

B. Prophylaxe der Immunreaktion durch lokale Immunsuppression

1. Grundlagen der lokalen immunmodulatorischen Therapie

Zur lokalen pharmakologischen Therapie steht am Auge eine Vielzahl von Substanzen zur Verfügung, die auf unterschiedliche Weise an ihren Wirkungsort gelangen können. Der Wirkungsort selbst kann wiederum auch verschieden sein und beispielsweise im Bereich der okulären Oberfläche, in der Vorderkammer, aber auch in den regionalen Lymphknoten oder anderen Stationen des Immunsystems (z.B. Milz, Knochenmark) liegen. Die zur Prophylaxe und Therapie von Immunreaktionen nach Keratoplastik relevanten Wirkorte sind letztendlich nicht abschließend bekannt, an den Strukturen des Auges selbst gehören die okuläre Oberfläche und die Vorderkammer dazu. Durch die Lokaltherapie werden im wesentlichen die Strukturen des Auges selbst erreicht, mit Einschränkung eventuell auch die regionalen Lymphknoten. Um eine Substanz dorthin zu bringen, gibt es grundsätzlich eine Vielzahl von Möglichkeiten oder Applikationsformen. Dazu gehören die topische Applikation (z.B. Augentropfen), die systemische Applikation, oral oder intravenös, außerdem die lokale subkonjunktivale oder subtenonale Injektion. Schließlich gibt es die Möglichkeit der intraokularen Applikation durch intravitreale Injektion oder die Implantation von Medikamententrägern. Auch die topische Anwendung kann in unterschiedlicher Form erfolgen. Neben der Gabe in Form von Augentropfen kann ein Wirkstoff als Augengel, Augensalbe oder mittels eines Trägers, z.B. einer Kontaktlinse, appliziert werden. Die Wahl der geeigneten Applikationsform richtet sich nach der Lokalisation und der Ausprägung der zugrunde liegenden Veränderung und der angestrebten Wirkdauer. Auch eine Kombination von lokaler und systemischer Therapie ist in vielen Fällen sinnvoll.

Zur Prophylaxe und Therapie der Immunreaktion nach Keratoplastik stehen Wirkstoffe prinzipiell verschiedener Substanzklassen zur Verfügung. Dazu gehören vor allem die Steroide sowie die Immunsuppressiva.

1.1. Pharmakodynamische Aspekte

Obwohl die Immunantwort vor allem eine systemische Reaktion des Organismus darstellt, können lokale Immunmechanismen einen wesentlichen Beitrag leisten. Spezifische Mechanismen des afferenten Schenkels der Immunantwort an der Augenoberfläche werden

seit Beginn der 1980er Jahre mit der Charakterisierung der Langerhans-Zellen und der Entdeckung ihrer Rolle als Antigen-präsentierende Zellen (APC's) beschrieben (Gillette 1982). Die funktionelle Gliederung des lymphatischen Gewebes auf der Augenoberfläche ist von Wotherspoone (Wotherspoone 1994) beschrieben worden. Er fand lockere Aggregationen von Lymphozyten und Sekundärfollikel mit Keimzentren, T-, B- und Plasmazellen, in analoger Organisation zum gastrointestinalen, urogenitalen oder respiratorischen lymphoiden Gewebe (MALT). Jedoch wurde organisiertes lymphoides Gewebe in nur 31 % der analysierten Präparate gefunden. 1997 analysierten Hingorani et al. die Verteilung der Leukozyten der normalen menschlichen Konjunktiva (Hingorani 1997). Sie fanden T-Zellen, Makrophagen und seltener B-Zellen und Neutrophile im konjunktivalen Epithel, und T- und B-Zellen, Makrophagen, Plasmazellen, „Natural killer“- (NK)-Zellen, Mastzellen und Neutrophile in der Substantia propria. HLA-Dr exprimierende APC's kommen in der Konjunktiva als CD68-positive Makrophagen und Langerhans-Zellen vor. Im Jahr 2000 untersuchten Knop et al. die Verteilung des lymphoiden Gewebes an kompletten Konjunktiva-Präparationen von menschlichen Leichenaugen (Knop 2000). Diese Studien untermauerten das Konzept des Konjunktiva assoziierten lymphatischen Gewebes („CALT“). Wesentliche Aspekte der Immunbiologie der Hornhaut werden in der folgenden Abbildung dargestellt. Lokale Mechanismen der Immunantwort als mögliche Ziele für eine lokale immunmodulatorische Therapie umfassen die Induktion der Expression von MHC II in der zentralen Hornhaut durch proinflammatorische Zytokine (z.B. Interferon-gamma (IFN- γ)) und die zentripetale Migration der Antigen-präsentierenden Zellen (APC's) von der Limbusregion unter dem Einfluss von z.B. TNF- α (Dekaris 1999).

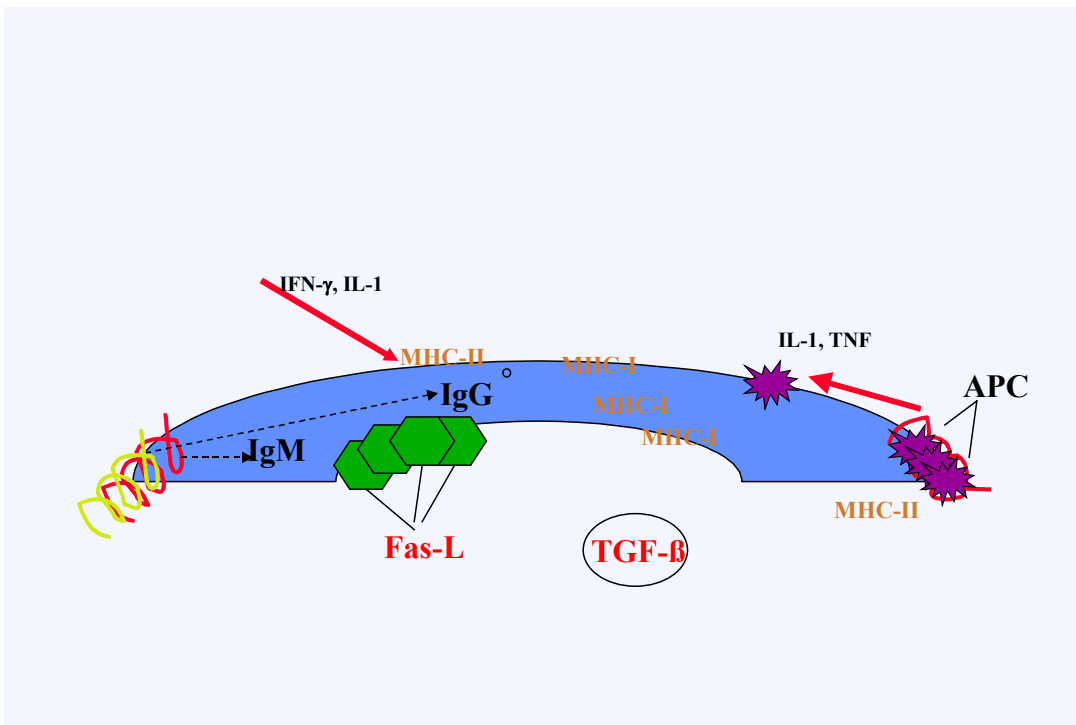


Abbildung 14: Immunbiologie der Hornhaut

Immunglobuline können die zentrale Hornhaut durch Diffusion aus den Limbusgefäßen erreichen. Korneale Epithelzellen, Keratozyten und Endothelzellen exprimieren MHC I. Zytokine wie IFN- γ oder IL-1 stimulieren Epithelzellen, MHC II zu exprimieren. Antigen-präsentierende Zellen (APC's) sind in der peripheren Hornhaut angesiedelt. Sie können durch proinflammatorische Zytokine (IL-1, TNF) zur zentripetalen Migration stimuliert werden. Außerdem können unreife APC's in der zentralen Hornhaut zur Expression von MHC-II stimuliert werden. Das Endothel exprimiert FAS-Ligand (FAS-L). Die Bindung an FAS-Ligand induziert Apoptose in T-Lymphozyten. Kammerwasser enthält hohe Konzentrationen an TGF- β . Die beiden letztgenannten Phänomene tragen wesentlich zur Aufrechterhaltung des Vorderkammerprivilegs (ACAID) bei.

Dennoch ist die Immunantwort eine systemische Reaktion, die im Immun-Reflexbogen über afferenten Schenkel, zentrales Antigen-Processing und efferenten Schenkel organisiert wird. Naturgemäß kann die topische Therapie nur auf die lokalen Mechanismen des afferenten oder efferenten Schenkels einwirken, kann jedoch das zentrale Antigen-Processing, das in den regionalen Lymphknoten oder in der Milz erfolgt, nicht direkt beeinflussen.

Wirkstoffkonzentrationen in regionalen Lymphknoten sind allerdings nach topischer Applikation bisher nicht untersucht worden.

Hohe Konzentrationen von immunmodulatorischen Wirkstoffen können auf der okulären Oberfläche verhältnismäßig leicht erreicht werden und infolgedessen gibt es zahlreiche Versuche, Erkrankungen der Konjunktiva und der okulären Oberfläche mit lokalen Immunmodulatoren –z.T. erfolgreich- zu therapieren (Keratokonjunktivitis sicca, Konjunktivitis vernalis). Im Gegensatz zu Krankheiten der Augenoberfläche können intraokulare immunmedierte Erkrankungen nur mit größeren Schwierigkeiten lokal immunsuppressiv behandelt werden. Ausreichende intraokulare Konzentrationen der bisher eingesetzten immunmodulatorischen Wirkstoffe sind schwer erreichbar, außerdem haben vorhandene Steroidpräparationen ausgezeichnete Penetrationseigenschaften (z.B. Prednisolonacetat), folglich ist der zu erzielende Standard für neue immunmodulatorische Wirkstoffe hoch. Der Bedarf an neuen pharmazeutischen Präparationen für aktuelle Immunmodulatoren kann daher als groß angesehen werden, die Entwicklung von neuen Formulierungen für bisher nicht lokal verfügbare Immunsuppressiva (Mycophenolat Mofetil, Rapamycin, Everolimus) stellt daher einen Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit dar.

1.2. Pharmakokinetische Aspekte

Chemische und physikalische Eigenschaften der Wirkstoffpräparationen, die die Hornhautpenetration beeinflussen, sind das Molekulargewicht, der Grad der Hydrophilie oder Lipophilie, pH-Wert, Osmolarität und die Viskosität der Präparation, von der die Kontaktzeit der Wirkstoffformulierung mit der Augenoberfläche abhängt. Der Grad der Hydrophilie wird durch den Oktanol-Wasser-Koeffizienten gekennzeichnet. Für eine günstige Penetration des lipophilen Epithels und des hydrophilen Stromas darf der Oktanol-Wasser-Koeffizient weder zu hoch noch zu tief sein. Vorteilhafte Korneapermeationseigenschaften haben Wirkstoffformulierungen mit einem Oktanol-Wasser-Koeffizienten von 2-3. Sehr lipophile Verbindungen werden im kornealen Epithel gespeichert und die intraokulare Bioverfügbarkeit ist sehr niedrig. Dies lässt sich beispielsweise in vielen Studien, die die okuläre Bioverfügbarkeit von Cyclosporin A untersucht haben, erkennen (Tabelle 2).

Tabelle 2: Studien über die Bioverfügbarkeit von topisch appliziertem Cyclosporin A (Augentropfen) in okulären Geweben: Die Konzentrationen in der Vorderkammer sind stark schwankend und niedrig, die Konzentrationen in der Hornhaut sind hoch.

Studie	Spezies	Dosis	CsA-Konz. Serum ng/ml	CsA-Konz. KW ng/ml	CsA-Konz. Konjunktiva ng/ml	CsA-Konz. Kornea ng/ml	Methode
Bell	Kaninchen	Tropfen 1%	116	27	-	-	Poly AK, RIA
Kaswan	Kaninchen	Tropfen 1%	-	85	-	>400 ng/g	Poly AK, RIA
Wiederholt	Kaninchen	Tropfen 2%	25-45	-	-	900-1400	
Stamer	Kaninchen	Tropfen 4%	-	1	133	551	Poly AK, RIA
Mosteller	Kaninchen	Tropfen 10%	75	62	-	557	Poly AK, RIA
Althaus	Mensch	Tropfen 2%	n.det.	81	-	-	HPLC, Mass.-spektr.
Pfau	Mensch	Tropfen 2%	4,7	33	10	-	Mono AK
Diaz-Lopes	Mensch	Tropfen 2%	n.det.	24	-	-	

Poly AK: polyklonale Antikörper, Mono AK: monoklonale Antikörper; RIA: Radioimmunassay, HPLC: "High performance liquid chromatography": Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, Mass.-spektr.

Massenspektrometrie, KW: Kammerwasser; n.det. nicht nachweisbar

Grundsätzlich ist eine lokale Pharmakotherapie am Auge durch wässrige Lösungen, Suspensionen, ölige Tropfen, Gele, Salben sowie solide Wirkstoffträger, z.B. Kontaktlinsen, möglich. Neben dem Erreichen einer hohen intraokularen Bioverfügbarkeit des aktiven

Wirkstoffs sollte die ideale Formulierung weder das Auge reizen noch die Sehschärfe beeinträchtigen. Der Grad der Reizung der okulären Oberfläche, den eine lokal applizierte Präparation erzeugt, ist von der Osmolarität der Zubereitung abhängig, während der Einfluss auf die Sehschärfe überwiegend durch die Viskosität bestimmt wird. So wird die lokale Medikamentenanwendung normalerweise in Form von niedrig-viskosen wässrigen Augentropfenlösungen bevorzugt. Wegen der häufig schlechten Wasserlöslichkeit der lipophilen Moleküle von Immunmodulatoren ist häufig der Einsatz von komplexierenden Substanzen oder Vehikeln notwendig, um eine ausreichende Wirkstoffkonzentration in der Präparation zu erreichen. Eine Möglichkeit zur Erhöhung der Löslichkeit von lipophilen Wirkstoffen ist die Komplexbildung mit Cyclodextrinen. Cyclodextrine (CDs) sind zyklische Oligosaccharidverbindungen, die normalerweise aus sechs bis acht Glykosid-verbundenen Glukoseeinheiten bestehen. Diese bilden Einschlusskomplexe mit lipophilen Wirkstoffmolekülen, was zu einer Zunahme der Löslichkeit und der hydrolytischen Stabilität führt. Es wird im allgemeinen angenommen, dass nur die freigesetzten Wirkstoffmoleküle und nicht der Wirkstoff-/CD-Komplex lipophile biologische Barrieren überwinden können (Loftsson 1999). Der Wirkstoff wird vor der Absorption aus dem Einschlusskomplex freigesetzt (van Dooren 1993). Im Falle wässriger Augentropfenlösungen können Cyclodextrine als Carrier dienen, indem sie die hydrophoben Wirkstoffmoleküle in gelöster Form halten und sie durch die wässrige Muzinschicht zur lipophilen epithelialen Barriere an der kornealen Oberfläche transportieren (Loftsson 1999). In der Augenheilkunde sind Cyclodextrine verwendet worden, um die Löslichkeit verschiedener Wirkstoffe zu erhöhen, wie Amphotericin B (Rajagopalan 1986) und Chloramphenicol (Abdel Rahman 1991), Karboanhydrasehemmer (Loftsson 1999), nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAID's), wie Diclofenac (Reer 1994) und Thalidomid (Siefert 1999). Außerdem sind vorteilhafte pharmakokinetische Eigenschaften von Cyclodextrin-Komplexen für Cyclosporin A (Sasamoto 1991) und, wie in dieser Arbeit dargestellt, für Mycophenolat Mofetil gezeigt worden (siehe unten).

Andere geeignete Vehikel zur Verbesserung der okulären Bioverfügbarkeit von lokal applizierten Pharmaka sind Liposomen. Liposomen sind membranähnliche Vesikel, die sowohl unilamellar als auch multilamellar sein können. Eine Verbesserung der intraokularen Bioverfügbarkeit von Immunmodulatoren durch Liposomen ist für Cyclosporin A (Milani 1993) und FK506 (Pleyer 1993) gezeigt worden. In einer Studie aus dem Jahr 2001 wurde die Anwendung von Chitosan-Nanopartikeln zur Applikation von Immunmodulatoren (CsA) an

der okulären Oberfläche untersucht (DeCampos 2001). Der Zweck dieser Vehikel ist nicht, die Hornhautpermeabilität zu verbessern, sondern die Konzentration des Wirkstoffs auf der okulären Oberfläche zu erhöhen. Die Autoren konnten eine erhebliche Zunahme der CsA-Konzentration in der Hornhaut und der Konjunktiva bis zu 24 Stunden nach der Applikation im Vergleich zur Anwendung von Suspension an einem Kaninchenmodell demonstrieren.

2. Topische Therapie mit Immunmodulatoren

Immunsuppressiva stellen derzeit einen wesentlichen Bestandteil der postoperativen Therapie bei Patienten nach Risikokeratoplastik zur Prophylaxe von Abstoßungsreaktionen dar (siehe Teil A). Zu diesem Zweck bisher zur Verfügung stehende Substanzen umfassen Cyclosporin A, Tacrolimus, Mycophenolat Mofetil, Sirolimus (Rapamycin), Everolimus und Leflunomid, wobei bisher vor allem Cyclosporin A und Mycophenolat Mofetil klinisch eingesetzt wurden. Die folgende Tabelle stellt klinisch relevante Parameter der verschiedenen zur systemischen Applikation in Frage kommenden Immunsuppressiva einschließlich der Nebenwirkungen zusammen.

Tabelle 3: Charakteristika der Immunsuppressiva zum systemischen Einsatz

Wirkstoff	Mechanismus	Initiale Dosis	Erhaltungsdosis	Nebenwirkungen	Kontrollparameter
Cyclosporin A	Calcineurin-Hemmer	3-5 mg/kg/d	Talblutspiegel 100-150 µg/l	Nierenfunktion, Hypertonus, Hirsutismus, Gingivahyperplasie, Tremor	Blutspiegel monatlich, Kreatinin, Blutdruck
Leflunomid	Pyrimidinsynthese-Hemmer	100mg/d	20 mg/d	Gastrointestinale Beschwerden, Hautausschläge, Alopezie, Hypertonie, Anämie	
Mycophenolat Mofetil	Purinsynthese-Hemmer	2 x 0,5 g/d	2 x 1,0 g/d	Diarrhoe, gastrointestinale Symptome, Infektion, Neutropenie	Blutbild, Leberenzyme
Tacrolimus	Calcineurin-Hemmer	0,1-0,2 mg/kg/d	Vollblutkonzentration 5–20 ng/ml	Knochenmarkdepression, Haematurie, Infektion	Blutspiegel, Blutbild, Urinstatus
Sirolimus (Rapamycin)	mTOR-Hemmer	6 mg/d	2 mg/d	Hyperlipidämie, Anämie, Leberfunktionsstörungen, Gelenksbeschwerden, Knochenschmerzen, Diarrhoe	Blutbild, Blutfette

Dem breiteren Einsatz von systemischen Immunsuppressiva stehen die aufgeführten, zum Teil schwerwiegenden Nebenwirkungen der Substanzen entgegen. Dazu kommt die mögliche Erhöhung der Infektionsanfälligkeit und die nicht auszuschließende Erhöhung der Inzidenz von Neoplasien, so dass der Einsatz dieser Substanzen für ophthalmologische Ziele an der Inkaufnahme möglicherweise lebensbedrohlicher Nebenwirkungen zu messen ist.

Wünschenswert wäre daher eine breitere lokale Anwendungsmöglichkeit immunmodulatorischer Substanzen.

Die zur lokalen Immunmodulation etabliertesten Wirkstoffe stellen die Steroide dar. Auf diese soll zunächst eingegangen werden, insbesondere weil sie den für die Anwendung anderer Immunmodulatoren zur Lokaltherapie zunächst zu erreichenden (bzw. zu übertreffenden) Standard darstellen. Anschließend werden die zum topischen Einsatz verfügbaren Immunsuppressiva einzeln dargestellt.

2.1. Steroide

Steroide sind bereits seit etwa 50 Jahren zur immunmodulatorischen Therapie etabliert und gehören zu den am meisten verordneten Wirkstoffen in der Ophthalmologie.

