

**Nano- und Mikroemulsionen zur topischen Applikation von  
schwerlöslichen Immunsuppressiva**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

Yücel Baspinar

August 2009

1. Gutachter: Univ. Prof. Dr. Hans-Hubert Borchert

2. Gutachter: Univ. Prof. Dr. Rainer H. Müller

Disputation am: 27.11.2009

**Meiner gesamten Familie in Dankbarkeit**

<b>1</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG .....</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>ALLGEMEINER TEIL .....</b>	<b>13</b>
<b>3.1</b>	<b>Die Haut .....</b>	<b>13</b>
	3.1.1 Aufbau und Funktion .....	13
	3.1.2 Dermale Arzneistoffaufnahme .....	20
	3.1.3 Atopische Dermatitis .....	26
<b>3.2</b>	<b>Das Auge .....</b>	<b>30</b>
	3.2.1 Aufbau und Funktion .....	30
	3.2.2 Ophthalmologische Arzneistoffaufnahme .....	37
	3.2.3 Keratoplastik .....	44
<b>4</b>	<b>KOLLOIDALE TRÄGERSYSTEME .....</b>	<b>45</b>
<b>4.1</b>	<b>Nanoemulsionen .....</b>	<b>47</b>
	4.1.1 Dermale/Transdermale Anwendung .....	49
	4.1.2 Parenterale Anwendung .....	49
	4.1.3 Perorale Anwendung .....	50
	4.1.4 Ophthalmologische Anwendung .....	51
<b>4.2</b>	<b>SLN/NLC .....</b>	<b>53</b>
<b>4.3</b>	<b>Nanosuspensionen .....</b>	<b>54</b>

<b>4.4</b>	<b>Mikroemulsionen .....</b>	<b>55</b>
4.4.1	Dermale/Transdermale Anwendung .....	55
4.4.2	Parenterale Anwendung .....	56
4.4.3	Perorale Anwendung .....	57
4.4.4	Ophthalmologische Anwendung .....	57
<b>5</b>	<b>MATERIALIEN .....</b>	<b>59</b>
<b>5.1</b>	<b>Lipide .....</b>	<b>59</b>
5.1.1	Eutanol <sup>®</sup> G .....	59
5.1.2	Tegosoft <sup>®</sup> CT .....	59
5.1.3	Tegosoft <sup>®</sup> OP .....	59
5.1.4	Tegosoft <sup>®</sup> DEC .....	60
5.1.5	Miglyol <sup>®</sup> .....	60
5.1.6	Propylenglykol .....	60
5.1.7	Triacetin .....	61
<b>5.2</b>	<b>Tenside .....</b>	<b>61</b>
5.2.1	Tween 80 .....	61
5.2.2	Phospholipide .....	61
5.2.3	Poloxamere .....	62
<b>5.3</b>	<b>Immunsuppressiva .....</b>	<b>63</b>
5.3.1	Topische Glucocorticoide .....	63
5.3.2	mTOR-Inhibitoren .....	68
5.3.2.1	Everolimus .....	69

5.3.2.2	Sirolimus .....	70
5.3.2.3	Immunmodulatoren .....	72
5.3.3	Calcineurin-Inhibitoren .....	76
5.3.3.1	Ciclosporin .....	76
5.3.3.2	Tacrolimus .....	79
5.3.3.3	Pimecrolimus .....	80
<b>5.4</b>	<b>Weitere Materialien .....</b>	<b>83</b>
5.4.1	Phytosphingosin .....	83
5.4.2	Tocopherolacetat .....	83
5.4.3	Kaliumsorbat .....	83
5.4.4	Fettsäuren .....	83
5.4.5	Wasser .....	83
<b>6</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>84</b>
<b>6.1.</b>	<b>Hochdruckhomogenisation .....</b>	<b>84</b>
<b>6.2</b>	<b>Partikelgrößenanalytik und Partikelladung .....</b>	<b>87</b>
6.2.1	Photonenkorrelationsspektroskopie .....	87
6.2.2	Laserdiffraktometrie .....	88
6.2.3	Zetapotenzial .....	89
<b>6.3</b>	<b>HPLC-Analytik .....</b>	<b>91</b>
<b>6.4</b>	<b>Penetrationsuntersuchungen an exzidierte Humanhaut.....</b>	<b>93</b>
<b>6.5</b>	<b>Freisetzung .....</b>	<b>97</b>

<b>6.6</b>	<b>Herstellung der Mikroemulsionen .....</b>	<b>97</b>
<b>6.7</b>	<b>Permeationsuntersuchungen an der Schweinecornea .....</b>	<b>98</b>
<b>6.8</b>	<b>Immunoassay zur Bestimmung von Everolimus.....</b>	<b>99</b>
<b>6.9</b>	<b>Viskosität .....</b>	<b>100</b>
<b>7</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSIONEN .....</b>	<b>101</b>
<b>7.1</b>	<b>Auswahl der Ölphase für Phytosphingosin .....</b>	<b>101</b>
<b>7.2</b>	<b>Auswahl der Ölphase für Prednicarbat .....</b>	<b>101</b>
	7.2.1 Löslichkeit schwerlöslicher Immunsuppressiva .....	102
<b>7.3</b>	<b>Viskosität .....</b>	<b>103</b>
<b>7.4</b>	<b>Prednicarbat-Nanoemulsion .....</b>	<b>104</b>
	7.4.1 Hochdruckhomogenisation mit Lab 40 .....	104
	7.4.1.1 Prozessparameter .....	104
	7.4.1.2 Rezepturzusammensetzung .....	114
	7.4.2 Langzeituntersuchung der chemischen Stabilität .....	124
	7.4.3 Hochdruckhomogenisation mittels EmulsiFlex C5 .....	128
	7.4.4 Vergleich der Homogenisatoren .....	131
	7.4.5 Negativ geladene Nanoemulsionen .....	132

<b>7.5</b>	<b>Everolimus-Nanoemulsionen .....</b>	<b>134</b>
7.5.1	Hochdruckhomogenisation mit Lab 40 .....	134
7.5.2	Hochdruckhomogenisation mit Emulsiflex C5 .....	141
<b>7.6</b>	<b>Sirolimus-Nanoemulsionen .....</b>	<b>143</b>
7.6.1	Hochdruckhomogenisation mit Lab 40 .....	143
7.6.2	Untersuchung der chemischen Stabilität .....	147
<b>7.7</b>	<b>Freisetzung .....</b>	<b>148</b>
<b>7.8</b>	<b>Penetration in die exzidierte Humanhaut .....</b>	<b>149</b>
<b>7.9</b>	<b>Permeation durch die Schweinecornea .....</b>	<b>151</b>
<b>7.10</b>	<b>Statistik .....</b>	<b>152</b>
<b>8</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>153</b>
<b>9</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>158</b>
<b>10</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>161</b>
<b>11</b>	<b>PUBLIKATIONSLISTE .....</b>	<b>179</b>
<b>12</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>181</b>
<b>13</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>182</b>



## 1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AD	atopische Dermatitis
Da	Dalton
EG	Eutanol G <sup>®</sup>
EIU	Endotoxin induzierte Uveitis
Ev	Everolimus
GC	Glucocorticoid
GRAS	Generally recognized as safe
HPLC	High performance liquid chromatography
LD	Laserdiffraktometrie
LE80	Lipoid E 80 <sup>®</sup>
LS75-3N	Lipoid S 75-3N
LS100-3	Lipoid S 100-3
LSL80-3	Lipoid SL 80-3
M <sub>r</sub>	Relative Molmasse
mTOR	mammalian target of rapamycin
NE	Nanoemulsion
NLC	Nanostructured Lipid Carrier
O/W	Öl-in-Wasser
PASI	Psoriasis Area and Severity Index
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PC	Prednicarbat
PCh	Phosphatidylcholin
P17EC	Prednisolon-17-ethylcarbonat
P21EC	Prednisolon-21-ethylcarbonat
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
PD	Prednisolon
PI	Polydispersitätsindex
Pim	Pimecrolimus
PS	Phytosphingosin
R	Regressionskoeffizient
RAD	Everolimus
S-1-P	Sphingosin-1-Phosphat
s	Standardabweichung
Sir	Sirolimus
SLN	Solid Lipid Nanoparticles (Feste Lipid Nanopartikel)
Tac	Tacrolimus
U/min	Umdrehungen pro Minute
ZP	Zetapotenzial
$\bar{x}$	arithmetischer Mittelwert
$\tilde{x}$	Median

## 2. Einleitung und Zielstellung

Unser Immunsystem ist verantwortlich für die Abwehr in den Körper eingedrungener Krankheitserreger, Mikroorganismen und fremder Substanzen und steht in engem Zusammenhang zu einer Reihe von Erkrankungen, deren Therapieziel wiederum eine Immunsuppression beinhaltet. Dieser Vorgang der Unterdrückung immunologischer Prozesse ist beispielsweise erforderlich um die akute Transplantatabstoßung nach einer Organtransplantation (z. B. nach Hornhauttransplantationen) zu verhindern oder einer Entzündungsreaktion der Haut entgegenzuwirken, z.B. bei der atopischen Dermatitis (AD). Die Standardtherapie bei entzündlichen Hauterkrankungen erfolgt mit lokalen oder in schweren Fällen mit systemischen Glucocorticoiden (GC). In dieser Arbeit werden Prednicarbat (PC)-haltige, positiv und negativ geladene Nanoemulsionen hergestellt, die physikalische und chemische Stabilität, die Freisetzung und die Penetration untersucht. PC ist ein schlecht lösliches, ausschließlich dermal angewendetes Glucocorticoid mit einem besonders günstigen Nutzen-Risiko-Verhältnis (soft-steroid) und bereits als Creme, Salbe und Fettsalbe im Handel. Ein Kennzeichen der atopischen Dermatitis, die trockene Haut, basiert vermutlich auf einem Ceramid-Mangel (Arikawa et al. 2002). Ein entscheidender Vorteil der hier verwendeten Nanoemulsionen liegt in der Einarbeitung von Phytosphingosin (PS). Es ist zum einen für die positive Ladung verantwortlich, zum anderen eine natürlich vorkommende Substanz, die bei der Ceramid-Synthese in der Haut eine entscheidende Rolle spielt. Es zeigte sich, dass bei geschädigter Haut, wie z.B. bei der AD, ceramidhaltige Formulierungen die Heilung positiv beeinflussen (Mao Qiang et al. 1993 und 1996, Chamlin et al. 2001, De Paepe et al. 2002). Formulierungen mit einer positiven Ladung führten in Untersuchungen zu einer gesteigerten Arzneistoffpenetration und -permeation, weil sie eine höhere Anziehungskraft zu den negativ geladenen Korneozyten des SC haben (Piemi et al. 1999, Song und Kim 2006). In der Regel wird dabei Stearylamin zur Erzeugung der positiven Ladung eingesetzt. Untersuchungen an drei Zelllinien zeigten eine Cytotoxizität dieser Substanz (Weyenberg et al. 2007). Deshalb wurde in dieser Arbeit PS verwendet, um die positive Ladung zu erzielen. Andere Substanzen zur positiven Aufladung von Emulsionen sind z.B. DOTAP und DOPE (Kim et al. 2001 a und b), Oleylamin (Rabinovich-Guillat et al. 2004), das Polymer Chitosan (Calvo et al. 1997, Jumaa und Müller 1999) oder das Tensid Cetyltrimethylammoniumbromid (Samama et al. 1987).

Wegen unerwünschter Arzneimittelwirkungen von GC bei dermalen oder systemischer Anwendung wurde in den letzten Jahren verstärkt auf Immunsuppressiva mit einem anderen Wirkmechanismus als GC hingearbeitet. So gibt es bereits zwei zugelassene Calcineurin-Inhibitoren (CNI) als halb feste Zubereitungen zur Anwendung auf der Haut: Tacrolimus (Protopic<sup>®</sup> 0,03 % und 0,1 %) und Pimecrolimus (Elidel<sup>®</sup> 1% der Firma Novartis und Douglan<sup>®</sup> 1% von 3M Medica). Calcineurin-Inhibitoren führen nach dermalen Applikation, im Gegensatz zu einigen GC, nicht zu einer Hautatrophie.

Eine weitere wichtige Anwendung von Immunsuppressiva erfolgt nach Organtransplantationen. Die Standardtherapie nach einer Cornea-Transplantation erfolgt beispielsweise mit GC, entweder lokal in Form von Augentropfen, -salben oder -gelen oder als systemische Therapie. Die Applikation dieser GC ist mit einer Reihe von unerwünschten Arzneimittelwirkungen verbunden, weshalb verstärkt nach Alternativen gesucht wird. Diese könnten z.B. die mTOR-Inhibitoren Sirolimus (Rapamune<sup>®</sup>) und Everolimus (Certican<sup>®</sup>) sein, beide bisher ausschließlich peroral zur Prophylaxe nach einer Herz- oder Nierentransplantation verwendet. Bislang gibt es kein zugelassenes Fertigarzneimittel zur topischen Applikation von mTOR-Inhibitoren. Langfristig wäre eine akzeptable Formulierung zur topischen Therapie nach einer Cornea-Transplantation und zur Anwendung an der Haut wünschenswert. Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen Nanoemulsionen zur dermalen Applikation von Prednicarbat, Sirolimus und Everolimus und eine Everolimus-haltige Mikroemulsion zur ophthalmologischen Applikation. Dabei soll einerseits die Penetration von geladenen, per Hochdruckhomogenisation hergestellten Nanoemulsionen an exzidierten Humanhaut vergleichend untersucht, und andererseits die Permeation einer Everolimus-haltigen Mikroemulsion an frisch isolierter Schweinecornea getestet werden. Von den positiv geladenen Nanoemulsionen wird eine verbesserte Penetration gegenüber den negativ geladenen Nanoemulsionen erwartet. Bei den positiv geladenen Nanoemulsionen mit mTOR-Inhibitoren stellte es sich jedoch heraus, dass sowohl Everolimus als auch Sirolimus chemisch instabil waren. Deshalb wurde vorerst auf die Untersuchung der Freisetzung und der Penetration an exzidierten Humanhaut verzichtet.

Permeationsuntersuchungen mit einer Sirolimus-haltigen Mikroemulsion an der Cornea führten zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis. Nach 240 min wurde mit gemessenen 4,3 ng/ml ein erwünschter therapeutischer Konzentrationsbereich von 12-20 ng/ml nicht einmal annähernd erreicht. Erst nach Entfernen des Hornhautepithels, der Hauptbarriere der Cornea, wurde eine höhere, aber immer noch nicht therapeutisch wirksame Konzentration von 6,7–9,8 ng/ml gemessen (Buech et al. 2007). Deshalb wird in dieser Arbeit die Permeation

einer Mikroemulsion mit Everolimus an der Schweinecornea geprüft. Bei der Therapie nach einer Nieren- oder Herztransplantation wird der optimale Konzentrationsbereich von Everolimus um eine Rejektion zu vermeiden mit 3-8 ng/mL angegeben (Fachinfo Novartis).

Die Problematik der in dieser Arbeit untersuchten und auch sehr vieler neu entdeckten bzw. synthetisierten Arzneistoffe liegt in den ungünstigen Eigenschaften, wie z.B. schlechte Wasserlöslichkeit, hohe Verteilungskoeffizienten ( $K_{O/W} > 500$ ) und z.T. bei der relativ hohen Molekülmasse ( $M_r > 500$ ). Die drei Arzneistoffe Prednicarbat, Sirolimus und Everolimus sind allesamt praktisch unlöslich in Wasser. Diese genannten problematischen Eigenschaften können eine angestrebte hohe lokale Bioverfügbarkeit limitieren. Um das Problem der schlechten Löslichkeit zu überwinden wurden diese Arzneistoffe in O/W-Nanoemulsionen eingearbeitet.

Als dermale Arzneistoffträgersysteme gewinnen nanopartikuläre Arzneiformen seit den 1990'ern immer mehr an Bedeutung. Die Vorteile von Nanoemulsionen sind z.B. eine erhöhte Sättigungslöslichkeit und dadurch eine erhöhte Lösungsgeschwindigkeit, höhere Arzneistoffstabilität, eine geringe Biotoxizität des Trägersystems, die Vermeidung organischer Lösemittel oder die Herstellung im Großmaßstab.

Bereits zugelassene Fertigarzneimittel als Nanoemulsionen sind z.B. Diazepam<sup>®</sup> Lipuro, Disoprivan<sup>®</sup>, Etomidat<sup>®</sup> Lipuro, Intralipid<sup>®</sup>, Lipofundin<sup>®</sup>, Propofol 1%/2% Fresenius, Stesolid<sup>®</sup>.

In dieser Arbeit sollen folgende Ziele für die Nanoemulsionen bestimmt bzw. erreicht werden:

- optimale Homogenisations-Prozessparameter, wie z.B. die Homogenisationstemperatur, der Homogenisationsdruck und die Anzahl der Homogenisationszyklen mit dem Micron LAB40 bzw. die Homogenisationsdauer mit dem Emulsiflex C5
- optimale Rezepturzusammensetzung
- Herstellung stabiler, positiv und negativ geladener Nanoemulsionen
- Emulsionströpfchen mit einer mittleren Größe von  $< 200$  nm
- Polydispersitätsindex  $< 0,2$
- keine Partikel  $> 500$  nm
- ausreichende physikochemische Lagerstabilität über mindestens 6 Monate
- Nachweis verbesserter Penetration positiv geladener Nanoemulsion gegenüber negativ geladener Nanoemulsion

### 3 ALLGEMEINER TEIL

#### 3.1 Die Haut

##### 3.1.1 Aufbau und Funktion

Mit einer Oberfläche von etwa 1,5-2 m<sup>2</sup> stellt bei einem normalgewichtigen Erwachsenen die Haut das größte menschliche Organ dar. Zu ihren Aufgaben zählen die Steuerung der Wasserabgabe, die Wärmeregulierung, der Schutz gegen mechanische und chemische Einwirkungen, Strahlenschutz und der Tastsinn. Mit Messmethoden konnte ein durchschnittlicher pH-Wert von 5,5 festgestellt werden. Die äußere Haut ist in drei Schichten gegliedert (Abb. 1):

- Epidermis (Oberhaut)
- Dermis (Lederhaut oder Corium)
- Subcutis (Unterhaut)

Die Epidermis und die Dermis bilden zusammen die Cutis. Hautanhangsgebilde, sog. Adnexen, wie z.B. Talg- und Schweißdrüsen, Haare und Nägel sind in die Haut eingelagert.

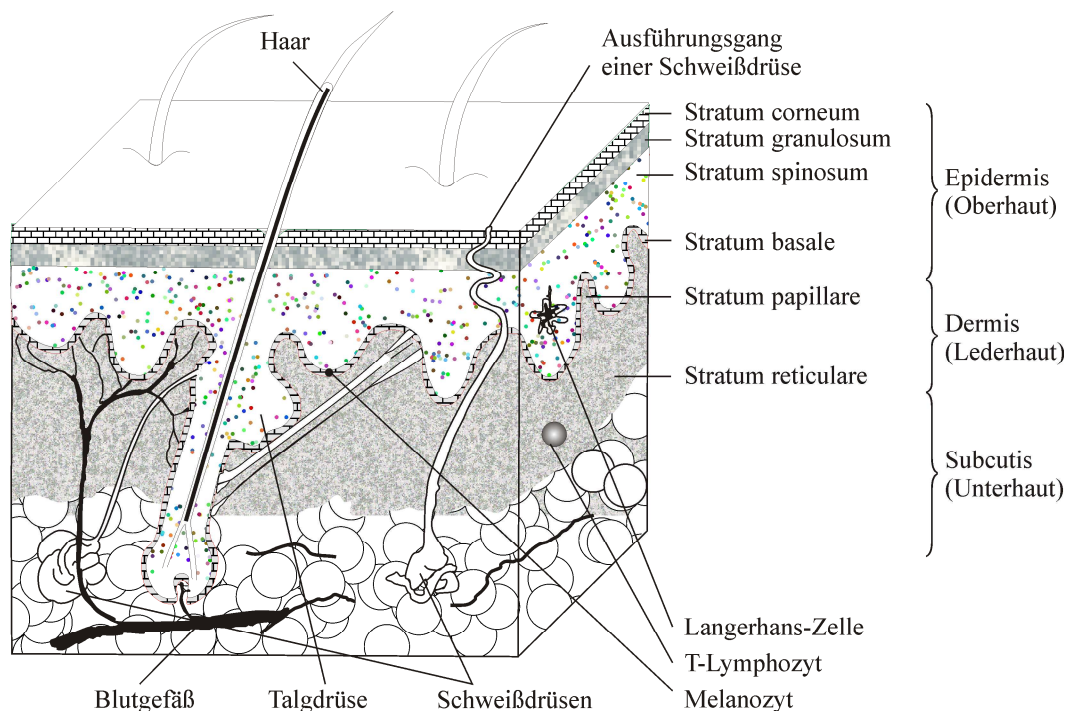


Abb. 1: Querschnitt durch die menschliche Haut

## **Epidermis (Oberhaut)**

Bei der Epidermis, die zu 90 % aus Keratinozyten besteht, handelt es sich um ein mehrschichtiges verhornendes Plattenepithel. Die Dicke der Haut kann je nach Körperregion, Alter und Geschlecht zwischen 0,03 (Kopf) und 4 mm (an den Fußsohlen und Handinnenflächen) variieren. Ihre Aufgabe liegt in der lebenslangen, kontinuierlichen Erneuerung der äußersten Hautschicht, der Hornschicht.

Gegliedert ist die Epidermis von außen nach innen in:

- Stratum corneum (Hornschicht)
- Stratum lucidum (Glanzschicht), nur an den Hand- und Fußinnenseiten
- Stratum granulosum (Körnerzellenschicht)
- Stratum spinosum (Stachelzellschicht)
- Stratum basale (Basalschicht)

Mit der Basalmembran durch Hemidesmosomen verbunden, besteht das **Stratum basale** aus zylindrischen Zellen. Die Zellteilungen finden vorwiegend in dieser tiefsten Schicht der Epidermis statt. Dabei verbleibt meist eine Tochterzelle im Verband des Stratum basale und die andere Tochterzelle wird als Stachelzelle an das 2-5 Zellschichten breite **Stratum spinosum** abgegeben. Neben einer ausgeprägten Volumenvergrößerung der Keratinozyten erfolgt in dieser Schicht auch eine zunehmende Abflachung der Zellen.

Keratohyalingranula kennzeichnen das darüber liegende, aus 2-3 Zellschichten bestehende **Stratum granulosum**. Diese Granula stellen die Vorstufen des Keratins der Hornschicht-Korneozyten dar. Dynamisch veränderbare Desmosomen verbinden alle Keratinozyten miteinander.

## **Stratum corneum**

Bis auf das **Stratum corneum** sind die restlichen Schichten der Epidermis lebendig. Das **Stratum corneum** ist eine hoch komplex organisierte und äußerst anpassungsfähige, biologisch tote, jedoch dynamische 10 bis 15 µm dünne Hautschicht und besteht aus geschickt angeordneten, verhornten Keratinozyten, sog. Korneozyten. Beim Übergang vom Stratum granulosum zum **Stratum corneum**, also bei der Keratinisierung der Keratinozyten, finden Umbauprozesse vom vitalen, kernhaltigen Keratinozyten zum kernlosen, äußerst rigiden

Korneozyten statt. Die Korneozyten sind ca. 0,5 bis 3  $\mu\text{m}$  dick, haben einen Durchmesser von 30 bis 40  $\mu\text{m}$  und zählen damit zu den größten Körperzellen. Das **Stratum corneum** erneuert sich etwa im Zeitraum von 8 Tagen und besteht aus 10 bis 20 Zellschichten voll keratinisierter Korneozyten, die überwiegend aus Keratinfilamenten aufgebaut sind, umgeben von einer dicht vernetzten, äußerst stabilen Hülle, der „cornified envelope“. Unter Normalbedingungen dauert die Reifung und Differenzierung der Keratinozyten, d.h. das Durchwandern aller epidermalen Zelllagen bis zur Abstoßung in der Hornschicht etwa 28 bis 30 Tage.

Normalerweise werden die Keratinozyten der Epidermis im Stratum basale neu gebildet und schilfern als Korneozyten an der Hautoberfläche ab. Der Keratinozyt durchläuft während des Neubildungsvorgangs die verschiedenen Phasen des Zellzyklus. Dabei ist die  $G_1$ -Phase zeitlich sehr variabel, die  $G_2$ -Phase und die Mitose mit zwei Stunden bzw. einer Stunde und die S-Phase mit 8 bis 12 Stunden sind relativ konstant. Mit 100 bis 300 Stunden ist die Gesamtdauer des epidermalen Zellzyklus sehr unterschiedlich. Der Zellzyklus kann innerhalb der  $G_1$ - bzw.  $G_2$ -Phase ( $G_1Q$  bzw.  $G_2Q$ , Quiescence = Ruhe) unterbrochen und nach entsprechender Aktivierung wieder aufgenommen werden. Auf diesem Weg überprüft das Keratinozytensystem geschädigte Zellen, leitet gegebenenfalls eine Apoptose ein oder stellt genügend Zeit für eine Reparatur zur Verfügung. Durch die Unterbrechung entsteht andererseits auch ein Zellpool, der bei Bedarf (z.B. bei Verletzungen) sehr schnell für die Zellteilung zur Verfügung stehen kann. Der Keratinozyt muss sich nach erfolgter Teilung entscheiden (D = Dichophase), ob er wieder in den Zellzyklus eintritt oder die einzelnen Differenzierungsphasen bis zum Korneozyten durchläuft. Die Zelle befindet sich jetzt in der  $G_0$ -Phase, welche jederzeit aufgehoben werden kann. Die Zellen können dann in das proliferative Geschehen einbezogen oder der Differenzierung zugeführt werden. Die Zellen im unteren Stratum spinosum können auch an der Zellproliferation teilnehmen, weil die Keratinozyten während der Differenzierung die Fähigkeit zur DNA-Synthese über längere Zeit behalten. Diese Fähigkeit geht erst nach fortgeschrittenem Differenzierungsvorgang im oberen Teil des Stratum spinosum bzw. im Stratum granulosum endgültig verloren.

Beim Übergang vom Stratum granulosum zum Stratum corneum vollzieht sich der Abschluss der epidermalen Differenzierungsvorgänge abrupt. Die Synthese von Zytokeratinen im Stratum basale stellt die Vorbereitung dieser Enddifferenzierung dar. Zusammen mit den im oberen Stratum spinosum synthetisierten Profilaggrin bilden die Keratinfilamente Aggregate, die im Stratum granulosum als Keratinohyalinsgranula sichtbar werden. Das Profilaggrin zerfällt und es entsteht das hochreaktive Filaggrin, das die Vernetzung der Keratinfilamente

über Disulfidbrücken mit der Bildung des unlöslichen Keratins abschließt. Die „cornified envelope“, eine äußerst stabile Membran von hoher chemischer Resistenz, umgibt den keratinisierten Korneozyten. Ausgangspunkt für die Entstehung dieser Membran ist die Synthese mehrere Proteine im oberen Stratum spinosum, wobei dem Involucrin die größte Bedeutung zukommt (Simon und Green 1984). Im Stratum granulosum lagern sich die Proteine an die innere Zellmembran der Keratinozyten und werden bei der Enddifferenzierung zum Korneozyten durch die Wirksamkeit von Transglutaminasen zu einer Hüllmembran quer vernetzt.

In den sog. Odland-Körpern, Zellorganellen im Stratum spinosum, erfolgt die epidermale Lipid-Synthese. Die Lipide in den Odland-Körpern sind lamellar angeordnet und werden in den Intrazellularraum des Stratum corneum exozytiert (Mao-Qiang et al. 1996). Die Lipide werden enzymatisch zu den aus Ceramiden, Cholesterol, Fettsäuren und Triglyceriden zusammengesetzten interzellulären Lipidbilayern umgewandelt.

Die Hornschicht ist nach dem allgemein akzeptierten „Ziegelstein-Mörtel“-Modell, das auf Elias und Friends (1975) zurückgeht, aus zwei Kompartimenten wie nach folgend beschrieben aufgebaut:

- Korneozyten (verhornte Keratinozyten)
- Interkorneozytäre, lamelläre Lipidschichten

Dabei stellen die Korneozyten, gefüllt mit dem Stützprotein Keratin, die „Ziegelsteine“ und die interzellulären Lipide den „Mörtel“ dar. Die interzellulären Lipide bestehen zu jeweils einem Drittel aus Ceramiden, freien Fettsäuren und Cholesterol bzw. dessen Derivaten. Eine entscheidende Rolle kommt dabei der Sphingolipidfraktion der Ceramide zu, die nach ihrer Lipophilie in neun Untergruppen unterteilt wird. Besonders wichtig sind die langkettigen Ceramid-Fraktionen, bei denen eine  $\omega$ -Hydroxyfettsäure mit Linolsäure verestert ist. Die dadurch entstehende C36-Seitenkette ragt bis in die nächste Lipiddoppelschicht hinein und man spricht dabei von einer „Nagelfunktion“. Der hohe Ordnungsgrad des „Mörtels“, der interzellulären Lipide, ist wichtig für die Barrierefunktion der Hornschicht. Eine 4 bis 5 nm dicke Bilayer-Struktur wird von den Stratum corneum-Lipiden gebildet, eine zweite von den langkettigen Ceramiden (Cer), z.B. Cer EOS und Cer EOP (**E** = **Ester** der Linolsäure, über eine **O** = **Omega**-Hydroxyfettsäure verestert mit einem **S** = **Sphingosin**- oder **P** = **Phytosphingosin**-Grundkörper). Über diese Bilayer penetrieren Wirkstoffe in das Stratum corneum.



Dieses Ziegelstein-Mörtel-Modell erklärt allerdings nicht die extreme Widerstandsfähigkeit der Hornschicht gegen mechanischen Stress und inneren Gewebedruck. Dieses bisher angenommene Ziegelstein-Mörtel-Modell vom Aufbau der Hornschicht der Haut konnte durch moderne elektronenmikroskopische Verfahren ergänzt werden (Pfeiffer et al. 2000). Nach den neuen Resultaten sind vier Strukturen für die Barrierefunktion und die Stabilität des Stratum corneum verantwortlich:

- hakenähnliche Strukturen der Korneozyten
- Korneodesmosomen
- die Bilayer des Stratum corneum und
- die Tight Junctions (Schlussleisten)

haken- oder klammerähnliche Strukturen der Korneozyten tragen zur mechanischen Stabilität und damit zur Barrierefunktion bei. Punktförmige molekulare Verbindungsstellen von Zelle zu Zelle sorgen für zusätzliche mechanische Stabilität. Diese Zell-Zell-Verbindungen werden in lebenden Hautschichten gebildet und dienen zur Aufrechterhaltung und Gestaltung des Zell-Gewebeverbands. Beim Übergang vom lebenden Stratum granulosum zum toten Stratum corneum werden diese Verbindungsstellen nicht abgebaut, sondern mit weiteren Proteinen ergänzt und stabilisiert. Ein dichter Rasen von Transmembranproteinen (Tab. 1), die die Korneodesmosomen bilden, greifen im Interzellularraum ineinander und „vernieten“ so die Korneozyten miteinander. Diese „Nieten“ haben einen wesentlichen Beitrag an der Kohäsion, tragen aber nicht zur mechanischen Stabilisierung bei.

Tabelle 1: Transmembranproteine im Stratum corneum

<b>Strukturen im Stratum corneum</b>	<b>Transmembranäre Glycoproteine</b>
Desmosomen	Desmogleine 1-3 Desmocoline 1-3
Corneodesmosomen	Corneodesmosin
Tight Junctions (Schlussleisten)	Occludin Claudine 1-15

Man findet im Durchschnitt ein Korneodesmosom pro  $\mu\text{m}^2$ , d.h. etwa 400-600 Korneodesmosomen pro Korneozyt und Seite. In mikroskopischen Aufnahmen kann man Oberflächen von ganzen Korneozyten mit punktförmiger Textur erkennen. Dadurch können die Korneozyten ein komplexes und dichtes Netzwerk ausbilden. In einem intercorneozytären Netzwerk, zusammengehalten über Keratinfasern, sorgen haken- und klammerähnliche Korneozytenstrukturen zusammen mit Korneodesmosomen für die mechanische Stabilität. Erst so kommt ein stabiles Strukturgerüst für die lamellare Organisation der hoch geordneten interzellulären Lipidschichten zwischen den abgestorbenen Hautzellen zustande. Wasser lagert sich bei übermäßiger Wasseraufnahme als Linse zwischen die Korneozyten und sprengt die Ebenen der Korneozyten auseinander, die mit Korneodesmosomen belegt sind, bevor die hakenähnlichen Verzahnungen reißen. Bei der Desquamation spielt der Abbau der Korneodesmosomen eine sehr wichtige Rolle. Eine zuvor nur in embryonaler Haut bekannte Barrierestruktur wurde auch in humaner adulter Haut entdeckt und beschrieben. Diese Barrierestruktur wird am Übergang von der lebenden zur toten Hautschicht aus Tight Junctions (Schlussleisten) gebildet (Schlüter et al. 2004). Ob diese zusätzliche Barriere als molekularer Filter für große Moleküle und als Strukturelement zur Polarisierung der Zelle dient wird diskutiert. Diese zusätzliche Barriere entsteht durch eine unterschiedliche Zusammensetzung und Organisation der Membranen der äußersten Stratum granulosum-Zellen an Stellen, an denen die Schlussleisten zu finden sind, im Vergleich zum Rest der Zelle. Die Polarisierung begünstigt zum einen den Export der Hautlipide in den interzellulären Raum nach außen hin zum Stratum corneum und verhindert zum anderen, dass die Hautlipide nach innen abgegeben werden. Mit Hilfe der Neutronendiffraktion kombiniert mit innovativen Präparationsmethoden konnte die molekulare Struktur der SC-Lipide intensiver untersucht werden. So konnten erstmals die molekularen Dimensionen sowohl der hydrophilen und der lipophilen Strukturen der SC-Bilayer als auch die Dicke der Wasserschicht zwischen den Kopfgruppen der Bilayer bestimmt werden. Die Dicke der unpolaren Region beträgt 2,8 nm und die der polaren Region 1,92 nm. Die Wasserschicht ist hingegen nur 0,16 nm dick. Daraus folgt, dass sich im Interzellulärraum des Stratum corneum sehr wenig Wasser (weniger als eine Monolage) befindet und somit auch wenig Raum und Wasser für die Diffusion hydrophiler Arzneistoffe zur Verfügung steht. Als weitere Zellen mit spezifischen Funktionen sind z.B. die zwischen die Basalzellen eingelagerten Melanozyten, Lymphozyten und die intraepidermalen Langerhans-Zellen hervorzuheben (Abb. 1). Mehrere horizontal angeordnete Schichten, die zapfenartig in die darunter liegende Dermis hineinragen, bilden den lebenden Anteil der Epidermis.

### **Dermis (Corium, Lederhaut)**

Die Basalmembranzzone trennt die Epidermis von der Dermis. Die Dermis (0,04-16 mm dick) erfüllt die Aufgabe der Ernährung und der Verankerung der Epidermis. Kollagene und elastische Fasern, die gemeinsam mit verschiedenen Zellen, wie Fibroblasten, Histiozyten (Gewebemakrophagen) und Mastzellen einschließlich extravaskulärer Leukozyten und Lymphozyten in eine gelartige Grundsubstanz eingelagert sind, bestimmen den Aufbau der Dermis. Im Papillarbereich an der Grenze zur Epidermis ist ein äußerst reaktives Gefäßnetz lokalisiert, das besonders an entzündlichen Prozessen in der Haut beteiligt ist.

### **Subcutis (Unterhaut)**

Traubenförmig angeordnete Fettzellen, die von Bindegewebssepten unterteilt sind, bilden im Wesentlichen die Subcutis. Haarfollikel und Schweißdrüsen ragen bis in die Subcutis hinein. In Abhängigkeit von hormonellen, nervalen und nutritiven Faktoren ist das subkutane Fettgewebe unterschiedlich dick. Das subkutane Fettgewebe dient v.a. als Nährstoff- und Wasserspeicher sowie zum Wärmeschutz.

### 3.1.2 Dermale Arzneistoffaufnahme

Bei einer dermalen Applikation können drei unterschiedliche Ziele angestrebt werden:

- Epidermale Formulierungen, bei denen der Wirkstoff auf der Hautoberfläche verweilen und seine Wirkung auch dort entfalten soll, z. B. bei einer Desinfektion, bei (dekorativen) Kosmetika oder bei Mitteln zur Insektenabwehr
- Endodermale oder diadermale Formulierungen, bei denen eine topische Applikation eine dermale Penetration der Wirkstoffe in tiefere Regionen der Haut wie die lebendige Epidermis oder die Dermis zulässt. Eine Absorption in den systemischen Kreislauf ist nicht das Ziel.
- Das Ziel einer topischen Therapie kann bei einer transdermalen Applikation auch eine systemische Wirkung sein

#### Penetration - Wege durch das Stratum corneum

Entgegen der früheren Position, dass Arzneistoffe das SC interzellulär oder transzellulär überwinden, kommt nach neuen Erkenntnissen ein dritter Penetrationsweg zusätzlich in Betracht: der korneodesmosomale Weg. Abb. 2 zeigt den Aufbau der Epidermis inkl. die Desmosomen.

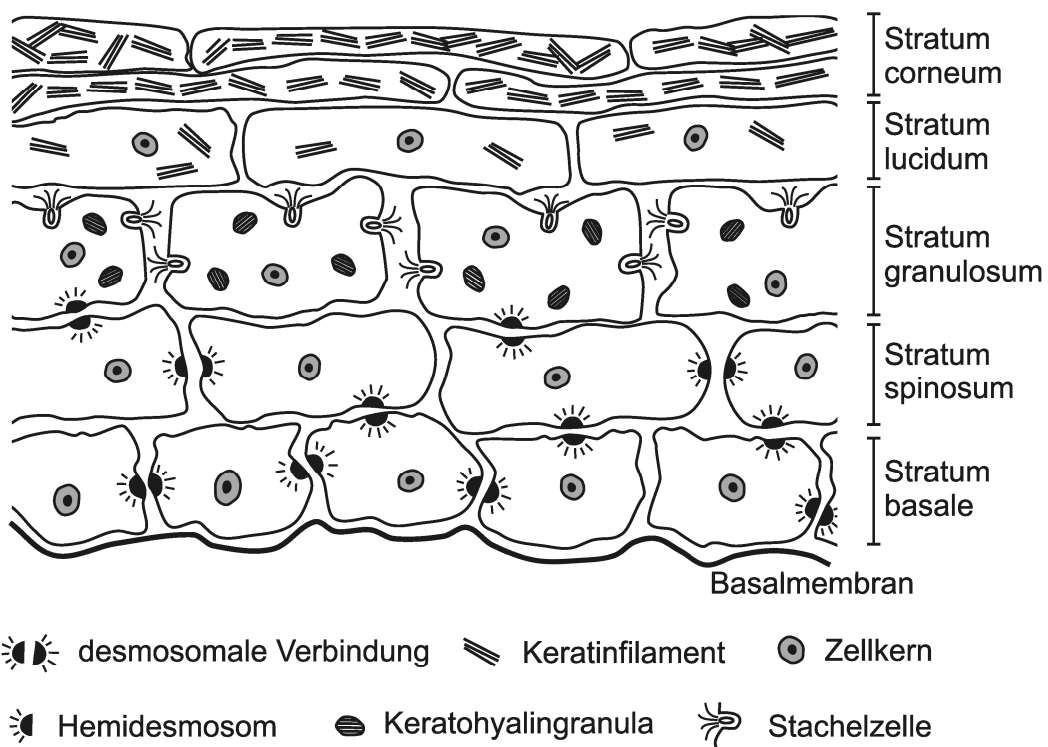


Abb. 2: Epidermale Differenzierung

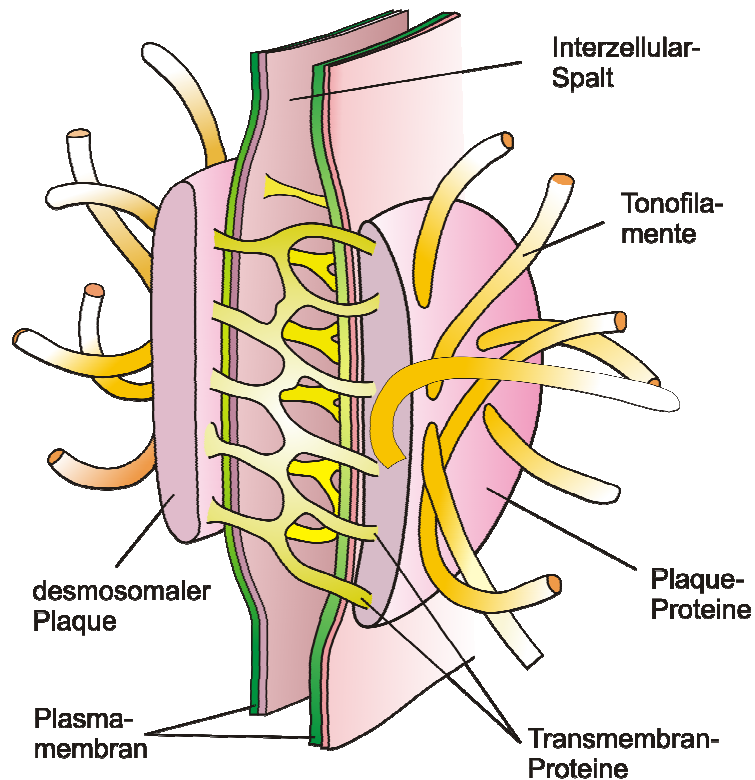


Abb. 3: Schematischer Aufbau eines Desmosoms

Sehr unwahrscheinlich ist bei der Penetration der Hornschicht der transzelluläre Weg, da die Substanzen abwechselnd durch lipophile und hydrophile Schichten diffundieren müssten. Denkbar ist auch eine Penetration über korneodesmosomale Strukturen (Abb. 2 und 3), die einzelne Kerneozyten molekular miteinander verbinden, bedenkt man die hohe Zahl an Korneodesmosomen pro Kerneozyt (hydrophile Route). Es ist aber auch möglich, dass lipophile Wirkstoffe die Hautbarriere durch laterale Diffusion entlang der lipophilen Kohlenwasserstoffketten der SC-Lipide überwinden können (interzelluläre, unpolare/lipophile Route). Nur Wirkstoffe mit einer ausreichenden Lipophilie, z.B. GC, können für die dermale Therapie eingesetzt werden. Bei dermalen Applikation muss berücksichtigt werden, dass extrem lipophile Stoffe, wie z.B. Betamethasonvalerat, in den lipophilen Bilayern des SC kumulieren und ein Depot bilden. Nach intensiver Untersuchung der molekularen Struktur der SC-Lipide konnte die polare/ hydrophile Route nachgewiesen werden. Wahrscheinlich sind nur kleine hydrophile Moleküle in der Lage über diese Route zu diffundieren, wie z.B. Harnstoff oder Propylenglykol. Die zuvor angenommenen Wege transglandulär und transfollikulär scheinen aufgrund des geringen Oberflächenanteils von 0,1 bis 1 % untergeordnet zu sein. Es wird allerdings in einer Publikation darauf hingewiesen, dass der transglanduläre Penetrationsweg über die Hautanhangsgebilde (Haarschäfte und Drüsenausführgänge) eine weitaus wichtigere Bedeutung zukommt als bisher angenommen

(Schäfer und Lademann 2001). Die Penetrationsrate von Wirkstoffen über die Adnexe kann je nach Körperregion bis auf das 10fache gesteigert werden. Der Diffusionskoeffizient kann dabei gegenüber dem interzellulären Weg erhöht sein. Die Diffusion von Ionen verläuft nach einem anderen Mechanismus als die Penetration neutraler Moleküle, nämlich über sog. wassergefüllte Weichen. Diese Diffusionsart wird auch für Aminosäuren und Peptide diskutiert. Auch für lipophilere Verbindungen, wie z.B. GC, scheint die Beteiligung des Porenwegs an der Penetration eine Rolle zu spielen. Der transepidermale Transport kann angesichts der Zweikompartiment-Struktur der Hornschicht interzellulär und transzellulär erfolgen. Die Annahme, dass unpolare Substanzen ausschließlich lateral durch interkorneozytäre Lipide und polare Substanzen zusätzlich durch Korneozyten diffundieren, erwies sich als nicht ganz richtig. Auch bei polaren Stoffen dominiert der interzelluläre Weg, wobei die hydratisierten Kopfgruppen der Bilayerlipide als bevorzugtes Passagemedium fungieren sollen. Der geringe Wassergehalt nicht okkludierter Korneozyten (5 bis 15 %) und die Tatsache, dass von den hydrophilen Substanzen dicht gepacktes Keratin und äußerst stabile Zellmembranen alternierend überwunden werden müssen, sprechen gegen den transzellulären Weg. Physikochemische und physiologische Faktoren der Haut bestimmen die Diffusion des Wirkstoffs. Die Beeinflussung der Hydratation durch topische Applikation einer Formulierung ist von großer Bedeutung. Okklusive Bedingungen (z. B. Transdermale Therapeutische Systeme, Vaseline) behindern den TEWL, was zu Hydratation und Mazeration der Hornschicht führt. Der Diffusionswiderstand der hydratisierten Strukturen gegen eindringende Substanzen ist reduziert. Auch Wirkstoff-Haut-Wechselwirkungen können auf die Penetration in tiefere Hautschichten einen nicht zu unterschätzenden Einfluss haben. Chemische Bindungen (z.B. van der Waals-Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen) sowie Biotransformationsreaktionen (z.B. Oxidation, Reduktion) können sich als Konkurrenz zum Substanztransport in die Epidermis und Dermis erweisen und so den Anteil bioverfügbaren Wirkstoffs verringern.

### **Enhancer**

Da nur Wirkstoffe mit ausreichender Lipophilie in das SC penetrieren, wird nach Auswegen gesucht, die Arzneistoffaufnahme zu verbessern oder gar erst zu ermöglichen. Dazu verwendet man Penetrationenhancer (Trommer und Neubert 2006, vgl. Tab. 2), die die Wirkstoffpenetration verbessern, und geeignete Vehikelsysteme. Neben diesen beiden Möglichkeiten wird noch an der Iontophorese bzw. anderen elektrochemischen Methoden (in

Form von Radiowellen und Mikronadeln) geforscht. Mikronadeln und Radiowellen erzeugen „Löcher“ im  $\mu\text{m}$ -Bereich, die erst nach 20-30 h verheilen. Wie effektiv die seit Jahren erfolgreich in der topischen Therapie eingesetzten Substanzen sind, hängt v. a. von ihren physikochemischen Eigenschaften ab. Diese Eigenschaften bestimmen, ob die Wirkstoffe über die polare oder die apolare Route durch das SC gelangen. Die meisten verwendeten Enhancer beeinflussen die lipophile Route, indem sie die SC-Lipide verflüssigen.

Tabelle 2: Übersicht zu einigen Penetrationenhancern

<b>Enhancer</b>	<b>Verbesserung über die polare (hydrophile) Route</b>	<b>Verbesserung über die apolare (lipophile) Route</b>
Eutanol G <sup>®</sup>	X	X
Azon	X	X
Dimethylsulfoxid	X	X
Ölsäure		X
Mittelkettige Triglyceride		X
Harnstoff	X	
Propylenglykol	X	

Es ist auffällig, dass Eutanol G, Azon und Dimethylsulfoxid aufgrund ihrer chemischen Struktur sowohl die Penetration über die lipophile, apolare als auch die Diffusion über die hydrophile, polare Route beeinflussen. Bisher wurde Azon in kommerziellen Zubereitungen nicht verwendet, Dimethylsulfoxid führt in höheren Konzentrationen wegen seiner guten Lösungseigenschaften durch Mazeration der Stratum corneum-Lipide zur Aufhebung der Barrierefunktion. In dieser Arbeit wurde Eutanol G verwendet, ein verzweigt-kettiger Fettalkohol, der auch in zahlreichen kommerziellen Zubereitungen zum Einsatz kommt (z.B. Prednitop<sup>®</sup> Salbe, Creme oder Fettsalbe mit dem Arzneistoff Prednicarbat) und beide Routen beeinflussen kann.

Da bisher nur sehr wenige kleine Moleküle bekannt sind, die durch die polaren Stratum corneum-Strukturen diffundieren können, besteht eine große Herausforderung in der Entwicklung von Enhancern für diesen Weg. Durch solche Penetrationenhancer könnten auch Problemarzneistoffe, z.B. pharmakologisch aktive Peptide, die bislang nur parenteral appliziert werden, oder Nukleinsäuren zur Gentherapie als dermale oder transdermale therapeutische Systeme eingesetzt werden.

## **Modulation**

Eine Modulation kann in Form einer Erhöhung der Penetration oder Permeation eines Arzneistoffes erfolgen oder in einer Anreicherung in definierten Hautschichten. Eine Penetrationssteigerung und/oder Penetrationsbeschleunigung kann auch erreicht werden durch physikalische Methoden, z.B. Schaffung von Okklusionsbedingungen, Anwendung von Iontophorese oder Ultraschall. Sogenannte Enhancer (Penetrationsverbesserer), die die Barrierefunktion herabsetzen, verändern Vehikelcharakteristika und interagieren mit Strukturen des Stratum corneum. Das Resultat ist eine Erhöhung der Hautpenetration. Wechselwirkung der Enhancer mit den Lipidstrukturen, z.B. Interkalation zwischen die Alkylketten der Bilayerschichten, führen zur Störung ihrer molekularen Organisation und zur Abnahme der Rigidität. Weitere Ursachen dieser Wirkung sind z.B. Hydratation, Lipidextraktion und veränderte Verteilungsbedingungen. Wenn eine Verbindung das SC passiert, ist auch eine Permeation mit Absorption in den Blutkreislauf und damit eine Ganzkörperbelastung nicht auszuschließen. Das Diffusionsmedium SC entspricht dem eines Festkörpers, während die tieferen dermalen Bereiche mit einem Hydrogel vergleichbar sind. Wegen der Lipidexozytose in den Interzellulärraum zwischen den Korneozyten sind Diffusionsvorgänge in den oberen Bereichen des Stratum granulosum stärker retardiert als in darunter liegenden Schichten. Substanzen, die die lebende Epidermisschicht erreichen, haben hier eine deutlich höhere Diffusionsgeschwindigkeit als im SC in Richtung des dermalen Gewebes transportiert werden.

## **Arzneistoff-Eigenschaften**

Neben den bereits behandelten Haut- und Formulierungs-Faktoren sind für eine ausreichende Penetration auch die Arzneistoff-Eigenschaften entscheidend. Die Stoffeigenschaften, die für eine nicht ausreichende Bioverfügbarkeit verantwortlich sind, haben Lipinski et al. 1997 zusammengefasst als die „5er Regel“. Diese besagt, dass bei

- einer Molmasse  $> 500$  Da;
- einem  $\log P > 5$  (Octanol/Puffer-Verteilungskoeffizient der ungeladenen Form);
- einer Zahl der H-Donatoren  $> 5$  und
- einer Zahl der H-Akzeptoren  $> 2 \times 5$

eine schlechte Bioverfügbarkeit vorliegt. Ausnahmen von dieser Regel betreffen Antibiotika, Antimykotika, Vitamine und Herzwirksame Glykoside.



Um auf einen klinischen Nachweis der Bioäquivalenz verzichten zu können, wurde das biopharmazeutische Klassifizierungssystem (BCS), eingeteilt in vier Klassen, entwickelt, die die Löslichkeit, die Permeabilität sowie die Freisetzung eines Arzneistoffs näher charakterisiert (Lindenberg et al. 2004, Rinaki et al. 2003, Wu und Benet 2005). Neben der Löslichkeit und der Permeation ist weiterhin die chemische Stabilität im Gastro-Intestinal-Trakt, eine möglichst geringe Inaktivierung im Darm und in der Leber weitere wichtige, die Bioverfügbarkeit beeinflussende Faktoren. Es sollte auch ein Rücktransport aus den Mucosazellen in das Darmlumen durch Transportproteine wie z.B. das P-Glycoprotein ausgeschlossen werden.

Die mTOR-Inhibitoren mit einer Molmasse deutlich über 500 Da werden bei intakter Haut als Problemarzneistoffe bezüglich der systemischen Bioverfügbarkeit und der Penetration, angesehen. Anfänglich wurden auch die Calcineurin-Inhibitoren als nicht penetrationsfähig angesehen, was durch die Zulassung mehrerer Präparate in Form halbfester Zubereitungen widerlegt wurde: Tacrolimus (Protopic<sup>®</sup> 0,03 % und 0,1 %) und Pimecrolimus (Elidel<sup>®</sup> 1% der Firma Novartis und Douglan<sup>®</sup> 1% von 3M Medica).

Es ist hochinteressant, dass Sirolimus anfänglich als Antimykotikum eingesetzt werden sollte, also einem Vertreter der Arzneistoff-Gruppe, die als Ausnahme der „5er Regel“ anzusehen ist, bevor die ausgezeichneten immunsuppressiven Eigenschaften erkannt wurden. Everolimus, das sich in der chemischen Struktur nur durch eine zusätzliche Ethyl-Gruppe unterscheidet kann als eine Weiterentwicklung von Sirolimus betrachtet werden kann. Die Penetrationsfähigkeit von Everolimus an der Haut muss noch untersucht werden. Untersuchungen bezüglich der topischen Anwendung von Sirolimus an der Haut deuten darauf hin, dass dieser Arzneistoff in der Lage ist in die Haut zu penetrieren (Ormerod et al. 2005).

### 3.1.3 Atopische Dermatitis

Das Hauptproblem der atopischen Dermatitis (AD) besteht in einer gestörten Barrierefunktion der Haut, basierend vermutlich auf Mutationen im codierenden Gen für Filaggrinpeptide. Filaggrin ist im Stratum basale verantwortlich für die Vernetzung der Keratinfilamente und damit die Bildung des unlöslichen Keratins, sorgt also für eine intakte epidermale Barriere. Zu dieser Barriestörung kommt noch die Entzündungsreaktion hinzu, die immer, auch während der Remissionsphase vorhanden ist, selbst wenn die Haut oberflächlich unversehrt aussieht. Diese permanent-subklinische Entzündung liefert die Grundlage für den nächsten Schub. Die atopische Dermatitis (AD, auch Neurodermitis atopica, atopisches Ekzem) ist eine stark juckende, entzündliche Hauterkrankung mit chronisch-rezidivierendem Verlauf. Sie ist beim Säugling durch Milchschorf, bei Kindern und Jugendlichen durch makulapapulöse Hauterscheinung, besonders an den Beugen der großen Gelenke (Barnetson und Rogers 2002), bei älteren Personen durch juckende Knötchen gekennzeichnet. AD wird wie die allergische Rhinokonjunktivitis und das allergische Asthma bronchiale zum Formenkreis atopischer Erkrankungen zugeordnet. „Atopie“ beschreibt eine genetisch determinierte Überempfindlichkeit von Haut und Schleimhaut gegenüber Umweltfaktoren in Verbindung mit einer erhöhten IgE-Bildung und/oder einer veränderten unspezifischen Reaktivität (Büchner 1991). Vier Hauptmerkmale für die Diagnosestellung der AD nach Hanifin und Rajka sind:

- Pruritus
- typische ekzematöse Morphologie
- Beugeneckzeme bei Erwachsenen, Gesicht- und Streckseitenbefall bei Säuglingen und Kindern
- Chronisch-rezidivierender Verlauf und persönliche oder familiäre Anamnese für atopische Erkrankungen (vgl. Rudikoff und Lebwohl 1998, Tab. 3)

Die genaue Ätiologie der AD ist zwar unklar, dennoch wird in der Pathogenese von einer Kombination unbekannter genetischer Faktoren und der Interaktion zwischen der Umwelt und dem Immunsystem ausgegangen. Dabei spielen die immunologischen Veränderungen und die verstärkte T-Zellaktivierung mit den entsprechend sezernierten inflammatorischen Zytokinen eine wesentliche Rolle. Die Untersuchung dieses Pathogenesekonzepts umfasst die TH1/TH2-Balance, die zugunsten der T-Helfer-2-Zellen (TH2) verschoben ist, die gesteigerte IgE-

Synthese, die Präsenz von IgE-Rezeptoren auf der Oberfläche der Langerhans-Zellen, Mechanismen der Staphylokokken-Superantigen-vermittelten T-Zellaktivierung und die gestörte Barrierefunktion der Hornschicht (Rudikoff und Lebowohl 1998). Die letzten zwei Punkte sind hochinteressant, weil in dieser Arbeit PS verwendet wird. Diese Substanz ist Bestandteil von Ceramiden und spielt bei deren Synthese eine entscheidende Rolle, die wiederum bei der Barrierefunktion des SC eine wichtige Aufgabe erfüllt. Weiterhin wurde bei PS festgestellt, dass es gewisse antimikrobielle Eigenschaften gegen bestimmte Erreger aufweist, z.B. auch gegen Staphylococcus aureus (s.u.). Untersuchungen brachten eine Verbindung zwischen Ceramid-Mangel und atopischer Dermatitis zum Vorschein (Imokawa et al. 1991, Yamamoto et al. 1991) In den letzten 20-30 Jahren ist die Prävalenz der AD stark angestiegen. Bei Kinder und Jugendlichen ist die Krankheit häufiger als bei Erwachsenen. Sie manifestiert sich in 70 % der Fälle vor dem 5. Lebensjahr. Etwa ein Drittel der Patienten verliert bis zum Erwachsenenalter die Symptome, bei einem Drittel persistieren sie bis zum Erwachsenenalter und bei einem Drittel treten sie erst im Erwachsenenalter auf. Der Juckreiz schränkt die Lebensqualität der Patienten erheblich ein (Schlafdefizit, Infektionen wegen der aufgekratzten Haut).

Tab. 3: Diagnosekriterien der AD nach Hanifin und Rejka

<b>Majorkriterien (mindestens 3)</b>	<b>Minorkriterien (mindestens 3)</b>
Pruritus	Xerose
Typische ekzematöse Morphologie und Verteilung	Positive Hauttests vom Soforttyp
Beugeneckzeme bei Erwachsenen, Gesicht- und Streckseitenbefall bei Säuglingen und Kindern	Erhöhtes Serum-IgE
Chronischer oder chronisch-rezidivierender Verlauf	Neigung zu Hautinfektionen (Herpes simplex, Staphylococcus aureus,)
Eigen- oder Familienanamnese für Atopie (Asthma bronchiale, Allergische Rhinokonjunktivitis, atopische Dermatitis)	Ichthyosis, palmare Hyperlinearität
	Chronisches Hand- bzw. Fussekzem
	Juckreiz beim Schwitzen u.v.m.

Die AD lässt sich pathophysiologisch in drei Typen einteilen:

- der intrinsische-Typ,
- der extrinsische-Typ und
- der gemischte Typ.

Beim intrinsischen-Typ fehlen die Allergien der Atemwege (Respirationsallergie) und die spezifische IgE-Bildung. Der „extrinsic-Typ“ zeichnet sich durch eine Sensibilisierung auf Umweltallergene und erhöhte Serum IgE-Werte aus. Der gemischte Typ geht einher mit einer Respirationsallergie und erhöhter Produktion von IgE. Eine zentrale Rolle spielen dabei die T-Lymphozyten. Die CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation kann dabei in zwei funktionelle Subsets unterteilt werden. TH1-Zellen synthetisieren hauptsächlich die Markerzytokine Interleukin-2 (IL-2) und Interferon  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ), TH2-Zellen hingegen u.a. IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13. TH2-Zellen, die in der akut entzündlichen Phase der AD dominieren, vermitteln in erster Linie humorale Immunantworten. Durch IL-4 und IL-13 induzierte IgE-Synthese und durch IL-5 aktivierte Proliferation und Ausreifung der eosinophilen Granulozyten sind charakteristisch für die TH2-vermittelte Immunreaktion. Eine prädominante TH1-Antwort mit vermehrter Interferon- $\gamma$ -Expression ist das Kennzeichen der chronischen Phase der AD und assoziiert mit einer zellulären Immunreaktion vom Spättyp. IL-4 ist einerseits das entscheidende Zytokin für die Induktion der IgE-Synthese und andererseits hemmt es die Generierung von TH1-Zellen. IFN- $\gamma$  hemmt die IgE-Synthese und die TH2-Proliferation, fördert aber das TH1-Zellwachstum (Böhm und Bauer 1997, Leung 2000).

Bei über 90% der Patienten mit AD ist die lädierte Haut mit *Staphylococcus aureus* besiedelt. Dieser Erreger produziert die Proteine Staphylokokkenenterotoxine A und B und „toxic-shock-syndrom-toxin-1“, sogenannte Superantigene. Dieses Superantigen interagiert mit HLA-Klasse-II-Molekülen, was zu einer Aktivierung von T-Zellen führt und somit die Infiltration von T-Zellen in die Haut fördert.

## Therapie

Eine Leitlinie zur topischen Therapie mit GC hat die Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen und Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) erarbeitet. Dabei werden der Klasse I die GC mit ausgeglichenem Verhältnis von erwünschten zu unerwünschten Wirkungen zugeordnet. Bei den GC der Klasse II überwiegen die erwünschten Wirkungen deutlich. GC sind bei akuten ekzematösen Hautveränderungen Mittel der Wahl. Kurzfristig eingesetzt werden stark wirksame GC. Eine längerfristige Therapie sollte mit den schwach wirksamen GC erfolgen. Einen Fortschritt in der topischen Therapie stellen die neuen nicht-halogenierten GC (z.B. Prednicarbat, Mometasonfumarat) dar, die ein deutlich verbessertes Nutzen-Risiko-Verhältnis aufweisen (soft steroids). Eine vielversprechende Alternative zu den GC stellt die Substanz-Klasse der immunsuppressiven Makrolide dar. Zwei Vertreter der Calcineurin-Inhibitoren, Tacrolimus und Pimecrolimus, sind bereits als halb feste Zubereitungen zugelassen (s.o.). Sie sind von der Potenz mit den hochpotenten GC vergleichbar, haben jedoch den grossen Vorteil, dass sie zu keiner Hautatrophie führen.

Derzeit findet bei der Therapie der AD ein Umdenken statt (s. PZ 23, 2009). Die Behandlung mit Calcineurin-Inhibitoren oder topischen GC erfolgt bei Erwachsenen und Kindern nicht nur während eines Schubes, sondern auch während der Remissionsphasen, um so den Schüben entgegenzuwirken. Bisher erfolgt die Therapie nach Abklingen eines Schubes mit Basistherapeutika (s. u.). Bei der neuen proaktiven Therapie wird unverzüglich zu Beginn eines Schubes mit der GC-Therapie begonnen. Nach Abklingen der akuten Phase wird intermittierend wie folgt mit GC behandelt:

- einmal pro Woche für zwei Monate bei milder Form,
- bei moderater AD zweimal pro Woche über vier bis sechs Monate und
- zwei- bis dreimal pro Woche über sechs Monate oder länger bei schwerem Verlauf.

