

# **Aerosolerzeugung mittels Mikropumpentechnologie**

Aufkonzentrierung von Nanopartikelsuspensionen und  
Einfluss von Additiven auf Aerosolparameter

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von  
Gotthardt, Marie-Christine, geb. Knüdeler  
aus Langenfeld

Gießen, 2015

Aus dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg

Standort Gießen

Medizinische Klinik und Poliklinik II

Prof. Dr. Werner Seeger

Gutachter: Prof. Dr. W. Seeger

Gutachter: Prof. Dr. Eikmann

Tag der Disputation: 22.06.2015

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>1 Einführung .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Aerosoltherapie.....	1
1.1.2 Anatomie der Lunge und Deposition von Aerosolpartikeln .....	1
1.1.3 Aerosolerzeugungstechnologie.....	4
<b>2 Kapitel 1: Verneblung von kolloidalen Nanosuspensionen für die Aerosoltherapie.....</b>	<b>8</b>
2.1 Literaturübersicht.....	9
2.2 Material und Methoden .....	12
2.2.1 Verneblungsversuche und Aerosolcharakterisierung .....	14
2.2.2 Quantifizierung der Konzentration der CF-Lösung während der Verneblung .....	16
2.2.3 Herstellung und Analyse der NP-Suspensionen .....	17
2.2.4 Quantifizierung der Nanopartikelkonzentration während der Verneblung .....	18
2.2.5 Statistische Untersuchungen.....	19
2.3 Ergebnisse.....	20
2.3.1 Verneblung von isotoner Kochsalzlösung.....	20
2.3.2 Einfluss der Verneblung auf die Konzentration der CF-Lösung .....	21
2.3.3 Charakterisierung und Verneblung der Nanopartikelsuspensionen.....	22
2.3.4 Einfluss der Verneblung auf die Konzentration der Nanopartikelsuspensionen .....	28
2.4 Diskussion .....	30
<b>3 Kapitel 2 : Einfluss von Additiven auf die Verneblung mit Mikropumpenverneblern.....</b>	<b>34</b>
3.1 Literaturübersicht.....	35
3.2 Material und Methoden .....	37
3.2.1 Mikropumpenvernebler .....	37
3.2.2 Herstellung und physikochemische Charakterisierung der Lösungen.....	40
3.2.3 Statistische Untersuchungen.....	43
3.3 Ergebnisse.....	44
3.3.1 Charakterisierung der Vernebler mit isotoner Kochsalzlösung.....	44

---

3.3.2	Effekt der Elektrolytkonzentration auf die Aerosolpartikelgrößen .....	44
3.3.3	Effekt von Oberflächenspannung auf Aerosolpartikelgrößen .....	46
3.3.4	Effekt der Viskosität auf die Aerosolpartikeldurchmesser .....	50
3.4	Diskussion .....	51
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>55</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>58</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>59</b>
	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>60</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>61</b>
	<b>Publikationsverzeichnis.....</b>	<b>68</b>
	<b>Erklärung zur Dissertation .....</b>	<b>69</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>70</b>

# 1 Einführung

## 1.1.1 Aerosoltherapie

Die Lunge eignet sich hervorragend als Zielort für die Applikation von Medikamenten mit lokaler oder auch systemischer Wirkung (Groneberg et al. 2003). Bei Erkrankungen des Respirationstraktes erfolgt so die Applikation lokal am betroffenen Organ, wodurch ein schnellerer Wirkungseintritt erzielt sowie hohe systemische Dosen und damit verbundene Nebenwirkungen reduziert werden können (Newman und Clarke 1983; Patton et al. 2004). Im Hinblick auf die systemische Wirkung bietet sich eine Möglichkeit, den First-Pass-Metabolismus zu umgehen, ohne auf invasivere Methoden wie die parenterale Verabreichung zurückgreifen zu müssen. Weitere Vorteile ergeben sich aus der höheren Membranpermeabilität der Lunge (Patton und Byron 2007; Schanker 1978) und der vergleichsweise geringen enzymatischen Aktivität (Im Keith et al. 1987; Ji et al. 1995; Tronde et al. 2003). Zur pulmonalen Verabreichung von Medikamenten eignet sich besonders deren Inhalation als Aerosol. Dafür stellt die Morphologie der Lunge mit ihrem weit verzweigten, englumigen Bronchialsystem, der sehr großen Oberfläche und ihren physiologischen Selbstreinigungs- und Barrieremechanismen gleichzeitig Herausforderung und Chance dar. Beispiele für Inhalationstherapeutika sind  $\beta_2$ -Sympathomimetika, Anticholinergika und Kortikosteroide bei Asthma bronchiale und der chronisch obstruktiven Lungenkrankheit (Buhl et al. 2006; Vogelmeier et al. 2007), oder Iloprost und Treprostinil für die Therapie der pulmonalen Hypertonie (Olschewski et al. 2002; Gessler et al. 2002; Galie et al. 2009).

## 1.1.2 Anatomie der Lunge und Deposition von Aerosolpartikeln

Der menschliche Atemapparat gliedert sich anatomisch in obere und untere Atmungsorgane. Die oberen Luftwege werden von Mund- und Nasenhöhle, Pharynx und Larynx gebildet, die unteren Atemwege setzen sich aus Trachea, Bronchien, Bronchiolen und Alveolen zusammen. Funktionell wird der Atemapparat in zwei Abschnitte gegliedert, den luftleitenden und den respiratorischen Abschnitt. Die oberen Atemwege, Trachea, Bronchi lobares und segmentales und die Bronchioli terminales dienen der Luftleitung, die Bronchioli respiratorii, die Ductus alveolares und die Alveolen dem Gasaustausch

(Schiebler 2005). Histologisch zeigt sich die Grenze zwischen luftleitendem und respiratorischem Abschnitt an der Veränderung des respiratorischen Schleimhautepithels, welches von kinozilienbesetztem, mehrreihigen Flimmerepithel in kubisches, kinozilienfreies Epithel übergeht (Gratzl 2005).

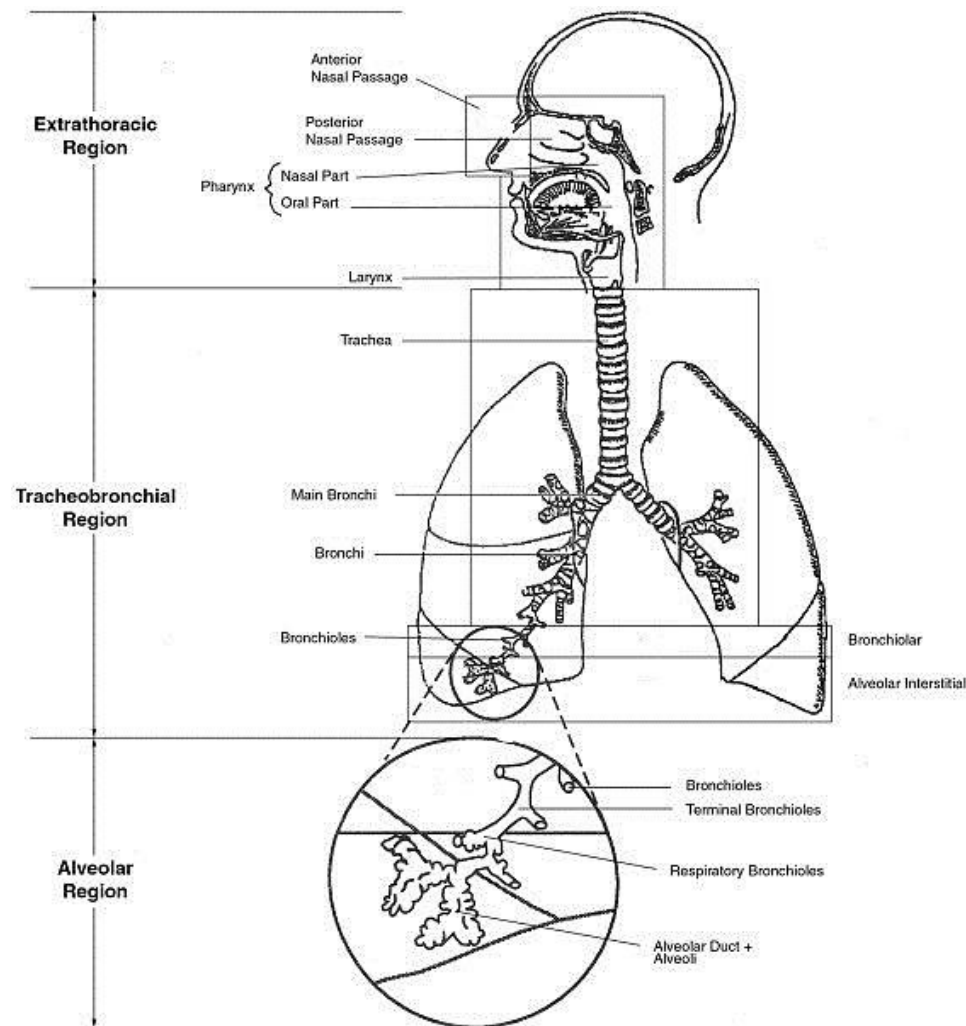


Abb. 1: Schematische Darstellung der anatomischen Verhältnisse im menschlichen Respirationstrakt, mod. nach Hofmann, 2011.

Die Kinozilien des Flimmerepithels transportieren Fremdpartikel in einem von den Drüsen- und Becherzellen des Epithels sezernierten Schleim in Richtung des Kehlkopfes und dienen so der Selbstreinigung (Rohen und Lütjen-Drecoll 2001). Der alveoläre Gasaustausch erfolgt über die nur etwa 0,1-1  $\mu\text{m}$  dicke Blut-Luft-Schranke. Diese wird aus Typ I-Pneumozyten, Kapillarendothelzellen, gemeinsamer Basallamina und dem Surfactant der Typ-II-Pneumozyten gebildet (Gratzl 2005). Bei Abnahme des Quer-

schnittes in den einzelnen Verzweigungsästen des Bronchialsystems und gleichzeitiger Zunahme des Gesamtquerschnittes verfügt die Lunge insgesamt über eine innere Oberfläche von bis zu 140 m<sup>2</sup> (Schiebler 2005).

Die Deposition von Aerosolpartikeln in der Lunge wird zusätzlich zu den anatomischen und physiologischen Gegebenheiten besonders von folgenden Faktoren bestimmt: Den physikochemischen Eigenschaften der Aerosolpartikel, der Inhalationsgeschwindigkeit und der Dauer des Atemzyklus. Diese Faktoren bedingen den Depositionsmechanismus; wobei man Diffusion, Sedimentation und Impaktion unterscheidet (Scheuch 1998; Stuart 1984; Voshaar et al. 2001). Um das aerodynamische Verhalten von Partikeln im Respirationstrakt unabhängig von Form, Größe oder Dichte vergleichen zu können, verwendet man als Bezugsgröße den MMAD (*mass median aerodynamic diameter*). Er ist definiert als der Durchmesser einer Kugel mit der Dichte 1 g/cm<sup>3</sup>, die in Luft die gleiche Sedimentationsgeschwindigkeit aufweist wie das betrachtete Teilchen (O'Callaghan und Barry 1997). Partikel mit einem Durchmesser von < 0,1 µm werden vor allem über Diffusion abgeschieden (Heyder 2004). Durch Brown'sche Molekularbewegungen kollidieren sie mit den Gasmolekülen, bis sie Kontakt zur Oberfläche der Atemwegswand erlangen. Mit sinkendem Partikeldurchmesser beschleunigt sich die Diffusion und es werden mehr Partikel deponiert. Aerosolpartikel größeren Durchmessers von etwa 0,5 bis 5 µm sedimentieren im Atemtrakt, d.h. sie fallen aufgrund der Gravitationskraft bis sie eine Atemwegswand erreichen (Voshaar et al. 2001). Die Deposition durch Diffusion und Sedimentation ist abhängig von der Strömungsgeschwindigkeit und der Aufenthaltsdauer des Aerosols in den Atemwegsabschnitten und steigt daher bei langsamerer Inhalationsgeschwindigkeit, längeren Atemzyklen und Atempausen (Voshaar et al. 2001). Bevorzugte Lokalisation der Deposition durch Diffusion und Sedimentation ist die Atemwegsperipherie, da hier der Abstand zwischen den Atemwegswänden gering und die Strömungsgeschwindigkeit langsamer ist (Scheuch 1998). Partikel mit MMAD zwischen 2 und 20 µm (Stuart 1984) deponieren bei schneller Inhalationsgeschwindigkeit über Massenträgheitsabscheidung (Impaktion) meist bereits im Oropharynx. Bei sehr langsamer Inhalation ist aber auch bei großem MMAD eine Deposition in tieferen Lungenabschnitten möglich (Zeman et al. 2010). Da die Inspirationsluft im Respirationstrakt wasserdampfgesättigt wird, nehmen hydrophile Partikel Wasser auf (Hygroskopizität), wodurch sich ihre Depositionswahrscheinlichkeit verän-

dert (Heyder 2004). Außerdem erhöht sich die Depositionswahrscheinlichkeit von Aerosolpartikeln, die eine Ladung tragen (Melandri 1983).

### 1.1.3 Aerosolerzeugungstechnologie

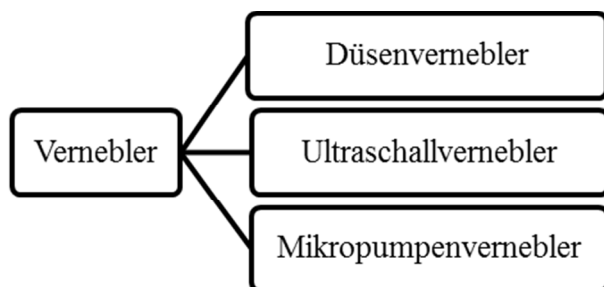
Es werden drei Systeme zur Aerosolerzeugung unterschieden: treibgasbetriebene Dosieraerosole (pMDI = *pressurized metered dose inhalers*), Trockenzerstäubung von Pulver (DPI = *dry powder inhalers*) und Flüssigkeitsverneblung (Gebhart 1997). Jedes System hat in Bezug auf Entität und Schwere der zu behandelnden Erkrankung, Alter und Fähigkeiten des Patienten, Einfachheit der Handhabung, sowie die Verfügbarkeit von geeigneten Medikamentenformulierungen Vor- und Nachteile (Dolovich et al. 2005). In der Therapie des Asthma bronchiale und der COPD werden weltweit am häufigsten treibgasenthaltende pMDIs verwendet (Dolovich und Dhand 2010). Bei pMDIs fällt vielen Patienten die Koordination von Auslösung des Aerosolstoßes und Inhalation schwer (Rau 2006; Melani et al. 2004). Einen weiteren Nachteil stellt die hohe oropharyngeale Aerosoldeposition aufgrund der großen Geschwindigkeit des emittierten Aerosols dar (Labiris und Dolovich 2003; Dolovich und Dhand 2010; Voshaar et al. 2005). Dieses Problem kann jedoch teilweise durch Verwendung von Zwischenstücken (*spacer*), Rückhaltekamern und Gesichtsmasken kompensiert werden (Newman et al. 1984; Rubin und Fink 2005).

DPIs erfordern keine Koordination der Einatmung, da die Dispersion des Pulvers durch den Inspirationsfluss des Patienten getriggert wird (Gebhart 1997). Auch wenn ein höherer Inspirationsfluss generell einen größeren Anteil an respirablen Aerosolpartikeln bereitstellt, führt dies gleichzeitig durch die hohe Geschwindigkeit der Partikel zur verstärkten oralen Deposition (Voshaar et al. 2005). Die Wirksamkeit ist aber auch unter Bedingungen mit eventuell verringertem Inspirationsfluss wie bei der akuten Exazerbation der COPD gegeben (Selroos et al. 2009). In das Pulverreservoir eindringende Feuchtigkeit führt zur Aggregation des Pulvers und reduzierter alveolarer Deposition und sollte daher vermieden werden (Maggi et al. 1999).

Flüssigkeitsvernebler zeichnen sich besonders durch ihre einfache Anwendung aus. Sie erfordern keine Koordination der Atmung oder bestimmte Atemtechniken und sich daher auch für die Behandlung von kleineren Kindern oder Patienten mit eingeschränkter



Koordinationsfähigkeit (Voshaar et al. 2001; Dolovich et al. 2005). Sie werden wie folgt unterteilt:



Bei Düsenverneblern wie dem PARI LC SPRINT® STAR wird durch einen Kompressor Druckluft erzeugt, die durch eine enge Düse beschleunigt und durch das Verneblerreservoir geleitet wird. Das Aerosol wird dabei durch den Bernoulli-Effekt erzeugt: An der Düsenöffnung entsteht ein Unterdruck, der die Flüssigkeit über eine Kapillare ansaugt und bei ausreichender Beschleunigung der Druckluft in Aerosoltropfen zerstäubt. Die größeren Aerosoltropfen werden von einer Prallplatte im Vernebler zurückgehalten (Gebhart 1997; Watts et al. 2008). Durch konstante Aerosolproduktion während des Atemzyklus kommt es zu einem Aerosolverlust während der Expiration. Inspiratorisch gerichtete Klappen, Verstärkung der Aerosolproduktion durch den Inspirationsfluss und atemsynchrone Verneblung sind Optionen den entstehenden Verlust zu begrenzen (O'Callaghan und Barry 1997; Nikander et al. 2000; Rau et al. 2004). Bei der Düsenverneblung verlässt während des Verneblungsvorgangs ein Teil der Flüssigkeit durch Verdunstung das Reservoir. Dies führt zu einem Konzentrationsanstieg des Wirkstoffs in der Verneblungsflüssigkeit (O'Callaghan und Barry 1997; McCallion et al. 1996c). Die Verdunstung induziert einen Abfall der Temperatur im Reservoir und die Massenausstoßrate des Verneblers nimmt ab (Clay et al. 1983). Diese Vorgänge beeinträchtigen eine zuverlässige und standardisierte Dosierung. Abgesehen davon können sich die relativ lange Verneblungszeit von mehreren Minuten und die etwas unhandlichen und weniger transportablen Geräte negativ auf die *Compliance* der Patienten auswirken (Labiris und Dolovich 2003).

Ultraschallvernebler versetzen die Flüssigkeit im Reservoir mit Hilfe eines piezoelektrischen Kristalls in Schwingung (Taylor und McCallion 1997). Dies geschieht entweder durch direkten Kontakt des Piezoelements zur Verneblungsflüssigkeit oder über ein Zwischenmedium (Voshaar et al. 2001). Bei ausreichend hoher Schwingungsfrequenz bilden sich Wellen an der Flüssigkeitsoberfläche, von deren Spitze sich Aerosoltropfen

ablösen (Taylor und McCallion 1997). Der mittlere Partikeldurchmesser ist dabei von der Schwingungsfrequenz und von den physikochemischen Eigenschaften der Verneblungsflüssigkeit abhängig (Dennis und Hendrick 1992; Taylor und McCallion 1997). Über das Ausmaß an Verdunstung sowie einen Konzentrationsanstieg des Wirkstoffs in der Verneblungsflüssigkeit wie bei den Düsenverneblern bestehen unterschiedliche Ansichten (Niven et al. 1995; Phipps und Gonda 1990; Dennis et al. 1990; Steckel 2003), jedoch kommt es immer zu einem deutlichen Temperaturanstieg während des Verneblungsvorgangs (Taylor und McCallion 1997; Steckel 2003). Dieser Temperaturanstieg kann neben einer möglichen Denaturierung von Proteinen und Peptiden auch durch die Änderung der physikochemischen Eigenschaften der Verneblungsflüssigkeit Einfluss auf Aerosolcharakteristika und die Massenausstoßrate haben (Niven et al. 1995; Steckel 2003; Beck-Broichsitter et al. 2012b).

Neuere technische Entwicklungen fokussieren auf Effizienzsteigerung der Aerosolerzeugung. Ziel ist die Erzeugung eines Aerosols mit Partikelgrößen zur Deposition auch in peripheren Lungenabschnitten, bei möglichst geringer Therapiedauer und unter Beibehaltung der Transportierbarkeit und der einfachen Handhabung (Dolovich und Dhand 2010). Eine neue Technologie ist die der Mikropumpenverneblung. Abbildung 2 zeigt die schematische Darstellung des Aufbaus und der Aerosolerzeugung anhand des Mikropumpenverneblers Aeroneb<sup>®</sup> Pro.

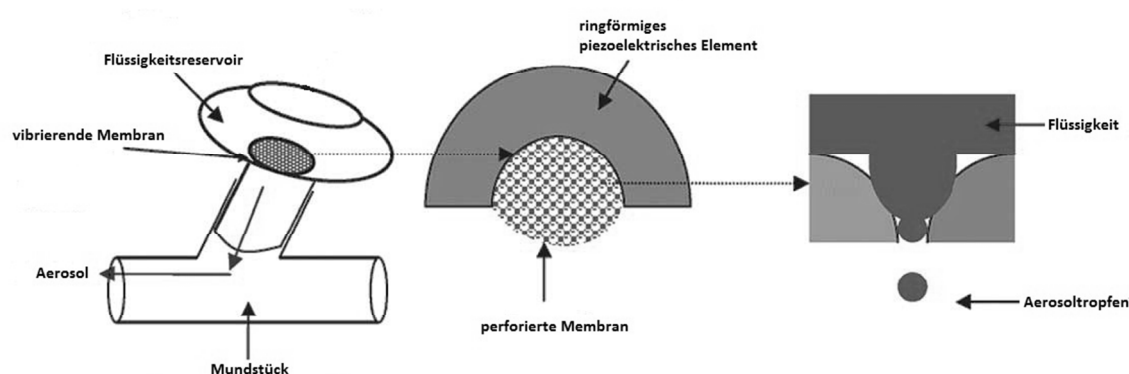


Abb. 2: Darstellung des Mikropumpenverneblers Aeroneb<sup>®</sup> Pro, Abbildung modifiziert nach Ghazanfari et al. 2007

Hierbei wird Aerosol durch eine perforierte vibrierende Membran erzeugt, die von einem ringförmigen piezoelektrischen Element umgeben ist (Dhand 2002; Knoch und

Keller 2005). Dieses Element kontrahiert und expandiert sich und versetzt damit die Membran in eine Auf- und Abwärtsbewegung um einige Mikrometer (Dhand 2002). In der Membran befinden sich bis zu mehrere tausend konisch geformte Poren mit einem Durchmesser von etwa 2  $\mu\text{m}$  (Knoch und Keller 2005). Die Flüssigkeit im Verneblerreservoir wird bei Schwingung der Membran in die Poren gepumpt und in Form von Aerosoltropfen ausgestoßen (Maehara et al. 1986). Die Membran kann entweder in direktem Kontakt zum vibrierenden Element stehen und als aktive Mikropumpe funktionieren, wie bei z.B. dem Aeroneb<sup>®</sup> Pro oder dem eFlow<sup>®</sup> rapid, oder die Vibrationen des Piezoelements werden über ein Zwischenelement (*Transducer Horn*) fortgeleitet, welches die Schwingungen auf die Flüssigkeit überträgt und durch die Poren der Membran presst, wie bei dem Omron NE-U22V<sup>®</sup> Micro-Air (Dhand 2002; Waldrep und Dhand 2008; Lass et al. 2006). Letzteres bezeichnet die Technologie der passiven Mikropumpe. Die Mikropumpentechnologie bietet gegenüber den konventionellen Verneblern einige Vorteile. Der schonende Verneblungsvorgang ohne vergleichbare Verdunstungseffekte oder Temperaturanstiege ermöglicht die Verneblung von empfindlicheren Formulierungen (Watts et al. 2008; Arzhavitina und Steckel 2010). Des Weiteren wird die Effizienz der Aerosolproduktion gesteigert und Medikamentenverluste reduziert, da auch kleinste Füllungsvolumina vernebelbar sind und fast kein Residualvolumen zurückbleibt (Pitance et al. 2010; Coates et al. 2011). Dies kann weiterhin gesteigert werden durch die Kombination der Mikropumpentechnologie mit einem System, welches das Atemmuster des Patienten analysiert und die Aerosolverabreichung nur während der frühen Phase der Inspiration steuert, die sog. *Adaptive-Aerosol-Delivery* (AAD<sup>®</sup>). Sensoren ermitteln über Druckschwankungen im Luftfluss die Phase des Atemzyklus und koordinieren die Aerosolabgabe (Denyer et al. 2004; Denyer und Dyche 2010). Die Lebensdauer der Vernebler ist jedoch durch die Neigung der Membranporen zur Verstopfung, besonders bei der Verneblung visköser Flüssigkeiten, und die teilweise schwierige Reinigung begrenzt (Zhang et al. 2007; Dhand 2002; Waldrep und Dhand 2008).