Intraokulare Steroidwirkungen

Die intraokulare Wirksamkeit von Steroiden basiert nicht nur auf einem einzelnen Angriffspunkt, sondern resultiert wie in anderen Geweben aus einer breiten Entfaltung antiinflammatorischer Effekte. Zu den Wirkungen der Steroide auf okuläre Gewebe gehören:

- Verminderung der zellulären Immunantwort
- Reduktion der entzündungsabhängigen erhöhten Gefäßpermeabilität
- Stabilisierung der Blut-Kammerwasserschranke
- Begrenzung der Fibrinexsudation
- Hemmung der Fibroblasten-Transdifferenzierung
- Hemmung der Epithelproliferation
- Hemmung der entzündlichen kornealen Neovaskularisation
- Verzögerung der Wundheilung
- Erhöhung des intraokularen Drucks
- Förderung der Kataraktentstehung

Ein wichtiger Aspekt der intraokularen Entzündung ist der Zusammenbruch der Blut-Kammerwasserschranke und der Blut-Retinaschranke. Steroide können die selektive Kapillarpermeabilität wiederherstellen, was sich klinisch durch einen Rückgang des Tyndall-Phänomens und die Reduktion eines retinalen Ödems zeigt. Die zelluläre inflammatorische Reaktion wird durch die Migration von Leukozyten aus den Gefäßen in das extravaskuläre Milieu unterhalten. Steroide hemmen die chemotaktische Leukozytenmigration. Dieses kann klinisch in einer Verminderung der zellulären Antwort in der Vorderkammer und in einer Demarkierung von chorioretinalen Infiltraten beobachtet werden. Ein weiterer Aspekt der antiinflammatorischen Wirkung von Steroiden ist die Stabilisierung von lysosomalen Vacuolen in Leukozyten. Dadurch wird die Freisetzung von proteolytischen Enzymen gehemmt, was das Auftreten von entzündungsabhängigen Gewebeschäden vermindern kann. Dieser protektive Effekt ist am Auge von besonderer Bedeutung, da hier die entzündungsinduzierte proteolytische Aktivität und Gewebsneubildung in besonderem Maße zu dauerhaften Schäden führen kann. Auf der anderen Seite führt die reduzierte lysosomale Aktivität zu einem reduzierten Abbau von Mycopolysacchariden im Trabekelwerk, was zur steroid-induzierten Erhöhung des intraokularen Drucks beiträgt.

Ein weiterer wichtiger Aspekt der antiinflammatorischen Steroidwirkung ist die Beeinflussung der Synthese von proinflammatorischen Cytokinen. Die Synthese von proinflammatorischen Prostaglandinen und Leukotrienen ist abhängig von der Phospholipase A2, einem Schlüsselenzym für die Synthese von Arachidonsäure als Substrat für die Synthese dieser Cytokine.

Steroide reduzieren die Arachidonsäurebildung durch Erhöhung der Transkription von Lipocortin, einem Hemmstoff der Phospholipase A2 (Sherif 2002).

Weiterhin hemmen Steroide die Proliferation und Transdifferenzierung von Keratozyten und stabilisieren die Homöostase von Keratozyten, Kollagenfibrillen und der extrazellulären Matrix, was zu einer die Hornhautnarbenbildung unterdrückenden Wirkung führt.

Pharmakokinetik

Die erheblichen Unterschiede in der antiinflammatorischen Wirksamkeit verschiedener Steroide bei systemischer Applikation (Dexamethason >> Prednisolon >> Hydrocortison) sind bei lokaler Anwendung deutlich geringer ausgeprägt. Die intraokulare Wirksamkeit von lokal applizierten Steroiden hängt in wesentlich stärkerem Umfang vom Ausmaß der

cornealen Penetration und der Geschwindigkeit des intraokularen Metabolismus ab, außerdem von Art und Lokalisation der vom Wirkstoff erreichten Zelltypen. Nach lokaler Applikation von Dexamethason konnte eine Bindung des Wirkstoffs in den Zellkernen von konjunktivalen und kornealen Epithelzellen, von Keratozyten und von Endothelzellen der Gefäße nachgewiesen werden.

Die korneale Penetrationsfähigkeit vieler Steroidpräparationen ist sehr gut. Nach topischer Applikation eines einzelnen Tropfens Prednisolons konnte der Wirkstoff im Kammerwasser bereits nach 15-30 min. nachgewiesen werden. Durch Erhöhung der Kontaktzeit mit der okulären Oberfläche, z.B. durch eine Präparation als Gel, kann die intraokulare Verfügbarkeit gegenüber einer Tropfenpräparation der gleichen Substanz und der gleichen Konzentration deutlich gesteigert werden. Die korneale Penetrationsfähigkeit der verschiedenen Steroidpräparationen weist erhebliche Unterschiede auf. Präparationen von an Acetat gebundenen Glucocorticoiden in lipophiler Suspension penetrieren die Hornhaut in größerem Maße als hydrophile Formulierungen als Phosphat oder Succinat. Das lipophile korneale Epithel ist für die hydrophile Verbindung Prednisolonphosphat die größte Barriere, bei abradiertem Epithel ist eine deutlich erhöhte Wirksamkeit von Prednisolonphosphat nachweisbar (Sherif 2002).

Nebenwirkungen

Steroid-induziertes Glaukom

Der augendrucksteigernde Effekt der Steroide ist bereits seit langem bekannt. Bei 30 % der Bevölkerung ist mit einem mäßigen Druckanstieg um etwa 10 mmHg zu rechnen, während bei 5 % deutlich höhere Druckanstiege auftreten. Das Ausmaß des Druckanstiegs bei der gleichen Person hängt von der Stärke des gegebenen Präparats und von der Dauer der Therapie ab. Risikofaktoren sind vorbestehendes primär chronisches Offenwinkelglaukom, Pigmentdispersion, hohe Myopie und Diabetes mellitus. Außerdem haben Verwandte von Patienten mit primär chronischem Offenwinkelglaukom ein erhöhtes Risiko, auf Steroidgabe mit Erhöhung des Augendrucks zu reagieren. Bei den meisten Betroffenen ist der Druckanstieg nach Absetzen der Steroide zumindest teilweise reversibel

Der Mechanismus der Steroidwirkung auf die Augendruckerhöhung ist nur teilweise geklärt. Versuche an Zellkulturen von Trabekelmaschenwerkzellen führten zur Charakterisierung des sog. TIGR Gens, dessen Expression durch Steroide induziert wird und das zu vermehrter intra- und extrazellulärer Glykoproteinablagerung führt. Diese vermehrte Bildung

extrazellulärer Matrix ist demnach für die Änderung des Abflusswiderstands im Trabekelmaschenwerk und damit für den Augendruckanstieg verantwortlich.

Die zweite schwerwiegende Nebenwirkung der lokalen Steroidtherapie am Auge ist die Kataraktinduktion. Diese ist ebenfalls seit Jahrzehnten bekannt und tritt in Form einer subcapsulären Linsentrübung auf. Das Risiko einer Kataraktentstehung ist abhängig von der Intensität und von der Dauer der Steroidtherapie. Nach systemischer oraler Steroidgabe wurde eine Kataraktinzidenz von 6,4 % – 38,7 % angegeben. Die Pathogenese der Kataraktentstehung nach Steroidgabe ist nicht ganz klar. Folgende Mechanismen können zur Ausprägung der Linsentrübung beitragen:

- Bindung von Steroidmolekülen an Lysinreste von Linsenbestandteilen
- Steroid-induzierte Änderungen der Kammerwasserzusammensetzung, z.B. Reduktion des Ascorbinsäuregehalts
- spezifische Steroidrezeptoren auf den Linsenepithelzellen
- weitere steroidabhängige Beeinflussungen des Stoffwechsels wie Veränderung des Phospholipidmetabolismus (Sherif 2002).

Neben den „klassischen“ Steroidverbindungen (Hydro)Cortison, Dexamethason und Prednisolon sind in den letzten Jahren neuere Steroidderivate entwickelt worden mit dem Ziel, die beeinträchtigenden Nebenwirkungen der Steroide, insbesondere die augendruckerhöhende Wirkung zu vermeiden. Zu diesen Verbindungen gehören Loteprednol und Rimexolon. Bei beiden Substanzen hat sich in Studien aus den 90er Jahren eine Wirksamkeit bei der allergischen Heufieberkonjunktivitis, Riesenpapillenkongjunktivitis, erhöhtem postoperativen Reizzustand und der Uveitis gefunden. Bei beiden Verbindungen wurde im Vergleich zu Prednisolonacetat eine deutlich verminderte Augendrucksteigerung nachgewiesen. Beide Wirkstoffe existieren als kommerziell erhältliche Präparationen, auf dem deutschen Markt als Vexol® (Rimexolon) und Lotemax® (Loteprednol).

Dennoch hat das Nebenwirkungsprofil der Steroide schon seit Jahren die Suche nach Alternativen in der immunmodulatorischen Lokalthherapie befördert. Diese hat zu Versuchen geführt, auch lokal anwendbare Präparationen der klinisch verfügbaren Immunsuppressiva zu entwickeln.

2.2. Cyclosporin A (CsA)

Dieser Wirkstoff ist das „Standard“-Immunsuppressivum in der Transplantationsmedizin geworden. Er wurde in den 1970er Jahren in die klinische Praxis eingeführt. Besonders bei Hochrisiko-Keratoplastik-Patienten ist CsA das Therapeutikum der ersten Wahl. Einen Überblick über die (begrenzten) Daten aus klinischen Untersuchungen zur Anwendung von Cyclosporin A bei der Hochrisiko-Keratoplastik zeigt folgende Tabelle:

Tabelle 4: Klinische Studien zur Anwendung von systemischem Cyclosporin A bei Risikokeratoplastik

Autor	Studientyp	Patienten eingeschlossen	Behandlungszeitraum	Outcome
Reinhard (1999)	Retrospektiv	200	≥ 6 Monate	Transplantatprognose verbessert bei Patienten mit atopischer Dermatitis
Lam (1998)	Prospektiv (in Kombination mit Single-pulse-Prednisolon)	11	Gesamtes Follow-up	Abstoßung in 90 % reversibel
Robert (1997)	Prospektiv	90	3 Monate	Keine Verbesserung der Prognose
Reinhard (1997)	Retrospektiv	130	≥ 6 Monate	Verbesserung der Prognose von Hochrisiko-Keratoplastiken
Hill (1994)	Prospektiv	43	12 Monate versus 4-6 Monate	Reduktion der Inzidenz und Steigerung der Reversibilität von Hochrisiko-Keratoplastiken
Hill (1989)	Prospektiv	18	4 – 12 Monate	Verbessertes Transplantatüberleben bei Hochrisiko-Keratoplastiken
Miller (1988)	Prospektiv	15	3 Monate	Verbessertes Transplantatüberleben nach Kurzzeit CsA Behandlung

Daraus abgeleitet wurden klinische Indikationen, bei denen Cyclosporin A bei der Keratoplastik eingesetzt werden sollte. Diese sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Tabelle 5: Indikationen für eine systemische CsA-Therapie nach KPL (nach Sundmacher 1994)

Indikationen für systemische CsA-Therapie
Tiefe Vaskularisationen der Empfängerhornhaut in ≥ 2 Quadranten
Limbusnahes Transplantat
≥ 3 Transplantate pro Auge oder ≥ 4 Transplantate insgesamt
Ausgeprägtes trockenes Auge jeder Ätiologie
Limbusstammzellinsuffizienz
Schwere rheumatoide Arthritis
Schweres endogenes Ekzem

Cyclosporin A ist ein Makrolidantibiotikum, das aus dem Bodenzpilz *Tolypocladium inflatum* isoliert worden ist. Die molekulare Struktur besteht aus einem hydrophoben zyklischen Unadecapeptid. CsA bindet im Zytoplasma an Cyclophiline. Der CsA-Cyclophilinkomplex blockiert die Calmodulin/Calcineurin vermittelte Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, die in die frühe T-Zell-Genexpression einbezogen sind, beispielsweise Interleukin 2. Außerdem ist eine antiretrovirale Aktivität von CsA bei in-vitro-Untersuchungen gefunden worden. Der Zusammenhang besteht darin, dass der von CsA gehemmte Calmodulin/Calcineurin Komplex auch Transkriptionsfaktoren aktiviert, die an der Expression von viralen Genen beteiligt sind (Thali 1995, Mortola 1998). Andererseits konnte aber eine klinische Untersuchung von CsA bei Patienten mit AIDS diese Resultate nicht bestätigen, da die Plasma-HIV-RNA Konzentrationen bei diesen Patienten unter niedrigdosierter CsA-Therapie anstiegen. Darüber hinaus stiegen weder die CD4-Zellzahl noch die Lymphozyten-Proliferations-Antworten in dieser Untersuchung (Calabrese 2002). Eine Vielzahl von experimentellen und klinischen Studien untersuchte topische Anwendungen von Cyclosporin A. Die pharmakokinetischen Eigenschaften von Cyclosporin A als lipophile Verbindung limitieren allerdings den Nutzen der lokalen Anwendung am Auge. Tabelle 2 zeigt, dass die intraokular erreichbaren Konzentration von Cyclosporin A

über einen weiten Bereich schwanken, die im Kammerwasser erzielbaren Konzentrationen sind jedoch durchweg niedrig. Andererseits werden sehr hohe Konzentrationen im kornealen Epithel erreicht. Es gibt auch einige Studien, die den Einsatz von Vehikeln zur Verbesserung der intraokularen Bioverfügbarkeit von CsA untersucht haben (Sasamoto 1991, Milani 1993)(Tabelle 6). Darüber hinaus konnte in einer dieser Studien auch eine Verbesserung der Wirksamkeit des lokal applizierten Wirkstoffs demonstriert werden (verlängertes Transplantatüberleben bei der experimentellen Keratoplastik)(Milani 1993).

Tabelle 6: Studien zur Verbesserung der okulären Verfügbarkeit und Wirksamkeit von topischem CsA durch Vehikel

Studie	Diagnose, Spezies	Präparation/ Vehikel	Wirkung
Sasamoto 1991	EIU, EAU Kaninchen, Ratte	Cyclodextrine	EIU supprimiert, EAU unbeeinflusst
Milani 1993	Keratoplastik, Ratte	Liposomen gegen ölige Tropfen	CsA/Liposomen Applikation verlängert Transplantatüberleben
DeCampos 2001	Kaninchen	Chitosan Nanopartikel	Hohe Konz. in Konj., Reduktion der systemischen Resorption

EIU: Endotoxin-induzierte Uveitis, EAU: Experimentelle Autoimmun-Uveitis

Es gibt aber auch experimentelle Studien, die keinen Nutzen der topischen CsA-Therapie zeigen (Zhang 2000).

In einer (unkontrollierten) Untersuchung von Patienten mit rheumatoider Arthritis zeigte die Applikation von Cyclosporin Augensalbe einen vorteilhaften Effekt hinsichtlich des Risikos einer Hornhauteinschmelzung (Pleyer 2002). Der Nutzen von topischem Cyclosporin A für die Prophylaxe der Immunreaktion nach Keratoplastik bleibt allerdings bis heute unklar, da die Ergebnisse von verfügbaren klinischen Untersuchungen widersprüchlich sind.

(Goichet-Bonnat 1987, Inoue 2000). Dies kann folgende Gründe haben: In vielen Studien wird CsA zusätzlich zu Steroiden eingesetzt (Goichet-Bonnat 1987), so dass die Wirkungen der einzelnen Pharmaka schwer abgrenzbar sind. Andererseits kann der Effekt von lokal angewendetem CsA auch auf der systemischen Resorption beruhen. Darüber hinaus zeigen viele Studien, dass durch topische Anwendung von CsA sehr niedrige intraokulare

Konzentrationen des Wirkstoffs erreicht werden (Tabelle 2, s.o.). Lokal gegebenes Cyclosporin A als postoperative Therapie nach Keratoplastik ist möglicherweise zum Einsparen von Steroiden von Nutzen, beispielsweise bei Steroid-Respondern, wie von Perry vorgeschlagen wurde (Perry 1997).

Es gibt eine Vielzahl von Versuchen, andere Augenkrankheiten mit topischem CsA zu behandeln, wie in Tabelle 7 gezeigt wird. Konstante günstige klinische Resultate konnten jedoch nur für eine kleine Anzahl von Diagnosen demonstriert werden, die Keratokonjunktivitis vernalis (Avunduk 2001, Gupta 2001), die atopische Keratokonjunktivitis (Hingorani 1998) und die schwere Keratokonjunktivitis sicca.

Tabelle 7: Indikationen, bei denen topisches CsA klinisch eingesetzt wurde

Infektiöse Erkrankungen	Adenovirale Keratokonjunktivitis Herpes-Keratitis
Immunmedierte Erkrankungen	Atopische Keratokonjunktivitis Keratokonjunktivitis vernalis Keratitis superficialis Thygeson Rheumatische korneale Ulcerationen Keratokonjunktivitis sicca Sjogren Syndrom Okuläre Komplikationen der GvHD (Konjunktivitis lignosa)
Postoperative Therapie	Keratoplastik Trabekulektomie Haze nach PRK

Klinische Untersuchungen zur Wirksamkeit von lokalem CsA beim trockenen Auge sind in der folgenden Tabelle gezeigt.

Tabelle 8: Klinische Studien zum Einsatz von CsA beim trockenen Auge

Studie	Präparation	Patientenzahl	Behandlungszeitraum	Wirkung
Kunert 2002	0,1 % ölige Tropfen	28	6 Monate	Erhöhung der Becherzellzahl, Reduktion des Epithelzellumsatzes
Brignole 2001	0,05%; 0,1% Emulsion	158	3 und 6 Monate	Reduzierte HLA-Dr-Expression
Kunert 2000	0,05 %; 0,1% ölige Tropfen	19	3 und 6 Monate	Reduktion der Anzahl aktivierter Lymphozyten
Turner 2000	0,05 %; 0,1 % Emulsion	21	6 Monate	Reduktion von IL-6 im konjunktivalen Epithel
Sall 2000	0,05 %	584	6 Monate	Verbesserter Schirmer-Test, reduzierte Anfärbbarkeit der Oberfläche mit Bengal-Rosa
Gunduz 1994	2 % Olivenöl	15	2 Monate	Erhöhte „Break-up“-Zeit; reduzierte Anfärbbarkeit der Oberfläche mit Bengal-Rosa

Die für diese Indikation eingesetzten Präparationen reichen von 0,05 %iger Emulsion (Turner 2000) bis zu 2 %iger öliger Lösung (Gunduz 1994). Alle diese Studien zeigen günstige Resultate. Untersuchte Parameter als Maß für die Wirksamkeit des lokal eingesetzten Präparats umfassten Bengalrosafärbung, Schirmer-Test (Sall 2000), „Break-up-time“ (Gunduz 1994), Becherzellzahl und Bestimmung des epithelialen „Turn-over“ (Kunert 2000, Kunert 2002).

