Die verschiedenen Schleimhautgewebe des Schweins (Wange, Zungenunterseite und Speiseröhre) und die beiden Schleimhautersatzmaterialien (Gelatinegel 10 % und Mucinpresslinge) wurden hinsichtlich der Eignung zur Bestimmung der mukoadhäsiven Eigenschaften untersucht. Es wurde zum einen auf die Differenzierbarkeit zwischen positiver und negativer Referenz und zum anderen auf die Ausprägung der mukoadhäsiven Eigenschaften der zu testenden Proben geachtet. Es wurde die Abziehmethode zur Bestimmung der Adhäsionskraft beim Auseinanderziehen von Probe und Schleimhautmaterial verwendet (vgl. Abschnitt 6.2.10.4). Teflon[®] wurde als negative Referenz herangezogen, da davon ausgegangen wird, dass es keine Adhäsion zur Probe zeigt. Da die auf dem Markt befindlichen mukoadhäsiven Filme (Breakyl[™], Onsolis[®], Belbuca[®] und Bunavil[™]) unter das Betäubungsmittelgesetz fallen, konnten diese Produkte nicht als Referenzmaterialien bezogen werden. Es wurde auf die kommerziell erhältliche mukoadhäsive Tablette Aftab[®] (Meda) als positive Referenz zurückgegriffen. Außerdem wurde ein dreischichtiger Placebofilm, der der Formulierung „Chito“ in Tabelle 3.6 entspricht, in die Untersuchungen mit aufgenommen, um auch eine filmförmige Arzneiform im Rahmen dieser Studie zu testen. Chitosan wurde verwendet, da dieses in der Literatur als eines der Polymere mit den stärksten mukoadhäsiven Eigenschaften gilt [182, 209]. Alle Proben wurden zusätzlich vor Beginn der Messung mit einer Mucindispersion benetzt, um den Einfluss auf die mukoadhäsiven Eigenschaften zu testen. Des Weiteren wurde für jedes Mukosamaterial ein Nullwert bestimmt, indem die Adhäsionskraft des Stempels ohne Probe gemessen wurde. Hinsichtlich der Adhäsionskraft wurde eine Grenze definiert, die der maximalen Zungenkraft bei Erwachsenen von 0,7 N (42,7 kPa) entspricht und als gestrichelte Linie in die Diagramme eingezeichnet wurde [210]. Da das Ph. Eur. keine Referenzwerte angibt und ein Vergleich mit Literaturdaten auf Grund unterschiedlicher Testbedingungen nur eingeschränkt möglich ist, wurde diese Zungenkraft als Richtwert für die Bewertung der Adhäsionskraft genutzt. Liegt die Adhäsionskraft im Bereich dieser Zungenkraft, kann davon ausgegangen werden, dass die Arzneiform selbst bei Beanspruchung durch die Zunge des Patienten an der Mundschleimhaut verbleibt. Weitere *in-vivo*-Einflüsse wie Speichelfluss oder die erhöhte Feuchtigkeit in der Mundhöhle werden bei diesen Modelluntersuchungen allerdings nicht berücksichtigt.

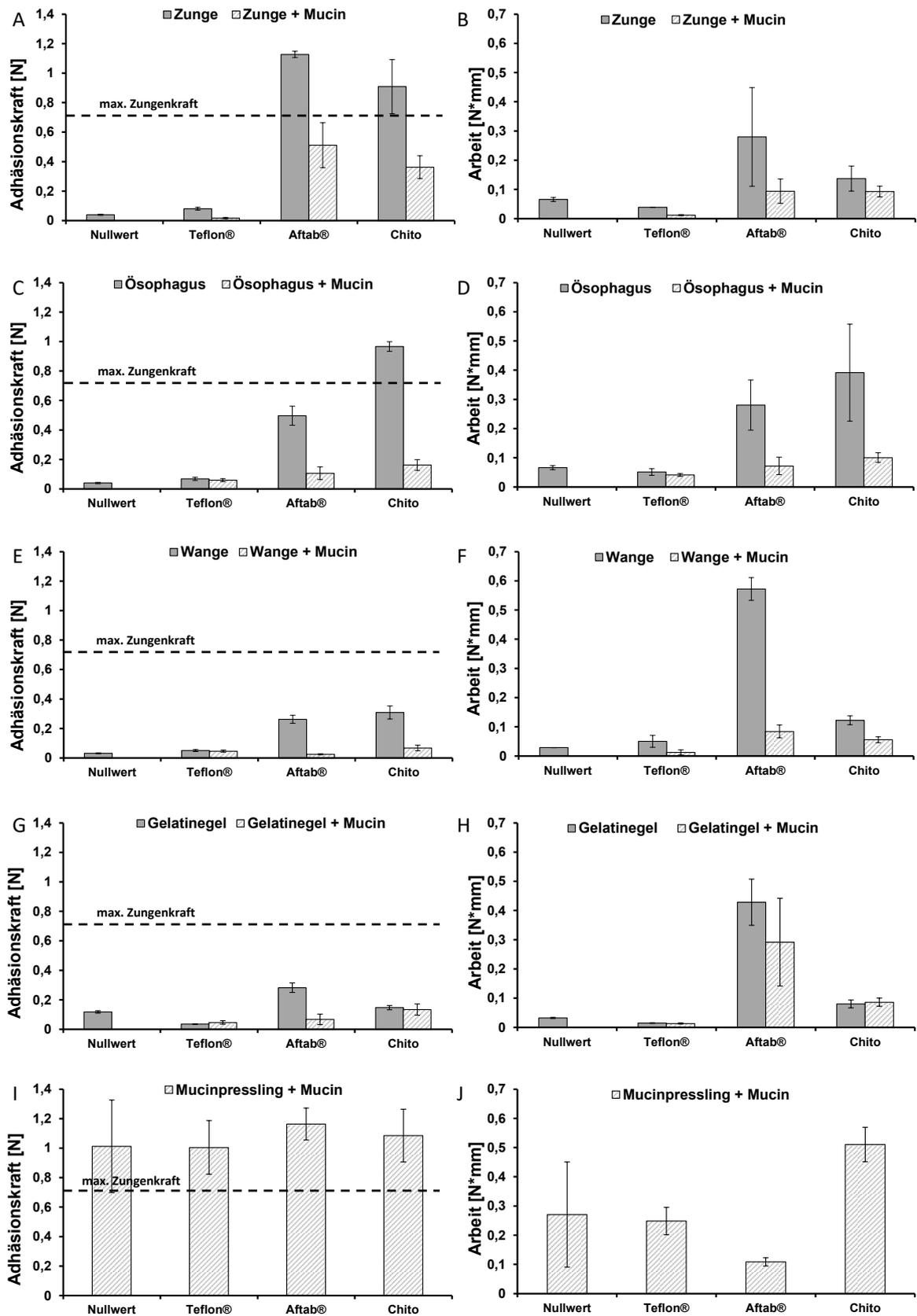


Abbildung 3.43: Vergleich von Adhäsionskraft und Arbeit unter Verwendung unterschiedlicher Mukosamaterialien; ohne (gefüllte Säulen) und nach Benetzung mit Mucindispersion (schraffierte Säulen); Zunge (A/B); Ösophagus (C/D); Wange (E/F); Gelatinegel (G/H); Mucinpressling (I/J); MW ± KI ($\alpha=0,05$); n=6

Die Ergebnisse der Bestimmung der Adhäsionskräfte und der Arbeit unter Verwendung der verschiedenen Mukosamaterialien sind in Abbildung 3.43 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass bei allen Schweineschleimhautgeweben ohne vorherige Benetzung mit Mucindispersion (Abbildung 3.43 A-F, gefüllte Säulen) eine Differenzierung zwischen Nullwert bzw. Teflon® als Negativreferenz und den beiden mukoadhäsiven Proben (Aftab® und Chito) möglich war. Die Zungenschleimhaut resultierte in den höchsten Adhäsionskräften für Aftab® und den Chitosan-Film, wobei auf Grund der hohen Streuungen keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Proben bestanden. Auch die Adhäsionskräfte, die mit der Wangenschleimhaut erhalten wurden, ergaben keine Unterschiede für die beiden Proben. Die absoluten Werte waren hingegen geringer für die bukkale Schleimhaut (Abbildung 3.43 B) verglichen zur sublingualen Schleimhaut (Abbildung 3.43 A) und lagen unterhalb des Richtwertes der maximalen Zungenkraft. An dieser Stelle muss allerdings erneut betont werden, dass die Arbeit mit tierischem, präpariertem Material mit hoher Variabilität behaftet ist. Aussagen über absolute Werte für die mukoadhäsiven Eigenschaften von Materialien können unter nicht standardisierten Bedingungen nur schwer getroffen werden. Mögliche Gründe für die geringeren Adhäsionskräfte der bukkalen Schweineschleimhaut können somit Schwankungen der Mukosadiecke, der Mukosabeschaffenheit, der Lagerungsdauer (Zeitpunkt der Schlachtung kann variieren) oder die unterschiedliche Anatomie der Wangenschleimhäute sein. Die bukkale Mukosa besteht im Gegensatz zur sublingualen Mukosa aus mehr Zellschichten (4-5-fache Anzahl an Zellschichten) [55, 211], wodurch die Elastizität der Mukosa beeinflusst werden könnte. Bei den Messungen mit der Ösophagusschleimhaut ohne Benetzung mit Mucindispersion wurden geringere Werte für Aftab® erhalten (Abbildung 3.43 C, gefüllte Säulen). Die Adhäsionskräfte des Chitosan-Films waren mit denen der Zungenschleimhaut vergleichbar. Die Speiseröhrenschleimhaut des Schweins ähnelt dem Aufbau der bukkalen Schleimhaut [211], wodurch auch hier Zellstrukturen-bedingte Einflüsse auf die Adhäsionskräfte nicht auszuschließen wären.

Die Arbeit, die der Fläche unter der Kraft-Weg-Kurve entspricht, berücksichtigt zusätzlich den Weg des Stempels, der benötigt wurde, um die mukoadhäsive Bindung zwischen beiden Parteien zu lösen. Ösophagus- und Zungenschleimhaut resultierten ohne die vorherige Benetzung mit Mucindispersion in vergleichbaren Werten für die Arbeit (Abbildung 3.43 B und D, gefüllte Säulen). Unterschiede zwischen Aftab® und Chitosan wurden nicht festgestellt. Bei beiden Proben sowie bei beiden Schleimhautgeweben wurden höhere Streuungen der Werte beobachtet. Diese können dadurch erklärt werden, dass die Schleimhaut beim Abziehen (Aufwärtsbewegung des Stempels, vgl. Abbildung 3.44, rechts) noch so stark an der Probe haftete, dass die Schleimhaut teilweise weiter nach oben gezogen wurde. Da dieser Vorgang allerdings nicht bei allen Messungen gleich stark beobachtet wurde, kam es zu starken Schwankungen der AUCs.

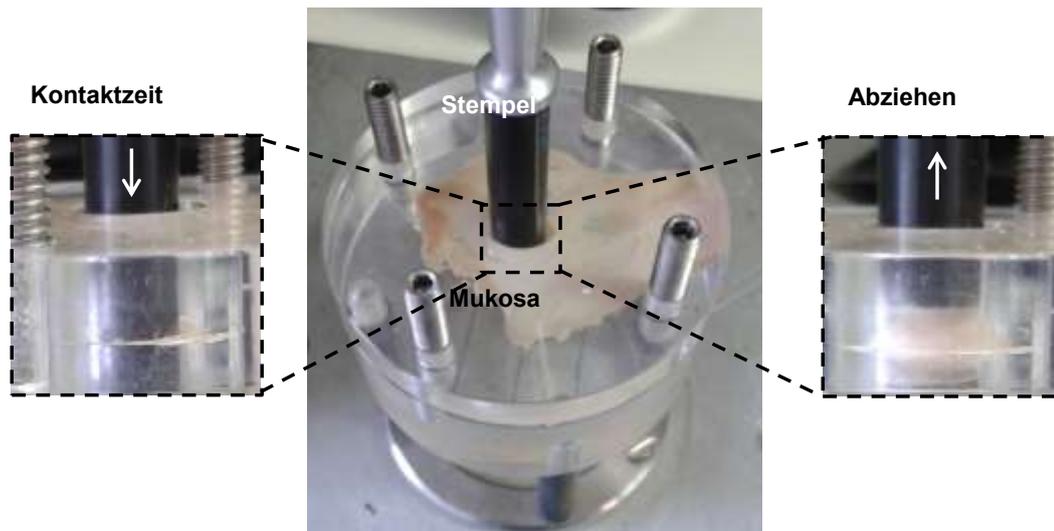


Abbildung 3.44: Mukoadhäsionsmessung eines Chitosan-Placebofilms unter Verwendung von sublingualem Mukosa; Stempel mit Film während der Kontaktzeit von 60 s (links); Aufwärtsbewegung des Stempels während des Abziehens (rechts)

Trotz der vergleichsweise niedrigen Adhäsionskraft für Aftab® unter Verwendung von bukkaler Schleimhaut wurden tendenziell die höchsten Werte für die Arbeit erhalten (Abbildung 3.43 F, gefüllte Säulen). In Abbildung 3.45 ist ein Kraft-Weg-Diagramm von Aftab® unter Verwendung bukkaler Mukosa (links) und sublingualem Mukosa (rechts) dargestellt. Schon während Kontaktphase kann ein unterschiedlicher Verlauf der beiden Kurven festgestellt werden. Durch die Krafteinwirkung (1 N) während dieser Phase scheint die bukkale Mukosa dem Druck mehr nachzugeben als die sublinguale Mukosa. Dies ist erkennbar an der Zunahme der positiven Strecke auf der Abszisse, wobei es sich wahrscheinlich um eine elastische Verformung der Mukosa handelt. Dadurch kann es zu einer Verdrängung oder Strukturänderung der bukkalen Mukosa kommen, wodurch sich die Kontaktfläche des Stempels ändern kann. Eine verringerte Kontaktfläche zwischen der am Stempel fixierten Arzneiform und der Mukosa wirkt sich stark auf den gemessenen Kraftverlauf aus, was auch die geringeren Adhäsionskräfte beider Arzneiformen im Vergleich zur ösophagealen und sublingualen Mukosa erklären könnte (Abbildung 3.43 E im Vergleich zu A und C). Außerdem ist in Abbildung 3.45 (links) zu erkennen, dass im Fall der bukkalen Schleimhaut ein längerer Weg notwendig war, um die mukoadhäsiven Bindungen zu trennen, was die erhöhte Arbeit im Vergleich zur sublingualen Mukosa erklärt. Zudem zeigte die sublinguale Mukosa sofort beim Beginn des Abziehvorgangs einen rapiden Kraftanstieg, wohingegen die bukkale Mukosa erst nach einer Strecke von etwa 1,2 mm das Kraftmaximum erreichte. Auch hier können die bereits oben genannten Punkte wie Schwankungen der Mukosadiecke, der Mukosabeschaffenheit, der Lagerungsdauer (Zeitpunkt der Schlachtung kann variieren) oder die unterschiedliche Zellstruktur der Wangenschleimhaut als mögliche Gründe aufgeführt werden. Es wurden Schleimhautgewebe von mindestens 2 Tieren in diese Studie mitaufgenommen. Um

die beobachteten Unterschiede zwischen den Schweineschleimhautgeweben zu verifizieren, wären zusätzliche Untersuchungen unter Verwendung von Schleimhautgeweben mehrerer Ursprungsquellen sowie die Testung weiterer Materialien notwendig.

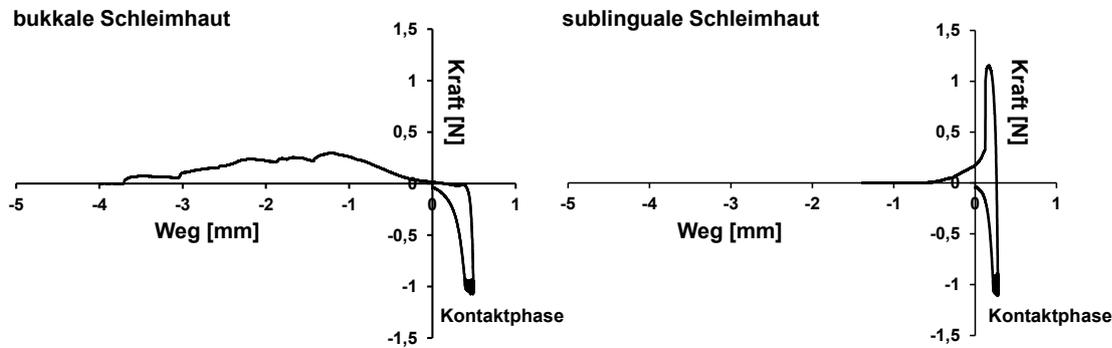


Abbildung 3.45: Kraft-Weg-Diagramm von Aftab[®] unter Verwendung von bukkaler Schleimhaut (links) und sublingualer Schleimhaut des Schweins (rechts)

Die Untersuchungen an den Mukosaersatzmaterialien ergaben für das Gelatinegel ohne vorherige Benetzung mit Mucindispersion (Abbildung 3.43 G und H, gefüllte Säulen) geringere Werte für Adhäsionskräfte und die Arbeit im Vergleich zur sublingualen und ösophagealen Schleimhaut, jedoch vergleichbare Werte zur bukkalen Schleimhaut. Auch hier war eine Differenzierung zwischen der negativen Referenz Teflon[®] und den beiden mukoadhäsiven Proben (Aftab[®] und Chito) möglich. Die Adhäsionskraft des Nullwertes war hingegen höher als bei den Schweineschleimhäuten und überraschenderweise nicht signifikant unterschiedlich zu dem Chitosan-Film, obwohl dieser unter Verwendung der Schweineschleimhäute eine stark ausgeprägte Mukoadhäsion zeigte. Die Eignung des Gelatinegels als Mukosaersatzmaterial zur Bestimmung der mukoadhäsiven Eigenschaften von Filmen sollte demnach an weiteren filmförmigen Polymerzubereitungen überprüft werden.

Bei den Messungen mit Mucinpresslingen ohne vorherige Benetzung der Probe mit Mucindispersion fand keine messbare Interaktion zwischen Probe und Mucinpressling statt. Erst nach einer Befeuchtung der Probematerialien mit Mucindispersion konnten Kraft-Weg-Diagramme aufgenommen werden (Abbildung 3.43 I und J, schraffierte Säulen). Es wurden hohe Adhäsionskräfte im Bereich von 1 - 1,2 N mit teils starken Streuungen gemessen. Eine Diskriminierung zwischen negativer und positiver Referenz war allerdings nicht mehr gegeben. Auch die Werte für die Arbeit belegten das unterschiedliche, teils widersprüchliche Verhalten der Mucinpresslinge. So zeigte der Nullwert hohe und Aftab[®] als positive Referenz niedrige Werte für die bestimmte Arbeit. Baloglu et al. verglichen bukkale Mukosa vom Rind mit Mucinpresslingen und konnten ebenfalls eine stärker ausgeprägte Mukoadhäsion der Mucinpresslinge feststellen [205]. Eine Differenzierung zwischen verschiedenen Probenmaterialien war auch hier nicht gegeben. Allerdings wurde

weder eine negative noch eine positive Referenz zur Einordnung der Ergebnisse angegeben.

Die vorherige Benetzung der Proben mit Mucindispersion führte bei allen anderen Mukosamaterialien zu einer Senkung der mukoadhäsiven Eigenschaften, wodurch eine Differenzierung der verschiedenen Proben auch hier nur noch bedingt oder gar nicht mehr möglich war. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die mukoadhäsiven Eigenschaften nach Befeuchtung der Proben mit Mucindispersion vornehmlich durch die Interaktion zwischen Mucin und Mukosamaterial und weniger von der Probe selbst bestimmt werden. Eventuell reicht eine Kontaktzeit von 60 s (vgl. Tabelle 6.9) unter diesen Umständen nicht aus, um eine Interaktion zwischen Probe und Mukosamaterial zu gewährleisten, da die Penetration der Polymerketten in die Mukusschichten der Mukosa ein zeitabhängiger Prozess ist [212]. Ein weiterer Grund für die reduzierten mukoadhäsiven Eigenschaften nach Befeuchtung der Proben mit Mucindispersion kann eine Überhydratation der Proben sein, die in der Ausbildung eines rutschigen Schleims mit reduzierter Adhäsion führen kann [212]. In der Literatur wird häufig ein vorheriger Benetzungsschritt mit Mucindispersionen vorgenommen [208, 213, 214]. Eine Untersuchung des Einflusses auf die mukoadhäsiven Eigenschaften wurde allerdings noch nicht beschrieben. Zur Erklärung der beobachteten Reduktion der Mukoadhäsion nach Benetzung mit Mucin könnten demnach Untersuchungen zu variierenden Geräteparametern, wie beispielsweise der Kontaktzeit, beitragen. Außerdem könnte die Benetzung der Proben mit Wasser oder Puffer ohne Mucin Aufschlüsse über eine mögliche Überhydratation der Polymere bieten.

Auf Basis der Untersuchungen an den Schweineschleimhautgeweben und Ersatzmaterialien wurde die sublinguale Schleimhaut des Schweines als tierisches *ex-vivo*-Modellmaterial für die folgende Untersuchung der mukoadhäsiven Eigenschaften der Dreischichtfilme aus Kapitel 3.2.4. ausgewählt. Auf eine vorherige Befeuchtung der Proben mit Mucindispersion wurde auf Grund der beobachteten stark reduzierten Mukoadhäsion verzichtet. Außerdem wurden die höchsten Werte für Adhäsionskraft und Arbeit erhalten und der zuvor definierte Richtwert der Zungenkraft erreicht. Als nicht tierisches Schleimhautersatzmaterial wird für die folgenden Untersuchungen außerdem das 10 %-ige Gelatinegel herangezogen, da Mucinpresslinge auf Grund der fehlenden Diskriminierung zwischen positiver und negativer Referenz als ungeeignet bewertet wurden.

3.2.6.4 Vergleich unterschiedlicher mukoadhäsiver Polymerschichten

Die in Kapitel 3.2.4 beschriebenen Dreischichtfilme mit Desmopressin als Wirkstoff wurden hinsichtlich ihrer mukoadhäsiven Eigenschaften unter Verwendung von sublingualer Schweineschleimhaut und einem Gelatinegel als Mukosamaterialien evaluiert. Dazu wurde die Abziehmethode verwendet und die Adhäsionskraft sowie die Arbeit bestimmt (vgl. Abschnitt 6.2.10.4). Die waagerechten, gestrichelten

Linien markieren die zuvor gemessenen Referenzwerte für Teflon® als negative und Aftab® als positive Referenz. Im Fall der Adhäsionskraft wurde auch hier die maximale Zungenkraft bei Erwachsenen als weiterer Richtwert für die Bewertung der Ergebnisse herangezogen (vgl. Abschnitt 3.2.6.3). Neben den in Kapitel 3.2.4 beschriebenen mukoadhäsiven Polymeren wurde außerdem EC als nicht mukoadhäsives Polymer in die Mukoadhäsionsstudien aufgenommen. Die Zusammensetzung der Polymerlösung für die mukoadhäsive, obere Schicht entsprach der AS der Dreischichtfilme (vgl. Tabelle 3.6) und wird in den folgenden Diagrammen als „EC“ abgekürzt. Alle anderen Filmschichten waren mit den übrigen Dreischichtfilmen vergleichbar.

Die Ergebnisse der Mukoadhäsionsuntersuchungen der Dreischichtfilme unter Verwendung von sublingualer Schweineschleimhaut sind in Abbildung 3.46 (Adhäsionskraft) und in Abbildung 3.47 (Arbeit) dargestellt. Die mukoadhäsiven Eigenschaften aller getesteten Dreischichtfilme lagen oberhalb der negativen Referenz, wobei EC den Erwartungen entsprechend die niedrigste Adhäsionskraft aufwies (vgl. Abbildung 3.46). Die Filme mit HPC und HPMC resultierten in niedrigeren Adhäsionskräften im Vergleich zu den restlichen mukoadhäsiven Polymeren. HPC, HPMC und PVP sind nicht geladene Polymere. Hinsichtlich einer gesteigerten Mukoadhäsion wurden ionische Polymere im Allgemeinen als vorteilhaft beschrieben, da sie auf Grund ihrer Ladung ionische Wechselwirkungen mit den Glykoproteinen des Mukus eingehen können [209, 212]. Dies könnte die niedrigeren Adhäsionskräfte der HPC- und HPMC-Filme im Vergleich zu CMC, PA und Chitosan erklären, da es sich hier um ionische Polymere handelt, nicht aber die hohe Adhäsionskraft der PVP-Filme. Neben der Ladung der Polymere spielen allerdings noch weitere Faktoren eine Rolle. Dazu gehören unter anderem das MG und die eingesetzte Konzentration der Polymere [212, 215]. Eine allgemein gültige Aussage über den Einfluss des MGs auf die mukoadhäsiven Polymereigenschaften kann allerdings nicht getroffen werden. Manche Polymere, wie beispielsweise Macrogol, zeigen verbesserte mukoadhäsive Eigenschaften mit steigendem MG, andere Polymere hingegen verhalten sich genau gegensätzlich [136, 212]. Hinsichtlich der Konzentration der Polymere wurde ein polymerspezifisches Konzentrationsoptimum beschrieben, um möglichst stark ausgeprägte mukoadhäsive Eigenschaften zu erhalten [136]. Die molare Masse der verwendeten HPC war mit 80000 g/mol [198] geringer als die des PVPs (1000000-1500000 g/mol) [216]. Das MG der HPMC war nicht genau bekannt, wird vom Hersteller aber als „hoch“ bewertet. Die unterschiedlichen Konzentrationen und molaren Massen können demnach zu unterschiedlich stark ausgeprägten mukoadhäsiven Eigenschaften der Polymere führen. So könnte vermutet werden, dass für PVP die optimale Konzentration gefunden wurde, für HPC und HPMC hingegen nicht. Untersuchungen an Polymeren mit unterschiedlichen MGs oder Konzentrationen wurden nicht durchgeführt, könnten aber in Zukunft Aufschlüsse über das

unterschiedliche Verhalten der hier verwendeten nicht ionischen Polymere bieten. Chitosan und PA zeigten zusammen mit PVP die höchsten Adhäsionskräfte und erreichten den Richtwert der Zungenkraft (lag bei PA innerhalb der Streuung). Chitosan und PA gehören zu den ionischen Polymeren und wurden bereits an vielen Stellen in der Literatur als stark mukoadhäsive Polymere beschrieben [102, 182, 209, 217]. Im Fall des kationischen Polymers Chitosan wird von einer elektrostatischen Interaktion zwischen Polymer und Mukus ausgegangen, wohingegen für die anionische PA die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen diskutiert wurde [212]. Keiner der Dreischichtfilme überschritt die positive Referenzlinie der Aftab[®]-Tablette, welches ebenfalls PA als mukoadhäsives Polymer enthält. MG und Konzentration der PA sind allerdings nicht deklariert. Wie oben bereits diskutiert, können unterschiedliche Konzentrationen und MGs der Polymere zu unterschiedlich stark ausgeprägten mukoadhäsiven Eigenschaften führen. Ein weiterer Grund für die niedrigeren Adhäsionskräfte der Filme im Vergleich zu Aftab[®] könnte die höhere Dicke der Tablette im Vergleich zu den Filmen sein.

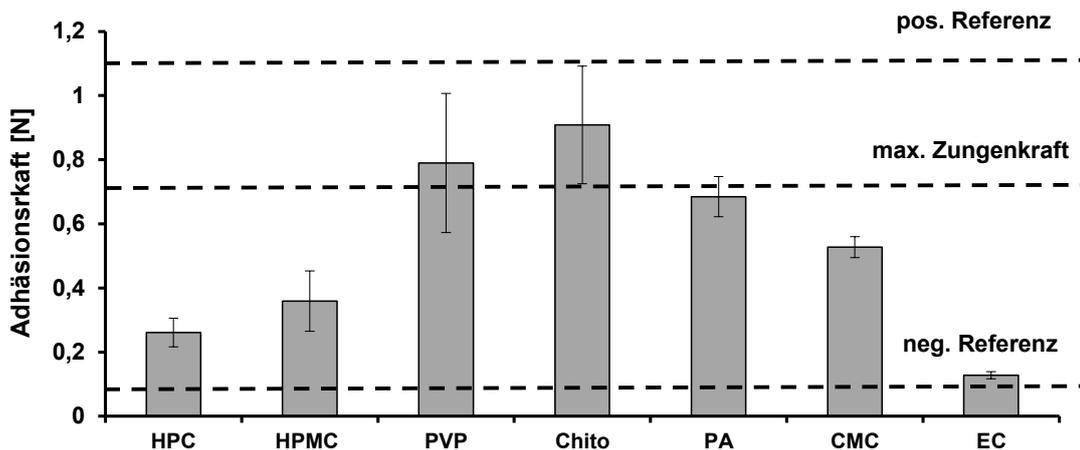


Abbildung 3.46: Adhäsionskraft unterschiedlicher mukoadhäsiver Polymerschichten unter Verwendung von sublingualer Mukosa von Schweinen; MW \pm KI ($\alpha=0,05$); n=6

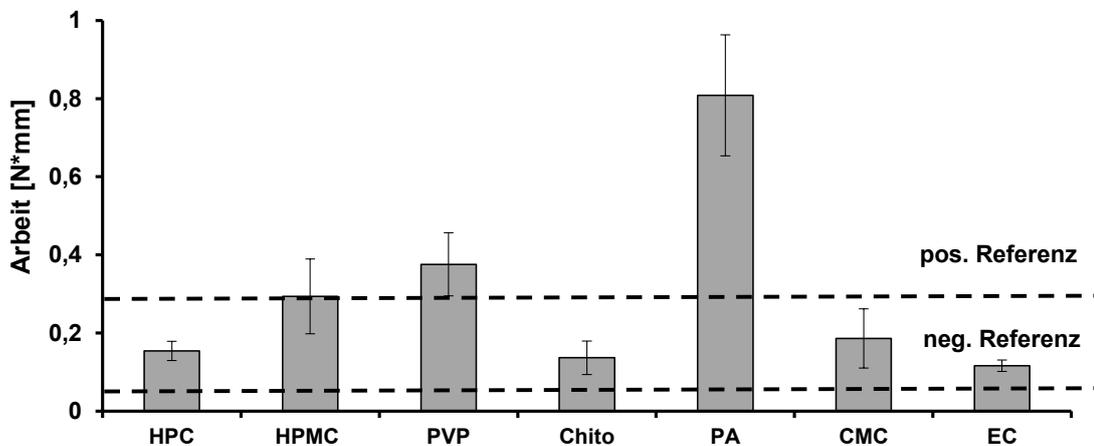


Abbildung 3.47: Adhäsionsarbeit unterschiedlicher mukoadhäsiver Polymerschichten unter Verwendung von sublingualer Mukosa von Schweinen; MW \pm KI ($\alpha=0,05$); n=6

Hinsichtlich der aufgewendeten Arbeit, bestimmt als Fläche unter der Kraft-Weg-Kurve (Abbildung 3.47), waren im Allgemeinen weniger Unterschiede zwischen den Polymeren festzustellen. PA und PVP als mukoadhäsive Polymerschichten resultierten wiederum in den höchsten Werten, wohingegen HPC, CMC und Chitosan niedrigere Werte zeigten. Trotz der hohen Adhäsionskraft des Chitosans wurde eine niedrigere Arbeit gemessen als bei den restlichen Polymeren, wie beispielsweise PA. Bei HPMC, PVP und PA wurden beim Abziehen der Probe während der Aufwärtsbewegung des Stempels Polymerfäden beobachtet, die an der Mukosa haften blieben und sich erst später ablösten. Es war demnach ein längerer Weg notwendig, um die Interaktion zwischen Polymer und Mukosa zu lösen, was auch die höheren Werte für die Arbeit erklärt. Für Chitosan wurde diese Beobachtung hingegen nicht gemacht, was auch für die vergleichsweise geringere Arbeit spricht.

Da es sich bei tierischer Mukosa um kollagenhaltiges, flexibles Gewebe handelt, sind vor allem hinsichtlich der Fläche unter der Kraft-Weg-Kurve hohe Variabilitäten möglich. Zum Teil wurde die Mukosa mit der Probe während der Stempelaufwärtsbewegung weit nach oben gezogen. Es wurde innerhalb der Messungen darauf geachtet, dass die Messstelle der Mukosa gewechselt wurde, trotzdem können Schwankungen in der Flexibilität des verwendeten Mukosastücks zu starken Abweichungen führen. Generell wurde ein großer Einfluss der Kontaktfläche zwischen Mukosa und Stempel festgestellt. Es musste vor jeder Messung erneut sichergestellt werden, dass die Mukosaoberfläche glatt und ohne Unebenheiten war. Vor allem durch die Befestigung in der Mukosahalterung (vgl. Abbildung 3.44) kann es zu einem Herausquellen der Mukosa aus der Öffnung kommen. War dies der Fall, konnte die Messung nicht fortgeführt werden. Dennoch kann es durch die Krafteinwirkung des Stempels zu einer Verschiebung des Mukosastücks kommen. Insbesondere für aufgewendete Arbeit können demnach Methoden-bedingte-Faktoren wie Oberfläche und Beschaffenheit des Mukosastücks einen starken Einfluss nehmen. Die Adhäsionskraft hingegen erschien innerhalb der hier durchgeführten Untersuchungen als robuster.

Die Ergebnisse der Mukoadhäsionsuntersuchungen der Dreischichtfilme unter Verwendung des Gelatinegels als Schleimhautersatzmaterial sind in Abbildung 3.48 (Adhäsionskraft) und in Abbildung 3.49 (Arbeit) dargestellt. Es ist zu erkennen, dass im Vergleich zur sublingualen Mukosa sowohl die Adhäsionskräfte als auch die Arbeit geringer waren. Dieser Trend wurde auch in den vorherigen Untersuchungen anhand des Chitosan-Placebofilms festgestellt (Abbildung 3.43 G und H im Vergleich zu A und B). Alle untersuchten Dreischichtfilme resultierten zwar in höheren mukoadhäsiven Eigenschaften als die negative Referenz, eine Differenzierung der Polymere war allerdings nur bedingt gegeben. Die Adhäsionskräfte der HPMC-, PVP-, PA- und CMC-Filme waren vergleichbar hoch, erreichten jedoch weder die Werte der positiven Referenz noch die der maximalen

Zungenkraft. Chitosan hingegen, welches unter Verwendung der sublingualen Schweinemukosa die höchsten Adhäsionskräfte zeigte, resultierte hier in geringeren Adhäsionskräften. Hinsichtlich der Arbeit (Abbildung 3.49) erschien lediglich der PA-Film als geeignet mukoadhäsiv.

