

6 Zusammenfassung/ Summary

Zusammenfassung. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollten geeignete Formulierungen für die bisher nur systemisch eingesetzten Arzneistoffe Ciclosporin und Mycophenolat Mofetil entwickelt werden, die eine erfolgreiche topische Therapie chronisch entzündlicher Hauterkrankungen ermöglichen. Darüber hinaus sollten im zweiten Teil dieser Arbeit für die beiden Arzneistoffe Sirolimus und Everolimus Augentropfen zur topischen Behandlung von entzündlichen Augenerkrankungen und zur Immunsuppression nach Keratoplastiken entwickelt werden.

Konventionelle Formulierungen wie z. B. Salben, Cremes oder Oleogele mit Ciclosporin und Mycophenolat Mofetil sind meistens unwirksam. Die Applikation gemeinsam mit starken Penetrationsenhancern, hohen Tensidkonzentrationen oder eine provozierte Schwächung der Hautbarrierefunktion scheint für eine Therapie erkrankter Haut nicht empfehlenswert zu sein. Daher wurden in dieser Arbeit gut verträgliche Lipidvesikel mit Ceramid IIB (CER), Diacylglyceriden (DAG) oder Phosphatidylcholin (PC) als Hauptkomponenten hergestellt. Die Lipidzusammensetzungen in den Ceramidvesikeln sollten eine möglichst weitgehende Ähnlichkeit zur extracellulären Lipidmatrix des humanen Stratum corneum aufweisen. Die Hydratisierung von Lipidfilmen mit Ceramiden und die Extrusion der gebildeten Vesikel durch Polycarbonatmembranen gelang durch eine Kombination technologischer Maßnahmen, wie der Auswahl geeigneter hydrophiler Emulgatoren, einer Temperaturerhöhung auf 80 °C, dem Einsatz von Mischkörpern, sowie dem Zusatz von 10 proz. Propylenglycol zur hydrophilen Phase. Die entwickelten Formulierungen erhielten die Bezeichnungen CER(-), CER(+), CER(I), DAG(B), DAG(I), PC(-) und PC(+), wobei (+) oder (-) das Vorzeichen des Zetapotenzials symbolisieren. B oder I steht für die hydrophilen Emulgatoren Brij[®] 58 oder Imwitor[®] 375. Die hergestellten Vesikel waren unilamellar, hatten mittlere Teilchendurchmesser zwischen 74 und 235 nm und Membrandicken zwischen 3,5 und 4,5 nm. Ausreichende Löslichkeiten wurden für Ciclosporin mit DAG und CER Vesikeln, für Mycophenolat Mofetil in PC und CER Vesikeln erzielt. Die Löslichkeit von Mycophenolat Mofetil wurde durch Ansäuern der hydrophilen Phase mit 0,4 proz. Milchsäure erhöht. Die Löslichkeit in den günstigsten Formulierungen betrug 6,6 – 7,4 mg/ml für Ciclosporin und 8,9 – 9,8 mg/ml für Mycophenolat Mofetil. CER und DAG Vesikel mit Ciclosporin waren über eine

Lagerzeit von drei Monaten deutlich stabiler als CER und PC Vesikel mit Mycophenolat Mofetil. Die Stabilität der PC(+) Vesikel konnte durch Austausch von natürlichem Sojalecithin gegen eine hochgereinigte Sorte mit gesättigten Alkylketten erhöht werden, blieb aber trotzdem unbefriedigend.

Im Hinblick auf die dermatologische Wirkung der Formulierungen und ihre Lagerstabilität wurden die Phasenübergangstemperaturen, der Aggregatzustand von schwer dispergierbaren Lipiden wie Ceramid IIIB und Phytosphingosin, Phasenseparationen sowie die regiospezifische Mikroviskosität der CER und DAG Membranen untersucht. In der Literatur wird der Mikroviskosität von Lipidvesikeln eine hohe Bedeutung für den Transport eingeschlossener Arzneistoffe ins Stratum corneum beigemessen. In DSC Scans konnten in DAG(I) und CER(I) Formulierungen mit Imwitor 375[®] als Emulgator sowohl frisch hergestellt als auch nach drei Monaten Lagerzeit keine Peaks beobachtet werden, was Hinweise auf den flüssigkristallinen Aggregatzustand dieser Vesikel über die gesamte Lagerzeit liefert. Der Emulgator Brij[®] 58 kann allerdings oberhalb von 70 °C unter Ausbildung micellarer Strukturen den Bilayer verlassen. Die dadurch bedingte Membranzerstörung erschwerte eine eindeutige Detektion von DSC Peaks oberhalb von 70 °C in DAG(B), CER(-) und CER(+).

