

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Quantifizierung der Immunsuppressiva mit HPLC-UV

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse beruhen zu einem bedeutenden Teil auf Quantifizierungen der vier Immunsuppressiva Ciclosporin, Mycophenolat Mofetil, Everolimus und Sirolimus. Zu diesem Zweck wurde die HPLC mit UV Detektion eingesetzt. Für eine angemessenen Beurteilung der Resultate sollen Aussagen zu folgenden Parametern getroffen werden:

- Spezifität der Methode
- Bestimmung der Kalibrierfunktion
- Präzision und Richtigkeit der Methode
- Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze
- Stabilität des Analyten.

Spezifität der Methode. Spezifität ist die Eigenschaft einer Methode, ein Analysensignal zu erhalten, das nur von der Konzentration des Analyten abhängig ist. Bei den untersuchten Arzneiformen handelt es sich um relativ einfach zusammengesetzte Matrices. Zur Sicherung der Spezifität wurden bei jeder Testserie arzneistofffreie Proben (Blindproben) der Formulierungen mitanalysiert und die Abwesenheit von Peaks im Bereich der Retentionszeit des Analyten dokumentiert.

Bestimmung der Kalibrierfunktionen, Richtigkeit und Präzision. Der Fehler einer Quantifizierung setzt sich aus dem systematischen und zufälligen Fehler zusammen. Die Richtigkeit einer Methode stellt dabei ein Maß für den systematischen Fehler dar, die Präzision für den zufälligen Fehler. Richtigkeit wird definiert als Abweichung des gemessenen Analyseergebnisses vom richtigen Wert. Der richtige Wert ist häufig nur durch theoretische Überlegungen (Einwaage und Verdünnungen) zu bestimmen, da in der Praxis keine Referenzmethode ohne systematischen Fehler durchgeführt werden kann. Zur Ermittlung der Richtigkeit wird daher die Verwendung mehrerer unabhängiger Einwaagen des Analyten empfohlen.

Als Maß für die Präzision wird die relative Standardabweichung der Mehrfachbestimmung von Proben mit bekannter Konzentration verwendet. Dabei wird zwischen Wiederholpräzision in der Serie und Vergleichspräzision unter variablen Bedingungen (verschiedene Versuchstage, Bearbeiter, Einwaagen) unterschieden (vgl. Döppenschmitt 1996).

Abb. 16 zeigt jeweils eine der aufgenommenen Kalibrierfunktionen jedes Wirkstoffes.

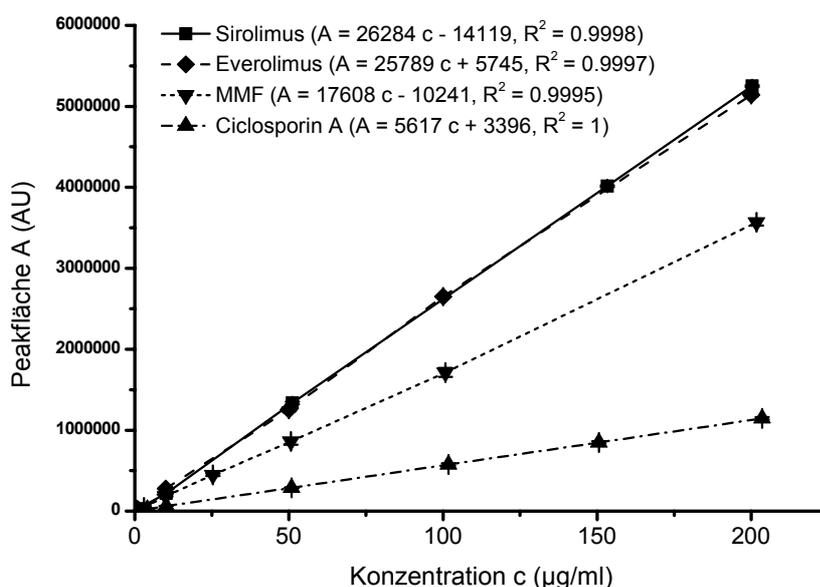


Abb. 16: Kalibrierfunktionen der untersuchten Immunsuppressiva mit ihren Geradengleichungen und dem Bestimmtheitsmaß R^2

Die Geradengleichungen folgen der allgemeinen Form $A \text{ (AU)} = m c \text{ (}\mu\text{g/ml)} + n$ (A = Peakfläche in arbitrary units, c = Konzentration des Analyten). Mit ansteigendem m steigt die Empfindlichkeit der Quantifizierung, d. h. bei gleicher Konzentrationsänderung des Analyten zeigt sich eine größere Änderung des Signals. Folglich vermindert sich die Empfindlichkeit in der Reihenfolge Sirolimus = Everolimus > MMF > Ciclosporin. Der Anstieg m ist im Wesentlichen abhängig von der Absorptionsintensität des Analyten. Die Kalibrierfunktionen von Sirolimus und Everolimus sind untereinander nahezu gleich, da die beiden Wirkstoffe sich lediglich durch eine funktionelle Gruppe unterscheiden. Diese funktionelle Gruppe sitzt soweit entfernt von den drei kumulierten Doppelbindungen, dass deren Absorptionsintensität kaum beeinflusst wird. Das π -Elektronensystem dieser

Doppelbindungen schafft die Voraussetzung für die exzellente Möglichkeit zur UV-Detektion der Wirkstoffe bei 278 nm. Bei dieser Wellenlänge absorbieren typischerweise aromatische Substanzen UV-Licht. Diese sind in den Formulierungen kaum enthalten, so dass nur wenige Störpeaks und eine ruhige Basislinie auftreten (hohe Spezifität). Sirolimus und Everolimus sind zwischen pH 1 und 10 nicht ionisierbar, so dass kleinere pH-Schwankungen im Laufmittel kaum einen Einfluss auf die Trennung haben (geringer multiplikativer systematischer Fehler). Eine Pufferung des Laufmittels ist daher nicht notwendig.

Ein π -Elektronensystem ist am CsA dagegen kaum vorhanden. Dieser Wirkstoff muss daher bei einer weniger gut geeigneten Wellenlänge von 210 nm detektiert werden, die der Eigenabsorptionswellenlänge der Lösungsmittel schon recht nahe kommt. Das Auftreten von Störpeaks ist bei dieser Wellenlänge häufiger, die Basislinie weist ein höheres Grundrauschen auf.

MMF hat zwar ein aromatisches π -Elektronensystem und eine höhere Absorptionsintensität als CsA, zeigt aber trotzdem kaum eine nennenswerte Absorption bei höheren Wellenlängen und wurde daher bei 214 nm detektiert. Die Esterbindung im MMF ist sehr instabil. Darüber hinaus reagiert es wegen seines pKa Wertes von 5,6 auf pH-Schwankungen im Laufmittel sehr empfindlich in Bezug auf die UV-Absorption und die Affinität zur lipophilen stationären Phase (hoher multiplikativer systematischer Fehler). Die Verwendung des lediglich mit Phosphorsäure angesäuerten Laufmittels (nach Jahn 2002) führte daher zu einer sehr niedrigen Reproduzierbarkeit der Retentionszeit und geringer Präzision der Peakflächen. Daher traten in den Kalibriergeraden hohe relative Standardabweichungen im Anstieg m sowie hohe additive systematische Fehler n auf. Das mit Triethylamin/Phosphorsäure auf pH 5,9 eingestellte Laufmittel (vgl. Tab. 29) verbesserte zwar deutlich die Reproduzierbarkeit von Peakflächen und Retentionszeiten, die Schwankungen im Anstieg m der Kalibrierfunktionen blieben aber immer noch deutlich höher als bei Sirolimus/Everolimus und auch größer als beim CsA (vgl. Tab. 2). Wegen überlappender Fremdstoffpeaks aus den Formulierungen (mangelnder Spezifität) wurde schließlich bei sonst konstanter Laufmittelzusammensetzung ein pH-Wert von 3,5 eingestellt, um die Retentionszeit auf einen peakfreien Abschnitt im Chromatogramm zu verschieben. Mit diesem Fließmittel wurden die MMF-Bestimmungen in dieser Arbeit durchgeführt.

Die relative Standardabweichung s (%) des Anstiegs m über mehrere Jahre bei unabhängigen Einwaagen ermöglicht Aussagen über den multiplikativen systematischen Fehler und über die Vergleichspräzision. Der Summand n drückt den additiven systematischen Fehler der Bestimmung aus und kann als Verschiebung der Kalibriergeraden vom Nullpunkt parallel zur y -Achse aufgefasst werden.

Für eine detaillierte Qualitätsbeurteilung der Richtigkeit und zur Ableitung praxisrelevanter Erkenntnisse wurde Tab. 2 erstellt.

Tab. 2: Anstiege m , Absolutbeträge des additiven systematischen Fehlers $|n|$ in AU und $\mu\text{g/ml}$ sowie die Bestimmtheitsmaße R^2 der über mehrere Jahre mit unabhängigen Einwaagen aufgenommenen Kalibrierfunktionen (\bar{x} , $n = 6$)

	m	$\pm s$ (%)	$ n $ (AU)	$ n $ ($\mu\text{g/ml}$)	R^2	$\pm s$ (%)
Sirolimus	26284	3,8	9642	0,4	0,9998	0,0004
Everolimus	24634	4,1	16376	0,7	0,9996	0,0002
Ciclosporin	5578	9,3	7355	1,3	0,9994	0,0005
MMF	17562	15,9	37578	2,1	0,9989	0,0004

Für Sirolimus und Everolimus sind die Anstiege m mit einer relativen Standardabweichung von etwa 4 % auch über mehrere Jahre sehr konstant. Der multiplikative systematische Fehler liegt folglich sehr niedrig. Daher reicht es, etwa monatlich eine neue Kalibrierfunktion zu erstellen und sich ansonsten auf die routinemässigen Qualitätskontrollproben bekannter Konzentration alle 10 Läufe zu beschränken. Beim CsA zeigt m mittlere relative Standardabweichungen von etwa 9 %. Hier sollte die Überprüfung der Kalibrierfunktion daher häufiger, z. B. wöchentlich erfolgen. MMF hat mit 16 % die höchste relative Standardabweichung von m . Hier muss daher vor jeder neuen Messreihe eine neue Kalibrierfunktion aufgenommen werden. Es konnte gezeigt werden, dass Werte von $s < 5$ % keinen für bioanalytische Bestimmungen relevanten Einfluss auf die Präzision der Methode hat (Döppenschmitt 1996). Verbindliche Grenzwerte sind aber schwer festlegbar, da diese stark von der analytischen Fragestellung abhängen.

Die niedrigen additiven systematischen Fehler n schließen die Richtigkeit der HPLC Anlage, aber auch die verwendeten Waagen, Pipetten und Maßkolben mit ein. Der additive systematische Fehler für Sirolimus und Everolimus liegt mit etwa 0,4 und 0,7 $\mu\text{g/ml}$ am niedrigsten, gefolgt von CsA mit 1,3 und MMF mit etwa 2,3 $\mu\text{g/ml}$. Alle

Bestimmtheitsmaße R^2 liegen nahe 1 und zeigen damit die hohe Übereinstimmung zwischen den Kalibrierfunktionen und den Regressiongeraden.

Zur Darstellung der Wiederholpräzision in der Serie wurden die relative Standardabweichung s_w (%) der Peakflächen mehrfach hintereinander injizierter Wirkstofflösungen abfallender Konzentrationen berechnet (Tab. 3). Unterhalb einer bestimmten Konzentration steigt s_w überproportional an. Dieser Bereich stimmt mit der Größenordnung des additiven systematischen Fehlers n überein.

Tab. 3: Peakflächen von mehrfach injizierten Immunsuppressiva in fallender Konzentration zur Ermittlung der relativen Standardabweichung s_w als Maß für die Wiederholpräzision (\bar{x} , $n=6$)

Wirkstoff	c (µg/ml)	A (AU)	$\pm s_w$ (%)	Wirkstoff	c (µg/ml)	A (AU)	s_w (%)
Sirolimus	200,3	5250882	0,2	Everolimus	200,0	5141027	0,4
	153,3	4015000	0,3		100,0	2650947	0,2
	51,1	1336510	1,1		50,0	1255605	1,9
	10,2	218325	0,2		10,0	278518	0,6
	1,0	28215	5,7		1,0	20795	4,4
	0,5	12750	14,3		0,5	12237	11,2
CsA	203,5	1146740	1,3	MMF	201,7	3569401	1,2
	150,6	849230	1,8		100,8	1713397	3,2
	101,8	574905	2,6		50,6	859329	4,5
	50,9	287392	2,4		25,4	449105	3,0
	10,2	63223	2,7		10,0	183930	3,6
	4,1	25007	6,4		3,0	48153	3,9
				0,6	13540	19,5	

Zur Darstellung der Richtigkeit und Vergleichspräzision wurden die Mittelwerte der Qualitätskontrollproben bekannter Konzentrationen in Tab. 4 dokumentiert. Die Abweichungen der relativen Richtigkeit d_{rel} von 100 % sind für Sirolimus, Everolimus und Ciclosporin sehr gering, bei MMF etwas größer. Bei niedrigen Konzentrationen von ≈ 10 µg/ml weicht d_{rel} erwartungsgemäß stärker von 100 % ab als bei hohen Konzentrationen. Eine hohe Vergleichspräzision drückt sich in niedrigen relativen Standardabweichungen s_v (%) der Mittelwerte aus. Die Vergleichspräzision verringert sich bei niedrigen Konzentrationen (z. B. CsA 50,1 µg/ml: $s_v = 1,0$ %, CsA 10,1 µg/ml: $s_v = 9,5$ %). MMF-Bestimmungen sind bei vergleichbarer Konzentration weniger präzise als Bestimmungen der anderen Arzneistoffe (MMF 103,3 µg/ml: $s_v = 6,6$ %;

Everolimus 100,0 µg/ml: $s_v = 3,1 \%$). Die Vergleichspräzision (s_v , vgl. Tab. 4) ist im Vergleich zur Wiederholpräzision (s_w , vgl. Tab. 3) geringer (z. B. Sirolimus 10,2 µg/ml: $s_v = 7,2 \%$; $s_w = 0,2 \%$). Die maximale Abweichung sollte in Anlehnung an gängige Akzeptanzkriterien für Qualitätskontrollproben 20 % nicht überschreiten (Arnoux und Morrison 1992). Diese Kriterien wurden für alle vier Arzneistoffe erfüllt.

Tab. 4: Berechnete richtige Konzentrationen μ von Qualitätskontrollproben, gemessene Mittelwerte \bar{x} mit relativer Standardabweichung s_v und Richtigkeit d

Wirkstoff	n	μ (µg/ml)	\bar{x} (µg/ml)	$\pm s_v$ (%)	d (µg/ml)	d_{rel} (%)
Sirolimus	10	10.2	9.5	7.2	-0.7	92.9
	9	51.1	51.6	2.8	0.5	101.1
Everolimus	13	50.0	50.0	5.1	0.0	100.0
	6	100.0	100.6	3.1	0.6	100.6
CsA	6	10.1	10.2	9.5	0.1	102.3
	9	50.1	49.2	1.0	-0.9	98.1
MMF	7	14.8	12.0	8.8	-2.8	80.8
	8	103.3	99.3	6.6	-4.0	96.1

n = Anzahl der in Dreifachbestimmung ermittelten Messwerte; s_v = Standardabweichung des Mittelwertes (Vergleichspräzision); $d = \bar{x} - \mu$; d_{rel} = relative Richtigkeit, $\bar{x} * 100 \% / \mu$

Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen. Die Definition der Grenzwerte instrumenteller Analysenverfahren wurde in älteren Arbeiten häufig anhand des Signal/Rauschabstandes vorgenommen. Die Bestimmungsgrenze eines Analysenverfahrens wurde bei einem Signal/Rauschabstand von 6:1, manchmal auch 10:1 festgelegt (Kromidas 1999). Für Sirolimus/Everolimus lag ein Abstand von 6:1 bei einer Konzentration von 0,2 µg/ml vor (vgl. Abb. 17), beim CsA und MMF bei 0,5 – 1 µg/ml.

Genauer ist jedoch, die analytischen Grenzwerte anhand des Blindwertes eines Verfahrens (Grundrauschen) und dessen Standardabweichung festzulegen:

$$NG = w_{BI} + 3 s_{BI}; \quad EG = w_{BI} + 6 s_{BI}; \quad BG = w_{BI} + 9 s_{BI}$$

wobei NG, EG und BG Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze sind, während w_{BI} der Blindwert (Grundrauschen) und s_{BI} seine Standardabweichung darstellen. In der Praxis ist die quantitative Erfassung eines Blindwertes allerdings häufig schwierig.

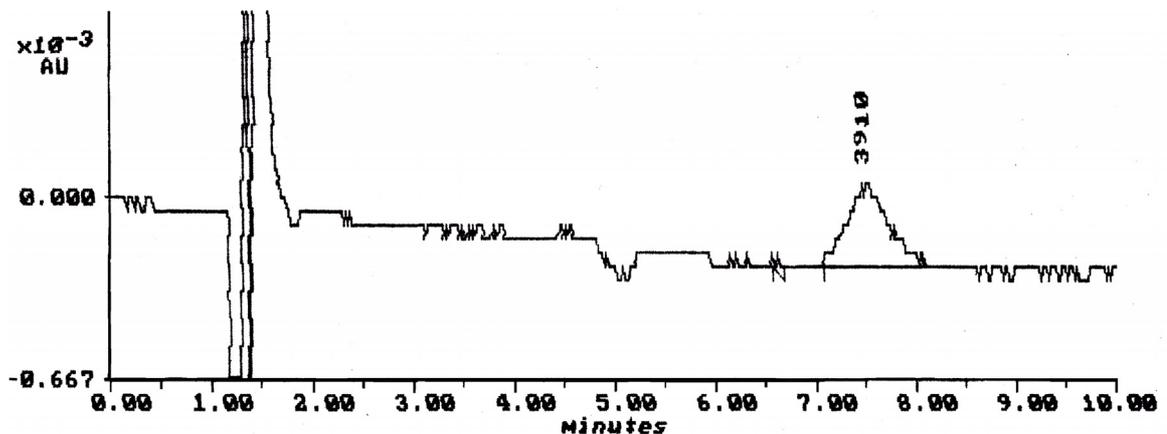


Abb. 17: Chromatogramm einer Sirolimuslösung 0,2 µg/ml mit einem Signal/Rausch Abstand von 6:1

Bei der Validierung von Analyseverfahren kann daher alternativ eine Regressionsanalyse durchgeführt werden. Die analytischen Grenzwerte ergeben sich dabei nach DIN 32645 und der Vertrauensbereich nach DIN 38402 aus der Streuung der Kalibrationspunkte um die Ausgleichsgerade. Die nach DIN 32645 über das Kalibriergeradenverfahren mit der Software Dintest-online errechneten analytischen Grenzwerte sind in Tab. 5 dargestellt. Vor der Zulassung zur Berechnung erfolgte ein Linearitätstest nach Mandel, die Prüfung der Varianzhomogenität, eine Prüfung auf Ausreißer (F-Test) und die Berechnung des Wichtungsfaktors, der bei Zulassung ungewichteter Auswertung nach DIN 32645 einen Wert von 1 annehmen muss.

Bei der Regressionsanalyse gelangt man zu höheren Grenzwerten als bei der Auswertung des Signal/Rausch Abstandes (z. B. 4,2 µg/ml statt 0,2 µg/ml für Sirolimus, vgl. Tab. 5). Die minimalen therapeutischen Vollblutkonzentrationen zur Prophylaxe der Abstoßungsreaktion transplanteder Organe liegen für Sirolimus, Everolimus und Ciclosporin jeweils bei 7-12 ng/ml, 5-8 ng/ml, und 100-400 ng/ml, sowie für

Mycophenolsäure bei 1-3 µg/ml nach Applikation von MMF. Ein Vergleich dieser Konzentrationen mit den analytischen Grenzwerten (Tab. 5) zeigt, dass die Bestimmungsgrenze der HPLC mit UV Detektion zu hoch liegt, um eine Quantifizierung von Proben aus Penetrations- oder Permeationsversuchen an der Haut oder der Cornea zu ermöglichen. Für solche Untersuchungen müssen Methoden mit niedrigeren Bestimmungsgrenzen genutzt werden, z. B. HPLC-MS, Quantifizierung radioaktiver Isotope oder Immunoassays. Daher wurde in dieser Arbeit ein Immunoassay für die Quantifizierung von Sirolimus in den Akzeptorproben der Permeationsversuche eingesetzt.

Tab. 5: Analytische Grenzwerte berechnet aus den Kalibrierfunktionen der vier Immunsuppressiva gemäß DIN 32645, $\alpha = 5\%$, $k = 3$

	Nachweisgrenze (µg/ml)	Erfassungsgrenze (µg/ml)	Bestimmungsgrenze (µg/ml)
Sirolimus	1,1	2,2	4,2
Everolimus	1,7	3,3	6,5
Ciclosporin	1,3	2,6	5,4
MMF	2,6	5,1	9,8

Es gab Versuche, die Bestimmungsgrenze der HPLC-UV für Sirolimus und Everolimus durch aufwendige Probenvorbereitung auf 1-2 ng/ml zu senken (Svensson et al. 1997, Napoli 2000, Malecki et al. 2000, Baldelli et al. 2005). Dabei wird von 1-2 ml Probenvolumen ausgegangen. Die Aufreinigung erfolgt im Allgemeinen zunächst durch eine Kombination aus Festphasen- und Flüssig/Flüssig Extraktionen. Der Rückstand wird abschließend in einem kleinen Volumen Lösungsmittel wieder aufgenommen, z. B. in 50 µl Methanol. Dies entspricht einer Aufkonzentrierung um den Faktor 20 – 40. Die häufig zu geringe Präzision der Extraktion muss durch Mitführen eines internen Standards, z. B. 32-O-Desmethoxysirolimus, verbessert werden. Das geringe Probenvolumen erlaubt nur eine Injektion pro Messwert, so dass die statistische Absicherung problematisch ist. Alle Glasgeräte müssen silanisiert werden und Kunststoffe dürfen nach Möglichkeit nicht mit den Lösungen in Kontakt kommen, um Oberflächenadsorptionen des Analyten zu verhindern. Die HPLC muss technisch zur Injektion sehr geringer Probenvolumina ausgerüstet sein.

Stabilität des Analyten. Die Aufbewahrung der Stamm- und Kalibrierlösungen von Sirolimus, Everolimus und Ciclosporin erfolgte gemäß der Herstellerangaben in methanolischer Lösung unter Lichtschutz bei -20 °C über max. 6 Monate. MMF-Lösungen sollten unter diesen Bedingungen nach einem deutlich kürzeren Zeitraum von max. einer Woche verworfen werden. Die Proben unbekannter Konzentrationen wurden sofort nach der Probennahme analysiert. Die Stabilität des Analyten wurde daher über die Analysenzeit vorausgesetzt.

Zusammengefasst lassen sich die Quantifizierungen der vier Immunsuppressiva in die folgende Reihenfolge abfallender Richtigkeit und Präzision einordnen: Sirolimus = Everolimus > CsA > MMF. Für die HPLC UV Methode in dieser Arbeit ist bei Sirolimus und Everolimus die Festlegung eines Arbeitsbereiches von 5 – 200 µg/ml sinnvoll, bei MMF und CsA dagegen ein Arbeitsbereich von 10 – 200 µg/ml.

5.2 Herstellung der Lipidvesikel zur dermalen Applikation von CsA und MMF

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von gut verträglichen Lipidvesikeln für die Immunsuppressiva CsA und MMF. Diese Lipidvesikel sollten die geringe Löslichkeit der Arzneistoffe steigern, die Freisetzungsgeschwindigkeit erhöhen und die Penetration der Wirkstoffe in die Haut verbessern. Im folgenden sollen die Eigenschaften definiert werden, die diese Vesikel aufweisen sollten.

1. Die Lipidzusammensetzung sollte eine hohe Ähnlichkeit zu den Lipiden im Stratum corneum haben, um einen günstigen Effekt auf die erkrankte Haut der Patienten auszuüben. Die hohe Ähnlichkeit soll die Penetration der Wirkstoffe in die Haut über eine erhöhte Fusionsneigung der Vesikel mit den Lipidlamellen im Stratum corneum verstärken und gleichzeitig die Wirkung lokal auf die Haut begrenzen (vgl. Kapitel 4.1.2.2).
2. Die Löslichkeit der Arzneistoffe sollte möglichst hoch sein, um ausreichend wirksame Formulierungen herstellen zu können.
3. Es sollten Teilchengrößen von etwa 100 nm erzielt werden, wobei die höchsten Penetrationsraten eingeschlossener Wirkstoffe zu erwarten sind (Verma D. D. et al. 2003a).
4. Eine größtmögliche Gleichförmigkeit der Teilchengrößen sollte erzielt werden, um eine hohe Reproduzierbarkeit der Löslichkeit, Wirksamkeit und Lagerstabilität zu erreichen.
5. Die Zetapotenziale sollten Absolutbeträge über + 30 mV oder unter -30 mV aufweisen, um mindestens mittlere Lagerstabilität zu erzielen (Müller 1996). Von den Lipidvesikeln mit positivem Zetapotenzial ist eine erhöhte Penetration eingeschlossener Wirkstoffe zu erwarten (Song und Kim 2006).

Es sollte geprüft werden, mit welchen Lipidzusammensetzungen sich diese zum Teil gegenseitig ausschließenden Anforderungen am günstigsten umsetzen lassen. Ceramide (CER), Diacylglyceride (DAG), oder Phosphatidylcholin (PC) wurden als Hauptlipide ausgewählt.

5.2.1 Entwicklung der Lipidvesikelrezepturen

5.2.1.1 Wahl der Herstellungsmethode

Die Membranextrusion gestattet Ansatzvolumina von 0,5 bis 1,0 ml und wurde deshalb wegen der begrenzten Verfügbarkeit einiger Hilfs- und Wirkstoffe ausgewählt. Weitere Vorteile sind milde Herstellungsbedingungen, eine gute Steuerbarkeit der Teilchengrößen über den Porendurchmesser der verwendeten Membran, und geringer apparativer Aufwand.

Zur Herstellung der Rohdispersionen für die Extrusion wurde wegen der kleinen Ansatzgrößen die Filmbildemethode benutzt. Das Lösen der einzusetzenden Wirk- und Hilfsstoffe in einem organischen Lösungsmittel ermöglicht eine gute Dosierbarkeit auch geringer Substanzmengen durch Pipettieren der Lösungen.

Um das Problem des Restlösungsmittelgehaltes zu minimieren, sollten die üblichen Chlorkohlenwasserstoffe wie Chloroform oder Dichlormethan durch weniger toxische Lösungsmittel wie Ethanol 96 %, Aceton, Hexan/Ethanol 96 % 2:1 oder Ethylacetat/Ethanol 96 % 2:1 ersetzt werden. Nachteilig ist allerdings die Feuergefährlichkeit dieser Lösungsmittel im Vergleich zu Chlorkohlenwasserstoffen. Leider zeigte sich, dass viele Lipide in Lösungsmitteln ohne Chlorkohlenwasserstoffe nicht in einer brauchbaren Konzentration von mindestens 10 mg/ml (1 %) gelöst werden können. Besonders schwer löslich in allen genannten Lösungsmitteln war Phytosphingosin. Die Ceramide III und IIIB ließen sich zwar mitunter im Ultraschallbad zunächst auflösen, kristallisierten aber häufig aus den Lösungsmitteln ohne Chlorkohlenwasserstoffe schon nach wenigen Stunden wieder aus, vor allem bei Lagerung im Kühlschrank. Hydriertes Lipoid® S 100-3 löste sich erst oberhalb von 30 °C in Ethanol 96 %, fiel aber schon bei Raumtemperatur wieder aus. Beim Hydratisieren der Lipidfilme traten unter Verwendung von Lösungsmitteln ohne Chlorkohlenwasserstoffe Probleme auf, den Lipidfilm vollständig von der Kolbenwand zu lösen. Auf die Verwendung von Chloroform/Methanol 2:1 als Lösungsmittel konnte daher letztlich nicht verzichtet werden.

Zur Reduktion des Restlösungsmittelgehaltes wurden die Lipidfilme vor der Hydratisierung im Vakuumtrockenschrank bei 0,1 kPa und 50 °C für 8 h inkubiert. Diese Maßnahme ist für das Gelingen der Extrusion Voraussetzung, weil sich die Polycarbonatmembranen sonst in der chloroformhaltigen Vesikelformulierung auflösen.