## **2 Kapitel 1: Verneblung von kolloidalen Nanosuspensionen für die Aerosoltherapie**

Für einen Teil der Ergebnisse dieser Arbeit erfolgte bereits die Veröffentlichung in *Pharmaceutical Research*, 2013 Jan; 30 (1):16-24.

## 2.1 Literaturübersicht

Zur weiteren Optimierung der Aerosoltherapie bedarf es der Beseitigung von gegenwärtig bestehenden Defiziten wie der relativ kurzen Wirkdauer und der nicht selektiven regionalen Verteilung inhalierter Wirkstoffe (Gessler, 2009). Die schnelle *Clearance* und die geringe Halbwertszeit vieler Wirkstoffe erfordern eine hohe Frequenz von Inhalationen pro Tag. Am Beispiel von Iloprost wurde gezeigt, dass bis zu neun tägliche Inhalationen nötig sind (Gessler et al. 2008). Durch die Verwendung von *Controlled-Release*-Formulierungen wie Liposomen, polymeren Mikro- oder Nanopartikeln kann die Häufigkeit der Dosierungen reduziert und eine langandauernde Wirkung erzielt werden (Sung et al. 2007; Rytting et al. 2008; Rogueda und Traini 2007; Rytting et al. 2010). Dies führt zu einer besseren *Compliance* der Patienten und begünstigt daher den Therapieerfolg (Richter et al. 2003).

Als Nanopartikel werden feste, kolloidale Partikel mit einem Durchmesser zwischen 10 und 1000 nm bezeichnet (Sung et al. 2007). Obwohl sich eine engere physikalische Definition der Nanotechnologie nur auf Größenordnungen von max. 100 nm bezieht, verfügen auch Partikel von einigen Hundert Nanometern über biochemische Besonderheiten (Wagner et al. 2006; Farokhzad und Langer 2009). Partikel dieser Größenordnung unterscheiden sich in ihren physikochemischen Eigenschaften deutlich von ihren Ausgangsmaterialien, da das Verhältnis von Oberfläche zu Masse bei Abnahme des einzelnen Partikeldurchmessers ansteigt (Pison et al. 2006). Daher befinden sich eine höhere Anzahl an Molekülen, und damit der reaktiven Gruppen, auf der Oberfläche und können mit der Umwelt interagieren (Yang et al. 2008; Zhang et al. 2010). Nanopartikel können als Trägersubstanz für Wirkstoffe verwendet werden indem man den Wirkstoff in der Nanopartikelmatrix löst, verkapselt, oder kovalent bindet (Soppimath et al. 2001; Sung et al. 2007). Um die Toxizität inhalierter Nanopartikel zu reduzieren eignen sich biodegradierbare Polymere als Matrix für die Integration von Wirkstoffen (Azarmi et al. 2008). Biodegradierbare Polymere von Typ PLA (*polylactide*) und PLGA (*d,l-lactide-co-glycolide*) werden im Körper zu Milch- und Glycolsäure hydrolysiert und über den Zitratzyklus metabolisiert (Panyam und Labhasetwar 2003). Sie zeigen im Vergleich mit nicht-biodegradierbaren Polymeren ein geringeres inflammatorisches Potential (Dailey et al. 2006) und beeinträchtigen nicht die Stabilität des Surfactants (Stuart et al. 2006; Beck-Broichsitter et al. 2011a). Natürliche und synthetische Polymere unterscheiden sich dabei in ihrer Degradationsrate, die bei den synthetischen Polymeren we-

sentlich langsamer ausfällt (Rytting et al. 2008). Die Zusammensetzung der Polymere kann chemisch und physikalisch modifiziert werden um die Verweildauer der Partikel am Absorptionsort zu verlängern, den Transport über biologische Barrieren zu erleichtern, und die *Clearance* zu beeinflussen (Avgoustakis 2004; Rytting et al. 2008). So kann durch Modifizierung von Größe, Form und Oberflächeneigenschaften die mukoziliäre *Clearance* wie auch die *Clearance* durch Makrophagen verlangsamt werden (Zhang et al. 2010). Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit der zielgerichteten, selektiven Verabreichung von Wirkstoffen nur an bestimmte Gewebe und Zellen, das *Drug Targeting*. Die Partikelaufnahme in die Zielzelle kann dabei durch optimale Adaptation der physikochemischen Eigenschaften oder Vermittlung durch Liganden und Antikörper erzielt werden (Gill et al. 2007; Yokoyama 2005). Bisher ist die zielgerichtete Deposition von Wirkstoffen in der Lunge durch die Inhalation nur schwer zu erreichen (Labiris und Dolovich 2003). Als Ziel kämen beispielsweise Endothelzellen oder Zellen der glatten Muskulatur der Blutgefäße bei der pulmonalen Hypertonie in Frage (Beck-Broichsitter et al. 2011b). Eine wichtige Rolle spielt das *Targeting* von Nanopartikeln auch in der Therapie von Tumorerkrankungen der Lunge, um die hochtoxische Wirkung von Chemotherapeutika auf die Tumorzellen zu beschränken (Brannon-Peppas und Blanchette 2004; Peer et al. 2007).

Einige Beispiele von Wirkstoffen, die momentan für die inhalative, Nanopartikelbasierte Applikation untersucht werden, sind (Mansour et al. 2009; Zhang et al. 2010):

<b>Indikation</b>	<b>Wirkstoff</b>
Asthma bronchiale	Budesonid, Salbutamol, Pranlukast
Infektionen	Rifampicin, Isoniazid, Itraconazol
Neoplasien	Doxorubicin, p53-Gen
Diabetes mellitus	Insulin

Die Deposition einzelner, freier Nanopartikel im Respirationstrakt ist limitiert, da sie aufgrund des geringen Durchmessers größtenteils wieder ausgeatmet werden (Heyder et al. 1986). Es bedarf demnach der Kombination einer geeigneten Nanopartikel Formulierung mit der passenden Aerosolerzeugungstechnologie, um für die tiefe Deposition optimale Aerosolpartikel mit einem MMAD von ca. 1- 5  $\mu\text{m}$  bereitzustellen (Beck-

Broichsitter et al. 2011b). Bewährte Methoden dafür sind die Zerstäubung eines als Trägermatrix für die Nanopartikel dienenden Trockenpulvers, sowie die Verneblung von Nanopartikelsuspensionen (Azarmi et al. 2008). Nanopartikelsuspensionen haben dabei den Vorteil, dass Aerosolpartikel mit geeignetem MMAD unabhängig von den aerodynamischen Eigenschaften der suspendierten Nanopartikel erzeugt werden können (Beck-Broichsitter et al. 2011b). Die erfolgreiche Integration der Nanopartikel in respirable Aerosoltröpfchen wird durch die geringe Größe der Nanopartikel begünstigt (Dailey et al. 2003). Zudem beeinflussen Konzentration und Eigenschaften der Partikel die physikochemischen Eigenschaften der Suspension, und damit auch die Aerosolgenerierung (Dailey et al. 2003; McCallion et al. 1995). Unabhängig davon wirkt sich die Aerosolzeugungstechnologie auf die Neigung der Nanopartikel zur Aggregation aus. Dailey et al. zeigten, dass bei der Verneblung von biodegradierbaren polymeren Nanopartikeln eine Aggregation besonders bei der Verneblung mit einem Düsenvernebler stattfand. Dies wurde teilweise auf die starke Konzentrationszunahme in Düsenverneblern durch die Verdunstung von Flüssigkeit während des Verneblungsvorgangs zurückgeführt (Dennis et al. 1990; O'Callaghan und Barry 1997; Steckel 2003).

Um von den Vorteilen von Therapeutika auf Nanopartikel-Basis in der Inhalationstherapie profitieren zu können, bedarf es demnach einer geeigneten Aerosolzeugungstechnologie. Zielsetzung dieser Arbeit war es, die Eignung von Düsen- und Mikropumpenverneblern hinsichtlich der Verneblung von Nanopartikelsuspensionen zu untersuchen. Dazu wurden Massenausstoß- und Aerosolcharakteristika, die Stabilität der Nanosuspensionen und die relative Konzentrationszunahme an Nanopartikeln in Suspension während des Verneblungsvorgangs mit einem Düsenvernebler und zwei Mikropumpenverneblern quantifiziert.

## 2.2 Material und Methoden

Substanzliste:

<b>Chemikalie</b>	<b>Herkunft</b>
Destilliertes Wasser (Aq. dest.)	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Aceton (99,5%) p.a.	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
5(6)-Carboxyfluorescein (CF) (95%)	Fluka, Buchs, Schweiz
Coumarin 6 (95%)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO) (99,9%) p.a.	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl) (0,9%)	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Poly(lactide-co-glykolide) (PLGA) Resomer® RG 502 H	Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Deutschland
Pluronic® F68 (Poloxamer 188)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tetrahydrofuran (THF) (99,9%) p.a.	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland



Geräteliste:

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Aeroneb <sup>®</sup> Pro	Aerogen, Dangan, Galway, Irland
eFlow <sup>®</sup> rapid	Pari GmbH, Starnberg, Deutschland
Elektronenmikroskop	JEM-3010 TEM, JEOL, Eching, Deutschland
Fluoreszenzspektrophotometer	Fluorescence Plate Reader, FL600, Bio-Tek, Bad Friedrichshall, Deutschland; LS50B, Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim, Deutschland
Gefriertrockner	ALPHA 1-4LSC, Christ, Osterode, Deutschland
Laserdiffraktometer HELOS <sup>®</sup>	Sympatec, Clausthal-Zellerfeld, Deutschland
PARI LC SPRINT <sup>®</sup> STAR	Pari GmbH, Starnberg, Deutschland
Spektrophotometer Ultrospec <sup>®</sup> 3000	Pharmacia Biotech <sup>®</sup> , Freiburg, Deutschland
Ultraschallbad (Sonorex TK30)	Bandeln electronic, Berlin, Deutschland
Vortexer	Labdancer, VWR, Darmstadt, Deutschland
Waage	Mettler-Toledo GmbH, Giessen; BP 211 D, Sartorius, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge 5418	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zetasizer NanoZS/ZEN3600	Malvern Instruments, Herrenberg, Deutschland

## 2.2.1 Verneblungsversuche und Aerosolcharakterisierung

### *Vernebler*

Es wurden der Düsenvernebler PARI LC SPRINT® STAR (Pari GmbH, Starnberg, Deutschland) sowie die Mikropumpenvernebler Aeroneb® Pro (Aerogen, Dangan, Galway, Irland) und eFlow® rapid (Pari GmbH, Starnberg, Deutschland) verwendet.

### *Bestimmung der Aerosolcharakteristika mittels Laserdiffraktometrie*

Die Laserdiffraktometrie ist eine etablierte Methode zur Bestimmung von Aerosolcharakteristika (Clark 1995). Die Analyse der Größenverteilung von Aerosolpartikeln mittels Laserdiffraktometrie beruht auf dem Prinzip der Lichtbeugung: Die Lichtwellen werden durch ein im Laserstrahl befindliches Teilchen von ihrer Ausbreitungsrichtung abgelenkt. Die Größe des Winkels dieser Lichtbeugung ist dabei abhängig vom Durchmesser des Teilchens. Die Verteilung der Partikeldurchmesser wird daher anhand des in der Brennebene der Linse entstehenden Beugungsmusters berechnet. Es existieren dabei zwei Berechnungsmodelle: die Mie-Theorie, welche im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, und die Fraunhofer-Theorie. Die Fraunhofer-Theorie ist dabei nur für Partikeldurchmesser geeignet, welche die Wellenlänge des emittierten Lasers wesentlich übertreffen. Die Mie-Theorie ist auf sphärische Partikel auch im Submikronbereich anwendbar. Für den bei der Verwendung der Mie-Theorie erforderlichen Brechungsindex des Mediums wurde hier der von Wasser (1,33) eingesetzt.

Zur Charakterisierung des Aerosols wurden folgende Kurvenparameter der berechneten Verteilung herangezogen: der geometrische mediane Volumendurchmesser (*Volume Median Diameter*, VMD), die geometrische Standardabweichung (*Geometric Standard Deviation*, GSD), sowie die Feinpartikelfraktion (FPF). Aus dem geometrischen Volumendurchmesser ( $d_g$ ) kann der aerodynamische Durchmesser ( $d_a$ ) anhand folgender Gleichung berechnet werden (Beck-Broichsitter et al. 2012):

$$d_a = d_g \cdot (\rho_p / (\rho_w \cdot \chi))^{1/2}$$

mit  $\rho_p$  = Dichte des Partikels,  $\rho_w$  = Dichte von Wasser (1 g/cm<sup>3</sup>),  $\chi$  = dynamischer Formparameter (für sphärische Partikel  $\chi = 1$ ). In dieser Arbeit wird der Durchmesser

der erzeugten Aerosolpartikel als VMD angegeben, da Lösungen vernebelt werden, deren Dichte sich von Wasser unterscheidet.

Die geometrische Standardabweichung als Maß für die Breite der Partikelgrößenverteilung berechnete sich nach der folgenden Gleichung:

$$GSD = \sqrt{\frac{d_{84\%}}{d_{16\%}}}$$

Für  $d_n$  wurde hier der Wert des Partikeldurchmessers an der Perzentile  $n$  der Summenverteilung eingesetzt. Die Feinpartikelfraktion wurde definiert als der Anteil Partikel mit einem Durchmesser kleiner als  $5,25 \mu\text{m}$ .

Die Vernebler wurden in der Mitte zwischen Lichtquelle und Detektor positioniert. Die Aerosolaustrittsstelle befand sich im Abstand von ca.  $1,5 \text{ cm}$  (Aeroneb<sup>®</sup> Pro, PARI LC SPRINT<sup>®</sup> STAR) bzw.  $2,5 \text{ cm}$  (eFlow<sup>®</sup> rapid) zum Laserstrahl. Durch diese Anordnung befand sich der Laserstrahl während der Messung im Zentrum der Aerosolwolke. Ein im Abstand von ca.  $10 \text{ cm}$  hinter dem Laserstrahl platzierter Staubsauger entfernte das Aerosol aus dem Messbereich, um Mehrfachmessungen durch Verwirbelungen zu verhindern.

#### *Gravimetrische Messung des Massenausstoßes*

Die Ermittlung des Massenausstoßes erfolgte gravimetrisch. Die Vernebler wurden ungefüllt, vor der Verneblung mit gefülltem Reservoir und nach der Verneblung gewogen. Der Quotient aus Gewichts Differenz und Verneblungsdauer wurde als Massenausstoßrate ( $\text{g}/\text{min}$ ) definiert.

#### *Verneblung von isotoner Kochsalzlösung*

Zur Charakterisierung der Vernebler wurden  $6 \text{ ml NaCl } 0,9\%$  in das Reservoir der Vernebler pipettiert. Die Verneblung erfolgte beim PARI LC SPRINT<sup>®</sup> STAR - Düsenvernebler und beim Aeroneb<sup>®</sup> Pro über  $10 \text{ Minuten}$ , wobei die Aerosolcharakteristika zu Beginn der Verneblung, und jeweils nach  $120 \text{ s}$  gemessen wurden. Beim eFlow<sup>®</sup> rapid wurde aufgrund des hohen Massenausstoßes nur  $5 \text{ Minuten}$  vernebelt, die Messungen erfolgten hier jeweils nach  $60 \text{ s}$ . Für jede Messreihe wurden drei Wiederho-

lungen durchgeführt ( $n = 4$ ). Beim Düsenvernebler wurden die Aerosolcharakteristika sowie der Massenausstoß zusätzlich unter Hinzufügen von 5 l/min, 10 l/min und 20 l/min zusätzlichem Luftfluss ermittelt.

### 2.2.2 Quantifizierung der Konzentration der CF-Lösung während der Verneblung

Als Vergleich zur Aufkonzentrierung der Nanopartikelsuspensionen wurde die Konzentration einer Lösung von 2  $\mu\text{g/ml}$  5(6)-Carboxyfluorescein (95%) (CF) in NaCl 0,9% während der Verneblung verfolgt (Steckel 2003). Zur Herstellung der Lösung wurden ca. 5 mg CF eingewogen und in 5 ml PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) pH 7,4 gelöst. Aus dieser Stammlösung wurden 200  $\mu\text{l}$  in einen 100 ml-Messkolben überführt und mit NaCl 0,9% bis zur Eichmarke aufgefüllt. Für die Ermittlung des Wertes zum Zeitpunkt  $t = 0$  wurden direkt jeweils 100  $\mu\text{l}$  in drei Eppendorf-Cups pipettiert und mit je 900  $\mu\text{l}$  NaCl 0,9% auf eine Konzentration von 0,2  $\mu\text{g/ml}$  verdünnt.

Die Verneblung erfolgte unter folgenden Umgebungsbedingungen: Temperatur:  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , relative Luftfeuchtigkeit:  $60 \pm 10\%$ . Die Vernebler wurden mit 6 ml der CF-Lösung gefüllt. Nach 2, 4, 6, 8, 10 Minuten (Aeroneb<sup>®</sup> Pro, PARI LC SPRINT<sup>®</sup> STAR) bzw. 1, 2, 3, 4, 5 Minuten (eFlow<sup>®</sup> rapid) wurde die Verneblung gestoppt und drei homogene Proben von je 100  $\mu\text{l}$  aus dem Reservoir entnommen. Die Verdünnung erfolgte entsprechend der Probe des Anfangszeitpunktes. Alle Eppendorf-Cups wurden zur Sicherstellung eines homogenen Mischverhältnisses ca. 20 s geschüttelt. Zur Durchführung der Messung wurden 100  $\mu\text{l}$  jeder Probe sowie 100  $\mu\text{l}$  NaCl 0,9% als 0-Probe in drei benachbarte Vertiefungen (Wells) einer Mikrotiterplatte (Assay Plate 96 Well, Costar Corp., Cambridge, Massachusetts, USA) pipettiert und von einem Fluoreszenz-Reader vermessen. Die Messung wurde unter Verwendung eines Filterpaares der Wellenlänge  $\lambda_{\text{ex}}$ : 485/20 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ : 530/25 nm durchgeführt. Die Kalibrierung des Gerätes erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie die Probenmessung. Der gewählte Konzentrationsbereich lag zwischen 0,1  $\mu\text{g/ml}$  und 1  $\mu\text{g/ml}$  und deckte damit den Bereich der zu erwartenden Messwerte ab. Es wurden nur Kalibrierungsgeraden einer Linearität von mind.  $R^2 = 0,999$  akzeptiert. Die Ergebnisse wurden als relative Konzentrationsveränderung in Bezug auf den Zeitpunkt  $t = 0$  präsentiert.

### 2.2.3 Herstellung und Analyse der NP-Suspensionen

Die Nanopartikel wurden mittels eines Nanopräzipitationsverfahrens hergestellt (Beck-Broichsitter et al. 2010b). Diese Methode beruht auf der spontanen Bildung von kolloidalen Partikeln im Nanometerbereich beim Hinzufügen eines Polymers, welches in einem mit Wasser mischbaren, organischen Lösungsmittel gelöst ist, zu einer wässrigen Phase (Fessi et al. 1989; Vitale und Katz 2003; Vauthier und Bouchemal 2009).

Als Polymer wurde PLGA (Resomer® RG 502 H) verwendet. Das verwendete Lösungsmittel wurde je nach benötigter finaler Nanopartikelgröße- und Konzentration gewählt; Aceton für Nanopartikel einer Größe von 100 nm in der Konzentration von 1 oder 2 mg/ml, DMSO für 5 mg/ml, und Tetrahydrofuran für eine Größe von 200 nm in 2 mg/ml. Die Lösungen wurden mit einer Peristaltikpumpe (Fördermenge 10 ml/min.) einer Pluronic® F68 (0,1 %) enthaltenden wässrigen Phase zugeführt (Injektionsnadel: Fine-Ject® 0,6\*30 mm); unter Verwendung eines Magnetrührers (500 rpm). Danach wurde die resultierende kolloidale Lösung für weitere 10 Minuten gerührt und anschließend dialysiert (MWCA: 50,000 Da, Spectra/Por® 6, Breda, Netherlands) um das wassermischbare, organische Lösungsmittel sowie einen Überschuss an Pluronic® F68 zu beseitigen. Vor Verwendung wurde die Nanopartikelsuspension filtriert (1,2 µm) um vorhandene Aggregate zu entfernen. Für die Bestimmung der Konzentration an Nanopartikeln in Suspension wurden Proben des Dialysats gefriergetrocknet und anschließend gewogen.