Durch dieses neue Therapieschema konnte die Häufigkeit der Rezidive bei Erwachsenen signifikant reduziert werden. Rückfettende, wirkstofffreie Extrerna und Ölbäder stellen die adjuvante Basistherapie dar. Die gestörte Barrierefunktion der Hornschicht führt zur trockenen und empfindlichen Haut bei Atopikern. Gesteigerter TEWL, erhöhte Permeabilität und erhöhte Rauigkeit sind charakteristisch für diese Barriestörung. Die Wiederherstellung dieser gestörten Barrierefunktion und die Einsparung von topischen GC sind wesentliche Therapieziele. Dazu werden u.a. O/W-Emulsionen bevorzugt eingesetzt, wie sie auch in dieser Arbeit hergestellt und untersucht wurden. Weiterhin wäre der Gebrauch Ceramidhaltiger Formulierungen angebracht, wie von Yilmaz und Borchert 2005 und 2006 entwickelt bzw. beschrieben wurden.

## 3.2 Das Auge

### 3.2.1 Aufbau und Funktion

Das Auge, bestehend aus dem Augapfel mit dem Sehnerv, liegt geschützt in der knöchernen Augenhöhle und ist von Fettgewebe umgeben. Der Augapfel ist kugelförmig und besteht aus drei Schichten (Abb. 4):

- äußere Augenhaut: Sklera und Cornea
- mittlere Augenhaut: Aderhaut, Ziliarkörper und Iris
- innere Augenhaut: Retina

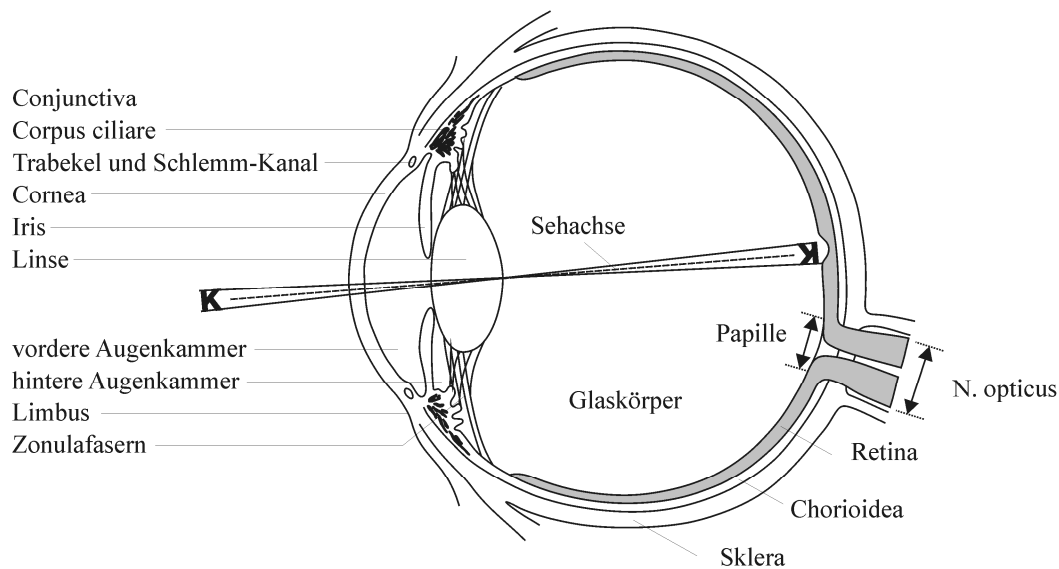


Abb. 4: Querschnitt durch den linken Augapfel

Die Sklera (Lederhaut) und die Cornea (Hornhaut) bilden die äußere Augenhaut. Drei hintereinander gelagerte, verschieden ausgebildete Abschnitte, Die Aderhaut (Chorioidea), der Ziliarkörper (Corpus ciliare) und die Iris (Regenbogenhaut) bilden die mittlere Augenhaut (Gefäßschicht des Auges), auch Uvea genannt. Die Retina (Netzhaut) bildet die innere Augenhaut.

## **Äußere Augenhaut**

### **Sklera**

Die weiße Sklera (Lederhaut), bildet die feste äußere Hülle des Augapfels und sorgt somit für die Formbeständigkeit des Auges. Das eigene Blutkreislaufsystem schimmert bei Entzündungen subconjunctival rötlich durch. Die Conjunctiva bulbi bedeckt in den vorderen Bereichen des Augapfels die Sklera.

### **Cornea**

Die transparente Cornea (Hornhaut) unterscheidet sich im Bau, im Stoffwechsel und in der Physiologie von vaskularisierten Organen, weil sie keine Blutgefäße aufweist.

Ihr Aufbau wird weiter unten ausführlicher erklärt.

## **Mittlere Augenhaut (Uvea)**

### **Aderhaut**

Ein schichtartig übereinanderliegendes System von Blutgefäßen bildet die Aderhaut (Chorioidea). Große Arterienäste der Aorta ciliares und die Vortexvenen liegen scleralseitig außen. Ein Netz von mittelgroßen Adern befindet sich weiter innen.

### **Ziliarkörper**

Wie ein Kranz umfasst der im vorderen Drittel des Augapfels liegende Ziliarkörper das Fenster der Cornea. Ein zweischichtiges Epithel bedeckt ihn, wobei das äußere, muskelseitige Blatt Pigment enthält (pigmentiertes Ziliarepithel) und die innere Zellschicht ein zylindrisches, nicht pigmentiertes Epithel ist. Das Ziliarepithel stellt eine Diffusionsbarriere (Blut/Kammerwasser-Schranke) zwischen den Ziliarkörper-Kapillaren und dem Extrazellularraum und der hinteren Augenkammer auf der äußeren Seite und dem Extrazellularraum auf der hinteren Glaskörperseite dar. Diese Schranke wird bei Entzündungen, perforierenden Verletzungen oder Verätzungen durchlässiger. Der

Proteingehalt im Kammerwasser steigt für Stunden oder bis zur Beseitigung der Schädigung stark an. Zwischen der Retina und dem Extrazellularraum existiert eine ähnliche Barriere.

### **Iris**

Die Iris ist eine vorn aus dem lockeren Irisstroma und hinten aus dem Pigmentblatt, einer Fortsetzung des pigmentierten Ziliarepithels, aufgebaute dünne Gewebescheibe.

### **Innere Augenhaut**

#### **Retina**

Auf der äußeren Seite der Retina liegen die Stäbchen und Zapfen, die nach dem Auftreffen von Licht elektrische Potentiale erzeugen, die zur Sinneswahrnehmung dienen.

Die Linse, die vordere und hintere Augenkammer, die das klare Kammerwasser enthalten, und der Glaskörper befinden sich im Inneren des Augapfels.

Weitere wichtige Bausteine des Auges sind u.a. die Conjunctiva (Bindehaut) und der Nervus opticus (Sehnerv).

#### **Linse**

Die transparente elastische Linse hat keine Blutgefäße und Nerven und wird durch Diffusion ernährt. Die Masse der Linse, ein wesentlicher Bestandteil des optischen Systems, besteht fast vollständig aus intrazellulärem Material, das von einer festen, elastischen Kapsel aus Glykoproteinen umhüllt ist. Ihre Fähigkeit die Gestalt zu ändern kommt dadurch zustande, dass sie durch feinste Fäden (Zonulafasern) am Ziliarkörper aufgehängt ist.

#### **Vordere und hintere Augenkammer**

Der Raum zwischen der Cornea und der Vorderseite der Iris wird als vordere, und der Raum zwischen der vorderen Glaskörpermembran und der Rückseite der Iris wird als hintere Augenkammer bezeichnet.



Beide Kammern sind mit klarem Kammerwasser gefüllt, das im Ziliarkörper gebildet wird und durch die Pupille von der vorderen in die hintere Kammer fließt. Das Trabekelwerk besteht aus Gewebekanälchen, die netzartig miteinander verwoben sind und erstreckt sich zwischen Cornea, Sklera und Ziliarkörper. Es stellt ein Filtersystem dar, durch den das Kammerwasser in den Schlemm'schen Kanal sickert. Zur Drucksteigerung im Auge (Glaukom) kommt es, wenn der Zufluss des Kammerwassers größer ist als es aus der Vorderkammer über die Trabekel in den Schlemm'schen Kanal sickern kann.

### **Kammerwasser**

Das Kammerwasser füllt als klare, wässrige Flüssigkeit die Räume der Hinter- und Vorderkammer aus. Abgesondert wird es im Ziliarkörper durch Filtration und Sekretion aus dem Blutplasma. Es umspült die Iris und die Linse, benetzt die Hornhautrückfläche, fließt durch das Trabekelwerk in den Schlemm'schen Kanal und weiter durch die Kammerwasservenen transscleral über das venöse Kreislaufsystem der Conjunctiva ab. Es enthält Elektrolyte und nichtionische Komponenten, die vergleichbar mit dem Plasma sind.

### **Glaskörper**

Die Retina, die den Glaskörper umgibt, wird durch den Aufbau des Glaskörpers geschützt und unterstützt. Ein Gerüst aus kollagenen Fibrillen bildet die gallertartige Masse des Glaskörpers. Er besteht zu 98 % aus Wasser, das an nur 2 % Hyaluronsäure, genauer an die polaren Gruppen der Schwefelsäureester, gebunden ist. Die Hyaluronsäure, ein Glykosaminoglykan, ist in die Lücken des kollagenen Gerüsts integriert. Normalerweise sind im Glaskörper keine Blutgefäße enthalten.

### **Conjunctiva**

Die Conjunctiva, eine Schleimhaut auf der Innenseite der Augenlider, beginnt an den Lidrändern (Conjunctiva tarsi) und schlägt auf der Höhe der Äquatorebene des Augapfels wieder nach vorne um und vereint sich mit der Sklera (Conjunctiva bulbi). Das conjunctivale Stroma ist reich an Blut- und Lymphgefäßen. Ein Kennzeichen aller Blutgefäße der Conjunctiva ist die Fähigkeit sich bei verschiedensten Reizen rasch und stark erweitern zu

können. Eine entzündliche Schwellung (Conjunctivitis) ist das Ergebnis der Absonderung von Exsudat und Blutzellen der Blutgefäße in das conjunctivale Stroma.

Ein mehrschichtiges Epithel bedeckt die Oberfläche der Conjunctiva und geht am Rand (Limbus) in das Corneaepithel über. Die Becherzellen befinden sich zwischen den Plattenepithelzellen. Das schleimige Sekret der Becherzellen enthält Glykoproteine (Mucin) und leistet damit einen wesentlichen Beitrag zur Bildung des präcornealen Tränenfilms.

### **Nervus opticus**

Durch eine siebartige Öffnung (Lamina cribosa) an der Rückseite des Augapfels verlaufen die Nervenfasern aus der Retina. und vereinen sich in einem Nervenstrang, dem Sehnerv (Nervus opticus).

### **Tränenflüssigkeit**

Die Oberfläche der Conjunctiva und der Cornea werden von der Tränenflüssigkeit bedeckt, die eine Vielzahl wichtiger Funktionen erfüllt. Der Tränenfilm wird in den Tränendrüsen (Glandulae lacrimalis), den Becherzellen und den akzessorischen Tränendrüsen der Conjunctiva gebildet. Der Lidschlag und die Tränenflüssigkeit sorgen für die Selbstreinigung der Cornea und Conjunctiva. Ein Reflex, der zum Lidschlag und folglich zur Tränenausscheidung führt, wird schon durch eine geringe Reizung, z.B. ein Staubkorn, ausgelöst. Etwa 5-10 Mal pro Minute erfolgt der Lidschlag auch im reizlosen Zustand (Robinson 1993). Etwa 6-10  $\mu\text{L}$  beträgt ihr Volumen (Dolder 1990, Reim 1990). Tagsüber wird alle 15 min die komplette Tränenflüssigkeit ausgetauscht, d.h. die Gesamtproduktion an Tränenflüssigkeit pro Tag beträgt ca. 1 mL, wobei die Produktion nachts fast vollständig eingestellt ist. Die lokale Bioverfügbarkeit topisch applizierter Arzneistoffe wird durch die Ableitung über die Tränenkanäle zum Tränennasenkanal verringert. Je nach Tageszeit schwankt ihr pH-Wert zwischen 7,14 und 7,82 (Carney et al. 1976).

Der Tränenfilm besteht aus drei Schichten. Eine hydrophile, etwa 0,2  $\mu\text{m}$  dicke Mucinschicht (Schleimschicht) liegt auf der hydrophoben Oberfläche des Corneaepithels. Sie grenzt an das Epithel der Cornea. Eine wässrige Schicht mit niedermolekularen Substanzen und Proteinen folgt nach außen (ca. 10  $\mu\text{m}$ ). Weiterhin enthält diese Schicht Immunglobuline (vor allem IgA), Vitamin A und Wachstumsfaktoren wie Epidermal Growth Factor (EGF), Transforming growth factor beta (TGFB), Tissue growth factor (TGF) und Fibronectin, ein Glykoprotein,

das eine Brückenfunktion zwischen Kollagenfibrillen und anderen Molekülen der extrazellulären Matrix ausübt, also eine Art Zellkleber ist.. Über dieser wässrigen Schicht liegt wie ein dünnes Häutchen eine Lipidschutzschicht, die aus Fettsäureestern, Cholesterin, Cholesterinestern, Triglyceriden und Phospholipiden besteht (0,1 µm).

Da die Cornea als Hauptdiffusionsbarriere eine besondere Rolle spielt soll ihre Struktur etwas ausführlicher beschrieben werden.

### **Cornea**

Die Cornea (Hornhaut) ist der glasklare, von Tränenflüssigkeit benetzte, gewölbte Teil der äußeren Augenhaut. Sie besitzt keine Blutgefäße und steht über ihren Rand (Limbus corneae) mit der Sklera und der Conjunctiva in Verbindung. Die Hornhaut hat einen geringeren Krümmungsradius und wölbt sich über der Iris und der Vorderkammer kuppelartig hervor. Mit einem Durchmesser von 11-12 mm und einer Dicke von 0,52 mm im zentralen Bereich- und 0,72 mm an den Rändern ist die Cornea nicht kreisrund, sondern etwas breiter in horizontaler Richtung als in vertikaler (Collins und Augustin 1996).

Die Cornea besteht von außen nach innen aus fünf Schichten:

- Corneaepithel
- Bowman-Schicht
- Stroma (Corneaparenchym, auch Substantia propria corneae)
- Descemet-Membran
- Corneaendothel

### **Epithel**

Ein 5-7schichtiges, 50-100 µm dickes und nicht verhorntes Plattenepithel bildet das lipophile Epithel. Untereinander durch Desmosomen verknüpft, sind die Basalzellen des Epithels außerdem an der Basalmembran durch Hemidesmosomen verankert, was für die hohe Widerstandsfähigkeit des Epithels gegen mechanische Beanspruchung verantwortlich ist. Die Basalmembran fungiert als Diffusionsbarriere für größere Moleküle.

### **Bowman-Membran**

Diese kräftige, zellfreie Membran mit einer Dicke von 10-13  $\mu\text{m}$  trennt das Epithel vom Stroma.

### **Stroma**

Das hydrophile Stroma stellt den größten Anteil an der Gewebemasse dar, wobei Keratozyten nur 5-10 % des Volumens ausfüllen und mindestens 90 % dem extrazellulären Raum zuzuordnen sind. Kollagene Fibrillen bilden den Hauptanteil des extrazellulären Materials, zwischen denen eine interfibrilläre Matrix aus Proteoglykanen eingelagert ist. Der gleichbleibende Abstand zwischen den kollagenen Fibrillen kommt durch die konstante Proteoglykan-Molekülgröße zustande. Die Transparenz der Cornea ist das Resultat der regelmäßigen Anordnung der Fasern und der Abwesenheit von Blutgefäßen. Da das Stroma ca. 70 % Wasser enthält, ist eine entsprechende Wasserlöslichkeit des Arzneistoffs Voraussetzung für die Diffusion.

### **Descemet-Membran**

Zwischen dem Stroma und dem Endothel liegt die sehr elastische, 5-10  $\mu\text{m}$  dicke Descemet-Membran. Sie ist die dickste Basalmembran des menschlichen Körpers.

### **Endothel**

Das 5  $\mu\text{m}$  dicke Endothel besteht aus einer einzigen Schicht regelmäßig angeordneter, abgeflachter Zellen. Das Endothel ist verantwortlich für den Stoffaustausch des Stromas mit dem Kammerwasser und damit für die Versorgung der Cornea mit Nährstoffen (z. B. Glucose oder Aminosäuren) und den Abtransport von Stoffwechselprodukten (z.B. Laktat). Die Dehydrierung des Stromas und damit die richtige Dicke und Transparenz der Cornea erfolgt über aktive Ionenpumpen des Endothels. Diese  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Ionen ziehen auf ihrem Wege Wasser aus dem Stroma mit, wodurch die makromolekulare Grundsubstanz des Stromas dehydriert. Die Barrierefunktion des eher lipophilen Endothels ist durch die geringe Schichtdicke abgeschwächt.

### 3.2.2 Ophthalmologische Arzneistoffaufnahme

Aus galenischer Sicht scheint die lokale Therapie von Augenerkrankungen nur wenig Spannendes zu bieten. Dem ist nicht ganz so. Die Therapie des hinteren Augenabschnittes erfolgt z. B. mit Implantaten und Retardinjektabilia als galenische Innovationen, während Formulierungen zur Behandlung des vorderen Augenabschnittes nur Teil-Innovationen darstellen.

Rund 95 % der Ophthalmika werden bei der Lokalthherapie eingesetzt. Davon stellen mit etwa 70 % wässrige Augentropfen den größten Anteil, während Gele und Salben zusammen nur rund 22 % ausmachen. Das Auge ist zwar leicht zugänglich, dennoch ist die Therapie oft suboptimal. Der Grund liegt in der Reinigungsfunktion des Auges, die als das natürliche Hindernis der Lokalthherapie betrachtet werden kann. Täglich produzieren die Tränendrüsen etwa 1 mL Tränen, wobei der Tränenfilm insgesamt etwa 7  $\mu\text{L}$  umfasst. Pro Minute werden max. 50  $\mu\text{L}$  Tränen über die Tränenkanäle in den Tränensack und dann weiter zum Nasengang abgeleitet. Der Hauptanteil der Arzneistofflösung oder -suspension von applizierten Augentropfen mit einem Volumen von 25-50  $\mu\text{L}$  wird innerhalb von 1-2 Minuten durch den Auswascheffekt von der Oberfläche weggespült. Es wird umso mehr ausgewaschen, je höher das getropfte Volumen ist. Durch die Verdünnung mit der Tränenflüssigkeit nimmt die Arzneistoffkonzentration auf ein Fünftel ab, mit dem Ergebnis, dass weniger als 5 % des applizierten Wirkstoffes corneal verfügbar sind. Die Gefahr von unerwünschten Arzneimittelwirkungen durch den resorbierten Anteil, der ohne First-pass-Effekt in den Blutkreislauf gelangt, steigt. Hinzu kommt eine Verringerung der cornealen Bioverfügbarkeit durch einen verstärkten Tränenfluß infolge von Irritationen.

Die Verweilzeit am Auge kann durch galenische Strategien erhöht werden. Ölige Arzneiformen sind wenig patientenfreundlich, haften dafür aber gut. Polyvinylalkohol (PVA) und Polyvinylpyrrolidon (PVP), sowie Cellulose-Derivate (Hypromellose, Carmellose und Hyetellose) erhöhen die Viskosität der Formulierung. Poloxamergele, deren Viskosität als ein in-situ-System (Robinson und Mlynek 1995) erst durch die temperaturbedingte Umwandlung (Gilbert et al. 1986) oder pH-Veränderung (Gurny et al. 1987) vom Sol zum Gel steigt sind weitere Alternativen zur ophthalmologischen Applikation. So erreichten Srividya et al. 2001 eine verzögerte Freisetzung von Ofloxacin in in-situ gelierenden, pH-abhängigen Augentropfen. Als Gelierungsmittel wurde Carbopol<sup>®</sup> 940 und als Viskositätserhöher Methocel E50LV (Hydroxypropylmethylcellulose) eingesetzt. Auch eine Erhöhung der Elektrolytkonzentration kann zur Viskositätserhöhung bei Poloxamer-haltigen Augentropfen

führen (Rozier et al. 1989). Dieses Prinzip nutzten auch Gan et al. 2009 in ihrer in vivo und in vitro Untersuchung zur Freisetzung von Cyclosporin an Kaninchenaugen aus einer Mikroemulsion. Mit der Cyclosporin-Mikroemulsion konnten im Vergleich zu zwei anderen Formulierungen eine bessere Benetzbarkeit, längere Verweildauer auf und höhere Konzentrationen in der Cornea erzielt werden. Hochmolekulare mucoadhäsive Stoffe wie Hyaluronsäure und Carbomer (Polyacrylsäure) sind hochinteressant. Diese Polymere gehen eine Wechselwirkung mit der Mucinschicht des Cornea-Epithels ein, wodurch eine Verbesserung der Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen zu erwarten ist. Solch ein mucoadhäsives System ist in den Fertigarzneimitteln Nyogel<sup>®</sup> oder Dispatim 0,1 % Augengel<sup>®</sup> (Arzneistoff Timolol), Ultracortenol<sup>®</sup> GL (Arzneistoff Prednisolon) als Gelrite<sup>®</sup>, ein niedrig acetylierter Gellangummi, zugelassen. Dabei handelt es sich um eine Formulierung zur pH-abhängigen in situ Gelierung, wodurch die Patienten-Compliance bei nur einmal täglich erfolgender Applikation des Augengels in Tropfenform verbessert wurde. Wenn man sich die Zusammensetzung ansieht, stellt man fest, dass beide Arzneimittel eine Kombination aus Carbomer und Polyvinylalkohol enthalten. In einer in vivo Studie an 167 Probanden wurde die Effektivität von Nyogel<sup>®</sup> in Bezug auf die Senkung des Augeninnendrucks gegen herkömmliche Timolol-haltige Augentropfen (0,5 % Timolol) verglichen (Rouland et al. 2002). Dabei erwiesen sich beide Formulierungen als gleich effektiv, wobei sich bei Nyogel<sup>®</sup> weniger Probanden über Brennen und eine Bindehautentzündung beklagten.

So wurden in vivo mit einem Timolol-Carbomer-Augengel in den Konzentrationen 0,05 und 0,025 %, sowie mit einer 0,1 % igen wässrigen Lösung nach einmaliger Applikation am Kaninchen-Auge Wirkstoffkonzentrationen nach 30, 60 und 240 min im Blut, im Kammerwasser und in der vom Auge heruntergewaschenen Formulierung bestimmt (von der Ohe et al. 1996). Im Blut war die Arzneistoff-Konzentration nach Applikation der wässrigen Lösung am größten, während nach Applikation des 0,05 % igen Gels im Kammerwasser und in der runtergewaschenen Formulierung die größte Arzneistoff-Konzentration messbar war. Daraus folgerten die Autoren, dass die Verweildauer des 0,05 % igen Gels den anderen Formulierungen überlegen war und somit eine verbesserte Bioverfügbarkeit im Kammerwasser aufwies, aber eine geringere systemische Resorption, was vorteilhaft ist, um Nebenwirkungen zu reduzieren. Timololmaleat zeigte in einer Formulierung mit 3 % Methylcellulose (Viskositätserhöher) und mit 25 % Poloxamer Pluronic F127 eine gesteigerte oculare Bioverfügbarkeit verglichen mit einer wässrigen Lösung und anderen Viskositätserhöhern bzw. anderen Pluronic-Konzentrationen (El-Kamel 2002).

Nano- und Mikropartikel, sowie Liposomen und Inserte führen auch zu einer längeren Verweilzeit. Atropin als freie Base eingearbeitet in Multilamellare Lipidvesikel bzw. Liposomen mit positiver Ladung führte an Kaninchen-Augen zu einer signifikant längeren Pupillen-Dilatation als negativ geladene oder ungeladene Liposomen und Atropin-Lösungen (Meisner et al. 1989). Bezogen auf die große Zahl der Untersuchungen über die Inserte ist die Ausbeute an zugelassenen Fertigarzneimitteln minimal. Dieser Auffassung sind auch Saettone und Salminen 1995, die sich in ihrer Arbeit u.a. mit Ocusert<sup>®</sup> und NODS<sup>®</sup> (New Ophthalmic Delivery System) beschäftigten. Ocusert<sup>®</sup> gibt Pilocarpin über einen Zeitraum von einer Woche frei. NODS<sup>®</sup> hat gegenüber herkömmlichen Inserten den Vorteil der Bioabbaubarkeit bzw. der Löslichkeit des Freigabesystems. Vielversprechender sind arzneistoffbeladene punctum plugs, „Stöpsel“ für die Tränenkanäle, und Kontaktlinsen mit langsamer, kontrollierter Freigabe. Etwa 3-5 % der applizierten Arzneistoffmenge gelangen in den vorderen Augenabschnitt. Deutlich aufwendiger ist der Weg in den hinteren Abschnitt, nämlich systemisch oder intravitreal, d.h. Einspritzen in den Glaskörper, z.B. bei altersbedingter Makuladegeneration (AMD).

Die äußerste lipophile Epithelschicht der Cornea besteht aus einem 5-7schichtigen nicht verhornten Plattenepithel. Die Tight Junctions zwischen den Zellen sorgen dafür, dass Wasser und andere hydrophile Verbindungen das Epithel nur unzureichend durchdringen. Lipophile Substanzen können allerdings gut durch das Epithel diffundieren. In der Regel haben Substanzen mit einer Molmasse größer 1000 kaum Chancen das Epithel zu passieren. Trotz eines Anteils von 10 % an der cornealen Gesamtmasse, kann das Epithel für geeignete lipophile Arzneistoffe als ein Depot dienen. Für größere Moleküle fungiert die Basalmembran ebenfalls als Barriere. Das Stroma hat einen ungefähren Wassergehalt von 70 %, was für eine rasche Diffusion dieser Schicht eine entsprechende Wasserlöslichkeit voraussetzt. Die Barriereeigenschaft des Endothels ist aufgrund seiner geringeren Schichtdicke verglichen mit dem Epithel, das wie das Endothel auch einen eher lipophilen Charakter hat, geringer. Die wichtigsten Barrieren beim Transport von Arzneistoffen stellen das Corneaepithel und –stroma dar (Huang et al. 1983). Die corneale Permeabilität wird dabei hauptsächlich durch die Lipophilie (Ahmed et al. 1987, Ashton et al. 1991, Wang et al. 1991) und den Octanol/Puffer Verteilungskoeffizient (pH 7,4) bestimmt, der im Idealfall zwischen 100 und 1000 liegen sollte (Schoenwald und Ward 1978, Schoenwald und Huang 1983). Hydrophile Moleküle können das lipophile Epithel und lipophile Stoffe das hydrophile Stroma am schwersten passieren. Ausschlaggebend für eine corneale Permeation sind neben der Lipophilie die Wasserlöslichkeit (Sieg und Robinson 1978), die Molekülgröße (Liaw und Robinson 1992),

die Ladung (Liaw et al. 1992) und der Ionisationsgrad (Doane et al. 1978, Brechue und Maren 1993, Sieg und Robinson 1978) eines Moleküls. Die nichtionisierte Form eines Moleküls kann die Cornea leichter passieren als die ionisierte Form (Dolder 1990). Der Hauptanteil der Arzneistoff-Absorption erfolgt über die Cornea, wobei aber nicht vernachlässigbare Mengen auch über die Sklera und die Conjunctiva absorbiert werden können (Watsky et al. 1988). Die Conjunctiva ist für hydrophile Verbindungen leichter passierbar als die Cornea und hat verglichen mit der Cornea eine deutlich größere Oberfläche.

Der relativ hohe Widerstand der Sklera wird beim intraskleralen Implantat Medidur<sup>TM</sup> zur Behandlung des diabetischen Makulaödems ausgenutzt und befindet sich in Phase III der klinischen Prüfung. Bis zu 36 Monate lang setzt dabei das 3 mm lange System 0,6 mg Fluocinolonacetonid pro Tag kontrolliert frei. Retisert<sup>®</sup> enthielt den gleichen Wirkstoff und musste operativ eingesetzt werden. Der Zulassungsantrag wurde jedoch vom Hersteller wieder zurückgezogen. Ganciclovir im Implantat Vitrasert<sup>®</sup> zur Behandlung der HIV-assoziierten CMV-Retinitis wurde 2000 in der EU zugelassen, aber wieder freiwillig durch den Hersteller vom Markt genommen (EMA). Alle diese genannten Implantate haben den Nachteil des chirurgischen Eingriffs nach Laufzeitende, da die verwendeten Polymere nicht bioabbaubar sind.

Trotz aller Versuche Alternativen zu etablieren ist die intravitreale Injektion immer noch die effizienteste Methode, um einen Wirkstoff im hinteren Abschnitt zu applizieren.

## **Lokale immunologische Therapie**

Zur lokalen Therapie am Auge kann eine Vielzahl von Wirkstoffen eingesetzt werden, die auf unterschiedliche Art an den Wirkort gelangen. Dieser Wirkort kann in der okulären Oberfläche, in der Vorderkammer oder auch in den regionalen Lymphknoten lokalisiert sein, wobei Wirkstoffkonzentrationen in regionalen Lymphknoten bisher noch nicht untersucht wurden. Die nach der Keratoplastik relevanten Wirkorte zur Prophylaxe und Therapie von Immunreaktionen sind nicht völlig geklärt, mit Sicherheit gehören aber die okuläre Oberfläche und die Vorderkammer dazu. Hier und auch in der Konjunktiva können hohe Wirkstoffkonzentrationen verhältnismäßig leicht erreicht werden. Im Gegensatz zu Erkrankungen der Oberfläche gestaltet sich die lokale immunsuppressive Behandlung intraokularer Erkrankungen schwierig. Das liegt auch zum Teil daran, dass vorhandene Glucocorticoid-Zubereitungen (z.B. Prednisolonacetat) exzellente Penetrationseigenschaften vorweisen. Bereits nach 15-30 Minuten nach topischer Applikation eines einzelnen Tropfens



Prednisolons konnte der Wirkstoff im Kammerwasser nachgewiesen werden. Insgesamt ist die corneale Penetrationsfähigkeit vieler Glucocorticoide, z.B. Prednisolon(-acetat), Dexamethason, Hydrocortisonacetat, Fluorometholon, Rimexolon sehr gut. Die Messlatte für neue immunsuppressive Wirkstoffe ist demzufolge hoch angelegt. Bis auf die Glucocorticoide erfolgt bisher die postoperative Therapie in Studien nach der Keratoplastik zur Prophylaxe von Abstoßungsreaktionen systemisch u.a. mit den Calcineurin-Inhibitoren Ciclosporin A, Tacrolimus und mit dem mTOR-Inhibitor Sirolimus. Gemessen an der Breite der zum Teil schwerwiegenden Nebenwirkungen (Tab. 4) ist eine lokale Anwendung dieser Substanzen wünschenswert.

Tab. 4: Einige Immunsuppressiva zur systemischen Applikation nach der Keratoplastik

<b>Wirkstoff</b>	<b>Hemmung von</b>	<b>Therapeutischer Bereich</b>	<b>Nebenwirkungen</b>
Ciclosporin A	Calcineurin	100-400 ng/mL	Nephrotoxizität, Hypertonie, Gingivahyperplasie, Hirsutismus
Tacrolimus	Calcineurin	5-20 ng/mL	Knochenmarkdepression, Infektionen, Haematurie
Sirolimus	mTOR	12-20 ng/mL	Hyperlipidämie, Diarrhoe Knochenschmerzen, Anämie, Leberfunktionsstörungen

Zusätzlich zu den bereits untersuchten Immunsuppressiva nach der Keratoplastik, gibt es noch den mTOR-Inhibitor Everolimus. Eingesetzt wird Everolimus bisher zur Prophylaxe nach Herz- und Nierentransplantationen, bei denen die wirksame Blut-Konzentration im Bereich von 3-8 ng/mL liegt (Fachinformation Novartis Pharma).

Den Goldstandard bei der lokalen Therapie nach der Keratoplastik stellen die seit etwa 50 Jahren verwendeten und am häufigsten verordneten Glucocorticoide dar. Das Zusammenspiel von mehreren antiinflammatorischen Effekten, und nicht ein einzelner Angriffspunkt, führt zur guten intraokularen Wirksamkeit der Glucocorticoide. Einige dieser Wirkungen auf okuläre Gewebe sind:

- Hemmung der Fibroblasten-Transdifferenzierung
- Reduktion der Gefäßpermeabilität, die entzündungsabhängig ist
- Verminderung der zellulären Immunantwort
- Stabilisierung der Blut-Kammerwasserschranke
- Hemmung der entzündlichen kornealen Neovaskularisation
- Hemmung der Epithelproliferation
- Verzögerung der Wundheilung
- Erhöhung des intraokularen Drucks
- Förderung der Kataraktentstehung

Neben diesen klassischen Glucocorticoiden (GC) sind in den letzten Jahren neue GC-Derivate entwickelt worden, mit der Absicht die Nebenwirkungen, v.a. die Erhöhung des intraokularen Drucks, zu vermeiden. Loteprednol (Lotemax<sup>®</sup>) und Rimexolon (Vexol<sup>®</sup>) haben im Vergleich zu Prednisolonacetat eine deutlich verminderte Augendruckerhöhung. Trotzdem macht es das Nebenwirkungsprofil der Glucocorticoide erforderlichlich neue Immunsuppressiva oder bereits zugelassene Immunsuppressiva mit einem anderen Wirkungsprofil als Glucocorticoide in topisch applizierbarer Arzneiform zur Anwendung am Auge zu etablieren.

## **Immunsystem des Auges**

Der wichtigste Faktor bei der Immunologie des Auges ist die Tatsache, dass das Auge praktisch keinen lymphatischen Abfluss aufweist. Im zentralen Bereich der gesunden Cornea sind keine Langerhans-Zellen, T- und B-Lymphozyten vorhanden, dafür aber Antigen-präsentierende Zellen, die durch proinflammatorische Zytokine (IL-1, TNF) zur zentripetalen Migration stimuliert werden können (Dekaris et al. 1999). Hinzu kommt, dass unreife Antigenpräsentierende Zellen in der zentralen Hornhaut zur Expression von MHC II stimuliert werden. FAS-Ligand wird vom Endothel exprimiert und die Bindung an den FAS-Ligand induziert die Apoptose in T-Lymphozyten. Der FAS-Ligand bildet eine Barriere, die das gesamte Auge umgibt. Allerdings sind einige CD4 und CD8 T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Makrophagen am Limbus um die Gefäße und im peripheren Cornea-epithel sowie im oberen Stromabereich anzutreffen (Scheiffarth et al. 1986, Vantrappen et al. 1985.). Zahlreiche Langerhans-Zellen befinden sich in der Conjunctiva, weniger dicht am Limbus, in den unteren Schichten des Epithels und dem oberen Stromaraum (Rodrigues et al.

1981, Gillette et al. 1982, Katami 1995). Im konjunktivalen Epithel wurden T-Zellen, Makrophagen, seltener B-Zellen und Neutrophile und im Stroma T- und B-Zellen, Makrophagen, Plasmazellen, Natürliche Killer-Zellen, Mastzellen und Neutrophile identifiziert (Hingorani et al. 1997). In der Conjunktiva kommen HLA (Humane Leukozyten Antigene)-DR exprimierende antigenpräsentierende Zellen (APC, Antigen Presenting Cells) als CD68-positive Makrophagen und Langerhans-Zellen vor. In einer Untersuchung zur Verteilung des lymphoiden Gewebes an kompletten Conjunktiva-Präparationen von menschlichen Leichenaugen wurde das Prinzip des Conjunktiva assoziierten lymphatischen Gewebes („CALT“) bestätigt (Knop und Knop 2000): Immunglobuline erreichen die Hornhaut durch Diffusion aus den Limbusgefäßen. MHC I wird von Epithelzellen, Keratozyten und Endothelzellen exprimiert. Epithelzellen werden von Zytokinen, z.B. IFN- $\gamma$  oder IL-1, stimuliert MHC II zu exprimieren. Zudem sind im Kammerwasser hohe Konzentrationen von TGF- $\beta$  ermittelt worden. In die Augenvorderkammer eingebrachte Fremdartigene können zu einer Toleranzentwicklung des Organismus gegen diese Fremdartigene führen (Streilein et al. 1980). Zur Beschreibung dieses Phänomens wurde der Begriff Immunprivileg eingeführt und für die Vorderkammer, das Hornhautstroma, den Glaskörper- und den Subretinalraum, aber auch für andere Organe wie z.B. das Gehirn, die Hoden, die Plazenta und die Haarfollikel beschrieben (Grisanti 1998).

Das Immunprivileg sorgt in der Regel dafür, dass die Augenstrukturen von starken Entzündungen verschont bleiben, die sonst zu eingeschränktem Sehvermögen führen könnten. Die zellulären und humoralen Bestandteile des Immunsystems werden von der Blut/Kammerwasser-Schranke und der Blut/Retina-Schranke zurückgehalten. Bei ausreichend starken Entzündungsreaktionen bricht das Immunprivileg allerdings zusammen.

Ein wichtiges diagnostisches Kriterium zur Beurteilung des Voranschreitens von Abstoßungsreaktionen ist die Vaskularisierung der Cornea, bei der die Blutgefäße vom Limbus her in die Cornea hineinwachsen. Diese Erscheinungen deuten auf eine, der eigentlichen Immunreaktion vorausgehende, unspezifische Entzündungsreaktion hin.

### 3.2.3 Keratoplastik

Im Jahre 1906 wurde eine Hornhauttransplantation am Menschen erstmals beschrieben. Die Hornhaut ist, abgesehen von der Bluttransfusion, das am häufigsten übertragene humane Gewebe. Die jährliche Zahl von Hornhauttransplantationen in den USA wird auf 44 000 beziffert, in Deutschland sind es immerhin noch etwa 5 000. Zur Bewertung des Erfolgs einer Transplantation werden die visuelle Rehabilitation und das Transplantat-Langzeitüberleben herangezogen. Neben dem Immunsystem stellt auch der chronische Endothelverlust eine ernsthafte Bedrohung für das Langzeitüberleben eines Transplantates dar. Etwa 60 % aller Hornhauttransplantate überleben laut einer australischen Analyse mindestens 10 Jahre (Coster 2000 und 2005). Bei Nierentransplantationen betrug diese Quote schon 1994 bis zu 90 % (Opelz 1994). Die häufigste Ursache für einen Misserfolg nach der Keratoplastik liegt in der Transplantatdekomensation, wobei akut und chronisch verlaufende Immunreaktionen wesentlich dazu beitragen. In einer Studie unter 201 dekompenzierten Transplantaten ist die Abstoßungsreaktion mit 34 % als die häufigste Ursache angegeben (Vail et al. 1996).

HLA (Human Leukocyte Antigens)-Antigene des Immunsystem vom Empfänger sind wie bei anderen Organen auch bei der Cornea an der Erkennung des Spendergewebes als Fremdgewebe durch Immunsystem das beteiligt. Eine differenzierte Verteilung dieser Proteine im Epithel, Stroma und Endothel wurde nachgewiesen (Mayer et al. 1983).

Ein morphologisches Einteilungsmuster der Abstoßung kann wie folgt formuliert werden:

- Epitheliale Abstoßung
- Subepitheliale Infiltrate
- Stromale Abstoßung
- Endotheliale Abstoßung

## 4 Kolloidale Trägersysteme

### Allgemeines

Etwa 40 % der in den letzten Jahren neu entdeckten bzw. synthetisierten Wirkstoffe haben eine schlechte Löslichkeit (Tab. 5), die eine angemessene Resorption verhindert und somit in der Regel auch zu einer geringen Bioverfügbarkeit führt. Das Resultat ist eine verminderte oder eventuell gar keine Wirkung. Die Entwicklung oder Synthese eines neuen Arzneistoffes allein ist nicht ausreichend um einen wirklichen Fortschritt in der Therapie zu erzielen. Hinzu kommt, dass erfolgsversprechenden, in vitro erhaltenen klinisch-experimentellen Daten häufig enttäuschende in vivo Ergebnisse folgen. Ein wichtiger Grund für so einen Therapie-Misserfolg ist z.B. eine schlechte Löslichkeit.

Tab. 5: Einteilung der Löslichkeiten nach Ph. Eur.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Ungefähre Anzahl Volumenteil Lösungsmittel in Milliliter je Gramm Substanz</b>
sehr leicht löslich	weniger als 1 Teil
leicht löslich	von 1 Teil bis 10 Teile
Löslich	von 10 Teilen bis 30 Teile
wenig löslich	von 30 Teilen bis 100 Teile
schwer löslich	von 100 Teilen bis 1 000 Teile
sehr schwer löslich	von 1 000 Teilen bis 10 000 Teile
praktisch unlöslich	über 10 000 Teile

Eine Möglichkeit diese Probleme zu beheben liegt in der Entwicklung von geeigneten Trägersystemen für Arzneistoffe. Das in vivo-Schicksal von Arzneistoffen wird nicht hauptsächlich von den Arzneistoffeigenschaften dominiert, sondern auch von den Eigenschaften des Trägersystems. Diese Trägersysteme sollen eine kontrollierte und lokale Freisetzung des Arzneistoffs entsprechend den Therapieanforderungen ermöglichen. Die Größe des Trägers hängt vom erwünschten Applikationsweg ab und geht von einigen Nanometern (Nanopartikel) bis Mikrometer (Mikropartikel) und sogar bis zu einigen Millimetern (Implantate). Für eine parenterale Applikation sind bioabbaubare Materialien wünschenswert, die, z.B. bei Implantaten einen chirurgischen Eingriff zur Entfernung des Implantates nach vollständiger Freisetzung des Arzneistoffs erübrigen. Solche Materialien würden außerdem

die parenterale Applikation von Nanopartikeln ermöglichen. Solche Mikropartikel und Implantate sind allerdings für ein drug targeting oder eine i.v.-Applikation zu groß. Deshalb hat das Interesse an nanopartikulären Trägersystemen in den letzten Jahren stark zugenommen. Nanopartikel sind kolloidale Systeme mit einer Größe von 10 nm bis 1 µm. Eine vergleichende Darstellung der Eigenschaften von Nanoemulsionen gegenüber Mikroemulsionen ist in Tab. 6 wiedergegeben. Der Wirkstoff liegt dabei gelöst, verkapselt oder adsorbiert in der Formulierung vor. Zu den nanopartikulären Formulierungen zählen u.a. feste Lipid Nanopartikel (solid lipid nanoparticles, SLN), Nanosuspensionen und Nanoemulsionen, aber auch Mikroemulsionen, deren Name irrtümlich eine Partikelgröße im Mikrometer-Bereich suggeriert.

Die Existenz von unterschiedlichen Trägersystemen wirft die Frage auf, welche von diesen Systemen die geeignetste für die beabsichtigte Applikation darstellt. Selbstverständlich kann man diese Frage nicht so einfach beantworten. Man muss daher folgende Aspekte berücksichtigen:

- Arzneistoff-Beladung
- therapeutische Zielstellung und mögliches drug targeting
- Träger-Schicksal in vivo, d.h. wie steht es mit Interaktionen mit der biologischen Umgebung, der Abbaurate und der Akkumulation in Organen
- akute und chronische Toxizität
- Herstellung im Großmaßstab
- physikalische und chemische Lagerstabilität
- Kosten

Eine höhere Arzneistoff-Beladung, z.B. durch eine verbesserte Löslichkeit, und auch ein mögliches drug-targeting können zu einer Dosisreduktion führen, was eine geringere Belastung des Organismus bedeutet.

Einer der Hauptvorteile von Nanopartikeln ist der natürliche Ursprung und somit die Bioabbaubarkeit der Lipide, was die Gefahr einer Toxizität praktisch ausschließt.

Der Gebrauch von Polymeren in Nanopartikeln beinhaltet die Probleme des Rest-Gehaltes an organischen Lösungsmitteln, Polymer-Zytotoxizität und die Umstellung des Herstellungsprozesses auf den Großmaßstab. Ein weiteres Problem stellt die Polymer-Hydrolyse während der Lagerung dar, weshalb oft eine Lyophilisation erforderlich ist, um den Polymerabbau zu verhindern.

## 4.1 Nanoemulsionen

Emulsionen sind per definitionem disperse Systeme aus zwei miteinander nicht mischbaren Flüssigkeiten. Sie sind von Natur aus thermodynamisch instabil, können aber mit Hilfe von Emulgatoren stabilisiert werden.

Nanoemulsionen sind Emulsionen mit einer Teilchengröße von 100-500 nm.

Tab. 6: gibt eine kurze Übersicht über die Unterschiede zwischen Nanoemulsionen und Mikroemulsionen.

<b>Nanoemulsion</b>	<b>Eigenschaft</b>	<b>Mikroemulsion</b>
< 500 nm (< 1000 nm)	<i>Partikelgröße</i>	10-100 nm
Nein	<i>Optische Isotropie</i>	ja
Milchig	<i>Erscheinung</i>	transparent
Kinetisch	<i>Stabilisierung</i>	thermodynamisch
durch Energieeintrag	<i>Entstehung</i>	spontan
statisch	<i>Mikrostruktur</i>	dynamisch
$\sim 50 \text{ mN m}^{-1}$	<i>Grenzflächenspannung</i>	$\sim 0 \text{ mN m}^{-1}$
Niedrig	<i>Tensid-Konzentration</i>	hoch

In den 1950er Jahren wurden die Lipid Nanoemulsionen im Rahmen der parenteralen Ernährung eingeführt. Als Lipidphase dienten pflanzliche Öle, z.B. Sojaöl, oder mittelkettige Triglyceride (z. B. Miglyol<sup>®</sup>) verwendet, deren Anteil in der Regel 10-20 % der Emulsion ausmachte. Weitere Bestandteile waren Phospholipide (0,6-1,5 %, zur Stabilisierung) und Glycerol (2,25 %, für Osmolarität). Im Laufe der Jahre hat man erkannt, dass dieses System auch als Träger für lipophile Arzneistoffe genutzt werden kann, und so wurde eine Reihe von Formulierungen eingeführt (Wretling 1981, Collins-Gold et al. 1990, Pranker und Stella 1990, Venkataram et al. 1990, Davis 1974 und 1976, Elbaz et al. 1993, Müller und Heinemann 1994, Klang et al. 1998).

Einige Beispiele von bereits im Handel befindlichen Lipid-Emulsionen als Fertigarzneimittel sind in Tab. 7 aufgeführt.

Tab. 7: Beispiele Handelspräparate wirkstoffhaltiger Lipid Emulsionen

Wirkstoff	Handelsname	Indikation	Hersteller
Diazepam	Diazepam-Lipuro <sup>®</sup>	Sedativum	Braun
Diazepam	Stesolid <sup>®</sup>	Sedativum	Alpharma-Isis
Etomidat	Etomidat-Lipuro <sup>®</sup>	Anästheticum	Braun
Propofol	Propofol- <sup>®</sup> Lipuro 1 %/-2 %	Anästheticum	Braun
Propofol	Disoprivan <sup>®</sup> 1 %/ 2%	Anästheticum	Astra Zeneca
Propofol	Propofol <sup>®</sup> 1%/2% Fresenius <sup>®</sup>	Anästheticum	Fresenius Kabi

Rojanasakul et al. 1992 zeigten in ihrer Arbeit, dass viele Gewebe auf ihrer Oberfläche eine negative Ladung aufweisen. Diese negative Ladung entsteht durch den isoelektrischen Punkt des Proteins Keratin (3,7-5) bei einem Haut pH-Wert von etwa 5,5-6,5. Die Lipide auf der Hautoberfläche bestehen u.a. aus Triglyceriden, die durch bakterielle Lipasen in Mono- und Diglyceride sowie freie Fettsäuren gespalten werden. Dadurch entsteht ein pH-Wert auf der Hautoberfläche von 5,5-6,5. Um die negative Ladung der Haut auszunutzen, wurden vermehrt positiv geladene Formulierungen, z. B. Nanoemulsionen entwickelt, die durch Anziehung der entgegengesetzten Ladungen zu einer verstärkten Interaktion mit der Hautoberfläche führen.

Hauptvorteile von Nanoemulsionen sind:

- Lösungsvermittlung schlecht wasserlöslicher Arzneistoffe
- toxikologische Unbedenklichkeit
- hoher Anteil an Lipidphase, dadurch höhere Beladung mit dem Arzneistoff
- Herstellung im Großmaßstab, z. B. per Hochdruckhomogenisation
- Sterilisierbarkeit des Endproduktes
- Stabilisierung hydrolyseempfindlicher Arzneistoffe

Aufgrund der geringen Partikelgröße von Nanoemulsionen und des flüssigen Zustands des Trägers ist eine kontrollierte Arzneistofffreisetzung stark limitiert. Für die meisten Arzneistoffe wurde eine schnelle Freisetzung festgestellt (Magenheim et al. 1993, Benita et al. 1986a und 1986b). Es wird geschätzt, dass eine verzögerte Arzneistofffreisetzung sehr lipophile Arzneistoffe erfordert, deren Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient größer als 1 000 000: 1 sein sollte (Nishikawa et al. 1998).



### **4.1.1 Dermale/ Transdermale Anwendung**

Die Hauptbarriere der Arzneistoffpenetration stellt das Stratum corneum (Hornschicht) dar. Man bedient sich physikalischer Verfahren (Hydratation, Iontophorese, Wärmebehandlung) und chemischer Prinzipien (Prodrugs, Penetrationsenhancer) Verfahren, um diese Barriere zu überwinden (Kalbitz et al. 1996). Die Verwendung von Penetrationsenhancern zur Verbesserung der dermalen Arzneistoffpenetration ist jedoch häufig mit Hautirritationen, Toxizität und Sensibilisierung verbunden (Neubert et al. 1996). Liposomen und Nanoemulsionen haben in ihrem Aufbau gewisse Strukturähnlichkeiten. Phospholipide stellen die Grundbausteine für Liposomen dar, die als kugelförmige Vesikel aus einer (unilamellar) oder mehreren (multilamellar) Lipiddoppelschichten aufgebaut sind. Hinsichtlich der Penetrationserhöhung von Arzneistoffen für die dermale Applikation gibt es zahlreiche Untersuchungen (Neubert et al. 1998). Eine verstärkte Wechselwirkung der Phospholipide mit dem Stratum corneum führt zu einer vollständigen Fusionierung der Phospholipide mit den lamellaren Lipidstrukturen der Haut und damit zu einer Penetrationserhöhung (Amselem 1998). Die Diffusionseigenschaften positiv und negativ geladener Nanoemulsionen mit Miconazol und Econazol wurden an der weiblichen haarlosen Ratte getestet (Piemi et al. 1999). Dabei wurden bei den positiv geladenen Nanoemulsionen sowohl bei Miconazol als auch bei Econazol höhere Arzneistoffmengen im Akzeptormedium, in der Dermis und in der Epidermis und somit auch eine höhere Gesamtmenge gefunden. Friedmann et al. 1995 untersuchten den Einfluss von Nanoemulsionen auf das Ausmaß der Penetration und auf die Effektivität. Die Corticosteroide Betamethasonvalerat und Betamethasondipropionat bzw. die NSARs Diclofenac, Indomethacin, Naproxen und Piroxicam zeigten dabei, verglichen mit herkömmlichen halbfesten Zubereitungen, eine verbesserte Penetration bzw. bessere Effektivität bezüglich der antiinflammatorischen Wirkung.

### **4.1.2 Parenterale Anwendung**

Levy und Benita 1989 beschrieben in ihrer Arbeit die Entwicklung einer Nanoemulsion zur parenteralen Applikation von Diazepam und verwendeten dabei zur Stabilisierung eine Kombination aus den Emulgatoren Ei-Phospholipid und Poloxamer 188. Die Verwendung von Stearylamin (SA) zur intravenösen Applikation könnte wegen der relativ hohen kritischen Mizellenbildungskonzentration (CMC) problematisch sein. Die verwendete SA-Konzentration in diesen Untersuchungen ist wesentlich höher als die CMC. In Tiermodellen

wurde zwar die Toxizität von positiv geladenen Nanoemulsionen mit SA als eher niedrig bewertet (Klang et al. 1994), dennoch weist schon der Hersteller Sigma Aldrich GmbH auf die Haut- und Schleimhautirritation hin. Die Oberflächeneigenschaften von gemischten Phospholipid-SA Monolayern und dessen Interaktionen mit einem nichtionischen Tensid (Poloxamer) wurden in vitro untersucht (Korner et al. 1994). Wegen des Verdachts von SA in reiner Form irritierend zu sein, wurde SA in Kombination mit einem Phospholipid in einer positiv geladenen Nanoemulsion fünf Tage lang stündlich am Kaninchenauge appliziert und problemlos, ohne eine toxische oder entzündliche Antwort gut vertragen (Klang et al. 1994). Über einen Zeitraum von 30 Tagen führte die Bolus-Injektion derselben Nanoemulsion zu keinem Todesfall der Kaninchen, was für das Fehlen einer akuten Toxizität spricht. Die gleiche an Ratten durch die Jugular-Vene applizierte positiv geladene Nanoemulsion verursachte keine Neurotoxizität (Korner et al. 1994). Eine verlängerte analgetische Wirkung von Nalbuphin, ein Morphinähnlicher Arzneistoff, und seiner Prodrugs Nalbuphinbenzoat und Nalbuphinenanthat war das Ziel einer Untersuchung von Wang et al. 2006. Die in vivo verlängerte analgetische Wirkung an Ratten zeigte eine gute Korrelation mit dem in vitro Freisetzungsprofil. Es wurden auch parenterale Emulsionen mit einer Partikelgröße < 200 nm für die Applikation von Chlorambucil als Krebstherapeutikum entwickelt (Ganta et al. 2008). An Ratten mit Colon-Karzinom zeigte diese Emulsion im Nanometer-Bereich eine verlängerte therapeutische Aktivität. Seki et al. 2004 verglichen in einer Untersuchung u.a. die Plasmaspiegel von Dexamethasonpalmitat nach dessen parenteraler Applikation an Ratten mit Hilfe von Lipid Nanosphären (LNS<sup>®</sup>), Lipid-Emulsionen in Nanometer-Bereich, gegen gewöhnliche Lipid-Emulsionen. Die signifikante Differenz im Plasmaspiegel nach Applikation von Lipid Nanosphären war erst nach fünf Stunden ausgeglichen. Wang und Cory 1999 haben eine übersättigte stabile Nanoemulsion mit Tirilazad zur parenteralen Applikation entwickelt. Das besondere hierbei war, dass die Arzneistoffkonzentration in der Nanoemulsion mit ausgezeichneter physikalischer Stabilität, mehr als doppelt so groß war wie in einer herkömmlichen Emulsion.

### **3.1.3 Perorale Anwendung**

Eine Nanoemulsion mit Primaquin wurde peroral an Albino-Mäusen angewendet und mit einer Primaquin-Lösung verglichen. Die Nanoemulsion führte im Vergleich zur Lösung zur Reduktion der antiparasitären Aktivität um 25 %. Die Untersuchung bezüglich der Verteilung des Arzneistoffs ins Plasma, in die Leber, die Nieren, das Gehirn, die Milz, die Lungen und

das Herz ergab signifikant höhere Konzentrationen an Primaquin bei Anwendung der Nanoemulsion verglichen mit der gewöhnlichen Lösung (Singh und Vingkar 2008). Eine orale Cefpodoxim-haltige Nanoemulsion wurde an Ratten gegen eine alkoholische Lösung, eine Suspension, eine herkömmliche Emulsion und eine parenterale Lösung hinsichtlich der Absorption bzw. der absoluten Bioverfügbarkeit verglichen (Nicolaos et al. 2003). Die Nanoemulsion und die normale Emulsion waren in der Zusammensetzung identisch. Unter den oralen Formulierungen erzielte die Nanoemulsion die größte Bioverfügbarkeit, vergleichbar mit der der parenteralen Lösung. Ilan et al. 1996 verglichen die orale Bioverfügbarkeit von Desmopressin in Form zweier Polymer-haltiger (Carbopol 940 und Methocel K4M) mucoadhäsiver Nanoemulsionen gegen eine nicht-mucoadhäsive Nanoemulsion und eine Salzlösung. Beide mucoadhäsiven Nanoemulsionen führten zu einer Erhöhung der oralen Bioverfügbarkeit, für die stellvertretend die antidiuretische Aktivität ermittelt wurde.

### 3.1.4 Ophthalmologische Anwendung

Ein wichtiger limitierender Faktor für die Anwendung zahlreicher Arzneistoffe am Auge ist die geringe Wasserlöslichkeit. Diese Arzneistoffe müssen die Barrieren (z.B. Hornhaut) des Auges überwinden, um an den Wirkort zu gelangen und so eine Wirkung zu entfalten. Diese Permeation als der geschwindigkeitsbestimmende Schritt stellt ein weiteres Problem dar, weil in der Cornea sowohl hydrophile als auch lipophile Gewebsbarrieren vorhanden sind. Täglich produzieren die Tränendrüsen etwa 1 mL Tränen, wobei der Tränenfilm insgesamt etwa 7  $\mu$ L umfasst. Der Hauptanteil der Arzneistofflösung oder -suspension von applizierten Augentropfen mit einem Volumen von 25-50  $\mu$ L wird innerhalb von 1-2 Minuten durch den Auswascheffekt von der Oberfläche weggespült (Mughtar und Benita 1994). Diese geringe okulare Bioverfügbarkeit nach einer ophthalmologischen Applikation eines Arzneistoffs ist in der Arbeit von Prausnitz und Noonan 1998 belegt worden. Diese mit wässrigen Lösungen verglichene schlechte Bioverfügbarkeit von lipophilen Arzneistoffen am Auge wurde mit zahlreichen Formulierungen verbessert (Tab. 8).

Die Wechselwirkungen Ciclosporin-haltiger durch Stearylamin positiv und mit Deoxycholsäure negativ geladener Nanoemulsionen mit dem Auge wurden am Kaninchen untersucht (Abdulrazik et al. 2001). Dabei zeigte die positiv geladene Nanoemulsion einen ausgeprägten Reservoir-Effekt von mehr als 8 Stunden im cornealen und conjunktivalen Gewebe des Kaninchenauges. In einer weiteren Studie wurde die elektrostatische

Wechselwirkung einer positiv geladenen Nanoemulsion mit der Cornea gezeigt, die bei physiologischem pH-Wert eine negative Ladung aufweist (Rojanasakul und Robinson 1989). In einer Ex-vivo-Untersuchung konnten die besseren Benetzungseigenschaften einer positiv geladenen Nanoemulsion an der Kaninchencornea gezeigt werden (Klang et al. 2000).

Die topische Applikation einer Nanoemulsion am Auge führt vermutlich wegen der Elektrolyten der Tränenflüssigkeit zum Brechen der Nanoemulsion. Die Wasserphase der Nanoemulsion fließt dabei ab, während die arzneistoffbeladene Ölphase als ein Depot im Bindegebewssack (Sackgasse) für eine lange Zeit verbleibt. Aufgrund der Lipophilie der Arzneistoffe in O/W-Nanoemulsionen scheint die transconjunktivale Penetration wichtiger zu sein als die klassische transcorneale Penetration. Die Bindehaut hat verglichen mit der Cornea die Vorteile der größeren Oberfläche und der höheren Permeabilität. Eine Nanoemulsion als Applikationssystem erhöht die lokale Bioverfügbarkeit, hält den pharmakologischen Effekt des Arzneistoffs aufrecht und senkt die systemischen Nebenwirkungen eines Arzneistoffes.

Tab. 8: Übersicht einiger O/W-Nanoemulsionen zur ophthalmologischen Anwendung

Literatur	Ladung der Nanoemulsion	Arzneistoff	Anwendung
Melamed et al. 1994	negativ	Adaprololmaleat	Glaukom
Ding und Olejnik 1997 Ding et al. 1995, Sall et al. 2000 Small et al. 2002, Brignole et al. 2000 und 2001, Kunert et al. 2000, Turner et al. 2000	negativ	Ciclosporin	trockenes Auge
Muchtar und Benita 1994, Naveh et al. 1994 und 2000	negativ	Dexanabinol und Pilocarpin (Base)	Glaukom
Muchtar et al. 1997 Calvo et al. 1996	negativ	Indomethacin	Entzündung
Zurowska-Pryczkowska et al. 1999, Garty et al. 1994	negativ	Pilocarpin (Base)	Glaukom
Muchtar et al. 1992	negativ	$\Delta^8$ -THC	Glaukom
Klang et al. 2000	negativ und positiv	Indomethacin	Entzündung
Wehrle et al. 1996	negativ und positiv	Miconazol	Pilzinfektion
Klang et al. 1999	positiv	Piroxicam	Entzündung

## 4.2 SLN/NLC

Wenn man anstelle des Öls (flüssiges Lipid) der Nanoemulsionen (s. 3.1) feste Lipide einsetzt, erhält man feste Lipidpartikel (Solid Lipid Nanoparticles, SLN) oder bei Mischungen aus einem flüssigem und einem festem Lipid NLC (Nanostructured Lipid Carrier).

Die ersten festen Lipidmikropartikel, „Nanopellets“ und „Lipospheres“ wurden in den 1980er Jahren durch Sprühtrocknung oder durch Dispergierung mit hochtourigen Rührern und Ultraschall hergestellt (Domb 1993, Speiser 1990). Es wurde nach alternativen Herstellungsmethoden gesucht, da diese Formulierungen einen hohen Mikropartikelanteil aufwiesen und somit für eine i.v. Applikation ungeeignet waren. Physikalische Instabilitäten und der relativ hohe Tensidgehalt zur Erzielung kleiner Partikel waren weitere Nachteile dieser Formulierungen. Feste Lipid-Nanopartikel wurden Anfang der 1990er Jahre als ein neuartiges Trägersystem mit deutlich verringertem Mikropartikel-Gehalt etabliert (Gasco 1993, Müller und Lucks 1996).

SLN bestehen aus festen Lipiden oder lipidähnlichen Substanzen physiologischer Herkunft oder solchen mit einer GRAS Einstufung. Die mittlere Partikelgröße liegt bei ca. 100-500 nm. Zahlreiche Untersuchungen (Ahlin et al. 2000, Cavalli et al. 1996, Domb et al. 1995, Heiati et al. 1996, Jennings und Gohla 2001, Lukowski et al. 2000, Müller et al. 1997a, Santos Maia et al. 2000, Siekmann und Westesen 1994, Yang et al. 1999, Zhang et al. 2000) sowie allgemeine, zusammenfassende Übersichtsarbeiten (Mehnert und Mäder 2001, Müller et al. 1995, Müller et al. 2000a) beschäftigten sich mit der Herstellung und Charakterisierung von SLN. Eine gute und zusammenfassende Übersicht zur parenteralen Applikation von Lipid-Nanopartikeln wurde von Joshi und Müller 2008 erarbeitet.