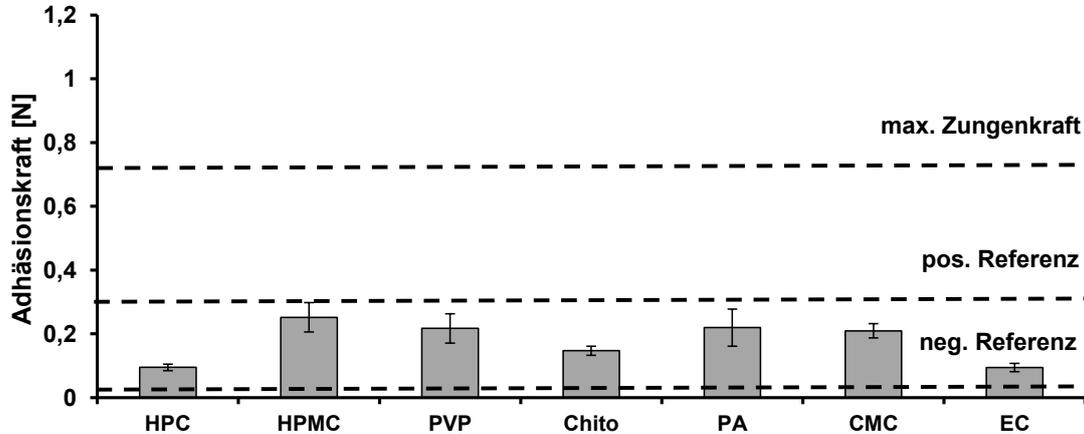


Abbildung 3.48: Adhäsionskraft unterschiedlicher mukoadhäsiver Polymerschichten unter Verwendung von Gelatinegelelen; MW \pm KI ($\alpha=0,05$); n=6

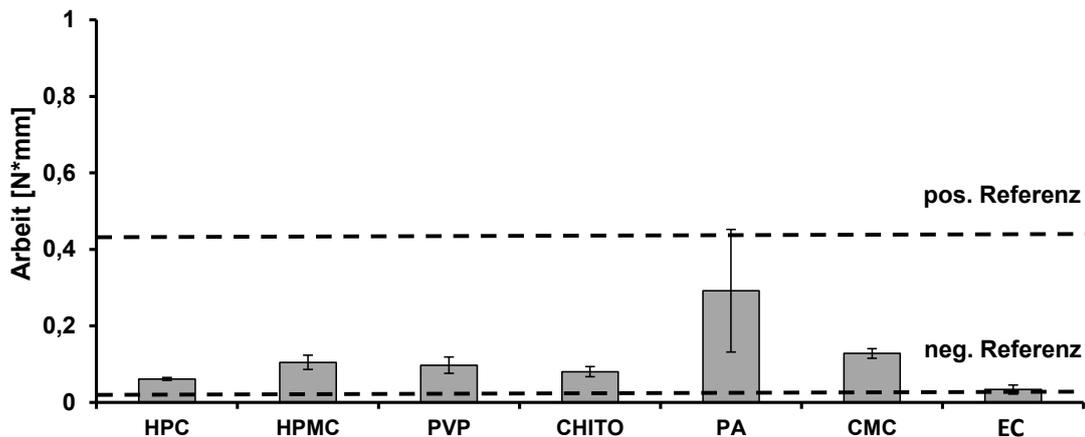


Abbildung 3.49: Adhäsionsarbeit unterschiedlicher mukoadhäsiver Polymerschichten unter Verwendung von Gelatinegelelen; MW \pm KI ($\alpha=0,05$); n=6

In der oberen Mukusschicht der Schleimhäute befinden sich zahlreiche, für die Mukoadhäsion wichtige Glykoproteine. Dies ist bei der Gelatine als Mukosaersatzmaterial nicht der Fall und kann zu den reduzierten mukoadhäsiven Eigenschaften führen. Außerdem können die starken Unterschiede in den Ergebnissen der Mukoadhäsionsmessungen der Dreischichtfilme mit beiden Mukosamaterialien möglicherweise mit der unterschiedlichen Elastizität von Schweinemukosa im Vergleich zu Gelatinegelelen erklärt werden. Die Oberfläche der Gelatine war glatt und wenig flexibel, wohingegen die sublinguale Schleimhaut eine hohe Flexibilität aufwies, was durch den höheren Kollagenanteil der Schweinemukosa bedingt ist. Kollagen ist als Strukturprotein hauptsächlich für die

Elastizität von Geweben verantwortlich. Gelatine besteht aus denaturiertem, tierischem Kollagen. Durch die hydrolytische Gewinnung werden die Kollagenfasern allerdings bis zur Primärstruktur der Polypeptidketten zerstört. Nach Quellung sorgt ein dem Kollagen ähnliches Tripelhelixgitter mit flexiblen, geknäulten Proteinketten für die Gelstruktur der Gelatine [218]. Untersuchungen zur Elastizität von Gelatinegelen lassen darauf schließen, dass sich vor allem die für die Elastizität ausschlaggebenden geknäulten Strukturen von denen des nativen Kollagens unterscheiden [219]. Durch die vergleichsweise starre Struktur des Gelatinegels war zum einen ein kürzerer Weg notwendig, um die Bindung zwischen Gel und Film zu trennen (geringere Arbeit, Abbildung 3.49). Zum anderen könnte die Starrheit des Gelatinegels auch eine verminderte mukoadhäsive Interaktion zwischen Gelatinegel und Film zur Folge haben, was die geringen Adhäsionskräfte erklären könnte (Abbildung 3.48). Texturprofilanalysen in Abschnitt 3.2.6.2 wiesen auf eine vergleichbare Elastizität des Gelatinegels und der sublingualen Mukosa hin. Allerdings wurden diese Untersuchungen nicht an mukoadhäsiven Proben, sondern nur mit Hilfe eines Stempels durchgeführt. Eine mukoadhäsive Interaktion zwischen Probe und Mukosamaterial war demnach nicht möglich.

Basierend auf den Mukoadhäsionsuntersuchungen an sublingualer Schweinemukosa, erwiesen sich die Dreischichtfilme PVP, Chitosan und PA hinsichtlich der mukoadhäsiven Eigenschaften am geeignetsten. Die Adhäsionskräfte lagen im Bereich des zuvor definierten Richtwerts, der der maximalen Zungenkraft von Erwachsenen entspricht. Sowohl PVP als auch Chitosan sowie PA finden in der Literatur oft Verwendung als mukoadhäsive Polymere in verschiedenen Arzneiformen [102, 182, 209, 217, 220, 221]. Auch als mukoadhäsive, filmbildende Polymere in Mehrschichtfilmen fanden sie bereits Einsatz [68, 88, 90].

Ziel der Mukoadhäsionsuntersuchungen war es, aus den zuvor entwickelten Dreischichtfilmen mit den unterschiedlichen mukoadhäsiven Schichten diejenigen auszuwählen, die geeignete mukoadhäsive Eigenschaften aufwiesen und somit für weitere Untersuchungen herangezogen werden sollten. Die Messungen mit den Gelatinegelen führten im Allgemeinen zu weniger diskriminierenden Ergebnissen. Dadurch wurde die Bewertung der Dreischichtfilme hinsichtlich der mukoadhäsiven Eigenschaften nur auf der Basis der Ergebnisse vorgenommen, die mit der sublingualen Schweinemukosa erhalten wurden. Aus diesem Grund wurden die Dreischichtfilme PVP, Chitosan und PA für weitere Untersuchungen hinsichtlich der Lagerstabilität von Desmopressin nach ICH-Richtlinie ausgewählt (vgl. Abschnitt 3.2.4.6).

3.2.6.5 Zusammenfassung

Zur Evaluierung mukoadhäsiver Eigenschaften wurde eine Auswahl unterschiedlicher Schweineschleimhautgewebe (Zunge, Wange und Ösophagus) und Schleimhautersatzmaterialien (Gelatinegel und Mucinpresslinge) untereinander verglichen. Die Materialien wurden hierbei insbesondere hinsichtlich ihrer Differenzierbarkeit bei der Messung von positiven und negativen Referenzen untersucht. Auf Grund der Ergebnisse wurde die sublinguale Schweinemukosa als *ex-vivo*-Modellmaterial und ein 10 %-iges Gelatinegel als Mukosaersatzmaterial ausgewählt.

Eine vorherige Benetzung der Probe mit Mucindispersion führte zu einer Verringerung der mukoadhäsiven Eigenschaften, wodurch eine Differenzierung zwischen nicht mukoadhäsiven und mukoadhäsiven Materialien nicht mehr gegeben war. Mögliche Gründe sind eine Überhydratation der Polymere oder eine ungenügende Interaktionszeit zwischen Probe und Mukosamaterial.

Die Mukoadhäsionsuntersuchungen der Dreischichtfilme an sublingualer Schweinemukosa zeigten, dass die mukoadhäsiven Eigenschaften der Dreischichtfilme PVP, Chitosan und PA am stärksten ausgeprägt waren. Der zuvor definierte Richtwert der maximalen Zungenkraft beim Erwachsenen als Adhäsionskraft zwischen Film und Mukosa konnte erreicht werden. Die Mukoadhäsionsmessungen an den Gelatinegelen resultierten in geringeren Adhäsionskräften der Dreischichtfilme und führten im Allgemeinen zu weniger diskriminierenden Ergebnissen im Vergleich zur sublingualen Mukosa.

Basierend auf den Mukoadhäsionsdaten der sublingualen Schweinemukosa fiel die Auswahl auf die Zubereitungen PVP, Chitosan und PA als Dreischichtfilme für die weitere Charakterisierung der Lagerstabilität des Desmopressins nach ICH über 6 Monate.

3.2.7 *Ex-vivo*-Permeations- und Freisetzungsuntersuchungen

3.2.7.1 Einleitung

Das Hauptziel dieser Arbeit bestand in der Entwicklung und Charakterisierung einer mukoadhäsiven, filmförmigen Zubereitung zur orotransmukosalen Applikation des Wirkstoffs Desmopressin bei Kindern und Erwachsenen. Entwicklung (vgl. Abschnitt 3.2.2 bis 3.2.4) sowie Charakterisierung, (vgl. Abschnitt 3.2.4.2 bis 3.2.4.6) und mukoadhäsive Eigenschaften (vgl. Abschnitt 3.2.6.4) der entwickelten Dreischichtfilme waren bereits Bestandteile vorheriger Kapitel. Auf Basis dieser Studien wurden die Dreischichtfilme PVP und Chitosan als am besten geeignet bewertet und als Basisformulierungen für die weitere Charakterisierung der orotransmukosalen *ex-vivo*-Permeation sowie zu Freisetzungsversuchen herangezogen. Diese Dreischichtfilme werden deshalb als „Basisformulierungen“ bezeichnet, da im Zuge der Optimierung des Permeations- und Freisetzungsverhaltens, zusätzliche Modifikationen in der Komposition der Dreischichtfilme vorgenommen wurden, die Bestandteil dieses Kapitels sind. Der Dreischichtfilm mit PA wurde auf Grund der Ausbildung eines schwer löslichen Polyelektrolytkomplexes nicht in die Permeations- und Freisetzungsstudien mitaufgenommen.

Studien zur orotransmukosalen *ex-vivo*-Permeation von Desmopressin wurden bisher nicht veröffentlicht, sodass zunächst Untersuchungen zur Methodenentwicklung durchgeführt wurden. Es sollte zu Beginn generell überprüft werden, ob Desmopressin als „nicht Lipinski“ Peptidmolekül mit einer hohen molaren Masse (1069 g/mol) und einer ausgeprägten Hydrophilie in der Lage ist, die lipophilen Biomembranen der Mukosa zu permeieren. Auf Grund der hydrophilen Molekülstruktur wurde in Studien zur intestinalen Desmopressinpermeation ein passiver, transzellulärer Permeationsweg beschrieben. Ein aktiver Transport wurde demnach ausgeschlossen [222-224].

3.2.7.2 Methodenentwicklung zur *ex-vivo*-Permeationsuntersuchung

Zur Charakterisierung der orotransmukosalen Permeation des Peptids Desmopressin wurden *ex-vivo*-Permeationsuntersuchungen unter Verwendung von Schweinemukosa als Modellmembran herangezogen, da die Schleimhautgewebe des Schweins denen des Menschen am ähnlichsten sind [225]. Die Literatur bietet hinsichtlich Untersuchungen zum Permeationsverhalten des Desmopressins nur wenig publizierte Daten. Diese beschränken sich auf nasale [226], dermale [227, 228] und intestinale [222, 224, 229] Permeationsstudien. Untersuchungen zur oromukosalen Permeation wurden bisher nicht beschrieben. Aus diesem Grund wurden innerhalb dieser Arbeit Untersuchungen an unterschiedlichen Zellmodellen sowie Donor- und Akzeptormedien durchgeführt, um bestmögliche Versuchsbedingungen zur Testung der Dreischichtfilme zu gewährleisten.

Es wurde jeweils ein horizontales und ein vertikales Zellmodell für die Versuche verwendet (vgl. Abbildung 6.11), wobei die Bezeichnung „horizontal“ und „vertikal“ entsprechend der Permeationsrichtung gewählt wurde. Die Osmolaritäten der verwendeten Akzeptor- und Donormedien sind in Tabelle 3.10 aufgelistet. Citratpuffer pH 5,5 wurde auf Grund der bekannten Stabilität des Desmopressins als Donor- und Akzeptormedium gewählt. Da die Osmolarität und Zusammensetzung des künstlichen Speichels (vgl. Tabelle 6.5) den *in-vivo*-Bedingungen nahe kommt, wurde dieser ebenfalls als Donormedium herangezogen. Phosphatpuffer pH 6,8 wurde innerhalb dieser Arbeit bereits als Freisetzungsmedium verwendet. Auch Polnok et al. nutzten Phosphatpuffer pH 6,8 als Akzeptormedium für intestinale Permeationsversuche mit Desmopressin [229]. Folglich wurden Desmopressindonorlösungen (5 mg/ml, Citratpuffer und Speichel) mit Citratpuffer und Phosphatpuffer als Akzeptormedien unter Verwendung beider Zellmodelle getestet. Sublinguale Schweineschleimhaut diente auf Grund der vielversprechenden Eignung zur Bestimmung der Mukoadhäsion als Membran. Es wurde die unter Abschnitt 6.2.7.4 beschriebene Methode unter Verwendung der FLD-Detektion zur Gehaltsbestimmung herangezogen.

Tabelle 3.10: Osmolaritäten der Donor- und Akzeptormedien zur Entwicklung der Permeationsmethode für Desmopressin (vgl. auch Tabelle 6.5 und Abschnitt 6.2.12)

Donormedien	Osmolarität [mosmol/L]	Akzeptormedien	Osmolarität [mosmol/L]
Citratpuffer pH 5,5	29	Citratpuffer pH 5,5	29
Künstlicher Speichel	313	Phosphatpuffer pH 6,8	669

Abbildung 3.50 enthält die Permeation von Desmopressin zu beiden Donor- und Akzeptormedien-Kombinationen unter Verwendung des vertikalen Zellmodells. Zur Ansicht der Einzelkurven wird auf Abbildung 7.1 im Anhang verwiesen. Aufgetragen ist die Masse an permeiertem Desmopressin bezogen auf die Permeationsfläche (0,82 cm²) (vgl. Formel 6.4) gegen die Zeit. Die oromukosale *ex-vivo*-Permeation des Desmopressins ist nur über eine Zeit von 4 h dargestellt. Es wurden im Rahmen dieser Versuche Profile über 24 h aufgenommen. Es zeigte sich allerdings, dass die Werte nach 4 h stark in beide Richtungen schwanken, was für eine Zerstörung der Mukosamembranen spricht. Vorversuche zeigten, dass der pH-Wert der Krebs-Ringer-Pufferlösung nach 6 h Lagerzeit der Mukosa stark abfällt. Dies kann auf einen bakteriellen Abbau der Mukosa schließen lassen. Aus diesem Grund wurden die Versuche nur über eine Messzeit von 4 h durchgeführt.

Tabelle 3.11 enthält die Korrelationskoeffizienten (R) der Permeationsprofile, den Flux (F_I) sowie die scheinbaren Permeabilitätskoeffizienten (K_P) (vgl. Formeln 6.5, und 6.6 in Abschnitt 6.2.12.1). K_P wird als „scheinbarer“ Permeabilitätskoeffizient

bezeichnet, da der „wahre“ Wert auf Grund von potentiellen Metabolisierungsreaktionen des Desmopressins in der Mukosa nicht zugänglich ist.

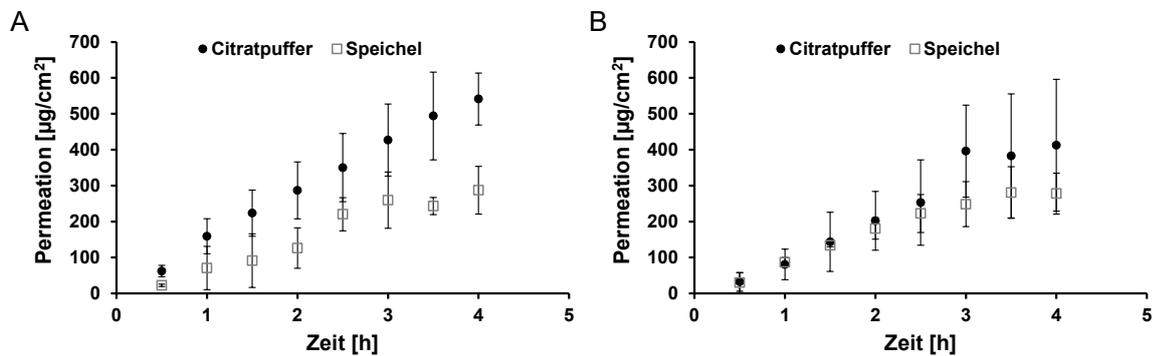


Abbildung 3.50: Permeationskinetiken von Desmopressin gelöst in Citratpuffer pH 5,5 und künstlichem Speichel als Donormedien (5 mg/ml); Akzeptormedium Citratpuffer pH 5,5 (A); Akzeptormedium Phosphatpuffer pH 6,8 (B); vertikales Zellmodell; sublinguale Schweineschleimhaut
MW \pm s; n=3

Trotz der nachteiligen Strukturattribute wie hohes MG, ausgeprägter Hydrophilie oder der Sensitivität gegenüber proteolytischen Enzymen wurde eine oromukosale *ex-vivo*-Permeation des Desmopressins beobachtet. Es ist zu erkennen, dass die Permeation des Desmopressins im Fall des Donormediums Citratpuffer einer Kinetik 0. Ordnung folgt, wohingegen es für den künstlichen Speichel über den Messzeitraum von 4 h nicht möglich war, eine eindeutige Kinetik zuzuordnen (vgl. R in Tabelle 3.11). Da es sich um eine Membran-kontrollierte Diffusion handelt, in der pro Zeiteinheit eine konstante Menge an Wirkstoff durch die Membran diffundiert, wäre eine Kinetik 0. Ordnung zu erwarten [43, 226]. Unter Verwendung von Citratpuffer als Donor- und Akzeptormedium (Abbildung 3.50, links) zeigte Desmopressin die höchste Permeation von etwa 6 % im Vergleich zu den anderen Versuchsbedingungen. Dies spiegelte sich auch in höheren Werten für K_P und F_l wieder als ein Maß für die Menge, die pro Zeiteinheit in der Gleichgewichtsphase permeiert (Tabelle 3.11). Auf Grund der hohen Streuungen der Ergebnisse und der geringen Stichprobenanzahl können allerdings keine Aussagen über Signifikanzen getroffen werden. Im Allgemeinen zeigte sich unter Verwendung des Phosphatpuffers als Akzeptormedium allerdings eine tendenziell geringere Permeation des Desmopressins im Vergleich zum Citratpuffer. Ein möglicher Grund kann in den stark unterschiedlichen Osmolaritäten der Akzeptormedien liegen (vgl. Tabelle 3.10). Der Phosphatpuffer wies von allen genutzten Medien die höchste Osmolarität und somit, als kolligative Eigenschaft, auch den höchsten osmotischen Druck auf. Demnach können die gelösten Ionen des Phosphatpuffers auf der Akzeptorseite durch die Mukosa in die Donorseite diffundieren, wodurch die Diffusion der gelösten Ionen (einschließlich des Desmopressins) von der Donorseite auf die Akzeptorseite gestört werden kann. Hinsichtlich Citratpuffer als Akzeptor wurde eine leicht verminderte Permeation unter Verwendung von Speichel als

Donormedium beobachtet. Die Osmolarität des Speichels lag mit etwa 300 mosmol/L nahe dem physiologischen Bereich (300-320 mosmol/L). Auch hier kann eine Ionendiffusion aus dem Akzeptormedium (29 mosmol/L) in die Donorkammer die Permeation des Desmopressins beeinträchtigen. Unter Verwendung von Citratpuffer als Akzeptor- und als Donormedium herrscht das geringste Konzentrationsgefälle zwischen beiden Kammern, das lediglich durch Desmopressin auf der Donorseite bestimmt wird. Demnach erschien die Wahl des Citratpuffers als Donor- und Akzeptormedium unter Verwendung des vertikalen Zellmodells am geeignetsten. Auch in der Literatur wird meist mit nur einem Medium, das gleichzeitig als Donor und Akzeptor dient, gearbeitet [18, 19, 32].

Tabelle 3.11: Korrelationskoeffizient (R), scheinbarer Permeabilitätskoeffizient (K_P) und Flux (Fl) von Desmopressin in unterschiedlichen Akzeptor- und Donormedien; MW \pm s; n=3

Akzeptor-Donormedium	R	$K_P \pm s$ [cm/h]	Fl $\pm s$ [μ g/h]
Citratpuffer-Citratpuffer	0,9979	$2,7 \cdot 10^{-2} \pm 0,5 \cdot 10^{-2}$	$111,3 \pm 20,6$
Citratpuffer-Speichel	0,9721	$1,2 \cdot 10^{-2} \pm 0,8 \cdot 10^{-2}$	$49,3 \pm 33,6$
Phosphatpuffer-Citratpuffer	0,9887	$2,0 \cdot 10^{-2} \pm 0,5 \cdot 10^{-2}$	$84,1 \pm 22,1$
Phosphatpuffer-Speichel	0,9743	$1,6 \cdot 10^{-2} \pm 0,5 \cdot 10^{-2}$	$68,6 \pm 22,9$

Unter Verwendung des horizontalen Zellmodells wurden hohe Permeationen von über 30 % mit starken Abweichungen erhalten (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse konnten auf nicht intakte Mukosamembranen zurückgeführt werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Mukosa bereits nach 30 min Messzeit porös wurde oder sogar gerissen ist. Die erhaltenen Permeationen sind demnach fehlerhaft und können nicht zur Auswertung herangezogen werden. Aus diesem Grund wurden weder K_P noch Fl berechnet.

Die schlechtere Eignung des horizontalen Zellmodells im Vergleich zum vertikalen Zellmodell kann möglicherweise auf die unterschiedlichen Druckverteilungen der Desmopressinlösung in der Donorkammer zurückgeführt werden. Im vertikalen Zellmodell (vgl. Abbildung 6.11, links) verteilt sich der Druck, der durch die Donorlösung ausgeübt wird, gleichmäßig auf die Mukosa. Beim horizontalen Zellmodell hingegen (vgl. Abbildung 6.11, rechts) kommt es zu einer ungleichmäßigen Druckbelastung auf die Mukosamembran, was zur Ausbildung von Rissen an den Stellen der Mukosa führen kann, die einem höheren hydrostatischen Druck ausgesetzt waren.

Demzufolge wurde für folgende Untersuchungen das vertikale Zellmodell zur Charakterisierung der oromukosalen *ex-vivo*-Desmopressinpermeation genutzt, wobei Citratpuffer pH 5,5 sowohl als Donor- als auch als Akzeptormedium diente. Außerdem wurde die Mukosadiecke erhöht, da es auch im Fall des vertikalen

Zellmodells an einigen Stellen zum Reißen der Mukosa kam. Um dies zu verhindern wurde für die folgenden Untersuchungen eine Mukosadicke von 200-400 μm angestrebt. Zuvor lag die Dicke der Mukosa bei 100-300 μm .

3.2.7.3 Permeationsuntersuchungen an verschiedenen Schleimhautgeweben

Die verbesserte BV des sublingual zu applizierenden, schnell zerfallenden Lyophilisats (Minirin® Lyophilisat zum Einnehmen, Ferring) im Vergleich zur oralen Tablette kann mit einer möglichen oropharyngealen Absorption des Desmopressins erklärt werden [164]. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit die sublinguale und die ösophageale Schleimhaut des Schweines als Modellschleimhäute zur Untersuchung der *ex-vivo*-Permeation des Desmopressins verglichen (vgl. Abschnitt 6.2.9). In der Literatur wird häufig die bukkale Schleimhaut des Schweines genutzt [19, 25, 32]. Allerdings ist aus der Praxis bekannt, dass es im Fall der bukkalen Schleimhaut oft zu Läsionen durch den Schlachtprozess kommen kann, wenn sich das Tier auf die Wange beißt, wodurch die Schleimhaut unbrauchbar wird. Außerdem bietet die bukkale Mukosa nur eine geringe Oberfläche für *ex-vivo*-Permeationsversuche, wodurch eine große Anzahl an Wangen gebraucht wird, sodass dies einen weiteren Grund für die Auswahl der ösophagealen Schleimhaut darstellte. Zudem ähnelt die Speiseröhrenschleimhaut dem histologischen Aufbau und der Permeabilität der bukkalen Mukosa [211, 230], wodurch auch Rückschlüsse auf die bukkale Permeation des Desmopressins möglich wären.

Der Fokus lag dabei zum einen auf der Entwicklung einer geeigneten Permeationsmethode zur Charakterisierung der Filmzubereitungen. Im Hinblick auf die angestrebte orotransmukosale Anwendung am Patienten sollten diese Versuche zum anderen dazu genutzt werden, Empfehlungen für einen geeigneten Applikationsort (sublingual oder bukkal/ösophageal) aussprechen zu können.

Zur Untersuchung der Permeabilität der Schleimhäute wurden wiederum Desmopressindonorlösungen verwendet (5 mg/ml, Citratpuffer pH 5,5) und hinsichtlich Permeationskinetik K_P und F_l analysiert (vgl. Abschnitt 6.2.12). Die Permeationsprofile einer Desmopressindonorlösung unter Verwendung von sublingualer (A) und ösophagealer Schweinemukosa (B) sind in Abbildung 3.51 dargestellt. Zur Ansicht der Einzelkurven wird auf Abbildung 7.2 im Anhang verwiesen. Unter Verwendung beider Schleimhautgewebe wurde wiederum eine Permeationskinetik 0. Ordnung festgestellt (vgl. R in Tabelle 3.12).

Auf Grund der Erhöhung der Dicke der sublingualen Schleimhaut im Vergleich zu den vorangegangenen Versuchen in Abschnitt 3.2.7.2 wurde eine Verringerung der Desmopressinpermeation festgestellt (5 % bei 100-300 μm im Vergleich zu 2 % bei 200-400 μm Mukosadicke). Es wurden allerdings auch deutlich weniger

Mukosabrüche beobachtet, sodass die Stichprobenanzahl von 3 auf 7 (sublingual) bzw. 6 (ösophageal) erhöht werden konnte (vgl. Abbildung 3.51).

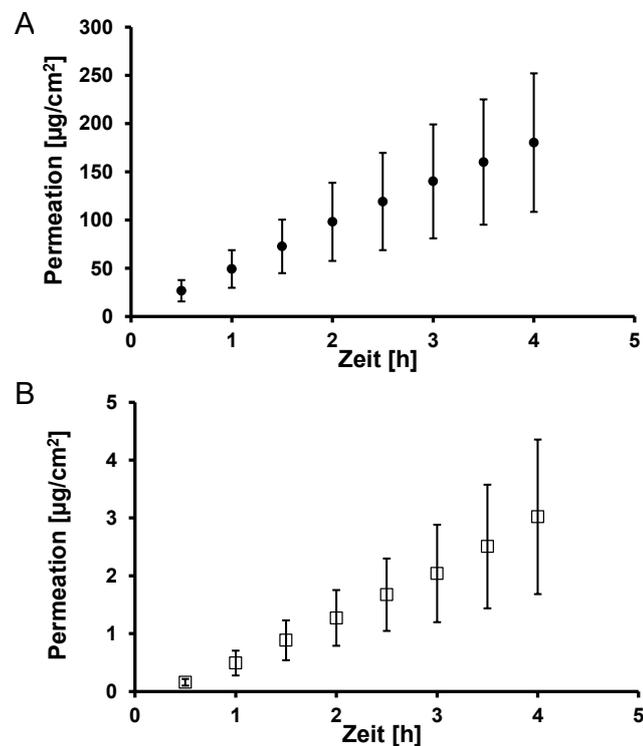


Abbildung 3.51: Permeationskinetiken einer Desmopressindonrlösung (5 mg/ml) unter Verwendung von sublingualer (A) und ösophagealer Schweineschleimhaut (B); MW \pm KI ($\alpha=0,05$); n=7 (sublingual); n=6 (ösophageal)

Insgesamt zeigte sich eine signifikant höhere Desmopressinpermeation durch die sublinguale Schleimhaut im Vergleich zur ösophagealen Mukosa ($p<0,05$). Es permeierten etwa 2 % durch die sublinguale und nur etwa 0,2 % durch die Ösophagusschleimhaut. Der Hauptgrund dieses Ergebnisses liegt wahrscheinlich in dem unterschiedlichen zellulären Aufbau und den daraus resultierenden unterschiedlichen Schleimhautdicken. Die sublinguale Mukosa ist aus etwa 8-12 Zellschichten aufgebaut (200-400 μm Dicke) [55], wohingegen die ösophageale Schleimhaut dem Aufbau der bukkalen Schleimhaut mit 40-50 Zellschichten ähnelt [230, 231] (500-700 μm Dicke), was das unterschiedliche Permeationsverhalten des Desmopressins erklären kann.

Außerdem wurde unter Verwendung der ösophagealen Schleimhaut eine zeitliche Verzögerung der Desmopressinpermeation festgestellt, was aus pharmakokinetischer Sicht eine Verzögerung des Wirkeintritts bedeuten könnte. Der Gleichgewichtsflux von 0,7 $\mu\text{g}/\text{h}$ (vgl. Tabelle 3.12) wurde erst nach 1 h erreicht. Die sublinguale Mukosa erreichte hingegen bereits zu Beginn den Gleichgewichtsflux und zeigte eine gleichmäßige Permeation.

Tabelle 3.12: Korrelationskoeffizienten (R), Permeabilitätskoeffizienten (K_P) und Flux (Fl) einer Desmopressindonorlösung unter Verwendung von sublingualer und ösophagealer Schweineschleimhaut; MW \pm KI; ($\alpha=0,05$); n=7 (sublingual); n= 6 (ösophageal)

Mukosa	R	$K_P \pm KI$ [cm/h]	Fl \pm KI [μ g/h]
Sublinguale Mukosa	0,9992	$8,7 \cdot 10^{-3} \pm 3,4 \cdot 10^{-3}$	$36,2 \pm 13,9$
Ösophageale Mukosa	0,9984	$1,6 \cdot 10^{-4} \pm 0,8 \cdot 10^{-4}$	$0,7 \pm 0,3$

Vergleicht man die K_P -Werte der sublingualen Permeation mit Literaturwerten der intestinalen Desmopressinpermeation ($1,8 - 3,6 \cdot 10^{-3}$ cm/h [224]; $2,2 \cdot 10^{-3}$ cm/h [184]; $4,3 \cdot 10^{-3}$ cm/h [232]), könnte von einer erhöhten sublingualen *ex-vivo*-Permeation des Desmopressins ausgegangen werden ($8,7 \cdot 10^{-3}$ cm/h). Trotz der höheren Permeabilität der nasalen Schleimhaut waren die gemessenen K_P -Werte der oromukosalen Permeation vergleichbar mit der Desmopressinpermeation unter Verwendung von Nasenschleimhaut des Kaninchens ($2,8-10,8 \cdot 10^{-3}$ cm/h) [226]. Es muss allerdings beachtet werden, dass die Versuchsbedingungen wie Mukosadicke oder Tierspezies (z.B. Schwein, Kaninchen) innerhalb der Studien variierten, wodurch ein direkter Vergleich der Daten nur bedingt möglich ist. Vor dem Hintergrund dieser Einschränkung wurden sie trotzdem zur Einschätzung der in dieser Arbeit gemessenen Permeation herangezogen, da keine oromukosalen Permeationsprofile für Vergleichszwecke zur Verfügung standen. Li et al. untersuchten das bukkale Permeationsverhalten des Peptids Oxytocin, welches der Molekülstruktur des Desmopressins ähnelt [43]. Es wurde ein K_P von $7,2 \cdot 10^{-4}$ cm/h unter Verwendung von 600 μ m dicker, bukkaler Schleimhaut des Kaninchens beschrieben. Obwohl ein direkter Vergleich zur oromukosalen Permeation des Desmopressins nicht möglich ist, können Literaturdaten dazu genutzt werden die erhaltenen Werte einzuordnen, da Molekülgröße und Mukosa ähnlich sind.

Anhand von Versuchen zu Desmopressindonorlösungen konnte eine erhöhte Permeabilität der sublingualen im Vergleich zur ösophagealen Mukosa gezeigt werden. In Anbetracht des Ziels der Entwicklung einer filmförmigen Zubereitung zur orotransmukosalen Administration kann auf Basis dieser Ergebnisse die sublinguale Applikation von Desmopressin empfohlen werden. Vor diesem Hintergrund wurde für die folgenden Permeationsuntersuchungen der Dreischichtfilme nur die sublinguale Schweineschleimhaut als Modellmembran verwendet.

3.2.7.4 Permeations- und Freisetzungsuntersuchungen

Das Permeationsverhalten von Arzneiformen ist nicht nur von der Permeabilität des Schleimhautgewebes für den jeweiligen Wirkstoff abhängig, sondern auch durch das Freisetzungsverhalten der Arzneiform bedingt. Die Mukosa fungiert als Barriere, die die Permeation der Wirkstoffmoleküle kontrolliert, sodass im Gleichgewichtszustand

pro Zeiteinheit nur eine bestimmte Menge Wirkstoff durch die Mukosa diffundieren kann (Flux). Insbesondere bei großen, „nicht-Lipinski“ Molekülen (Desmopressin) ist die Membrankontrolle von großer Bedeutung. Eine schnelle Freisetzung aus der Filmmatrix in Richtung Mukosa kann demnach dazu führen, dass die Desmopressinmoleküle schneller freigesetzt werden, als sie durch die Mukosa permeieren können. Die Folgen wären Wirkstoffverluste durch Speichelauswascheffekte oder Degradationsprozesse durch proteolytische Enzyme, die sich in der Mukusschicht der Schleimhaut befinden. Andererseits sollte die Freisetzung des Desmopressins aus der Filmmatrix nicht in dem Maße verlangsamt werden, dass die Freisetzung den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt innerhalb der oromukosalen Permeation einnimmt, da so die Permeation ebenfalls negativ beeinflusst werden kann. Aus diesem Grund wurden die Permeation und die Freisetzung der entwickelten Dreischichtfilme nachfolgend zusammenhängend betrachtet.

Die in dieser Arbeit verwendeten Freisetzungsmethoden mussten eine unidirektionale Freisetzung der niedrig dosierten Dreischichtfilme ermöglichen. Die Anwendung einer Blattrührer- oder Drehkorbchenapparatur mit hohen Freisetzungsvolumina, die oft für filmförmige Zubereitungen Verwendung finden [93, 103], war demnach nicht zielführend. Aus diesem Grund wurde eine Freisetzungsmethode entwickelt, die dem Aufbau des „rotierenden Zylinders“ nach USP nachempfunden wurde (vgl. Abschnitt 6.2.11.1). Diese ermöglicht eine unidirektionale Freisetzung der niedrig dosierten Dreischichtfilme mit dem vornehmlichen Ziel der Qualitätskontrolle, da *in-vivo*-Bedingungen vernachlässigt werden. Folglich wurde noch eine weitere Freisetzungsmethode zur Charakterisierung der Filme herangezogen, die die biorelevanten Verhältnisse in der Mundhöhle imitieren sollte. Dazu wurde die Methode nach Krampe et al. an die hier erforderlichen Gegebenheiten (niedrig dosierte Filme) angepasst (vgl. Abschnitt 6.2.11.2) [127].

Zur Untersuchung der *ex-vivo*-Permeation der Dreischichtfilme musste ein höherer Desmopressingehalt gewählt werden, um eine valide Analytik zu ermöglichen. Folglich wurden Dreischichtfilme mit einem Gehalt von 2,5 mg/0,82 cm² hergestellt. Auf Grund des höheren Feststoffanteils wurde Glycerol als Weichmacher hinzugegeben. Die Komposition der Filmzubereitungen ist in Tabelle 3.13 erläutert. Neben den Dreischichtfilmen PVP und Chitosan wurde auch der Einschichtfilm HCl-b, der demnach nur aus der WS bestand, getestet, um den Einfluss des dreischichtigen Aufbaus auf die Permeation und Freisetzung des Desmopressins zu evaluieren.

Zur Messung der *ex-vivo*-Permeation wurden die Filme mit der oberen Filmschicht (MS) auf die Mukosaoberfläche gelegt und kurz vor der Messung mit 200 µl Akzeptormedium benetzt (vgl. Abschnitt 6.2.12.1).

Tabelle 3.13: Zusammensetzung der Lösungen zur Herstellung der Filmschichten zur Untersuchung des Permeations- und Freisetzungsverhaltens von Desmopressin

Formulierung	MS	WS	AS
PVP	PVP 16,0 %	Desmopressin 7,3 % HPC 15,0 % HCl 1N 0,2 % Glycerol 3,0 % Wasser 74,5 %	EC 16,0 %
	Glycerol 2,0 %		Glycerol 3,5 %
	Wasser 82,0 %		Wasser 5,0 %
Chito	Chito 2,5 %	HCl 1N 0,2 % Glycerol 3,0 % Wasser 74,5 %	Ethanol 75,5 %
	HPMC 6,0 %		
	Glycerol 2,0 %		
	HCl 0,1 N 89,5 %		
HCl-b	-		-

HPMC: Pharmacoat® 603; HPC: Klucel® ELF; PVP: Kollidon® 90; Chito: Chitosan 85 % deacetyliert; EC: Aqualon® N22; Ethanol: 99 %

Abbildung 3.52 enthält die Permeationsprofile der Dreischichtfilme PVP (A) und Chitosan (B) sowie des Einschichtfilms HCl-b (C) (vgl. Abschnitt 6.2.12). Zur Ansicht der Einzelkurven wird auf Abbildung 7.3 im Anhang verwiesen. Trotz der Applikation als Film und der niedrigeren Menge an Desmopressin im Vergleich zu den zuvor untersuchten Donorlösungen (2,5 mg im Vergleich zu 7,5 mg) war es auch mit den entwickelten Filmzubereitungen möglich, eine Permeation des Desmopressins durch die sublinguale Schweinemukosa zu erzielen. Von allen untersuchten Filmen zeigte nur der Dreischichtfilm PVP eine zeitliche Verzögerung der Desmopressinpermeation. Erst nach etwa 1 h wurde der Gleichgewichtsflux von 10,3 µg/h erreicht (vgl. Tabelle 3.14 und Abbildung 3.52 A). Ein möglicher Grund für die zeitliche Verzögerung der Desmopressinpermeation könnte in der höheren Feststofffraktion und der damit verbundenen höheren Dicke der oberen Filmschicht (MS), die mit der Mukosa in Kontakt ist, liegen. Der Feststoff- bzw. Polymeranteil des PVP-Films lag bei 16 %, wohingegen die Chitosanschicht nur insgesamt 8,5 % Polymer enthielt (vgl. Tabelle 3.13). Bei Kontakt mit Akzeptormedium kommt es zur Quellung der PVP-Schicht, wodurch sich eine Gelschicht zwischen Film und Mukosa ausbilden kann, die wiederum die Permeation des Desmopressins zu Beginn verzögern kann. Geht man davon aus, dass die Dicke der Gelschicht neben des Polymertyps auch von dem Polymeranteil abhängt, wäre im Fall des Chitosans eine dünnere Gelschicht zu erwarten, was auch die sofortige Desmopressinpermeation nach 0,5 h erklären könnte. Untersuchungen zum Quellverhalten der Polymere wurden allerdings in dieser Studie nicht vorgenommen.

