

## 4 Solubilisierung schwerlöslicher Arzneistoffe

Zur Steigerung der Löslichkeit und Bioverfügbarkeit von Problemарzneistoffen eignen sich nanodisperse Lipidsysteme, zu denen Lipidvesikel, Nanoemulsionen und feste Lipidnanopartikel gezählt werden. Lipidvesikel zeichnen sich durch eine Lipiddoppelschicht aus, die ein wässriges Kompartiment umschließt. Bei den Nanoemulsionen stabilisiert dagegen eine Lipidmonoschicht einen flüssigen und bei den Lipidnanopartikeln einen festen Lipidkern (Abb. 15).

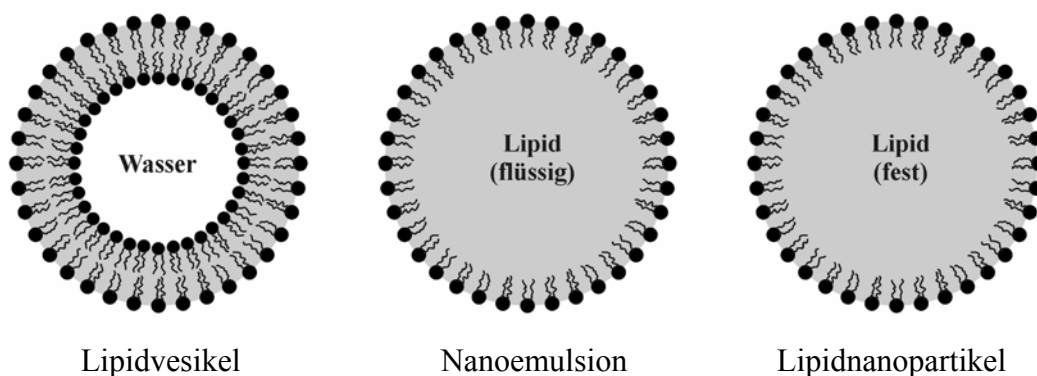


Abb. 15: Nanodisperse Systeme im strukturellen Vergleich

In dieser Arbeit stehen vor allem Lipidvesikel im Mittelpunkt, die auf ihre Eignung für eine dermale Applikation von CsA und MMF geprüft werden sollen.

### 4.1 Lipidvesikel und Liposomen

**Lipidvesikel** sind kugelig in sich abgeschlossene Membranlamellen, die einen wässrigen Innenraum von einer kontinuierlichen wässrigen Phase abtrennen (Schubert 1997). Lipidvesikel enthalten eine oder mehreren Lipiddoppelschichten (Bilayer) aus amphiphilen Lipiden, deren hydrophile Teile („Kopfgruppen“) der wässrigen Seite zugewandt sind. Die lipophilen Molekülteile der beiden Lipidschichten (Monolayer) zeigen aufeinander zu und bilden den hydrophoben Innenbereich der Membran (Abb. 15).

**Liposomen** sind künstliche Lipidvesikel, für deren Herstellung hauptsächlich Phosphatidylcholine (PC, häufig in hydrierter Form) oder Phospholipidmischungen, die

vorwiegend PC enthalten (z. B. Sojalecithin) sowie Anteile von Cholesterol oder Glykolipide verwendet werden.

Wenn die Lipidvesikel ausschließlich nichtionische Lipide enthalten, hat sich der Begriff Niosomen etabliert. Weiterhin sind auch Sphingolipide wie die Ceramide zur Ausbildung von Lipiddoppelschichten befähigt, wobei die gebildeten Vesikel häufig als Sphingosomen bezeichnet werden. In dieser Arbeit soll der Begriff Liposom nur für phospholipidhaltige Vesikel zur Anwendung kommen, während alle anderen Systeme Lipidvesikel genannt werden.

Liposomen werden abhängig von ihrer Größe, der Anzahl der Lipiddoppelschichten und dem Vorhandensein innerer Vesikel als large multilamellar vesicles (MLV, 100-1000 nm), large unilamellar vesicles (LUV, > 50 nm), small unilamellar vesicles (SUV, < 50 nm), oligolamellar large vesicles (OLV) oder multivesicular vesicles (MVV) bezeichnet (New York Academy of Science 1977, Schubert 1997). Die Größe der Liposomen variiert von 20 nm bis zu einigen Mikrometern, wobei die Dicke der Doppelschichten bei 3-5 nm liegt (Arndt und Fichtner 1986, Lasic 1993). Sehr kleine SUV von unter 30 nm Größe können durch Ultraschallbehandlung aus Eilecithin hergestellt werden (Huang 1969). Bei solchen extrem kleinen SUV ist der Lipidanteil im äusseren Monolayer etwa doppelt so groß wie im Inneren. Die hohe Membranspannung bewirkt einen instabilen Zustand mit gesteigerter Fusionsneigung, erhöhter Wechselwirkung mit größeren Molekülen sowie erhöhte Membranpermeabilität. Das Volumen der hydratisierten Bilayer ist etwa fünf mal so groß wie das des wässrigen Innenraumes. Daraus resultiert eine geringe Einschlusskapazität für hydrophile Moleküle. LUV haben dagegen nahezu spannungsfreie Membranen und damit eine höhere Lagerstabilität. Im Vergleich zur eingesetzten Lipidmenge weisen sie eine höhere Beladungskapazität für hydrophile Wirkstoffe auf. OLV und MVV zeigen aufgrund der erhöhten Anzahl von Lipidlamellen häufig eine verzögerte Freisetzung eingeschlossener Wirkstoffe, was zur Erzielung von Depoteffekten ausgenutzt werden kann.

Die ersten Arbeiten an Lipidvesikeln wurden im frühen 20. Jahrhunderts durchgeführt. Bereits 1911 konnte bei Untersuchungen zu Flüssigkristallen unter dem Mikroskop beobachtet werden, dass sich aus Phospholipiden und Wasser spontan Vesikel bilden

(Lehmann 1912). Seit den 60iger Jahren des 20. Jahrhunderts wurden Phospholipidvesikel intensiv als Modelle biologischer Membranen erforscht (Bangham und Horne 1964, Bangham et al. 1965, Papahadjopoulos und Miller 1967). Es wurde erkannt, dass die Vesikel einen Anteil des wässrigen Lösungsmittels einschließen, dass sie osmotisch aktiv sind und für verschiedene Moleküle und Ionen eine unterschiedliche Permeabilität besitzen. In dieser Zeit etablierte sich der Begriff Liposom (Seissa and Weissmann 1968). Später wurden die Liposomen auch als Träger für Arzneistoffe in Betracht gezogen (Gregoriadis und Buckland 1973, Poste und Papahadjopoulos 1976). Die vielseitigen Anwendungsbereiche der Liposomen beruhen auf den Möglichkeiten, hydrophile Moleküle im wässrigen Innenraum zu verkapseln, amphiphile oder geladene Moleküle an die Membranen zu adsorbieren und lipophile Moleküle in die inneren Membranbereiche zu inkorporieren. Bei der Entwicklung von Liposomen als Arzneistoffträger hoffte man zunächst, die Arzneistofftoxizität zu reduzieren und den Arzneistoff gezielt am Wirkort freisetzen zu können. Ein solches Drug targeting nach parenteraler Applikation sollte durch Modifizierung der Liposomenmembran, ihrer Oberfläche und Ladung sowie durch die Variation der Lamellenzahl erreicht werden.

#### **4.1.1 Lipidvesikel zur parenteralen Applikation**

In den 60iger und 70iger Jahren des 20. Jahrhunderts wurden Proteine, Nucleinsäuren, Vitamine sowie Steroide, vor allem aber antineoplastisch wirksame Arzneimittel liposomal verkapselt (vgl. Arndt und Fichtner 1986). Zu den intensiv untersuchten Wirkstoffen zählten unter anderem Cytarabin, Methotrexat, Bleomycin, Actinomycin D oder Doxorubicin. Man hoffte dabei, dass Tumorzellen infolge ihrer erhöhten Endozytoserate zur bevorzugten Aufnahme von Liposomen im Vergleich zu Normalzellen befähigt seien. Diese Annahme ließ sich leider nicht bestätigen. Vielmehr reichern sich größere Liposomen nach intravasaler Applikation meist innerhalb weniger Minuten in Organen wie Leber und Milz an, in denen die Gefäßendothelien netzartig durchbrochen sind und Löcher von etwa 100 nm aufweisen (Retikuloendotheliales System = RES). Nur kleinere SUV können zu einem geringen Teil durch Lücken zwischen den Endothelzellen der Kapillarwände aus dem Gefäßsystem ins umliegende Gewebe gelangen. Der Grund für die Anreicherung der Liposomen im RES liegt in der Adsorption von immunologisch aktiven Serumproteinen, den Opsoninen, an der Oberfläche der Liposomen und die folgende Aufnahme in die phagozytierenden Zellen,

vor allem Gewebsmakrophagen. Diese erkennen Liposomen und andere Partikel aufgrund des Opsonierungsmusters als fremd und eliminieren sie. Durch geeignete Modifikation der Liposomenoberfläche konnte die Erkennung der Liposomen durch Makrophagen unterdrückt und somit ihre Halbwertszeit im Blut verlängert werden. Derartige Liposomen werden als Stealth Liposomen (Papahadjopoulos 1991, Allen et al. 1991, Blume und Cevc 1992) oder Ninja Liposomen bezeichnet (Huang 1990). Die Tarnwirkung wird durch die Kopplung von Polyethylenglycolresten an den Kopfbereich der Lipide (Pegylierung) erzielt. Die Halbwertszeit von solchen modifizierten Liposomen im Blut beträgt ca. 20 Stunden.

Der Wirkstoff Doxorubicin (Doxil<sup>®</sup>, Caelyx<sup>®</sup>) wird in derartigen Formulierungen vermarktet. Vorteilhaft sind dabei die erhöhte Wirkdauer sowie die bessere Verträglichkeit des Wirkstoffes im Vergleich zur nichtliposomalen Lösung. Insbesondere vermindert sich die kardiotoxische Wirkung. Durch die langsamere Freisetzung des Wirkstoffes können gefährlich hohe Plasmaspiegel-Spitzen vermieden werden.