#### *Charakterisierung der NP*

Der Partikeldurchmesser und die Größenverteilung wurden mit dynamischer Lichtstreuung (DLS), das  $\zeta$ -Potential mit Laser-Doppler-Anemometrie (LDA) ermittelt. Das Messverfahren der dynamischen Lichtstreuung beruht auf der Streuung von Laserlicht an Partikeln in Suspension. Durch die Brown'sche Molekularbewegung der suspendierten Partikel fluktuiert die Intensität des Streulichts. Da die Geschwindigkeit der Brown'schen Molekularbewegung abhängig von der Größe der Partikel ist, ermöglicht die Analyse der Intensitätsfluktuationen den Rückschluss auf die Durchmesser der suspendierten Partikel. Die Fluktuation von Streulichtintensität wird bei der LDA zur Ermittlung der Mobilität suspendierter Partikel im elektrischen Feld verwendet. An der

Oberfläche von suspendierten Partikeln bilden sich elektrochemische Doppelschichten, an deren Grenzflächen bei Scherspannung das  $\zeta$ - Potential entsteht. Durch das Ausmaß der Partikelmobilität bei Anlage von Wechselstrom kann auf das  $\zeta$ - Potential rückgeschlossen werden. Ein hohes  $\zeta$ - Potential wirkt der Partikelaggregation entgegen und ist daher ein Indikator für die Stabilität von kolloidalen Suspensionen. Die Transmissions-elektronenmikroskopie (TEM) diente der Darstellung der Nanopartikelmorphologie. Die Funktionsweise beruht auf der Erzeugung eines Elektronenstrahls, der durch die zu untersuchende Probe geleitet wird. Durch Erfassung der Durchdringung bzw. Streuung der Elektronen an der Probe wird eine vergrößerte Abbildung dieser generiert. Zur Probenherstellung wurden Tropfen der Nanopartikelsuspension auf ein kohlebeschichtetes Kupfernetz (S160-3, Plano, Wetzlar, Deutschland) gegeben und vakuumgetrocknet.

#### **2.2.4 Quantifizierung der Nanopartikelkonzentration während der Verneblung**

##### *Verneblung und Probenentnahme:*

Die Vernebler wurden mit jeweils 6 ml Nanopartikelsuspension gefüllt. Die Verneblung sowie die Probenentnahme erfolgten unter den gleichen Umgebungsbedingungen und entsprechend der Vorgehensweise bei der Referenzlösung. Während der zehninütigen Verneblung wurde die Aerosolanalyse mittels Laserdiffraction und die gravimetrische Bestimmung des Massenausstoßes durchgeführt. Jede Versuchsreihe (je  $n = 4$ ) wurde mit Nanopartikeln eines Durchmessers von durchschnittlich 100 nm in den Konzentrationen 1 mg/ml, 2 mg/ml, 5 mg/ml, sowie eines Durchmessers von durchschnittlich 200 nm in einer Konzentration von 2 mg/ml angefertigt.

Die Nanopartikelkonzentration jeder Probe wurde mittels zwei spektroskopischen Messverfahren, Spektralphotometrie und Fluoreszenzspektroskopie, und Gravimetrie analysiert. Die Ergebnisse werden als relative Konzentrationsveränderung in Bezug auf den Zeitpunkt  $t = 0$  präsentiert.

##### *Spektralphotometrie:*

Bei der Spektralphotometrie werden Proben mit Licht einer bestimmten Wellenlänge bestrahlt. Das Verhältnis der Intensität des eingestrahnten Lichtes zur Intensität des

Lichtes nach Durchstrahlung der Probe wird gemessen. Dieses Verhältnis, die Extinktion, ist dabei proportional zur Konzentration der Probe. Hier wurden die Proben mit Licht einer Wellenlänge von 630 nm gemessen. Die Nanopartikelkonzentration jeder Probe wurde anhand einer Kalibrierungskurve berechnet.

#### *Fluoreszenzspektroskopie:*

Bei der Fluoreszenzspektroskopie wird durch die Intensität des emittierten Lichtes die Konzentration einer Probe bestimmt. Dazu wurden die Nanopartikel mit dem Fluoreszenzfarbstoff Coumarin 6 (0,1% (m/m)) beladen. Coumarin 6 eignet sich aufgrund der hohen Verkapselungseffizienz in Nanopartikeln für ihre quantitative Analyse (Barichello JM). Die Proben wurden getrocknet und anschließend in Acetonitril gelöst. Die Ermittlung der Konzentration an Coumarin-6 mit dem Fluoreszenzspektrophotometer erfolgte unter Verwendung folgender Einstellungen:  $\lambda_{\text{ex}}$ : 440 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ : 501 nm (Spaltbreite 2,5 nm). Die Berechnung des Coumarin-6-Gehaltes erfolgte anhand einer Kalibrierungskurve (Beck-Broichsitter et al. 2010).

#### *Gravimetrische Messung:*

Um die Nanopartikelkonzentration gravimetrisch zu ermitteln wurden Proben von 1 ml Nanopartikelsuspension zunächst bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren um eine Partikelaggregation hervorzurufen. Dies ermöglicht nach dem Wiederauftauen eine vollständige Trennung der Phasen durch Zentrifugation. Die Suspension wurde dann direkt für 1h bei  $25^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert ( $16,873 \cdot g$ ). Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und der zurückbleibende Niederschlag gefriergetrocknet bis das Gewicht konstant war.

### **2.2.5 Statistische Untersuchungen**

Alle Messungen wurden mit drei Wiederholungen durchgeführt ( $n = 4$ ). Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde das Programm SigmaStat 3.5 (STATCON, Witzenhausen, Deutschland) verwendet. Um statistisch signifikante Unterschiede zu identifizieren, wurde eine einfache Varianzanalyse mit einem Bonferroni-Test durchgeführt, dabei wurden p-Werte von  $p < 0,05$  als statistisch signifikant angesehen und mit einem \* versehen.

## 2.3 Ergebnisse

### 2.3.1 Verneblung von isotoner Kochsalzlösung

#### *Aerosolcharakterisierung und Messung des Massenausstoßes*

Die Verneblungsexperimente wurden mit zwei Mikropumpenverneblern (Aeroneb<sup>®</sup> Pro und eFlow<sup>®</sup>rapid) und einem Düsenvernebler (PARI LC SPRINT<sup>®</sup> STAR) durchgeführt. Die Ergebnisse der laserdiffraktometrischen Aerosolcharakterisierung und der gravimetrischen Massenausstoßbestimmung für isotone Kochsalzlösung als Verneblungsflüssigkeit sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Aerosolcharakteristika- und Massenausstoßwerte für die Verneblung von isotoner NaCl-Lösung mit zwei Mikropumpen- und einem Düsenvernebler.

Vernebler		VMD <sup>a</sup> / $\mu\text{m}$	GSD <sup>b</sup>	FPF <sup>c</sup> / %	Massenausstoßrate / g/min
PARI LC SPRINT <sup>®</sup> STAR		$3.0 \pm 0.1$	$1.78 \pm 0.02$	$85.3 \pm 1.9$	$0.08 \pm 0.01$
Aeroneb <sup>®</sup> Pro		$5.5 \pm 0.1$	$1.87 \pm 0.02$	$47.2 \pm 1.2$	$0.44 \pm 0.04$
eFlow <sup>®</sup> rapid		$4.6 \pm 0.4$	$1.65 \pm 0.05$	$62.5 \pm 8.5$	$0.71 \pm 0.04$

Darstellung der Werte als Mittelwert  $\pm$  SD ( $n = 4$ ). <sup>a</sup> mediane Volumendurchmesser; <sup>b</sup> geometrische Standardabweichung; <sup>c</sup> Feinpartikelfraktion

Der Düsenvernebler erzeugte die kleinsten Aerosolpartikeldurchmesser mit einem VMD von  $3.0 \pm 0.1 \mu\text{m}$ , die der Mikropumpenvernebler lagen bei  $4.6 \pm 0.4 \mu\text{m}$  (eFlow<sup>®</sup>rapid) und  $5.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$  (Aeroneb<sup>®</sup> Pro). Die GSD war für alle Vernebler  $< 1.9$ . Die größte Feinpartikelfraktion wurde mit dem Düsenvernebler erzielt ( $\sim 85\%$ ), gegenüber der der Mikropumpenvernebler (Aeroneb<sup>®</sup> Pro:  $\sim 47\%$ , eFlow<sup>®</sup>rapid:  $\sim 63\%$ ). Die gravimetrische Messung des Massenausstoßes ergab die höchste Massenausstoßrate für den eFlow<sup>®</sup>rapid mit  $0.71 \pm 0.04 \text{ g/min}$ , gefolgt vom Aeroneb<sup>®</sup> Pro mit  $0.44 \pm 0.04$



g/min. Die Massenausstoßrate des PARI LC SPRINT® STAR war mit  $0.08 \pm 0.01$  g/min deutlich niedriger.

### **2.3.2 Einfluss der Verneblung auf die Konzentration der CF-Lösung**

Der Einfluss der Verneblung auf das Konzentrationsverhalten der Lösung im Verneblerreservoir wurde anhand des internen CF-Standards bestimmt (Abb. 3). Für den PARI LC SPRINT® STAR zeigte sich eine Zunahme der Konzentration in Abhängigkeit von Verneblungsdauer und zusätzlichem Luftstrom (Abb.3 A). Während bei einer Verneblungsdauer von 10 Minuten für einen zusätzlichen Luftstrom von 20 l/min ein Anstieg der Konzentration auf  $154,6 \pm 8,8\%$  festgestellt wurde, war die Konzentrationszunahme bei 0 l/min deutlich geringer ( $109,8 \pm 2,0\%$ ). Bei Betrachtung des Konzentrationsverhaltens über die Dauer des Verneblungsvorgangs zeigte sich für den Düsenvernebler ein größerer Zuwachs unter Verwendung von zusätzlichem Luftstrom (Abb. 3A, Einsatz).

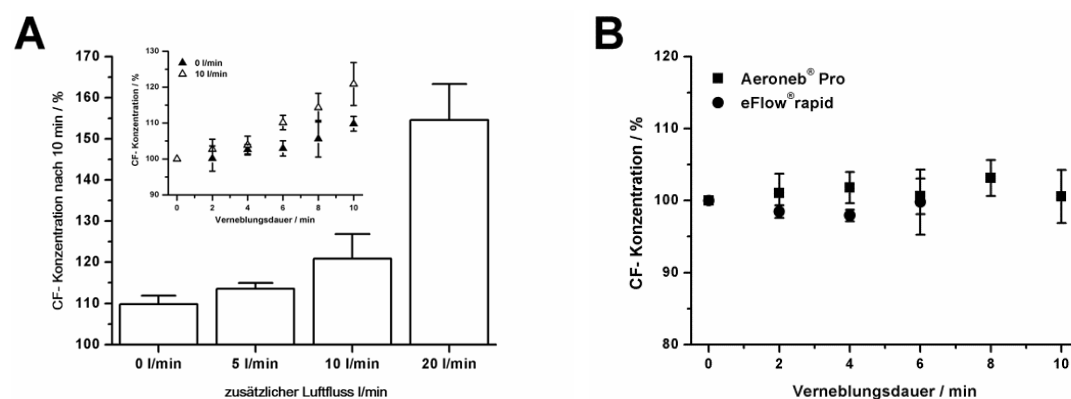


Abb. 3: Konzentrationszunahme einer Verneblungslösung von 5(6)-Carboxyfluorescein (CF) in NaCl 0,9% (m/v) in Abhängigkeit von Verneblungsdauer und zusätzlichem Luftstrom während der Verneblung mit einem Düsen- (PARI LC SPRINT® STAR, (A)) und zwei Mikropumpenverneblern (Aeroneb® Pro, eFlow® rapid, (B)). Der Einsatz in (A) zeigt die Konzentrationszunahme von CF über die Dauer des Verneblungsvorgangs bei 0 l/min bzw. 10 l/min Zuluft. Darstellung der Werte als Mittelwert  $\pm$  SD ( $n = 4$ ).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen des Düsenverneblers blieb die Konzentration der CF-Lösung bei beiden Mikropumpenverneblern über die beobachtete Verneblungsdauer konstant (Aeroneb® Pro:  $100,6 \pm 3,7\%$  nach 10 min. (Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 4$ ); eFlow® rapid:  $99,8 \pm 4,5\%$  nach 6 min. (Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 4$ ).

### 2.3.3 Charakterisierung und Verneblung der Nanopartikelsuspensionen

#### *Charakterisierung der Nanopartikelsuspensionen nach Herstellung*

Als Zielgröße für die biologisch abbaubaren Nanopartikel nach ihrer Herstellung aus PLGA war ein Durchmesser von 100 nm bzw. 200 nm vorgesehen. Ihre physikochemischen Eigenschaften wurden mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS), Laser-Doppler-Anemometrie (LDA) und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) evaluiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 und Abb. 4 dargestellt. Für die PLGA100-Nanopartikel wurde direkt nach Herstellung ein mittlerer Durchmesser von  $104,0 \pm 2,2$  nm (Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 11$ ), für die PLGA200-Nanopartikel von  $200,5 \pm 4,2$  nm (Mittelwert  $\pm$

SD,  $n = 4$ ) ermittelt, bei einer schmalen Partikelgrößenverteilung (Polydispersitätsindex (PDI)  $< 0,12$ ). Das  $\zeta$ -Potenzial betrug für beide Partikelformulierungen  $\sim -30$  mV.

Tabelle 2: Physikochemische Eigenschaften der Poly(lactide-co-glykolide) (PLGA)-Nanopartikel (NP), ermittelt durch dynamische Lichtstreuung (DLS) und Laser-Doppler-Anemometrie (LDA).

<b>NP</b>	<b>Formulierung</b>	<b>Größe / nm</b>	<b>PDI<sup>a</sup></b>	<b><math>\zeta</math>-Potenzial / mV</b>
PLGA100		$104.0 \pm 2.2$	$0.110 \pm 0.018$	$-32.0 \pm 3.4$
PLGA200		$200.5 \pm 4.2$	$0.112 \pm 0.011$	$-33.3 \pm 2.3$

Darstellung der Werte als Mittelwert  $\pm$  SD ( $n \geq 4$ ). <sup>a</sup> Polydispersitätsindex

Die Transmissionselektronenmikroskopie diente der visuellen Darstellung der NP und bestätigte die Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuung.

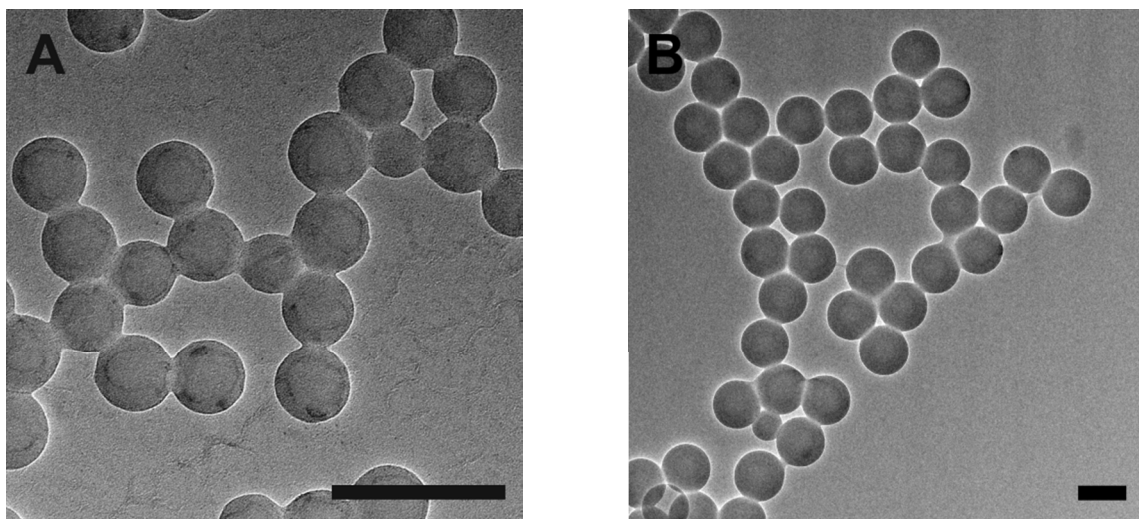


Abb. 4: Transmissionselektronenmikroskopische Darstellung der PLGA-NP mit mittleren hydrodynamischen Durchmessern von 100 nm (A) bzw. 200 nm (B). Skalierungsbalken in A und B: 200 nm

#### *Verneblung der Nanosuspensionen*

Die Verneblung der Nanosuspensionen PLGA100 und PLGA200 erfolgte in den Konzentrationen 1, 2, und 5 mg/ml. Alle Vernebler produzierten aus den getesteten Nanopartikelsuspensionen Aerosole mit geeigneten Parametern für die pulmonale Applikation. Die Ergebnisse der laserdiffraktometrischen Aerosolanalyse und der Messung des Massenausstoßes sind in Tabelle 3 dargestellt. Die Verneblung der verschiedenen Nanosuspensionen mit dem PARI LC SPRINT® STAR bzw. dem Aeroneb® Pro ergab VMD von  $3,0 \pm 0,2 \mu\text{m}$  bis  $3,4 \pm 0,4 \mu\text{m}$  bzw. von  $5,5 \pm 0,1 \mu\text{m}$  bis  $5,9 \pm 0,1 \mu\text{m}$ . Die Verneblung von PLGA100 in der Konzentration 2 mg/ml mit dem eFlow® *rapid* erzielte Aerosolpartikelgrößen von  $4,6 \pm 0,2 \mu\text{m}$ .

Tabelle 3: Aerosolcharakteristika und Massenausstoßwerte für die Verneblung von poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) Nanopartikeln mit einem Düsen- und zwei Mikropumpenverneblern.

Vernebler	NP Formulierung	NP- Konzentration / mg/ml	VMD <sup>a</sup> / $\mu\text{m}$	GSD <sup>b</sup>	FPF <sup>c</sup> / %	Massenausstoßrate / g/min
PARI LC SPRINT® STAR	PLGA100	1	3.2 ± 0.1	1.67 ± 0.02*	86.1 ± 1.7	0.07 ± 0.01
	PLGA100	2	3.0 ± 0.2	1.64 ± 0.03*	88.6 ± 3.6	0.07 ± 0.02
	PLGA100	5	3.2 ± 0.2	1.70 ± 0.10	86.6 ± 4.5	0.08 ± 0.04
	PLGA200	2	3.4 ± 0.4	1.67 ± 0.05*	83.2 ± 7.4	0.08 ± 0.03
Aeroneb® Pro	PLGA100	1	5.8 ± 0.2	1.90 ± 0.04	44.4 ± 2.6	0.35 ± 0.03*
	PLGA100	2	5.8 ± 0.3	1.85 ± 0.08	43.8 ± 3.2	0.29 ± 0.06*
	PLGA100	5	5.9 ± 0.1*	1.82 ± 0.04	42.4 ± 1.7*	0.25 ± 0.04*
	PLGA200	2	5.5 ± 0.1	1.70 ± 0.01*	46.2 ± 2.7	0.22 ± 0.04*
eFlow® rapid	PLGA 100	2	4.6 ± 0.2	1.60 ± 0.01	61.2 ± 3.1	0.52 ± 0.10*

Markiert(\*) sind statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zur Verneblung von NaCl 0,9% (Tabelle I). Darstellung der Werte als Mittelwert  $\pm$  SD ( $n \geq 4$ ). <sup>a</sup> medianer Volumendurchmesser; <sup>b</sup> geometrische Standardabweichung; <sup>c</sup> Feinpartikelfraktion

Bei allen Verneblern wurden nur geringfügige Unterschiede der Aerosolparameter im Vergleich zur Verneblung von isotoner Kochsalzlösung festgestellt. Es zeigte sich jedoch bei den Mikropumpenverneblern eine signifikant erniedrigte Massenausstoßrate ( $p < 0,05$ ).

### Stabilität der Nanosuspensionen während der Verneblung

Die Stabilität der Nanosuspensionen unter Verneblung mit Düsen- und Mikropumpenverneblern wurde exemplarisch anhand der PLGA100- und PLGA200-Nanosuspensionen in der Konzentration 2 mg/ml getestet. Die aus dem Verneblerreservoir entnommenen Proben wurden mit DLS analysiert, die Ergebnisse sind in Abb. 5 dargestellt.