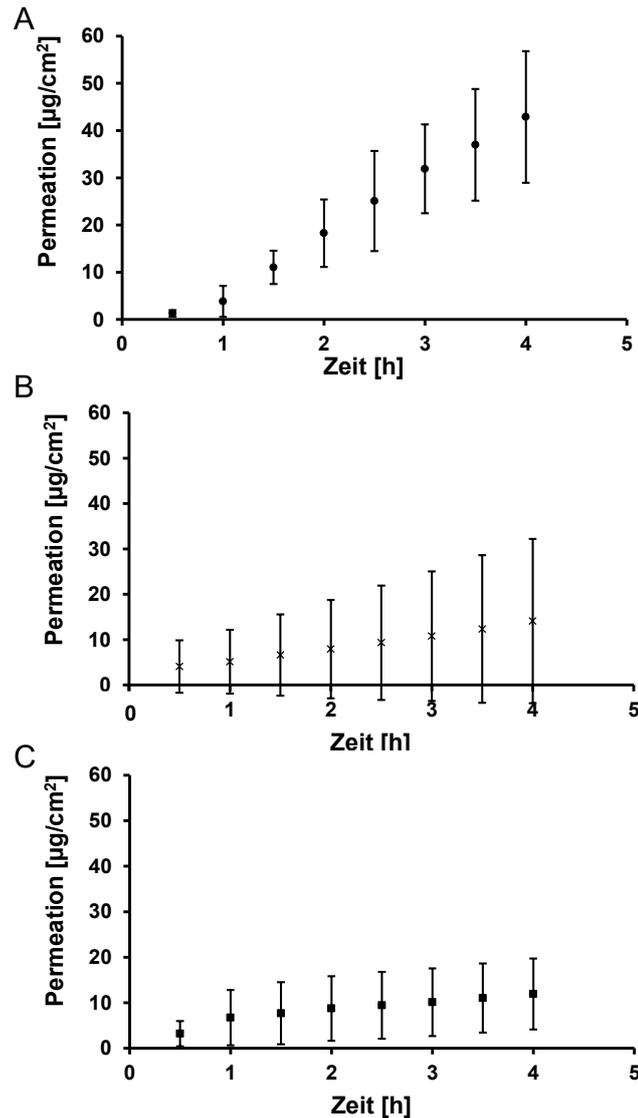


Abbildung 3.52: Permeationskinetiken des Dreischichtfilms PVP (A); Chito (B) und des Einschichtfilms HCl-b (C) unter Verwendung von sublingualer Schweineschleimhaut; MW \pm s; n=3 (PVP, Chito); n=4 (HCl-b); Einzelkurven in Abbildung 7.3 im Anhang enthalten

Allgemein zeigte der Dreischichtfilm mit Chitosan in der MS die Tendenz einer geringeren Desmopressinpermeation nach 4 h (etwa 0,5 %) im Vergleich zum PVP-Film (etwa 1,5 %). Auch die Streuungen waren im Fall des Chitosan-Films deutlich ausgeprägter. Dies kann anhand der Einzelkurven in Abbildung 7.3 B (Anhang) erklärt werden, da zu erkennen ist, dass eines der drei Permeationsprofile deutlich höher lag als die anderen beiden. Da allerdings nach der Permeation keine Risse in der Mukosa festgestellt wurden und auch der Integritätstest (vgl. Abschnitt 6.2.12.2) keine Hinweise auf Mukosadefekte lieferte, wurden die Ergebnisse in die Auswertung mitaufgenommen.

Trotz des beschriebenen permeationsfördernden Effekts des Chitosans [182] wurde innerhalb dieser Arbeit eine tendenziell geringere Permeation des Desmopressins im Vergleich zum PVP-Film beobachtet. Aussagen über Signifikanzen waren allerdings

auf Grund des niedrigen Stichprobenumfangs nicht möglich. Bereits in Kapitel 3.2.4.6 wurde im Zusammenhang mit der höheren Lagerstabilität des Desmopressins in dem Chitosan-Dreischichtfilm die Wirkung des Chitosans als schützende Barriere gegenüber Luftfeuchtigkeit diskutiert. Kommt es auch im Fall der oromukosalen Permeation zu einer Barrierewirkung des Chitosans, könnte dies die tendenziell geringere Desmopressinpermeation erklären.

Tabelle 3.14: Korrelationskoeffizienten (R) und Flux (Fl) des Desmopressins aus den Drei- bzw. Einschichtfilmen; MW \pm s; n=3 (PVP, Chito); n=4 (HCl-b)

Formulierung	R	Fl \pm s [$\mu\text{g}/\text{h}$]
PVP	0,9971	10,3 \pm 4,0
Chito	0,9982	2,3 \pm 2,9
HCl-b	0,9549	2,2 \pm 1,4

Das Permeationsverhalten des einschichtigen Films HCl-b war ebenfalls geringer ausgeprägt als das des PVP-Films (vgl. Tabelle 3.14 und Abbildung 3.52 C). Auf Grund der fehlenden MS sowie AS wäre eine höhere *ex-vivo*-Permeation zu erwarten gewesen. Vergleicht man die Konzentrationen an Desmopressin, die am Ende der Permeationsmessung (nach 4 h) in der Mukosa nachgewiesen wurden (vgl. Abschnitt 6.2.12.1), so konnten für den Einschichtfilm tendenziell höhere Werte beobachtet werden als für die beiden Dreischichtfilme (vgl. Abbildung 3.53). Ist der Anteil an freigesetztem Desmopressin höher als der Anteil, der pro Zeiteinheit durch die Mukosa permeieren kann, liegt Desmopressin im „Überschuss“ in bzw. an der Mukosa vor, wodurch ein vermehrter enzymatischer Abbau des „überschüssigen“ Desmopressins möglich wäre. Ein verstärkter Desmopressinabbau könnte somit auch die verminderte Permeation im Vergleich zum PVP-Film erklären. Allerdings wäre unter dieser Annahme auch ein verstärkter hydrolytischer Abbau des Desmopressins unter der Verwendung der Donorlösungen zu erwarten, da auch hier ein „Desmopressinüberschuss“ vorlag. Daten zur Desmopressinkonzentration in der Mukosa stehen im Fall der Desmopressinlösungen nicht zur Verfügung und müssten noch erhoben werden. Andererseits bestand der Unterschied zwischen der Desmopressindonorlösung und dem Einschichtfilm in der höheren Konzentration des gelösten Films von 12,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (2,5 mg/Film benetzt mit 200 μl Akzeptormedium) im Vergleich zu 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ der Donorlösung. Dadurch war im Fall des Einschichtfilms mehr Desmopressin pro Mukosafläche vorhanden.

Freisetzungsuntersuchungen unter Verwendung der Stempel-und-Filter-Methode konnten Hinweise für diese Annahme liefern (vgl. Abbildung 3.54 A). Es wurde eine vollständigere Freisetzung für den einschichtigen Film HCl-b erhalten, wohingegen die Dreischichtfilme Chitosan und PVP eine langsamere Freisetzung über 60 min zeigten. Außerdem ergab die Analyse der Abdeckschichten, dass bei beiden

Dreischichtfilmen selbst nach 4 h Messzeit immer noch ein Teil des Desmopressins im Film verblieb, was wiederum für eine langsamere Freisetzung des Desmopressins während den Permeationsmessungen spricht.

Im Fall des Chitosan-Films wurde ein höherer Anteil (5 %) an Desmopressin in der AS nachgewiesen. Dies spiegelt die bereits erwähnte niedrigere Desmopressinpermeation des Chitosan-Films wider. Es wurden jedoch keine Unterschiede im Freisetzungverhalten beider Dreischichtfilme festgestellt (vgl. Abbildung 3.54 A). Beide zeigten unter Verwendung der Stempel-und-Filter-Methode eine Freisetzung von etwa 70 % nach 1 h. Auch die nachgewiesene Desmopressinkonzentration in der Mukosa war bei beiden Dreischichtfilmen vergleichbar. Der höhere Desmopressinanteil in der AS des Chito-Films lässt zwar eine geringere Freisetzung vermuten, diese Annahme konnte allerdings mit den hier verwendeten Freisetzungsmethoden nicht bestätigt werden.

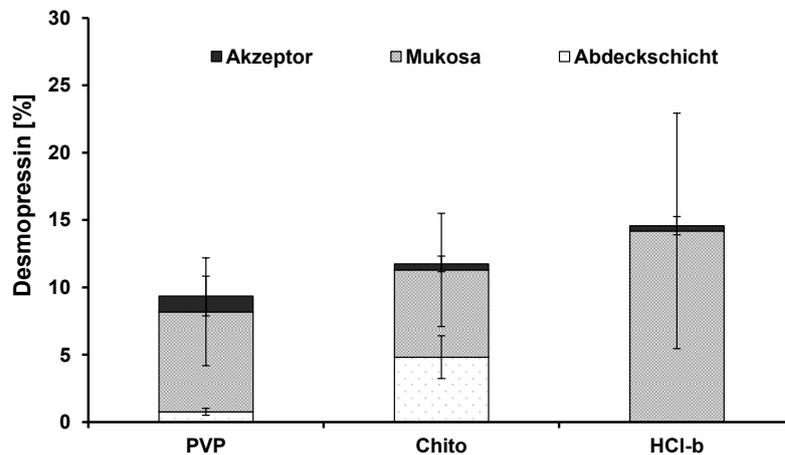


Abbildung 3.53: Wiedergefundene Desmopressinkonzentration im Akzeptormedium, in der AS und in der sublingualen Mukosa nach 4 h *ex-vivo*-Permeation bezogen auf den gemessenen Gehalt der Filme; MW \pm s; n=3 (PVP, Chito); n=4 (HCl-b)

Aus Abbildung 3.53 geht außerdem hervor, dass bei allen Filmen nach der Permeation nur etwa 10-15 % des Desmopressins wiedergefunden wurde, was auf einen starken hydrolytischen Abbau von bis zu 90 % des Desmopressins während der Permeationsmessung hindeuten kann. Die enzymatische Flora der oralen Mukosa ist im Vergleich zur intestinalen Mukosa hinsichtlich der Peptidapplikation zwar besser geeignet [12], trotzdem finden sich auch hier für einen enzymatischen Abbau verantwortliche Aminopeptidasen, Carboxypeptidasen und Dipeptidylpeptidasen [61]. So wurde für Desmopressin und Strukturanaloga des Desmopressins in Anwesenheit von Proteaseinhibitoren eine erhöhte intestinale Permeation erreicht, was durch eine verminderte Degradation der Peptide erklärt wurde [233]. Auch Bird et al. zeigten einen vergleichsweise hohen Abbau des Peptids Endorphin von etwa 80 % nach 6 h Kontakt mit bukkaler

Schweineschleimhaut, der ebenfalls auf die Anwesenheit proteolytischer Enzyme zurückgeführt wurde [18].

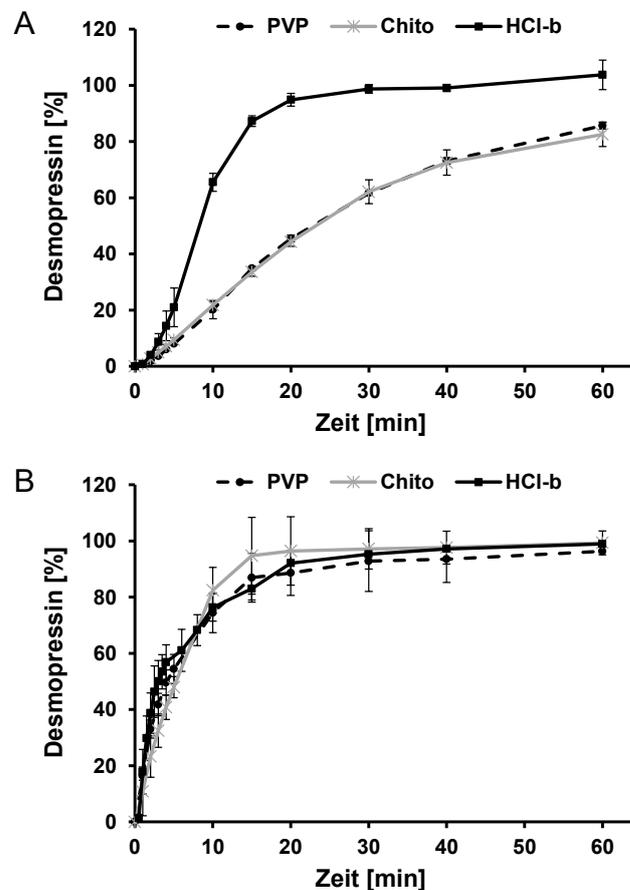


Abbildung 3.54: Freisetzungprofile der Dreischichtfilme PVP und Chito sowie des Einschichtfilms HCl-b; Stempel- und Filter-Methode (6 cm² Filme) (A); Methode des modifizierten Zylinders (3 cm² Filme) (B); MW ± s; n=3

Um auszuschließen, dass eine unvollständige Desmopressinfreisetzung die Permeation des Peptids limitiert, wurde die Freisetzung aus den Filmen darüber hinaus mit Hilfe der Methode des modifizierten Zylinders analysiert. Es könnte beispielsweise während der Filmherstellung durch zu kurze Trocknungszeiten zu einem Übergang des Desmopressins aus der mittleren WS in die unlösliche AS gekommen sein, was eine unvollständige Freisetzung zur Folge haben kann. Es zeigte sich allerdings für alle Filme bereits nach 30 min eine vollständige Desmopressinfreisetzung unter Verwendung der Methode des modifizierten Zylinders.

Es wurde demnach ein Einfluss der verwendeten Methode auf das Freisetzungsprofil der Dreischichtfilme beobachtet. Unter Verwendung der Methode des modifizierten Zylinders erfüllen die Dreischichtfilme die Anforderungen der FDA-Leitlinie für schnell freisetzende orale Arzneiformen (80 % Freisetzung nach 30 min für Arzneistoffe der Klasse III des Biopharmazeutischen Klassifizierungssystems) [234].

Die Freisetzungsprofile der Dreischichtfilme, die mit der Stempel-und-Filter-Methode erhalten wurden, deuten auf eine Matrixfreisetzung hin. Da diese Methode den *in-vivo*-Verhältnissen im Mundraum am nächsten kommt, kann davon ausgegangen werden, dass die Dreischichtfilme auch bei der orotransmukosalen Applikation eine verlängerte Matrix-Freisetzung zeigen. Vor dem Hintergrund einer gleichmäßigen Wirkstoffliberation über den Anwendungszeitraum (beispielsweise über die Nacht als Therapie der Enuresis Nocturna) wird eine Matrix-ähnliche Freisetzung in Richtung der Mukosa angestrebt.

Die unidirektionale Freisetzung der Dreischichtfilme wurde mit Hilfe der Methode des modifizierten Zylinders überprüft. Die Filme wurden mit der mukoadhäsiven Seite auf den Zylinder geklebt wurden, sodass die AS mit dem Freisetzungsmedium in Kontakt und starken hydrodynamischen Einflüssen ausgesetzt war. Es wurden nach 60 min insgesamt maximal $4,7 \pm 2,0$ % im Fall des PVP Dreischichtfilms freigesetzt, sodass von einer unidirektionalen Freisetzung ausgegangen werden kann.

Um den Einfluss der Freisetzung aus der Filmmatrix auf das Permeationsprofil zu testen, wurde der Desmopressinmatrix (WS) EC als nicht wasserlösliches, freisetzungsmodifizierendes Polymer hinzugegeben. Es wurden verschiedene Polymeranteile EC/HPC getestet und hinsichtlich der Eignung zur Filmherstellung evaluiert. Die Kombination aus 5 % HPC und 10 % EC erwies sich am geeignetsten. Die Kompositionen der MS und AS wurden nicht verändert (vgl. Tabelle 3.15).

Tabelle 3.15: Zusammensetzung der Lösungen zur Herstellung der Filmschichten mit EC zur Untersuchung des Permeations- und Freisetzungsverhaltens von Desmopressin

Formulierung	MS		WS		AS	
EC-PVP	PVP	16,0 %	Desmopressin	7,3 %	EC	16,0 %
	Glycerol	2,0 %	HPC	5,0 %	Glycerol	3,5 %
	Wasser	82,0 %	EC	10,0 %	Wasser	5,0 %
EC-Chito	Chito	2,5 %	HCl 1N	0,2 %	Ethanol	75,5 %
	HPMC	6,0 %	Glycerol	4,0 %		
	Glycerol	2,0 %	Wasser	5,0 %		
	HCl 0,1 N	89,5 %	Ethanol	68,5 %		

HPMC: Pharmacoat® 603; HPC: Klucel® ELF; PVP: Kollidon® 90; Chito: Chitosan 85 % deacetyliert; EC: Aqualon® N22; Ethanol: 99 %

Die Ergebnisse der Permeationsuntersuchungen sind in Abbildung 3.55 und in Tabelle 3.16 dargestellt. Zur Ansicht der Einzelkurven wird auch hier wiederum auf den Anhang verwiesen (Abbildung 7.4). Im Fall des EC-Chitosan-Films wurden keine verwertbaren Permeationskinetiken erhalten. Die Konzentrationen des Desmopressins lagen im Bereich des Signal-Rausch-Verhältnisses unterhalb der

Bestimmungsgrenze. Der Dreischichtfilm mit Chitosan in der MS und EC in der WS eignet sich demnach nicht zur orotransmukosalen Desmopressinapplikation. Für den PVP-äquivalenten Film konnte hingegen eine Desmopressinpermeation gemessen werden. Die Gesamtmenge (0,12 %) sowie der Flux (vgl. Tabelle 3.16) waren jedoch deutlich geringer als die des Dreischichtfilmes ohne EC. Auch im Fall des EC-PVP-Films wurde eine zeitliche Verzögerung in der Desmopressinpermeation beobachtet. Der Gleichgewichtsfluss wurde, ähnlich dem PVP-Film, erst nach etwa 0,5 h erreicht, was wiederum mit der Ausbildung einer Gelschicht als Diffusionsbarriere erklärt werden könnte.

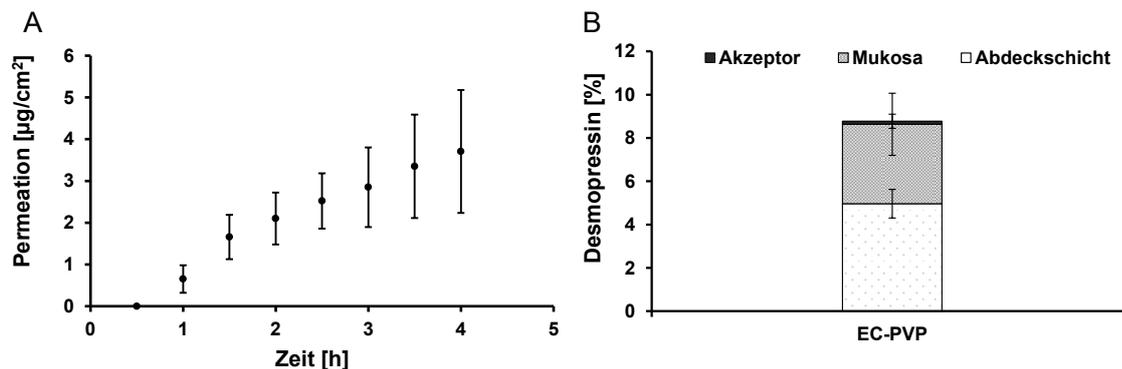


Abbildung 3.55: Permeationskinetik des Dreischichtfilms EC-PVP unter Verwendung von sublingualer Schweineschleimhaut (A); Einzelkurven in Abbildung 7.4 im Anhang; Wiedergefundene Desmopressinkonzentration im Akzeptormedium, in der AS und in der sublingualen Mukosa nach 4 h *ex-vivo*-Permeation bezogen auf den gemessenen Gehalt der Filme; MW \pm s; n=3 (B)

Tabelle 3.16: Flux (Fl) des Desmopressin aus dem Dreischichtfilm EC-PVP; MW \pm s; n=3

Formulierung	R	Fl \pm s [$\mu\text{g}/\text{h}$]
EC-PVP	0,9844	0,8 \pm 0,4

Die vergleichsweise hohe Desmopressinkonzentration, die nach der Permeation im Film verblieben ist (AS, etwa 5 %), deutet bereits auf eine geringere Desmopressinfreisetzung aus der Filmmatrix während der Permeation hin (vgl. Abbildung 3.55, B). Freisetzungsuntersuchungen unter Verwendung beider Methoden bestätigten dies (vgl. Abbildung 3.56 A und B). Der EC-PVP-Dreischichtfilm setzte nach 60 min im Vergleich zum PVP-Film ohne EC insgesamt weniger frei. Die ersten 30 min der Desmopressinfreisetzung waren allerdings vergleichbar. Erst nach 30 min flachte das Freisetzungsprofil des EC-PVP-Films ab. Selbst unter Verwendung der Methode des modifizierten Zylinders konnte keine vollständige Freisetzung des Desmopressins aus dem EC-PVP-Film nach 60 min erzielt werden. Demnach kann ein Einfluss der Desmopressinfreisetzung aus der Filmmatrix auf die oromukosale Permeation vermutet werden.

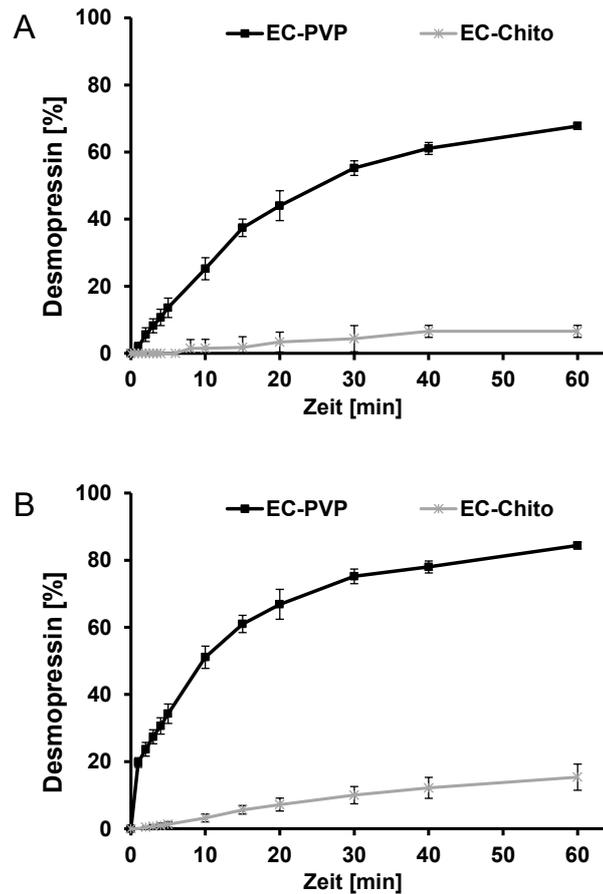


Abbildung 3.56: Freisetzungprofile der Dreischichtfilme mit EC; Stempel- und Filter-Methode (6 cm² Filme) (A); Methode des modifizierten Zylinders (3 cm² Filme) (B); MW \pm s; n=3

Der EC-Chitosan-Film setzte unter Verwendung beider Methoden nur etwa 6 bzw. 15 % nach 60 min frei. REM-Aufnahmen der Filmoberflächen der Dreischichtfilme mit EC als freisetzungsmodifizierendes Polymer zeigten eine vergleichbare Oberfläche beider Filme vor der Freisetzung (vgl. Abbildung 3.57 A am Beispiel des PVP-Films). Nach der Freisetzung zeigte der EC-PVP-Film eine porenreiche Oberfläche, die darauf hindeutet, dass sich die obere PVP-MS aufgelöst hat und die wasserlöslichen HPC-Teile aus der mittleren WS heraus gelöst wurden. Die entstanden Poren können zur Freisetzung des Desmopressins führen. Die Oberfläche des EC-Chitosan-Films wies tendenziell kleinere Poren auf, was darauf hindeutet, dass sich die Chitosan-MS schlechter bzw. langsamer aufgelöst hat und demnach die geringere Freisetzung des Desmopressins erklären könnte.

Die geringere Desmopressinfreisetzung aus dem EC-Chitosan-Film lässt auch Rückschlüsse auf die nicht messbare oromukosale Permeation des Desmopressins zu. Die Kombination aus EC in der WS und Chitosan in der MS scheint die Desmopressinliberation aus der Filmmatrix und demnach auch die Permeation durch die sublinguale Mukosa stark zu beeinträchtigen. Es wurde bereits im Zusammenhang mit dem Chitosan-Dreischichtfilm in Abbildung 3.52 und in Abbildung 3.53 die Wirkung des Chitosans als Permeationsbarriere für

Desmopressin vermutet. Die Ergebnisse zum Freisetzungs- und Permeationsverhaltens des EC-Chitosan-Films bestärken dies.

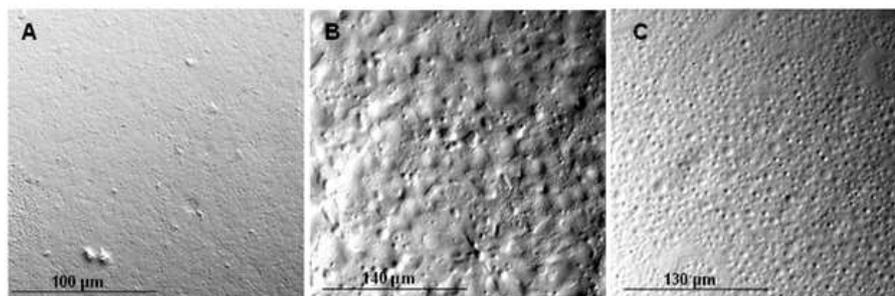


Abbildung 3.57: REM-Aufnahmen des Dreischichtfilms EC-PVP vor der Freisetzung (A) und des Dreischichtfilms EC-PVP (B) und des Dreischichtfilms EC-Chito nach der Freisetzung (C) unter Verwendung der Freisetzungsmethode des modifizierten Zylinders

Untersuchungen an Dreischichtfilmen mit EC als freisetzungsmodifizierendes Polymer konnten zeigen, dass eine verringerte Freisetzung auch zu einer reduzierten oromukosalen Permeation führen kann. Andererseits zeigte auch der schnell freisetzende Einschichtfilm HCl-b eine verminderte Desmopressinpermeation gegenüber dem PVP-Dreischichtfilm. Es lässt sich demnach vermuten, dass ein Kompromiss zwischen einem schnell- und langsam freisetzenden Desmopressinfilm gefunden werden sollte, um eine optimale Desmopressinpermeation zu erzielen.

3.2.7.5 Permeations- und Freisetzungsuntersuchungen der Dreischichtfilme unter Verwendung von Permeationsverbesserern

In den zuvor beschriebenen Untersuchungen zu den Dreischichtfilmen konnte eine maximale Desmopressinpermeation von etwa 1,5 % ($43 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) erzielt werden. Ein Zusatz von Permeationsverbesserern resultierte bereits für einige Peptide in einer erhöhten oromukosalen *ex-vivo*- [19, 235] oder *in-vivo*- [21, 236] Permeation. Folglich wurden verschiedene Permeationsverbesserer in die PVP-Basisfilme eingearbeitet und deren Einfluss auf die Permeation getestet. Permeationsverbesserer können in verschiedene Gruppen unterteilt werden, wobei die folgenden Gruppen im Zusammenhang mit der orotransmukosalen Applikation am häufigsten Verwendung finden: Tenside/Gallensalze, Fettsäuren, Polyole und Terpene [8, 237]. Aus diesem Grund wurden Natriumlaurylsulfat (SDS, Tensid), Natriumglycodesoxychololat (Glycodesoxychololat, Gallensalz) und Ölsäure (Fettsäure) als anionische und Propylenglykol (Polyol) sowie Menthol (Terpen) als neutrale Permeationsverbesserer verwendet. Chitosan, als ein häufig verwendeter kationischer Permeationsverbesserer, wurde bereits in Abschnitt 3.2.7.4 diskutiert.

Tabelle 3.17 enthält die Zusammensetzungen der Filmschichten. Die Permeationsverbesserer befanden sich in der oberen MS, da eine Einarbeitung in die WS auf Grund einer Präzipitatbildung zwischen den anionischen

Permeationsverbesserern und Desmopressin nicht möglich war. Eine vergleichbare Präzipitatbildung wurde bereits in Kapitel 3.2.5 zwischen Desmopressin und dem anionischen Polymer PA diskutiert. In diesem Fall konnte die manifeste Inkompatibilität auf die Ausbildung eines schwer löslichen Polyelektrolytkomplexes zurückgeführt werden und lässt vermuten, dass es sich auch bei den Präzipitaten zwischen Desmopressin und anionischen Permeationsverbesserern um einen solchen Komplex handelt. Innerhalb von Vorversuchen wurden Filme mit den Permeationsverbesserern und niedrigerem Desmopressingehalt (0,2 %) hergestellt. Hier wurde allerdings weder eine Präzipitatbildung noch ein zu geringer Gehalt beobachtet (Ergebnisse nicht gezeigt), wodurch eine Inkompatibilität zwischen den anionischen Permeationsverbesserern und Desmopressin zunächst ausgeschlossen wurde und sie in die Untersuchungen aufgenommen wurden.

Tabelle 3.17: Zusammensetzung der Lösungen zur Herstellung der Filmschichten mit Permeationsverbesserern zur Untersuchung des Permeations- und Freisetzungsverhaltens von Desmopressin

Formulierung	MS	WS	AS
SDS	PVP	16,0 %	
	Glycerol	2,0 %	
	SDS	1,0 %	
	Wasser	81,0 %	
Glycodesoxy- cholol	PVP	16,0 %	
	Glycerol	2,0 %	
	Glycodesoxycholol	1,0 %	
	Wasser	81,0 %	
Ölsäure	PVP	16,0 %	
	Glycerol	2,0 %	
	Ölsäure	1,0 %	
	Wasser	81,0 %	
			Desmopressin 7,3 %
Menthol	PVP	16,0 %	
	Glycerol	2,0 %	
	Menthol	1,0 %	
	Ethanol	81,0 %	
			HPC 15,0 %
Propylenglykol	PVP	16,0 %	
	Glycerol	2,0 %	
	Propylenglykol	1,0 %	
	Wasser	81,0 %	
		HCl 1N 0,2 %	Glycerol 3,5 %
		Glycerol 3,0 %	Wasser 5,0 %
		Wasser 74,5 %	Ethanol 75,5 %

HPC: Klucel® ELF; PVP: Kollidon® 90; EC: Aqualon® N22; Ethanol: 99 %

Um eine Präzipitatbildung zwischen beiden Komponenten zu vermeiden, wurden daher alle Permeationsverbesserer in die MS eingearbeitet. Während der Filmherstellung sowie im finalen Film wurde keine Präzipitatbildung festgestellt. Auch die Gehaltsbestimmungen der höher konzentrierten Desmopressinfilme (Daten nicht gezeigt) ergaben keine Auffälligkeiten. Die Permeations- und Freisetzungsergebnisse werden im Folgenden für die anionischen und neutralen Permeationsverbesserer getrennt betrachtet. Die Ergebnisse der Permeationsstudie der anionischen Permeationsverbesserer sind in Abbildung 3.58 und Tabelle 3.18 dargestellt (vgl. Abschnitt 6.2.12). Aus Vergleichsgründen und zur besseren Veranschaulichung wurde das Permeationsprofil des PVP-Dreischichtfilms ohne Permeationsverbesserer in die Abbildungen aufgenommen und als PVP-Referenz bezeichnet. Es ist zu erkennen, dass alle anionischen Permeationsverbesserer (Abbildung 3.58) eine geringere Desmopressinpermeation zeigten als die PVP-Referenz. Auf Grund des niedrigen Stichprobenumfangs können zwar keine Aussagen über Signifikanzen getroffen werden, es ist allerdings ein eindeutiger Trend zu erkennen. Es wurde demnach trotz der Verwendung anionischer Permeationsverbesserer keine erhöhte Permeation beobachtet, sondern ein gegenteiliger Effekt dieser Substanzen auf die Desmopressinpermeation festgestellt. Ein möglicher Grund kann in der zuvor beschriebenen Präzipitatbildung zwischen Desmopressin und dem anionischen Permeationsverbesserer liegen. Die Permeationsverbesserer befanden sich zwar in der MS, trotzdem könnte es zu einer Präzipitatbildung an der Grenzfläche zwischen Film und Mukosa gekommen sein. Nach Benetzung der Filme lösen sich die mukoadhäsive und die wirkstoffhaltige Schicht auf, sodass Desmopressin zusammen mit den Permeationsverbesserern an der Grenzschicht zur Mukosa vorliegt und interagieren könnte. Eine eventuelle Präzipitatbildung kann folglich die Desmopressinpermeation limitieren.

In Abbildung 3.58 A und C ist weiterhin ersichtlich, dass bei SDS und Ölsäure bereits nach 0,5 h eine messbare Permeation im Bereich des Gleichgewichtsflux erzielt wurde (vgl. Tabelle 3.18). Für den PVP- und den Glycodesoxycholat-Film wurden hingegen erst nach 1 h Desmopressinkonzentrationen im Akzepturmedium gemessen. Bei dem PVP-Film wurde bereits eine mögliche Quellschicht auf Grund des höheren Polymeranteils diskutiert. Dieser war hier allerdings bei allen Filmen gleich. Demnach kann ein Einfluss der Permeationsverbesserer auf die anfängliche Permeation angenommen werden. Der permeationsfördernde Mechanismus der Tenside und der Fettsäuren beruht im Allgemeinen auf einer Interaktion bzw. Störung der Zellstrukturen der Biomembranen, wodurch die Fluidität und Permeabilität der Membranen erhöht wird [128]. Dies könnte zumindest die anfängliche Desmopressinpermeation positiv beeinflussen. Für Glycodesoxycholat, dessen Wirkmechanismus auf ähnlichen Prinzipien beruht, würde dies allerdings nicht zutreffen, wodurch dieses Ergebnis bisher nicht geklärt werden konnte.

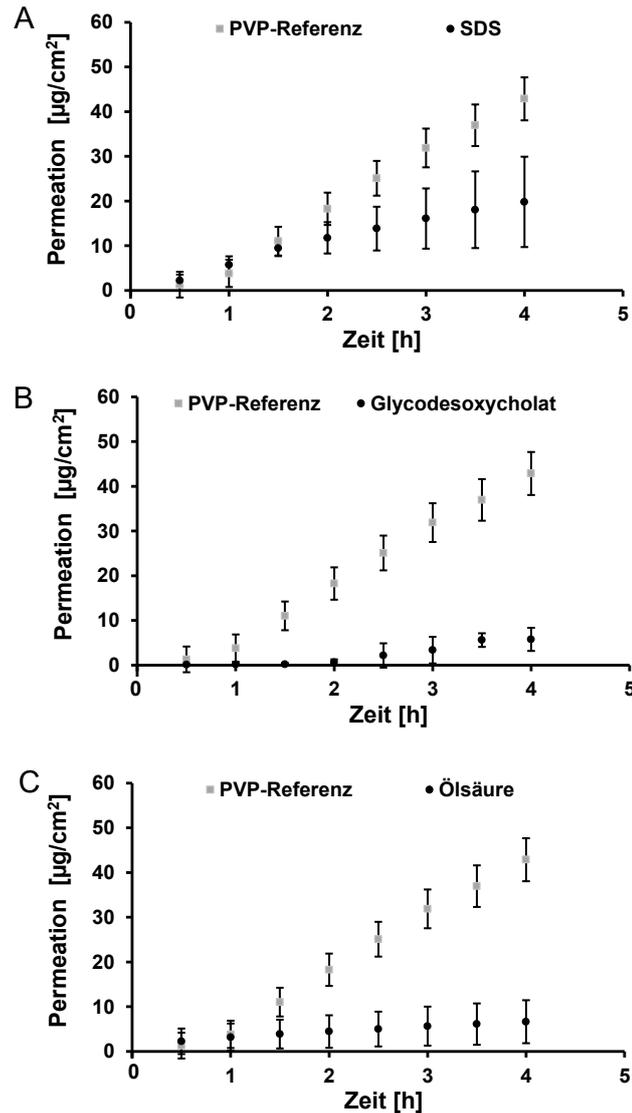


Abbildung 3.58: Permeationskinetiken des Dreischichtfilms PVP mit SDS (A); Glycodesoxycholol (B) und Ölsäure (C) als anionische Permeationsverbesserer unter Verwendung von sublingualer Schweineschleimhaut; MW \pm s; n=4 (SDS); n=3 (Glycodesoxycholol und Ölsäure); Einzelkurven in Abbildung 7.5 im Anhang enthalten

Tabelle 3.18: Flux (Fl) des Desmopressins aus den Dreischichtfilmen mit anionischen Permeationsverbesserern; MW \pm s; n=4 (SDS); n=3 (Glycodesoxycholol und Ölsäure)

Formulierung	R	Fl \pm s [µg/h]
SDS	0,9909	3,4 \pm 2,4
Glycodesoxycholol	0,9485	1,5 \pm 0,8
Ölsäure	0,9957	1,0 \pm 0,5

Die visuelle Inspektion der Filme nach den Permeationsuntersuchungen zeigte keine Auffälligkeiten, die für die zuvor vermutete Präzipitatbildung während der Permeation sprechen würden. Es wurden REM-Aufnahmen (vgl. Abschnitt 6.2.4.6)

der sublingualen Mukosa vor (Abbildung 3.59 A) und nach (Abbildung 3.59 B) der Permeation aufgenommen. Auch hier waren keine Veränderungen, die auf eine Präzipitatbildung hinweisen, erkennbar. Es zeigte sich lediglich die durch die Hydratisierung bedingte Quellung. Neben der Mukosa wurden auch REM-Aufnahmen der Dreischichtfilme vor (Abbildung 3.59) und nach (Abbildung 3.59 D) der Permeation gefertigt, welche hier am Beispiel des SDS-Films gezeigt sind. Nach der Permeation waren ungleichmäßige Erhebungen auf der Oberfläche der AS zu erkennen. Ob es sich dabei um Restpartikel des diskutierten Präzipitats handelt, kann nicht mit Sicherheit gesagt, aber als möglicher Hinweis angesehen werden.