Die Liposomen in dem Doxorubicinpräparat Myocet<sup>®</sup> sind dagegen nicht pegyliert und haben daher eine etwas kürzere Halbwertszeit von ca. 5 – 19 h, die aber immer noch deutlich länger als die von freiem Doxorubicin ist. Auch diese Formulierung weist eine verbesserte Verträglichkeit auf (Levine et al. 2004, Pharma Forum 2004). Der Wirkstoff wird über einen durch Citronensäure hervorgerufenen pH Gradienten in diese Liposomen inkorporiert (Li et al. 1998). Elektronenmikroskopische Bilder zeigen, dass sich in den citrathaltigen Liposomen mit dem Doxorubicin Komplexe in Form linearer, geschwungener oder zirkulärer Faserbündel ausbilden, die kaum mit der Vesikelmembran in Wechselwirkung stehen.

Ein anderes Prinzip zur Erhöhung der Verweilzeit im Blutkreislauf wurde im Präparat Daunoxome<sup>®</sup> mit Daunorubicin als Wirkstoff verwirklicht. Liposomen interagieren nach parenteraler Applikation neben der Markierung mit den Opsoninen auch mit Lipoproteinen, vor allem HDL, die durch Anlagerung und Lipidaustausch die Liposomenmembran destabilisieren (Scherphof et al. 1978). Zur Verminderung dieser Destabilisierung sowie der Opsonierung haben die Liposomen im Daunoxome<sup>®</sup> sehr starre Membranen mit hohen Phasenübergangstemperaturen, da sie als Hauptlipid Distearoylphosphatidylcholin (DSPC) mit gesättigten Fettsäureresten sowie einen hohen Anteil von 50 % (mol/mol) Cholesterol enthalten. Dabei ist zu beachten, dass die

Mikroviskosität in reinen DSPC-Liposomen höher ist als in gemischten DSPC/Cholesterolliposomen (vgl. Kapitel 5.4).

Tumorversorgende Blutgefäße zeichnen sich durch deutliche interzelluläre Spalten in ihren Gefäßwänden aus und unterscheiden sich von normalen Blutgefäßen dadurch, dass 20 – 25 % ihrer Endothelzellen durch Tumorzellen substituiert sein können (Petraik und Goddard 1989, Baban und Seymour 1998, Berdel und Panse 2005). Die Formulierung der Zytostatika in Liposomen mit kleinen Teilchengrößen (in DaunoXome<sup>®</sup> z. B. ca. 50 nm) verbessert daher die Aufnahme der Wirkstoffe in die Tumorzellen bei geringerer Verfügbarkeit in gesundem Gewebe. Es konnte gezeigt werden, dass sich kationische Liposomen selektiv an aktivierten Endothelzellen von tumorversorgenden Blutgefäßen sammeln (Schmitt-Sody et al. 2003). Es wird daher versucht, antineoplastische Wirkstoffe wie z. B. Paclitaxel in kationischen Liposomen zu formulieren und damit noch selektiver im Tumorgewebe freizusetzen (Gruber 2004).

Neben den bereits erwähnten Antineoplastika Daunorubicin und Doxorubicin sind weitere liposomale Präparate mit Cytarabin (DepoCyt<sup>®</sup>), dem Schmerzmittel Morphin (DepoMorphine<sup>®</sup>), dem Fungizid Amphotericin B (Ambiosome<sup>®</sup>, Abelcet<sup>®</sup>) sowie Impfstoffe gegen Hepatitis A (Epaxal<sup>®</sup>) und Influenza (Inflexal<sup>®</sup>) auf dem Markt (vgl. Lasic 1998). In den Präparaten DepoCyt<sup>®</sup> und DepoMorphine<sup>®</sup> kommt die DepoFoam<sup>®</sup> Technologie zur Anwendung. Hinter diesem Begriff verbergen sich multivesikuläre Liposomen bestehend aus mehreren internen, wässrigen Kompartimenten, die durch ein zusammenhängendes Netzwerk aus Lipidmembranen voneinander getrennt sind (Katre et al. 1998, Ye et al. 2000). Diese Vesikel haben eine Größe von etwa 1 bis 100 µm und sollen als intramuskuläres oder subkutan Depot den enthaltenen Arzneistoff über einen Zeitraum von einigen Tagen bis mehreren Wochen hinhaltend freisetzen. Dies ermöglicht eine deutliche Verbesserung der Lebensqualität für die Patienten und eine erhöhte Therapiesicherheit, weil die Wirkstoffe nur noch alle zwei Wochen appliziert werden müssen. Das lipophile Fungizid Amphotericin B ist in liposomaler Formulierung vollständig in die Liposomenmembran integriert und bleibt dort auch während der Blutzirkulation. Die Liposomen mit Amphotericin B bestehen aus hydriertem Sojalecithin, Cholesterollipid und Distearoylphosphatidylcholin mit einer Teilchengröße von unter 100 nm. Ähnlich wie beim DaunoXome<sup>®</sup> unterdrückt die starre Membran die Opsonierung der Liposomen sowie den Lipidaustausch mit HDL.

Die liposomale Verarbeitung dient vor allem dem Schutz der Patienten vor freiem Amphotericin B, welches eine erhebliche Nephrotoxizität zeigt. In den beiden Impfstoffen Epaxal<sup>®</sup> und Inflexal<sup>®</sup> werden die Hämagglutinine abgetöteter Viren in Liposomen verankert, um die immunologische Antigenität zu erhöhen und die Sicherheit des Impfstoffes zu verbessern (Gluck et al. 2002, Mischler et al. 2006).

Im Gegensatz zur parenteralen Gabe erscheint eine perorale Applikation von Liposomen wegen ihrer Instabilität gegen Magen-pH-Werte, Enzyme im GIT Trakt sowie den Gallensalzen im Dünndarm wenig sinnvoll. Günstiger sind dagegen die Voraussetzungen für eine topische Applikation der Liposomen sowohl auf der Haut als auch am Auge.

### **4.1.2 Lipidvesikel zur dermalen Applikation**

Viele Studien zeigen deutlich höhere Absorptionsraten sowie stärkere pharmakologische Effekte von Arzneistoffen, wenn diese in liposomaler Formulierung anstatt in konventionellen Darreichungsformen wie z. B. Salben oder Cremes appliziert wurden. Es konnte gezeigt werden, dass sich wasserunlösliche Substanzen nach der Applikation mit Liposomen in der Epidermis anreichern. Triamcinolonacetonid erzielte liposomal verkapselt im Vergleich zu suspendiertem Wirkstoff 4-5 mal höhere Konzentrationen in der Epidermis, gleichzeitig aber dreimal niedrigere Konzentrationen im Thalamus (Mezei und Gulasekharan 1982). Die lokale Bioverfügbarkeit in der Haut war demnach bei gleichzeitig verminderter systemischer Verfügbarkeit erhöht. Ähnliche Ergebnisse konnten mit anderen Steroiden wie Dihydrotestosteron oder Hydrocortison als Wirkstoff erzielt werden (Vermorken et al. 1984, Lasch und Wohlrab 1986, Wohlrab und Lasch 1987, Wohlrab et al. 1989).

Liposomen wurden auch benutzt, um die dermale Bioverfügbarkeit von topisch appliziertem Econazol zu erhöhen (Mezei 1993). Klinische Studien hatten gezeigt, dass 0,2 oder 0,5 proz. Econazol liposomal verkapselt genauso effektiv oder sogar stärker wirksam war als eine 1 proz. Econazol Creme. Zusätzlich konnte die Applikationsfrequenz verringert und die Patientencompliance verbessert werden. Diese Zubereitung kam daher bereits 1988 als Pevaryl<sup>®</sup>-Lipogel für die lokale Behandlung von Dermatomykosen auf den Markt.

Der anästhesierende Effekt von topisch appliziertem Tetracain in multilamellaren Vesikeln war im Vergleich zu einer konventionellen Creme deutlich ausgeprägter (Gesztos und Mezei 1988). Auch die liposomale Applikation von Lidocain führte zu einer verstärkten und verlängerten Wirksamkeit (Foldvari et al. 1990).

Liposomal verarbeitete Antibiotika wie Clindamycin und Tobramycin zeigten bei der Behandlung der Akne oder anderen Hautinfektionen eine bessere Wirksamkeit als Zubereitungen mit den freien Wirkstoffen (Price et al. 1990, Škalko et al. 1992). Eine Einzeldosis der liposomal verkapselten Antibiotika konnte die Bakterienzahl stärker reduzieren als wiederholte Applikationen der freien Wirkstoffe.

Liposomal verkapseltes Methotrexat wurde nach dermalen Applikation an Nacktmäusen 2-3 fach stärker in der Haut zurückgehalten als bei Anwendung einer einfachen Lösung, während die systemische Verfügbarkeit bei den Liposomen deutlich niedriger lag (Patel 1985). Folglich bilden die Liposomen ein Depot, aus dem der Wirkstoff anhaltend freigesetzt wird.

Nach topischer Applikation von Diclofenac in wässrigen Gelen mit hydrierten Phospholipiden konnten deutlich erhöhte Konzentrationen des Wirkstoffes im Plasma von Ratten und Menschen gemessen werden als nach der Applikation einer freien Arzneistofflösung (Nishihata et al. 1987). Im Diclac<sup>®</sup> Schmerzgel wird Diclofenac 5 % in einem Liposomengel vermarktet. Nach Informationen der Novartis AG permeierte Diclofenac aus dieser Formulierung nach 8 h allerdings nicht stärker durch exzidierte, haarlose Mehrschweinchenhaut als aus einer herkömmlichen Gelgrundlage oder aus einem Diclofenac-Diethylammonium-Emulsionsgel (Voltaren<sup>®</sup> Emulgel), während das Diclofenac-Diethylammonium-Emulsionsgel nach 24 h den anderen beiden Formulierungen deutlich überlegen war (König und Zijlstra 2005). Allerdings stellt sich die Frage der therapeutischen Relevanz der Messung eines 24 h-Wertes, da eine Formulierung in der Praxis selten so lange auf der Haut verbleibt.