Durchgesetzt haben sich als Verfahren bei der Produktion von SLN die Hochdruck-homogenisation, in beschränktem Maß die Präzipitation aus O/W-Emulsionen und die Herstellung aus einer Mikroemulsion (Gasco 1997, Gohla und Dingler 2001, Marengo et al. 2000, Müller und Lucks 1996, Müller et al. 2000a, Sjöström et al. 1995). Der Gebrauch von und der Rest-Gehalt an organischen Lösemitteln ist bei den letzten beiden Verfahren als ein Nachteil einzustufen. Bezüglich ihrer physikalischen Stabilität, Struktur, Kristallinität, Sterilisierbarkeit, Trocknung, Weiterverarbeitung zu Globuli, Tabletten, Cremes, Wirkstoffinkorporation und kontrollierter Wirkstoffabgabe lipophiler und hydrophiler Wirkstoffe für unterschiedliche Applikationsarten (p.o., i.v., i.p., dermal) wurden SLN in vitro und in vivo intensiv charakterisiert (z.B. Freitas und Müller 1999, Heiati et al. 1998, Müller et al. 1997b, Müller et al. 2000, Westesen et al. 1997, Zara et al. 1999).

Vorteile von SLN gegenüber anderen Arzneistoffträgern bei dermalen Applikation sind:

- Schutz labiler Wirkstoffe gegen chemische Zersetzung (Dingler 1998, Jenning 1999, Jenning und Gohla 2001)
- Einarbeitung in Cremes und Hydrogele (Dingler 1998, Jenning 1999)
- Wirkstoffanreicherung in bestimmten Hautschichten (Jenning et al. 2000b, Santos Maia et al. 2000)
- Kontrollierte Wirkstoffabgabe inkorporierter Wirkstoffe (Dingler et al. 1998, Jenning et al. 2000a)

### 4.3 Nanosuspension

Nanosuspensionen (NS) mit einer Teilchengröße  $< 1 \mu\text{m}$  bestehen lediglich aus Arzneistoff, Emulgator und Wasser. Mögliche Herstellungsmethoden sind z.B. per Kugelmühle (Merisko-Liversidge et al. 1996) oder Hochdruckhomogenisation (Müller und Peters 1998, Ford et al. 1999). Tab. 9 gibt eine kurze Übersicht über bereits zugelassene NS Arzneimittel.

Tab. 9: Beispiele einiger Nanosuspensionen als Fertigarzneimittel

Produkt	Arzneistoff	Hersteller
Rapamune	Sirolimus	Wyeth
Ritalin LA	Methylphenidate	Novartis
Emend	Aprepitant	Merck

Bei dem Fertigarzneimittel Rapamune<sup>®</sup> wird der Arzneistoff Sirolimus zuerst mit dem Tensid Poloxamer 188 als Nanosuspension vorformuliert. Diese Nanocrystals<sup>™</sup> werden anschließend zu einer Schicht-Tablette verarbeitet. Dafür wird ein inerte Tabletten-Kern aus Lactose, direkt komprimiert mit PEG 8000 und Talkum, zuerst mit einem Schellack-Siegel und dann mit einer Zucker-Andeckschicht überzogen. Darauf wird die aktive Schicht bestehend aus Nanosuspension, Zucker und mikrokristalliner Cellulose aufdragiert.

Eine gute Übersicht über verschiedene Herstellungstechniken und Patente findet sich in der Arbeit von Keck und Müller 2006.

## 4.4 Mikroemulsionen

Für Arzneistoffe, die nicht als wässrige Lösungen formuliert werden können, stellen Mikroemulsionen (ME) u.a. neben Nanoemulsionen eine vielversprechende Alternative dar. ME sind thermodynamisch stabile, einphasige, niedrig viskose und opaleszente Systeme und bestehen aus einer lipophilen, einer hydrophilen Komponente, einem Tensid und einem Kotsensid. Der Begriff Mikro im Namen suggeriert irrtümlich eine Partikelgröße im  $\mu\text{m}$ -Bereich. Tatsächlich sind ME etwa 10-100 nm klein. Der Arzneistoff muss dabei in einer geeigneten lipophilen Komponente, z.B. in Fettsäuren, Fettsäureestern, Fettalkoholen oder Triglyceriden, gelöst werden. Am meisten verwendet werden Isopropylmyristat und Isopropylpalmitat. Es ist bekannt, dass lipophile Komponenten mit einer sehr langen Kohlenstoff-Kette, z.B. Sojaöl, problematisch sind bei der Bildung von ME. Komponenten mit einer mittleren Kettenlänge, z.B. MCT oder Fettsäureester hingegen sind geeignetere Kandidaten. Die pharmazeutische Anwendung von ME ist durch die physiologische Verträglichkeit der eingesetzten Tenside bzw. deren hohe Konzentrationen stark eingeschränkt. Durch die Wasseraufnahme sinkt die in der wasserfreien Mischung der ME-Komponenten vorhandene Sättigungslöslichkeit eines lipophilen Arzneistoffs. Wenn beim Überschreiten der Sättigungslöslichkeit der Arzneistoff nicht auskristallisiert, entsteht eine übersättigte Lösung mit hoher thermodynamischer Aktivität. Der Arzneistoff strebt so schnell wie möglich das Verlassen des Systems an. Dieser Vorgang kann zu einer Erhöhung der Bioverfügbarkeit von schwerlöslichen Arzneistoffen und somit zu einer längeren Wirkdauer führen. Zwei Ziele, die oft bei Arzneistoffen angestrebt, aber oft nicht erreicht werden. Der Anteil eines Tensids in einer gewöhnlichen Emulsion ist sehr gering, 0,1 – 10 % des Gesamtgewichts. In einer ME beträgt dieser Anteil mindestens 10 %. Dieser hohe Anteil ist erforderlich, weil der Anstieg der Grenzfläche zwischen der wässrigen und der lipophilen Phase sehr groß ist. Das Kotsensid spielt eine entscheidende Rolle in ME, indem es das Tensid unterstützt die Grenzflächenspannung zu reduzieren und so die thermodynamische Stabilität zu gewährleisten.

### 4.4.1 Dermale/Transdermale Anwendung

Positiv geladene Miconazol-haltige Mikroemulsionen zeigten gegenüber negativ geladenen eine mehr als doppelt so große Akkumulation in der Schweinehaut (Piemi et al. 1999).

Eine ausführliche Übersicht über die dermale bzw. transdermale Anwendung von Mikroemulsionen gibt die Arbeit von Heuschkel et al. 2008 wieder. Dabei wurde die

Penetration bzw. Permeation sowohl in vitro als auch in vivo an zahlreichen Tier-Spezies (Ratte, Maus, Kaninchen, Schwein und Rind) und auch am Menschen untersucht. Die Auswahl der in dieser Übersicht wiedergegebenen lipophilen, hydrophilen und auch amphiphilen Arzneistoffe ist sehr vielfältig und reicht dabei von NSAID's, Lokalanästhetika bis hin zu  $\beta$ -Blockern. Kemken et al. 1992 erreichten mit einer Bildung einer übersättigten Bupranolol-haltigen Mikroemulsion aus einer wasserfreien Mikroemulsion einen gesteigerten Arzneistoff-Flux und somit einen erhöhten pharmakodynamischen Effekt in Albino-Kaninchen. Die hydrophile Komponente bestand meist aus Wasser. Kochsalz-Lösung (pH 7,4 bzw. 0,01 molar), Acetatpuffer und PBS-Lösung (verschiedene pH-Werte) waren eher die Ausnahme. Die Auswahl der lipophilen Komponente orientiert sich vor allem an den Lösungseigenschaften für die Arzneistoffe. Typische lipophile Komponenten sind z.B. Ölsäure, Isopropylmyristat, Isopropylpalmitat und MCT. Besondere Sorgfalt ist bei der Auswahl der Tenside und Kotside geboten, sie dürfen nicht irritierend sein. Sorbitanfettsäure-Ester, Polysorbate, (PEGylierte) Glycerolfettsäure-Ester, PEGylierte Fettalkohole und Poloxamere zählen zu den am meisten gebrauchten Tensiden. Als Co-Tensid werden vor allem Alkohole, wie z.B. Ethanol, (Iso-) Propanol und Propylenglykol verwendet.

### 4.4.2 Parenterale Anwendung

Date und Nagersenker 2008a geben eine Übersicht über parenterale Mikroemulsionen. Dieselben Autoren untersuchten auch das Potenzial von Mikroemulsionen zur parenteralen Applikation von Propofol (Date und Nagersenker 2008b). Dabei zeigte eine ausreichend physikochemisch stabile Propofol-haltige Mikroemulsion vernachlässigbare Hämolyse und ist damit eine geeignete Alternative zum bereits vorhandenen Diprivan<sup>®</sup>. Rhee et al. 2007 entwickelten eine Mikroemulsion zur parenteralen Applikation und verglichen das hämolytische Potenzial dieser Mikroemulsion mit dem Fertigarzneimittel Sporanox<sup>®</sup> und einer PEG 400-Lösung mit Itraconazol. Dabei zeigte sich eine Überlegenheit der entwickelten Mikroemulsion gegenüber Sporanox<sup>®</sup> (Arzneistoff Itraconazol) und Bioäquivalenz mit der PEG-400-Lösung. Park et al. 1999 untersuchten u.a. die Plasmaspiegel von Flurbiprofen nach Injektion einer Mikroemulsion, einer wässrigen Lösung (PBS, pH 7,4) und von Lipfen<sup>®</sup> (enthält Flurbiprofenaxetil als Prodrug) in Ratten. Bereits nach 15 min zeigte sich bei der Mikroemulsion ein signifikant höherer Plasmaspiegel. Kale und Patravale 2008 entwickelten erfolgreich eine physikalisch und chemisch stabile Lorazepam-haltige Mikroemulsion mit sehr niedrigem hämolytischem Potenzial als Alternative zum bereits erhältlichen Ativan<sup>®</sup>.



Eine Mikroemulsion mit Rifampicin, einem säurelabilen Tuberkulostatikum, wurde von Ahmed et al. 2008 entwickelt, u.a. die Freisetzung und die physikochemische Stabilität untersucht und als eine alternative Formulierung deklariert.

### 4.4.3 Perorale Anwendung

Die wohl bekannteste orale Applikation einer Mikroemulsion ist die von Cyclosporin (Sandimmun® Optoral 100 mg/ml Lösung zum Einnehmen) u.a. zur Prophylaxe der Transplantat-Abstoßung nach allogenen Transplantationen von Niere, Leber, Herz, Lunge und Pankreas. Gui et al. 2008 formulierten eine Mikroemulsion zur oralen Anwendung von Berberin, einem Isochinolin-Alkaloid aus der Berberitze mit schwacher antibiotischer Wirkung und einer Bioverfügbarkeit von weniger als 5 % nach i.v.-Gabe am Kaninchen. Sie untersuchten vergleichend die Resorption ihrer entwickelten Mikroemulsion mit einer Suspension, hergestellt aus Tabletten, an Ratten. Die relative Bioverfügbarkeit der Mikroemulsion betrug gegenüber der Tablette 647 %.

### 4.4.4 Ophthalmologische Anwendung

Trotz einiger Nachteile haben Mikroemulsionen v.a. bei der Applikation am Auge auch Vorteile:

- thermodynamische Stabilität
- einfache Herstellung
- Transparenz
- gute Tropfbarkeit.

Weiterhin haben Untersuchungen gezeigt, dass bedingt durch eine verbesserte Löslichkeit und Stabilität der verwendeten Arzneistoffe eine Verbesserung der okulären Bioverfügbarkeit erreicht werden kann. Man darf auch nicht vernachlässigen, dass ein Kotensid-Anteil von > 15 % selbstkonservierend wirkt (Keipert 1997, Vandamme 2002). Indomethacin und Atropin wurden als schwerlösliche Arzneistoffe in Mikroemulsionen mit den Tensiden Polysorbat 80 und Lecithin eingearbeitet und so die Stabilität von Indomethacin verglichen mit wässriger Lösung erhöht (Siebenbrodt und Keipert 1991). In einer weiteren Untersuchung zeigten sich bei in vitro Freisetzungstests verglichen mit wässrigen Pufferlösungen eine verzögerte und im Vergleich zu Augenölen eine schnellere Freisetzung von Chloramphenicol,

Indomethacin und Diclofenac-Natrium, die zusammen mit dem nichtionischen Tensid Poloxamer 184 in Mikroemulsionen eingearbeitet wurden (Siebenbrodt und Keipert 1993). Keipert und Schulz 1994 entwickelten Mikroemulsionen mit Saccharoseestergemischen als Tenside, um die ophthalmologische Verträglichkeit zu verbessern. Im HETCAM-Test wurde gezeigt, dass die Formulierungen nicht irritierend für Schleimhäute sind. Pilocarpin als Modellarzneistoff in einer Mikroemulsion mit Lecithin und Miranol zeigte einen verzögerten Wirkeintritt, aber längere und intensivere Wirkung verglichen mit wässrigen Augentropfen (Naveh et al. 1994). Eine verzögerte Freisetzung von Pilocarpinhydrochlorid in einer Mikroemulsion auf Lecithin- und Macrogol-1500-glycerolricinat-Basis wurde von Hasse und Keipert 1997 erreicht. Radomska und Dobrucki 2000 entwickelten und charakterisierten verschiedene Mikroemulsionen mit Polysorbat 60 und 80 und Sojalecithinen zur ophthalmologischen Anwendung von Vitamin A (Retinol) und seinen Estern, die über 6 Monate physikalisch stabil waren. Eine gut verträgliche Dexamethason-Mikroemulsion wurde entwickelt und mit einer Dexamethason-Suspension an Albino-Kaninchen verglichen (Fialho und da Silva-Cunha 2004). Es wurden zu verschiedenen Zeiten nach ophthalmologischer Applikation Kammerwasser-Proben genommen und auf den Gehalt an Dexamethason untersucht. Der Zeitpunkt der maximalen Konzentration der Mikroemulsion wurde schon nach 30 min erreicht, bei der Suspension hingegen nach 60 min. Die maximale Konzentration der Mikroemulsion war verglichen mit der Suspension doppelt so groß. Diese Mikroemulsion wurde vom Kaninchen-Auge gut vertragen.

## 5 Materialien

### 5.1 Lipide

#### 5.1.1 Eutanol<sup>®</sup> G

Eutanol<sup>®</sup> G (EG, Fa. Caesar & Loretz, Caelo, GmbH, Hilden) hat als an Position 2 verzweigter, einwertiger Alkohol einen Schmelzbereich  $-1\text{ °C}$  bis  $+1\text{ °C}$ . Er ist eine universell einsetzbare „Ölkomponente“, ist farb- und geruchlos, leicht löslich in fetten Ölen aber praktisch unlöslich in Wasser. EG hat eine Dichte von  $0,84\text{ g/cm}^3$  (Sicherheitsdatenblatt Caelo) ( $0,83\text{-}0,85$ , Fiedler 1996:  $0,8463$ ), eine dynamische Viskosität von  $60\text{ mPa s}$  ( $20\text{ °C}$ ) und einen gemessenen Brechungsindex von  $1,456$ . Er besitzt gute Löseeigenschaften für verschiedene Wirkstoffe und verbessert das Penetrationsvermögen von Salben und Cremes bzw. deren Wirkstoffen.

Caelo macht folgende Angaben zur Toxizität: LD 50 (oral, Ratte) beträgt  $>5000\text{ mg/kg}$  und es besteht keine Reizwirkung auf Haut und Augen (OECD 404/405). Weiterhin wurde an haarlosen Mäusen, an Ratten, am Kaninchen und am Menschen (Patch-Test, Burckhardt-Test) die Prüfung auf lokale Verträglichkeit durchgeführt. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass Eutanol<sup>®</sup> G praktisch ungiftig und gut lokal verträglich ist.

#### 5.1.2 Tegosoft<sup>®</sup> CT

Tegosoft<sup>®</sup> CT (Capryl triglycerid) ist ein natürliches Triglycerid nachempfundenes kosmetisches Öl mit angenehmem Hautgefühl. Es ist unlöslich in Wasser, farblos bis gelblich mit schwachem Eigengeruch und hat eine Dichte von  $0,955\text{ g/cm}^3$  ( $20\text{ °C}$ ). Es besitzt ein gutes Lösungsvermögen für öllösliche Wirkstoffe und UV-Filter. Es ist ein universell einsetzbares Emollient mit pflegenden Eigenschaften, basierend auf pflanzlichen Rohstoffen.

#### 5.1.3 Tegosoft<sup>®</sup> OP

Tegosoft<sup>®</sup> OP (Octylpalmitat) ist ein universell einsetzbares Öl mit pflegenden Eigenschaften und guten Lösungseigenschaften für Wirkstoffe. Es ist unlöslich in Wasser, gelblich mit schwachem Eigengeruch. Die Dichte beträgt bei  $20\text{ °C}$   $0,857\text{ g/cm}^3$ .

### **5.1.4 Tegosoft<sup>®</sup> DEC**

Tegosoft<sup>®</sup> DEC (**Diethylhexylcarbonate**) ist ein sehr leichtes Öl mit sehr niedriger Viskosität und sehr gutem Spreitvermögen. Es ist unlöslich in Wasser, löslich in Ethanol, hat eine Dichte von 0,88 g/ cm<sup>3</sup> bei 20 °C. Es zeichnet sich durch ein gutes Lösungsvermögen für kristalline Wirkstoffe aus. Es ist als einzigartiges Emollient besonders gut geeignet für leichte und nicht-ölige Hautpflege und Sonnenschutzprodukte.

Alle Ölkomponenten der Tegosoft-Reihe wurden von Degussa, Personalcare, Essen bezogen.

### **5.1.5 Miglyol<sup>®</sup>**

Das flüssige Triglycerid Miglyol (Fa. Caesar & Loretz GmbH, Hilden) besteht hauptsächlich aus den Estern der C<sub>8</sub>-C<sub>12</sub> Fettsäuren. Es wird als ölige Komponente mit guten spreitungs- und permeationsfördernden Eigenschaften für Suspensionen, Lösungen, Salben; Cremes und als Lösungsvermittler eingesetzt. Miglyol besitzt eine niedrige Viskosität und einen Erstarrungspunkt von -22 °C bis -50 °C, je nach Modifikation.

### **5.1.6 Propylenglykol**

Propylenglykol (1, 2-Propandiol) ist eine klare, farblose, fast geruchlose, mit Wasser und Ethanol mischbare, aber mit fetten Ölen nicht-mischbare Flüssigkeit. Es wird als Kotensid in Mehrkomponentensystemen angewendet und fördert die Bildung von O/W-Emulsionen. Es kann die Löslichkeit und die Resorption verschiedener Wirkstoffe verbessern. Durch seine antimikrobielle Eigenschaft sind weitere Konservierungsmittel nicht erforderlich. Das Haut-Irritationspotenzial ist konzentrationsabhängig. Eine 40 %ige wässrige Lösung wirkt an der Schleimhaut nur leicht irritierend. 50 % ige Lösungen verursachen am Kaninchenauge keine Reizungen, eine unverdünnte Anwendung führt jedoch zu schwachen Rötungen der Konjunktiva. 70 % ige Propylenglykol-Salben zeigten im Humanversuch keine Reizungen und Schädigungen (Grant 1993).

### **5.1.7 Triacetin**

Triacetin (1, 2, 3-Propantrioltriacetat, Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland) ist eine farblose, klare und viskose Flüssigkeit. Triacetin hat eine geringe Mischbarkeit mit Wasser und wird u.a. als Weichmacher in Materialien für Tablettenüberzüge verwendet.

## **5.2 Tenside**

Emulgatoren dienen zur Stabilisierung von Emulsionen. Aus der großen Vielfalt an Tensiden ist aus toxikologischen Gründen nur eine kleine Zahl für pharmazeutische Formulierungen verwendbar, wie z.B. Lecithine natürlichen Ursprungs oder synthetische Polymere, wie z.B. Pluronic F68 (Poloxamer 188) oder Tween 80 (Polysorbat 80).

Die alte Bezeichnung Lecithin steht für eine Mischung von natürlichen Phospholipiden (s.u.).

### **5.2.1 Tween<sup>®</sup> 80**

Tween<sup>®</sup> 80 (Firma Uniqema, Everberg, Belgien) (Polysorbat 80; Polyoxyethylen (20) sorbitanmonooleat) ist ein nichtionischer sterischer Emulgator mit einem HLB-Wert von 15,3. Polysorbate, Polyoxyethylen-Sorbitanfettsäureester, sind Mischungen von Partialestern des Sorbitans und seiner Anhydride mit Fettsäuren, die mit 20 mol Ethylenoxid pro mol Sorbitan copolymerisiert sind. Es ist eine gelb gefärbte, viskose Flüssigkeit, löslich in Wasser und Ethanol, unlöslich in Mineralöl, Erdnussöl. Von der Humanhaut und dem Kaninchenauge wird das Produkt reaktionslos vertragen. Der LD50-Wert bei Ratten wird mit 38 g/kg angegeben (Fiedler 1996). In zahlreichen oralen (z.B. Adalat<sup>®</sup> retard), parenteralen (Cordarex<sup>®</sup>, Masern Impfstoff Merieux<sup>®</sup>), ophthalmologischen (Isopto<sup>®</sup>-Dex Augentropfen), und dermalen (Flammazine<sup>®</sup> Creme, Cortidexason Salbe N, Karison<sup>®</sup> Salbe) Fertigarzneimitteln ist Tween<sup>®</sup> 80 als Hilfsstoff zugelassen (Rote Liste<sup>®</sup>, 2008).

### **5.2.2 Phospholipide**

Verwendet wurden zur Herstellung der Nanoemulsionen Emulgatorgemische aus Soja- (S) und Eipospholipiden (E) (Lipoid KG, Ludwigshafen), die als amphiphile Emulgatoren mit einer hervorragenden Hautverträglichkeit in die Gruppe der Phosphoglyceride gehören:

- Lipoid E 80 (LE80)
- Lipoid S 75-3N (LS75-3N)
- Lipoid S 100-3 (LS100-3)
- Lipoid S 80-3 (LS80-3)

Tab. 10: Zusammensetzung verwendeter Phospholipide

	<b>LE80</b>	<b>LS 75-3N</b>	<b>LS 100-3</b>	<b>LSL 80-3</b>
Phosphatidylcholin (+LPC)	80,0-85,0	min. 70,0	min. 96,0	78,0-88,0
Phosphatidylethanolamin	7,0-9,5			
Lysophosphatidylcholin (LPC)	max. 3,0			15,0-25,0
Lysophosphatidylethanolamin	max. 0,5			
Sphingomyelin	2,0-3,0			

### 5.2.3 Poloxamere

Poloxamere sind eine Gruppe von mehr als 50 verschiedenen, amphiphilen, nicht-ionischen Block-Copolymeren, die durch Polykondensation von Propylenoxid und Ethylenoxid hergestellt werden. Polyoxypropylen (POP) stellt den hydrophoben Mittelteil und Polyoxyethylen (POE) die hydrophilen Endteile im Molekül. Im Namen der verschiedenen Poloxamere sind Kennziffern wie L, P oder F. L steht für flüssig, P für pastenartig und F für flocken- oder pulverförmig. Weiterhin steht im Namen eine zwei oder dreistellige Ziffer. Mit dem Faktor 10 multipliziert gibt die letzte Ziffer den ungefähren relativen Massenanteil der Ethylenoxideinheiten in Prozent an. Die relative Molekülmasse des Polypropylenglykol-Blockes wird durch die vorangehende(n) Ziffer(n) wiedergegeben. Alle Produkte zeichnen sich durch eine praktisch nicht vorhandene Toxizität aus (Fiedler 1996).

Poloxamer 188 (Lutrol F68<sup>®</sup>, BASF, Ludwigshafen) ist ein praktisch nicht toxisches, zur parenteralen Anwendung zugelassenes sterisches, nichtionisches Polyoxyethylen-Polypropylen-Blockpolymer (n = 75, m = 30, HLB 29).

Poloxamer 184 (Synperonic<sup>®</sup> L 64, C.H. Erbslöh, Düsseldorf-Hafen, Deutschland) ist eine viskose Flüssigkeit ( $\eta = 720 \text{ mPa s}$ , 25 °C) mit einem mittleren Molekulargewicht von ca. 2900 (n = 13, m = 30, HLB 15)

## 5.3 Immunsuppressiva

### 5.3.1 Topische Glucocorticoide

#### Prednicarbat

Prednicarbat (PC) ist ein weißes bis fast weißes Pulver, praktisch unlöslich in Wasser, leicht löslich in Ethanol und Aceton, wenig löslich in Propylenglykol. In wässriger Lösung findet bei pH <3 und >12 Hydrolyse statt. Es hat eine Schmelztemperatur von 110 bis 112 °C und einen weiteren Schmelzpunkt der zweiten kristallinen Form bei 183 °C. Eine 1 % ige wässrige Suspension hat einen pH-Wert zwischen 6,5 und 6,7.

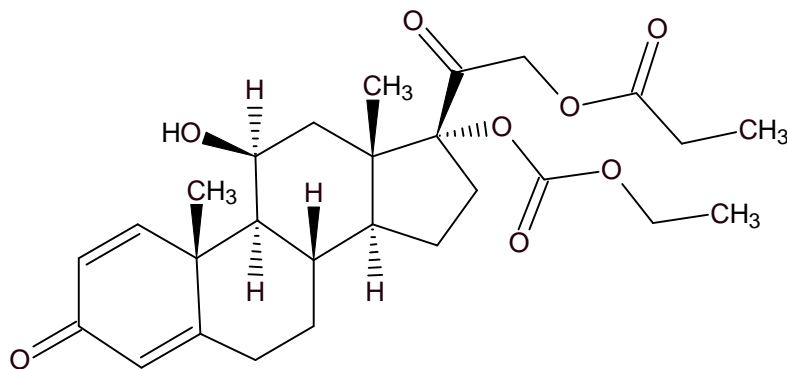


Abb. 5: Strukturformel von Prednicarbat

Prednicarbat (Abb. 5) gehört zu den neueren Soft-Steroiden, deren Kennzeichen ein besonders günstiges Nutzen-Risiko-Verhältnis ist. Die Resorption nach topischer Applikation ist gering (nur 1 bis 10 % der Dosis) und abhängig vom Hautareal und von der galenischen Zubereitung. In der Haut wird PC rasch zu Prednisolon-17-ethylcarbonat (PD-17-EC) metabolisiert, das eine ca. 8fach stärkere Affinität zu GC-Rezeptoren hat als PC selbst, und zerfällt langsam zu Prednisolon (PD), das renal eliminiert wird.

Die entzündliche, immunsuppressive, antiproliferative, apoptotische und auch vasokonstriktorische Wirkung von Glucocorticoiden bildet die Grundlage der therapeutischen Anwendung bei entzündlichen Erkrankungen der Haut. Erhebliche unerwünschte Arzneimittelwirkungen, z.B. der Abbau von Skelettmuskulatur und Unterhautfettgewebe (Hautatrophie), Zunahme und gleichzeitige Umverteilung von Fettreserven (Cushing-Syndrom), Hemmung des Knochenaufbaus und damit erhöhtes Risiko einer Osteoporose, führten zur Lokalthherapie mit einer deutlich besseren Verträglichkeit als bei peroraler

Therapie. So führt eine kurzfristige topische Anwendung zu keiner Störung in der Nebennierenrindenfunktion und ebenso ist die Gefahr der Osteoporose und des Hochdrucks eher niedrig einzustufen. Die antiinflammatorische Wirkung beruht vor allem auf dem Eingriff in die Zytokinsynthese. Membranständige Rezeptoren werden stimuliert, so dass IL-1 und TNF- $\alpha$  eine Signalkette auslösen, die zu einer zytoplasmatischen Freisetzung des Nukleären Faktors  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) führt. NF $\kappa$ B ist ein Transkriptionsfaktor, der im Ruhezustand über die Bindung an ein zytoplasmatisches Inhibitorprotein (IKB $\alpha$ ) inaktiviert ist, wandert in den Zellkern, bindet an die Promotorregion seiner zahlreichen Zielgene, rekrutiert Coaktivatoren und basale Transkriptionsfaktoren (BTF) und leitet den Zutritt der RNA-Polymerase und damit die Ablesung des kodierenden Teils der Zielgerade ein. Dazu gehören z.B. die Gene von Zytokinen (IL-1, IL-2, IL-4, IL-8, IL-13, TNF- $\alpha$ ), Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, VCAM-1), chemotaktische Faktoren (GM-CSF, MCP-1) und die Gene von Enzymen (induzierbare Formen von Cyclooxygenase und NO-Synthase, Phospholipase A<sub>2</sub>), die Entzündungsmediatoren bilden. Die Tatsache, dass bei allen Pharmaka, die mit der NF $\kappa$ B-Wirkung interferieren, antientzündliche und immunsuppressive Wirkungen miteinander verbunden sind, verdeutlicht die zentrale Stellung von NF $\kappa$ B. Auch andere Transkriptionsfaktoren, wie z.B. das Aktivator-1 (AP-1) bzw. der Nukleäre Faktor aktivierter T-Zellen (NFAT) fördern die Zytokinsynthese, wirken aber weitgehend spezifisch auf das IL-2 Gen, anders als NF $\kappa$ B. Die Mediatorfreisetzung führt zu einer zunehmenden Entzündung und bei Keratinozyten zu einer Differenzierungsstörung. Glucocorticoide greifen in diesen Kreislauf durch Hemmung der Synthese von Interleukinen, Chemotaktischen Faktoren, Adhäsionsproteinen und Mediatoren ein. Die Hemmung der Zytokinsynthese führt zur Rückkehr der aktivierten Zellen in den Ruhezustand und zur Abnahme der Chemotaxis der Entzündungszellen. Die T-Lymphozyten-Zahl sinkt auch infolge der antiproliferativen und antiapoptotischen Wirkung der GC.

### **Wirkmechanismus**

GC binden an cytosolische GR, der GC-GR-Komplex transloziert vom Cytosol in den Zellkern und bindet an spezifische DNA-Sequenzen, sog. Glucocorticoid Response-Elemente, die aus einer charakteristischen Basenfolge bestehen. Diese Response-Elemente, von denen es positive und negative gibt, befinden sich in zahlreichen DNA-Abschnitten (u.a. Promotoren), die die Genexpression steuern. Der GR steuert über die Bindung an die Response-Elemente und der damit verbundenen Dimerisierung ligandenabhängig die Transkription bzw. die



Expression vieler entzündungsrelevanter Gene, wobei zwischen direkten und indirekten Effekten unterschieden werden kann. Bei der direkten Regulation der Expression befinden sich die Response-Elemente im Promotor des jeweiligen Gens. Der indirekte Effekt beruht auf der Inaktivierung der Transkriptionsfaktoren NF $\kappa$ B und AP-1 (Eberhardt 2003). Die Folge ist eine Hemmung der Expression vieler proinflammatorischer und immunstimulierender Gene wie iNOS (induzierbare NO-Synthase), verschiedene Interleukine und Adhäsionsmoleküle. Die stark entzündungshemmende und immunsuppressive Aktivität der GC beruht auf einer Senkung der Expression entzündungsfördernder und immunstimulierender Gene, während die Expression entzündungshemmender und immunsuppressiver Gene gesteigert wird. Bei der immunsuppressiven Wirkung spielt u.a. die verminderte Transkription von IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF $\alpha$  in Monozyten/Makrophagen und von ILK-2 in T-Zellen eine Rolle.

### **Genomische Glucocorticoidwirkungen**

Glucocorticoide (GC) binden spezifisch an einen intrazellulären Rezeptor (Glucocorticoidrezeptor, GR), dessen Oberflächenstruktur dadurch verändert wird. Diese Änderung befähigt nun den Rezeptor zu weiteren Wechselwirkungen, z.B. mit DNA. Der Glucocorticoid-Glucocorticoidrezeptor-Komplex (GCGR-Komplex) bindet unter Homodimerisierung an spezifische Sequenzen in der Promotorregion von Glucocorticoid-sensitiven Genen, den Glucocorticoid-responsiven Elementen (GRE). Nach Anlagerung von basalen Transkriptionsfaktoren (BTF) steigt bei positiven GRE die Expression der Zielgene. Diesen Eingriff in die Genexpression bezeichnet man als Transaktivierung. Neben der Transaktivierung können GC auch über die Transrepression in die Genexpression eingreifen. Dabei interagieren die GC-GR-Komplexe mit entzündungsfördernden BTF und deren Bindung an die Promotorregion der durch diese BTF kontrollierten Gene blockieren. Auf diesem direkten Weg interferieren GC z.B. mit der Bindung von NF $\kappa$ B an seine Bindungssequenz, die in der Promotorregion zahlreicher Entzündungsgene vorhanden ist. Die Hemmung der Bildung verschiedener Entzündungsmediatoren durch GC kann so erklärt werden (Schäfer-Korting und Korting 2003).

Die antientzündlichen Wirkungen der GC werden mit der Transrepression und die Stoffwechseleffekte mit der Transaktivierung in Verbindung gebracht.

### **Glucocorticoidrezeptoren: Regulation der Bildung bei atopischer Dermatitis**

Der überwiegende Teil der Effekte von GC wird über die Bindung an den ubiquitär verbreiteten  $\alpha$ -Subtyp des humanen Glucocorticoidrezeptors (hGR $\alpha$ ) vermittelt. Von diesem wurden zwei Unterformen A und B entdeckt (hGR $\alpha$ -A und hGR $\alpha$ -B), die sich N-terminal unterscheiden. Die Existenz einer weiteren Spleißvariante des GR-Gens, des hGR $\beta$ , ist schon länger bekannt. Dieser  $\beta$ -Subtyp besitzt aber aufgrund seines verkürzten C-Terminus, im Gegensatz zum  $\alpha$ -Subtyp, keine intakte Bindungsstelle für GC. Es ist umstritten, ob hGR $\beta$  die Aktivität von hGR $\alpha$  inhibiert, evtl. durch Bildung eines hGR $\alpha$ /hGR $\beta$ -Dimers. Eine Hemmung der Glucocorticoidwirkung durch hGR $\beta$  bei Keratinozyten und Fibroblasten ist wenig wahrscheinlich, zumindest bei kurzer Exposition. Bei längerer Exposition bewirken GC eine Downregulation von hGR $\alpha$ , während für hGR $\beta$  sowohl eine Zu- als auch eine Abnahme beschrieben wurden.

### **Entwicklung spezieller, dermaler Glucocorticoide mit günstigem Nutzen/Risiko-Verhältnis (soft steroids)**

Entzündliche Hauterkrankungen sind chronisch-rezidivierend und stellen daher besondere Anforderungen an die Therapieverträglichkeit. Deshalb wurden spezielle GC entwickelt, die bei dermalen Anwendung gut ins Gewebe penetrieren, dabei rasch die Entzündung und die überschießende Immunreaktionen hemmen, rasch zu weniger potenten GC abgebaut werden, die eine geringere Affinität zum GR haben.

Eine Veresterung einer oder beider Hydroxylgruppe(n) an C17 bzw. C21 führt zu einer besseren Penetration zum Wirkort. Die 21-Ester sind lipophiler als die korrespondierende alkoholische Form. Die 17-Monoester besitzen eine vielfach höhere Rezeptoraffinität als die Ausgangssubstanz, während nur kleine 21-Monoester problemlos mit der Bindungsstelle des Rezeptors interagieren (Lange et al. 2000). Drugdesign kann die systemischen, teilweise auch die lokalen Nebenwirkungen reduzieren. So sind die dermal angewendeten GC nicht nur von sehr unterschiedlicher antientzündlicher Potenz, gleichpotente GC unterscheiden sich in der lokalen Verträglichkeit. Bestimmte GC rufen nur eine geringe Hautverdünnung hervor, weil sie eine schwächere Wirkung auf Fibroblasten haben. Eine starke bzw. lang anhaltende Hemmung der Kollagenbildung bzw. der Proliferation von Fibroblasten hat eine zunächst reversible, später irreversible Hautatrophie mit Striaebildung zur Folge.

Prednicarbat bildet den Goldstandard der topischen GC mit verbessertem Nutzen/Risiko-Verhältnis. Die zweimal tägliche Applikation von Prednicarbat, Mometason und Betamethasonvalerat über 6 Wochen führte zu dem Ergebnis, dass Prednicarbat zu einer Abnahme der Cutis-Dicke von 13 %, Mometason zu einer Abnahme von 17 % und Betamethasonvalerat zur Abnahme von 24 % führten (Korting et al. 2002). Anhand eines In-Vitro-Testsystems, welches auf der IL-1-Bildung beruht, kann das Hautverdünnungspotenzial bestimmt werden. Bei Keratinozyten bewirkt IL-1 eine entzündliche Reaktion und bei Fibroblasten fördert es die Proliferation.

In einer weiteren Studie wurden die pharmakodynamischen Effekte auf epidermale und dermale Zellen von PC, seinen Metaboliten PD-17-EC und PD gegen Betamethasonvalerat (BMV), Betamethason (BM) und Desoximethason (DM) verglichen (Lange et al. 1997). Als Parameter für die antiinflammatorische Aktivität wurde die TNF- $\alpha$  stimulierte Abnahme der IL-1  $\alpha$  -Synthese in Keratinozyten gemessen. PC, PD-17-EC und BMV zeigten verglichen mit BM, PD und DM eine höhere antiinflammatorische Potenz. In Fibroblasten hingegen ist der antiproliferative Effekt von PC weniger ausgeprägt als z.B. von BMV oder DM. Zur Therapie der AD ist eine hohe antiinflammatorische Aktivität in den Keratinozyten erwünscht, eine antiproliferative Wirkung in Fibroblasten dagegen unerwünscht. Diese Kriterien werden von PC durchweg erfüllt, womit dieser Arzneistoff wie oben erwähnt den Goldstandard der topischen AD-Therapie bildet.

### 5.3.2 mTOR-Inhibitoren

#### Wirkmechanismus

mTOR-Inhibitoren bilden mit dem zytoplasmatischen Protein FKBP-12 einen Komplex. Die wachstumsfaktorstimulierende Phosphorylierung der p70-S6-Kinase wird gehemmt. Der mTOR-Inhibitor-FKBP-12-Komplex bindet an mTOR und reguliert so dessen Funktion. mTOR regelt als regulierendes Schlüsselprotein den Zellmetabolismus, das Wachstum und die Proliferation. Die Unterbindung der mTOR-Funktion führt zur Unterbrechung des Zellzyklus. Die Wirkung von mTOR-Inhibitoren ist nicht auf T-Zellen beschränkt. Sie hemmen allgemein die durch Wachstumsfaktoren stimulierte Proliferation, damit die klonale Expansion antigenaktivierter T-Zellen, von hämatopoetischen und nicht hämatopoetischen Zellen, z.B. von vaskulären glatten Muskelzellen. Eine Verletzung der Endothelzellen löst eine durch Wachstumsfaktoren stimulierte Proliferation der vaskulären Muskelzellen aus und führt zur Bildung einer Neointima und spielt somit eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der chronischen Abstoßung.

Anders als bei den Calcineurin-Inhibitoren (4.3.3) kommt es hier nicht zur Hemmung von Calcineurin, sondern zur Inhibierung von mTOR. mTOR (mammalian Target of Rapamycin) ist eine Proteinkinase, die durch Phosphorylierung verschiedene Translationsinitiatoren und Elongationsfaktoren aktiviert, die ihrerseits die Translation von Regulatoren des Zellzyklus in T- und B-Lymphozyten steuern. Die mTOR-Inhibition führt zur Unterdrückung der Progression des Zellzyklus von der G<sub>1</sub>- in die S-Phase und hemmt damit die Lymphozyten-Proliferation und –Aktivierung. Everolimus wirkt als reversibler Proliferationsinhibitor, d.h. es inhibiert auf zellulärer Ebene die wachstumsfaktorstimulierte Zellproliferation unabhängig von der Zellabstammung oder dem Wachstumsfaktor. Es stoppt die klonale Expansion von aktivierten T-Zellen von der G<sub>1</sub>- zur S-Phase. Calcineurin-Inhibitoren, Ciclosporin A und Tacrolimus hemmen die Aktivierung von T-Zellen durch Inhibition des Übergangs von der G<sub>0</sub>- zur G<sub>1</sub>-Phase.

### 5.3.2.1 Everolimus

Everolimus (RAD,  $M_r = 958$ ) ist ein Makrolid-Immunsuppressivum und wird durch eine chemische Veränderung des natürlichen Produktes Sirolimus gewonnen (Abb. 6). Ziel der Behandlung mit Everolimus ist die Prävention der Aktivierung und/oder Proliferation von T-Zellen. Eine pharmakodynamische Synergie wird durch die verschiedenen Wirkmodi für Everolimus und Calcineurin-Inhibitoren begründet. Die Hauptmetaboliten sind Hydroxylverbindungen (24/25 OH RAD, 46 OH RAD) mit offenem Ring und 40-Phosphatidylcholin-RAD (PCh-RAD). Es gibt aktuell keine Hinweise in der Literatur zur dermalen Anwendung von Everolimus. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Permeation an der Schweinecornea untersucht. Ausgehend von der erwünschten Everolimus Plasma-Konzentration von 3-8 ng/ml nach einer Organtransplantation, wurde eine Konzentration von 8,64 ng/ml in Ex-vivo-Untersuchungen schon nach 30 min erreicht. Vorhergehende Untersuchungen bezüglich Sirolimus waren weniger erfolgreich (Büch et al. 2006). Die EMEA hat im Jahr 2009 eine positive Empfehlung für Everolimus zur Behandlung des metastasierenden Nierenzellkarzinoms ausgesprochen.

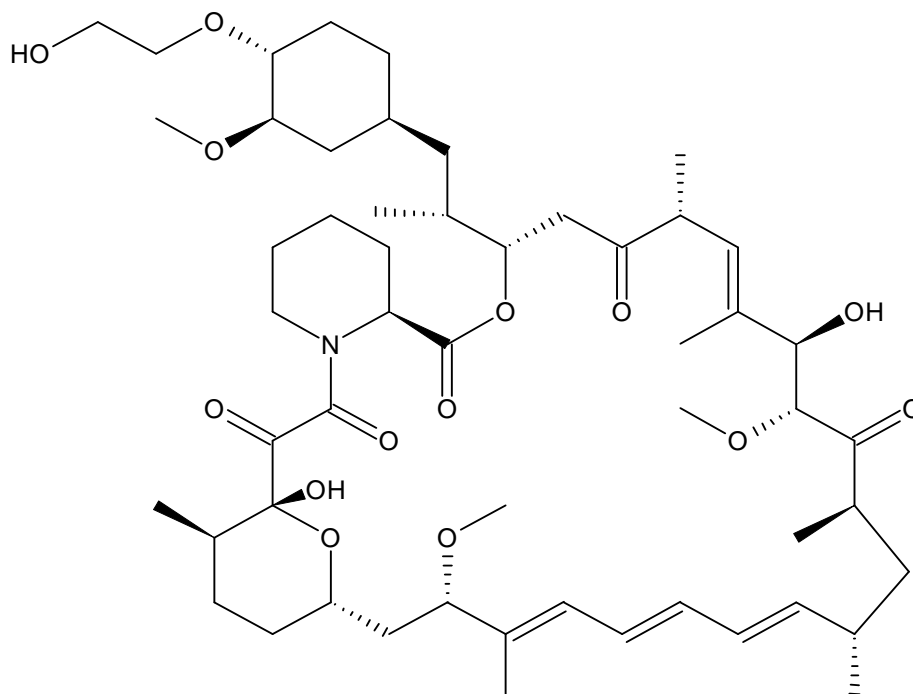


Abb. 6: Strukturformel von Everolimus

### 4.3.2.2 Sirolimus

Sirolimus (Rapamune Lösung 1 mg/mL) wird angewendet zur Prophylaxe der Transplantatabstoßung nach Nieren- und Herztransplantation. Ormerod et al. 2005 untersuchten mit Hilfe von Franz-Zellen die Penetration in das Stratum corneum zweier Sirolimus-haltiger Lösungen mit den Konzentrationen 2,2 und 8 %. Nach Applikation der 8 % igen Lösung wurde eine höhere Konzentration im Akzeptormedium gemessen als nach Applikation der 2,2 % igen Formulierung. Somit wurde die Penetration bzw. Permeation von Sirolimus ( $M_r = 914$ ) bewiesen. Tabelle 11 beinhaltet weitere Beispiele zur dermalen Applikation von Sirolimus.

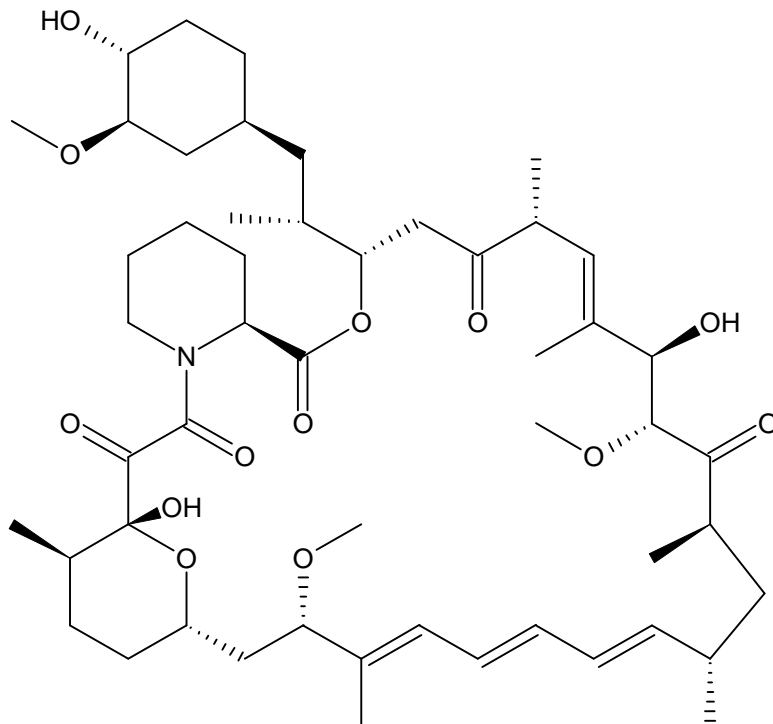


Abb. 7 Strukturformel von Sirolimus

Tab. 11: gibt eine Übersicht zu den bisherigen Studien über die topische Applikation von Sirolimus

<b>Studie</b>	<b>Indikation</b>	<b>Ergebnis</b>
Javier et al. 1997	Psoriasis	Sirolimus inhibiert die Stammzellen-Proliferation von Keratinozyten
Ormerod et al. 2005	Psoriasis	Sirolimus penetriert in das Stratum corneum
Reitamo et al. 2001	Psoriasis	Nicht Sirolimus als Monotherapie, sondern nur als Kombination mit Ciclosporin führte zur Verbesserung des PASI
Büch et al. 2007	Keratoplastik	Sirolimus permeiert nur unzureichend durch die Schweinecornea
Olsen et al. 1994	Keratoplastik	Überleben des Cornea-Transplantates an Ratten wurde verlängert
Ohia et al. 1997	EIU	EIU an Kaninchen wurde inhibiert
Reis et al. 2001	Keratoplastik	Die beste Überlebensrate an Ratten in Kombination mit CyA

Abkürzungen: PASI = Psoriasis Area and Severity Index; ME = Mikroemulsion;

EIU = Endotoxin induzierte Uveitis

### 5.3.2.3 Immunmodulatoren

#### Fingolimod (alt: FTY-720)

Die verschiedenen Klassen der Immunsuppressiva wirken über eine Blockade der T- oder B-Zellaktivierung, der Zell-Proliferation, der Zytokinproduktion oder der Antikörperproduktion. FTY-720 (2-Amino-2-(2-[4-octylphenyl]ethyl)-1,3-propanediol-hydrochlorid) wirkt nach einem ganz anderen Prinzip. Fingolimod ist ein synthetisches Derivat des natürlich in dem Pilz *Isaria sinclaria* vorkommenden Wirkstoffs Myriocin (Abb. 8). Es gibt klinische Untersuchungen von Fingolimod zur Indikation bei Multipler Sklerose, nach Nierentransplantationen und bei chronischen Virusinfektionen.

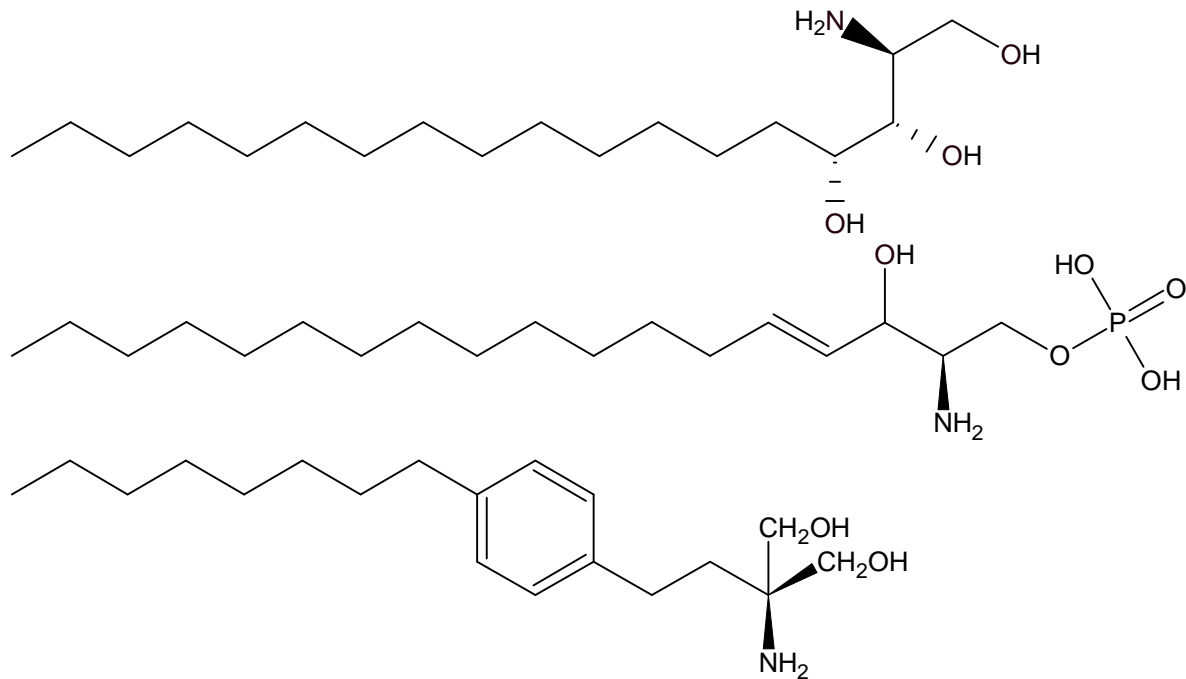


Abb. 8: Vergleich der Strukturformeln von Phytosphingosin, Sphingosin-1-Phosphat und FTY 720

#### Wirkmechanismus

Anders als bisher verfügbare Immunsuppressiva tötet Fingolimod Immunzellen nicht ab oder hindert sie an der Vermehrung. Fingolimod hemmt die Auswanderung von Lymphozyten aus den lymphoiden Organen in das Blut.

Das Enzym Sphingosin-Kinase-2 beschleunigt nach der Einnahme die Umwandlung von Fingolimod zu FTY720-Phosphat (FTY720-P), welches dann an die Sphingosin-1-phosphat – Rezeptoren (S1P-R) S1P-R<sub>1</sub>, S1P-R<sub>3</sub>, S1P-R<sub>4</sub>, S1P-R<sub>5</sub> binden kann, die an der Zelloberfläche



von u.a. B- und T-Zellen lokalisiert sind. Diese Rezeptoren haben bei der Wanderung von Lymphozyten in die Lymphknoten eine wichtige Funktion. Lymphozyten durchwandern normalerweise den Körper. Sobald sie auf AG-Strukturen (Bakterien, Viren) treffen, werden sie aktiviert, wandern daraufhin in die Lymphknoten und proliferieren dort. Wenn sich genügend Lymphozyten in den Knoten angesammelt haben, wandern sie wieder in den Blutkreislauf und bekämpfen dort die Infektion. Die Lymphozyten reduzieren zunächst bei dieser Wanderung in die Lymphknoten die Expression der S1P-Rezeptoren. Sobald die Lymphozyten die Lymphknoten wieder verlassen, werden die Rezeptoren erneut hochreguliert. FTY-720 wirkt auf zwei verschiedene Arten als Immunsuppressivum (Paugh et al. 2003, Böhler et al. 2005). S1P-Rezeptoren sind an G-Proteine gekoppelt und werden durch Ligandenbindung und Autophosphorylierung oder durch ligandenunabhängige Phosphorylierung durch andere Kinasen aktiviert. Sphingosin-Kinasen phosphorylieren in mikromolaren Konzentrationen FTY-720 zu FTY-720-P. FTY-720-P hat eine hohe Affinität zu den Rezeptoren S1P-R<sub>1</sub>, S1P-R<sub>3</sub>, S1P-R<sub>4</sub>, S1P-R<sub>5</sub>, verändert das Ceramid-S1P-Gleichgewicht und führt zur Apoptose der betroffenen Zellen. In nanomolaren Konzentrationen entfaltet FTY-720 klinisch relevante Wirkungen. FTY-720 bindet bevorzugt an S1P-R<sub>1</sub> und S1P-R<sub>5</sub>, mit geringerer Affinität auch an S1P-R<sub>2</sub>. Nach der Bindung von FTY-720 werden die Rezeptoren internalisiert, aus der Zellmembran ins Zellinnere verlagert und abgebaut und stehen somit für die Wanderung der Lymphozyten aus den Lymphknoten nicht mehr zur Verfügung. So reduziert FTY-720 die Rezirkulation der Lymphozyten in die Blutbahn und in das periphere Gewebe, damit auch in ein Transplantat. Die Lymphozyten werden stattdessen von Entzündungsherden und Transplantaten abgezogen und im sekundären lymphatischen Gewebe festgehalten. Eine Lymphopenie, also eine Reduktion der Lymphozytenzahl im Blut und im entzündlichen Gewebe, was beispielsweise nach einer Organtransplantation erwünscht ist, ist das Resultat. Deshalb ist FTY-720 eher als „Immunmodulator“ und nicht als Immunsuppressivum einzustufen.

### **Klinische Studien**

Die tägliche intraperitoneale Injektion von Fingolimod nach der Corneatransplantation von Ratten zu Mäusen zeigte eine dosisabhängige Verzögerung der Transplantatabstoßung (Sedlakova et al. 2005).

In einer Phase-II-Studie wurden 281 Multiple Sklerose-Patienten peroral mit Fingolimod behandelt. Verglichen mit der Placebo-Gruppe konnte nach sechs Monaten eine Verringerung

der aktiven Herde von bis zu 80 % und eine Reduktion der Schubrate von ca. 50 % festgestellt werden. Es konnte gezeigt werden, dass diese festgestellten positiven Ergebnisse in einer offenen 18-monatigen Anschlussstudie anhielten.

Nach Nierentransplantationen in Kombination mit Ciclosporin angewendet zeigten sich in der Phase-III der klinischen Prüfung Nebenwirkungen (Makula-Ödeme), v. a. bei Diabetikern mit Prädisposition zur diabetischen Retinopathie. Bei frisch transplantierten Nieren war eine leichte Funktionseinschränkung zu beobachten. Die Indikation der Transplantatabstoßung wurde schließlich aber aufgegeben, da die Resultate verglichen mit Mycophenolatmofetil in der Kontrollgruppe nicht besser waren.

In einer 2008 an Mäusen mit lymphozytärer Choriomeningitis durchgeführten Studie verschwand der Virus nach dreitägiger niedrig dosierter Therapie mit Fingolimod vollständig. Dieses Resultat steht eigentlich im Widerspruch zu der immunsuppressiven Wirkung von Fingolimod. Die Ursache dafür könnte in der sehr kurzen Behandlung und der sehr niedrigen Dosis liegen, die dazu führen, dass die virus-spezifischen Lymphozyten in den Lymphknoten kurzzeitig zurückgehalten werden und so deren optimale Aktivierung erlauben. Die aktivierten Lymphozyten wandern nach Absetzen von Fingolimod an den Ort der Virusinfektion und töten das Virus ab.

### **Sphingosin-1-Phosphat**

Sphingosin-1-Phosphat (S1P) ist das Lysophospholipid der Phosphorsäure-Ester des Sphingosins. Es hat einen großen Einfluss auf die Prozesse der Zellproliferation, Zellmigration und der Zelldifferenzierung. S1P entsteht aus dem Sphingolipid Sphingomyelin. Das Enzym Sphingomyelin-Phosphodiesterase hydrolysiert Sphingomyelin unter Abspaltung eines Phosphocholinrestes zum Ceramid. Dieses Ceramid wird durch Ceramidase weiter zu Sphingosin hydrolysiert. Die Sphingosinkinase beschleunigt unter ATP-Verbrauch die Übertragung eines Phosphatrestes auf die Hydroxylgruppe, es entsteht S1P.

Der Abbau erfolgt einerseits als Umkehrung des letzten Schritts der Synthese (S1P wird zu Sphingosin und Phosphat hydrolysiert), andererseits spaltet Sphinganin-1-phosphat-Aldolase (auch Sphingosin-1-phosphat-Lyase) S1P in Hexadecenal und Phosphoethanolamin.

Wie schon bereits erwähnt, erfüllt S1P als Signalmolekül vielfältige intra- und extrazelluläre Aufgaben:

- S1P dient als Schutzfaktor bei toxischen Ereignissen und steigert die Zellproliferation. Eine vermehrte Bildung von S1P führt zur Verringerung von Sphingosin und Ceramid, welche der Apoptose förderlich sind.
- Durch Aktivitätssteigerung zytoskeletaler Bewegungsfunktionen (S1P1-Rezeptor-Aktivierung) und innergeweblicher Verankerungen (S1P2-Rezeptor-Aktivierung) verstärkt S1P als Gewebshormon bei der Zellmigration das gerichtete Wanderverhalten einzelner Zellen. Als Folge wird die Rezirkulation von Lymphozyten gehemmt.
- Die Endothel-Durchlässigkeit für große Moleküle und Zellen wird reduziert, indem das VE-Cadherin-System/adherens junction aktiviert wird. Die Wirkung des VEGF wird gehemmt. Unter VE-Cadherin-System/adherens junction wird eine Gruppe von Adhäsionsverbindungen zusammengefasst, die eine Verbindung zwischen den Aktin-Filamenten zweier Zellen herstellen und sie dadurch mechanisch verstärken.
- Viele Vorgänge der Angiogenese, z.B. Induktion der endothelialen NO-Synthase (eNOS), Proliferation und Migration von Endothelzellen und Gefäßreifung durch glatte Muskelzellen werden unterstützt.
- S1P-Bildung erfolgt in den Blutplättchen, wo es auch gespeichert und bei Aktivierung sezerniert wird. In den Plättchen ist kein abbauender Stoffwechselweg verfügbar.
- S1P stimuliert COX-2 zur Produktion von PGE2. Ceramid-1-phosphat führt zur synergistischen Induktion der cytosolischen Phospholipase A2

### 5.3.3 Calcineurin-Inhibitoren

Die Aktivierung von Calcineurin erfolgt durch Bindung und Erkennung von (Auto-) Antigenen durch den T-Zell-Rezeptor auf der Oberfläche von T-Lymphozyten. Calcineurin ist eine cytosolische Proteinphosphatase, die NFAT (nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen) dephosphoryliert, worauf dieser in den Zellkern transloziert und als Transkriptionsfaktor die Transkription von IL-2 und weiterer T-Zell-Zytokine wie IL-4 und IL-5 induziert. Ciclosporin, Tacrolimus und Pimecrolimus binden an Immunophiline, wobei Tacrolimus und Pimecrolimus mit dem Immunophilin FKBP-12, Ciclosporin mit Cyclophilin interagieren. Die Immunophilin-Wirkstoffkomplexe binden an Calcineurin, hemmen die Calcineurin-vermittelte Dephosphorylierung von NFAT, mit dem Ergebnis, dass die Bildung und Freisetzung verschiedener Zytokine wie IL-2 und die T-Zell-Aktivierung unterdrückt wird. Die Calcineurin-Inhibitoren sind bei T-Zell-vermittelten Immunerkrankungen indiziert und haben sich u.a. bei Organtransplantationen und atopischer Dermatitis als wirksam erwiesen.

#### 5.3.3.1 Ciclosporin

Ciclosporin, ein Stoffwechselprodukt des Bodenpilzes *Tolypocladium inflatum*, ist ein neutrales, zyklisches und sehr lipophiles Peptid aus elf Aminosäuren ( $M_r = 1202$ ) mit einer ungewöhnlichen C9-Aminosäure in Position 1. Die Tatsache, dass von den elf Stickstoffatomen der Peptidbindungen sieben methyliert sind, trägt wesentlich zur hohen Lipophilie und zur Proteasestabilität bei. Die restlichen vier Stickstoffatome bilden transannellare Wasserstoffbrücken zu Carbonylfunktionen aus. Ciclosporin wird peroral und parenteral appliziert u.a. zur Prophylaxe und Therapie der Transplantatabstoßung (klinisch untersucht auch nach Keratoplastik, Tab. 12) und bei schweren Psoriasis-Formen, AD und rheumatoider Arthritis (Rote Liste 2008). Obwohl die hervorragende Wirksamkeit von Ciclosporin bei AD belegt ist, schränkt das Risiko von potenziellen Nebenwirkungen wie Nephrotoxizität und arterielle Hypertonie den Einsatz ein (Brockow et al. 1999).

