

**Entwicklung von Arzneiformen zur dermalen und ophthalmologischen
Applikation schwerlöslicher Immunsuppressiva**

Dissertation

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

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

Guido Büch

im Februar 2007

1. Gutachter: Univ. Prof. Dr. H.-H. Borchert

2. Gutachter: Univ. Prof. Dr. R.-H. Müller

Disputation am: 15. Mai 2007

Das Fehlen einer besonderen Kennzeichnung oder eines entsprechenden Hinweises auf ein Warenzeichen, ein Gebrauchsmuster oder einen Patentschutz lässt nicht den Schluss zu, dass über die in dieser Arbeit angegebenen Dinge frei verfügt werden kann.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG.....	8
2	ANATOMIE UND PHYSIOLOGIE DER HAUT UND DES AUGES	11
2.1	Funktion und Aufbau der Haut	11
2.1.1	Struktur und Funktion des Stratum corneum.....	13
2.1.2	Transport von Arzneistoffen durch das Stratum corneum.....	17
2.2	Funktion und Aufbau des Auges.....	19
2.2.1	Struktur der Cornea und Transport von Arzneistoffen	22
3	PHARMAKOLOGIE UND EIGENSCHAFTEN DER IMMUNSUPPRESSIVA	26
3.1	Calcineurininhibitoren (CNI).....	28
3.1.1	Gemeinsamer Wirkmechanismus	28
3.1.2	Ciclosporin	29
3.1.3	Tacrolimus (FK 506).....	36
3.1.4	Pimecrolimus (SDZ ASM 981).....	37
3.1.5	Wirksamkeit und Sicherheit von dermal appliziertem Tacrolimus und Pimecrolimus	38
3.2	mTOR Inhibitoren	41
3.2.1	Gemeinsamer Wirkungsmechanismus	41
3.2.2	Sirolimus (Rapamycin).....	43
3.2.3	Everolimus (SDZ RAD, RAD 001).....	46
3.3	Hemmung der Nukleotidbiosynthese.....	47
3.3.1	Hemmstoffe der Purinbiosynthese	48
3.3.1.1	Mycophenolsäure	48
3.3.1.2	Mycophenolat Mofetil (MMF).....	49
3.3.2	Hemmstoffe der Pyrimidinbiosynthese.....	51
3.3.2.1	Leflunomid und FK 778.....	51
3.4	Agonisten von Sphingosin-1-Phosphat Rezeptoren.....	52
3.4.1	Einleitung	52
3.4.2	Fingolimod (FTY 720).....	53
4	SOLUBILISIERUNG SCHWERLÖSLICHER ARZNEISTOFFE	55
4.1	Lipidvesikel und Liposomen.....	55
4.1.1	Lipidvesikel zur parenteralen Applikation	57
4.1.2	Lipidvesikel zur dermalen Applikation	60
4.1.2.1	Wirkungsmechanismen dermal applizierter Lipidvesikel	64
4.1.2.2	Einfluss der Eigenschaften vesikulärer Formulierungen auf den dermalen Wirkstofftransport	66
4.1.3	Lipidvesikel zur ophthalmologischen Applikation.....	71
4.2	Löslichkeitsverbessernde Arzneiformen zur ophthalmologischen Applikation	73
4.2.1	Cyclodextrinkomplexe	73
4.2.2	Hydrotrope Mischungen mit Kosolventien	75
4.2.3	Poloxamergele.....	76
4.2.4	Mikroemulsionen	78

5	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	83
5.1	Quantifizierung der Immunsuppressiva mit HPLC-UV	83
5.2	Herstellung der Lipidvesikel zur dermalen Applikation von CsA und MMF	92
5.2.1	Entwicklung der Lipidvesikelrezepturen	93
5.2.1.1	Wahl der Herstellungsmethode	93
5.2.1.2	Entwicklung der Ceramidvesikel	94
5.2.1.3	Verbesserung der hydrophilen Phase	100
5.2.1.4	Entwicklung der Diacylglyceridvesikel	101
5.2.1.5	Entwicklung der Phospholipidvesikel	104
5.2.2	Löslichkeit für CsA und MMF	106
5.2.3	Teilchengrößen und Polydispersitätsindices	111
5.2.4	Zetapotenziale	113
5.2.5	Stabilität	115
5.3	Physikochemische Charakterisierung der Vesikel aus Ceramiden und Diacylglyceriden	117
5.3.1	Kryoelektronenmikroskopie	118
5.3.2	Lichtmikroskopie	120
5.3.3	Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)	121
5.3.4	Protonenresonanzspektroskopie (¹ H NMR)	128
5.3.4.1	¹ H NMR Spektren der DAG Vesikel	134
5.3.4.2	¹ H NMR Spektren der CER Vesikel	136
5.4	Messung der Mikroviskosität in Vesikelmembranen mit der ESR-Spektroskopie	142
5.4.1	Berechnung der Rotationskorrelationszeiten τ_c und Erstellung einer Kalibrierfunktion	146
5.4.2	Mikroviskositäten in den Vesikelmembranen	150
5.5	Freisetzung von CsA und MMF aus den Lipidvesikeln	153
5.6	Herstellung von Augentropfen mit Sirolimus und Everolimus	157
5.6.1	Cyclodextrinlösungen	159
5.6.2	Liposomen	162
5.6.3	Hydrotrope Mischungen (HM) unter Zusatz von Kosolventien	163
5.6.4	Poloxamergele	164
5.6.5	Mikroemulsion	167
5.7	Permeationsversuche mit Sirolimus gelöst in der Mikroemulsion	170
5.8	Topische Applikation von Sirolimus und Everolimus nach penetrierender Keratoplastik	172
5.9	Bewertung der Ergebnisse mit Sirolimus und Everolimus	174
6	ZUSAMMENFASSUNG/ SUMMARY	177
7	MATERIALIEN	184
7.1	Lipide mit einer Kohlenstoffkette: Brij 58	184
7.2	Lipide mit zwei Kohlenstoffketten	184
7.2.1	Phospholipide	184
7.2.2	Ceramide	185
7.2.3	Partialglyceride	186