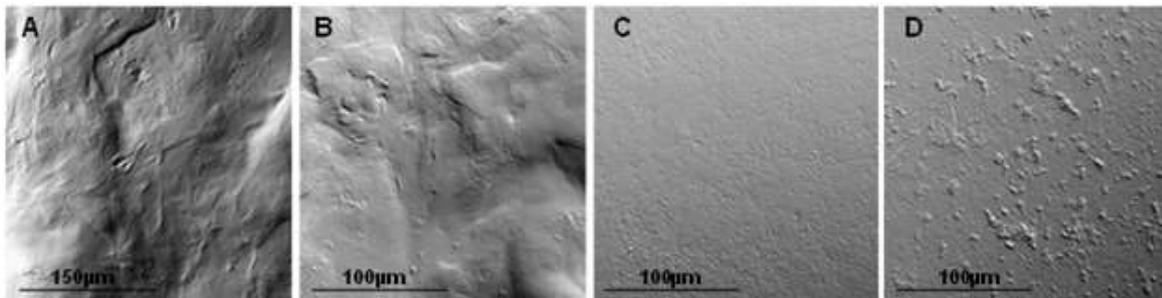


Abbildung 3.59: REM-Aufnahmen der Mukosa vor (A) und nach (B) 4 h *ex-vivo*-Permeation des Dreischichtfilms mit SDS; AS des Dreischichtfilms PVP (C) und des Dreischichtfilms mit SDS (D) nach 4 h *ex-vivo*-Permeation

Die Analyse der Desmopressinkonzentration in den jeweiligen Abdeckschichten (ASs) und der Mukosa ergab keine Unterschiede zwischen den Dreischichtfilmen mit anionischen Permeationsverbesserern (vgl. Abschnitt 6.2.12.1). Im Vergleich zum PVP-Referenzfilm (vgl. Abbildung 3.53) wurde allerdings eine tendenziell höhere Desmopressinmenge in bzw. auf der Mukosa nachgewiesen, was wiederum für die Ausbildung des Präzipitats auf der Mukosa sprechen könnte.

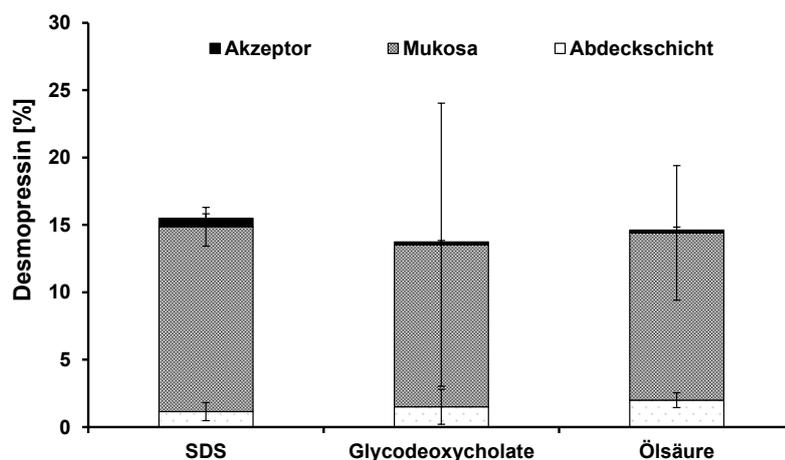


Abbildung 3.60: Wiedergefundene Desmopressinkonzentration im Akzeptormedium, in der AS und in der sublingualen Mukosa nach 4 h *ex-vivo*-Permeation der Dreischichtfilme mit anionischen Permeationsverbesserern bezogen auf den gemessenen Gehalt der Filme; MW \pm s; n=4 (SDS); n=3 (Glycodeoxycholat und Ölsäure)

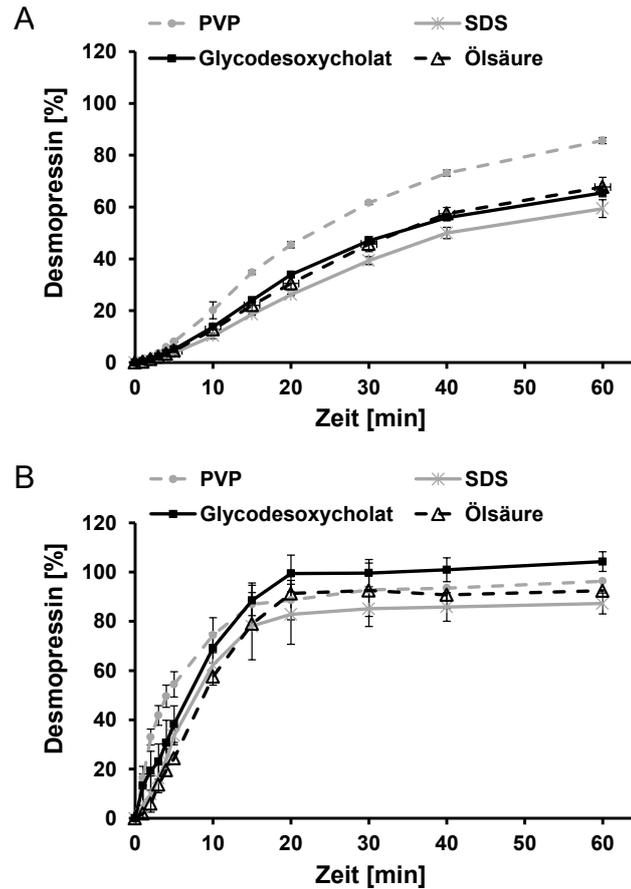


Abbildung 3.61: Freisetzungsp Profile des Dreischichtfilms PVP mit SDS, Glycodesoxycholot und Ölsäure als anionische Permeationsverbesserer; Stempel- und Filter-Methode (A) (6 cm² Filme) und der Methode des modifizierten Zylinders (3 cm² Filme) (B); MW ± s; n=3

Freisetzungsuntersuchungen zu den Dreischichtfilmen mit den anionischen Permeationsverbesserern ergaben unter Verwendung der biorelevanten Stempel- und Filter-Freisetzungsmethode (vgl. Abschnitt 6.2.11.2) eine langsamere und geringere Freisetzung der Dreischichtfilme mit SDS, Glycodesoxycholot und Ölsäure im Vergleich zur PVP-Referenz (vgl. Abbildung 3.61 A). In den ersten Minuten zeigten die Dreischichtfilme noch keine Unterschiede im Freisetzungsprofil. Nach 60 min Freisetzungszeit wurden allerdings nur etwa 60-70 % des Desmopressins aus den Dreischichtfilmen freigesetzt, wohingegen der PVP-Film eine Freisetzung von über 80 % zeigte. Die Freisetzungsuntersuchungen unter Verwendung der Methode des modifizierten Zylinders (vgl. Abschnitt 6.2.11.1) ergaben hingegen keine Unterschiede im Freisetzungsverhalten der Dreischichtfilme. Alle Filme erreichten nach 30 min ein Plateau, das auf eine vollständige Freisetzung hindeutet. Für SDS wurde nur eine Freisetzung von etwa 80 % erreicht. Die Unterschiede lagen allerdings im Bereich der Schwankungen der anderen Dreischichtfilme, die durch den manuellen Probenzug bedingt sein können.

Bei der biorelevanten Freisetzungsmethode wird der Dreischichtfilm mit der mukoadhäsiven Seite auf einen Filter gelegt, der innerhalb dieser Methode die

Mukosabarriere darstellen soll (vgl. Abschnitt 6.2.11.2). Findet auch an der Grenzfläche zwischen Dreischichtfilm und Filter die vermutete Präzipitatbildung zwischen Desmopressin und den anionischen Permeationsverbesserern statt, so könnte dieses Präzipitat als Barriere fungieren und die Desmopressinfreisetzung behindern. Es wurden daher REM-Aufnahmen der Filterpapiere vor der Freisetzung (Abbildung 3.62 A) nach der Freisetzung des PVP-Films (Abbildung 3.62 B) und nach der Freisetzung des SDS-Films (Abbildung 3.62 C) angefertigt. Vor der Freisetzung war die poröse Struktur des Filters zu erkennen, die sich auf Grund des Polymers nach der Freisetzung des PVP-Films verdichtet hat. Nach der Freisetzung der Dreischichtfilme mit anionischen Permeationsverbesserern (beispielhaft dargestellt an SDS) waren deutlich weniger poröse Strukturen zu erkennen und die Oberfläche erschien dichter. Dies könnte als Hinweis auf eine mögliche Präzipitatbildung auf dem Filter während der Freisetzung angesehen werden. REM-Aufnahmen der AS nach der Freisetzung zeigten allerdings keine Veränderungen, die auf eine Präzipitatbildung deuten (vgl. Abschnitt 6.2.4.6, Aufnahmen nicht gezeigt). Gehaltsuntersuchungen der AS und Filterpapiere nach der biorelevanten Freisetzung enthielten Rückstände von Desmopressin, allerdings waren keine Unterschiede zwischen den Filmzubereitungen festzustellen.

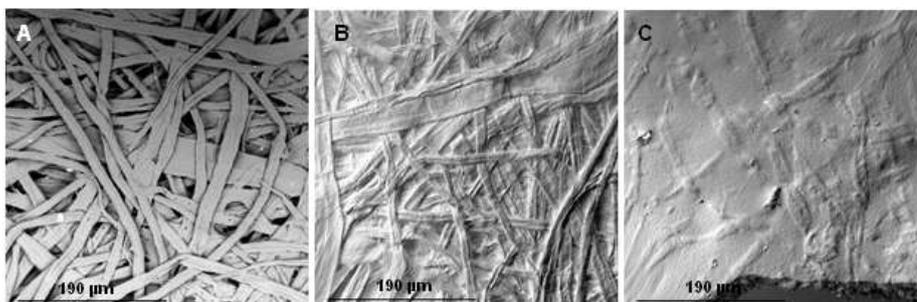


Abbildung 3.62: REM Aufnahmen des Filters vor der Freisetzung (A); nach der Freisetzung des Dreischichtfilms PVP (B); und nach der Freisetzung des Dreischichtfilms mit SDS (C) unter Verwendung der Stempel-und-Filter-Methode

Die Permeationsprofile der Dreischichtfilme mit den neutralen Permeationsverbesserern Menthol und Propylenglykol sind in Abbildung 3.63 dargestellt und Tabelle 3.19 enthält wiederum die Werte für R und Fl. Die Permeationsprofile des PVP-Referenzfilms wurden aus Vergleichsgründen auch hier mit dargestellt. Zur Ansicht der Einzelpermeationskurven der neutralen Permeationsverbesserer wird auf Abbildung 7.6 im Anhang verwiesen. Auf Grund der hohen Abweichungen des Mentholfilms waren keine Unterschiede zu dem PVP-Referenzfilm erkennbar. Die starke Streuung der Ergebnisse kann anhand der Einzelkurven in Abbildung 7.6 A (Anhang) erklärt werden, da zu erkennen ist, dass eines der vier Permeationsprofile deutlich höher lag als die anderen Profile. Die übrigen Filme resultierten in vergleichbaren Permeationsprofilen, die alle unterhalb

der des PVP-Referenzfilms lagen. Da allerdings keine Risse in der Mukosa festgestellt wurden und der Integritätstest (vgl. Abschnitt 6.2.12.2) keine Hinweise auf Mukosadefekte lieferte, wurde das nach oben abweichende Permeationsprofil in die Auswertung aufgenommen.

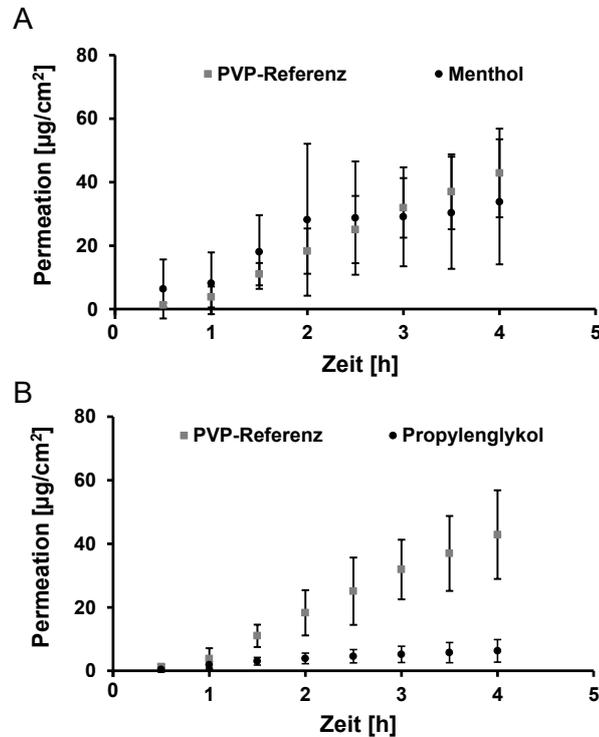


Abbildung 3.63: Permeationskinetiken des Dreischichtfilms PVP mit Menthol (A); und Propylenglykol (B) als neutrale Permeationsverbesserer unter Verwendung von sublingualer Schweineschleimhaut; MW \pm s; n=4; Einzelkurven in Abbildung 7.6 im Anhang enthalten

Ähnlich den Beobachtungen zu SDS und Ölsäure zeigte sich im Fall des Mentholfilms keine zeitliche Verzögerung der Desmopressinpermeation, was wiederum vor allem auf das stark nach oben abweichende Permeationsprofil zurückzuführen ist. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass Menthol als Permeationsverbesserer einen Einfluss auf die Permeabilität der Membran hat. Der Wirkmechanismus des Menthols ist allerdings unklar. Shojaei et al. diskutierten einen Einfluss auf den Verteilungskoeffizienten zwischen Akzeptormedium und Mukosa unter Verwendung von Nukleosidanaloga als Modellsubstanzen [238].

Tabelle 3.19: Flux (Fl) des Desmopressin aus den Dreischichtfilmen mit neutralen Permeationsverbesserern; MW \pm s; n=4

Formulierung	R	Fl \pm s [$\mu\text{g}/\text{h}$]
Menthol	0,9252	5,3 \pm 5,6
Propylenglykol	0,9812	1,3 \pm 0,7

Hinsichtlich des Dreischichtfilms mit Propylenglykol als neutraler Permeationsverbesserer wurde ebenfalls eine geringere Desmopressinpermeation im Vergleich zum PVP-Film festgestellt (vgl. Abbildung 3.63 und Tabelle 3.19). Da sich die Filmzubereitung nur in dem Anteil an Propylenglykol in der MS von der PVP-Referenz unterschied und keine Präzipitatbildung beobachtet wurde, die einen permeationslimitierenden Effekt ausüben könnte, wäre eine Permeation ähnlich dem PVP-Film zu erwarten. Die vergleichsweise niedrigere Permeation kann demnach nicht mit einer möglichen Permeationsbarriere durch Bildung eines Präzipitats an der Grenzfläche zwischen Mukosa und Film erklärt werden, was im Fall der anionischen Permeationsverbesserer vermutet wurde. Die Untersuchung des Desmopressingehalts in Mukosa und AS nach der Permeation ergab auch keine Unterschiede zwischen dem PVP- und Propylenglykol bzw. Menthol-Film (vgl. Abbildung 3.64). In beiden Fällen wurden wiederum nur etwa 15 % der gesamten Desmopressinmenge wiedergefunden. Ein höherer enzymatischer Abbau der Filme mit Permeationsverbesserern kann somit ebenfalls ausgeschlossen werden.

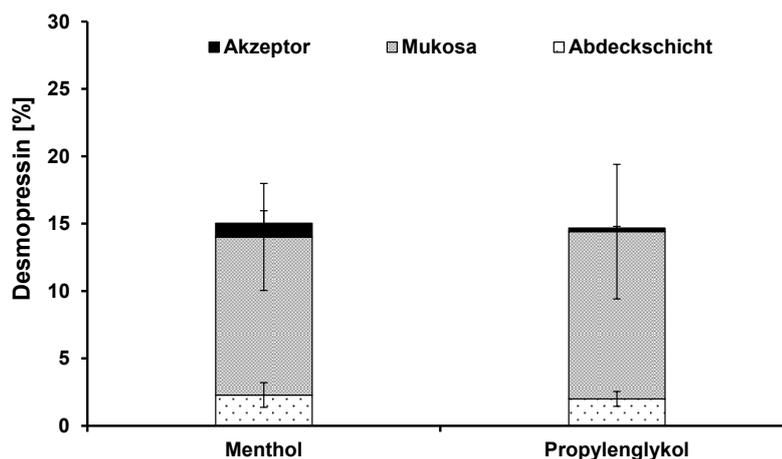


Abbildung 3.64: Desmopressinkonzentration im Akzeptormedium, in der AS und in der sublingualen Mukosa nach 4 h *ex-vivo*-Permeation der Dreischichtfilme mit neutralen Permeationsverbesserern; MW \pm s; n=4

Untersuchungen zum Freisetzungsverhalten beider Dreischichtfilme mit den neutralen Permeationsverbesserern zeigten für beide Filme eine vergleichbare Desmopressinfreisetzung zu dem PVP-Dreischichtfilm als Referenz (vgl. Abbildung 3.65). Im Gegensatz zu den Dreischichtfilmen mit anionischen Permeationsverbesserern konnte hier das Freisetzungsverhalten keine Hinweise auf die verringerte Desmopressinpermeation im Vergleich zum PVP-Referenzfilm liefern. Es zeigten sich lediglich die durch die Freisetzungsmethoden bedingten Unterschiede, die bei allen Dreischichtfilmen beobachtet wurden. Demnach ergab sich unter Verwendung der Methode des modifizierten Zylinders eine schnelle Freisetzung (80 % nach 30 min) und unter Verwendung der Stempel-und-Filter-Methode eine verlängerte Freisetzung.

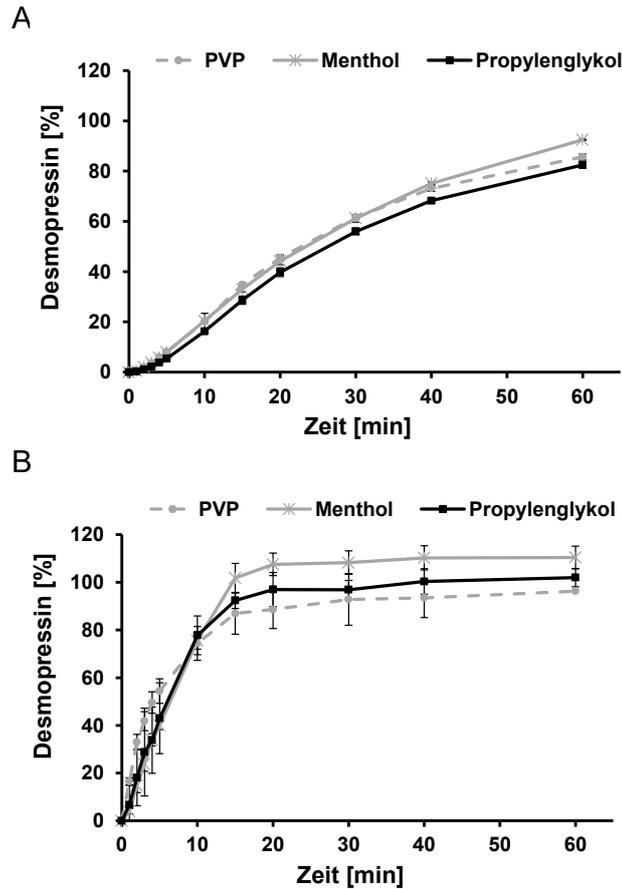


Abbildung 3.65: Freisetzungprofile des Dreischichtfilms PVP mit Menthol und Propylenglykol als neutrale Permeationsverbesserer; Stempel- und Filter-Methode (6 cm² Filme) (A); Methode des modifizierten Zylinders (3 cm² Filme) (B); MW ± s; n=3

Folglich kann auch im Fall der neutralen Permeationsverbesserer von einem negativen Effekt auf die Desmopressinpermeation ausgegangen werden, wenngleich die Gründe für verringerte Permeation auf der Basis dieser Ergebnisse nicht identifiziert werden konnten. Die Bildung eines Präzipitats mit Desmopressin kann nicht zu dem Ergebnis geführt haben. Genauso können freisetzungsbedingte Gründe ausgeschlossen werden. Gehaltsbestimmungen der Filme ergaben keine Hinweise auf eine mögliche Instabilität des Desmopressins. Ein vermehrter enzymatischer Abbau wurde ebenfalls als unwahrscheinlich eingestuft.

Demzufolge sind weitere Untersuchungen mit höheren Stichprobenumfängen notwendig, um eine eindeutige Aussage über das Permeationsverhalten der Dreischichtfilme mit neutralen Permeationsverbesserern zu treffen. Im Rahmen der hier durchgeführten Permeationsuntersuchungen wurde innerhalb einer Versuchscharge mit mindestens 6 verschiedenen Schweinezungen gearbeitet. Die Mukosastücke wurden auf die einzelnen Proben randomisiert, da interindividuelle Schwankungen der Mukosapermeabilität die Ergebnisse verfälschen können. Trotzdem kann ein Einfluss der Mukosaquelle auf die Permeationsprofile nicht ausgeschlossen werden.

Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass keiner der verwendeten anionischen und neutralen Permeationsverbesserer einen positiven Effekt auf die Desmopressinpermeation aus dem Dreischichtfilm aufwies. Hinsichtlich der pädiatrischen Zielgruppe ist es von Vorteil, auf Permeationsverbesserer verzichten zu können, da diese oft zu Schleimhautirritationen führen und somit zulassungsbezogene Probleme nach sich ziehen können.

3.2.7.6 Zusammenfassung

Bestandteil dieses Kapitels war die Charakterisierung des oromukosalen, *ex-vivo*-Permeationsverhaltens des Desmopressins sowie des Freisetzungsverhaltens der entwickelten Filmzubereitungen. Im Allgemeinen konnte trotz der ungünstigen physikochemischen Eigenschaften des Desmopressins eine oromukosale *ex-vivo*-Permeation erzielt werden. Auf Basis der Ergebnisse von Methodenentwicklungsuntersuchungen wurde Citratpuffer pH 5 sowie ein vertikales Permeationszellmodell zur Charakterisierung des Permeationsverhaltens von Desmopressin herangezogen. Untersuchungen an verschiedenen Schleimhautgeweben des Schweins resultierten in einer höheren *ex-vivo*-Desmopressinpermeation durch sublinguale Mukosa im Vergleich zu ösophagealer Mukosa. Dies kann hauptsächlich auf die Unterschiede in den Mukosadicken und der Zellschichtenanzahl zurückgeführt werden.

Der Dreischichtfilm mit PVP zeigte gegenüber Chitosan als mukoadhäsivem Polymer trotz vergleichbarer Freisetzungprofile eine höhere oromukosale *ex-vivo*-Desmopressinpermeation. Der Zusatz von EC als wasserunlösliches Polymer in der Desmopressinmatrix (WS) führte zu einer Verlängerung der Freisetzung, die sich ebenfalls in einer Reduktion der Desmopressinpermeation widerspiegelte. Chitosan führte auch hier zu einer stark verringerten Desmopressinpermeation, die außerhalb der analytischen Bestimmungsgrenze lag (Signal-Rauschverhältnis < 10). Aus diesem Grund wurde eine Barrierewirkung des Chitosans auf das oromukosale *ex-vivo*-Permeationsverhalten des Desmopressins diskutiert. Der einschichtige Desmopressinfilm HCl-b resultierte in einer schnelleren Freisetzung, aber geringeren Desmopressinpermeation verglichen mit dem Dreischichtfilm mit PVP.

Im Allgemeinen zeigten die Dreischichtfilme unter Verwendung der biorelevanten Stempel-und-Filter-Methode eine verlängerte Freisetzung, die der Higuchi-Kinetik ähnelt und somit im Hinblick auf die angestrebte orotransmukosale Anwendung als vorteilhaft eingestuft werden kann. Nach 60 min wurden nur maximal $4,7 \pm 2,0$ % Desmopressin über die Abdeckschicht freigesetzt, wodurch von einer unidirektionalen Freisetzung ausgegangen werden kann.

Entgegen den Erwartungen führte keiner der verwendeten Permeationsverbesserer zu einer Erhöhung der Desmopressinpermeation. Die verringerte Desmopressinpermeation unter Verwendung der anionischen Permeationsverbesserer

SDS, Glycodesoxycholat und Ölsäure kann eventuell auf die Bildung eines schwer löslichen Elektrolytkomplexes an der Grenzfläche zwischen Mukosa und Film zurückgeführt werden. Allerdings konnte die verringerte Desmopressinpermeation der Dreischichtfilme mit den neutralen Permeationsverbesserern Menthol und Propylenglykol auf Basis der Ergebnisse nicht geklärt werden.

Das Hauptziel dieser Arbeit bestand in der Entwicklung einer filmförmigen Zubereitung zur orotransmukosalen Applikation des Peptidhormons Desmopressin bei Kindern und Erwachsenen. Schlussfolgernd konnten dreischichtige Filme entwickelt werden, mit denen eine oromukosale Permeation von bis zu 1,5 % Desmopressin (PVP; entsprechend 43 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) nach 4 h auch ohne die Wirkung von Permeationsverbesserern erzielt werden konnte.

3.2.7.7 Ausblick

Die entwickelten Dreischichtfilme stellen eine aussichtsreiche Arzneiform zur orotransmukosalen Applikation von Desmopressin dar, wobei die sublinguale Anwendung durch die ausgeprägte Mukoadhäsion sowie der hohen Permeabilität als besonders vielversprechende Applikationsroute erscheint. Der Film könnte unter der Zunge des Kindes oder des Erwachsenen angebracht werden und den Wirkstoff über eine spezifizierte Zeit in der Nacht durch die sublinguale Schleimhaut freigeben. Die unlösliche Abdeckschicht (AS) könnte dabei zusätzlich als Kontrollmechanismus für den Anwender oder die Eltern dienen, um eine Therapiesicherheit zu schaffen.

Unter der Annahme, dass der Anteil an permeiertem Desmopressin gleichzeitig auch bioverfügbar wird, könnte auf der Basis dieser Ergebnisse auf eine 10-fache Erhöhung der BV im Vergleich zur oralen Applikation einer Tablette oder eines Lyophilisats geschlossen werden. *In-vivo*-Daten in der adulten und pädiatrischen Population wären notwendig, um diese Vermutung zu verifizieren. Weiterhin wären Studien notwendig, um eine potentielle Reizung der oromukosalen Schleimhaut des Patienten auszuschließen. Im Zuge der Therapiesicherheit würden darüber hinaus Untersuchungen zur sublingualen *in-vivo*-Verweilzeit unter Berücksichtigung der mechanischen Beanspruchung durch die Zunge benötigt werden.

Aufbauend auf den Erkenntnissen dieser Arbeit können weitere Maßnahmen zur Verbesserung der orotransmukosalen Permeation des Desmopressins ergriffen werden. Dazu gehört beispielsweise die Implementierung von Enzyminhibitoren zur Reduktion der Desmopressindegradation. Einen weiteren Ansatz bietet Nanoverkapselung von Desmopressinpartikeln. Nanopartikel können auf Grund ihrer Größe und Mobilität zu einer verbesserten oromukosalen Permeation führen.

Die Ausbildung eines Elektrolytkomplexes mit anionischen Molekülen, wie beispielsweise PA, könnte auch als Vorteil genutzt werden, um eine gesteuerte Freisetzung zu erzielen und die Effizienz der Desmopressinliberation aus dem Film zu steigern.

4 Zusammenfassung

Im Zuge der Weiterentwicklung biotechnologischer Möglichkeiten und des wachsenden Bedarfs an wirksamen Arzneistoffen in vielen Indikationsbereichen, wie beispielsweise Autoimmunerkrankungen oder viralen Infektionen ist in den letzten Jahren ein starker Zuwachs an zugelassenen Arzneistoffen mit Peptidstruktur zu verzeichnen gewesen. Auf Grund der problematischen Struktureigenschaften peptidischer Stoffe sind diese meist durch eine geringe orale Bioverfügbarkeit charakterisiert, wodurch eine parenterale Applikation notwendig ist. Es besteht demnach ein großes Interesse an alternativen, nicht invasiven Applikationswegen, um die Therapietreue des Patienten zu verbessern. Innerhalb dieser Arbeit wurden daher filmförmige Zubereitungen zur orotransmukosalen Peptidapplikation entwickelt, hergestellt und hinsichtlich der speziellen Anforderungen an diese Arzneiform charakterisiert. Da es sich dabei um ein neues Forschungsgebiet unserer Arbeitsgruppe handelt, wurden zunächst pharmakologisch inaktive Modellpeptide herangezogen, um kritische Prozess- und Produktattribute zu definieren und diese auf ein pharmakologisch aktives Peptid anzuwenden. Dazu wurde eine filmförmige Arzneiform zur orotransmukosalen Applikation des Peptidhormons Desmopressinacetat (Desmopressin), welches vornehmlich im pädiatrischen Bereich Anwendung findet, entwickelt.

Anhand von Stabilitätsuntersuchungen verschiedener einschichtiger Filmzubereitungen mit den Modellpeptiden konnte der pH-Wert als kritisches Produktattribut definiert werden. Lag der pH-Wert der Zubereitung außerhalb des pH-Wert Optimums der Peptide, kam es über eine Lagerungszeit von 3 Monaten zu einem starken hydrolytischen Abbau der Peptide. In Folge dessen eignete sich HPMC allein ohne pH-regulierende Zusätze nicht als filmbildendes Polymer und führte bereits nach der Herstellung zu starken Abbaureaktionen beider Peptide. Dabei war die Degradation des Peptids mit dem freien N-terminalen Ende stärker ausgeprägt. Auf der Basis der Ergebnisse zu den Modellpeptiden konnten weiterhin Peptid spezifische Anforderungen für die Einarbeitung in filmförmige Zubereitungen definiert werden. Strukturmerkmale wie freie, stark basische oder saure funktionelle Gruppen sollten vermieden werden oder als das korrespondierende Salz eingesetzt werden, um selbstinduzierten, pH-abhängigen Instabilitäten entgegenzuwirken. Eine stark ausgeprägte Hydrolyseempfindlichkeit ist demnach unbedingt zu vermeiden.

Bei dem Transfer der Ergebnisse auf das pharmakologisch aktive Peptid Desmopressin wurden deshalb zunächst Langzeitstabilitätsuntersuchungen unter Verwendung verschiedener pH-Regulatoren sowie HPC und HPMC als Desmopressinmatrices durchgeführt. Es zeigte sich, dass Salzsäure als pH-Regulator sowie HPC als filmbildendes Polymer am besten zur Stabilisierung des

Desmopressins in der Filmzubereitung geeignet waren. Diese dienten fortan als Desmopressimatrix.

Um eine orotransmukosale Desmopressinapplikation zu erzielen, wurden dreischichtige Filme bestehend aus einer mukoadhäsiven Schicht (MS), einer Wirkstoffschicht (WS) und einer Abdeckschicht (AS) zur unidirektionalen Freisetzung in Mukosarichtung entwickelt. Zur Auswahl der Hilfsstoffe wurde sich neben den zuvor definierten formulierungs- und peptidspezifischen Anforderungen zusätzlich an der EMA Richtlinie zur Unbedenklichkeit pharmazeutischer Hilfsstoffe in pädiatrischen Arzneimitteln orientiert. Mit Ausnahme des Dreischichtfilms mit Polyacrylsäure (PA) als mukoadhäsives Polymer erfüllten alle Filme die Anforderungen zur Gleichförmigkeit einzeldosierter Arzneiformen (2.9.40 Ph. Eur.) und führten zu keinerlei Degradation des Desmopressins. Die mukoadhäsiven Eigenschaften der Dreischichtfilme mit Povidon (PVP), PA und Chitosan (Chito) waren am stärksten ausgebildet. Die Untersuchungen zur Lagerstabilität nach ICH zeigten, dass Desmopressin in allen Filmzubereitungen über einen Zeitraum von 6 Monaten Lagerung bei 21 °C und 45 % r.F. stabil blieb. Unter Stressbedingungen (40 °C und 75 % r.F.) konnte eine teils starke Degradation des Desmopressin festgestellt werden. Die Dreischichtfilme, die das Polymer Chitosan in der MS enthielten, zeigten unter diesen Bedingungen deutlich weniger Abbaureaktionen des Desmopressins. Es wurde auf Grund der pH-abhängigen Löslichkeit eine Barrierefunktion des Chitosans gegenüber feuchtigkeitsinduzierten, hydrolytischen Abbaureaktionen angenommen. Es ist demnach eine, für filmförmige Zubereitungen übliche, trockene Lagerung in Aluminiumsachets bei Raumtemperatur notwendig.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit bestand in der Evaluation verschiedener tierischer Schleimhautgewebe sowie Schleimhautersatzmaterialien hinsichtlich ihrer Eignung zur Testung der mukoadhäsiven Eigenschaften von Arzneiformen. Es konnte gezeigt werden, dass die getesteten Schleimhautersatzmaterialien im Vergleich zu tierischer Mukosa zu weniger diskriminierenden Ergebnissen führten, wodurch sie als weniger geeignet zur Bestimmung der Mukoadhäsion von Arzneiformen bewertet wurden.

Außerdem wurden zum ersten Mal Untersuchungen zur oromukosalen *ex-vivo*-Permeation des Desmopressins durchgeführt. Es konnten erfolgreich neue Methoden zur Bestimmung der *ex-vivo*-Permeation von Donorlösungen sowie von den entwickelten Dreischichtfilmen etabliert werden. Trotz der nachteiligen physikochemischen Strukturattribute des Desmopressins konnte erstmals eine oromukosale Permeation von bis zu 5 % im Fall der Donorlösungen durch sublinguale Schweineschleimhaut erzielt werden. Die ösophageale Mukosa resultierte auf Grund des dickeren Zellschichtaufbaus in einer geringeren Permeabilität von etwa 0,2 %. Der Dreischichtfilm mit PVP als mukoadhäsives Polymer erreichte nach 4 h mit etwa 1,5 % (entsprechend 43 µg/cm²) die höchste oromukosale *ex-vivo*-Desmopressinpermeation im Vergleich zu allen anderen Filmen. Chitosan schien

auch hier eine Barrierefunktion auszuüben, was sich in einer geringeren Permeation sowie teilweise auch in einer verlängerten Freisetzung äußerte. Der Einsatz von Permeationsverbesserern führte zu einer Reduktion der Desmopressinpermeation. Im Fall der anionische Permeationsverbesserer kann diese Beobachtung wahrscheinlich auf eine Präzipitatbildung zwischen der Desmopressinbase und den Säuregruppen der Permeationsverbesserer an der Grenzschicht zwischen Mukosa und Film zurückgeführt werden. Die niedrigere Permeation bei Verwendung der getesteten neutralen Permeationsverbesserer Menthol und Propylenglykol konnte nicht abschließend geklärt werden.

Weiterhin konnte eine Freisetzungsmethoden-bedingte Kinetik der Dreischichtfilme festgestellt werden. Während unter Verwendung der Methode des modifizierten Zylinders eine schnelle Freisetzung nach 60 min beobachtet wurde, führte die biorelevante Stempel-und-Filter-Methode zu Profilen, die einer verlängerten Matrixfreisetzung ähnelten.