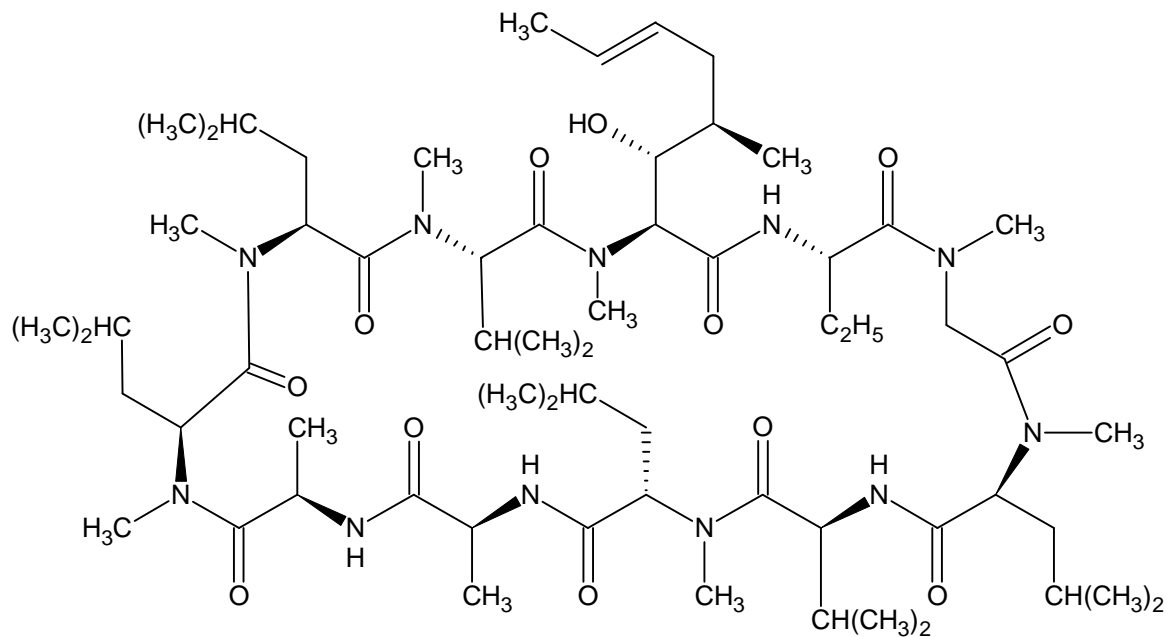


Abb. 9: Strukturformel von Ciclosporin

Tab. 12: Beispiele klinischer Studien über die systemische Applikation von Ciclosporin nach der Keratoplastik

Studie	Ergebnis
Hill 1989	Verbessertes Transplantatüberleben nach Hochrisikokeratoplastiken
Hill 1994	Steigerung der Reversibilität und Reduktion der Inzidenz von Hochrisikokeratoplastiken
Miller et al. 1988	Verbessertes Transplantatüberleben
Reinhard et al. 1997	Verbesserung der Prognose von Hochrisikokeratoplastiken
Reinhard et al. 1999	Bei Patienten mit atopischer Dermatitis Prognose verbessert
Robert et al 1997	Keine Verbesserung der Prognose

Die ungünstigen pharmakokinetischen Eigenschaften, wie z.B. das hohe Molekulargewicht, niedrige Wasserlöslichkeit und die extreme Lipophilie, limitieren die lokale Applikation am Auge. Tab 13 gibt eine Übersicht über die intraokular gemessenen Konzentrationen von Ciclosporin in verschiedenen Geweben.

Tab. 13: Übersicht über die in verschiedenen okularen Geweben gemessenen Konzentrationen von Ciclosporin nach topischer Applikation als Augentropfen

<b>Studie</b>	<b>Spezies</b>	<b>Dosis</b>	<b>KW</b> [ng/mL]	<b>K</b> [ng/mL]	<b>KO</b> [ng/mL]
Althaus et al. 1996	Mensch	2 %	81	-	-
Pfau et al. 1995	Mensch	2 %	33	10	-
Bell und Hunnisett 1986	Kaninchen	1 %	27	-	-
Kaswan 1988	Kaninchen	1 %	85	-	> 400
Mosteller et al. 1985	Kaninchen	10 %	62	-	557
Stamer et al. 1989	Kaninchen	4 %	1	133	551
Wiederholt et al. 1986	Kaninchen	2 %	-	-	900 - 1400

KW = Kammerwasser; K = Konjunktiva; KO = Kornea; - = keine Angabe

Tab. 14: Verschiedene Applikationen von Ciclosporin zur Behandlung der atopischen Dermatitis

<b>Studie</b>	<b>Arzneiform bzw. eingearbeitet in</b>	<b>c [CsA]</b>	<b>Ergebnis</b>
Griffiths et al 1987	Salbengrundlage	2 %	k. V.
Bousema et al 1990	Oleogel	10 %	k.V.
Schulze et al. 1990	Decoderm-Basiscreme	5 %	k.V.
Jahn 2002	Mikroemulsion	2 %	Erythem, Infiltration und Schuppung verbessert
Lopes et al 2005	MO + PG		Verbesserte Penetration und Permeation am Schweineohr
Egbaria et al 1990	Lipidvesikel		Penetration Verbessert, keine Permeation

CsA = Ciclosporin-Konzentration; k.V. = keine Verbesserung; MO + PG = Monoolein und Propylenglykol

Bei dermalen Applikation ist Ciclosporin unwirksam, da es normalerweise zu keiner Penetration der obersten Hautschichten kommt. Verbesserte Penetration und Permeation von CsA werden nur unter Verwendung hoher Tensidkonzentrationen, z. B. in Mikroemulsion, und mit Penetrationenhancern wie Propylenglykol, Monoolein, Ölsäure oder Dimethylsulfoxid erreicht (Tab. 14). Die Verträglichkeit dieser Substanzen ist aber bei vorgeschädigter Haut, wie z.B. bei atopischer Dermatitis, eingeschränkt.

### 5.3.3.2 Tacrolimus

Tacrolimus, ein Stoffwechselprodukt des Pilzes *Streptomyces tsukubaensis*, hat keine strukturelle Verwandtschaft mit Ciclosporin. Verwendet wird Tacrolimus sowohl topisch bei atopischer Dermatitis als auch systemisch zur Prophylaxe der Transplantatabstoßung. Tabelle 15 gibt eine kurze Übersicht über Untersuchungen zur topischen Applikation von Tacrolimus nach der Keratoplastik.

Tab. 15: Übersicht zum topischen Einsatz von Tacrolimus nach der Keratoplastik

Studie	Spezies	Transplantatüberleben
Benelli et al 1996	Mensch, Ratte	Transplantatüberleben verlängert
Hikita et al. 1997	Ratte	Transplantatabstoßung verzögert
Okada et al. 1996	Ratte	Transplantatüberleben verlängert
Tchah und Lim 1999	Mensch, Ratte	Transplantatüberleben leicht verbessert

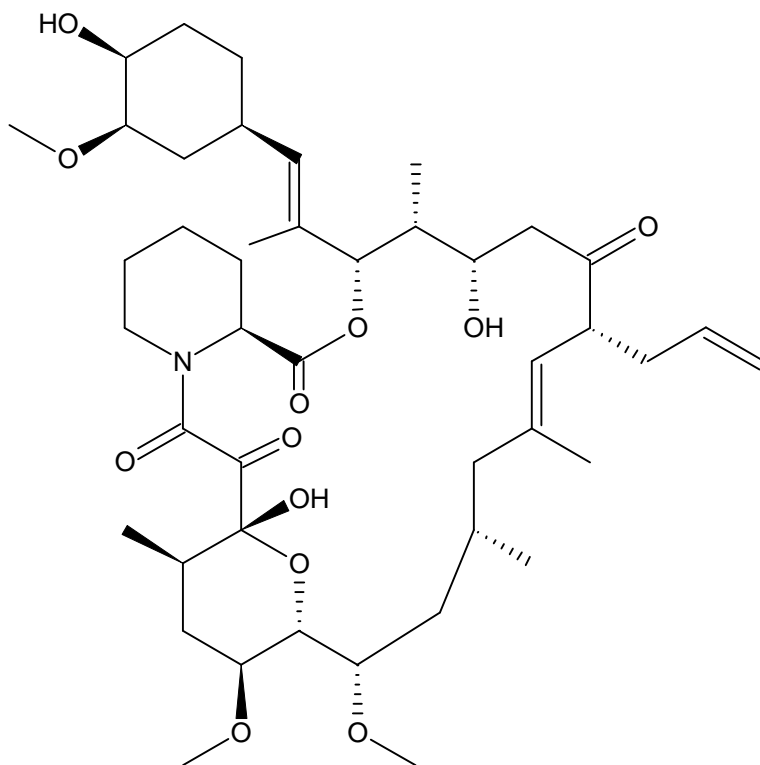


Abb. 10: Strukturformel von Tacrolimus

2002 wurde Protopic<sup>®</sup> (Tacrolimus 0,1%/ 0,03 %) zur Behandlung der mittelschweren bis schweren AD bei Erwachsenen und Kindern ab 2 Jahren, die vorher auf andere Therapien nicht angemessen reagiert oder diese nicht vertragen haben, zugelassen.

### 5.3.3.3 Pimecrolimus

Pimecrolimus ist strukturell eng verwandt mit Tacrolimus und wird zur Therapie der atopischen Dermatitis verwendet (Marsland 2002). Seit 2002 ist Pimecrolimus in Form einer 1 %-igen Creme (Elidel<sup>®</sup>, Douglan<sup>®</sup>) zur Kurzzeitbehandlung und intermittierenden Langzeitbehandlung für Kinder ab 2 Jahren mit leichter bis mittelschwerer atopischer Dermatitis zugelassen. Billich et al. 2004 verglichen die in vitro Permeation von den beiden Calcineurin-Inhibitoren Pimecrolimus und Tacrolimus gegen die Glucocorticoide Betamethason-17-valerat, Clobetasol-17-propionat und Diflucortolon-21-valerat. Dabei zeigte es sich, dass die Permeationsrate von Pimecrolimus verglichen mit den anderen Arzneistoffen kleiner war. Trotzdem konnte eine eindeutige Permeation nachgewiesen werden.

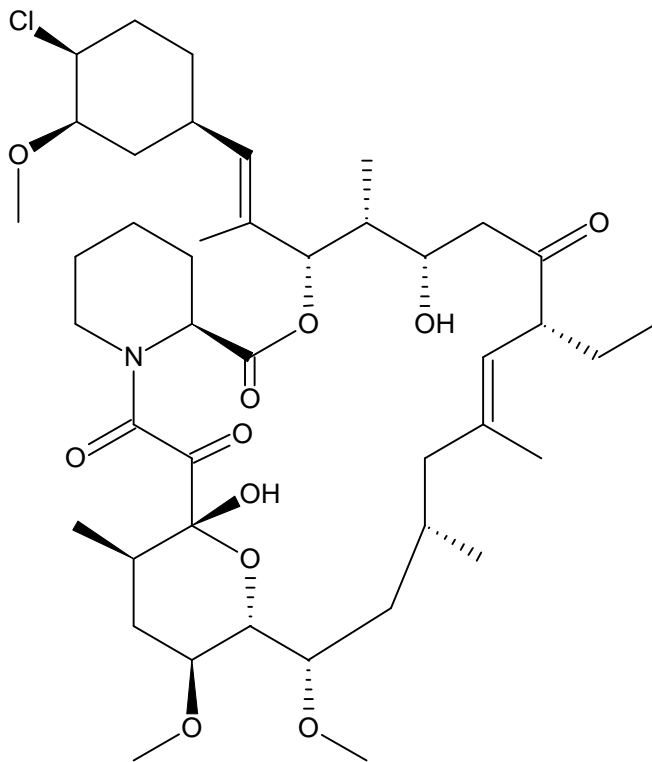


Abb. 11: Strukturformel von Pimecrolimus



## **Hautselektivität der topischen Calcineurin-Inhibitoren**

Topisch angewendete Arzneistoffe zur Behandlung der AD sollen idealerweise in das Stratum corneum penetrieren und in der Epidermis und Dermis in therapeutisch relevanten Konzentrationen vorliegen, ohne in die Blutbahn zu gelangen. Lipophilie und Molekulargewicht sind für die Absorption und Penetration entscheidend. Calcineurin-Inhibitoren sind lipophiler als GC und besitzen ein Molekulargewicht von beispielsweise 822 Da für Tacrolimus und 810 Da für Pimecrolimus. Die intakte Epidermis hat eine Barrierefunktion für Moleküle, die größer als 800 Da sind. Tacrolimus und Pimecrolimus überwinden jedoch die im Rahmen der AD gestörte epidermale Barriere.

Für die Therapie der schweren und mittelschweren AD wurde Tacrolimus als Salbe zugelassen und entspricht der Stärke potenter topischer GC, z.B. Betamethasonvalerat. In insgesamt fünf Studien in den USA und Europa an Erwachsenen, Minderjährigen und Kindern über 2 Jahren mit AD wurde eine signifikante Verbesserung des Erythems, der Lichenifikation, des Ödems, des Nässens, der Schuppung und des Juckreizes festgestellt. Die Wirksamkeit einer Pimecrolimus-Creme wurde in acht Studien an Erwachsenen, Kindern und Kleinkindern bewiesen.

Widersprüchlich sind die Literaturangaben bezüglich des Vergleichs der Potenz mit GC. So gibt es einerseits Quellen, die besagen, dass die Wirkstärke schwächer ist als die Potenz wirksamer GC. Es gibt aber auch Angaben, dass die Wirksamkeit von Pimecrolimus mit der von hochpotenten GC, z.B. Clobetasolpropionat, vergleichbar ist (Smith 2000, Hanifin und Chan 1999)

## **Karzinogenität**

In präklinischen Langzeit-Karzinogenitätsstudien wurde gezeigt, dass sowohl Tacrolimus als auch Pimecrolimus keine Karzinogene darstellen. Photokarzinogenitätsstudien zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Vehikel und Tacrolimus in der klinisch angewandten Dosierung. Die Inzidenz von weißem Hautkrebs in klinischen Studien mit Tacrolimus wurde bei fast 10 000 Erwachsenen untersucht mit dem Ergebnis, dass keine über das normale Maß der US-Kontrollbevölkerung hinausgehenden Inzidenz vorliegt (Koo et al. 2005, Frieling et al. 2000).

## **Stellungnahmen zum Gebrauch topischer Calcineurininhibitoren**

In einer Stellungnahme der Food and Drug Administration (FDA) im Jahre 2005 bezüglich des Auftretens von über 20 Fällen von Lymphomen verschiedener histologischer Subtypen und von 10 kutanen Tumoren wurde bekanntgegeben, dass Tierexperimente in drei unterschiedlichen Spezies unter extremen Bedingungen mit oraler Medikation von Calcineurin-Inhibitoren in hoher Dosierung zu keinen Lymphomen führte. Bedenkt man, dass weltweit mehr als 40 000 Patienten in Studien mit Tacrolimus und Pimecrolimus und etwa 7 Millionen nach der Zulassung von Tacrolimus und Pimecrolimus zur dermalen Anwendung behandelt wurden, ist die Anzahl der wenigen Fälle vernachlässigbar. Der Europäischen Arzneimittelagentur (European Medicines Agency, EMA) wurden 19 Fälle zu Neoplasien nach dermalen Tacrolimus-Therapie sowie 10 Fälle nach dermalen Pimecrolimus-Therapie gemeldet. Nach lokaler Anwendung von Pimecrolimus und Tacrolimus in diesen Studien konnten nur bei wenigen Patienten und auch nur vorübergehend extrem niedrige Blutspiegel gemessen werden.

Die FDA empfiehlt die topischen Calcineurin-Inhibitoren als „Second-line-Therapeutika“ für die Kurzzeittherapie und die intermittierende Langzeittherapie für Patienten mit AD einzusetzen, die entweder schlecht auf andere Therapien ansprechen oder diese nicht tolerieren. Die FDA empfiehlt weiterhin auf diese Therapie bei Kindern unter zwei Jahren zu verzichten.

Die EMA hat jedoch eine andere Sichtweise zur Sicherheit dieser beiden Produkte bei Kindern ab 2 Jahren. Hinzu kommt, dass verschiedene Fachgesellschaften und Expertenkomitees weltweit Bedenken in Bezug auf das Verhalten der FDA geäußert haben. Auf der Tagung der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG) im Jahre 2005 in Dresden wurde darauf hingewiesen, dass das Inzidenzrisiko für Lymphome, nicht-melanozytären Hautkrebs und für Melanome deutlich unter deren Spontaninzidenz liegt.

## **5.4 Weitere Materialien**

### **5.4.1 Phytosphingosin**

Phytosphingosin (Firma Degussa, Essen) ist eine freie, amphiphile Sphingoidbase (2S-Amino-1, 3S, 4R-octadecantriol) mit einem  $pK_b$ -Wert von ca. 9 (Strukturformel s. Abb. 8). Es ist damit verantwortlich für die positive Aufladung der untersuchten Nanoemulsionen bei einem eingestellten pH-Wert von ca. 5,5. Im humanem Stratum corneum kommt es in hohen Konzentrationen vor (Bibel et al. 1992, 1993 und 1995). Phytosphingosin sowie Sphingosin sind natürlich vorkommende, entzündungshemmende Stoffe mit hemmenden Eigenschaften auf Mikroorganismen (vgl. Wolf et al. 1997, Lambers und Streekstra 1998, 2002, Lersch und Schick, 2003).

### **5.4.2 $\alpha$ -Tocopherolacetat**

$\alpha$ -Tocopherolacetat (Synopharm, Barsbüttel, Deutschland) wurde in einer Konzentration von 0,03 % in den Nanoemulsionen als Antioxidationsmittel eingesetzt.

### **5.4.3 Kaliumsorbat**

Als Konservierungsmittel wurde Kaliumsorbat in einer Konzentration von 0,1 % verwendet.

### **5.4.4 Fettsäuren**

Zur Herstellung negativ geladener Nanoemulsionen wurden verschiedene Fettsäuren (Stearinsäure, Laurinsäure, Palmitinsäure und Myristinsäure) in Eutanol G überprüft.

Alle Fettsäuren wurden von Carl Roth GmbH & Co, KG, Karlsruhe, Deutschland bezogen.

### **5.4.5 Wasser**

Das in dieser Arbeit verwendete Wasser zur Herstellung der Nanoemulsionen und für analytische Zwecke (HPLC) ist Reinstwasser (bidestilliertes Wasser), gewonnen über die Anlage Millipore der Firma Schwalbach, Deutschland.

## 6 Methoden

### 6.1 Hochdruckhomogenisation

#### Micron LAB 40

Schon vor mehr als 100 Jahren wurde der erste Hochdruckhomogenisator zum Homogenisieren von Milch verwendet. Er besteht aus einer Hochdruckpumpe, die die Flüssigkeit in ein Ventil presst. Die Flüssigkeit läuft dabei durch einen schmalen Spalt und erfährt einen sehr starken Anstieg der Strömungsgeschwindigkeit, weil dasselbe Flüssigkeitsvolumen in derselben Zeit durch einen kleineren Strömungsquerschnitt fließen muss. Die Flüssigkeit entspannt nach Durchgang des Spalts. Das Zerkleinerungsprinzip der Hochdruckhomogenisation beruht auf der Kavitation. Sie läuft nach der Bernoulli-Gleichung, die besagt, dass in einem durchströmten System die Summe aus dem statischen Wanddruck ( $P_{st}$ , sich innerhalb einer ruhenden Flüssigkeit einstellendem Druck) und dem dynamischen Druck ( $P_{dyn}$ , aus der Strömungsgeschwindigkeit resultierendem Druck) der Flüssigkeit konstant ist:

$$P_{st} + P_{dyn} = K$$

$$P_{dyn} = \frac{1}{2} \cdot \delta \cdot v^2$$

$K$  ist eine Konstante,  $\delta$  die Dichte der Flüssigkeit und  $v$  die Strömungsgeschwindigkeit.

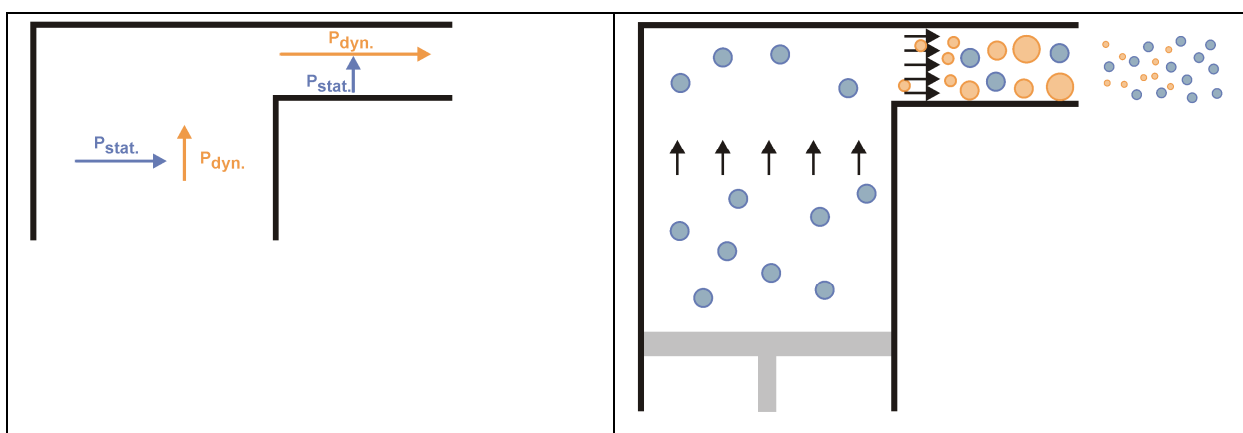


Abb. 12 Schematische Darstellung der rechten Ventilhälfte eines Kolben-Spalt-Homogenisators

Wird eine Flüssigkeit durch einen engen Spalt gepresst, nimmt die Strömungsgeschwindigkeit und folglich der dynamische Druck ( $P_{\text{dyn}}$ ) der Flüssigkeit zu und im Gegenzug nimmt der Bernoulli-Gleichung folgend der statische Wanddruck ( $P_{\text{st}}$ ) ab (Abb. 12). Sinkt der statische Druck soweit ab, dass der Dampfdruck der Flüssigkeit unterschritten wird, fängt die Flüssigkeit an zu siedeln und es kommt es zur Ausbildung von Gasblasen (Kavitationsblasen) und von Schock- bzw. Stoßwellen. Beim Spaltaustritt endet die Verengung, der Flüssigkeit steht plötzlich ein sehr großes Volumen zur Verfügung und die Strömungsgeschwindigkeit, damit auch der dynamische Druck, fällt abrupt ab. Im Gegenzug nimmt der statische Druck bis über den Dampfdruck der Flüssigkeit sprunghaft zu. Der Verdampfungsvorgang kommt zum Stehen und der in den Gasbläschen entstandene Dampf kondensiert an deren Aussenwand. Es kommt in den Gasbläschen zu einem starken Unterdruck, wodurch die Bläschen implodieren. Jedes Bläschen sendet beim Implodieren Schockwellen und kleinste Flüssigkeitsstrahlen mit sehr hoher Geschwindigkeit, mit Auswirkung auf die nähere Umgebung. Dadurch werden die in der Flüssigkeit enthaltenen Öltröpfchen beschleunigt, verformt, zerrissen und zerkleinert. Dieser Vorgang, bei dem durch Druckschwankungen Hohlräumen gebildet und wieder aufgelöst werden, nennt man Kavitation (lat.: cavitare = aushöhlen). Dabei entstehen kurzzeitig Drücke von bis zu mehreren tausend bar. Neben der Kavitation tragen auch Strömungs- und Scherkräfte zur Partikelzerkleinerung bei.

Die Mindestmenge für diesen Homogenisator LAB 40 (Unna, Deutschland) beträgt 20 ml, die Höchstmenge 40 ml. New chemical entities (NCEs) machen es aus Kostengründen erforderlich auf kleinere Probenmengen zurückzugreifen. Zu diesem Zweck kann man den EmulsiFlex C5 mit einem Mindestvolumen von 7 ml verwenden.

## **EmulsiFlex-C5**

Der Hochdruckhomogenisator EmulsiFlex-C5 (Avestin, Kanada) besteht aus den Elementen Pumpe, Ventil, Manometer und Temperierbad.

### Pumpe

Dieser Homogenisator besitzt eine druckluft-/und druckgasbetriebene Hochdruckpumpe, ohne produktberührende Dichtungsringe. Die einzige Kunststoffdichtung ist eine Kolbendichtung, bestehend aus Ultra High Molecular Weight Polyethylene. Er arbeitet durch ein spezielles Pumpenmotorsteuerventil besonders leise.

### Ventil

Das pneumatisch regulierbare, dynamische Ventil enthält keine Dichtungsringe aus Gummi. Ein Teflonring zur Abdichtung des Ventilsystems ist die einzige Kunststoffdichtung. Alle anderen Dichtungen sind Metall-auf-Metall- oder Metall-auf-Keramik-Dichtungen.

Dieser Homogenisator erreicht einen Durchsatz von 1-5 L/h, der vom eingestellten Druck abhängig ist. 7 mL beträgt die kleinstmögliche Probenmenge, der Substanzverlust liegt unter 1 mL. Ein Druckbereich zwischen 30 und 2000 bar ist frei wählbar. Das gesamte Gerät kann zum Temperieren des Probenmaterials in ein Wasserbad eingetaucht werden.

Ein Vorteil ist die leichte Reinigung des Gerätes mit heißem Wasser, Ethanol, Aceton und anderen Lösungsmitteln, die durch das Gerät gepumpt werden können. Auch durch Spülen mit Druckluft/-gas können verbliebene Rückstände entfernt werden. Das gesamte Gerät inkl. Ventil kann zur Reinigung und Wartung zerlegt werden. Alle Teile, die mit dem Produkt in Kontakt stehen, können autoklaviert werden. Für Anwendungen im Labormaßstab reicht zum Betreiben ein Stickstoffbehälter oder ein kleiner Kompressor.

## 6.2 Partikelgrößenanalytik und Partikelladung

### 6.2.1 Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)

Dabei handelt es sich um ein dynamisches Streulichtverfahren, bei der die durch Diffusion der Teilchen hervorgerufenen Schwankungen der Streulichtintensität erfasst werden (Müller und Schuhmann 1996). Man erhält als Ergebnis den mittleren Partikeldurchmesser der Probe im Messbereich zwischen 5 nm und 3-5 µm und den Polydispersitätsindex (PI), als Maß für die Breite der Verteilung. Kleine Partikel werden durch die Brownsche Molekularbewegung der sie umgebenden Flüssigkeitsmoleküle zu einer schnelleren Bewegung angeregt, weil sie eine geringere Trägheit besitzen als große Teilchen. Ein Photomultiplier erfasst die Intensitätsschwankungen. Eine Autokorrelationsfunktion wird mit Hilfe eines Korrelators berechnet und an eine theoretische Korrelationsfunktion  $g(\tau)$  angepasst. Die mathematische Abweichung zwischen der gemessenen und der theoretischen Korrelationsfunktion beschreibt der PI, der dimensionslos ist. In der Praxis spricht man bei Werten zwischen 0,03 und 0,06 von Monodispersität, zwischen 0,1 und 0,2 von einer engen, bei Werten zwischen 0,25 und 0,5 von einer breiten und bei Werten 0,5 von einer multimodalen Verteilung. Die Diffusionskonstante  $D$  wird über die theoretische Korrelationsfunktion ermittelt und in die Stokes-Einstein-Gleichung eingesetzt. Der Radius bzw. der Durchmesser der Hauptpopulation kann wie folgt berechnet werden:

$$r = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D}$$

$r$  = mittlerer Teilchenradius

$k$  = Boltzmann-Konstante

$\eta$  = dynamische Viskosität des Meßmediums

$T$  = absolute Temperatur

$D$  = Diffusionskonstante

Diese Zusammenhänge gelten jedoch nur für kugelförmige Partikel, wobei auch die Temperatur und die Viskosität des Meßmediums entscheidend sind. Die Tröpfchen der durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsion sind zwar sphärisch, aber nicht einheitlich rund, sondern eher leicht deformiert. Verwendet wurden für die Messungen ein Zetasizer 4

und ein Zetasizer Nano ZS (beides Malvern Instruments, UK). Beim Zetasizer 4 wurde ein Laser mit einer Wellenlänge von 632,4 nm verwendet und in einem Winkel von 173° gemessen. Die Proben wurden mit bidestilliertem Wasser auf die empfohlene Streulichtintensität verdünnt, um Mehrfachstreuungen zu vermeiden.

Da mit diesem Verfahren die mittlere Teilchengröße ermittelt wird, aber keine Aussage zu eventuell vorhandenen Partikeln im Mikrometer-Bereich möglich ist, wird zusätzlich das Verfahren der Laserdiffraktometrie herangezogen um die Partikelgröße (-verteilung) festzustellen.

### **6.2.2 Laserdiffraktometrie**

Wenn Teilchen unterschiedlicher Größe in den Strahlengang eines (Laser-)Lichtstrahls eingebracht werden entstehen Beugungsmuster. Je kleiner der Partikel ist, desto stärker ist die Krümmung seiner Oberfläche, desto größer ist der Beugungswinkel. Das Verfahren der Laserdiffraktometrie nutzt die Analyse dieser Beugungsmuster mittels mathematischer Ermittlung der Partikelgröße und der -verteilung. Diese Beugungsmuster sind charakteristisch sind für den Partikeldurchmesser (Müller und Schuhmann 1996).

Es handelt sich um ein Vorwärtsmeßverfahren, bei dem der Laserstrahl durch ein optisches System aufgeweitet wird. Eine Fourier-Linse, die der Probe nachgeschaltet ist, sorgt dafür, dass die Beugungsbilder unabhängig von der Lage der Partikel im Meßvolumen an einer Stelle des aus Ringsegmenten aufgebauten Multielementdetektors fokussiert werden.

Durch die Verwendung zweier Fourier-Linsen und dreier Detektoren (low-, mid- und high-angle-detector) und der Kombination mit der PIDS-Technologie im Gerät LS230 der Firma Coulter Electronics, ergibt sich ein Meßbereich zwischen 40 nm und 2000 µm. PIDS steht für Polarization Intensity Differential Scattering und ermöglicht eine exakte Bestimmung von Partikelgrößen im Submikronbereich aufgrund unterschiedlicher Streuung polarisierten Lichtes. Durch ein Filtrerrad wird jeweils nur das Licht einer Polarisationssebene (senkrecht oder parallel zur Streuebene) und dreiverschiedenen Wellenlängen (450, 600 und 900 nm) aus der gebündelten weißen Lichtquelle herausgefiltert. Sechs PIDS-Detektoren im Winkel von 60°, 75°, 90°, 105°, 120° und 146° erfassen die Symmetrie des Streumusters.

Die mathematische Auswertung der LD-Beugungsbilder erfolgt nach der Fraunhofer- oder der Mie-Theorie. Die Fraunhofer-Auswertung ist für kugelförmige Partikel ratsam mit einer Größe über der Wellenlänge der verwendeten Lichtquelle, hier ein Halbleiterlaser mit etwa 750 nm. Da die mittlere Partikelgröße der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten



Nanoemulsionen deutlich unter 500 nm liegt, wurde die Mie-Theorie herangezogen. Diese mathematische Auswertung setzt aber die Kenntnis des realen Brechungsindex der Partikel sowie des durch die Partikel absorbierten Anteils des Laserlichtes (imaginärer Teil) voraus. Der Brechungsindex der Nanoemulsionen wurde als 1,456 und als Lichtabsorption 0,01 festgelegt. Alle Proben wurden nach ausreichender Verdünnung dreifach gemessen.

Das Ergebnis der Messung ist eine Gesamtverteilungskurve, die eine Volumenverteilung darstellt und eine Aussage über die prozentualen Anteile bestimmter Partikelgrößen an der Gesamtpopulation zulässt.

Die Durchmesser LD50, LD90, LD95 und LD99 wurden als charakteristische Parameter festgelegt. In dieser Arbeit wurde ausschließlich der LD99-Durchmesser angegeben. Dieser besagt, dass 99 % der detektierten Partikel einen kleineren Durchmesser aufweisen als der genannte Wert. Größere Partikel werden stärker gewichtet, weil es sich um eine volumenbezogene Verteilung handelt.

### **6.2.3 Zetapotenzial**

Ein Maß für die elektrostatischen Abstoßungskräfte und damit für die Lagerstabilität disperser Systeme wie z. B. Nanoemulsionen ist das Zetapotenzial (ZP). Partikel disperser Systeme besitzen eine meist negative Oberflächenladung (Nernst Potenzial). Negative dehydratisierte Ionen lagern sich an die Oberfläche an (innere Helmholtz-Schicht) und positive Gegenionen lagern sich auf diese Schicht (äußere Helmholtzschicht). Die innere und äußere Helmholtz-Schicht werden zusammen als Sternschicht bezeichnet. Diese Schicht ist fixiert und kann nicht abgeschert werden. Hydratisierte Kationen, die mehr Platz beanspruchen, können nicht zu einem vollständigen Ladungsausgleich führen. Das Sternpotenzial weist immer noch einen negativen Wert auf. Eine diffuse Schicht aus hydratisierten Kationen und Anionen, die das Teilchen wie eine Wolke umgeben, führt zur asymptotischen Ladungsannäherung gegen Null. Es kommt durch die unterschiedlichen Ladungsverteilungen zu linearen Potenzialverläufen in der Sternschicht und zum exponentiellen Abfall des Potenzials in der diffusen Schicht. Bei der Diffusionsbewegung der Teilchen wird die diffuse, nicht fixierte Schicht durch Reibungskräfte teilweise abgestreift. Das Teilchen ist nach aussen nicht mehr neutral und kann nach dem Anlegen eines elektrostatischen Feldes zur entgegengesetzt geladenen Elektrode hin beschleunigt werden. Diese Beschleunigung führt zur weiteren Erhöhung der Reibungskräfte, was wiederum eine weitere Abstreifung der diffusen Schicht zur Folge hat. Ein ausreichend starkes elektrisches Feld streift die diffuse Schicht bis kurz vor dem fixierten

Sternpotenzial. Die Hydrathülle der Sternschicht hält den Rest der diffusen Schicht. Das Potenzial an der Scherebene nach dem Abstreifen wird als Zetapotenzial ( $\xi$ ) bezeichnet. Je größer die elektrostatische Abstoßung zwischen den Partikeln ist, desto größer ist das Zetapotenzial und desto größer ist somit die Stabilität der Dispersion. Beträge von Zetapotenzial-Werten  $> 30$  mV stehen für stabile Systeme, wobei es auch Ausnahmen von dieser Regel gibt. Die Messung des Zetapotenzials erfolgt über die Laser-Doppler-Anemometrie. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes bewegen sich die Partikel abhängig von der angelegten Feldstärke mit einer bestimmten Geschwindigkeit in Richtung der entgegengesetzt geladenen Elektrode. Um ein Abscheren der gesamten diffusen Schicht zu gewährleisten, muss das elektrische Feld entsprechend ausgewählt werden. Die Probe mit sich bewegenden Partikeln wird mit einem Laser bestrahlt, der gestreut wird. Das Resultat ist eine Frequenzverschiebung der Wellenlänge des gestreuten Laserlichts (Doppler Effekt), wobei die Größe dieser Verschiebung von der Partikelgeschwindigkeit abhängig ist. Durch Messung der Frequenz des gestreuten Laserlichts kann auf die Teilchengeschwindigkeit geschlossen werden. Diese Teilchengeschwindigkeit ins Verhältnis gesetzt zur angelegten Feldstärke ergibt die elektroforetische Mobilität, die die Teilchengeschwindigkeit und somit die Ladung unabhängig von der angelegten Feldstärke kennzeichnet. Die elektroforetische Mobilität wird nun nach Helmholtz-Smoluchowski in das Zetapotenzial umrechnet (Müller 1996). Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die Messungen ein Zetasizer 4 bzw. ein Zetasizer Nano ZS (beides Malvern Instruments, UK) verwendet. Die Messungen erfolgten nach Einstellung des pH-Wertes auf  $5,5 \pm 0,1$  und entsprechender Verdünnung der Nanoemulsionen mit bidestilliertem Wasser, das mit Kochsalz auf eine Leitfähigkeit von  $50 \mu\text{S}/\text{cm}$  eingestellt wurde.

### 6.3 HPLC-Analytik

Die Retentionszeit von Prednicarbat nach der Methode aus dem Europäischen Arzneibuch beträgt ca. 17 min. Es wurden verschiedene Fließmittelmischungen und eine Gradientenmethode getestet. Die Gradienten-Methode sowie die verschiedenen überprüften Fließmittelmischungen erwiesen sich bei der verwendeten HPLC-Anlage als unbrauchbar, ebenso wie die verschiedenen, getesteten Fließmittelmischungen.

Für die Kalibriergeraden (Abb. 13 und 14) und die Gehaltsbestimmungen der Nanoemulsionen mit Prednicarbat, Everolimus und Sirolimus wurden die in der Tab.16 aufgeführten HPLC-Parameter verwendet.

Tab. 16: HPLC- Analytik von Prednicarbat, Everolimus und Sirolimus

	<b>Prednicarbat</b>	<b>Everolimus</b>	<b>Sirolimus</b>
<b>Säule</b>	LiChrospher <sup>®</sup> RP18, LiChroCart <sup>®</sup> 125-4 (5 µm) (Merck, Darmstadt)		
<b>Vorsäule</b>	LiChrospher <sup>®</sup> RP18, LiChroCart <sup>®</sup> 4-4 (Merck, Darmstadt)		
<b>Pumpe</b>	L6200A (Merck Hitachi, Deutschland)		
<b>Autosampler</b>	AS 2000-A (Merck Hitachi, Deutschland)		
<b>Detektor</b>	DAD-Detektor, L-4500 (Merck Hitachi, Deutschland)		
<b>Wellenlänge [nm]</b>	254	278	
<b>Mobile Phase</b>	AcCN + Wasser (5 Teile + 6 Teile)	Acetonitril/Methanol/Wasser (38/34/28)	
<b>Flussrate</b>	0,7 ml/min	0,8 ml/min	
<b>Temperatur</b>	25 °C	70 °C	
<b>Injektionsvolumen</b>	20 µl		
<b>Laufzeit [min]</b>	22	10	
<b>Retentionszeit [min]</b>	17,4 ± 0,8	5 ± 0,2	4 ± 0,2
<b>Konzentrationsbereich für Kalibrierfunktion (n = 6)</b>	1-100 µg/ml	1-100 µg/ml	1-100 µg/ml
<b>Geradengleichung</b>	A = 18914 c + 14706	A = 23708 c – 10183	A = 26514 c – 19277
<b>R<sup>2</sup></b>	0,9998	0,9995	0,9997

AcCN = Acetonitril, A = Peakfläche, R = Regressionskoeffizient,

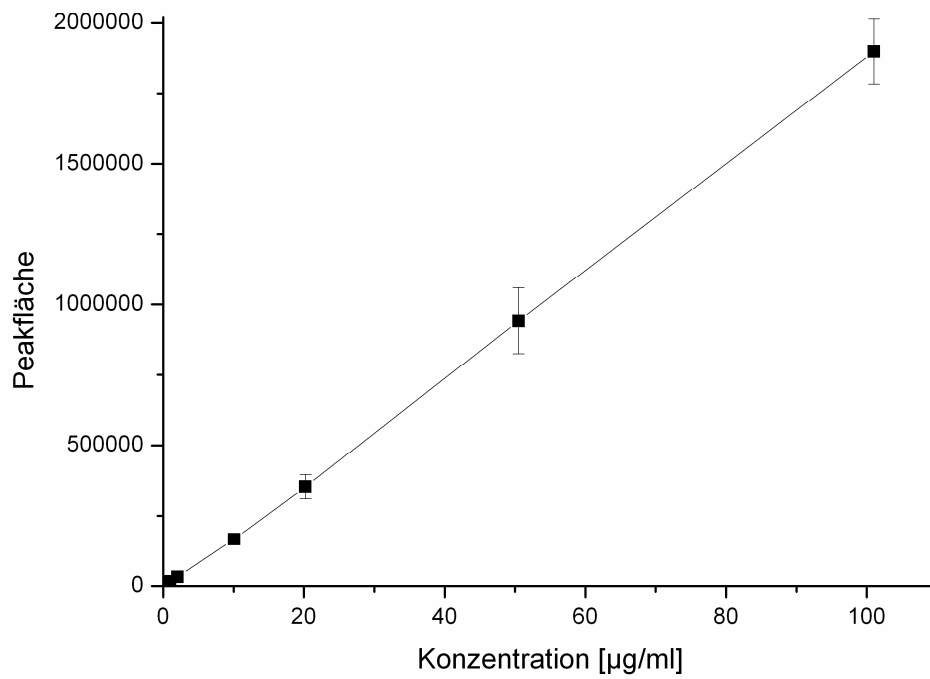


Abb. 13: Kalibrierfunktion für Prednicarbat ( $\bar{X} \pm s$ ; n = 6).

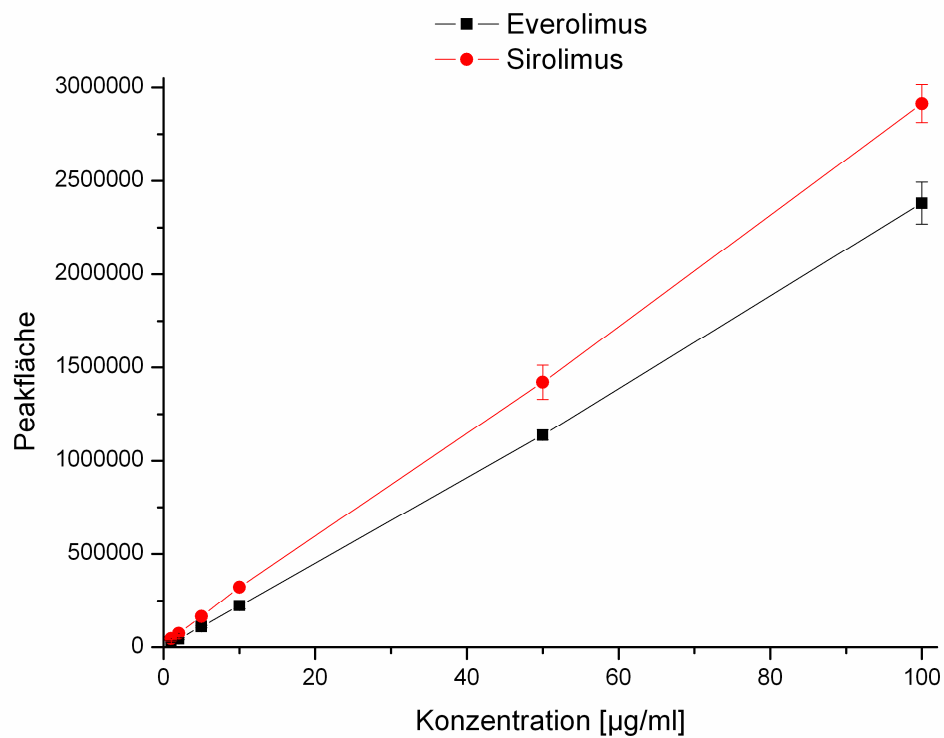


Abb. 14: Kalibriergerade für Everolimus und Sirolimus ( $\bar{X} \pm s$ ; n = 6).

## **6.4 Penetrationsuntersuchungen an exzidiierter Humanhaut**

### **Negativ geladene Nanoemulsionen**

Um die Penetration der positiv geladenen Nanoemulsion gegen die der negativ geladenen vergleichend zu untersuchen, wurde überprüft, ob die Fettsäuren Stearinsäure, Laurinsäure, Palmitinsäure und Myristinsäure zu 1 % in Eutanol G löslich sind. Stearinsäure war in dieser Konzentration in Eutanol G nicht löslich, Laurinsäure und Palmitinsäure fielen nach 3 Tagen Lagerung bei 25 °C wieder aus. Somit war von den getesteten Fettsäuren nur Myristinsäure geeignet und wurde zur Herstellung negativ geladener Nanoemulsionen per Hochdruckhomogenisation bei 50 °C mit 10 Zyklen und 300 bar eingesetzt. Anschließend wurden die Partikelgröße und –ladung charakterisiert.

### **Ex-vivo-Penetrations-Untersuchungen mit Franz-Zellen**

Die Haut für die Penetrationsuntersuchungen stammte von Patientinnen zwischen 18 und 55 Jahren und wurde maximal 24 Stunden vorher chirurgisch entfernt. Das subkutane Fettgewebe wurde mit Skalpell und Scheren, das Blut mit PBS-Lösung entfernt und die Haut mit Zellstoff trocken getupft. Mit einem Locheisen (d=30 mm) wurden Hautproben ausgestanzt und in Petrischalen (d=50 mm) eingelegt, die mit 1,5 mL Dulbeccos Modified Eagles Medium-Nährlösung befüllt waren. Die Hautstücke wurden bei 4 °C gelagert und die Penetrationsuntersuchungen innerhalb von 72 Stunden abgeschlossen, um die Viabilität der Haut zu gewährleisten. Die Franz-Diffusionszellen wurden mit einer PBS-Lösung (Akzeptorvolumen 7 mL) befüllt, die Haut aufgespannt und eine Stunde so temperiert, dass die Temperatur auf der Hautoberfläche 32 °C betrug. Jeweils 500 µL der positiv bzw. negativ geladenen Formulierungen, entsprechend einer PC-Menge von 1250 µg, wurden auf die Haut aufgetragen. Nach Inkubations von 1, 2, 3, 6 und 24 Stunden wurden 300 µL Probe entnommen und durch frische, temperierte PBS-Lösung ersetzt. Nach 24 Stunden wurde die überschüssige Formulierung vorsichtig von der Haut entfernt und die Hautoberfläche vorsichtig mit 5 mal 1 mL Isopropanol abgespült. Die Hautoberfläche wurde jeweils zweimal mit einem trockenen Tupfer und zweimal mit isopropanolfeuchtem Tupfer vorsichtig abgetupft. Die Tupfer wurden in geeignete Vials eingelegt und mit Ethylacetat benetzt. Anschließend wurden die Vials eine Minute auf dem Vortexer geschüttelt und für 30 Minuten in einem Ultraschallbad behandelt. Danach wurde das Ethylacetat abgenommen, die Tupfer

sorgfältig ausgewrungen. Das Ethylacetat sowie die Isopropanolwaschflüssigkeit wurden am Rotationsverdampfer vollständig eingeeengt. Die Rückstände wurden in 1,0 mL Methanol aufgenommen, 5 min bei 14 000 U/min zentrifugiert und die Arzneistoffmenge mittels HPLC bestimmt. Zur Bestimmung der Arzneistoffpenetration in die Haut wurden nach Abschluß der Penetrationsversuche die Hautstücke mit einem Einbettmedium auf Probentische gestellt und bei -80 °C eingefroren. Mit einem Gefriermikrotom wurden 100µm dicke Schnitte hergestellt und der Arzneistoff extrahiert.

### **Wahl eines geeigneten Extraktionsmittels und einer Extraktionsmethode**

Zur Extraktion von PC und seinen biologisch aktiven Metaboliten wurde nach einem geeigneten Extraktionsmittel und einer geeigneten Extraktionsmethoden gesucht. Dafür wurden nach Auftragen von jeweils 500 µl der Nanoemulsion auf die Haut und Inkubation von 24 Stunden die Haut mit Hilfe eines Einbettmediums bei – 80 °C auf Probentischen eingefroren und in 100 µm dicke Schichten geschnitten. Verschiedene Extraktionsmittel und Extraktionsmethoden getestet.

#### **Extraktionsmittel**

Mit jeweils drei geschnittenen Hautproben wurden folgende Extraktionsmittel überprüft:

- Ethanol (96 %, V/V)
- Ethylacetat bzw.
- ein Gemisch aus Acetonitril und Wasser (6+4)

Ethylacetat erwies sich dabei als das Extraktionsmittel mit dem das meiste Prednicarbat aus geschnittenen Hautproben extrahiert werden konnte. Mit jeweils drei weiteren Hautstücken wurde nun überprüft, welche der u.g. Extraktionsmethoden am Besten geeignet war.

#### **Extraktionsmethode**

##### **Methode 1**

Bei dieser Methode wurden die geschnittenen Hautstücke in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß nacheinander dreimal mit 0,5 mL Ethylacetat versetzt, eine Minute auf dem Vortexer geschüttelt und jeweils 30 min in einem Ultraschallbad extrahiert. Die Ethylacetat-Phasen wurden abgenommen. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, die abgenommenen

Ethylacetatphasen vereinigt und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde in 1,0 ml Methanol aufgenommen, bei 14 000 U/min 5 min lang zentrifugiert und der Gehalt an PC inkl. der Metaboliten per HPLC bestimmt.

### **Methode 2**

Drei Hautstücke wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 0,5 mL bidestilliertem Wasser versetzt, eine Minute auf dem Vortexer geschüttelt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und auf einem Wasserbad bei 37 °C wieder aufgetaut. Anschließend wurden 0,5 mL Ethylacetat dazugegeben, eine Minute auf dem Vortexer geschüttelt, 5 Minuten bei 14 000 U/min zentrifugiert und die Ethylacetat-Phase abgenommen. Der weitere Vorgang ist der Methode 1 analog.

### **Methode 3**

Bei der Methode 3 wurden die vorhergehenden Methoden 1 und 2 kombiniert, d.h. nach der Prozedur des Einfrierens mit flüssigem Stickstoff und Auftauens auf dem Wasserbad erfolgte eine Extraktion im Ultraschallbad (30 min).

Die vereinigten Ethylacetat-Phasen wurden am Rotationsverdampfer eingeengt, in Methanol aufgenommen, wiederum eingeengt und in 1,0 mL Methanol aufgenommen, um anschließend eine HPLC-Analytik durchzuführen. Bei dieser Methode 3 konnte das meiste Prednicarbat, inkl. der Metaboliten extrahiert werden.

Zur Beurteilung der Wiederfindung wurde Betamethasonvalerat als interner Standard eingesetzt.

### **Extraktion und Analyse des Prednicarbats und seiner Metabolite aus den Mikrotom-Schnitten**

Nach dem Schneiden am Gefriermikrotom wurden die Hautschnitte in Eppendorf-Reaktionsgefäße platziert, mit 0,5 mL bidestilliertem Wasser versetzt, eine Minute auf dem Vortexer geschüttelt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach dem Auftauen auf dem Wasserbad bei 37 °C, wurden 0,5 mL Ethylacetat dazu gegeben, eine Minute auf dem Vortexer geschüttelt, fünf Minuten bei 14 000 U/min zentrifugiert, die Ethylacetat-Phase abgenommen und in einem Vial vereinigt. Dieser Vorgang wurde insgesamt fünfmal wiederholt. Danach wurden die Hautschnitte mit 0,5 ml Ethylacetat 30 min im Ultraschallbad

extrahiert und die Ethylacetatphasen erneut abgenommen. Die vereinigten Ethylacetat-Phasen wurden am Rotationsverdampfer vollständig eingengt und in 1,0 mL Methanol aufgenommen. Anschließend erfolgte eine HPLC-Analyse zur Bestimmung des Gehalts an Prednicarbat und seinen Metaboliten Prednisolon (PD), Prednisolon-17-Ethylcarbonat (PD-17-EC) und Prednisolon-21-Ethylcarbonat (PD-21-EC) (Strukturformeln s.Abb. 15).

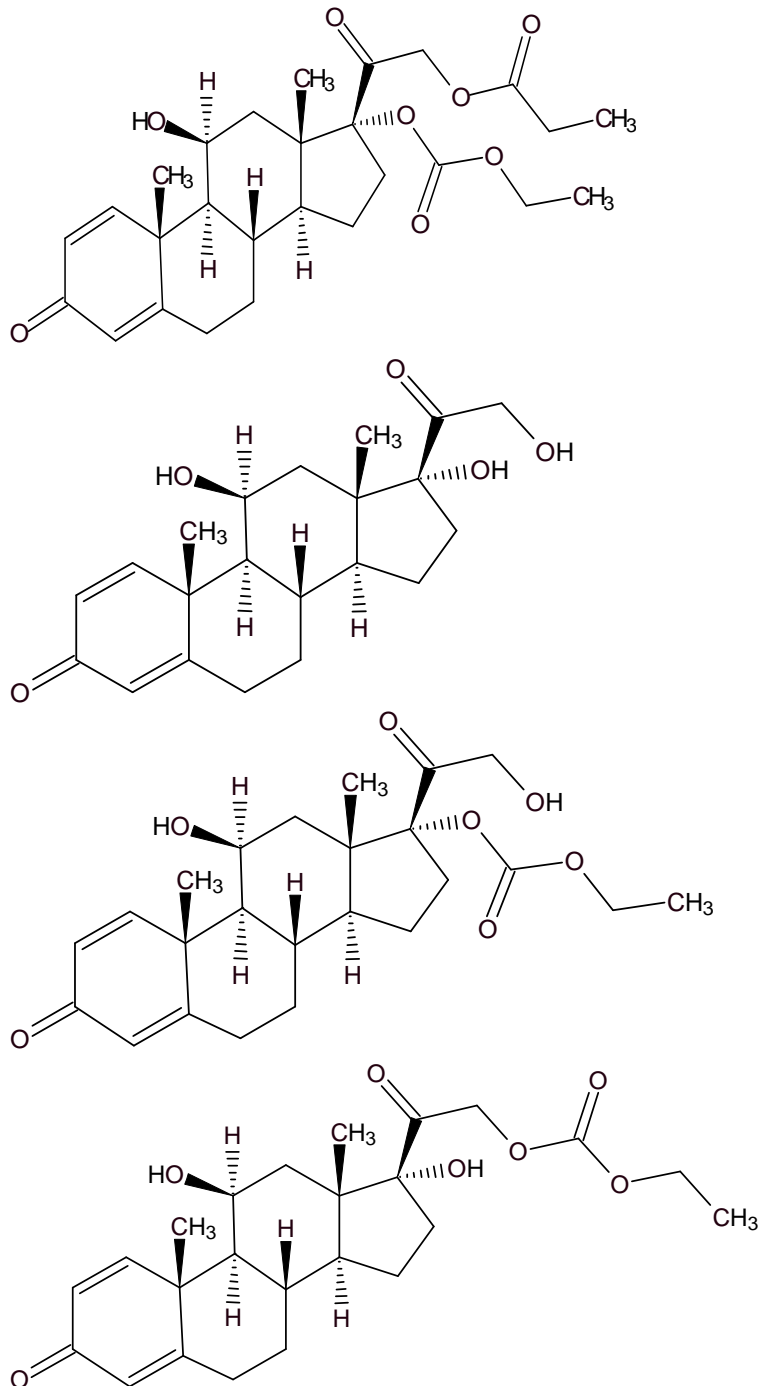


Abb. 15: Vergleich der Strukturformeln von Prednicarbat, Prednisolon, Prednisolon-17-Ethylcarbonat und Prednisolon-21-Ethylcarbonat



## 6.5 Freisetzung

Mit Hilfe von Franz-Diffusionszellen wurde die Freisetzung von Prednicarbat in positiv bzw. negativ geladenen Nanoemulsionen vergleichend untersucht. Da der Arzneistoff in Wasser praktisch unlöslich ist, wäre PBS als Akzeptormedium ein limitierender Faktor. So wurden verschiedene Mischungen aus Ethanol und PBS hergestellt (von Ethanol/PBS 80:20 bis zu 20:80) und die Löslichkeit von Prednicarbat in diesen Mischungen überprüft. Die Franz-Diffusionszellen, mit einer Nephrophan<sup>®</sup>-Membran, wurden mit 7 ml einer Ethanol-PBS-Mischung (1:1) als Akzeptormedium befüllt und 1 Stunde temperiert. 500 µL der positiv bzw. negativ geladenen Formulierungen als Donatormedium, was einer PC-Menge von 1250 µg entspricht, wurden aufgetragen, nach 1, 2, 3, 6 und 24 Stunden 500 µL Probe aus dem Akzeptorkompartiment entnommen und durch frische, temperierte Ethanol-PBS-Mischung ersetzt. Nach 24 Stunden wurde die überschüssige Formulierung vorsichtig von der Membran entfernt und die Membran vorsichtig mit 2 mL Ethylacetat gewaschen und in Vials eingelegt bis zur weiteren Analyse bei - 80 °C gelagert. Die Vials mit Ethylacetat wurden eine Minute auf dem Vortexer gemischt und für 30 Minuten in ein Ultraschallbad gelegt. Danach wurde die Membran sorgfältig ausgewrungen, das Ethylacetat abgenommen und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Die Membran wurde ebenfalls mit Ethylacetat versetzt, eine Minute auf dem Vortexer gemischt und für 30 Minuten in ein Ultraschallbad gelegt. Ethylacetat wurde abgenommen und mit der Ethylacetatphase der Waschflüssigkeit vereinigt und vollständig eingeeengt. Die Rückstände wurden in 1,0 mL Methanol aufgenommen, zentrifugiert (5 min, bei 14 000 U/min) und die Wirkstoffmenge mittels HPLC bestimmt.

## 6.6 Herstellung der Everolimus-haltigen Mikroemulsion

Triacetin und Poloxamer 184 wurden bei 180 °C für 30 min heißluftsterilisiert (Heraeus SUT 6200, Hanau, Deutschland) und die Propylenglykol/Wasser-Mischung bei 121 °C und 2 bar für 15 min autoklaviert (Selectomat S 2000, Münchener Medizin Mechanik GmbH, Deutschland). Mit 2,0 g Triacetin wurden 10 mg Everolimus angelöst und anschließend 1,5 g Poloxamer unter Rühren zugefügt. Unter weiterem Rühren wurde eine Mischung aus 4,0 g Propylenglykol und 2,5 g Wasser zugefügt und die fertige Mikroemulsion durch ein 5 µm Polytetrafluorethylen Filter (Sartorius, Göttingen, Deutschland) filtriert.

## 6.7 Permeationsuntersuchungen an der Schweinecornea

Für die Durchführung der in-vitro Permeationsuntersuchungen wurden sog. Ussing-Kammern aus Acrylglas (Gründberg Kunststoffe, Rödermark, Deutschland) mit einer Oberfläche von  $0,5 \text{ cm}^2$  verwendet (Siefert und Keipert 1997, Scholz 2003). Sie gewährleisten eine sichere Fixierung der Cornea zwischen beiden Halbzellen wobei die anatomische Krümmung der Cornea erhalten bleibt. In einem Wasserbad (Lauda T., Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland) werden die Zellen auf  $33 \pm 1 \text{ °C}$  temperiert. Bezogen wurden die Augen frisch geschlachteter Schweine von der LVAT (Lehr- und Versuchsanstalt für Tierzucht und Tierhaltung, Teltow, Deutschland). Die Präparation der Cornea ist von Siefert und Keipert 1997 sowie Scholz 2003 beschrieben worden. Die Unversehrtheit der Cornea wurde makroskopisch überprüft, das anhaftende Muskelgewebe entfernt und der Augapfel mit Bicarbonat-Ringerlösung pH 7,4 (BR) gespült. Die Cornea wurde mit einem Skalpell und einer Schere so entfernt, dass sich ein etwa 3 mm breiter Ring um das unbeschädigte Gewebe befand. Nach dem Spülen mit BR wurde die entfernte Cornea mit der Epithelseite zum Donatorkompartiment in die Permeationszelle eingespannt. Als Donor wurde 1 mL der Mikroemulsion (mit Everolimus und als Kontrolle eine arzneistofffreie Mikroemulsion mit sonst gleicher Zusammensetzung) verwendet. Eine Pumpe (Ismatec, Glattbrugg-Zürich, Schweiz) pumpte kontinuierlich mit einer Flussrate von 5 mL/min das Akzeptorvolumen von 15 mL BR durch die Akzeptorhalbzelle. Nach 30, 60 und 240 min wurden aus der Akzeptorhalbzelle 5,0 mL Proben entnommen und durch frische, temperierte BR ersetzt. Bis zur Quantifizierung wurden die Proben bei  $-20 \text{ °C}$  gelagert. Mit einer Trypanblaulösung 0,4 %, die tote Zellen anfärbt, wurde die Vitalität des cornealen Gewebes überprüft. Unmittelbar nach der Isolierung waren punktuelle Färbungen erkennbar, die nach den Permeationsversuchen vergrößert waren. Als Positiv- und Negativkontrolle wurde frisch isolierte und mit Triton-X-100 Lösung 1 % behandelte Cornea eingesetzt.

Bicarbonat-Ringerlösung pH 7,4

BR I: NaCl 7,14 g + KCl 0,38 g + 0,526 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$  +  $\text{NaHCO}_3$  2,29 g Wasser ad 500,0 mL,

BR II: 0,154 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$  + 0,2 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$  + Glucose 0,92 g, Wasser ad 500,0 mL

BR I und BR II wurden getrennt hergestellt, gemischt und auf pH 7,4 mit 0,1 M HCl oder 0,1 M NaOH eingestellt.

## 6.8 Immunoassay zur Bestimmung von Everolimus

### INNOFLUOR® CERTICAN® Assay-System

Zur Quantifizierung von Everolimus wurde ein Innofluor® Certican® Assay verwendet. Dieser Fluoreszenz-Polarisations Immuno-Assay (FPIA) basiert auf dem Prinzip der kompetitiven Bindung. Das Antigen (AG) in der Probe konkurriert mit dem Fluorescein-markierten Antigen um eine feste Anzahl von Antikörperbindungsstellen. Wird das kleine, rasch in der Lösung rotierende Fluorescein-markierte Antigen mit linear polarisiertem Licht angeregt, so wird das emittierte Licht signifikant depolarisiert. Die Rotation verlangsamt sich bei Bindung des Fluorescein-markierten Antigens an einen Antikörper und das linear polarisierte Anregungslicht bleibt bei der Ausstrahlung in hohem Maße polarisiert. Erhöhte Mengen von nicht markiertem Antigen in der Probe resultieren in einer verminderten Bindung von Fluorescein-markiertem Antigen an Antikörper und einer verminderten Polarisation des von der Probe emittierten Lichtes. Mittels Vergleich des Polarisationswertes einer unbekannt Probe mit den Polarisationswerten einer auf dem FPIA-Analysegerät erstellten Kalibrierungskurve kann die Antigen-Konzentration ermittelt werden. Die Probe wird vor Beginn der automatisierten Pipettiersequenz manuell mit einem Proteinfällungsreagenz extrahiert und zentrifugiert. Der Überstand wird in die Probenküvette pipettiert und die Antikörper- und Tracerreagenzien werden in das System geladen. Die Akzeptabilität der Kalibrierkurve wird durch die Messung der Kontrollen in verschiedenen Konzentrationsstufen untersucht. Dabei wird auch geprüft, ob sich der Polarisationsfehler (PERR) und der mittlere quadratische Fehler (RMSE) der Kalibrierungskurve innerhalb der festgelegten Grenzen befinden.

## 6.9 Viskosität

Die Viskosität ( $\eta$ ) ist definiert als die um den inneren Reibungswiderstand zu überwindene notwendige Kraft. Zur Bestimmung der Viskosität idealviskoser oder Newtonscher Flüssigkeiten schreibt das Europäische Arzneibuch 6.0 eine Methode mit einem Kapillarviskosimeter vor, die auf der Messung der Strömungsgeschwindigkeit in dünnen Rohren und Kapillaren beruht. Die Viskosität ist dabei umgekehrt proportional der Fließgeschwindigkeit. Die auftretende laminare Strömung folgt dem Hagen-Poiseuille-Gesetz:

$$\frac{v}{t} = \frac{p \pi r^4}{8 \eta l}$$

Durch Umformen lässt sich die Gleichung auch wie folgt darstellen:

$$\eta = k \rho t$$

k = Gerätekonstante

$\rho$  = Dichte

t = Durchflußzeit

Die Gerätekonstante ist meist den Herstellerunterlagen zu entnehmen. Die zur Berechnung der Viskosität erforderliche relative Dichte wurde mit einem Densitometer DMA 38 der Firma Anton Paar GmbH, Graz, Österreich gemessen. Das gebräuchlichste Kapillarviskosimeter ist das Ubbelohde-Viskosimeter. In dieser Arbeit wurde die Viskosität mit einem Mikroviskosimeter (benötigtes Volumen ca. 3 ml) nach Ubbelohde bestimmt (DIN 51562:2). Das Europäische Arzneibuch schreibt vor, dass die Prüfung nur dann gültig ist, wenn zwei aufeinanderfolgende Messungen um höchstens 1 % abweichen. Gemessen wurden die Durchflußzeiten bei 25 und 50 °C (n = 6).