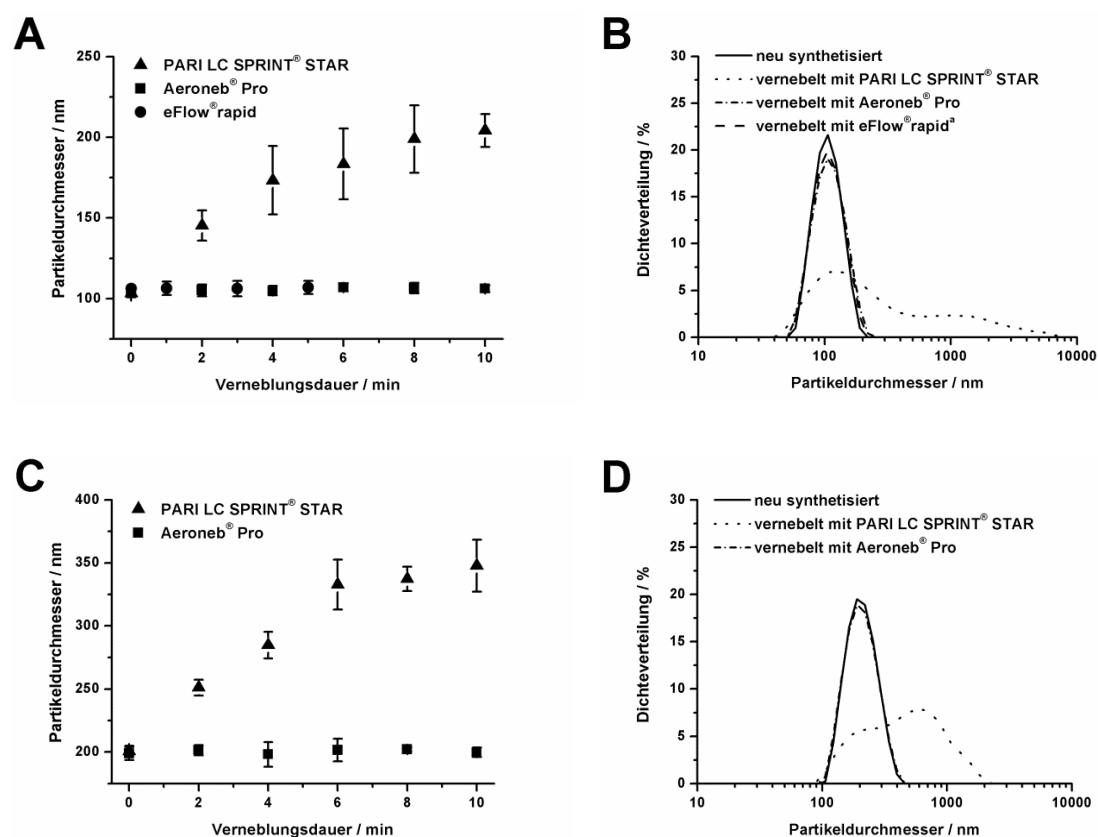


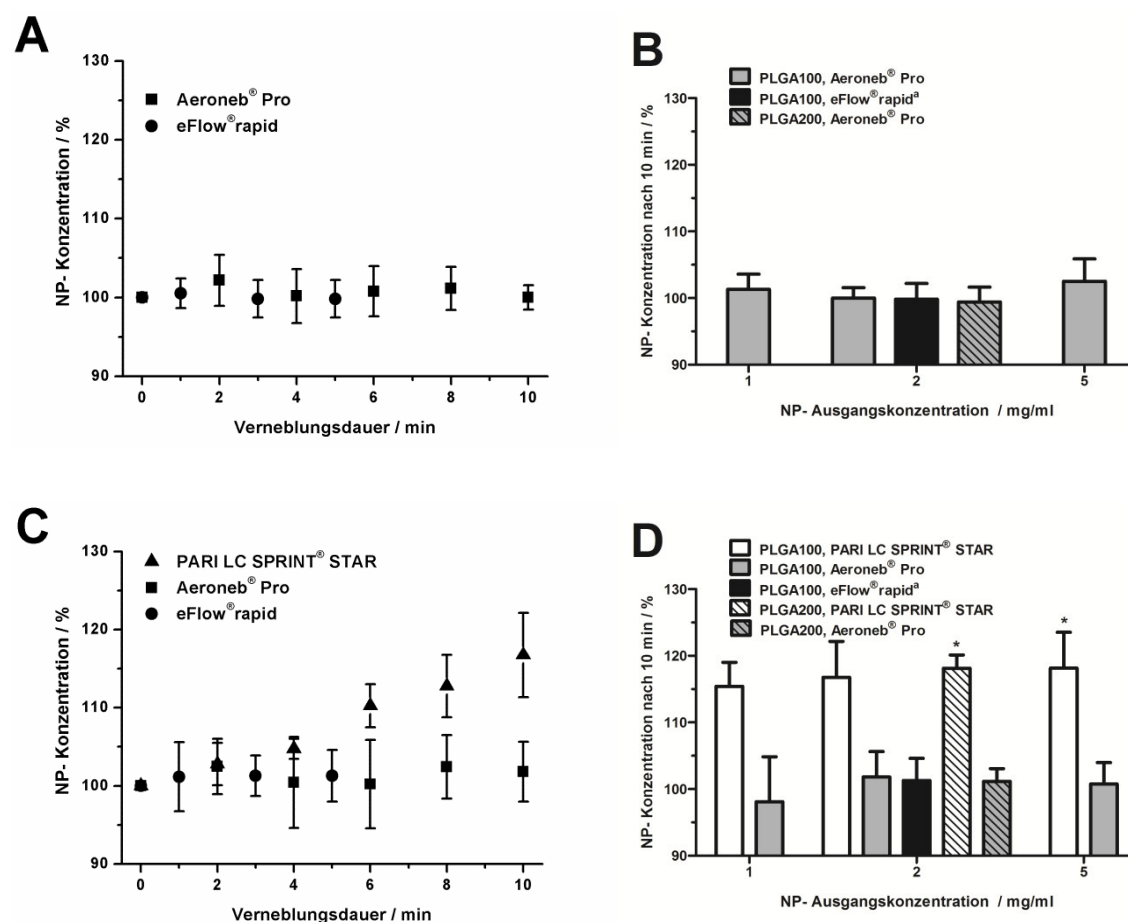
Abb. 5: Stabilität der poly(D, L-lactide-co-glycolide) (PLGA)-Nanopartikel in der Konzentration 2 mg/ml unter Verneblung mit Düsen- (PARI LC SPRINT® STAR) und Mikropumpenverneblern (Aeroneb® Pro, eFlow®rapid), erfasst mit dynamischer Lichtstreuung (DLS) (A,C). Darstellung der Werte als Mittelwert  $\pm$  SD ( $n = 4$ ). (B) und (D) zeigen Verteilungskurven der Nanopartikeldurchmesser nach 10 Minuten, bzw. <sup>a</sup> 5 Minuten Verneblung (eFlow®rapid, B). A, B: PLGA 100 nm; C,D: PLGA 200 nm.

Durch die Düsenverneblung wurden ein Anstieg der mittleren Partikeldurchmesser sowie eine Verbreiterung der Partikelgrößenverteilung der Nanosuspensionen hervorgerufen. Diese Effekte nahmen mit der Länge der Verneblungsdauer an Ausprägung zu. Die

Verneblung mit den Mikropumpenverneblern zeigte dahingegen keinen Einfluss auf die Stabilität der Nanosuspensionen während der untersuchten Verneblungsdauer.

### 2.3.4 Einfluss der Verneblung auf die Konzentration der Nanopartikelsuspensionen

Um das Verhalten der Konzentration der Nanopartikelsuspensionen während des Verneblungsvorgangs zu verfolgen, wurden zu vorbestimmten Zeitpunkten Proben aus dem Reservoir entnommen. Die Konzentration dieser Proben wurde mittels Spektralphotometrie, Fluoreszenzspektroskopie und Gravimetrie quantifiziert (Abb. 6). Für die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen wurden die Nanopartikel vorher mit dem Fluoreszenzfarbstoff Coumarin-6 (0,1% (m/m)) beladen. Die Verkapselungseffizienz von Coumarin-6 betrug bis zu  $97 \pm 3,8\%$  (Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 8$ ).





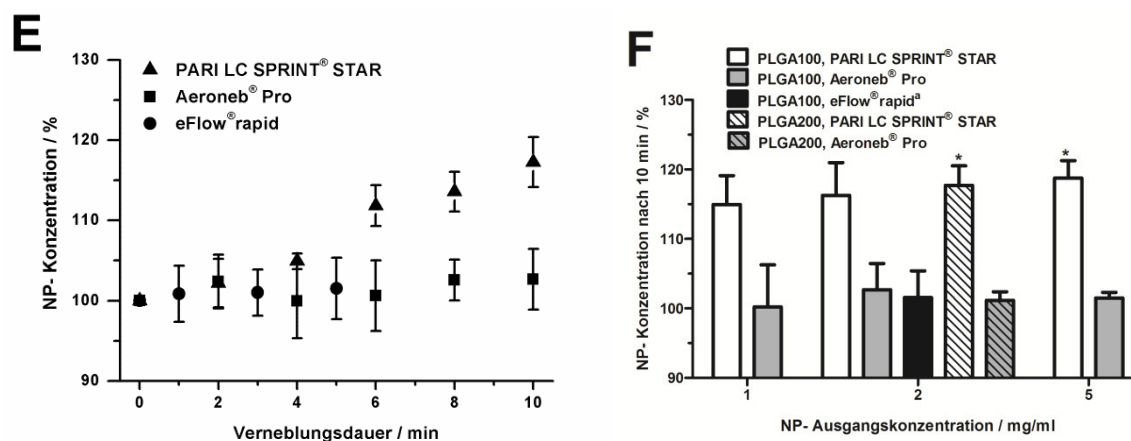


Abb. 6: Einfluss der Verneblung mit einem Düsen (PARI LC SPRINT® STAR)- und zwei Mikropumpenverneblern (Aeroneb® Pro, eFlow®rapid) auf die Konzentration der poly (D, L -lactide-co-glycolide) (PLGA)-Nanopartikelsuspensionen (100 bzw. 200nm). Dargestellt sind die Ergebnisse der Spektralphotometrie (A, B), Gravimetrie (C, D), und Fluoreszenzspektroskopie (E, F). Die Verneblungen in (A), (C) und (E) wurden mit PLGA 100 NP in einer Konzentration von 2mg/ml durchgeführt. Markiert (\*) sind statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zur Verneblung von NaCl 0,9% (Abb. 2A). Darstellung der Werte als Mittelwert  $\pm$  SD ( $n \geq 4$ ). <sup>a</sup> NP- Konzentration nach 5 Minuten Verneblung (B, D, F).

Da die Verneblung mit dem Düsenvernebler zur Aggregation der Nanopartikel geführt hatte (Abb. 5), konnten die Transmissionsversuche nur mit den Proben aus den Mikropumpenverneblern durchgeführt werden. Diese ergaben für den Aeroneb® Pro und den eFlow®rapid keine relevante Veränderung der Nanopartikelkonzentration während der beobachteten Verneblungsdauer (Abb. 6A und 6B). Eine konstante Konzentration von ~100% in der gravimetrischen und fluoreszenzspektroskopischen Analyse bestätigte dies (Abb. 6C - 6F).

Im Gegensatz dazu wurde für die Düsenverneblung eine graduell ansteigende Konzentration während des Verneblungsvorgangs gemessen (Abb. 6C und 6E). Wie anhand der Verneblung der PLGA100-Nanosuspension erkennbar, war der Konzentrationsanstieg nach 10 Minuten umso ausgeprägter, je höher die die Konzentration an Nanopartikeln in der Ausgangssuspension war (Abb. 6D und 6F). Ebenso führte die Verneblung der

PLGA200-Nanosuspension (2 mg/ml) zu einer stärkeren Konzentrationszunahme als die Verneblung der PLGA100-Nanosuspension derselben Ausgangskonzentration (Abb. 6D und 6F).

Zudem zeigte die Verneblung von PLGA100 (5 mg/ml) und PLGA200 (2 mg/ml) mit dem Düsenvernebler PARI LC SPRINT® STAR eine signifikant größere Konzentrationszunahme im Vergleich zur Verneblung isotoner Kochsalzlösung (Abb. 3A, 6D und 6F).

## 2.4 Diskussion

### *Vergleich von Düsen- und Mikropumpentechnologie*

Um von den Vorteilen einer gezielten Inhalationstherapie- hohe lokale Dosis, weniger Nebenwirkungen, atraumatische Verabreichung etc.- bestmöglich profitieren zu können, bedarf es der genauen Kenntnis der applizierten Dosis, sowie der Kontrolle des Wirkortes und der Wirkungsdauer (Groneberg et al. 2003). Durch die Entwicklung geeigneter Medikamentenformulierungen und deren Applikation mit modernen Verneblungstechnologien könnten diese Anforderungen erfüllt werden. Die jüngere Generation der Mikropumpenvernebler stellt hierbei eine effizientere Alternative zu den Düsen- und Ultraschallverneblern dar (Dhand 2002; Watts et al. 2008). Von den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Verneblern produzierten sowohl die Mikropumpenvernebler als auch der Düsenvernebler Aerosole mit geeigneten VMD und Feinpartikelfractionen für die tiefe pulmonale Deposition (Tab. I) (Carvalho et al. 2011). Die höhere Massenausstoßrate des Aeroneb® Pro und des eFlow® rapid gegenüber der des PARI LC SPRINT® STAR deutet jedoch auf eine effizientere Aerosolproduktion durch die Mikropumpenvernebler hin (Tab. I). Dies ist vor allem unter dem Aspekt zu berücksichtigen, dass die Massenausstoßrate aller Vernebler gravimetrisch gemessen wurde. Dies führt bei der Düsenverneblung zu einer Überschätzung der Menge des tatsächlich emittierten Aerosols, da während der Verneblung Flüssigkeit aus dem Verneblerreservoir verdunstet (Dennis et al. 1990; O'Callaghan et al. 1989). Auf diesem Vorgang beruht auch der bei dem PARI LC SPRINT® STAR beobachtete Konzentrationsanstieg in der Verneblungsflüssigkeit, dessen Ausmaß mit Verneblungsdauer und Menge an zusätzlichem Luftfluss noch weiter zunahm (Abb. 3A). Bei der Mikropumpenverneblung hin-

gegen wird das Aerosol durch eine perforierte, vibrierende Membran erzeugt (Waldrep und Dhand 2008), wobei keine Verdunstung stattfindet. Dementsprechend wies die Flüssigkeit im Reservoir des Aeroneb<sup>®</sup> Pro und des eFlow<sup>®</sup> rapid eine konstante Konzentration über die beobachtete Verneblungsdauer auf (Abb. 3 B).

### *Verneblung der Nanosuspensionen*

Neben der Aerosolerzeugungstechnologie stellt die Entwicklung von geeigneten Medikamentenformulierungen eine weitere Strategie zur Optimierung der Inhalationstherapie dar. Das Feld der Nanotechnologie eröffnet Möglichkeiten, die zeitliche und räumliche Verteilung von Wirkstoffen am Zielort zu beeinflussen und spezifische Gewebe und Zellen gezielt zu therapieren (Farokhzad und Langer 2009; LaVan et al. 2002). Für die Inhalation in Aerosolform werden an die nanoskalierten Formulierungen folgende Anforderungen gestellt: unkomplizierte und ökonomische Herstellung, geringe Aggregationsneigung, vernebelbar und stabil unter Verneblung, hohe Wirkstoffverkapselung/Adsorption sowie geringe Toxizität (Chow et al. 2007; Vauthier und Bouchemal 2009). Neben der Trockenpulverzerstäubung in DPIs hat sich die Flüssigkeitsverneblung als geeignet erwiesen, Aerosole aus kolloidalen Suspensionen aus biodegradierbaren PLGA-Nanopartikeln zu erzeugen (Yang et al. 2008; Dailey et al. 2003; Rytting et al. 2008; Beck-Broichsitter et al. 2009; Beck-Broichsitter et al. 2010a; Beck-Broichsitter et al. 2012a). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Nanopartikel mithilfe des bewährten Nanopräzipitationsverfahrens aus präformierten Polymeren hergestellt (Vauthier und Bouchemal 2009; Beck-Broichsitter et al. 2010b). Wie die nachfolgende Evaluation der Nanopartikel zeigte, konnten stabile, annähernd monodisperse Suspensionen mit Partikelgrößen von 100 nm bzw. 200 nm, enger Größenverteilung und einem Zeta-Potential von  $> -25$  mV synthetisiert werden (Tabelle 2). Dies wurde durch die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen bestätigt (Abb. 4).

In den Verneblungsexperimenten ließ sich mit allen Verneblern ein adäquates Aerosol für die pulmonale Deposition erzeugen (Tabelle 3). Die Aerosolcharakteristika und die Massenausstoßrate betreffend, zeigten sich signifikante Unterschiede zur Verneblung von isotoner Kochsalzlösung (Tabelle 1 und 3). Diese Größenordnungen sind jedoch im Hinblick auf Beeinflussung ihrer pulmonalen Depositionswahrscheinlichkeit nur von geringfügiger Relevanz (Carvalho et al. 2011).

### *Auswirkungen der Düsenverneblung auf Nanosuspensionen*

Um Nanosuspensionen als *Controlled-Release*-Formulierungen in der Aerosoltherapie einsetzen zu können, ist ihre Stabilität unter Verneblung von entscheidender Bedeutung. Die wiederholte Analyse der Nanopartikel während des Verneblungsvorgangs zeigte einen Anstieg der Nanopartikeldurchmesser unter Verneblung mit dem PARI LC SPRINT® STAR (Abb. 5). Zurückgeführt wird dieser Effekt auf die Verneblungstechnologie. Durch Recycling der Aerosoltropfen an den Prallplatten des Verneblers und die hohen Scherkräfte durch die Druckluft kommt es zu hochfrequenten interpartikulären Kontakten, infolgedessen die Nanopartikel aggregieren (Dailey et al. 2003; Hureaux et al. 2009). Von diesen Mechanismen sind besonders hydrophobe Nanopartikel, wie PLGA-NP, betroffen (Dailey et al. 2003). Ähnliche Vorgänge wurden auch für die Düsenverneblung von Liposomen beschrieben (Elhissi et al. 2007; Kleemann et al. 2007).

Des Weiteren ist bei der Düsenverneblung die Konzentrationszunahme der Lösungen im Verneblerreservoir durch Verdunstung bekannt (O'Callaghan et al. 1989; Dennis et al. 1990; Steckel 2003). Bei Untersuchung des Konzentrationsverhaltens der Nanopartikelsuspensionen wurde ein signifikant stärkerer Konzentrationsanstieg gegenüber der isotonen Kochsalzlösung festgestellt (Abb. 3A, 6D und F). Dieser Konzentrationsanstieg nahm dabei mit steigender initialer Nanopartikelkonzentration (PLGA100, 5 mg/ml) und -Durchmesser (PLGA200, 2 mg/ml) weiter zu (Abb. 6D, F). Untersuchungen der Konzentration von Mikropartikelsuspensionen unter Düsenverneblung hatten gezeigt, dass die Größe der Mikropartikel das Ausmaß des Konzentrationsanstiegs beeinflusst, und Partikel, welche die Größe der emittierten Aerosoltropfen überschreiten, im Verneblerreservoir zurückbleiben (Mc Callion et al. 1996b). Dies deutet darauf hin, dass der Konzentrationsanstieg der Nanopartikelsuspensionen nicht allein auf Verdunstungsvorgänge zurückzuführen ist, sondern dass auch die oben beschriebene Partikelaggregation zu einem Verbleib der Partikel im Verneblerreservoir führt.

### *Auswirkungen der Mikropumpenverneblung auf Nanosuspensionen*

Im Gegensatz dazu hatte die Mikropumpenverneblung keine entsprechenden Effekte auf Stabilität oder Konzentration der Nanosuspensionen. Die Partikel im Reservoir des Aeroneb® Pro und des eFlow® *rapid* wiesen konstante Durchmesser über die gesamte

beobachtete Verneblungsdauer auf (Abbildung 5 A, C). Die Evaluation der Partikelkonzentration ergab Werte von ca. 100% bezogen auf die Ausgangskonzentration nach 10, bzw. 5 – minütiger Verneblung (Abb. 6); entsprechend den Ergebnissen bei der Verneblung isotoner Kochsalzlösung. Diese Ergebnisse bestätigen die Mikropumpentechnologie als geeignete Methode, aus kolloidalen Nanosuspensionen adäquate Aerosole für die Inhalationstherapie zu erzeugen (Beck-Broichsitter et al. 2009; Beck-Broichsitter et al. 2012a). In Mikropumpenverneblern wird die Größe der Aerosoltropfen nicht durch Recycling-Mechanismen und Rückhalteplatte reguliert, sondern durch die Maße der Poren in der vibrierenden Platte. Die Poren sind konisch geformt, ihr Durchmesser verengt sich von ca. 80  $\mu\text{m}$  (Aeroneb<sup>®</sup> Pro) bzw. ca. 30  $\mu\text{m}$  (eFlow<sup>®</sup> rapid) auf der Seite der Reservoirflüssigkeit zu 2- 5  $\mu\text{m}$  auf der Aerosolseite (Lass et al. 2006; Zhang et al. 2007; Waldrep und Dhand 2008). Die hier verwendeten Nanopartikel behielten ihren Ausgangsdurchmesser von 100, bzw. 200 nm und konnten somit über die gesamte Verneblungsdauer die Poren der vibrierenden Platte passieren. Für Suspensionen, deren Partikel über einen größeren Durchmesser verfügen oder die aufgrund mangelnder Stabilität aggregieren, könnte die Verneblung eingeschränkt sein. Bei der Verneblung von kolloidalen Suspensionen mit Mikropumpenverneblern gilt es demnach zu beachten, dass die Größe der suspendierten Partikel den Porendurchmesser der perforierten vibrierenden Platte nicht überschreitet.

### *Schlussfolgerungen*

Die Untersuchungen dieser Arbeit bestätigten die Flüssigkeitsverneblung als geeignete Methode, um aus biodegradierbaren, kolloidalen Nanosuspensionen Aerosole für die Inhalationstherapie zu erzeugen. Durch die Gegenüberstellung von Düsen- und Mikropumpenverneblung konnte jedoch gezeigt werden, dass die Auswahl einer passenden Verneblungstechnologie nicht nur für die effiziente Erzeugung von adäquaten Aerosolen, sondern auch für die Stabilität der Nanosuspension unter Transformation in Aerosolform entscheidend ist. Düsenverneblung führte zu Partikelaggregation und – Retention im Verneblerreservoir, und kann somit die Verabreichung einer funktionell intakten Formulierung nicht gewährleisten. Mikropumpenverneblung hingegen führte nicht zur Aufkonzentrierung der Nanosuspension und erwies sich somit als geeignete Technologie für die Verneblung von Partikelsuspensionen im Nanometerbereich.

### **3 Kapitel 2 : Einfluss von Additiven auf die Verneblung mit Mikropumpenverneblern**

Für einen Teil der Ergebnisse dieser Arbeit erfolgte bereits die Veröffentlichung in International Journal of Pharmaceutics 2014 Jan 1;459(1-2):23-9; Jan 30;461(1-2):34-7 und European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2014 Aug;87(3):524-9.

### 3.1 Literaturübersicht

Die in Kapitel 1 dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse bestätigen die Mikropumpentechnologie als geeignet, sensitive *Controlled-Release*-Formulierungen auf der Basis von biodegradierbaren Nanopartikeln zu vernebeln. Um Nanosuspensionen im klinischen Alltag einsetzen zu können, muss jedoch die Stabilität der Formulierungen über einen längeren Zeitraum hinweg gewährleistet sein. Die Methode des Gefriertrocknens stellt eine Möglichkeit dar, der Partikelaggregation entgegen zu wirken und die Formulierung somit haltbar zu machen (Abdelwahed et al. 2006). Dabei werden Additive hinzugefügt, die die physikochemischen Eigenschaften der Suspensionen beeinflussen können (Beck-Broichsitter et al. 2012b). Von der Düsen- und Ultraschallverneblung ist der Einfluss unterschiedlicher physikochemischer Eigenschaften der Verneblungsflüssigkeit auf die Aerosolproduktion bekannt (Davis 1978; McCallion et al. 1995; McCallion und Patel 1996; Finlay et al. 2000; Steckel 2003; Ghazanfari et al. 2007; Beck-Broichsitter et al. 2012b). Um die Wirksamkeit einer Inhalationstherapie zu garantieren, muss man über die applizierte Dosis, und somit über die Depositionswahrscheinlichkeit eines Aerosols in den verschiedenen Atemwegsabschnitten, eine Aussage treffen können. Dafür charakterisiert man die Aerosole anhand von folgenden Kenngrößen: die Partikelgrößenverteilung des Aerosols, die durch Angabe des medianen aerodynamischen Massendurchmessers (MMAD) mit seiner geometrischen Standardabweichung (GSD) quantifiziert wird, und den respirablen Anteil an Aerosolpartikeln, die Feinpartikelfraktion (FPF). Zudem benötigt man die Masse des pro Zeiteinheit vom Vernebler emittierten Aerosols (die Massenausstoßrate) (Scheuch 1998). Vorangehende Untersuchungen haben gezeigt, dass diese Faktoren nicht nur von der Technologie der Aerosolerzeugung abhängig sind. Beobachtungen der Aerosolcharakteristika und der Massenausstoßrate während Düsen- und Ultraschallverneblung zeigten eine Änderung dieser mit zunehmender Verneblungsdauer, was unter Kenntnis der Temperaturdifferenzen und der Konzentrationszunahme zwischen Beginn und Ende der Verneblung auf eine Änderung der physikochemischen Eigenschaften der Flüssigkeit im Verneblerreservoir zurückgeführt wurde (Steckel 2003; Finlay et al. 2000). Viele Studien haben diesen Einfluss von Temperatur, Konzentration, Viskosität und Oberflächenspannung auf Charakteristika und Menge der Aerosolerzeugung für die Düsen- und Ultraschallverneblung untersucht. Dabei wurde für die Düsenverneblung ein umgekehrt proportionaler Zusammenhang von Viskosität und MMAD, sowie Massenausstoßrate registriert (Davis 1978; McCallion et al. 1995; McCallion und Patel 1996; Beck-Broichsitter et al.