Im Rahmen der Filmformulierungsentwicklung wurde eine manifeste Inkompatibilität von Desmopressin in Form eines Präzipitats mit anionischen Substanzen beobachtet. Im Fall der PA konnte anhand von Verdrängungsreaktionen sowie Freisetzungsuntersuchungen die Bildung eines unlöslichen Polyelektrolytkomplexes zwischen der Desmopressinbase und dem Polyacrylatanion nachgewiesen werden. In demineralisiertem Wasser konnte ein rapider Freisetzungsanstieg der Filme mit PA nach Zugabe von Natriumacetat erzielt werden, was mit einer Verschiebung der Gleichgewichtsreaktion auf die Seite des Desmopressinacetats erklärt werden konnte.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass filmförmige Zubereitungen zur orotransmukosalen Peptidapplikation erfolgreich entwickelt, hergestellt sowie hinsichtlich den speziellen Anforderungen dieser Arzneiform mit geeigneten Methoden charakterisiert wurden. Die dargestellten Ergebnisse zu dem Peptidhormon Desmopressin können als vielversprechender Ansatz zur möglichen Erhöhung der oromukosalen BV sowie zur Verbesserung der Therapiesicherheit auf Grund reduzierter Nahrungsmittelinterferenz angesehen werden. Es ergeben sich dadurch nicht nur wichtige Vorteile hinsichtlich der Therapietreue des Patienten, sondern auch die Möglichkeit wirtschaftlicher Einsparungen durch reduzierte Wirkstoffkosten.

5 Summary

In recent years, the number of approved peptide drugs has raised as a result of the progressing biotechnological possibilities and the increasing need of potent drug candidates in various indication areas, like autoimmune diseases or viral infections. Due to their adverse physicochemical structure attributes, the oral bioavailability of these peptides is very low and demands parenteral application. Consequently, there is a need for alternative and non-invasive routes of administration to improve patient compliance. To overcome this issue, the present work was focusing on the development, production and characterization of film preparations for orotransmucosal administration. Due to the fact that the orotransmucosal peptide delivery by film preparations is an innovative research area with little data published, the first step was the definition of critical formulation and process attributes by using two pharmacological inactive model peptides, which should then be transferred to a pharmacological active peptide drug available on the market. As pharmacological peptide desmopressin acetate (desmopressin), which is mainly used in the hormonal treatment of children, was chosen.

Within stability tests of single layer films containing the two model peptides, the pH-value of the formulations could be identified as one of the main critical formulation attributes. Storage stability analysis showed pronounced degradation of the peptides after 3 months, if the pH-value was out of the optimum pH-range. Therefore, HPMC without any pH-value-modifying additives was not suitable to stabilize both peptides and resulted in high degradation immediately after production, while the degradation of the unprotected peptide with the free N-terminal end was higher, compared to the other model peptide. Based on these results, it was also possible to define some peptide related requirements, which are assessed as important for a successful incorporation of peptide drugs in film formulations. Structure attributes like free alkaline or acidic functional groups should be avoided or used as the corresponding salt to prevent self-mediated, pH-value-dependent hydrolytic degradation processes.

By transferring the outcomes of the model peptides to desmopressin as pharmacologically active peptide, long term stability studies on several pH-value-modifying agents as well as HPC und HPMC as film forming polymers were performed. HPC as film former and hydrochloric acid as pH-value-modifier were found to provide suitable stability of desmopressin within the film matrix and were used for further experiments.

To achieve orotransmucosal desmopressin delivery, triple layer films consisting of a mucoadhesive, a drug and a backing layer were developed to ensure unidirectional drug release to the oral mucosa. In addition to the preliminary defined formulation and peptide related requirements, the excipients were selected regarding their

toxicity profile for the paediatric population according to the EMA “Guideline on pharmaceutical development of medicines for paediatric use”. Except for the triple layer film containing polyacrylic acid as mucoadhesive layer, all film formulations confirmed to the monograph 2.9.40 of the Ph. Eur. regarding the uniformity of dosage units and did not result in any desmopressin degradation after manufacturing. During long term storage stability studies over 6 months at 21 °C and 45 % r. H., desmopressin remained stable in all film formulations, whereas stressed conditions (40 °C 75 % r. H.) led to several degradation processes within the film formulations. The triple layer film containing chitosan as mucoadhesive layer showed less degradation compared to all other formulations. This might be an indicator for chitosan acting as a barrier against moisture related hydrolytic degradation and can be explained by the pH-value-dependent solubility of chitosan. Therefore, as usual for film formulations, storage at room temperature, protected from moisture in aluminum sachets, is recommended.

Another part of this work was focusing on the evaluation of different animal mucosal tissue as well as alternative mucosal materials regarding their feasibility for measuring the mucoadhesive properties of dosage forms. It could be shown that the alternative mucosal materials led to less discriminating results compared to the animal mucosal tissue. Hence, based on these results, alternative mucosal materials were assessed as not suitable for mucoadhesion testing of dosage forms.

For the first time, oromucosal *ex-vivo* studies on the permeation ability of desmopressin were performed. Methods, which are able to determine the *ex-vivo* permeation of donor solutions as well as the developed film formulations, were successfully established. Despite several adverse physicochemical structure attributes of desmopressin, it was firstly possible to achieve oromucosal permeation of desmopressin of up to 5 % by using porcine sublingual mucosa as model membrane. Due to the higher membrane thickness of esophageal mucosa, the permeability of desmopressin was lower (0.2 %) compared to the sublingual one. The triple layer film made of PVP as mucoadhesive layer resulted in the highest (1.5 %, corresponding to 43 µg/cm²) oromucosal *ex-vivo* permeation compared to all other film formulations. Again, chitosan seemed to act as barrier for the permeation and dissolution ability of desmopressin. The incorporation of permeation enhancers into the mucoadhesive layer did not result in any increase of permeation. Anionic permeation enhancers even led to a decrease of the permeation of desmopressin, which was probably due to a precipitate formation between the desmopressin base and the permeation enhancer anion at the boundary between the mucosa and the film. The lower desmopressin permeation, which was observed for the film containing propylene glycol, could not be explained so far.

Furthermore, a differing dissolution behavior of the triple layer films was detected by using different methods. Whereas the triple layer films showed an immediate

release by using the modified cylinder method, the dissolution profile recorded by the biorelevant punch and filter method was similar to matrix controlled dissolution kinetic.

During formulation development studies, a manifest incompatibility between desmopressin and anionic substances by forming a precipitate was observed. Regarding polyacrylic acid, it was possible to verify the formation of a polyelectrolyte complex between the desmopressin base and the polyacrylic acid anion by dissolution studies as well as competition reactions. The dissolution of a film containing polyacrylic acid and desmopressin in demineralized water could be rapidly increased after adding sodium acetate as electrolyte, because of shifting the equilibrium reaction from desmopressin polyacrylate back to desmopressin acetate.

To conclude, oromucosal film preparations for orotransmucosal peptide delivery could be successfully developed, produced and characterized regarding the special requirements of this dosage form. The presented results about the triple layer films of the peptide hormone desmopressin can be assessed as a promising option to possibly increase the oromucosal bioavailability of desmopressin as well as to enhance therapy safety by reduced adverse food-drug interactions. Finally, the developed dosage form could provide advantages not only related to improved compliance of the patient but also related to the possibility to safe drug related costs.

6 Experimenteller Teil

6.1 Materialien

In Tabelle 6.1 sind die verwendeten Peptidmoleküle und Standards aufgelistet. Die beiden Modellpeptide wurden im Rahmen einer Zusammenarbeit mit der Pharmazeutischen Chemie eigenständig synthetisiert und auf deren Reinheit überprüft. Tabelle 6.2 enthält die verwendeten Substanzen zur Herstellung der Ein- und Dreischichtfilme und Tabelle 6.3 beinhaltet die Substanzen zur analytischen Charakterisierung der Peptide sowie der Filmzubereitungen. In Tabelle 6.4 sind die zur Bestimmung der Mukoadhäsion und Permeation verwendeten Mukosamaterialien aufgelistet.

Tabelle 6.1: Peptidmoleküle und Standards

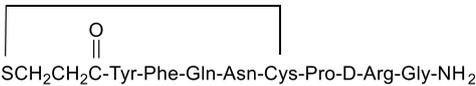
Peptid	Aminosäuresequenz	Bezugsquelle
Cbz-MP	Cbz-Ala-Phe-GlyOEt	Eigensynthese
NH ₂ -MP	NH ₂ -Ala-Phe-GlyOEt	Eigensynthese
Desmopressinacetat		PolyPeptide Labortories, Limhamn, Schweden
Desmopressinacetat Referenzstandard		EDQM, Straßburg, Frankreich

Tabelle 6.2: Substanzen zur Filmherstellung

Substanz	Handelsname	Bezugsquelle
Carmellose Natrium	Walocel® C2000 PA07	Dow Wolff Celulosics, Bomlitz, Deutschland
Chitosan 85% deacetyliert		Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Citronensäure Monohydrat		Chemsolute, Renningen, Deutschland
Dimethylaminoethylmethacrylat	Eudragit® EPO	Evonik, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 99%		Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Ethylcellulose	Aqualon® N22	Ashland, Waalwijk, Niederlande
Glycerol 85 %		Caelo, Hilden, Deutschland

Glycodesoxycholol Natrium		Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Hypolose	Klucel® ELF Klucel® LFPH	Ashland, Waalwijk, Niederlande
Hypromellose	Pharmacoat® 606 Pharmacoat® 603	Shin-Etsu, Tokio, Japan
Hypromellose Actatsuccinat	Aqucoat® AS-MF	Shin-Etsu, Tokio, Japan
Maleinsäure		Merck, Darmstadt, Deutschland
Ammoniummethacrylat Copolymer Typ B	Eudragit® RSPO	Evonik, Darmstadt, Deutschland
Menthol		Caelo, Hilden, Deutschland
Natriumlaurylsulfat		Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Natriummonohydrogenphosphat		Merck, Darmstadt, Deutschland
Ölsäure		Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Polyacrylsäure	Carbopol® 974P NF Carbopol® 971P NF	Lubrizol, Ohio, USA
Polyethylenoxid	Polyox® WSR N 10	Dow Wolff Celulosics, Bomlitz, Deutschland
Polyvinylacetat	Vinnapas® B60	Wacker Chemie, München, Deutschland
Polyvinylalkohol	Emprove® 4.88	Merck, Darmstadt, Deutschland
Povidon	Kollidon® 90	BASF, Ludwigshafen, Deutschland
Propylenglykol		Caelo, Hilden, Deutschland
Salzsäure 1N		Merck, Darmstadt, Deutschland
Wasser, gereinigt		Eigengewinnung durch Destillation

Tabelle 6.3: Substanzen für analytische Zwecke

Substanz	Bezugsquelle
Acetonitril	VWR, Darmstadt, Deutschland
Ammoniak 25 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Calciumchlorid Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Carmellose Natrium 400	Caelo, Hilden, Deutschland

Citronensäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure 96 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliummonohydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Krebs-Ringer Bicarbonat Puffer	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriummonohydrogenphosphat-Dodecahydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natronlauge	Applichem, Darmstadt, Deutschland
ortho-Phosphorsäure 85 %	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Sorbinsäure	Caelo, Hilden, Deutschland
Sorbitol	Caelo, Hilden, Deutschland
Triethylamin	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Trifluoressigsäure	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Trypanblau 0,4 % für Zellkulturen	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland

Sofern keine zusätzlichen Angaben gemacht wurden, wurde das entsprechende Anhydrat der Puffersalze verwendet.

Tabelle 6.4: Mukosa- und Mukosaersatzmaterialien zur Bestimmung der Mukoadhäsion und Permeation

Mukosamaterial	Bezugsquelle
Schweinewangen	Lokaler Schlachtbetrieb
Schweinezungen	Lokaler Schlachtbetrieb
Schweinespeiseröhren	Lokaler Schlachtbetrieb
Pharmagelatine Typ A, 160 Bloom	Gelita, Eberbach, Deutschland
Mucin Typ II, Porcine stomach	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland

Alle verwendeten tierischen Schleimhäute stammten von deutschen Landschweinen im Alter von 7-8 Monaten mit einem Gewicht von 100-150 kg. Die tierischen Materialien wurden unmittelbar nach der Schlachtung präpariert und verwendet.

Tabelle 6.5: Verwendete Puffer und Medien

Puffer	Zusammensetzung*	Anwendungsbereiche
Phosphatpuffer pH 3	Kaliumdihydrogenphosphat 25mM	
Phosphatpuffer pH 6	Natriumdihydrogenphosphat 57mM	Dispersionsmittel für Modellpeptide (Abschnitt 3.1.2)
Phosphatpuffer pH 8	Natriumdihydrogenphosphat 26mM	
Phosphatpuffer pH 10	Ammoniumchlorid 100mM	
Acetatpuffer pH 4,5	Natriumacetat 50 mM Essigsäure 50 mM	Dispersionsmittel für Desmopressin (Abschnitt 3.2.5)
Citratpuffer pH 5	Citronensäure 10 mM	Akzeptor- und Donormedium (Abschnitt 3.2.7)
Phosphat-Citratpuffer pH 5,5	Citronensäure 4mM Natriummonohydrogenphosphat 10 mM	Dispersionsmittel zur Filmherstellung (Abschnitt 3.2.3)
Krebs-Ringer Bicarbonat Puffer (fertige Mischung; vgl. Tabelle 6.3)	D-Glucose 10 mM Magnesiumchlorid 0,5 mM Kaliumchlorid 5 mM Natriumchlorid 120 mM Kaliumdihydrogenphosphat 0,7 mM Kaliummonohydrogenphosphat 1 mM	Nähr- und Lagerungsmedium (Abschnitt 6.2.9)
Phosphatpuffer pH 6,8	Kaliumdihydrogenphosphat 100 mM Natriummonohydrogenphosphat 300 mM	Akzeptor-, Freisetzungs- und Dispersionsmedium für Mucin (Abschnitt 3.2.7, 3.2.5 und 6.2.10)
Künstlicher Speichel (NRF 7.5.)	Kaliumchlorid: 0,12 Natriumchlorid: 0,085 Natriummonohydrogenphosphat Dodecahydrat: 0,25 Calciumchlorid Dihydrat: 0,015 Magnesiumchlorid Hexahydrat: 0,005 Sorbinsäure: 0,1 Carmellose-Natrium 400: 0,5 Sorbitol-Lsg. 70%: 4,3 Aqua purificata. ad 100,0	Donormedium, (Abschnitt 3.2.7)

*Sofern keine zusätzlichen Angaben gemacht wurden, wurde das entsprechende Anhydrat der Puffersalze verwendet.

6.2 Methoden

6.2.1 Polymerlösungen

6.2.1.1 Herstellung der Polymerlösungen

Die Polymerlösungen wurden hergestellt, indem zunächst die erforderliche Menge des Peptids auf einer Analysenwaage mit einer Genauigkeit von 0,1 mg (Typ CP224S, Sartorius, Göttingen, Deutschland) eingewogen und in der entsprechenden Menge Lösungsmittel und ggf. Glycerol 85 % oder pH-Wert-Regulatoren) gelöst wurde. Danach wurde das Polymer unter ständigem Rühren auf einem Magnetrührer hinzugegeben. Bei Verwendung von Polymergemischen wurden die verschiedenen Polymere vor der Zugabe manuell vermengt. Die Polymerlösungen wurden bis zur vollständigen Homogenität und Luftblasenfreiheit gerührt.

6.2.1.2 Berechnung der Peptidfraktion

Es wurde eine volumenbezogene Berechnung der Peptidfraktion vorgenommen, wobei näherungsweise die Dichte der Polymerlösungen auf 1 g/cm³ festgelegt wurde. Da zur Bestimmung der Gleichförmigkeit einzeldosierter Arzneiformen (Ph Eur. 2.9.40) Filme mit einer Fläche von 3 cm² verwendet wurden, wurde die Berechnung auf ein Volumen von 0,15 cm³ (bei einer Rakelhöhe von 500 µm) bezogen, welches durch die oben beschriebene Dichteannahme einer Masse von 0,15 g entspricht. Laut Rakelherstellerangaben (Erichsen 2007) ist eine Arzneistoffmehreinwaage von 30 % empfohlen. Aus Vorversuchen erwies sich eine Mehrweinwaage von 20 % als ausreichend. Es ergab sich folgende Formel zur Berechnung der Peptidfraktion:

$$\text{Einwaage}[mg] = \left(\frac{\text{Peptid pro Einzeldosis [mg]} \cdot \text{Ansatzgröße[g]}}{0,15 [g]} \right) * 1,2 \quad 6.1$$

6.2.1.3 Dynamische Viskosität der Polymerlösungen

Die dynamische Viskosität der Polymerlösungen wurde mittels Rheometer (Kinexus Rheometer, Malvern Instruments, Herrenberg, Deutschland) bestimmt. Dazu wurde eine Kegel-Platte Messgeometrie (Kegel CP1/60 SR 2482 SS, Platte PL65 S0520 SS) mit einem Winkel von 1 ° und einem Durchmesser von 60 mm verwendet. Zur Charakterisierung des Fließverhaltens der Polymerlösungen wurde eine Auf- und Abwärtskurve einer Scherrampenmessung zwischen 0,1 und 100 s⁻¹ aufgenommen. Dies diente zur Überprüfung, ob die entsprechende Scherrate zur Punktmessung im linearen Bereich lag. Die Scherrate wurde der Rakelhöhe- und Geschwindigkeit während des Filmausziehprozesses angepasst und nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Scherrate [s}^{-1}\text{]} = \frac{\text{Ausziehgeschwindigkeit [\mu m/s]}}{\text{Rakelhöhe [\mu m]}} \quad 6.2$$

Alle Messungen wurden bei einer Temperatur von 25 °C durchgeführt. Die Datenauswertung erfolgte mit der Gerätesoftware rSpace (Kinexus, Malvern Instruments, Herrenberg, Deutschland). Es wurde eine Dreifachbestimmung der scheinbaren Viskosität der Polymerlösungen vorgenommen und MW sowie Standardabweichung berechnet.

6.2.1.4 pH-Wert der Polymerlösungen

Der pH-Wert der Polymerlösungen wurde mittels pH-Elektrode (pH-Meter 766 Calimatic, Knick, Berlin, Deutschland) ermittelt. blieb der pH-Wert für mindestens 30 s stabil, wurde dieser als Endpunkt definiert.

6.2.2 Herstellung der Einschichtfilme

Die Herstellung der Einschichtfilme erfolgte durch Ausziehen der Polymerlösung auf einer Intermediärfolie bestehend aus einer Polyamid/Polyestermischung (Mediflex XM Type AMWL, Gent, Belgien). Dazu wurde eine Filmziehbank (Coatmaster 510, Erichsen, Hemer, Deutschland) mit verstellbarer Rakel verwendet. Es wurde eine Ausziehgeschwindigkeit von 6 mm/s und eine Rakelhöhe von 500 μm gewählt. Die Gesamtbreite des Films betrug 22 cm. Die Filme wurden bei Raumtemperatur getrocknet und die Ränder (ca. 2 cm) auf Grund unregelmäßiger Dicken entfernt und verworfen. Je nach weiterer analytischer Charakterisierung wurde der Film in kleinere Filmstücke mit einer Fläche von 0,82 (Kreisform, r=0,5 cm), 3 (Rechteck, 1,5 x 2 cm), 6 (Rechteck, 2 x 3 cm) oder 30 cm² (Rechteck, 3 x 10 cm) mit Hilfe eines Skalpell geschnitten oder eines Locheisens gestanzt.

6.2.3 Herstellung der Dreischichtfilme

Die Herstellung der Dreischichtfilme erfolgte nach der gleichen Methode wie in Abschnitt 6.2.2 beschrieben. Die unterste, zu Beginn ausgezogene Schicht wurde auf der Filmziehbank bei Raumtemperatur getrocknet. Die Trocknungszeit der Filme betrug zwischen 1 und 12 Stunden. Nachdem der Trocknungsprozess abgeschlossen war, wurden die weiteren Polymerlösungen über dem getrockneten Film mit Hilfe der Rakel ausgestrichen und getrocknet. Neben den Rändern wurde hierbei auch der mittlere Teil des Dreischichtfilms, was einer Fläche von 2 x 40 cm entsprach, verworfen, da es ggf. zu Schleifspuren der Mikrometerschraube an der Rakel kommen kann. Die Weiterverarbeitung erfolgte wie in Abschnitt 6.2.2.

6.2.4 Morphologie der Filme

6.2.4.1 Dicke

Die Dicke der Filme wurde mit Hilfe einer Mikrometerschraube (Mitutoyo, Neuss, Deutschland) mit einem Messbereich von 0-25 mm und einer Messgenauigkeit von 0,001 mm gemessen. Pro Filmzubereitung wurden jeweils $n=10$ Filme (1,5 x 3 cm) in deren Mitte vermessen und anschließend zur Gehaltsbestimmung genutzt. MW, Standardabweichung und Konfidenzintervall (KI) wurden berechnet.

6.2.4.2 Masse

Zur Bestimmung der Masse wurden 10 Filme einzeln gewogen (Analysenwaage, Typ CP224S, Sartorius, Göttingen, Deutschland; Messgenauigkeit 0,1 mg) und anschließend zur Gehaltsbestimmung genutzt. MW, Standardabweichung und KI wurden berechnet.

6.2.4.3 Visuelle Beurteilung

Alle Filmzubereitungen wurden sowohl direkt nach der Herstellung und Trocknung als auch nach deren Einlagerung unter kontrollierten Bedingungen (vgl. auch Abschnitt 6.2.8) visuell beurteilt. Dabei wurde besonders auf Inhomogenitäten in der Filmoberfläche und das Auftreten von Luftblasen, Löchern oder Verfärbungen im Film geachtet. Des Weiteren waren durch Ablösen des Filmes von der Intermediärfolie und der damit verbundenen leichten Dehnung des Filmes erste visuelle Einschätzungen der Flexibilität bzw. Sprödigkeit möglich.

6.2.4.4 Fotografie

Fotografische Aufnahmen von Filmen, Geräten oder Versuchsaufbauten und anderen verwendeten Materialien wurden mit Hilfe einer Kamera (Nikon D300), ausgestattet mit einem AF-S NIKKOR 16-85 mm Objektiv (Nikon, Tokyo, Japan), gemacht. Als Hintergrundmaterialien dienten Tonkarton oder Kunststoffunterlagen.

6.2.4.5 Polarisationsmikroskopie

Es wurden polarisationsmikroskopische Aufnahmen von den Filmzubereitungen gemacht (DMLB, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland), wobei eine 10-fache Vergrößerung im Durchlichtmodus gewählt wurde.

6.2.4.6 Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie (REM) diente zur Charakterisierung der Filme sowie einigen anderen Materialien wie Papierfilter oder Schweinemukosa (Phenom G2 pro, L.O.T.-Oriël, Eindhoven, Niederlande). Es wurde unter Vakuum mit einer Arbeitsspannung von 5-10 kV gearbeitet. Dazu wurden die Proben mit einer

Schichtdicke von 16 nm mit Gold besputtert (LOT Quantum Design, Darmstadt, Germany).

6.2.5 Röntgendiffraktometrie

Die Festphaseneigenschaften der Filme und Ausgangsmaterialien wurden mittels Röntgendiffraktometrie (X'Pert Pro Analytical, PANalytical, Almelo, Niederlande) untersucht. Alle Messungen wurden im Reflektionsmodus durchgeführt. Es wurde eine Kupferanode mit 40 kV und 40 mA über $K\alpha$ -Strahlung ($\lambda=1,5406 \text{ \AA}$) verwendet. Die Proben wurden für 10 min in einem Winkelbereich von $10\text{-}50^\circ 2\Theta$ mit einem Winkelabstand von $0,01^\circ 2\Theta$ und einer Geschwindigkeit von 30 s/Winkelabstand vermessen. Es wurde eine Divergenzblende von 1° und eine Anti-Streulichtblende von 2° eingesetzt. Aus den Pulverausgangsmaterialien wurden zu Beginn Presslinge hergestellt und die Filme wurden in eine Probenhalterung eingespannt. Zur Auswertung wurde die Gerätesoftware X'Pert Data Collector (PANalytical, Almelo, Niederlande) verwendet.

6.2.6 Karl-Fischer Titration

Der Wassergehalt der Filme wurde nach der Herstellung als Karl-Fischer Titration mittels V20 Compact KF Volumeter (Mettler Toledo, Gießen, Deutschland) bestimmt. Hydranal-Methanol (Honeywell, Seelze, Deutschland) diente dabei als Arbeitsmedium und die Titration wurde mit HydranalComposite (Honeywell, Seelze, Deutschland) durchgeführt. Die Kalibrierung erfolgte mit einem Hydranal-Water Standard (Honeywell, Seelze, Deutschland). Die Filmproben wurden zuvor unter kontrollierten Bedingungen (21°C , 45 % r.F.) gelagert.

6.2.7 Gehaltsbestimmung

6.2.7.1 Allgemein

Die Gehaltsbestimmung für alle verwendeten Peptide erfolgte mittels HPLC Analytik (Agilent 1260 Infinity, Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Die entwickelten Methoden wurden gemäß der Reviewer Guidance (1994) und ICH Leitlinie Q2 R1 [239, 240] validiert und werden in den folgenden Abschnitten (6.2.7.2 - 6.2.7.4) detailliert erläutert.

Alle peptidhaltigen Filme wurden zudem der Prüfung auf „Gleichförmigkeit einzeldosierter Arzneiformen“ gemäß Ph. Eur. 2.9.40 unterzogen. Die niedrigdosierten Filme ($< 25 \text{ mg}$ und 25 % Arzneistoff pro Film) wurden einzeln auf Gehalt geprüft und der Akzeptanzwert (AV) nach folgender Formel berechnet:

$$AV = |M - \bar{x}| + k * s \quad 6.3$$

\bar{x} steht dabei für den Mittelwert ($n=10$) der Einzelgehalte in der Einheit Prozent. Es wurde der Sollgehalt an Peptid pro Film verwendet. M stellt den Referenzwert, s die Standardabweichung und k die Akzeptanzkonstante ($k=2,4$) dar.

6.2.7.2 Beidseitig geschütztes Modellpeptid (Cbz-MP)

Das beidseitig geschützte Modellpeptid (Cbz-MP) wurde mittels UV/VIS Detektion bei einer Wellenlänge von 210 nm analysiert. Es wurde eine CC 250/3 Nucleodur C18 Gravity, 5 μm Säule mit einer EC 4/3 Nucleodur C18, 5 μm Vorsäule (Machery-Nagel, Düren, Deutschland) verwendet. Die Flussrate wurde auf 0,7 ml/min und das Injektionsvolumen auf 15 μl eingestellt. Die Temperatur des Säulenofens wurde auf 30 °C konstant gehalten. Die mobile Phase bestand aus Wasser und Acetonitril in dem Verhältnis 47/53 (v/v). Es wurde eine Stammlösung mit 10 mg/100 ml Cbz-TP in Wasser und eine Kalibrierreihe von 10-70 $\mu\text{g/ml}$ erstellt. Die Filme wurden in 10 ml eines 1:1 Gemisches aus Acetonitril und Wasser gelöst und vor der Messung durch einen Polypropylenfilter der Porengröße 0,45 μm filtriert.

Abbildung 6.1 zeigt ein typisches Chromatogramm eines gelösten Films mit 0,5 mg Cbz-TP. Die Retentionszeit lag bei 3,3 min. Die HPLC-Methode für Cbz-TP wurde hinsichtlich Wiederholbarkeit, Linearität, Präzision und Spezifität validiert. Zur Ermittlung der Wiederholbarkeit wurde eine einmalig hergestellte Probe (50 $\mu\text{g/ml}$) 10 Mal vermessen sowie 6 einzeln hergestellte Proben der gleichen Konzentration vermessen. Die relative Standardabweichung lag bei 0,08 % und 0,88 %. Die Linearität wurde über Kalibriergeraden mit 7 Konzentrationen an fünf aufeinanderfolgenden Tagen bestimmt. Das Bestimmtheitsmaß lag zwischen 0,9992 und 0,9999. Zur Bestimmung der Präzision wurden an fünf aufeinanderfolgenden Tagen eine Lösung der Konzentration 50 $\mu\text{g/ml}$ jeweils dreimal vermessen. Die relative Standardabweichung lag bei 0,51 %. Die Spezifität wurde durch Vermessen von reinem Fließmittel und einer Lösung eines peptidfreien Films bestimmt. Das Fließmittel zeigte keine Absorption bei einer Messwellenlänge von 210 nm und die Filmprobe führte zu einer Vergrößerung des Signals im Bereich des Injektionspeaks, zeigte aber keine Störsignale im Bereich der Retentionszeit des Cbz-TPs.

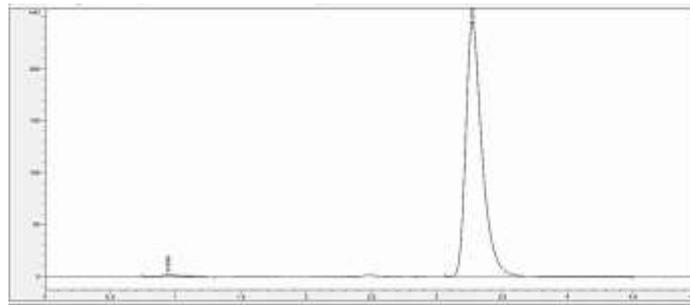


Abbildung 6.1: Typisches Chromatogramm einer Lösung eines Filmes mit Cbz-MP; UV/VIS-Detektion bei 210 nm

6.2.7.3 Einseitig geschütztes Modellpeptid (NH₂-MP)

NH₂-MP wurde mittels UV/VIS Detektion bei einer Wellenlänge von 210 nm analysiert. Es wurde eine Perfectsil 120-2 ODS, 5 µm x 4 C8 Säule (MZ-Analysentechnik, Mainz, Deutschland) verwendet. Die Flussrate wurde auf 0,65 ml/min und das Injektionsvolumen auf 15 µl eingestellt. Die wässrige Komponente der mobilen Phase bestand aus 0,1 % Ammoniak (25 %), 0,05 % Triethylamin und Phosphorsäure zur Einstellung eines pH-Werts von 3. Die organische Phase bestand aus Acetonitril. Beide wurden in einem Verhältnis 40/60 (v/v) verwendet. Es wurden eine Stammlösung mit 10 mg/100 ml NH₂-TP in Wasser und eine Kalibrierreihe von 10-70 µg/ml erstellt. Die Filme wurden in 10 ml eines 1:1 Gemisches aus Acetonitril und Wasser gelöst und vor der Messung durch einen Polypropylenfilter der Porengröße 0,45 µm filtriert.

Abbildung 6.2 zeigt ein typisches Chromatogramm eines gelösten Films mit 0,5 mg NH₂-TP. Die Retentionszeit lag bei 3,4 min. Die HPLC-Methode für NH₂-TP hinsichtlich Wiederholbarkeit, Linearität, Präzision und Spezifität validiert.

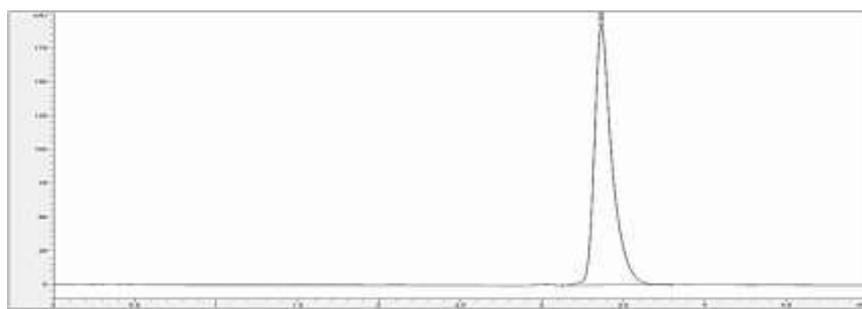


Abbildung 6.2: Typisches Chromatogramm einer Lösung eines Films mit NH₂-MP; UV/VIS-Detektion bei 210 nm

Zur Wiederholbarkeit wurde eine einmalig hergestellte Probe mit (50 µg/ml) 10 Mal vermessen sowie 6 einzeln hergestellte Proben der gleichen Konzentration vermessen. Die relative Standardabweichung lag bei 0,13 % und 0,35 %. Die Linearität wurde mittels Kalibriergerade an fünf aufeinanderfolgenden Tagen bestimmt. Das Bestimmtheitsmaß lag zwischen 0,9991 und 0,9999. Zur Bestimmung der Präzision wurden an fünf aufeinanderfolgenden Tagen eine Lösung der

Konzentration 50 µg/ml jeweils dreimal vermessen. Die relative Standardabweichung lag bei 0,91 %. Zur Bestimmung der Spezifität wurde reines Fließmittel und eine Lösung eines peptidfreien Films vermessen. Das Fließmittel zeigte keine Absorption bei einer Messwellenlänge von 210 nm und die Filmprobe führte zu einer Vergrößerung des Signals im Bereich des Injektionspeaks, zeigte aber keine Störsignale im Bereich der Retentionszeit des NH₂-TPs.

6.2.7.4 Desmopressinacetat

Desmopressin wurde mittels Kombination aus einem UV/VIS Detektor (UV) und einem Fluoreszenz Detektor (FLD) bei einer Wellenlänge von 220 nm analysiert. Es wurde ein EC 125/4 Nucleosil C 18, 3 µm Säule unter Vorschaltung einer Vorsäule des Types EC 4/3 Nucleosil C18, 3 µm (Machery-Nagel, Düren, Deutschland) verwendet. Die Flussrate wurde auf 1 ml/min und das Injektionsvolumen auf 40 µl eingestellt. Die Säulentemperatur wurde bei 35 °C konstant gehalten. Die mobile Phase bestand aus 0,08 % Trifluoressigsäure (A, % Vol.) und Acetonitril (B) im Verhältnis 77/23 (v/v). Es wurden Stammlösungen mit 10 mg/100 ml Desmopressin in Wasser hergestellt. Kalibrierreihen von 0,1 µg-10 µg/ml (FLD) und 10 µg-500 µg (UV) dienten zur Bestimmung der Desmopressinkonzentration der Proben. Je nach Arzneistoffgehalt im Film wurden diese in einem angemessenen Volumen Wasser gelöst und durch einen Polypropylenfilter mit 0,45 µm Porengröße filtriert. Die Dreischichtfilme wurden zunächst in 3 ml Acetonitril dispergiert, um die EC zu lösen. Danach wurden 7 ml Wasser zur Probe hinzugegeben und für 15 min geschüttelt, bevor mit der Filtration der Proben begonnen wurde.

Abbildung 6.3 und Abbildung 6.4 zeigen typische Chromatogramme der UV- bzw. Fluoreszenzdetektion von Desmopressin. Die Retentionszeit lag bei 3,6 min.

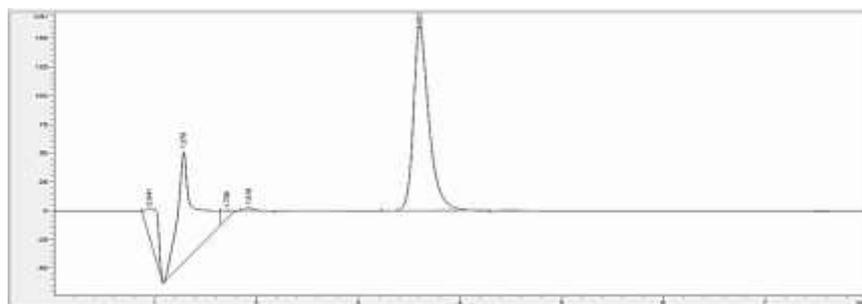


Abbildung 6.3: Typisches Chromatogramm einer Lösung eines Films mit Desmopressin; UV/VIS-Detektion bei 220 nm

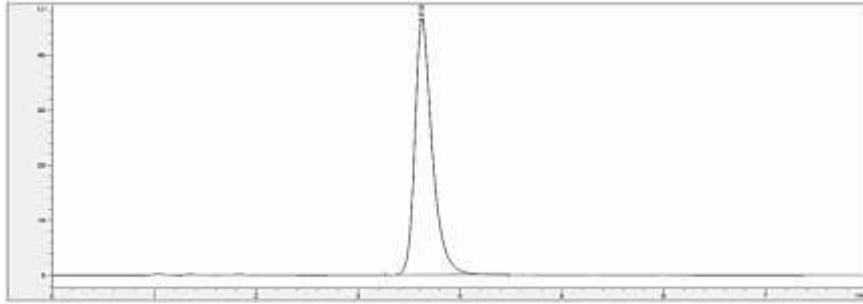


Abbildung 6.4: Typisches Chromatogramm einer Desmopressinlösung der Konzentration 0,5 µg/ml; Fluoreszenz-Detektion bei 220 nm

Die HPLC-Methode mittels UV/VIS-Detektion wurde hinsichtlich Wiederholbarkeit, Linearität, Präzision, Selektivität, Wiederfindung und Robustheit validiert. Hinsichtlich der Fluoreszenzdetektion wurde die Methode auf Wiederholbarkeit, Linearität und Präzision geprüft. Zur Wiederholbarkeit wurde eine einmalig hergestellte Probe mit (UV: 20 µg/ml; FLD: 2 µg/ml) 10 Mal vermessen sowie 6 einzeln hergestellte Proben der gleichen Konzentration vermessen. Die relative Standardabweichung lag bei 0,18 % und 0,69 % (UV) sowie 0,55 % und 1,18 % (FLD). Die Linearität wurde über Kalibriergeraden an fünf aufeinanderfolgenden Tagen bestimmt. Das Bestimmtheitsmaß lag zwischen 0,9996 und 0,9999 (UV) sowie 0,9998 und 0,9999 (FLD). Zur Bestimmung der Präzision wurde an fünf aufeinanderfolgenden Tagen eine Lösung der Konzentration 20 µg/ml (UV) und 2 µg/ml (FLD) hergestellt jeweils dreimal vermessen. Die relative Standardabweichung lag bei 1,34 % (UV) und 0,39 % (FLD).