## **7 Ergebnisse und Diskussionen**

### **7.1 Auswahl der Ölphase für Phytosphingosin**

Das in dieser Arbeit zur Erzeugung der positiven Ladung verwendete Phytosphingosin (PS) stellt eine ausserordentliche Problemsubstanz bezüglich der Löslichkeit und somit eine Herausforderung dar. Als Bestandteil der Ceramide ist PS extrem schlecht löslich. Deshalb wurde eine Reihe von Ölkomponenten untersucht, um diese Substanz zu lösen. Dafür wurde eine ausreichende Menge an PS in Eutanol<sup>®</sup> G, Tegosoft<sup>®</sup> CT, Tegosoft<sup>®</sup> OP, Tegosoft<sup>®</sup> DEC und Miglyol<sup>®</sup> bei Temperaturen deutlich über 100 °C gelöst und zum Abkühlen stengelassen. PS war zwar in allen Ölkomponenten löslich, blieb jedoch beim Abkühlen auf 20 °C nur in Eutanol<sup>®</sup> G gelöst. In allen anderen Ölkomponenten kristallisierte PS bereits deutlich oberhalb von 70 °C aus.

Die Untersuchungen bezüglich der Rekristallisation wurden nach Zugabe von vier verschiedenen Lipoiden (Lipoid E 80<sup>®</sup>, Lipoid S 75-3N, Lipoid S 100-3 und Lipoid S 80-3) wiederholt, brachte aber keine Verbesserung.

### **7.2 Auswahl der Ölphase für Prednicarbat**

Das Europäische Arzneibuch gibt an, dass Prednicarbat praktisch unlöslich in Wasser ist. Mit einer ausreichenden Menge an Prednicarbat wurde überprüft, ob der Arzneistoff in den möglichen Ölkomponenten löslich ist. Prednicarbat war in allen getesteten Ölen löslich und blieb auch nach Lagerung von 7 Tagen bei 25 °C in Lösung.

Somit war der limitierende Faktor für die Herstellung der Nanoemulsionen einzig die Löslichkeit des zur positiven Aufladung verwendeten Phytosphingosins.

## 7.2.1 Löslichkeit schwerlöslicher Immunsuppressiva

### Löslichkeit von Prednicarbat in Eutanol G

10 mL Eutanol G wurden mit Prednicarbat gesättigt und 24 Stunden mit 120 Bewegungen/Minute bei 25 °C geschüttelt. Anschließend wurde 30 min bei 14000 U/min zentrifugiert. 50 µL des Überstandes wurden abgenommen, mit Methanol auf 1,0 mL ergänzt und der Gehalt an Prednicarbat per HPLC bestimmt (n = 6).

Die Löslichkeit von Prednicarbat in Eutanol G betrug 12,91 mg/mL

### Löslichkeit von Everolimus bzw. Sirolimus in Eutanol G

Die Wasserlöslichkeit von Sirolimus beträgt 2,6 µg/mL (Simamora et al. 2001). Die Löslichkeit sollte für eine angemessene Bioverfügbarkeit entsprechend angemessen hoch sein. Für die Untersuchungen bezüglich der Nanoemulsionen erfolgte die Orientierung an der Konzentration bereits zugelassener topischer Calcineurin-Inhibitoren. 0,1 % Everolimus und Sirolimus waren in Eutanol G löslich und blieben auch nach Lagerung von 7 Tagen bei 25 °C in Lösung.

10 mL Eutanol G wurden mit Everolimus bzw. Sirolimus gesättigt und 24 h bei 120 Bewegungen/Minute bei 25 °C geschüttelt. Anschließend wurde 30 min bei 14000 U/min zentrifugiert, 50 µL des Überstandes wurden abgenommen, mit Methanol auf 1,0 mL ergänzt und die Menge per HPLC bestimmt (n = 6).

Die Löslichkeit von Everolimus in Eutanol G beträgt 36,8 mg/mL und von Sirolimus 8,36 mg/mL.

### 7.3 Viskosität

Das Sicherheitsdatenblatt der Firma Caelo bezüglich Eutanol G<sup>®</sup> (EG) beziffert die dynamische Viskosität auf 60 mPa s, eine eigene Messung zur Überprüfung ergab einen Wert von 59 mPa s. Die Dichte von  $0,84 \frac{\text{g}}{\text{cm}^{-3}}$  laut Hersteller wurde durch eine Messung bestätigt.

Die Zusammensetzung der Ölphasen ist identisch mit denen der Endformulierung in den fertigen Nanoemulsionen und lieferte nach Messung die in der Tab. 17 aufgeführten Viskositäten.

Tab. 17: Die dynamischen Viskositäten der verschiedenen Ölphasen gemessen mit Kapillarviskosimeter nach Ubbelohde bei 25 und 50 °C ( $\bar{x} \pm s$ ; n = 6).

Formulierung	Viskosität [mPa s]	
	25 °C	50 °C
In Eutanol G gelöst		
<i>PS</i>	71,56 ± 0,02	22,27 ± 0,06
<i>PSPC</i>	74,55 ± 0,14	22,83 ± 0,06
<i>MSPC</i>	63,97 ± 0,14	20,13 ± 0,05
<i>PSEv</i>	71,85 ± 0,08	22,23 ± 0,03
<i>PSSir</i>	72,40 ± 0,07	22,74 ± 0,06

Abkürzungen: PS = Phytosphingosin, PSPC = PS und Prednicarbat, MSPC = Myristinsäure und Prednicarbat, PSEv = PS und Everolimus, PSSir = PS und Sirolimus

Verglichen mit reinem EG nimmt die Viskosität zu, wenn zusätzliche Bestandteile eingearbeitet werden. Die hinzugekommenen Substanzen erhöhen die innere Reibung und damit die Kraft, die notwendig ist um den inneren Reibungswiderstand zu überwinden. Weiterhin spielen die Affinitäten bzw. Lösungseigenschaften dieser gelösten Verbindungen eine wichtige Rolle. Bemerkenswert ist, dass die zur Erzeugung der negativen Ladung in den fertigen Nanoemulsion verwendete Myristinsäure die Viskosität nicht so stark erhöht wie PS. Durchweg ist zu erkennen, dass bei 50 °C die Viskosität deutlich abnimmt, was auf den höheren Energieeintrag zurückzuführen ist. Die höhere Energie sorgt dafür, dass sich die ungeordneten Partikel in einer Flüssigkeit schneller bewegen und so weniger Reibung verursachen.

## **7.4 Prednicarbat-Nanoemulsion**

### **7.4.1 Hochdruckhomogenisation mit LAB 40**

Die Herstellung chemisch und physikalisch stabiler Nanoemulsionen zur dermalen Applikation von Prednicarbat, Sirolimus und Everolimus war eines der Ziele dieser Arbeit. Das Hauptproblem bei der Herstellung der Nanoemulsionen per Hochdruckhomogenisation liegt darin, die Bedingungen so zu wählen, dass primär eine ausreichende physikalische Stabilität über einen langen Zeitraum möglich ist. Welche Auswirkungen die Homogenisationsparameter, wie z. B. Temperatur, Druck und Zyklen auf die chemische Stabilität haben, wird in dieser Arbeit ebenfalls untersucht. Ein Vorteil von Nanopartikeln, nämlich der Schutz empfindlicher Arzneistoffe soll damit auch belegt werden. Prednicarbat als ein Doppelster ist für diesen Zweck ein guter Kandidat, zumal über dessen chemische Stabilität in Nanopartikeln bisher nicht in der Literatur beschrieben ist.

#### **6.4.1.1 Prozessparameter**

Zur Untersuchung und Bestimmung der bestmöglichen Bedingungen für die endgültige Formulierung wurden folgende ausgewählte Parameter untersucht:

- Homogenisationstemperatur (25 und 50 °C)
- Homogenisationsdruck (300, 500 und 700 bar)
- Anzahl der Homogenisationszyklen (3, 5, 8 und 10 Zyklen für den LAB 40) bzw. Homogenisationsdauer (1-10 min für den EmulsiFlex C5)

Wie in den Abb. 16 und 17 dargestellt, zeigen die Ergebnisse eindeutig, dass die Homogenisationstemperatur einen großen Einfluß auf die mittlere Partikelgröße (PCS), die Breite der Verteilung (PI) und die Partikelgröße (Größenverteilung) (LD) hat.



## Homogenisationstemperaturen

### 25 °C

Bei einer Homogenisation mit 25 °C und 3 Zyklen führt eine Erhöhung des Druckes von 300 bar auf 500 bar zu einer Verkleinerung der mittleren Partikelgröße von  $228 \pm 4$  nm auf  $189 \pm 3$  nm. Der PI wird dabei von  $0,16 \pm 0,05$  auf  $0,13 \pm 0,05$  reduziert. Eine weitere Steigerung auf 700 bar führt zu  $168 \pm 3$  nm kleinen Partikeln, mit einem unveränderten PI von  $0,13 \pm 0,03$  (Abb. 16). Eine Druckerhöhung von 300 auf 500 bar führt bei einer Anzahl von 10 Zyklen zu einer Verkleinerung der mittleren Partikelgröße von anfänglichen  $205 \pm 4$  nm zunächst auf  $155 \pm 2$  nm. Der PI von  $0,19 \pm 0,03$  sinkt dabei auf  $0,11 \pm 0,06$ . Eine weitere Erhöhung des Druckes auf 700 bar führt lediglich zu einer geringen Verkleinerung sowohl der Partikelgröße ( $150 \pm 3$  nm) als auch des PI ( $0,09 \pm 0,04$ ). Eine Druckerhöhung von 300 bar auf 500 bar führt unabhängig von der Anzahl der Zyklen zu einer deutlichen Reduzierung der mittleren Partikelgröße, eine weitere Druckerhöhung auf 700 bar führt zu einer weiteren Reduktion der Partikelgröße, die aber mit steigender Anzahl der Zyklen abgeschwächt wird. Die Differenz der Reduktion der mittleren Partikelgröße von  $155 \pm 2$  nm auf  $150 \pm 3$  nm durch eine Druckerhöhung von 500 auf 700 bar bei 3 Zyklen ist nicht signifikant. Bei Betrachtung der PI-Werte kann man feststellen, dass das Ausmaß der Reduktion mit steigender Anzahl der Zyklen stärker ausgeprägt ist. Die Ergebnisse lassen sich mit dem Prinzip der Hochdruckhomogenisation gut erklären. Nach der Bernoulli-Gleichung ist die Summe aus statischem Druck und dynamischem Druck konstant. Für eine Homogenisation bei 25 °C mit einer niedrigen Anzahl an Zyklen ist ein hoher Druck von 700 bar erforderlich, um die Partikel zu zerkleinern. Dass die Viskosität der Ölphase bei 25 °C viel höher ist als bei 50 °C ist dabei auch von entscheidender Bedeutung (Tab. 17). Bei einer hohen Anzahl an Zyklen hingegen scheint ein Druck von 500 bar optimal zu sein, um möglichst kleine Partikel zu erhalten. Die optimalen Bedingungen ergeben sich als Summe aus der Homogenisationstemperatur, dem Homogenisationsdruck und der Anzahl der Homogenisationszyklen. Mit 25 °C wurde die Nanoemulsion mit der kleinsten mittleren Partikelgröße ( $144 \pm 2$  nm) und der engsten Verteilung ( $0,09 \pm 0,05$ ) mit 5 Zyklen und 700 bar erhalten. Aus Abb. 17 geht hervor, dass die LD-Partikelgröße durch eine Druckerhöhung von 300 auf 500 bar mit steigender Anzahl der Zyklen immer stärker verringert wird. Bei 3 Zyklen wird die LD-Partikelgröße durch die Druckerhöhung von  $449 \pm 65$  nm auf  $298 \pm 1$  nm verringert, bei 10 Zyklen von  $441 \pm 9$  nm auf  $234 \pm 2$  nm. Die gleiche Tendenz lässt sich auch bei der

mittleren Partikelgröße feststellen. Eine weitere Erhöhung des Homogenisationsdruckes auf 700 bar bewirkt mit 3, 5 und 8 Zyklen noch eine signifikante Verkleinerung, aber mit 10 Zyklen kaum noch eine weitere Verbesserung (Reduktion von  $234 \pm 2$  nm auf  $223 \pm 3$  nm).

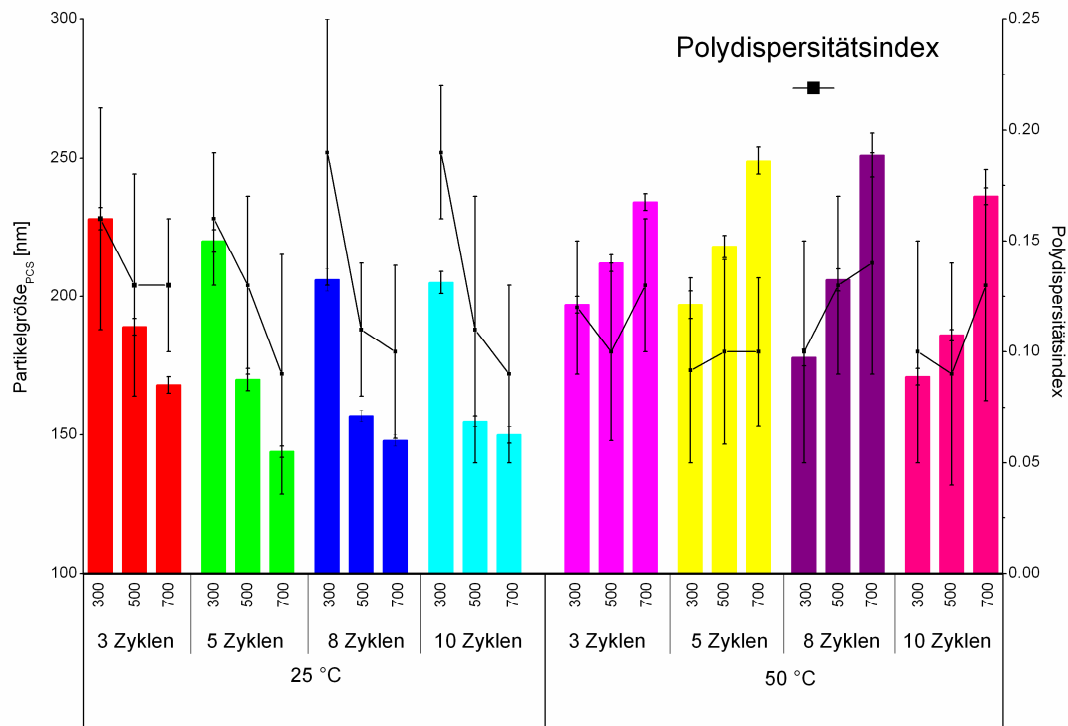


Abb. 16: Einfluss der Homogenisationsparameter Temperatur (25 und 50 °C), Druck (300, 500 und 700 bar) und der Anzahl der Zyklen (3, 5, 8 und 10) auf die mittlere Partikelgröße (dargestellt durch die farbigen Balken, bestimmt mittels Photonenkorrelationsspektroskopie, PCS) und den Polydispersitätsindex der Prednicarbat-haltigen positiv geladenen Nanoemulsion ( $\bar{x} \pm s$ ; n = 5).

## 50 °C

Bei einer Homogenisationstemperatur von 50 °C ist der Einfluss des Homogenisationsdruckes und der Anzahl der Zyklen auf die mittlere Partikelgröße und die LD-Partikelgröße genau entgegengesetzt. Hier sind schon 300 bar ausreichend, unabhängig von der Anzahl der Homogenisationszyklen, um die kleinsten Partikel zu erhalten (Abb. 16). Bei 3 Zyklen und 300 bar führt eine Erhöhung des Druckes auf 500 bar zu einer Zunahme der mittleren Partikelgröße von  $197 \pm 3$  nm auf  $212 \pm 3$  nm, und bei weiterer Druckerhöhung auf 700 bar beträgt die mittlere Teilchengröße sogar  $234 \pm 3$  nm. Wahrscheinlich entstehen zunächst kleine Partikel. Da aber der optimale Energieeintrag um stabile Partikel zu erhalten überschritten wird (Akkar und Müller 2003b) koaleszieren diese anfänglich kleinen Partikel zu größeren. Die gleiche Tendenz der Zunahme der mittleren Partikelgröße bei einer Druckerhöhung ist durchweg auch bei 5, 8 und 10 Zyklen zu beobachten. Mit 300 bar führt

eine Erhöhung der Zyklenzahl von 3 auf 10 zu einer Abnahme der mittleren Partikelgröße von  $197 \pm 3$  nm auf  $171 \pm 3$  nm. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Drucksteigerung zu größeren Partikeln führt. Beim Polydispersitätsindex ist eine eindeutige Tendenz wie bei 25 °C nicht feststellbar. Eine Gemeinsamkeit besteht aber darin, dass durchweg bei 700 bar, unabhängig von der Anzahl der Zyklen, immer der größte PI-Wert und damit die breiteste Verteilung zu verzeichnen ist. Trotzdem ist aber festzuhalten, dass sämtliche PI-Werte  $< 0,2$  sind. Bei der LD-Partikelgröße ist ebenfalls eine Zunahme mit steigendem Druck unabhängig von der Anzahl der Zyklen zu erkennen (Abb. 17). Eine Zunahme des Homogenisationsdruckes von 300 bar auf 500 bar bei 3 Zyklen führt dazu, dass der LD-Durchmesser von  $295 \pm 2$  nm auf  $336 \pm 1$  nm zunimmt. Dargestellt ist in dieser Arbeit durchweg die LD99-Partikelgröße. LD99 bedeutet, dass 99% der gemessenen Probe einen kleineren Durchmesser haben, als der angegebene Wert. Eine weitere Zunahme des Druckes führt zu größeren Partikeln ( $434 \pm 8$  nm). Bei 10 Zyklen hat eine Druckerhöhung von 300 auf 500 bar zur Folge, dass der LD99-Durchmesser von 257 auf 279 nm zunimmt. Bei gleichbleibendem Druck von 300 bar führt eine Erhöhung der Anzahl an Zyklen zu einer kleineren LD-Partikelgröße. Bei 500 und 700 bar ist diese Tendenz nicht durchweg zu beobachten. Die kleinste mittlere Partikelgröße ( $171 \pm 3$  nm) mit der kleinsten LD-Partikelgröße (257 nm) konnten mit 300 bar und 10 Zyklen erreicht werden. Um die engste Verteilung (PI  $0,09 \pm 0,05$ ) zu erhalten, waren allerdings 500 bar erforderlich. Bei 300 bar betrug der PI  $0,1 \pm 0,05$ .

Insgesamt lässt sich folgende Aussage machen: Eine Erhöhung der Anzahl der Zyklen hat eine Verkleinerung der mittleren Partikelgröße zur Folge, nicht aber eine Erhöhung des Druckes. Der optimale Druck für eine Homogenisation bei 50 °C beträgt 300 bar, ein höherer Druck führt zur Überschreitung des optimalen Energieeintrages in das System (Akkar und Müller 2003b). Dabei nehmen die Grenzfläche und damit auch die Grenzflächenenergie stark zu. Als Folge dieser Erhöhung der Grenzflächenenergie koaleszieren die vermutlich anfänglich kleinen Emulsionströpfchen bei einem weiteren Energieeintrag in das System, verursacht durch eine Druckerhöhung, wenn diese Grenzfläche nicht von Emulgator-Molekülen besetzt und damit stabilisiert wird. Das Resultat einer nicht ausreichenden Stabilisierung ist wie in diesem Fall u.a. eine Zunahme der mittleren Partikelgröße. Dieses Phänomen, das eine Erhöhung des Homogenisationsdrucks zu einer Erhöhung der mittleren Partikelgröße führt, ist beispielsweise von Trotta et al. 2002 beschrieben worden.

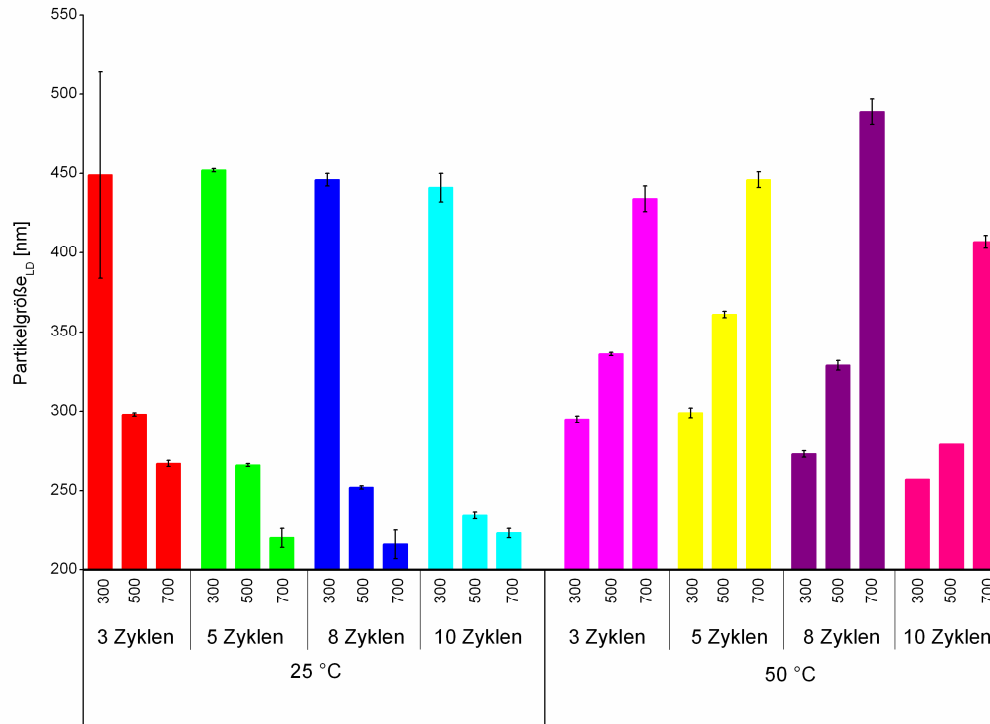


Abb. 17: Einfluss der Homogenisationsparameter Temperatur (25 und 50 °C), Druck (300, 500 und 700 bar) und der Anzahl der Zyklen (3, 5, 8 und 10) auf die Partikelgröße LD99 (mittels Laserdiffraktometrie, LD) der Prednicarbat-haltigen positiv geladenen Nanoemulsion ( $\bar{x} \pm s$ ; n = 5)

Wie schon beschrieben führt bei 25 °C eine Homogenisation mit steigendem Druck zu kleineren Partikeln mit kleinerem PI, während nach der Produktion bei 50 °C die gegenteilige Tendenz beobachtet wurde, nämlich dass die Partikel und der PI mit steigendem Homogenisationsdruck größer wurden. Dieses anfänglich widersprüchlich scheinende Phänomen geht aber einher mit dem Prinzip der Hochdruckhomogenisation. Betrachtet man z.B. die Hochdruckhomogenisation in der Milchindustrie, erfolgt die Homogenisation immer in einem zweistufigen Prozess. Der erste Homogenisationsschritt dient dabei der Minimierung der Fetttropfen und der zweite Schritt zur Abtrennung der Agglomerate, die während des ersten Homogenisationsganges entstehen. Die Agglomeration oder z.T. auch die Koaleszenz der Tröpfchen nach dem ersten Schritt ist das Resultat einer ungenügenden Besetzung der neu entstandenen Oberfläche mit dem Emulgator, weil auch der Transport der Emulgatormoleküle zur neuen Oberfläche eine gewisse Zeit erfordert. Kurz nach der Homogenisation ist die neu gebildete Emulsion aufgrund des hohen Energieeintrages und der noch nicht vollständig besetzten Oberfläche der Tröpfchen anfällig für Agglomeration und Koaleszenz. In einem zweistufigen Homogenisationsprozess wäre die Zeit zwischen beiden Schritten ausreichend, damit der Emulgator in die Grenzfläche diffundiert, die Grenzflächenspannung senkt und damit die Emulsionströpfchen stabilisiert. Der zweite Homogenisationsschritt wird dann bei

einem geringeren Druck durchgeführt (ca. 15 % des Druckes vom ersten Schritt, Jahnke 2001). Dieser Druck reicht aus, um Agglomerate abzutrennen, nicht aber um die Emulsionstropfen weiter zu zerkleinern. Wenn man wie bei dieser Arbeit eine einstufige Homogenisation durchführt, können die Emulsionstropfen kurz nach der Homogenisation zur Reagglomeration und zur Rekoaleszenz neigen. Die Stabilität einer Emulsion hängt u.a. von der Rigidität des gebildeten Emulgatorfilms ab. Damit könnte auch die gesteigerte Instabilität erklärt werden, die bei der Steigerung der Homogenisationstemperatur von 25 auf 50 °C beobachtet wurde. Die bei 25 °C produzierte Emulsion, genauer die Ölphase, hat eine höhere Viskosität als die bei 50 °C (Tab. 17). Die mit steigendem Druck ebenfalls steigende Partikelgröße der

Emulsionströpfchen bei 50 °C kann damit begründet werden, dass dieser erhöhte Druck einen erhöhten Energieeintrag zur Folge hat. Die Summe aus der erhöhten Temperatur und den erhöhten Drücken führt zu einer Überschreitung des optimalen Energieeintrages (Akkar und Müller 2003b). Im Falle der bei 25 °C produzierten Nanoemulsion überwiegt die Stabilität des Emulgatorfilms die Destabilisierung und verhindert so eine Rekoaleszenz nach der Homogenisation (Trotta et al. 2002).

Die Bewertung der physikalischen Stabilität erfolgt als Gesamtbild durch Messung der mittleren Partikelgröße über PCS, der Partikelgröße per LD und die Angabe über die Breite der Verteilung als Polydispersitätsindex. Natürlich spielt auch das Zetapotenzial eine ganz entscheidende Rolle bei der physikalischen Stabilität. Da die genaue Zusammensetzung der Nanoemulsion noch untersucht wird und speziell der Anteil des Phytosphingosins das Zetapotenzial entscheidend beeinflusst, wurde bisher auf die Messung des Zetapoteinzials verzichtet.

### **Partikelcharakterisierung nach Lagerung**

Um abschließend die optimalen Homogenisationsbedingungen festzulegen wurde die Lagerstabilität der Nanoemulsionen nach 120 Tagen Lagerung bei 25 und 40 °C bezüglich der mittleren Partikelgröße (mittels PCS) (Abb. 18), der LD-Partikelgröße (LD99) (Abb. 20) und des PI (Abb. 19) als Maß für die Breite der Verteilung untersucht. Dabei zeigte es sich, dass sechs Formulierungen in die engere Auswahl kamen (Tab. 18), als geeignet eingestuft zu werden. Da aber exakte Prozessparameter zur weiteren Untersuchung der Rezepturzusammensetzung benötigt werden, wurde schließlich der Gehalt an Prednicarbat per HPLC überprüft, um die Entscheidung zu erleichtern.

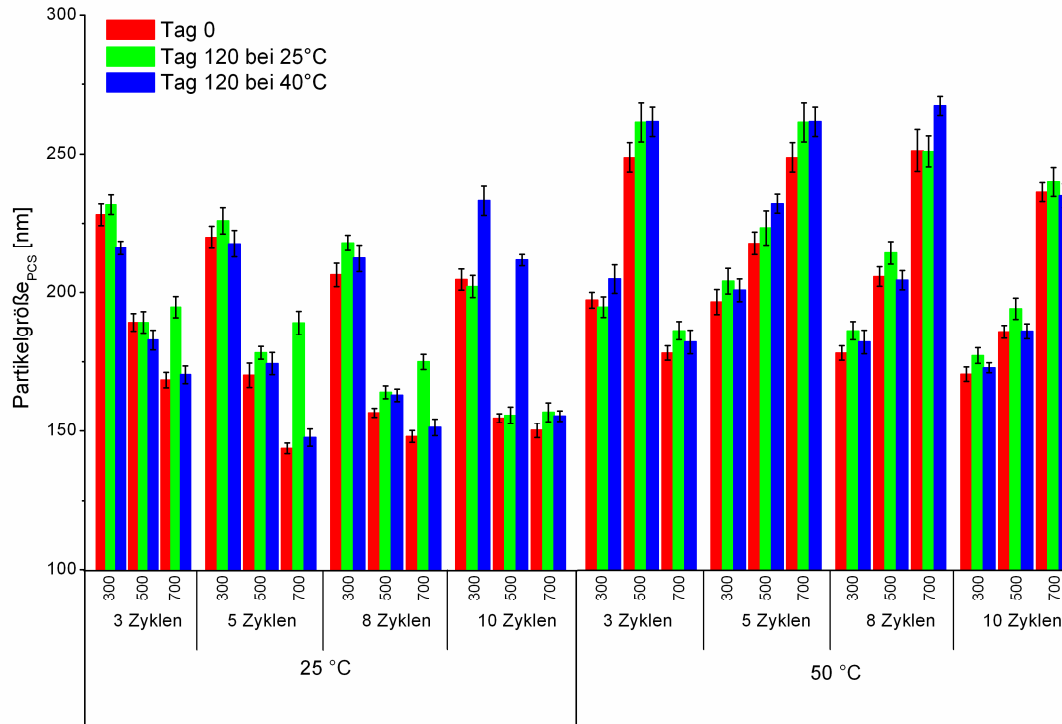


Abb. 18: Einfluss der Homogenisationsparameter Temperatur (25 und 50 °C), Druck (300, 500 und 700 bar) und der Anzahl der Zyklen (3, 5, 8 und 10) auf die Stabilität der mittleren Partikelgröße (mittels Photonenkorrelationsspektroskopie, PCS) nach Lagerung der Prednicarbat-haltigen positiv geladenen Nanoemulsion ( $\bar{x} \pm s$ ; n = 5).

Als erwünschte Auswahlkriterien für die optimalen Prozessparameter wurden festgelegt:

- stabile, kleine mittlere Partikelgröße < 200 nm
- sehr enge Verteilung der Partikel, d.h. PI von etwa 0,1
- stabile LD-Partikelgröße von < 300 nm

Bei den meisten Formulierungen sind nach Lagerung keine signifikanten Veränderungen der mittleren Partikelgröße aufgetreten (Abb. 18). Die Betrachtung des PI zeigt ähnlich wie bei der mittleren Partikelgröße, dass die meisten Formulierungen auch nach der Lagerung stabil sind. Die verhältnismäßig stärksten Veränderungen sind bei der LD-Partikelgröße zu verzeichnen. Insgesamt sind diese Änderungen jedoch untergeordnet.

Es ist auffällig, dass bei 18 der 24 untersuchten Formulierungen die mittlere Partikelgröße nach Lagerung bei 40 °C kleiner ist nach Lagerung bei 25 °C. Die erhöhte Temperatur muss sich also positiv auf die physikalische Stabilität auswirken. Der Grund liegt in der allgemeinen besseren Löslichkeit der eingesetzten Komponenten bei erhöhten Temperaturen. Es ist auch festzuhalten, dass die meisten Formulierungen auch Lagerung größtenteils keine physikalischen Instabilitäten zeigen.

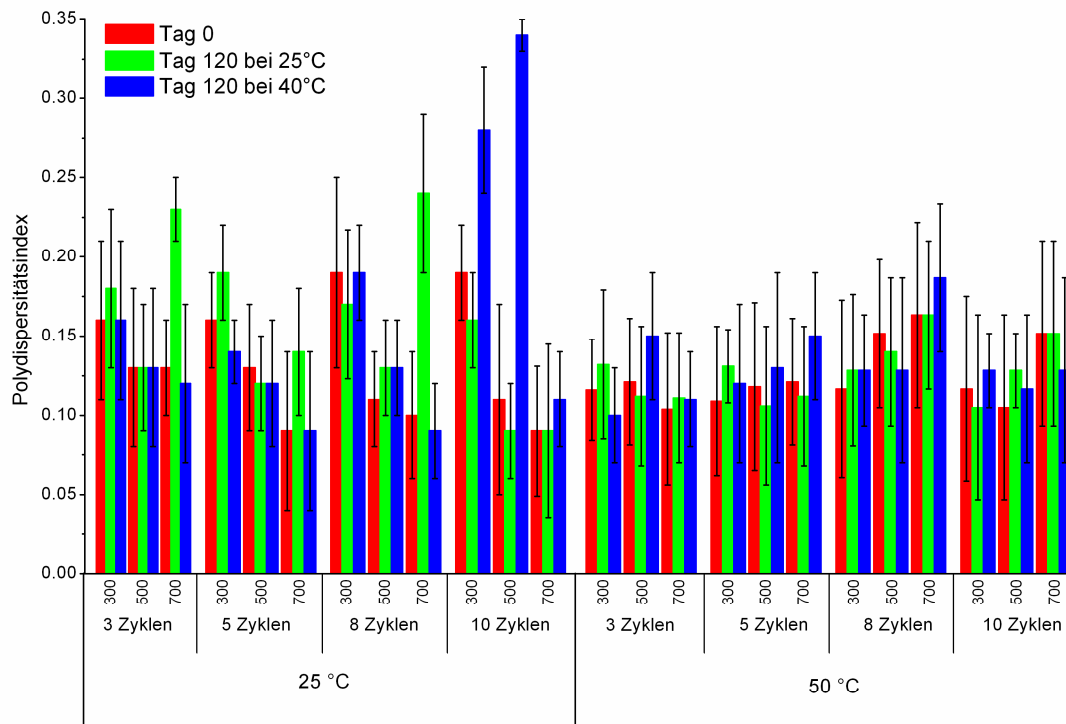


Abb. 19: Einfluss der Homogenisationsparameter Temperatur (25 und 50 °C), Druck (300, 500 und 700 bar) und der Anzahl der Zyklen (3, 5, 8 und 10) auf die Stabilität der Polydispersitätsindices nach Lagerung der Prednicarbat-haltigen positiv geladenen Nanoemulsion ( $\bar{X} \pm s$ ; n = 5).

Die mittlere Partikelgröße und der Polydispersitätsindex mehrerer Formulierungen sind am Tag der Herstellung sehr ähnlich. Nach Lagerung von 120 Tagen bei 25 und 40 °C wird aber deutlich, dass die meisten Formulierungen instabil sind. Da mehr als eine Formulierung die erforderlichen Auswahlkriterien zur Festlegung der optimalen Prozessparameter erfüllten, musste letztlich der Prednicarbat-Gehalt herangezogen werden, um eine Entscheidung über die optimalen Prozessparameter zu treffen.

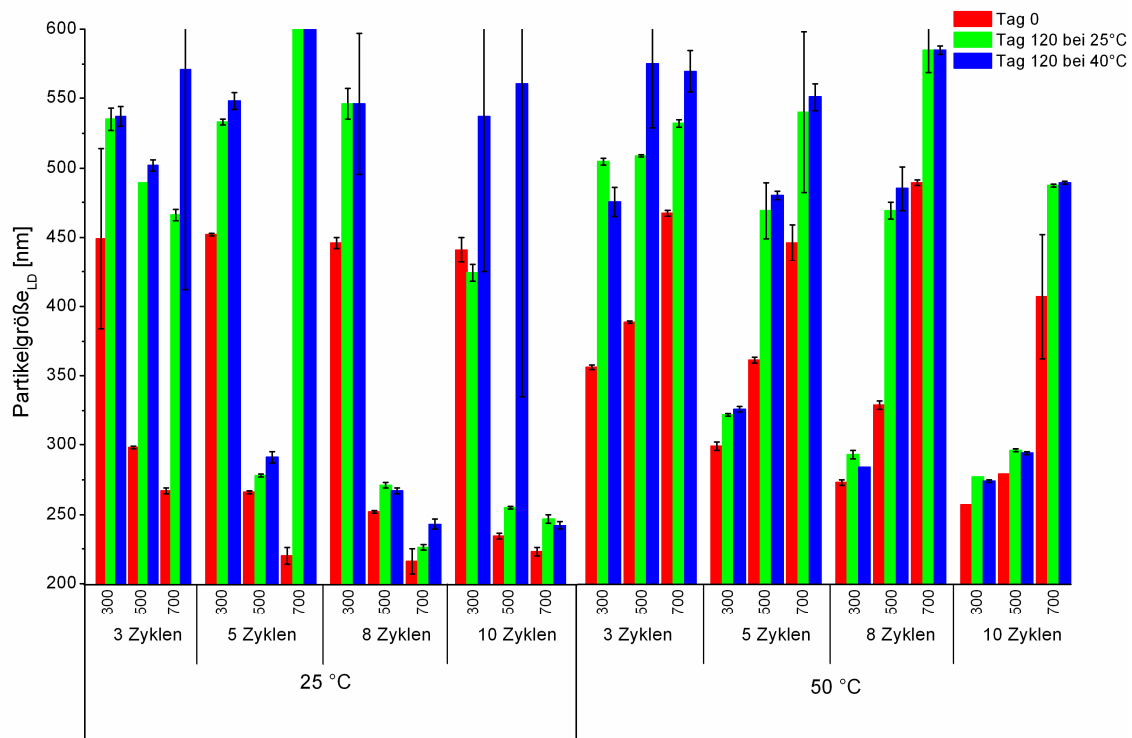


Abb. 20: Einfluss der Homogenisationsparameter Temperatur (25 und 50 °C), Druck (300, 500 und 700 bar) und der Anzahl der Zyklen (3, 5, 8 und 10) auf die Stabilität der Partikelgröße (mittels Laserdiffraktometrie, LD) nach Lagerung der Prednicarbat-haltigen positiv geladenen Nanoemulsion ( $\bar{x} \pm s$ ; n = 5).

Die insgesamt sechs Formulierungen (Tab. 18) wurden per HPLC auf den Gehalt an Prednicarbat untersucht. Dabei zeigte es sich, dass der Gehalt an Prednicarbat in den Formulierungen unterschiedlich war. Die Formulierung mit dem höchsten Gehalt war die, die bei **50 °C mit 10 Zyklen und 300 bar** homogenisiert wurde.

Der Arzneistoffgehalt der besten Formulierungen aus dem Teil der Optimierung der Prozessparameter wurde untersucht. Interessant war dabei, dass mit steigender Anzahl an Homogenisationszyklen und –temperatur auch der Prednicarbatgehalt steigt. Dieses Ergebnis des steigenden Gehalts mit erhöhten Temperaturen ist damit zu erklären, dass die Löslichkeit temperaturabhängig ist und bei Temperaturerhöhung ebenfalls steigt (Levy und Benita 1989). Eine andere mögliche Ursache könnte eine Anreicherung des Arzneistoffs in oder in der Nähe der Emulgatorschicht sein, wie schon für Amphotericin B postuliert (Lance et al. 1995). Prednicarbat hat als Grundgerüst ein Pregnan-System, das auch in Cholesterol, einem klassischen Emulgator, vorliegt. Daher liegt es nahe, dass auch Prednicarbat mit seinem lipophilen Pregnangrundgerüst und den hydrophilen Esterstrukturen zumindest teilweise zwischen die wässrige und die lipophile Schicht, also in die Lecithin-Grenzschicht, eingelagert wird. Die Anordnung des Prednicarbats wird dabei offensichtlich von den Parametern der Homogenisation, besonders von der Temperatur beeinflusst. Diese Ergebnisse



zeigen, dass die optimale Formulierung, abhängig von den Prozessparametern der Homogenisation, nicht nur durch die kleinsten Partikel mit der bestmöglichen Stabilität charakterisiert wird, sondern auch durch einen möglichst hohen Arzneistoffgehalt.

Tab. 18: Eine Übersicht der mittleren Partikelgrößen und der PI-Werte der stabilsten Nanoemulsionen und ein Vergleich der Werte nach Lagerung bei 25 und 40 °C.

	<b>25 °C, 5 Zyklen, 500 bar</b>	<b>25 °C, 8 Zyklen, 500 bar</b>	<b>25 °C 10 Zyklen, 700 bar</b>	<b>50 °C 8 Zyklen, 300 bar</b>	<b>50 °C 10 Zyklen, 300 bar</b>	<b>50 °C 10 Zyklen, 500 bar</b>
PCS ± s	170 ± 4 nm	157 ± 2 nm	150 ± 3 nm	178 ± 3 nm	171 ± 3 nm	186 ± 2 nm
PCS* ± s	174 ± 4 nm	163 ± 2 nm	157 ± 3 nm	182 ± 3 nm	173 ± 2 nm	186 ± 3 nm
PI ± s	0,13 ± 0,04	0,11 ± 0,03	0,09 ± 0,04	0,10 ± 0,05	0,10 ± 0,05	0,09 ± 0,05
PI* ± s	0,12 ± 0,04	0,13 ± 0,03	0,09 ± 0,06	0,11 ± 0,03	0,11 ± 0,02	0,10 ± 0,04
Gehalt* in %	47	71	78	83	84	83
Gehalt** in %	75	81	90	106	107	103

\* = nach Lagerung von 120 Tagen bei 40 °C

\*\* = nach Lagerung von 120 Tagen bei 25 °C

Da der Gehalt der Nanoemulsionen zur Optimierung der Prozessparameter am Tag der Herstellung nicht untersucht wurde, wurden diese sechs Formulierungen noch mal homogenisiert und der Gehalt über einen längeren Zeitraum untersucht. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die optimalen Herstellungsparameter temperaturabhängig sind. Für eine Homogenisation bei einer niedrigen Temperatur von beispielsweise 25 °C werden vergleichsweise höhere Drücke (500 bzw. 700 bar) benötigt, während bei höheren Temperaturen (50 °C) ein niedriger Druck (300 bar) ausreicht um kleine Partikel mit einer engen Verteilung zu erhalten.

### 7.4.1.2 Rezepturzusammensetzung

Bei der Optimierung der Rezepturzusammensetzung wurden die folgenden Komponenten bzw. deren Konzentrationen untersucht:

- Phytosphingosin (0,3 %-0,7 %)
- Ölphase Eutanol<sup>®</sup> G (10 %-20 %)
- Verschiedene Lipophile Emulgatoren (2 %)
- Lipophiler Emulgator Lipoid E80<sup>®</sup> (0,5 %- 3 %)
- Hydrophiler Emulgator Tween 80<sup>®</sup> (0,5 %- 3 %)

Auf eine Untersuchung bezüglich des pH-Wert-Einflusses wurde verzichtet, da die Formulierungen auf einen pH-Wert von ca. 5,5 eingestellt wurden, was als verträglich für die Haut eingestuft ist.

#### Phytosphingosin-Konzentration

Eine Erhöhung der Phytosphingosin-Konzentration von 0,3 auf 0,7 % führt zu einer geringen Erhöhung des mittleren Partikeldurchmessers von  $147 \pm 1$  nm auf  $159 \pm 4$  nm (Abb. 21). Diese Beobachtung der mäßig steigenden mittleren Partikelgröße mit steigendem Anteil an Substanz zur positiven Aufladung der Nanoemulsionen, in dem Fall mit Stearylamin, machten auch Elbaz et al. 1993. Der Polydispersitätsindex (PI) (von  $0,09 \pm 0,05$  bis  $0,12 \pm 0,04$ ) und die LD99-Partikelgrößen (Abb. 22) sind bei allen Konzentrationen durchweg klein (von  $222 \pm 3$  nm bis  $253 \pm 2$  nm). Das Zetapotenzial nimmt mit steigender PS-Konzentration von 0,3 auf 0,7 % wie erwartet zu (von  $41 \pm 3$  auf  $63 \pm 3$  mV) (Abb.22), weil mit steigender PS-Konzentration in der Formulierung die Oberfläche der Tröpfchen dichter mit PS besetzt wird. Diese Tendenz der steigenden Zetapotenziale mit steigendem Agens zur Aufladung der Nanoemulsion, die auch Elbaz et al. 1993 feststellten, spricht dafür, dass die eingesetzten PS-Moleküle sich in die O/W-Grenzfläche einlagern. Das ist erklärbar mit der Struktur des Phytosphingosins, das einen hydrophilen Kopf und einen lipophilen Schwanz hat und somit oberflächenaktive Eigenschaften vorweisen kann. Bei einer pH-Einstellung der Nanoemulsionen auf 5,5 sorgt PS ( $pK_b \approx 9$ ) für die positive Ladung und ist somit entscheidend an der Stabilität der Nanoemulsion durch elektrostatische Abstoßung beteiligt.

Nach Lagerung von 28 Tagen bei 25 und 40 °C sind aber nur die Formulierungen mit einer Konzentration von 0,6 % bzw. 0,7 % stabil geblieben. Bei PS-Konzentrationen < 0,6 % nehmen nach Lagerung sowohl der Polydispersitätsindex als auch die mittlere Partikelgröße zu. Obwohl die Zetapotenziale für alle eingesetzten PS-Konzentrationen durchweg einen Wert von über +30 mV haben, ist bei Konzentrationen < 0,6 % nach Lagerung eine z.T. starke Abnahme zu erkennen. Interessanterweise sind die bei 40 °C gelagerten Formulierungen physikalisch stabiler als die bei 25 °C gelagerten. Nach 120 Tagen Lagerung bei 40 °C nimmt bei den Formulierungen mit 0,3 %, 0,4 % und 0,7 % PS die LD-Partikelgröße stark zu (auf etwa 500 nm). Insgesamt ist eine PS-Konzentration von < 0,6 % für eine Stabilisierung über einen längeren Zeitraum nicht ausreichend, weil die O/W-Grenzfläche eventuell nicht ausreichend besetzt ist und damit die elektrostatische Abstoßung zur Stabilisierung nicht ausreicht. Die Tendenzen der Partikelcharakterisierung sind in Tab. 19 zusammengefasst.

Tab. 19: Übersicht über die untersuchten Eigenschaften der positiv geladenen Prednicarbat-haltigen Nanoemulsionen mit verschiedenen Phytosphingosin-Konzentrationen nach Lagerung

PS-Konzentration [%]	mittlere Partikelgröße (PCS)	PI	LD99-Durchmesser	ZP
0,3	↑	↑	↑	↓
0,4	→	↑	↑	↓
0,5	↑	↑	→	↓
<b>0,6</b>	→	→	→	→
0,7	→	↑	↑	↓

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass nur bei der Formulierung mit 0,6 % PS die mittlere Partikelgröße, der PI, die LD-Partikelgröße und das ZP nach Lagerung stabil geblieben sind.

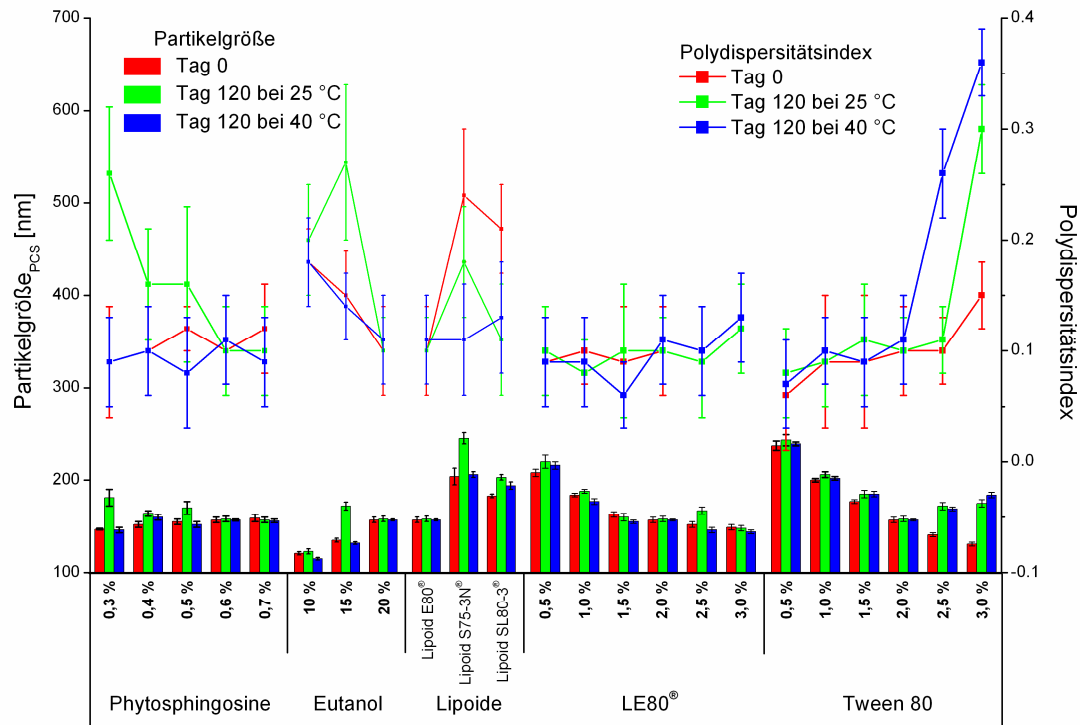


Abb. 21: Einfluss der verschiedenen der Rezepturbestandteile bzw. deren Konzentrationen auf die mittlere Partikelgröße (mittels Photonkorrelationspektroskopie, PCS), den Polydispersitätsindex sowie deren Stabilität nach Lagerung der bei 50 °C, 10 Zyklen und 300 bar homogenisierten Prednicarbat-haltigen positiv geladenen Nanoemulsion ( $\bar{X} \pm s$ ;  $n = 5$ ).

### Eutanol® G-Konzentration

Im Gegensatz zu PS führte eine Erhöhung der Konzentration von Eutanol® G (EG), der dispergierten Phase, zu einem Anstieg der Partikelgröße (von  $121 \pm 2$  nm auf  $157 \pm 3$  nm). Levy und Benita 1989 berichteten von einer ähnlichen Tendenz für Diazepam-haltige O/W-Nanoemulsionen. Der PI hingegen wurde reduziert (von  $0,18 \pm 0,03$  auf  $0,11 \pm 0,04$ ). Der LD-Durchmesser wird ebenso wie die mittlere Partikelgröße größer (von  $203 \pm 1$  nm auf 250 nm). Die ZP-Werte liegen zwischen  $50 \pm 1$  und  $57 \pm 5$  mV. Ein höherer Anteil an dispergierter Phase führt zu einem Anstieg der Partikelgröße in der Nanoemulsion. Je größer der Anteil an dispergierter Phase ist, desto mehr Energie muss in das System eingebracht werden, um die Emulsionströpfchen zu zerkleinern. Wenn diese eingebrachte Energie konstant bleibt, der Anteil an disperser Phase aber zunimmt, werden die Partikel größer, wie in diesem Fall (Jahnke 2001). Der Abfall des PI bei steigendem Ölanteil kann damit begründet werden, dass ein höherer Anteil die Scherkräfte im System und damit den „Stress“ erhöht, was eine engere Partikelverteilung begünstigt. Die LD-Partikelgröße blieb bei allen

eingesetzten EG-Konzentrationen stabil. Die Formulierung mit 10 % EG ist bezüglich der mittleren Partikelgröße und des PI stabil, das ZP nimmt aber nach Lagerung von  $54 \pm 3$  mV auf  $40 \pm 4$  mV ab. Die ebenfalls abnehmende Tendenz des ZP bei einem EG-Anteil von 15 % (von  $57 \pm 5$  mV auf  $45 \pm 2$  mV) und der hohe PI nach Lagerung bei 25 °C ( $0,27 \pm 0,07$ ) waren Ausschlußkriterien dieser Konzentration. Obwohl die Partikel der Nanoemulsion mit 20 % EG etwas größer sind als bei dem Einsatz von 10 bzw. 15 % EG, wurden 20 % EG schließlich als die optimale Konzentration zur weiteren Untersuchung verwendet, weil sowohl der PI als auch das ZP nach Lagerung eine ausgesprochene Stabilität aufwiesen (Abb. 22 und 23). Die Tendenzen der Partikeleigenschaften nach der Lagerung sind in Tab. 20 aufgeführt.

Tab. 20: Übersicht über die untersuchten Eigenschaften der positiv geladenen Prednicarbat-haltigen Nanoemulsionen mit verschiedenen Eutanol G-Konzentrationen nach Lagerung

EG-Konzentration [%]	mittlere Partikelgröße (PCS)	PI	LD99-Durchmesser	ZP
10	→	→	→	↓
15	↑	↑	→	↓
<b>20</b>	→	→	→	→

### Auswahl des lipophilen Emulgators

Um einen möglichst optimalen Emulgator für die lipophile Phase der Nanoemulsionen zu erhalten, wurden mit vier verschiedenen Lipoiden Nanoemulsionen hergestellt und der Einfluss von drei verschiedenen Lipoiden auf die mittlere Partikelgröße, den PI, die LD-Partikelgröße und auf das ZP untersucht. Beim Homogenisieren mit Lipoid S 100-3<sup>®</sup> kam es zur Gelierung der Nanoemulsion, so dass diese Formulierung mit diesem Lipoid sofort verworfen wurde. Der Einsatz von Lipoid E 80<sup>®</sup> ergab die kleinsten Partikel ( $157 \pm 3$  nm) mit der engsten Verteilung (PI  $0,1 \pm 0,04$ ), gefolgt vom Lipoid S 75 – 3N<sup>®</sup> ( $183 \pm 2$  nm, PI  $0,2 \pm 0,04$ ) und Lipoid SL 80-3<sup>®</sup> ( $204 \pm 9$  nm, PI  $0,24 \pm 0,06$ ). Das höchste ZP liegt nach Gebrauch von Lipoid SL 80-3<sup>®</sup> vor ( $52 \pm 0,7$  mV).  $50 \pm 1$  mV konnten nach Einsetzen von Lipoid E80<sup>®</sup> gemessen werden, sowie  $41 \pm 3$  mV für die Nanoemulsion mit Lipoid S 75 – 3N<sup>®</sup>. Die Tendenzen der mittleren Partikelgröße, des PI und des ZP wurden durch die Ergebnisse der LD-Partikelgröße bestätigt.  $491 \pm 3$  nm betrug die LD-Partikelgröße bei Lipoid S 75 – 3N<sup>®</sup>,  $300 \pm 2$  nm bei Lipoid SL 80-3<sup>®</sup> und 250 nm bei Lipoid E80<sup>®</sup>. Auch nach Lagerung von 28 Tagen bei 25 °C und 40 °C blieben die mittlere Partikelgröße, der PI, die LD-Partikelgröße und das ZP beim Einsatz von Lipoid E 80<sup>®</sup> konstant. Das Zetapotenzial war bei allen eingesetzten Lipoiden wie erwünscht  $> + 30$  mV. Lipoid S75-3N<sup>®</sup> war ungeeignet, da das

Zetapotenzial schon nach 28 Tagen auf  $33 \pm 1$  mV abnahm, so dass man davon ausgehen kann bei längerer Lagerung Werte  $< + 30$  mV zu erhalten. Das höchste Zetapotenzial von etwa 50 mV konnte durch den Einsatz von Lipoid E80<sup>®</sup> erreicht werden, der über einen Lagerungszeitraum von 28 Tagen bei 25 °C und 40 °C praktisch unverändert blieb. Hinzu kommt, dass ausser bei Lipoid E80<sup>®</sup> der LD-Durchmesser nach Lagerung deutlich größer wurde, was als ein Hinweis auf physikalische Instabilität zu werten ist. Es scheint so, dass eine gewisse Zusammensetzung der Phospholipide für die physikalische Stabilität der Nanoemulsionen von entscheidender Bedeutung ist. Lipoid ist der Handelsname für Lecithin, ein komplexes Gemisch von Phosphatidylcholinen (PCh). Dabei handelt es sich um Stoffe, bei denen Glycerol mit einer Phosphorsäure und zwei Fettsäuren verestert ist. Die Phosphorsäure ist zusätzlich mit Cholin verestert. Durch Hydrolyse kann es passieren, dass PCh zu Lyso-PCh und einer freien Fettsäure zerfällt. Das würde bedeuten, dass die negative Ladung zunimmt. Lipoid SL 80-3<sup>®</sup> enthält zu 15-25 % Lysophosphatidylcholin, was sich nachteilig auf das Zetapotenzial auswirkt. Der Gehalt an Phosphatidylcholin des Lipoids S 75 - 3N scheint mit 70 % zu gering, um die Nanoemulsionströpfchen ausreichend zu stabilisieren. Um ein stabiles und hohes ZP zu erhalten ist es wichtig, dass PCh und dieses Lyso-PCh in einem bestimmten Verhältnis vorliegen. Vermutlich ist die Zusammensetzung des Lipoid E80<sup>®</sup> förderlich bei der Bildung und Einlagerung in Kombination mit PS an der Grenzfläche der Nanoemulsionströpfchen. Zur genaueren Zusammensetzung der verwendeten Lipide s. Tab 4.2.2. Korner et al. 1994 beschreiben, dass gewisse Mengen an Phosphatidsäure und Phosphatidylinositol, die in Soja-Phospholipiden vorliegen, einen bestimmten Beitrag zur negativen Ladung der Nanoemulsion leisten. Tab. 21 fasst die Tendenzen der Partikeleigenschaften der untersuchten Nanoemulsion zusammen.

Tab. 21: Übersicht über die untersuchten Eigenschaften der positiv geladenen Prednicarbat-haltigen Nanoemulsionen mit verschiedenen Lipoiden nach Lagerung

Lipoid	mittlere Partikelgröße (PCS)	PI	LD99-Durchmesser	ZP
<b>Lipoid E 80</b>	→	→	→	→
Lipoid S75-3N	↑	↓	↑	↓
Lipoid S L 80-3	→	↓	↑	↓

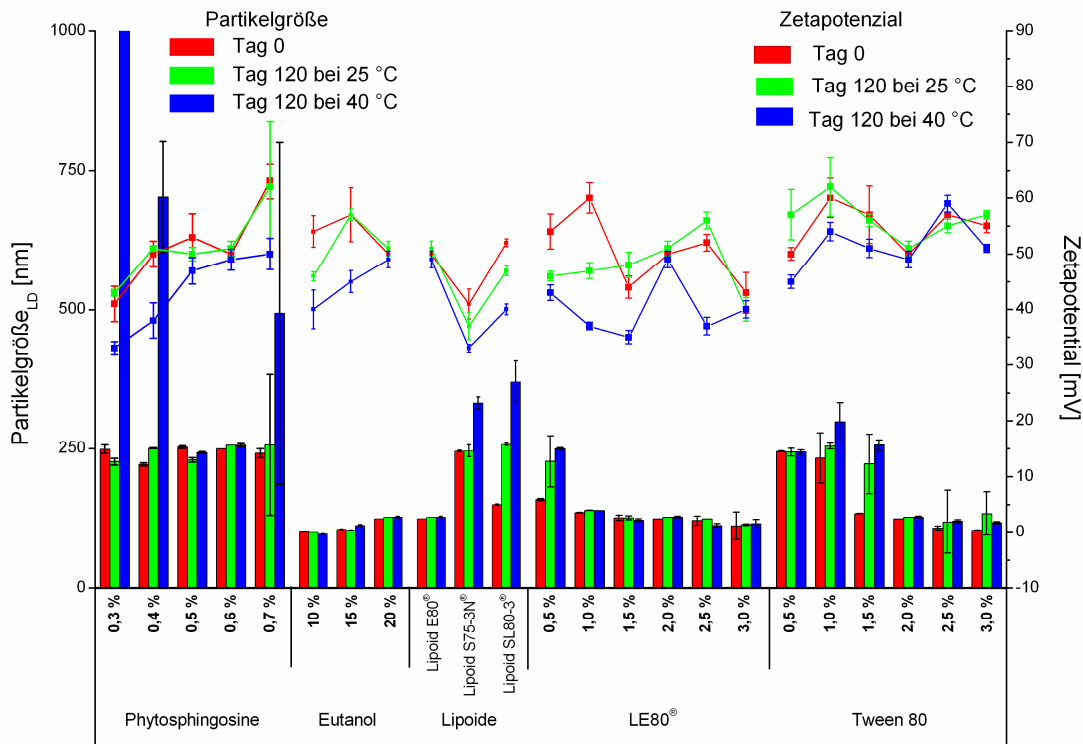


Abb. 22: Einfluss der verschiedenen der Rezepturbestandteile bzw. deren Konzentrationen auf die Partikelgröße (bestimmt mittels Laserdiffraktometrie, LD), die Zetapotenziale sowie die Stabilität nach Lagerung bei 50 °C, 10 Zyklen und 300 bar homogenisierter Prednicarbat-haltigen positiv geladenen Nanoemulsionen ( $\bar{X} \pm s$ ; n = 5).

### Lipoid E80®-Konzentration

Die Erhöhung der LE80-Konzentration von 0,5 auf 3 % führte zu einer kontinuierlichen Verringerung der Partikelgröße (von  $208 \pm 4$  auf  $150 \pm 3$  nm), aber einer geringen Zunahme des PI (von  $0,09 \pm 0,04$  auf  $0,12 \pm 0,05$ ). Sämtliche ZP-Werte liegen deutlich über + 30 mV, wobei ein direkter Bezug zwischen der LE 80-Konzentration und dem ZP nicht zu erkennen ist. Das höchste ZP liegt am Tag der Homogenisation bei einer LE80-Konzentration von 1 % vor ( $60 \pm 3$  mV). Mit steigender Konzentration wurde der LD-Durchmesser kontinuierlich von  $318 \pm 4$  nm auf  $224 \pm 24$  nm verringert. Bis auf die Nanoemulsion mit 2,5 % LE80 bleiben sowohl die mittlere Partikelgröße als auch der PI bei allen Formulierungen auch nach Lagerung konstant klein. Bei Betrachtung der LD-Partikelgrößen ist zu erkennen, dass nur bei der Nanoemulsion mit 0,5 % LE80 eine Zunahme auftritt. Nach Lagerung nehmen, bis auf die Formulierung mit 2 % LE80, sämtliche ZP-Werte ab, was den Schluss einer evtl. physikalischen Instabilität erlaubt. Eine Abnahme des ZP hat eine Reduktion der elektrostatischen Abstoßung und damit über längere Sicht auch eine Abnahme der physikalischen Stabilität zur Folge. Eine LE80-Konzentration < 2 % erscheint somit als nicht

ausreichend, um die Grenzfläche der Nanoemulsion ausreichend zu besetzen und damit diese zu stabilisieren. Zur Stabilisierung von Nanoemulsionen, die per Hochdruckhomogenisation hergestellt wurden, ist es erforderlich, dass der eingesetzte Emulgator innerhalb von Sekundenbruchteilen an die neu entstandene riesige Grenzfläche diffundiert, diese besetzt und somit die Nanoemulsionströpfchen stabilisiert, damit es nicht zur Koaleszenz kommt. Das kann man vorbildlich daran verfolgen, dass eine Erhöhung der LE80-Konzentration auf 3 % zu immer kleiner werdenden mittleren Partikelgrößen führt. Die endgültige Partikelgröße bzw. die Partikelgrößenverteilung wird durch das Ausmaß der Grenzflächenbesetzung in der Nanoemulsion und der Viskosität entscheidend beeinflusst (Levy und Benita 1989). Eine partielle oder ungenügende Besetzung der entstandenen Teilchen führt zu einem Anstieg der Oberflächenspannung, was wiederum durch einen Anstieg der Partikelgröße kompensiert wird. Das stabilste ZP ist bei der Formulierung mit 2 % LE 80 zu finden. Das lässt den Schluß zu, dass es mit 2 % LE80 und PS zur Bildung eines dichtgepackten Films kommt, mit verbesserten mechanischen und elektrostatischen Eigenschaften, die zur Formierung von stabilisierten Emulsionströpfchen führt. Eine Erhöhung der Konzentration über 2 % bringt keine entscheidende Verbesserung, d.h. weder wird die mittlere Partikelgröße signifikant kleiner noch der PI. Hinzu kommt, dass bei diesen LE80-Konzentrationen > 2 % entweder der PI nach Lagerung zu- oder das ZP abnimmt. Der Abfall der Zetapotenziale kann damit erklärt werden, dass der verwendete Emulgator Lipoid E 80 zu einem kleinen Anteil Lysolecithin mit negativer Ladung enthält. Diese Ladung wird anfänglich durch die positive Ladung des PS kompensiert bzw. übertroffen. Ein Absinken des positiven ZP deutet darauf hin, dass die negative Ladung zunimmt, was z.B. durch einen steigenden Anteil an Lysolecithin verursacht werden kann. Das kann wiederum durch die Empfindlichkeit des Lipoid E80<sup>®</sup> z.B. gegenüber Oxidation oder andere Vorgänge hervorgerufen werden. Wie schon für den Arzneistoff Amphotericin B beschrieben (Lance et al. 1995), lagert sich das Prednicarbat vermutlich in die Emulgatorschicht ein, so dass sich Lipoid E80<sup>®</sup> räumlich nicht optimal ausrichten kann. Durch eine Lagerung bei 40 °C wird die Fluidität der LE80-Emulgatorschicht erhöht, Prednicarbat, LE80 und auch PS können sich dadurch besser ausrichten und sorgen für eine erhöhte Stabilität. In der Tab. 22 sind die untersuchten Eigenschaften der Nanoemulsionen tendenziell wiedergegeben.