5.2.1.2 Entwicklung der Ceramidvesikel

Die Herstellung von Ceramidformulierungen ist schwierig, weil sich Ceramide und freie Fettsäuren nur schwer in wässrigen Medien dispergieren lassen, vor allem wenn sie lange Fettsäurereste enthalten (Kirjavainen et al. 1999, Imura et al. 2001). Die Auswahl eines geeigneten hydrophilen Tensids ist für die Machbarkeit der Herstellung und im Hinblick auf die Stabilität der Formulierung notwendig. In der Vergangenheit wurden Phospholipide und Cholesterolsulfat als hydrophile Tenside vorgeschlagen (van den Berg 1998, Imura et al. 2001, Produktinformation Lipoid GmbH 2002). Leider kann eine Langzeitapplikation dieser Substanzen die Barrierefunktion der Haut stören (Elias et al. 1984, Produktinformation Natipide II 1996, Sato et al. 1998). Zu hohe Gehalte an Cholesterolsulfat führen zu Störungen im Abschuppungsprozess der Keratinozyten in der obersten Schicht des Stratum corneum und zu verminderter Barrierefunktion. Es sollte daher möglichst eine Alternative zu diesen hydrophilen Tensiden gefunden werden.

Als Vorbild für die Ceramidvesikel diente die Zusammensetzung der Lipidlamellen im Stratum corneum: 40-45 % Ceramide, 25 % Cholesterol, 25 % freie Fettsäuren (Kettenlänge C24-C26, aber auch C16-C18, vor allem Palmitinsäure, Stearinsäure, Ölsäure, Linolsäure). Cholesterol wurde auch deshalb in einer Konzentration von $\approx 25\%$ (m/m) in den Vesikeln verwendet, weil ein angemessener Cholesterolgehalt in der Vesikelmembran eine verstärkte Penetration eingeschlossener Arzneistoffe in die Haut begünstigt (Vrovnik et al. 1997). Die nur in geringen Anteilen von bis zu 5 % im Stratum corneum enthaltenen Lipide Cholesterolsulfat, andere Cholesterolester und sonstige Lipide wurden in den Lipidvesikeln nicht berücksichtigt. Zur Herstellung positiv geladener Vesikel sollte auf den Anteil freier Fettsäuren verzichtet und stattdessen Phytosphingosin inkorporiert werden.

Es wurden zunächst zwei Versuchsreihen mit ceramidhaltigen Lipidvesikeln durchgeführt (Tab. 6). In allen Proben betrug der Lipidgehalt der Formulierung 5 % bzw. 50 mg/ml. Die Summe der Massen ergibt daher in jeder Reihe der Tabelle 50 mg. Die Zahl aus der Tabelle (mg) mit Faktor zwei multipliziert ergibt den Anteil des Lipids (%) in der Vesikelmembran.

Tab. 6: Zusammensetzung von ceramidhaltigen Lipidfilmen mit freien Fettsäuren oder Phytosphingosin

Ceramidvesikel mit freien Fettsäuren	
CER(1)	Ceramid IIIB/Ceramid III/Cholesterol/Ölsäure/Palmitinsäure/ Lipoid [®] S100-3 (12,5/7,5/12,5/10/2,5/5) [mg]
CER(2)	Ceramid IIIB/Cholesterol/Ölsäure/Palmitinsäure/Lipoid [®] S100-3 (20/12,5/10/2,5/5) [mg]
CER(3)	Ceramid IIIB/Cholesterol/Ölsäure/Lipoid [®] S100-3 (20/12,5/12,5/5) [mg]
CER(4)	Ceramid IIIB/Ceramid III/Cholesterol/Lipoid [®] S100-3 (19,5/13/12,5/5) [mg]
Ceramidvesikel mit Phytosphingosin	
CER(5)	Ceramid IIIB/Cholesterol/Lipoid [®] S100-3 (32,5/12,5/5) [mg]
CER(6)	Ceramid IIIB/Cholesterol/Phytosphingosin/Lipoid [®] S100-3 (32/12/1/5) [mg]
CER(7)	Ceramid IIIB/Cholesterol/Phytosphingosin/Lipoid [®] S100-3 (31/12/2,5/4,5) [mg]
CER(8)	Ceramid IIIB/Cholesterol/Phytosphingosin/Lipoid [®] S100-3 (29/11,5/5/4,5) [mg]
CER(9)	Ceramid IIIB/Cholesterol/Phytosphingosin/Lipoid [®] S100-3 (26/10/10/4) [mg]
Gereinigtes Wasser ad 1000 µl	

Die erste Versuchsreihe (CER 1-4) sollte zu negativ geladenen Ceramidvesikeln führen und enthielt daher freie Fettsäuren. Von oben nach unten nimmt der Anteil gesättigter Fettsäuren ab und damit die erwartete Hydratisierbarkeit zu. Probe CER(1) enthält alle Lipide (Ceramid IIIB/Ceramid III/Cholesterol/Ölsäure/Palmitinsäure) in ähnlicher prozentualer Zusammensetzung wie im Stratum corneum. CER(2) enthält kein Ceramid III mit gesättigten Alkylketten mehr, aber noch die gesättigten Palmitinsäure und die ungesättigte Ölsäure. Ceramide und Fettsäuren mit gesättigten Alkylketten sind besonders schwer zu hydratisieren. CER(3) enthält nur noch Ceramid IIIB mit einer ungesättigten Alkylkette und freie ungesättigte Ölsäure. CER(4) ist ein Gemisch der Ceramide IIIB und III ohne Fettsäurezusatz. Der Cholesterolgehalt liegt in allen Proben bei konstant 12,5 mg/ml bzw. 25 % der Vesikelmembran. Als Emulgator wurde in allen Fällen Lipoid[®] S 100-3 mit weitgehend gesättigten Fettsäuren in einer Konzentration von 10 % der Vesikelmembran eingesetzt.

Die zweite Versuchsreihe sollte Vesikel mit positivem Zetapotenzial ergeben. Es sollte geprüft werden, wieviel Phytosphingosin für ein Zetapotenzial von etwa 30 mV enthalten sein muss. Die Rezepturen enthalten daher von oben nach unten Phytosphingosin in ansteigender Masse. Das Verhältnis der restlichen Lipide zueinander blieb konstant. Die Gesamtmasse dieser Lipide wurde anteilmäßig reduziert. Die entscheidenden Schritte bei der Vesikelherstellung sind die Hydratisierung und die

Extrusion. Sämtliche Proben der ersten Versuchsreihe (CER 1-4) waren so hydrophob, dass ihre Lipidfilme nahezu komplett an der Kolbenwand kleben blieben. Im Gegensatz dazu wird in anderen Publikationen über die Herstellung von Vesikeln ähnlicher Zusammensetzung berichtet, z. B. Ceramid III/Cholesterol/Stearinsäure (24/15/11 mg pro ml Formulierung, van den Berg 1998) oder Ceramid III/Ceramid IV/Cholesterol/Palmitinsäure/Cholesterolsulfat (12,5/7,5/12,5/12,5/5 mg pro ml Formulierung, Kirjavainen et al. 1999). Vermutlich war für die Autoren dieser Untersuchungen eine vollständige Hydratisierbarkeit der Proben nicht das oberste Ziel. Bei den phytosphingosinhaltigen Proben verbesserte sich die Hydratisierbarkeit mit steigendem Phytosphingosinanteil von oben nach unten. CER (5) ohne Phytosphingosin war nicht hydratisierbar, ab CER(7) ließen sich die Lipidfilme von der Kolbenwand lösen. Allerdings war die Stabilität der so gebildeten Zubereitungen sehr gering. Eine Extrusion scheiterte häufig an einreißenden Membranen.

Daraus wurden die folgenden Schlussfolgerungen gezogen: Ceramid III mit seiner gesättigten Fettsäure sowie die langkettigen Fettsäuren Ölsäure und Palmitinsäure sind für eine Hydratisierung zu hydrophob. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Zugabe langkettiger Fettsäuren zu Mischungen aus Ceramiden und Cholesterol eine Umwandlung hexagonaler Lipidstrukturen zu orthorhombischen Strukturen bewirkt, wobei sich der Molekülabstand der Lipide von 0,41 auf 0,37 nm verringert (Bouwstra und Ponc 2006). Diese erhöhte Packungsdichte ist vermutlich für die geringe Hydratisierbarkeit der fettsäurehaltigen Lipidfilme verantwortlich. Künstlich hergestellte Mischungen aus Ceramiden und Cholesterol weisen hexagonale Strukturen am Rand und flüssige Packungen im Zentrum auf. Die verminderte Packungsdichte der hexagonalen Lipidstrukturen könnte der Grund sein, warum die Applikation von Ceramidprodukten ohne Zusatz von Cholesterol und freien Fettsäuren die Barrierefunktion der Haut auch stören kann (Mao Qiang 1996, Chamlin et al. 2001, De Pape et al. 2002). Jedenfalls reicht ein Zusatz von 10 % Lipoid® S 100-3 im Lipidfilm nicht aus, um zu hydratisierbaren Lipidfilmen mit Ceramiden zu kommen. Phytosphingosin kann dagegen in einer Konzentration oberhalb von 5 % der Vesikelmembran die Hydratisierung erleichtern. Ab etwa 10 % Phytosphingosin in der Vesikelmembran wurden Zetapotenziale oberhalb von 30 mV erreicht.

Zur Verbesserung der Hydratisierbarkeit wurde die Herstellungsmethode modifiziert. Statt einfachen Schüttelns im temperierten Wasserbad bei 80 °C wurde die

Hydratisierung nun am Ultraschallbad vorgenommen. Dies erleichtert das Ablösen des Lipidfilms und führt gleichzeitig zu verringerten Teilchengrößen der Rohdispersion. Damit sinkt auch die Neigung der Membranen, beim Extrudieren zu verstopfen.

Weiterhin wurden in jeden Rundkolben vor dem Abrotieren der Lösungsmittel sieben Glaskugeln mit einem Durchmesser von 5 mm zugegeben. Diese Glaskugeln vergrößern einerseits im Rundkolben die verfügbare Oberfläche und führen damit zu dünneren Lipidfilmen, die sich schneller hydratisieren lassen. Andererseits wirken die Kugeln wie Mischkörper und verbessern durch ihre rollenden Bewegungen das Ablösen der Lipidfilme von der Kolbenwand. Gleichzeitig verringern sich dadurch die Teilchengrößen der gebildeten Vesikel. Es konnte gezeigt werden, dass der Zusatz solcher Mischkörper die Beladungskapazität der Vesikel für zugesetzte Arzneistoffe erhöhen kann (Yamabe et al. 2003). Dieser Effekt war bei Verwendung von Mischkörpern mit zwei unterschiedlichen Durchmessern am stärksten ausgeprägt. Gleichzeitig beeinflusst der Mischkörperdurchmesser die Größe der gebildeten Vesikel. Größere Mischkörper erhöhen im Vergleich zu kleineren Mischkörpern den Vesikeldurchmesser. Während der Versuche zu dieser Arbeit zeigte sich allerdings, dass kleine Mischkörper von 1 mm Durchmesser große Flüssigkeitsmengen an ihrer Oberfläche adsorbierten, so dass die vollständige Entnahme der Formulierung aus dem Rundkolben oft nicht gelingt. Auf die kleinen Mischkörper wurde daher nach Vorversuchen verzichtet.

Stabile Tensidfilme ergeben sich oft durch Mischungen von Emulgatoren mit verschiedener Phasenlage, also o/w und w/o. Bei den Stratum corneum Lipiden Ceramid, Cholesterol und freie Fettsäuren überwiegen die unpolaren Molekülteile deutlich im Vergleich zu den polaren. Sie sind folglich mit w/o Emulgatoren vergleichbar. Mit dem verbesserten Herstellungsverfahren wurde daher nach o/w Emulgatoren gesucht, die die Hydratisierbarkeit der Lipidfilme aus Ceramiden, Cholesterol und Fettsäuren verbessern können. Zur Verfügung standen Polysorbat 80, Brij[®] 58, Myrj[®] 52, Imwitor[®] 370, Imwitor[®] 375, Imwitor[®] 380, Tagat[®] S und Solutol[®] HS 15. Diese wurden zunächst in einem Anteil von 25 mg pro ml der Gesamtformulierung bzw. 50 % der Vesikelmembran erprobt. Gleichzeitig wurden die langkettigen Fettsäuren durch die mittelkettige Laurinsäure ersetzt und deren Konzentration auf 2 mg/ml bzw. 4 % der Vesikelmembran verringert (Tab. 7).

Tab. 7: Zusammensetzungen der Ceramidvesikel zur Optimierung des hydrophilen Tensids

Ceramidvesikel mit freien Fettsäuren	
CER(10-18)	Ceramid IIIB/Cholesterol/Laurinsäure/X (15,5/7,5/2/25) [mg]

Ceramidvesikel mit Phytosphingosin	
CER(19-25)	Ceramid IIIB/Cholesterol/Phytosphingosin/X (13/7/5/25) [mg]

Gereinigtes Wasser ad 1000 µl

X = Polysorbat 80, Brij[®] 58, Myrj[®] 52, Imwitor[®] 370, Imwitor[®] 375, Imwitor[®] 380, Tagat[®] S, Solutol[®] HS 15

Von den untersuchten hydrophilen Tensiden bildeten nur Brij[®] 58 und Imwitor[®] 375 hydratisierbare Lipidfilme und führten damit zur Bildung von Vesikeln. Allerdings brauchten die Formulierungen mit Brij[®] 58 beim Hydratisieren deutlich weniger Zeit als die mit Imwitor[®] 375. Die Zubereitungen mit Imwitor[®] 375 waren außerdem nur schwer extrudierbar, die Membran verstopfte.

Die Eignung von Brij[®] 58 zur Hydratisierung von ceramidhaltigen Lipidfilmen lässt sich mit der Struktur dieses Tensids begründen. Der langgestreckte Polyoxyethylen-Stearylether besteht aus nur eine Alkylkette, was offenbar eine erleichterte Hydratisierung sowie eine verbesserte Extrudierbarkeit bewirkt. Es ist allgemein bekannt, dass Tenside mit zwei Alkylketten bevorzugt Lipiddoppelschichten ausbilden, während Tenside mit nur einer Alkylkette häufig Mizellen formen. Durch Kombination beider Typen können in Abhängigkeit vom Mischungsverhältnis Vesikel mit unterschiedlichen Mikroviskositäten gebildet werden. Die gleichzeitige Anwesenheit von stabilisierenden und destabilisierenden Molekülen in der Membran verbessert mit ihrer Tendenz zur Verteilung im Bilayer die Möglichkeiten zur Herstellung von fluideren, leichter verformbaren Vesikeln im Vergleich zu konventionellen Liposomen oder Niosomen (Cevc et al. 1992, van den Berg et al. 1999 und 2001). Die Eignung des Partialglycerids Imwitor[®] 375 zur erleichterten Hydratisierung der Ceramidfilme lässt sich dagegen auf den hohen Anteil an Ölsäure und Linolsäure unter den enthaltenen Fettsäureresten zurückführen. Durch die sp²-Hybridisierung der Doppelbindungen entstehen gewinkelte Alkylketten, die eine hohe laterale Packungsdichte der Lipide verhindern und so die Membran fluidisieren.

Mit einer weiteren Versuchsreihe sollte geprüft werden, ob sich der Anteil der hydrophilen Tenside Brij[®] 58 und Imwitor[®] 375 in der Vesikelmembran reduzieren lässt, ohne dass sich dabei die Hydratisierbarkeit vermindert (Tab. 8). Das Verhältnis der restlichen Lipide zueinander blieb konstant. Die Gesamtmasse dieser Lipide wurde anteilmäßig erhöht.

Tab. 8: Zusammensetzung der Ceramidvesikel zur Optimierung des Gehaltes der hydrophilen Tenside Brij[®] 58 und Imwitor[®] 375

Ceramidvesikel mit freien Fettsäuren	
CER(26)	Ceramid IIIB/Cholesterol/Laurinsäure/X (16,5/10/3,5/ 20) [mg]
CER(27)	Ceramid IIIB/Cholesterol/Laurinsäure/X (18,5/11,5/5/ 15) [mg]
CER(28)	Ceramid IIIB/Cholesterol/Laurinsäure/X (19/12/9/ 10) [mg]
CER(29)	Ceramid IIIB/Cholesterol/Laurinsäure/X (20/12,5/12,5/ 5) [mg]
Ceramidvesikel mit Phytosphingosin	
CER(30)	Ceramid IIIB/Cholesterol/Phytosphingosin/X (15,5/9,5/5/ 20) [mg]
CER(31)	Ceramid IIIB/Cholesterol/Phytosphingosin/X (16/10/5/ 15) [mg]
CER(32)	Ceramid IIIB/Cholesterol/Phytosphingosin/X (21,5/13,5/5/ 10) [mg]
CER(33)	Ceramid IIIB/Cholesterol/Phytosphingosin/X (24,5/15,5/5/ 5) [mg]
Gereinigtes Wasser ad 1000 µl	
X = Brij [®] 58 oder Imwitor [®] 375	

Die Proben CER(26-29) mit freien Fettsäuren waren bei beiden hydrophilen Emulgatoren Brij[®] 58 und Imwitor[®] 375 nicht vollständig hydratisierbar. Von den Proben CER(30-33) mit Phytosphingosin war nur CER(30) mit Brij[®] 58 hydratisierbar. Diese Probe ließ sich anschließend auch extrudieren. Daraus folgt, dass Brij[®] 58 in einer Konzentration von > 40 % der Vesikelmembran notwendig ist, um Mischungen aus Ceramiden, Cholesterol und freien Fettsäuren hydratisieren zu können. Unter Verwendung von 10 % Phytosphingosin in der Vesikelmembran kann der Anteil von Brij[®] 58 auf 40 % gesenkt werden.

CsA hat eine gute Löslichkeit in Partialglyceriden. Es wurde daher die Überlegung angestellt, wenigstens in einer Ceramidvesikelzubereitung den Anteil von Brij[®] 58 zugunsten eines Partialglycerids zu verringern. Der geeignetste Kandidat war

Imwitor[®] 375, der freilich allein nicht in der Lage war, einen hydratisierbaren Lipidfilm mit den Ceramiden zu bilden. Daher wurde die Probe CER(10) mit X = Imwitor[®] 375 als Ausgangspunkt für eine weitere Entwicklung gewählt. Der Anteil der hydrophoben Lipide Ceramid IIIB und Cholesterol wurde reduziert, der Anteil Imwitor[®] 375 dagegen erhöht und zusätzlich mit einem kleinen Anteil Brij[®] 58 kombiniert. Das Ergebnis ist die Lipidzusammensetzung in Tab. 9, deren Lipidfilm sich hydratisieren ließ.

Tab. 9: Minimierung des Anteils von Brij[®] 58 zugunsten des Partialglycerids Imwitor[®] 375

Ceramidvesikel mit freien Fettsäuren	
CER(34)	Ceramid IIIB/Cholesterol/Laurinsäure/Imwitor [®] 375/Brij [®] 58 (11/7/2/30/10) [mg]
Gereinigtes Wasser ad 1000 µl	

Abschließend wurden drei Rezepturen für eine detaillierte Charakterisierung sowie eine Löslichkeitsprüfung mit den beiden Immunsuppressiva CsA und MMF ausgewählt: CER(10) mit Brij[®] 58, CER(30) mit Brij[®] 58 sowie CER(34) mit Imwitor[®] 375 und Brij[®] 58. Im folgenden erhielten diese Rezepturen die Bezeichnungen CER(-), CER(+) und CER(I) (vgl. Tab. 32). Das + und – deutet auf das Vorzeichen des Zetapotenzials hin, das I auf den hydrophilen Hauptemulgator Imwitor[®] 375. Der Bestandteil Laurinsäure im CER(I) lässt erwarten, dass CER(I) genauso wie CER(-) ein negatives Zetapotenzial hat.

5.2.1.3 Verbesserung der hydrophilen Phase

Die oben genannten Rezepturen waren zwar hydratisierbar, der erforderliche Kraftaufwand beim Extrudieren aber sehr hoch. Dies führte häufig zu Membranrissen, die durch Einsatz einer günstigeren hydrophilen Phase vermieden werden sollten. Zunächst wurde Phosphatpuffer nach Sörensen pH 5,5; 6,5 und 7,4 getestet. Bei einem pH-Wert von 6,5 ist im allgemeinen die Stabilität von Lipidvesikeln am höchsten. Es zeigte sich allerdings, dass durch den Phosphatpuffer die Hydratisierung der Lipidfilme länger dauert als bei Verwendung reinen Wassers. Gleichzeitig steigt der Kraftaufwand beim Extrudieren an. Auch andere Autoren berichten, dass die Herstellung von

Lipidvesikeln mit Pufferlösungen als hydrophiler Phase erschwert ist (Fröhlich 2000). Niedrige pH-Werte der Puffer wurden in dieser Quelle als Erklärung für die erschwerte Hydratisierung von Vesikeln mit negativem Zetapotenzial in Betracht gezogen. Die Lipidfilme mit freien Fettsäuren lassen sich tatsächlich leichter in Puffern mit pH 7,4 hydratisieren als in Puffern mit pH 5,5. Bei Lipidfilmen mit Phytosphingosin ist es genau umgekehrt. Nach den in dieser Arbeit gewonnenen Erfahrungen hängt die Hydratisierbarkeit allerdings auch von der Ionenstärke des Puffers ab. Mit steigender Konzentration an Puffersalzen sinkt die Hydratisierbarkeit der Lipidfilme. Vermutlich konkurrieren die Ionen mit den Hydrathüllen der Lipide. Darüber hinaus sank die Löslichkeit der Wirkstoffe Pimecrolimus und MMF mit steigender Ionenstärke von Pufferlösungen ab (Fröhlich 2000, Jahn et al. 2001). Daher wurde auf den Zusatz von Puffersalzen zur pH-Wert Einstellung schließlich verzichtet.

Zur Verbesserung der Hydratisierung sowie zur Verringerung des Kraftaufwandes während der Extrusion wurden der wässrigen Phase Glycerol, Sorbitol oder Propylenglycol zugefügt. Es wurde eine Konzentration von jeweils 10 % gewählt. Propylenglycol verbesserte die Hydratisierung effektiver und erleichterte die Extrusion stärker als Glycerol oder Sorbitol. Als günstigste hydrophile Phase wurde daher schließlich Wasser/Propylenglycol 90/10 (v/v) ausgewählt (hydrophile Phase 1, Tab. 32).

5.2.1.4 Entwicklung der Diacylglyceridvesikel

Aufbauend auf den Erfahrungen mit den Ceramidvesikeln sollten Diacylglyceridvesikel durch Substitution des Ceramidanteils in den Lipidfilmen durch Diacylglyceride entwickelt werden. Precirol[®] ATO 5 (hauptsächlich Glyceroldistearat) und Imwitor[®] 742 (Glyceroldicaprylat/Glyceroldicaprinat) standen als Hauptlipide zur Verfügung. Bei diesen Produkten handelt es sich ähnlich wie bei Lecithinen nicht um Reinstoffe, sondern um Mischungen von verschiedenen Lipiden ähnlicher Zusammensetzung.

In einer ersten Versuchsreihe sollten mit dem Precirol[®] Diacylglyceridvesikel mit positivem Zetapotenzial hergestellt werden (Tab. 10). Von oben nach unten sinkt der Anteil des hydrophilen Emulgators Brij[®] 58, so dass die Lipidfilme insgesamt lipophiler und damit schwerer hydratisierbar werden. DAG(1) hatte nach der Hydratisierung sehr

dünnflüssige, schäumende Konsistenz und sah einer einfachen Tensidlösung sehr ähnlich. Möglicherweise hatten sich schon Mizellen gebildet. Die Probe ließ sich leicht durch 50 nm Membranen extrudieren und sah danach eingetrübt, aber gerade noch durchsichtig aus. DAG(2) war bereits schwer hydratisierbar, ließ sich aber noch mit hohem Kraftaufwand durch 400 nm Membranen extrudieren. Die relativ spröden Lipidfilme von DAG(3) und DAG(4) lösten sich nur schwer von der Kolbenwand, klumpten danach und waren nicht extrudierbar.

Tab. 10: Zusammensetzung von Diacylglyceridvesikeln mit Phytosphingosin

Diacylglyceridvesikel mit Phytosphingosin	
DAG(1)	Precirol [®] /Cholesterol/Phytosphingosin/Brij [®] 58 (10,5/3/5/31,5) [mg]
DAG(2)	Precirol [®] /Cholesterol/Phytosphingosin/Brij [®] 58 (16/4/5/25) [mg]
DAG(3)	Precirol [®] /Cholesterol/Phytosphingosin/Brij [®] 58 (28/7/5/10) [mg]
DAG(4)	Precirol [®] /Cholesterol/Phytosphingosin/Brij [®] 58 (32/8/5/5) [mg]

Gereinigtes Wasser ad 1000 µl

Glyceroldistearat ist für die Herstellung von Vesikeln vermutlich nicht gut geeignet, da durch die große Kettenlänge der Stearinsäure zu starre Lipidfilme entstehen. Der hydrophile Bereich des Glyceroldistearat-Moleküls ist im Vergleich zu den langen Fettsäuren sehr klein. Man kann die Lipidfilme zwar mit sehr viel Tensid wie in DAG(1) hydratisieren, allerdings ist unter diesen Bedingungen die Vesikelbildung erschwert. Bereits bei 50 % hydrophilem Tensid in der Vesikelmembran wie im DAG(2) ist eine Extrusion nur noch schwer möglich. Daher sollte die nächste Versuchsreihe mit dem kürzerkettigen Imwitor[®] 742 durchgeführt werden (Tab. 11). Wegen der erschwerten Einarbeitung von Phytosphingosin wurde die Herstellung von Diacylglyceridvesikeln mit positivem Zetapotenzial nicht mehr verfolgt. Um zu nichtionischen Vesikeln zu gelangen, musste Phytosphingosin weggelassen werden.

Imwitor[®] 742 ist im Gegensatz zu Precirol[®] schon bei Raumtemperatur flüssig und bildet daher nach dem Entfernen der Lösungsmittel im dem Rotationsverdampfer optisch klare, flüssige Lipidfilme an der Rundkolbenwand. Allerdings ist die Hydratisierung trotzdem nicht so leicht wie bei Phospholipiden mit ungesättigten Fettsäuren.

Bei der Versuchsreihe nach Tab. 11 nahm von oben nach unten die Hydratisierbarkeit zu, allerdings ließen sich die Proben in allen Fällen so gut wie nicht extrudieren. DAG(8) wurde daher noch einmal mit der hydrophilen Phase Wasser/Propylenglycol 90/10 (v/v) hergestellt. Erst damit gelang auch die Durchführung der Extrusion.

Tab. 11: Zusammensetzung nichtionischer Diacylglyceridvesikel

Nichtionische Diacylglyceridvesikel	
DAG(5)	Imwitor [®] 742 (50) [mg]
DAG(6)	Imwitor [®] 742/Cholesterol (40/10) [mg]
DAG(7)	Imwitor [®] 742/Cholesterol/Brij [®] 58 (35/9/7) [mg]
DAG(8)	Imwitor [®] 742/Cholesterol/Brij [®] 58 (29/7/14) [mg]
Gereinigtes Wasser ad 1000 µl	

In einem weiteren Versuch wurde geprüft, ob sich der hydrophile Emulgator Brij[®] 58 in DAG(8) durch Imwitor[®] 375 ersetzen lässt (Tab. 12).

Tab. 12: Zusammensetzung von Diacylglyceridvesikeln mit Imwitor[®] 375

Diacylglyceridvesikel	
DAG(9)	Imwitor [®] 742/Cholesterol/Imwitor [®] 375 (29/7/14) [mg]
Gereinigtes Wasser ad 1000 µl	

Imwitor[®] 375 ist ein Partialglycerid, dass zur Verstärkung seiner Hydrophilie Ester mit Citronensäure und Milchsäure enthält. DAG(9) besteht daher ausschließlich aus Partialglyceriden und Cholesterol, ist aber keine nichtionische Formulierung. Nach dieser Rezeptur ließen sich Vesikel herstellen. Für weitere Versuche wurden daher die Formulierungen DAG(8) und DAG(9) ausgewählt. Unter Verwendung der hydrophilen Phase Wasser/Propylenglycol 90/10 (v/v) sollten ihre Solubilisierungsmöglichkeiten für CsA und MMF geprüft werden. Nach ihrem jeweiligen hydrophilen Emulgator wurden sie als DAG(B) und DAG(I) bezeichnet (vgl. Tab. 32).

5.2.1.5 Entwicklung der Phospholipidvesikel

Phospholipide sind klassischerweise die Hauptbestandteile von Lipidvesikeln. Im Gegensatz zu den Ceramiden und Diacylglyceriden haben sie deutlich ausgeprägtere hydrophile Kopfgruppen und sind daher wesentlich einfacher zu hydratisieren und zu extrudieren.

