

## 4 Zusammenfassung

### 4.1 Zusammenfassung (deutsch)

Gegenstand dieser Arbeit war es, das transdermale Permeationsverhalten des 8 $\alpha$ -Aminoergolinderivates Protergurid auf Basis von Transdermalsystemen zu untersuchen und mittels passiver Methoden der Permeationssteigerung die transdermalen Wirkstoffflüsse zu optimieren. Als Modellmembran wurde die exzidierte Haut der haarlosen Maus verwendet. Neben den pflasterspezifischen Eigenschaften wie dem transdermalen Arzneistofffluss wurden auch arzneistoffspezifische, rezeptorvermittelte Wirkungen, welche für einen transdermal applizierten Arzneistoff von ausgeprägter Bedeutung sind, untersucht. So kann der Arzneistoff durch Interaktion mit vaskulären  $\alpha$ -Adrenozeptoren die dermale Durchblutung und somit seine eigene Bioverfügbarkeit oder aber durch Wechselwirkung mit dem Histamin H<sub>1</sub>-Rezeptor die lokale Verträglichkeit des Transdermalsystems beeinflussen. Auch der 5-HT<sub>2B</sub>-Rezeptor, welcher höchstwahrscheinlich in die Pathogenese kardialer Valvulopathien unter der Therapie mit bestimmten Ergolinderivaten involviert ist, war als weitere Zielstruktur von übergeordnetem Interesse.

In einem ersten Schritt wurde das „drug in adhesive“-Matrixdesign für transdermale Arzneiformen näher untersucht. In einer vergleichenden Studie zur Eignung unterschiedlicher Hauthaftkleber wurden Transdermalsysteme mit einer einheitlichen Wirkstoffbeladung hergestellt und anhand der Parameter transdermalen Fluss von Protergurid, Wirkstoffrekristallisation während Lagerung sowie Hautadhäsion und Hautverträglichkeit in vivo der korrespondierenden Placebopflaster bewertet. Die Gruppe der Acrylat-basierten Polymere gewährleisteten im Gegensatz zu den lipophilen Silikon- und Polyisobutylenklebern eine gute Stabilität der Pflaster, wobei insbesondere der Gelva<sup>®</sup> 7883 Hauthaftkleber (Solutia) ein ausgewogenes Verhältnis zwischen den Evaluierungsparametern aufwies und somit als Basis für eine konsequente Optimierung der Formulierung ausgewählt wurde. Es konnte in weiteren Experimenten gezeigt werden, dass der transdermale Fluss von Protergurid direkt mit der Konzentration in den Acrylatmatrizes verknüpft war, wobei nach Erreichen der Sättigungskonzentration der steady state Fluss des Wirkstoffs ein Maximum erreichte. Dies wurde dadurch begründet, dass ungelöster Arzneistoff nicht zur Diffusion befähigt ist, nicht zu der thermodynamischen Aktivität als treibende Kraft des Permeationsvorganges beiträgt

und Proterguridkristalle polarisationsmikroskopisch in hochbeladenen Formulierungen bereits nach kurzer Lagerperiode identifiziert werden konnten. Die optimale Proterguridkonzentration in der Gelva<sup>®</sup>-Matrix, welche einen 10%igen Zusatz an PVP zur Hemmung der Rekrystallisation enthielt, betrug demnach etwa 4% und lieferte einen steady state Fluss von 0,53 (0,06)  $\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$  durch die exzidierte Haut der haarlosen Maus.

In einem weiteren Optimierungsschritt wurden chemische Permeationsverstärker in die Basisformulierung integriert, um den transdermalen Fluss von Protergurid im steady state zu erhöhen. Aus der Gruppe der N-Alkylpyrrolidone bewirkte insbesondere N-Dodecylpyrrolidon eine signifikante Flussteigerung, wenn bereits in einer geringen Konzentration von 5% verwendet. N-Octylpyrrolidon ermöglichte zwar ebenfalls eine signifikante Steigerung, jedoch waren die erzielten Flüsse ähnlich denen der mit 5% N-Methylpyrrolidon formulierten Matrixpflaster. Aus diesen Ergebnissen ergab sich der Ansatz, weitere chemische Permeationsverstärker mit einer polaren Kopfgruppe und einem C<sub>12</sub>-Alkylrest zu untersuchen.