Zur Bestimmung der Selektivität wurden reines Fließmittel und eine Lösung eines peptidfreien Films vermessen. Das Fließmittel zeigte keine Absorption bei einer Messwellenlänge von 220 nm. Die Filmprobe führte zu einer Vergrößerung des Injektionspeaks, zeigte aber keine Störsignale im Bereich der Retentionszeit von Desmopressin. Verunreinigungen von Desmopressin standen nicht zur Verfügung, weshalb der Reinstoff und Desmopressinlösungen Stressbedingungen ausgesetzt wurden, um Abbaureaktionen zu provozieren (Tabelle 6.6)

Tabelle 6.6: Selektivität der HPLC-Methode zu Desmopressinacetat

Probe	Stressfaktor	Stressbedingungen
Reinstoff	Hitze	80 °C, 24 h
Reinstoff	Licht	UV Licht, 32 d
Lösung 20 µg/ml	Hydrolyse	90 °C, 2 h
Lösung 20 µg/ml	Säure	Salzsäure 1N, 24 h
Lösung 20 µg/ml	Base	Natronlauge 1N, 24 h
Lösung 20 µg/ml	Oxidation	Wasserstoffperoxid, 3 %, 30 min

Der Einfluss von Hydrolyse, Säure, Base sowie Oxidation führte zu Abbaureaktionen des Wirkstoffs und Veränderungen im Chromatogramm. Abbildung 6.5 zeigt am Beispiel der Hydrolyse die entstandenen Abbauprodukte im Chromatogramm. Trotz der Basislinientrennung der Abbaupeaks wurde diese Methode nur zur Gehaltsbestimmung von Desmopressin validiert und nicht zur quantitativen Analyse von Abbauprodukten verwendet.

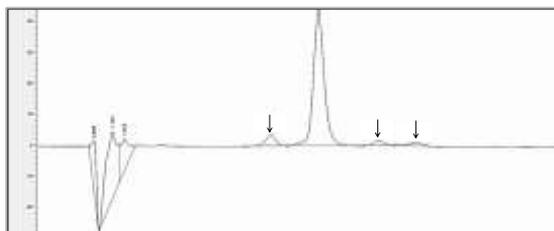


Abbildung 6.5: Chromatogramm von Desmopressin nach Hydrolyse; Pfeile markieren entstandene Abbauprodukte

Zur Bestimmung der Wiederfindung wurden peptidfreie Filme gelöst und mit einer Desmopressinlösung versetzt. Die Wiederfindung lag zwischen 100,3 und 102,8 %. Zur Untersuchung der Robustheit der Methode wurden Änderungen in der Messwellenlänge, Säulenofentemperatur, Flussrate und Fließmittelzusammensetzung vorgenommen und deren Einfluss auf Retentionszeit und Signalfläche untersucht (Tabelle 6.7).

Tabelle 6.7: Robustheit der HPLC-Methode zu Desmopressin; Konzentration der Probe 20 µg/ml; MW ± s; s=0 für Retentionszeit; n=3

	Signalfläche [mAu]	Retentionszeit [min]
Standardmethode	718,4 ± 1,5	3,60
Wellenlänge 225 nm	553,6 ± 0,5	3,59
Wellenlänge 215 nm	898,9 ± 4,4	3,62
Temperatur 30 °C	723,8 ± 0,3	3,70
Temperatur 40 °C	722,3 ± 1,3	3,45
Flussrate 0,9 ml	799,3 ± 0,7	3,96
Flussrate 1,1 ml	648,2 ± 0,5	3,21
Fließmittel 80/20 (A/B)	728,3 ± 9,5	6,42
Fließmittel 70/30 (A/B)	729,6 ± 26,4	1,69

Im Hinblick auf die Signalfläche ist die Methode hinsichtlich Änderungen in Temperatur und Fließmittelzusammensetzung innerhalb der getesteten Grenzen als robust einzustufen. Auch die Retentionszeit betreffend, ist die Methode hinsichtlich

Änderungen in der Messwellenlänge robust. Fließmittelzusammensetzung, Säulenofentemperatur und Flussrate haben einen starken bis sehr starken Einfluss auf die Retentionszeit von Desmopressin.

6.2.8 Stabilitätsuntersuchungen

6.2.8.1 Stresstests der Modellpeptide

Beide Modellpeptide wurden hinsichtlich ihrer Stabilität bei verschiedenen pH-Werten und Temperaturen untersucht. Zur Evaluierung der pH-Wert-Stabilität wurden Pufferlösungen (pH 3, 6, 8 und 10, vgl. Tabelle 6.5) mit einer Peptidkonzentration von 50 µg/ml über 96 h gerührt und der zeitabhängige Verlauf der Peptidkonzentration mittels HPLC-Analytik (vgl. Abschnitt 6.2.7.2 und 6.2.7.3) bestimmt. Zur Untersuchung des Einflusses der Temperatur auf die Stabilität der Modellpeptide wurden wässrige Lösungen mit einer Peptidkonzentration von 50 µg/ml über 72 h bei 40, 50, 60 und 70 °C im Trockenschrank gelagert und ebenfalls der zeitabhängige Verlauf der Peptidkonzentration mittels HPLC-Analytik (vgl. Abschnitt 6.2.7.2 und 6.2.7.3) untersucht.

6.2.8.2 Stabilitätsuntersuchungen der Einsichtfilme

Alle peptidhaltigen Einsichtfilme wurden hinsichtlich ihrer Lagerstabilität bei 21 °C und 45 % r.F. untersucht. Dazu wurden jeweils 10 Filme offen und vor Staub geschützt in Glasgefäßen für 3 und 6 Monate eingelagert. Nach Auslagerung wurden diese hinsichtlich Filmdicke (vgl. Abschnitt 6.2.4.1), Masse (vgl. Abschnitt 6.2.4.2), Peptidgehalt (vgl. Abschnitt 6.2.7) sowie möglichen erkennbaren Abbauprodukten im Chromatogramm untersucht.

6.2.8.3 Stabilitätsuntersuchungen der Ein- und Dreischichtfilme

Bezüglich des Arzneistoffs Desmopressin wurden ausgewählte Filmzubereitungen hinsichtlich Lagerstabilität gemäß ICH Guideline Q1A [180] untersucht. Dazu wurden jeweils 10 Einzelfilme (3 cm²) offen in Glasgefäßen und im aluminiumbeschichteten Primärpackmittel bei zwei unterschiedlichen Bedingungen für 3 Monate eingelagert. Zur Versiegelung des Aluminiumpackmittels wurde ein Folienschweißgerät (Fermant 22 N, Folienschweißtechnik, Bergisch-Gladbach, Deutschland) verwendet. Die Filmproben wurden zum einen bei 21 °C und 45 % r.F. und zum anderen bei 40 °C und 75 % r.F. (Klimaschrank KBF 720, Binder, Tuttlingen, Deutschland) eingelagert. Nach Auslagerung der Filme wurden diese zunächst visuell beurteilt und anschließend hinsichtlich Filmdicke (vgl. Abschnitt 6.2.4.1), Masse (vgl. Abschnitt 6.2.4.2), Desmopressingehalt (vgl. Abschnitt 6.2.7) sowie möglichen erkennbaren Abbauprodukten im Chromatogramm untersucht.

6.2.9 Präparation der Schweinemukosa

6.2.9.1 Allgemein

Zur Präparation der Mukosa wurden 3 verschiedene Körperteile des Schweins verwendet (vgl. Tabelle 6.4), die anschließend zur Bestimmung der Mukoadhäsion sowie zu Permeationsmessungen herangezogen wurden. Alle Schweinematerialien wurden nach Schlachtung in Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer gelagert und unmittelbar verwendet. Die Schweinematerialien wurden wie im folgenden Abschnitt erläutert präpariert. Die Dicke wurde jeweils mittels Mikrometerschraube bestimmt (Mitutoyo, Neuss, Deutschland).

6.2.9.2 Präparation der Schweinewangen

Schweinewangenstücke wurden bereits in einem vorpräparierten Zustand mit einer Dicke von $800 \pm 100 \mu\text{m}$ geliefert. Mögliche Unebenheiten an den Präparationskanten an der Innenseite wurden manuell mit einem Skalpell entfernt, um eine glatte Unterseite für weitere Mukoadhäsionsversuche zu gewährleisten.

6.2.9.3 Präparation der Schweinzungen

Das hintere Ende der Schweinezungen wurde zur besseren Handhabbarkeit zunächst mittels einer Geflügelschere entfernt. Zur Texturprofilanalyse (vgl. Abschnitt 6.2.10.2) wurde die Zungenoberseite mittels Skalpell und Geflügelschere entfernt und bis zur gewünschten Dicke präpariert. Zur Bestimmung der Mukoadhäsion (vgl. Abschnitt 6.2.10.4) und Permeation (vgl. Abschnitt 6.2.12) wurde die oberste Schleimhautschicht der Zungenunterseite mit Hilfe eines präzise einstellbaren Dermatoms (Dermatom Padgett S600, Integra, New Jersey, USA) abgetragen. Abbildung 6.6 zeigt eine Schweinzunge während (links) und nach (rechts) dem Präparationsprozess mittels Dermatom. Der Pfeil markiert die abgetrennte obere Schicht der Unterseite der Zunge. Die Mukosa im Bereich des Zungenbands wurde nicht zur Messung verwendet. Die Mukosadicke zur Bestimmung des Texturprofils lag bei $1700 \pm 200 \mu\text{m}$, die zur Bestimmung der Mukoadhäsion bei $800 \pm 100 \mu\text{m}$ und die zur Bestimmung der Permeation bei $300 \pm 100 \mu\text{m}$.



Abbildung 6.6: Präparation einer Schweinzunge

6.2.9.4 Präparation der Schweinspeiseröhren

Die Schweinspeiseröhren wurden mit einer Geflügelschere längs durchgeschnitten (Abbildung 6.7, links), um eine plane Fläche zu erzeugen. Danach wurde eine Seite durch eine Klemme fixiert und mit Hilfe einer Pinzette wurde die obere Schleimhautschicht durch kräftiges Ziehen entfernt (Abbildung 6.7, rechts, markiert durch Pfeil). Dabei wurde darauf geachtet, dass darunter befindliche Muskelpartien nicht mit abgetrennt wurden. Die Mukosadicke lag bei $600 \pm 100 \mu\text{m}$.



Abbildung 6.7: Präparation einer Schweinspeiseröhre

6.2.10 Mukoadhäsion

6.2.10.1 Schweinemukosa

Zuvor präparierte Wangen- und Zungenmukosa vom Schwein (vgl. Abschnitt 6.2.9) wurden als tierische Modellschleimhäute zur Mukoadhäsionsmessung verwendet.

6.2.10.2 Gelatinegele – Texturprofilanalyse

Als Alternativmaterial zu Schweinemukosa als Modellschleimhaut wurden Gelatinegele in verschiedenen Konzentrationen (2,5, 5, 10, 15 und 20 %) sowie Mucinpresslinge (vgl. Abschnitt 6.2.10.3) genutzt. Die Herstellung der Gelatinegele erfolgte, indem zunächst die benötigte Menge an gereinigtem Wasser auf $80 \text{ }^\circ\text{C}$ erwärmt wurde und danach die entsprechende Menge an Gelatine darin gelöst wurde. Die homogene Gelatinelösung wurde anschließend in Petrischalen bis zu einer vorher ermittelten Füllhöhe gegossen und über Nacht erkalten gelassen. Es wurden kreisrunde Stücke mit einem Durchmesser von 2 cm gestanzt. Die Dicke der Gelatinegele lag bei $1700 \pm 100 \mu\text{m}$ zur Texturprofilanalyse und bei $1000 \pm 50 \mu\text{m}$ zu Bestimmung der Mukoadhäsion (vgl. Abschnitt 6.2.10.4). Dünnere Gelatinegele konnten nicht verwendet werden, da sie der Beanspruchung während der Messung nicht standhielten und gerissen sind.

Tabelle 6.8: Geräteparameter zur Texturprofilanalyse

Geräteparameter	Wert
Testgeschwindigkeit	0,20 mm/s
Post-Testgeschwindigkeit	0,20 mm/s
Zielmodus	Deformation
Deformation	15,0 %
Anzahl der Kompressionszyklen	2
Auslösekraft	0,049 N

Es wurde eine Texturprofilanalyse von allen Gelatinegelen und der Schweinezungenschleimhaut durchgeführt. Dazu wurde ein Texture Analyser (TA.Xtplus, Stable Micro Systems, Surrey, England) im Testmodus der Kompression und ein Aluminiumstempel mit einem Durchmesser von 0,5 cm verwendet, wobei die in Tabelle 6.8 gelisteten Geräteparameter eingestellt wurden. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels Gerätesoftware (Exponent, Stable Micro Systems, Surrey, England). Es wurden zwei Kompressionszyklen nacheinander durchgeführt und folgende Parameter bestimmt (vgl. Abbildung 6.8). Die Maximalkraft im ersten Kompressionszyklus stellt die Härte (F_{\max}) der Probe dar. Das Verhältnis der positiven Flächen unter der Kurve ($(AUC_1 + AUC_2) / AUC_3$) aus Kompressionszyklus eins und zwei ist ein Maß für die Kohäsivität oder Verformung der Probe. Die negative Fläche unter der Kurve (AUC_4) im ersten Kompressionszyklus gibt die Klebrigkeit der Probe wieder. Die Elastizität berechnet sich aus dem Quotienten aus der Fläche unter der absteigenden Kurve (AUC_2) und der gesamten Fläche unter der Kurve des ersten Kompressionszyklus ($AUC_2 / (AUC_1 + AUC_2)$). Jede Probe wurde sechsmal vermessen und MW, Standardabweichung sowie KI berechnet.

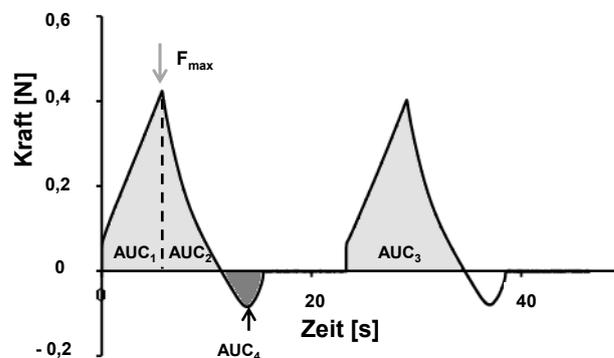


Abbildung 6.8: Beispiel-Kraft-Zeit Diagramm der Kompressionsanalyse eines 10 %-igen Gelatinegels

6.2.10.3 Mucinpresslinge

Es wurden Presslinge aus Mucinpulver vom Schweinemagen (vgl. Tabelle 6.4) hergestellt. Dazu wurden jeweils 250 mg Mucinpulver einzeln eingewogen und mit einer Exzenterpresse (EK0, Korsch, Berlin, Deutschland) mit einer Presskraft von 21 ± 1 kN (bzw. 67 ± 3 MPa) verpresst. Es wurde ein Stempelwerkzeug mit einem Durchmesser von 20 mm verwendet. Auf eine Schmierung wurde verzichtet, um die Oberfläche der Presslinge für spätere Mukoadhäsionsmessungen nicht zu beeinflussen.

6.2.10.4 Mukoadhäsionsprüfung mittels Texture Analysers

Zur Bestimmung der Mukoadhäsion wurde ein Texture Analyser (TA.Xtplus, Stable Micro Systems, Surrey, England) im Testmodus der Adhäsion verwendet. Die gewählten Geräteparameter sind in Tabelle 6.9 aufgelistet

Tabelle 6.9: Geräteparameter zur Mukoadhäsionsmessung

Geräteparameter	Wert
Testgeschwindigkeit	0,05 mm/s
Post-Testgeschwindigkeit	0,05 mm/s
Ausgeübte Kraft	1,000 N
Rücklauf	8,0 mm
Kontaktzeit	60 s
Auslösekraft	0,049 N

Beim Auseinanderziehen von Probe und Mukosa bzw. Gelatinegel wurde die Adhäsionskraft bestimmt (vgl. Abbildung 6.9 A). Die Probe wurde mittels doppelseitigem Klebeband an einem Stempel ($\varnothing=1$ cm) befestigt und abwärts in Richtung Mukosa bewegt, welche in einer Halterung eingebracht war. Nach Kontakt mit der Mukosa wurde eine Kraft von 1 N ausgeübt und nach 60 s wurde der Stempel wieder aufwärts bewegt, um die Probe von der Mukosa zu trennen. Die dazu benötigte Kraft und Strecke wurden aufgezeichnet und mittels Gerätesoftware (Exponent, Stable Micro Systems, Surrey, England) ausgewertet. In Abbildung 6.9 B ist ein typisches Kraft-Weg-Diagramm am Beispiel einer Mukadhäsionsbestimmung eines PVP-Films dargestellt. Adhäsionskraft als Maximalkraft (F_{\max}) nach Trennung von Probe und Mukosa und die Adhäsionsarbeit als Fläche unter der Kraft-Weg Kurve (AUC) wurden berechnet.

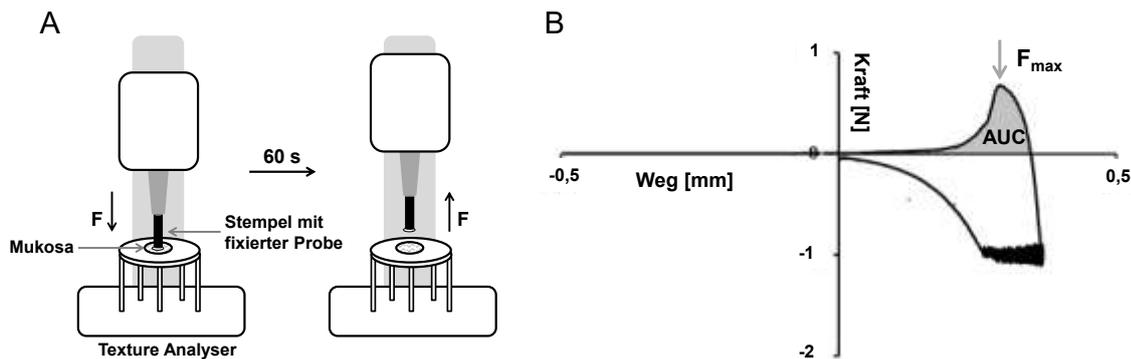


Abbildung 6.9: Schemazeichnung des Mukoadhäsionsmessprinzips (links); Beispiel-Kraft-Weg Diagramm eines PVP-Films (rechts)

Neben verschiedenen Filmzubereitungen wurde eine auf dem Markt befindliche mukoadhäsive Tablette (Aftab[®], Meda Pharma, Bad Homburg, Deutschland) als positive Referenz- und Teflonband als negative Referenzprobe vermessen. Alle Proben wurden zuvor unter kontrollierten Bedingungen gelagert (21 °C, 45 % r.F.). Es wurden kreisförmige Ausstanzungen der Filme ($\varnothing=1$ cm) vermessen.

Die Mukoadhäsionsmessungen wurden ohne vorherige Befeuchtung der Schweineschleimhäute und Gelatinegele durchgeführt. Des Weiteren wurden ausgewählte Filmzubereitungen sowie positive und negative Referenzen durch Eintauchen (30 s) in eine Mucindispersion benetzt und danach auf Mukoadhäsion untersucht. Dazu wurde eine 5 %-ige Mucindispersion (Mucinpulver vom Schweinemagen, vgl. Tabelle 6.4) in Phosphatpuffer pH 6,8 frisch hergestellt und maximal 2-4 h bei 6-8 °C gelagert. Es wurden 6 Proben vermessen und MW, Standardabweichung sowie KI berechnet.

6.2.11 Freisetzung

6.2.11.1 Methode des modifizierten rotierenden Zylinders

Zur Untersuchung des Freisetzungsprofils der Filme wurde eine Freisetzungsapparatur entwickelt, die es ermöglicht, die unidirektionale Freisetzung aus niedrig dosierten Filmen zu untersuchen. Eine schematische Darstellung des Aufbaus ist in Abbildung 6.10 A dargestellt. Das Prinzip wurde der Dissolution Apparatur 6 des USP nachempfunden, welche vor allem zur Qualitätskontrolle für Transdermalpflaster Anwendung findet. Als Filmhalterung wurde ein Zylinder ($r=1,5$ cm, $h=3,2$ cm) verwendet, welcher mit einer Röhreinheit verbunden wurde (IKA Rührer RW20DZM, IKA Werke, Staufen im Breisgau, Deutschland). Der Film wurde an zwei Ecken mit doppelseitigem Klebeband befestigt. Im Fall der Dreischichtfilme wurden diese so befestigt, dass die AS nach Innen zum Zylinder zeigte. Zur Überprüfung der unidirektionalen Freisetzung wurden die Filme umgedreht, sodass die AS nach außen zum Freisetzungsmedium zeigte, um die

Permeabilität der AS zu untersuchen. Die Umdrehungsgeschwindigkeit lag bei 50 U/min. Es wurde eine Freisetzungsgefäß mit abgerundetem Boden und einem Volumen von ca. 120 ml verwendet. Der an der Röhreinheit befestigte Zylinder wurde in einem Abstand von 25 mm zum Mittelpunkt des Gefäßbodens positioniert. Als Freisetzungsmedium wurden 80 g Phosphatpuffer pH 6,8 (1:10 verdünnt) verwendet. Die Freisetzungsuntersuchungen wurden in einem Wasserbad (Julabo, Seelbach, Deutschland) bei 37 °C durchgeführt. Die Probennahme von 500 µl und Ergänzung von frischem Freisetzungsmedium erfolgte manuell. Es wurde unter sink-Bedingungen gearbeitet. Die Entnahmezeitpunkte waren entweder nach 60, 120, 180, 240, 300, 600, 900, 1200, 1320, 1440, 1560, 1680, 1800, 2400 und 3600 s (Filmgröße 30 cm², vgl. Abschnitt 3.2.5.3) oder nach 60, 120, 180, 240, 300, 600, 900, 1200, 1800, 2400 und 3600 s (Filmgröße 3 cm², vgl. Abschnitt 3.2.7.4). Die Proben wurden sofort durch einen Polypropylenfilter mit einer Porenweite von 0,45 µm (VWR, Radnor, Pennsylvania, USA) filtriert und verdünnt (1:2,5). Die Gehaltsbestimmung erfolgte mittels HPLC wie in Abschnitt 6.2.7.4 beschrieben. Es wurden jeweils 3 Filme untersucht und MW sowie Standardabweichung berechnet.

6.2.11.2 Stempel-und-Filter-Methode

Zur biorelevanten Freisetzungsuntersuchung wurde die „Stempel-und-Filter-Methode“ nach Krampe et al. [127] verwendet und teilweise modifiziert (schematischer Aufbau Abbildung 6.10 B). In einen Probenhalterungsrahmen der Größe 2x3 cm wurde zunächst ein Filterpapier eingespannt um auf dieses einen Film der gleichen Größe zu platzieren. Der Probenhalter samt Filter und Papier wurde in das Freisetzungsgefäß (Trockenglas mit einem Durchmesser von 5,3 cm) eingehängt, sodass der Filter in der Halterung Kontakt mit der Oberfläche des Freisetzungsmediums hatte, um die unidirektionale Freisetzung an der Mundschleimhaut zu simulieren. Die mechanische Belastung im Mundraum wurde durch ein Gewicht (14 g) berücksichtigt, welches während der Freisetzungsmessung auf den Film gelegt wurde. Zur Simulation des Speichelflusses wurde das Gewicht alle 30 s kurz entfernt und der Film mit 200 µl Freisetzungsmedium aus dem Freisetzungsgefäß benetzt. Im Fall der Dreischichtfilme wurden diese mit der AS nach oben auf den in der Halterung befindlichen Filter gelegt. Als Freisetzungsmedium wurden 40 g Phosphatpuffer pH 6,8 eingesetzt. Es wurde unter sink-Bedingungen gearbeitet. Die Untersuchungen wurden im Wasserbad (Magnetrührer, IKA RCT classic, IKA, Staufen, Deutschland) bei 37 °C durchgeführt. Die Probennahme erfolgte manuell nach 60, 120, 180, 240, 300, 600, 900, 1200, 1800, 2400 und 3600 s unter Ergänzung von frischem Freisetzungsmedium. Es wurde ein Probenvolumen von 10 ml entnommen, um die Absorption im Mundraum zu imitieren. Die Proben wurden direkt durch einen Polypropylenfilter (0,45 µm) filtriert und unverdünnt mittels HPLC (vgl. Abschnitt 6.2.7.4) analysiert. Es wurden jeweils 3 Filme untersucht und MW sowie Standardabweichung berechnet.

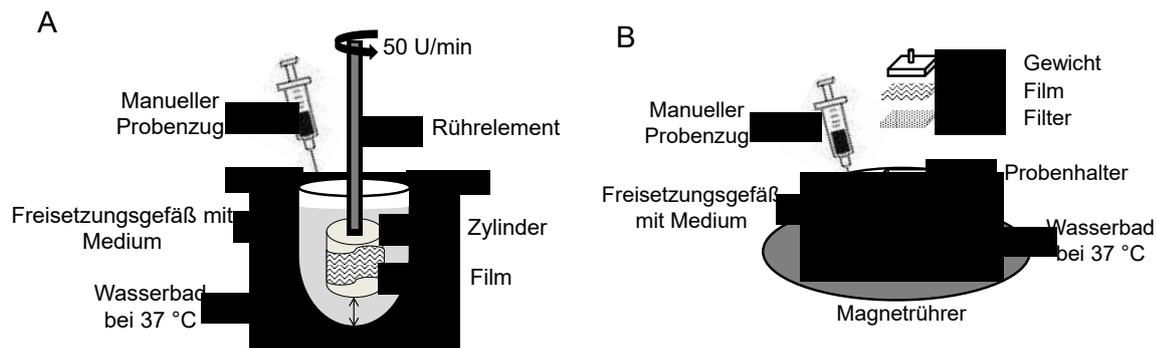


Abbildung 6.10: Schemazeichnung zur Methode des modifizierten Zylinders (links) und modifizierte Stempel- und Filter-Freisetzungsmethode nach Krampe [127] (rechts)

6.2.12 *Ex-vivo*-Permeationsuntersuchungen

6.2.12.1 Aufbau der *ex-vivo*-Permeationsmessungen

Zur Bestimmung der *ex-vivo*-Permeation von Desmopressin wurden frische Schweinezungenmukosa und Schweinespeiseröhrenmukosa verwendet, welche wie in Abschnitt 6.2.9 beschrieben präpariert wurden. Abbildung 6.11 zeigt den schematischen Versuchsaufbau zur Messung der *ex-vivo*-Permeation von Desmopressinlösungen (A) und Desmopressinfilmen (B). Die Mukosastücke wurden in zwei Typen von Permeationszellmodellen eingespannt: in ein vertikales Zellmodell (Abbildung 6.11, links) und in ein horizontales Zellmodell (Abbildung 6.11, rechts) [129, 241]. Beide Zellmodelle ermöglichen einen automatischen und luftblasenfreien Probenzug geeigneter Volumina. Die Permeationsfläche betrug bei beiden Zellen 0,82 cm². Das horizontale Zellmodell wurde nur mit Desmopressinlösungen verwendet.

Akzeptor- und Donorkammer wurden zunächst mit einer Schicht Teflonband und anschließend mit Parafilm® (Bemis, Meckenheim, Deutschland) abgedichtet. Zur zusätzlichen Fixierung diente eine Klemme. Als Akzeptormedien dienten jeweils 10 ml Citratpuffer pH 5 oder 10 ml Phosphatpuffer pH 6,8, die vor Beginn der Messung in die Akzeptorkammer eingefüllt wurden. Im Fall der Desmopressinlösungen wurde eine Donorlösung mit einer Konzentration von 5 mg/ml hergestellt, wovon 1,5 ml in die Donorkammer eingefüllt wurden. Als Lösungsmittel wurde Citratpuffer pH 5 oder künstlicher Speichel verwendet. Die Osmolaritäten der Donor- und Akzeptormedien wurden mit einem Osmometer bestimmt (Osmomat 3000, Gonotec, Berlin, Deutschland). Die Filme wurden mittels Lochsisen in kreisförmige Ausschnitte mit einer Fläche von 0,82 cm² gestanzt und, soweit vorhanden, mit der obersten mukoadhäsiven Schicht auf die Schleimhaut gelegt. Kurz vor Beginn der Messung wurden die Filme mit 200 µl Citratpuffer pH 5 benetzt. Die Messungen wurden bei 34 °C im Wasserbad (Julabo, Seelbach, Deutschland) durchgeführt. Die Probenentnahme erfolgte durch automatischen Probenzug und Abfüllung in Vials (Hanson Vision AutoPlus™ Maximizer™, Vision

AutoFill™, Hanson Research, Chatsworth, USA). Die Proben wurden unverdünnt mit der in Abschnitt 6.2.7.4 beschriebenen Methode und FLD-Detektion vermessen. Für einen Zeitraum von 4 h wurde alle 30 min ein Volumen von 4,5 ml entnommen, wovon 3 ml als Spülvorlauf und 1,5 ml als Probevolumen genutzt wurden. Das entnommene Volumen wurde sofort ergänzt. Eine zusätzliche Kanüle in der Akzeptorkammer diente zum Druckausgleich während des Probenzugs.

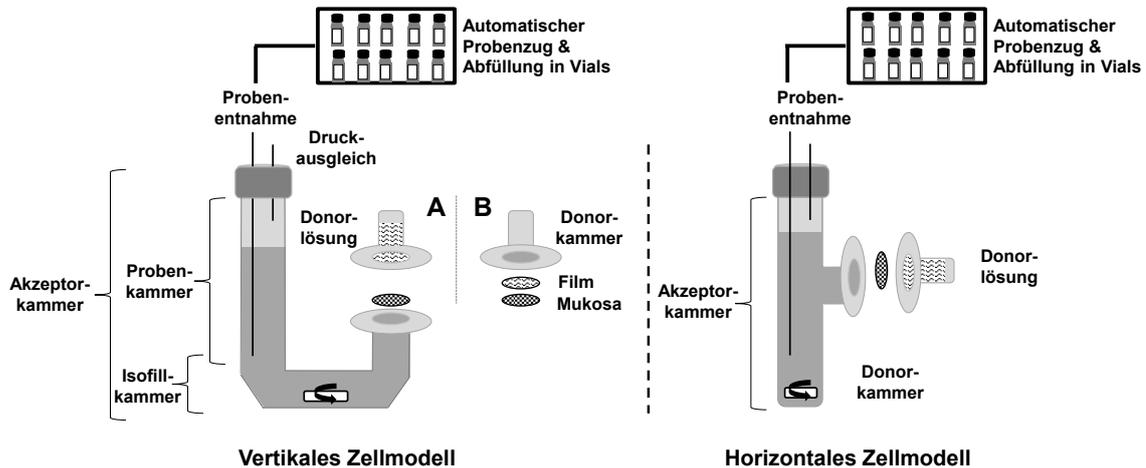


Abbildung 6.11: Schemazeichnung zur Permeationsmethode für Donor-Desmopressinlösungen (A) und Desmopressinfilme (B) unter Verwendung des vertikalen Zellmodells (links) und horizontalen Zellmodells (rechts)

Nach den Permeationsmessungen wurde jede Zelle visuell auf Dichtigkeit und Unversehrtheit der Mukosa untersucht. Zellen, bei denen einer der Faktoren nicht mehr gegeben war, wurden nicht in die Auswertung der Ergebnisse miteinbezogen. Zusätzlich wurden der verbliebene Film, welcher hauptsächlich aus der AS bestand, sowie die Mukosa auf Desmopressinrückstände untersucht. Der Film wurde in einer Mischung aus Wasser und Acetonitril 70/30 (v/v) gelöst. Die Mukosa wurde mit 3 ml Acetonitril ausgewaschen. Die Flüssigkeit wurde anschließend bei 2500 U/min für 15 min zentrifugiert (Multifuge 1L, Heraerus, Meerbusch, Deutschland) [228] und mit 7 ml Wasser verdünnt. Die Analyse erfolgte mittels HPLC (vgl. Abschnitt 6.2.7.4).

Zur Auswertung wurde die Permeation (P) [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$] nach Formel 6.4 für jeden Zeitpunkt berechnet, wobei $c(t_1)$ die gemessene Konzentration zum Zeitpunkt t_1 , $V(Z)$ das Volumen der Zelle, $V(P)$ das Volumen der Probe und A die Fläche darstellt.

$$P(t_1) = \frac{c(t_1) * V(Z)}{A} \quad 6.4$$

$$P(t_2) = P(t_1) + \left(\frac{c(t_2) * V(Z) - \left(\frac{c(t_1) * (V(Z) - V(P))}{V(Z)} \right)}{A} \right)$$

Der Flux (Fl) [$\mu\text{g}/\text{h}$] wurde nach Formel 6.5 berechnet, wobei m der Steigung des linearen Bereichs der Permeations-Zeit-Kurve entspricht.

$$Fl = m * A \quad 6.5$$

Der scheinbare Permeabilitätskoeffizient (K_p) [cm/h] berechnet sich nach Formel 6.6, wobei $c(D)$ die Konzentration der eingesetzten Donorlösung darstellt.

$$K_p = \frac{Fl}{A * c(D)} \quad 6.6$$

6.2.12.2 Integritätstest der Schweinemukosa

Zur Integritätsbestimmung der verwendeten Schweinemukosa wurde das Prinzip des Farbausschlusses (engl. dye exclusion) genutzt, welches auf der Fähigkeit gesunder, lebensfähiger Zellen beruht, Färbemittel bei Exposition abzuweisen [242]. Als Farbstoff wurde Trypanblau gewählt. Dazu wurde die präparierte Mukosa (vgl. Abschnitte 6.2.9) für einige Sekunden in eine wässrige Trypanblaulösung (0,4 %) gehalten, oberflächlich anhaftender Farbstoff mit Wasser abgewaschen und visuell auf Blaufärbung untersucht. Bei starker Blaufärbung war die Integrität der Mukosa nicht mehr gegeben und die Mukosa sowie die Ergebnisse wurden nicht verwendet. Abbildung 6.12 zeigt beispielhaft die Färbung von Zungenmukosa mittels Trypanblaulösung vor (links) und nach (Mitte) einer Permeationsmessung von 4 h. In beiden Fällen wurde die Integrität der Mukosa als gegeben bewertet. Nach Zerstörung der Integrität durch Behandlung mit Acetonitril ist eine starke Blaufärbung zu beobachten (Abbildung 6.12, rechts).



Abbildung 6.12: Integritätstest von Zungenmukosa; direkt nach der Präparation (links); nach einer Permeationsmessung von 4 h (Mitte); nach Behandlung mit Acetonitril für 24 h (rechts)

6.2.13 Durchstoßkraft

Zur Bestimmung der mechanischen Eigenschaften der Filme wurde die Durchstoßkraft und die Dehnung der Filme bestimmt [146]. Alle Filme wurden zuvor unter kontrollierten Bedingungen gelagert (21 °C, 45 % r.F.). Ein 2 x 3 cm großer Film wurde waagrecht in einen Probenstisch eingespannt, in dessen Mitte sich eine kreisrunde Aussparung ($\varnothing=1$ cm) befindet. Dort liegt der Film frei vor und kann von einem herunterfahrenden Stempel (Geschwindigkeit 1 mm/s) durchstoßen werden, wobei die benötigte Kraft und der zurückgelegte Weg aufgenommen werden. Dazu wurde ein Texture Analyser (TA.Xtplus, Stable Micro Systems, Surrey, England) im Testmodus der Kompression und ein Stempel des Durchmessers 4,8 mm eingesetzt. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels Gerätesoftware (Exponent, Stable Micro Systems, Surrey, England). Die Durchstoßkraft entsprach der Maximalkraft beim Bruch des Filmes und die Arbeit wurde über die Fläche unter der Kraft-Weg-Kurve (AUC) ermittelt (Abbildung 6.13, links). Die maximale Dehnung bis zum Bruch wurde wie in Abbildung 6.13, rechts dargestellt nach Formel 6.7 bestimmt. Es wurden jeweils 6 Filme vermessen und MW, Standardabweichung sowie KI berechnet.