Es standen die unhydrierten Sojalecithine Lipoid[®] S 75, Lipoid[®] S 100, das hydrierte Lipoid[®] S 100-3 sowie das unhydrierte Eilecithin Lipoid[®] E 80 zur Verfügung. Sojalecithine bilden im Vergleich zu Eilecithinen etwas größere Vesikel, sind dafür aber bei der Lagerung etwas stabiler. Daher wurden die Sojalecithine für diese Arbeit bevorzugt.

Die weniger aufgereinigten Sorten wie Lipoid[®] S 75 bilden leichter Liposomen als hochgereinigte und können schon bei Raumtemperatur hydratisiert werden. Im Gegensatz dazu müssen die hochgereinigten und hydrierten Sorten wie Lipoid[®] S 100-3 bei etwa 60 °C hydratisiert werden und brauchen dafür trotzdem länger als die weniger aufgereinigten Sorten. Dafür ist die Lagerstabilität der Vesikel aus hydrierten Phospholipiden höher.

Ein interessanter Vertreter ist DMPC. Die enthaltene Fettsäure Myristinsäure ist gesättigt und lässt daher relativ hohe Lagerstabilität erwarten. Trotzdem liegt die Phasenübergangstemperatur reiner DMPC-Liposomen relativ niedrig bei 24 °C. Dieses Lipid ermöglicht daher die Herstellung von Vesikelmembranen, die bei einer Temperatur von 20 °C im Gelzustand hohe Lagerstabilität besitzen, dafür aber nach der Applikation bei 32 °C in den flüssigen Zustand übergehen. Leider ist DMPC im Vergleich zu den natürlichen Sojalecithinen relativ teuer. Es wurde eine Versuchsreihe zur Herstellung positiv geladener DMPC Vesikel durchgeführt (Tab. 13).

Tab. 13: Zusammensetzung von DMPC Vesikeln mit ansteigendem Anteil Phytosphingosin

DMPC Vesikel mit Phytosphingosin	
DMPC(1)	DMPC/Cholesterol (40/10) [mg]
DMPC(2)	DMPC/Cholesterol/Phytosphingosin (39,5/10/0,5) [mg]
DMPC(3)	DMPC/Cholesterol/Phytosphingosin (38,5/9/2,5) [mg]

Gereinigtes Wasser ad 1000 µl

Die Hydratisierung und Extrusion dieser Vesikel gelang bei 30 °C im Gegensatz zu den Lipidfilmen aus Diacylglyceriden und Ceramiden auf Anhieb relativ leicht. Eine weitere Reihe wurde mit Lipoid® S 75 durchgeführt (Tab. 14). Dabei sollte geprüft werden, wie sich ein Zusatz von Polysorbat 80 auf die Phospholipidvesikel auswirkt. Polysorbat 80 hatte sich als gut geeignetes Tensid zur Solubilisierung von MMF erwiesen (Scholz 2003). Mit einer 1, 5 oder 10 proz. Lösung von Polysorbat 80 ließ sich die Löslichkeit von MMF jeweils um den Faktor 4, 17 oder 36 erhöhen.

Tab. 14: Zusammensetzung von negativ geladenen Phospholipidvesikeln

Phospholipidvesikel mit Laurinsäure und Polysorbat 80	
PC(1)	Lipoid® S 75/Cholesterol/Laurinsäure/Polysorbat 80 (16/4/5/25) [mg]
PC(2)	Lipoid® S 75/Cholesterol/Laurinsäure/Polysorbat 80 (28/7/5/10) [mg]
PC(3)	Lipoid® S 75/Cholesterol/Laurinsäure/Polysorbat 80 (32/8/5/5) [mg]
PC(4)	Lipoid® S 75/Cholesterol (40/10) [mg]
Gereinigtes Wasser ad 1000 µl	

Alle Formulierungen mit Lipoid® S 75 liessen sich leicht hydratisieren und extrudieren. Mit steigendem Anteil Polysorbat 80 wurde der Kraftaufwand beim Extrudieren geringer. PC(2) erschien als die Probe mit den günstigsten Eigenschaften. Um zu einer Liposomenformulierung mit positivem Zetapotenzial zu gelangen, wurde der Laurinsäureanteil von 5 mg durch einen gleichen Anteil an Phytosphingosin ersetzt (Tab. 15).

Tab. 15: Zusammensetzung von positiv geladenen Phospholipidvesikeln

Phospholipidvesikel mit Phytosphingosin und Polysorbat 80	
PC(5)	Lipoid® S 75/Cholesterol/Phytosphingosin/Polysorbat 80 (28/7/5/10) [mg]
Gereinigtes Wasser ad 1000 µl	

Formulierung PC (2) und PC (5) wurden schließlich mit der hydrophilen Phase Wasser/Propylenglycol 90/10 (v/v) für weitere Versuche mit den Wirkstoffen CsA und MMF ausgewählt. Nach dem Vorzeichen ihres Zetapotenzials werden sie als PC(-) und PC(+) bezeichnet (Tab. 32).

Die Entwicklung der Vesikelrezepturen lässt sich wie folgt zusammenfassen: Vesikel aus ungereinigten Phospholipiden mit vielen ungesättigten Alkylketten können am einfachsten hergestellt und schon bei Raumtemperatur hydratisiert und extrudiert werden. Vesikel aus Diacylglyceriden sind unter Nutzung von Vertretern mit mittelkettigen Alkylketten bei etwa 60 °C herstellbar. Man braucht allerdings einen hydrophilen Emulgator, um zu extrudierbaren Formulierungen zu gelangen. Vesikel aus Ceramiden benötigen den höchsten technologischen Aufwand. Sie müssen oberhalb von 80 °C hydratisiert und extrudiert werden. Man benötigt einen hohen Anteil eines geeigneten hydrophilen Emulgators sowie 10 % Propylenglycol in der wässrigen Phase, um zu extrudierbaren Formulierungen zu kommen.

5.2.2 Löslichkeit für CsA und MMF

Die Zubereitungen mit den höchsten Löslichkeiten der Arzneistoffe CsA und MMF sollten für eine detaillierte Charakterisierung ausgewählt werden. Dazu wurden jeweils 10 mg Wirkstoff pro ml Formulierung eingesetzt und die Löslichkeiten gemessen (Tab. 16).

Tab. 16: Löslichkeit von Ciclosporin und Mycophenolat Mofetil in Vesikelformulierungen^a

Formulierung	Löslichkeit von Ciclosporin (mg/ml) ^b	Löslichkeit von Mycophenolat Mofetil (mg/ml) ^b
CER(-)	1,05 – 1,52	2,04 – 3,13
CER(+)	0,91 – 1,18	2,56 – 2,72
DAG(B)	6,76 – 6,98	0,35 – 0,36
DAG(I)	5,02 – 5,08	0,85 – 0,87
PC(-)	0,71 – 0,73	4,41 – 4,52
PC(+)	0,83 – 0,88	3,04 – 3,13
DMPC(+)	0,25 – 0,26	0,06 – 0,07

^aHydrophile Phase 1 ^b Spannweite (n = 3)

CsA löst sich gut in Vesikeln aus Diacylglyceriden und etwas weniger gut in Ceramidvesikeln, am geringsten aber in den Phosphatidylcholinvesikeln. Die hohe Löslichkeit von CsA in Partialglyceriden wird bereits zur Herstellung der handelsüblichen peroral applizierbaren Mikroemulsion genutzt (vgl. Kapitel 3.1.2).

Aufbauend auf dieser Erkenntnis wurde Formulierung CER(I) entwickelt (vgl. Tab. 9). MMF löst sich gut in den Phosphatidylcholinvesikeln, etwas weniger in den Ceramidvesikeln und am geringsten in den Diacylglyceridvesikeln. Die positiv geladenen DMPC-Vesikel mit Phytosphingosin waren offenbar für beide Wirkstoffe nicht geeignet. Daher wurde die Entscheidung getroffen, zur Solubilisierung von CsA die Formulierungen CER(-), CER(+), CER(I), DAG(B) und DAG(I) genauer zu untersuchen, während MMF in CER(-), CER(+), PC(-) und PC(+) eingearbeitet werden sollte. Die ausgewählten Vesikelformulierungen wurden hergestellt, detailliert charakterisiert und einem Stabilitätstest über drei Monate unterzogen. Die Ergebnisse der Löslichkeitsbestimmungen mit diesen Vesikeln sind in Tab. 17 zusammengefasst.

Tab. 17: Löslichkeit und Stabilität von Ciclosporin und Mycophenolat Mofetil in Vesikelformulierungen^a

Arzneistoff	Formulierung	Löslichkeit sofort nach der Herstellung (mg/ml) ^b	Konzentration nach drei Monaten Lagerzeit (mg/ml) ^b
Ciclosporin	CER(-)	1,74 – 1,88	1,61 – 2,00
	CER(+)	0,71 – 0,85	0,87 – 1,09
	CER(I)	4,88 – 6,20	6,33 – 8,40
	DAG(B)	6,60 – 7,35	7,65 – 9,55
	DAG(I)	5,02 – 5,99	5,97 – 6,36
Mycophenolat Mofetil	PC(-)	1,15 – 1,38	1,20 – 1,28
	PC(+)	0,33 – 0,36	0,16 – 0,19
	CER(-)	0,44 – 0,52	0,25 – 0,31
	CER(+)	0,26 – 0,39	0,05 – 0,14

^a Hydrophile Phase 1 ^b Spannweite (n = 3)

Die Löslichkeit von CsA in DAG(B), DAG(I) und CER(I) Vesikeln war höher als in CER(-) und CER(+). Die höhere Löslichkeit des CsA in CER(I) im Gegensatz zu CER(-) und CER(+) kann mit der guten Löslichkeit des Wirkstoffes in Partialglyceriden wie Imwitor[®] 375 oder Imwitor[®] 742 assoziiert werden. Es kann kaum ein Abbau des CsA über die Lagerzeit von drei Monaten bei 4 – 8 °C beobachtet werden. Der scheinbar höhere Arzneistoffgehalt nach der Lagerzeit liegt in der Spannweite der Analysenmethode.

Die Löslichkeit von MMF ist in den Vesikeln ohne Pufferung relativ niedrig, auch im Vergleich zu den Proben aus den Vorversuchen. Dies lässt sich durch die starken Schwankungen der MMF-Löslichkeit bei geringen Änderungen des pH-Wertes erklären. Eine höhere MMF Löslichkeit konnte in PC(-) und CER(-) mit Laurinsäure in der Vesikelmembran im Vergleich zu PC(+) und CER(+) gemessen werden, was vermutlich eine Folge des geringeren pH-Wertes in der Formulierung ist. Die höchste Löslichkeit an MMF in Vesikeln mit ungepufferter hydrophiler Phase 1 konnte in PC(-) mit Werten zwischen 1,15 und 1,38 mg/ml gemessen werden. Lipoid® S 75 war das Hauptlipid in dieser Formulierung. Der hohe Anteil anderer Bestandteile (max. 30 %) in diesem Lipid, darunter freie Fettsäuren, kann den pH-Wert zusätzlich vermindern und führt auf diese Weise zu der höheren Löslichkeit von MMF. Daher wurde versucht, in einer weiteren Versuchsreihe durch eine Absenkung des pH-Wertes der hydrophilen Phase die MMF Löslichkeit zu steigern und gleichzeitig reproduzierbarer zu machen.

Zur Auswahl einer geeigneten Säure wurden die physiologischen Gegebenheiten auf der Haut betrachtet. Die Hautoberfläche ist mit einem dünnen Film bedeckt, der aus Talg- und Schweißbestandteilen, Bakterien und losen Hautschuppen besteht und pH-Werte von etwa 4 bis 6,5 aufweist. Dieser Film stellt kein Hindernis für die Penetration von Arzneistoffen dar (Scheuplein und Blank 1971), hat aber eine schwache antimikrobielle Schutzwirkung. Das saure Sekret der Schweißdrüsen enthält u.a. Milchsäure, Brenztraubensäure, Cholin, Harnstoff und verschiedene Aminosäuren (Gebler 2000). Der Talg enthält neben 60 % Triglyceriden, 25 % Wachsestern, 12 % Squalen und 2 % Cholesterolestern (Downing et al. 1986) auch freie Fettsäuren, die bei hydrolytischen Prozessen durch bakterielle Lipasen freigesetzt werden. Aus dem Keratinisierungsprozess stammen Aminosäuren und Abbauprodukte wie 5-Oxoprolinpyroglutaminsäure. Je nach Hauttyp bilden diese Bestandteile eine o/w oder w/o Emulsion. Die Lipide aus dem Hydrolipidfilm interagieren mit dermal applizierten Vesikeln und können zur Formation lipidgefüllter Aggregate führen (van den Berg et al. 1999). Der saure pH-Wert spielt für die Bildung und Strukturierung der epidermalen Lipide und somit der Permeabilitätsbarriere eine essentielle Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass durch Milchsäure die Ceramidbiosynthese von Keratinozyten in vitro um bis zu 300 % ansteigt (Rawlings et al. 1996). Dabei war die L-Milchsäure dem D-Isomer deutlich überlegen. Mit radioaktiv markiertem ^{14}C wurde nachgewiesen, dass die Milchsäure zu Acetat metabolisiert und für die Ceramidsynthese verwendet wurde. Die Milchsäure führte aber auch zu einer Modifikation der synthetisierten

Ceramidderivate. Es konnte gezeigt werden, dass sich nach der Applikation von 4 proz. Milchsäurepräparaten über vier Wochen das Fettsäuremuster im Ceramid I signifikant veränderte. Der Anteil Stearinsäure und Ölsäure verringerte sich, während der Anteil Linolsäure und Palmitinsäure größer wurde.

Der saure pH-Wert des Hydrolipidfilmes ist außerdem wichtig zur Wiederherstellung und Normalisierung der Lipiddoppelmembranen im SC nach mechanischer oder chemischer Schädigung. Es konnte gezeigt werden, dass die Applikation von milchsäurehaltigen Ceramidpräparaten über vier Wochen zu einer gesteigerten Widerstandsfähigkeit der Haut gegenüber Entfettung mit SDS-Lösung und einer verringerten Austrocknung und Schuppung der Haut führte (Rawlings et al. 1996). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die topische Applikation von Hydroxycarbonsäuren zu einer Proliferation von Keratinozyten beitragen (Bartolone et al. 1995). Milchsäuresalze führten zu einer ansteigenden Epidermisdicke bei Hautatrophien, die nach Glukokortikoidbehandlung aufgetreten waren (Lavker et al. 1992).

Diese Untersuchungen belegen, dass die Bedeutung des Hydrolipidfilmes auf der Haut und insbesondere der L-Milchsäure für die korrekte Ausbildung der Lipiddoppelmembranen im Stratum corneum nicht unterschätzt werden sollte. Ungepufferte Formulierungen haben oft eine bessere Verträglichkeit als gepufferte, weil Puffersysteme der Einstellung des physiologischen pH-Wertes entgegenwirken.

Auf der Suche nach einem physiologisch verträglichen System zur Stabilisierung des pH-Wertes unter Vermeidung von Puffersalzen wurde Milchsäure in einer Konzentration von 0,4 % ausgewählt, um die hydrophile Phase von PC- und CER-Vesikeln anzusäuern und die Löslichkeit von MMF zu steigern. Eine Mischung Wasser/Propylenglycol 90/10 (v/v) mit 0,4 % Milchsäure (hydrophile Phase 2) hatte einen scheinbaren pH-Wert von 2,2. In frisch hergestelltem PC(-) und CER(-) mit angesäuerter hydrophiler Phase 2 konnten 7,88 - 10,60 mg/ml bzw. 8,92 - 9,82 mg/ml MMF gelöst werden (Tab. 18).

Leider ist die Stabilität von MMF in wässrigen Medien sehr gering und wird durch das Ansäuern nicht verbessert. Der Arzneistoffgehalt sinkt selbst bei einer Lagertemperatur von 4-8 °C relativ schnell. Die Hydrolyse der Esterbindung und eine Rekristallisation des Arzneistoffes kommen als Ursache für den raschen Abfall des Wirkstoffgehaltes in Frage. In Übereinstimmung mit diesen Messungen berichten auch andere Autoren über eine geringe Stabilität von MMF. Hohe Abbauraten von bis zu 70 % wurden in

wässrigen Lösungen nach nur 24 h Lagerung bei einer relativ milden Temperatur von 37 °C gefunden (Lidgate et al. 2002). Beim Autoklavieren von MMF Lösungen unter Standardbedingungen (121 °C, 15 min, 2 bar) wurden Abbauraten von 57 % gemessen (Scholz et al. 2003). Mycophenolsäure ist das einzige Abbauprodukt bei pH-Werten > 6, während ein Lactonanalogon der Mycophenolsäure, ein Hydroxylacton und andere nicht näher aufgeklärte Strukturen bei pH-Werten < 6 gefunden wurden (Hooijmaaijer et al. 1999). Eine erythroide oder orange Verfärbung wurde nach drei Monaten Lagerzeit von Lipidvesikelformulierungen mit MMF beobachtet. Es gelang der Nachweis, dass die Bildung eines N-Oxids für diese Verfärbung verantwortlich ist (Plätzer 2002). Vermutlich würde eine Lagerung bei Raumtemperatur die Kristallisation des Wirkstoffes vermindern, aber gleichzeitig die Spaltung der Esterbindung beschleunigen. Die niedrige Löslichkeit des MMF in PC(+) sowie die besonders niedrige Wirkstoffstabilität in dieser Formulierung fällt ins Auge. Es kann geschlussfolgert werden, dass diese niedrige Stabilität durch Phytosphingosin als kationisches Lipid in der Phosphatidylcholinmembran verursacht wird. Folglich sollte Phytosphingosin in Phospholipidvesikeln nicht verwendet werden. Es sollte beachtet werden, dass PC(+) mit angesäuerter hydrophiler Phase 2 Lipoid® S 100-3 als Phospholipid enthält anstatt Lipoid® S 75 (vgl. Kapitel 5.2.4).

Tab. 18: Löslichkeit und Stabilität von MMF nach Ansäuern der hydrophilen Phase

Arzneistoff	Formulierung	Löslichkeit sofort nach der Herstellung (mg/ml) ^a	Konzentration nach drei Monaten Lagerzeit (mg/ml) ^a
Mycophenolat Mofetil	PC(-)	7,88 – 10,60	5,27 – 6,90
	PC(+)	0,89 – 1,06	0,21 – 0,37
	CER(-)	8,92 – 9,82	8,18 – 10,40
	CER(+)	4,44 – 5,90	1,73 – 2,19

^a Spannweite (n = 3)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die am besten geeigneten Lipidvesikelformulierungen die Löslichkeit von CsA um Faktor 170 – 290 erhöhen und die von MMF etwa um Faktor 135 – 230 verglichen mit reinem Wasser oder wässrigen Pufferlösungen.

5.2.3 Teilchengrößen und Polydispersitätsindices

Es konnte gezeigt werden, dass die Penetration von liposomal verkapseltem Carboxyfluorescein indirekt proportional zur verwendeten Vesikelgröße war (Verma D. D. 2003a). Daher sollten kleine Vesikelgrößen zwischen 100 und 200 nm erzielt werden, um die Vesikelinfiltration in die Haut zu erhöhen, die verfügbare Diffusionsfläche für die Arzneistoffe zu maximieren und den Okklusionseffekt der Partikel zu vergrößern. Tab. 19 und Tab. 20 zeigen die mittleren Teilchendurchmesser sowie die Polydispersitätsindices der Vesikel.

Tab. 19: Teilchengrößen der Vesikel in den Formulierungen mit Ciclosporin und Mycophenolat Mofetil frisch hergestellt und nach drei Monaten Lagerzeit bei 4 - 8 °C

Arzneistoff	Formulierung	Teilchengröße (nm) ^a	
		frisch hergestellt	3 Monate gelagert
Ciclosporin ^b	CER(-)	91,3 – 98,5	140,8 – 166,7
	CER(+)	114,2 – 124,0	121,3 – 126,9
	CER(I)	159,5 – 207,1	194,8 – 239,3
	DAG(B)	218,4 – 235,6	226,2 – 240,3
	DAG(I)	196,6 – 231,2	202,7 – 242,0
Mycophenolat Mofetil ^b	PC(-)	66,8 – 87,0	202,9 – 227,6
	PC(+)	89,8 – 126,4	84,3 – 183,6
	CER(-)	73,5 – 94,4	77,3 – 92,7
	CER(+)	105,0 – 121,3	106,2 – 125,9
Mycophenolat Mofetil ^c	PC(-)	114,4 – 146,0	149,9 – 275,1
	PC(+)	117,4 – 128,0	130,7 – 137,0
	CER(-)	116,5 – 127,9	126,8 – 221,6
	CER(+)	139,7 – 155,5	165,9 – 262,1

^a Spannweite (n = 3); ^b Hydrophile Phase 1; ^c Hydrophile Phase 2 mit 0,4 % Milchsäure (m/v)

Eine Verringerung des Teilchendurchmessers auf etwa 100 nm gelang für die Formulierungen PC(-), PC(+), CER(-), und CER(+). Die Vesikel in DAG und CER(I) konnten mit einer Größe von etwa 200 nm hergestellt werden. Durch den hohen Gehalt an Partialglyceriden ähneln die Eigenschaften von CER(I) mehr den DAG Vesikeln als den anderen CER Formulierungen. Die mittleren Teilchendurchmesser von CER und DAG Vesikeln mit CsA waren über die Lagerzeit relativ stabil, während bei den MMF Vesikeln die PC Formulierungen und die CER-Vesikel mit angesäuerter hydrophiler

Phase 2 deutliche Steigerungen der Partikeldurchmesser aufwiesen. Die anderen Formulierungen zeigten eine ansteigende Tendenz zur Teilchengrößenerhöhung in der folgenden Reihenfolge: CER(-) < PC(+) << PC(-) mit und ohne Milchsäure. Kleine Teilchengrößenverteilungen ($PI < 0,25$) konnten für frisch hergestellte DAG-Vesikel und alle Vesikel mit positivem Zetapotenzial in hydrophiler Phase 1 beobachtet werden. Breite Teilchengrößenverteilungen ($0,25 < PI < 0,5$) wurden sowohl in allen frisch hergestellten Vesikeln mit negativem Zetapotenzial als auch bei CER Vesikeln mit angesäuerter hydrophiler Phase 2 beobachtet. Der Polydispersitätsindex blieb über die Lagerzeit bei den Formulierungen CER(I), DAG und den Vesikeln mit positivem Zetapotenzial in hydrophiler Phase 1 relativ konstant. Bei den Formulierungen mit negativem Zetapotenzial stieg er dagegen deutlich an. Der Zusatz der Milchsäure in den MMF Formulierungen CER(-) und CER(+) erhöhte den PI auf Werte über 0,6, welcher als Grenzwert für die Bestimmung von Teilchengrößenverteilungen angesehen wird. Diese Erhöhung des PI wird vermutlich durch eine Beeinflussung der Hydratation von Ceramiden und/oder Phytosphingosin durch den niedrigen pH-Wert verursacht.

Tab. 20: Polydispersitätsindices der Vesikelformulierungen mit Ciclosporin und Mycophenolat Mofetil frisch hergestellt und nach drei Monaten Lagerzeit bei 4 - 8 °C

Arzneistoff	Formulierung	Polydispersitätsindex ^a	
		Frisch hergestellt	3 Monate gelagert
Ciclosporin ^b	CER(-)	0,424 – 0,478	0,234 – 0,354
	CER(+)	0,172 – 0,224	0,194 – 0,216
	CER(I)	0,420 – 0,478	0,437 – 0,571
	DAG(B)	0,183 – 0,199	0,149 – 0,220
	DAG(I)	0,131 – 0,188	0,128 – 0,164
Mycophenolat Mofetil ^b	PC(-)	0,254 – 0,374	0,057 – 0,288
	PC(+)	0,150 – 0,211	0,099 – 0,396
	CER(-)	0,363 – 0,482	0,345 – 0,443
	CER(+)	0,207 – 0,241	0,150 – 0,202
Mycophenolat Mofetil ^c	PC(-)	0,090 – 0,100	0,277 – 0,354
	PC(+)	0,215 – 0,315	0,219 – 0,231
	CER(-)	0,228 – 0,421	0,600 – 0,623
	CER(+)	0,500 – 0,587	0,522 – 0,593

^a Spannweite (n = 3); ^b Hydrophile Phase 1; ^c Hydrophile Phase 2 mit 0,4 % Milchsäure (m/v)

5.2.4 Zetapotenziale

Die Ergebnisse der Zetapotenzialmessungen sind in Tab. 21 aufgelistet. Zetapotenziale von ungefähr +30 mV (mittlere Stabilität) konnten in den Formulierungen mit Phytosphingosin und hydrophiler Phase 1 erzielt werden. Werte zwischen -30 und -50 mV wurden in Formulierungen mit Laurinsäure gemessen. Frisch hergestellte DAG Vesikel hatten ohne ionisierbare Lipide wie Phytosphingosin und Laurinsäure kleine Zetapotenziale von -10,0 bis -14,8 mV für DAG(B) und -13,2 bis -20,8 mV für DAG(I).

Tab. 21: Zetapotenziale der Vesikelformulierungen mit Ciclosporin und Mycophenolat Mofetil frisch hergestellt und nach drei Monaten Lagerzeit bei 4 - 8 °C

Arzneistoff	Formulierung	Zetapotenzial (mV) ^a		pH-Wert ^{a, b}	
		Frisch hergestellt	3 Monate gelagert	Frisch hergestellt	3 Monate gelagert
Ciclosporin ^c	CER(-)	-22,9 – -25,5	-20,8 – -24,2	5,22 – 5,25	4,02 – 4,22
	CER(+)	33,3 – 39,9	17,5 – 20,5	5,29 – 5,39	4,78 – 4,78
	CER(I)	-48,7 – -60,1	-36,6 – -49,7	5,61 – 5,84	4,92 – 5,06
	DAG(B)	-10,0 – -14,8	-22,7 – -29,0	5,31 – 5,33	4,97 – 5,03
	DAG(I)	-13,2 – -20,8	-30,9 – -36,9	5,34 – 5,42	4,48 – 4,84
Mycophenolat Mofetil ^c	PC(-)	-57,1 – -57,3	-36,3 – -50,2	5,81 – 6,15	4,05 – 4,20
	PC(+)	24,9 – 26,7	0,8 – 4,9	6,62 – 6,70	5,36 – 5,48
	CER(-)	-26,5 – -33,8	-24,8 – -31,9	5,58 – 5,72	5,07 – 5,25
	CER(+)	44,8 – 45,6	20,7 – 23,1	6,81 – 6,84	6,28 – 6,33
Mycophenolat Mofetil ^d	PC(-)	-6,6 – -18,6	-21,8 – -25,8	4,01 – 4,14	3,70 – 3,85
	PC(+)	43,7 – 48,3	34,8 – 54,7	5,76 – 6,05	5,35 – 5,58
	CER(-)	13,2 – 26,2	11,1 – 13,7	4,08 – 4,23	3,91 – 4,02
	CER(+)	55,5 – 59,3	44,0 – 49,3	6,19 – 6,24	5,92 – 6,12

^a Spannweite (n = 3); ^b pH-Werte der Proben im Zetasizer, nicht in den Vesikelformulierungen; ^c Hydrophile Phase 1; ^d Hydrophile Phase 2 mit 0,4 % Milchsäure (m/v)

Es kann davon ausgegangen werden, dass der Abfall der Zetapotenziale über die Lagerzeit durch die Abspaltung freier Fettsäuren aus den Lipiden verursacht wird. Trotz der niedrigen Zetapotenziale zeigten die DAG Formulierungen zufriedenstellende Stabilität. Das Zetapotenzial von PC(+) blieb knapp unterhalb von +30 mV. Der verwendete Lecithintyp Lipoid[®] S 75 hat einen relativ hohen Anteil freier Fettsäuren. Diese Fettsäuren können in der Vesikelmembran die Ausbildung eines hohen Zetapotenzials offenbar verhindern. Die Zetapotenziale von frisch hergestelltem PC(+) sanken während der Lagerzeit von 24,9 - 26,7 mV auf 0,8 - 4,9 mV. Folglich ist ein

stabiler Einschluss von Phytosphingosin in die Membranen von PC(+) nicht möglich. Über Phasenseparationen zwischen Sphingolipiden und Phospholipiden wurde auch von anderen Autoren berichtet. Die Formation separater Lipiddomänen konnte in gemischten DPPC/Ceramid III Vesikeln festgestellt werden (Imura et al. 2001). Weiterhin ist es nicht ausgeschlossen, dass der Abfall des Zetapotenzials im PC(+) durch eine Reaktion der freien Fettsäuren aus dem Lipoid[®] S 75 mit Phytosphingosin verursacht sein könnte. In der Versuchsreihe PC(+) mit angesäuerter hydrophiler Phase sollten solche Prozesse vermieden werden. Daher wurde Lipoid[®] S 75 durch Lipoid[®] S 100-3 substituiert. Diese Lecithinsorte enthält nicht nur deutlich weniger freie Alkylketten, sondern bildet infolge seiner gesättigten Fettsäuren auch deutlich rigidere Membranen aus. Phasenseparationen sind in solchen Membranen mit erhöhter Mikroviskosität weniger wahrscheinlich als in Membranen mit niedriger Mikroviskosität. Tab. 21 zeigt, dass PC(+) mit Lipoid[®] S 100-3 höhere und deutlich stabilere Zetapotenziale hatte. Die niedrigen Löslichkeiten für MMF (Tab. 18) zeigen aber auch, dass sich die Formulierung trotzdem nicht zur Einarbeitung von Arzneistoffen eignet.