Die topische Applikation von liposomal verkapselten Enzymen zur DNA Reparatur ist eine Strategie zur Prävention von Hauttumoren. Patienten mit *Xeroderma Pigmentosum* (Mondscheinkrankheit, Lichtschrumpfhaut) haben einen autosomal rezessiv vererbten genetischen Defekt von Endonukleasen, die zur Nukleotidexcision notwendig sind.

Betroffene zeigen daher nach Sonnenlichtexposition eine mehr als 1000 fach erhöhte Inzidenz maligner Hauttumore. Für viele Patienten verläuft die Erkrankung bereits im Kindesalter tödlich. Durch das Sonnenlicht hervorgerufene DNA Defekte ließen sich in Zellkulturen durch die intrazelluläre Gabe der Endonuklease des Bakteriophagen T4 beheben (Tanaka et al. 1975). Der Bakteriophage T4 codiert dieses Enzym in dem Gen *denV* und expremiert es nach der Infektion seines Wirtes *E. coli*. Das Substrat des Enzyms ist ein Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer, welches nach Exposition von UV Licht auf die Doppelbindungen der Pyrimidinbasen Cytosin und Thymin auftritt. Es bildet sich dabei ein Cyclobutanring zwischen zwei benachbarten Pyrimidinbasen. Die Endonuklease spaltet neben einem solchen Dimer den DNA-Strang und markiert die Stelle für andere endogene DNA-Reparaturenzyme. Die T4-Endonuklease wurde in pH-sensitiven sphärischen Liposomen mit einem Durchmesser von ca. 200 nm verarbeitet und die Kombination als T4N5 Liposomen bezeichnet (Yarosh 2001). Nach Applikation dieser Liposomen auf Maushaut ließ sich T4-Endonuklease in lebenden Schichten der Epidermis nachweisen. Die topische Applikation eines T4N5 Hydrogeles auf die Haut von *Xeroderma Pigmentosum* Patienten beschleunigte deutlich die Entfernung von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren (Yarosh et al. 1996). Darüber hinaus ließ sich mit dem Gel das Neuauftreten von Hauttumoren bei solchen Patienten deutlich verringern (Yarosh et al. 2001). Ebenso wie die T4-Endonuklease kann auch die DNA-Photolyase Pyrimidin-Dimere entfernen, die unter Einwirkung von UV-Licht gebildet wurden (Krutmann 2001). DNA-Photolyasen finden sich in verschiedenen Pflanzen, Tieren sowie pro- und eukaryotischen Mikroorganismen (vgl. Schleicher 2001). DNA-Photolyasen aus der Blaualge *Anacystis nidulans* werden liposomal formuliert in der Produktreihe Ladival<sup>®</sup> med zur Prävention und Linderung des Sonnenbrandes vermarktet. Zusätzlich wird die günstige Wirkung der DNA-Endonukleasen dadurch unterstützt, dass sich die lichtinduzierte Erythem-Schwelle der Haut nach Vorbehandlung mit Liposomen verdoppelt (Thiele et al. 1993).

Auch eine verbesserte Penetration und Permeation von Interferonen konnte nach topischer Applikation liposomaler Formulierungen festgestellt werden (Egbaria et al. 1990a, Short et al. 1995, Foldvari and Moreland 1997, Zolin et al. 2001). Dabei konnten die Vorteile von **Ceramidvesikeln** gegenüber Liposomen demonstriert werden. IFN  $\alpha$  formuliert in Ceramidvesikeln penetriert zweimal stärker in die Haut als bei Anwendung konventioneller Liposomen (Egbaria et al. 1990a). Untersuchungen mit



CsA in verschiedenen Formulierungen zeigen eine steigende Akkumulation des Wirkstoffes im SC haarloser Maushaut in folgender Reihenfolge: Hautlipidvesikel > Liposomen > o/w Emulsion > ethanolische Lösung (Egbaria et al. 1990b). Die Permeation des CsA durch die Haut wird dagegen in einer anderen Reihenfolge gefördert: ethanolische Lösung >> Liposomen > Ceramidvesikel > o/w Emulsion. Diese Ergebnisse zeigen, dass CsA nach topischer Applikation in Vesikeln ein Depot im SC bildet, aber nachweisbar nicht durch die Haut permeiert. Daher ist das Risiko unerwünschter systemischer Wirkungen sehr gering. Die Penetration von CsA ins SC humaner Kadaverhaut ex vivo zeigte unter Berücksichtigung verschiedener Vesikeltypen die Reihenfolge: Hautlipidvesikel (MLV) > Liposomen (MLV)  $\approx$  Hautlipidvesikel (LUV) > Liposomen (LUV) >> Emulsion (Egbaria et al. 1991a). In den tieferen Schichten dagegen war mehr CsA aus den Phospholipidvesikeln als aus den Hautlipidvesikeln nachweisbar: Liposomen (MLV) > Hautlipidvesikel (MLV) > Liposomen (LUV) > Hautlipidvesikel (LUV) >> Emulsion. Es kann geschlussfolgert werden, dass Ceramidvesikel den Wirkstoff stärker im SC zurückhalten als Phospholipidvesikel. Die Penetration von CsA aus allen vesikulären Formulierungen erfolgt allerdings deutlich stärker als aus konventionellen Emulsionen. Weiterhin zeigen multilamellare Vesikel offenbar leichte Vorteile gegenüber unilamellaren, möglicherweise durch höhere Löslichkeit des Wirkstoffes und dessen länger andauernde Freisetzung.

Darüber hinaus zeigen Ceramidformulierungen einen ausgeprägten pflegenden Effekt. Es konnte gezeigt werden, dass Vesikel mit Stratum corneum Lipiden die Barrierefunktion vorgeschädigter Haut beschleunigt wiederherstellen können (Produktinformation Lipoid 2002, De Paepe et al. 2002). Dazu wurde die Haut gezielt mit Aceton oder mit SDS-Lösungen entfettet. Es konnte gezeigt werden, dass Formulierungen mit Ceramiden, Cholesterol und freien Fettsäuren sehr effektiv die Hautbarrierefunktion von Kindern mit atopischem Ekzem wiederherstellen können (Chamlin et al. 2001). Ceramidformulierungen ohne Cholesterol und freie Fettsäuren konnten die Barrierefunktion allerdings auch stören (Mao-Qiang et al. 1993 und 1996). Ein reduzierter Anteil von Ceramiden im Stratum corneum, vor allem ein Verlust der Ceramide I, II und IV wurde für chronisch entzündliche Hautkrankheiten wie Psoriasis und atopisches Ekzem beschrieben (vgl. Kapitel 2.1.1).

#### **4.1.2.1 Wirkungsmechanismen dermal applizierter Lipidvesikel**

Obwohl die penetrationsfördernden Wirkungen der Liposomen unbestritten sind, gehen die Meinungen über das Zustandekommen dieser Wirkung recht weit auseinander. Ursprünglich wurde angenommen, dass Liposomen das SC intakt durchqueren und in der Haut ihren Inhalt nach und nach abgeben (Mezei 1985, Patel 1985). Andererseits ist es bis heute nicht gelungen, intakte Lipidvesikel in tieferen Hautschichten als dem SC nachzuweisen (van den Berg et al. 1998 und 1999, Honeywell-Nguyen 2003). Es konnte aber mit Hilfe hydrophiler und lipophiler Fluoreszenzfarbstoffe visualisiert werden, dass sich die Penetration von Liposomen auf das Stratum corneum beschränkt (Lasch et al. 1991). Die Lipidvesikel penetrieren nicht in Blutgefäße. Nur der nicht eingeschlossene Wirkstoff ist in der Lage, in Blutgefäße zu diffundieren (Mezei 1993). Folglich müssen Wirkstoffe aus den Lipidvesikeln freigesetzt werden, um in tiefere Hautschichten als das SC und in den Blutkreislauf gelangen zu können.

Viele Autoren gehen davon aus, dass die Lipide der Liposomen sich mit denen des SC vermischen und damit die Penetrationsverbesserung durch eine verstärkte Hydratation des SC über die hydrophileren Kopfgruppen der Phospholipide zustande kommt (Egbaria und Weiner 1991b, Schubert et al. 1992). Es wurde beobachtet, dass der Vermischungseffekt der Lipide bei Verwendung ceramidhaltiger Vesikel intensiver ausfällt, da diese eine höhere Ähnlichkeit zu den Lipiden des SC aufweisen (Egbaria und Weiner 1991b). Bei in vitro Versuchen konnten Liposomenlipide nachweislich in Hautlipidvesikel eindringen, wenn man beide Vesikeltypen miteinander mischt (Blume A. et al. 1993, Kirjavainen et al. 1999). Die eingedrungenen Lipide aus den Vesikeln könnten die Anordnung der Lipide in den interzellulären Lamellen des SC stören und so deren Mikroviskosität verringern. Es konnte eindeutig belegt werden, dass liposomale Lipide unabhängig voneinander in das SC diffundieren (du Plessis et al. 1992a) und dass Liposomen auf der Haut eintrocknen und ihre Vesikelstruktur verlieren (Schubert et al. 1993). Dabei behalten multilamellare Liposomen ihre Integrität länger als unilamellare Liposomen und sind Liposomen aus hydrierten Phospholipiden länger stabil als solche aus unhydrierten Phospholipiden (Moll 2004). Infolge der durch den Zerfall der Vesikel entstehenden Lipidschicht auf der Hautoberfläche könnten die penetrationsfördernden Eigenschaften auch durch die Schaffung einer optimalen physikochemischen Umgebung erklärbar sein. Denkbar wäre eine erhöhte Hydratation des SC infolge des Mikrookklusionseffektes unter dem Lipidfilm (Jacobs et al. 1988).