Während Laurinsäure, Tween<sup>®</sup> 20 und Azone<sup>®</sup>, welches, wie im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt, erst in höheren Konzentrationen > 10% signifikante Flussteigerungen hervorrief, bei einer Einarbeitung von 5% keine Vorteile gegenüber der Basisformulierung ermöglichten, waren Span<sup>®</sup> 20 und Dodecanol effektiv. Dennoch konnte N-Dodecylpyrrolidon als wirksamster Permeationsverstärker für Protergurid bewertet werden. Der erzielte steady state Fluss von Protergurid betrug 0,89 (0,15)  $\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ , wenn die Pflaster mit 5% N-Dodecylpyrrolidon formuliert wurden.

Das nach dem EpiDerm<sup>®</sup>-Hautirritationsmodell der Firma MatTek als moderat irritierend eingestufte N-Dodecylpyrrolidon ermöglichte des weiteren eine lineare Flussteigerung des Wirkstoffs in Abhängigkeit von der Konzentration des Permeationsverstärkers im Vehikel über den Konzentrationsbereich 0 - 20%. Der maximale steady state Fluss von Protergurid bei 20% N-Dodecylpyrrolidon konnte zu 1,43 (0,27)  $\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$  bestimmt werden und war demnach nahezu dreimal höher als bei der permeationsverstärkerfreien Kontrolle und etwa halbmaximal bezogen auf den Arzneistofffluss der permeationsverstärkerfreien Kontrolle durch Haut ohne Stratum corneum (3,33 (0,79)  $\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ ).

Eine Anwendung der Reservoirtechnologie ergab, dass die mikroporöse Polyethylenmembran Solupor<sup>®</sup> 10P05A (DSM) in Verbindung mit einer Silikonadhesivschicht (Bio-PSA<sup>®</sup> 7-4202;

Dow Corning) und einer 1%igen Lösung von Protergurid in 2-Propanol mit 2% Klucel<sup>®</sup> LF für den Arzneistoff signifikant besser permeabel war als die Ethylvinylacetatmembranen CoTran<sup>®</sup> 9705 und CoTran<sup>®</sup> 9715 (3M), bei welchen eine Erhöhung des Vinylacetats den transmembranären Fluss steigerte. Durch Variierung des Lösungsmittels konnte die Wirkstofffreisetzung durch die Solupor<sup>®</sup>-Membran manipuliert werden, jedoch zeigte sich 2-Propanol mit 2% Klucel<sup>®</sup> LF im Permeationsexperiment als am besten geeignetes Lösungsmittel für das Arzneistoffreservoir. Durch eine Erhöhung der Proterguridkonzentration auf 10% im Solupor<sup>®</sup>-System wurden transdermale Flüsse von bis zu 3,73 (1,37)  $\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$  erzielt und konnten durch Einarbeitung von 10% N-Dodecylpyrrolidon auf 4,11 (0,58)  $\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$  gesteigert werden.

In den pharmakologischen Untersuchungen konnte Protergurid als Antagonist am Histamin H<sub>1</sub>-Rezeptor sowie an den  $\alpha_{1A/1B/1D}$ -Adrenozeptoren, zwischen denen das Ergolin nicht zu diskriminieren vermochte, identifiziert werden. Eine damit einhergehende Unterdrückung entzündlicher, durch Histamin hervorgerufener Reaktionen und Blockierung der adrenerg vermittelten Vasokonstriktion von Hautgefäßen, was eine erhöhte transdermale Bioverfügbarkeit des Arzneistoffes erwarten ließe, machen Protergurid zu einem vielversprechenden Dopaminagonisten für die transdermale Applikation. Der durch die  $\alpha_1$ -adrenolytischen Eigenschaften induzierte Effekt auf die Durchblutung des dermalen Gewebes könnte jedoch durch den ebenfalls beobachteten partiellen Agonismus von Protergurid am 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptor antagonisiert werden. Am relaxierenden 5-HT<sub>2B</sub>-Rezeptor, welcher höchstwahrscheinlich in die Vermittlung kardialer Valvulopathien involviert ist, konnte Protergurid ebenfalls als partieller Agonist charakterisiert werden. Aufgrund der starken dopaminergen Wirkkomponente dieser Substanz liegen therapeutische Plasmakonzentrationen (< 50 pg/mL) jedoch um einen Faktor von etwa 550 unter denen, welche notwendig sind, um diesen 5-HT-Subrezeptor zu stimulieren. Dennoch wäre bei einer klinischen Evaluierung eine genaue echo-kardiographische Untersuchung der Herzklappen indiziert.