Tab. 22: Übersicht über die untersuchten Eigenschaften der positiv geladenen Prednicarbat-haltigen Nanoemulsionen mit verschiedenen Lipoid E 80-Konzentrationen nach Lagerung

LE80-Konzentration [%]	mittlere Partikelgröße (PCS)	PI	LD99-Durchmesser	ZP
0,5	→	→	↑	↓
1	→	↓	→	↓
1,5	→	→	→	↓
<b>2</b>	→	→	→	→
2,5	↑	↑	→	↓
3	→	→	→	↓

### Tween<sup>®</sup> 80-Konzentration

Analog der Erhöhung der LE80-Konzentration führt eine Erhöhung der T80-Konzentration zu einer Erniedrigung der mittleren Partikelgröße von  $237 \pm 5$  auf  $131 \pm 2$  nm, zu einer Erhöhung des PI von  $0,06 \pm 0,05$  auf  $0,15 \pm 0,03$  und zu kleineren LD-Partikeldurchmessern (Reduktion von  $490 \pm 2$  nm auf  $208 \pm 1$  nm). Allerdings ist dieser Effekt sowohl der Zunahme bzw. der Abnahme bei T80 stärker ausgeprägt als bei LE80. Die ZP-Werte nehmen bis auf die Formulierungen mit 2 bzw. 2,5 % T80 ab. Nach Lagerung ist zu erkennen, dass sowohl die mittlere Partikelgröße als auch der PI erst bei einer Konzentration  $> 2$  % zunehmen. Die LD-Partikelgröße und das ZP sind nur bei den T80-Konzentrationen von 2 bzw. 2,5 % konstant, wobei die LD-Partikelgröße auch bei der Formulierung mit 0,5 % T80 konstant war.

Diese Effekte lassen den Schluss zu, dass eine Variation der T80-Konzentration einen größeren Einfluß auf die Partikeleigenschaften und damit auch auf die physikalische Stabilität der Nanoemulsion hat als die Veränderungen z.B. der LE80-Konzentration. Zusatz von Emulgatoren verändert die Viskosität der Ölphase (bei LE80) bzw. der wässrigen Phase (hier bei T80) und beeinflusst so den Homogenisationsprozess und damit die endgültige Partikelgröße, den PI und auch das ZP. Eine ausreichende physikalische Stabilität, dargestellt durch konstant kleine Partikel mit einer möglichst engen Verteilung, wurde erst bei einer T80-Konzentration von 2 % erreicht. Niedrigere Konzentrationen führten entweder zu größeren Partikeln oder zu fallenden ZP-Werten. Höhere Konzentrationen hatten eine breitere Verteilung zur Folge, was allgemein als Ursache für eine Instabilität angesehen wird.

Tween<sup>®</sup> 80 ist in den Nanoemulsionen verantwortlich für eine sterische Stabilisierung. Dieser Emulgator hat einen großen hydrophilen und einen lipophilen Bereich. Die lipophilen Propylenoxidketten ragen in den hier vorliegenden O/W-Nanoemulsionen in die EG-Phase

(Ölphase) hinein und die hydrophilen Bereiche (frei bewegliche Ethylenoxiddketten) reichen weit in die wässrige Phase. Wenn sich die Partikel einander nähern ist aus sterischen Gründen ein direkter Kontakt begrenzt. Die Ethylenoxiddketten können sich aber gegenseitig durchdringen und so die Beweglichkeit, und somit die Entropie, reduzieren. Es ist aber auch wahrscheinlich, dass es in der Emulgatorgrenzschicht zu einer Verdrängung des Lipoid E80 kommt. Tab. 23 führt die Tendenzen bezüglich der Partikeleigenschaften auf.

Tab. 23: Übersicht über die untersuchten Eigenschaften der positiv geladenen Prednicarbat-haltigen Nanoemulsionen mit verschiedenen Tween 80-Konzentrationen nach Lagerung

T80-Konzentration [%]	mittlere Partikelgröße (PCS)	PI	LD99-Durchmesser	ZP
0,5	→	→	→	↓
1	→	→	↑	↓
1,5	→	→	↑	↓
<b>2</b>	→	→	→	→
2,5	↑	↑	→	→
3	↑	↑	↑	↓

Tab. 24 zeigt einen kurzen Vergleich zwischen den hydrophilen Emulgatoren Tween<sup>®</sup> 80 und Poloxamer<sup>®</sup> 188 zur sterischen Stabilisierung der Nanoemulsionen

Tab. 24: Vergleich des Einfusses der sterischen Emulgatoren auf die mittlere Partikelgröße und den Polydispersitätsindex

Nanoemulsion	PCS ± s [nm]		PI ± s	
	Tag 0	Tag 28	Tag 0	Tag 28
<b>Tween<sup>®</sup> 80</b>	157 ± 3	158 ± 3	0,1 ± 0,04	0,1 ± 0,04
<b>Poloxamer<sup>®</sup> 188</b>	187 ± 4	214 ± 3	0,3 ± 0,04	0,26 ± 0,04

Die positiv geladene Nanoemulsion, die mit Tween<sup>®</sup> 80 hergestellt wurde, ist gegenüber der mit Poloxamer<sup>®</sup> 188 bezüglich der mittleren Partikelgröße und des PI eindeutig überlegen. Hinzukommt, dass die mittlere Partikelgröße der Poloxamer<sup>®</sup> 188-haltigen Nanoemulsion nach 28 Tagen noch weiter steigt. Weiterhin kann man bei der Poloxamer<sup>®</sup> 188-haltigen Nanoemulsion mit einem Polydispersitätsindex von 0,3 nicht mehr von einer engen Partikelverteilung sprechen (vgl. Tab. 24).

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass die Formulierung mit 20 % Eutanol G, 0,6 % Phytosphingosin, 2 % Lipoid E 80 und 2 % Tween 80 homogenisiert bei 50 °C, mit 300 bar und 10 Zyklen die beste von den untersuchten Nanoemulsionen war (s. Tab. 25).

Tab. 25: Zusammensetzung der optimierten Rezeptur der positiv geladenen Nanoemulsion

<b>Bestandteil</b>	<b>Konzentration (m/m%)</b>
<i>Ölphase</i>	
Eutanol G	<b>20</b>
Prednicarbat	<b>0,25</b>
Lipoid E 80	<b>2</b>
Phytosphingosin	<b>0,6</b>
Vitamin E	<b>0,03</b>
<i>Wasserphase</i>	
Tween 80	<b>2</b>
Kaliumsorbitat	<b>0,1</b>
Wasser zu	<b>100</b>

### **7.4.2 Langzeituntersuchung der chemischen und physikalischen Stabilität**

Die Untersuchung des Prednicarbat-Gehaltes brachte einen klaren Zusammenhang zwischen den Prozessparametern (Homogenisationstemperatur, Homogenisationsdruck und Anzahl der Homogenisationszyklen) und dem Arzneistoff-Gehalt an Prednicarbat hervor. Die sechs Formulierungen aus Abschnitt 6.4.1.1 (Tab. 16) wurden inklusive der Nanoemulsion mit der optimierten Rezeptur nochmals homogenisiert und die Stabilität untersucht. Dabei zeigte es sich, dass bereits nach 30 Tagen der Gehalt in vier dieser Formulierungen unter 90 % lag. Nur die Formulierungen, die bei 50 °C, mit 10 Zyklen und 300 bzw. 500 bar homogenisiert wurden, hatten einen Gehalt von mehr als 90 % und wurden weiterhin untersucht. Die Formulierung, die mit 300 bar hergestellt wurde, enthielt nach einem Jahr Lagerung mehr Prednicarbat (93 % bei 25 und 84 % bei 40 °C gelagert) als die mit 500 bar mit 88 bzw. 84 %. Mit einem hohem Energieeintrag als Ausdruck der Summe aus der hohen Homogenisationstemperatur (50 °C), -druck und Anzahl der Zyklen, ist es gelungen so einen hohen Gehalt an Prednicarbat in den Nanoemulsionen zu sichern. Dies ist ein beachtliches Ergebnis, berücksichtigt man, dass Prednicarbat ein Doppellester ist und dass es in der Literatur keine Hinweise auf Untersuchungen bezüglich des Prednicarbat-Gehalts in den Formulierungen gibt.

Lance et al. 1995 haben für den Arzneistoff Amphotericin B eine Einlagerung in die Grenzflächen-Lecithinschicht der O/W-Emulsionen postuliert. Davon ausgehend haben Akkar und Müller 2003a das sowohl in Wasser als auch in Lipiden schwerlösliche Carbamazepin in Nanoemulsionen mit Hilfe der als SolEmuls Technologie bekannten Methode eingearbeitet. Dabei wurde festgestellt, dass mit steigender Anzahl an Homogenisationszyklen ein steigender Anteil des Arzneistoffs inkorporierbar war, bis eine Sättigung des Systems eintrat. Für Prednicarbat ist so eine Einlagerung in die Lecithin-Grenzschicht ebenfalls denkbar. Wenn man die Struktur betrachtet, ist das Pregnan-Grundgerüst, analog zum Cholesterol, charakteristisch. Cholesterol ist aus technologischer Sicht ein guter Emulgator. Das würde den erhöhten Gehalt mit steigender Homogenisationstemperatur und Anzahl der Zyklen erklären.

Die physikalische Langzeitstabilität über einen Zeitraum von 1 Jahr zeigt, dass die mittlere Partikelgröße stabil ist (Abb. 23). Der PI beträgt am Tag der Homogenisation  $0,1 \pm 0,04$ , nach 1 Jahr Lagerung bei 25 °C  $0,06 \pm 0,01$  und nach Lagerung bei 40 °C sogar  $0,05 \pm 0,01$ .

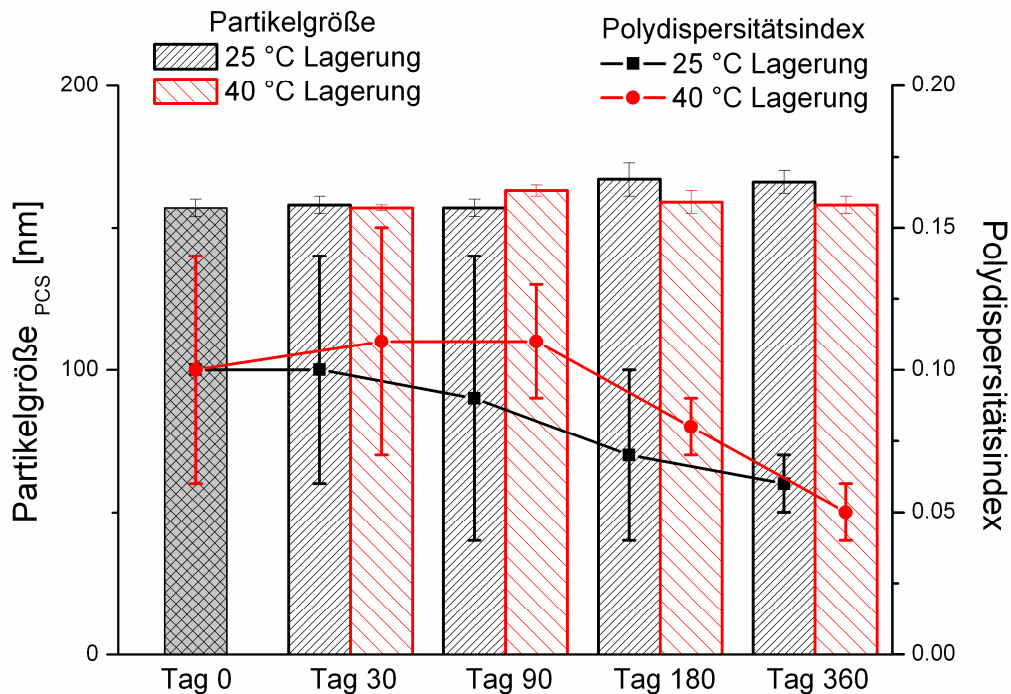


Abb. 23: Die mittleren Partikelgrößen (PCS) und die Polydispersitätsindices der optimierten, bei 50 °C, 10 Zyklen und 300 bar homogenisierten, durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsion nach einjähriger Lagerung bei 25 und 40 °C ( $\bar{x} \pm s$ ; n = 5).

Das ursprüngliche ZP von  $50 \pm 1$  mV nimmt nach Lagerung nur leicht ab und beträgt  $46 \pm 2$  mV bzw.  $45 \pm 1$  mV ab, ist aber immer noch eindeutig  $> +30$  mV.

Der LD-Durchmesser hingegen nimmt nach Lagerung minimal von  $252 \pm 2$  nm am Tag der Homogenisation auf  $280 \pm 3$  nm nach Lagerung bei  $25\text{ °C}$  und  $272 \pm 3$  nm nach Lagerung bei  $40\text{ °C}$  zu.

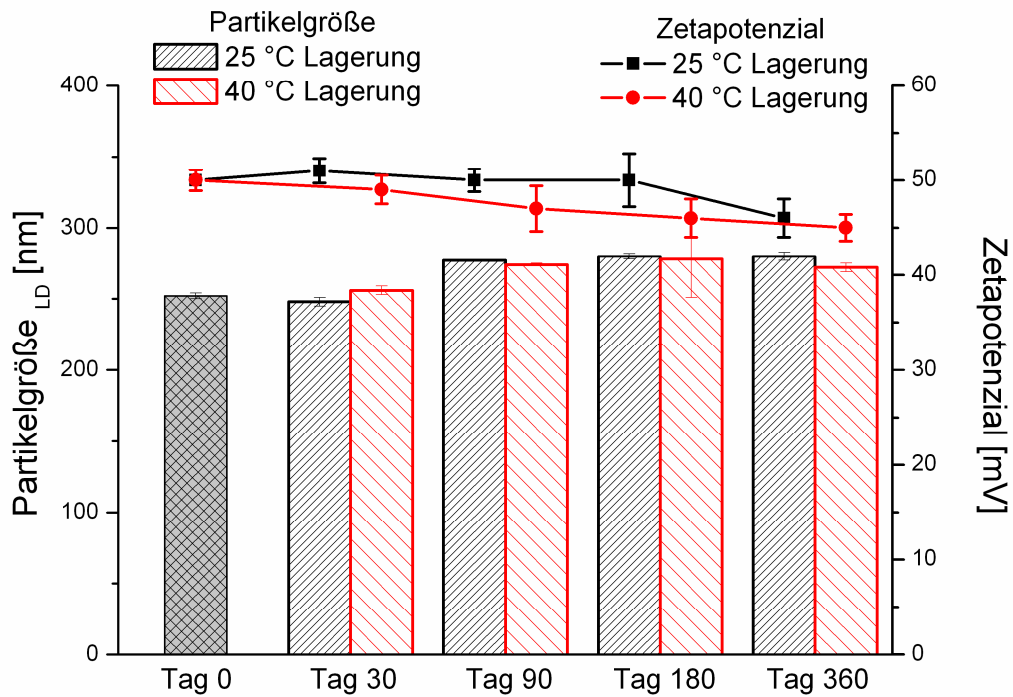


Abb. 24: Die LD-Partikelgrößen und die Zetapotenziale der optimierten, bei  $50\text{ °C}$ , 10 Zyklen und 300 bar homogenisierten, durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsion nach einjähriger Lagerung bei  $25$  und  $40\text{ °C}$  ( $\bar{X} \pm s$ ;  $n = 5$ ).

Der Prednicarbat-Gehalt von ursprünglichen 102 % am Tag der Homogenisation nimmt auf 92 % nach Lagerung von 1 Jahr bei 25 °C und 83 % nach Lagerung bei 40 °C ab. Berücksichtigt man, dass Prednicarbat ein Doppellester ist und dass eine O/W-Nanoemulsion vorliegt, ist das ein bemerkenswertes Ergebnis.

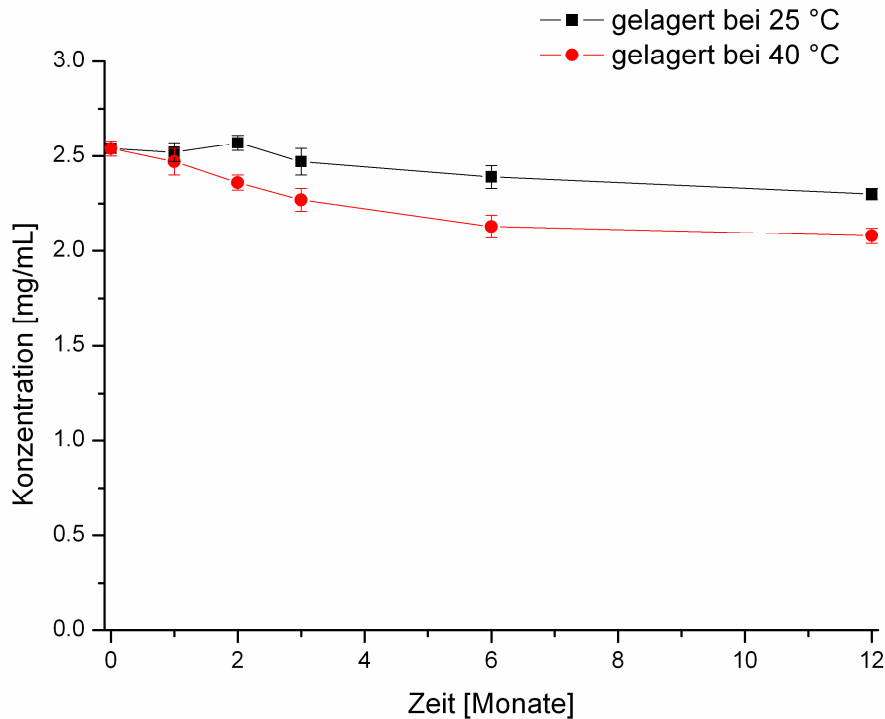


Abb. 25: Der Prednicarbat-Gehalt in der optimierten, bei 50 °C, 10 Zyklen und 300 bar homogenisierten, durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsion nach einjähriger Lagerung bei 25 und 40 °C ( $\bar{X} \pm s$ ; n = 6).

Diese Ergebnisse zeigen die hervorragende chemische und physikalische Stabilität der positiv geladenen Prednicarbat-haltigen Nanoemulsion. Die physikalische Stabilität wurde dabei zunächst durch Variation der Prozessparameter (Homogenisationstemperatur, Homogenisationsdruck und Anzahl der Homogenisationszyklen) und anschließend durch Anpassen der Konzentrationen der verschiedenen Rezepturbestandteile verbessert. Insgesamt tragen die Komponenten aus den Emulgatoren Lipoid E80<sup>®</sup> und Tween<sup>®</sup> 80, und dem für die positive Ladung verantwortlichen Phytosphingosin zur sehr guten physikalischen Stabilität bei. Dabei sorgen Lipoid E80<sup>®</sup> und Phytosphingosin für eine elektrostatische Stabilisierung, und Tween<sup>®</sup> 80 für eine sterische Stabilisierung.

### 7.4.3 Hochdruckhomogenisation mittels EmulsiFlex C5

Anhand der Ergebnisse der Hochdruckhomogenisation mit dem LAB 40 wurde beim Homogenisieren mit dem Emulsiflex C5 auf die Untersuchung des Einflusses der Homogenisationstemperaturen und der Homogenisationsdrücke auf die Partikelgröße und den PI verzichtet und gleich bei 50 °C mit 300 bar homogenisiert. Untersucht wurde lediglich der Einfluss der Homogenisationszeit auf die Partikelgröße, den Polydispersitätsindex und das Zetapotenzial sowohl am Tag der Homogenisation als auch nach Lagerung bei 25 und 50 °C. Die Partikelgröße beträgt nach 1 Minute  $169 \pm 3$  nm und  $167 \pm 4$  nm nach 10 Minuten. Eine längere Homogenisation führt nicht zu kleineren Partikeln (Abb. 26). Lediglich der Polydispersitätsindex wird ab der Minute 2 etwas kleiner, aber durch eine längere Homogenisationszeit nicht mehr verbessert. Eine weitere Verkleinerung des PI ist also wie bei der Partikelgröße durch längere Homogenisation nicht möglich, wobei die engste Verteilung mit einem PI von  $0,06 \pm 0,04$  nach einer Homogenisationszeit von 6 Minuten vorliegt. Die Polydispersitätsindices zwischen den Homogenisationszeiten 2 und 8 Minuten liegen zwischen 0,06 und 0,09, d.h. der Unterschied ist minimal und nicht von Bedeutung.

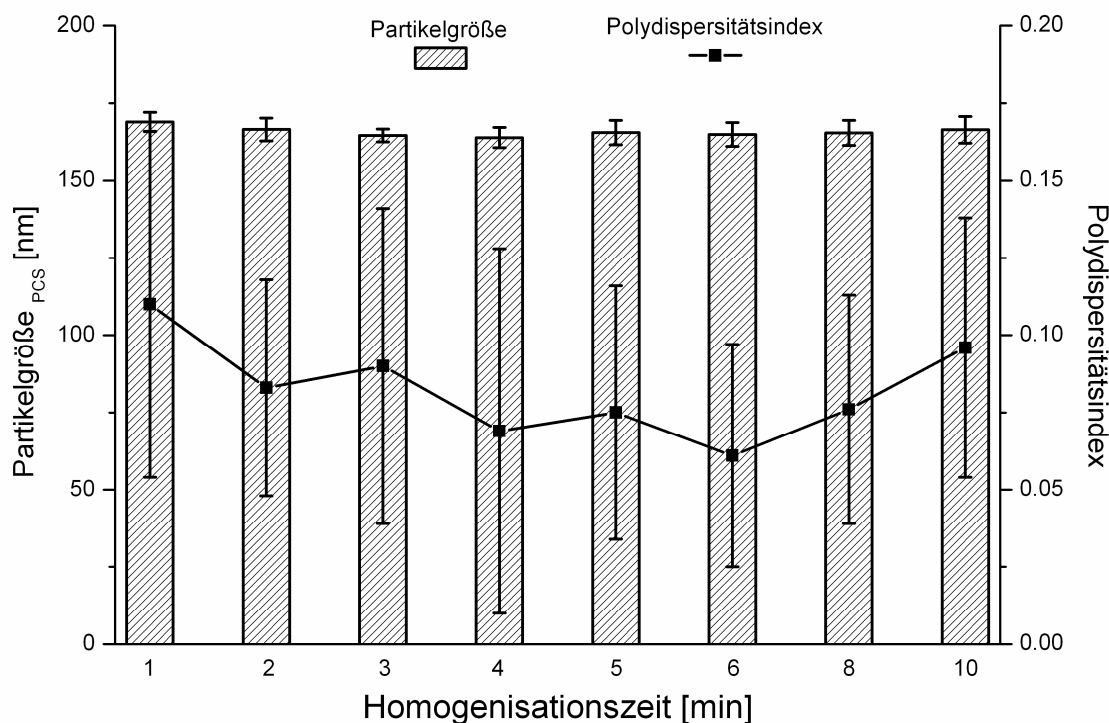


Abb. 26: Einfluss der Homogenisationszeit auf die mittlere Partikelgröße (bestimmt mittels Photonenkorrelationspektroskopie, PCS) und den Polydispersitätsindex der Prednicarbat-haltigen positiv geladenen Nanoemulsion, die bei 50 °C und 300 bar produziert wurde ( $\bar{x} \pm s$ ; n = 5).



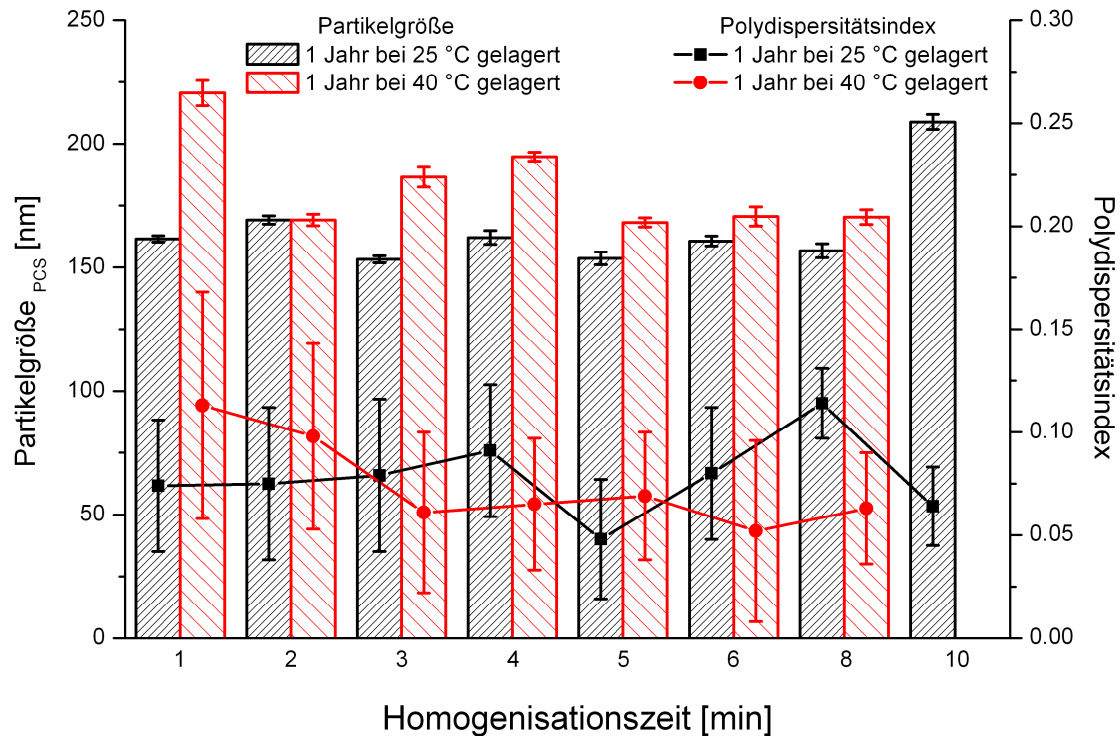


Abb. 27: Einfluss der Homogenisationszeit auf die mittlere Partikelgröße (bestimmt mittels Photonenkorrelationsspektroskopie, PCS) und den Polydispersitätsindex der mit 50 °C und 300 bar produzierten Prednicarbat-haltigen positiv geladenen Nanoemulsion nach 1 Jahr Lagerung bei 25 °C und 40 °C ( $\bar{x} \pm s$ ; n = 6).

Dieses Ergebnis wird auch nach Lagerung von 1 Jahr bei 25 °C und 40 °C bestätigt (Abb. 27). Die mittleren Partikelgrößen der bei 40 °C gelagerten Nanoemulsionen sind geringfügig größer als die der bei 25 °C gelagerten Nanoemulsionen. Die mittlere Partikelgröße der 10 min lang homogenisierten und ein Jahr bei 40 °C gelagerten Nanoemulsion konnte nicht dargestellt werden (Abb. 27), da es zur Phasenseparation kam. Eine auch nach Lagerung bei 40 °C praktisch unveränderte mittlere Partikelgröße liegt bei der 5 min lang homogenisierten Nanoemulsion vor ( $168 \pm 2$  nm). Die Polydispersitätsindices der gelagerten Nanoemulsionen sind durchweg als stabil zu bewerten. Insgesamt sind sowohl die mittlere Partikelgröße und der Polydispersitätsindex auch nach 1 Jahr Lagerung als sehr gut und stabil einzustufen.

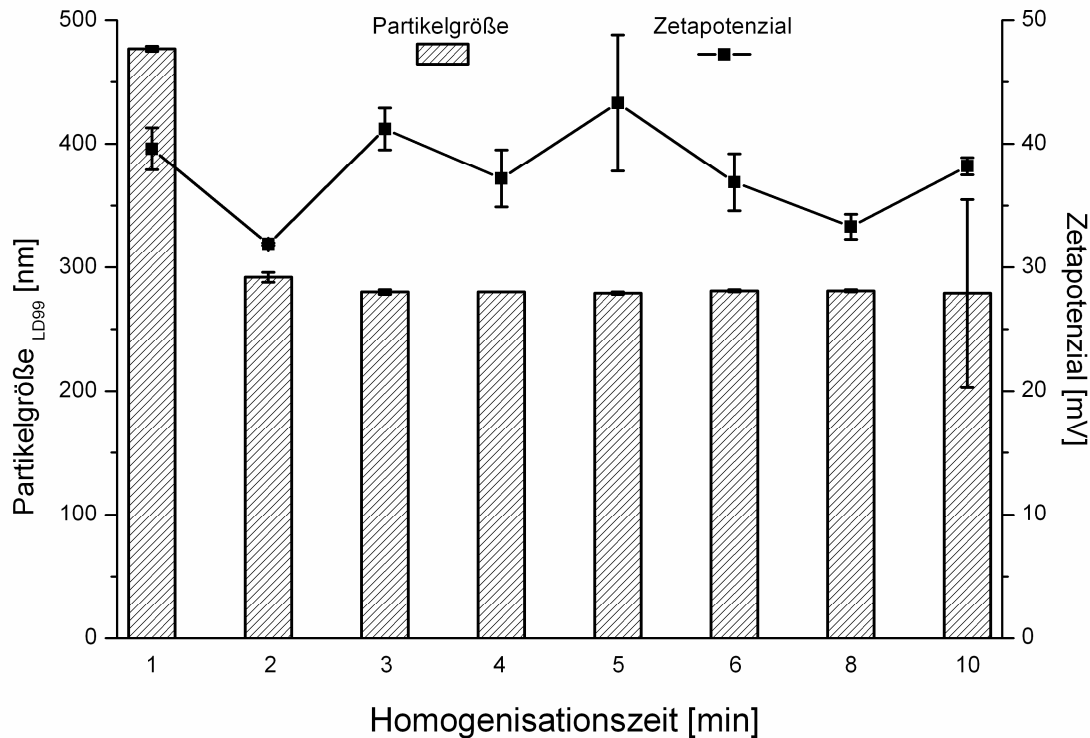


Abb. 28: Einfluss der Homogenisationszeit auf die Partikelgröße (bestimmt mittels Laserdiffraktometrie, LD) und das Zetapotenzial der bei 50 °C mit 300 bar hergestellten Prednicarbat-haltigen positiv geladenen Nanoemulsion ( $\bar{X} \pm s$ ;  $n = 5$ ).

Das Zetapotenzial ist schon ab einer Homogenisationszeit von 1 Minute größer + 30 mV. Der Energieeintrag bei dieser Homogenisationszeit ist allerdings nicht ausreichend für stabile Nanoemulsionen. Am Tag der Homogenisation liegt das höchste ZP nach einer 5 min Homogenisation bei einem Wert von  $43 \pm 5$  mV (Abb. 29). Nach 1 Jahr Lagerung bei 25 °C beträgt das ZP dieser 5 Minuten lang homogenisierten Nanoemulsion  $37 \pm 1$  mV, nach 1 Jahr Lagerung bei 40 °C aber nur noch  $26 \pm 0,2$  mV. Allerdings sind sämtliche ZP nach Lagerung bei 40 °C kleiner als + 30 mV, wobei das höchste Zetapotenzial bei der 5 Minuten lang homogenisierten Nanoemulsion vorliegt. Zusätzlich wurde neben der mittleren Partikelgröße die Partikelgrößenverteilung mit Hilfe der Laserdiffraktometrie bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die kleinsten Partikel bereits nach 3 Minuten erhalten werden (280 nm). Die stärkste Verkleinerung ist nach 2 Minuten zu verzeichnen (LD99-Durchmesser nach 1 Minute etwa 477 nm, 292 nm nach 2 Minuten, aber nach 3 Minuten dann keine weitere Verbesserung mehr möglich, 280 nm). Ein LD99-Durchmesser von 280 nm bedeutet in dem Fall, dass 99 % der gemessenen Probe kleiner sind als der angegebene Wert. Nach einjähriger Lagerung bei 25 °C und 40 °C waren die LD-Durchmesser lediglich bei der 5 Minuten lang homogenisierten Nanoemulsion konstant bei  $293 \pm 6$  nm bzw.  $303 \pm 2$  nm. Da sich die mittlere Partikelgröße und der PI, bzw. deren Veränderungen zwischen den Homogenisationszeiten von 2 und 8 min

kaum unterscheiden, wurde als die beste der untersuchten Homogenisationszeiten 5 min festgelegt. Eine längere Homogenisation mit dem Emulsiflex C5 führt nicht zu einer stabileren Formulierung.

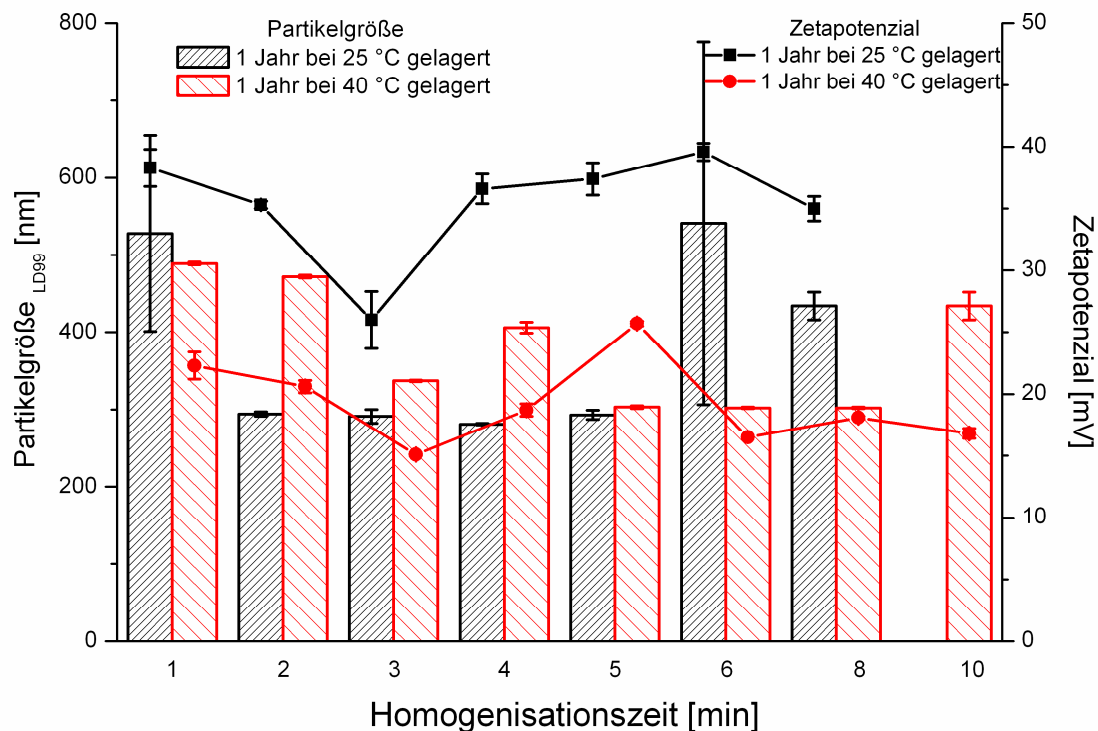


Abb. 29: Einfluss der Homogenisationszeit auf die Partikelgröße (mittels Laserdiffraktometrie, LD) und den Zetapotenzial einer mit 50 °C und 300 bar hergestellten Prednicarbat-haltigen positiv geladenen Nanoemulsion nach 1 Jahr Lagerung bei 25 °C und 40 °C ( $\bar{x} \pm s$ ; n = 5).

#### 7.4.4 Vergleich der Homogenisatoren

Da die Homogenisationsbedingungen, wie Temperatur, Druck und Anzahl der Zyklen bzw. Homogenisationszeit gleich gestaltet wurden, hat es sich angeboten, beide Homogenisator-typen bezüglich der Partikelcharakterisierung vergleichend zu untersuchen. Dabei wurden einerseits die mittlere Partikelgröße (PCS), die Breite der Verteilung (PI), die LD-Partikelgröße und das Zetapotenzial (ZP) am Tag der Herstellung und die physikalische Stabilität nach 1 Jahr Lagerung bei 25 bzw. 40 °C überprüft. Vergleicht man die mittlere Partikelgröße, den PI und den LD-Durchmesser dieser mit dem Emulsiflex C5 homogenisierten Formulierung mit der Nanoemulsion, die mit dem LAB 40 hergestellt wurde, ist zu erkennen, dass die Ergebnisse praktisch identisch sind. Lediglich das kleinere ZP lässt Nachteile beim C5 erkennen. Bei einer Temperatur von 50 °C und 300 bar sind 10 Homogenisationszyklen des LAB 40 mit 5 min Homogenisationsdauer des C5 gleichzusetzen. Eine kürzere Homogenisation mit dem C5 führt zu weniger stabilen Nanoemulsionen (Abb. 29).

### 7.4.5 Negativ geladene Nanoemulsionen

Um den Einfluss der Ladung auf das Ausmaß der Penetration vergleichend zu untersuchen, wurde eine mit Myristinsäure negativ geladene Nanoemulsion, als Gegenstück zu der bereits ausführlich besprochenen positiv geladenen Nanoemulsion, per Hochdruckhomogenisation hergestellt. Anschließend wurde die Penetration an exzidiierter Humanhaut untersucht. Die negativ geladenen Nanoemulsionen wurden wie die positiv geladenen bei 50 °C, mit 300 bar und 10 Zyklen homogenisiert. Bei den negativ geladenen Nanoemulsionen fällt auf, dass sowohl die mittlere Partikelgröße ( $136 \pm 2$  nm) als auch der PI ( $0,05 \pm 0,03$ ) verglichen mit der positiv geladenen Nanoemulsion ( $157 \pm 3$  nm und  $0,1 \pm 0,04$ ) kleiner sind.

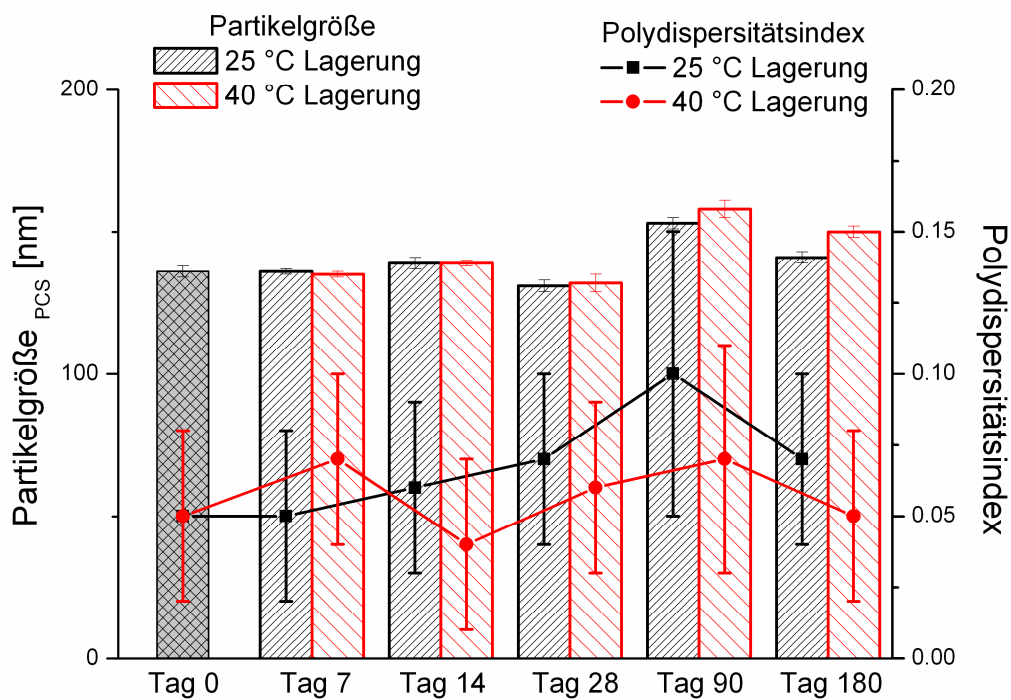


Abb. 30: Einfluss der Lagerung (180 Tage bei 25 °C und 40 °C) auf die mittlere Partikelgröße (bestimmt mittels Photonenkorrelationsspektroskopie, PCS) und den Polydispersitätsindex einer mit 50 °C, 10 Zyklen und 300 bar hergestellten Prednicarbat-haltigen negativ geladenen Nanoemulsion ( $\bar{x} \pm s$ ;  $n = 5$ ).

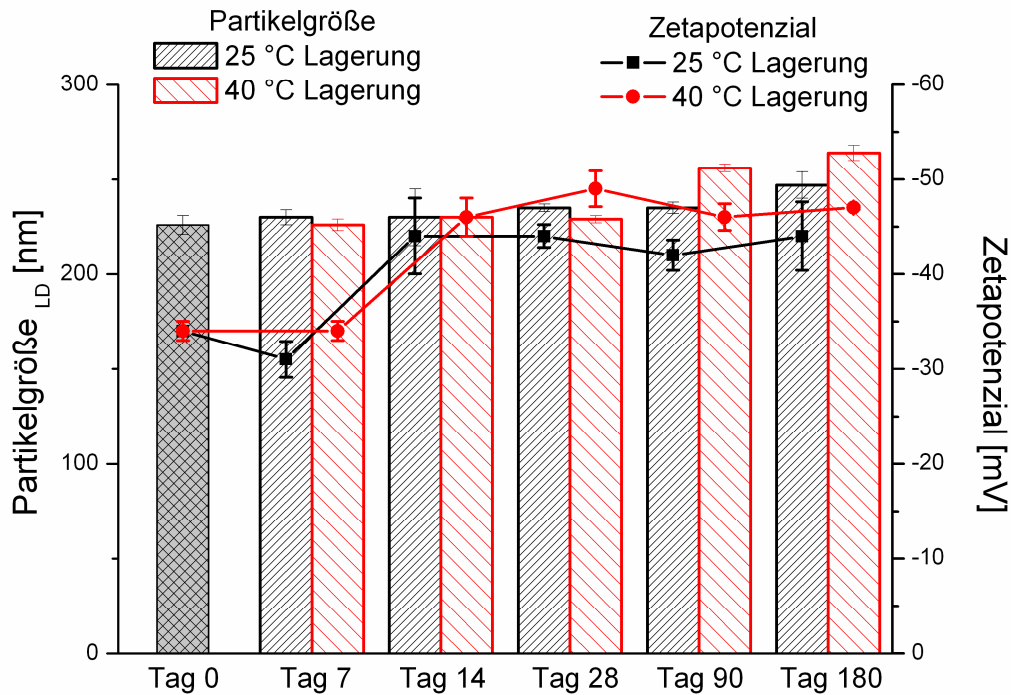


Abb. 31: Einfluss der Lagerung (180 Tage bei 25 °C und 40 °C) auf die Partikelgröße (bestimmt mittels Laserdiffraktometrie, LD) und das Zetapotenzial einer mit 50 °C, 10 Zyklen und 300 bar hergestellten Prednicarbat-haltigen negativ geladenen Nanoemulsion ( $\bar{x} \pm s$ ;  $n = 5$ ).

Nach Lagerung von 6 Monaten bei 25 und 40 °C sind sowohl die mittlere Partikelgröße als auch der PI äußerst stabil. Bei dem LD-Durchmesser ist ein kleiner Anstieg von  $226 \pm 5$  nm auf  $247 \pm 7$  nm bzw. auf  $264 \pm 4$  nm zu verzeichnen. Interessanterweise nimmt das ZP von  $-34 \pm 1$  mV (am Tag der Homogenisation) auf  $-44 \pm 4$  mV bzw.  $-46 \pm 2$  mV nach Lagerung von 14 Tagen zu und bleibt über 180 Tage konstant. Ein Grund könnte die im Verlauf der Lagerung bessere Anordnung der Myristinsäure an der Grenzfläche zusammen mit Lipoid E80 sein, wodurch die Erhöhung des ZP etwas zeitverzögert zustande kommt. Das bedeutet nicht, dass die Anfangswerte schlecht sind, weil auch sie betragsmäßig, unabhängig vom Vorzeichen, einen Wert von  $> 30$  mV.

## 7.5 Everolimus-Nanoemulsionen

In dieser Arbeit wurde auch versucht, das bisher ausschließlich systemisch zur Prophylaxe der Abstoßung nach Organtransplantationen verwendete Everolimus in eine topische Applikationsform zur Anwendung auf der Haut gegen entzündliche Erkrankungen einzuarbeiten. Aufgrund der sehr schlechten Löslichkeit scheiden wässrige Systeme aus. So wurde dieser Arzneistoff in Nanoemulsionen eingearbeitet und charakterisiert.

Die Everolimus- und auch Sirolimus-haltigen Nanoemulsionen setzten sich wie folgt zusammen:

<b>Bestandteil</b>	<b>Konzentration (m/m%)</b>
<i><b>Ölphase</b></i>	
Eutanol G	20
Everolimus bzw. Sirolimus	0,1
Lipoid E 80	2
Phytosphingosin	0,6
Vitamin E	0,03
<i><b>Wasserphase</b></i>	
Tween 80	2
Kaliumsorbitat	0,1
Wasser zu	100

### 7.5.1 Hochdruckhomogenisation mit LAB 40

Abb. 32 zeigt den Einfluss der Homogenisationstemperaturen von 25 und 50 °C auf die mittlere Partikelgröße und den PI einer Everolimus-haltigen durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsion, die bei 300 bar und verschiedener Anzahl von Zyklen homogenisiert wurde. Bei beiden Homogenisationstemperaturen ist gut zu erkennen, dass mit steigender Anzahl der Homogenisationszyklen sowohl die mittlere Partikelgröße als auch der PI abnehmen. Bei 25 °C beträgt die mittlere Partikelgröße nach Zyklus 1  $221 \pm 9$  nm und der PI  $0,32 \pm 0,02$ . Die mittlere Partikelgröße und der PI nehmen sowohl bei Steigerung der

Zyklenzahl als auch bei Erhöhung der Temperatur auf 50 °C ab. Nach zehn Zyklen sind die Partikel bei 25 °C nur noch  $134 \pm 3$  nm groß und der PI hat einen Wert von  $0,11 \pm 0,03$ . Bei 50 °C und 1 Zyklus beträgt die Partikelgröße  $205 \pm 4$  nm und der PI  $0,25 \pm 0,02$ , nach 10 Zyklen  $130 \pm 4$  nm und der PI  $0,06 \pm 0,02$ . Dabei sind die mittlere Partikelgröße und der PI der bei 50 °C homogenisierten Nanoemulsion durchweg kleiner als die bei 25 °C. Als Grund ist die Abnahme der Viskosität durch die Temperaturerhöhung auf 50 °C von  $71,85 \pm 0,08$  mPa s bei 25 °C auf  $22,23 \pm 0,03$  mPa s bei 50 °C aufgrund einer Erhöhung der Energiezufuhr zu nennen. Da sowohl eine Steigerung der Anzahl der Zyklen als auch eine Temperaturerhöhung einen höheren Energieeintrag in das System mit sich bringen, führen beide Veränderungen zu kleineren Partikeln mit engerer Verteilung. Deshalb sind bei gleichbleibendem Homogenisationsdruck die bei 50 °C homogenisierten Partikel verglichen mit denen bei 25 °C immer kleiner und enger verteilt. Je größer die Anzahl der Zyklen wird, desto geringer wird das Ausmaß der Verkleinerung, sowohl der mittleren Partikelgröße als auch hinsichtlich der Breite der Verteilung. Nichtsdestotrotz sind die kleinsten Partikel mit der engsten Verteilung nach 10 Zyklen zu finden.

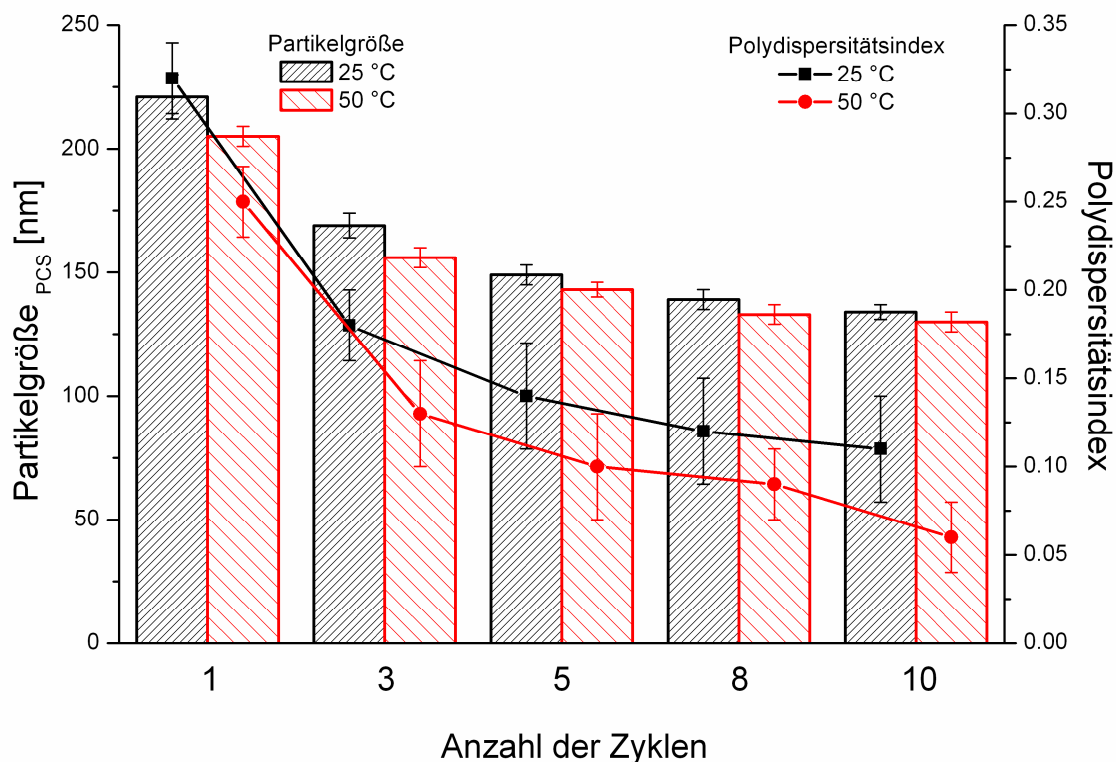


Abb. 32: Einfluss der Homogenisationstemperaturen 25 und 50 °C und der Anzahl der Zyklen auf die mittlere Partikelgröße (bestimmt mittels Photonenkorrelationsspektroskopie, PCS) und den PI einer Everolimus-haltigen, durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsion ( $\bar{x} \pm s$ ; n = 5).

Die Erhöhung der Zyklenzahl auf das ZP bringt Überraschendes zum Vorschein, und zwar dass das ZP mit steigender Zyklenzahl von  $64 \pm 4$  auf  $46 \pm 3$  mV abnimmt. Vermutlich lagern sich bei nur 1 Zyklus mehr PS-Moleküle in die Grenzschicht ein als Emulgatormoleküle. Erst durch Steigerung der Anzahl der Zyklen verdrängt LE80 PS aus der Grenzschicht und sorgt so für kleiner werdende Partikel. Einen ähnlich ungünstigen Einfluss auf das ZP konnte man schon bei der Homogenisation von positiv geladenen Prednicarbat-haltigen Nanoemulsionen mit dem Emulsiflex C5 feststellen. 10 Zyklen reichen nicht aus, um den LD-Durchmesser auf einen Wert  $< 300$  nm zu reduzieren. Besser geeignet ist eine Homogenisationstemperatur von  $50$  °C. Bereits nach 5 Zyklen liegt der LD-Durchmesser bei  $293 \pm 1$  nm und wird durch eine weitere Erhöhung stetig bis zu einem Wert von  $252 \pm 3$  nm reduziert. Anders als bei  $25$  °C wird das ZP durch eine Erhöhung der Zyklenzahl ab 3 Zyklen nicht weiter reduziert. Nach 1 Zyklus beträgt das ZP  $62 \pm 2$  mV und bleibt zwischen 3 und 10 Zyklen relativ konstant zwischen 49 und 52 mV.

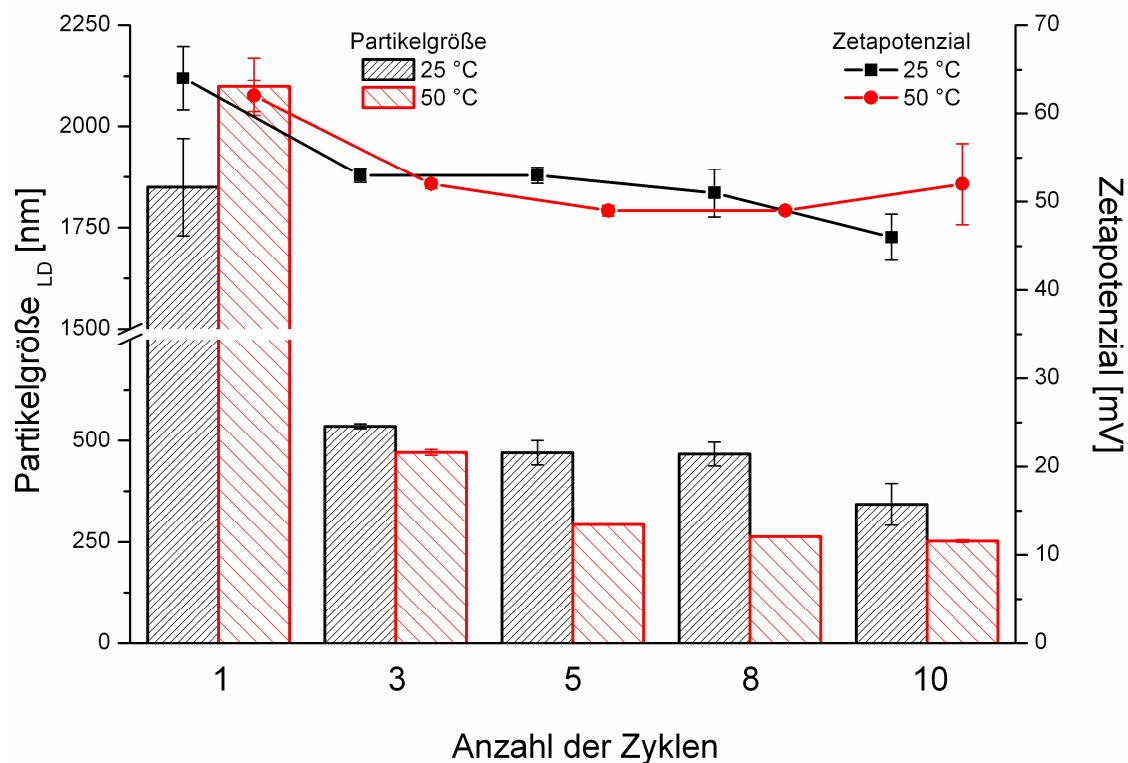


Abb. 33: Einfluss der Homogenisationstemperaturen 25 und 50 °C und der Anzahl der Zyklen auf die Partikelgröße (bestimmt mittels Laserdiffraktometrie, LD) und den Polydispersitätsindex einer Everolimus-haltigen, durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsion ( $\bar{x} \pm s$ ;  $n = 5$ ).

Zusammenfassend kann man sagen, dass bei einer Homogenisationstemperatur von  $25$  °C und 300 bar 5 Zyklen als geeignet, aber immer noch nicht als optimal zu betrachten sind, um



kleine Partikel ( $149 \pm 4$  nm) mit enger Verteilung ( $0,14 \pm 0,03$ ) und einem hohem ZP-Wert ( $53 \pm 3$  mV) zu erhalten.

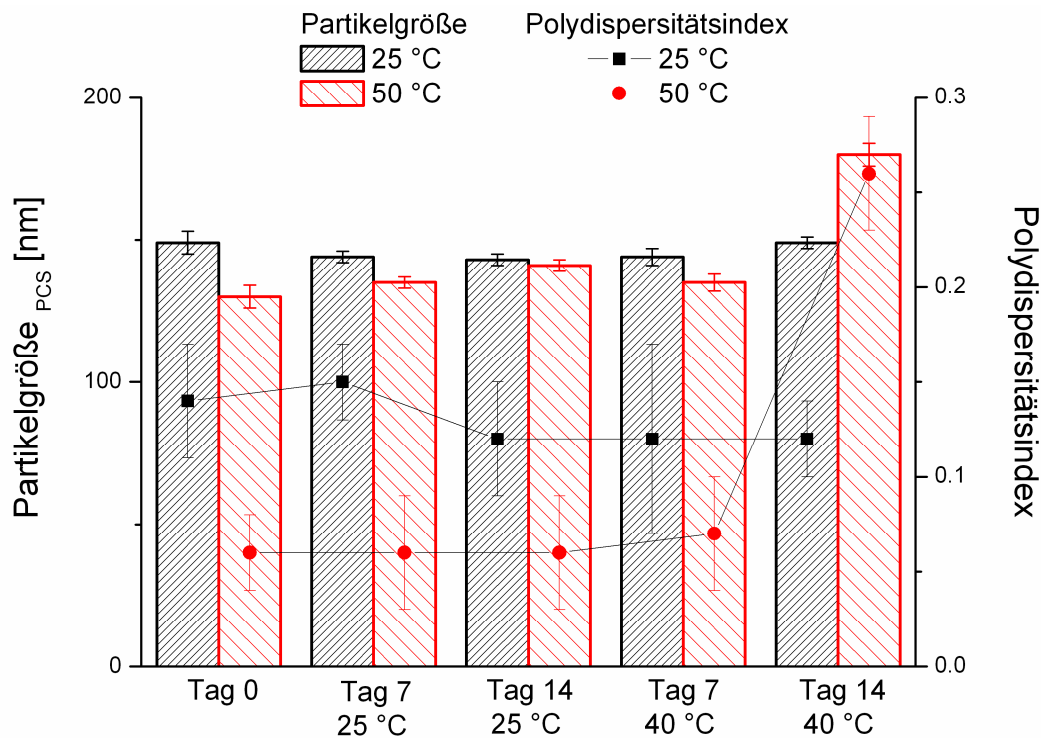


Abb. 34: Einfluss der Lagerung über 28 Tage bei 25 und 40 °C auf die mittlere Partikelgröße (bestimmt mittels Photonenkorrelationspektroskopie, PCS) und den Polydispersitätsindex zweier Everolimus-haltiger positiv geladener Nanoemulsion, die mit 10 Zyklen, 300 bar und 25 bzw. 50 °C hergestellt wurden ( $\bar{x} \pm s$ ;  $n = 5$ )

Nach Lagerung der mit 5 Zyklen bei 25 °C homogenisierten Nanoemulsion wird deutlich, dass die mittlere Partikelgröße, der PI und das ZP über 14 Tage stabil sind. Der LD-Durchmesser ist aber nur nach Lagerung bei 25 °C stabil, während die LD-Partikelgröße der bei 40 °C gelagerten Nanoemulsion von  $470 \pm 30$  nm auf  $606 \pm 20$  nm zunimmt.

Die bei 50 °C homogenisierte Nanoemulsion zeigt nach Lagerung bei 25 °C keinerlei Veränderungen der mittleren Partikelgröße, des PI und des LD-Durchmessers. Lediglich das ZP wird von  $52 \pm 5$  mV auf  $47 \pm 2$  mV reduziert, genau wie nach Lagerung bei 40 °C. Insgesamt wirkt sich eine Lagerung bei 40 °C nachteilig auf die mittlere Partikelgröße ( $180 \pm 4$  nm), den LD-Durchmesser ( $> 1 \mu\text{m}$ ) und den PI ( $0,26 \pm 0,03$ ) aus, so dass nicht mehr von einer engen Verteilung die Rede sein kann.

Die mittlere Partikelgröße der bei 25 °C homogenisierten Nanoemulsion ist sowohl nach Lagerung bei 25 als auch bei 40 °C stabil, während diese Aussage für die bei 50 °C homogenisierte Formulierung nur nach Lagerung bei 25 °C zutrifft. Nach 14 Tagen bei 40 °C beträgt die mittlere Partikelgröße  $180 \pm 4$  nm, was einem signifikanten Anstieg gleichkommt.