Die verstärkte Hydratisierung der Haut durch Liposomen führte zum intensiven Gebrauch der Liposomen in der Kosmetik. Bei regelmäßigem Auftragen wird nach 7 Tagen eine maximale Hautfeuchtigkeit gemessen, die bis zum Ende der Applikation beibehalten wird (Röding und Ghyczy 1991). Dabei muss allerdings beachtet werden, dass eine lang anhaltende und hoch dosierte topische Applikation von Phospholipiden auch zu Hautirritationen und zu Störungen im Lipidgleichgewicht des SC führen kann (Produktinformation Natipide II 1996).

Zusammenfassend wurden im Wesentlichen drei Typen von Wechselwirkungen zwischen Liposomen und Haut diskutiert: 1) Adsorption und Fusion von Vesikeln auf und in der Haut, die zu einer verstärkten Hydratisierung des SC sowie erhöhter thermodynamischer Aktivität und gesteigerter Penetration von Arzneistoffen führen, 2) Interaktionen intakter Vesikel mit den tieferen Schichten des SC, die zu erhöhter Penetration von Arzneistoffen durch eine Störung der Barrierefunktion sorgen, 3) Penetration von Vesikellipiden in tiefere SC-Schichten, die sich dort mit den SC-Lipiden mischen und deren Struktur verändern.

Die Bedeutung des **transfollikulären Transportweges** für die Penetration von Lipidvesikeln in die Haut wurde intensiv untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sich Fluoreszenzfarbstoffe formuliert in multilamellaren Liposomen deutlich stärker in Haarwurzeln und Talgdrüsen des Hamsterohres ansammeln als gelöst in anderen Formulierungen, darunter nichtliposomale Phospholipidzubereitungen, wässrige Pufferlösungen pH 7,4, 0,05 proz. SDS-Lösung sowie 5 oder 10 proz. Mischungen aus Ethanol/Wasser oder Propylenglycol/Wasser (Lieb et al. 1992). Bei der topischen Applikation von liposomal verkapseltem IFN  $\gamma$  auf haarlose Maushaut, geringbehaarte Humanhaut und haarreiche Hamsterhaut konnte ein konstanter Wirkstoffgehalt im SC gemessen werden, während der in tieferen Hautschichten nachgewiesene Anteil von 0,3 % auf 0,6 % und 6,1 % anstieg (du Plessis et al. 1992b). Folglich erhöhte sich die Penetration des Wirkstoffs in tiefere Schichten proportional zur Zahl der vorhandenen Follikel. Der follikuläre Weg hat also bei der topischen Applikation einen nicht unerheblichen Einfluss auf die lokale Bioverfügbarkeit liposomal applizierter Arzneistoffe. Dies ließ sich auch für IFN  $\alpha$  und CsA nachweisen, welche formuliert in Niosomen im Vergleich zu Kontrollösungen höhere Konzentrationen in Haarfollikeln und Talgdrüsen, aber auch in oberen SC Schichten aufwiesen (Niemic et al. 1995).

Dabei zeigte sich, dass Niosomen aus kürzerkettigen Diacylglyceriden im Vergleich zu längerkettigen ebenso wie im Vergleich zu konventionellen Liposomen höhere topische Bioverfügbarkeiten erzielten. Weiterhin erwies sich der Zusatz eines einkettigen Polyoxyethylen-Alkylethers in den Niosomen als vorteilhaft, da er im Vergleich zu Niosomen ohne diesen Zusatz zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Haut führte. Es konnte nachgewiesen werden, dass der Zusatz mizellbildender Tenside mit nur einer Alkylkette die Mikroviskosität in der Vesikelmembran vermindern kann (van den Berg et al. 2001).

#### **4.1.2.2 Einfluss der Eigenschaften vesikulärer Formulierungen auf den dermalen Wirkstofftransport**

Es wurde intensiv untersucht, wie sich die Variationen von Liposomeneigenschaften auf deren penetrationsverbessernde Fähigkeiten auswirken.

Der Einfluss der **Partikelgröße** wird unterschiedlich beurteilt. Ein indirekt proportionales Verhältnis zwischen der Partikelgröße und der Penetrationsintensität hydrophiler und lipophiler Farbstoffe wurde gefunden (Verma D. D. et al. 2003a). Die höchste Penetrationsintensität und größte Eindringtiefe wurde mit kleinen Teilchengrößen zwischen 70 und 120 nm gemessen. Dieser Zusammenhang erscheint aufgrund der größeren Oberfläche kleiner Vesikel und der verbesserten Eindringtiefe in Spalten zwischen den Korneozyten oder Haarfollikel gut nachvollziehbar. Andere Autoren kamen allerdings zu abweichenden Ergebnissen (Šentjurc et al. 1999, vgl. Kapitel 5.4). Jedoch wurden auch in dieser Arbeit Partikelgrößen im Nanometerbereich bevorzugt, so dass eine Teilchengröße von 200 nm als akzeptable Richtgröße für eine dermale Vesikelformulierung erscheint.

Eine erhöhte **Lamellenzahl** führt zu verzögerter Freisetzung und erhöhter Beladungskapazität. Eine hohe Konzentration von 30-50 % Phospholipiden in der Formulierung erzeugt eine multivesikuläre Matrix und kann zur Überführung der Zubereitung in den halbfesten Zustand benutzt werden (Tardi et al. 1998).

Der Einfluss des **Zetapotenzials** von Liposomen auf die Penetration von Wirkstoffen in die Haut wurde untersucht. Dabei zeigten positiv geladene Vesikel aus

Phospholipid/Tween<sup>®</sup> 20 Mischungen (sogenannte Flexosomen<sup>®</sup>) eine signifikant höhere in vitro-Penetration als negativ geladene oder neutrale Vesikel (Song und Kim 2006). Als kationisches Lipid wurde 1,2-Dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP) eingesetzt. Eine erhöhte lokale Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen am Auge konnte auch mit kationischen Liposomen zur ophthalmologischen Applikation erzielt werden (vgl. Kapitel 4.1.3). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass kationische Vesikel zu verstärkter elektrostatischer Adsorption auf den negativ geladenen Epithelien des SC oder der Cornea führen.

Liposomen erhöhen die Penetration hydrophiler Farbstoffe ins SC nicht nur dann, wenn der Farbstoff im inneren wässrigen Vesikelkompartiment vorliegt, sondern auch, wenn er ausschließlich in der umgebenden wässrigen Phase gelöst ist (Verma D. D. et al. 2003b). Dies lässt sich durch die generell durch Liposomen erhöhte Hydratisierung des SC erklären, könnte aber auch eine Folge der Assoziation solcher Farbstoffe an einzelne Lipide oder die äußere Vesikelmembran sein. Der Farbstoff ließ sich allerdings in größeren Tiefen (auch in lebender Epidermis) nachweisen, wenn er im hydrophilen Innenraum gelöst war. Eine Entfernung uneingeschlossener Wirkstoffe aus den Formulierungen für eine topische Applikation erscheint jedenfalls nicht ratsam.

**Cholesterol** gilt im Allgemeinen als Membranstabilisator. Es ist aber zu beachten, dass Cholesterol die Membranviskosität nur oberhalb der Phasenübergangstemperatur erhöht, darunter aber verringert (Oldfield und Chapman 1972, Coderch et al. 2000). Beim Überschreiten der Phasenübergangstemperatur ist der Abfall der Mikroviskosität deutlich vermindert, wenn Cholesterol in der Membran enthalten ist. Gleichzeitig verbreitert sich der Bereich der Phasenübergangstemperatur. Cholesterol vermindert die Destabilisierung parenteral applizierter Liposomen durch HDL (vgl. Kap. 4.1.1). In natürlichen cholesterolhaltigen Membranen können sich auf der extrazellulären Seite abgegrenzte Lipiddomänen hoher Ordnung bilden, die wie Flöße auf der Membran schwimmen und daher als lipid rafts bezeichnet werden (vgl. Löffler 2003). Die lipid rafts enthalten außer dem Cholesterol eine große Anzahl gesättigter Phospho- und Sphingolipide und tragen oftmals Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-verankerte Proteine. Ein signifikanter Transport liposomal verkapselter hydrophiler Spinsonden in die Haut konnte nur beobachtet werden, wenn mindestens 30 mol % Cholesterol im Bilayer enthalten war (Vrhovnik et al. 1998). Dies zeigt auf der einen Seite, dass die

gleichzeitige Anwesenheit von verschiedenen Lipiddomänen in Vesikelmembranen einen entscheidenden Einfluss auf die Wirkstoffpenetration haben könnte. Andererseits scheint aber auch die durch Cholesterol **erhöhte Mikroviskosität** von Membranen oberhalb ihrer Phasenübergangstemperatur für dieses Ergebnis wichtig zu sein. Ein Zusammenhang zwischen hoher Mikroviskosität und erhöhter Penetration liposomal verkapselter Spinsonden in die Haut wurde auch von anderen Autoren gefunden (Coderch et al. 2000).