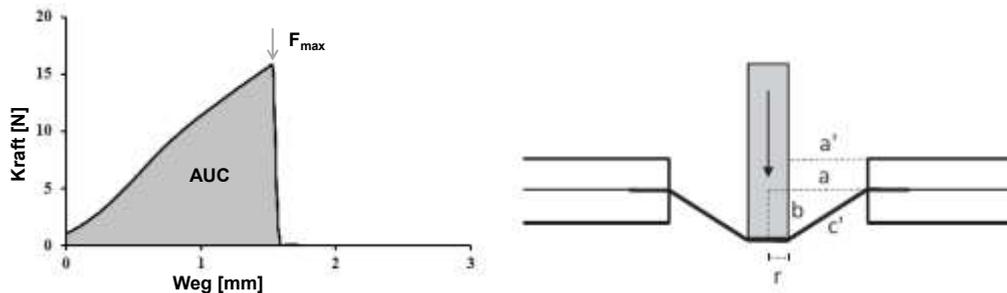


Abbildung 6.13: Typisches Kraft-Weg-Diagramm am Beispiel eines einschichtigen HPC-Filmes (links); Bestimmung der maximalen Dehnung bis zum Bruch [146] (rechts)

$$Dehnung = \left(\frac{\sqrt{a'^2 + b^2} + r}{a} - 1 \right) \times 100 \quad 6.7$$

6.2.14 Zerfall

6.2.14.1 Diarahmenmethode

Ein Film von der Größe 1,5 x 3 cm wird in einen Diarahmen eingespannt und waagrecht auf den Rand eines Becherglases gelegt [110, 113]. Es wird ein Tropfen Wasser von 200 μ l mittig auf den Film platziert und die Zeit gemessen, bis der Tropfen durch den Film gesickert ist. Es wurden jeweils 6 Filme vermessen sowie MW, Standardabweichung und KI berechnet.

6.2.14.2 Petrischalenmethode

Die Filme wurden in eine Petrischale mit einem Durchmesser von 5,6 cm und 3 ml Wasser gegeben. Die Petrischale wurde gleichmäßig bewegt und die Zeit gemessen, die benötigt wurde, bis der Film vollständig zerfallen ist [110, 113]. Es wurden jeweils 6 Filme vermessen sowie MW, Standardabweichung und KI berechnet.

6.2.14.3 Modifizierter Zerfallstester nach Ph. Eur.

Das Prinzip des konventionellen Zerfallstesters für Tabletten und Kapseln nach Ph. Eur. wurde zur Überprüfung der Zerfallszeit von orodispersiblen Filmen modifiziert [179]. Dazu wurde ein automatisierter Zerfallstester (Pharma Test, Hainburg, Deutschland) verwendet. 6 Filme mit einer Größe von 3 x 2 cm wurden in eine Probenhalterung eingeklemmt und am unteren Ende wurde ein Messinggewicht mit einer Masse von 3g befestigt. Der Probenhalter wurde in ein Gefäß mit 500 ml Phosphatpuffer pH 6,8 (37 °C) abgesenkt und damit die Auf- und Ab-Bewegung des Probenhalters gestartet. Die Endpunktdetektion erfolgte automatisch und beruht auf einer Widerstandsänderung innerhalb des Messsystems, sobald der Film zerfallen ist. Das Gewicht sinkt ab und berührt den zweiten Kontakt am Boden des Probengefäßes, wodurch der Widerstand stark absinkt und als Endpunkt der Messung detektiert wird.

7 Anhang

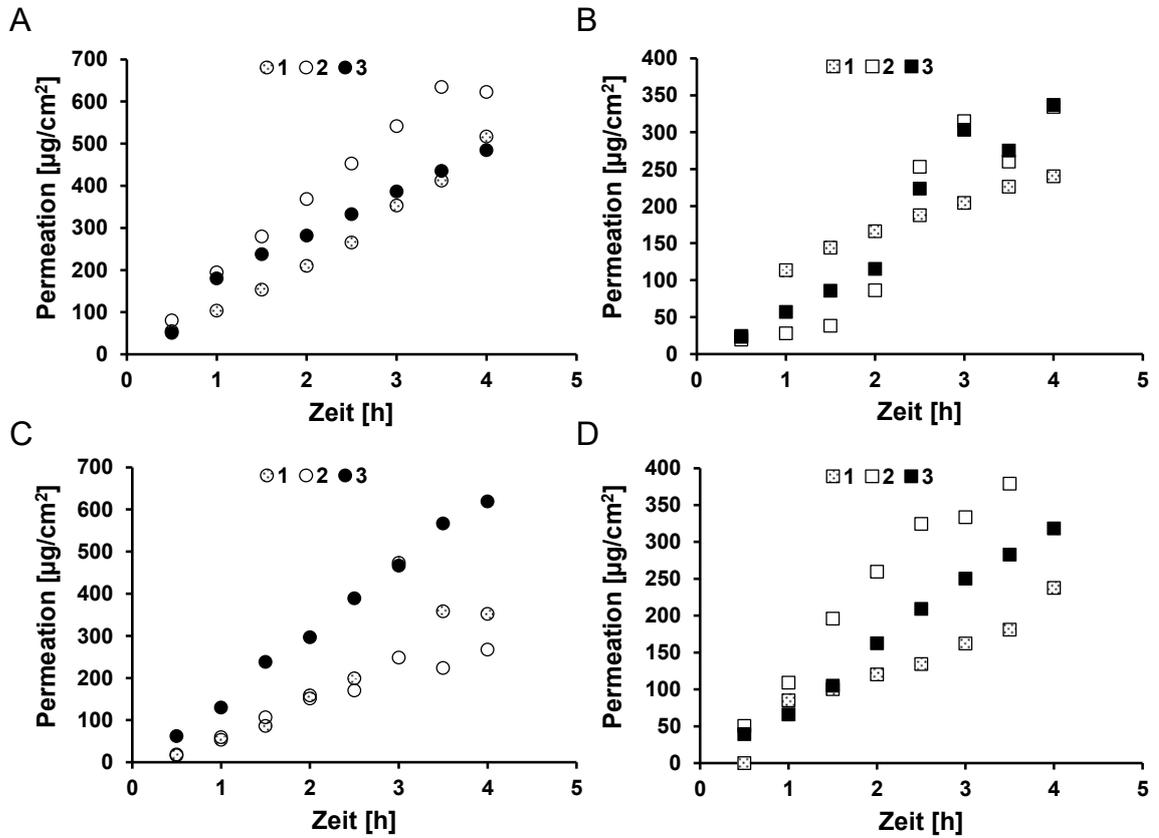


Abbildung 7.1: Einzelkurven der Permeationsversuche unter Verwendung des vertikalen Zellmodells; Akzeptormedium Citratpuffer und Donormedium Citratpuffer (A); Speichel (B); Akzeptormedium Phosphatpuffer und Donormedium Citratpuffer (C); Speichel (D)

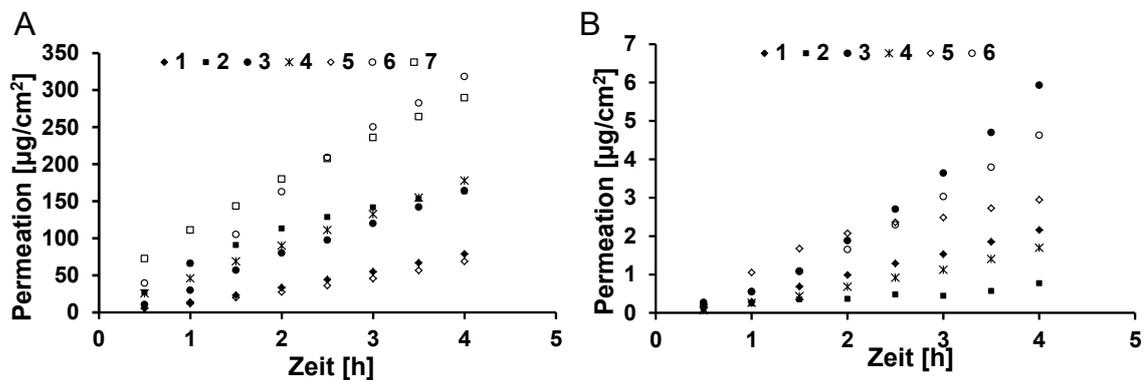


Abbildung 7.2: Einzelkurven der Permeationsversuche unter Verwendung von sublingualer (A); und ösophagealer Schweinemukosa (B)

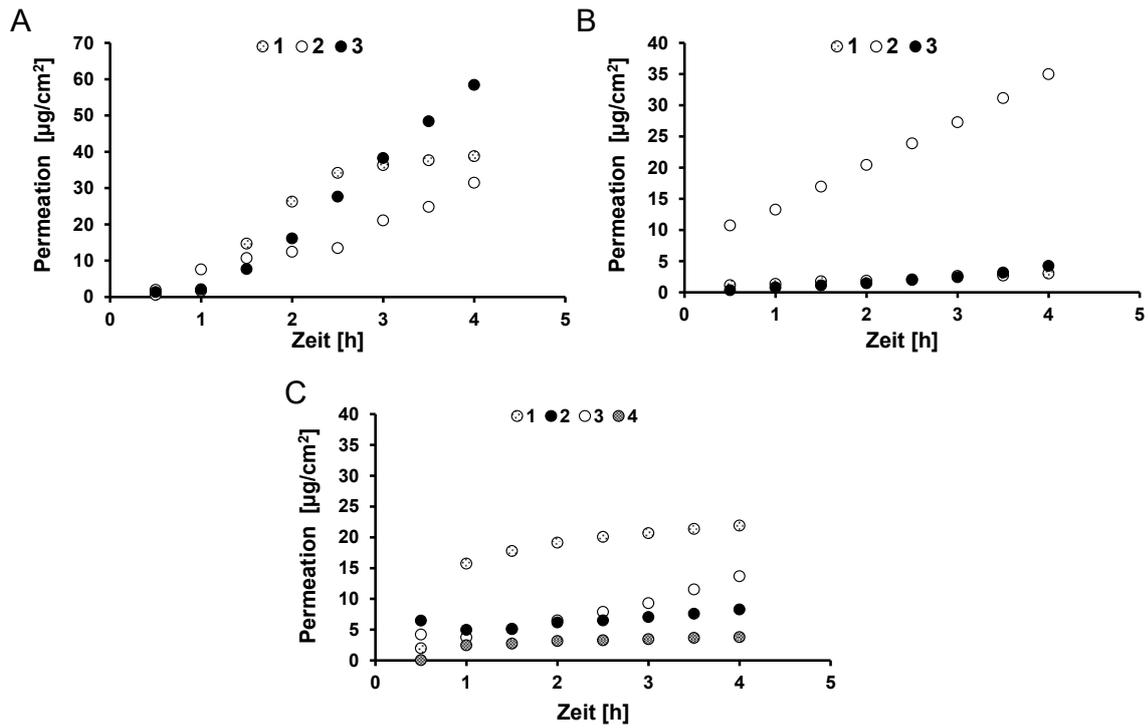


Abbildung 7.3: Einzelkurven der Permeationsversuche der Dreischichtfilme PVP (A); und Chito (B); und des Einschichtfilms HCl-b (C)

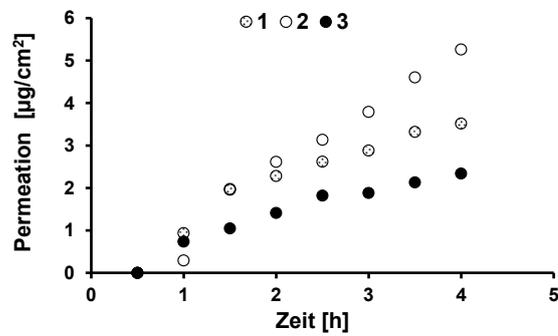


Abbildung 7.4: Einzelkurven der Permeationsversuche des Dreischichtfilms EC-PVP

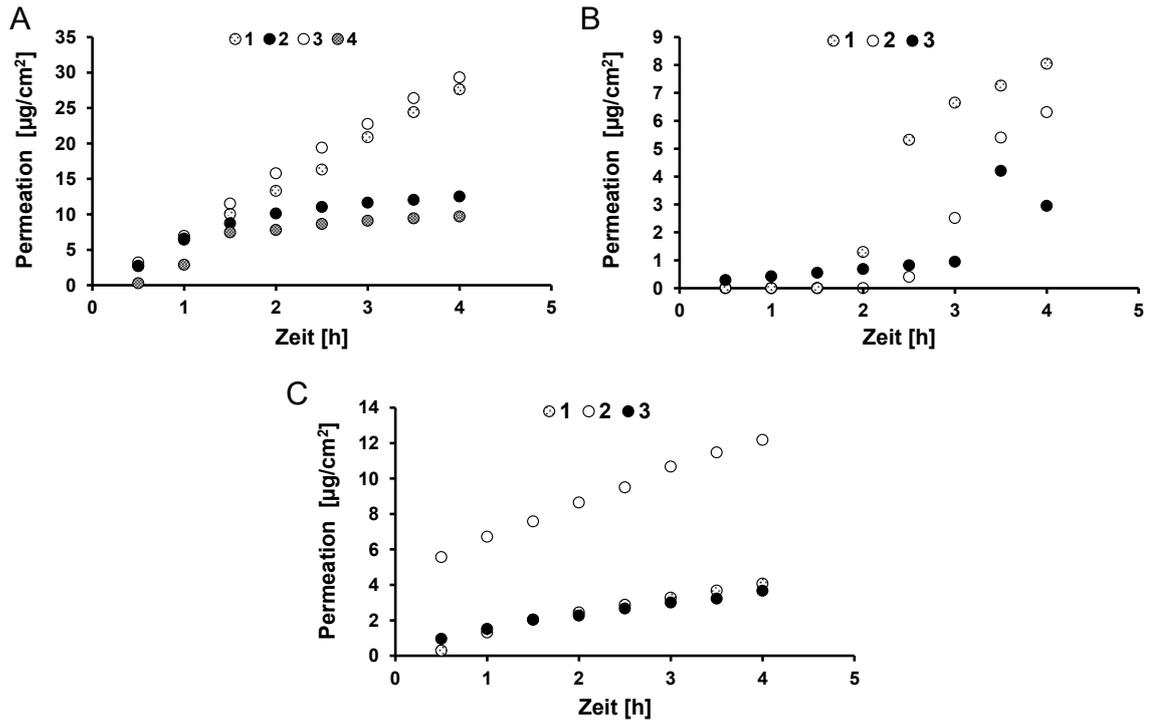


Abbildung 7.5: Einzelkurven der Permeationsversuche des Dreischichtfilms PVP mit SDS (A); Glycodesoxycholat (B) und Ölsäure (C) als neutrale Permeationsverbesserer

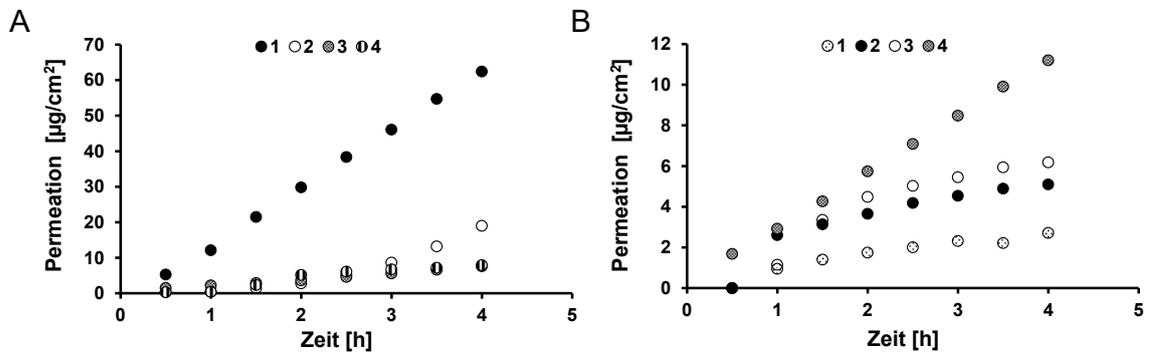


Abbildung 7.6: Einzelkurven der Permeationsversuche des Dreischichtfilms PVP mit Menthol (A); und Propylenglykol (B) als neutrale Permeationsverbesserer

8 Literaturverzeichnis

1. Antosova, Z., Mackova, M., Kral, V., and Macek, T., *Therapeutic application of peptides and proteins: Parenteral forever?* Trends in Biotechnology, 2009. 27(11): 628-635.
2. Johnson-Léger, C., Power, C.A., Shomade, G., Shaw, J.P., and Proudfoot, A.E.I., *Protein therapeutics - Lessons learned and a view of the future.* Expert Opinion on Biological Therapy, 2006. 6(1): 1-7.
3. Humphrey, M.J. and Ringrose, P.S., *Peptides and related drugs: A review of their absorption, metabolism, and excretion.* Drug Metabolism Reviews, 1986. 17(3-4): 283-310.
4. Singh, R., Singh, S., and Lillard, J.W., *Past, present, and future technologies for oral delivery of therapeutic proteins.* Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008. 97(7): 2497-2523.
5. Shaji, J. and Patole, V., *Protein and peptide drug delivery: Oral approaches.* Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008. 70(3): 269-277.
6. Mathias, N.R. and Hussain, M.A., *Non-invasive systemic drug delivery: Developability considerations for alternate routes of administration.* Journal of Pharmaceutical Sciences, 2010. 99(1): 1-20.
7. Brown, L.R., *Commercial challenges of protein drug delivery.* Expert Opinion on Drug Delivery, 2005. 2(1): 29-42.
8. Patel, D.A., Patel, M.R., Patel, K.R., and Patel, N.M., *Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: A review.* International Journal of Drug Development and Research, 2012. 4(2): 99-116.
9. Mashru, R.C., Sutariya, V.B., Sankalia, M.G., and Parikh, P.P., *Development and evaluation of fast-dissolving film of salbutamol sulphate.* Drug Development and Industrial Pharmacy, 2005. 31(1): 25-34.
10. Galey, W.R., Lonsdale, H.K., and Nacht, S., *The in vitro permeability of skin and buccal mucosa to selected drugs and tritiated water.* Journal of Investigative Dermatology, 1976. 67(6): 713-717.
11. Rathbone, M.J. and Hadgraft, J., *Absorption of drugs from the human oral cavity.* International Journal of Pharmaceutics, 1991. 74(1): 9-24.
12. Rathbone, M.J., Drummond, B.K., and Tucker, I.G., *The oral cavity as a site for systemic drug-delivery.* Advanced Drug Delivery Reviews, 1994. 13(1-2): 1-22.
13. Bodde, H.E., Devries, M.E., and Junginger, H.E., *Mucoadhesive polymers for the buccal delivery of peptides, structure-adhesiveness relationships.* Journal of Controlled Release, 1990. 13(2-3): 225-231.
14. Dixit, R.P. and Puthli, S.P., *Oral strip technology: Overview and future potential.* Journal of Controlled Release, 2009. 139(2): 94-107.

15. Castro, P.M., Fonte, P., Sousa, F., Madureira, A.R., Sarmiento, B., and Pintado, M.E., *Oral films as breakthrough tools for oral delivery of proteins/peptides*. Journal of Controlled Release, 2015. 211: 63-73.
16. Şenel, S. and Hincal, A.A., *Drug permeation enhancement via buccal route: Possibilities and limitations*. Journal of Controlled Release, 2001. 72(1-3): 133-144.
17. Aungst, B.J., Saitoh, H., Burcham, D.L., Huang, S.M., Mousa, S.A., and Hussain, M.A., *Enhancement of the intestinal absorption of peptides and nonpeptides*. Journal of Controlled Release, 1996. 41(1-2): 19-31.
18. Bird, A.P., Faltinek, J.R., and Shojaei, A.H., *Transbuccal peptide delivery: Stability and in vitro permeation studies on endomorphin-1*. Journal of Controlled Release, 2001. 73(1): 31-36.
19. Oh, D.H., Chun, K.H., Jeon, S.O., Kang, J.W., and Lee, S., *Enhanced transbuccal salmon calcitonin (sCT) delivery: Effect of chemical enhancers and electrical assistance on in vitro sCT buccal permeation*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2011. 79(2): 357-363.
20. Hoogstraate, A.J., Verhoef, J.C., Tuk, B., Pijpers, A., Van Leengoed, L.A.M.G., Verheijden, J.H.M., Junginger, H.E., and Boddé, H.E., *Buccal delivery of fluorescein isothiocyanate-dextran 4400 and the peptide drug busarelin with glycodeoxycholate as an absorption enhancer in pigs*. Journal of Controlled Release, 1996. 41(1-2): 77-84.
21. Hoogstraate, A.J., Verhoef, J.C., Pijpers, A., Van Leengoed, L.A.M.G., Verheijden, J.H.M., Junginger, H.E., and Boddé, H.E., *In vivo buccal delivery of the peptide drug busarelin with glycodeoxycholate as an absorption enhancer in pigs*. Pharmaceutical Research, 1996. 13(8): 1233-1237.
22. Dowty, M.E., Knuth, K.E., Irons, B.K., and Robinson, J.R., *Transport of thyrotropin releasing hormone in rabbit buccal mucosa in vitro*. Pharmaceutical Research, 1992. 9(9): 1113-1122.
23. Sayani, A.P., Chun, I.K., and Chien, Y.W., *Transmucosal delivery of leucine-enkephalin - Stabilization in rabbit enzyme extracts and enhancement of permeation through mucosae*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1993. 82(11): 1179-1185.
24. Kotze, A.F., de Leeuw, B.J., Luessen, H.L., de Boer, A.G., Verhoef, J.C., and Junginger, H.E., *Chitosans for enhanced delivery of therapeutic peptides across intestinal epithelia: In vitro evaluation in Caco-2 cell monolayers*. International Journal of Pharmaceutics, 1997. 159(2): 243-253.
25. Lee, J. and Kellaway, I.W., *Buccal permeation of D-Ala(2), D-Leu(5) enkephalin from liquid crystalline phases of glyceryl monooleate*. International Journal of Pharmaceutics, 2000. 195(1-2): 35-38.
26. Llabot, J.M., Manzo, R.H., and Allemanni, D.A., *Double-layered mucoadhesive tablets containing nystatin*. AAPS PharmSciTech, 2002. 3(3).

27. Pather, S.I., Rathbone, M.J., and Şenel, S., *Current status and the future of buccal drug delivery systems*. Expert Opinion on Drug Delivery, 2008. 5(5): 531-542.
28. Anders, R., Merkle, H.P., Schurr, W., and Ziegler, R., *Buccal absorption of protirelin: An effective way to stimulate thyrotropin and prolactin*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1983. 72(12): 1481-1483.
29. Merkle, H.P. and Wolany, G., *Buccal delivery for peptide drugs*. Journal of Controlled Release, 1992. 21(1-3): 155-164.
30. Langoth, N., Kahlbacher, H., Schoffmann, G., Schmerold, I., Schuh, M., Franz, S., Kurka, P., and Bernkop-Schnurch, A., *Thiolated chitosans: Design and in vivo evaluation of a mucoadhesive buccal peptide drug delivery system*. Pharmaceutical Research, 2006. 23(3): 573-579.
31. Nakane, S., Kakumoto, M., Yukimatsu, K., and Chien, Y.W., *Oramucosal delivery of LHRH: Pharmacokinetic studies of controlled and enhanced transmucosal permeation*. Pharmaceutical Development and Technology, 1996. 1(3): 251-9.
32. Jin, L., Boyd, B.J., White, P.J., Pennington, M.W., Norton, R.S., and Nicolazzo, J.A., *Buccal mucosal delivery of a potent peptide leads to therapeutically-relevant plasma concentrations for the treatment of autoimmune diseases*. Journal of Controlled Release, 2015. 199: 37-44.
33. Dorkoosh, F.A., Verhoef, J.C., Ambagts, M.H.C., Rafiee-Tehrani, M., Borchard, G., and Junginger, H.E., *Peroral delivery systems based on superporous hydrogel polymers: Release characteristics for the peptide drugs busereelin, octreotide and insulin*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2002. 15(5): 433-439.
34. Chinwala, M.G. and Lin, S., *Application of hydrogel polymers for development of thyrotropin releasing hormone-loaded adhesive buccal patches*. Pharmaceutical Development and Technology, 2010. 15(3): 311-327.
35. Giovino, C., Ayensu, I., Tetteh, J., and Boateng, J.S., *Development and characterisation of chitosan films impregnated with insulin loaded PEG-b-PLA nanoparticles (NPs): A potential approach for buccal delivery of macromolecules*. International Journal of Pharmaceutics, 2012. 428(1-2): 143-151.
36. Morales, J.O., Huang, S., Williams, R.O., and McConville, J.T., *Films loaded with insulin-coated nanoparticles (ICNP) as potential platforms for peptide buccal delivery*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2014. 122: 38-45.
37. Morales, J.O., Ross, A.C., and McConville, J.T., *Protein-coated nanoparticles embedded in films as delivery platforms*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2013. 65(6): 827-838.
38. Anders, R. and Merkle, H.P., *Evaluation of laminated muc-cohesive patches for buccal drug delivery*. International Journal of Pharmaceutics, 1989. 49(3): 231-240.

39. Cui, Z.R. and Mumper, R.J., *Buccal transmucosal delivery of calcitonin in rabbits using thin-film composites*. *Pharmaceutical Research*, 2002. 19(12): 1901-1906.
40. Cui, Z.R. and Mumper, R.J., *Bilayer films for mucosal (genetic) immunization via the buccal route in rabbits*. *Pharmaceutical Research*, 2002. 19(7): 947-953.
41. Boateng, J.S. and Ayensu, I., *Preparation and characterization of laminated thiolated chitosan-based freeze-dried wafers for potential buccal delivery of macromolecules*. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2014. 40(5): 611-618.
42. Li, C., Koch, R.L., Raul, V.A., Bhatt, P.P., and Johnston, T.P., *Absorption of thyrotropin-releasing hormone in rats using a mucoadhesive buccal patch*. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 1997. 23(3): 239-246.
43. Li, C., Bhatt, P.P., and Johnston, T.P., *In vitro release and permeation of oxytocin from a mucoadhesive buccal patch*. *Pharmaceutical Development and Technology*, 1996. 1(4): 357-64.
44. Ding, J., He, R., Zhou, G., Tang, C., and Yin, C., *Multilayered mucoadhesive hydrogel films based on thiolated hyaluronic acid and polyvinylalcohol for insulin delivery*. *Acta Biomaterialia*, 2012. 8(10): 3643-3651.
45. Becker, D.J. and Foley Jr, T.P., *1-Deamino-8-d-arginine vasopressin in the treatment of central diabetes insipidus in childhood*. *The Journal of Pediatrics*, 1978. 92(6): 1011-1015.
46. Lottmann, H.B. and Alova, I., *Primary monosymptomatic nocturnal enuresis in children and adolescents*. *International Journal of Clinical Practice*, 2007. 61(Suppl. 155): 8-16.
47. de Waele, K., Cools, M., de Guchteneere, A., van de Walle, J., Raes, A., van Aken, S., de Coen, K., Vanhaesebrouck, P., and de Schepper, J., *Desmopressin lyophilisate for the treatment of central diabetes insipidus: First experience in very young infants*. *International Journal of Endocrinology and Metabolism*, 2014. 12(4).
48. Cvetković, R.S. and Plosker, G.L., *Desmopressin: In adults with nocturia*. *Drugs*, 2005. 65(1): 99-107.
49. European Medicines Agency (EMA), *Inventory of paediatric therapeutic needs - Endocrinology*. EMA/PDCO/52553/2015 Corr.1, 2015.
50. Şenel, S., Rathbone, M.J., Cansz, M., and Pather, I., *Recent developments in buccal and sublingual delivery systems*. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2012. 9(6): 615-628.
51. Squier, C.A., *The permeability of oral mucosa*. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine : An official publication of the American Association of Oral Biologists*, 1991. 2(1): 13-32.
52. Shojaei, A.H., *Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: A review*. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* 1998. 1(1): 15-30.

53. Hearnden, V., Sankar, V., Hull, K., Juras, D.V., Greenberg, M., Kerr, A.R., Lockhart, P.B., Patton, L.L., Porter, S., and Thornhill, M.H., *New developments and opportunities in oral mucosal drug delivery for local and systemic disease*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012. 64(1): 16-28.
54. Borges, A., Silva, C., Coelho, J.F.J., and Simões, S., *Oral films: Current status and future perspectives*. *Journal of Controlled Release*, 2015. 206: 1-19.
55. Lam, J.K.W., Xu, Y., Worsley, A., and Wong, I.C.K., *Oral transmucosal drug delivery for pediatric use*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2014. 73: 50-62.
56. Madhav, N.V.S., Shakya, A.K., Shakya, P., and Singh, K., *Orotransmucosal drug delivery systems: A review*. *Journal of Controlled Release*, 2009. 140(1): 2-11.
57. Jiménez Castellanos, M., Zia, H., and Rhodes, C.T., *Mucoadhesive drug delivery systems*. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 1993. 19(1-2): 143-194.
58. Peppas, N.A. and Buri, P.A., *Surface, interfacial and molecular aspects of polymer bioadhesion on soft tissues*. *Journal of Controlled Release*, 1985. 2: 257-275.
59. Lagerlöf, F. and Dawes, C., *The volume of saliva in the mouth before and after swallowing*. *Journal of Dental Research*, 1984. 63(5): 618-621.
60. Zwier, N., Huysmans, M.C.D.N.J.M., Jager, D.H.J., Ruben, J., Bronkhorst, E.M., and Truin, G.J., *Saliva parameters and erosive wear in adolescents*. *Caries Research*, 2013. 47(6): 548-552.
61. Yamahara, H. and Lee, V.H.L., *Drug metabolism in the oral cavity*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1993. 12(1-2): 25-39.
62. Peh, K.K. and Wong, C.F., *Polymeric films as vehicle for buccal delivery: Swelling, mechanical, and bioadhesive properties*. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 1999. 2(2): 53-61.
63. Nishigaki, M., Kawahara, K., Nawa, M., Futamura, M., Nishimura, M., Matsuura, K., Kitaichi, K., Kawaguchi, Y., Tsukioka, T., Yoshida, K., and Itoh, Y., *Development of fast dissolving oral film containing dexamethasone as an antiemetic medication: Clinical usefulness*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2012. 424(1-2): 12-17.
64. Preis, M., Woertz, C., Kleinebudde, P., and Breitzkreutz, J., *Oromucosal film preparations: Classification and characterization methods*. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2013. 10(9): 1303-1317.
65. Hoffmann, E.M., Breitenbach, A., and Breitzkreutz, J., *Advances in orodispersible films for drug delivery*. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2011. 8(3): 299-316.
66. Janßen, E.M., Schliephacke, R., Breitenbach, A., and Breitzkreutz, J., *Drug-printing by flexographic printing technology - A new manufacturing process*

- for orodispersible films*. International Journal of Pharmaceutics, 2013. 441(1-2): 818-825.
67. Okamoto, H., Nakamori, T., Arakawa, Y., Iida, K., and Danjo, K., *Development of polymer film dosage forms of lidocaine for buccal administration: II. Comparison of preparation methods*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2002. 91(11): 2424-2432.
68. Ramineni, S.K., Cunningham, L.L., Dziubla, T.D., and Puleo, D.A., *Development of imiquimod-loaded mucoadhesive films for oral dysplasia*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2013. 102(2): 593-603.
69. Remuñán-López, C., Portero, A., Vila-Jato, J.L., and Alonso, M.J., *Design and evaluation of chitosan/ethylcellulose mucoadhesive bilayered devices for buccal drug delivery*. Journal of Controlled Release, 1998. 55(2-3): 143-152.
70. Adhikari, S.N.R., Nayak, B.S., Nayak, A.K., and Mohanty, B., *Formulation and evaluation of buccal patches for delivery of atenolol*. AAPS PharmSciTech, 2010. 11(3): 1038-1044.
71. Mishra, R. and Amin, A., *Formulation and characterization of rapidly dissolving films of cetirizine hydrochloride using pullulan as a film forming agent*. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research, 2011. 45(1): 71-77.
72. Onishi, H., Sakata, O., Masuda, K., and Machida, Y., *Novel mucoadhesive oral patch containing diazepam*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2005. 31(7): 607-613.
73. Shidhaye, S.S., Saindane, N.S., Sutar, S., and Kadam, V., *Mucoadhesive bilayered patches for administration of sumatriptan succinate*. AAPS PharmSciTech, 2008. 9(3): 909-916.
74. Nafee, N.A., Ismail, F.A., Boraie, N.A., and Mortada, L.M., *Mucoadhesive buccal patches of miconazole nitrate: In vitro/in vivo performance and effect of ageing*. International Journal of Pharmaceutics, 2003. 264(1-2): 1-14.
75. Park, D.M., Song, Y.K., Jee, J.P., Kim, H.T., and Kim, C.K., *Development of chitosan-based ondansetron buccal delivery system for the treatment of emesis*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2012. 38(9): 1077-1083.
76. Langoth, N., Kalbe, J., and Bernkop-Schnurch, A., *Development of buccal drug delivery systems based on a thiolated polymer*. International Journal of Pharmaceutics, 2003. 252(1-2): 141-148.
77. Preis, M., Pein, M., and Breitzkreutz, J., *Development of a taste-masked orodispersible film containing dimenhydrinate*. Pharmaceutics, 2012. 4(4): 551-562.
78. Bin Liew, K., Tan, Y.T.F., and Peh, K.K., *Characterization of oral disintegrating film containing donepezil for alzheimer disease*. AAPS PharmSciTech, 2012. 13(1): 134-142.
79. Speer, I., Preis, M., and Breitzkreutz, J., *Prolonged release properties for orodispersible films combining solvent casting and hot-melt extrusion*. 10th

- World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Glasgow, 2016.
80. Das, N.G. and Das, S.K., *Development of mucoadhesive dosage forms of buprenorphine for sublingual drug delivery*. Drug Delivery: Journal of Delivery and Targeting of Therapeutic Agents, 2004. 11(2): 89-95.
81. Kumar, M., Garg, G., Kumar, P., Kulkarni, G.T., and Kumar, A., *Design and in vitro evaluation of mucoadhesive buccal films containing famotidine*. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2010. 2(3): 86-90.
82. Repka, M.A., Gutta, K., Prodduturi, S., Munjal, M., and Stodghill, S.P., *Characterization of cellulosic hot-melt extruded films containing lidocaine*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2005. 59(1): 189-196.
83. Wong, C.F., Yuen, K.H., and Peh, K.K., *Formulation and evaluation of controlled release Eudragit buccal patches*. International Journal of Pharmaceutics, 1999. 178(1): 11-22.
84. Tonglairoum, P., Ngawhirunpat, T., Rojanarata, T., Panomsuk, S., Kaomongkolgit, R., and Opanasopit, P., *Fabrication of mucoadhesive chitosan coated polyvinylpyrrolidone/cyclodextrin/clotrimazole sandwich patches for oral candidiasis*. Carbohydrate Polymers, 2015. 132: 173-179.
85. Desai, K.G.H., Mallery, S.R., Holpuch, A.S., and Schwendeman, S.P., *Development and in vitro-in vivo evaluation of fenretinide-loaded oral mucoadhesive patches for site-specific chemoprevention of oral cancer*. Pharmaceutical Research, 2011. 28(10): 2599-2609.
86. Satishbabu, B. and Srinivasan, B., *Preparation and evaluation of buccoadhesive films of atenolol*. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008. 70(2): 175-179.
87. Perugini, P., Genta, I., Conti, B., Modena, T., and Pavanetto, F., *Periodontal delivery of ipriflavone: New chitosan/PLGA film delivery system for a lipophilic drug*. International Journal of Pharmaceutics, 2003. 252(1-2): 1-9.
88. El-Kamel, A.H., Ashri, L.Y., and Alsarra, I.A., *Micromatrical metronidazole benzoate film as a local mucoadhesive delivery system for treatment of periodontal diseases*. AAPS Pharmscitech, 2007. 8(3).
89. Obaidat, R.M., Bader, A., Al-Rajab, W., Sheikha, G.A., and Obaidat, A.A., *Preparation of mucoadhesive oral patches containing tetracycline hydrochloride and carvacrol for treatment of local mouth bacterial infections and candidiasis*. Scientia Pharmaceutica, 2011. 79(1): 197-212.
90. Abu-Huwaij, R., Assaf, S., Salem, M., and Sallam, A., *Potential mucoadhesive dosage form of lidocaine hydrochloride: II. In vitro and in vivo evaluation*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2007. 33(4): 437-448.

91. Juliano, C., Cossu, M., Pigozzi, P., Rasso, G., and Giunchedi, P., *Preparation, in vitro characterization and preliminary in vivo evaluation of buccal polymeric films containing chlorhexidine*. AAPS Pharmscitech, 2008. 9(4): 1153-1158.
92. Furtado, S., Bharath, S., Basavaraj, B.V., Abraham, S., Deveswaran, R., and Madhavan, V., *Development of chitosan based bioadhesive bilayered patches of metoprolol tartarate*. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 2010. 4(3): 198-202.
93. Singh, T.P., Singh, R.K., Shah, J.N., and Mehta, T.A., *Mucoadhesive bilayer buccal patches of verapamil hydrochloride: Formulation development and characterization*. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2014. 6(4): 234-241.
94. Palem, C.R., Gannu, R., Yamsani, V.V., Yamsani, S.K., and Yamsani, M.R., *Development of bilayered mucoadhesive patches for buccal delivery of felodipine: In vitro and ex vivo characterization*. Current Trends in Biotechnology and Pharmacy, 2010. 4(2): 673-683.
95. Doijad, R.C., *Buccoadhesive drug delivery system of isosorbide dinitrate: Formulation and evaluation*. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2006. 68(6): 744-748.
96. Yedurkar, P., Dhiman, M.K., Petkar, K., and Sawant, K., *Biopolymeric mucoadhesive bilayer patch of pravastatin sodium for Buccal delivery and treatment of patients with atherosclerosis*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2013. 39(5): 670-680.
97. Borges, A.F., Silva, C., Coelho, J.F.J., and Simões, S., *Oral films: Current status and future perspectives II-Intellectual property, technologies and market needs*. Journal of Controlled Release, 2015. 206: 108-121.
98. Kumar, A., Bali, V., Kumar, M., and Pathak, K., *Comparative evaluation of porous versus nonporous mucoadhesive films as buccal delivery system of glibenclamide*. AAPS Pharmscitech, 2013. 14(4): 1321-1332.
99. Das, C. and Sajeeth, C.I., *Design, development and evaluation of mucoadhesive patches of repaglinide for buccal delivery*. International Journal of Pharmacy and Technology, 2013. 5(1): 5271-5288.
100. Portero, A., Teijeiro-Osorio, D., Alonso, M.J., and Remuñán-López, C., *Development of chitosan sponges for buccal administration of insulin*. Carbohydrate Polymers, 2007. 68(4): 617-625.
101. Diaz del Consuelo, I., Falson, F., Guy, R.H., and Jacques, Y., *Ex vivo evaluation of bioadhesive films for buccal delivery of fentanyl*. Journal of Controlled Release, 2007. 122(2): 135-140.
102. Avachat, A.M., Gujar, K.N., and Wagh, K.V., *Development and evaluation of tamarind seed xyloglucan-based mucoadhesive buccal films of rizatriptan benzoate*. Carbohydrate Polymers, 2013. 91(2): 537-542.