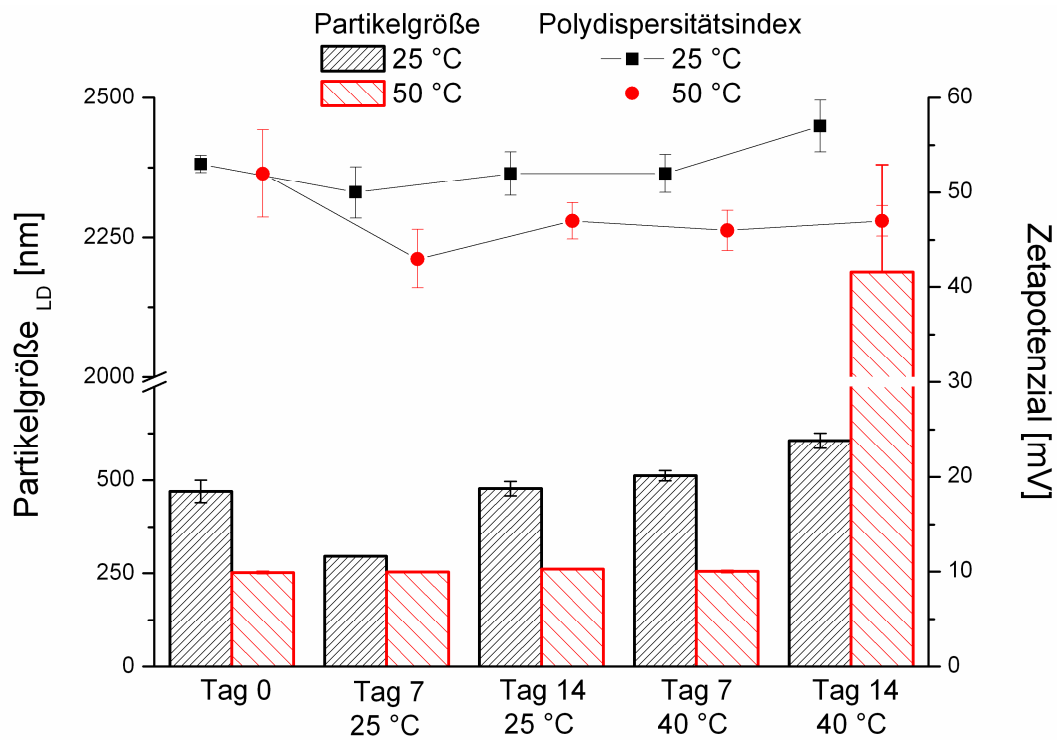


Abb. 35: Einfluss der Lagerung über 28 Tage bei 25 und 40 °C auf die Partikelgröße (bestimmt mittels Laserdiffraktometrie, LD) und das Zetapotenzial zweier Everolimus-haltiger positiv geladener Nanoemulsionen, die mit 10 Zyklen, 300 bar und 25 bzw. 50 °C hergestellt wurden ( $\bar{X} \pm s$ ;  $n = 5$ ).

Obwohl die mit 50 °C hergestellte Nanoemulsion anfangs kleinere Partikel mit einer engen Verteilung hatte, war sie nach Lagerung von 14 Tagen bei 40 °C nicht mehr physikalisch stabil. Es scheint so, als ob die sehr große Grenzfläche, die durch den hohen Energieeintrag bei der Hochdruckhomogenisation entstanden ist, längerfristig nicht zu stabilisieren ist, weil die Emulsionströpfchen koaleszieren. Dieses Phänomen des Überschreitens des Energieoptimums wurde schon von Akkar und Müller 2003b beschrieben. Die physikalische Stabilität der mit 25 °C produzierten Nanoemulsion ist als gut, aber aufgrund des LD-Durchmessers von  $> 300$  nm als suboptimal einzustufen. Nach 6 Monaten Lagerung kommt es bei der mit 50 °C hergestellten Everolimus-haltigen positiv geladenen Nanoemulsion zum Bruch der Emulsion. Die mit 25 °C produzierte Nanoemulsion hat nach diesem Zeitraum eine mittlere Partikelgröße von etwa 200 nm, einen PI  $> 0,3$  und ein ZP von etwa 50 mV (bei 25 °C gelagert) bzw. 36 mV nach Lagerung bei 40 °C (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse der physikalischen Langzeitstabilität zeigen eindeutig, dass Everolimus kein geeigneter Arzneistoff für die in dieser Arbeit verwendete Nanoemulsion darstellt, zumindest bei deren Herstellung oder Lagerung bei erhöhten Temperaturen.

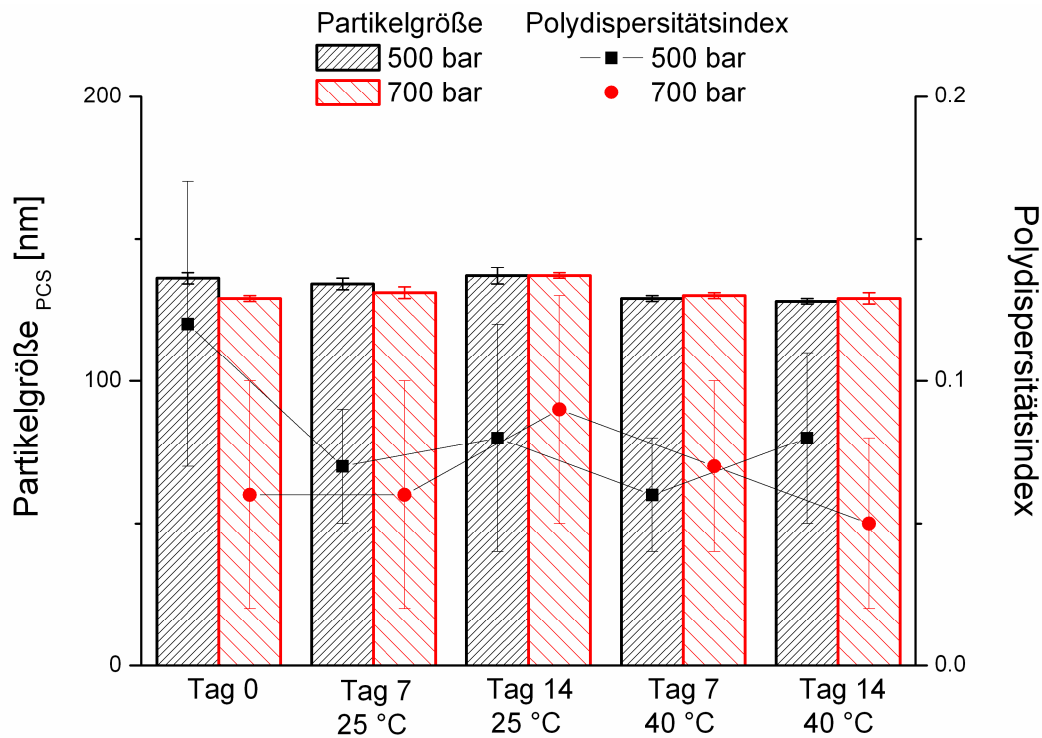


Abb. 36: Einfluss des Homogenisationsdruckes von 500 und 700 bar auf die mittlere Partikelgröße (bestimmt mittels Photonenkorrelationsspektroskopie, PCS), den PI und die Lagerstabilität einer Everolimus-haltigen, durch Phytosphingosin positiv geladenen, mit 25 °C und 10 Homogenisationszyklen produzierten Nanoemulsion ( $\bar{X} \pm s$ ;  $n = 5$ ).

Bei einer gleichbleibenden Homogenisationstemperatur (25 °C) und Anzahl der Zyklen (10) führt eine Erhöhung des Homogenisationsdruckes von 300 bar auf 500 bar bzw. auf 700 bar nicht zu einer Verkleinerung der mittleren Partikelgröße. Die Nanoemulsionströpfchen liegen zwischen  $129 \pm 1$  nm und  $136 \pm 2$  nm. Der PI wird von  $0,11 \pm 0,03$  bei 300 bar bzw. von  $0,12 \pm 0,05$  bei 500 bar auf  $0,06 \pm 0,04$  bei 700 bar reduziert. Das Zetapotenzial von  $46 \pm 3$  mV bei 300 bar wird durch die Druckerhöhung auf  $35 \pm 1$  mV bzw. auf  $36 \pm 3$  mV verkleinert. Einen zweiten positiven Effekt neben der Reduktion des PI kann man bei der LD-Partikelgröße registrieren, die von  $343 \pm 51$  nm (300 bar) auf  $241 \pm 20$  nm (500 bar) bzw. auf  $211 \pm 1$  nm (700 bar) reduziert wird.

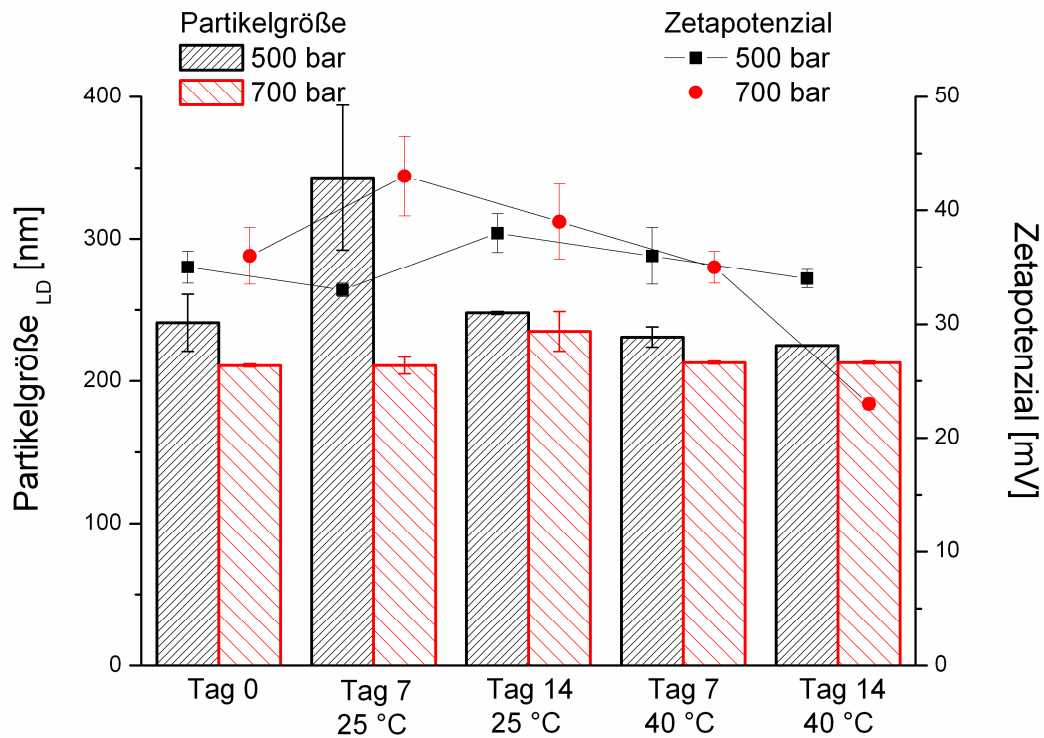


Abb. 37: Einfluss des Homogenisationsdruckes von 500 und 700 bar auf die LD-Partikelgröße (bestimmt mittels Laserdiffraktometrie, LD), das Zetapotenzial und die Lagerstabilität einer Everolimus-haltigen, durch Phytosphingosin positiv geladenen mit 25 °C und 10 Homogenisationszyklen produzierten Nanoemulsion ( $\bar{X} \pm s$ ;  $n = 5$ ).

Mit unterschiedlichen Homogenisationsdrücken hergestellte Nanoemulsionen zeigen nach 14 Tagen bei 25 bzw. 40 °C sehr stabile mittlere Partikelgrößen, unabhängig von der Lagerungstemperatur. Der PI der mit 500 bar produzierten Nanoemulsion ( $0,12 \pm 0,05$ ) wird nach 14 Tagen kleiner ( $0,08 \pm 0,04$ ), während der PI der mit 700 bar hergestellten Formulierung einen Wert von  $0,09 \pm 0,04$  bzw.  $0,05 \pm 0,03$  annimmt. Die mit 500 bar erhaltene Formulierung hat nach 14 Tagen ein praktisch unverändertes ZP von  $38 \pm 2$  mV bzw.  $34 \pm 1$  mV. Ein ebenfalls stabiles ZP ist für die Nanoemulsion mit 700 bar nach Lagerung von 14 Tagen bei 25 °C zu verzeichnen, während sich nach 14 Tagen bei 40 °C ein Wert von nur  $23 \pm 1$  mV ergibt. Die LD-Partikelgrößen sind unabhängig von dem Homogenisationsdruck und der Lagertemperatur stabil bei  $< 250$  nm.

Man kann als zusammenfassend sagen, dass für die Homogenisation von positiv geladenen Everolimus-haltigen Nanoemulsionen bei 25 °C mit 10 Zyklen ein Druck von 700 bar keinerlei Vorteile bietet. Ein Druck von 500 bar hat verglichen mit 300 bar den Vorteil eines kleineren LD-Durchmessers, während mit 300 bar das Zetapotenzial (46 mV) um etwa 10 mV höher liegt. Da aber das ZP der mit 500 bar homogenisierten Nanoemulsion stabil ist, ist

dieser Druck zur Homogenisation von Everolimus-haltigen positiv geladenen Nanoemulsion unter diesen Bedingungen mit dem LAB 40 als optimal anzusehen.

### 7.5.2 Hochdruckhomogenisation mittels EmulsiFlex C5

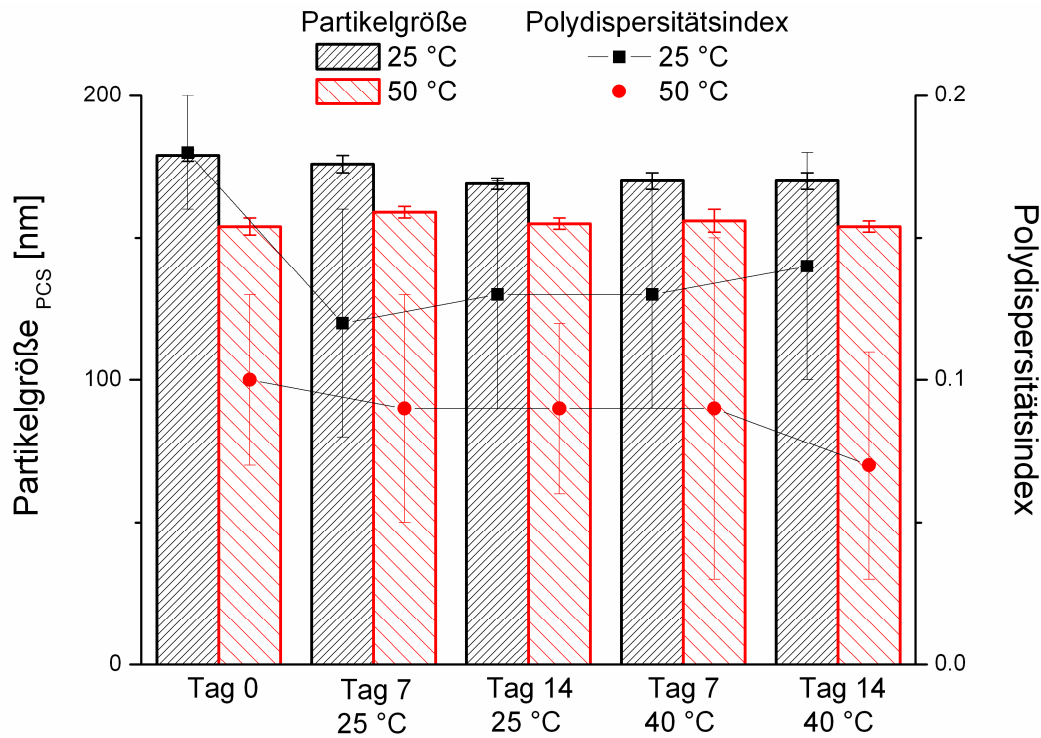


Abb. 38: Einfluss der Homogenisationstemperaturen von 25 und 50 °C auf die mittlere Partikelgröße (bestimmt mittels Photonenkorrelationsspektroskopie, PCS), den PI und die Lagerstabilität einer mit dem EmulsiFlex C5 mit 300 bar und 10 Homogenisationszyklen produzierten Everolimus-haltigen, durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsion ( $\bar{x} \pm s$ ; n = 5).

Eine Erhöhung der Homogenisationstemperatur von 25 auf 50 °C führt zur Verringerung der mittleren Partikelgröße (von  $179 \pm 2$  nm auf  $154 \pm 3$  nm), des PI (von  $0,18 \pm 0,02$  auf  $0,1 \pm 0,03$ ), des ZP (von  $49 \pm 1$  mV auf  $42 \pm 2$  mV) und des LD-Durchmessers (von  $486 \pm 46$  nm auf  $284 \pm 1$  nm). Die mittlere Partikelgröße und der LD-Durchmesser der mit 25 °C homogenisierten Nanoemulsion bleiben nach Lagerung von 14 Tagen bei 25 und 40 °C stabil, der PI wird sogar etwas kleiner. Nach Lagerung bei 25 °C bleibt das ZP konstant, bei 40 °C gelagert nimmt das ZP von  $49 \pm 1$  mV auf  $32 \pm 1$  mV ab. Erhöhte Lagertemperaturen sorgen für eine erhöhte Fluidität der Emulgator-PS-Kombination in der Grenzschicht, wodurch sich sowohl die Emulgatormoleküle als auch das PS besser bewegen können. Das stabile ZP nach Lagerung bei 25 °C deutet darauf hin, dass PS auch weiterhin in der Grenzschicht lokalisiert ist und dadurch verstärkt für eine elektrostatische Abstoßung sorgt. Wenn die Grenzschicht

aber durch eine erhöhte Temperatur fluider wird, könnte die starre Struktur an Stabilität verlieren und es kommt zum Abfall des ZP. Durch die verringerte Rigidität der Grenschicht könnte PS aus der Grenschicht hinausdiffundieren, was auch die geringe Abnahme der mittleren Partikelgröße nach Lagerung erklären würde. Da sämtliche LD-Partikelgrößen nach Lagerung bei etwa 500 nm liegen, scheidet die Temperatur von 25 °C für eine Homogenisation von Everolimus-haltigen positiv geladenen Nanoemulsion mit dem Emulsiflex C 5 aus. Der Energieeintrag durch eine Homogenisation bei 25 °C reicht für eine Langzeitstabilität des LD-Durchmessers nicht aus.

Bei einer Homogenisation mit 50 °C sind unabhängig von der Lagertemperatur die mittlere Partikelgröße, der PI, das ZP und der LD-Durchmesser sehr stabil. Gegenüber der Homogenisationstemperatur von 25 °C haben 50 °C den Vorteil, dass die hergestellte Nanoemulsion kleinere Partikel mit einer deutlich engeren Verteilung aufweisen. Nur das ZP ist etwas kleiner, aber immer noch deutlich > 30 mV.

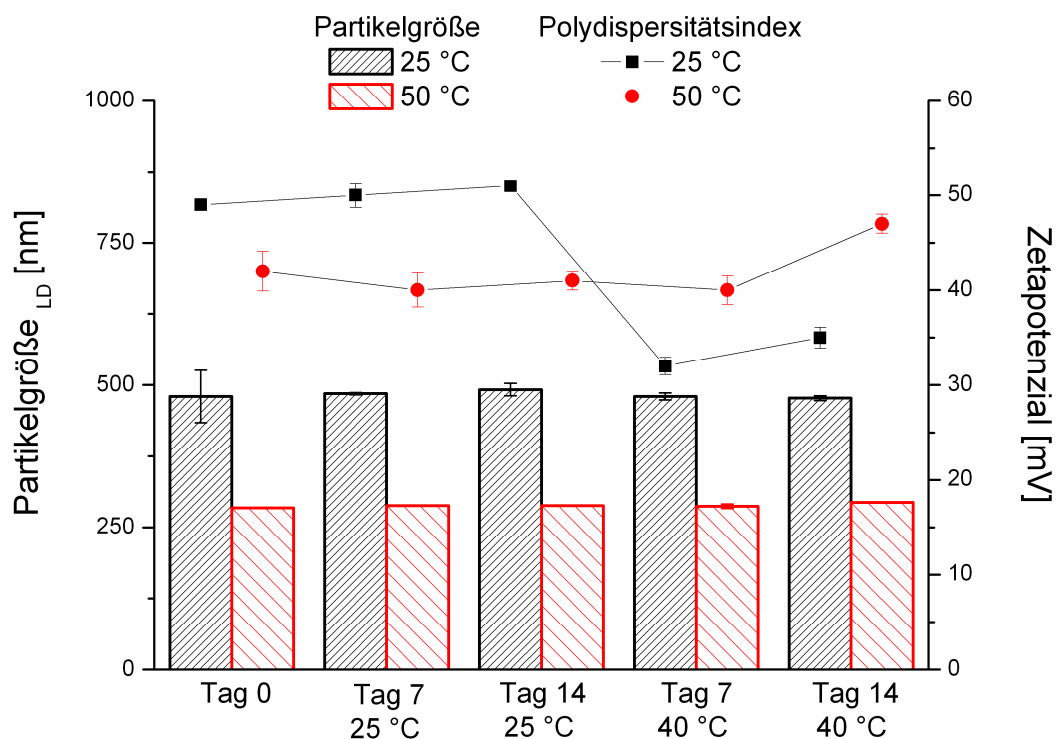


Abb. 39: Einfluss der Homogenisationstemperaturen von 25 und 50 °C auf die LD-Partikelgröße (bestimmt mittels Laserdiffraktometrie, LD), das Zetapotenzial und die Lagerstabilität einer mit dem Emulsiflex C5 bei 300 bar und 10 Homogenisationszyklen produzierten Everolimus-haltigen, durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsion ( $\bar{X} \pm s$ ; n = 5).

## 7.6 Sirolimus-Nanoemulsionen

### 7.6.1 Hochdruckhomogenisation mittels LAB 40

Homogenisation mit steigender Zyklenzahl führt sowohl bei 25 als auch bei 50 °C zu einer Reduktion der mittleren Partikelgröße, des PI, des LD-Durchmessers und auch des ZP. Bis auf die kleiner werdenden ZP-Werte sind die restlichen Ergebnisse erwünscht. Eine Erhöhung der Zyklenzahl von 1 auf 3 macht sich bei der Partikelverkleinerung mit 25 °C (von  $221 \pm 9$  nm auf  $165 \pm 2$  nm) stärker bemerkbar als bei 50 °C (von  $183 \pm 4$  nm auf  $154 \pm 4$  nm). Ab einer Zyklenzahl von 5 ist zwischen beiden Homogenisationstemperaturen kein Unterschied der mittleren Partikelgrößen mehr feststellbar. Die effektivste Verringerung des PI wird durch Erhöhung der Zyklenzahl von 1 auf 3 erreicht (von  $0,3 \pm 0,03$  auf  $0,16 \pm 0,02$  bei 25 °C und von  $0,19 \pm 0,03$  auf  $0,12 \pm 0,03$  bei 50 °C). Nach 10 Zyklen beträgt der PI nur noch  $0,08 \pm 0,02$  bzw.  $0,07 \pm 0,03$ . Die Zetapotenziale nehmen von  $59 \pm 0,7$  mV auf  $50 \pm 0,4$  mV (25 °C) bzw. von  $58 \pm 0,8$  mV auf  $46 \pm 0,3$  mV ab (50 °C). Das Ziel keine Partikel  $> 500$  nm zu haben wird bei 25 °C nach 8 Zyklen und bei 50 °C schon nach 1 Zyklus erreicht.

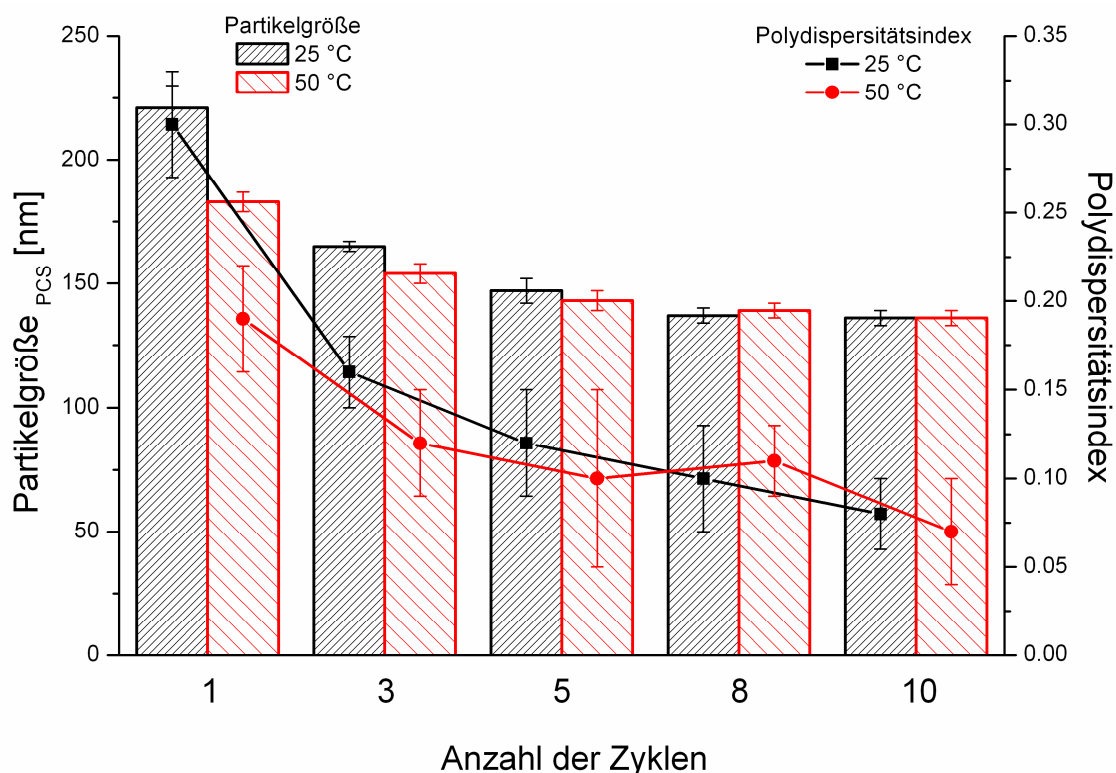


Abb. 40: Einfluss der Homogenisationstemperaturen von 25 und 50 °C und der Anzahl der Zyklen auf die mittlere Partikelgröße (bestimmt mittels Photonenkorrelationsspektroskopie, PCS) und den PI einer mit 300 bar und 10 Homogenisationszyklen produzierten Sirolimus-haltigen, durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsion ( $\bar{X} \pm s$ ;  $n = 5$ ).

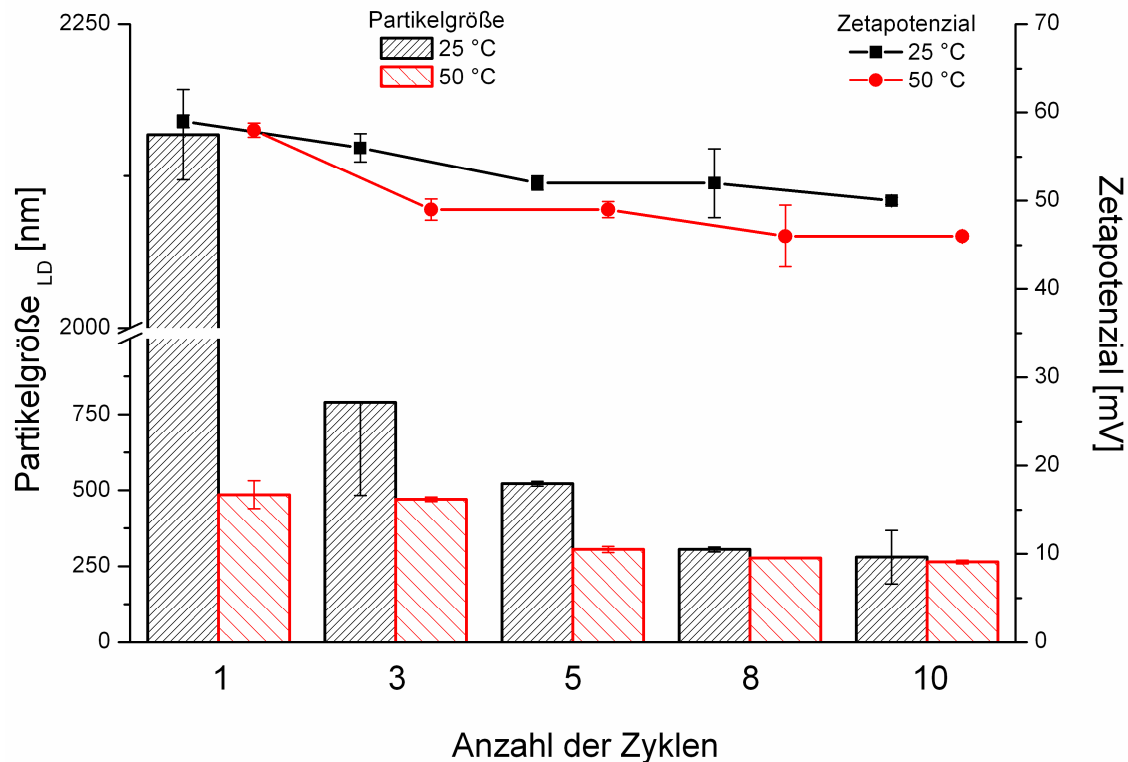


Abb. 41: Einfluss der Homogenisationstemperaturen von 25 und 50 °C und der Anzahl der Zyklen auf die LD-Partikelgröße (mittels Laserdiffraktometrie, LD) und das Zetapotenzial einer mit 300 bar und 10 Homogenisationszyklen produzierten Sirolimus-haltigen, durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsion ( $\bar{X} \pm s$ ; n = 5).

Die mit 50 °C homogenisierte Nanoemulsion hat im Vergleich zu der mit 25 °C homogenisierten einen kleinere mittlere Partikelgröße, einen kleineren PI, kleinere ZP-Werte und geringere LD-Durchmesser. Allerdings nehmen die Unterschiede mit steigender Anzahl an Zyklen immer mehr ab. Diese Ergebnisse der Partikelverkleinerung und der PI-Verkleinerung sind mit der Reduktion der Viskosität der Ölphase von  $72,4 \pm 0,07$  (25 °C) auf  $22,74 \pm 0,06$  (50 °C) erklärbar (Tab. 17).



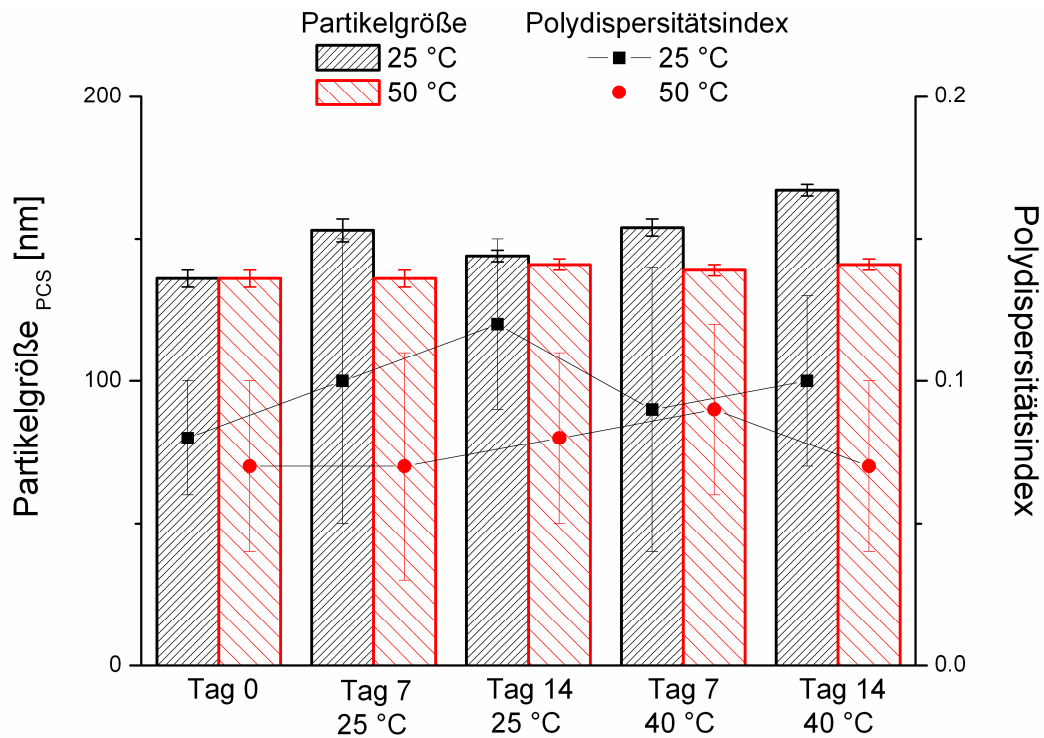


Abb. 42: Einfluss der Lagerung auf mittlere Partikelgröße (bestimmt mittels Photonenkorrelationspektroskopie, PCS) und den PI von Sirolimus-haltigen, durch Phytosphingosin positiv geladenen, mit 300 bar, 10 Homogenisationszyklen und 25 bzw. 50 °C produzierten Nanoemulsionen ( $\bar{X} \pm s$ ; n = 5).

Nach Lagerung von 14 Tagen bei 25 °C bleiben bei der mit 25 °C hergestellten Nanoemulsion die mittlere Partikelgröße, das ZP und der LD-Durchmesser stabil, der PI wird etwas größer (von 0,08 auf 0,12), während nach Lagerung bei 40 °C alle untersuchten Werte, inklusive dem ZP, größer werden. Im Gegensatz dazu ist die mit 50 °C homogenisierte Nanoemulsion auch nach Lagerung äußerst stabil.

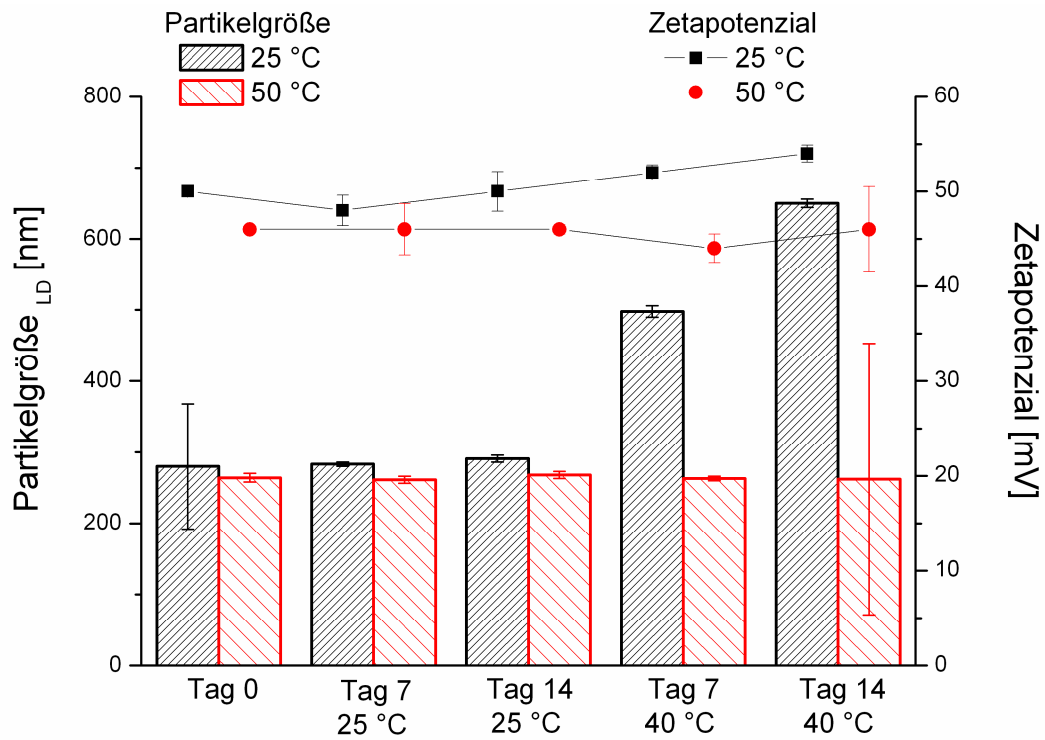


Abb. 43: Einfluss der Lagerung auf die LD-Partikelgröße (bestimmt mittels Laserdiffraktometrie, LD) und das Zetapotenzial von Sirolimus-haltigen, durch Phytosphingosin positiv geladenen, mit 300 bar, 10 Homogenisationszyklen und 25 bzw. 50 °C produzierten Nanoemulsionen ( $\bar{x} \pm s$ ; n = 5).

## 7.6.2 Untersuchung der chemischen Stabilität

Die Untersuchung des Gehalts an Everolimus und Sirolimus zeigte schon unmittelbar nach der Homogenisation eine drastische Reduzierung der ursprünglichen Arzneistoff-Menge auf ca. nur noch 20 % der ursprünglich eingesetzten Arzneistoffmenge vorlag. Auf der Suche nach der Ursache für diese drastische Reduzierung des Arzneistoffgehalts, wurden die Homogenisationsparameter einzeln variiert und der Einfluss auf den Arzneistoffgehalt untersucht. Eine Änderung der Homogenisationstemperatur von 50 auf 25 °C zeigte keinen Unterschied, d. h. der Gehalt war sehr niedrig. Da schon mit einem niedrigen Druck von 300 bar gearbeitet wurde, lag es nahe den Einfluss der Zyklenanzahl auf den Gehalt zu untersuchen. Dafür wurde nach jedem der zehn Zyklen eine Probe entnommen und der Gehalt mittels HPLC untersucht. Das Ergebnis blieb unverändert. Das läßt den Schluß zu, das ein Vorgang, der unmittelbar mit dem Homogenisieren zusammenhängt oder die Hochdruck-homogenisation an sich für die Reduktion des Arzneistoffgehalts verantwortlich ist und nicht wie zunächst angedacht die Prozessparameter. Vermutlich wirken sich die während der Homogenisation kurzzeitig entstehenden Drücke von bis zu einigen tausend bar nachteilig auf die chemische Stabilität aus. Außerdem entstehen beim Homogenisieren kurzzeitig hohe Temperaturspitzen von deutlich über 100 °C. Bedenkt man, dass sowohl Everolimus als auch Sirolimus thermolabil sind, ist das Phänomen des chemischen Abbaus des Arzneistoffs damit erklärbar. Es wäre angebracht bei Temperaturen zwischen 2 – 8 °C Nanoemulsionen zu produzieren und den Arzneistoffgehalt zu untersuchen. Das ist allerdings mit Phytosphingosin-haltigen, positiv geladenen Nanoemulsionen problematisch, da PS bei Temperaturen < 20 °C aus EG wieder ausfällt.

## 7.7 Freisetzung

Bei der durch Phytosphingosin positiv geladenen Nanoemulsion betrug der freigesetzte Anteil nach 24 h 9,5 % (119 µg) und 14 % (175 µg) bei der mit Myristinsäure negativ geladenen Nanoemulsion. Umso erstaunlicher sind deshalb die Ergebnisse der Penetrationsstudien zu bewerten. Der unterschiedliche Anteil an freigesetztem Arzneistoff beider Formulierungen kann mit den kleineren Partikeln der negativ geladenen Nanoemulsion begründet werden (etwa 130 nm), während die positiv geladenen Nanoemulsionen rund 160 nm klein waren. Je kleiner die Partikel sind, desto größer ist die Oberfläche und damit herrscht ein größerer Lösungsdruck über den Partikeln. Wang et al. 2006 haben das Freisetzungsverhalten von Nalbuphin und zweier Prodrugs mit verschiedenen Emulgatoren untersucht. Sie haben dabei festgestellt, dass die Freisetzungsrates entscheidend von dem Co-Emulgator abhängt. Interessanterweise war die Freisetzung der Arzneistoffe in Formulierungen mit Stearylamin am geringsten. Diese Formulierung hatte im Gegensatz zu den restlichen ein positives Zetapotential. In dieser Arbeit wurde ein sehr ähnliches Ergebnis erzielt. Die positiv geladene Nanoemulsion zeigt eine deutlich geringere Freisetzungsrates als die negativ geladene. Da der einzige Unterschied zwischen den Nanoemulsionen, neben der für die Freisetzung mit entscheidenden Partikelgröße, die Ladung ist, scheint die ladungsverursachende Komponente verantwortlich zu sein für die unterschiedliche Freisetzungsrates.

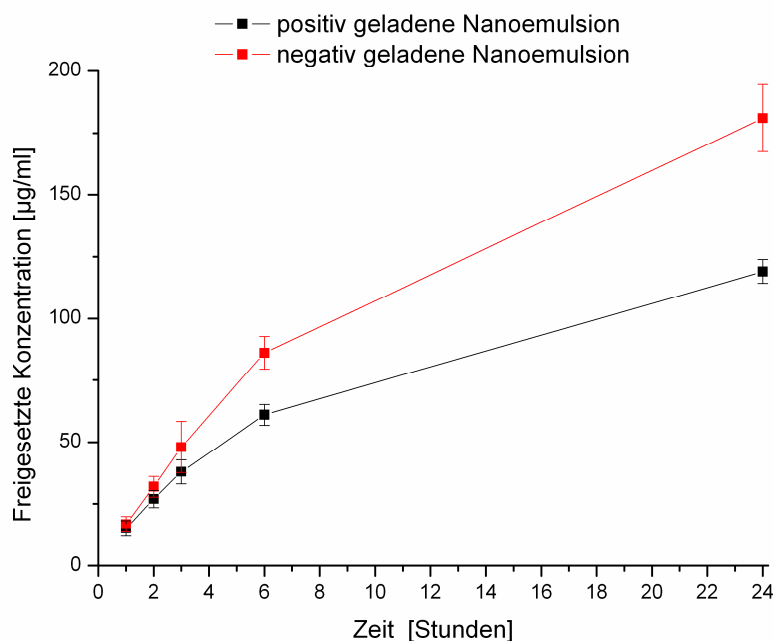


Abb. 44: Freisetzungsprofile der negativ geladenen und der positiv geladenen Prednicarbat-haltigen Nanoemulsion ( $\bar{X} \pm s$ ; n = 6)

## 7.8 Penetration in die exzidierte Humanhaut

Die Penetration negativ und positiv geladener Nanoemulsionen wurde an exzidiierter Humanhaut zeigt, dass bei einer applizierten Menge von 1250  $\mu\text{g}$  PC der Anteil an PC inkl. den Metaboliten, der aus der positiv geladenen Nanoemulsion in die Haut penetriert  $17,59 \pm 3,67 \mu\text{g}$  betrug, während und  $12,71 \pm 3,35 \mu\text{g}$  bei den negativ geladenen Nanoemulsionen in die Haut penetriert (Tab. 26). Dieses Ergebnis ist umso erstaunlicher, berücksichtigt man, dass Prednicarbat aus der negativ geladenen Nanoemulsion deutlich schneller freigesetzt wird, als das der positiv geladenen Formulierung.

Tab 26: Nach der Extraktion aus exzidiierter Humanhaut bestimmte Prednicarbatmenge (inkl. der Metaboliten) per HPLC

Ladung der Nanoemulsion	Menge an Prednicarbat [ $\mu\text{g}$ ]		
	Hautoberfläche	Epidermis und Dermis	Wiederfindungsrate [%]
positiv	$1109 \pm 130$	$17,59 \pm 3,67$	90
negativ	$1184 \pm 53$	$12,71 \pm 3,35$	96

Die Penetrationsergebnisse zeigen zwischen den positiv und negativ geladenen Nanoemulsionen einen signifikanten Unterschied. Wie in der Literatur schon mehrfach gezeigt, führen Formulierungen mit einer positiven Ladung zu einer gesteigerten Arzneistoffpenetration und –permeation, weil durch Wechselwirkung mit der Oberfläche der negativ geladenen Korneozyten eine stärkere Fixierung an das Stratum corneum zeigen (Song und Kim 2006). Die Diffusionseigenschaften positiv und negativ geladener Nanoemulsionen mit Miconazol und Econazol wurden an der weiblichen haarlosen Ratte getestet (Piemi et al. 1999). Dabei wurden bei den positiv geladenen Nanoemulsionen sowohl bei Miconazol als auch bei Econazol höhere Arzneistoffmengen im Akzeptormedium, in der Dermis und in der Epidermis und somit auch eine höhere Gesamtmenge gefunden.

Die positiv geladene Nanoemulsion führt trotz einer langsameren Freisetzung als die negativ geladene Nanoemulsion zu einer besseren Penetration in die Humanhaut. Die Gründe liegen bei dem hohen Lösungsdruck der Nanoemulsionen und einer verstärkte Interaktion der positiv geladenen Tröpfchen mit der negativ geladenen Haut.

Zur statistischen Absicherung der Ergebnisse wurde die Normalverteilung überprüft. Dazu wurden der arithmetische Mittelwert gegen den Median und die Standardabweichung

verglichen und es wurde ein Shapiro-Wilk-Test durchgeführt. Die Nullhypothese Normalverteilung konnte nicht verworfen werden, d.h. es lag eine Normalverteilung vor. Ein Ausreisser-Test nach Dixon zeigte, dass keine Ausreisser vorlagen. Schließlich konnte mit einem Zweistichproben-t-Test gezeigt werden, dass der Unterschied in der Penetration zwischen der positiv und der negativ geladenen Nanoemulsion mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha < 5 \%$  nicht zufällig ist.

Dieser Unterschied liegt in der erhöhten Anziehung der positiv geladenen Nanoemulsion mit der negativ geladenen Haut. Durch diese verstärkte Interaktion kommt es zu einer erhöhten Penetration.

## 7.9 Permeation durch die Schweinecornea

Ein Arzneistoff muss sowohl hydrophile als auch lipophile Struktureigenschaften vorweisen, um durch die unterschiedlichen Schichten der Cornea zu permeieren. Dabei müssen nacheinander die äußere Lipidschicht (Epithel), die mittlere wässrige Schicht (Stroma) und die innere Lipidschicht (Endothel) überwunden werden. Die Applikation von Mikroemulsionen ist in diesem Fall vorteilhaft, da das Tensid und das Kotensid die Membranpermeabilität erhöhen, die Penetration verbessern bzw. die Arzneistoff-Passage durch die Cornea erleichtern. Permeationsuntersuchungen einer Sirolimus-haltigen Mikroemulsion brachten kein zufriedenstellendes Ergebnis. Erst nach Entfernen des Epithels, der Hauptdiffusionsbarriere der Hornhaut, wurde eine Konzentration gemessen, die mit etwa 10 ng/ml immer noch unter dem therapeutischen Bereich von 12-20 ng/ml anzusiedeln ist. Bei der Entwicklung des halbsynthetischen Sirolimus-Derivats Everolimus bestand das primäre Ziel darin, die schlechte Bioverfügbarkeit zu verbessern, hauptsächlich über eine Verbesserung der Löslichkeit. Sirolimus hat eine Löslichkeit von 2,6 µg/ml, während Everolimus schon deutlich besser wasserlöslich ist (20 µg/ml). Deshalb ist es nicht überraschend, dass Everolimus deutlich besser durch die Cornea permeiert als Sirolimus. Ein Vergleich der Verteilungskoeffizienten bringt zum Vorschein, dass Everolimus hydrophober als Sirolimus ist und somit durch das Hornhaut-Epithel besser permeieren kann.

Bei den Permeationsuntersuchungen durch die Schweinecornea wurde schon nach 30 min eine Konzentration von 8,64 ng/ml im Akzeptormedium gemessen werden. Nach 60 min bzw. 240 min war ein Gehalt von rund 12 ng/ml bzw. 16 ng/ml feststellbar.

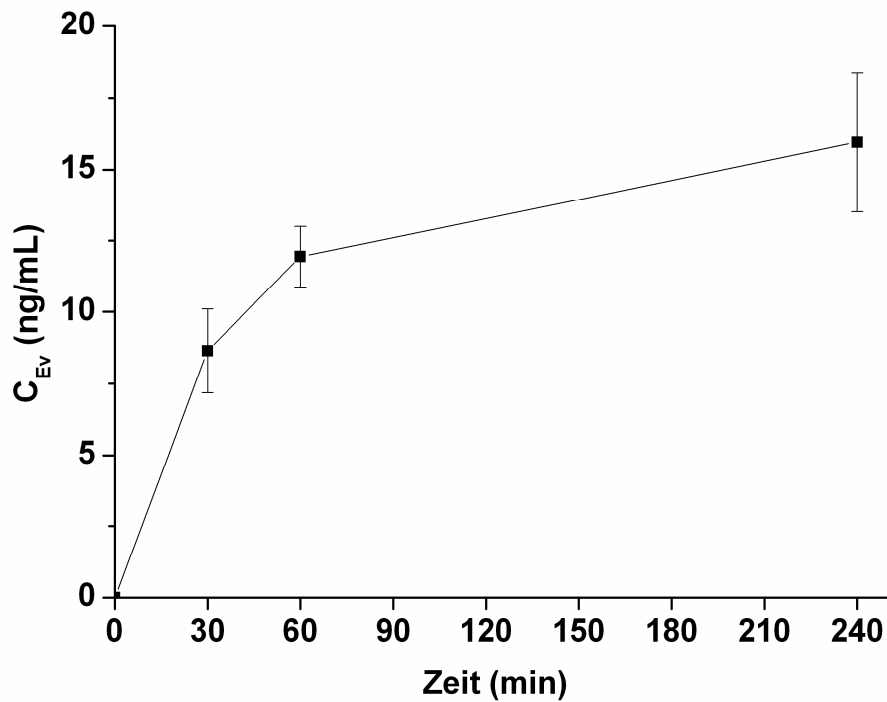


Abb. 45: Permeation von Everolimus durch frisch isolierte Schweinecornea ( $c_{EV}$  = Everolimus-Konzentration im Akzeptormedium) ( $\bar{X} \pm s$ ; n = 5).

## 7.10 Statistik

Alle Messwerte mit ausreichendem Stichprobenumfang wurden auf Ausreisser (nach Dixon) und auf Normalverteilung (Vergleich von Median, arithmetischem Mittelwert und Standardabweichung und Shapiro-Wilk-Test) getestet. Die Mittelwerte wurden auf signifikante Unterschiede durch den t-Test geprüft (Irrtumswahrscheinlichkeit < 0,05).



## 8 Zusammenfassung

### **Prednicarbat-Nanoemulsionen**

Das Problem vieler neuer und auch bereits vorhandener Arzneistoffe liegt in der schlechten Löslichkeit. Diese limitiert die Bioverfügbarkeit, wodurch es zu verminderter oder evtl. keiner Wirkung kommt. Aus diesem Grund sind neue Strategien und Formulierungen notwendig. Eine Möglichkeit liegt in der Entwicklung von nanopartikulären Trägersystemen, z.B. Nanoemulsionen. Die in dieser Arbeit untersuchten Formulierungen sind vorzugsweise zur dermalen Applikation gedacht. Aufgrund der negativen Ladung der Haut wird durch eine verstärkte Interaktion positiv geladener Nanoemulsionen eine verbesserte Penetration erwartet. Diese Annahme wird anhand der Penetration des schwerlöslichen Glucocorticoids Prednicarbat überprüft. Zur positiven Aufladung wurde in dieser Arbeit Phytosphingosin (PS) verwendet. Diese Substanz hat gegenüber dem in der Regel verwendeten Stearylamin den Vorteil, dass es nicht toxisch ist. PS ist bereits in Kosmetika zur Behandlung der Akne vulgaris zugelassen. Außerdem hat es gewisse antimikrobielle Eigenschaften beispielsweise gegen *Staphylokokkus aureus*, das gehäuft auf der Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis vorkommt. Weiterhin ist diese Substanz Bestandteil von Ceramiden und spielt bei deren Synthese und bei der Barrierefunktion des Stratum corneum eine wichtige Rolle. Allerdings ist auch bei dieser Substanz das Hauptproblem die schlechte Löslichkeit. Dafür musste ein geeignetes Öl für die O/W-Nanoemulsionen gefunden werden, das sowohl PS als auch Prednicarbat in ausreichender Konzentration löst. Prednicarbat war in mehreren getesteten Ölen löslich, während PS nach Lösen in diversen Ölkomponenten bei hohen Temperaturen beim Abkühlen wieder ausfiel. Einzig Eutanol G (Octyldodecanol) war in der Lage, das PS in Lösung zu halten. Mit diesem Öl wurden positiv geladene Nanoemulsionen per Hochdruckhomogenisation durch Variation der Homogenisationsparameter Temperatur (25 und 50 °C), Druck (300, 500 und 700 bar) und Anzahl der Zyklen (3, 5, 8 und 10) hergestellt und charakterisiert. Eine Homogenisation bei 25 °C führt mit steigendem Druck und steigender Anzahl an Zyklen zu Partikeln mit immer kleiner werdenden mittleren Partikelgrößen und Polydispersitätsindices. Bei 50 °C hingegen führte eine Druckerhöhung und Steigerung der Zyklenzahl zu größeren Partikeln. Der Prednicarbat-Gehalt der Formulierung, die mit 50 °C, 10 Zyklen und 300 bar hergestellt wurde, war auch nach Lagerung am größten. Ein höherer Druck führt zur Überschreitung des optimalen Energieeintrages in das System (Akkar und Müller 2003b). Dabei nehmen die Grenzfläche

und damit auch die Grenzflächenenergie stark zu. Als Folge koaleszieren die vermutlich anfänglich kleinen Emulsionströpfchen bei einem weiteren Energieeintrag in das System. Eine Stabilisierung dieser Grenzfläche kann durch den Einbau von Emulgator-Molekülen erreicht werden. Dieses Phänomen, dass eine Erhöhung des Homogenisationsdrucks zu einer Erhöhung der mittleren Partikelgröße führt, ist beispielsweise von Trotta et al. 2002 beschrieben worden. Die Untersuchung des Prednicarbat-Gehaltes brachte einen klaren Zusammenhang zwischen den Prozessparametern und dem Arzneistoff-Gehalt hervor.

Als nächstes wurde die Rezepturzusammensetzung optimiert, indem folgende Komponenten bzw. deren Konzentration variiert und die Stabilität untersucht wurden:

- Phytosphingosin (0,3 – 0,7 %),
- Eutanol G (10 – 20 %),
- Lipide (Soja- und Ei-Phospholipide),
- Lipoid (0,5 – 3%) und
- Tween 80 (0,5 – 3 %).

Dabei wurden 0,6 % PS, 20 % Eutanol G, 2 % Lipoid E80 und 2 % Tween 80 als die optimalen Konzentrationen bestimmt.

Eine Kombination aus dem Emulgator Lipoid E80, das sich zusammen mit Phytosphingosin in die O/W-Grenzfläche einlagert und somit für eine elektrostatische Stabilisierung verantwortlich ist, und dem Emulgator Tween 80 zur sterischen Stabilisierung, führen letztlich zu der erreichten sehr guten Stabilität. Durch diese Kombination aus bestmöglichen Prozess- und Rezepturparametern resultiert auch eine sehr gute chemische Stabilität, weil sich Prednicarbat vermutlich mit in die O/W-Grenzschicht einlagert. Durch die Einlagerung des Arzneistoffs, des Lipoids E80 und von Phytosphingosin in die Grenzfläche und des sterischen Stabilisators Tween 80 wird ein Kontakt mit bzw. ein Übergang des Prednicarbats in die Wasserphase reduziert. Das Ergebnis ist ein sehr hoher Gehalt an Prednicarbat nach 1 Jahr Lagerung.

Zum Nachweis der verbesserten Wirksamkeit einer positiv geladenen Nanoemulsion wurde als nächstes eine mit Myristinsäure negativ geladene Prednicarbat-haltige Nanoemulsion hergestellt. Sowohl von der negativ als auch von der positiv geladenen Nanoemulsion wurden die Freisetzung und auch die Penetration an exzidiierter Haut vergleichend untersucht. Bei einer Applikation von 1250 µg Prednicarbat betrug bei der negativ geladenen Nanoemulsion die freigesetzte Menge 175 µg nach 24 h, und 119 µg nach 24 h bei der positiv geladenen Nanoemulsion. Diese Mengen entsprechen einem Anteil von 14 % für die negativ geladene und 9,5 % für die positiv geladene Nanoemulsion. Nach Applikation von 1250 µg PC

penetrierte bei der positiv geladenen Nanoemulsion mehr in die Haut (17,6 µg) als bei der negativ geladenen Nanoemulsion (12,7 µg). Dieser Unterschied ist durch die verstärkte Wechselwirkung der positiv geladenen Formulierung mit der negativ geladenen Haut zu erklären. Durch die verstärkte Interaktion der positiv geladenen Nanoemulsion kommt es zu einer besseren Spreitung auf der Hautoberfläche, beschrieben durch Messungen des Kontaktwinkels als Vergleich zwischen einer positiv geladenen und einer negativ geladenen Formulierung (Yilmaz 2005). Klang et al. 2000 haben den Kontaktwinkel zwischen der Augen-Cornea und positiv bzw. negativ geladenen Emulsionen gemessen. Die Cornea trägt wie alle menschlichen Gewebe eine negative Oberflächenladung (Rojanasakul et al. 1992). Die positiv geladene Emulsion hatte einen signifikant kleineren Winkel zu der Cornea als die negativ geladene Emulsion, was einem besseren Kontakt gleichkommt.

Ein Vergleich zwischen den Homogenisatoren Micron LAB40 und Emulsiflex C5 zeigte letztlich nur geringe Unterschiede, die hauptsächlich etwas niedrigeren, aber immer noch akzeptablen Zetapotenziale betrafen.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse die hervorragende physikalische Stabilität der positiv geladenen Prednicarbat-haltigen Nanoemulsion und den hohen Prednicarbat-Gehalt nach Lagerung von 1 Jahr bei 25 und 40 °C.

## **Everolimus- und Sirolimus-Nanoemulsionen zur dermalen Applikation**

Die Standardtherapie von entzündlichen Hautkrankheiten erfolgt mit topischen Glucocorticoiden. Da diese Therapie mit einigen Nebenwirkungen verbunden ist, läuft die Suche nach alternativen Arzneistoffen zur dermalen Anwendung auf Hochtouren. Ansatz ist dabei der Eingriff in das Immunsystem, um die entzündlichen Reaktionen zu unterdrücken. Es gibt bereits neben den Glucocorticoiden viele andere Vertreter der Immunsuppressiva, wie z.B. die Calcineurin- oder mTOR-Inhibitoren, die gegen entzündliche Prozesse eingesetzt werden. Das Problem dieser Arzneistoffe ist die schlechte Wasserlöslichkeit und die eingeschränkte Penetration in die Haut. In der Dermatologie gilt als Faustregel, dass Arzneistoffe u.a. mit einem Molekulargewicht 500 Da nicht in die intakte Haut eindringen. Angewendet werden sollen sie aber beispielsweise bei atopischer Dermatitis, bei der die Barrierefunktion der Haut ohnehin schon gestört ist. So konnten Ormerod et al. 2005 eine Penetration von Sirolimus in die Haut nachweisen. Die dabei verwendeten Lösungen bestanden aus Caprylsäure, Isopropylmyristat und Benzylalkohol.

Besser wäre es, eine bereits bekannte Formulierung zu untersuchen. Deshalb wurden in dieser Arbeit Everolimus und Sirolimus in eine positiv geladene Nanoemulsion eingearbeitet, um die Penetration an exzidiierter Humanhaut zu untersuchen.

Die Nanoemulsionen wurden per Hochdruckhomogenisation durch Variation diverser Parameter (Temperatur, Druck und Anzahl der Zyklen) hergestellt und die physikalische Stabilität nach Lagerung untersucht. Die Mehrzahl der hergestellten Nanoemulsionen waren über mind. 14 Tage Lagerung bei 25 und 40 °C physikalisch stabil, nach 6 Monaten trat allerdings meist eine Phasenseparation ein. Der Arzneistoffgehalt der Nanoemulsionen wurde per HPLC untersucht. Dabei wurde leider festgestellt, dass der Gehalt sowohl an Everolimus als auch an Sirolimus in den Nanoemulsionen stark abnimmt, weshalb vorerst auf eine Untersuchung der Penetration verzichtet wurde. Es scheint so, dass die Methode der Hochdruckhomogenisation für die Produktion von positiv geladenen, Phytosphingosin-haltigen Nanoemulsionen für diese Wirkstoffe nicht geeignet ist. Vermutlich sind die kurzzeitig während der Homogenisation entstehenden Temperaturspitzen von deutlich mehr als 100 °C bei den eher thermolabilen mTOR-Inhibitoren entscheidend für die Reduktion des Gehalts. Eine Produktion bei einer Temperatur deutlich unter 20 °C würde evtl. neue Erkenntnisse bringen. Allerdings ist eine Homogenisation bei diesen niedrigen Temperaturen mit PS und EG nicht möglich, da PS bei unter 20 °C wieder auskristallisiert.

## **Everolimus-Mikroemulsion zur ophthalmologischen Applikation**

Bei einer jährlichen Cornea-Transplantationsrate von etwa 5000 allein in Deutschland ist es dringend erforderlich andere, lokal am Auge anwendbare Arzneistoffe als alternative zu den bereits seit mehr als 50 Jahren angewendeten Glucocorticoide (GC), die mit einer Reihe von Nebenwirkungen verbunden sind zu etablieren. Eine systemische Applikation sowohl von GC als auch von neuartigen Immunsuppressiva belastet unnötig den Organismus und ist auch mit Nebenwirkungen verbunden. Idealerweise sollte eine ophthalmologische Therapie im vorderen Augenbereich lokal erfolgen. In den letzten Jahren wurden vermehrt alternativ zu den GC an Calcineurin- und mTOR-Inhibitoren geforscht, Immunsuppressiva mit einem anderen Wirkprinzip als GC. Indiziert sind diese Arzneistoffe u.a. zur Prophylaxe der Transplantatabstoßung diverser Organe oder bei schweren Verlaufsformen entzündlicher Hauterkrankungen. Leider ist es bisher nicht gelungen, weder einen der Vertreter der Calcineurin-Inhibitoren (Ciclosporin, Tacrolimus oder Pimecrolimus) noch einen mTOR-Inhibitor (Everolimus und Sirolimus) in einer ophthalmologisch anwendbaren Arzneiform zu etablieren (Tabelle 11, 12, 13 und 15). Der Grund liegt einerseits in der schlechten Löslichkeit der Arzneistoffe, was eine Applikation als wässrige Augentropfen praktisch ausschließt und andererseits oft in einer unzureichenden Permeation durch die Hauptbarriere, die Cornea. Untersuchungen der Permeation von Sirolimus an Schweinecornea führten zu dem Ergebnis, dass die Permeation unzureichend ist, um einen therapeutisch wirksamen Plasmakonzentrationsbereich von 12-20 ng/ml zu erzielen. Im Akzeptormedium wurden nach 240 min etwa 4 ng/ml gemessen und nach Entfernen des Hornhautepithels rund 10 ng/ml. In dieser Arbeit wurde die Permeation an frisch isolierter Schweinecornea einer Everolimus-haltigen Mikroemulsion untersucht. Novartis gibt einen therapeutisch wirksamen Plasmakonzentrationsbereich von 3-8 ng/ml an, um eine Abstoßung nach einer Organtransplantation zu verhindern. Die gemessenen Konzentrationen im Akzeptormedium betragen 8,64 ng/ml nach 30 Minuten, rund 12 ng/ml nach 60 Minuten und etwa 16 ng/ml nach 240 min.

## 9 Summary

### **Prednicarbate-Nanoemulsion**

Immunosuppressive drugs are generally poorly soluble in water, which is a limiting factor of bioavailability. This requires the development of new strategies for enhancing the solubility. Nanoemulsions and other nanoparticles are suitable for incorporating these immunosuppressive agents to apply them for a topical route.

Human skin and other epithelia carry a negative charge. This fact should lead to a better interaction with positively charged formulations, resulting in an enhanced penetration into the skin. The drugs used in this work are prednicarbate (PC), everolimus (Ev) and sirolimus (Sir), all poorly soluble in water. PC is an exclusively dermally used corticosteroid with a good benefit-risk ratio (soft steroid).