Im Gegensatz dazu sehen viele Autoren allerdings eher einen Zusammenhang zwischen **niedriger Mikroviskosität** und gesteigerter Wirkstoffpenetration und -permeation. Es wurde die Fähigkeit von Natriumcholat, Didecanoylphosphatidylcholin, Tween<sup>®</sup> 20, oder anderen Tensiden vor allem mit kurzen Alkylketten untersucht, sehr gut deformierbare Vesikel mit Phosphatidylcholin auszubilden (sogenannte Transfersomen<sup>®</sup> oder Flexosomen<sup>®</sup>). Es konnte gezeigt werden, dass solche Vesikel sowohl die lokale als auch systemische Verfügbarkeit von Glukokortikoiden erhöhen (Cevc et al. 1997). CsA verkapselt in gemischten Phosphatidylcholin/Natriumcholat Vesikeln permeierte durch exzidierte Maushaut (Guo et al. 2000). Sogar die Permeation von großen hydrophilen Peptiden wie Insulin in therapeutischen Mengen durch intakte Humanhaut wurde beschrieben (Cevc et al. 1998). Cholatvesikel wurden auch als transdermaler Carrier für antioxidative Enzyme wie Superoxid Dismutase oder Katalase genutzt (Simoes et al. 2004). Die eingesetzten Tenside sollen sowohl die Liposomen als auch die Hautlipide während des Durchtritts der Lipidaggregate fluidisieren. Die Vesikel sollen sich deshalb durch Poren pressen können, die kleiner als ein Zehntel ihres Durchmessers sind. Die treibende Kraft für das Passieren von Poren soll die hohe Affinität der Vesikel zu tieferen Hautschichten mit ihrem deutlich höheren Wassergehalt im Vergleich zur relativ trockenen Hautoberfläche sein (Cevc 1992). Der Wassergehalt im Stratum corneum beträgt etwa 15-20 %, während im Stratum granulosum etwa 70 % gemessen werden. Unter nichtokklusiven Bedingungen sollen daher nach dem Eintrocknen der topisch aufgetragenen Formulierung die intakten Vesikel wegen ihrer guten Deformierbarkeit die Haut durch sogenannte tunnelähnliche Regionen passieren. Nach der Applikation von Fluoreszenzfarbstoffen in fluiden Vesikeln konnten die tunnelähnlichen Regionen visualisiert werden (Van den Berg et al. 1999). Sie erscheinen als maschendrahtähnliches Netzwerk mit einem Abstand von etwa 5 µm im Stratum corneum, aber in tieferen Schichten als dem SC war kein

Fluoreszenzfarbstoff nachweisbar. Die Applikation der Fluoreszenzfarbstoffe in rigiden Vesikeln führte dagegen zur Sichtbarmachung der polygonalen Korneozytenstruktur. Offenbar führen die fluiden Vesikel zu einer Änderung der Struktur im SC, die den Penetrationsweg von Fluoreszenzfarbstoffen verändern. Die fluiden Vesikel reduzierten offenbar die Bindungskraft zwischen den Korneozyten, wobei in elektronenmikroskopischen Bildern weniger Desmosomen sichtbar wurden. In der lebenden Epidermis blieben solche Strukturänderungen jedoch aus. Intakte Vesikel waren nur in den obersten 3-4 Schichten des SC sichtbar, die Lipide aus den Vesikeln aber auch in deutlich tieferen Schichten. Die verstärkte Akkumulation von Vesikeln in tunnelähnlichen Regionen konnte auch von anderen Autoren bestätigt werden, wobei der Nachweis intakter Vesikel unterhalb des SC ebenfalls nicht möglich war (Honeywell-Nguyen et al. 2003). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die tunnelähnlichen Regionen Störstellen in den interzellularen Lipidlamellen in Bereichen mit wellenförmigen Lipideinschlüssen sind.

Es konnte gezeigt werden, dass Ceramid- und Phospholipidvesikel im Gelzustand auf der Hautoberfläche ausgedehnte Schichten- und Bilayerstapel ausbilden, während flüssigkristalline Vesikel nicht fusionierten und keinerlei Adsorption zeigten (van den Bergh et al. 1999). Trotzdem bewirkten die flüssigkristallinen Vesikel deutliche inter- und intrazelluläre Interaktionen in tieferen Schichten des SC, während bei Vesikeln im Gelzustand nur nach Zusatz des hydrophilen Cholesterolsulfats schwache interzelluläre Interaktionen beobachtet werden konnten. Folglich verstärkt eine hohe Mikroviskosität von Vesikelmembranen eher deren Adsorption auf der Haut und damit die Hydratisierung des SC, während eine niedrige Mikroviskosität eher zur Fluidisierung tieferer Schichten des SC und damit zu einer Verminderung von dessen Barrierefunktion führt. Daher könnte die Variation der Mikroviskosität in den Vesikelmembranen ein Instrument sein, um die Akkumulation von Wirkstoffen auf die Haut zu beschränken oder eine systemische Verfügbarkeit zu ermöglichen.

Der Einfluss von **Ethanol** auf die Penetration liposomal verkapselter Wirkstoffe wurde untersucht. Ein Zusatz von 32 % (w/v) führte zu einer um Faktor 4-7 gesteigerten Permeation von hydrophilen Modellarzneistoffen wie Sotalol oder Natriumsalicylat durch humane Kadaverhaut, während die Permeation des lipophileren Propranolols kaum beeinflusst wurde (Kirjavainen et al. 1999). Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass Modellvesikels aus humanen SC-Lipiden durch Behandlung mit

ethanolhaltigen Liposomen zum Zerreißen neigen. Folglich könnte in Anwesenheit von Ethanol die Mischung der Liposomenlipide mit den Lipiden des SC erhöht und daher dessen Barrierefunktion stärker gestört sein als ohne Ethanol. Liposomen zeigten eine gesteigerte Akkumulation des Wirkstoffs CsA im SC frisch exzidiierter Humanhaut, wenn 10 oder 20 % Ethanol in der wässrigen Phase enthalten war (Verma D. D. und Fahr 2004). Die ethanolhaltigen Vesikel wurden als Invasomen bezeichnet (Verma D. D. 2002).

Es wird die Frage erörtert, ob die positiven Wirkungen von Phospho- und Sphingolipiden auf der Haut zwingend an vesikuläre Strukturen gebunden ist oder ob deren bloße Anwesenheit in der Formulierung zum gleichen Ergebnis führt (Daniels 2001). Es ist vorstellbar, dass die Fusion von Lipiden der Formulierung mit denen des SC auch aus nichtvesikulären Strukturen stattfindet. Zugelassene Produkte deklarieren oftmals nur das Lipid (meist Phosphatidylcholin) als Hilfsstoff und nicht die vesikuläre Struktur, was möglicherweise aber auch nur das Zulassungsverfahren vereinfachen soll. Hametum<sup>®</sup> Creme mit Hamamelisextrakt wird zur Behandlung entzündeter Haut eingesetzt, wobei das PC in eine o/w Emulsion eingearbeitet wurde (vgl. Ghyczy 1998).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass konventionelle Liposomen bzw. PC als Hilfsstoff vor allem zu einer Anreicherung von Arzneistoffen in der oberen Epidermis bei gleichzeitig geringerer systemischer Verfügbarkeit führen. Ceramidvesikel bauen im Vergleich zu Liposomen ein höheres Wirkstoffdepot im Stratum corneum auf, verstärken die Fusion von Vesikellipiden mit denen des Stratum corneum, haben eine bessere Verträglichkeit und verringern die systemische Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen. Die penetrationsfördernden Wirkungen von Lipidvesikeln können durch kleine Partikelgrößen von ca. 100-200 nm, ein positives Zetapotenzial sowie durch Zusatz von Ethanol in der hydrophilen Phase verstärkt werden. Cholesterol in der Membran erhöht die Membranstabilität, sorgt aber auch für das Vorhandensein verschiedener Lipiddomänen in der Membran, die für die Wirkstoffpenetration einen wichtigen Einfluss haben. Eine sehr niedrige Mikroviskosität der Vesikelmembran fördert vor allem den transdermalen Wirkstofftransport.



### 4.1.3 Lipidvesikel zur ophthalmologischen Applikation

Mit der ophthalmologischen Applikation von Liposomen konnten in den meisten Fällen eine verbesserte okuläre Verfügbarkeit sowie verlängerte Wirkdauer verschiedener Arzneistoffe im Vergleich zu Lösungen oder Suspensionen erzielt werden.

Der Effekt der liposomalen Verarbeitung des hydrophilen Antibiotikums Penicillin G und des lipophilen Indoxol wurde im Vergleich zur freien Lösung bzw. einfacher Solubilisierung mit Polysorbat 80 untersucht (Schaeffer und Krohn 1982). Dabei wurde ein vierfach erhöhter Flux von Penicillin G durch isolierte Kaninchencornea festgestellt, wenn die Liposomenmembran mit Stearylamin positiv aufgeladen wurde. Folglich ist die erste Interaktion zwischen der negativ geladenen Corneaoberfläche und den positiv geladenen Liposomen eine elektrostatische Adsorption. Die Penetration erhöht sich, weil der Wirkstoff leichter über die adsorbierte Vesikelmembran in die Membranen der Epithelzellen übertreten kann. Signifikant höhere Wirkstoffkonzentrationen konnten bei Applikation von liposomal verkapseltem Triamcinolonacetonid im Vergleich zu einer einfachen Suspension des Wirkstoffes in verschiedenen Geweben des Auges gemessen werden (Singh und Mezei 1983). Das hydrophile Antibiotikum Dihydrostreptomycinsulfat zeigte allerdings verkapselt in Liposomen eine niedrigere okuläre Bioverfügbarkeit als aus einer freien Lösung, wobei unter den liposomalen Zubereitungen die positiv geladenen die höchsten Konzentrationen erzielten (Singh und Mezei 1983). Eine verlängerte Wirkdauer von liposomalem Atropin konnte im Vergleich zur freien Lösung im Kaninchenaug nachgewiesen werden, wobei die Wirkdauer bei positiv geladenen Liposomen am längsten anhielt (Meisner et al. 1989). Es wurde versucht, die Effektivität von Pilocarpinnitrat durch Verkapselung in Liposomen zu erhöhen, auf die zusätzlich ein mucoadhäsiver Überzug aus Carbopol 1342 aufgebracht wurde (Durrani et al. 1992). Allerdings führte der Überzug in vitro zu einer verzögerten Freisetzung des Wirkstoffes. Die überzogenen Liposomen führten am Kaninchenaug zu erhöhten AUC-Werten im Kammerwasser sowie zu einer verlängerten Wirkdauer im Vergleich zu einer Lösung der gleichen Konzentration des Wirkstoffes in Phosphatpuffer. Der Effekt von topisch applizierten Liposomen mit CsA auf die Abstoßungsreaktion nach allogener Corneatransplantation wurde an einem Rattenmodell untersucht (Milani et al. 1993). Die mittlere Transplantatüberlebenszeit war dabei gegenüber der Behandlung mit CsA gelöst in Olivenöl, Leerliposomen sowie unbehandelten Tieren deutlich erhöht. Die Ergebnisse mit liposomal verkapseltem