2.3. Tacrolimus

Tacrolimus (FK 506) (Abbildung 15) ist ein Antibiotikum, das aus dem Mikroorganismus *Streptomyces tsubukaensis* isoliert worden ist. Die immunsuppressive Potenz ist im Vergleich zu CsA ausgeprägter, aber ebenso die Nephrotoxizität, so dass ein schmales therapeutisches Fenster resultiert. FK506 ist von klinischem Nutzen bei Patienten nach Lebertransplantation, bei denen es eine im Vergleich zu CsA überlegene Wirksamkeit zur Prophylaxe der Transplantatabstoßung hat. In der Augenheilkunde ist die Wirksamkeit von FK506 in experimentellen Keratoplastik-Modellen demonstriert worden, (Okada 1996, Benelli 1996). Eine klinische Studie konnte die Wirksamkeit von systemischem Tacrolimus zur Reduktion der Abstoßungsrate nach Limbo-Keratoplastik zeigen. In dieser Untersuchung erlitt kein Patient eine irreversible Transplantatabstoßung unter Therapie mit Tacrolimus (Sloper 2001). Wie CsA ist Tacrolimus lipophil, dennoch werden intraokular höhere Wirkstoffkonzentrationen als beim CsA erreicht, wenn der Wirkstoff mit Vehikeln wie Cyclodextrinen oder Liposomen (Pleyer 1993, Benelli 1996) komplexiert wird. Die Molekülformel der Substanz ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

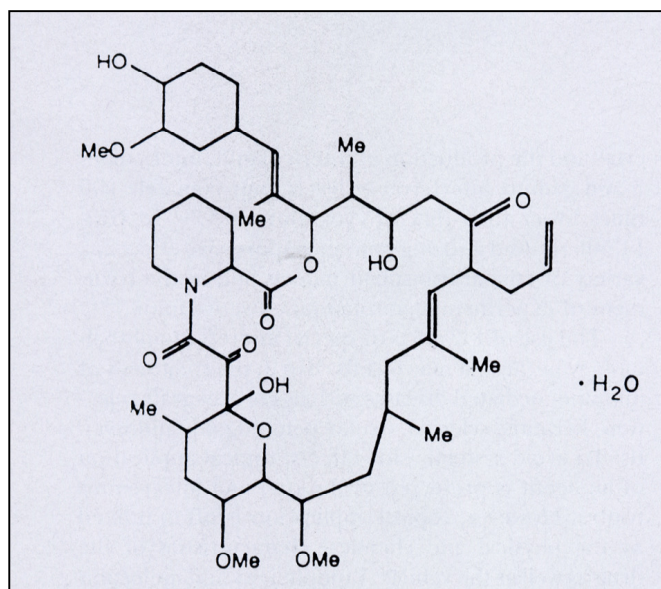


Abbildung 15: Molekülformel von Tacrolimus (FK506)

Experimentelle Untersuchungen über topische Anwendungen von FK506 zeigt die folgende Tabelle.

Tabelle 9: Experimentelle Studien zum Einsatz von topischem FK506

Studie	Diagnose	Art	Präparation	Wirkung
Whitcup 1998	EIU	Ratte	Liposomen	EIU unterdrückt
Hikita 1995	EIU	Ratte	0,05%; 0,3 %	EIU unterdrückt
Tchah 1999	Keratoplastik	Meerschweinchen	0,03%; 0,1%;	Transplantatüberleben
		-Ratte	0,3%	leicht verbessert
Hikita 1997	Keratoplastik	Ratte	0,3 %	Transplantatabstoßung verzögert
Benelli 1996	Keratoplastik	Meerschweinchen	0,3mg/ml	Verlängertes
		- Ratte	Cyclodextrine	Transplantatüberleben
Okada 1996	Keratoplastik	Ratte	0,024 mg/d	Verlängertes Transplantatüberleben

Außer zur Verhinderung der Transplantatabstoßung wurde ein vorteilhafter Effekt von lokalem FK506 bei der Endotoxin induzierten Uveitis (EIU) (Whitcup 1998) gezeigt. Die beiden ersten klinischen Untersuchungen zum lokalen Einsatz von FK506 stammen aus den Jahren 2001 und 2002. In einer chinesischen Studie fanden die Autoren einen vorteilhaften Effekt bei Patienten nach Keratoplastik bei Ulcus Mooren (Xie 2002). In einer weiteren (unkontrollierten) Studie behandelten die Autoren Patienten mit atopischer Blepharokonjunktivitis mit einer 0,1 %igen FK506 –Salbenpräparation und fanden eine Reduktion der Beschwerden der Patienten (Mayer 2001). In einer neuen Studie aus dem Jahr 2005 wurden erste klinische Ergebnisse des topischen Einsatzes von FK506 bei der Prophylaxe der Immunreaktion nach Keratoplastik vorgestellt (Reinhard 2005). Dabei wurde gezeigt, dass in einer Gruppe von 20 mit topischem FK506 (0,06%) 3 mal täglich über 6 Monate behandelten Patienten nach Normalrisiko-Keratoplastik innerhalb des ersten postoperativen Jahres keine Immunreaktion auftrat. Als Präparation wurde dabei eine Polyvinylalkohol, Benzalkoniumchlorid, Kochsalz und verschiedene Puffer enthaltende wässrige Lösung verwendet. Bei immerhin 8 Patienten dieser Gruppe musste das Präparat allerdings wegen lokaler Nebenwirkungen wieder abgesetzt werden.

3. Eigene Untersuchungen lokaler Präparationen der neuen Immunsuppressiva Mycophenolat Mofetil und Sirolimus/Everolimus

3.1. Entwicklung einer topischen Präparation von Mycophenolat Mofetil als Cyclodextrinkomplex und intraokulare Verfügbarkeit am Kaninchen

3.1.1. Einführung

Mycophenolat Mofetil (MMF) stellt ein recht neues Immunsuppressivum in der Augenheilkunde dar. Es wurde bisher in einer Reihe von experimentellen sowie in klinischen Studien in der Augenheilkunde eingesetzt (Chanaud 1995, Reis 1998, Reis 1999, Kilmartin 2001, Reinhard 2005). Aufgrund des selektiven Wirkmechanismus der Substanz sowie der nachgewiesenen Wirksamkeit bei der Hochrisikokeratoplastik und anderen Indikationen stellt MMF eine wertvolle Alternative zu den bisher eingesetzten Immunsuppressiva in der Augenheilkunde dar.

Mycophenolat Mofetil ist eine Substanz, die die Proliferation der B- und T-Lymphozyten hemmt. Es unterbindet durch eine nicht-kompetitive Inhibition der Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase die De-novo-Synthese der Purinnucleotide (Allison 1991, Allison 2000). Lymphozyten sind im Gegensatz zu anderen Zellen vorwiegend auf diesen de-novo-Weg der Purinsynthese angewiesen. Mycophenolat Mofetil (MMF) ist eine Esterverbindung der Mycophenolsäure. Dabei stellt MMF ein Pro-Drug dar, das durch Hydrolasen (Esterasen) zum eigentlichen Wirkstoff, der Mycophenolsäure, hydrolysiert wird. Die Molekülformel beider Verbindungen ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

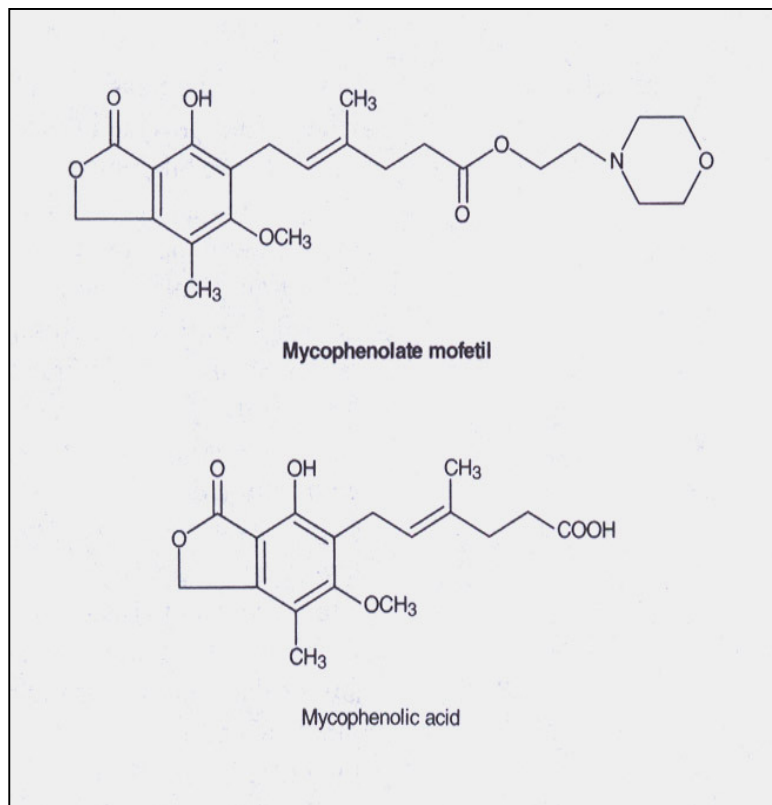


Abbildung 16: Molekülformel von MMF und MPA

Mycophenolat Mofetil ist in Deutschland für die Prophylaxe von Abstoßungsreaktionen bei Nierentransplantationen zugelassen. Die Sicherheit und Wirksamkeit von MMF wurde hierfür in 3 randomisierten, doppelblind angelegten, multizentrischen Studien untersucht. Diese Studien verglichen zwei Dosierungen von MMF (2 g bzw. 3 g Tagesdosis) mit Azathioprin oder mit Placebo. Das Protokoll enthielt zusätzlich die Behandlung mit Cyclosporin und initial Kortikosteroiden. In diesen 3 Studien reduzierte MMF in Kombination mit Cyclosporin und Kortikosteroiden die Inzidenz von akuten Abstoßungsreaktionen in den ersten 6 Monaten nach Transplantation. Die Zahl der Abstoßungsreaktionen sank durch die Therapie mit Mycophenolat Mofetil auf etwa die Hälfte (Grinyo 1995, Sollinger 1995, Keown 1996).

Der Einsatz von Mycophenolat Mofetil anstelle von Azathioprin führte auch bei Herztransplantationen in ersten klinischen Pilotstudien zu einer deutlichen und signifikanten Reduktion der Anzahl von Abstoßungsreaktionen (Ensley 1993, Ensley 1993a, Kirklin 1994, Taylor 1994). In einer Studie von Kobashigawa konnte Mycophenolat Mofetil in Kombination mit Cyclosporin und Kortikosteroiden anstelle von Azathioprin die Mortalität

und Abstoßungsrate im ersten Jahr nach Herztransplantation reduzieren (Kobashigawa 1998). Über die Behandlung von Autoimmunerkrankungen liegen noch wenig Berichte vor, allerdings gibt es Pilotstudien zur Wirksamkeit bei rheumatoider Arthritis sowie bei Psoriasis und Neurodermitis. In einer multizentrischen Studie wurde festgestellt, dass MMF zu einer Reduktion der psoriatischen Läsionen in etwa zwei Dritteln der Fälle führte. Außerdem kam es nach Absetzen der Substanz bei den meisten Patienten zu erneutem Aufflammen der Erkrankung (Kitchen 1997). In einer Langzeitstudie (13 Jahre) verbesserte sich die Symptomatik bei Psoriasis-Patienten um 60% innerhalb des ersten Therapie-Jahres mit MMF. Diese Remission blieb stabil im Verlauf der weiteren Behandlung (Kalbheim-Gapp 1998).

Im Rahmen einer Studie bei 600 Patienten mit rheumatoider Arthritis führte die Behandlung mit Mycophenolat Mofetil zu einer signifikanten Reduzierung der T-Zellzahl, jedoch zu keiner Änderung des prozentuellen Anteils von T-Helferzellen, T-Suppressorzellen, B-Lymphozyten und der Monozyten. Außerdem sanken unter dieser Therapie die Spiegel von IgG, IgM, IgA und Rheumafaktoren (Goldblum 1993). Es liegen auch Berichte über die Behandlung bei endogener Uveitis vor. Hierbei wurde MMF bei 11 Patienten als ein steroidsparendes Mittel, als Kombinationstherapie mit Cyclosporin A oder anstelle von Cyclosporin A oder Azathioprin gegeben. Die Aufnahme von MMF im Protokoll führte zu einem Rückgang der entzündlichen Symptome und zu einer Visusverbesserung oder Visusstabilisierung. In den meisten Fällen konnte die Steroiddosis reduziert werden. Insgesamt zeigten 9 von 11 Patienten eine vorteilhafte Reaktion auf Mycophenolat Mofetil bei wenigen Nebenwirkungen (Larkin und Lightman 1998).

Die Wirksamkeit von Mofetil zur Prophylaxe von Immunreaktionen nach Risikokeratoplastik wurde bereits in einer klinischen Studie im Vergleich zur Wirkung von Cyclosporin A gezeigt (Reis 1999). Derzeit wird in Deutschland eine Multicenterstudie zum systemischen Einsatz von Mycophenolat Mofetil nach der Risikokeratoplastik durchgeführt. Die Zwischenergebnisse wurden kürzlich publiziert und belegen eine Wirksamkeit der Substanz bei systemischer Applikation von 2 g tgl. (Reinhard 2005).

In der hier dargestellten Untersuchung wurde die intraokuläre Bioverfügbarkeit von lokalen Präparationen von MMF untersucht.

3.1.2. Material und Methoden

Material:

Mycophenolat Mofetil (MMF, Molekulargewicht 433,5 g/mol) und Mycophenolsäure (MPA, Molekulargewicht 320,35 g/mol) wurden freundlicherweise von Roche Bioscience, Palo Alto Ca, USA zur Verfügung gestellt. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) wurde von Wacker Chemie GmbH, Burghausen kostenlos überlassen. Dimethylsulfoxid (DMSO) wurde von Synopharm, Barsbüttel bezogen und Methyltertbutylether (MTBE) von Fluka Chemie, Buchs, Schweiz. Acetonitril stammte von Baker, Deventer, Niederlande. Das zur Herstellung von Sörensen Phosphatpuffer (SPP) pH7,4 benötigte Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄) wurde bei Merck, Darmstadt bezogen, und Dinatriumhydrogenphosphat stammte von Laborchemie Apolda. SPP pH 7,4 enthielt 19,2 % (v/v) KH₂PO₄ Lösung (0,9 % (w/v)) und 80,8 % Na₂HPO₄ Lösung (1,19% w/v) Steriles H₂O wurde als Lösungsmittel verwendet. Natriumchlorid (NaCl) wurde bei Merck, Darmstadt bezogen.

Mycophenolat Mofetil (MMF) / Mycophenolsäure (MPA) Präparationen:

Es wurden eine 1 %ige MMF/ 10 % HP- β -CD Lösung (MMF-CD) und eine 1 %ige MPA/ 10 % HP- β -CD Lösung (MPA-CD) hergestellt (Abbildung). Um die Reagenzien vollständig in Lösung zu bringen, wurde die Präparation in einem Autoklaven unter Standardbedingungen erhitzt (121°C, 200kPa, 15 min). Demnach wurde bei diesem Schritt gemäß den Kriterien der „Europäischen Pharmacopoeia“ auch eine Sterilisation der Präparation erzielt.

1 % ige MMF Suspension (MMF-SP) wurde unter denselben Bedingungen hergestellt. Die Suspension wurde ohne viskositätserhöhende Zusätze hergestellt, daher wurde die Suspension jeweils vor Anwendung für mindestens 10 min. in ein Ultraschallbad gestellt. Dadurch wurde ein konstanter Wirkstoffgehalt bei jeder Anwendung gewährleistet. Die Partikelgröße der Suspension wurde lichtmikroskopisch auf unter 25 μ m geschätzt. Um eine physiologische Osmolarität der Präparation einzustellen, wurde der Formulierung NaCl-Lösung zugesetzt. Die Osmolarität jeder Formulierung wurde mit einem automatischen Osmometer (Knauer, Berlin) bestimmt und auf 311 - 324 mOsmol/kg eingestellt. Dadurch wurden die Präparationen leicht hyperton. Die Zusammensetzungen der eingesetzten Präparationen sind nochmals in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 10: MMF und MPA Formulierungen

	Substanzen / g		
	MMF-CD	MMF-SP	MPA-CD
Mycophenolat	0,1	0,1	-
Mofetil			
Mycophenolsäure	-	-	0,1
Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin	1,0	-	1,0
Natriumchlorid	0,03	0,68	0,03
Sörensen-Phosphatpuffer pH7,4 ad	10,0	10,0	10,0

Quantitative Bestimmung von Mycophenolat Mofetil und Mycophenolsäure:

Die quantitative Bestimmung der MMF und MPA Konzentration erfolgte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie „High performance liquid chromatography“ (HPLC). Das verwendete System bestand aus einem L-4500 „Diode Array Detector“, einem D-6000 Interface und einer L-6200 „Intelligent Pump“ (Merck Hitachi). Reverse Phase Säulen (Merck LiChroCart®, LiChrospher® 100 RP-18 (5 μ l)) wurden für die Auftrennung der Komponenten verwendet. Das zum Aufnehmen von MMF eingesetzte Eluat bestand aus 75 % Acetonitril und 25 % deionisiertem H₂O und enthielt 0,1 % Phosphorsäure (85%). Als Eluat für das weniger lipophile MPA wurde eine Mischung aus 40 % Acetonitril und 60 % deionisiertem H₂O (mit 0,1 % Phosphorsäure) eingesetzt. Die Flussrate wurde konstant bei 1,0 ml/min. gehalten. Die Analytik fand bei Raumtemperatur statt.

In-vivo Untersuchungen am Kaninchen:

32 Kaninchen (Chinchilla Bastard pigmentiert) von 3 – 3,5 kg Gewicht wurden von Charles River Deutschland GmbH, Kißlegg/Sulzfeld bezogen. Die Tiere wurden nach den „Guidelines for the Care an Use of Laboratory Animals“ des „National Institute of Health“ behandelt. Alle Versuchsprotokolle entsprachen den „ARVO Statements for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research“. Eine initiale Dosis von 5 x 50 μ l MMF-CD, MMF-SP,

MPA-CD wurde im Abstand von einer Minute in den Bindehautsack des jeweils rechten Auges der Tiere getropft. Das linke Auge diente als Kontrolle. Die Tiere wurden nach 30, 60 bzw. 240 min durch Ketamininjektion in die Ohrvene tief narkotisiert und im Tiefschlaf durch Injektion von Kaliumchloridlösung getötet. Zum entsprechenden Zeitpunkt wurde zunächst aus der Ohrvene 5 ml Blut entnommen. Dieses wurde unmittelbar anschließend zur Gewinnung von Plasma zentrifugiert. Dann wurden die okulären Gewebe asserviert. Dazu wurde zunächst die Konjunktiva von Bulbus und Lidern abpräpariert, dann die Vorderkammer mit einer 30 G Kanüle (Insulinspritze) punktiert und Kammerwasser gewonnen (etwa 150 µl), dann wurde die Kornea am Limbus mit einer Vannasschere präpariert und anschließend die Iris mit einer chirurgischen Pinzette gewonnen. Die Gewinnung des Glaskörpers erfolgte dann durch Aufnehmen in eine 2 ml Spritze. Dann wurde der verbliebene Bulbus von den Augenmuskeln abgetrennt und die Aderhaut stumpf von der Sklerahülle abpräpariert und so schließlich die Sklera asserviert. Die Gewebeproben wurden in vorgewogenen Plastikröhrchen bei -84°C bis zur Extraktion aufbewahrt.

Extraktion der Gewebe:

- Kammerwasser: Die Kammerwasserproben wurden direkt unverdünnt in die HPLC eingesetzt.
- Glaskörper und Plasma: 1000 bzw. 3000 µl Methyltertbutylether wurden 500 bzw. 1000µl Glaskörper bzw. Plasma zugesetzt und für mindestens 1 Stunde mit dem Magnetrührer gerührt. Der Vorgang wurde mindestens einmal wiederholt. Dann wurde die organische Phase abgetrennt und erhitzt, bis das Lösungsmittel vollständig verdampft war. Der Rückstand wurde in 1000µl SPP pH7,4 wiedergelöst und unmittelbar anschließend in der HPLC analysiert.
- Kornea und Sklera: Kornea und Sklera wurden mit chirurgischer Schere mechanisch zerkleinert und anschließend mit einem Ultraschallstab (Bandelin Sonoplus HD 70Cycle 70) homogenisiert. Das zerkleinerte Gewebe wurde dann mit einer Mischung aus SPP pH 7,4 und Dimethylsulfoxid (3 + 7) aufgenommen. Die Proben wurden anschließend für 15 min zentrifugiert und der Überstand schließlich in der HPLC analysiert.
- Konjunktiva und Iris/Ziliarkörper: Diese wurden mittels Ultraschall in SPP/DMSO (s.o.) homogenisiert, zentrifugiert und der Überstand in der HPLC analysiert. Während des Homogenisierens wurden die Proben mit Eiswasser gekühlt.

Statistische Auswertung:

Der Vergleich der Mittelwerte der verschiedenen Gruppen MMF-CD, MMF-SP MPA-CD zu je drei Zeitpunkten (30, 60 240 min.) erfolgte mittels t-Test und ANOVA Test.