Positively and negatively charged nanoemulsions were made by high pressure homogenisation, the physical and chemical stability was investigated and also liberation and penetration were checked. The positive charge was induced by phytosphingosine (PS) and the negative charge by myristic acid. PS as a native constituent of the skin has, contrary to the toxic stearylamine (Weyenberg et al. 2997), the advantage of being non-toxic. PS is just like PC poorly soluble in water, so a suitable solvent for both actives must be chosen. PC was soluble in several oils, while PS precipitated at temperatures below 20 °C. Only Eutanol G was suitable for solving PS without any precipitation.

With this oil positively charged nanoemulsion were made by high pressure homogenisation due varying the process parameters homogenisation temperature (25 and 50 °C), homogenisation pressure (300, 500 and 700 bar) and number of cycles (3, 5, 8 and 10 cycles). Nanoemulsions produced at 25 °C led to smaller particles and a narrow width of distribution with an increased homogenisation pressure and number of cycles. Nanoemulsions homogenized at 50 °C led to the opposite, namely bigger particles with an increased homogenisation pressure and number of cycles. With 50 °C obviously too much energy was put into the system. Increasing particles with increasing homogenisation pressure were described by Trotta et al. 2002 and by Akkar and Müller 2003b. The interfacial area and the interfacial energy increase, resulting in coalescing of small to bigger particles, when surfactant molecules do not cover the interfacial film to stabilize the emulsion droplets. Nevertheless even after storage of 4 months at 25 and 40 °C several formulations were very similar. The drug content determined by HPLC was the last parameter checked before

defining the most favourite conditions. The determination of the drug content in the nanoemulsions revealed a clear relation between the process parameters and the drug content. Higher temperatures usually result in a better solubility.

The next step was optimizing the composition by varying the constituents of the nanoemulsion phytosphingosine (0,3 – 0,7 %), Eutanol G (10 – 20 %), lipoids (soybean- and egg yolk phospholipids), lipid E80 (0,5 – 3%) and Tween 80 (0,5 – 3 %). The excellent stability is the result of the combination the electrostatic stabilizer Lipoid E80, which forms together with PS a stabilizing close-packed mixed film and causing repulsion at the interface between the water and the oil phase, and the steric stabilizer Tween 80. The drug content after storage of 1 year at 25 and 40 °C showed that the nanoemulsions still contained 92 % and 83 %, respectively, which is remarkable for a double ester like prednicarbate. A possible explanation was made by Lance et al. 1995 for the drug amphotericin b. They postulated an enrichment of the drug in the surfactant layer. Due to the fact, that prednicarbate has some similarities in his structure compared to cholesterol, a classic surfactant, this is possible.

Homogenizing negatively charged nanoemulsions was the next step, followed determining the drug release and also the penetration into excised human skin. Applying the negatively charged nanoemulsion with 1250 µg prednicarbate, 175 µg (14 %) were released after 24 h, while this amount was 119 µg (9.5 %) after applying the positively charged nanoemulsion. Wang et al. 2006 investigated the release of nalbuphine and his prodrugs. By altering the co-surfactant they observed a clear relation between these co-surfactants and the release rate. Adding stearylamine to the nanoemulsion led to a slower release. The amount of prednicarbate and his metabolites penetrating into the skin after applying negatively charged nanoemulsions was 12.7 µg and 17.6 µg for the positively charged formulation. Formulations with a positive charge interact more effectively with the negatively charged skin, resulting in an enhanced penetration. Measurements of the contact angle between human skin and the cornea, respectively of positively charged formulations have shown a smaller angle than for negatively charged formulations (Yilmaz 2005, Klang et al. 2000). A Comparison between the homogenizers Micron LAB 40 and Emulsiflex C5 revealed, that there is no difference in the particle size and size distribution, but a slight difference for the zetapotential. Summarizing the results positively charged nanoemulsions have over a period of one year even at 40 °C an excellent physical and chemical stability with a particle size of approx. 160 nm, a polydispersity index of 0.1 and a zetapotential of + 50 mV, and a prednicarbate content of 92 % and 83 % after storage of one year at 25 °C and 40 °C, respectively.

### **Everolimus/Sirolimus-Nanoemulsion**

The therapy of inflamed skin diseases occurs generally with topical corticosteroids. Because of side effects, especially skin thinning, alternative drugs are desired. Besides the corticosteroids there are other immunosuppressive drugs, e.g. calcineurin inhibitors or mTOR-inhibitors. The problem of these drugs is the penetration into the skin. Nevertheless Ormerod et al. 2005 could prove a penetration of sirolimus into the skin. In this work besides prednicarbate everolimus and sirolimus were homogenized to positively charged nanoemulsions by varying the parameters temperature, pressure, and number of cycles and homogenisation time, respectively. With only a few exceptions all formulations were stable for at least 14 days, even after storage at 40 °C. The drug contents of everolimus and sirolimus were determined by HPLC. Unfortunately the drug was degraded after high pressure homogenizing. The shortly resulting high temperatures during high pressure homogenizing are disadvantageous for these mTOR-inhibitors.

### **Everolimus-Microemulsion**

Approx. 5000 cornea-transplantations were made in Germany per year. After the transplantation the therapy for preventing the rejection is carried out with topical or systemic corticosteroids. Both application routes have severe side effects. Alternative drugs for ocular application are necessary, but due to solubility problems of the drug the preparation will be difficult. Calcineurin- and mTOR- inhibitors are such alternatives, which are actually used for preventing the rejection of solid organs. Unfortunately it was not possible to establish one of these drugs in an ocular applicable formulation. The main reasons for this failure are the poor solubility and the non-sufficient permeation through the cornea, the main barrier of the anterior eye. Investigating the permeation of Sirolimus has shown only a slight permeation, which is not enough to reach a therapeutic concentration. In this work the permeation of everolimus-containing microemulsion was investigated on freshly isolated pig cornea, resulting to a concentration of 8,64 ng/ml after 30 min, approx. 12 ng/ml after 60 and around 16 ng/ml after 240 min. Regarding the therapeutic concentration in plasma of 3-8 ng/ml, this microemulsion is a serious candidate for ocular application of Everolimus and an alternative for the established corticosteroids.



## 10 Literaturverzeichnis

### A

Abdulrazik, M.; Tamilvanan, S.; Khoury, K.; Benita, S.: Ocular delivery of cyclosporine A. II Effect of submicron emulsion's surface charge on ocular distribution of topical cyclosporine A, *STP Pharma. Sci.* 11 (2001) 427-432.

Ahlin, P.; Sentjere, M.; Strancar, J.; Kristl, J.; Location of lipophilic substances and ageing of solid lipid nanoparticles studied by EPR, *STP Pharma Sci.* 10 (2) (2000) 125-132.

Ahmed, I.; Gokhale, R.D.; Shah, M.V.; Patton, T.F.: Physicochemical determinants of drug diffusion across the conjunctiva, sclera, and cornea, *J. Pharm. Sci.* 76 (1987) 583-586.

Ahmed, M.; Ramadan, W.; Rambhu, D.; Shakeel, F.: Potential of nanoemulsions for delivery of rifampicin, *Pharmazie* 63 (2008) 806-811.

Akkar, A.; Müller, R.H.: Formulation of intravenous carbamazepine emulsions by SolEmuls technology, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 55 (2003a) 305-312.

Akkar, A.; Müller, R.H.: Intravenous itraconazole emulsions produced by SolEmuls technology, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 56 (2003b) 29-36.

Althaus, C.; Dagres, E.; Reinhard, T.; Christians, U.; Sundmacher, R.: Ciclosporin-A and its metabolites in the anterior chamber after topical and systemic application as determined with high-performance liquid chromatography mass spectrometry, *Ger. J. Ophthalmol.* 5 (1996) 189-194.

Amselem, S.; Friedmann, D.: Submicron emulsions as drug carriers for topical administration. In: Benita S., editor. *Submicron emulsions in drug targeting and delivery.* Amsterdam, The Netherlands: Harwood Academic Publishers; 1998, 1536-173.

Arikawa, J.; Ishibashi, M.; Kawashima, M.; Takagi, Y.; Ichikawa, Y.; Imokawa, G.: Decreased Levels of Sphingosine, a Natural Antimicrobial Agent, may be Associated with Vulnerability of the Stratum Corneum from Patients with Atopic Dermatitis to Colonization by *Staphylococcus aureus*, *J. Invest. Derm.*, 119 (2002) 433-439.

Ashton, P.; Podder, S.K.; Lee, V.H.L.: Formulation influence on conjunctival penetration of four beta-blockers in the pigmented rabbit: a comparison with corneal penetration, *Pharm. Res.* 8 (1991) 1166-1174.

### B

Barnetson, R. St. C.; Rogers, M.: Childhood atopic eczema, *BMJ* 324 (2002) 1376-1379.

Bell, T.A.; Hunnisett, A.G.: Ciclosporin A: tissue levels following topical and systemic administration to rabbits, *Br. J. Ophthalmol.* 70 (1986) 852-855.

- Benelli, U.; Lepri, A.; Del Tacca, M.; Nardi, M.: FK-506 delays corneal graft rejection in a model of corneal xenotransplantation, *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 12 (1996) 425-431.
- Benita, S.; Friedmann, D.; Weinstock, M.: Pharmacological evaluation of an injectable prolonged release emulsion of physostigmine in rabbits, *J. Pharm. Pharmacol.* 38 (1986a) 653-658.
- Benita, S.; Friedmann, D.; Weinstock, M.: Physostigmine emulsions: a new injectable controlled release system, *Int. J. Pharm.* 30 (1986b) 47-55.
- Bibel, D.J.; Aly, R.; Shinefield, H.R.: Antimicrobial Activity of Sphingosines, *J. Invest. Derm.* 98 (1992) 269-273.
- Bibel, D.J.; Aly, R.; Shinefield, H.R.: Topical sphingolipids in antisepsis and antifungal therapy, *Clin. Exp. Derm.* 20 (1995) 395-400.
- Bibel, D.J.; Aly, R.; Shah, S.; Shinefield, H.R.: Sphingosines: Antibacterial Barriers of the Skin, *Acta Derm. Venereol.* 73 (1993) 407-411.
- Billich, A.; Aschauer, H.; Aszodi, A.; Stuetz, A.: Percutaneous absorption of drugs used in atopic eczema: pimecrolimus permeates less through skin than corticosteroids and tacrolimus, *Int. J. Pharm.* 269 (2004) 29-35.
- Böhler, T.; Budde, K.; Neumayer, H.-H.; Waiser, J.: Novel Mediators of FTY720 in Human Lymphocytes, *Transplantation* 79 (2005) 492-495.
- Böhm, I.; Bauer, R.: TH1-Zellen, TH2-Zellen und atopische Dermatitis, *Hautarzt* 48 (1997) 223-227.
- Bousema, M.T.; Tank, B.; Heule, F.; Naafs, B.; Stolz, E.; van Joost, T.: Placebo-controlled study of psoriasis patients treated topically with a 10 % cyclosporine gel, *J. Am. Acad. Dermatol.* 22 (1990) 126-127.
- Brechue, W.F.; Maren, T.H.: pH and drug ionization affects ocular pressure lowering of topical carbonic anhydrase inhibitors, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34 (1993) 2581-2587.
- Brignole, F.; Pisella, P.J.; De Saint-Jean, M.; Goldschild, M.; Goguel, A.; Baudouin, C.: Flow cytometric analysis of inflammatory markers in KCS: 6-month treatment with topical cyclosporine A, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42 (2001) 90-95.
- Brignole, F.; De Saint-Jean, M.; Goldschild, M.; Goguel, A.; Baudouin, C.: Flow cytometric analysis of inflammatory markers in conjunctival epithelial cells of patients with dry eyes, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41 (2000) 1356-1363.
- Brockow, K.; Abeck, D.; Ring, J.: Die systemische Therapie im Behandlungskonzept des atopischen Ekzem, *Hautarzt* 50 (1999) 323-329.
- Buech, G.; Bertelmann, E.; Pleyer, U.; Siebenbrodt, I.; Borchert, H.-H.: Formulation of Sirolimus Eye Drops and Corneal Permeation Studies, *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 23 (2007) 292-303.

Büchner, S.A.: Atopische Dermatitis, Schweiz Med. Forum 19 484-490.

## C

Calvo, P.; Remunan-Lopez, C.; Vila-Jato, J.L.; Alonso, M.J.: Development of positively charged colloidal drug carriers: chitosan-coated polyester nanocapsules and submicron-emulsions, Colloid Polym. Sci. 275 (1997) 46-53.

Calvo, P.; Vila-Jato, J.L.; Alonso, M.J.: Comparative in Vitro Evaluation of Several Colloidal Systems, Nanoparticles, Nanocapsules, and Nanoemulsions, as Ocular Drug Carriers, J. Pharm. Sci. 85 (1996) 530-536.

Carney, L.G.; Hill, R.M.: Human tear pH/ Diurnal variations, Arch. Ophthalmol. 94 (1976) 821-824.

Cavalli, R.; Marengo, E.; Rodriguez, L.; Gasco, M.R.: Effects of some experimental factors on the production process of solid lipid nanoparticles, Eur. J. Pharm. Biopharm. 43 (2) (1996) 110-115.

Chamlin, S.L.; Frieden, I.J.; Fowler, A.J.; Williams, M.L.; Kao, J.; Elias, P.M.: Ceramide-Dominant, Barrier repair lipids improve childhood atopic dermatitis, Arch. Dermatol. 137 (2001) 1110-1112.

Collins, J.F.; Augustin, A.J.: Augenheilkunde, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 1996.

Collins-Gold, L.C.; Lyons, R.T.; Bartholow, L.C.: Parenteral emulsions for drug delivery, Adv. Drug. Deliv. Rev. 5 (1990) 189-208.

Coster, D.J., Philpott, M. and Bain, M.: Procurement of All the Donor Corneas Needed: How is it achieved? Transplant. Proceed. 32 (2000) 69-71.

Coster, D.J.; Williams, K.A.: The Impact of Corneal Allograft Rejection on the Long-Term Outcome of Corneal Transplantation, Am. J. Ophthalmol. 140 (2005) 1112-1122.

## D

Date, A.A.; Nagarsenker, M.S.: Parenteral microemulsion: An overview, Int. J. Pharm. 355 (2008a) 19-30.

Date, A.A.; Nagarsenker, M.S.: Design and Evaluation of Microemulsions for Improved Parenteral Delivery of Propofol, AAPS PharmSciTech 9 (2008b) 138-145.

Davis, S.S.: Pharmaceutical aspects of intravenous fat emulsions, Am. J. Hosp. Pharm. 31 (1974) 149-170.

Davis, S.S.: The emulsion-obsolete dosage form or novel drug delivery system and therapeutic agent? J. Clin. Pharm. 1 (1976) 11-27.

Degussa Personal Care Herstellerinformation

Dekaris, I.; Zhu, S.N.; Dana, M.R.: TNA-alpha regulates corneal Langerhans cell migration, *I. Immunol.* 162 (1999) 4235-4239.

De Paepe, K.; Roseeuw, D.; Rogiers, V.: Repair of acetone- and sodium lauryl sulphate-damaged human skin barrier function using topically applied emulsions containing barrier lipids, *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 16 (2002) 587-594.

Ding, S.; Tien, W.; Olejnik, O.: Nonirritating emulsions for sensitive tissue, US Patent 5474979 (to Allergan Inc, USA), 12 December 1995.

Ding, S.; Olejnik, O.: Cyclosporin ophthalmic oil/water emulsions. Formulation and characterization, *Pharm. Res.* 14 (1997) S 41.

Dingler, A.: Feste Lipid-Nanopartikel als kolloidale Wirkstoffträgersysteme zur dermalen Applikation, Dissertation (1998).

Doane, M.G.; Jensen, A.D.; Dohmann, C.H.: Penetration routes of topically applied eye medication, *Am. J. Ophthalmol.* 85 (1978) 383-386.

Dolder, R.: Ophthalmika: Pharmakologie, Biopharmazie und Galenik der Augenarzneimittel, *Wiss. Verlagsges. Stuttgart* 1990.

Domb, A.J.; Marlinski, A.; Maniar, M.; Teomin, L.: Insect repellent formulations of N,N-diethyl-m-toluamide (DEET) in a liposphere system: efficacy and skin uptake, *J. Am. Mosquito control ass.* 11(1) (1995) 29-34.

## **E**

Eberhardt, W.; Kilz, T.: Molekulare Grundlagen der Glucocorticoidwirkung, *Pharmazie in unserer Zeit* 32 (2003) 288-294.

Egbaria, K.; Ramachandran, C.; Weiner, N.: Topical delivery of ciclosporin: evaluation of various formulations using in vitro diffusion studies in hairless mouse, *Skin Pharmacol.* 3 (1990) 21-28.

Elbaz, E.; Zeevi, A.; Klang, S.; Benita, S.: Positively charged submicron emulsions- a new type of colloidal drug carrier, *Int. J. Pharm.* 96 (1993) R 1-6.

Elias, P.M.; Friends, D.S.: The permeability barrier in mammalian epidermis, *J. Cell Biol.* 20 (1975) 1-19.

El-Kamel, A.H.: In vitro and in vivo evaluation of Pluronic F127-based ocular delivery of timolol maleate, *Int. J. Pharm.* 241 (2002) 47-55.

## **F**

Fialho, S. L.; da Silva-Cunha, A.: New vehicle based on a microemulsion for topical ocular administration of dexamethasone, *Clin. Exp. Ophthalmol.* 32 (2004) 626-632.

Fiedler, H.P.: Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzender Gebiete, 4. Auflage, Edition Cantor Verlag, Aulendorf (1996).

Ford, J.; Woolfe, J.; Florence, A.T.: Nanospheres of ciclosporine A: poor oral absorption in dogs, *Int. J. Pharm.* 183 (1999) 3-6.

Freitas, C.; Müller, R.H.; Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN) and crystallinity of the lipid phase, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 47 (1999) 125-132.

Friedmann, D.I.; Schwarz, J.S.; Weisspapier, M.: Submicron emulsion vehicle for enhanced transdermal delivery of steroidal and nonsteroidal anti-inflammatory drugs, *J. Pharm. Sci.* 84 (1995) 324-329.

Frieling, U.M.; Schaumberg, D.A.; Kupper, T.S.; Muntwyler, J.; Henekens, C.H.: A randomized, 12-year primary-prevention trial of beta carotene supplementation for non-melanoma skin cancer in the physician's health study, *Arch. Dermatol.* 136 (2000) 179-184.

## G

Gan, L.; Gan, Y.; Zhu, C.; Zhang, X.; Zhu, J.: Novel microemulsion in situ electrolyte-triggered gelling system for ophthalmic delivery of lipophilic cyclosporine A: In vitro and in vivo results, *Int. J. Pharm.* 365 (2009) 143-149.

Ganta, S.; Paxton, J.W.; Baguley, B.C.; Garg, S.: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of chlorambucil delivered in parenteral emulsion, *Int. J. Pharm.* 360 (2008) 115-121.

Garty, N.; Lusky, M.; Zalish, M. et al.: Pilocarpine in submicron emulsion formulation for treatment of ocular hypertension: a phase II clinical trial, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35 (1994) 2175.

Gasco, M.R., Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution, US Patent USS 5250236 (1993).

Gilbert, J. C.; Hadgraft, J.; Bye, A. and Brookes, L.G.: Drug release from Pluronic F-127 gels, *Int. J. Pharm.* 32 (1986) 223-228.

Gillette, T.E.; Chandler, J.W.; et al.: Langerhans cells on the ocular surface, *Ophthalmol.* 89 (1982) 700-711.

Grant, M.S.: Toxicology of the eye, Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, USA, 1993.

Griffiths, C.E.M.; Powles, A.V.; Baker, B.S.; Fry, L.; Vladimirsson, H.: Topical cyclosporin and psoriasis, *Lancet* 1 (1987) 806.

Grisanti, S.: Das Immunprivileg des Auges, *Ophthalmologie* 95 (1998) 124-135.

Gui, S. Y.; Wu, L.; Peng, D. Y.; Liu, Q. Y.; Yin, B. P.; Shen, J.Z.: Preparation and evaluation of a microemulsion for oral delivery of berberine, *Pharmazie* 63 (2008) 516-519.

Gurny, R.; Ibrahim, H.; Aebi, A.; Buri, P.: Design and evaluation of controlled release systems for the eye, *J. Contr. Rel.* 6 (1987) 367-373.

## H

Hanifin, J. und Chan, S.: Biochemical and immunological mechanisms in atopic dermatitis: New targets for emerging therapies, *J. Am. Acad. Dermatol.* 41 (1999) 72-77.

Haße, A.; Keipert, S.; Development and characterization of microemulsions for ocular application; *Eur. J. Pharm Biopharm.* 43 (1997) 179-183.

Heiati, H.; Phillips, N.C.; Tawashi, R.; Evidence for phospholipids bilayer formation in solid lipid nanoparticles formulated with phospholipids and triglyceride, *Pharm. Res.* 13 (9) (1996) 1406-1410.

Heiati, H.; Tawashi, R.; Phillips, N.C.; Drug retention and stability of solid lipid nanoparticles containing azidothymidine palmitate after autoclaving, storage and lyophilisation, *J. Microencaps.* 15 (2) (1998) 173-184.

Heuschkel, S.; Goebel, A.; Neubert, R.H.H.; Microemulsions- Modern Colloidal Carrier for Dermal and Transdermal Drug Delivery, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 603-631.

Hikita, N.; J.S. Lopez, Chan, C.-C.; Mochizuki, M.; Nussenblatt, R.B.; de Smet, M.D.: Use of Topical FK506 in a Corneal Graft Rejection Model in Lewis Rats, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38 (1997) 901-909.

Hill, J.C.: The use of ciclosporine in high-risk keratoplasty, *Am. J. Ophthalmol.* 107 (1989) 506-510.

Hill, J.C.: Systemic ciclosporine in high-risk keratoplasty, *Ophthalmology* 101 (1994) 128-133.

Hingorani, M.; Metz, D.; Lightmann, S.L.: Characterisation of the normal conjunctival leukocyte population, *Exp. Eye Res.* 64 (1997) 905-912.

Huang, H.-S.; Schoenwald, R.D.; Lach, J.L.: Corneal penetration behaviour of betablocking agents II: assessment of barrier contributions, *J. Pharm. Sci.* 72 (1983) 1272-1286.

## I

Ilan, E.; Amselem, S.; Weisspapier, M.; Schwarz, J.; Yogev, A.; Zawoznik, E.: Improved oral delivery of desmopressin via a novel vehicle: mucoadhesive submicron emulsion, *Pharm. Res.* 13 (1996) 1083-1087.

Imokawa, G.; Abe, A.; Jin, K.; Higaki, Y.; Kawashima, M.; Hidano, A.: Decreased level of ceramides in human stratum corneum in atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin? *J. Invest. Dermatol.* 96 (1991) 523-526.

## J

Jahn, K.: Moderne galenische Zubereitungen zur dermalen Anwendung von Ciclosporin A und Mycophenolatmofetil, Dissertationen, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Deutschland, 2002.

Jahnke, S.: The theory of high-pressure homogenization. In: Müller, R. H. and Böhm, B.H.L. (Ed.), Dispersion Techniques for Laboratory and Industrial Scale Processing, wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (2001).

Jenning, V.: Feste Lipid-Nanopartikel (SLN) als Trägersystem für die dermale Applikation von Retinol: Wirkstoffinkorporation; -freisetzung und Struktur, Dissertation, Freie Universität Berlin (1999).

Jenning, V.; Gohla, S.; Encapsulation of retinoids in solid lipid nanoparticles (SLN), J. Microencaps. 18 (2) (2001) 149-158.

Jenning, V.; Gysler, A.; Schäfer-Korting, M.; Gohla, S.: Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin, Eur. J. Pharm. Biopharm. 49 (2000a) 211-218.

Jenning, V.; Schäfer-Korting, M.; Gohla, S.: Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties, J. Contr. Rel. 66 (2000b) 115-126.

Joshi, M.D.; Müller, R.H.: lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives, Eur. J. Pharm. Biopharm. 71 (2008) 161-172.

Jumaa, M.; Müller, B.W.: Physicochemical properties of chitosan-lipid emulsions and their stability during the autoclaving process, Int. J. Pharm. 183 (1999) 175—84.

## **K**

Kalbitz, J.; Neubert, R.; Wohlrab, W.: Modulation of drug penetration in the skin, Pharmazie 51 (1996) 619-637.

Kale, A. A. und Patravale, V.A.: Development and Evaluation of Lorazepam Microemulsion for Parenteral Delivery, AAPS PharmSciTech 9 (2008) 966-971.

Kaswan, R.L.: Intraocular penetration of topically applied ciclosporine, Transplant. Proc. 20 (1988) 650-655.

Katami, M.: The mechanisms of corneal allograft failure in the rat, Eye 9 (1995) 197-207.

Keck, C.; Müller, R.H.: Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenisation, Eur. J. Pharm. Biopharm. 62 (2006) 3-16.

Keipert, S.: Ophthalmika: etablierte Arzneiformen und neue Konzepte, in: Müller, R.H., Hildebrandt, G.E. (Hg): Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen, Wiss. Verlagsges. Stuttgart 1997.

Keipert, S.; Schulz, G.: Mikroemulsionen auf Saccharosebasis, Pharmazie 49 (1994) 195-197.

Kemken, J.; Ziegler, A.; Müller, B.W.: Influence of Supersaturation on the Pharmacodynamic Effect of Bupranolol After Dermal Administration Using Microemulsions As Vehicle, Pharm. Res. 9 (1992) 554-558.

Kim, T.W.; Chung, H.; Kwon, I.C.; Sung, H.C.; Jeong, S.Y.: Optimization of Lipid Composition in Cationic Emulsion as In Vitro and In Vivo Transfection Agents, *Pharm. Res.* 18 (2001a) 54-60.

Kim, Y.J.; Kim, T.W.; Chung, H.; Jeong, S.Y.: Counterion Effects on Transfection Activity of Cationic Lipid Emulsion, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 6 (2001b) 279-283.

Klang, S.; Abdulrazik, M.; Benita, S.: Influence of Emulsion Droplet Surface Charge on Indomethacin Ocular Tissue Distribution, *Pharm. Dev. Technol.* 5 (2000) 521-532.

Klang, S.H.; Frucht-Pery, J.; Hoffman, A.; Benita, S.: Physicochemical Characterization and Acute Toxicity Evaluation of a Positively-charged Submicron Emulsion Vehicle, *J. Pharm. Pharmacol.* 46 (1994) 983-993.

Klang, S.H.; Parnas, M.; Benita, S.: Emulsions as drug carriers-possibilities, limitations and future perspectives, in: R.H. Müller, S. Benita, B. Böhm (Eds), *Emulsions and Nanosuspensions for the Formulation of Poorly Soluble Drugs*, Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, 1998, 31-65.

Klang, S.H.; Siganos, C.S.; Benita, S.; Frucht-Pery, J.: Evaluation of a positively charged submicron emulsion of piroxicam on the rabbit corneum healing process following alkali burn, *J. Contr. Rel.* 57 (1999) 19-27.

Knop, N.; Knop, E.: Conjunctival-associated lymphoid tissue in the human eye, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41 (2000) 1270-1279.

Koo, J.Y.M.; Fleischer, A.B.; Abramovits, W.; Pariser, D.M.; McCall, C.O.; Horn, T.D.; Gottlieb, A.B.; Jaracz, E.; Rico, M.J.: Tacrolimus ointment is safe and effective in the treatment of atopic dermatitis: Results in 8000 patients, *J. Am. Acad. Dermatol.* 53 (2005) S195-S205.

Korner, D.; Benita, S.; Albrecht, G.; Baszkin, A.: Surface Properties of mixed phospholipid-stearylamin monolayers and their interaction with a non-ionic surfactant (poloxamer), *Coll. Surf. B*, 3 (1994) 101-109.

Korting, H.C.; Unholzer, A.; Schäfer-Korting, M.; Tausch, I.; Gassmueller, J.; Nietsch, K.-H.: Different Skin Thinning Potential of Equipotent Medium-Strength Glucocorticoids, *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 15 (2002) 85-91.

Kunert, K.S.; Tisdale, A.S.; Stern, M.E.; Smith, J.A.; Gipson, I.K.: Analysis of topical cyclosporin treatment of patients with dry eye syndrome: effect on conjunctival lymphocytes, *Arch. Ophthalmol.* 118 (2000) 1489-1496.

## **L**

Lambers, J.W.J.; Streekstra, H.: Antimicrobial compositions for topical use, US Patent 6, 147, 118 (1998)

Lance, M.R.; Washington, C.; Davis, S.S.: Structure and toxicity of Amphotericin B/triglyceride emulsion formulations, *J. Antimicrob. Chemother.* 36 (1) (1995) 128.



Lange, K.; Gysler, A.; Bader, M.; Kleuser, B.; Korting, H.C.; Schäfer-Korting, M.: Prednicarbate Versus Conventional Topical Glucocorticoids: Pharmacodynamic Characterization In Vitro, *Pharm. Res.* 14 (1997) 1744-1749.

Lange, K.; Kleuser, B.; Gysler, A.; Bader, M.; Maia, C.; Scheiderei, C.; Korting, H.C.; Schäfer-Korting, M.: Cutaneous Inflammation and Proliferation in vitro: Differential Effects and Mode of Action of Topical Glucocorticoids, *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 13 (2000) 93-103.

Lersch, P.; Schick, U.: Choosing the right ingredients for cosmeceuticals, *Speciality Chemicals Magazine* 23 (2003) 30-31.

Leung, D.: Atopic dermatitis: new insights and opportunities for therapeutic intervention, *J. Allergy Clin. Immunol.* 105 (2000) 860-876.

Levy, M.Y.; Benita, S.: Design and characterization of a submicronized o/w emulsion of diazepam for parenteral use, *Int. J. Pharm.* 54 (1989) 103-112.

Liaw, J.; Robinson, J.R.: The effect of polyethylene glycol molecular weight on corneal transport and the related influence of penetration enhancers, *Int. J. Pharm.* 88 (1992) 125-140.

Liaw, J.; Rojanasakul, Y.; Robinson, J.R.: The effect of drug charge density on corneal transport, *Int. J. Pharm.* 88 (1992) 111-124.

Lindenberg, M.; Kopp, S.; Dressmann, J.B.: Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58 (2004) 265-278.

Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney, P.J.: Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug Del. Rev.* 23 (1997) 3-25.

Lopes, L.B.; Collet, J.H.; Vitoria, M.; Bentley, L.B.: Topical delivery of cyclosporin A: an in vitro study using monoolein as a penetration enhancer, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 60 (2005) 25-30.

Lukowski, G.; Kasbohm, J.; Pfflegel, P.; Illing, A.; Wulff, H.: Crystallographic investigation of cetylpalmitate solid lipid nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 196 (2000) 201-205.

## M

Magenheim, B.; Levy, M.Y.; Benita, S.: A new in vitro technique for the evaluation of drug release profile for colloidal carriers-ultrafiltration technique at low pressure, *Int. J. Pharm.* 94 (1993) 115-223.

Mao-Qiang, M.; Feingold, K.R.; Wang, F.; Thornfeldt, C.R.; Elias, P.M.A.: Exogenous lipids influence permeability barrier recovery in acetone-treated murine skin, *Archiv. Dermatol.* 129 (1993) 728-738.

- Mao-Qiang, M.; Feingold, K.R.; Wang, F.; Thornfeldt, C.R.; Elias, P.M.A.: A natural lipid mixture improves barrier function and hydration in human and murine skin, *J. Soc. Cos. Chem.* 47 (1995) 157-166.
- Marengo, E.; Cavalli, R.; Caputo, O.; Rodriguez, L.; Gasco, M.R.; Scale-up of the preparation process of solid lipid nanoparticles. Part I, *Int. J. Pharm.* 205 (2000) 3-13.
- Marsland, A.M.; Griffiths, C.E.: The macrolide immunosuppressants in dermatology: mechanisms of action, *Eur. J. Dermatol.* 12 (2002) 618-622.
- Mayer, D.J.; Daar, A.S.; Casey, T.A.; Fabre, J.W.: Localization of HLA-A, B, C and HLA-DR antigens in the human cornea: practical significance for grafting technique and HLA typing, *Transplant. Proc.* 15 (1983) 126-129.
- Mehnert, W.; Mäder, K.: Solid lipid nanoparticles Production, characterization and applications, *Adv. Drug Del.* 47 (2001) 165-196.
- Meisner, D.; Pringle, J.; Mezei, M.: Liposomal ophthalmic drug delivery. III. Pharmacodynamic and biodisposition studies of atropine, *Int. J. Pharm.* 55 (1989) 105-113.
- Melamed, S.; Kurtz, S.; Greenbaum, A.; Haves, J.F.; Neumann, R.; Garty, N.: Adaprolol maleate in submicron emulsion, a novel soft  $\beta$ -blocking agent, is safe and effective in human studies, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35 (1994) 1387-1390.
- Merisko-Liversidge, E.; Sarpotdar, P.; Bruno, J.; Hajj, S.; Wei, L.; Peltier, N.; Rake, J.; Shaw, J.M.; Pugh, S.; Polin, L.; Jones, T.; Corbett, T.; Cooper, E.; Liversidge, G.G.: Formulation and antitumor activity evaluation of nanocrystalline suspension of poorly soluble anticancer drugs, *Pharm. Res.* 13 (1996) 272-278.
- Miller, K.; Huber, C.; Niederwieser, D.; Göttinger, W.: Successful engraftment of high-risk corneal allografts with short-term immuno-suppression with ciclosporine, *Transplantation* 45 (1988) 651-6553.
- Mosteller, M.W.; Gebhardt, B.M.; Hamilton, A.M.; Kaufmann, H.E.: Penetration of topical ciclosporine into the rabbit cornea, aqueous humor, and serum, *Arch. Ophthalmol.* 103 (1985) 101-102.
- Muchtar, S.; Abdulrazik, M.; Frucht-Pery, J.; Benita, S.: Ex-vivo permeation study of Indomethacin from a submicron emulsion through albino rabbit cornea, *J. Contr. Rel.* 44 (1997) 55-64.
- Muchtar, S.; Almog, S.; Torracca, M.T.; Saettone, M.F.; Benita, S.: A submicron emulsion as ocular vehicle for delta-8-tetrahydrocannabinol: effect on intraocular pressure in rabbits, *Ophthalm. Res.* 24 (1992) 142-149.
- Muchtar, S.; Benita, S.: Emulsions as drug carriers for ophthalmic use, *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Asp.* 91 (1994) 181-190.
- Müller, B.W.: Topische Mikroemulsionen als neue Wirkstoffträgersysteme, In: Müller, R.H.; Hildebrandt, G.E. (Hg): *Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen*, Wiss. Verlagsges. Stuttgart 1997.

Müller, R.H.: Zetapotenziale und Partikelladung in der Laborpraxis, Wiss. Verlagsges. Stuttgart, Deutschland, 1996.

Müller, R. H.; Dingler, A.; Weyhers, H.; zur Mühlen, A.; Mehnert, W.; Solid lipid nanoparticles- ein neuartiger Wirkstoff-Carrier für Kosmetika und Pharmazeutika- III. Langzeitstabilität, Gefrier- und Sprühtrocknung, Anwendung in Kosmetika und Pharmazeutika, Pharm. Ind. 59 (7) (1997b) 614-619.

Müller, R.H.; Heinemann, S.: Fat emulsions for parenteral nutrition IV: Lipofundin MCT/LCT regimens for total parenteral nutrition (TPN) with high electrolyte load, Int. J. Pharm. 107 (1994) 121-132.

Müller, R.H.; Lucks, J.S., Arzneistoffträger aus festen Lipidteilchen, Feste Lipidnanosphären (SLN), European Patent EP 0605497 (1996).

Müller, R.H.; Mäder, K.; Gohla, S.; Solid Lipid nanoarticles (SLN) for controlled drug delivery- review of the state of the art, Eur. J. Pharm. Biopharm. 50 (1) (2000a) 161-178.

Müller, R.H.; Peters, K.: Nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs, I. Preparation by a size-reduction technique, Int. J. Pharm. 160 (1998) 229-237.

Müller, R.H.; Mehnert, W.; Lucks, J.S.; Schwarz, C.; zur Mühlen, A.; Weyhers, H.; Freitas, C.; Rühl, D.; Solid lipid nanoparticles (SLN) – an alternative colloidal carriersystem for controlled drug delivery, Eur. J. Pharm. Biopharm. 41 (1) (1995) 62-69.

Müller, R.H.; Schuhmann, R.: Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart (1996).

## N

Naveh, N.; Muchtar, S.; and Benita, S.: Pilocarpine incorporated into a submicron emulsion vehicle causes an unexpected prolonged ocular hypotensive effect in rabbits, J. Ocul. Pharmacol. 10 (1994) 509-520.

Naveh, N.; Weissman, C.; Muchtar, S.; Benita, S.; Mechoulam, R.: A submicron emulsion of HU-211, a synthetic cannabinoid, reduces intraocular pressure in rabbits, Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 238 (2000) 334-38.

Neubert, R.; Schmalfuß, U.; Huschka, C.; Wohlrab, W.: Neuere Entwicklungen auf dem Gebiet der dermalen Wirkstoffapplikation, Pharm. Ind. 60 (1998) 149-156:

Neubert, R.; Schmalfuß, U.; Wohlrab, W.; Huschka, C.: Wirkstoffpenetration in die Haut und deren Modulation, Pharmazeutische Zeitung 17 (1996) 1483-1493.

Nicolaos, G.; Crauste-Manciet, S.; Farinotti, R.; Brossard, D.: Improvement of cefpodoxime proxetil oral absorption in rats by an oil-in-water submicron emulsion, Int. J. Pharm. 263 (2003) 165-171.

Nishikawa, M.; Takakura, Y.; Hashida, M.: Biofate of fat emulsions, in: Benita (Ed.), Submicron Emulsions in Drug Targeting and Delivery, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 1998, 99-108.

## O

Ohia, E.O.; Mancino, M.; and Kulkarni, P.S.: Effects of steroids and immunosuppressive drugs on endotoxin-uveitis in rabbits, *J. Ocular. Pharmacol.* 8 (1997) 295-307.

Okada, K.; Sakata, H.; Minamoto, A.; Fujihara, M.: Effect of FK 506 administered topically versus intramuscularly suppression of the corneal immune reaction in rats, *Ophthalmologica* 210 (1996) 175-179.

Olsen, T.W.; Benegas, N.M.; Joplin, A.C.; Evangelista, T.; Mindrup, E.A.; Holland, E. J.: Rapamycin inhibits corneal allograft rejection and neovascularization, *Arch. Ophthalmol.* 112 (1994) 1471-1475.

Opelz, G.: Effect of the maintenance immunosuppressive drug regimen on kidney transplant outcome, *Transplantation* 58 (1994) 443-446.

Ormerod, A. D.; Shah, S.A.A.; Copeland, P.; Omar, G.; Winfield, A.: Treatment of psoriasis with topical Sirolimus: preclinical development and a randomized, double-blind trial, *Brit. J. Der.* 152 (2005) 758-764.

## P

Park, K.-M. and Kim, C.-K.: Preparation and Evaluation of flurbiprofen-loaded microemulsion for parenteral delivery, *Int. J. Pharm.* 181 (1999) 173-179.

Paugh, S.W.; Payne, S.G.; Barbour, S.G.; Milstien, S.; Spiegel S.: The immunosuppressant FTY720 is phosphorylated by sphingosine kinase 2, *FEBS Letters* 554 (2003) 189-193.

Pfau, B.; Kruse, F.E.; Rohrschneider, K.; Zorn, M.; Fiehn, W.; Burk, R.O.W.; Voelcker, H.E.: Comparison between local and systemic ciclosporine concerning the concentration in conjunctivitis, aqueous humor and blood, *Ophthalmologie* 92 (1995) 833-839.

Pfeiffer, S.; Vielhaber, G.; Vietzke, J.-P.; Wittern, K.-P.; Hintze, U.; Wepf, R.: High-Pressure Freezing Provides New Information on Human Epidermis: Simultaneous Protein Antigen and Lamellar Lipid Structure Preservation. Study on Human Epidermis by Cryoimmobilization, *J. Invest. Dermatol.* 114 (2000) 1030-1038.

Ph. Eur. 2005 Monographie Prednicarbat

Piemi, M.P.Y.; Korner, D.; Benita, S.; Marty, J.P.: Positively and negatively charged submicron emulsions for enhanced topical delivery of antifungal drugs, *J. Contr. Rel.* 58 (1999) 177-187.

Pranker, R.J.; Stella, V.J.: The use of oil-in-water emulsions as a vehicle for parenteral drug administration, *J. Parent. Sci. Technol.* 44 (1990) 139-149.

Prausnitz, M.R.; Noonan, J.S.: Permeability of cornea, sclera and conjunctiva: a literature analysis for drug delivery to the eye, *J. Pharm. Sci.* 87 (1998) 1479-1488.

Produktinformation Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Deutschland, 2002.

Prüfzertifikat Novartis Pharma AG: Use guidelines for RAD, Basel, 2005.

Prüfzertifikat LC Laboratories: Solubility of Rapamycin, Cat. No. R-5000, Woburn, MA, USA, 2004.

PZ 23/09: *Pharmazeutische Zeitung* 23 (2009), 2099-2100.

## R

Rabinovich-Guillat, L.; Couvreur, P.; Lambert, G.; Goldstein, d.; Benita; S.; Dubernet, C.: Extensive surface studies help to analyze zeta potential data: the case of cationic emulsion, *Chem. Phys. Lipids* 131 (2004) 1-13.

Radomska, A.; Dobrucki, R.: The use of some ingredients for microemulsion preparation containing retinol and its esters, *Int. J. Pharm.* 196 (2000) 131-134.

Reim, M.: *Augenheilkunde*, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 1990.

Reinhard, T.; Sundmacher, R.; Godehard, E.; Heering, P.: Preventive systemic ciclosporine A after keratoplasty at increased risk for immune reactions as the only elevated risk factor, *Ophthalmologie* 94 (1997) 496-500.

Reinhard, T.; Moller, M.; Sundmacher, R.: Penetrating keratoplasty in patients with atopic dermatitis and without systemic ciclosporine A, *Cornea* 18 (1999) 645-651.

Reitamo, S.; Spuls, S.; Sassolas, B.; Lahfa, M.; Claudy, A.; Griffiths, C.E.M.: Efficacy of Sirolimus (rapamycin) administered concomitantly with a subtherapeutic dose of ciclosporine in the treatment of severe psoriasis: a randomized controlled trial, *Br. J. Dermatol.* 145 (2001) 438-445.

Rhee, Y.-S.; Park, C.-W.; Nam, T.-Y.; Shin, Y.-S.; Chi, S.-C.; Park, E.-S.: Formulation of Parenteral Microemulsion Containing Itraconazole, *Arch. Pharm. Res.* 30 (2007) 114-123.

Rinaki, E.; Valsami, G.; Macheras, P.: Quantitative Biopharmaceutics Classification System: The Central Role of Dose/Solubility Ratio, *Pharm. Res.* 20 (2003) 1917-1925.

Robert, P.Y.; Delbose, B.; Preux, P.M.; Monnot, P.H.; Drouet, M.; Peyronet, P.; Adenis, J.P.: treatment with ciclosporine A, with low doses, in high-risk penetrating keratoplasties, A bicentric study of 90 cases, *J. Fr. Ophthalmol.* 20 (1997) 507-514.

Robinson, J.C.: Ocular Anatomy and Physiology relevant to ocular drug delivery, in: Mitra, A.K.: *Ophthalmic drug delivery systems*, Marcelk Decker, New York, 1993.

Robinson, J. R.; Mlynek, G. M.: Bioadhesive and phase-change polymers for ocular drug delivery, *Adv. Drug Del. Rev.* 16 (1995) 45-50.

Rodrigues, M.M.; Rowden, G. et al.: Langerhans cells in the normal conjunctiva and peripheral cornea of selected species, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 21 (1981) 759-765.

Rojanasakul, Y.; Robinson, J.: Transport mechanisms of the cornea: characterization of barrier permselectivity, *Int. J. Pharm.* 55 (1989) 237-246.

Rojanasakul, Y.; Wang, L.Y.; Bhat, M.; Glover, D.D.; Malanga, C.J.; Ma, J.K.H.: The Transport Barrier of Epithelia: A Comparative Study on Membrane Permeability and Charge Selectivity in the Rabbit, *Pharm. Res.* 9 (1992) 1029-1034.

Rote Liste 2008, Arzneimittelverzeichnis für Deutschland (einschließlich EU-Zulassungen und bestimmter Medizinprodukte), Verlag Rote Liste Service GmbH, Frankfurt am Main.

Rouland, J.-F.; Morel-Mandrino, P.; Elena, P.-P.; Polzer, H.; Raj, P. S.: Timolol 0.1 % Gel (Nyogel 0.1 %) Once Daily versus Conventional Timolol 0.5 % Solution Twice Daily : A Comparison of Efficacy and Safety, *Ophthalmologica* 216 (2002) 449-454.

Rozier, A.; Mazuel, C.; Grove, J.; Plazonnet, B.: Gelrite: A novel, ion-activated, in-situ gelling polymer for ophthalmic vehicles. Effect on bioavailability of timolol, *Int. J. Pharm.* 57 (1989) 163-168.

Rudikoff, D.; Lebwohl, M.: Atopic dermatitis, *Lancet* 351 (1998) 1715-1721.

## S

Saettone, M.F. und Salminen, L.: Ocular Inserts for topical delivery, *Adv. Drug Fdel. Rev.* 16 (1995) 95-106.

Sall, K.; Stevenson, O.D.; Mundorf, T.K.; Reis, B.L.: Two multicenter, randomized studies of the efficacy and safety of cyclosporine ophthalmic emulsion in moderate-to-severe dry eye disease, CsA Phase 3 Study Group, *Ophthalmology* 107 (2000) 631-639.

Samama, J.P.; Lee, K.M.; Biellmann, J.F.: Enzymes and microemulsions-Activity and kinetic properties of liver alcohol dehydrogenase in ionic water-in-oil microemulsion, *Eur. J. Pharm.* 163 (1987) 609-617.

Santos Maia, C.; Mehnert, W.; Schäfer-Korting, M.: Solid Lipid Nanoparticles as drug carriers for topical glucocorticoids, *Int. J. Pharm.* 196 (2000) 165-167.

Schäfer-Korting, M. und Korting, H.-C.: Topische Glucocorticoidtherapie- Bei Bronchialasthma und entzündlichen Dermatosen, *Pharmazie in unserer Zeit*, 32 (2003) 306-312.

Scheiffarth, O.F.; Gabriel, N. et al.: Immunhistochemische Charakterisierung von Lymphozyten in der Cornea, *Fortschr. Ophthalmol.* 83 (1986) 714-715.

Schlüter, H.; Wepf, R.; Moll, I.; Franke, W.W.: Sealing the live part of the skin: The integrated meshwork of desmosomes, tight junctions and curvilinear ridge structured in the cells of the uppermost granular layer of the human epidermis, *Eur. J. Cell. Biol.* 83 (2004) 655-665.

- Scholz, M.: In vitro-Permeationsstudien von hydrophilen und lipophilen Arzneistoffen an okularen Geweben und Zellkulturen, Dissertation, Humboldt Universität Berlin, Deutschland, 2003.
- Schulze, H.J.; Mahrle, G.; Steigleder, G.K.: Topical cyclosporin A in psoriasis, *Br. J. Dermatol.* 122 (1990) 113-114.
- Sedlakova, K.; Muckersie, E.; Robertson, M.; Filipec, M.; Forrester, J.V.: FTY720 in Corneal Concordant Xenotransplantation, *Transplantation* 79 (2005) 297-303.
- Seki, J.; Sonoke, S.; Saheki, A.; Fukui, H.; Sasaki, H.; Mayumi, T.: A nanometer lipid emulsions, lipid nano-sphere (LNS<sup>®</sup>), as a parenteral drug carrier for passive drug targeting, *Int. J. Pharm.* 273 (2004) 75-83.
- Siebenbrodt, I.; Keipert, S.: Versuche zur Entwicklung und Charakterisierung ophthalmologischer verwendbarer tensidhaltiger Mehrkomponentensysteme, *Die Pharmazie* 46 (1991) 435-438.
- Siebenbrodt, I.; Keipert, S.: Poloxamer-Systems as Potential Ophthalmics-II. Microemulsions, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 39 (1993) 25-30.
- Siefert, B.; Keipert, S.: Influence of alpha-cyclodextrin and dyoxyalkylated beta-cyclodextrin derivatives on the in vitro corneal uptake and permeation of aqueous pilocarpine-HCl solutions, *J. Pharm. Sci.* 86 (1997) 716-720.
- Sieg, J.W.; Robinson, J.R.: Vehicle effects on ocular drug bioavailability, II: evaluation of pilocarpine, *J. Pharm. Sci.* 66 (1978) 1222-1228.
- Siekmann, B.; Westesen, K.: Melt-homogenized solid lipid nanoparticles stabilized by the nonionic surfactant tyloxapol – I. Preparation and particle size determination, *Pharm. Pharmacol. Lett.* 3 (1994) 194-197.
- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Produktinformation von Stearylamin (2004).
- Simamora, P.; Alvarez, J.M.; Yalkowsky, S.H.: Solubilization of rapamycin, *Int. J. Pharm.* 213 (2001) 25-29.
- Simon, M. and Green, H.: Participation of membrane-associated proteins in the formation of the cross-linked envelope of the keratinocyte, *Cell* 36 (1984) 827-836.
- Singh, K.K.; Vingkar, S.K.: Formulation, antimalarial activity and biodistribution of oral lipid nanoemulsion of primaquine, *Int. J. Pharm.* 347 (2008) 136-143.
- Sjöström, B.; Kaplun, A.; Talmon, Y.; Cabane, B.: Structures of nanoparticles prepared from oil-in-water emulsions, *Pharm. Res.* 12 (1) (1995) 39-48.
- Small, D.S.; Acheampong, A.; Reis, B., et al. Blood concentration of cyclosporine A during long-term treatment with cyclosporine A ophthalmic emulsion in patients with moderate to severe dry eye disease, *J. Ocular Pharmacol. Ther.* 18 (2002) 411-418.
- Smith, C.H.: New approaches to topical therapy; *Clin. Derm.* 25 (2000) 567-574.

Song, Y.K.; Kim, C.K.: Topical delivery of low-molecular-weight heparin with surface-charged flexible liposomes, *Biomaterials* 27 (2006) 271-280.

Speiser, P.: Lipidnanopellets als Trägersystem für Arzneimittel zur peroralen Anwendung, European Patent EP 0167825 (1990).

Srividya, B.; Cardoza, R.M.; Amin, P.D.: Sustained ophthalmic delivery of ofloxacin from pH triggered in situ gelling system, *J. Control. Release* 73 (2001) 205-211.

Stamer, L.; Bohnke, M.; Vogelberg, K.; Arndt, R.: Tissue levels of locally applied ciclosporine A in the rabbit eye, *Fortschr. Ophthalmol.* 86 (1989) 540-542.

Streilein, J.W.; Niederkorn, J.Y. and Shadduck, J.A.: Systemic unresponsiveness induced in adult mice by anterior chamber presentation of minor histoincompatibility antigens, *J. Exp. Med.* 152 (1980) 1121-1125.

Svensson, J.-O.; Brattström, C.; Säwe, J.: Determination of Rapamycin in Whole Blood by HPLC, *Ther. Drug Monit.* 19 (97) 112-116.

## T

Tchah, H. and Lim, B.: Effect of FK 506 on the cornea: use of topical FK 506 in corneal transplantation in a guinea pig-rat model, *Korean J. Ophthalmol.* 13 (1999) 71-77.

Trommer, H.; Neubert, R.H.H.: Overcoming the Stratum Corneum: The Modulation of Skin Penetration; *Skin Pharmacol. Physiol.* 19 (2006) 106-121.

Trotta, M.; Pattarino, F.; Ignoni, T.: Stability of drug-carrier emulsions containing phosphatidylcholine mixtures, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 53 (2002) 203-208.

Turner, K.; Pflugfelder, S.C.; Ji, Z.; Feuer, W.J.; Stern, M.; Reis, B.L.: Interleukin-6 levels in the conjunctival epithelium of patients with dry eye disease treated with ciclosporine ophthalmic emulsion, *Cornea* 19 (2000) 492-496.

## V

Vail, A.; Gore, S.M.; Bradley, B.A.; Easty, D.L.; Rogers, C.A.; Armitage, W.J.: Clinical and surgical factors influencing corneal graft survival, visual acuity and astigmatism, *Ophthalmology* 103 (1996) 41-49.

Vandamme, T.F.: Microemulsions as ocular drug delivery systems: recent developments and future challenges, *Prog. Retr. Eye Res.* 21 (2002) 15-34.

Vantrappen, L.; Geboes, K. Et al.: Lymphocytes and langerhans cells in the normal human cornea, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 26 (1985) 220-225.

Venkataram, S.; Awni, W.M.; Jordan, K.; Rahman, Y.E.: Pharmacokinetics of two alternative dosage forms for ciclosporine: Liposomes and Intralipid, *J. Pharm. Sci.* 79 (1990) 216-219.



Von der Ohe, N.; Stark, M.; Mayer, H.; Brewitt, H.: How can the bioavailability of timolol be enhanced? A pharmacokinetic pilot study of novel hydrogels, *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 234 (1996) 425-456.

## W

Wang, J.-J.; Sung, K.C.; Hu, O. Y.-P.; Yeh, C.-H.; Fang, J.-Y.: Submicron lipid emulsion as a drug delivery system for nalbuphine and its prodrugs, *J. Contr. Rel.* 115 (2006) 140-149.

Wang, W.; Sasaki, H.; Chien, D.S.; Lee, V.H.L.: Lipophilicity influence on conjunctival and corneal drug penetration in the pigmented rabbit: a comparison with corneal penetration, *Curr. Eye Res.* 10 (1991) 571-579.

Watsky, M.A.; Jablonski, M.M.; Edelhauser, H.F.: Comparison of conjunctival and corneal surface areas in rabbit and human, *Curr. Eye Res.* 7 (1988) 483-486.

Wehrle, P.; Korner, D.; Benita, S.: Sequential Statistical Optimization of a Positively-Charged Submicron Emulsion of Miconazole, *Pharm. Dev. Technol.* 1 (1996) 97-111.

Westesen, K.; Bunjes, H.; Koch, M.H.J.: Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential, *J. Contr. Rel.* 48 (1997) 223-236.

Weyenberg, W.; Filev, P.; Van den Plas, D.; Vandervoort, J.; De Smet, K.; Sollie, P.; Ludwig, A.: Cytotoxicity of submicron emulsions and solid lipid nanoparticles for dermal application, *Int. J. Pharm.* 337 (2007) 291-298.

Wiederholt, M.; Kossendrup, D.; Schulz, W.; Hoffmann, F.: Pharmacokinetic of topical ciclosporine A in the rabbit eye, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 27 (1986) 519-524.

Wolf, F.; Juestel, C.; Schreiber, J.; Klier, M.: Sphingolipids as antimicrobial agents, German Patent 19602108 (1997).

Wretling, A.: Development of fat emulsions, *J. Parenter. Enter. Nutr.* 5 (1981) 230-235.

Wu, C.-Y.; Benet, L. Z.: Predicting Drug Disposition via Application of BCS: Transport/Absorption/Elimination Interplay and Development of a Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System, *Pharm. Res.* 22 (2005) 11-23.

## Y

Yamamoto, A.; Serizawa, S.; Ito, M.; Sato, Y.: Stratum corneum abnormalities in atopic dermatitis, *Arch. Dermatol. Res.* 283 (1991) 219-223.

Yang, S.; Zhu, J.; Lu, Y.; Liang, B.; Yang, C.: Body distribution of camptothecin solid lipid nanoparticles after oral administration, *Pharm. Res.* 16 (5) (1999) 751-757.

Yilmaz, E.: Entwicklung phytosphingosinhaltiger, positiv geladener Nanoemulsionen zur dermalen Applikation, Dissertation (2005).

Yilmaz, E.; Borchert, H.-H.: Design of a phytosphingosine-containing, positively-charged nanoemulsion as a colloidal carrier system for dermal application of ceramides, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 60 (2005) 91-98.

Yilmaz, E.; Borchert, H.-H.: Effect of lipid-containing, positively charged nanoemulsions on skin hydration, elasticity and erythema- An in vivo study, *Int. J. Pharm.* 307 (2006) 232-238.

## **Z**

Zara, G.P.; Cavalli, R.; Fundaro, A.; Bargoni, A.; Caputo, O.; Gasco, M.R.; Pharmacokinetics of doxorubicin incorporated in solid lipid nanospheres (SLN), *Pharm. Res.* 40 (1999) 281-286.

Zhang, Q.; Yie, G.; Li, Y.; Yang, Q.; Nagai, T.; Studies on the ciclosporin A loaded stearic acid nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 200 (2000) 153-159.

Zurowska-Pryczkowska, K.; Sznitowska, M.; Janicki, S.: Studies on the effect of pilocarpine incorporated into a submicron emulsion on the stability of the drug and the vehicle, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 47 (1999) 255-260.

## 11 Publikationsliste

### Zeitschriftenartikel

Baspinar, Y.; Bertelmann, E.; Pleyer, U.; Buech, G.; Siebenbrodt, I.; Borchert, H.-H.: Corneal Permeation Studies of Everolimus-Microemulsion, J. Ocular Pharmacol. Ther. 24 (2008) 399-402.

Baspinar, Y., Keck, C.M. and Borchert, H.-H.: Positively charged prednicarbate nanoemulsion for the treatment of atopic dermatitis, eingereicht bei Int. J. Pharm. Sci.  
Artikel in Review

Baspinar, Y. and Borchert, H.-H.: Penetration of a prednicarbate- containing positively charged nanoemulsion for dermal application- is there a benefit?  
Artikel in Vorbereitung

Baspinar, Y. and Borchert, H.-H.: Everolimus- containing nanoemulsion for dermal application- is there a chance?  
Artikel in Vorbereitung

Baspinar, Y. and Borchert, H.-H.: Stable positively charged nanoemulsion for dermal application of sirolimus and everolimus- is there a penetration?  
Artikel in Vorbereitung

## **Vorträge**

Baspinar, Y. und Borchert, H.-H., Entwicklung und Charakterisierung positiv geladener, Prednicarbat-haltiger Nanoemulsionen zur dermalen Applikation, DPhG Doktorandentagung (2007)

## **Posterpräsentationen**

Baspinar, Y. and Borchert, H.-H.; mTOR inhibitors for dermal application- a possible formulation, International Symposium of Pharmaceutical Technology Sep. 5<sup>th</sup>-9<sup>th</sup>, 2008, Antalya, Turkey

Baspinar, Y. und Borchert, H.-H., Entwicklung und Charakterisierung positiv geladener Nanoemulsionen zur dermalen Applikation, Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft (DPhG), Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor, Berlin 2006

Baspinar, Y. und Borchert, H.-H., Positiv geladene Nanoemulsion zur dermalen Applikation von Everolimus, Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft (DPhG), Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor, Berlin 2008

## 12 Lebenslauf

**Diese Seite wurde aus Datenschutzgründen entfernt.**

### 13 Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Borchert danke ich ganz herzlich für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und seine ausgezeichnete wissenschaftliche sowie menschliche Betreuung und volle Unterstützung mit anregenden Diskussionen und Tipps. Die mir gewährten Freiräume bei der Erstellung dieser Arbeit waren sehr hilfreich. Sein menschliches Verständnis und seine Bemühungen um eine familiäre und harmonische Atmosphäre im Arbeitskreis machten nicht nur mir das Arbeiten sehr leicht.

Herrn Dr. Siebenbrodt danke ich für seine Bereitschaft zur Diskussion und sein offenes Ohr für sämtliche Probleme. Seine sehr hilfreichen Ratschläge bei technologischen Fragestellungen haben mir einiges erleichtert.

Herrn Dr. Brosig danke ich für seine Unterstützung nicht nur beim apparativen Aufbau und der Durchführung der Penetrationsversuche und für die Hilfe bei der Präparation der Schweineaugen. Ohne ihn wäre die gleichzeitige Studentenbetreuung und Versuchsdurchführung nicht möglich gewesen.

Herrn Prof. Dr. Pleyer und Herrn Prof. Dr. Bertelmann danke ich für die finanzielle Möglichkeit der Untersuchung der Permeation von Everolimus an Schweineaugen.

Herrn Dr. Herrmann danke ich nicht nur für die kritische Durchsicht einiger Manuskripte und Präsentationen, sondern auch für die anschließende Diskussion.

Seine Hilfsbereitschaft in allen Computerproblemen und Fragen haben mir einiges an Zeit Nerven erspart.

Man musste bei ihm im Labor nie hungern.

Herrn Dr. Bauer von der Charite Berlin danke für seine Unterstützung bezüglich des FPIA. Seine Hilfe mir bei fehlenden Reagenzien auszuhelfen werde ich ihm nie vergessen. Seine fachliche Kompetenz wird durch seine zahlreichen Vorträge in Fachkreisen wiedergespiegelt, die zeigen, dass er sich bestens mit dem Thema auskennt.

Der Firma mibe GmbH danke ich für die Bereitstellung des Prednicarbats über den Zeitraum von 3 Jahren, ohne den die Arbeit nicht erfolgt hätte.

Herrn Dr. Lersch von der Firma Degussa danke ich für die Bereitstellung von Phytosphingosin und kosmetischen Ölkomponenten.

Herrn Dr. Wajda danke ich für die Bereitstellung der Lipide.

Frau Fuhrmann-Selter danke ich für ihre aktive Unterstützung bei der Durchführung des FPIA und bei der Extraktion der Hautproben nach den Penetrationsversuchen.

Frau Peggy Schlupp danke ich ganz herzlich für viele Diskussionen und Fragestellungen in jeglicher Sicht.

Frau Prof. Schäfer-Korting danke ich für ihre unkomplizierte Hilfe bei der Benutzung des Gefriermikrotoms zum Schneiden der Hautproben.

Frau Uwarow von der Lehr- und Versuchsanstalt Teltow (LVAT) danke ich für die Bereitstellung der Schweineaugen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Müller bedanken, der mir die Grundlagen der Nanotechnologie beigebracht hat und bei dem ich sehr viel gelernt habe. Ohne die Bereitstellung der Geräte zur Partikelanalyse zu nutzen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

An dieser Stelle auch ein ganz großes Dankeschön an Herrn Dr. Yilmaz, ohne dessen Ansporn ich diese Arbeit nie zu Ende gebracht hätte. Seine motivierenden Worte haben mir durch einige Täler in den letzten Jahren geholfen.

Meinen Mitdoktoranden Dr. Bettina Großkopf, Dr. Guido Büch, Andreas Schendler, Benjamin Wessinger, Julian Gallego Llerena und Dr. Christian Wischke danke ich für die gute  
Arbeitsatmosphäre.

## Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Berlin, den 25.08.2009

Yücel Baspinar