Der Einfluss des pH-Wertes auf das Zetapotenzial kann durch einen Vergleich zwischen den MMF Formulierungen mit und ohne Milchsäurezusatz eingeschätzt werden. Mit fallendem pH-Wert (oder steigender Anzahl von Hydroniumionen) steigen auch die Zetapotenziale. Das Ansäuern der hydrophilen Phase hat auf die negativ geladenen Vesikel einen deutlich stärkeren Einfluss als auf die positiv geladenen Vesikel. Durch Zufügen der Milchsäure steigt das Zetapotenzial von PC(-) und CER(-) um etwa 40 mV, während in PC(+) und CER(+) der Anstieg um etwa 10 – 20 mV deutlich moderater ausfällt. Von den Formulierungen mit Milchsäure in der hydrophilen Phase hat nur noch PC(-) ein negatives Zetapotenzial. Die pH-Werte der Proben im Zetasizer zeigen, dass Phytosphingosin in den Vesikelmembranen die pH-Absenkung puffert. Die pH-Werte der Phytosphingosin enthaltenen Proben von PC(+) und CER(+) waren mit 6,6 bis 6,8 etwas höher als die in den phytosphingosinfreien Proben PC(-) und CER(-) mit 5,6 bis 6,2. Dies könnte der Grund für die höhere Löslichkeit von MMF in Formulierungen mit negativem Zetapotenzial im Vergleich zu Formulierungen mit positivem Zetapotenzial sein.

5.2.5 Stabilität

Die chemische Stabilität von Lipidvesikeln ist durch Lipidoxidation mit reaktiven Sauerstoffspezies, Temperatur, Lichteinfall und durch die Anwesenheit katalytisch wirkender Metallionen ebenso beeinflusst wie durch die Spaltung von Esterbindungen in den Lipiden durch alkalische oder saure Verseifung. Diese Prozesse können durch die Zugabe von Antioxidantien und Chelatbildnern, eine niedrige Lagertemperatur von 4 °C unter Stickstoffatmosphäre sowie durch die Auswahl eines geeigneten Puffersystems beeinflusst werden (vgl. Lasic 1993). Etwas komplizierter stellt sich das Problem der physikalischen Stabilität dar, welche die Vesikelgröße und Größenverteilung, die Lamellenzahl, Oberflächenmodifikationen der Membranen, die Mikroviskosität des Bilayers und die Vesikelaggregation umfasst. Es konnte gezeigt werden, dass sterilisierte Liposomendispersionen bei einer Lagertemperatur von 4 °C über einen Zeitraum von mehreren Jahren stabil sein können (Lasic 1993, Bucke 1996).

Um die physikalische Stabilität der Formulierungen beurteilen zu können, wurden die Teilchendurchmesser (Tab. 19), ihre Teilchengrößenverteilungen (Tab. 20) und die Zetapotenziale direkt nach der Herstellung und nach einer Lagerzeit von drei Monaten bei 4-8 °C gemessen. Die Ergebnisse zeigen, dass diese Parameter in den untersuchten Formulierungen mit CsA annähernd konstant waren. Im Allgemeinen wird die Ansicht vertreten, dass Vesikel mit niedrigen Zetapotenzialen von nahe 0 mV instabil sind. Der Grenzwert von 30 mV für eine mittlere Stabilität wurde allerdings bei Untersuchungen von Suspensionen fester Partikel gewonnen (Müller 1996) und kann nur als Orientierungswert zur Abschätzung der Stabilität flüssiger Vesikel herangezogen werden. Die DAG Formulierungen mit CsA hatten trotz ihres niedrigen Zetapotenzials eine hohe Stabilität.

Es konnte gezeigt werden, dass der mittlere Teilchendurchmesser von CsA haltigen Liposomen mit Ethanol in der hydrophilen Phase relativ stabil über eine Lagerzeit von bis zu 32 Wochen war, während der PI in der selben Zeit deutlich von $< 0,15$ auf $> 0,4$ anstieg (Verma und Fahr 2004). Leider konnten in dieser Quelle keine Daten über die gleichzeitige Stabilität des eingeschlossenen Wirkstoffes CsA gefunden werden.

Obwohl der Wirkstoff MMF aufgrund seiner Esterstruktur eine niedrige Lagerstabilität aufweist, hatten die Lipidvesikel selbst in den MMF Formulierungen CER(-) und

CER(+) mit der ungepufferten hydrophilen Phase 1 relativ konstante Teilchengrößen, Polydispersitätsindices und Zetapotenziale. Demgegenüber ist die Stabilität dieser Vesikel in der mit Milchsäure angesäuerten hydrophilen Phase 2 deutlich geringer. Die Teilchengrößen und Polydispersitätsindizes der Vesikel mit hydrophiler Phase 2 sind bereits frisch hergestellt im Vergleich zu Vesikeln in der hydrophilen Phase 1 erhöht und erhöhen sich während der Lagerzeit noch weiter. Die Vesikel mit Phytosphingosin sind weniger stabil als die mit Laurinsäure. Die Zetapotenziale und die MMF Löslichkeit von PC(+) zeigen, dass diese Formulierung eine besonders geringe Stabilität aufweist, obwohl Phospholipide mit gesättigten Fettsäuren eingesetzt wurden.

Die Entwicklung einer Gefriertrocknungsmethode erscheint sinnvoll, um die Lagerungsdauer auf Zeiten über drei Monaten ausdehnen zu können. Die Bedingungen für die Gefriertrocknung müssen allerdings sehr genau für jede einzelne Formulierung optimiert werden (Radatz 1994). Eine denkbare Alternative wäre die Lagerung der Vesikelformulierungen im gefrorenen Zustand bis zur Abgabe an den Patienten und eine Beschränkung der Haltbarkeit nach dem Auftauen auf vier Wochen.

5.3 Physikochemische Charakterisierung der Vesikel aus Ceramiden und Diacylglyceriden

Die Eigenschaften von Vesikeln sind sehr stark von der Zusammensetzung der Lipide in ihren Membranen abhängig. Es existieren verschiedene Möglichkeiten für die Anordnung dieser Lipide, die sich in sehr unterschiedlichen Membraneigenschaften äussern. In dieser Arbeit sollte geprüft werden, wie die Eigenschaften von Membranen aus Ceramiden oder Diacylglyceriden von denen konventioneller Liposomen abweichen. Die Lipide in einer Doppelschicht gehen beim Überschreiten der Phasenübergangstemperatur T_s nicht aus dem festen Zustand (Gelzustand) direkt in den flüssigen Zustand über, was mit einer Zerstörung der Aggregate verbunden wäre, sondern in den flüssigkristallinen (fluiden) Zustand (Arndt und Fichtner 1986). Unterhalb von T_s liegen die Alkylketten der Fettsäurereste in einer hohen lateralen Packungsdichte und maximal gestreckt vor. Oberhalb von T_s erhalten diese Ketten eine wesentlich höhere Beweglichkeit, wobei sich die lateralen Abstände zwischen den Ketten deutlich vergrößern. Gleichzeitig verringert sich die Dicke der Membran beim Überschreiten von T_s , weil die Fettsäureketten nicht mehr maximal gestreckt vorliegen. T_s hängt stark von der Lipidzusammensetzung des Bilayers ab und ist eine Funktion der Länge der Kohlenstoffketten, des Grades der Ungesättigtheit der Fettsäuren sowie des Wassergehaltes im System. Die Phasenübergangstemperatur hat unter anderem einen starken Einfluss auf die Mikroviskosität der Membran. Es konnte gezeigt werden, dass hochviskose Ceramid- und Phospholipidvesikel im Gelzustand auf der Hautoberfläche ausgedehnte Schichten- und Bilayerstapel ausbilden, während flüssigkristalline Vesikel nicht fusionierten und keinerlei Adsorption zeigten, dafür aber in tieferen Hautschichten Wechselwirkungen mit den SC-Lipiden eingingen (van den Bergh et al. 1999). Folglich beeinflusst die Mikroviskosität der Vesikel die Art der Wechselwirkungen mit dem Stratum corneum sowie die Freisetzungsgeschwindigkeit und die Penetrationstiefe inkorporierter Wirkstoffe. Vesikeln mit niedriger Mikroviskosität werden sehr gute Eigenschaften für einen transdermalen Wirkstofftransport attestiert (Cevc et al. 1998, Guo et al. 2000, Simoes et al. 2004). Die Ausbildung verschiedener Lipiddomänen in der Membran, insbesondere cholesterolreicher Bereiche, beeinflusst offenbar entscheidend den Transport eingeschlossener Wirkstoffe in die Haut (Vrhovnik et al. 1997, Ogiso 1998). In Vesikeln aus Ceramid/Cholesterol war ebenso wie in den Lipidlamellen des humanen Stratum corneum die Anwesenheit von auskristallisiertem

Cholesterin nachweisbar (Bouwstra et al. 2001, Bouwstra und Ponc 2006). Zur Untersuchung der Vesikelmorphologie und der Eigenschaften ihrer Membranen wurden in dieser Arbeit die Kryoelektronenmikroskopie, die Lichtmikroskopie, die DSC sowie die ^1H NMR herangezogen.

5.3.1 Kryoelektronenmikroskopie

Die Morphologie der CER(-) und DAG(B) Vesikel wurde mit Hilfe der Elektronenmikroskopie visualisiert (Abb. 18).

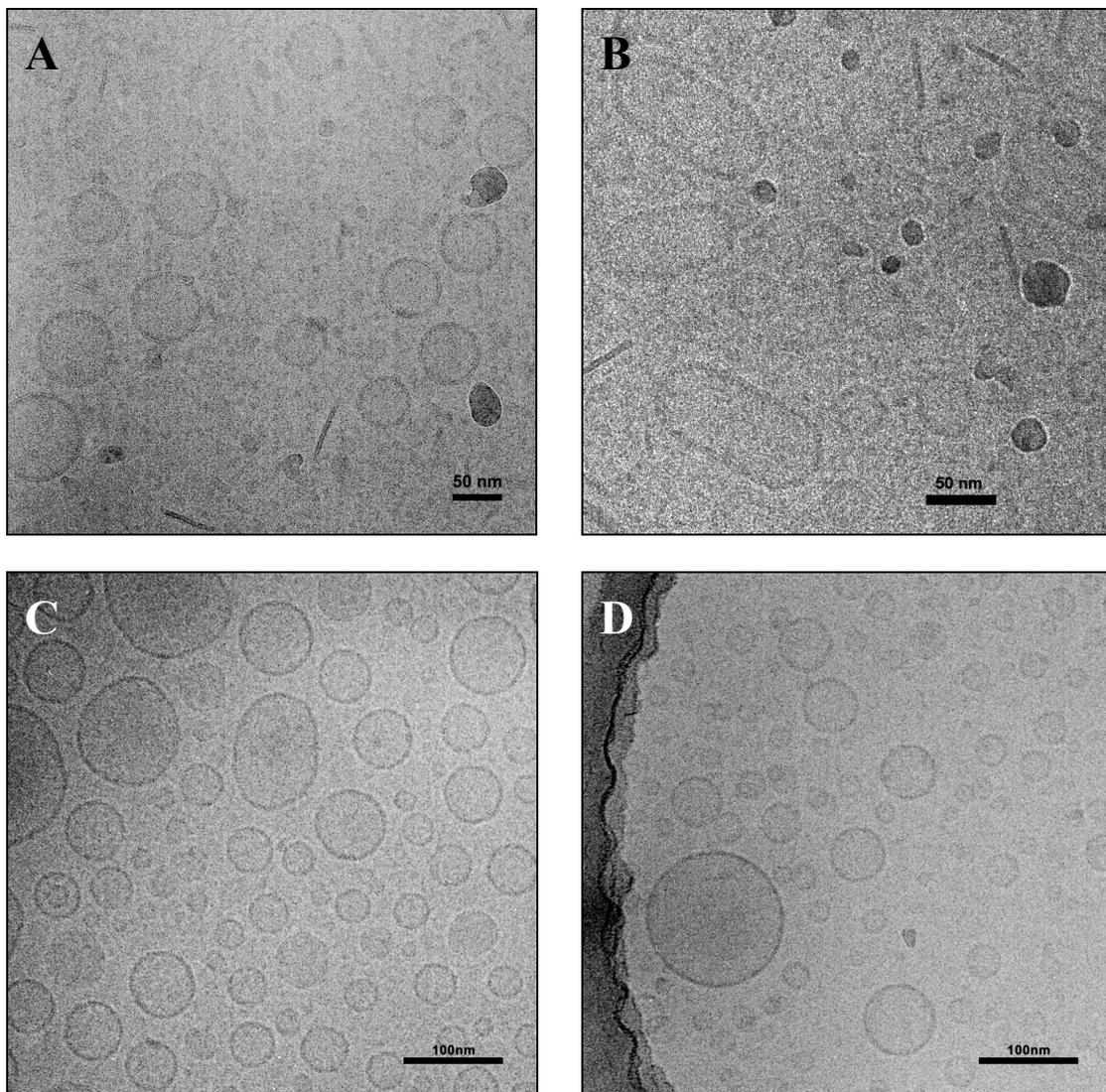


Abb. 18: Elektronenmikroskopische Bilder von Lipidvesikeln, (A) CER(-) ohne Arzneistoff, (B) CER(-) mit MMF in hydrophiler Phase 1, (C) DAG(B) ohne Arzneistoff, (D) DAG(B) mit CsA

Es konnte die Bildung unilamellarer Vesikel festgestellt werden. Solche Vesikel sind bei extrudierten Formulierungen typisch, weil bei dieser Herstellungsmethode die äusseren Schichten multilamellarer Vesikel abgeschält werden. Die Lipidbilayer der Formulierung CER(-) sind sehr gut erkennbar. Bild A zeigt CER(-) ohne Arzneistoff in hydrophiler Phase 1. Die Vesikel sind genau kugelförmig. Die Dicke der CER(-) Membran stimmt mit 3,5 bis 4,5 nm gut mit anderen Literaturwerten für Ceramidvesikel überein, z.B. mit 4,69 nm für Vesikel aus synthetischem Palmitoylceramid (Shah et al. 1995). Gleichzeitig ist die Dicke niedriger als bei den Lipidlamellen des humanen Stratum corneum von 6 und 13 nm (Bouwstra und Ponc 2006). Dies lässt sich mit den kürzeren Alkylketten der synthetisch hergestellten Vesikel im Vergleich zu natürlichen Ceramiden erklären. Weiterhin fehlen die Acylceramide, deren lange Ketten offenbar die Ausbildung höherer Membranschichtdicken begünstigen. Bild B zeigt CER(-) mit MMF in hydrophiler Phase 1. Der Einschluss von MMF verminderte die Membrandicke auf Werte von 3,4 bis 3,6 nm. Die Vesikel wechselten durch den MMF Einschluss von der runden zu einer ovalen Form. Dies zeigt die molekularen Interaktionen zwischen Arzneistoff und Membranlipiden. Die Vesikelgrößen zwischen 50 und 120 nm stimmen gut mit den Ergebnissen der PCS Messungen überein (Teilchengröße zwischen 73,5 und 94,4 nm, PI zwischen 0,363 und 0,482, Tab. 19 und Tab. 20). Es sind Objekte sichtbar, die sich als Membranfragmente interpretieren lassen. Solche Membranfragmente könnten entstehen, wenn die Formulierungen nach der Extrusion bei 80 °C zu rasch abkühlen, so dass den Membranlipiden keine Zeit für eine Reorganisation zu intakten sphärischen Vesikeln bleibt. DAG(B) ohne Arzneistoff in Bild C zeigt eine Abweichung von der idealen Kugelform, vor allem bei den größeren Vesikeln. Solche Abweichungen lassen sich mit einer deutlich kleineren Mikroviskosität der DAG(B) Vesikel verglichen mit den CER(-) Vesikeln erklären. Bei den DAG(B) Vesikeln mit CsA in Bild D lässt sich keine solche Abweichung beobachten. Vermutlich führt der Einschluss von CsA zu schwerer deformierbaren Vesikeln als in DAG(B) ohne Arzneistoff.

5.3.2 Lichtmikroskopie

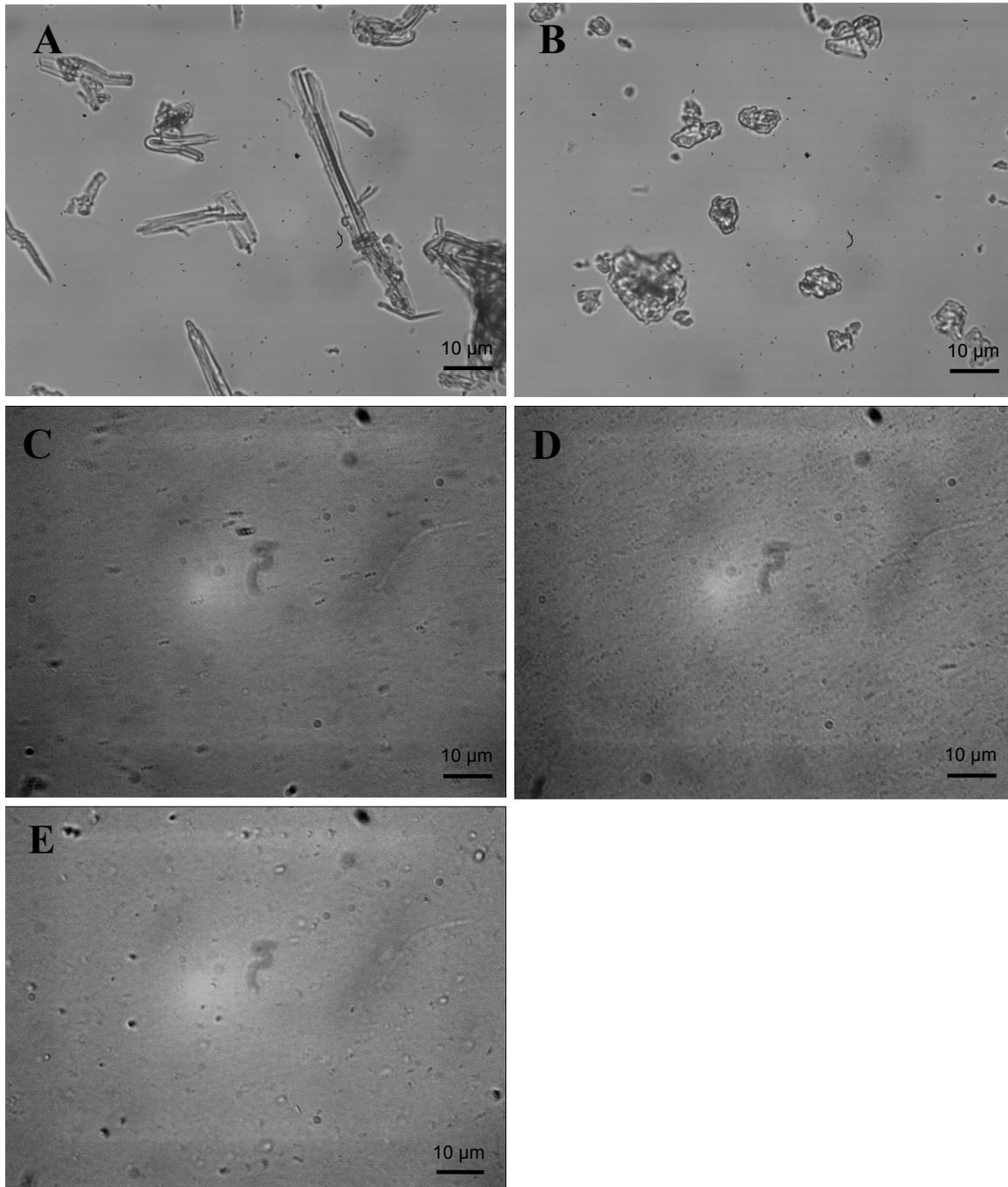


Abb. 19: Lichtmikroskopische Bilder von (A) Ceramid IIIB in kristallinem Zustand, (B) Phytosphingosin in kristallinem Zustand, (C) CER(-) 6 Monate gelagert, (D) CER(+) 6 Monate gelagert; (E) CER(I) 6 Monate gelagert (Vergrößerung 1 000 ×).

Ceramid IIIB und Phytosphingosin sind schwer lösliche Lipide mit hohen Schmelztemperaturen, die in Membranen zu Phasenseparationen und zum Auskristallisieren neigen. Daher wurden die Formulierungen CER(-), CER(+) und

CER(I) unter dem Lichtmikroskop mit polarisiertem Licht untersucht (Abb. 19). Es konnten nach 6 Monaten Lagerzeit keine Kristalle gefunden werden.

5.3.3 Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)

Die DSC kann zur Untersuchung von Lipidwechselwirkungen in Vesikeln benutzt werden, insbesondere zur Detektion ungelöster fester Bestandteile, der Phaseninversionstemperatur oder Phasenseparationen (Oldfield und Chapman 1972, Shah et al. 1995, Holopainen et al. 2000, Garidel et al. 2002). Die DSC kann auch Hinweise auf die Interaktionen von Membranen mit inkorporierten Fremdstoffen liefern. Es konnte gezeigt werden, dass DMPC und Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) Liposomen eine sinkende Phasenübergangstemperatur aufweisen, wenn Phloretin oder 6-Ketocholestanol inkorporiert waren (Valenta et al. 2004). Dies deutet auf eine sinkende Mikroviskosität der Membranen hin. Eine Senkung der Phasenübergangstemperatur wurde auch für Penetrationsenhancer wie Dodecyl-2-(N,N-dimethylaminopropionat) (DDAIP) in DPPC Membranen (Wolka et al. 2004) und 1-Menthol or 1,8-Cineol in artefiziellen Stratum corneum Lipid Membranen registriert (Narishetty et al. 2005). Diese Ergebnisse zeigen, dass solche Enhancer vor allem inter- und intralamellare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Lipiden abschwächen. Dies führt zu einer verminderten Integrität im Stratum corneum und verringert daher dessen Barrierefunktion. Reine und synthetische Lipide wurden bevorzugt in diesen Studien untersucht, um die Interpretation der Ergebnisse zu vereinfachen.

Es ist zu beachten, dass durch eine komplexe Mischung aus drei bis fünf Bestandteilen wie in dieser Arbeit Störungen durch gegenseitige Wechselwirkungen auftreten können. Jedes Lipid hat zusätzlich noch einen Anteil an Verunreinigungen, deren Einfluss auf die DSC Kurven unbekannt ist. Es wurde ein Temperaturbereich bis zu 170 °C gescannt, um die Schmelztemperaturen aller beteiligten Lipide erfassen zu können. Zu diesem Zweck kamen Mitteldrucktiegel zum Einsatz. Dabei ist anzumerken, dass durch den gasdichten Verschluss der Mitteldrucktiegel ab 100 °C der Druck im System stark ansteigt. Ab 110 °C können die Bilayer sich zersetzen und die Lipide dehydratisiert werden. Es kann daher nicht mehr mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass oberhalb von 110 °C noch Vesikel vorliegen. Deshalb ist für die vorliegenden Interpretationen vor allem der Bereich zwischen 20 und 110 °C wichtig.

Es wurden DSC Kurven von allen DAG und CER Formulierungen in hydrophiler Phase 1 sowohl frisch hergestellt als auch nach drei Monaten Lagerzeit aufgenommen. Tab. 22 zeigt die Teilchengrößen, Polydispersitätsindizes und Zetapotenziale dieser Vesikel.

Tab. 22: Teilchengrößen (d), Polydispersitätsindizes (PI) und Zetapotenziale (ZP) der Vesikel aus den DSC Untersuchungen^a

Formulierung	d (nm)	PI	ZP (mV)	pH ^b
CER(-)	110,4 – 114,0	0,253 – 0,303	-28,3 – -31,1	5,12 – 5,32
CER(+)	102,1 – 109,3	0,336 – 0,356	33,1 – 33,5	5,33 – 5,39
CER(I)	200,1 – 204,2	0,401 – 0,409	-50,8 – -53,8	5,59 – 5,71
DAG(B)	220,9 – 229,3	0,143 – 0,223	-10,6 – -19,0	5,29 – 5,36
DAG(I)	213,9 – 224,7	0,148 – 0,228	-15,3 – -15,7	5,34 – 5,50

^a Spannweite, n=3; ^b pH-Werte der Proben im Zetasizer, nicht in den Vesikelformulierungen

Die DSC Kurven von DAG(I) frisch hergestellt, nach drei Monaten Lagerzeit sowie von allen Einzelkomponenten sind in Abb. 20 dargestellt. Die Kurven der Einzelkomponenten zeigen, dass die Partialglyceride Imwitor[®] 742 und 375 bereits bei Raumtemperatur flüssig sind, während die Festsubstanz Cholesterol einen Schmelzpunkt von 147 °C aufweist. Die Abwesenheit von Peaks in den beiden Kurven von DAG(I) zwischen 20 und 100 °C belegt, dass kein Phasenübergang zwischen Gelzustand und flüssig-kristalliner Phase in diesem Temperaturbereich auftritt. Auch nach der Lagerzeit sind weder Phasentrennungen noch Kristallisierungserscheinungen zu beobachten.

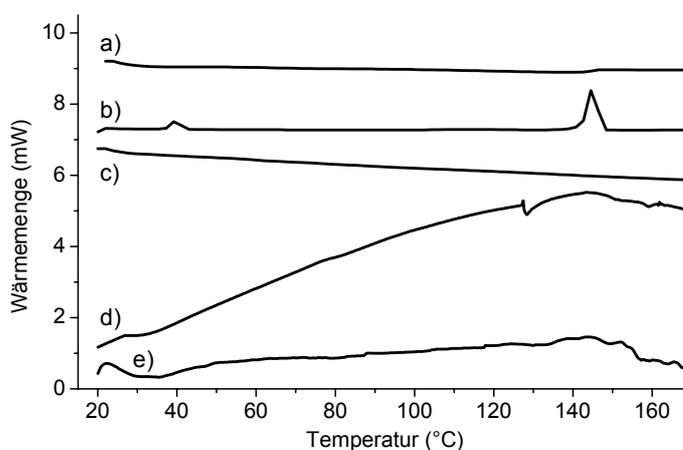


Abb. 20: DSC Scans von DAG(I) und seiner reinen Lipidkomponenten: a) Imwitor[®] 742 b) Cholesterol c) Imwitor[®] 375 d) DAG(I) frisch hergestellt und e) DAG(I) 3 Monate gelagert

Die Abb. 21 zeigt die DSC Scans für DAG(B). Eine Phasenübergangstemperatur sowie Schmelzpunkte von Brij[®] 58 oder Cholesterol können auch in DAG(B) nicht beobachtet werden, aber oberhalb von 70 °C treten exotherme Peaks auf (Kristallisationen und/oder Membranzerstörung). Da sich die Zusammensetzungen von DAG(B) und DAG(I) nur in einer Substitution des hydrophilen Emulgators Brij[®] 58 durch Imwitor[®] 375 unterscheiden, muss Brij[®] 58 für die Instabilität von DAG(B) bei höheren Temperaturen verantwortlich sein. Es ist allgemein bekannt, dass nichtionische Tenside stark auf Temperaturunterschiede reagieren. Die polaren Oxyethylen-Gruppen von Brij[®] 58 (HLB = 15,7) werden mit steigender Temperatur zunehmend dehydratisiert. Folglich sinkt der HLB-Wert unter 15,7 ab. Gleichzeitig werden Van-der-Waals Bindungen zwischen den Stearylketten in Brij[®] 58 und den lipophilen Ketten anderer Moleküle abgeschwächt. Die Dispersion hydrophober Lipide wie Ceramide oder Cholesterol mit Brij[®] 58 wird daher bei höherer Temperatur schwierig. Bei höherer Temperatur können daher in Zubereitungen mit diesem Emulgator kristallisierte Feststoffe nur noch schwer erkannt werden.