Stabile therapeutische Plasmakonzentrationen von Protergurid könnten bereits mittels 20 cm<sup>2</sup> großer Matrix-Transdermalsysteme oder 3 cm<sup>2</sup> großer Reservoirpflaster (aktive Pflastergrößen) ohne Anwendung chemischer Permeationsverstärker beim Menschen in vivo realisiert werden, sofern die geringere Permeabilität von Humanhaut gegenüber der Haut der haarlosen Maus mit einem Faktor von 10 kalkuliert wird. Demnach erscheint die Entwicklung einer attraktiv-kleinen, transdermalen Darreichungsform für Protergurid vielversprechend.

Die so erzielbaren nahezu konstanten Plasmakonzentrationen haben bei der medikamentösen Therapie des Morbus Parkinson den therapeutischen Vorteil, Dyskinesien und „off“-Phasen, wie sie unter oraler Langzeittherapie mit kurzwirksamen Dopaminagonisten, insbesondere Levodopa, beschrieben wurden, hinauszuzögern oder gar zu vermeiden.

## 4.2 Summary (englisch)

The aim of this thesis was to investigate the transdermal permeation characteristics of the highly potent dopamine receptor agonist proterguride, an  $8\alpha$ -aminoergoline, using transdermal drug delivery systems (TDDS). In addition, passive strategies to promote the transdermal flux of the compound across hairless mouse skin serving as a model membrane were tested. Beside patch-specific characteristics, the action of the active pharmaceutical ingredient at different functional receptors was of exceptional interest, especially at those regulating dermal blood perfusion, e.g.  $\alpha$ -adrenoceptors, and thus exercising influence on transdermal bioavailability. Furthermore, the action of proterguride at histamine  $H_1$  receptors mediating urticarial reactions was of major significance. The  $5-HT_{2B}$  receptor was also considered as a target, since it is most likely involved in the pathogenesis of drug-induced cardiac valvulopathies, as recently described for treatment with different ergoline-derived compounds.

First, the drug-in-adhesive matrix patch design was used to identify suitable pressure-sensitive adhesives (PSA) for a TDDS containing proterguride by evaluating patches in respect to transdermal drug flux, crystallization during storage, and skin adhesion and skin irritation in vivo of corresponding placebo patches. The group of the acrylates provided good stability with the Gelva<sup>®</sup> 7883 polymer (Solutia) being most suitable as a basis for further development, due to its balanced influence on transdermal drug flux, stability, skin adhesion and local tolerability. Gelva<sup>®</sup> 7883 was thus chosen as polymer for further optimization of drug-in-adhesive matrix patches. By contrast, the lipophilic PSAs, silicone, and polyisobutylene facilitated drug crystallization already within short storage periods of 30 days. The next step was to determine the optimum drug load of the Gelva<sup>®</sup> 7883 matrix containing an additional 10% polyvinylpyrrolidone acting as crystallization inhibitor. With increasing drug load, the steady state flux of the compound increased in a linear way and levelled off at a concentration of approx. 4%. In higher loaded patches, drug crystals have

been detected by polarized microscopy and thus have to be considered as the reason for no further increases of steady state flux values above this concentration. This can be explained by the theory of diffusion, which suggests that only dissolved drug molecules contribute to thermodynamic activity as the driving force in the permeation process. The steady state flux of proterguride through hairless mouse skin in vitro amounted to 0.53 (0.06)  $\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$  if 4% of the drug was dissolved in the Gelva<sup>®</sup> 7883-based matrix.

A further attempt to promote the transdermal drug flux consisted of the incorporation of chemical permeation enhancers (CPE). Of the N-alkylpyrrolidones group, N-dodecylpyrrolidone significantly raised steady state flux of proterguride when used at a concentration of 5%. N-octylpyrrolidone (5%) also significantly increased the transdermal flux of the compound, but was somewhat less effective than N-dodecylpyrrolidone. However, flux values obtained using N-octylpyrrolidone were similar to those achieved with 5% N-methylpyrrolidone. Thus, other CPEs bearing a twelve-membered carbon chain and a polar headgroup were investigated and evaluated in the skin permeation assay.