103. Puratchikody, A., Prasanth, V.V., Mathew, S.T., and Kumar, B.A., *Development and characterization of mucoadhesive patches of salbutamol sulfate for unidirectional buccal drug delivery*. *Acta Pharmaceutica*, 2011. 61(2): 157-170.
104. Soni, R., Sagar, G.V., and Sharma, P., *Formulation, development and in-vitro evaluation of mucoadhesive bilayered buccal patches of montelukast sodium*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2012. 4(2): 484-497.
105. Swamy, P.V., Amitkumar, T., Shirsand, S.B., Patil, A.N., and Farhana, L., *Design and evaluation of buccal patches of granisetron hydrochloride*. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 2010. 44(1): 95-101.
106. Palem, C.R., Gannu, R., Doodipala, N., Yamsani, V.V., and Yamsani, M.R., *Transmucosal delivery of domperidone from bilayered buccal patches: In vitro, ex vivo and in vivo characterization*. *Archives of Pharmacal Research*, 2011. 34(10): 1701-1710.
107. Govindasamy, P., Kesavan, B.R., and Narasimha, J.K., *Formulation of unidirectional release buccal patches of carbamazepine and study of permeation through porcine buccal mucosa*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2013. 3(12): 995-1002.
108. Li, C., Bhatt, P.P., and Johnston, T.P., *Transmucosal delivery of oxytocin to rabbits using a mucoadhesive buccal patch*. *Pharmaceutical development and technology*, 1997. 2(3): 265-74.
109. Jay, S., Fountain, W., Cui, Z., and Mumper, R.J., *Transmucosal delivery of testosterone in rabbits using novel bi-layer mucoadhesive wax-film composite disks*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2002. 91(9): 2016-2025.
110. Garsuch, V. and Breitzkreutz, J., *Novel analytical methods for the characterization of oral wafers*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2009. 73(1): 195-201.
111. Woertz, C. and Kleinebudde, P., *Development of orodispersible polymer films with focus on the solid state characterization of crystalline loperamide*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2015. 94: 52-63.
112. Perumal, V.A., Govender, T., Lutchman, D., and Mackraj, I., *Investigating a new approach to film casting for enhanced drug content uniformity in polymeric films*. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2008. 34(10): 1036-1047.
113. Garsuch, V. and Breitzkreutz, J., *Comparative investigations on different polymers for the preparation of fast-dissolving oral films*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2010. 62(4): 539-545.
114. Repka, M.A., Majumdar, S., Battu, S.K., Srirangam, R., and Upadhye, S.B., *Applications of hot-melt extrusion for drug delivery*. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2008. 5(12): 1357-1376.

115. Arya, A., Chandra, A., Sharma, V., and Pathak, K., *Fast dissolving oral films: An innovative drug delivery system and dosage form*. International Journal of ChemTech Research, 2010. 2(1): 576-583.
116. Cavallari, C., Fini, A., and Ospitali, F., *Mucoadhesive multiparticulate patch for the intrabuccal controlled delivery of lidocaine*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2013. 83(3): 405-414.
117. Nagy, Z.K., Nyúl, K., Wagner, I., Molnár, K., and Marosi, G., *Electrospun water soluble polymer mat for ultrafast release of donepezil HCl*. Express Polymer Letters, 2010. 4(12): 763-772.
118. Genina, N., Fors, D., Vakili, H., Ihalainen, P., Pohjala, L., Ehlers, H., Kassamakov, I., Haeggström, E., Vuorela, P., Peltonen, J., and Sandler, N., *Tailoring controlled-release oral dosage forms by combining inkjet and flexographic printing techniques*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2012. 47(3): 615-623.
119. Preis, M., Woertz, C., Schneider, K., Kukawka, J., Broscheit, J., Roewer, N., and Breitzkreutz, J., *Design and evaluation of bilayered buccal film preparations for local administration of lidocaine hydrochloride*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2014. 86(3): 552-561.
120. Krampe, R., Visser, J.C., Frijlink, H.W., Breitzkreutz, J., Woerdenbag, H.J., and Preis, M., *Oromucosal film preparations: Points to consider for patient centricity and manufacturing processes*. Expert Opinion on Drug Delivery, 2015: 1-14.
121. Morales, J.O. and McConville, J.T., *Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2011. 77(2): 187-199.
122. Parmar, H.G., Jain, J.J., Patel, T.K., and Patel, V.M., *Buccal patch: A technical note*. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 2010. 4(3): 178-182.
123. Abruzzo, A., Bigucci, F., Cerchiara, T., Cruciani, F., Vitali, B., and Luppi, B., *Mucoadhesive chitosan/gelatin films for buccal delivery of propranolol hydrochloride*. Carbohydrate Polymers, 2012. 87(1): 581-588.
124. Llabot, J.M., Palma, S.D., Manzo, R.H., and Allemandi, D.A., *Design of novel antifungal mucoadhesive films. Part II. Formulation and in vitro biopharmaceutical evaluation*. International Journal of Pharmaceutics, 2007. 336(2): 263-268.
125. Xia, Y., Chen, F., Zhang, H., and Luo, C., *A new method for evaluating the dissolution of orodispersible films*. Pharmaceutical Development and Technology, 2015. 20(3): 375-379.
126. Abu-Huwajj, R., Assaf, S., Salem, M., and Sallam, A., *Mucoadhesive dosage form of lidocaine hydrochloride: I. Mucoadhesive and physicochemical characterization*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2007. 33(8): 855-864.

127. Krampe, R., Sieber, D., Pein-Hackelbusch, M., and Breitzkreutz, J., *A new biorelevant dissolution method for orodispersible films*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2016. 98: 20-25.
128. Sohi, H., Ahuja, A., Ahmad, F.J., and Khar, R.K., *Critical evaluation of permeation enhancers for oral mucosal drug delivery*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2010. 36(3): 254-282.
129. Kerski, S., Rathsack, W., and Stodt, G., *Peremationszelle mit Isofillkammer*. Patent: DE 20 2015 004 165 U1, 2015.
130. Kulkarni, U., Mahalingam, R., Pather, S.I., Li, X., and Jasti, B., *Porcine buccal mucosa as an in vitro model: Relative contribution of epithelium and connective tissue as permeability barriers*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009. 98(2): 471-483.
131. Kulkarni, U., Mahalingam, R., Pather, I., Li, X., and Jasti, B., *Porcine buccal mucosa as in vitro model: Effect of biological and experimental variables*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2010. 99(3): 1265-1277.
132. Teubl, B.J., Absenger, M., Fröhlich, E., Leitinger, G., Zimmer, A., and Roblegg, E., *The oral cavity as a biological barrier system: Design of an advanced buccal in vitro permeability model*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2013. 84(2): 386-393.
133. Walle, T., Walle, U.K., Sedmera, D., and Klausner, M., *Benzo[a]pyrene-induced oral carcinogenesis and chemoprevention: Studies in bioengineered human tissue*. Drug Metabolism and Disposition, 2006. 34(3): 346-350.
134. Woertz, C., Preis, M., Breitzkreutz, J., and Kleinebudde, P., *Assessment of test methods evaluating mucoadhesive polymers and dosage forms: An overview*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2013. 85(3): 843-853.
135. Jones, D.S., Woolfson, A.D., and Brown, A.F., *Textural, viscoelastic and mucoadhesive properties of pharmaceutical gels composed of cellulose polymers*. International Journal of Pharmaceutics, 1997. 151(2): 223-233.
136. Duchêne, D., Touchard, F., and Peppas, N.A., *Pharmaceutical and medical aspects of bioadhesive systems for drug administration*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 1988. 14(2-3): 283-318.
137. Smart, J.D., *The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2005. 57(11): 1556-1568.
138. Hassan, E.E. and Gallo, J.M., *A simple rheological method for the in vitro assessment of mucin-polymer bioadhesive bond strength*. Pharmaceutical Research, 1990. 7(5): 491-495.
139. Nafee, N.A., Ismail, F.A., Boraie, N.A., and Mortada, L.M., *Mucoadhesive delivery systems. I. Evaluation of mucoadhesive polymers for buccal tablet formulation*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2004. 30(9): 985-993.

140. Kockisch, S., Rees, G.D., Young, S.A., Tsibouklis, J., and Smart, J.D., *Polymeric microspheres for drug delivery to the oral cavity: An in vitro evaluation of mucoadhesive potential*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2003. 92(8): 1614-1623.
141. Cilurzo, F., Cupone, I.E., Minghetti, P., Buratti, S., Selmin, F., Gennari, C.G.M., and Montanari, L., *Nicotine fast dissolving films made of maltodextrins: A feasibility study*. AAPS Pharmscitech, 2010. 11(4): 1511-1517.
142. Boateng, J.S., Stevens, H.N.E., Eccleston, G.M., Auffret, A.D., Humphrey, M.J., and Matthews, K.H., *Development and mechanical characterization of solvent-cast polymeric films as potential drug delivery systems to mucosal surfaces*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2009. 35(8): 986-996.
143. Sharma, R., Kamboj, S., Singh, G., and Rana, V., *Development of aprepitant loaded orally disintegrating films for enhanced pharmacokinetic performance*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2016. 84: 55-69.
144. Deutsches Institut für Normung (DIN), *DIN EN ISO 527-1 Bestimmung der Zugeigenschaften Teil 1: Allgemeine Grundsätze*. Beuth Verlag GmbH, Berlin, 1996.
145. Deutsches Institut für Normung (DIN), *DIN EN ISO 527-3 Bestimmung der Zugeigenschaften Teil 3: Prüfbedingungen für Folien und Tafeln*. Beuth Verlag GmbH, Berlin, 2003.
146. Preis, M., Knop, K., and Breitzkreutz, J., *Mechanical strength test for orodispersible and buccal films*. International Journal of Pharmaceutics, 2014. 461(1-2): 22-29.
147. Yehia, S.A., El-Gazayerly, O.N., and Basalious, E.B., *Fluconazole mucoadhesive buccal films: In vitro/in vivo performance*. Current Drug Delivery, 2009. 6(1): 17-27.
148. Asane, G.S., Nirmal, S.A., Rasal, K.B., Naik, A.A., Mahadik, M.S., and Rao, Y.M., *Polymers for mucoadhesive drug delivery system: A current status*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2008. 34(11): 1246-1266.
149. Choudhary, A., Tiwari, G., Pandey, M., Kymonil, K.M., and Saraf, S.A., *Formulation and characterization of carvedilol buccal mucoadhesive patches*. International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences, 2010. 1(4): 396-401.
150. Desai, K.G.H. and Pramod Kumar, T.M., *Preparation and evaluation of a novel buccal adhesive system*. AAPS Pharmscitech, 2004. 5(3).
151. Shen, B.D., Shen, C.Y., Yuan, X.D., Bai, J.X., Lv, Q.Y., Xu, H., Dai, L., Yu, C., Han, J., and Yuan, H.L., *Development and characterization of an orodispersible film containing drug nanoparticles*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2013. 85(3 PART B): 1348-1356.

152. European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM), European Pharmacopoeia 8.0. Restlösemittel. Strasbourg, France, Council of Europe, 2012.
153. Bernkop-Schnurch, A., *Chitosan and its derivatives: Potential excipients for peroral peptide delivery systems*. International Journal of Pharmaceutics, 2000. 194(1): 1-13.
154. Senel, S., Kremer, M.J., Kas, S., Wertz, P.W., Hincal, A.A., and Squier, C.A., *Enhancing effect of chitosan on peptide drug delivery across buccal mucosa*. Biomaterials, 2000. 21(20): 2067-2071.
155. Schipper, N.G.M., Olsson, S., Hoogstraate, J.A., deBoer, A.G., Varum, K.M., and Artursson, P., *Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs .2. Mechanism of absorption enhancement*. Pharmaceutical Research, 1997. 14(7): 923-929.
156. Luessen, H.L., Rentel, C.O., Kotze, A.F., Lehr, C.M., de Boer, A.G., Verhoef, J.C., and Junginger, H.E., *Mucoadhesive polymers in peroral peptide drug delivery .4. Polycarbophil and chitosan are potent enhancers of peptide transport across intestinal mucosae in vitro*. Journal of Controlled Release, 1997. 45(1): 15-23.
157. Nair, A.B., Kumria, R., Harsha, S., Attimarad, M., Al-Dhubiab, B.E., and Alhaider, I.A., *In vitro techniques to evaluate buccal films*. Journal of Controlled Release, 2013. 166(1): 10-21.
158. Van Kerrebroeck, P. and Nørgaard, J.P., *Desmopressin for the treatment of primary nocturnal enuresis*. Pediatric Health, 2009. 3(4): 311-327.
159. Holmes, C.L., Landry, D.W., and Granton, J.T., *Science review: Vasopressin and the cardiovascular system part 1 - Receptor physiology*. Critical Care, 2003. 7(6): 427-434.
160. Vilhardt, H., *Basic pharmacology of desmopressin: A review*. Drug Investigation, 1990. 2(5): 2-8.
161. Hashim, H. and Abrams, P., *Desmopressin for the treatment of adult nocturia*. Therapy, 2008. 5(5): 667-683.
162. Vilhardt, H. and Lundin, S., *Biological effect and plasma concentrations of DDAVP after intranasal and peroral administration to humans*. General Pharmacology, 1986. 17(4): 481-483.
163. Wolfish, N.M. and Pham, C., *Management of nocturnal enuresis in children*. Canadian Pharmacists Journal, 2009. 142(2): 76-80.
164. De Bruyne, P., De Guchtenaere, A., Van Herzeele, C., Raes, A., Dehoorne, J., Hoebeke, P., Van Laecke, E., and Van de Walle, J., *Pharmacokinetics of desmopressin administered as tablet and oral lyophilisate formulation in children with monosymptomatic nocturnal enuresis*. European Journal of Pediatrics, 2014. 173(2): 223-228.

165. De Guchtanaere, A., Van Herzeele, C., Raes, A., Dehoorne, J., Hoebeke, P., Van Laecke, E., and Vande Walle, J., *Oral lyophilizate formulation of desmopressin: Superior pharmacodynamics compared to tablet due to low food interaction*. Journal of Urology, 2011. 185(6): 2308-2313.
166. Juul, K.V., Van Herzeele, C., De Bruyne, P., Goble, S., Walle, J.V., and Nørgaard, J.P., *Desmopressin melt improves response and compliance compared with tablet in treatment of primary monosymptomatic nocturnal enuresis*. European Journal of Pediatrics, 2013. 172(9): 1235-1242.
167. Arima, H., Oiso, Y., Juul, K.V., and Nørgaard, J.P., *Efficacy and safety of desmopressin orally disintegrating tablet in patients with central diabetes insipidus: Results of a multicenter open-label dose-titration study*. Endocrine Journal, 2013. 60(9): 1085-1094.
168. Lottmann, H., Froeling, F., Alloussi, S., El-Radhi, A.S., Rittig, S., Riis, A., and Persson, B.E., *A randomised comparison of oral desmopressin lyophilisate (MELT) and tablet formulations in children and adolescents with primary nocturnal enuresis*. International journal of clinical practice, 2007. 61(9): 1454-1460.
169. European Medicines Agency (EMA), *Guideline on pharmaceutical development of medicines for paediatric use*. EMA/CHMP/QWP/52553/2012 Rev.2, 2012.
170. Klingmann, V., Thabet, Y., and Breitzkreutz, J., *Arzneiformen für Kinder*. Pharmakon, 2016. 4: 134-140.
171. Scheidl, H., Hantich, G., Hesse, E., and Zapf, T., *Stable, nasally, orally or sublingually applicable pharmaceutical preparations*. Patent: US 2003/0119728 A1, 2003.
172. European Medicines Agency (EMA), *Reflection paper: Formulations of choice for the paediatric population*. EMA/CHMP/PEG/194810/2005, 2009.
173. Woertz, C., *Entwicklung und Charakterisierung von orodispersiblen Polymerfilmen mit suspendiertem Arzneistoff*. Dissertation. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2015.
174. Krekeler, A., *Formulation development an manufacturing of ODFs and MBFs* APV course: ODx and MBx - Orodispersible and mucoadhesive buccal formulations, Innsbruck, 2015.
175. Elmeshad, A.N. and El Hagrasy, A.S., *Characterization and optimization of orodispersible mosapride film formulations*. AAPS Pharmscitech, 2011. 12(4): 1384-1392.
176. Deutsches Institut für Normung (DIN), *DIN EN ISO 14477 Verpackung, flexible Packstoffe - Bestimmung der Durchstoßfestigkeit*. Beuth Verlag, Berlin, 2004.
177. Deutsches Institut für Normung (DIN), *DIN EN 10002-1 Metallische Werkstoffe, Zugversuch Teil 1: Prüfung bei Raumtemperatur* Beuth Verlag, Berlin, 2001.

178. Krampe, R., *Orodispersible Filme mit schwerlöslichem, hochdosiertem Arzneistoff: Herstellungstechniken und biorelevante Beurteilung*. Dissertation. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2015.
179. Preis, M., Gronkowsky, D., Grytzan, D., and Breitzkreutz, J., *Comparative study on novel test systems to determine disintegration time of orodispersible films*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2014. 66(8): 1102-1111.
180. International Council for Harmonisation of Technical Requirements (ICH), *Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2)*. 2003.
181. Hoffmann, E.M., *Flexible Arzneistoffbeladung orodispersibler Filme durch Bedrucken*. Dissertation. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2012.
182. Boateng, J., Ayensu, I., and Pawar, H., *Chitosan*, in *Mucoadhesive Materials and Drug Delivery Systems* 2014, Wiley Blackwell. p. 233-254.
183. Law, S.L., Huang, K.J., and Chou, V.H.Y., *Stability of desmopressin loaded in liposomes*. Journal of Liposome Research, 2003. 13(3-4): 269-277.
184. Kahns, A.H., Buur, A., and Bundgaard, H., *Prodrugs of peptides. 18. Synthesis and evaluation of various esters of desmopressin (dDAVP)*. Pharmaceutical Research, 1993. 10(1): 68-74.
185. Christophersen, P.C., Zhang, L., Müllertz, A., Nielsen, H.M., Yang, M., and Mu, H., *Solid lipid particles for oral Delivery of peptide and protein drugs II - The digestion of trilaurin protects desmopressin from proteolytic degradation*. Pharmaceutical Research, 2014: 1-9.
186. Zhou, X.H. and Li Wan Po, A., *Peptide and protein drugs: I. Therapeutic applications, absorption and parenteral administration*. International Journal of Pharmaceutics, 1991. 75(2-3): 97-115.
187. Langoth, N. and Bernkop-Schnürch, A., *The use of multifunctional polymers as auxiliary agents in non-invasive peptide delivery*. American Pharmaceutical Review, 2005. 8(2): 80-84.
188. Ilan, E., Amselem, S., Weisspapier, M., Schwarz, J., Yogev, A., Zawoznik, E., and Friedman, D., *Improved oral delivery of desmopressin via a novel vehicle: Mucoadhesive submicron emulsion*. Pharmaceutical Research, 1996. 13(7): 1083-1087.
189. Luessen, H.L., de Leeuw, B.J., Langemeyer, M.W.E., de Boer, A.G., Verhoef, J.C., and Junginger, H.E., *Mucoadhesive polymers in peroral peptide drug delivery .6. Carbomer and chitosan improve the intestinal absorption of the peptide drug busirelin in vivo*. Pharmaceutical Research, 1996. 13(11): 1668-1672.
190. Kindermann, C., Matthée, K., Sievert, F., and Breitzkreutz, J., *Electrolyte-Stimulated biphasic dissolution profile and stability enhancement for tablets containing drug-Polyelectrolyte complexes*. Pharmaceutical Research, 2012. 29(10): 2710-2721.

191. Jimenez-Kairuz, A., Allemandi, D., and Manzo, R.H., *Mechanism of lidocaine release from carbomer-lidocaine hydrogels*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2002. 91(1): 267-272.
192. Kindermann, C., Matthée, K., Strohmeyer, J., Sievert, F., and Breitzkreutz, J., *Tailor-made release triggering from hot-melt extruded complexes of basic polyelectrolyte and poorly water-soluble drugs*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2011. 79(2): 372-381.
193. Lubrizol, *Product specification Carbopol NF Polymer*. 2011.
194. Lueßen, H.L., Bohner, V., Pérard, D., Langguth, P., Verhoef, J.C., De Boer, A.G., Merkle, H.P., and Junginger, H.E., *Mucoadhesive polymers in peroral peptide drug delivery. V. Effect of poly(acrylates) on the enzymatic degradation of peptide drugs by intestinal brush border membrane vesicles*. International Journal of Pharmaceutics, 1996. 141(1-2): 39-52.
195. El-Samaligy, M.S., Yahia, S.A., and Basalious, E.B., *Formulation and evaluation of diclofenac sodium buccoadhesive discs*. International Journal of Pharmaceutics, 2004. 286(1-2): 27-39.
196. Ayensu, I., Mitchell, J.C., and Boateng, J.S., *Development and physico-mechanical characterisation of lyophilised chitosan wafers as potential protein drug delivery systems via the buccal mucosa*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2012. 91(1): 258-265.
197. Jimenez-Kairuz, A.F., Allemandi, D.A., and Manzo, R.H., *Equilibrium properties and mechanism of kinetic release of metoclopramide from carbomer hydrogels*. International Journal of Pharmaceutics, 2003. 250(1): 129-136.
198. Ashland, *Klucel hydroxypropylcellulose - Physical and chemical properties*. http://www.ashland.com/Ashland/Static/Documents/ASI/PC_11229_Klucel_HPC.pdf (abgerufen: 07.06.2016), 2012.
199. Sudhakar, Y., Kuotsu, K., and Bandyopadhyay, A.K., *Buccal bioadhesive drug delivery - A promising option for orally less efficient drugs*. Journal of Controlled Release, 2006. 114(1): 15-40.
200. Mortazavi, S.A. and Smart, J.D., *An investigation into the role of water movement and mucus gel dehydration in mucoadhesion*. Journal of Controlled Release, 1993. 25(3): 197-203.
201. Huang, Y.B., Leobandung, W., Foss, A., and Peppas, N.A., *Molecular aspects of muco- and bioadhesion: Tethered structures and site-specific surfaces*. Journal of Controlled Release, 2000. 65(1-2): 63-71.
202. Cook, M.T. and Khutoryanskiy, V.V., *Mucoadhesion and mucosa-mimetic materials - A mini-review*. International Journal of Pharmaceutics, 2015. 495(2): 991-998.
203. Sekhar, K.C., Naidu, K.V.S., Vishnu, Y.V., Gannu, R., Kishan, V., and Rao, Y.M., *Transbuccal delivery of chlorpheniramine maleate from mucoadhesive buccal patches*. Drug Delivery, 2008. 15(3): 185-191.

204. Han, R.Y., Fang, J.Y., Sung, K.C., and Hu, O.Y.P., *Mucoadhesive buccal disks for novel nalbuphine prodrug controlled delivery: Effect of formulation variables on drug release and mucoadhesive performance*. International Journal of Pharmaceutics, 1999. 177(2): 201-209.
205. Baloglu, E., Karavana, S.Y., Senyigit, Z.A., and Guneri, T., *Rheological and mechanical properties of poloxamer mixtures as a mucoadhesive gel base*. Pharmaceutical Development and Technology, 2011. 16(6): 627-636.
206. Keely, S., Rullay, A., Wilson, C., Carmichael, A., Carrington, S., Corfield, A., Haddleton, D.M., and Brayden, D.J., *In vitro and ex vivo intestinal tissue models to measure mucoadhesion of poly (methacrylate) and N-trimethylated chitosan polymers*. Pharmaceutical Research, 2005. 22(1): 38-49.
207. Hall, D.J., Khutoryanskaya, O.V., and Khutoryanskiy, V.V., *Developing synthetic mucosa-mimetic hydrogels to replace animal experimentation in characterisation of mucoadhesive drug delivery systems*. Soft Matter, 2011. 7(20): 9620-9623.
208. Xu, X., Shen, Y., Wang, W., Sun, C., Li, C., Xiong, Y., and Tu, J., *Preparation and in vitro characterization of thermosensitive and mucoadhesive hydrogels for nasal delivery of phenylephrine hydrochloride*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2014. 88(3): 998-1004.
209. Ahuja, A., Khar, R.K., and Ali, J., *Mucoadhesive drug delivery systems*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 1997. 23(5): 489-515.
210. Hermes, M.F.K., *Kindgerechte, niedrigdosierte Zubereitungen mit Enalaprilmaleat*. Dissertation. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2012.
211. Diaz-Del Consuelo, I., Jacques, Y., Pizzolato, G.P., Guy, R.H., and Falson, F., *Comparison of the lipid composition of porcine buccal and esophageal permeability barriers*. Archives of Oral Biology, 2005. 50(12): 981-987.
212. Lee, J.W., Park, J.H., and Robinson, J.R., *Bioadhesive-based dosage forms: The next generation*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2000. 89(7): 850-866.
213. Jones, D.S., Bruschi, M.L., de Freitas, O., Gremião, M.P.D., Lara, E.H.G., and Andrews, G.P., *Rheological, mechanical and mucoadhesive properties of thermoresponsive, bioadhesive binary mixtures composed of poloxamer 407 and carbopol 974P designed as platforms for implantable drug delivery systems for use in the oral cavity*. International Journal of Pharmaceutics, 2009. 372(1-2): 49-58.
214. Jones, D.S., Woolfson, A.D., Brown, A.F., Coulter, W.A., McClelland, C., and Irwin, C.R., *Design, characterisation and preliminary clinical evaluation of a novel mucoadhesive topical formulation containing tetracycline for the treatment of periodontal disease*. Journal of Controlled Release, 2000. 67(2-3): 357-368.

215. Gurny, R., Meyer, J.M., and Peppas, N.A., *Bioadhesive intraoral release systems: design, testing and analysis*. Biomaterials, 1984. 5(6): 336-340.
216. BASF, *Technical information: Soluble Kollidon grades*. 2011.
217. Lehr, C.M., Bouwstra, J.A., Schacht, E.H., and Junginger, H.E., *In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers*. International Journal of Pharmaceutics, 1992. 78(1): 43-48.
218. Joly-Duhamel, C., Hellio, D., and Djabourov, M., *All gelatin networks: 1. Biodiversity and physical chemistry*. Langmuir, 2002. 18(19): 7208-7217.
219. Joly-Duhamel, C., Hellio, D., Ajdari, A., and Djabourov, M., *All gelatin networks: 2. The master curve for elasticity*. Langmuir, 2002. 18(19): 7158-7166.
220. Hirlekar, R.S. and Kadam, V.J., *Design of buccal drug delivery system for a poorly soluble drug*. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 2009. 2(3): 49-53.
221. Naga Raju, K., Velmurugan, S., Deepika, B., and Vinushitha, S., *Formulation and in-vitro evaluation of buccal tablets of Metoprolol tartrate*. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2011. 3(2): 239-246.
222. Lundin, S. and Artursson, P., *Absorption of a vasopressin analogue, 1-deamino-8-d-arginine-vasopressin (dDAVP), in a human intestinal epithelial cell line, CaCO-2*. International Journal of Pharmaceutics, 1990. 64(2-3): 181-186.
223. Pantzar, N., Lundin, S., and Westrom, B.R., *Different properties of the paracellular pathway account for the regional small intestinal permeability to the peptide desmopressin*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1995. 84(10): 1245-1248.
224. Föger, F., Kopf, A., Loretz, B., Albrecht, K., and Bernkop-Schnürch, A., *Correlation of in vitro and in vivo models for the oral absorption of peptide drugs*. Amino Acids, 2008. 35(1): 233-241.
225. Vries, M.E., *Developments in buccal drug delivery*. Critical reviews in therapeutic drug carrier systems, 1991. 8(3): 271-303.
226. Bortolotti, F., Balducci, A.G., Sonvico, F., Russo, P., and Colombo, G., *In vitro permeation of desmopressin across rabbit nasal mucosa from liquid nasal sprays: The enhancing effect of potassium sorbate*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009. 37(1): 36-42.
227. Getie, M., Wohlrab, J., and Neubert, R.H.H., *Dermal delivery of desmopressin acetate using colloidal carrier systems*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2005. 57(4): 423-427.
228. Getie, M. and Neubert, R.H.H., *LC-MS determination of desmopressin acetate in human skin samples*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2004. 35(4): 921-927.

229. Polnok, A., Verhoef, J.C., Borchard, G., Sarisuta, N., and Junginger, H.E., *In vitro evaluation of intestinal absorption of desmopressin using drug-delivery systems based on superporous hydrogels*. International Journal of Pharmaceutics, 2004. 269(2): 303-310.
230. Diaz Del Consuelo, I., Falson, F., Guy, R.H., and Jacques, Y., *Transport of fentanyl through pig buccal and esophageal epithelia in vitro. Influence of concentration and vehicle pH*. Pharmaceutical Research, 2005. 22(9): 1525-1529.
231. Squier, C.A. and Kremer, M.J., *Biology of oral mucosa and esophagus*. Journal of the National Cancer Institute. Monographs, 2001(29): 7-15.
232. Lundin, S., Pantzar, N., Broeders, A., Ohlin, M., and Westrom, B.R., *Differences in transport rate of oxytocin and vasopressin analogues across proximal and distal isolated segments of the small intestine of the rat*. Pharmaceutical Research, 1991. 8(10): 1274-1280.
233. Ungell, A.L., Andreasson, A., Lundin, K., and Utter, L., *Effects of enzymatic inhibition and increased paracellular shunting on transport of vasopressin analogues in the rat*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1992. 81(7): 640-645.
234. Food and Drug Administration (FDA), *Dissolution testing and specification criteria for immediate-release solid oral dosage forms containing biopharmaceutics classification system class 1 and 3 drugs* 2015.
235. Starokadomskyy, P.L. and Dubey, I.Y., *New absorption promoter for the buccal delivery: Preparation and characterization of lysalbinic acid*. International Journal of Pharmaceutics, 2006. 308(1-2): 149-154.
236. Langoth, N., Bernkop-Schnürch, A., and Kurka, P., *In vitro evaluation of various buccal permeation enhancing systems for PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide)*. Pharmaceutical Research, 2005. 22(12): 2045-2050.
237. Caon, T., Jin, L., Simões, C.M.O., Norton, R.S., and Nicolazzo, J.A., *Enhancing the buccal mucosal delivery of peptide and protein therapeutics*. Pharmaceutical Research, 2015. 32(1): 1-21.
238. Shojaei, A., Khan, M., Lim, G., and Khosravan, R., *Transbuccal permeation of a nucleoside analog, dideoxycytidine: Effects of menthol as a permeation enhancer*. International Journal of Pharmaceutics, 1999. 192(2): 139-146.
239. Center for Drug Evaluation and Research, *Reviewer Guidance. Validation of chromatographic methods*. 1994.
240. International Council for Harmonisation of Technical Requirements (ICH), *Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1)*. 2005.
241. Schenk, D. and Gassner, F., *Permeation cell for invitro determination of skin permeation of pharmaceutical drugs*. Patent: US 6294134 B1, 2001.

-
242. Pappenheimer, A.M., *Experimental studies upon lymphocytes : I. The reactions of lymphocytes under various experimental conditions.* The Journal of Experimental Medicine, 1917. 25(5): 633-650.

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Professor Dr. Jörg Breitzkreutz für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die Vergabe eines herausfordernden und aktuellen Promotionsthemas. Vielen Dank für die immerwährende Unterstützung, die vielen fachlichen und konstruktiven Diskussion sowie für die Ermöglichung der Teilnahme an zahlreichen Dienstreisen, Konferenzen und Fortbildungen. Nicht zuletzt möchte ich mich für das uneingeschränkte Vertrauen, das Sie mir auch in schwierigen Phasen meiner Promotionszeit entgegen gebracht haben, herzlich bedanken.

Bei Herrn Professor Dr. Dr. h.c. Peter Kleinebudde möchte mich herzlich für die Übernahme des Koreferats bedanken. Weiterhin vielen Dank für Ihr offenes Ohr sowie die ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft über fachliche aber auch weniger fachliche Themen innerhalb meiner Zeit am Institut.

Professor Dr. Miriam Pein-Hackelbusch stand mir vor allem zu Beginn meiner Promotion mit Rat und Tat zur Seite und hat mir durch ihre Hilfe den Einstieg in mein Promotionsthema erleichtert. Dafür möchte ich mich recht herzlich bedanken.

Prof. Dr. Thomas Kurz, Dr. Finn Hansen und Tanja Knaab danke ich für die angenehme Zusammenarbeit während meiner Promotion sowie die Synthese und Analyse der Modellpeptide. Vielen Dank an Tanja Knaab, die mir mit ihren zahlreichen chemischen Ratschläge geholfen hat, spezifische Fragestellungen meines Promotionsthemas zu bearbeiten.

Für die stete Ansprechbarkeit und Diskussionsbereitschaft innerhalb der Fokusgruppen und zahlreicher anderer Gelegenheiten danke ich Dr. Klaus Knop und Prof. Dr. Markus Thommes.

Ein großer Dank geht an die tesa Labtec GmbH für die Ermöglichung der Durchführung von *ex-vivo*-Permeationsuntersuchungen. Insbesondere möchte ich mich bei Sebastian Kerski, Gabriele Stodt und Dr. Armin Breitenbach für die theoretische und vor allem für die praktische Unterstützung innerhalb der Permeationsmessungen bedanken.

Der Firma ProSense, insbesondere Herrn Uwe Hess, danke ich für die Bereitstellung eines automatisierten Probenzugs zur Untersuchung der *ex-vivo*-Permeation.

Annemarie Schmitz danke ich für die Ratschläge rund um das Thema HPLC-Trouble-Shooting sowie die daraus meist resultierenden Bestellungen diverser Ersatzmaterialien. Bei Karin Mathée möchte ich mich für die Durchführung der Karl-Fischer-Messungen bedanken. Danke auch an Stefan Stich für die Unterstützung in technischen Fragen.

Den Studierenden Mariam Maasfeld und Nebahat Demirel danke ich für die unterstützenden Untersuchungen im Rahmen ihres Wahlpflichtpraktikums zur Methodenentwicklung der Mukoadhäsionsmessung. Angelika Pastuschka und Felix Frenken danke ich für die Durchführung einiger Freisetzungsuntersuchungen sowie Jhinuk Rahman für die Vorbereitung der Einlagerungsstudie der Filme.

Alle Institutsmitglieder haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Danke für die kollegiale und angenehme Arbeitsatmosphäre, die unvergesslichen Erlebnisse auf zahlreichen Kongressreisen und die vielen privaten Aktivitäten, durch die mir meine Promotionszeit immer in schöner Erinnerung bleiben wird. Der Mädelsgruppe danke ich für die erheiternden Stunden und die gewachsenen Freundschaften, die noch weit über die Promotionszeit hinausgehen werden.

Robin Meier, Isabell Speer, Shirin Barimani, Isabell Immohr, Carmen Stomberg, Miriam Pein-Hackelbusch, Tanja Knaab und Tim Meier danke ich für die Korrekturen und hilfreichen Anmerkungen beim Lesen der Manuskriptteile. Danke auch an meine lieben Bürokolleginnen Caro und Alessia, die mir während meiner Schreibphase jeden Wunsch von den Lippen abgelesen haben.

Bei Robins und meiner wundervollen Familie möchte ich mich für die Unterstützung bedanken. Insbesondere bei meinen Eltern und meiner Schwester möchte ich mich von ganzen Herzen dafür bedanken, dass sie in jeder Lebenslage für mich da waren und für die Sicherheit, dass sie es auch immer sein werden. Danke, dass sie trotz der Entfernung stets so nah bei mir waren und mich innerhalb der letzten Jahre so liebevoll unterstützt haben.

Schließlich gilt mein größter Dank Robin. Selbst an den schwierigsten Tagen innerhalb der letzten Jahre ist es ihm stets gelungen, mich mit seiner liebevollen, humorvollen, ehrlichen und (wahrscheinlich auch vor allem) mit seiner leicht verrückten Art zu motivieren und aufzubauen. Danke für die grenzenlose und bedingungslose Unterstützung, die Tränen, die Du getrocknet hast und das Lächeln, das Du hinterlassen hast.