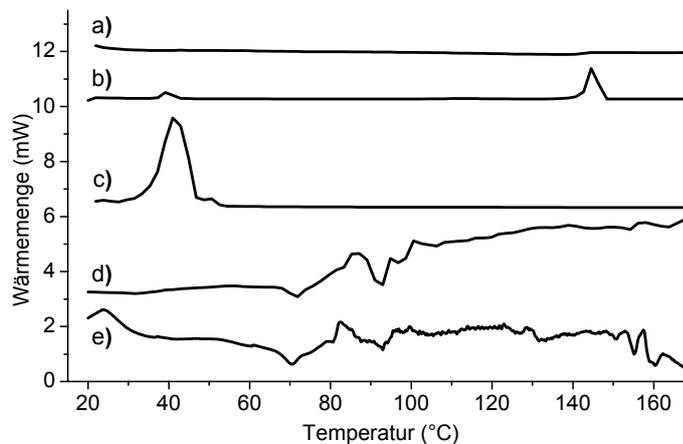


Abb. 21: DSC Scans von DAG(B) und seiner reinen Lipidkomponenten: a) Imwitor[®] 742 b) Cholesterol c) Brij[®] 58 d) DAG(B) frisch hergestellt und e) DAG(B) 3 Monate gelagert

Bei DSC Untersuchungen mit ähnlichen Polyoxyethylenalkylethern wie Brij[®] 58, aber mit kürzeren Polyoxyethylenketten, wurden vergleichbare Ergebnisse beschrieben (Buckton et al. 1994). Es wurde postuliert, dass diese Tenside mit nur einer Alkylkette bei steigender Temperatur einen Übergang aus der vesikulären Phase in micellare Strukturen durchlaufen. Die Ausbildung solcher micellarer Strukturen vermindert notwendigerweise die Anzahl der Tensidmoleküle im Bilayer, so dass deren Stabilität bei höheren Temperaturen abnimmt. Eine höhere Stabilität der Tensidaggregate wurde mit abnehmender Anzahl von Polyoxyethylengruppen und zunehmender Anzahl von

Methylgruppen in der Alkylkette beobachtet. Dies belegt, dass Polyoxyethylenalkylether durch die Ausbildung hydrophober Strukturen stabilisiert werden. Dies könnte der Grund für die gute Eignung von Brij[®] 58 sein, hydrophobe Lipide wie Ceramid IIIB oder Phytosphingosin zu dispergieren.

Abb. 22 stellt die DSC Scans der Formulierung CER(I) und seiner Einzelkomponenten dar. Die Schmelzpeaks von Ceramid IIIB, Cholesterol, Laurinsäure und Brij[®] 58 sind in dieser Formulierung weder direkt nach der Herstellung noch nach drei Monaten Lagerzeit sichtbar. Dies zeigt, dass die Membranen von CER(I) auch bei Temperaturerhöhungen nicht destabilisiert werden und alle Lipide in homogen verteilter Form vorliegen. Es werden keine Phasenübergangstemperaturen sichtbar.

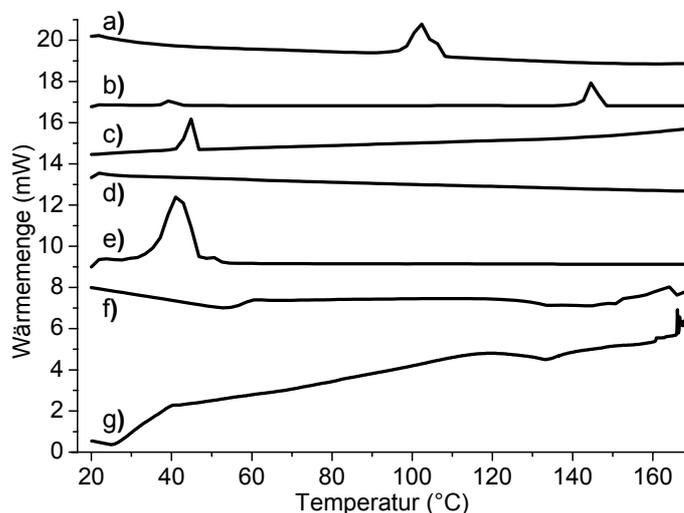


Abb. 22: DSC Scans von CER(I) und seiner reinen Lipidkomponenten: a) Ceramid IIIB b) Cholesterol c) Laurinsäure d) Imwitor[®] 375 e) Brij[®] 58 f) CER(I) frisch hergestellt und g) CER(I) 3 Monate gelagert

Abb. 23 zeigt keine endothermen Schmelzpeaks von Ceramid IIIB, Cholesterol, Laurinsäure oder Brij[®] 58 und auch keinen endothermen Phasenübergang in frisch hergestelltem CER(-). Dafür bilden sich zwei exotherme Peaks, die bei 95 und 115 °C auf Kristallisierungserscheinungen oder Membranzerstörung durch Dehydratation hinweisen. Solche Peaks wurden bei gemischten Phospholipid/Ceramid III Vesikeln als Phasenseparation interpretiert (Imura et al. 2001). Nach einer Lagerzeit von drei Monaten scheinen sich diese Phasenseparationen verstärkt zu haben.

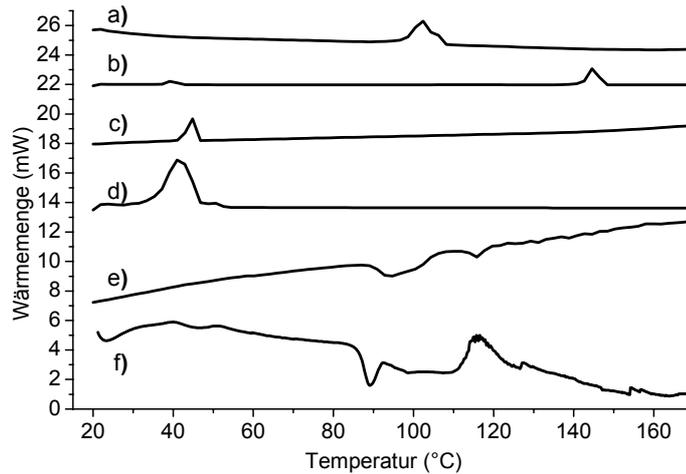


Abb. 23: DSC Scans von CER(-) und seiner Lipidkomponenten: a) Ceramid IIIB b) Cholesterol c) Laurinsäure d) Brij[®] 58 e) CER(-) frisch hergestellt und f) CER(-) 3 Monate gelagert

Abb. 24 stellt die DSC Kurven von CER(+) dar. Es kann kein klarer Schmelzpeak von Lipidkomponenten und auch keine Phasenübergangstemperatur in CER(+) beobachtet werden, aber eine Kombination aus einem exothermen und endothermen Peak erscheint bei 95 °C ähnlich wie in Formulierung C(B) mit Ceramid IIIB und Brij[®] 58 allein (Abb. 25). Diese Erscheinung wird vermutlich von den micellbildenden Eigenschaften von Brij[®] 58 verursacht, die oberhalb von 95 °C zur Membranzerstörung führen. Ein endothermes Signal, welches einer Glasübergangstemperatur ähnelt, kann nach drei Monaten Lagerzeit bei 50 °C beobachtet werden.

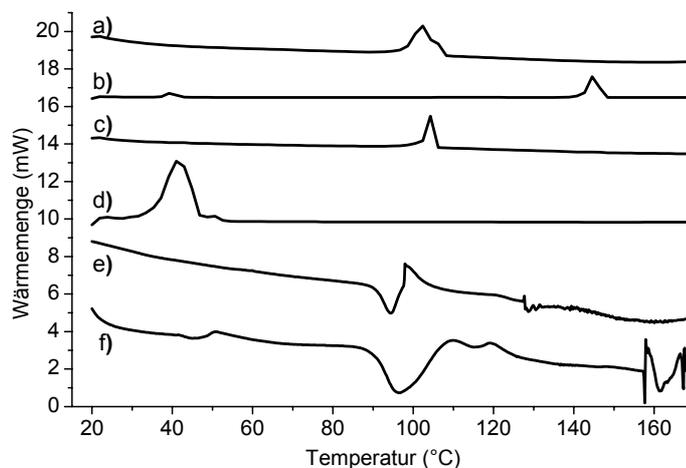


Abb. 24: DSC Scans von CER(+) und seiner reinen Lipidkomponenten: a) Ceramid IIIB b) Cholesterol c) Phytosphingosin d) Brij[®] 58 e) CER(+) frisch hergestellt und f) CER(+) 3 Monate gelagert

Um die DSC Kurven der Ceramidvesikel besser interpretieren zu können, wurden die drei vesikulären Formulierungen C(B), Ch(B) und PS(B) (Lipidzusammensetzung vgl. Tab. 33) mit nur einer hydrophoben Komponente (Ceramid IIIB, Cholesterol, oder Phytosphingosin) und Brij[®] 58 als Tensid in derselben Menge wie in den CER-Vesikeln hergestellt, um die Temperatur herauszufinden, bei der die Instabilität der Vesikelmembranen beginnt.

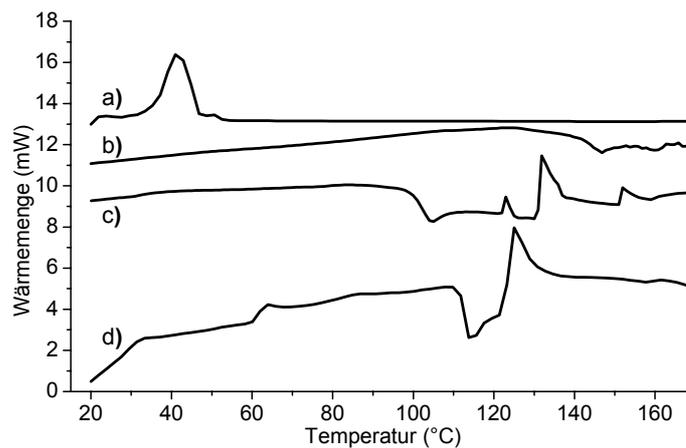


Abb. 25: DSC Scans von a) trockenem Brij[®] 58 im Vergleich zu seinen vesikulären Formulierungen b) PS(B) c) Ch(B) und d) C(B)

Der kleine Anteil Phytosphingosin kann leicht dispergiert werden, aber Cholesterol und Ceramid IIIB kristallisieren bei höheren Temperaturen aus (Abb. 25). Bei diesen Temperaturen können allerdings auch durch die Drucksteigerung im Tiegel Membranzerstörungen auftreten. Die Kristallisationstemperatur für Ceramid IIIB in der C(B) Membran (110 °C) lag höher als seine Schmelztemperatur (101 °C). Die Abwesenheit eines Phasenübergangspeaks zwischen 20 und 100 °C liefert Hinweise auf den flüssigen Zustand der C(B)-Membran.

Es ist allgemein bekannt, dass die zunehmende Hydratation eines Lipids zu einem Abfall seiner Schmelztemperatur führt, z. B. von 85 °C für trockenes Distearylphosphatidylcholin auf 58 °C (Oldfield und Chapman 1972). Dabei wird der DSC Peak schärfer und schmaler. Es ließ sich weiterhin belegen, dass durch die Hydratation zwischen den Kopfgruppen von Ceramidmolekülen die Ausbildung eines festen Netzwerks aus Wasserstoffbrücken induziert wird (Garidel et al. 2002). Schmelz- und Kristallisationstemperatur müssen nicht übereinstimmen. Die Schmelztemperatur

von hydratisiertem Phytoceramid I lag bei 105,2 °C, während die Rekristallisation erst bei 101,0 °C einsetzte. Dabei belegte die dreifach höhere Enthalpieänderung beim Phasenübergang im Vergleich zum Ceramid III die besonders hohe Packungsdichte der langkettigen Acylceramide. Wie auch immer, der Einfluss der Hydratisierung auf die Schmelztemperatur sollte auch für Ceramid IIIB geprüft werden, um die Interpretation der DSC-Kurven der Ceramidvesikel zu erleichtern. Abb. 26 zeigt die DSC Kurven von reinem und trockenem Ceramid IIIB, dieselbe Menge Ceramid IIIB ohne weitere Zusätze vollständig hydratisiert und Ceramid IIIB in der Vesikel Membran C(B) gemeinsam mit Brij® 58.

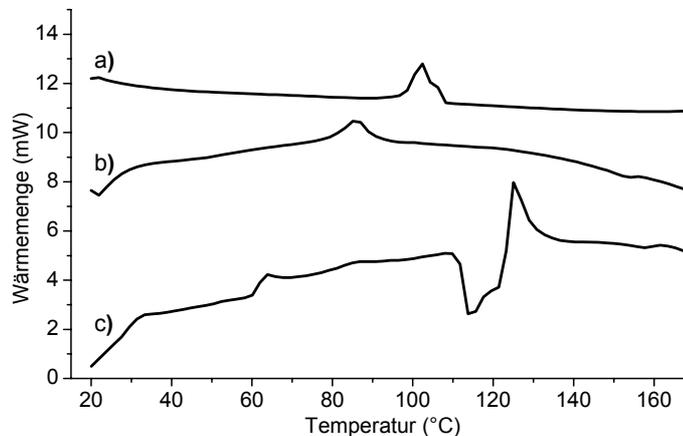


Abb. 26: DSC Scans von a) trockenem Ceramid IIIB im Vergleich zu b) hydratisiertem Ceramid IIIB und c) der vesicularen Formulierung C(B)

Die Schmelztemperatur von Ceramid IIIB fällt durch die vollständige Hydratisierung um etwa 20 °C ab. Durch die Hydratisierung können auch Strukturunterschiede induziert werden. Eine breite exotherme Übergangstemperatur konnte zwischen 55 und 70 °C bei höheren Hydratisierungsgraden von synthetischem Palmitoylceramid beobachtet werden und wurde als Konversion einer metastabilen in eine stabilere Form erklärt (Shah et al. 1995). Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Peaks kristalliner Lipide in Vesikelmembranen im Vergleich zum trockenen Zustand um 20 – 30 °C absinken. Dies spricht gegen die Anwesenheit fester Lipidbestandteile in der Formulierung CER(+), deren ausgeprägter Peak bei etwa 98 °C beobachtet wurde.

Der abgesenkte Schmelzpunkt von hydratisiertem Ceramid IIIB ermöglicht wahrscheinlich erst die Herstellung von Ceramidvesikeln bei 80 °C. Bei dieser Temperatur liegt trockenes Ceramid IIIB noch in einem festen Zustand vor, welcher die Ausbildung von Vesikeln verhindert, während vollständig hydratisiertes Ceramid IIIB

bei dieser Temperatur bereits im flüssigen Zustand die Herstellung von Vesikeln ermöglicht. Formulierung CER(-) zeigte eine Neigung zu Phasenseparationen über eine Lagerzeit von drei Monaten. Die Langzeitstabilität dieser Formulierung könnte durch eine Veränderung des Verhältnisses zwischen dem hydrophilen Brij[®] 58 und den lipophilen Bestandteilen verbessert werden.

Zusammenfassend ist anzumerken, dass in keiner der fünf untersuchten Zubereitungen Phasenübergangstemperaturen beobachtet werden konnten. Dies stimmt mit den Beobachtungen anderer Autoren an Vesikeln aus Phospholipiden oder Sphingolipiden überein, nach denen komplexe Lipidmischungen zu einer Verbreiterung der Phasenübergangstemperatur führen (Oldfield und Chapman 1972). Cholesterol in der Membran kann den Bereich der Phasenübergangstemperatur verbreitern, die Fläche des DSC Peaks verringern und ab 32 mol % sogar dessen Verschwinden bewirken (Ladbrooke et al. 1968). Gemischte DMPC/Palmitoylceramid Vesikel hatten eine steigende Phasenübergangstemperatur bis zu einem Gehalt von 6 % Ceramid in der Vesikelmembran, während darüber kein Phasenübergang mehr detektierbar war (Holopainen et al. 2000). Es konnte gezeigt werden, dass Phasenübergänge trotz fehlender DSC Peaks stattfinden können. Sie erstrecken sich dann über einen weiten Temperaturbereich (Lippert et al. 1971).

Es lässt sich daher anhand der in dieser Arbeit gemessenen DSC Kurven nicht mit abschließender Sicherheit sagen, ob die untersuchten Membranvesikel im Gelzustand oder im flüssigkristallinen Zustand vorliegen. Darüber hinaus werden die Membranen mit Brij[®] 58 bei Temperaturen oberhalb von 70 °C häufig zerstört, weil dieser Emulgator mit steigender Temperatur lipophiler wird, den Bilayer verlässt und micellare Strukturen ausbildet. Zusätzliche Informationen über die Mobilität der Membranlipide sollten daher aus den Ergebnissen der NMR Spektroskopie gewonnen werden.

5.3.4 Protonenresonanzspektroskopie (¹H NMR)

Die Protonenresonanzspektroskopie (¹H NMR) kann genutzt werden, um pharmazeutische Formulierungen zu charakterisieren und um den bevorzugten Aufenthaltsort eines enthaltenen Arzneistoffes darin festzustellen (Schote et al. 2002, Lv et al. 2006). Die ¹H NMR kann außerdem grundlegende Informationen über die

Mobilität, den Aggregatzustand und die Mikroumgebung von Lipiden in komplexen Stoffgemischen liefern. Die chemische Verschiebung der Signale hängt von der chemischen Umgebung ab und erlaubt die Zuordnung von Peaks zu spezifischen Protonen der Molekülstruktur. Daher ermöglicht die ^1H NMR Spektroskopie Aussagen über Interaktionen spezifischer Protonen in Lipiden von Membransystemen ohne ein spektroskopisches Label und auch in Gemischen mit anderen untersuchten Substanzen. Die Eigenschaften von Membranlipiden werden von der hydrophilen Kopfgruppe an der Außenseite der Membran bis zur endständigen lipophilen Methylgruppe im ^1H NMR Spektrum von 4,5 bis 0,7 ppm beschrieben. Die Lipide zeigen schmale und scharfe Peaks, wenn sie gelöst in einem organischen Lösungsmittel mit niedriger Viskosität vermessen werden. In diesen Lösungsmitteln ist eine ungerichtete Bewegung in alle Richtungen möglich. Mit absinkender Mobilität von Atomen werden diese Peaks dagegen breiter und abgerundeter und können im festen Aggregatzustand völlig verschwinden. (Oldfield und Chapman 1972, vgl. Canet 1994, Galla 1988). Daher erlaubt die ^1H NMR Spektroskopie die Differenzierung zwischen flüssigen und festen Domänen sowie die Detektion unterschiedlicher lokaler Mikroviskositäten entlang der Molekülstruktur eines Lipids. Die ansteigende Signalintensität und die verkleinerte Linienbreite sowohl der polaren Kopfgruppe als auch der Methylengruppen entlang der Acylketten in Phospholipidmembranen wurden benutzt, um die ansteigende Mobilität von Lipidmolekülen beim Überschreiten der Phasenübergangstemperatur nachzuweisen (Oldfield et al. 1971, vgl. Galla 1988). Dabei wurde festgestellt, dass die Protonen in Methylgruppen der polaren Cholinkopfgruppe ($-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$) im Gelzustand deutlich mobiler bleiben als die Protonen der Acylketten. Dies belegt, dass diese Kopfgruppen nicht im Lipidbilayer eingeschlossen sind, sondern zur hydrophilen Phase hin orientiert vorliegen. Die ^1H NMR Spektroskopie wurde auch zur Charakterisierung nichtvesikulärer Lipidsysteme benutzt. Es wurde beobachtet, dass mittelkettige Triglyceride (MCT) formuliert in festen Glycerylbehenat-Nanopartikeln einen flüssigen Aggregatzustand behalten (Jenning et al. 2000). Darüber hinaus konnte die hohe Mobilität der Protonen in Methylgruppen von Poloxameren sowohl in Nanoemulsionen als auch in Nanostrukturierten Lipidcarriern (NLC) nachgewiesen werden, während MCT Protonen in Nanoemulsionen sehr mobil, aber in NLC stark immobilisiert sein konnten (Jores 2004). In der vorliegenden Arbeit sollte die ^1H NMR benutzt werden, um die Membraneigenschaften von Lipidvesikeln aus Ceramiden und Diacylglyceriden zu untersuchen. Dazu wurden die Spektren der Membranvesikel mit ihrer

eingeschränkten Lipidmobilität mit Spektren von einfachen Lösungen derselben Lipidmischungen verglichen.

Um die Zuordnung der NMR Signale zu den Lipiden in den komplex zusammengesetzten Membransystemen zu ermöglichen, wurden die Spektren der reinen Lipide gelöst in deuteriertem Chloroform/deuteriertem Methanol 2:1 aufgenommen (Abb. 27-Abb. 29). Die Lipide wurden wie folgt nummeriert: 1 = Ceramid IIIB, 2 = Cholesterol, 3 = Laurinsäure, 4 = Phytosphingosin, 5 = Brij[®] 58, 6 = Imwitor[®] 742 and 7 = Imwitor[®] 375. Die Peaks in jedem Spektrum und die zugehörigen Protonen in der Strukturformel darunter sind mit Buchstaben in alphabetischer Reihenfolge beschriftet. 1AB ist zum Beispiel das Signal der Protonen, die zu den Kohlenstoffatomen an der Doppelbindung des Ceramid IIIB gehören. Die ¹H NMR Spektren von geeigneten Verbindungen wie Pentaethylglycolmonodecylether, Glycerol-1-oleat-2,3-distearat oder Ethyllactat wurden als Referenzspektren zur Zuordnung der Signale zu den Protonen in den Lipiden benutzt (Spectral databank of organic compounds 2006). Die ¹H NMR Spektren erlauben die Zuordnung von Signalen bei etwa 5,3 ppm zu den Protonen an Kohlenstoffatomen einer Doppelbindung, bei 4,1-4,3 ppm zu Protonen benachbart zu Sauerstoffatomen in den polaren Kopfgruppen von Glyceriden, die Ethylenglycolketten von Brij[®] 58 bei 3,6-3,8 ppm, Protonen in Nachbarschaft von Esterbindungen, Hydroxylgruppen oder in polaren Teilen der Citronensäure oder Milchsäure bei 2,6-2,8 ppm, Methylengruppen in langkettigen Fettsäuren mit ansteigender Distanz zur Carbonylfunktion bei 2,3, 1,6 oder 1,1-1,4 ppm, während endständige Methylgruppen bei 0,8-0,9 ppm erscheinen. In den meisten Fällen ist der Peak bei 1,1 – 1,4 ppm am größten.

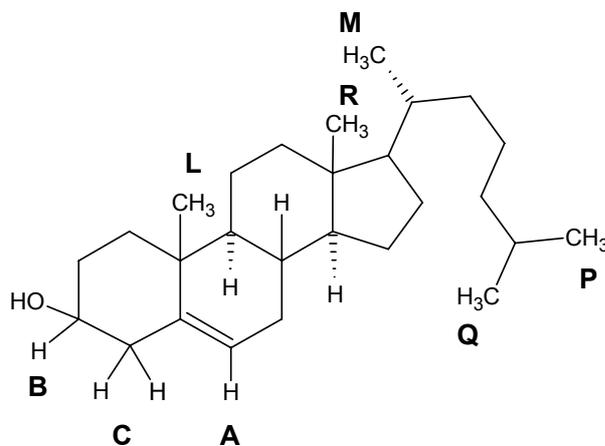
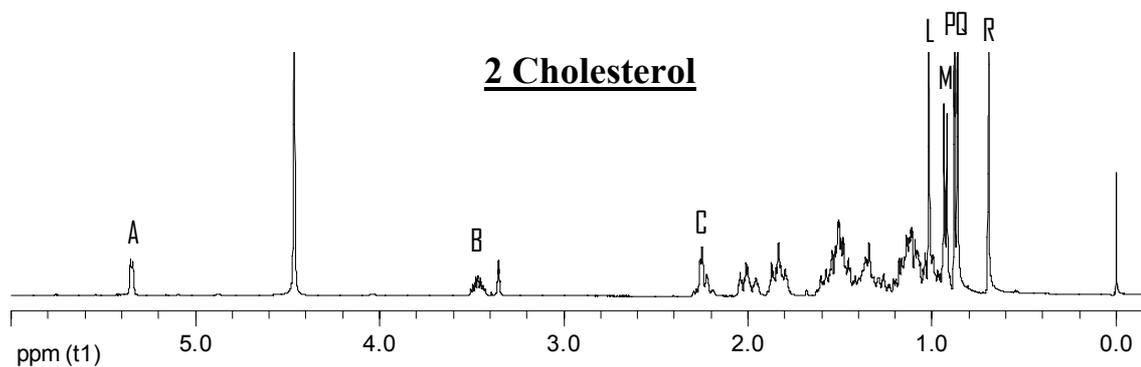
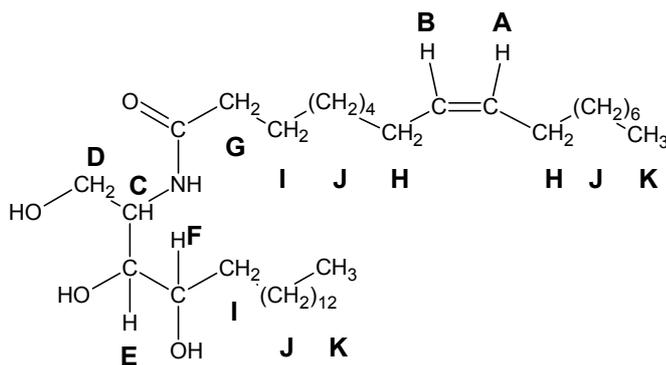
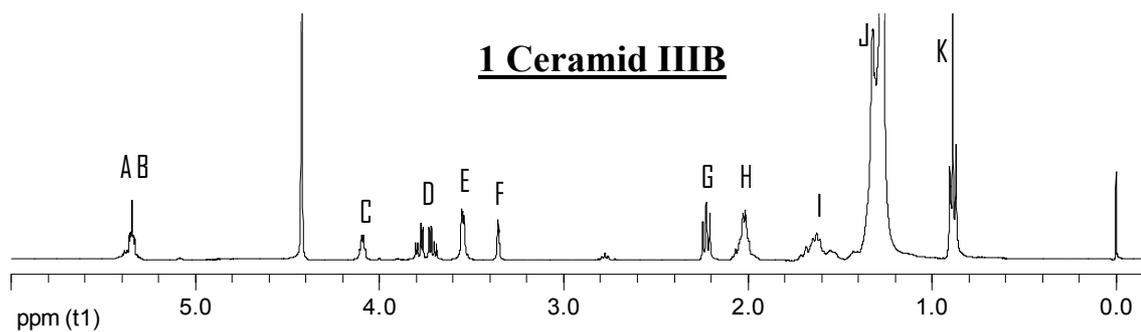


Abb. 27: ^1H NMR Spektren von Ceramid IIB und Cholesterol, die Bezeichnung der Signale und der korrespondierenden Protonen erfolgte in alphabetischer Reihenfolge