2012b). Bei Ultraschallverneblern hingegen wurde ein direkter Zusammenhang bei gering viskösen Lösungen festgestellt (McCallion et al. 1995; McCallion et al. 1996c), die Verneblung von Lösungen einer Viskosität von  $> 2$  mPas (Beck-Broichsitter et al. 2012b), bzw.  $> 6$  mPas (Mc Callion und Patel 1996) erwies sich jedoch als unmöglich. Ein Effekt der Oberflächenspannung konnte nur unter konstanter Einstellung der Viskosität registriert werden (McCallion et al. 1995). Es wurden bei Düsen- sowie Ultraschallverneblung kleinere MMAD bei steigender Oberflächenspannung generiert (Mc Callion und Patel 1996). Der Massenausstoß von Düsenverneblern nahm zu, während für Ultraschallvernebler kein klarer Trend registriert wurde (Mc Callion et al. 1996a).

Die Mikropumpentechnologie zeichnet sich durch nur sehr geringe Temperaturanstiege während des Verneblungsvorgangs aus (Beck-Broichsitter et al. 2012b). Ebenso wurden keine Konzentrationsanstiege der Flüssigkeit im Verneblerreservoir festgestellt (Kap. 1, Abb. 3 und Beck-Broichsitter et al. 2012b). Um den Einfluss physikochemischer Eigenschaften auf Aerosolcharakteristika und Massenausstoßrate der Mikropumpenverneblung zu quantifizieren wurden bisher nur wenige Untersuchungen durchgeführt. Ghanzafari et al. untersuchten die Aerosolcharakteristika eines passiv und eines aktiv vibrierenden Mikropumpenverneblers. Die Viskositätswerte von 1- 2,74 mPas wurden mittels Glycerol- Lösungen eingestellt. Die Glycerol- Lösungen wiesen dabei nur geringe Schwankungen der Oberflächenspannungen auf. Es zeigte sich in beiden Verneblern eine Abnahme der MMAD und eine Zunahme der FPF mit steigender Viskosität. Für den passiv vibrierenden Vernebler waren Viskositätswerte ab  $\sim 2$  mPas nicht mehr vernebelbar. Auch beim aktiv vibrierenden Vernebler nahm der Massenausstoß mit steigender Viskosität ab. Ein klarer Effekt der Oberflächenspannung auf die Aerosolcharakteristika konnte nicht festgestellt werden. Auch Zhang et al. 2007 bestätigten den Zusammenhang zwischen physikochemischen Eigenschaften und Aerosolproduktion, indem sie Lösungen unterschiedlicher Dichte, Viskosität und Oberflächenspannung vernebelten, jedoch wurden die Faktoren dabei nicht unabhängig voneinander untersucht.

Als weiterer Einflussfaktor wurde die Elektrolytkonzentration der Lösung untersucht. Die Verneblung von Natrium-Chlorid-Lösungen in aufsteigenden Konzentrationen von 0-0,9% (w/v) führte ähnlich der Viskosität zur Erzeugung von Aerosolpartikeln kleineren Durchmessers, hatte jedoch im gewählten Konzentrationsbereich keinen signifikanten Einfluss auf den Massenausstoß (Ghanzafari et al. 2007). Zhang et al. 2007 unter-



suchten den Effekt einer Zugabe von Natrium-Chlorid-Lösungen (0,1% (w/v)) zu organischen Lösungen bei der Verneblung durch den aktiv vibrierenden Aeroneb<sup>®</sup> Lab und stellten entsprechend eine Abnahme der MMAD um bis zu 50%, aber auch eine starke Zunahme des Massenausstoßes fest. In diesen Untersuchungen wurde jedoch nicht der Einzelfaktor Elektrolytkonzentration betrachtet, da jeweils parallel Viskosität, Oberflächenspannung und Elektrolytkonzentration variiert wurden. Für den eFlow<sup>®</sup> *rapid* existieren diesbezüglich noch weniger Daten. Baumann et al. fanden bei Zugabe von oberflächenaktiven und viskösen Substanzen zur Verneblungsflüssigkeit eine Abnahme der MMAD. Dies deutet darauf hin, dass auch die Aerosolproduktion durch den eFlow<sup>®</sup> *rapid* von den physikochemischen Eigenschaften der Verneblungsflüssigkeit beeinflusst wird.

Hier war es nun Zielsetzung, den separaten Effekt von Elektrolytkonzentration, Viskosität und Oberflächenspannung auf die Aerosolparameter bei der Verneblung mit Mikropumpenverneblern zu untersuchen. Dazu wurden die physikochemischen Eigenschaften von Lösungen in ansteigender Konzentration untersucht. Es wurde nur jeweils eine der untersuchten physikochemischen Eigenschaften variiert. Die Lösungen wurden in ansteigenden Konzentrationen mit zwei aktiv vibrierenden Mikropumpenverneblern vernebelt und die Aerosolparameter mittels Laserdiffraktometrie erfasst.

## 3.2 Material und Methoden

### 3.2.1 Mikropumpenvernebler

Es wurden die Mikropumpenvernebler Aeroneb<sup>®</sup> Pro (Aerogen, Dangan, Galway, Irland) und eFlow<sup>®</sup> *rapid* (Pari GmbH, Starnberg, Deutschland) verwendet. Die Funktionsweise beider Vernebler beruht auf dem Prinzip einer perforierten Membran, die durch ein ringförmiges piezoelektrisches Element in Vibration versetzt wird. Die Schwingungsfrequenz des Aeroneb<sup>®</sup> Pro beträgt dabei 128 kHz, die des eFlow<sup>®</sup> *rapid* 117 kHz (Dhand 2002; Herstellerangaben). Die Verneblungsflüssigkeit wird in die konisch geformten Poren gepumpt und bildet nach Passage der Membran das Aerosol (Dhand 2002). Die Membranen der beiden verwendeten Vernebler weisen bezüglich Materialkomposition und Herstellungsmechanismus einige Unterschiede auf. Die Membran des Aeroneb<sup>®</sup> Pro besteht aus einer Palladium-Nickel-Legierung und die Per-

foration wird durch einen galvanotechnischen Prozess hergestellt (Scott Borland et al. 2001; Shen et al. 2008). Die Stahlmembran des eFlow<sup>®</sup>rapid wird durch Laserbohrung perforiert (Kohno und Matsuoka 2004; Knoch und Keller 2005; Geerken et al. 2008). Die Membranen wurden aus den Verneblern herauspräpariert und ihre Morphologie rasterelektronenmikroskopisch untersucht (Abb. 7) (CamScan-4DV, CamScan, Waterbeach, England). Die chemische Zusammensetzung wurde mittels energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX) (Voyager, Noran Instruments, Middleton, USA) analysiert (Abb.8).

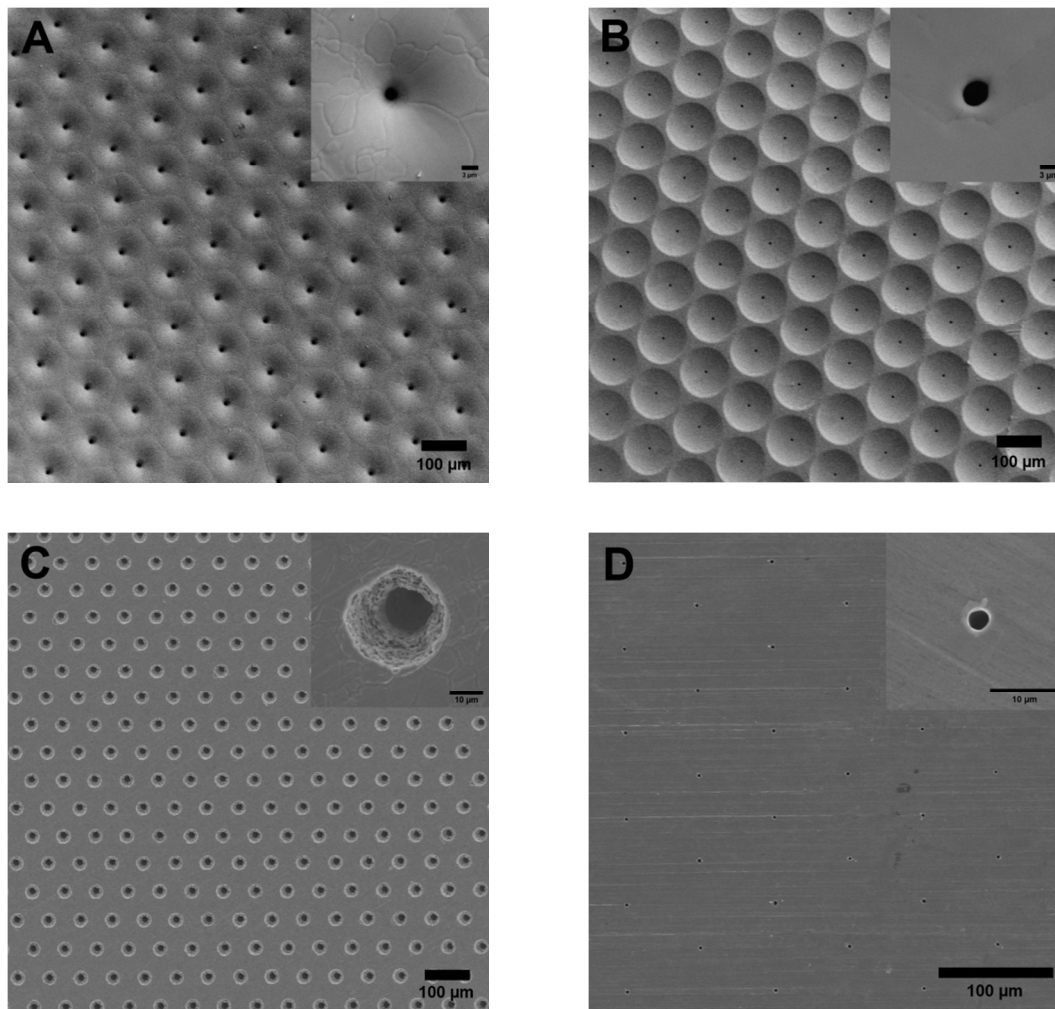


Abb. 7: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der perforierten Membranen des Aeroneb<sup>®</sup>Pro ( A. Innenseite, B: Außenseite) und des eFlow<sup>®</sup>rapid. (C: Innenseite D: Außenseite). Einsätze: einzelne Pore in stärkerer Vergrößerung.

Die konische Form der Poren ist durch den größeren Durchmesser der Öffnung auf den Innenseiten gegenüber dem der Aerosolseiten erkennbar.

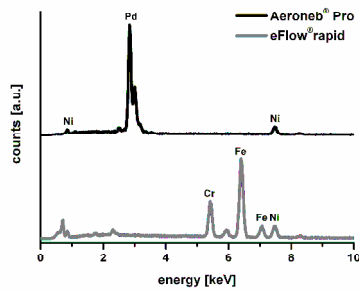


Abb.8: Materialanalyse der Verneblermembranen mittels energiedispersiver Röntgenspektroskopie, Aeroneb<sup>®</sup> Pro (schwarze Linie) und eFlow<sup>®</sup> rapid (graue Linie)

Dargestellt ist die Zusammensetzung der Membran des Aeroneb<sup>®</sup> Pro aus einer Palladium/Nickel- Legierung, die des eFlow<sup>®</sup> rapid aus einem Chrom-Nickel-Stahl.

### 3.2.2 Herstellung und physikochemische Charakterisierung der Lösungen

Substanzliste:

<b>Chemikalie</b>	<b>Herkunft</b>
Destilliertes Wasser (Aq. dest.)	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Benzalkoniumchlorid (BAC) (95%) p.a.	Fluka, Buchs, Schweiz
Empigen <sup>®</sup> BB (35%)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glycin (99%)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat (99%) p.a.	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcitrat (99%) p.a.	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl) (0,9%)	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Saccharose (99,5%)	Fluka, Buchs, Schweiz
Sodiumdodecylsulfat (SDS) p.a.	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Tween <sup>®</sup> 20	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Geräteliste:

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Aeroneb <sup>®</sup> Pro	Aerogen, Dangan, Galway, Irland
Dichtemesser	DMA 4100 M, Anton Paar, Graz, Österreich
eFlow <sup>®</sup> rapid	PARI, Starnberg, Deutschland
Ubbelohde- Kapillarviskosimeter	Schott, Mainz, Deutschland
Laserdiffraktometer	Sympatec, Clausthal- Zellerfeld, Deutschland
Leitfähigkeitsmesser	FE30, Five Easy, Mettler- Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Tensiometer	Easy Dyne, KRÜSS GmbH, Hamburg, Deutschland
Ultraschallbad (Sonorex TK30)	Bandeln electronic, Berlin, Deutschland
Waage	Mettler- Toledo GmbH, Gießen, Deutschland

### *Elektrolytkonzentration*

Zur Untersuchung des Einflusses variierender Elektrolytkonzentrationen wurden NaCl-Lösungen über einen Konzentrationsbereich von ~0,02- 154 mmol/l (1 µg/ml- 9 mg/ml (m/v)) vernebelt. Des Weiteren erfolgte die Verneblung von Lösungen der schwächeren Elektrolyte Natriumacetat ~0,12- 122 mmol/l (1 µg/ml- 10 mg/ml (m/v)), Natriumcitrat ~0,003- 3,4 mmol/l (1 µg/ml- 300 mg/ml (m/v)) und Glycin ~1,3- 2663 mmol/l (0,1 mg/ml- 200 mg/ml (m/v)). Die Leitfähigkeit der Elektrolyte wurde in einem Konzentrationsbereich von 0,001 mg/ml bis 10 mg/ml bei einer Umgebungstemperatur von 20° gemessen. Die Kontrolle wurde mit Aq. dest. durchgeführt. Die Messung jeder Konzentration erfolgte mit drei Wiederholungen ( $n = 4$ ).

### *Oberflächenspannung*

Für die Bereitstellung von Flüssigkeiten unterschiedlicher Oberflächenspannung wurden folgende oberflächenaktive Agenzien eingesetzt: Tween<sup>®</sup>20 als nicht-ionisches Tensid, Natriumlaurylsulfat (SDS) als Beispiel eines anionischen Tensids, Benzalkoniumchlorid als kationisches Tensid, sowie Empigen<sup>®</sup>BB als amphoterer Tensid. Die Messung der Oberflächenspannung erfolgte nach der Du-Noüy-Ringmethode. Dabei wurden die Tenside in aufsteigenden Konzentrationen von durchschnittlich 0,001 mg/ml bis 10 mg/ml bei 20° C sowie 25° C gemessen (für jede Konzentration  $n=4$ ). Die kritische Mizellenbildungskonzentration wurde für jedes Tensid ermittelt (*cmc*, *critical micelle concentration*). Diese bezeichnet die Konzentration, ab dieser durch eine weitere Steigerung der Tensidkonzentration die Oberflächenspannung nicht weiter gesenkt wird. Zur Berechnung der *cmc* werden aus der Kurve der Oberflächenspannungswerte die Werte im konzentrationsabhängigen und im konstanten Bereich linear extrapoliert. Am Schnittpunkt dieser Geraden befindet sich die *cmc* (Software: Origin 8.0, OriginLab, Northampton, USA; Quelle: Herstellerangaben Easy Dyne, KRÜSS GmbH, Hamburg, Deutschland).

### *Viskosität*

Flüssigkeiten steigender Viskosität wurden durch Lösung von Saccharose in Aq. dest. in Konzentrationen von ~30- 1022 mmol/l (1% (m/v)- 40% (m/v)) repräsentiert. Saccharose ermöglicht eine Modifizierung der Viskosität bei weitgehend konstanter Oberflächenspannung (Mc Callion und Patel 1996). Zusätzlich wurden die Viskositätseffekte von Natriumcitratlösungen in höherem Konzentrationsbereich evaluiert. Mit einem Ubbelohde- Kapillarviskosimeter wurden die Durchflusszeiten von Wasser, sowie von Saccharoselösungen in den Konzentrationen 2,5%, 3,33%, 5%, und 10% (m/v) gemessen. Durch Einsetzen der Werte für die kinematische Viskosität von Wasser (1,02 mPas bei 20° bzw. 0,91 mPas bei 25°; Quelle: DIPPR<sup>®</sup> 801) in (1)  $K = v / t_{(korrt)}$  ( $K$  = Kapillarkonstante,  $v$  = kinematische Viskosität,  $t_{(korrt)}$  = korrigierte Durchflusszeit) wurde die Kapillarkonstante ermittelt. Die korrigierte Durchflusszeit  $t$  ergab sich nach Subtraktion des Hagenbach-Korrekturfaktors von den gemessenen Durchflusszeiten. Die kinematische Viskosität der untersuchten Lösungen wurde dann nach (2)  $v = t_{(korrt)} * K$  ( $K$  = Kapillarkonstante,  $v$  = kinematische Viskosität,  $t_{(korrt)}$  = korrigierte Durchflusszeit) be-

rechnet. Nach Bestimmung der Dichtewerte der Lösungen wurde die dynamische Viskosität nach (3)  $\eta = \nu * \rho$  ( $\nu$  = kinematische Viskosität,  $\rho$  = Dichte) berechnet. Die Messungen wurden für jede Konzentration mit drei Wiederholungen ( $n = 4$ ) bei 20° und 25° durchgeführt.

### *Verneblung der Lösungen*

Die Bestimmung der Aerosolparameter erfolgte mittels Laserdiffraktometrie (s. Kap. 1, Methoden 2.2.1). Für beide Vernebler erfolgte vorab eine Charakterisierung mit isotoner Kochsalzlösung. Für die Untersuchung der verschiedenen Lösungen wurden jeweils 6 ml in das Verneblerreservoir gefüllt. Die Verneblungsdauer betrug fünf Minuten. Die laserdiffraktometrische Bestimmung der Aerosolparameter erfolgte nach einer Minute Verneblungsdauer ( $n = 6$ ). Jede Konzentration wurde mit drei Wiederholungen vernebelt ( $n = 4$ ).

### **3.2.3 Statistische Untersuchungen**

Die Berechnungen der beschreibenden Statistik erfolgten mit Microsoft Excel 2010. Alle Messungen wurden mind. mit drei Wiederholungen durchgeführt ( $n \geq 4$ ). Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

### 3.3 Ergebnisse

#### 3.3.1 Charakterisierung der Vernebler mit isotoner Kochsalzlösung

Zur Charakterisierung der Vernebler erfolgte die Verneblung von isotoner Kochsalzlösung. Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse der Laserdiffraktometrie.

Tabelle 4: Aerosolparameter bei Verneblung von isotoner Kochsalzlösung mit zwei Mikropumpenverneblern.

Vernebler	$d_a^1$ [ $\mu\text{m}$ ]	GSD <sup>2</sup>	FPF <sup>3</sup> [%]
Aeroneb <sup>®</sup> Pro	$4.9 \pm 0.2$	$1.94 \pm 0.07$	$53.9 \pm 1.0$
eFlow <sup>®</sup> rapid	$4.7 \pm 0.1$	$1.63 \pm 0.01$	$60.8 \pm 1.4$

Darstellung der Werte als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 4$ ). <sup>1</sup>aerodynamischer Durchmesser, <sup>2</sup>geometrische Standardabweichung, <sup>3</sup>Feinpartikelfraktion.

#### 3.3.2 Effekt der Elektrolytkonzentration auf die Aerosolpartikelgrößen

Um den Effekt der Elektrolytkonzentration auf die Aerosolpartikeldurchmesser zu evaluieren, wurden Lösungen von starken (NaCl) und schwachen (Natriumacetat, Glycin, Natriumcitrat) Elektrolyten in aufsteigenden Konzentrationen vernebelt. Abb. 9 stellt die ermittelten Leitfähigkeiten und die Aerosolpartikelgrößen während der Verneblung dar. Bei Auswahl des Konzentrationsbereiches für NaCl (A) war auffällig, dass eine Mindestelektrolytkonzentration notwendig war, um Aerosol zu erzeugen. Die Verneblung von destilliertem Wasser ohne Zugabe von Elektrolyt war nicht möglich.



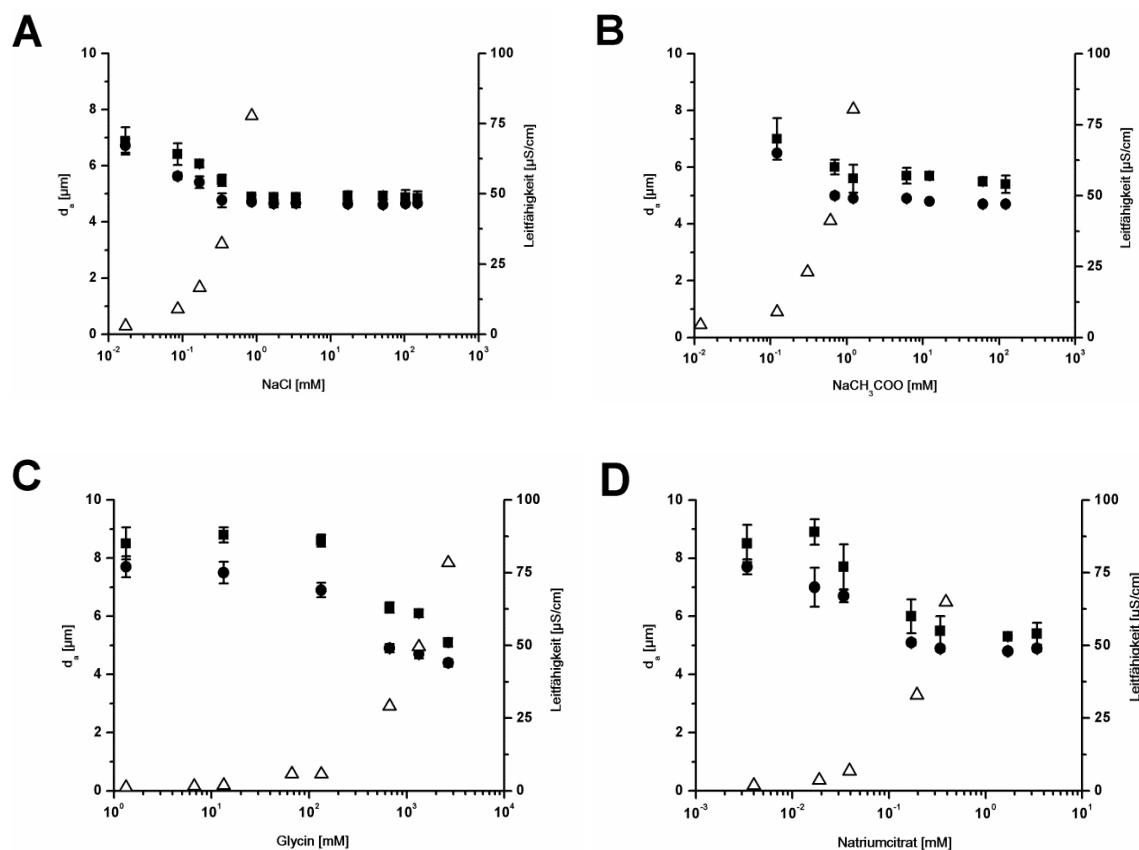


Abb. 9: Aerosolpartikeldurchmesser des Aeroneb<sup>®</sup> Pro (Quadrate) und des eFlow<sup>®</sup> rapid (Punkte) bei Verneblung von Lösungen ansteigender Elektrolytkonzentration; NaCl (A), NaAcetat (B), Glycin (C), Natriumcitrat (D). Mitaufgeführt ist die Leitfähigkeitskurve der Elektrolyte (Dreieckssymbole). Darstellung der Werte als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 4$ ).