3.1.3. Ergebnisse

- Physikalische und chemische Eigenschaften von Mycophenolat Mofetil und Mycophenolsäure: MMF ist nur gering wasserlöslich (43 µg/ml bei pH7,4 bei Raumtemperatur). Die Löslichkeit erhöht sich deutlich in saurem Milieu (4,27 mg/ml bei pH3,6). Der Octanol-Wasser-Koeffizient (pH7) beträgt $\log P = 0,47$. Die pKa Werte für MMF sind 5,6 für die Morpholinogruppe und 8,5 für die Phenolgruppe. MPA ist ebenfalls schlecht wasserlöslich. Die Wasserlöslichkeit beträgt 63,9 µg/ml.
- Okuläre Verträglichkeit: Die Kaninchenversuche zeigten, dass die Applikation von MMF-CD und MPA-CD keinerlei erkennbare Reizungen am Auge hervorrief. Dagegen führt die Anwendung von MMF Suspension zu milder Konjunktivitis.
- Stabilität von Mycophenolat Mofetil: Während des Sterilisationsprozesses der Präparationen im Autoklaven kam es zu einer partiellen Hydrolyse von MMF. Für MMF-SP betrug die Degradation 10,35 ± 1,35 %, Das Autoklavieren von MMF-CD führte zu einer Degradation von 48,5 ± 5,48 %. Die Sterilisation von MPA-CD führte zu keinem weiteren Wirkstoffverlust. Die Wirkstoffkonzentration blieb während der Experimente konstant.
- in-vivo-Studien an Kaninchen: MMF und MPA Konzentrationen wurden in den Körperflüssigkeiten Kammerwasser, Glaskörper und Plasma sowie in den Geweben Kornea, Konjunktiva, Iris-Ziliarkörper und Sklera bestimmt. Nach MMF-CD Applikation kann in allen untersuchten Flüssigkeiten und Geweben nur MPA detektiert werden Die ursprüngliche Esterverbindung MMF findet sich nur bei Applikation von MMF-SP in Konjunktiva, Iris-Ziliarkörper und Sklera, jedoch nicht in der Kornea. Bei Applikation von MMF-CD und MMF-SP finden sich bereits nach 30 min. im Kammerwasser recht hohe Konzentrationen von MPA (23,98 / 24,49 µg ml)(Abbildung 17).

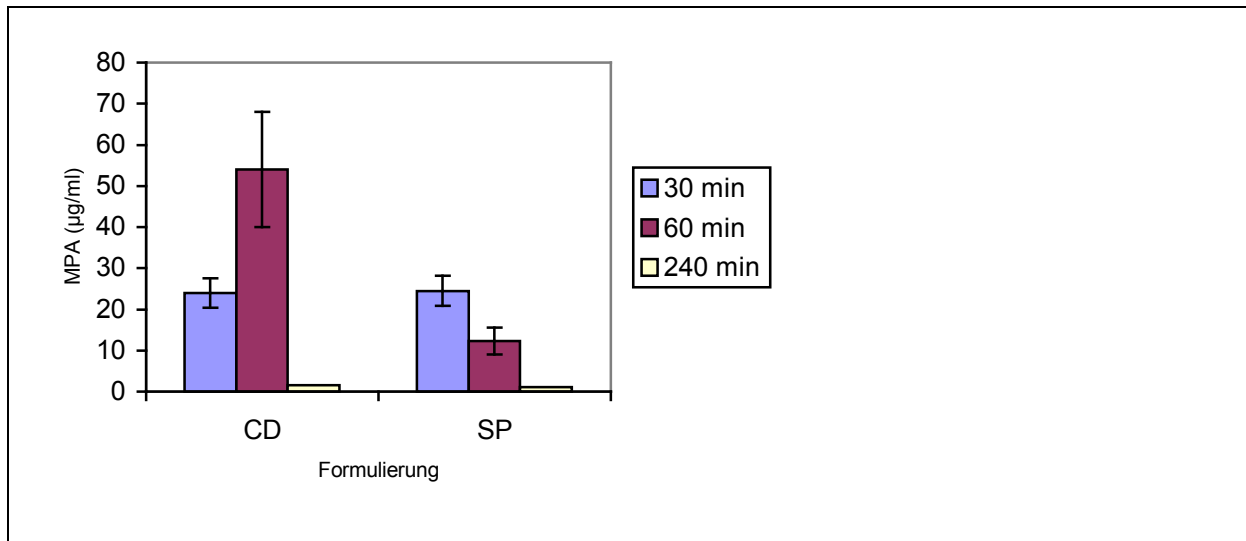


Abbildung 17: Kammerwasserkonzentrationen von MPA im Vergleich der Applikation von MMF-CD und MMF-SP

Nach 60 min lag die Kammerwasserkonzentration von MPA nach Applikation von MMF-CD signifikant höher als nach Applikation von MMF SP (4,3 fach höher). Nach 240 min. war MPA nach Applikation beider Präparationen nur noch in geringer Menge nachweisbar (1,59 µg/ml versus 1,08 µg/ml). In den okulären Geweben Kornea, Sklera und Konjunktiva war die MPA Konzentration nach Applikation von MMF-CD signifikant höher als nach Anwendung von MMF-SP (Abbildung 18).

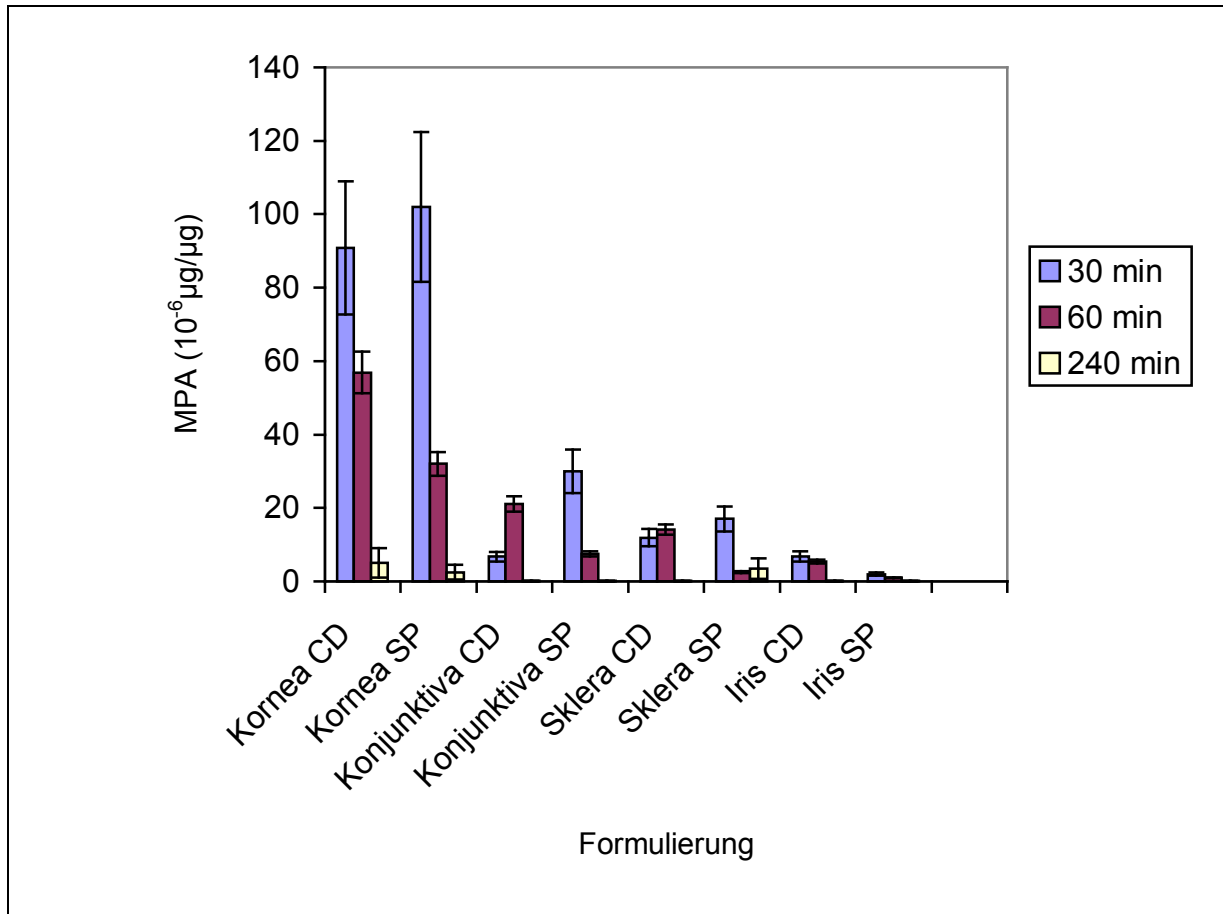


Abbildung 18: MPA-Konzentrationen in okulären Geweben im Vergleich der Applikation von MMF-CD und MMF-SP

Hingegen lag die MPA-Konzentration in der Konjunktiva 30 min. nach Anwendung von MMF-SP höher als nach Applikation von MMF-CD ($30,15 \times 10^{-6} \mu\text{g}/\mu\text{g}$ versus $6,75 \times 10^{-6} \mu\text{g}/\mu\text{g}$). Die Konzentrationen von MPA im Glaskörper waren sehr niedrig (Abbildung 19).

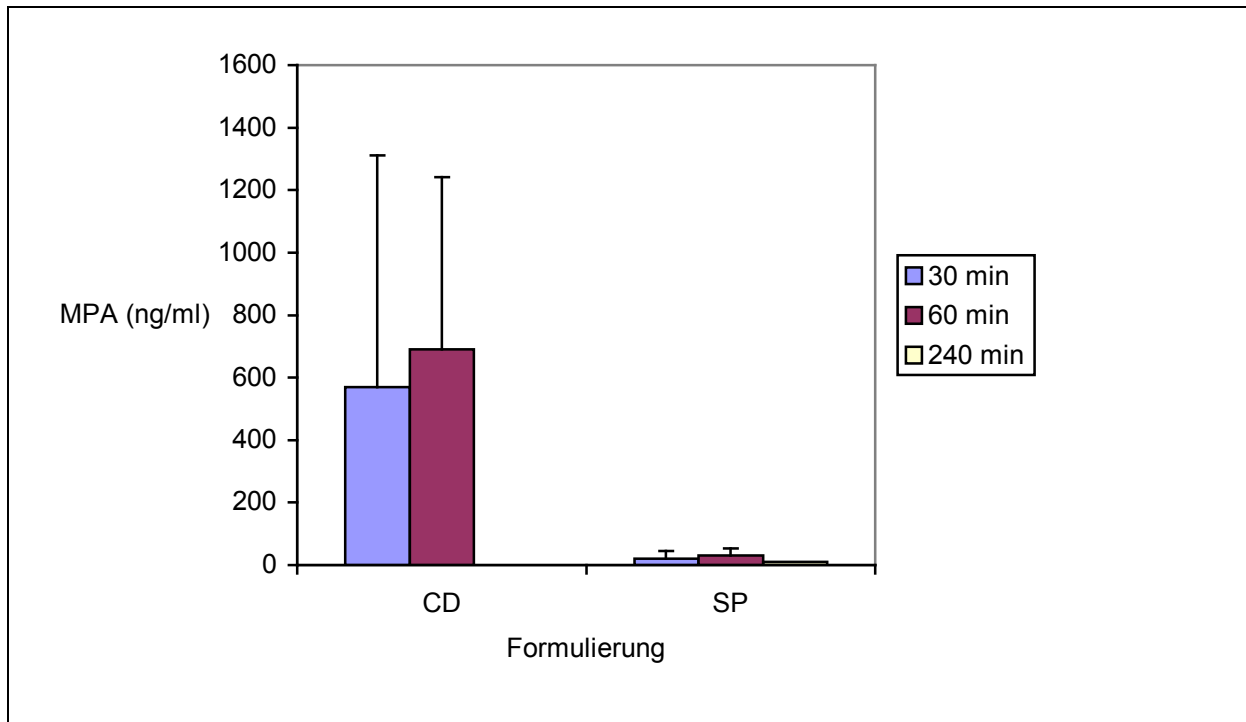


Abbildung 19: MPA-Konzentrationen im Glaskörper im Vergleich der Applikation von MMF-CD und MMF-SP

Durch MMF –CD wurden nur geringfügig höhere Konzentrationen erreicht als durch Anwendung von MMF-SP (Unterschiede nicht signifikant). Die Plasmakonzentrationen waren ebenfalls alle sehr niedrig und damit fast vernachlässigbar (Abbildung 20).

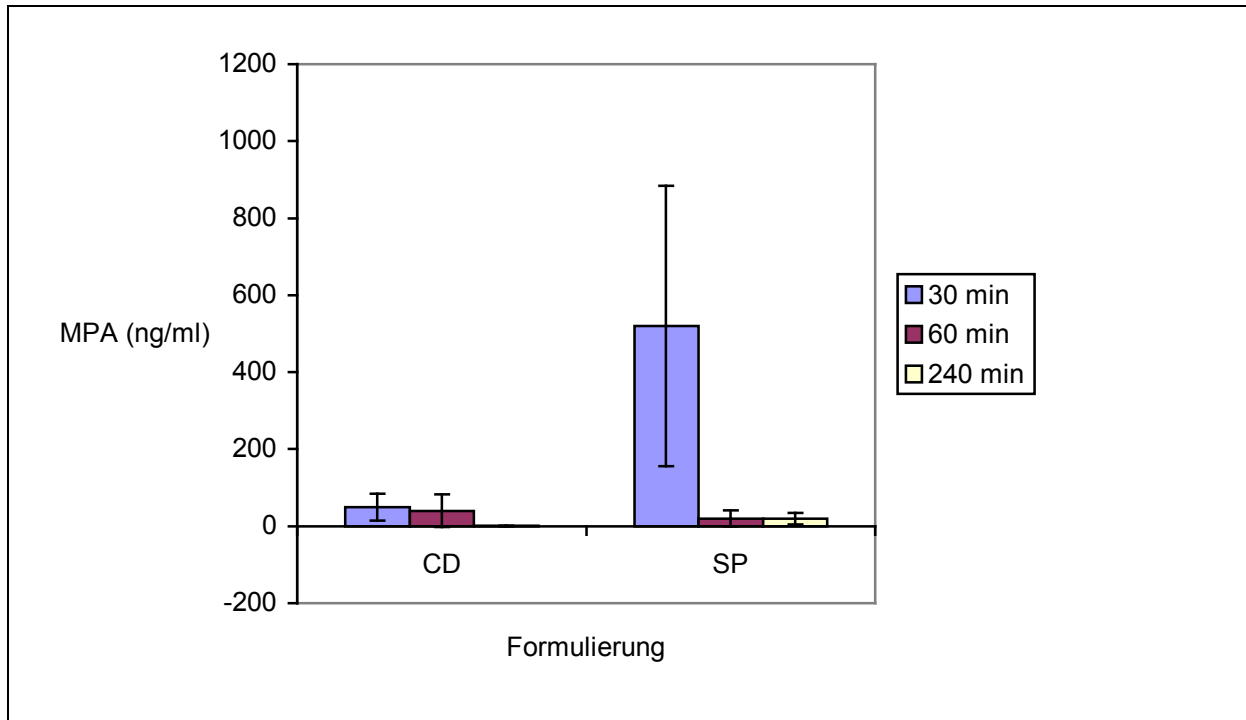


Abbildung 20: MPA-Konzentrationen im Plasma im Vergleich MMF-CD und MMF-SP

Die durch Applikation von MPA-CD erreichten Wirkstoffkonzentrationen sind alle deutlich niedriger als die mit MMF-CD erzielten (Tabelle 11), obwohl ja die Ausgangspräparation von MMF-CD bereits einen erheblichen Anteil MPA enthielt (s.o.). Nur in der Konjunktiva und im Plasma war nach 30 und 60 Minuten nach MPA-CD-Applikation ein etwas höherer MPA-Gehalt nachweisbar als nach MMF-CD Anwendung.

Tabelle 11: MPA-Konzentrationen in okulären Geweben im Vergleich der Applikation von MMF-CD und MPA-CD

Gewebe	Einheit	MPA-CD		MMF-CD	
		30 min	60 min	30 min	60 min
<i>Kammerwasser</i>	µg/ml	6,41 ± 2,34	5,10 ± 2,90	23,98 ± 3,16	52,20 ± 16,82
<i>Glaskörper</i>	ng/ml	72,06 ± 37,77	42,40 ± 58,25	549,27 ± 822,55	689,26 ± 607,69
<i>Plasma</i>	ng/ml	931,12 ± 92,82	126,32 ± 223,89	46,79 ± 62,19	39,78 ± 46,81
<i>Kornea</i>	10 ⁻⁶ µg/µg	25,40 ± 14,58	16,33 ± 4,87	90,78 ± 21,16	56,90 ± 6,94
<i>Sclera</i>	10 ⁻⁶ µg/µg	7,66 (n = 2)	1,96 ± 0,81	11,93 ± 5,87	14,08 ± 2,89
<i>Konjunktiva</i>	10 ⁻⁶ µg/µg	16,41 ± 17,75	1,51 ± 2,49	6,75 ± 7,84	21,05 ± 8,32
<i>Iris</i>	10 ⁻⁶ µg/µg	0,03 ± 0,07	0,06 ± 0,12	6,82 ± 4,69	5,38 ± 5,98

3.1.4. Diskussion

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind von erheblichem Interesse, da erstmalig gezeigt wird, dass eine topische Applikation von MMF durch geeignete Präparationen am Auge möglich ist und intraokular hohe Spiegel des Wirkstoffs MPA erreicht werden können. Die Untersuchungen zeigen, dass die Mycophenolat-Mofetil-Cyclodextrin Komplex-Formulierung eine geeignetere Zubereitung ist als die MMF-Suspension. MMF-CD wurde vom Kaninchenauge besser toleriert und die intraokular messbaren Konzentrationen waren bei Applikation von MMF-CD höher als bei Anwendung der Suspension. Zur topischen postoperativen prophylaktischen Therapie nach Keratoplastik sind hohe Wirkstoffspiegel in der Kornea und in der Vorderkammer wünschenswert, so dass MMF-CD als eine für diese Anwendung geeignete Formulierung erscheint.

Ferner zeigen diese Versuche, dass die Komplexbildung von MMF mit Cyclodextrinen nicht nur die Löslichkeit erhöht, sondern auch die Bioverfügbarkeit des Wirkstoffs MPA in den okulären Geweben erhöht. Die das Pro-Drug enthaltende Formulierung MMF-CD ist nach unseren Ergebnissen der den eigentlichen Wirkstoff enthaltenden Formulierung MPA-CD vorzuziehen, da höhere intraokulare Konzentrationen des Wirkstoffs erreicht werden.

Darüber hinaus weisen unsere Ergebnisse nach, dass nach topischer Applikation von MMF intraokular (im Kammerwasser) hohe Konzentrationen der aktiven Substanz MPA erreichbar sind (Abbildung 17). Die im Glaskörper erzielten Konzentrationen liegen dagegen um mehrere Zehnerpotenzen niedriger und damit an der Grenze der biologischen Wirksamkeit von MPA in vitro (Proliferationshemmung von Lymphozyten in der Zellkultur)(Allison 1991). Aufgrund der erheblich niedrigeren erzielbaren Konzentrationen im hinteren Augenabschnitt (Glaskörper, Abbildung 19) ist eine Wirksamkeit des topisch applizierten MMF bei der intermediären und posterioren Uveitis eher nicht zu erwarten. Für immunmedierte Erkrankungen der okulären Oberfläche und des vorderen Segments stellt die topische Therapie aber nach unserer Ansicht einen vielversprechenden Ansatz dar. Die Wirksamkeit von MMF bei systemischer Applikation wurde bei verschiedenen Erkrankungen sowohl experimentell als auch klinisch in einer kontrollierten Studie zur Prophylaxe der Immunreaktion bei der Hochrisikokeratoplastik gezeigt (Reis 1999). Darüber hinaus wurde ein günstiger Effekt des MMF in unkontrollierten Studien bei der Uveitis (Zierhut 2001) und beim okulären Pemphigoid gefunden. Im Hinblick auf die Nebenwirkungen systemischer Immunsuppressiva stellt die topische immunmodulatorische Therapie nach unserer Ansicht eine sinnvolle ergänzende Therapieoption bei immunmedierten Erkrankungen des Auges dar. Die Untersuchung einer Wirksamkeit dieses Präparats, beispielsweise bei der schweren Keratokonjunktivitis sicca, bei der atopischen Keratokonjunktivitis oder beim rheumatischen Hornhautulcus, erscheint sinnvoll und wünschenswert und wird von uns geplant.