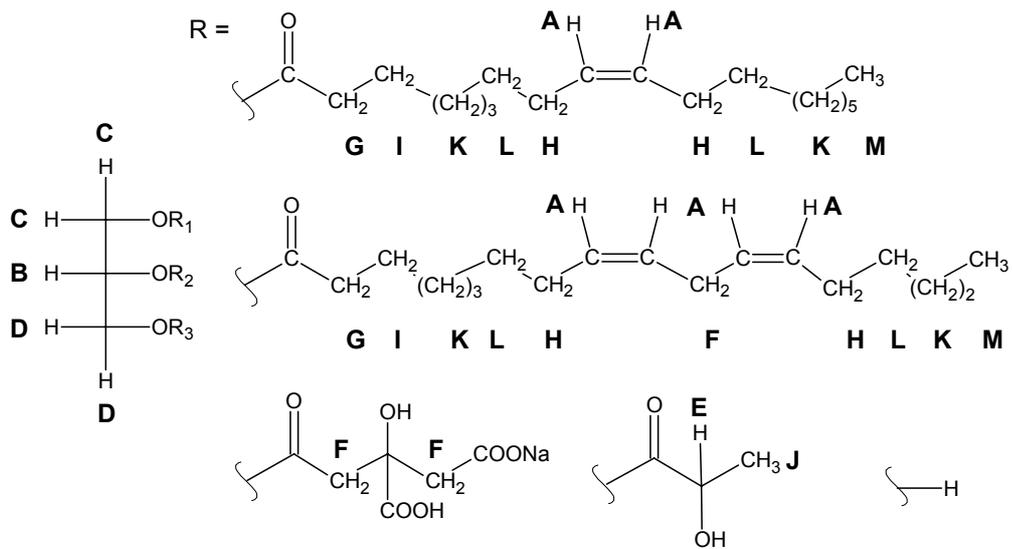
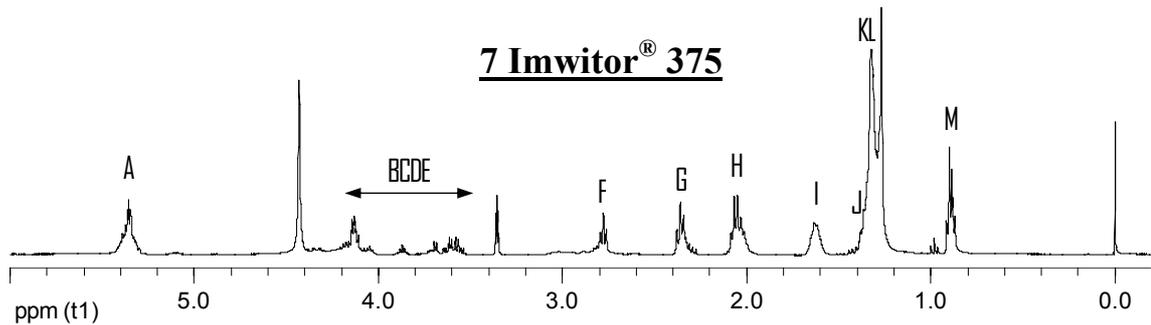
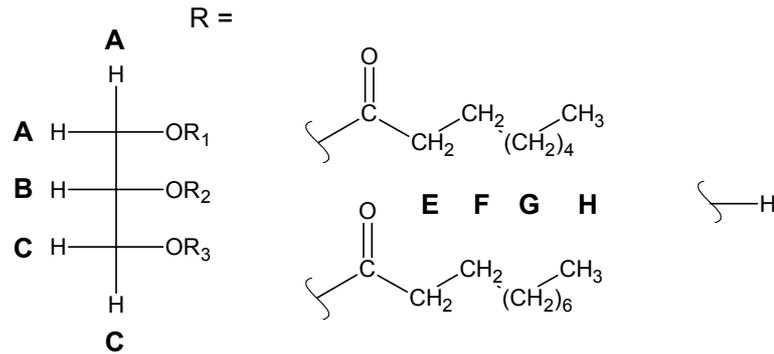
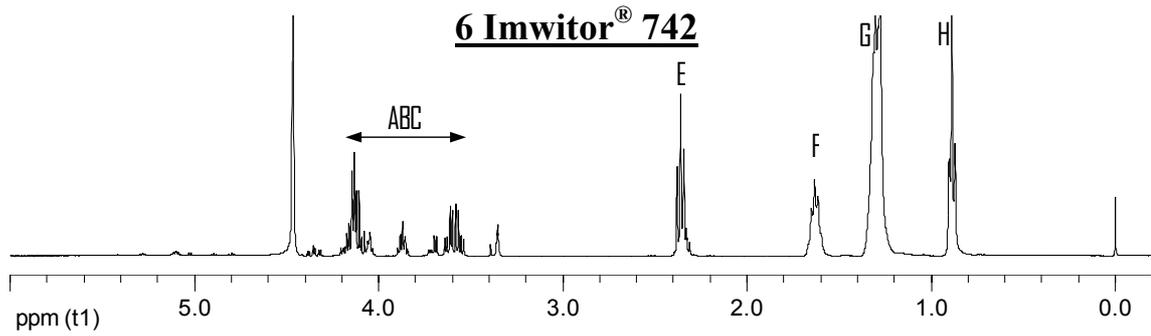


Abb. 29: ¹H NMR Spektren von Laurinsäure, Phytosphingosin und Brij[®] 58, die Bezeichnung der Signale und der korrespondierenden Protonen erfolgte in alphabetischer Reihenfolge

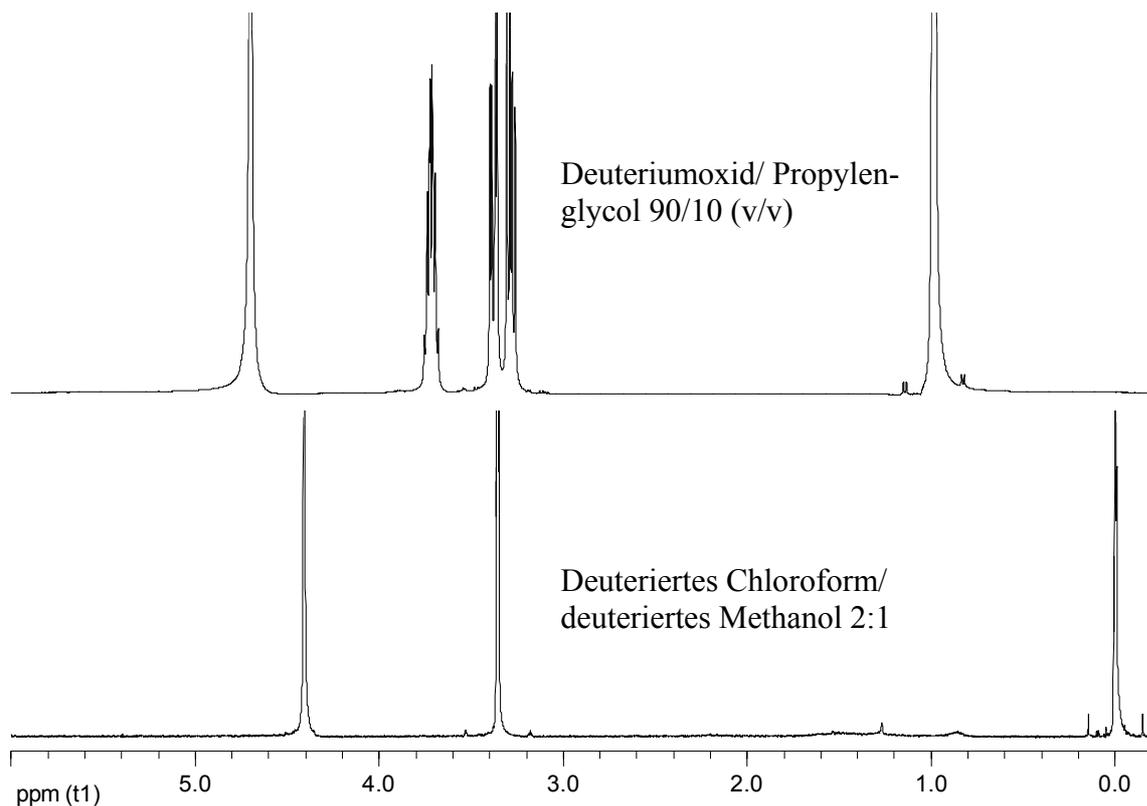


Abb. 30: ^1H NMR Spektren der lipidfreien Lösungsmittel

Es sollte beachtet werden, dass die Peaks der deuterierten Lösungsmittel Chloroform, Methanol, und Deuteriumoxid ebenso wie die Peaks des undeuterierten Propylenglycols in den Spektren erscheinen (vgl. Abb. 30). Die drei intensiven Signale von Propylenglycol zwischen 3,2 und 3,8 ppm verdecken die Peaks der hydrophilen polaren Kopfgruppen der Vesikelmembranen, das Signal bei 1 ppm erschwert vor allem die Analyse der Methylen- und endständigen Methylgruppen der Alkylketten.

5.3.4.1 ^1H NMR Spektren der DAG Vesikel

Abb. 31 zeigt die Spektren der Vesikelmembranen in den Formulierungen DAG(I) und DAG(B) (jeweils oben) und ihre Lipidmischungen in einfacher Lösung in deuteriertem Chloroform/deuteriertem Methanol 2:1 (jeweils unten). Die Beschriftung der Signale erfolgte wie in den ^1H NMR Spektren der Protonen in den reinen Lipiden (Abb. 27-Abb. 29).

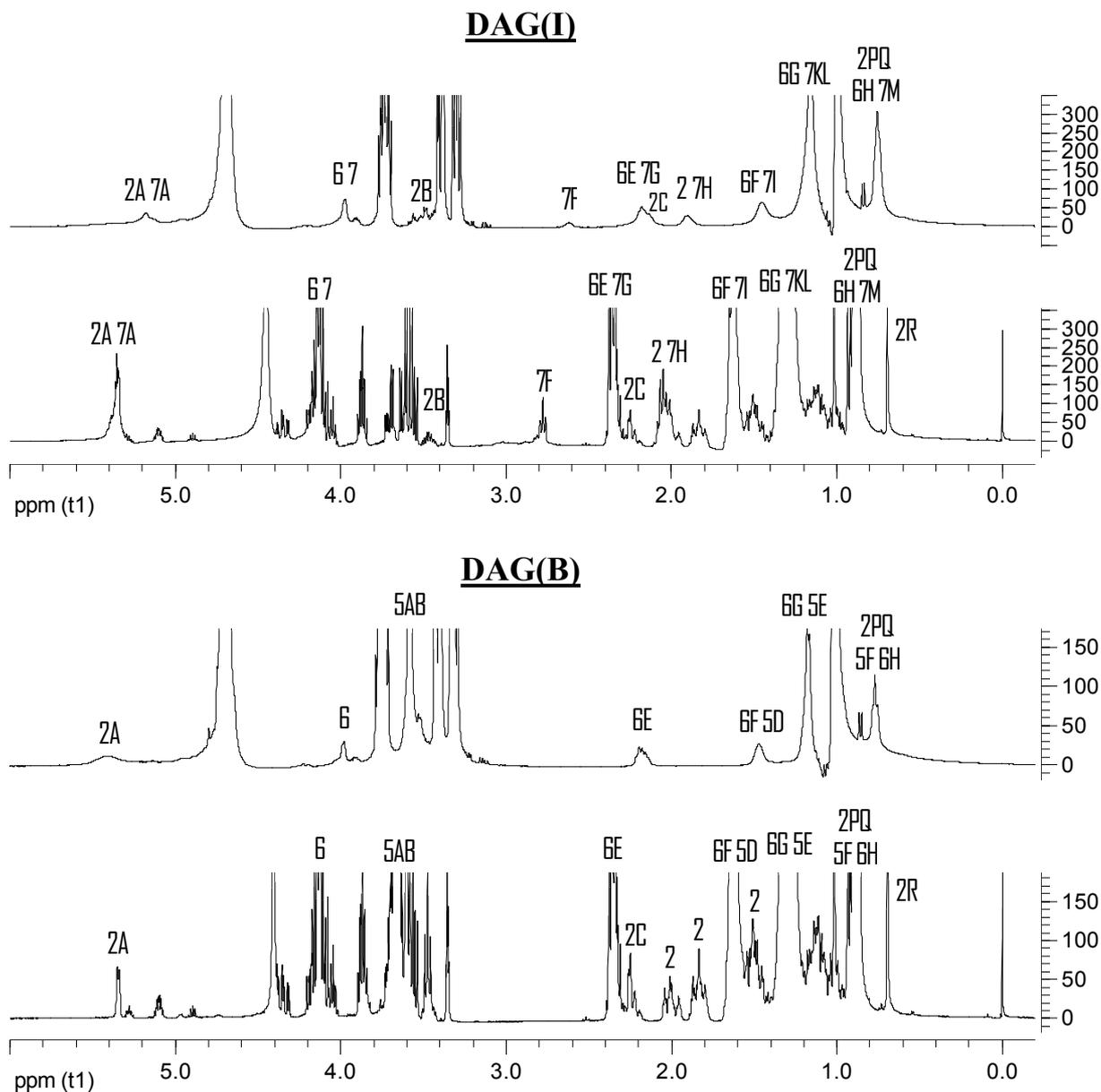


Abb. 31: ^1H NMR Spektren der Membranvesikel DAG(I) und DAG(B) (jeweils oben) im Vergleich zu ihren Lipiden gelöst in deuteriertem Chloroform/deuteriertem Methanol 2:1 (jeweils unten). Zu den Bezeichnungen der Signale siehe Abb. 27-29

Die NMR Signale der Lipide in den Vesikelmembranen sind breiter, kleiner und weniger scharf als dieselben Peaks von Lipiden gelöst in deuteriertem Chloroform/deuteriertem Methanol 2:1. Dies belegt die eingeschränkte Mobilität der Protonen in der Vesikelmembran im Vergleich zu den freien Lösungen in deuteriertem Chloroform/deuteriertem Methanol. Eine leichte Verschiebung der Peaks aus den Membranen zu kleineren ppm Werten kann im Vergleich zu der Lipidlösung in deuteriertem Chloroform/deuteriertem Methanol beobachtet werden. Die Signalintensität ist hoch genug, um die Membranvesikel in der gleichen Verstärkung

wie die Lipidlösung in deuterierten Lösungsmitteln auszuwerten. Im Spektrum der DAG(I) Vesikel können Signale der polaren Kopfgruppen zwischen 3,2 und 4,4 ppm beobachtet werden (Peak 6, 7 und 2B), ebenso Signale der Alkylketten in der inneren Membran zwischen 0,6 und 3 ppm (i. e. Peak 6E 7G, 2 7H, 6F 7I; ...). Die hohe Peakintensität von Protonen an Kohlenstoffatomen in Doppelbindungen des Cholesterols und Imwitor[®] 375 (Peak 2A 7A) sowie im polaren Bereich der Zitronensäure in Imwitor[®] 375 (Peak 7F) belegen eine besonders hohe Mobilität dieser Molekülstrukturen. Die Protonen von Methylengruppen zwischen den Doppelbindungen in Imwitor[®] 375 erscheinen ebenso bei 2,8 ppm (Peak 7F) und sind folglich ebenfalls mobiler als andere Membranteile. Die zahlreichen Peaks des Cholestan-systems bei 1,8, 1,5 und 1,1 ppm sind in den Spektren der Lipide im deuterierten Lösungsmittel sichtbar, können aber nicht in den Spektren der DAG(I) Vesikel beobachtet werden. Die intensiveren Signale bei 5,2-5,3 und bei 0,9 ppm korrespondieren mit den Protonen an den Doppelbindungen und den endständigen Methylgruppen der Alkylseitenkette im Cholesterol. Dies belegt die geringe Mobilität des Cholestan-ringsystems im Vergleich zum Bereich der Doppelbindung und der Alkylseitenkette. Die Eigenschaften der DAG(B) Membranen ähneln denen von DAG(I) Membranen, aber die Anzahl der Peaks im Spektrum der Vesikel ist wegen der Abwesenheit der vielen intensiven Imwitor[®] 375 Signale niedriger. Die Ethylenglycolreste des Brij[®] 58 geben ein intensives Signal (Peak 5AB bei 3,6 ppm) in DAG(B).

Zusammenfassend sind die Protonen in fast allen Membranregionen der DAG Vesikel mobil genug für eine Detektion im ¹H NMR Spektrum. Folglich liegen diese Vesikelmembranen im flüssigkristallinen Zustand vor und haben eine niedrige Mikroviskosität.

5.3.4.2 ¹H NMR Spektren der CER Vesikel

Abb. 32 zeigt die Spektren der Membranvesikel CER(I), CER(-) und CER(+) dispergiert in Deuteriumoxid/Propylenglycol und darunter ihre jeweiligen Lipidmischungen gelöst in deuteriertem Chloroform/deuteriertem Methanol 2:1. Zur Beschriftung der Signale siehe Abb. 27-Abb. 29.

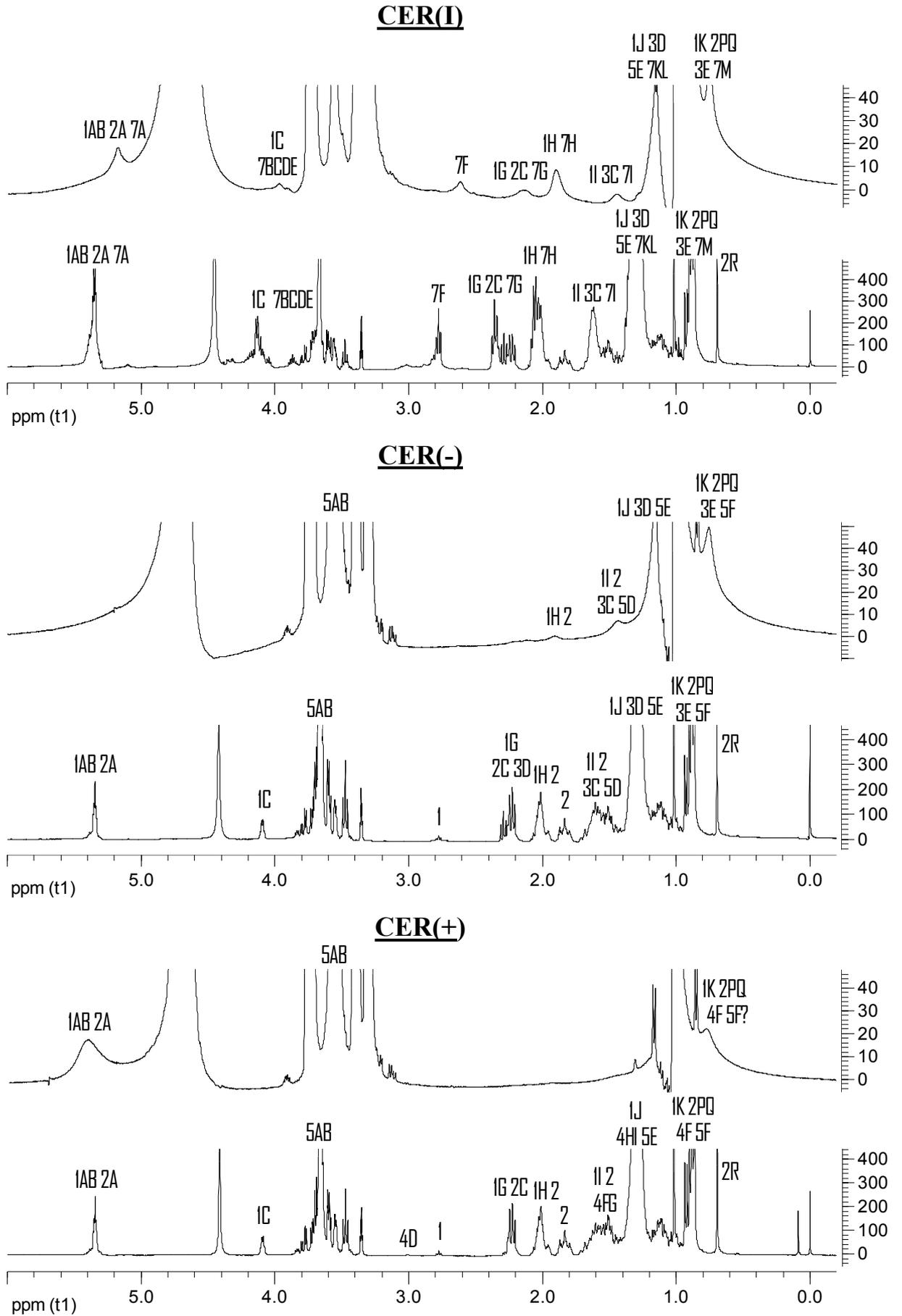


Abb. 32

Abb. 32 (vorige Seite): ^1H NMR Spektren der Membranvesikel CER(I), CER(-) und CER(+) (jeweils oben) im Vergleich zu ihren Lipiden gelöst in deuteriertem Chloroform/deuteriertem Methanol 2:1 (jeweils unten). Zu den Bezeichnungen der Signale siehe Abb. 27-29

Die Spektren der ceramidhaltigen Vesikelmembranen mussten 10fach verstärkt dargestellt werden. Erst dadurch wurden die kleinen Signale sichtbar, die in deutlich höherer Intensität in den Spektren der Lipidlösungen zu beobachten sind. Eine solche Verstärkung war bei den Messungen der DAG Vesikel nicht notwendig, was die deutlich höhere Mikroviskosität der CER Membranen belegt. CER(I) zeigt noch eine flüssige Membran im Bereich der lipophilen Alkylketten. Peaks von Protonen der Kohlenstoffatome der Doppelbindungen des Ceramid IIIB, Cholesterol und Imwitor[®] 375 können bei 5,2 ppm beobachtet werden (Peak 1AB, 2A und 7A), außerdem Signale der hydrophilen Kopfgruppen des Ceramid IIIB und Imwitor[®] 375 (Peak 1C, 7BCDE) und auch Signale der Methylengruppen in Alkylketten zwischen 1,3 und 3,0 ppm (i. e. peak 1H 7H,...). Die hohe Peakintensität der Protonen in der polaren Citratregion von Imwitor[®] 375 (7F) zeigt, dass diese hydrophile Region mobiler ist als Protonen im lipophilen Innenbereich der Membran.

Die Signale des lipophilen Innenbereiches der CER(-) Membran (1H 2, 1I 2 3C 5D) sind im Gegensatz zu denen von CER(I) fast nicht mehr zu sehen, aber der intensive Peak der Ethylenglycolreste des Brij[®] 58 ist deutlich zu erkennen (5AB bei 3,6 ppm). Schon anhand des hohen HLB-Wertes von Brij[®] 58 (15,7) kann man eine starke Interaktion der hydrophilen Gruppen mit dem wässrigen Medium erwarten. Die ^1H NMR Spektren von CER(-) zeigen klar, dass die Protonen in hydrophilen Gruppen sehr mobil sind, während die Peaks aus dem hydrophoben Innenbereich wegen ihrer geringen Mobilität kaum noch zu erkennen sind. Der Peak 1C bei 4,05 ppm, welcher zur hydrophilsten Region von Ceramid IIIB gehört, ist bei den Vesikelmembranen nicht zu sehen. Dies belegt die geringe Mobilität auch dieses Molekülteiles. Die Signale der Protonen an den Doppelbindungen in Ceramid IIIB und Cholesterol (1AB und 2A bei 5,25 ppm) fehlen in CER(-), können aber in CER(+) detektiert werden. Daraus kann geschlossen werden, dass im lipophilen Innenbereich der CER(+) Membran, aber nicht in CER(-), kleine Bereiche um die Doppelbindungen herum existieren, die eine verminderte lokale Mikroviskosität aufweisen. Aus sterischen Gründen (sp^2 Hybridisierung der C Atome) wirken Doppelbindungen wie Spacer in einer Lipiddomäne und bilden einen Raum für die höhere Mobilität der Protonen, wie man an Abb. 32 erkennt. Wenn kurzkettige Moleküle, z. B. Laurinsäure, solche Freiräume

belegen, wird die Mobilität der betreffenden Protonen eingeschränkt, so dass das entsprechende Signal aus dem Spektrum verschwindet. Das Spektrum von CER(-) Vesikeln zeigt zwei sehr kleine Signale aus der inneren Membran zwischen 1,3 und 3 ppm (Peak 1H 2 und 1I 2 3C 5D). Signal 1H gehört zu den Protonen, die an Kohlenstoffatomen benachbart zu einer Doppelbindung sitzen, während 1I 3C und 5D die Protonen von Kohlenstoffatomen repräsentieren, die in einer Entfernung von 2 Kohlenstoffatomen zu einer Keto- oder Ethergruppe lokalisiert sind. Folglich muss die Mikroviskosität in diesen Bereichen etwas niedriger sein als in anderen Membranteilen. Es konnten keine Peaks der langen Alkylketten von CER(+) zwischen 1,2 und 3 ppm beobachtet werden. Daraus kann man auf den Gelzustand und die hohe Mikroviskosität dieser Membranen schließen. Das Signal der endständigen Methylgruppe der Alkylketten bei 0,8-0,9 ppm (Peak 1K, 2PQ, 4F, 5F) erscheint in allen drei CER Formulierungen mit fallender Intensität in der Reihenfolge CER(I)>CER(-)>CER(+). Folglich nimmt die Mobilität dieser Methylgruppen in dieser Reihenfolge ab, ist aber immer noch deutlich höher als bei den mittelständigen Methylengruppen.

Zusammenfassend nimmt die Mikroviskosität der inneren Membranen in der Reihenfolge CER(I)<CER(-)<CER(+) zu. Die polaren Kopfgruppen von Imwitor[®] 375 und Brij[®] 58 haben eine größere Mobilität in ihrer wässrigen Mikroumgebung als die lipophilen Ketten in der inneren Membran.

Die ¹H NMR Spektren zeigen, dass die Eigenschaften der Membranen aus Ceramiden und Diacylglyceriden mit denen aus Phospholipiden vergleichbar sind, aber unterschiedliche Mikroviskositäten aufweisen. Die hohe Beweglichkeit der Lipide sowohl an den polaren Kopfgruppen als auch an den Alkylketten wurde in DAG(I), DAG(B) und CER(I) nachgewiesen. Folglich liegen diese Membranen im flüssigkristallinen Zustand vor. Die Mikroviskosität in CER(I) ist allerdings höher als in DAG Vesikeln, was an der höheren Peakintensität der DAG-Formulierungen sichtbar wird. Die Immobilisation der langen Alkylketten des Ceramid IIIB und der Stearylketten von Brij[®] 58 konnte in CER(-) und CER(+) gezeigt werden, was auf einen Gelzustand dieser Vesikel hinweist. Die hydrophilen Ketten von Brij[®] 58 und Imwitor[®] 375 sind zur wässrigen Umgebung hin orientiert und nicht in den Bilayer integriert. Die Protonen an Doppelbindungen, Protonen von Alkylketten in einem

Abstand von 2 C Atomen von Keto- oder Estergruppen sowie die Protonen der terminalen Methylgruppen haben eine ausgeprägtere Beweglichkeit als ihre molekulare Umgebung. Folglich haben diese Bereiche eine niedrigere lokale Mikroviskosität als andere Membranteile. Im Gegensatz dazu sind die Cholestanringe des Cholesterols selbst in sonst sehr fluiden Vesikeln wie DAG(B) und DAG(I) relativ unbeweglich. Ebenso sind die hydrophilen Bereiche des Ceramid III B sehr unbeweglich in den CER Vesikeln. Diese Resultate stehen in Übereinstimmung mit der generell akzeptierten Meinung, dass die Mikroviskosität einer Lipidmembran in der flüssigkristallinen Phase nahe der Oberfläche am größten ist und an der Grenzfläche der beiden Monolayer am geringsten (Oldfield und Chapman 1972, Bergethon 1998, vgl. auch Abb. 33). Folglich sind die Kopfgruppen des Ceramid IIIB und der Ring A des Cholestansystems dicht an der Membranoberfläche lokalisiert, während sich die terminalen Methylgruppen in einer Region niedriger Mikroviskosität in der Mitte des Bilayers befinden. Die Mikroviskosität der lipophilen Innenmembran der Vesikel steigt in der Reihenfolge DAG(I)<DAG(B)<CER(I)<CER(-)<CER(+). (vgl. Abb. 33).

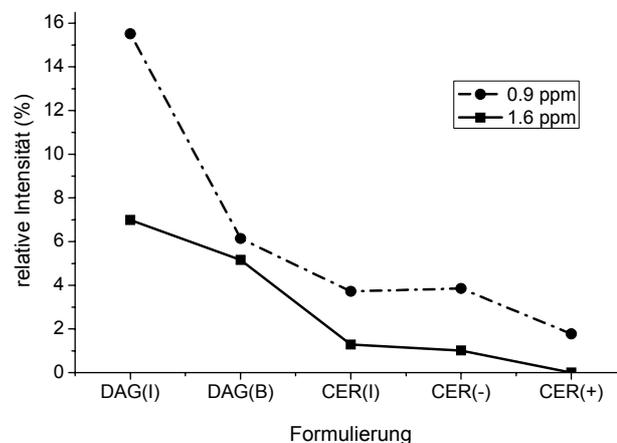


Abb. 33: Abschätzung der relativen Signalintensitäten in ^1H NMR Spektren von Lipidvesikeln im Vergleich zu analogen Lipiden gelöst in deuteriertem Chloroform/deuteriertem Methanol 2:1

Zur Veranschaulichung der gewonnenen Erkenntnisse wurden für die DAG(I) und die CER(+) Membran Modellanordnungen erstellt (Abb. 34 und Abb. 35). Bereiche hoher Mobilität sind grau unterlegt, Bereiche niedriger Mobilität sind dagegen weiß dargestellt.