Die Steigerung der Elektrolytkonzentration führte im geringen Konzentrationsbereich bei beiden Verneblern zu einer kontinuierlichen Abnahme der erzeugten VMD. Dieser Effekt war sowohl bei beiden Verneblern, als auch bei jeder der vernebelten Substanzen zu beobachten (A-D). Für NaCl (A) zeigte sich für den Aeroneb<sup>®</sup> Pro eine Abnahme der VMD von  $6,9 \pm 0,49 \mu\text{m}$  auf  $4,9 \pm 0,06 \mu\text{m}$  im Konzentrationsbereich von  $\sim 0,02 \text{ mM}$  bis  $\sim 1 \text{ mM}$ , danach blieben die VMD konstant. Entsprechend verhielten sich die VMD des eFlow<sup>®</sup> rapid, die VMD nahmen von  $6,7 \pm 0,25 \mu\text{m}$  auf  $4,7 \pm 0,09 \mu\text{m}$  ab. In diesem Konzentrationsbereich stieg die Leitfähigkeit von  $\sim 3 \mu\text{S/cm}$  auf  $\sim 80 \mu\text{S/cm}$ . Eine weitere Steigerung der Leitfähigkeit auf bis zu  $\sim 13 \text{ mS/cm}$  für NaCl 0,9 % führte zu keiner weiteren Reduktion der Aerosolpartikeldurchmesser. Für Natriumacetat, Glycin und Natriumcitrat waren höhere Elektrolytkonzentrationen erforderlich, um entspre-

chende VMD zu erzielen (B-D). Der Aeroneb<sup>®</sup> Pro erzeugte erst ab Konzentrationen von ~100 mM Natriumacetat (B), 2600 mM Glycin (C), bzw. ~2 mM Natriumcitrat (D) ein Aerosol mit einem VMD  $\leq 5\mu\text{m}$ . Der eFlow<sup>®</sup> *rapid* dagegen benötigte für VMD entsprechender Größe nur Konzentrationen von ~1mM Natriumacetat (B), ~600 mM Glycin (C), bzw. ~1mM Natriumcitrat (D). Tabelle 5 stellt die Leitfähigkeitswerte der Elektrolytkonzentrationen, ab diesen VMD  $\leq 5\mu\text{m}$  generiert wurden, gegenüber:

Tabelle 5: Leitfähigkeiten der Mindestelektrolytkonzentrationen für die Erzeugung von Aerosolpartikeldurchmessern  $\leq 5\mu\text{m}$  bei Verneblung mit dem Aeroneb<sup>®</sup> Pro, bzw. eFlow<sup>®</sup> *rapid*.

<b>Elektrolytlösung</b>	<b>Aeroneb<sup>®</sup> Pro</b>	<b>eFlow<sup>®</sup> <i>rapid</i></b>
NaCl	~80 $\mu\text{S/cm}$	~20 $\mu\text{S/cm}$
Natriumacetat	~7 mS/cm	~40 $\mu\text{S/cm}$
Glycin	~80 $\mu\text{S/cm}$	~30 $\mu\text{S/cm}$
Natriumcitrat	~300 $\mu\text{S/cm}$	~30 $\mu\text{S/cm}$

Bei Verneblung mit dem eFlow<sup>®</sup> *rapid* waren für alle eingesetzten Elektrolytlösungen Konzentrationen mit niedrigeren Leitfähigkeiten erforderlich als für den Aeroneb<sup>®</sup> Pro. Für die Erzeugung eines Aerosols mit VMD  $\leq 5\mu\text{m}$  mit dem eFlow<sup>®</sup> *rapid* war bei jeder der Elektrolytlösungen eine Leitfähigkeit von ca. 30  $\mu\text{S/cm}$  erforderlich. Beim Aeroneb<sup>®</sup> Pro stimmten die Leitfähigkeitswerte nur für NaCl und Glycin überein. Für Natriumacetat und Natriumcitrat waren sehr hohe Elektrolytkonzentrationen und dementsprechend hohe Leitfähigkeitswerte erforderlich, um entsprechende VMD zu erzielen.

### 3.3.3 Effekt von Oberflächenspannung auf Aerosolpartikelgrößen

Um den Effekt von unterschiedlicher Oberflächenspannung der Verneblungslösung zu erfassen, wurden Verdünnungen von Tween<sup>®</sup>20 (nicht-ionisches Tensid), Natriumlaurylsulfat (SDS) (anionisch), Benzalkoniumchlorid (kationisch) und Empigen<sup>®</sup>BB (zwitterionisch) vernebelt. Der Bereich der Oberflächenspannung reichte dabei von ~72 mN/m (entsprechend A. dest.) bis ~35 mN/m. Abbildung 10 zeigt die Ergebnisse der Partikelgrößenmessung mittels Laserdiffraktometrie.

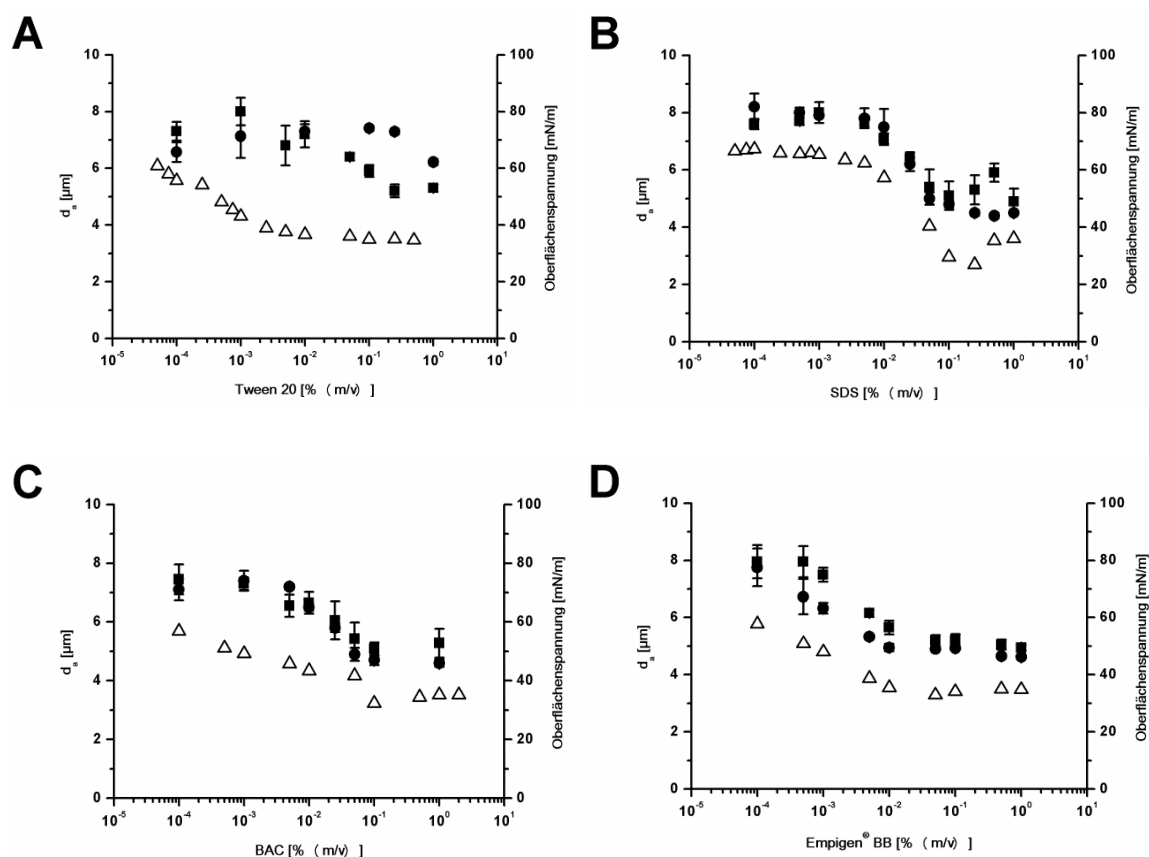


Abb. 10: Aerosolpartikeldurchmesser des Aeroneb<sup>®</sup> Pro (Quadrate) und des eFlow<sup>®</sup> rapid (Punkte) bei Verneblung von Surfactants ansteigender Konzentrationen, Tween<sup>®</sup>20 (A), SDS (B), Benzalkoniumchlorid (C) und Empigen<sup>®</sup>BB (D) Mitgeführt ist die Oberflächenspannungskurve der Surfactants (Dreieckssymbole). Darstellung der Werte als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 4$ ).

Mit beiden Verneblern ließ sich aus den eingesetzten Tensidlösungen Aerosol erzeugen. Die Konzentrationssteigerung von Tween<sup>®</sup>20 (A) hatte keinen eindeutigen Effekt auf die Aerosolpartikeldurchmesser. Ab Konzentrationen von  $\sim 0,1$  % bzw. Oberflächenspannungswerten von  $\sim 42$  mN/m schwankten die erzeugten VMD beider Vernebler jedoch weniger stark als bei der Verneblung geringerer Tensidkonzentrationen. Im Gegensatz dazu wurde bei den ionischen Tensiden (B, C, D) eine Abnahme der VMD bei Steigerung der Tensidkonzentrationen festgestellt. Ab einer bestimmten Konzentration nahmen die erzeugten VMD nicht weiter ab, sondern blieben konstant (B, C, D). Tenside kann man anhand der Konzentration charakterisieren, ab der durch weitere Zugabe von Tensid die Oberflächenspannung nicht weiter gesenkt wird; die Kritische Mizellenbildungskonzentration (CMC). Um festzustellen, ob ein Zusammenhang besteht zwi-

schen der CMC der Tenside und der niedrigsten Konzentration, die zur Erzeugung von konstanten VMD führte, erfolgte die Gegenüberstellung in Tabelle 6:

Tabelle 6: Vergleich der Kritischen Mizellenbildungskonzentration (CMC) der Surfactants bei  $\sim 25^\circ$  mit den Mindestkonzentrationen für die Erzeugung konstanter VMD.

Surfactant	CMC <sup>1</sup> [ mg/ml]	CMC <sup>2</sup> [mg/ml]	C <sup>3</sup> [mg/ml]	
			Aeroneb <sup>®</sup> Pro	eFlow <sup>®</sup> rapid
TWEEN <sup>®</sup> 20	0,02	0,06		n.b.
SDS	1,9	2	0,7	0,5
BAC	0,9	~ 0,8	0,9	0,8
EMPIGEN <sup>®</sup> BB	0,4	0,6	0,4	0,1

Darstellung der Werte als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 4$ ). CMC<sup>1</sup> = im Rahmen dieser Arbeit ermittelte Werte; CMC<sup>2</sup> = Literaturwerte für die CMC (Mc Callion et al. 1996a; Krase 2003; Herstellerangaben); C<sup>3</sup> = Mindestkonzentration für konstante VMD; n.b. = nicht bestimmt.

Es zeigt sich eine gute Übereinstimmung der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Werte für die CMC und den Literaturwerten. Bei der Verneblung von Tween<sup>®</sup>20 im untersuchten Konzentrationsbereich konnten mit beiden Verneblern keine konstanten Werte für die VMD gemessen werden. Die C<sup>3</sup> konnte daher nicht bestimmt werden. Bei der Verneblung von Benzalkoniumchlorid stimmten die CMC<sup>1</sup> und die C<sup>3</sup> beider Vernebler überein: CMC<sup>1</sup>, C<sup>3</sup>  $\sim$  0,9 mg/ml. Für Empigen<sup>®</sup>BB waren die benötigten C<sup>3</sup> am niedrigsten. Es zeigte sich eine Übereinstimmung für die Aerosolpartikeldurchmesser des Aeroneb<sup>®</sup>Pro (CMC<sup>1</sup>, C<sup>3</sup> = 0,4 mg/ml), für den eFlow<sup>®</sup>rapid waren die VMD bereits ab einer Konzentration 0,1 mg/ml konstant. Für das negativ geladene SDS lag die c<sup>3</sup> für die Vernebler unterhalb der ermittelten CMC des Surfactants.

Da eine Reduktion der Aerosolpartikeldurchmesser nur für die ionischen Tenside feststellbar war, wurde deren Leitfähigkeit als weiterer Einflussfaktor herangezogen und quantifiziert. Abbildung 11 zeigt die VMD und den Verlauf der Leitfähigkeitskurven der Tenside.

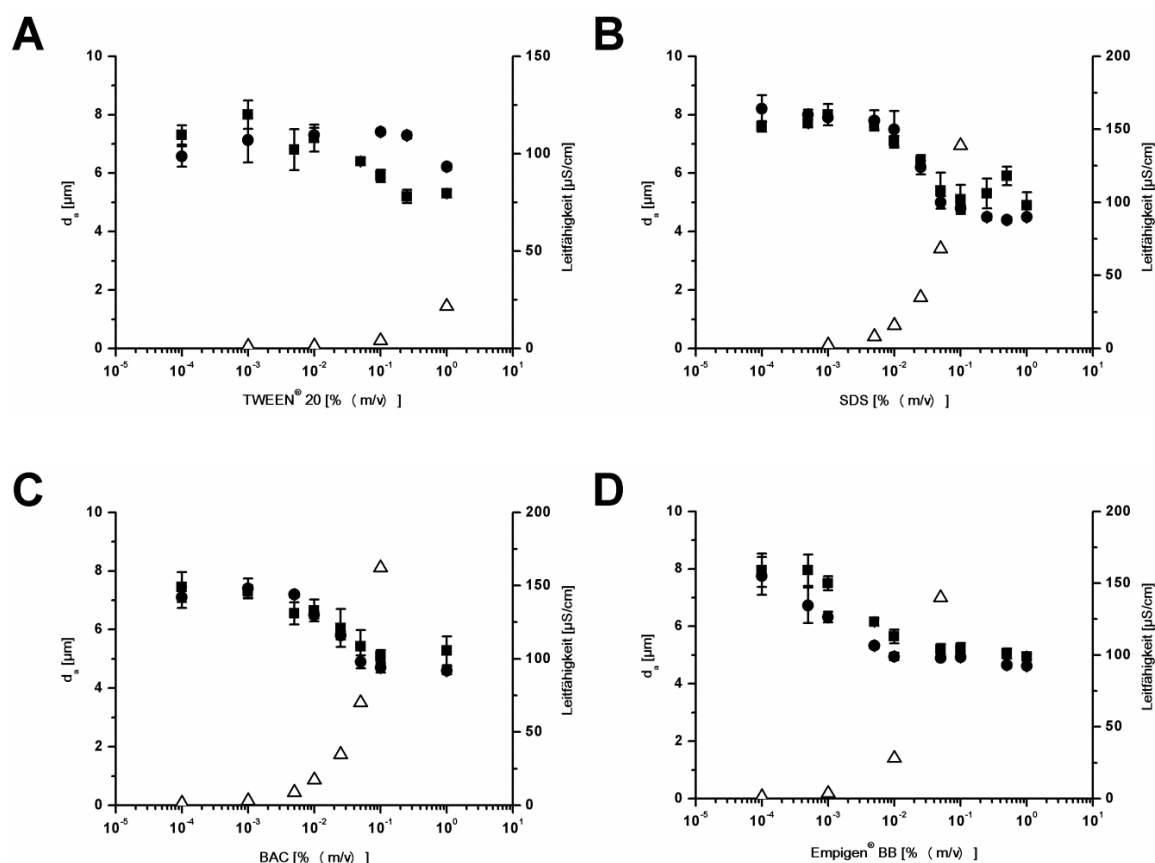


Abb. 11: Aerosolpartikeldurchmesser des Aeroneb<sup>®</sup> Pro (Quadrate) und des eFlow<sup>®</sup> rapid (Punkte) bei Verneblung von Surfactants ansteigender Konzentration, Tween<sup>®</sup>20 (A), SDS (B), Benzalkoniumchlorid (C) und Empigen<sup>®</sup>BB (D). Mitaufgeführt ist die Leitfähigkeitskurve der Surfactants (Dreieckssymbole). Darstellung der Werte als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 4$ ).

Die höchsten Leitfähigkeitswerte im gemessenen Konzentrationsbereich wurden für das zwitterionische Tensid Empigen<sup>®</sup>BB ermittelt (D). Die Betrachtung der generierten Aerosolpartikeldurchmesser bei der Verneblung der ionischen Tenside deutet auf die Wichtigkeit des Einflusses der Leitfähigkeit auf die Reduktion der VMD hin. Ab Leitfähigkeitswerten von  $\sim 70 \mu\text{S}$  bei Verneblung von SDS und BAC (B, C) wurden mit beiden Verneblern  $VMD \leq 5 \mu\text{m}$  generiert. Bei der Verneblung von Empigen<sup>®</sup>BB (D) erzeugte der Aeroneb<sup>®</sup> Pro erst ab  $\sim 140 \mu\text{S}$ , der eFlow<sup>®</sup> rapid bereits ab  $\sim 30 \mu\text{S}$  Aerosolpartikel dieser Größenordnung.

### 3.3.4 Effekt der Viskosität auf die Aerosolpartikeldurchmesser

Die Viskositätseffekte wurden durch die Verneblung von Saccharose- und Natriumcitratlösungen quantifiziert. Bei den physikochemischen Eigenschaften von Natriumcitrat steht im niedrigen Konzentrationsbereich die Leitfähigkeit im Vordergrund, während höhere Konzentrationen zunehmend viskös sind. Abbildung 12 zeigt die generierten Aerosolpartikeldurchmesser bei der Verneblung von Saccharose und Natriumcitrat in aufsteigenden Konzentrationen bei gleichzeitiger Betrachtung der Viskositätswerte der Lösungen.

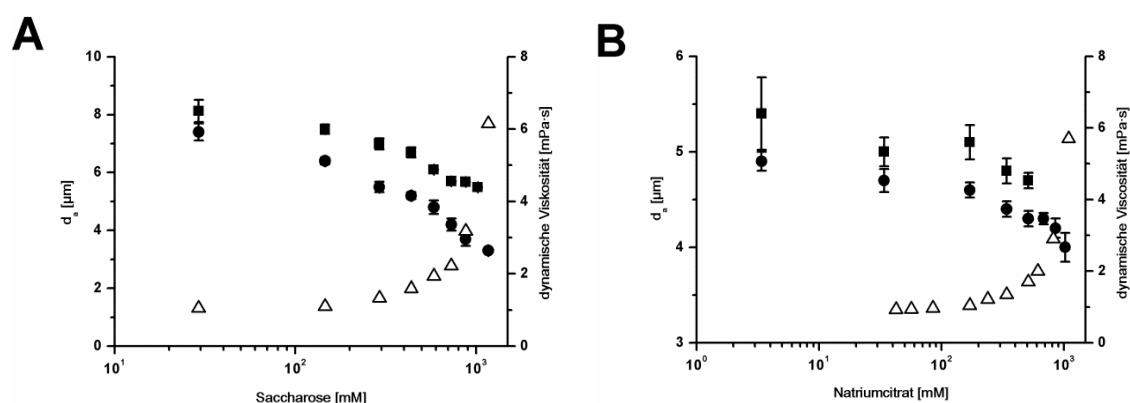


Abb. 12: Aerosolpartikeldurchmesser des Aeroneb<sup>®</sup> Pro (Quadrate) und des eFlow<sup>®</sup> rapid (Punkte) bei Verneblung von Saccharoselösungen (A), bzw. Natriumcitratlösungen (B) ansteigender Konzentration. Mitaufgeführt ist die Viskositätskurve der Lösungen (Dreieckssymbole). Darstellung der Werte als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 4$ ).

Für beide Vernebler ist eine deutliche Abnahme der VMD bei steigender Lösungskonzentration, bzw. zunehmender Viskosität feststellbar. Die Aerosolpartikel des eFlow<sup>®</sup> rapid wiesen über den gesamten Konzentrationsbereich geringere Durchmesser auf als die des Aeroneb<sup>®</sup> Pro. Mit dem eFlow<sup>®</sup> rapid konnten Saccharoselösungen einer Viskosität von  $\sim 6$  cP vernebelt werden, wohingegen der Aeroneb<sup>®</sup> Pro nur Saccharoselösungen einer Viskosität von max. 2 cP vernebelte (A). Dementsprechend konnte für den eFlow<sup>®</sup> rapid durch Steigerung der Viskosität von  $\sim 1$  cP auf  $\sim 6$  cP eine Abnahme der VMD von  $7,4 \pm 0,3 \mu\text{m}$  auf  $3,3 \pm 0,1 \mu\text{m}$  festgestellt werden (A); für den Aeroneb<sup>®</sup> Pro war die Viskosität nur um  $\sim 1$  cP steigerbar, der Effekt auf die Partikeldurchmesser entsprechend geringer von  $8,1 \pm 0,2 \mu\text{m}$  auf  $6,7 \pm 0,1 \mu\text{m}$ . Die Verneblung von Natriumcitrat erzielte im niedrigen Konzentrationsbereich kleinere Aerosolpartikel als Sac-

charose. Dies wird auf die elektrische Leitfähigkeit der Lösung zurückgeführt (B und Abb. 9 D). Im Konzentrationsbereich von  $\sim 0,2$  mM bis  $\sim 200$  mM wurden mit dem eFlow<sup>®</sup>rapid annähernd konstante VMD erzielt (B und Abb. 9 D). Die darauffolgende weitere Reduktion der VMD von  $4,6 \pm 0,08$   $\mu\text{m}$  auf  $4,0 \pm 0,15$   $\mu\text{m}$  im Konzentrationsbereich bis  $\sim 1000$  mM wird daher als Viskositätseffekt gedeutet.