Deshalb mussten zusätzliche Informationen mit Hilfe der Protonenresonanzspektroskopie (¹H NMR) gewonnen werden. Anhand ihrer hohen Signalintensität wurde eine hohe Protonenmobilität in den Alkylketten der Lipide von DAG Membranen registriert. Dies bestätigt den flüssigkristallinen Zustand dieser Vesikel. Die geringe Signalintensität der Protonen an den Cholesterolringen zeigte, dass die Beweglichkeit benachbarter Lipide durch den starren immobilisierten Cholestangrundkörper eingeschränkt wird. Die Signalintensitäten der Protonen in den Alkylketten der CER(I) Membranen waren deutlich niedriger als in den DAG Membranen, während in CER(-) und CER(+) aus diesem Bereich nahezu keine Peaks beobachtet werden konnten. CER(I) liegt folglich im flüssigkristallinen Zustand vor, hat aber eine höhere Mikroviskosität als die DAG Membranen. CER(-) und CER(+) weisen dagegen einen Gelzustand auf. Trotzdem existieren in diesen hochviskosen Membranen Regionen mit erhöhter Protonenmobilität, vor allem an Doppelbindungen und in terminalen Methylgruppen. Folglich kann in hochviskosen Ceramidmembranen die Diffusion von Arzneistoffen parallel zur Membranoberfläche bevorzugt entlang der mobilen terminalen Methylgruppen stattfinden. Der sperrige Cholesterolgrundkörper

mit seiner Doppelbindung verhindert in den hochviskosen Ceramidmembranen die Ausbildung einer hohen lateralen Packungsdichte der Lipide. Daraus folgt, dass Arzneistoffe in Nachbarschaft zur Doppelbindung der Cholesterolemoleküle im Vergleich zu cholesterolfreien Domänen erleichtert von einer Seite der Membran auf die andere permeieren können. Anhand der fallenden Protonenmobilität in ihren Membranen lassen sich die fünf untersuchten Zubereitungen in die folgende Reihenfolge steigender Mikroviskosität einordnen: DAG(I)<DAG(B)<CER(I)<CER(-)<CER(+).

Die Ergebnisse der ^1H NMR wurden anhand quantitativer ESR Messungen untermauert. Die fluiden DAG Vesikel wiesen eine Mikroviskosität von 39,84 - 43,48 mPa s auf, PC(-) und CER(I) lagen bei 71,02 – 78,27 mPa s, während CER(-), PC(+) und CER(+) mit jeweils $267,17 \pm 68,2$, $538,08 \pm 184,2$ und $565,84 \pm 163,0$ mPa s deutlich hochviskoser waren. Im Vergleich dazu haben einfache Liposomen aus natürlichem Sojaphosphatidylcholin eine Mikroviskosität von $49,8 \pm 2,5$ mPa s, während für gemischte Sojaphosphatidylcholin/ Natriumcholatvesikel (sogenannte Transfersomen[®]) erniedrigte Mikroviskositäten von $28,8 \pm 2,5$ mPa s gemessen wurden.

Durch Verwendung eines Mehrschichtmodells mit lipophilen Akzeptormembranen, das wegen der geringen Wasserlöslichkeit der Wirkstoffe genutzt werden musste, wurde eine steigende Freisetzungsgeschwindigkeit von Ciclosporin und Mycophenolat Mofetil für CER Vesikel im Vergleich zu PC und DAG Vesikeln gemessen. Folglich hat die Lipidzusammensetzung den stärksten Einfluss auf die Freisetzungsgeschwindigkeit. Insbesondere die starke Adhäsion der Ceramidmembranen an lipophilen Oberflächen beschleunigt unter diesen Bedingungen die Freisetzung. Dagegen hatten Mikroviskosität und Zetapotenzial nur eine untergeordnete Bedeutung für die in-vitro Freisetzung.

Im zweiten Teil der Arbeit erwies sich die Entwicklung von Augentropfen mit dem nahezu wasserunlöslichen mTOR Inhibitor Sirolimus als große Herausforderung. Wegen zu geringer Löslichkeit und Stabilität von Sirolimus mussten Cyclodextrinkomplexe, Liposomen und Poloxamergele als potentielle Darreichungsformen ausgeschlossen werden. In hydrotropen Mischungen zeigte Sirolimus zwar ausreichende Löslichkeit, aber wegen geringer Stabilität und ungenügender cornealer Verträglichkeit musste diese Darreichungsform verworfen