Tacrolimus (Pleyer et al. 1993, Whitcup et al. 1998) werden in Kapitel 5.9 detailliert diskutiert. In beiden Untersuchungen bestanden die Liposomenmembranen aus den Lipiden Phosphatidylcholin/Phosphatidylserin im Verhältnis 7:3. Die corneale Penetration und Absorption von Aciclovir verkapselt in geladenen liposomalen Systemen wurde untersucht (Law et al. 2000). Stearylamin und Dicetylphosphat wurden benutzt, um eine positive bzw. negative Ladung der Liposomen zu erzielen. Kationische Liposomen zeigten *in vitro* eine geringere Wirkstoffpenetration als anionische oder eine freie Lösung. Demgegenüber ließ sich mit kationischen Liposomen *in vivo* eine deutlich gesteigerte okuläre Bioverfügbarkeit von Aciclovir sowie ein Depoteffekt in der Cornea nachweisen. Morphologische Untersuchungen zeigten eine geschlossene Schicht positiv geladener Liposomen auf der Corneaoberfläche, die zu einer verlängerten Kontaktzeit der Liposomen mit der Cornea führten. Es kann geschlussfolgert werden, dass kationische Liposomen über diesen Mechanismus zu erhöhter Permeation von Aciclovir führen. Es verwundert daher nicht, dass positiv geladene Liposomen mit Aciclovir zu deutlich höheren Kammerwasserkonzentrationen im Kaninchenauge führten als eine Salbe oder eine freie Lösung (Chetoni et al. 2004). Trotz der deutlich geringeren Aciclovir-Dosis von 0,18 mg bei Applikation der Liposomen war die Kammerwasser-AUC nur 1,6 mal kleiner als die AUC nach Applikation einer Dosis von 1,5 mg in der Salbe. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Phospholipidvesikel mit Cholesterol und kationischen Lipiden wie Stearylamin zur Erhöhung der okulären Bioverfügbarkeit schwerlöslicher Arzneistoffe am Auge appliziert werden können.

Über die Fähigkeit zur Solubilisierung schwerlöslicher Arzneistoffe hinaus haben Liposomen auch pflegende und entzündungslindernde Effekte am Auge. Es konnte gezeigt werden, dass ein arzneistoffreies liposomales Augenspray die Symptome des trockenen Auges im Vergleich zu rein wässrigen Augensprays signifikant besser lindern kann (Lee et al. 2004). Dies wird damit erklärt, dass beim trockenen Auge neben der fehlenden Tränenflüssigkeit bei 80 % der Patienten auch Defizite an Lipidbestandteilen im Tränenfilm und an den Geweben festgestellt werden können. Das Augenspray wird auf das geschlossene Auge aufgesprüht und wird unter dem Handelsnamen Tears again<sup>®</sup> vermarktet.

## 4.2 Löslichkeitsverbessernde Arzneiformen zur ophthalmologischen Applikation

Neben den Lipidvesikeln wurden weitere ophthalmologisch verträgliche Arzneiformen auf ihre Eignung zur Solubilisierung von Sirolimus geprüft. Poloxamergele und eine Mikroemulsion wurden außerdem zur Solubilisierung von Everolimus genutzt.

### 4.2.1 Cyclodextrinkomplexe

Cyclodextrine (CD) sind nichtreduzierende cyclische Oligosaccharide aus üblicherweise 6 bis 8 Glucoseeinheiten, die über 1,4- $\alpha$ -glykosidische Bindungen verknüpft sind. Die Benennung der CD richtet sich nach der Anzahl  $n$  der Glucosemoleküle im Ring:  $\alpha$ :  $n = 6$ ,  $\beta$ :  $n = 7$ ,  $\gamma$ :  $n = 8$ . Die Herstellung der nativen CD erfolgt in der Regel auf biotechnologischem Weg durch Hydrolyse von Stärke (vorwiegend Maisstärke) und anschließende Cyclisierung unter Nutzung des bakteriellen Enzyms Cyclodextrin-Glykosyltransferase (CGTase). Die Eigenschaften der CD lassen sich durch Substitutionen an den freien Hydroxylgruppen variieren. Auf diese Weise lassen sich z. B. Methyl-, Hydroxyethyl-, Hydroxypropyl-, Succinyl-, oder Glucosylcyclodextrine darstellen. In der Regel haben diese Derivate eine höhere Wasserlöslichkeit als die nativen CD.

In Ph. Eur. 2005 werden drei CD-Derivate aufgeführt: Alfadex (natives  $\alpha$ -CD) als Cyclohexakis(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glucopyranosyl mit der Summenformel  $(C_6H_{10}O_5)_6$  und einer Molmasse  $M_r$  von 973, Betadex (natives  $\beta$ -CD) als Cyclo- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-heptagluco-pyranosid mit der Summenformel  $(C_6H_{10}O_5)_7$  und  $M_r$  von 1135 sowie Hydroxypropylbetadex (HP- $\beta$ -CD) mit der Summenformel  $C_{42}H_{70}O_{35} (C_3H_6O)_x$ .

Der lipophile Innenraum der CD enthält je nach Derivatisierung unterschiedlich viele Etherbrücken und Hydroxylgruppen. Die Polarität dieses Innenraumes wurde mit derjenigen einer wässrig-ethanolischen Lösung verglichen (Loftsson und Brewster 1996). Molekülteile passender Dimension können in den von CD gebildeten, runden und leicht konischen Hohlraum eingeschlossen und dort unter Verminderung der Ringspannung durch hydrophobe Wechselwirkungen, van der Waals-Kräfte oder

Wasserstoffbrücken fixiert werden (Davies 1988). Daher stehen in wässriger Lösung freie Arzneistoffmoleküle im Gleichgewicht mit Arzneistoffmolekülen, die in den CD-Komplexen eingeschlossen sind. Durch Fremdmoleküle können eingeschlossene Arzneistoffe wieder aus den CD-Komplexen verdrängt werden.

CD und ihre Derivate sind selbst weitgehend untoxisch, können aber Bestandteile von Zellmembranen, z. B. Cholesterol, Phosphatidylcholin, Sphingomyeline, Gallensalze oder Proteine komplexieren (Bentley et al. 1997, Irie und Uekama 1997). HP- $\beta$ -CD ist das am häufigsten in ophthalmologischen Zubereitungen eingesetzte Derivat. Nach ein und mehrfacher Applikation in Konzentrationen bis 12,5 % konnte am Kaninchenauge elektronenmikroskopisch keine Schädigung der cornealen Oberfläche festgestellt werden (Jansen et al. 1990). Die dreimal tägliche Applikation einer 18 % Lösung wurde von 9 Patienten über 28 Tage gut vertragen (Loftsson et al. 1996). Es kann wegen der hohen strukturellen Ähnlichkeit davon ausgegangen werden, dass HP- $\gamma$ -CD ähnlich gut toleriert wird.

Aufgrund ihrer molekularen Ausdehnung und ihres hydrophilen Charakters können biologische Membranen von CD Molekülen nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß durchdrungen werden. Lediglich für das kleine  $\alpha$ -CD und das teilweise lipophile Dimethyl- $\beta$ -CD wurde eine begrenzte Fähigkeit festgestellt, durch Rindercornea zu permeieren (Siefert 1998). Infolge des löslichkeitsverbessernden Effektes kann es in vielen Fällen aber trotzdem zu einer gesteigerten okularen Bioverfügbarkeit eingeschlossener Wirkstoffe kommen. Diese Substanzen treten aus dem Komplex direkt in die Membran über, ohne vorher hydratisiert zu werden.

CD lassen sich auch zur retardierten Freisetzung von Arzneistoffen einsetzen und können damit über die geringere Applikationsfrequenz zu einer besseren Compliance beitragen. CD haltige Augentropfen mit 0,7 proz. Dexamethason zeigten sich in ihrer Wirkung bei einmal täglicher Applikation im Vergleich zu einer dreimal täglich applizierten 0,1 proz. Dexamethasonlösung gleichwertig oder sogar überlegen (Loftsson et al. 2006).

Von den neueren Immunsuppressiva wurden bisher CsA und MMF (vgl. Kapitel 3.3.1.2) in cyclodextrinhaltigen Formulierungen am Auge getestet. 0,025 proz. CsA

konnte in einer wässrigen 4 proz.  $\alpha$ -CD Lösung gelöst werden (Kanai et al. 1989). Diese Formulierung zeigte gegenüber anderen eingesetzten vorwiegend lipophilen Zubereitungen die geringste Toxizität und eine gesteigerte Wirkstoffpenetration in die Cornea. Obwohl im Kammerwasser der Augen behandelter Kaninchen kein CsA nachweisbar war, zeigte sich eine erhöhte Überlebenszeit von Corneatransplantaten. 0,075 proz. CsA gelöst in einer  $\alpha$ -CD Lösung konnte zwar am Kaninchenauge eine experimentell induzierte Uveitis vermindern, zeigte aber keinen Effekt am Rattenauge (Sasamoto et al. 1991). Die Permeation von CsA durch isolierte Kaninchencornea wurde zwischen einer  $\alpha$ -CD Lösung, öligen Tropfen und einer Salbe verglichen (Checks et al. 1992). Obwohl die CsA Konzentration in der CD Lösung etwa achtfach niedriger lag, war die Permeation aus den Vehikeln vergleichbar hoch. Dies deutet einen schwachen permeationssteigernden Effekt der CD-Moleküle an. In dieser Arbeit soll die Löslichkeit von Sirolimus in 10 proz. wässrigen Cyclodextrinlösungen geprüft werden.