3.2. Penetrationswege in den Intraokularraum: transkorneal – parakorneal

3.2.1. Einführung

Intraokular wirksame Konzentrationen von Pharmaka können grundsätzlich über zwei Penetrationswege erreicht werden, den transkornealen sowie den parakornealen. Dabei wurde über längere Zeit der parakorneale Weg als vernachlässigbar angesehen, da man davon ausging, dass in Bindehaut und Sklera gelangte Substanz weitestgehend über die Blutgefäße in die systemische Zirkulation aufgenommen wird (Doane 1978). Weiterführende Arbeiten zur Bedeutung des parakornealen Penetrationsweges zeigten jedoch, dass diesem eine größere Bedeutung zukommt als zuvor angenommen (Ahmed 1985, Schoenwald 1997, Schoenwald 1978). Das Verhältnis der beiden Penetrationswege ist substanzabhängig. Dabei spielen verschiedene Eigenschaften des Pharmakons eine Rolle, wie Molekülgröße, Ladung, pH-Wert der Lösung, schließlich Eigenschaften der Aufarbeitung, wie z.B. die Viskosität der Lösung der Substanz, wodurch u.a. die Kontaktzeit mit der Augenoberfläche beeinflusst wird.

Insbesondere wird aber die Tendenz einer Substanz, eher transkorneal oder eher parakorneal zu penetrieren, vom Ausmaß der Hydrophilie bzw. Lipophilie des Moleküls bestimmt. Lipophile Moleküle gelangen eher transkorneal ins Augeninnere, hydrophilere Verbindungen penetrieren zu einem höheren Anteil parakorneal (Chien 1990).

Über die Anteile der beiden Penetrationswege gibt es nur wenige Untersuchungen. Die getrennte Messung ist experimentell aufwendig. Der transkorneale Weg kann beispielsweise am Kaninchenmodell durch Versiegelung der kornealen Oberfläche mit einer aufgeklebten Kontaktlinse blockiert werden (Ahmed 1985). Bei derartigen experimentellen Ansätzen entstehen allerdings erhebliche Artefakte, da davon auszugehen ist, dass die Blockade eines Penetrationswegs gleichzeitig zur Erhöhung des über den anderen Weg penetrierten Substanzanteils führt. Weitere Fehler entstehen dadurch, dass die über beide Wege gelangenden Anteile nur in getrennten Versuchen bestimmt werden können, also beispielweise nur bei verschiedenen Tieren.

Eleganter dagegen erscheinen Untersuchungen, die auf dem Einsatz von Substanzen beruhen, die bei transkornealer bzw. parakornealer Penetration unterschiedlich metabolisiert werden. Der Anteil der jeweils penetrierten Substanz könnte dann durch Messung der entsprechenden Metaboliten intraokular bestimmt werden.

Mycophenolat Mofetil ist dabei eine vielversprechende Substanz (s.o.). Es handelt sich bei diesem Immunsuppressivum, wie bereits dargestellt, um den Morpholinoethylester der

Mycophenolsäure. Mycophenolat Mofetil wird leicht durch Esterasen zu Mycophenolsäure hydrolysiert, die beispielsweise im kornealen Epithel vorkommen.

Die im vorangehenden Abschnitt dargestellten Versuche lassen sich in diesem Zusammenhang auch auf die Frage hin interpretieren, ob nach lokaler Applikation von MMF eine getrennte Bestimmung der trans- und parakorneal penetrierten Substanz durch die Messung der MMF- und MPA-Konzentration intraokular und intrakorneal möglich ist.

3.2.2. Material und Methoden

Die Versuchsdurchführung entsprach der im vorangegangenen Abschnitt dargestellten Anordnung.

3.2.3. Ergebnisse

Von den in Abschnitt 3.1.3. ausführlich dargestellten in okulären Geweben erhobenen MPA und MMF Konzentrationen sollen die im Hinblick auf die in diesem Abschnitt gestellte Frage relevanten Bestimmungen nochmals hervorgehoben werden.

Im Kammerwasser werden bei Applikation von MMF-CD nach 30 und 60 min hohe Konzentrationen des aktiven Metaboliten MPA erreicht (Abbildung 21). Dabei sind die Konzentrationen, die mit MMF-CD erreicht werden, 4 –10 mal höher als die nach Gabe von MPA-CD gemessenen. Die bei Einsatz von MMF-CD erzielten Konzentrationen sind nach 60 min signifikant höher als die mit MMF-SP erreichten ($p < 0,05$).

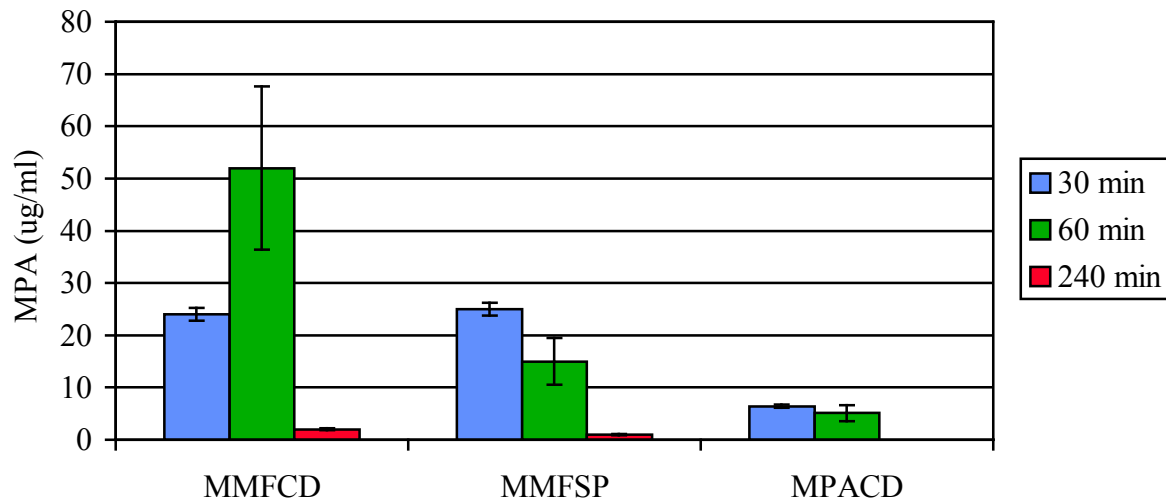


Abbildung 21: Mycophenolsäurekonzentration (MPA) im Kammerwasser 30, 60 und 240 min. nach Applikation von Mycophenolat Mofetil-Cyclodextrinkomplex (MMF-CD), 1% Mycophenolat Mofetil Suspension (MMF-SP) bzw. 30 u. 60 min nach Applikation von Mycophenolsäure-Cyclodextrinkomplex (MPA-CD) beim Kaninchen (n=4; Σ 32 Tiere)

In der Hornhaut ist ausschließlich MPA in hohen Konzentrationen nachweisbar (Abbildung 22, 24).

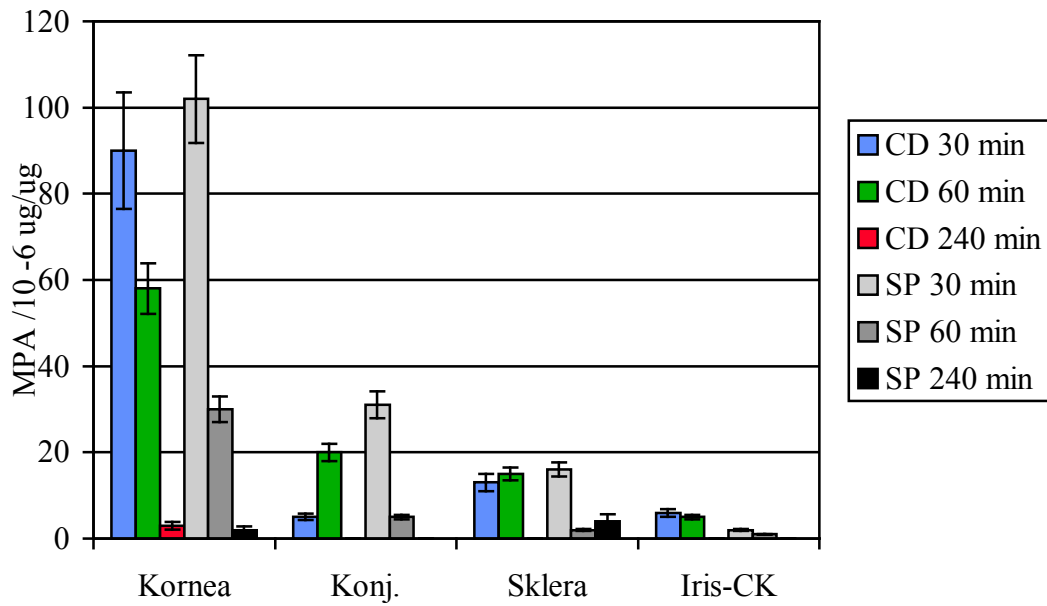


Abbildung 22: MPA Konzentration in Kornea, Konjunktiva, Sklera und Iris-Ziliarkörper 30, 60 und 240 min. nach MMF-CD und MMF-SP Applikation bei je 4 Kaninchen (Σ 24 Tiere)

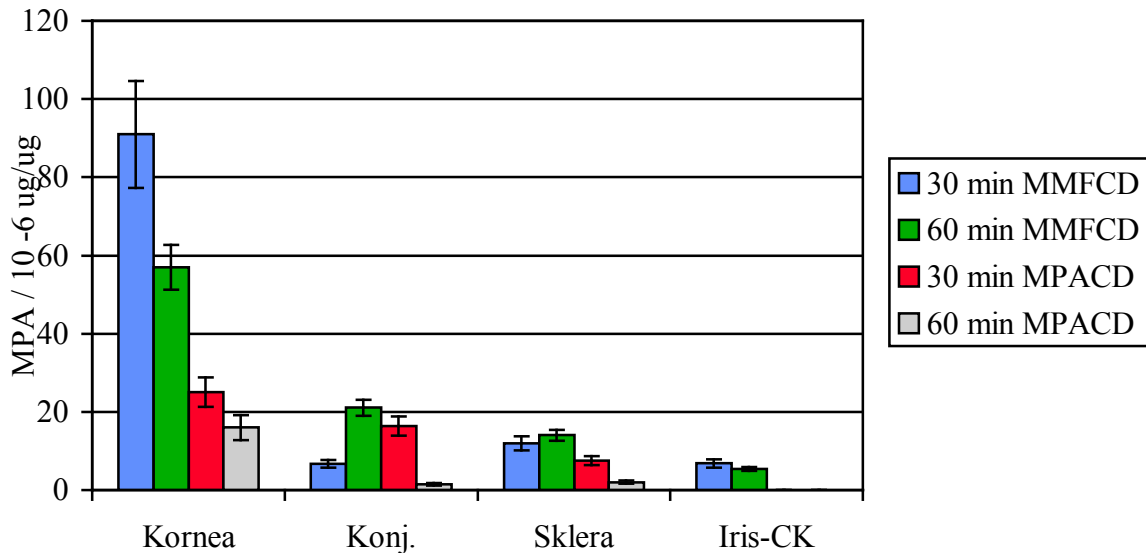


Abbildung 23: MPA Konzentration in Kornea, Konjunktiva, Sklera und Iris-Ziliarkörper 30 und 60 min. nach Applikation von MMF-CD bzw. MPA-CD bei je 4 Kaninchen (Σ 16 Tiere)

Dabei zeigt sich nach 30 min. kein signifikanter Unterschied zwischen den mit MMF-CD und MMF-SP erzielten Konzentrationen. Dagegen sind die Konzentrationen von MPA nach 60 min bei Einsatz von MMF-CD gegenüber MMF-SP signifikant höher ($p < 0,05$). Im Vergleich von MMF-CD gegenüber MPA-CD zeigen sich nach 30 und 60 min signifikant höhere MPA Konzentrationen nach Applikation von MMF-CD ($p < 0,05$) (Abbildung 22, 23). Transkorneal kann also offenbar kein MMF penetrieren.

In Iris-Ziliarkörper, sowie Konjunktiva und Sklera ist bei Einsatz von MMF-SP neben MPA auch MMF nachweisbar (Abbildung 24). Das in Iris-Ziliarkörper detektierte MMF muss den Intraokularraum parakorneal erreicht haben.

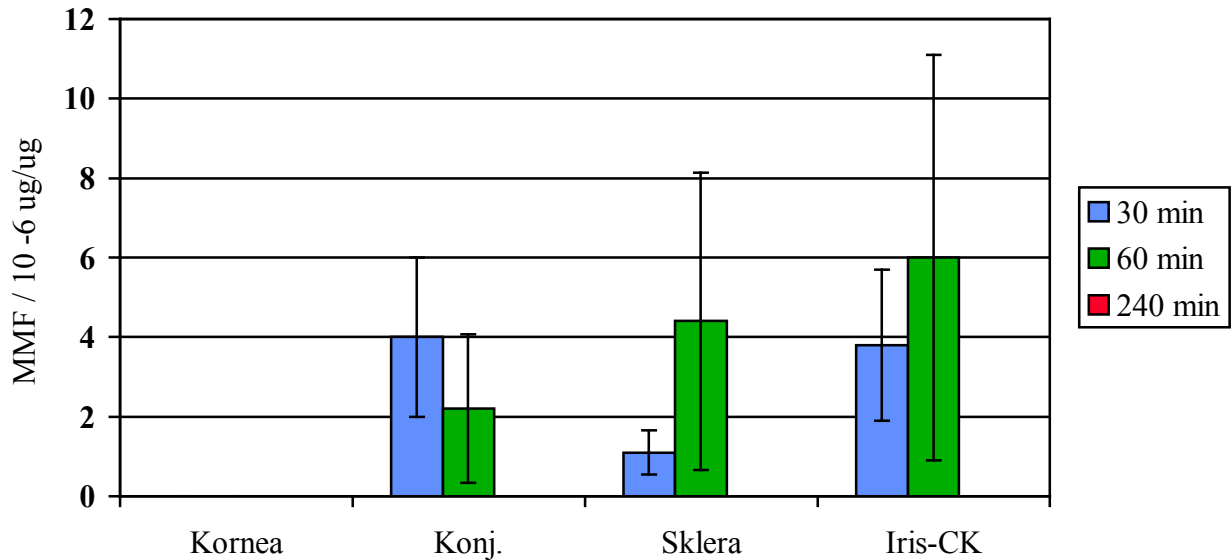


Abbildung 24: MMF-Konzentration in Kornea, Konjunktiva, Sklera und Iris-Ziliarkörper 30, 60 und 240 min. nach Applikation von MMF-SP 1% bei je 4 Kaninchen (Σ 12 Tiere)

Zu keinem Zeitpunkt war in den Kontrollaugen (linkes Auge bei jedem Versuchstier) applizierte Substanz (MMF, MPA) nachweisbar.

3.2.4. Diskussion

In der Zusammenschau erlauben die erhobenen MMF- und MPA-Konzentrationen aufschlussreiche Berechnungen zum Anteil des transkornealen und des parakornealen Penetrationsweges. Da intrakorneal zu keinem Zeitpunkt MMF nachweisbar ist (Abbildung 24), kann davon ausgegangen werden, dass MMF transkorneal nicht penetrieren kann. Das leicht hydrolysierbare MMF wird offenbar von Hydrolasen (Esterasen) im kornealen Epithel quantitativ zu MPA hydrolysiert. In mehreren Studien wurde eine hohe Esteraseaktivität im kornealen Epithel nachgewiesen (Coupland 1994, Lee 1983, Lee 1983). Die Esteraseaktivität weist speziesspezifische Unterschiede auf. Rinderaugen zeigen beispielsweise gegenüber Kaninchen eine höhere Esteraseaktivität im Stroma (Lee 1985), während beim Kaninchen erhebliche Unterschiede in der Zusammensetzung der Esterasensubgruppen zwischen

pigmentierten und Albino-Kaninchen gefunden wurden (Lee 1983). Ein dem MMF ähnliches Penetrationsverhalten wurde auch für andere Esterverbindungen wie das Unoproston-Isopropyl nachgewiesen (Babiolo 2001).

Intraokular ist aber MMF in unseren Versuchen sowohl bei Applikation von MMF-CD als auch bei Einsatz von MMF-SP nachweisbar (in Iris-Ziliarkörper, Abbildung 24). Der Vergleich von MPA-CD und MMF-CD zeigt, dass zwar bei Applikation von MMF-CD MPA in Iris-Ziliarkörper detektierbar ist (Abbildung 23), dass aber bei Einsatz von MPA-CD in Iris-Ziliarkörper kein MPA zu finden ist (Abbildung 23), obwohl hohe Konzentrationen im Kammerwasser vorliegen (Abbildung 21). Dies spricht dafür, dass der parakorneal penetrierte Anteil von MPA sehr gering ist, wenn man davon ausgeht, dass transkorneal penetrierte Substanz zuerst ins Kammerwasser gelangt, während der parakorneale Weg über Bindehaut und Sklera über die Uvea in die Vorderkammer führt. Daraus ergibt sich, dass nach Applikation von MMF-SP in Iris-Ziliarkörper nachweisbares MMF näherungsweise dem parakorneal penetrierten Anteil entsprechen muss.

Zusammenfassend konnten unsere Experimente zeigen, dass nach topischer Applikation von MMF der transkorneale und der parakorneale Penetrationsweg durch Messung von MMF und MPA intraokular anteilmäßig erfasst werden kann. Darüber hinaus ist die topische Anwendung von MMF ein vielversprechender Therapieansatz bei immunmedierten Erkrankungen des vorderen Augenabschnitts (s.o.).

3.3. Einsatz von topischem MMF am Keratoplastikmodell der Ratte

3.3.1. Einführung

MMF ist, wie in den vorangehenden Abschnitten dargestellt, eine vielversprechende Substanz zur postoperativen Therapie nach Keratoplastik. Bei systemischer Applikation hat sich MMF als gleich wirksam wie Cyclosporin A zur postoperativen Therapie nach der Risikokeratoplastik erwiesen (Reis 1999). Mit der von uns zur Lokalthherapie entwickelten Formulierung MMF Cyclodextrinkomplex (MMF-CD) lassen sich hohe Konzentrationen des Wirkstoffs MPA in der Kornea und in der Vorderkammer erzielen. Vor diesem Hintergrund führten wir Versuche zur lokalen MMF Applikation zur Prophylaxe der Abstoßungsreaktion an einem Keratoplastikmodell an der Ratte durch.

3.3.2. Material und Methoden

Tiere:

Für alle Versuche wurden weibliche Inzucht-Ratten (Charles River Kißlegg) von 200 – 250 g Körpergewicht verwendet. Lewis (RT1A) Ratten dienten als Empfänger. Die Transplantate wurden von DA (RT1.A^{av1}) Tieren gewonnen. Diese Stämme unterscheiden sich auf dem gesamten MHC-Genort (Gill 1987). Die Tiere wurden in Drahtboden-Käfigen unter kontrollierten regelmäßigen Hell/Dunkel Zyklen gehalten. Sie wurden mit einer Standard-Labornahrung gefüttert und hatten freien Trinkwasserzugang. Bei jedem Tier wurde nur ein Auge hornhauttransplantiert, so daß kein Tier durch die Versuche erblindete. Die Tiere wurden entsprechend den Richtlinien des "National Institute of Health" „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ behandelt. Insgesamt wurden 12 Tiere eingesetzt.

Tiermodell:

Orthotope Hornhauttransplantationen wurden in Modifikation einer bereits publizierten Vorgehensweise durchgeführt (Pleyer 1996). Die Spendertiere wurden mit einer Überdosis Pentobarbital (Narcofen®, Rhone Merieux, Laupheim) anästhesiert und getötet. Vor der Transplantation wurden die Empfängergeraugen mit in 10-minütigem Abstand getropftem Atropinsulfat 1% Augentropfen weitgestellt (CibaVision, Wefling). Die Pupillendilatation erfolgte zur Vermeidung von chirurgisch bedingten Irisbeschädigungen und Ausbildung von vorderen Synechien bei flacher Vorderkammer. Durch subkonjunktivale Injektion von 0,05 ml einer Lösung aus Atropin 1 mg /ml und Suprarenin 1 : 1000 wurde die maximale Mydriasis während der chirurgischen Intervention aufrechterhalten.