werden. Dagegen konnte eine Mikroemulsion erfolgreich genutzt werden, um Sirolimus in einer ophthalmologisch anzustrebenden Konzentration von 1 mg/ml zu lösen. Dies entspricht einer Erhöhung der Löslichkeit um etwa den Faktor 400. Trotz allgemein geringer Stabilität erwies sich Sirolimus in der Mikroemulsion über einen Zeitraum von 12 Monaten bei 20 °C unter Lichtschutz haltbar. Eine aseptische Herstellung der Zubereitung ist notwendig, da übliche Sterilisationsverfahren nicht angewendet werden können. Die Augentropfen sind zur Behandlung chronisch entzündlicher Erkrankungen im externen Augenbereich verwendbar, z. B. trockene Bindehautentzündung, allergische Bindehautentzündung oder atopische Lidrandentzündung. Sie sind allerdings nicht in der Lage, wirksame Sirolimuskonzentrationen im Corneaendothel oder im Kammerwasser aufzubauen. Aufgrund der fehlenden Permeation erscheint die Eignung zur Prävention cornealer Abstoßungsreaktionen und zur Therapie der Autoimmunuveitis fraglich.

Das Sirolimusderivat Everolimus wurde zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit entwickelt. Die etwa achtfach höhere Wasserlöslichkeit und der kleinere Verteilungskoeffizient von Everolimus ermöglicht die Einarbeitung in einer Konzentration von 1 mg/ml sowohl in einem 15 proz. Poloxamer 407 Gel als auch in einer Mikroemulsion. Allerdings zeigte Everolimus in einem viskositätsoptimierten Poloxamer gel eine eingeschränkte Stabilität mit Abbauraten von etwa 50 % in nur drei Monaten. In der Mikroemulsion war Everolimus bei 20 °C ebenfalls über 12 Monate annähernd stabil.

An einem experimentellen Keratoplastikmodell wurde *in vivo* die Wirksamkeit der Mikroemulsionen mit Sirolimus oder Everolimus bei der Prävention der Abstoßungsreaktion untersucht. Die Transplantatüberlebenszeit in der vehikelbehandelten Kontrollgruppe betrug $13,3 \pm 1,7$ d und konnte durch topische Applikation von Mikroemulsionen mit 0,025 oder 0,05 proz. Everolimus signifikant auf $16,4 \pm 2,3$ d und $21,4 \pm 7,0$ d verlängert werden. Dagegen wurde die Überlebenszeit der Transplantate durch Applikation von 0,1 proz. Sirolimus oder 0,1 proz. Everolimus verkürzt. Aufgrund der beobachteten Wundheilungsstörungen, die wahrscheinlich auf eine Hemmung der Zellproliferation zurückzuführen sind, wird für die Zukunft die topische Applikation von Sirolimus und Everolimus im Rahmen der Glaukomchirurgie erwogen.

Summary. In the first part of the present study the well compliant lipid vesicles CER(-), CER(+) CER(I), DAG(B), DAG(I), PC(-), and PC(+) have been developed using ceramide IIIB (CER), diacylglycerides (DAG), or phosphatidylcholine (PC) as main lipids for a topical treatment of chronic inflammatory dermatoses with the poorly soluble immunosuppressants ciclosporine and mycophenolate mofetil (MMF). B and I indicate the used hydrophilic emulsifiers Brij[®] 58 or Imwitor[®] 375 whereas (+) or (-) symbolise the positive or negative zeta potential.

Adequate solubilities were obtained with lipid vesicles containing DAG or CER for ciclosporine, and PC or CER for MMF. The manufactured vesicles were unilamellar, had average diameters between 74 and 235 nm, as well as membrane thicknesses between 3.5 and 4.5 nm. The solubility of ciclosporine and MMF in the most favorable formulations was 6.6-7.4 mg/mL and 8.9-9.8 mg/mL, respectively. The solubility of MMF was increased by acidification of the hydrophilic phase with lactic acid. CER and DAG vesicles with Ciclosporin were much more stable than CER and PC vesicles with MMF over 3 months storage.

The microviscosity of vesicle membranes influences the drug release into the skin whereas the prevention of recrystallisation processes and phase separations in the membrane are also important for their storage stability. Particularly the microviscosity in the membrane, the phase inversion temperature, and the state of aggregation of scarcely dispersible lipids like ceramide IIIB or phytosphingosine should be examined in CER und DAG vesicles. Differential scanning calorimetry (DSC) scans indicate fluid membranes in CER(I) and DAG(I) with Imwitor[®] 375 as hydrophilic surfactant. Brij[®] 58 can leave the bilayer at temperatures > 70 °C and constitutes micellar structures. The resulting membrane destruction above this temperature complicates a purposeful analysis in CER(-), CER(+) and DAG(B) due to multiple peaks in DSC scans.