#### 4.2.2 Hydrotrope Mischungen mit Kosolventien

Unter **Hydrotropie** versteht man eine starke Steigerung der Wasserlöslichkeit hydrophober, meist organischer Verbindungen (Neuberg 1916). Dabei wird der schwerlöslichen Substanz eine geeignete zweite Komponente zugesetzt, die selbst kein Lösungsmittel ist und oft nur eine begrenzte Löslichkeit in Wasser aufweist. Diese zweite Komponente nennt man hydrotrop. Hydrotrope Substanzen enthalten üblicherweise hydrophile und hydrophobe Molekülteile, wobei der hydrophobe Teil zur Bildung micellarer Strukturen typischerweise zu klein ist (Matero 2002). Hydrotrope Stoffe sind gewöhnlich anionische Komponenten bestehend aus einem aromatischen Ring, der mit einem Sulfat-, Sulfonat- oder Carboxylrest substituiert ist (Ho und Kraus 1982). Typische Beispiele für solche Verbindungen sind Natriumxylensulfonat (SXS), Natriumbenzoat, 5-Methylsalicylat, 5-Ethylsalicylat oder Natrium-3-hydroxynaphthoat (vgl. Schmolzer 2003, Bauduin 2005). Es können aber auch kationische oder neutrale aromatische Verbindungen als hydrotrope Substanzen verwendet werden, z. B. p-Aminobenzoensäurehydrochlorid, Procainhydrochlorid, Resorcinol oder Pyrogallol (Saleh 1985).

Es wird in Analogie zur Micellbildung angenommen, dass die hydrotropen Substanzen gestapelte Aggregate aus planaren aromatischen Ringen bilden, die dann zur Solubilisierung der schwerlöslichen Substanz beitragen können. Diese These eignet sich

allerdings nicht zur Erklärung der hydrotropen Eigenschaften von kurzkettigen Natriumalkanoaten (Danielsson und Stenius 1971) oder Alkylsulfaten (Firman et al. 1985). Daher wurde anhand von Kristallstrukturuntersuchungen versucht, eine alternative Organisationsstruktur zu belegen (Srinivas et al. 1997). Die hydrotropen Substanzen formen demnach offene Stapel, die an lamellare Flüssigkristalle erinnern. In diesen Flüssigkristallen liegen hydrophobe Cluster der unpolaren Regionen alternierend mit den angrenzenden ionischen oder polaren Regionen in einem zweidimensionalen Netzwerk aneinander. Trotz dieser Erkenntnisse wird die Konzentration der hydrotropen Substanz, bei der ein plötzlicher Löslichkeitsanstieg der zu solubilisierenden Substanz auftritt, in Analogie zur Kritischen Micell Konzentration (CMC) als Minimale Hydrotrope Konzentration (MHC) bezeichnet (Balasubramanian et al. 1989). Die MHC-Werte liegen aber mit ca. 1 M deutlich höher als die üblichen CMC Werte von  $10^{-2}$  bis  $10^{-3}$  M.

Zur Steigerung der begrenzten Wasserlöslichkeit der hydrotropen Substanzen werden oft als Kosolventien Lösungsmittel wie Ethanol, Propylenglycol oder Aceton benötigt. Sirolimus konnte in hydrotropen Mischungen mit Kosolventien in Konzentrationen bis zu 11,26 mg/ml eingearbeitet werden (Simamora 2001). Dabei wurden 1,5 – 5 proz. Benzylalkohol (Mischbarkeit mit Wasser ca. 40 mg/ml) und 1,5 - 5 proz. Natriumbenzoat/Benzoensäurepuffer (Wasserlöslichkeit Benzoessäure 3,4 mg/ml) als aromatische hydrotrope Komponenten eingesetzt, die mit 10 proz. Ethanol und 40 proz. Propylenglycol als Kosolventien in wässrigen Mischungen gelöst werden konnten. Die Kosolventien allein erhöhten die Löslichkeit von Sirolimus um etwa zwei Größenordnungen, der Zusatz der hydrotropen Substanzen noch einmal um 1-2 Größenordnungen. Hydrotrope Mischungen ähnlicher Zusammensetzung werden auch vermarktet, um die Löslichkeit hydrophober Benzodiazepine in Injektionslösungen zu verbessern (Badwan et al. 1982, Rote Liste 2006). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich die Konzentration der hydrotropen Stoffe sowie der Kosolventien auf ein ophthalmologisch tolerierbares Maß reduzieren lässt, um Sirolimus in einer Konzentration von 0,1 % in Lösung zu bringen.

### 4.2.3 Poloxamergele

Seit Anfang der 80er Jahre des zwanzigsten Jahrhunderts wurden Polyoxyethylen-Polyoxypropylen (POE-POP) Block Polymere (Poloxamere oder Pluronic) als

Gelbildner und Solubilizer zur Herstellung ophthalmologisch verwendbarer Lösungen in Erwägung gezogen. Die Formulierungen aus diesen Polymertensiden sind gut verträglich und optisch klar. Im Gegensatz zu Gelen aus anderen Polymeren zeigen einige Poloxamergele konzentrationsabhängig mit steigender Temperatur im Bereich zwischen 15 und 25 °C einen Übergang von einer flüssigen Lösung zu einem halbfesten Gel. Poloxamerlösungen können daher nach der Applikation in situ halbfeste Systeme bilden und so die corneale Verweildauer deutlich erhöhen. Poloxamer 407 zählt wegen seiner geringen Toxizität zu den am häufigsten untersuchten Poloxameren in Augengelen.

Der miotische Effekt von Pilocarpinnitrat formuliert in einem 25 proz. Poloxamer 407 Gel war am Kaninchenauge deutlich stärker und länger ausgeprägt als bei Verwendung einer wässrigen Lösung (Miller und Donovan 1982). Gele verschiedener Poloxamere konnten erfolgreich zur Solubilisierung des schwerlöslichen Mydriaticums Tropicamid in einer neutralen Lösung eingesetzt werden, um so die Verträglichkeit im Vergleich zu herkömmlichen Lösungen mit pH 5,0 zu verbessern (Saettone et al. 1988). Die okulare Bioverfügbarkeit erwies sich aus beiden Formulierungen am Kaninchenauge und am Auge des Menschen vergleichbar. Die Löslichkeit und Stabilität der Arzneistoffe Chloramphenicol, Indomethacin und Diclofenac-Na konnte in 10-20 proz. Poloxamergelen im Vergleich zu wässrigen Pufferlösungen gesteigert werden (Siebenbrodt und Keipert 1992). Die drei Arzneistoffe wiesen aus diesen Formulierungen eine verzögerte in-vitro Freisetzung auf. Es konnten mit einem Poloxamergel im Kammerwasser von Kaninchenaugen deutlich höhere Indomethacinkonzentrationen erzielt werden als mit einer kommerziell erhältlichen Indomethacinlösung (Chetoni et al. 2000). Darüber hinaus ließen sich mit dem Gel die Symptome einer experimentell hervorgerufenen Uveitis schneller lindern.

Durch rheologische Messungen wurde nachgewiesen, dass sich durch das Autoklavieren von Poloxamergelen deren Viskosität verringert (Siebenbrodt 1989). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die corneale Verweildauer mit steigender Poloxamerkonzentration ansteigt und maximal etwas über eine Stunde betragen kann (Edsman et al. 1998). Dabei wurde darauf hingewiesen, dass die starke Konzentrationsabhängigkeit der Sol-Gel-Umwandlung in Verbindung mit der Verdünnung der Zubereitung durch die Tränenflüssigkeit auch Probleme mit sich bringt, z. B. im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit der Wirkung. Weiterhin ist eine Applikation der Poloxamerlösung mit Kühlschranktemperatur notwendig, um die

Tropfbarkeit sicher zu stellen. Durch die Kälte verursachte Irritationen der Augen könnten für die lokale Bioverfügbarkeit negative Auswirkungen haben. Es gab daher Versuche, die Sol-Gel-Umwandlung durch Mischungen verschiedener Poloxamere sowie die corneale Verweildauer durch Zusatz des mucoadhesiven Polysaccharids Natriumhyaluronat zu optimieren (Wei et al. 2002). Eine Formulierung aus 21 proz. Pluronic F 127 und 10 proz. Pluronic F 68 war bis 25 °C fließfähig und bei Körpertemperatur halbfest. Darüber hinaus blieb die Mischung bei 35 °C auch vor und nach Verdünnung mit Tränenflüssigkeit bei ihrer hohen Viskosität. Der Zusatz des Natriumhyaluronats verringerte allerdings die Festigkeit des Geles deutlich und brachte daher keinen Vorteil für die Kontaktzeit im Vergleich zu dem oben genannten optimierten Poloxamergel. Zur okularen Applikation von rekombinant hergestelltem humanen Epidermalen Wachstumsfaktor (rhEGF) wurde eine HP- $\beta$ -CD Lösung mit einer Mischung aus 16 proz. Poloxamer 407 und 14 proz. Poloxamer 188 zu einem Gel kombiniert (Kim et al. 2002). Die Stabilität des Proteins im Gel war durch die Komplexbildung mit den Cyclodextrinen bei 4 °C erhöht. Die in vitro Freisetzung von rhEGF war im Vergleich zu einer einfachen Lösung verzögert und verlängerte sich bei einer Erhöhung des rHEGF/CD Verhältnisses von 1:4 auf 1:20 noch weiter. Bei Applikation am Kaninchenauge wurde mit den Gelen eine erhöhte AUC in der Tränenflüssigkeit gemessen, was auf eine verlängerte Anwesenheit des rhEGF im Bereich vor der Cornea hindeutet.

In dieser Arbeit sollte die Löslichkeit von Sirolimus und Everolimus in einem 15 proz. Poloxamer 407 getestet werden.

### 4.2.4 Mikroemulsionen

Im Jahre 1943 wurde beobachtet, dass sich bei Zusatz eines Alkohols zu einer Mischung aus Wasser, Öl und einer Seife definierter Konzentration transparente und flüssige Systeme bilden (Hoar und Schulman 1943). Solche Systeme wurden später als Mikroemulsion bezeichnet (Schulman et al. 1959). Mikroemulsionen sind klare bis opaleszente, einphasige und niedrigviskose Systeme von ölarziger Konsistenz (Danielson und Lindman 1981, Pfüller 1986, Ecclestone 1994). Sie bestehen aus einer lipophilen Komponente, einem Tensid, einem Kocensid (meistens Alkohole wie Propylenglycol oder Butanol) sowie einer hydrophilen Komponente (meistens Wasser). Die lipophile und die hydrophile Komponente sind im eingesetzten



Konzentrationsbereich nicht miteinander mischbar. Trotzdem sind Mikroemulsionen thermodynamisch stabil. Selbst wenn eine Mikroemulsion bei höheren oder niedrigen Temperaturen trüb wird und sich in ihre Komponenten zerlegt, bildet sie sich bei Zimmertemperatur von selbst zurück. Diese selbstformenden Eigenschaften führen in vorteilhafter Weise zu einfachen Herstellungsprozessen.