Chirurgisches Vorgehen:

Die Spenderhornhaut wurde am getöteten Spendertier mittels eines 3,5 mm Trepans trepaniert und mit gebogenen Castroviejo Scheren unter sterilen Bedingungen ausgeschnitten. Dabei wurde ein Operationsmikroskop eingesetzt. Die Spenderhornhaut wurde dann auf einen sterilen Tropfen Methylcellulose (1%) gesetzt. Die Anästhesie der Empfängertiere erfolgte durch Injektion von Narcoren (2,5 – 5,0 mg /kg). Die Empfängerhornhaut wurde mittels eines 3,0 mm Trepans trepaniert. Bei Eröffnung der Vorderkammer wurde ein Viskoelastikum in die Vorderkammer injiziert (Healon®, AMO, Erlangen), um die Vorderkammertiefe aufrechtzuerhalten und Iris- und Linsenbeschädigung zu vermeiden. Nach Entnahme der Empfängerhornhaut wurde die Spenderhornhaut aufgesetzt und mittels Nylon 10-0 Fäden (6 – 8 Einzelknopfnähte) eingenäht. Dadurch wurde eine optimale Adaptation der Wundränder erreicht. Schließlich wurde die Vorderkammer mit physiologischer NaCl-Lösung tonisiert. Am Ende der Operation wurde antibiotische Augensalbe (Floxal®, Dr. MannPharma, Berlin) appliziert.

MMF-CD-Präparation:

Die Mycophenolat-haltige Augentropfen-Präparation wurde, wie im vorausgegangenen Abschnitt dargestellt, als Cyclodextrinkomplexlösung (MMF-CD) hergestellt (0,1 g MMF, 1,0 g HP- β -Cyclodextrin, 0,03 g NaCl, SPP ad 10 g), außerdem wurde eine Präparation ohne Wirkstoff nur mit Vehikel in gleicher Konzentration hergestellt.

Behandlungsprotokoll:

Die Tiere wurden in 3 Gruppen geteilt (4 Tiere pro Gruppe), 1.: Behandlungsgruppe; 2.: Gruppe nur mit Vehikel behandelt; 3.: Gruppe unbehandelt. Die Tropfapplikation erfolgte 2 stündlich (auch nachts) während der ersten 3 Tage, dann 2 stündlich nur tagsüber.

Transplantatbeurteilung:

Die Transplantate wurden unter dem Operationsmikroskop dreimal in der ersten Woche postoperativ beurteilt, danach täglich. Die Methodik der Beurteilung wurde entsprechend einer früheren Publikation durchgeführt (Pleyer 1995). Die Transplantate wurden im Hinblick auf Transparenz und Ausbildung eines Ödems auf einer Skala von 0 bis 4 (fehlend, leicht, mittel, schwer) eingestuft. Dabei wurde die Transparenz folgendermaßen beurteilt: klares Transplantat 0; leichter Haze 1; erhöhter Haze, Irisstrukturen gut erkennbar 2; erhöhter Haze, Irisstrukturen schlecht erkennbar 3; Transplantat trüb, keine Vorderabschnittsstrukturen mehr sichtbar 4. Das Ödem wurde so eingestuft: kein Ödem 0; leichte stromale Quellung 1; diffuses stromales Ödem 2; diffuses stromales und epitheliales Ödem 3; bullöse Keratopathie 4. Auf

der Basis dieser beiden Werte wurde täglich ein „Abstoßungswert“ von 0 bis 4 bestimmt. Entsprechend dieser Wert der Einstufung mittel oder schwer (also 3 oder 4), wurden die Transplantate als abgestoßen eingestuft. Komplikationen wie Infektionen, Vorderkammerverlust oder Katarakt wurden ebenfalls erfasst. Wenn eine Komplikation auftrat, wurden die Tiere von der weiteren Beurteilung ausgeschlossen und für die Auswertung als „verloren“ eingestuft.

Statistische Auswertung:

Die Transplantatüberlebensraten wurden mittels einer Mantel-Haenszel-Überlebensanalyse verglichen.

3.3.3. Ergebnisse

Die Therapie wurde von allen Tieren gut vertragen. Infektionen, Vorderkammerverlust oder Katarakt wurden nicht beobachtet, d.h. alle 12 Tiere blieben bis zur Transplantatabstoßung in die Studie eingeschlossen. Die Überlebensraten der Transplantate sind in der folgenden Abbildung zu sehen. Die Unterschiede in den Überlebensraten waren nicht signifikant ($p > 0,05$). Insbesondere zeigten die MMF behandelten Tiere auch keinen Trend zu längerem Transplantatüberleben, im Gegenteil war in der MMF-behandelten Gruppe sogar ein Trend zu einer früheren Abstoßung erkennbar ohne statistische Signifikanz ($p > 0,05$).

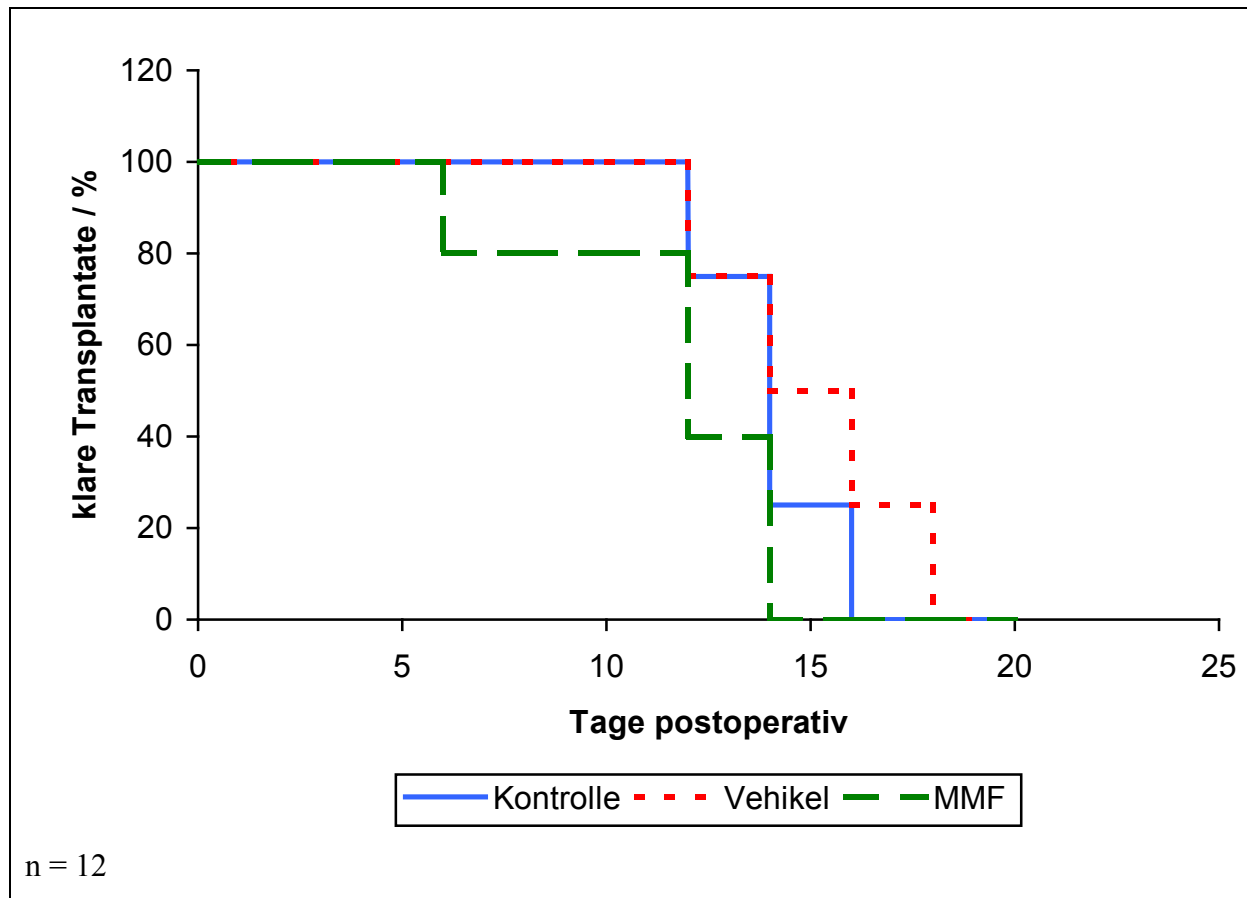


Abbildung 25: Überlebenskurven der Hornhauttransplantate der in 3 unterschiedlichen Gruppen behandelten Tiere: Kontrolle: unbehandelt, MMF mit topischem MMF- β -CD behandelte Tiere, Vehikel: mit topischer β -Cd Lösung behandelte Tiere

3.3.4. Diskussion

Wir untersuchten eine -wie in vorausgegangenen Versuchen gezeigt worden war (s.o.)- gut verträgliche topische MMF-Präparation (MMF- β -Cyclodextrinkomplex) auf ihre Wirksamkeit zur Prophylaxe der Abstoßungsreaktion an einem etablierten Rattenmodell. Dabei konnten wir zeigen, daß topisches MMF als alleiniges Therapeutikum für diese Indikation unwirksam ist. Dies steht im Gegensatz zur Wirksamkeit dieser Substanz bei systemischer Applikation. Die Effektivität von systemischem MMF für diese Indikation war in früheren Untersuchungen sowohl an einem Rattenmodell (Reis 1998) als auch in klinischen Studien gezeigt worden (Reis 1999, Reinhard 2005).

Diese Abhängigkeit der Wirksamkeit von der Applikationsform kann auf verschiedenen Faktoren beruhen. Aus pharmakodynamischer Sicht ist anzumerken, daß MMF relativ spät in der Kaskade der Aktivierung der Immunantwort wirkt, nämlich auf die Phase der Lymphozytenproliferation, wobei im Rahmen der Abstoßungsreaktion insbesondere die T-Zellvermehrung von Bedeutung ist. Diese erfolgt aber vermutlich nicht im Transplantat selbst, sondern in den zentralen Stationen des lymphatischen Systems, die vermutlich von dem topisch angewandten Wirkstoff nicht -ausreichend- erreicht werden. Inwieweit lokal applizierte immunmodulatorische Substanzen in den regionalen Lymphknoten nachweisbar werden, ist bisher nicht untersucht worden. Dieses sollte nach den Ergebnissen unserer hier dargestellten Versuche aber Ziel einer zukünftigen Versuchsreihe sein. Nach den Ergebnissen der im vorausgegangenen Kapitel ausgeführten Versuche zur Bioverfügbarkeit der lokal applizierten MMF-Cyclodextrin-Formulierung ist nach unserer Meinung eine unzureichende Penetration als Ursache für die Unwirksamkeit von MMF im Keratoplastik-Rattenmodell auszuschließen. Die im Kammerwasser erreichten Konzentrationen des Wirkstoffs MPA sind hoch. Lokale toxische Effekte sowohl des Wirkstoffs als auch des Vehikels sind ebenfalls nach unserer Ansicht auszuschließen, da sich die Überlebenskurven der mit Vehikel allein behandelten Transplantate nicht signifikant von den Wirkstoff behandelten und nicht von den unbehandelten Kontrollen unterscheiden.

Dennoch ist als Resultat dieser Experimente festzuhalten, daß die MMF-Cyclodextrin-Präparation gut verträglich ist. Der Nutzen der Formulierung als Kombinationstherapie (beispielsweise mit topischem CsA) zur Prophylaxe der Abstoßungsreaktion oder auch allein zur Therapie anderer immunmediierter Erkrankungen der okulären Oberfläche (atopische Keratokonjunktivitis, rheumatisches korneales Ulkus, schwere Keratokonjunktivitis sicca) bleibt ein interessanter Therapieansatz und wird von uns weiter untersucht.

Im Hinblick auf die prophylaktische Therapie der Abstoßungsreaktion haben wir jedoch zunächst einen anderen Ansatz für weitere Untersuchungen verfolgt, und zwar die Entwicklung einer topischen Formulierung eines weiteren vielversprechenden Immunsuppressivums, worauf im folgenden Kapitel eingegangen wird.

3.4. Entwicklung einer topischen Präparation von Sirolimus/Everolimus

3.4.1. Einführung

Sirolimus (Rapamycin) ist ein cyclisches Makrolidantibiotikum mit einer dem FK 506 ähnlichen Struktur. Es stammt aus einem Boden-Mikroorganismus, *Streptomyces hygroscopicus*, der auf der Osterinsel Rapa Nui gefunden wurde, die damit in die Namensgebung dieses Wirkstoffs einging. Die Molekülformel ist in der folgenden Abbildung gezeigt.

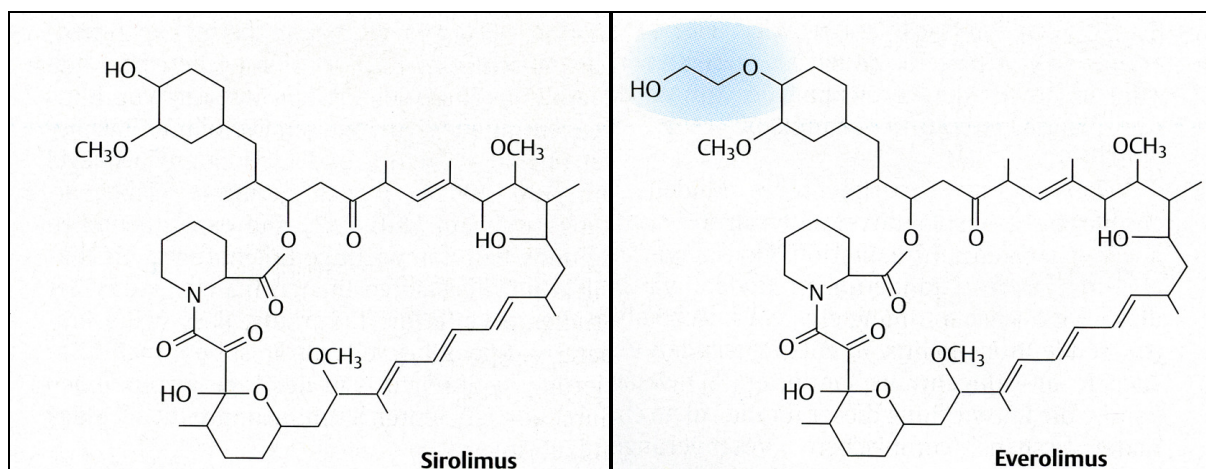


Abbildung 26: Molekülformel von Sirolimus (Rapamycin) und Everolimus

Die immunsuppressiven Eigenschaften des Moleküls wurden 1977 von Martel und Sehgal entdeckt. Rapamycin bindet an FKBP-25, hat aber keinen Effekt auf den Calcineurin-Calmodulin-Komplex, über den z.B. Cyclosporin A wirkt. Es interferiert auch nicht mit der Interleukin-2 Produktion. Dagegen hemmt Rapamycin zwei Proteine: mToR 1 und mToR 2 (mammalian target of rapamycin), die mit der Zellzyklusprogression der G1 Phase assoziiert sind. Im Vergleich zu Cyclosporin A und Tacrolimus wirkt Rapamycin auf einen späteren Zeitpunkt der Zellzyklusprogression, indem es nicht die Produktion proliferationsstimulierender Zytokine (z.B. IL-2) hemmt, sondern das Proliferationssignal, das von diesen Faktoren ausgeht.

Rapamycin hat sich in experimentellen Untersuchungen zur Organtransplantation und in klinischen Studien zur Nierentransplantation als hocheffektiv erwiesen (Morris 1995, Brattstrom 1996). Phase-III-Studien zum Einsatz bei der Nierentransplantation wurden

kürzlich durchgeführt. Für die systemische Applikation ist von besonderer Bedeutung, daß im Gegensatz zu den Calcineurininhibitoren von Rapamycin keine Nephrotoxizität bekannt ist. Eine Reihe von experimentellen Studien haben bereits eine Wirksamkeit von Rapamycin auch bei ophthalmologischen Krankheitsbildern gezeigt. Im Tiermodell ist die Applikation dabei meist parenteral intraperitoneal vorgenommen worden.

Everolimus (RAD) ist ein zur oralen Gabe besser geeignetes Rapamycinderivat. Es handelt sich um ein Produkt der Firma Novartis Pharma GmbH, die den Wirkstoff unter dem Handelsnamen Certican® vertreibt. Das Präparat wurde in Deutschland im Jahr 2004 zugelassen. Zugelassenen Indikationen sind derzeit die Herz- und die Nierentransplantation (Land 2005). Everolimus stammt von der Grundsubstanz Sirolimus ab, aus der es semisynthetisch hergestellt wird. Im Vergleich zu Sirolimus hat das Molekül von Everolimus eine höhere Polarität indem an Position 40 der Rapamycin-Struktur eine Hydroxyethyl-Kette substituiert ist (Abbildung 26). Dies führt zu einer gesteigerten oralen Bioverfügbarkeit und zu einer reduzierten Verteilung im Gewebe. Der Wirkungsmechanismus entspricht dem des Sirolimus, indem Everolimus ebenfalls als Proliferationssignalhemmer die intrazelluläre Signalübertragung vom IL-2-Rezeptor inhibiert.

Bisherige mit Sirolimus und/oder Everolimus in der Ophthalmologie durchgeführte Studien sind zusammengefasst in der folgenden Tabelle dargestellt:

Tabelle 12: Experimentelle Studien zur Anwendung von Sirolimus (Rapamycin)/ Everolimus in der Ophthalmologie

Studie	Diagnose	Art	Wirkung
Martin 1995	EAU	Ratte	Synergistische Wirkung mit CsA; Dosisreduktion
Kulkarni 1994	EIU	Kaninchen	Leukozyteninfiltration unterdrückt
Roberge 1993	EAU	Ratte	Entzündung unterdrückt
Ohia 1992	EIU	Kaninchen	EIU inhibiert
Olsen 1994	Keratoplastik	Ratte	Verlängertes Transplantatüberleben
Thompson 1998	Keratoplastik	Ratte	Verlängertes Transplantatüberleben
Reis 2002 (Everolimus)	Keratoplastik	Ratte	Günstigstes Transplantatüberleben in Kombination mit CsA

Eine Wirksamkeit von Rapamycin wurde also sowohl bei der Prophylaxe der Abstoßungsreaktion nach Keratoplastik als auch bei der experimentellen Uveitis gefunden, was den Einsatz dieser Substanz in der Ophthalmologie durchaus wünschenswert macht. Krankheitsbilder, bei denen eine topische Applikation des Wirkstoffs von besonderem klinischem Interesse sind, sind insbesondere die Abstoßungsreaktion nach Keratoplastik, immunmedierte Erkrankungen der okulären Oberfläche sowie die verschiedenen Formen der Autoimmun-Uveitis. Ziel der in diesem Abschnitt dargestellten Untersuchungen ist es, topische Anwendungsmöglichkeiten verschiedener Aufarbeitungen von Rapamycin zu untersuchen.

Die besondere Bedeutung dieser Untersuchungen liegt:

- in der Untersuchung der Pharmakokinetik von lokal appliziertem Rapamycin und Everolimus
- in der Erweiterung von Erkenntnissen über die Hornhautpermeabilität
- im therapeutischen Einsatz von lokal appliziertem Rapamycin bei der Hochrisikokeratoplastik (siehe auch folgenden Abschnitt) oder bei anderen Erkrankungen, die auf eine Immunsuppression ansprechen, wie dem okulären

Pemphigoid oder der Uveitis, um lokale immunmodulatorische Effekte ohne systemische Nebenwirkungen zu ermöglichen.