7.3	Weitere Lipide und Tenside	187
7.3.1	Cholesterol	187
7.3.2	Phytosphingosin	187
7.3.3	Polysorbat 80	187
7.3.4	DPME	188
7.3.5	Triacetin	188
7.3.6	Propylenglycol	188
7.3.7	Poloxamere	189
7.4	Cyclodextrine	190
7.5	Herkunft weiterer Materialien	190
8	METHODEN	192
8.1	Wirkstoffanalytik	192
8.1.1	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)	192
8.1.2	Konzentrationen von CsA und MMF in den Lipidvesikeln	194
8.1.3	Konzentrationen von Sirolimus und Everolimus in den Augentropfen und Löslichkeit von Sirolimus in augenverträglichen Lipiden	194
8.1.4	Immunoassay für Sirolimus (IMX [®] -System)	195
8.2	Herstellung der Lipidvesikel zur Anwendung auf der Haut	197
8.3	Charakterisierung der Lipidvesikel	199
8.3.1	Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)	199
8.3.2	Zetapotenzial	200
8.3.3	Kryoelektronenmikroskopie	201
8.3.4	Lichtmikroskopie	202
8.3.5	Dynamische Differenzkalorimetrie	202
8.3.6	Protonenresonanzspektroskopie (¹ H NMR)	203
8.3.7	Elektronen Spin Resonanz (ESR) Spektroskopie	204
8.3.7.1	Messprinzip	205
8.3.7.2	Bestimmung der Rotationskorrelationszeiten	207
8.3.8	Freisetzungstests	208
8.4	Herstellung der Arzneiformen zur Anwendung am Auge	210
8.4.1	Herstellung der Cyclodextrin (CD) Lösungen	210
8.4.2	Herstellung der Liposomen zur ophthalmologischen Anwendung	211
8.4.3	Herstellung der Hydrotropen Mischungen (HM)	212
8.4.4	Herstellung der Poloxamergele	212
8.4.5	Herstellung der Mikroemulsion	213
8.5	Permeationsversuche mit isolierter Schweinecornea	213
8.6	Penetrierende Keratoplastik	215
8.7	Physikochemische Charakterisierung der Formulierungen	216
8.7.1	Viskositätsmessungen	216
8.7.2	Dichte	217
8.7.3	Osmolalität	217
8.7.4	pH-Wert	217
9	LITERATURVERZEICHNIS	219
10	ANHANG	251

Abkürzungsverzeichnis

AU	Arbitrary units
BAC	Benzalkoniumchlorid
BR	Bicarbonat-Ringerlösung pH 7,4
CD	Cyclodextrin
CER	Ceramid
CNI	Calcineurininhibitoren
CsA	Ciclosporin
d	Tag
DAG	Diacylglyceride
DSC	Differential scanning calorimetry
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPME	14-Doxylpalmitinsäuremethylester
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
ESR	Elektronenspinresonanz
Evl	Everolimus
FGF	Fibroblast growth factor
FK 506	Tacrolimus (<u>T</u> sukuba <u>mac</u> rolide <u>imm</u> une <u>s</u> uppressant)
FTY 720	Fingolimod
GBR	Glutathion-Bicarbonat-Ringerlösung pH 7,4
HEC	Hydroxyethylcellulose
HLB	Hydrophilie/Lipophilie Balance
HM	Hydrotrope Mischungen
HET CAM	Hühnereitest an der Chorionallantoismembran
HPC	Hydroxypropylcellulose
HP- β -CD	Hydroxypropyl-beta-Cyclodextrin
HP- γ -CD	Hydroxypropyl-gamma-Cyclodextrin
HPMC	Hydroxypropylmethylcellulose
IFN	Interferon
IL 2	Interleukin 2
IMPDH	Inosinmonophosphatdehydrogenase
IPM	Isopropylmyristat
IPP	Isopropylpalmitat

$K_{o/w}$	Verteilungskoeffizient zwischen Octanol und Wasser
Lef	Leflunomid
M_r	Relative Molmasse
MCT	Mittelkettige Triglyceride
MMF	Mycophenolat Mofetil
MPA	Mycophenolsäure
MPAG	Mycophenolsäureglucuronid
mTOR	mammalian target of rapamycin
$^1\text{H NMR}$	Nuclear magnetic resonance spectroscopy of protons
PASI	Psoriasis activity and severity index
Ph. Eur.	Europäisches Arzneibuch
PC	Phosphatidylcholin
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
P-gp	P-Glykoprotein
PI	Polydispersitätsindex
PTFE	Polytetrafluorethylen
R	Spannweite
SC	Stratum corneum
SDS	Sodium dodecylsulphate = Natriumlaurylsulfat
SDZ RAD	Everolimus
Sir	Sirolimus (Rapamycin)
SPC	Soja-Phosphatidylcholin
t	Zeit
T	Temperatur
T_s	Schmelztemperatur
TEWL	Transepidermaler Wasserverlust
UAW	unerwünschte Arzneimittelwirkung
VEGF	Vascular endothelial growth factor
η	dynamische Viskosität
τ_c	Rotationskorrelationszeit
\tilde{x}	Median
\bar{x}	Mittelwert