Mikroemulsionen werden auch als kritische Lösungen bezeichnet. Dieser Begriff reflektiert, dass solche Systeme neben den Eigenschaften von Emulsionen (Streuung von Laserlicht erlaubt häufig Messung von Teilchengrößen) auch Eigenschaften einer Lösung besitzen (Arzneistoffe zeigen eine Sättigungslöslichkeit, aber keinen Verteilungskoeffizienten zwischen lipophiler und hydrophiler Phase, Grenzflächenspannung ist nahe 0 mN/m, thermodynamische Stabilität). Das Öl ist in Wasser gelöst wie auch das Wasser im Öl. Im Nanosekundenbereich bilden sich Öltröpfchen und zerfallen unter Bildung wasserreicher Bereiche wieder. Mikroemulsionen sind daher hochdynamische Systeme, deren Assoziate aufgrund der hohen Flexibilität der Grenzflächen ständigem Aufbrechen und spontanen Reorganisationsprozessen unterworfen sind (Keipert et al. 1989). In Analogie zu Makroemulsionen lässt sich anhand des Verhältnisses von Öl- zu Wasserphase in o/w und w/o-Mikroemulsionen differenzieren. Bei Vorliegen etwa gleicher Anteile an öliger und wässriger Phase bilden sich bikontinuierliche Systeme, bei denen sich beide Bereiche stärker durchdringen und durch eine kontinuierliche tensidreiche Grenzflächenschicht getrennt sind. Auch der HLB-Wert eines Tensids als Maßzahl für das Verhältnis von lipophilen und hydrophilen Gruppen im Molekül entscheidet darüber, welcher Mikroemulsionstyp sich ausbildet. Bei HLB Werten von 4-7 bilden sich w/o-Systeme, bei 9-20 eher o/w-Mikroemulsionen (vgl. Jahn 2002). Der HLB-Wert ist insbesondere bei nichtionischen Tensiden stark temperaturabhängig. Daher wirkt sich eine Temperaturerhöhung negativ auf die Stabilität von o/w-Mikroemulsionen aus, da die hydrophilen Eigenschaften des Tensids abnehmen und eine Phaseninversion eintreten kann.

Die begrenzte Anzahl physiologisch verträglicher Tenside sowie deren hohe benötigte Konzentration sind limitierende Faktoren für die pharmazeutische Anwendung von Mikroemulsionen. Es werden meist Lecithine oder Poloxamere als Tenside eingesetzt. Durch den Herstellungsprozess bedingt können sich bei diesen Hilfsstoffen Chargeninhomogenitäten ergeben. Da das Mikroemulsionsgebiet häufig nur einen sehr

engen Bereich im Phasendiagramm umfasst, kann ein Chargenwechsel dazu führen, dass sich in der ursprünglichen Zusammensetzung keine Mikroemulsion mehr bildet (Lawrence 1996).

Allerdings bieten Mikroemulsionen gerade für die ophthalmologische Applikation auch entscheidende Vorteile: Transparenz, gute Tropfbarkeit, einfache Herstellung, thermodynamische Stabilität, Löslichkeits- und Stabilitätsverbesserung eingearbeiteter Arzneistoffe, Verbesserung der okulären Bioverfügbarkeit und selbstkonservierende Eigenschaften bei mehr als 15 % Kotensid (Keipert 1997, Vandamme 2002). Durch den hohen Tensidgehalt kann vor allem eine Erhöhung der cornealen Permeabilität erwartet werden. Von besonderer Bedeutung ist die Bildung übersättigter Systeme durch Wasseraufnahme. Ein lipophiler Wirkstoff zeigt in der wasserfreien Mischung der Mikroemulsionskomponenten eine Sättigungslöslichkeit, die durch Aufnahme von Wasser absinkt. Kristallisiert der Wirkstoff beim Überschreiten der Sättigungslöslichkeit nicht aus, so bilden sich übersättigte Lösungen mit hoher thermodynamischer Aktivität. Der Wirkstoff hat dann ein hohes Bestreben, das System schnellstmöglich zu verlassen. Die Bioverfügbarkeit schwerlöslicher Wirkstoffe aus solchen Lösungen kann daher deutlich erhöht sein und mit einer verlängerten Wirkdauer einhergehen.

In der Literatur wird seit Ende der 80er Jahre des 20. Jahrhunderts über die Entwicklung ophthalmologisch verträglicher Mikroemulsionen berichtet. Für den relativ hydrophilen Wirkstoff Timolol wurden lecithinhaltige o/w-Mikroemulsionen entwickelt (Gallerate et al. 1988). Zur Erhöhung der Lipophilie des Arzneistoffes wurde Octansäure zugesetzt, die mit Timolol ein Ionenpaar bildet. Auf diese Weise wird die Wirkung der Ölphase als Reservoir zusätzlich verstärkt. Gleichzeitig führte die erhöhte Lipophilie des Wirkstoffes zu einer leichteren Penetration des lipophilen Epithels am Kaninchenauge und damit zu einer höheren lokalen Bioverfügbarkeit des Arzneistoffes (Gasco et al. 1989). Ein ähnliches Formulierungsprinzip konnte auch für Levobunol verwirklicht werden (Gallerate et al. 1993).

Die schwerlöslichen Arzneistoffe Atropin und Indomethacin konnten in o/w-Mikroemulsionen mit den Tensiden Polysorbat 80 und Lecithin formuliert werden (Siebenbrodt und Keipert 1991). Es konnte gezeigt werden, dass Indomethacin in dieser Formulierung eine höhere Stabilität hat als in wässriger Lösung. Die schwerlöslichen Arzneistoffe Chloramphenicol, Indomethacin und Diclofenac-Na wurden später in einer

Mikroemulsion mit dem nichtionischen Tensid Poloxamer 184 verarbeitet (Siebenbrodt und Keipert 1993). Alle drei Arzneistoffe zeigten bei in vitro Freisetzungstests durch eine artifizielle Modellmembran ein verzögertes Freisetzungsprofil im Vergleich zu wässrigen Pufferlösungen, aber eine schnellere Freisetzung als aus Augenölen. Wahrscheinlich beeinflusst die Anwesenheit von Poloxameren die Freisetzungskinetik. Die getesteten Formulierungen blieben bei Lagerung über 12 Monate bei 25 °C klar.

Zur Verbesserung der okularen Verträglichkeit wurden Mikroemulsionen mit Saccharoseestergemischen als Tensiden entwickelt (Keipert und Schulz 1994). Im HET CAM Test wurden diese Zubereitungen als nicht irritierend für Schleimhäute eingestuft. Der Wirkstoff Pilocarpinhydrochlorid zeigte aus diesen Formulierungen eine um etwa 50 % verminderte Freigaberate durch eine Nephrophanmembran im Vergleich zu einer wässrigen Kontrollösung. Pilocarpin wurde auch weiterhin recht ausführlich als Modellarzneistoff für ophthalmologisch verwendbare Mikroemulsionen untersucht, weil die Substanz in der Therapie des Glaukoms sehr gebräuchlich ist und die pharmakologischen Effekte Miosis und verringerter Augeninnendruck experimentell relativ leicht zugänglich sind. Bei Einarbeitung in eine Mikroemulsion mit Lecithin und Miranol als Tenside konnte anhand des verringerten Innendruckes am Kaninchenauge ein verzögerter Wirkungseintritt, aber dafür auch eine länger anhaltende und intensivere Wirkung im Vergleich zu wässrigen Augentropfen nachgewiesen werden (Naveh et al. 1994). Dabei ließ sich auch am unbehandelten Kontrollauge ein gesenkter Augeninnendruck messen, was auf einen systemischen Effekt hindeutet. Bei Einarbeitung von Pilocarpinhydrochlorid in eine o/w Mikroemulsion auf der Basis von Lecithin und Macrogol-1500-glycerolricinoleat konnte in vitro eine verzögerte Freisetzung im Vergleich zu einer wässrigen Lösung festgestellt werden (Hasse und Keipert 1997). Am Kaninchenauge ließ sich mit dieser Zubereitung ein längerer miotischer Effekt messen als mit wässriger Arzneistofflösung, wobei die Kammerwasser-AUC deutlich höher lag. Weder im Draize-Test am Kaninchenauge noch im HET CAM Test konnte für diese Mikroemulsion eine Irritation festgestellt werden, so dass ihr eine akzeptable Verträglichkeit bescheinigt werden kann.

Für die okulare Applikation von Vitamin A (Retinol) und seiner Ester wurden verschiedene Mikroemulsionen mit Polysorbat 60 und 80 sowie Sojalecithinen als Tensiden entwickelt und charakterisiert (Radomska und Dobrucki 2000). Die erarbeiteten Formulierungen zeigten sich bei 20 °C über 6 Monate physikalisch stabil.

Für das lipophile Antibiotikum Chloramphenicol wurde mit den Tensiden Sorbitanmonolaurat (Span 20) und Polysorbat 20 eine o/w Mikroemulsion ohne Alkohole als Kotensid entwickelt (Lv et al. 2006). Der Wirkstoff war über drei Monate Lagerzeit stabiler als in kommerziell erhältlichen Augentropfen, zeigte aber immer noch deutliche Abbauerscheinungen. Alle Komponenten der Mikroemulsion waren als Lebensmittelzusatzstoff zugelassen, so dass eine gute Verträglichkeit zu erwarten ist. Ergebnisse von Verträglichkeitsstudien wurden allerdings nicht gezeigt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Mikroemulsionen im Vergleich zu wässrigen Lösungen am Auge zu einem verzögerten Wirkungseintritt, aber auch zu einer längeren und intensiveren Wirkung führen. Sie lassen sich daher als Retardarzneiform einsetzen.