4.2. Material und Methoden

Die Experimente zur Herstellung einer geeigneten lokal applizierbaren Formulierung von Sirolimus und Everolimus wurden im Rahmen eines Kooperationsprojektes mit dem Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin durchgeführt. Zunächst musste eine geeignete galenische Aufarbeitung des lipophilen Moleküls gefunden werden. Analog zu den Versuchen mit MMF erschien auch für Rapamycin die Komplexierung mit Cyclodextrinen zunächst eine geeignete Aufarbeitung zu sein. Cyclodextrinlösungen, Liposomen, hydrotope Mixturen, Poloxamer Gele und eine Mikroemulsion wurden auf ihre Fähigkeit, Sirolimus in Lösung zu bringen, untersucht. Die für Sirolimus optimierte Präparation wurde dann auch für Everolimus verwendet.

- Chemikalien und Reagenzien:

Sirolimus wurde von Wyeth Pharma GmbH (Münster) und LC Laboratories (Woburn, MA, USA) bezogen und wurde wie erhalten in die Versuche eingesetzt. Bei allen Experimenten wurde MilliQ Wasser (Millipore, Bedford, MA, USA) verwendet. Cyclodextrine wurden von Wacker Chemie (Burghausen) bezogen, die Phospholipide stammten von Lipoid (Ludwigshafen), Stearylamin von Sigma Aldrich (Steinheim).

Dihexadecylphosphat (Dicetylphosphat), Benzylalkohol, Benzolsäure und Natriumbenzoat wurden von Fluka (Buchs, Schweiz) bezogen, Lutrol® F 127 von BASF (Ludwigshafen). Triacetin stammte von Alfa Aesar (Karlsruhe), Synperonic® L 64 wurde bei C.H. Erbslöh (Düsseldorf), Methanol und Acetonitril (beide Gradientengrad) für die HPLC wurden von Merck (Darmstadt) bezogen. Chloroform stammte ebenfalls von Merck (Darmstadt) und Carl Roth (Karlsruhe), Propylenglykol von Wasserfuhr (Bonn). Alle weiteren Chemikalien waren von pharmazeutischem oder analytischem Grad und wurden wie vom kommerziellen Hersteller erhalten in die Versuche eingesetzt.

- Präparation der verschiedenen Formulierungen:

- Cyclodextrinlösungen (CD)

1 mg Sirolimus pro ml Formulierung wurde in Methanol gelöst und anschließend mittels Evaporator oder Vakuumtrockenkammer bei 40 °C getrocknet. Cyclodextrine und Hydroxypropylcellulose (HPC) wurden abgewogen, 100 µl einer 1 %igen Benzalkoniumchlorid-(BAC) Lösung wurden hinzugefügt und die Mischung mit H₂O auf 10 ml aufgefüllt. Die Mischung wurde in einem Autoklaven für 15 min auf 121 °C erhitzt, dann auf Raumtemperatur abgekühlt und durch einen 0,8 mm-Filter (Sartorius, Göttingen, Germany) filtriert und unter aseptischen Bedingungen in Tropfflaschen abgefüllt.

- Liposomen

Die Liposomen wurden nach der Filmmethode hergestellt. Dabei lag die finale Lipidkonzentration bei 5 %. Die Lipide und der Wirkstoff wurden in Chloroform/Methanol (2/1) gelöst. Die Mischung wurde bis zur Trockenheit in einem Rotationsevaporator bei 40 °C und reduziertem Druck evaporiert. Letzte Reste des organischen Lösungsmittels wurden in einer Vakuumtrockenkammer bei 40 °C und 1 mbar über 8 Stunden entfernt.

Der Lipidfilm wurde mit Pufferlösungen oder Wasser/Propylenglykol Mischungen (85/15) in einem Sonicatorbad bei 60 °C über 15 min hydriert. Die Liposomen wurden mittels Extrusion durch eine Polycarbonatmembran von 200nm Porengröße (Nucleopore, CA, USA) ausgefällt. Die Vesikelsuspension wurde schließlich durch Filtration durch einen 0,2 µm Polycarbonatfilter (Sartorius, Göttingen) sterilisiert.

Bei den in der liposomalen Dispersion verwendeten Lipiden handelte es sich um folgende:

PC(-): Lipoid S 100/Cholesterin/Dicetylphosphat

PC(+): Lipoid S 100/Cholesterin/Stearylamin

Die Propylenglykolproben hatten einen Gehalt von 15 % Propylenglykol in der wässrigen Phase. Konservierungsmittel wurden diesen Proben nicht zugesetzt. Die Proben PC(+)pH 5,4 und PC(-)pH7,4 wurden gemäß der Ph. Eur. mit Phosphatpuffer angesetzt und mit NaCl isotonisiert.

- Hydrotrope Mixturen (HM)

Propylenglykol and Benzylalkohol wurden gemischt, der Wirkstoff wurde hinzugefügt und so lange gerührt, bis eine klare Lösung entstanden war. Benzolsäure und Natriumbenzoat wurden hinzugefügt, und die Lösung wurde unter sehr langsamem Zugeben mit Wasser versetzt. Dabei erfolgte mildes Erwärmen im Wasserbad auf 50 °C. Ungelöste Bestandteile und Partikel wurden am Ende des Herstellungsprozesses durch Filtration durch einen Filter mit Porengröße 0,8 µm (Sartorius, Göttingen) entfernt.

- Poloxamer Gele

Lutrol® F 127, Benzylalkohol und der Wirkstoff wurden ausgewogen, ein steriler Magnetprüher wurde in das Gefäß gegeben, und die Mischung wurde unter ständigem Rühren bei 80 ° C im Wasserbad geschmolzen. Die Mischung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, und der Puffer (Phosphatpuffer pH 7,4 R ohne NaCl) wurde hinzugefügt. Die Mischung wurde im Kühlschrank bei 4 – 8 ° C für 48 –72 Stunden gelagert und dabei gelegentlich geschüttelt, bis alles Polymer gelöst war. Am Ende der Kühlzeit wurde die Lösung mittels Magnetprüher kräftig gerührt. Das Auflösen evtl. noch vorhandener Trübungen wurde durch Erhitzen der Mischung im Wasserbad auf 80 °C erreicht. Nach Wiederabkühlen wurde die Lösung schließlich durch einen 5 µm PTEE-Filter filtriert (Sartorius, Göttingen).

- Mikroemulsionen (ME)

Triacetin und Synperonic® L 64 wurden bei 180 °C für 30 min trocken sterilisiert, die Propylenglykol/Wasser Mischung wurde bei 121 °C und 2 bar autoklaviert. Triacetin und die Wirkstoffe wurden unter aseptischen Bedingungen ausgewogen und mit einem Magnetprüher gerührt. Dann wurde Synperonic® hinzugefügt. Das vollständige Lösen der Substanz dauert mehrere Stunden. Die hydrophile Phase wurde unter kontinuierlichem Schütteln aufgenommen. Dann wurde die Mikroemulsion durch einen 5 µm PTFE-Filter (Sartorius, Göttingen) unter aseptischen Bedingungen filtriert. Die Formulierung löst übliche Filtermaterialien wie Cellulosenitrat oder Acetat.

- Permeationsversuche an der Ussig Kammer:

Die Permeation des Wirkstoffs durch die isolierte Schweinehornhaut wurde in Versuchen mit Permeationskammern aus Acrylglas (Ussig-Kammern, Gründberg Kunststoffe, Roedermark)

getestet. Augen von frischgeschlachteten Schweinen wurden aus der Lehr- und Versuchsanstalt für Tierzucht und Tierhaltung Teltow (LVAT, Ruhlsdorf) bezogen. Korneoskleralscheiben (Durchmesser 15 mm) wurden trepaniert und so in die Permeationskammern eingepasst, dass das Epithel in Richtung der Donorseite wies. Als Donorlösung wurde ein ml der zu testenden Sirolimusformulierung verwendet. Als Akzeptorvolumen dienten 15 ml einer Bicarbonat-Ringer-Lösung. Die Akzeptorlösung wurde mittels einer Ismatec IPS 12 Pumpe (Glattbrugg, Zürich, Schweiz) bei einer Flow-Rate von 5 ml/min umgewälzt. Nach 30, 60 und 240 Minuten wurde jeweils eine Probe von 5 ml Volumen aus dem Akzeptormedium entnommen und durch frische Ringerlösung ersetzt. Die entnommenen Proben wurden mittels Immunoassay (s.u.) auf den Gehalt an Sirolimus untersucht. Die Vitalität der eingesetzten Hornhaut wurde am Ende des Versuchs mittels Trypanblaufärbung der Endothelseite getestet. Epithelabradierte Hornhäute wurden gewonnen, indem das Epithel am isolierten Bulbus vor der Trepanation mittels eines Hockeymessers ohne Verletzung des Stromas abgeschoben wurde.

- Analytik:

Der Wirkstoffgehalt der Formulierungen wurde mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie „High performance liquid chromatography“ (HPLC) untersucht. Die Molekülstruktur von Sirolimus liefert 3 akkumulierte Doppelbanden, die eine Detektion des Moleküls unter UV-Bestrahlung bei einer Wellenlänge von 278 nm erlauben. Das verwendete System bestand aus einem L-4500 „Diode Array Detector“, einem D-6000 Interface und einer L-6200 „Intelligent Pump“ (Merck Hitachi). Reverse Phase Säulen (Merck LiChroCart®, LiChrospher® 100 RP-18 (5 µl)) wurden für die Auftrennung der Komponenten verwendet. Die auf den Gehalt an Sirolimus zu analysierenden Formulierungen wurden mit Chloroform / Methanol (1 / 2) oder mit reinem Methanol verdünnt (1 :10) und mit dem Vortex-Mixer bis zum Erreichen einer homogenen Mischung geschüttelt und so in die HPLC eingesetzt. Die Flussrate wurde konstant bei 1,0 ml/min gehalten. Die Analytik fand bei Raumtemperatur statt. Mit dieser Technik wurden in gleicher Weise Konzentrationsbestimmungen von Everolimus in den entsprechenden Präparationen durchgeführt.

Zur Bestimmung des Wirkstoffs in den Permeationsversuchen ist diese Methode allerdings ungeeignet, da die Nachweisgrenze erheblich über dem therapeutischen Bereich von

Sirolimus (5 – 15 ng/ml) (Land 2004) liegt. In diesen Versuchen wurden die Wirkstoffspiegel mittels Immunoassay (IMX®-System, Abbott, Wiesbaden) bestimmt. Dazu wurden 150µl der Akzeptorlösung mit 300 µl Fällungsreagenz in einem Eppendorf Röhrchen vermischt und 15 s bei höchster Geschwindigkeit auf einem Vortex-Mixer homogenisiert. Dann wurden die Röhrchen für 4 min bei 10000g zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415 C, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg). Der Überstand wurde in ein Probenfeld der IMX-Reaktionszelle dekantiert und diese zur Messung in das Karussell des IMX-Moduls gestellt. Der Messbereich des Systems liegt bei 1,5 bis 30 ng / ml.

3.4.3. Ergebnisse

Die durch Cyclodextrinkomplexierung in der Lösung erreichbare Rapamycinkonzentration ist gering (60 – 70 µg/ml). Darüber hinaus weist die Cyclodextrinpräparation eine geringe Stabilität über die Zeit auf (Abbildung 27).

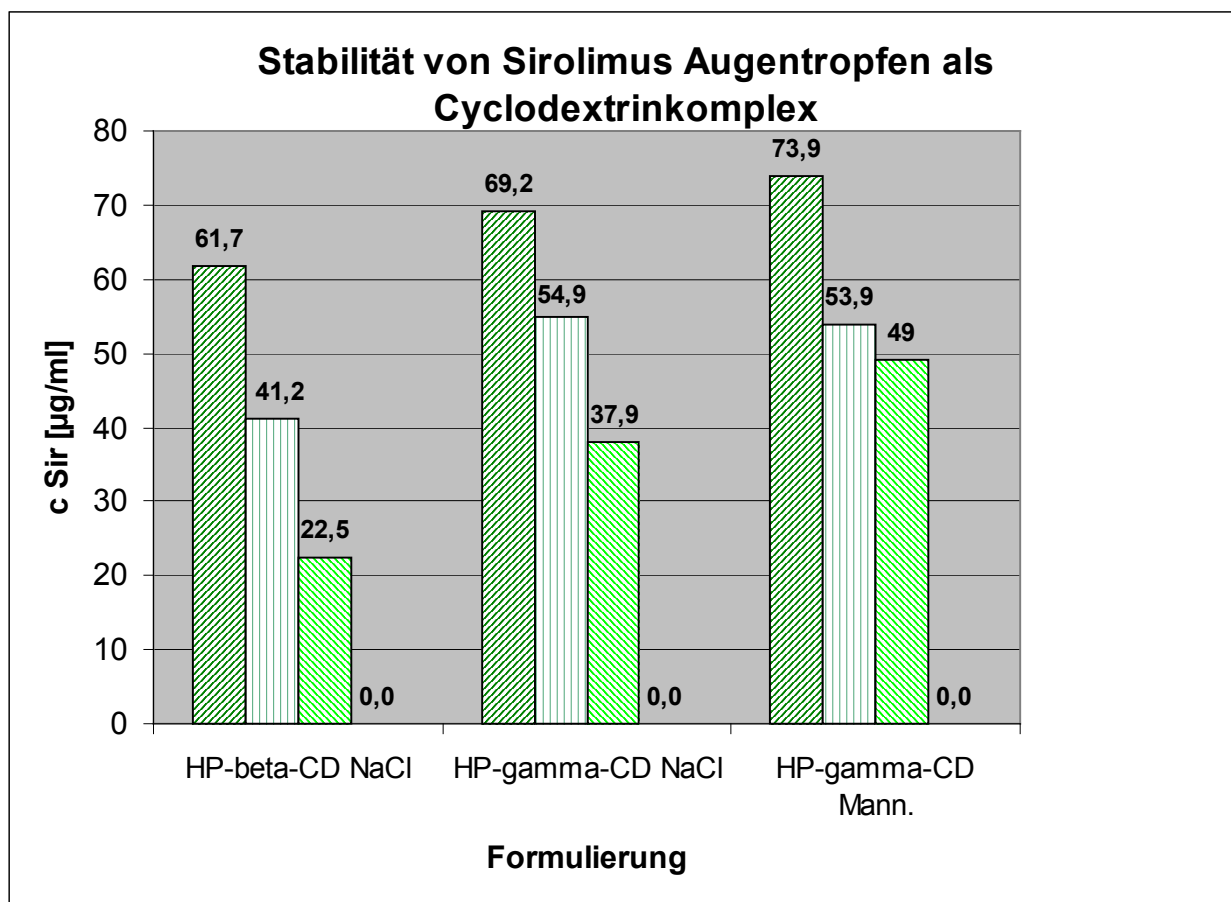


Abbildung 27: Wirkstoffgehalt von 3 Sirolimus-Cyclodextrinkomplexpräparationen und Stabilität über die Zeit (jeweils nach 0, 3, 6 und 12 Monaten)

Durch die von uns getesteten liposomalen Komplexierungen lässt sich keine messbare Wirkstoffkonzentration in der Präparation aufbauen.

Der Einschluss von Sirolimus in eine Mikroemulsion ist nach unseren Ergebnissen der beste Weg, um eine stabile reproduzierbar hohe Wirkstoffkonzentration von 1 mg/ml in einer augenkompatiblen Formulierung zu erreichen. Dieses entspricht also einer Sirolimus-Konzentration in der Präparation von 0,1 %. In gleicher Weise wurde noch eine 0,05 % Sirolimus-Mikroemulsion hergestellt. Zum Vergleich (Abbildung 27) sind durch Cyclodextrinkomplexierung nur maximal 60 – 70 µg / ml erreichbar (0,006-0,007 %).

Nach Abschluss der Versuche zur Optimierung einer lokalen Präparation von Sirolimus wurden –aufgrund der chemischen Ähnlichkeit beider Verbindungen- in gleicher Weise 2

Formulierungen von Everolimus als Mikroemulsion mit einem Wirkstoffgehalt von 0,05 % und von 0,1 % hergestellt.

Die Ergebnisse der Penetrationsversuche mit der optimierten Sirolimus-Mikroemulsion an isolierten Schweinehornhäuten in einer Ussig-Kammer sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

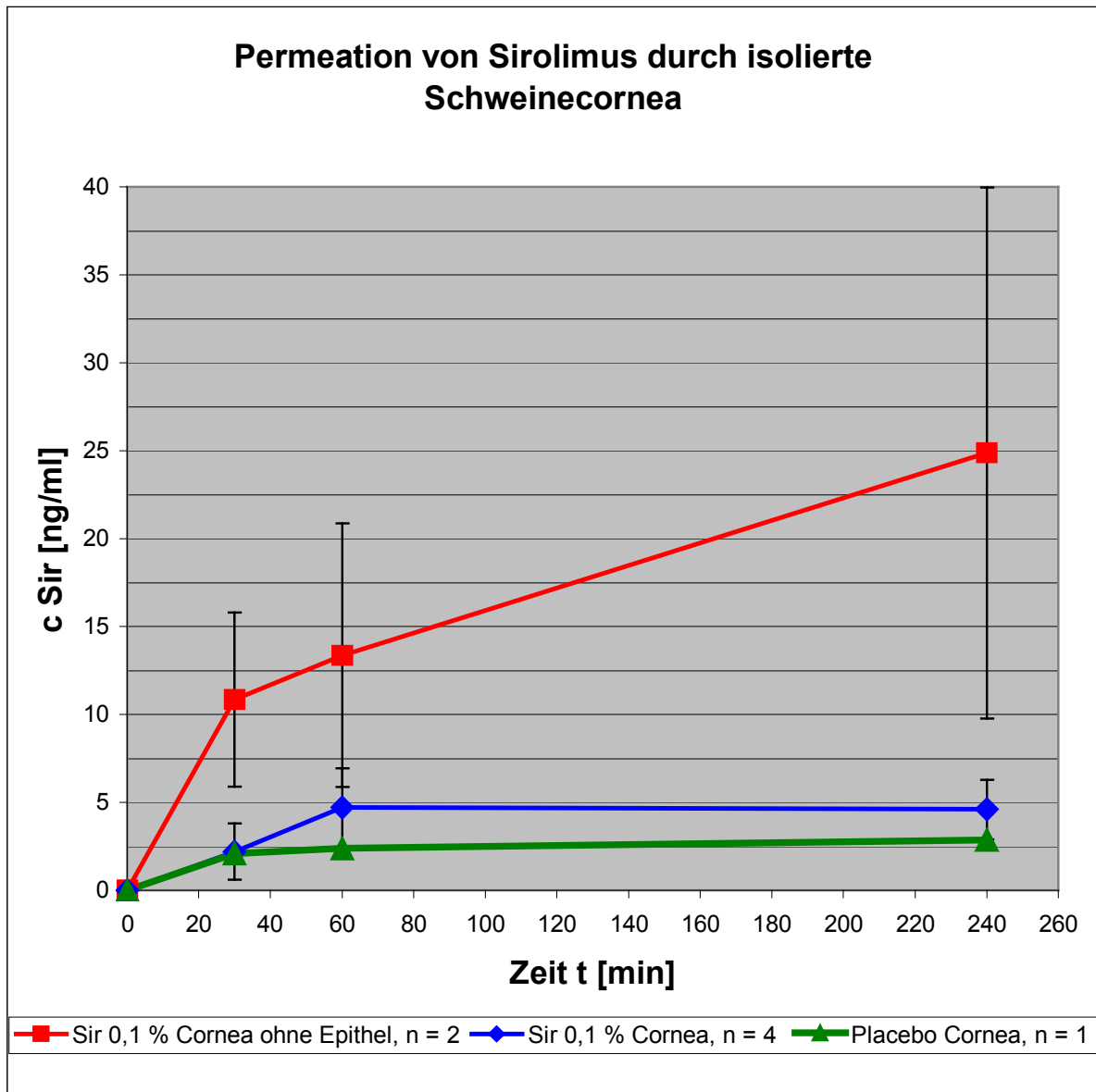


Abbildung 28: Penetration von Sirolimus 0,1 % durch intakte und epithelabradierte Schweinehornhäute

Der Wirkstoff kann die intakte Hornhaut also kaum penetrieren. Die im Akzeptormedium mittels Immunoassay messbaren Wirkstoffkonzentrationen liegen unterhalb des therapeutischen Bereichs (unter 5 ng/ml) und unterscheiden sich nicht signifikant von den mittels Placebo erzielten Werten. Im Akzeptormedium kann nur nach Abradierung des kornealen Epithels ein therapeutischer Wirkstoffspiegel erzielt werden (12 ng/ml nach 1h; 25 ng/ml nach 4 h). Demgegenüber konnte bei Einsatz der Sirolimus-Cyclodextrinformulierung

in die Permeationskammer zu keinem Zeitpunkt Wirkstoff im Akzeptormedium detektiert werden. In der Trypanblaufärbung war eine Endothelschädigung am Ende der Versuche (nach der letzten Messung nach 240 min) nicht nachweisbar. Permeationsversuche mit Everolimus wurden nicht durchgeführt, da zur Bestimmung von Everolimus nur die HPLC zur Konzentrationsbestimmung zur Verfügung stand und damit für Everolimus kein ausreichend sensitives Analyseverfahren vorlag. Der für Sirolimus eingesetzte Immunoassay (s.o.) ist für Everolimus ungeeignet.