### 3.4 Diskussion

#### *Besonderheiten der Mikropumpentechnologie bei der Verneblung von Flüssigkeiten unterschiedlicher physikochemischer Eigenschaften*

Der Einfluss von Additiven, welche die physikochemischen Eigenschaften der Verneblungslösung beeinflussen, auf die Aerosolerzeugungstechnologie ist bisher vor allem von der Düsen- und Ultraschallverneblung bekannt (Davis 1978; McCallion et al. 1995; Mc Callion und Patel 1996; Finlay et al. 2000; Steckel 2003; Ghazanfari et al. 2007; Beck-Broichsitter et al. 2012b). In dieser Arbeit wurden Leitfähigkeit, Viskosität, und Oberflächenspannung als Einflussfaktoren für die Mikropumpenverneblung evaluiert. Als Zielgröße wurden die VMD der Vernebler betrachtet, da die Partikelgröße in Bezug auf die Deposition im Respirationstrakt eine entscheidende Rolle spielt (Heyder 2004). Die Aerosolanalyse erfolgte mittels Laserdiffraktometrie, die als eine bewährte Methode zur Erfassung der Aerosolpartikeldurchmesser bekannt ist (Clark 1995). Die in dieser Arbeit verwendeten Mikropumpenvernebler generierten Aerosol über einen breiten Konzentrationsbereich der untersuchten Lösungen, wobei die VMD des Aeroneb<sup>®</sup> Pro durchgehend etwas größere Durchmesser als die des eFlow<sup>®</sup>rapid aufwiesen (Abb. 9-12). Die Experimente mit NaCl in aufsteigender Konzentration ergaben, dass eine Mindestkonzentration an Elektrolyt für die Erzeugung von Aerosol vorhanden sein muss, da sich aus Aq. dest. kein Aerosol erzeugen ließ (Abb. 9 A). Dies stimmt nicht mit den Ergebnissen von Ghazanfari et al. 2007 überein, die mit dem Aeroneb<sup>®</sup> Pro aus deionisiertem Wasser Aerosol erzeugen konnten. Düsen- und Ultraschallvernebler erzeugen dagegen aus deionisiertem Wasser Aerosol (Mc Callion und Patel 1996; Mc Callion et al. 1996a). Aus den Verneblungsversuchen bezüglich des Einflusses der Oberflächenspannung ging hervor, dass sich die Mikropumpenvernebler für die Verneblung von Surfactants in hoher Konzentration eignen (Abb. 10), während bei der Düsenverneblung Schaumbildung zu beobachten war (Mc Callion et al. 1996a). Dagegen war die Aeroso-

lerzeugung bei Verneblung visköser Lösungen limitiert. Der Aeroneb<sup>®</sup> Pro- Vernebler konnte aus Lösungen mit Viskositätswerten  $\geq 2$  cP kein Aerosol produzieren (Abb. 12), was die Ergebnisse von Ghazanfari et al. 2007 und Beck-Broichsitter et al. 2012b bestätigte. Mit dem eFlow<sup>®</sup> rapid waren auch Flüssigkeiten mit Viskositätswerten von 6 cP vernebelbar (Abb. 11). Auf diesen Viskositätsbereich ist auch die Aerosolproduktion mit Ultraschallverneblern begrenzt, wohingegen Düsenvernebler auch vielfach visköse-re Lösungen vernebeln können (Mc Callion und Patel 1996). Die in dieser Arbeit untersuchten Vernebler funktionieren beide nach dem Prinzip der Mikropumpentechnologie, weisen jedoch einige Unterschiede bezüglich der Materialkomposition der Membran, des Perforationsverfahrens, der Porenanzahl- und Geometrie und der Schwingungsfrequenz auf (Abb. 7, 8 und Dhand 2002; Scott Borland et al. 2001; Knoch und Keller 2005; Zhang et al. 2007). Diese strukturellen und funktionellen Unterschiede könnten eine Ursache für die hier beobachteten Differenzen der Vernebler darstellen.

#### *Effekte von Leitfähigkeit, Oberflächenspannung und Viskosität*

Der Trend zur Reduktion der generierten Aerosolpartikeldurchmesser bei Steigerung der Elektrolytkonzentration und damit der Leitfähigkeit war bereits von Ghazanfari et al. 2007 und Zhang et al. 2007 beschrieben worden. In der vorliegenden Arbeit konnte nun für die verwendeten Elektrolyte ein enger Konzentrationsbereich definiert werden, dessen Variation die erzeugten VMD beeinflusst (Abb. 9). Für die pulmonale Deposition von therapeutischen Aerosolen werden Aerosolpartikeldurchmesser von 1- 5  $\mu\text{m}$  als geeignet angesehen (Heyder 2004; Carvalho et al. 2011). Daher wurden die Leitfähigkeitswerte der Mindestkonzentrationen, die die Erzeugung von  $\text{VMD} \leq 5 \mu\text{m}$  ermöglichen, verglichen (Tab. 5). Für den eFlow<sup>®</sup> rapid konnten übereinstimmende Leitfähigkeitswerte von etwa 30  $\mu\text{S}$  mit jeder der vernebelten Elektrolytlösungen gefunden werden. Diese Übereinstimmung war bei dem Aeroneb<sup>®</sup> Pro nur für NaCl und Glycin bei  $\sim 80 \mu\text{S}$  gegeben. Für Natriumcitrat war der benötigte Leitfähigkeitswert viel höher (Abb. 9 D). Zurückgeführt wird diese Beobachtung auf die Eigenschaft von Natriumcitrat, neben der Leitfähigkeit auch die Viskosität einer Lösung zu beeinflussen. Im Fall von Natriumacetat war eine Reduktion der VMD des Aeroneb<sup>®</sup> Pro auf  $\sim 5 \mu\text{m}$  nur mit einer hohen Elektrolytkonzentration möglich (Abb. 9 B). Diese Ergebnisse deuten auf die Möglichkeit hin, die VMD von Mikropumpenverneblern für therapeutische Aerosole zu optimieren, indem eine Mindestleitfähigkeit der Verneblungslösung eingestellt



wird. Der Effekt der Oberflächenspannung auf die generierten VMD war durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente nicht klar erkennbar, da eine Reduktion der VMD nur bei den leitenden Tensiden festgestellt wurde (Abb. 10). Diese Ergebnisse ergänzen und bestätigen die Versuche von Ghazanfari et al. 2007, die auch keinen klaren Trend der VMD bei den Oberflächenspannungsexperimenten erkennen konnten. Die erwartete Übereinstimmung der CMC der Tenside und der Mindestkonzentration, ab der konstante Aerosolpartikeldurchmesser generiert werden, konnte nur für Benzalkoniumchlorid gefunden werden (Tab. 6). Eine Erklärung bietet die Theorie von Zhang et al., wonach die Diffusionsdauer der Tensidmoleküle zu hoch ist, um unter der hohen Vibrationsfrequenz der Verneblermembran eine relevante Oberflächenspannungsreduktion hervorzurufen. Es wird angenommen, dass die Leitfähigkeit der ionischen Tenside der entscheidende Faktor für die Partikelreduktion ist (Abb. 11). Diese Annahme wird unterstützt durch die Übereinstimmung der Leitfähigkeitsbereiche von vernebelten Elektrolyt- und Tensidkonzentrationen für die Erzeugung von pulmonal deponierbaren VMD (Abb. 9 und Abb. 11). Die geringe Abnahme der VMD bei der Verneblung hoher Konzentrationen von Tween<sup>®</sup>20 (Abb. 10A, 11A) wird auf kontaminationsbedingte Leitfähigkeit der Lösung zurückgeführt. Die Erzeugung von kleineren VMD als Effekt der Viskosität war vor allem mit dem eFlow<sup>®</sup>rapid zu erfassen, da mit dem Aeroneb<sup>®</sup> Pro nur Lösungen bis ~2 cP vernebelbar waren (Abb. 12). Diese Ergebnisse ergänzen die Untersuchungen von Ghazanfari et al. 2007 und Zhang et al. 2007, die eine Reduktion der VMD des Aeroneb<sup>®</sup> Pro bei steigender Viskosität registriert hatten. Die Viskositätsexperimente wurden mit einer nichtleitenden Lösung (Saccharose) und einer Elektrolytlösung durchgeführt. Die Generation von kleineren VMD durch den Aeroneb<sup>®</sup> Pro und den eFlow<sup>®</sup>rapid mit der Elektrolytlösung bei vergleichbaren Viskositätswerten bestätigt wiederum die Leitfähigkeit als bedeutenden Einflussfaktor (Abb. 12). Da die in dieser Arbeit verwendeten Additive nur zum Teil für die pulmonale Applikation geeignet sind (Chow et al. 2007), müssen für die Anwendung in der Inhalationstherapie die physikochemischen Eigenschaften durch biokompatible Zusatzstoffe eingestellt werden.

### *Schlussfolgerungen*

Die Untersuchungen dieser Arbeit konnten den Einfluss physikochemischer Eigenschaften der Verneblungslösung auf die Aerosolerzeugung mit Mikropumpenverneblern

quantifizieren. Die Leitfähigkeit und die Viskosität einer Lösung wurden als bedeutende Einflussfaktoren erfasst. Ein Effekt variierender Oberflächenspannungen konnte dagegen nicht festgestellt werden. Die Mikropumpentechnologie unterscheidet sich in diesen Ergebnissen von der Düsen- und Ultraschalltechnologie. Ebenso wurden Unterschiede zwischen den untersuchten Mikropumpenverneblern bezüglich der Aerosolzeugung aus Lösungen unterschiedlicher physikochemischer Eigenschaften gefunden. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Wichtigkeit der Kompatibilität von gewähltem Vernebler und der zu vernebelnden Formulierung. Durch Einstellung der physikochemischen Eigenschaften der Verneblungslösung können die Parameter therapeutischer Aerosole, und damit ein entscheidender Faktor für die pulmonale Deposition, beeinflusst werden. Es eröffnet sich somit eine weitere Möglichkeit, die Inhalationstherapie durch Bereitstellung geeigneter Aerosole zu optimieren.

## 4 Zusammenfassung

Die Inhalationstherapie bietet eine attraktive Alternative der Medikamentenapplikation für lokale und systemische Erkrankungen. Eine Möglichkeit zur Erzeugung therapeutischer Aerosole ist die Verneblung von Flüssigkeiten. Dabei gilt es, aktuell bestehende Nachteile wie unsichere Dosierung und hohe Frequenz der Inhalationen zu überwinden. Dafür stellen die Optimierung der Aerosolerzeugungstechnologie und die Entwicklung geeigneter Medikamentenformulierungen vielversprechende Ansätze dar. In dieser Arbeit wurde die Erzeugung von Aerosolen mittels Mikropumpentechnologie im Hinblick auf zwei unterschiedliche Aspekte untersucht. Im ersten Kapitel erfolgte die Verneblung von *Controlled-Release*-Formulierungen in Form von biokompatiblen, polymeren Nanosuspensionen mit Düsen- und Mikropumpenverneblern. Es wurde die Konzentration der Nanopartikelsuspensionen während des Verneblungsvorgangs bestimmt und die Verneblungstechnologien bezüglich ihrer Eignung für die Verneblung sensitiver Formulierungen verglichen. Bei den Düsenverneblern wurde ein ausgeprägter Konzentrationsanstieg der Nanosuspensionen registriert. Die weitere Analyse der Nanopartikel zeigte, dass Düsenverneblung zu Aggregation und Retention der Partikel im Verneblerreservoir führte. Mit den Mikropumpenverneblern wurden weder Aufkonzentrierung oder Partikelaggregation festgestellt, sodass sich diese Technologie für die Verneblung von Nanosuspensionen eignet. Die Stabilität von Nanosuspensionen über einen langen Zeitraum ist begrenzt. Gefriertrocknung stellt eine Möglichkeit dar, die Haltbarkeit zu erhöhen. Dabei werden Additive hinzugefügt, welche die physikochemischen Eigenschaften beeinflussen können. Da der Einfluss unterschiedlicher physikochemischer Eigenschaften der Verneblungslösung auf die Aerosolparameter von der Düsen- und Ultraschallverneblung bekannt ist, wurde im zweiten Kapitel dieser Einfluss auf die Mikropumpentechnologie untersucht. Es erfolgte die Verneblung von Lösungen mit einer weiten Spanne an Elektrolytkonzentration, Oberflächenspannung und Viskosität mit zwei Mikropumpenverneblern und die Evaluation der Aerosolpartikeldurchmesser mittels Laserdiffraktometrie. Dabei zeigte sich, dass die Durchmesser der generierten Aerosolpartikel vor allem von der Leitfähigkeit und, in geringerem Ausmaß, von der Viskosität der Verneblungslösung abhängen. Die benötigten Konzentrationen der Additive für die Produktion geeigneter Aerosolpartikeldurchmesser konnten quantifiziert werden. Diese Ergebnisse deuten auf eine weitere Möglichkeit hin, die Aerosolpartikeldurchmesser für die Inhalationstherapie zu optimieren. So kann durch Einstellung der

physikochemischen Eigenschaften der Verneblungsflüssigkeit einer der wichtigsten Faktoren für die Deposition im Respirationstrakt kontrolliert werden.

## Summary

Application of medicines by inhalation is a promising strategy of drug delivery for local and systemic diseases. Nebulization of fluids is known as a suitable method to produce therapeutic aerosols. However, existing drawbacks like imprecise dosing and frequent inhalations need to be revised. The development of new aerosolization technologies as well as controlled-release formulations represents an opportunity to improve treatment efficiency. The aim of this study was the investigation of two aspects of vibrating-membrane-nebulization. Chapter one evaluates the suitability of vibrating-membrane-nebulization in comparison to air jet-nebulization for aerosolization of biodegradable polymeric nanosuspensions. The suspension concentration and stability during nebulization with different nebulizer types was evaluated. Air jet-nebulization led to a significant rise in suspension concentration which caused the suspension particles to aggregate and remain in the nebulizer reservoir. In vibrating-membrane-nebulization none of these effects occurred, presenting vibrating-membrane-nebulization as the technology of choice for sensitive formulations. To guarantee long-term formulation stability controlled-release-formulations like polymeric nanosuspensions need further processing, e.g. freeze-drying. This includes the addition of excipients influencing the physicochemical properties of the nebulization fluid. The impact of physicochemical properties on aerosolization for air jet- and ultrasonic nebulization is known. Therefore, chapter two of this study investigated the impact of additives on vibrating-membrane-technology. Fluids possessing a wide range of conductivity, surface tension and viscosity were nebulized with two different vibrating-membrane-nebulizers. The produced aerosol droplet diameters were assessed by laser diffraction and correlated with the physicochemical properties of the solutions. The impact of conductivity and, to a lesser extent, viscosity was detected and the concentration of additive needed to achieve suitable droplet diameters was quantified. By adding particular amounts of conductivity or viscosity enhancers customizing of aerosol droplet diameters produced by vibrating-membrane-nebulizers seems technically feasible. As aerosol droplet diameter is an important factor for pulmonary deposition the control of its dimension by influencing the physicochemical properties of the nebulization fluid represents an opportunity to optimize inhalation therapy.

## Abkürzungsverzeichnis

c	Konzentration
CMC	Kritische Mizellenbildungskonzentration
DLS	Dynamische Lichtstreuung
FPF	Feinpartikelfraktion
GSD	Geometrische Standardabweichung
LDA	Laser-Doppler-Anemometrie
NP	Nanopartikel
MMAD	Medianer Aerodynamischer Durchmesser
PLA	Polylactide
PLGA	Poly(lactide-co-glycolide)
SD	Standardabweichung
TEM	Transelektronenmikroskopie
VMD	Geometrischer Volumendurchmesser

## Abbildungsverzeichnis

Abb.: 1 Schematische Darstellung der anatomischen Verhältnisse im menschlichen Respirationstrakt, mod. nach Hofmann 2011 .....	2
Abb. 2: Darstellung des Mikropumpenverneblers Aeroneb <sup>®</sup> Pro, Abbildung modifiziert nach Ghazanfari et al. 2007 .....	6
Abb. 3: Konzentrationszunahme einer Verneblungslösung von 5(6)-Carboxyfluoreszeïn (CF) in NaCl 0,9% (m/v) in Abhängigkeit von Verneblungsdauer und zusätzlichem Luftstrom während der Verneblung mit einem Düsen- (PARI LC SPRINT <sup>®</sup> STAR, und zwei Mikropumpenverneblern (Aeroneb <sup>®</sup> Pro, eFlow <sup>®</sup> rapid).....	22
Abb. 4: Transelektronenmikroskopische Darstellung der PLGA-NP.....	24
Abb. 5: Stabilität der poly(D, L-lactide-co-glycolide) (PLGA) Nanopartikel in der Konzentration 2mg/ml unter Verneblung mit Düsen- (PARI LC SPRINT <sup>®</sup> STAR) und Mikropumpenverneblern (Aeroneb <sup>®</sup> Pro, eFlow <sup>®</sup> rapid), erfasst mit dynamischer Lichtstreuung (DLS).....	27
Abb. 6: Einfluss der Verneblung mit einem Düsen (PARI LC SPRINT <sup>®</sup> STAR)- und zwei Mikropumpenverneblern (Aeroneb <sup>®</sup> Pro, eFlow <sup>®</sup> rapid) auf die Konzentration der poly (D, L -lactide-co-glycolide) (PLGA) Nanopartikelsuspensionen.. .....	29
Abb. 7: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der perforierten Membranen des Aeroneb <sup>®</sup> Pro und des eFlow <sup>®</sup> rapid.....	38
Abb.8: Materialanalyse der Verneblermembranen mittels energiedispersiver Röntgenspektroskopie, Aeroneb <sup>®</sup> Pro (schwarze Linie) und eFlow <sup>®</sup> rapid (graue Linie).....	38
Abb. 9: Aerosolpartikeldurchmesser des Aeroneb <sup>®</sup> Pro und des eFlow <sup>®</sup> rapid bei Verneblung von Lösungen ansteigender Elektrolytkonzentration .....	45
Abb. 10: Aerosolpartikeldurchmesser des Aeroneb <sup>®</sup> Pro und des eFlow <sup>®</sup> rapid bei Verneblung von Surfactants ansteigender Konzentration. Mitaufgeführt ist die Kurve der Oberflächenspannung .....	47
Abb. 11: Aerosolpartikeldurchmesser des Aeroneb <sup>®</sup> Pro und des eFlow <sup>®</sup> rapid bei Verneblung von Surfactants ansteigender Konzentration. Mitaufgeführt ist die Kurve der Leitfähigkeit. ....	49
Abb. 12: Aerosolpartikeldurchmesser des Aeroneb <sup>®</sup> Pro und des eFlow <sup>®</sup> rapid bei Verneblung von Saccharoselösungen, bzw. Natriumcitratlösungen ansteigender Konzentration.....	50

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Aerosolcharakteristika- und Massenausstoßwerte für die Verneblung von isotoner NaCl-Lösung mit zwei Mikropumpen- und einem Düsenvernebler. ....	20
Tabelle 2: Physikochemische Eigenschaften der Poly(lactide-co-glykolide) (PLGA) Nanopartikel (NP), ermittelt durch dynamische Lichtstreuung (DLS) und Laser-Doppler-Anemometrie (LDA).....	23
Tabelle 3: Aerosolcharakteristika und Massenausstoßwerte für die Verneblung von poly(lactide-co-glykolide) (PLGA) Nanopartikeln mit einem Düsen- und zwei Mikropumpenverneblern. ....	25
Tabelle 4: Aerosolparameter bei Verneblung von isotoner Kochsalzlösung. ....	44
Tabelle 5: Leitfähigkeiten der Mindestelektrolytkonzentrationen für die Erzeugung von Aerosolpartikeldurchmessern $\leq 5\mu\text{m}$ bei Verneblung mit dem Aeroneb <sup>®</sup> Pro, bzw. eFlow <sup>®</sup> <i>rapid</i> .....	46
Tabelle 6: Vergleich der Kritischen Mizellenbildungskonzentration (CMC) der Surfactants bei $\sim 25^\circ$ mit den Mindestkonzentrationen für die Erzeugung konstanter VMD.....	48



## Literaturverzeichnis

- Abdelwahed, Wassim; Degobert, Ghania; Stainmesse, Serge; Fessi, Hatem (2006): Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. In: *2006 Supplementary Non-Thematic Collection* 58 (15), S. 1688–1713.
- Anderson, P. J. (2001): Delivery options and devices for aerosolized therapeutics. In: *Chest* 120 (3 Suppl), S. 89S-93S.
- Arzhavitina, A.; Steckel, H. (2010): Surface active drugs significantly alter the drug output rate from medical nebulizers. In: *International Journal of Pharmaceutics* 384 (1–2), S. 128–136.
- Avgoustakis, Konstantinos (2004): Pegylated poly(lactide) and poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: preparation, properties and possible applications in drug delivery. In: *Curr Drug Deliv* 1 (4), S. 321–333.
- Barichello JM, Morishita M. Takayama K. Nagai T.: Encapsulation of Hydrophilic and Lipophilic Drugs in PLGA Nanoparticles by the Nanoprecipitation Method. In: *Drug Development & Industrial Pharmacy* Apr;25(4):471-6 1999 (Apr;25(4)), S. 471–476.
- Baumann, Romy; Glöckl, Gunnar; Nagel, Stefan; Weitschies, Werner (2012): Preparation and characterization of magnetizable aerosols. In: *Eur J Pharm Sci* 45 (5), S. 693–697.
- Beck-Broichsitter, M.; Gauss, J.; Packhaeuser, C.; Lahnstein, K.; Schmehl, T.; Seeger, W. et al. (2009): Pulmonary drug delivery with aerosolizable nanoparticles in an ex vivo lung model. In: *International Journal of Pharmaceutics* 367 (1-2), S. 169–178.
- Beck-Broichsitter, Moritz; Gauss, Julia; Gessler, Tobias; Seeger, Werner; Kissel, Thomas; Schmehl, Thomas (2010a): Pulmonary targeting with biodegradable salbutamol-loaded nanoparticles. In: *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 23 (1), S. 47–57.
- Beck-Broichsitter, Moritz; Thieme, Marcel; Nguyen, Juliane; Schmehl, Thomas; Gessler, Tobias; Seeger, Werner et al. (2010): Novel 'Nano in Nano' Composites for Sustained Drug Delivery: Biodegradable Nanoparticles Encapsulated into Nanofiber Non-Wovens. In: *Macromol. Biosci.* 10 (12), S. 1527–1535.
- Beck-Broichsitter, Moritz; Kleimann, Pia; Gessler, Tobias; Seeger, Werner; Kissel, Thomas; Schmehl, Thomas (2012a): Nebulization performance of biodegradable sildenafil-loaded nanoparticles using the Aeroneb® Pro: Formulation aspects and nanoparticle stability to nebulization. In: *International Journal of Pharmaceutics* 422 (1-2), S. 398–408.
- Beck-Broichsitter, Moritz; Kleimann, Pia; Schmehl, Thomas; Betz, Thomas; Bakowsky, Udo; Kissel, Thomas; Seeger, Werner (2012b): Impact of lyoprotectants for the stabilization of biodegradable nanoparticles on the performance of air-jet, ultrasonic, and vibrating-mesh nebulizers. In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 82 (2), S. 272–280.
- Beck-Broichsitter, Moritz; Rytting, Erik; Lehardt, Tobias; Wang, Xiaoying; Kissel, Thomas (2010b): Preparation of nanoparticles by solvent displacement for drug delivery: a shift in the "ouzo region" upon drug loading. In: *Eur J Pharm Sci* 41 (2), S. 244–253.
- Buhl, R.; Berdel, D.; Criée, C.-P; Gillissen, A.; Kardos, P.; Kroegel, C. et al. (2006): Guidelines for Diagnosis and Treatment of Asthma Patients. In: *Pneumologie* 60 (03), S. e1.