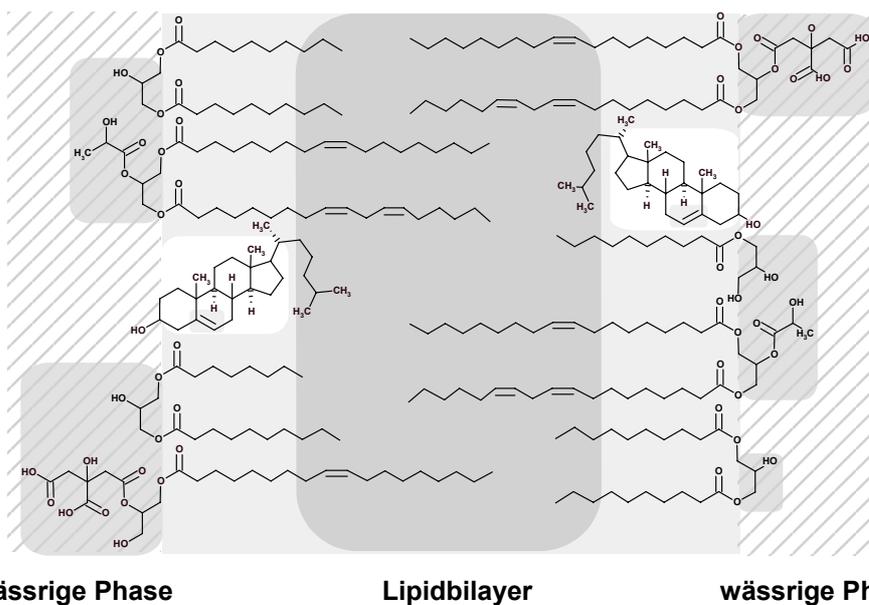


Abb. 34: Darstellung hoher (grau unterlegt) und niedriger (weiß) Protonenmobilität in einer DAG(I) Membran anhand der ^1H NMR-Spektren

Der starre immobilisierte Cholestangrundkörper in der Membran behindert oberhalb von T_S die Bewegungen der Lipidketten vor allem bis zu einem Abstand von acht Kohlenstoffatomen von der hydrophilen Kopfgruppe entfernt und führt daher in diesem Bereich zu einer Trägerschicht mit erhöhter Mikroviskosität (Hubbel und McConell 1971, Oldfield und Chapman 1972). Unterhalb von T_S verhindert Cholesterol dagegen das Erstarren der Lipide in einer dicht gepackten Lateralstruktur und verringert deshalb in diesen Membranen die Mikroviskosität (Abb. 35).

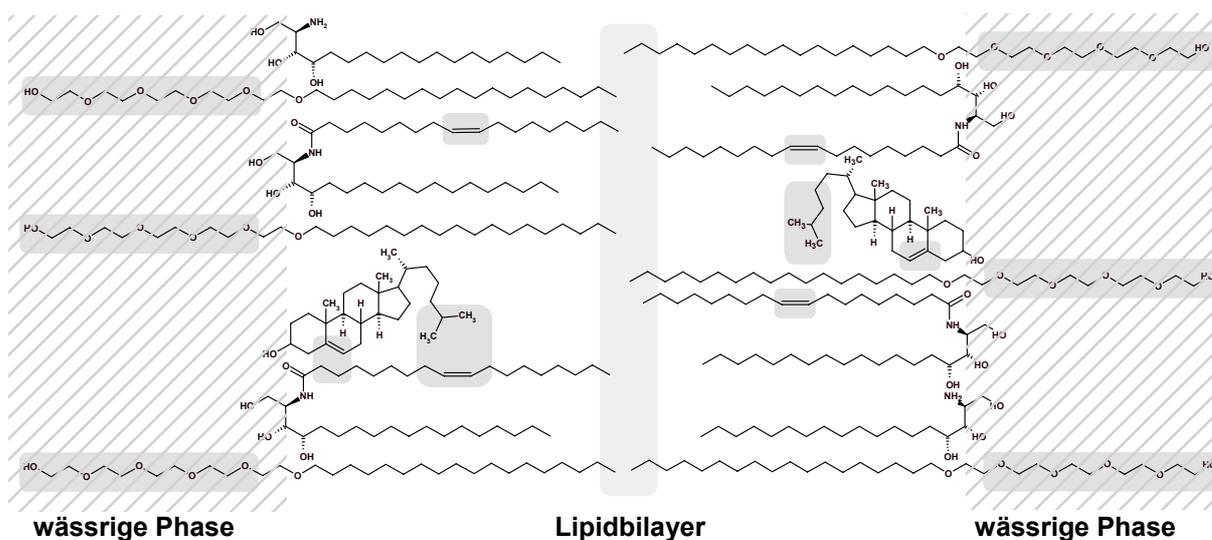


Abb. 35: Darstellung hoher (grau unterlegt) und niedriger (weiß) Protonenmobilität in einer CER(+) Membran anhand der ^1H NMR-Spektren

Aus dem Modell der CER(+) Membran lässt sich schlussfolgern, dass die interzelluläre Permeation von Xenobiotika durch die Lipidlamellen des SC entlang der Alkylketten nur schwer möglich ist, weil diese eine hohe Packungsdichte und folglich eine hohe Mikroviskosität aufweisen. Eine solche Permeation ist dagegen im Bereich der deutlich mobileren terminalen Methylgruppen viel leichter möglich. Die Beweglichkeit terminaler Methylgruppen wird durch Cholesterol noch erhöht (New 1990). Bei einer Permeation von Substanzen von einer Seite der Membran zur anderen muss der oberflächennahe Bereich mit seiner hohen Mikroviskosität überwunden werden. Dies ist im Bereich der Doppelbindung des Cholesterols am einfachsten, der eine niedrigere Mikroviskosität als seine unmittelbare Umgebung aufweist. Dies erklärt die verbesserte Penetration und Permeation von Fremdstoffen durch das Stratum corneum und Modellmembranen in Anwesenheit von Cholesterol (Vrhovnik et al. 1997, Ogiso 1998). Es fällt auf, dass in gesundem SC die Acylceramide I, IV und IX so angeordnet sind, dass die beiden Doppelbindungen der Linolsäure genau in der Mitte einer Lipiddoppelschicht platziert werden (Bouwstra und Pones 2006). Diese Anordnung erhöht folglich noch die Mobilität der terminalen Methylgruppen. Gleichzeitig steigt die Elastizität der Haut gegenüber einer Scherkraft parallel zur Hautoberfläche.

Die qualitativen Aussagen zur Mikroviskosität der Lipidvesikel sollten anhand von quantitativen Messungen mit der ESR Spektroskopie untermauert und mit der Mikroviskosität anderer Vesikel verglichen werden.

5.4 Messung der Mikroviskosität in Vesikelmembranen mit der ESR-Spektroskopie

In der Literatur wird häufig der Mikroviskosität von Lipidvesikelmembranen eine besondere Bedeutung für den Wirkstofftransport eingeschlossener Arzneistoffe in und durch die Haut zugesprochen (vgl. Kapitel 4.1.2.2). Die meisten Autoren sehen einen Zusammenhang zwischen Vesikeln mit niedriger Mikroviskosität und hohen Permeations- und Penetrationsraten. Bis heute konnten aber keine belastbaren Werte gefunden werden, mit deren Hilfe man die Mikroviskosität verschiedener Vesikel miteinander vergleichen könnte. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit eine Methode zur Quantifizierung der Mikroviskosität in den Membranen verschiedener Vesikelsysteme entwickelt werden.

Die ESR-Spektroskopie und -tomographie ist eine sehr elegante Methode zur nichtinvasiven und nichtdestruktiven Untersuchung der Mikroumgebung und von Permeationsprozessen stabiler Nitroxylradikale, sogenannter Spinsonden. Der Einfluss der Teilchengröße von Liposomen und Niosomen auf den Transport hydrophiler Spinsonden in die Haut von Schweineohren wurde untersucht (Šentjurc et al. 1999). Vesikel mit Teilchengrößen zwischen 200 nm und 800 nm wiesen höhere Penetrationsraten auf als Vesikel mit Durchmessern < 200 nm, weil kleinere Vesikel im Kontakt mit anderen Oberflächen ihre Integrität schneller einbüßen und damit weniger Einfluss auf den Transport der eingeschlossenen Spinsonde ausüben. In einer anderen Publikation war eine signifikante Freisetzung hydrophiler Spinsonden nur zu beobachten, wenn wenigstens 30 mol% Cholesterol in den Liposomen eingeschlossen waren (Vrovnik et al. 1997). Dies zeigt, dass rigidere Membranen vorteilhaft für eine Arzneistoffpenetration sein können. ESR Messungen können die Rotationskorrelationszeiten τ_c einer Spinsonde liefern. Der Zusammenhang zwischen der Rotationskorrelationszeit einer Spinsonde in einem idealen Lösungsmittel mit der dynamischen Viskosität η ist über die Debye-Stokes-Einstein-Gleichung gegeben (Gl. 1):

$$\tau_c = \frac{4 \pi \eta r^3}{3 k_b T} \quad \text{Gl. 1}$$

Dabei ist r der Radius des (kugelförmigen) Diffusionsmoleküls mit seiner Solvatationshülle, k_b die Boltzman-Konstante und T die absolute Temperatur.

Strukturierte Flüssigkeiten erfordern oftmals die Anwendung des Gierer/Wirtz-Modells (Gierer und Wirtz 1953, Spagnol und Wirtz 1953, Stösser et al. 2006, Strehmel et al. 2006), welches einer linearen Beziehung folgt (Gl. 2):

$$\frac{\eta}{\tau} = A + B \cdot \eta^x \quad \text{Gl. 2}$$

$$x = \frac{E_\eta - E_2}{E_\eta} \quad \text{Gl. 3}$$

mit x als Ausdruck der Aktivierungsenergie der Viskosität (E_η) und der Aktivierungsenergie für den Sprung ins freie Volumen (E_2). A und B sind intrinsische Konstanten in Gl. 2.

Die τ_C Werte von Spinsonden wurden benutzt, um den temperaturabhängigen Einfluss von Cholesterol auf die Mikroviskosität im Bilayer genauer darzustellen (Coderch et al. 2000). Cholesterol erhöhte die Mikroviskosität im Bilayer unterhalb der Phasenübergangstemperatur, senkte sie aber in Systemen über dieser Temperatur ab. Daher ist in Systemen aus Ceramiden oder gesättigten Phospholipiden mit T_s Werten größer als 32 °C (Hauttemperatur) die Mikroviskosität mit steigender Cholesterolkonzentration geringer. Dies stimmt mit früheren Arbeiten ohne Einbeziehung von τ_C überein, nach denen die Mikroviskosität von Membranen in der Reihenfolge DPPC > DPPC/Ch > Ei-PC/Ch > Ei-PC abnimmt (Oldfield und Chapman 1972). Diese Beobachtung wurde mit einem intermediären Zustand cholesterolhaltiger Membranen erklärt, dessen Eigenschaften zwischen dem rigiden Gelzustand und dem flüssigkristallinen Zustand liegen. Es sollte beachtet werden, dass die Fluidität der gesättigten cholesterolhaltigen Membran (DPPC/Ch) noch oberhalb der ungesättigten cholesterolhaltigen Membran (EiPC/Ch) liegt.

Unter Nutzung der Spinsonden 5-, 12- und 16-Doxylstearinsäure konnte gezeigt werden, dass τ_C sich erhöhte, wenn die Doxylgruppe dichter zur Kopfgruppenregion einer Membran positioniert wurde (Van den Berg et al. 2001). Besonders hoch war die mit 5-Doxylstearinsäure gemessene Mikroviskosität, wenn es sich um cholesterolhaltige Membranen handelte. Darüber hinaus verringerten sich die τ_C Werte von Spinsonden mit steigendem Anteil des nichtionischen Tensids Octaoxyethylenlaurylester mit nur einer Alkylkette in Membranen aus Sucroselaurylester/Cholesterolsulfat. Folglich können Tenside mit nur einer Alkylkette die Mikroviskosität in Membranen vermindern.

Obwohl in verschiedenen ESR Untersuchungen τ_C benutzt wurde, um die Effekte verschiedener Lipide und physikalischer Umgebungsbedingungen auf die Mikroviskosität im Bilayer zu belegen, waren diese Erkenntnisse auf qualitative Aussagen beschränkt. Es fehlte in der Literatur ein Zusammenhang zwischen τ_C und der dynamischen Viskosität η . Es wurden Glycerol/Ethanol-Systeme in verschiedenen Mischungsverhältnissen benutzt, um eine Kalibrierkurve zur Quantifizierung der Mikroviskosität in DMPC Liposomen mit der Spinsonde Doxylstearinsäure einzuführen (Bahri et al. 2005). Diese Vorgehensweise setzt allerdings voraus, dass keine Verteilungsgleichgewichte der Spinsonde zwischen lipophilem Bilayer und der hydrophilen Phase vorliegen. In dieser Arbeit wurde deshalb zur Reduzierung von Messfehlern die lipophilere Spinsonde Doxylpalmitinsäuremethylester (DPME) benutzt,

um solche Phasenverteilungen zu minimieren. Mischungen aus mittelkettigen Triglyceriden (MCT) und Rizinusöl wurden unter folgenden Gesichtspunkten als Kalibrationssystem ausgewählt: (i) Diese Mischungen sind homogen (ii) die Spinsonde ist komplett löslich in diesen Mischungen, (iii) die molekulare Spinsondenumgebung zwischen den Alkylketten der Triglyceride ähnelt den Verhältnissen in einer Vesikelmembran (iv) die Mischungen decken einen Viskositätsbereich ab, wie er von den zu untersuchenden Vesikelmembranen erwartet werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Spinsonde DPME in verschiedenen Vesikelmembranen inkorporiert, um mit Hilfe der ESR Spektroskopie die Rotationskorrelationszeiten τ_c messen zu können. Anhand dieser Werte sollte die Mikroviskosität im Bilayer über eine Kalibrationskurve berechnet werden. Mit dieser Methode wurden die Mikroviskositäten der entwickelten Vesikelmembranen mit denen in einfachen Sojaphosphatidylcholin Liposomen, gemischten Sojaphosphatidylcholin/Natriumcholat Liposomen (sogenannte Transfersomen[®]), sowie gemischten Sojaphosphatidylcholin/Dilaurylphosphatidylcholin (DLPC) Liposomen verglichen.

Tab. 32 zeigt die Zusammensetzung der Lipidvesikel und Tab. 23 die Partikelgrößen, Teilchengrößenverteilungen und Zetapotenziale der Vesikel für die ESR Messungen.

Es wurden Partikelgrößen zwischen 100 und 220 nm für alle Präparationen außer DAG(B) gemessen. Die Mehrheit der Formulierungen wiesen breite Teilchengrößenverteilungen auf ($0,25 < PI < 0,5$), während die Vesikel in CER(-), CER(+), DLPC 1:1, DLPC 3:1 und SPC schmale Teilchengrößen hatten. Die Zugabe von Natriumcholat zu Sojaphosphatidylcholin (in den Formulierungen (TSCH und TSCHet) führte zu einer geringeren Reproduzierbarkeit der Partikelgrößen (größere Standardabweichung) und breiteren Größenverteilungen (höheren PI Werten), verglichen mit reinen Phosphatidylcholin Liposomen (Formulierung SPC). Die Zetapotenziale sind ebenfalls in Tab. 23 gelistet. Die Zetapotenziale in DLPC und SPC liegen dicht bei null mV und belegen damit die hohe Qualität des Phosphatidylcholins sowie die Abwesenheit freier Fettsäuren als Folge von Abbauprozessen. Die Zugabe von Natriumcholat verringert die Zetapotenziale um ungefähr 20 mV im Vergleich zu reinen Phosphatidylcholin-Liposomen.

Tab. 23: Teilchengrößen, Polydispersitätsindices (PI), und Zetapotenziale (ZP) der Lipidvesikel ($\bar{x} \pm s$, n=6), pH-Werte in den Proben im Zetasizer, nicht in den Vesikelformulierungen

	Größe (nm)	PI	ZP (mV)	pH-Wert
Hydrophile Phase 1				
CER(-)	143,5 ± 8,9	0,206 ± 0,08	-19,3 ± 4,6	5,20 ± 0,24
CER(+)	175,0 ± 22,2	0,217 ± 0,04	36,2 ± 2,4	6,13 ± 0,14
CER(I)	131,5 ± 9,3	0,320 ± 0,01	-54,0 ± 6,8	5,80 ± 0,13
DAG(B)	358,7 ± 21,4	0,629 ± 0,02	-10,4 ± 0,5	6,31 ± 0,04
DAG(I)	139,9 ± 1,0	0,337 ± 0,01	-62,8 ± 2,1	5,75 ± 0,08
Hydrophile Phase 2				
CER(-)	149,3 ± 16,2	0,182 ± 0,07	14,6 ± 5,9	3,53 ± 0,10
CER(+)	150,3 ± 12,2	0,247 ± 0,06	42,4 ± 5,1	3,84 ± 0,09
PC(-)	191,0 ± 3,3	0,202 ± 0,04	-39,4 ± 2,5	3,51 ± 0,03
PC(+)	166,0 ± 16,0	0,194 ± 0,07	40,2 ± 3,2	3,99 ± 0,05
Hydrophile Phase 3				
DLPC 1:1	220,6 ± 6,8	0,179 ± 0,01	-2,5 ± 0,1	6,63 ± 0,06
DLPC 3:1	191,6 ± 22,5	0,207 ± 0,02	-4,4 ± 0,3	6,74 ± 0,13
Hydrophile Phase 4				
TSCH	183,8 ± 68,2	0,446 ± 0,05	-22,4 ± 1,7	6,63 ± 0,06
TSCHet	144,8 ± 83,8	0,399 ± 0,06	-21,4 ± 1,9	6,69 ± 0,04
SPC	162,5 ± 7,6	0,223 ± 0,05	-4,4 ± 4,9	6,45 ± 0,06

5.4.1 Berechnung der Rotationskorrelationszeiten τ_c und Erstellung einer Kalibrierfunktion

Die Rotationskorrelationszeit τ_c ist ein Parameter, um die Mobilität von Spinsonden in ihrer Mikroumgebung ausdrücken zu können. Sie ist definiert als die Zeit, die zur Ausmittlung des anisotropen Anteils der g und A Kopplungskonstanten benötigt wird. Im Bereich zwischen $0,01 \text{ ns} \leq \tau_c \leq 3 \text{ ns}$ (der sogenannten "fast motional region") kann τ_c durch die Analyse der Linienbreiten und relativen Signalintensitäten aus dem ESR Spektrum entnommen werden (vgl. Kapitel 8.3.7.2). Die Beziehung zwischen den

spektralen Parametern und τ_c ist über eine empirische Formel gegeben (Evans et al. 2005).

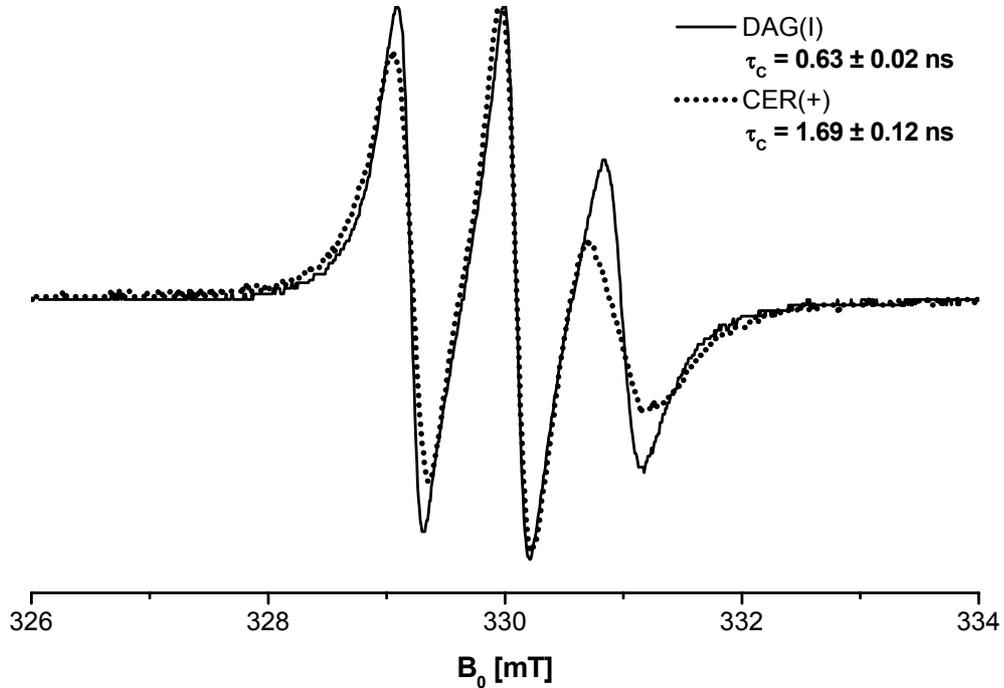


Abb. 36: ESR Spektren von DAG(I) und CER(+) mit ihren berechneten Rotationskorrelationszeiten τ_c

Es kann davon ausgegangen werden, dass die lipophile Spinsonde DPME aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften im Bilayer inkorporiert vorliegt. Abb. 36 zeigt die Unterschiede im ESR Spektrum von DAG(I) in Hydrophiler Phase 1 mit einer niedrigen Mikroviskosität und CER(+) in Hydrophiler Phase 1 mit einer deutlich höheren Mikroviskosität als in DAG(I). Um eine Beziehung zwischen dynamischer Viskosität (der sogenannten Makroviskosität) und der Mikroviskosität einer Vesikelmembran herstellen zu können, wurde eine Kalibrierfunktion erstellt. Zu diesem Zweck kam ein einphasiges System aus mittelkettigen Triglyceriden und Rizinusöl zur Anwendung. Acht Systeme mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen wurden mit einem Ubbelohde Kapillarviskosimeter vermessen. Nach Zugabe der Spinsonde DPME erfolgte die Bestimmung der Rotationskorrelationszeiten mit Hilfe der ESR. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 37 dargestellt.

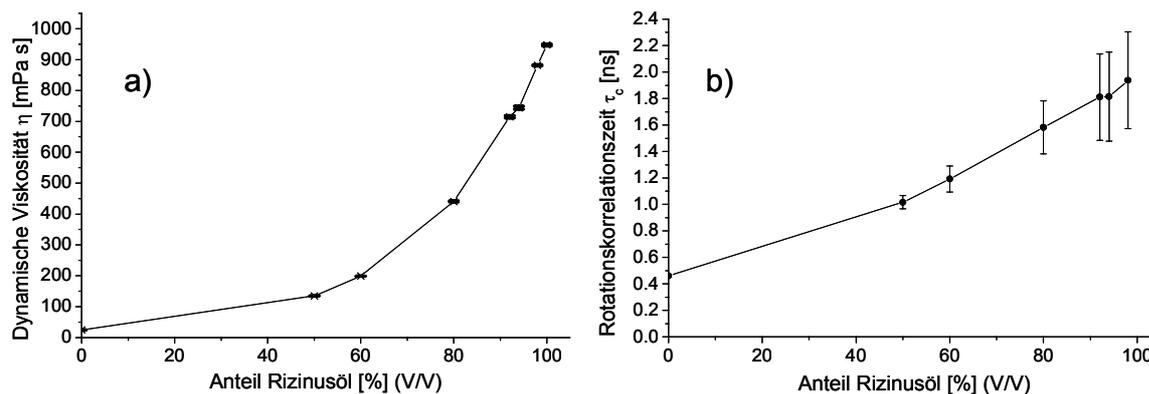


Abb. 37: a) Dynamische Viskositäten η von Mischungen aus mittelkettigen Triglyceriden/Rizinusöl gemessen am Ubbelohde Kapillarviskosimeter und b) die Rotationskorrelationszeiten τ_c von DPME in denselben Mischungen ($T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$)

Abb. 37a zeigt deutlich, dass kein linearer Zusammenhang zwischen η and τ_c besteht. Die Mobilität der Spinsonde in der Matrix ist daher keine einfache lineare Funktion der makroskopischen Viskosität und folgt insbesondere nicht der Stokes-Einstein-Beziehung. Diese Beobachtung ist ein wichtiger Hinweis auf eine Bewegung der Spinsondenmoleküle in einer strukturierten Flüssigkeit. Für diesen Fall kann das Gierer/Wirtz Modell angewendet werden, welches den Zusammenhang zwischen der Mikroviskosität und den gesamten dynamischen Prozessen im System beschreibt (Gierer und Wirtz 1953, Spagnol und Wirtz 1953, Stösser et al. 2006, Strehmel et al. 2006). Die Bestimmung des Exponenten x (vgl. Gl. 3) ergibt einen Wert von 0,9. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Aktivierungsenergie (E_2) für den Sprung in das freie Volumen klein ist, während die Aktivierungsenergie (E_η) der Viskosität das System dominiert. Die Anwendung des Gierer/Wirtz-Plots liefert den gewünschten linearen Zusammenhang (vgl. Abb. 38b). Die Werte der Rotationskorrelationszeiten τ_c aus den ESR Messungen können über die Kalibrierfunktion in Abb. 39 in die dynamische Viskosität η umgerechnet werden. Die Abbildung zeigt, dass alle vermessenen Vesikel innerhalb des Bereichs der Kalibrierfunktion liegen. Das logarithmische Verhältnis der Werte belegt, dass die steigenden Messfehler der höheren Rotationskorrelationszeiten (Annäherung an die obere Grenze 3 ns des zugrundeliegenden Berechnungsmodells) ebenfalls logarithmiert werden. Folglich ist die Richtigkeit und Präzision von τ_c Quantifizierungen in sehr fluiden Membranen besser als in rigiden Vesikeln. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich die Verhältnisse in Vesikelmembranen mit denen in strukturierten Flüssigkeiten und nicht mit denen in idealen Lösungsmitteln vergleichen lassen.

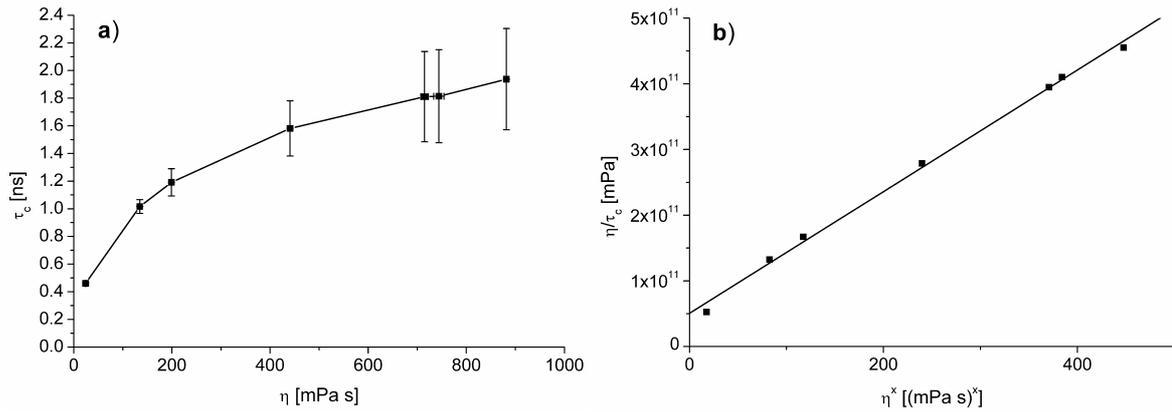


Abb. 38: a) Für die Spinsonde DPME in Mischungen aus mittelkettigen Triglyceriden/Rizinusöl ist zwischen der Rotationskorrelationszeit τ_c und der dynamischen Viskosität η keine Stokes-Einstein-Beziehung nachweisbar, b) Gierer/Wirtz-Plot für DPME in Mischungen aus mittelkettigen Triglyceriden/Rizinusöl zur Herstellung einer Beziehung zwischen τ_c und den gesamten dynamischen Eigenschaften des Systems

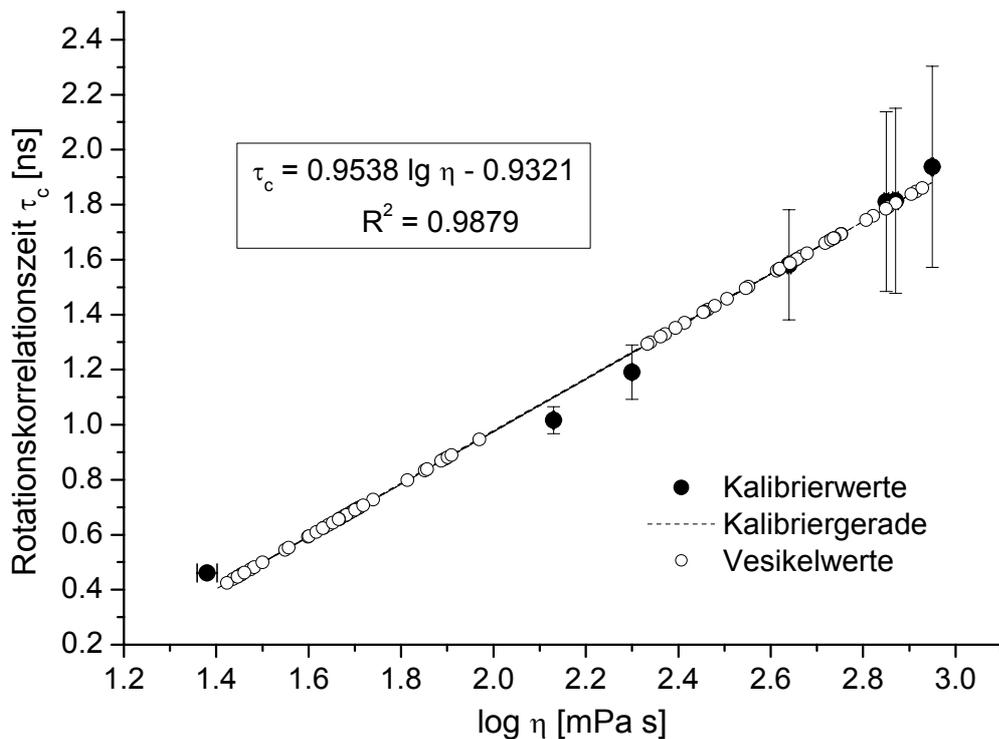


Abb. 39: Beziehung zwischen der dynamischen Viskosität η und Rotationskorrelationszeiten τ_c für DPME in Mischungen aus mittelkettigen Triglyceriden/Rizinusöl

Auch bei Anwendung des passenden Modells ist die dynamische Viskosität zwar kein idealer Parameter zur Darstellung der Mobilität einer Spinsonde, ermöglicht aber die Klassifizierung von Mikroviskositäten in verschiedenen Vesikelmembranen. Es ist allgemein bekannt, dass die Dynamik von Spinsonden hauptsächlich durch ihre molekulare Struktur, ihre Polarität und die Homogenität ihres Lösungsmittels

beeinflusst wird. Zur Minimierung möglicher Messfehler sollten daher die Bedingungen im Kalibriersystem so ähnlich wie möglich zur Mikroumgebung in Vesikelmembranen sein, wo die Spinsonde von unpolaren lipophilen Alkylketten umgeben ist. Diese Bedingung wird in einer Lösung der gleichen Spinsonde in Triglyceriden erfüllt, nicht jedoch in einem polaren System gleicher Viskosität wie z. B. Glycerol/Wasser oder Glycerol/Ethanol Mischungen.