¹H NMR spectra present clear proton peaks in alkyl chains between 1.3 and 3 ppm in DAG(I), DAG(B) and CER(I) indicating the fluid state of their membranes. In CER(-) and CER(+) almost no signals are observable between 1.3 and 3 ppm. Consequently these membranes are in a gel state. Selected protons in hydrophilic head groups of Brij[®] 58 and Imwitor[®] 375, close to double bonds, or in terminal methyl groups have an enhanced peak intensity indicating their higher mobility whereas other protons for instance in cholesterol have a decreased peak intensity. It can be concluded that within the membranes regions of different local microviscosities exist. The cholesterol ring

system decreases the mobility of alkyl chains in fluid membranes close to the membrane surface. In gel state vesicles the cholesterol ring system with its double bond disturbs a high lateral package density and increases the mobility of terminal methyl groups. Consequently in rigid ceramide membranes a diffusion of drugs from one membrane side to the other is facilitated in cholesterol domains, whereas the diffusion of lipophilic drugs parallel to the membrane surface is enhanced close to the terminal methyl groups. The hydrophilic head groups are not included into the inner region of the bilayer. The membrane viscosities increase in the order DAG(I)<DAG(B)<CER(I)<CER(-)<CER(+).

In order to quantify the microviscosity in vesicle membranes the electron spin resonance (ESR) was used. The fluid DAG vesicles had a microviscosity of 39.84 – 43.48 mPa s, PC(-) and CER(I) were determined with 71.02 – 78.27 mPa s, whereas CER(-), PC(+) and CER(+) were much more rigid with 267.17 ± 68.2 , 538.08 ± 184.2 , and 565.84 ± 163.0 mPa s, respectively. Liposomes containing natural soyphosphatidylcholine have a microviscosity of 49.8 ± 2.5 mPa s, and mixed soyphosphatidylcholine/ sodium cholate vesicles (so called Transfersomes[®]) had decreased microviscosities of 28.8 ± 2.5 mPa s.

A multilayer model with lipophilic acceptor membranes was used to determine the in vitro drug release due to the poor aqueous solubility of ciclosporine and MMF. An increased release of both drugs was detected for rigid CER vesicles in comparison to the other formulations, especially to the very fluid DAG vesicles. The enhanced adhesion of ceramide vesicles to lipophilic surfaces increases the drug release under these conditions. Consequently the lipid composition in the vesicle membranes is much more important for the in-vitro drug release, whereas their microviscosity and their zeta potential have no or only minor influence.

The second part of the present paper shows the development of eye drops with 1 mg/mL sirolimus or everolimus. Cyclodextrin solutions, liposomes, hydrotrope mixtures, poloxamer gels, and a microemulsion were tested for their suitability to dissolve the extremely hydrophobic drug sirolimus whereas a poloxamer gel and a microemulsion were proved to dissolve everolimus. Both drugs are sensitive to hydrolysis, high temperatures, and oxidation induced by light exposure. A microemulsion is a suitable vehicle to prepare eye drops with sufficiently high sirolimus concentrations of 1 mg/mL in a formulation with acceptable tolerance and satisfactory stability over 12 months. An

aseptic processing is necessary because common sterilisation procedures can not be performed. However, the drug can not permeate the intact cornea. After removal of the corneal epithelium drug concentrations in the acceptor sample reach the lower limit of therapeutical levels. As a consequence the present sirolimus eye drops might be a promising therapeutic tool for immunomodulatory treatment of ocular surface disorders like keratoconjunctivitis sicca, vernal conjunctivitis, or atypical blepharitis. They are not suitable to achieve therapeutic concentrations in the aqueous humour of patients with intact cornea.

Everolimus was developed to overcome the low bioavailability of sirolimus and has an eight times higher solubility in water as well as a lower distribution coefficient. Therefore everolimus was soluble in a concentration of 1 mg/mL in a poloxamer gel as well as in the microemulsion. Unfortunately the drug showed a degradation rate of approximately 50 % in three months in the poloxamer gel, but in the microemulsion it was almost stable over 12 months at 20 °C.

The topical administration of the microemulsion with everolimus or sirolimus was examined for a prevention of corneal allograft rejections in an experimental rat model. Local administration of 0.05 % or 0.025 % everolimus showed significantly prolonged mean survival times of corneal grafts (21.4 ± 7.0 days, and 16.4 ± 2.3 days, respectively) in comparison to the vehicle control group (13.3 ± 1.7 days). In contrast to these results the mean survival time was reduced by a topical administration of 0.1 % sirolimus or everolimus. This observation was associated with reduced lesion healing which was probably induced by an inhibition of cell proliferation. Therefore a topical application of sirolimus or everolimus in the antiglaucoma surgery should be investigated in the future.