Lauric acid, Tween<sup>®</sup> 20, and Azone<sup>®</sup> failed to deliver high quantities of proterguride across hairless mouse skin. In the case of Azone<sup>®</sup>, significantly increased steady state flux values were only achieved at concentrations above 10%. By contrast, Span<sup>®</sup> 20 and dodecanol were nearly as effective as N-dodecylpyrrolidone, which permitted a steady state flux of proterguride of 0.89 (0.15)  $\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$  when used at the 5% level.

Furthermore, N-dodecylpyrrolidone, which showed moderate skin irritation potential in the EpiDerm<sup>®</sup> assay (MatTek), linearly increased steady state flux of the drug resulting from the concentration of the CPE within the range of 0 to 20%. At the highest concentration of 20%, the transdermal flux of proterguride in the steady state amounted to 1.43 (0.27)  $\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$  and thus was three times higher than the CPE-free control. The flux amounted to 43% of the maximum flux that could have been achieved by applying the control to tape-stripped hairless mouse skin (3.33 (0.79)  $\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ ).

The reservoir technology indicated that microporous Solupor<sup>®</sup> 10P05A-membrane (DSM) combined with a silicone adhesive layer (Bio-PSA<sup>®</sup> 7-4202; Dow Corning) was more permeable to proterguride dissolved in 2-propanol containing an additional 2% Klucel<sup>®</sup> LF than ethylene vinylacetate membranes (CoTran<sup>®</sup> 9705 / 9715; 3M), where permeability is governed by the amount of vinylacetate. The choice of the solvent influenced drug release

through Solupor<sup>®</sup>-membrane; however, 2-propanol + 2% Klucel<sup>®</sup> LF seemed to be the first choice for transdermal delivery of proterguride through hairless mouse skin from Solupor<sup>®</sup>-based reservoir patches. Increasing the concentration of proterguride to 10% in these patches resulted in increased steady state flux values for up to 3.73 (1.37)  $\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ , whereas the addition of 10% of N-dodecylpyrrolidone to this formulation raised steady state flux of proterguride to 4.11 (0.58)  $\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ .

The second part of this thesis deals with the pharmacological action of proterguride at different non-dopaminergic monoamine receptors. The data show that proterguride can be classified as an antagonist at histamine  $\text{H}_1$ -receptors as well as at  $\alpha_{1A/1B/1D}$ -adrenoceptors. However, there appeared to be no subtype selectivity. In vivo, according to these results, proterguride will suppress itching and erythema mediated by histamine  $\text{H}_1$ -receptors, as well as  $\alpha_1$ -adrenoceptor mediated vasoconstriction of cutaneous blood vessels. This can be expected to increase the transdermal bioavailability of the drug. However, at  $5\text{-HT}_{2A}$  receptors that are also involved in vasoconstriction of cutaneous blood vessels, proterguride acted as a partial agonist. Conceivably, this may antagonize the  $\alpha_1$ -adrenolytic effects of the compound. Furthermore, as recently published data suggests, agonism at serotonergic  $5\text{-HT}_{2B}$  receptors might play an important role in drug-induced cardiac valvulopathies and pulmonary hypertension. At relaxant  $5\text{-HT}_{2B}$  receptors of pig pulmonary arteries, proterguride also behaved as a partial agonist, but such high plasma concentrations will not be achieved in humans when used for dopaminergic therapy. However, clinical trials should include close monitoring for cardiac valvular abnormalities to rule out the possibility that the partial agonism of proterguride at the  $5\text{-HT}_{2B}$  receptor is clinically relevant.

Based on this data, therapeutic doses might be delivered to humans in vivo by a 20  $\text{cm}^2$  sized drug-in-adhesive matrix patch or, alternatively, by an extremely small 3  $\text{cm}^2$  (active area) sized reservoir patch, even when formulated without CPEs. This takes into account the high affinity of proterguride to dopamine receptors and the assumption that human skin is 10 times less permeable than hairless mouse skin. The pharmaceutical and pharmacological results highlight the suitability of proterguride for the development of an attractively-sized TDDS in order to achieve constant plasma concentrations. Especially in the therapy of Parkinson's disease, continuous dopaminergic stimulation is expected to prevent or at least to postpone major therapeutic complications including motor fluctuations ("on-off"-phenomena) and dyskinesias related to pulsatile stimulation of dopaminergic receptors.