3.4.4. Diskussion

In den in diesem Abschnitt dargestellten Untersuchungen wurde erstmals gezeigt, dass die Herstellung einer topisch am Auge anwendbaren Präparation von Sirolimus und Everolimus möglich ist. Die besondere Problematik der Entwicklung einer Tropfenpräparation dieser Wirkstoffe auf wässriger Basis besteht darin, dass die lipophile Substanz in Wasser praktisch unlöslich ist. In derartigen Situationen sind Cyclodextrine häufig geeignete Komplexbildner, mit denen die okuläre Bioverfügbarkeit einer Reihe von Wirkstoffen erheblich verbessert werden konnte (Siefert 1999, siehe auch Abschnitt 3.2.). Unsere Versuche mit Sirolimus zeigten jedoch, dass die in der Cyclodextrinformulierung erreichbaren Wirkstoffkonzentrationen recht gering waren. In Permeationsversuchen durch die isolierte Schweinekornea ließ sich ebenfalls kein Wirkstoff im Akzeptormedium nachweisen (Ergebnisse nicht einzeln dargestellt). Die wahrscheinlichste Ursache für diesen geringen Nutzen des Einsatzes von Cyclodextrinen liegt in der Molekülgröße von Sirolimus/Everolimus, die erheblich über der von beispielsweise Mycophenolat Mofetil liegt, so dass die Bildung von Einschlusskomplexen nicht in ausreichendem Maß erfolgt. Erheblich höhere Wirkstoffkonzentrationen ließen sich durch Präparation von Sirolimus/Everolimus als Mikroemulsion erreichen. Diese Präparation wird daher von uns bei guter lokaler Verträglichkeit als zur topischen Anwendung bestgeeignetste Formulierung angesehen.

Dennoch kann auch diese für eine topische Anwendung am Auge beste verfügbare Sirolimus-Präparation intraokular bei intakter epithelialisierter Hornhaut keine therapeutischen Wirkstoffspiegel aufbauen. Die erhöhte Penetration bei abradiertem Epithel spricht für eine Speicherung des Wirkstoff im kornealen Epithel, wie für andere lipophile Substanzen gut bekannt ist (z.B. Cyclosporin A; siehe Abschnitt B.2.2.). Die Präparation scheint daher zur

Therapie von Erkrankungen der okulären Oberfläche wie schwerer Keratokonjunktivitis sicca, Keratokonjunktivitis vernalis oder atopischer Keratokonjunktivitis geeignet. Die Wirksamkeit bei diesen Indikationen wird von uns weiter untersucht.

3.5. Einsatz von topischem Sirolimus/Everolimus am Keratoplastikmodell der Ratte

3.5.1. Einführung

Nach Abschluss der Experimente zur Entwicklung einer geeigneten lokal anwendbaren Präparation von Sirolimus/Everolimus wurde die Wirksamkeit dieser Präparationen an einem experimentellen Keratoplastikmodell untersucht. Die Darstellung dieser Untersuchungen erfolgt im folgenden Abschnitt.

3.5.2. Material und Methoden

Die Durchführung der Versuche zur Wirksamkeit der topischen Applikation von Sirolimus und Everolimus-Mikroemulsion erfolgte analog zu den Versuchen zur Anwendung von topischem MMF am Keratoplastikmodell der Ratte. Die Durchführung der experimentellen Keratoplastiken und die Tropfenapplikation wurde von Frau Dr. Lie im Labor der Augenklinik Charité Campus Virchow-Klinikum übernommen.

Tiere:

Für alle Versuche wurden weibliche Inzucht-Ratten (Charles River Kiblegg) von 200 – 250 g Körpergewicht verwendet. Lewis (RT1A) Ratten dienten als Empfänger. Die Transplantate wurden von DA (RT1.A^{av1}) Tieren gewonnen. Diese Stämme unterscheiden sich auf dem gesamten MHC-Genort (Gill 1987). Die Tiere wurden in Drahtboden-Käfigen unter kontrollierten regelmäßigen Hell/Dunkel Zyklen gehalten. Sie wurden mit einer Standard-Labornahrung gefüttert und hatten freien Trinkwasserzugang. Bei jedem Tier wurde nur ein Auge hornhauttransplantiert, so daß kein Tier durch die Versuche erblindete. Die Tiere wurden entsprechend den Richtlinien des „National Institute of Health“ „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ behandelt. Insgesamt wurden 20 Tiere eingesetzt.

Tiermodell:

Orthotope Hornhauttransplantationen wurden in Modifikation einer bereits publizierten Vorgehensweise durchgeführt (Pleyer 1996). Die Spendertiere wurden mit einer Überdosis Pentobarbital (Narcoren®, Rhone Merieux, Laupheim) anästhesiert und getötet. Vor der Transplantation wurden die Empfängeraugen mit in 10 minütigem Abstand getropftem Atropinsulfat 1% Augentropfen weitgestellt (CibaVision, Wefling). Die Pupillendilatation erfolgte zur Vermeidung von chirurgisch bedingten Irisbeschädigungen und Ausbildung von vorderen Synechien bei flacher Vorderkammer. Durch subkonjunktivale Injektion von 0,05

ml einer Lösung aus Atropin 1 mg /ml und Suprarenin 1 : 1000 wurde die maximale Mydriasis während der chirurgischen Intervention aufrechterhalten.

Chirurgisches Vorgehen:

Die Spenderhornhaut wurde am getöteten Spendertier mittels eines 3,5 mm Trepanns trepaniert und mit gebogenen Castroviejo Scheren unter sterilen Bedingungen ausgeschnitten. Dabei wurde ein Operationsmikroskop eingesetzt. Die Spenderhornhaut wurde dann auf einen sterilen Tropfen Methylcellulose (1%) gesetzt. Die Anästhesie der Empfängertiere erfolgte durch Injektion von Narcoren (2,5 – 5,0 mg /kg). Die Empfängerhornhaut wurde mittels eines 3,0 mm Trepanns trepaniert. Bei Eröffnung der Vorderkammer wurde ein Viskoelastikum in die Vorderkammer injiziert (Healon®, AMO, Erlangen), um die Vorderkammertiefe aufrechtzuerhalten und Iris- und Linsenbeschädigung zu vermeiden. Nach Entnahme der Empfängerhornhaut wurde die Spenderhornhaut aufgesetzt und mittels Nylon 10-0 Fäden (6 – 8 Einzelknopfnähte) eingenäht. Dadurch wurde eine optimale Adaptation der Wundränder erreicht. Schließlich wurde die Vorderkammer mit physiologischer NaCl-Lösung tonisiert. Am Ende der Operation wurde antibiotische Augensalbe (Floxal®, Dr. MannPharma, Berlin) appliziert.

Sirolimus- und Everolimus-Präparation:

Die Sirolimus und Everolimus Mikroemulsionen wurden, wie im vorausgegangenen Abschnitt beschrieben, hergestellt. Dabei wurde eine 0,1 %ige Sirolimus-Mikroemulsion und eine 0,05 %ige Everolimus-Mikroemulsion eingesetzt. Als Kontrolle der Formulierung wurde eine Mikroemulsion in gleicher Zusammensetzung ohne Wirkstoff verwendet.

Behandlungsprotokoll:

Die Tiere wurden in 3 Gruppen geteilt (2 x 8 Tiere und 1x 4 Tiere pro Gruppe), 1. Sirolimus-(0,1%)-Behandlungsgruppe (8 Tiere), 2. mit Vehikel (ohne Wirkstoff) behandelte Gruppe (8 Tiere), 3. Everolimus-(0,05%)-Behandlungsgruppe (4 Tiere). Die Tropfenapplikation erfolgte in jeder Gruppe 5-mal täglich.

Transplantatbeurteilung:

Die Transplantate wurden unter dem Operationsmikroskop dreimal in der ersten Woche postoperativ beurteilt, danach täglich. Die Methodik der Beurteilung wurde entsprechend einer früheren Publikation durchgeführt (Pleyer 1995). Die Transplantate wurden im Hinblick auf Transparenz und Ausbildung eines Ödems auf einer Skala von 0 bis 4 (fehlend, leicht, mittel, schwer) eingestuft. Dabei wurde die Transparenz folgendermaßen beurteilt: klares

Transplantat 0; leichter Haze 1; erhöhter Haze, Irisstrukturen gut erkennbar 2; erhöhter Haze, Irisstrukturen schlecht erkennbar 3; Transplantat trüb, keine Vorderabschnittsstrukturen mehr sichtbar 4. Das Ödem wurde so eingestuft: kein Ödem 0; leichte stromale Quellung 1; diffuses stromales Ödem 2; diffuses stromales und epitheliales Ödem 3; bullöse Keratopathie 4. Auf der Basis dieser beiden Werte wurde täglich ein „Abstoßungswert“ von 0 bis 4 bestimmt. Entsprechend diesem Wert der Einstufung mittel oder schwer (also 3 oder 4), wurden die Transplantate als abgestoßen eingestuft. Komplikationen wie Infektionen, Vorderkammerverlust oder Katarakt wurden ebenfalls erfasst. Wenn eine Komplikation auftrat, wurden die Tiere von der weiteren Beurteilung ausgeschlossen und für die Auswertung als „verloren“ eingestuft.

Statistische Auswertung:

Die Transplantatüberlebensraten wurden mittels einer Mantel-Haenszel Überlebens-Analyse verglichen.

3.5.3. Ergebnisse

Die Therapie wurde von allen Tieren gut vertragen. Die Ergebnisse im Hinblick auf das Transplantatüberleben sind in der folgenden Abbildung 29 dargestellt. Die Überlebenszeiten der Sirolimus behandelten Hornhäute unterscheiden sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe. 50 % der Everolimus behandelten Transplantate waren über 20 Tage nach der Transplantation noch klar und überlebten damit fast doppelt so lang wie die mittlere Überlebenszeit der Vehikel-behandelten Tiere (11Tage). Damit zeigte sich in der Everolimus Gruppe ein Trend zu einem verlängerten durchschnittlichen Transplantatüberleben. Die Induktion einer Toleranz war aber auch in der Everolimusgruppe nicht erkennbar, d.h. alle Transplantate wurden innerhalb der Beobachtungszeit (25 Tage) abgestoßen.

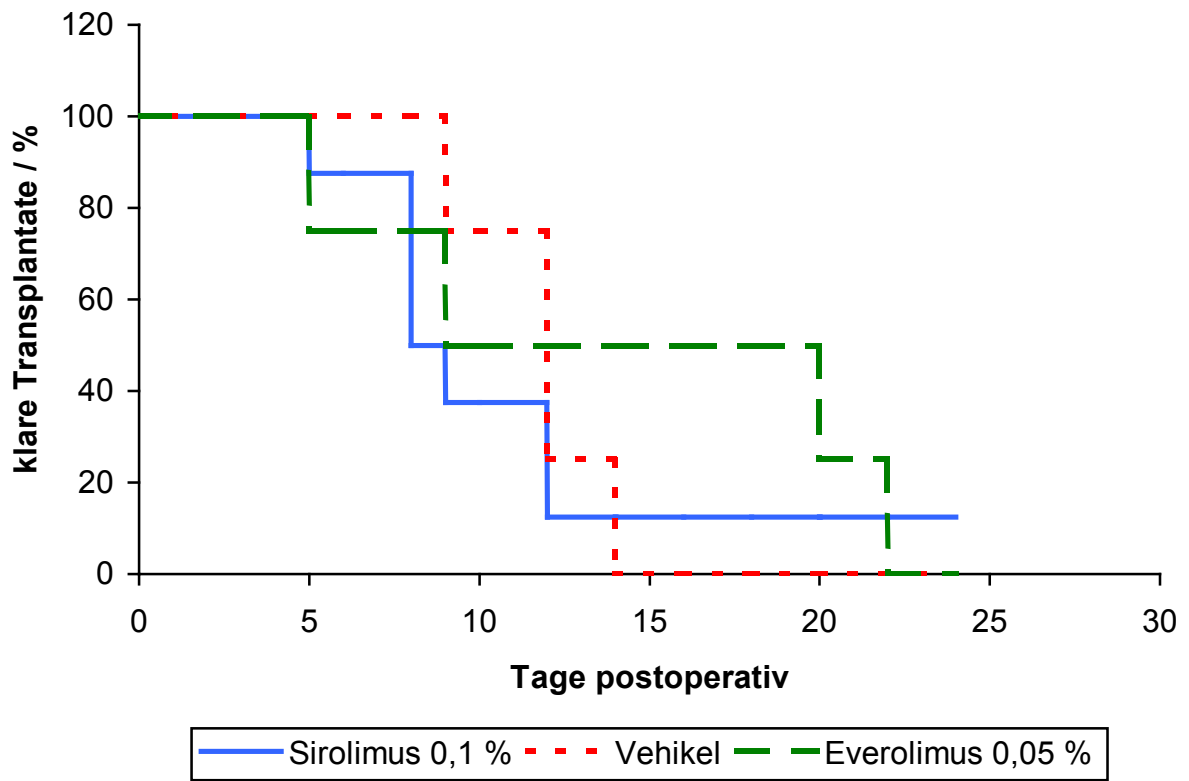


Abbildung 29: Überlebenskurven von orthotopen topisch mit Sirolimus und Everolimus behandelten Hornhauttransplantaten der Ratte (n = 20 Tiere)

3.5.4. Diskussion

Wir untersuchten je eine in vorausgegangenen Versuchen entwickelte topische Sirolimus- und Everolimus-Präparation (Sirolimus/Everolimus-Mikroemulsion) auf ihre Wirksamkeit zur Prophylaxe der Abstoßungsreaktion an einem etablierten Rattenmodell. Dabei konnten wir zeigen, dass topisches Sirolimus als alleiniges Therapeutikum für diese Indikation unwirksam ist. Everolimus zeigte in diesen Versuche einen Trend zu einem verlängerten Transplantatüberleben. Dies steht im Gegensatz zur Wirksamkeit dieser Substanzen bei systemischer Applikation. Die Effektivität von systemischem Sirolimus und von Everolimus für diese Indikation war in früheren Untersuchungen an mehreren Rattenmodellen (Olson 1994, Thompson 1998, Reis 2002) gezeigt worden.

Diese Abhängigkeit der Wirksamkeit von der Applikationsform kann auf verschiedenen Faktoren beruhen. Aus pharmakodynamischer Sicht ist festzuhalten, dass Sirolimus auf die Phase der Lymphozytenaktivierung hemmend wirkt, in dem die intrazelluläre Signalübertragung vom IL-2-Rezeptor in den T-Zellen inhibiert wird. Bis heute ist jedoch nicht letztendlich geklärt, ob diese bereits im Transplantat selbst erfolgt, oder erst in den regionalen Lymphknoten stattfindet. Diese werden aber möglicherweise von dem topisch angewandten Wirkstoff nicht -ausreichend- erreicht. Inwieweit lokal applizierte immunmodulatorische Substanzen in den regionalen Lymphknoten nachweisbar werden, ist bisher nicht untersucht worden. Dieses sollte nach den Ergebnissen unserer hier dargestellten Versuche aber Ziel einer zukünftigen Versuchsreihe sein. Nach den Ergebnissen der im vorausgegangenen Kapitel ausgeführten Versuche zur Bioverfügbarkeit der lokal applizierten Sirolimus-Formulierung kommt auch die unzureichende Penetration als Ursache für die Unwirksamkeit von Sirolimus im Keratoplastik-Rattenmodell in Frage. Ob eine hohe Wirkstoffkonzentration eines Immunmodulators im Kammerwasser (oder in der Aderhaut, im Kammerwinkel) für die Inhibierung einer Abstoßungsreaktion erforderlich ist, ist jedoch ebenfalls bis heute nicht geklärt. Lokale toxische Effekte sowohl des Wirkstoffs als auch des Vehikels sind nach unserer Ansicht unwahrscheinlich, da sich die Überlebenskurven der mit Vehikel allein behandelten Transplantate nicht signifikant von den Wirkstoff behandelten und nicht von den unbehandelten Kontrollen unterschieden.

Dennoch ist als Resultat dieser Experimente festzuhalten, dass die Sirolimus/Everolimus-Mikroemulsion gut verträglich ist. Der Nutzen der Formulierung als Kombinationstherapie (beispielsweise mit topischem CsA) zur Prophylaxe der Abstoßungsreaktion nach Keratoplastik oder auch allein zur Therapie anderer immunmediierter Erkrankungen der

okulären Oberfläche (atopische Keratokonjunktivitis, rheumatisches korneales Ulkus, schwere Keratokonjunktivitis sicca) bleibt ein interessanter Therapieansatz und wird von uns weiter untersucht.

4. Zusammenfassung Teil B

Die topische Applikation von Immunsuppressiva ist aus verschiedenen Gründen ein wünschenswerter therapeutischer Ansatz nicht nur zur Prophylaxe der Immunreaktion nach Keratoplastik, sondern auch zur Therapie weiterer immunmediierter Erkrankungen der okulären Oberfläche und des vorderen Augenabschnitts. Dabei steht sowohl die Suche nach Alternativen zur systemischen Anwendung der Immunsuppressiva als auch die Bereitstellung von alternativen therapeutischen Ansätzen zur lokalen Steroidmedikation aufgrund der Nebenwirkungsprofile im Vordergrund.

Lokale Präparationen von Cyclosporin A wurden bereits zahlreich untersucht, ein kommerziell vertriebenes lokales CsA Präparat ist verfügbar (Restasis®). Auch zur lokalen Anwendung von Tacrolimus gibt es erste klinische Ergebnisse. Lokal applizierbare Formulierungen von Mycophenolat Mofetil und Sirolimusd/Everolimus wurden in den in dieser Arbeit dargestellten Versuchen erstmalig untersucht. Für MMF ist dabei eine Cyclodextrinformulierung die geeignetste Präparation, während Sirolimus / Everolimus am günstigsten in einer Mikroemulsion lokal angewendet werden. Mit topisch appliziertem MMF lassen sich hohe Konzentrationen des eigentlichen Wirkstoffs Mycophenolsäure (MPA) im Kammerwasser erzielen, dagegen penetriert Sirolimus die Hornhaut nur bei abradierem Epithel. Da MMF und MPA über verschiedene Penetrationswege nach intraokular gelangen (MPA transkorneal, MMF parakorneal), lassen sich die Anteile der beiden Penetrationswege näherungsweise durch den Vergleich von MMF und MPA intraokular und intrakorneal bestimmen.

Bei der experimentellen Keratoplastik sind topisch appliziertes MMF und Sirolimus im Hinblick auf eine Verlängerung des Transplantatüberlebens unwirksam. Everolimus zeigt eine eingeschränkte Wirksamkeit. Die lokale Verträglichkeit von MMF-Cyclodextrin-Komplex-Formulierung ist im Kaninchenmodell gut. Die Wirksamkeit einer Kombination zweier lokaler Immunsuppressiva zur Prophylaxe der Immunreaktion nach Keratoplastik (CSA + MMF oder Everolimus + MMF) sollte in zukünftigen Untersuchungen analysiert werden. Darüber hinaus sind MMF-Cyclodextrinformulierung und Everolimus-Mikroemulsion vielversprechende lokale Präparationen dieser neuen Immunsuppressiva auch für andere Indikationen. Die Wirksamkeit dieser Präparate bei Erkrankungen der okulären Oberfläche wie z.B. dem immunologischen Hornhautulcus oder der atopischen Keratokonjunktivitis sollte weiter untersucht werden.