- Carvalho, Thiago C.; Peters, Jay I.; Williams, Robert O. (2011): Influence of particle size on regional lung deposition--what evidence is there? In: *Int J Pharm* 406 (1-2), S. 1–10.
- Chow, Albert H. L.; Tong, Henry H. Y.; Chattopadhyay, Pratibhash; Shekunov, Boris Y. (2007): Particle engineering for pulmonary drug delivery. In: *Pharm. Res* 24 (3), S. 411–437.
- Clark, Andrew R. (1995): The use of laser diffraction for the evaluation of the aerosol clouds generated by medical nebulizers. In: *International Journal of Pharmaceutics* 115 (1), S. 69–78.
- Clay, MichelleM; Newman, StephenP; Pavia, Demetri; Lennard-Jones, Timothy (1983): Assesment of Jet nebulisers for lung aerosol therapy. In: *Originally published as Volume 2, Issue 8350* 322 (8350), S. 592–594.
- Coates, Allan L.; Denk, Oliver; Leung, Kitty; Ribeiro, Nancy; Chan, Jeffrey; Green, Maria et al. (2011): Higher Tobramycin concentration and vibrating mesh technology can shorten antibiotic treatment time in cystic fibrosis. In: *Pediatr. Pulmonol* 46 (4), S. 401–408.
- Dailey, Lea Ann; Schmehl, Thomas; Gessler, Tobias; Wittmar, Matthias; Grimminger, Friedrich; Seeger, Werner; Kissel, Thomas (2003): Nebulization of biodegradable nanoparticles: impact of nebulizer technology and nanoparticle characteristics on aerosol features. In: *J Control Release* 86 (1), S. 131–144.
- Davis, S. S. (1978): Physico-chemical studies on aerosol solutions for drug delivery I. Water-propylene glycol systems. In: *International Journal of Pharmaceutics* 1 (2), S. 71–83.
- Dennis, J. H.; Hendrick, D. J. (1992): Design characteristics for drug nebulizers. In: *J Med Eng Technol* 16 (2), S. 63–68.
- Dennis, J. H.; Stenton, S. C.; Beach, J. R.; Avery, A. J.; Walters, E. H.; Hendrick, D. J. (1990): Jet and ultrasonic nebuliser output: use of a new method for direct measurement of aerosol output. In: *Thorax* 45 (10), S. 728–732.
- Denyer, J.; Nikander, K.; Smith, N. J. (2004): Adaptive Aerosol Delivery (AAD) technology. In: *Expert Opin Drug Deliv* 1 (1), S. 165–176.
- Denyer, John; Dyche, Tony (2010): The Adaptive Aerosol Delivery (AAD) technology: Past, present, and future. In: *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 23 Suppl 1, S. S1-10.
- Dhand, Rajiv (2002): Nebulizers that use a vibrating mesh or plate with multiple apertures to generate aerosol. In: *Respir Care* 47 (12), S. 1406-16; discussion 1416-8.
- Dolovich, Myrna B.; Ahrens, Richard C.; Hess, Dean R.; Anderson, Paula; Dhand, Rajiv; Rau, Joseph L. et al. (2005): Device selection and outcomes of aerosol therapy: Evidence-based guidelines: American College of Chest Physicians/American College of Asthma, Allergy, and Immunology. In: *Chest* 127 (1), S. 335–371.
- Dolovich, Myrna B.; Dhand, Rajiv (2010): Aerosol drug delivery: developments in device design and clinical use. In: *Lancet*.
- Elhissi, A. M. A.; Faizi, M.; Naji, W. F.; Gill, H. S.; Taylor, K. M. G. (2007): Physical stability and aerosol properties of liposomes delivered using an air-jet nebulizer and a novel micropump device with large mesh apertures. In: *International Journal of Pharmaceutics* 334 (1–2), S. 62–70.

- Farokhzad, Omid C.; Langer, Robert (2009): Impact of Nanotechnology on Drug Delivery. In: *ACS Nano* 3 (1), S. 16–20.
- Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J. Ph; Ammoury, N.; Benita, S. (1989): Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. In: *International Journal of Pharmaceutics* 55 (1), S. R1. Online verfügbar unter <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378517389902810>.
- Finlay, W. H.; Lange, C. F.; King, M.; Speert, D. P. (2000): Lung delivery of aerosolized dextran. In: *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 161 (1), S. 91–97.
- Galie, N.; Hoepfer, M. M.; Humbert, M.; Torbicki, A.; Vachiery, J.-L; Barbera, J. A. et al. (2009): Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). In: *European Heart Journal* 30 (20), S. 2493–2537.
- Gebhart, J. (1997): Methoden zur Erzeugung und Charakterisierung therapeutischer Aerosole. In: *Aerosole in der Inhalationstherapie*, S. 49–61.
- Geerken, Maik J.; Groenendijk, Max N. W.; Lammertink, Rob G. H.; Wessling, Matthias (2008): Micro-fabricated metal nozzle plates used for water-in-oil and oil-in-water emulsification. In: *Journal of Membrane Science* 310 (1–2), S. 374–383.
- Gessler, Tobias; Schmehl, Thomas; Olschewski, Horst; Grimminger, Friedrich; Seeger, Werner (2002): Aerosolized vasodilators in pulmonary hypertension. In: *J Aerosol Med* 15 (2), S. 117–122.
- Ghazanfari, T.; Elhissi, A.; Ding, Z.; Taylor, K. (2007): The influence of fluid physicochemical properties on vibrating-mesh nebulization. In: *International Journal of Pharmaceutics* 339 (1-2), S. 103–111.
- Gratzl, Manfred (Hg.) (2005): Histologie. Mit 17 Tabellen : [neue Approbationsordnung]. Unter Mitarbeit von Luiz Carlos Uchôa Junqueira und José Carneiro. 6., neu übers., überarb. und aktualisierte Aufl. Heidelberg: Springer.
- Groneberg, D. A.; Witt, C.; Wagner, U.; Chung, K. F.; Fischer, A. (2003): Fundamentals of pulmonary drug delivery. In: *Respir Med* 97 (4), S. 382–387.
- Heyder, Joachim (2004): Deposition of inhaled particles in the human respiratory tract and consequences for regional targeting in respiratory drug delivery. In: *Proc Am Thorac Soc* 1 (4), S. 315–320.
- Hofmann, Werner (2011): Modelling inhaled particle deposition in the human lung—A review. In: *Journal of Aerosol Science* 42 (10), S. 693–724.
- Hureaux, José; Lagarce, Frédéric; Gagnadoux, Frédéric; Vecellio, Laurent; Clavreul, Anne; Roger, Emilie et al. (2009): Lipid nanocapsules: Ready-to-use nanovectors for the aerosol delivery of paclitaxel. In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 73 (2), S. 239–246.
- Im Keith; Olson, E. B., JR; Wilson, N. M.; Jefcoate, C. R. (1987): Immunological identification and effects of 3-methylcholanthrene and phenobarbital on rat pulmonary cytochrome P-450. In: *Cancer Res* 47 (7), S. 1878–1882.
- Ji, C. M.; Cardoso, W. V.; Gebremichael, A.; Philpot, R. M.; Buckpitt, A. R.; Plopper, C. G.; Pinkerton, K. E. (1995): Pulmonary cytochrome P-450 monooxygenase system and Clara cell differentiation in rats. In: *Am J Physiol* 269 (3 Pt 1), S. L394-402.

Kleemann, Elke; Schmehl, Thomas; Gessler, Tobias; Bakowsky, Udo; Kissel, Thomas; Seeger, Werner (2007): Iloprost-Containing Liposomes for Aerosol Application in Pulmonary Arterial Hypertension: Formulation Aspects and Stability. In: *Pharm Res* 24 (2), S. 277–287.

Knoch, Martin; Keller, Manfred (2005): The customised electronic nebuliser: a new category of liquid aerosol drug delivery systems. In: *Expert Opin Drug Deliv* 2 (2), S. 377–390.

Kohno und Matsuoka (2004): Microfabrication and drilling using diffraction-free pulsed laser beam generated axicon lens. In: *JSME International Journal Series B Fluids and Thermal Engineering* (74), S. 497–500.

Krase, Sigrun (2003): Einfluss von Formulierungsparametern auf die nasale Verfügbarkeit von Natriumcromoglicat, Xylometazolinhydrochlorid und Oxymetazolinhydrochlorid.

Labiris, N. R.; Dolovich, M. B. (2003): Pulmonary drug delivery. Part II: the role of inhalant delivery devices and drug formulations in therapeutic effectiveness of aerosolized medications. In: *Br J Clin Pharmacol* 56 (6), S. 600–612.

Lass, Joseph S.; Sant, Andrew; Knoch, Martin (2006): New advances in aerosolised drug delivery: vibrating membrane nebuliser technology. In: *Expert Opin. Drug Deliv.* 3 (5), S. 693–702.

LaVan, David A.; Lynn, David M.; Langer, Robert (2002): Moving smaller in drug discovery and delivery. In: *Nat. Rev. Drug Disc.* 1 (1), S. 77–84.

Maehara, Naoyoshi; Ueha, Sadayuki; Mori, Eiji (1986): Influence of the vibrating system of a multipinhole-plate ultrasonic nebulizer on its performance. In: *Rev. Sci. Instrum* 57 (11), S. 2870.

Maggi, L.; Bruni, R.; Conte, U. (1999): Influence of the moisture on the performance of a new dry powder inhaler. In: *Int J Pharm* 177 (1), S. 83–91.

Mc Callion, O. N. M.; Patel, M. J. (1996): Viscosity effects on nebulisation of aqueous solutions. In: *International Journal of Pharmaceutics* 130 (2), S. 245–249

Mc Callion, O. N. M.; Taylor, K. M. G.; Thomas, M.; Taylor, A. J. (1996a): The influence of surface tension on aerosols produced by medical nebulisers. In: *International Journal of Pharmaceutics* 129 (1-2), S. 123–136.

Mc Callion, Orla N. M.; Taylor, Kevin M. G.; Thomas, Marian; Taylor, Anthony J. (1996b): Nebulisation of monodisperse latex sphere suspensions in air jet and ultrasonic nebulisers. In: *International Journal of Pharmaceutics* 133 (1–2), S. 203–214.

McCallion, O. N. M.; Taylor, K. M. G.; Bridges, P. A.; Thomas, M.; Taylor, A. J. (1996c): Jet nebulisers for pulmonary drug delivery. In: *International Journal of Pharmaceutics* 130 (1), S. 1–11.

McCallion, O. N.; Taylor, K. M.; Thomas, M.; Taylor, A. J. (1995): Nebulization of fluids of different physicochemical properties with air-jet and ultrasonic nebulizers. In: *Pharm. Res* 12 (11), S. 1682–1688.

Melandri, C. (1983): Deposition of charged particles in the human airways. In: *J. Aerosol Sci* (14), S. 657–669.

Melani, Andrea S.; Zanchetta, Doriana; Barbato, Natalino; Sestini, Piersante; Cinti, Cristina; Canessa, Piero Aldo et al. (2004): Inhalation technique and variables associat-

- ed with misuse of conventional metered-dose inhalers and newer dry powder inhalers in experienced adults. In: *Ann. Allergy Asthma Immunol* 93 (5), S. 439–446.
- Newman, S. P.; Clarke, S. W. (1983): Therapeutic aerosols 1--physical and practical considerations. In: *Thorax* 38 (12), S. 881–886.
- Newman, S. P.; Millar, A. B.; Lennard-Jones, T. R.; Morén, F.; Clarke, S. W. (1984): Improvement of pressurised aerosol deposition with Nebuhaler spacer device. In: *Thorax* 39 (12), S. 935–941.
- Nikander, K.; Turpeinen, M.; Wollmer, P. (2000): Evaluation of pulsed and breath-synchronized nebulization of budesonide as a means of reducing nebulizer wastage of drug. In: *Pediatr. Pulmonol* 29 (2), S. 120–126.
- Niven, R. W.; Ip, A. Y.; Mittelman, S.; Prestrelski, S. J.; Arakawa, T. (1995): Some factors associated with the ultrasonic nebulization of proteins. In: *Pharm. Res* 12 (1), S. 53–59.
- O'Callaghan, C.; Barry, P. W. (1997): The science of nebulised drug delivery. In: *Thorax* 52 Suppl 2, S. S31-44.
- O'Callaghan, C.; Clarke, A. R.; Milner, A. D. (1989): Inaccurate calculation of drug output from nebulisers. In: *Eur. J. Pediatr* 148 (5), S. 473–474.
- Olschewski, Horst; Simonneau, Gerald; Galiè, Nazzareno; Higenbottam, Timothy; Naeije, Robert; Rubin, Lewis J. et al. (2002): Inhaled iloprost for severe pulmonary hypertension. In: *N. Engl. J. Med* 347 (5), S. 322–329.
- Patton, John S.; Byron, Peter R. (2007): Inhaling medicines: delivering drugs to the body through the lungs. In: *Nat Rev Drug Discov* 6 (1), S. 67–74.
- Patton, John S.; Fishburn, C. Simone; Weers, Jeffrey G. (2004): The lungs as a portal of entry for systemic drug delivery. In: *Proc Am Thorac Soc* 1 (4), S. 338–344.
- Phipps, P.; Gonda, I. (1990): Droplets produced by medical nebulizers. Some factors affecting their size and solute concentration. In: *Chest* 97 (6), S. 1327–1332.
- Pison, Ulrich; Welte, Tobias; Giersig, Michael; Groneberg, David A. (2006): Nanomedicine for respiratory diseases. In: *Eur. J. Pharmacol* 533 (1-3), S. 341–350.
- Pitance, Laurent; Vecellio, Laurent; Leal, Teresinha; Reychler, Gregory; Reychler, Herve; Liistro, Giuseppe (2010): Delivery Efficacy of a Vibrating Mesh Nebulizer and a Jet Nebulizer under Different Configurations. In: *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery* 23 (6), S. 389–396.
- Rau, Joseph L. (2006): Practical problems with aerosol therapy in COPD. In: *Respir Care* 51 (2), S. 158–172.
- Rau, Joseph L.; Ari, Arzu; Restrepo, Ruben D. (2004): Performance comparison of nebulizer designs: constant-output, breath-enhanced, and dosimetric. In: *Respir Care* 49 (2), S. 174–179.
- Rohen, Johannes W.; Lütjen-Drecoll, Elke (2001): Funktionelle Anatomie des Menschen. Lehrbuch der makroskopischen Anatomie nach funktionellen Gesichtspunkten : mit 41 Tabellen. 10., völlig neu gestaltete und erw. Stuttgart [u.a.]: Schattauer.
- Rubin, Bruce K.; Fink, James B. (2005): Optimizing aerosol delivery by pressurized metered-dose inhalers. In: *Respir Care* 50 (9), S. 1191–1200.

- Rytting, Erik; Nguyen, Juliane; Wang, Xiaoying; Kissel, Thomas (2008): Biodegradable polymeric nanocarriers for pulmonary drug delivery. In: *Expert Opin Drug Deliv* 5 (6), S. 629–639.
- Schanker, L. S. (1978): Drug absorption from the lung. In: *Biochem Pharmacol* 27 (4), S. 381–385.
- Scheuch, Gerhard (1998): 2. Waldecker Aerosol-Inhalations-Seminar. München-Deisenhofen: Dusterl-Verl. Feistle.
- Schiebler, Theodor Heinrich (2005): Anatomie. Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskatalogs ; Springer.
- Scott Borland et al. (2001): Method for the construction of an aperture plate for dispensing liquid droplets.
- Selroos, Olof; Borgström, Lars; Ingelf, Jarl (2009): Use of dry powder inhalers in acute exacerbations of asthma and COPD. In: *Ther Adv Respir Dis* 3 (2), S. 81–91.
- Steckel, H. (2003): Factors affecting aerosol performance during nebulization with jet and ultrasonic nebulizers. In: *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 19 (5), S. 443–455.
- Shen, Sheng-Chih; Wang, Yu-Jen; Chen, Yung-Yue (2008): Design and fabrication of medical micro-nebulizer. In: *Sensors and Actuators A: Physical* 144 (1), S. 135–143.
- Stuart, B. O. (1984): Deposition and clearance of inhaled particles. In: *Environ. Health Perspect* 55, S. 369–390.
- Taylor, K. M.; McCallion, O. N. (1997): Ultrasonic nebulisers for pulmonary drug delivery. In: *International Journal of Pharmaceutics* (153), S. 93–104.
- Tronde, Ann; Nordén, Bo; Marchner, Hans; Wendel, Anna-Karin; Lennernäs, Hans; Bengtsson, Ursula Hultkvist (2003): Pulmonary absorption rate and bioavailability of drugs in vivo in rats: structure-absorption relationships and physicochemical profiling of inhaled drugs. In: *J Pharm Sci* 92 (6), S. 1216–1233.
- Vauthier, Christine; Bouchemal, Kawthar (2009): Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. In: *Pharm Res* 26 (5), S. 1025–1058.
- Vitale, Steven A.; Katz, Joseph L. (2003): Liquid Droplet Dispersions Formed by Homogeneous Liquid–Liquid Nucleation: “The Ouzo Effect”. In: *Langmuir* 19 (10), S. 4105–4110.
- Vogelmeier, C.; Buhl, R.; Criée, C.; Gillissen, A.; Kardos, P.; Köhler, D. et al. (2007): Leitlinie der Deutschen Atemwegsliga und der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit chronisch obstruktiver Bronchitis und Lungenemphysem (COPD). In: *Pneumologie* 61 (5), S. e1–e40.
- Voshaar, T.; App, E. M.; Berdel, D.; Buhl, R.; Fischer, J.; GESSLER, T. et al. (2001): Empfehlungen für die Auswahl von Inhalationssystemen zur Medikamentenverabreichung. In: *Pneumologie* 55 (12), S. 579–586.
- Voshaar, T.; Hausen, T.; Kardos, P.; Köhler, D.; Schultze-Werninghaus, G.; Schürmann, W.; Vogelmeier, C. (2005): Inhalationstherapie mit dem Respimat Soft Inhaler bei Asthma und COPD. In: *Pneumologie* 59 (1), S. 25–32.

- Wagner, Volker; Dullaart, Anwyn; Bock, Anne-Katrin; Zweck, Axel (2006): The emerging nanomedicine landscape. In: *Nat Biotechnol* 24 (10), S. 1211–1217.
- Waldrep, J. C.; Dhand, R. (2008): Advanced nebulizer designs employing vibrating mesh/aperture plate technologies for aerosol generation. In: *Curr Drug Deliv* 5 (2), S. 114–119.
- Watts, Alan B.; McConville, Jason T.; Williams, Robert O. (2008): Current Therapies and Technological Advances in Aqueous Aerosol Drug Delivery. In: *Drug Development and Industrial Pharmacy* 34 (9), S. 913–922.
- Yang, Wei; Peters, Jay I.; Williams, Robert O. (2008): Inhaled nanoparticles--a current review. In: *Int J Pharm* 356 (1-2), S. 239–247.
- Zeman, K. L.; Wu, J.; Bennett, W. D. (2010): Targeting aerosolized drugs to the conducting airways using very large particles and extremely slow inhalations. In: *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 23 (6), S. 363–369.
- Zhang, Guifang; David, Anand; Wiedmann, Timothy Scott (2007): Performance of the vibrating membrane aerosol generation device: Aeroneb Micropump Nebulizer. In: *J Aerosol Med* 20 (4), S. 408–41

## Publikationsverzeichnis

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

**Beck-Broichsitter Moritz, Knuedeler Marie-Christine, Schmehl Thomas, Seeger Werner** (2013): Following the concentration of polymeric nanoparticles during nebulization. In: *Pharmaceutical Research* 30(1):16-24.

**Beck-Broichsitter Moritz, Knuedeler Marie-Christine, Oesterheld Nina, Seeger Werner, Schmehl Thomas**(2014): Boosting the aerodynamic properties of vibrating-mesh nebulized polymeric nanosuspensions. In: *International Journal of Pharmaceutics* 459(1-2):23-9.

**Beck-Broichsitter Moritz, Oesterheld Nina, Knuedeler Marie-Christine, Seeger Werner, Schmehl Thomas** (2014): On the correlation of output rate and aerodynamic characteristics in vibrating-mesh-based aqueous aerosol delivery. In *International Journal of Pharmaceutics* 461(1-2):34-7.

**Beck-Broichsitter Moritz, Knuedeler Marie-Christine, Seeger Werner, Schmehl Thomas** (2014): Controlling the droplet size of formulations nebulized by vibrating-membrane technology. In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 87(3):524-9.



## **Erklärung zur Dissertation**

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus- Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Kornwestheim

## **Danksagung**

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Werner Seeger für die Überlassung des Promotionsthemas und die Möglichkeit der Promotion in seiner Arbeitsgruppe.

Ich danke ganz herzlich der Arbeitsgruppe Aerosolphysik- und Therapie, besonders Herrn Dr. Moritz Beck- Broichsitter für die Unterstützung bei der Herstellung und Analyse der Nanopartikel, der Analyse der Verneblermembranen und den statistischen Berechnungen, sowie die umfassende und motivierte Begleitung. Herrn Dr. Thomas Schmehl danke ich für die ausführliche und sorgfältige Korrektur meiner Arbeit und gemeinsam mit Herrn Dr. Tobias Gessler für die konstruktive und engagierte Betreuung und Begleitung.

Ganz besonderer Dank gilt auch meinen Kolleginnen aus dem Labor, Helene, Laura und Julia für ihre stetige Hilfsbereitschaft, ausführliche Einarbeitung und das unterhaltensreiche und abwechslungsreiche Arbeitsklima.

Bei meinen Schwiegereltern Helga und Rainer Gotthardt, meinem Bruder Marcel Knüdeler und meinen ältesten Freundinnen Aylin Bora und Helene Sailer bedanke ich mich herzlich für liebevolle und engagierte Zeitinseln in der letzten Phase.

Für ihre Unterstützung auf vielfältigste Weise bedanke ich mich sehr herzlich bei meinen Eltern, Claudia und Reinhard Knüdeler und meinem Ehemann Manuel Gotthardt.