5.4.2 Mikroviskositäten in den Vesikelmembranen

Die Rotationskorrelationszeiten τ_c von DPME und die zugehörigen dynamischen Viskositäten η der Vesikelmembranen sind in Tab. 24 dargestellt. Doppelbindungen in den Membranlipiden haben den stärksten Einfluss auf die Mikroviskosität. Die Mikroviskosität steigt deutlich von $71,02 \pm 6,8$ auf $538,08 \pm 184,2$ mPa s, wenn der Hauptbestandteil Lipoid[®] S 75 mit ungesättigten Fettsäuren in PC(-) durch Lipoid[®] S 100-3 mit gesättigten Fettsäuren in PC(+) ersetzt wird.

Die niedrige Mikroviskosität von etwa 40 mPa s in DAG(B) und DAG(I) wird durch die kurzen Alkylketten in Imwitor[®] 742 hervorgerufen. Die niedrige Mikroviskosität von CER(I), verglichen mit anderen Ceramidvesikeln, kann durch die Doppelbindungen im enthaltenen Tensid Imwitor[®] 375 erklärt werden. CER(-), CER(+), und PC(+) haben deutlich höhere Mikroviskositäten. Die berechnete Reihenfolge der ansteigenden Mikroviskosität in DAG und CER Vesikeln steht in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der ¹H NMR Spektroskopie (vgl. Abb. 33).

Die Liposomen aus reinem ungesättigtem Sojaphosphatidylcholin (SPC, Lipoid[®] S 100) haben eine Mikroviskosität von $49,75 \pm 2,5$ mPa s. Der Wert für PC(-) ist größer als der von SPC. Die Ursachen liegen in den membranstabilisierenden Eigenschaften von Cholesterol oberhalb der Phasenübergangstemperatur.

Die pH-Werte der hydrophilen Phasen haben einen Einfluss auf die Mikroviskosität. Die Formulierungen CER(-) und CER(+) wurden sowohl mit der hydrophilen Phase 1 ohne Milchsäure als auch mit hydrophiler Phase 2 mit Milchsäure hergestellt (Tab. 24). Die Mikroviskosität von CER(-) steigt durch Ansäuern mit der Milchsäure an, was mit einer sinkenden Anzahl von geladenen Carboxylgruppen in freien Fettsäuren einhergeht. Die Mikroviskosität von CER(+) sinkt durch die Ansäuerung, was mit einer steigenden Anzahl protonierter Aminogruppen einhergeht. Folglich führt eine

ansteigende Zahl geladener Gruppen auf der Membranoberfläche zu einer geringeren Mikroviskosität. Diese Vermutung könnte für die Regulation von Transportprozessen durch Zellmembranen bedeutsam sein.

Tab. 24: Rotationskorrelationszeiten τ_c von DPME und Mikroviskositäten η in den Vesikelmembranen ($T = 20\text{ °C}$, $\bar{x} \pm s$, $n=6$)

	τ_c (ns)	η (mPa s)
Hydrophile Phase 1		
CER(-)	$1,38 \pm 0,09$	$267,17 \pm 68,2$
CER(+)	$1,69 \pm 0,12$	$565,84 \pm 163,0$
CER(I)	$0,87 \pm 0,01$	$78,27 \pm 1,2$
DAG(B)	$0,60 \pm 0,01$	$39,84 \pm 0,8$
DAG(I)	$0,63 \pm 0,02$	$43,48 \pm 2,6$
Hydrophile Phase 2		
CER(-)	$1,42 \pm 0,08$	$291,13 \pm 60,4$
CER(+)	$1,59 \pm 0,02$	$436,41 \pm 23,1$
PC(-)	$0,83 \pm 0,04$	$71,02 \pm 6,8$
PC(+)	$1,67 \pm 0,12$	$538,08 \pm 184,2$
Hydrophile Phase 3		
DLPC 1:1	$0,68 \pm 0,01$	$48,89 \pm 1,7$
DLPC 3:1	$0,69 \pm 0,03$	$50,72 \pm 3,6$
Hydrophile Phase 4		
TSCH	$0,45 \pm 0,06$	$28,30 \pm 4,8$
TSCHEt	$0,47 \pm 0,03$	$29,37 \pm 1,9$
SPC	$0,68 \pm 0,02$	$49,75 \pm 2,5$

Transfersomen[®] mit Sojaphosphatidylcholin und Natriumcholat (TSCH), sowie TSCH mit 8.5 % Ethanol in der hydrophilen Phase (TSCHEt) wurden gemäß bereits publizierter Vorschriften hergestellt (Cevc et al. 1998). Die Herstellung von TSCH schloss drei Frier/Tauzyklen mit ein. Die Zugabe von Natriumcholat zum Lipidbilayer verringerte die Mikroviskosität auf $28,30 \pm 4,8$ (TSCH) und $29,37 \pm 1,9$ mPa s (TSCHEt). Das Ethanol und die Frier/Tau Zyklen blieben folglich ohne Einfluss auf die

Mikroviskosität. Ähnlich zu den Phosphatidylcholin/Natriumcholat Vesikeln sind die Membranen aus Diacylglyceriden als Hauptlipidkomponenten mit 39,84 - 43,48 mPa s deutlich dünnflüssiger als Liposomen aus Sojaphosphatidylcholin mit 49,75 mPa s.

Andere Membranvesikel mit kurzen Fettsäuren wurden durch Mischung von Dilaurylphosphatidylcholin (DLPC) mit Sojaphosphatidylcholin im Verhältnis 1:1 oder 1:3 (DLPC 1:1 und DLPC 3:1) hergestellt. Ihre Mikroviskositäten von $48,89 \pm 1,7$ und $50,72 \pm 3,6$ mPa s haben die gleiche Dimension wie die Liposomen aus reinem Sojaphosphatidylcholin. Demzufolge besitzen Membranen aus Phosphatidylcholin mit gesättigten C₁₂ Ketten (Dodecyl- oder Lauryl-) die gleiche Mikroviskosität wie Membranen aus Phosphatidylcholin mit einer Mischung von längeren (C₁₆ und C₁₈), aber ungesättigten Alkylketten. Deshalb hat DLPC keinen Einfluss auf die Mikroviskosität von Liposomen aus Sojaphosphatidylcholin. Die Anzahl der C Atome in gesättigten Alkylketten von Phosphatidylcholin muss niedriger als 12 sein, um die Mikroviskosität in Liposomen aus natürlichem Sojalecithin zu senken. Eine Mikroviskosität von 62,56 mPa s wurde für DMPC Liposomen (gesättigte C₁₄ Alkylketten) im flüssigen Zustand bei 25 °C gemessen (Bahri et al. 2005). Dieser Wert ist etwas höher als der in der vorliegenden Arbeit ausgewiesene von 48,89 - 50,72 mPa s für DLPC Liposomen, weil die Alkylketten zwei 2 C Atome länger sind. Zur Messung wurden polare Glycerol/Ethanol Mischungen als Kalibriersystem und Doxylstearinsäure als Spinsonde benutzt. Dies belegt eine gute Übereinstimmung von Messwerten, die in verschiedenen Arbeitskreisen unter Nutzung unterschiedlicher Spinsonden in Kalibriersystemen abweichender physikochemischer Eigenschaften durchgeführt wurden. Folglich überwiegen die Vorteile einer Kalibrierkurve zur Erfassung der Mikroviskosität die geringen quantitativen Abweichungen des angewendeten Berechnungsmodells.

Jedenfalls können sehr unterschiedliche Systeme unter Nutzung geeigneter Spinsonden mit spezifischen physikochemischen Eigenschaften mit Hilfe der ESR Spektroskopie untersucht werden. Diese unterschiedlichen Eigenschaften sind gleichzeitig manchmal unvorteilhaft, weil die Ergebnisse nur für die betreffende Spinsonde und ihre unmittelbare molekulare Umgebung gelten. Zur Überwindung dieses Nachteils erlaubt die einfache Berechnung von Rotationskorrelationszeiten τ_c in verschiedenen Systemen die Berechnung der dynamischen Viskositäten über eine Kalibrierfunktion. Solche Ergebnisse sind besonders für den Vergleich verschiedener Vesikelmembranen von

Interesse, weil deren dynamische Viskositäten sonst nur schwer ermittelt werden können. Die Vorteile der ESR liegen in ihrer hohen Empfindlichkeit, dem geringen Probenvolumen und der Möglichkeit zur Untersuchung nichttransparenter Proben.

5.5 Freisetzung von CsA und MMF aus den Lipidvesikeln

Da der Nachweis intakter Vesikel in tieferen Schichten als dem Stratum corneum bisher nicht gelungen ist, setzt der Transport von immunsuppressiven Wirkstoffen zu den Lymphozyten in der Dermis eine ausreichende Freisetzungsgeschwindigkeit voraus. Die Freisetzung von CsA und MMF aus den Lipidvesikeln wurde daher untersucht. Dabei sollten die gewonnenen Erkenntnisse aus der physikochemischen Charakterisierung in die Beurteilung mit einfließen.

Wegen der geringen Wasserlöslichkeit von Ciclosporin und Mycophenolatmofetil ist die Einhaltung von sink Bedingungen in konventionellen Freisetzungstests mit wässrigen Akzeptorlösungen kaum möglich. Daher wurde ein Mehrschichtmembranmodell mit lipophilen Akzeptormembranen ausgewählt. Die Ergebnisse der Freisetzungstests mit diesem Modell sind in Abb. 40 und Abb. 41 dargestellt. Die Legenden zeigen die mit der ESR Spektroskopie gemessenen Mikroviskositäten der Membranen.

Die Freisetzungsraten von CsA lagen nach 1000 min zwischen 53 und 100 %, die von MMF zwischen 69 und 100 %. Die Richtigkeit und Präzision der CsA Bestimmungen sind besser als die von MMF. Dies kann mit der deutlichen Instabilität von MMF in wässrigen Lösungen mit pH-Werten zwischen 2 und 7 (Lidgate et al. 2002) sowie mit der hohen Empfindlichkeit der HPLC Methode gegenüber Schwankungen des pH-Wertes in der mobilen Phase begründet werden (vgl. Kapitel 5.1). Die Wiederfindungsrate der Wirkstoffe lag unter Anwendung des Mehrschichtmembranmodells bei 81,3 – 97,7 % für CsA (n=5) und 77,7 – 89,4 % für MMF (n=4).

Die fünf CsA Formulierungen zeigten prägnante Unterschiede in ihren Freisetzungsraten. Die beiden DAG Formulierungen hatten eine langsame CsA Freisetzung von ungefähr 20 %, 30 %, 40 % und 55 % der applizierten Dosis nach jeweils 30, 100, 300 und 1000 min. Bis auf die etwas schnellere Freisetzung von DAG(B) nach 30 und 100 min wiesen beide DAG Formulierungen sehr ähnliche Freisetzungsraten auf. Die Formulierungen CER(-) und CER(+) zeigten dagegen eine

deutlich schnellere Arzneistofffreisetzung unabhängig von ihrem jeweiligen Zetapotenzial. Mehr als 65 % der applizierten Dosis waren schon nach 30 min freigesetzt. Dieser Anteil stieg bereits nach 100 min auf über 80 %. Die Arzneistofffreisetzung war mit mehr als 90 % nach 300 min bereits abgeschlossen. Die Freisetzungsgeschwindigkeit von CsA aus der Formulierung CER(I) lag zwischen den DAG und den anderen CER Vesikeln. Obwohl CsA in DAG Vesikeln im Vergleich zu CER Vesikeln eine deutlich höhere Löslichkeit hatte, war die Freisetzungsgeschwindigkeit aus DAG Vesikeln deutlich geringer.

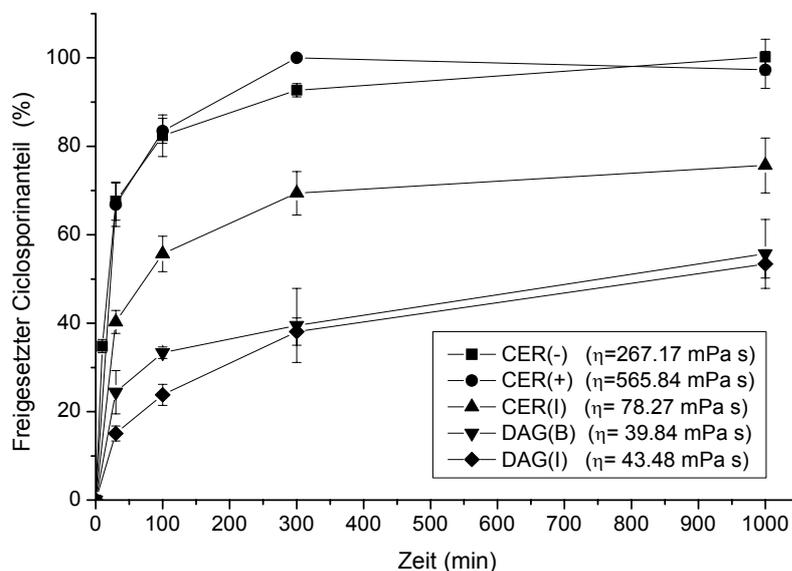


Abb. 40: In-vitro Freisetzung von Cyclosporin aus fünf verschiedenen Vesikelformulierungen mit dem Mehrschichtmembranmodell (\bar{x} und R, n=3)

Die Freisetzungsgeschwindigkeit könnte auch durch den Ort des Wirkstoffes in der Membran beeinflusst werden. Die Meinungen über die Position der CsA Moleküle in vesikularen Formulierungen gehen allerdings recht weit auseinander. ^1H NMR Untersuchungen zeigen, dass CsA innerhalb der Vesikelmembran eingeschlossen wird (Schote et al. 2002). Im Gegensatz dazu kommen andere Autoren zu dem Schluss, dass der Wirkstoff auch an der Oberfläche der Vesikelmembranen adsorbiert vorliegt (Fahr et al. 1995, Ouyang et al. 1995). Jedenfalls konnte trotz des hydrophoben Charakters des Wirkstoffes ein schneller Austausch zwischen verschiedenen Lipidvesikeln nachgewiesen werden (Ouyang et al. 1995). Die Geschwindigkeit dieses Austausches der Wirkstoffmoleküle könnte für eine rasche Freisetzung des Wirkstoffes in den Akzeptor oder das Stratum corneum eine wichtige Rolle spielen. Es liegt auf der Hand, dass auf der Vesikeloberfläche adsorbierte Moleküle den Akzeptor schneller erreichen

können als in der Membran eingelagerte Moleküle, die erst den Randbereich der Membran mit seiner hohen Mikroviskosität passieren müssen.

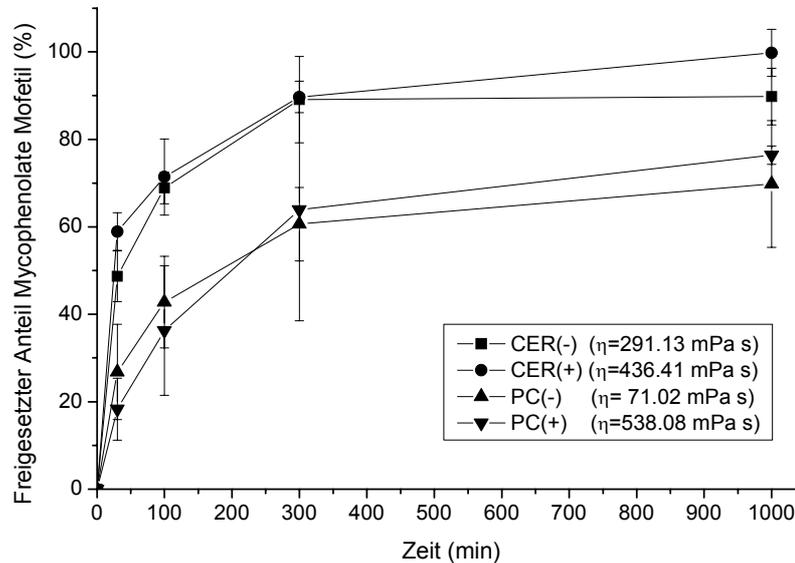


Abb. 41: In-vitro Freisetzung von MMF aus vier verschiedenen Vesikelformulierungen mit dem Mehrschichtmembranmodell (\bar{x} und R, n=3)

Mit MMF beladene CER Vesikel hatten eine schnellere Freisetzung als mit MMF beladene PC Vesikel. Die Formulierungen mit 0,4 % Milchsäure in der hydrophilen Phase 2 wurden für die Freisetzungstests ausgewählt, weil sie eine deutlich höhere Löslichkeit für MMF hatten und konstantere pH-Werte im Vergleich zu den Formulierungen mit ungepufferter hydrophiler Phase 1 aufwiesen. Ein großer Anteil an MMF dürfte außerhalb des Bilayers in der hydrophilen Phase gelöst sein. Die vorliegenden Ergebnisse konnten Befürchtungen entkräften, dass aus der angesäuerten hydrophilen Phase die protonierten Wirkstoffmoleküle für eine Freisetzung in den lipophilen Akzeptor nicht schnell genug zur Verfügung stehen würden. Der Anteil des unprotonierten und damit lipophileren Wirkstoffes im Gleichgewicht, der vorwiegend in den Vesikelmembranen vorliegt, ermöglicht eine schnelle Wirkstofffreisetzung aus den CER Vesikeln, unabhängig von deren Zetapotenzial und unabhängig von der höheren Löslichkeit von MMF in CER(-) und PC(-) im Vergleich zu CER(+) und PC(+). MMF hat bei pH 2 einen $\log K_{\text{Octanol/Pufferlösung}}$ von -0,5, was einem K von 0,32 entspricht (Lidgate et al. 2002). Folglich sind selbst in diesem sauren Milieu noch 32 % der Moleküle in der lipophilen Phase verteilt, was die ausreichende Freisetzungsgeschwindigkeit erklärt. Für die Verhältnisse in vivo muss beachtet werden, dass sich der pH-Wert von 5,5 auf der Hautoberfläche auf 7,0 in der Epidermis

erhöht (Bouwstra und Ponec 2006). Folglich fällt auf diesem Weg die Wasserlöslichkeit von MMF um 2-3 Zehnerpotenzen ab, was für eine ausreichende Penetration sehr ungünstig ist. Gleichzeitig erhöht sich aber der Verteilungskoeffizient stark zugunsten der lipophilen Phase ($K = 316$ bei pH 7), so dass sich MMF mit zunehmender Eindringtiefe verstärkt in die Lipidlamellen des SC umverteilen muss.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Freisetzung von CsA und MMF aus den Formulierungen CER(-) und CER(+) nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für eine sich anschließende Penetration in die menschliche Haut ist. CER(I), PC(-) und PC(+) hatten nach 100 – 300 min mittlere Freisetzungsraten von etwa 60 - 70 %. Dies dürfte für eine ausreichende Wirkstoffpenetration kaum ein Hinderungsgrund sein. Die niedrigviskosen DAG Vesikel könnten dagegen unzureichende Wirkstoffpenetration in die Haut aufweisen, da die Freisetzungsgeschwindigkeit langsam ist.

Die Mikroviskositäten der Vesikel sind in den Legenden der beiden Freisetzungsdigramme dargestellt (Abb. 40 und Abb. 41). Die Freisetzungsversuche mit CsA und MMF zeigten erhöhte Freisetzungsraten für Vesikel mit steigendem Anteil Ceramid IIIB im Bilayer verglichen mit anderen Vesikeln. Die CER-Vesikel weisen eine höhere Mikroviskosität, eine höhere Plastizität sowie eine erhöhte Adhäsionskraft an Oberflächen auf. Diese Eigenschaften der CER-Vesikel führen offenbar zu einer größeren Diffusionsfläche sowie einer längeren verfügbaren Diffusionszeit für eingeschlossene Wirkstoffe. Dies könnte der Grund für die schnellere Arzneistofffreisetzung im Vergleich zu Vesikeln ohne Ceramide sein, vor allem im Vergleich zu den sehr fluiden DAG(I) Vesikeln. Als Konsequenz daraus erscheint die spezifische Lipidkomposition in den Vesikelmembranen wichtiger für die Freisetzung als die niedrige Mikroviskosität. Diese Schlussfolgerung wird gut durch das Ergebnis untermauert, dass die Formulierungen PC(-) mit $71,02 \pm 6,8$ mPa s und PC(+) mit $538,08 \pm 184,2$ mPa s fast identische Freisetzungsraten aufwiesen, und zwar unabhängig von der Mikroviskosität oder dem Zetapotenzial.

5.6 Herstellung von Augentropfen mit Sirolimus und Everolimus

Trotz der günstigen Ein-Jahres-Überlebensraten stimmen die Langzeitaussichten cornealer Transplantate bei Hochrisikopatienten bisher nicht sehr optimistisch. Im Gegensatz zu Überlebensraten transplantatierter Nieren von $> 90\%$ liegt die Fünfjahresprognose der penetrierenden Keratoplastik bei Hochrisikopatienten nur bei etwa 50% . Im Hinblick auf die Prävention von Abstoßungsreaktionen sind daher vor allem bei diesen Patienten Immunsuppressiva vorteilhaft und notwendig. Die systemische Applikation von CsA wird zwar bei Hochrisikopatienten für eine Verringerung der Abstoßungsepisoden um die Hälfte praktiziert (Collins und Augustin 1996). Allerdings handelt es sich um keine lebenserhaltende Indikation, für die eine Inkaufnahme der ernstesten UAW des CsA gerechtfertigt erscheint. Außerdem ist der vordere Augenabschnitt mit einer systemischen Therapie nur schwer erreichbar, so dass die erzielten Ergebnisse oft nicht befriedigen können. Eine topische Therapie mit Immunmodulatoren wäre wegen der geringeren applizierten Dosis und der verringerten UAW zweifellos sehr vorteilhaft. Die Cornea ist wegen ihrer leichten Erreichbarkeit, ihrer spezifischen Anatomie, sowie ihrer leichten diagnostischen Zugänglichkeit ein idealer Ort für eine topische Therapie.

Die Wirksamkeit von systemisch appliziertem Sirolimus und Everolimus in der Behandlung ophthalmologischer Erkrankungen konnte nachgewiesen werden (vgl. Kapitel 3.2), aber der Ort der Arzneistoffwirkung am Auge ist bisher nicht genau bekannt. Leider ist auch die systemische Anwendung von Sirolimus und Everolimus wegen ihrer dosisabhängigen UAW auf vitale Indikationen beschränkt. Eine topische Applikation erfordert üblicherweise bei der Verhinderung der Transplantatabstoßung und der Behandlung der autoimmun-Uveitis die Permeation des Arzneistoffes durch die Cornea. Wegen ihrer physikochemischen Eigenschaften sind die Wirkstoffe Sirolimus und Everolimus für hohe corneale Permeationsraten nicht gerade prädestiniert.

Ziel dieser Arbeit war es, die beiden mTOR Inhibitoren Sirolimus und Everolimus für eine topische Applikation zu etablieren. Es sollte eine augenverträgliche Formulierung mit einer Konzentration von 1 mg/ml ($0,1\%$) hergestellt werden. Dies entspricht einer Erhöhung der Sättigungslöslichkeit um etwa den Faktor 400 für Sirolimus und Faktor 50 für Everolimus.

Weiterhin sollte die Fähigkeit von Sirolimus geprüft werden, die frisch isolierte Schweinecornea zu permeieren. Es sollte weiterhin untersucht werden, ob sich die Überlebenszeit allotransplantierter Cornea an der Ratte durch die topische Applikation von Sirolimus oder Everolimus erhöhen lässt.

Mögliche okulare Formulierungen für schwerlösliche Arzneistoffe sind Cyclodextrinlösungen (CD), Liposomen, hydrotrope Mischungen (HM), Poloxamergele oder Mikroemulsionen (siehe Kap. 4.2). In der vorliegenden Arbeit wurde die Löslichkeit von Sirolimus in den folgenden Formulierungen getestet: (1) 10 proz. (m/v) Lösungen von alpha-Cyclodextrin (α -CD), Hydroxypropyl-beta-Cyclodextrin (HP- β -CD) oder Hydroxypropyl-gamma-Cyclodextrin (HP- γ -CD) unter Zusatz von 0,25 proz. (m/v) eines wasserlöslichen Polymers wie Hydroxypropylcellulose, Hydroxypropylmethylcellulose, Hydroxyethylcellulose, (2) Liposomen mit einer Lipidkonzentration von 5 % (m/v) und positivem und negativem Zetapotenzial, (3) HM mit 10 – 40 proz. (m/m) Propylenglycol, 2 proz. (m/m) Benzylalkohol und 5 proz. (m/m) Benzoesäure/Natriumbenzoat, (4) ein 15 proz. (m/m) Poloxamer 407 Gel, (5) eine Mikroemulsion. Die Auswahl einer geeigneten lipophilen Komponente zur Entwicklung einer Mikroemulsion basierte auf einem Löslichkeitstest von Sirolimus in Isopropylmyristat, mittelkettigen Triglyceriden und Isopropylpalmitat. Die Löslichkeit von Everolimus wurde in einem 15 proz. (m/m) Poloxamer 407 Gel und in einer Mikroemulsion geprüft. Einige der genannten Formulierungen erhöhen nicht nur die Löslichkeit für Arzneistoffe. Sie können auch die okulare Bioverfügbarkeit steigern und zu einer verlängerten Wirkdauer führen, z. B. Liposomen (Schaeffer und Krohn 1982, Singh und Mezei 1983, Meisner und Mezei 1989, Milani et al. 1993, Pleyer et al. 1993, Law et al. 2000), Poloxamergele (Miller et al. 1982) und Mikroemulsionen (Naveh et al. 1994, Hasse und Keipert 1997).

5.6.1 Cyclodextrinlösungen

Cyclodextrinlösungen können über die einfache Schüttelmethode hergestellt werden. Die Löslichkeit von Sirolimus in 10 proz. hypotonen Lösungen von α -CD, HP- β -CDs und HP- γ -CDs, hergestellt nach der Schüttelmethode, betrug jeweils 44,8; 70,2 und 125,8 $\mu\text{g/ml}$. Erhöhte Löslichkeit für Sirolimus in CD Komplexen ist nur dann feststellbar, wenn der Wirkstoff in Methanol gelöst und das Lösungsmittel abgedampft wird, bevor man das Wasser und die CD dazugibt. Vermutlich hat Sirolimus unterschiedliche Kristallmodifikationen mit verschiedenen Löslichkeiten. Die ansteigende Löslichkeit spiegelt die größer werdenden Kavitätendurchmesser der CD Derivate wider. Wegen seiner geringen Lösungsverbesserung und seiner nicht ausreichend belegten Verträglichkeit wurde α -CD daraufhin von den weiteren Versuchen ausgeschlossen.

Es konnte gezeigt werden, dass sich der löslichkeitsverbessernde Effekt von CD-Komplexen durch Autoklavieren erhöhen lässt (Loftsson 1998). Eine weitere Steigerung bewirkt der Zusatz hydrophiler Polymere wie HEC, HPC oder PVP (Loftsson 1998, Loftsson und Masson 2004). Diese Löslichkeitsverbesserung erreicht bei etwa 0,25 % hydrophilem Polymer in der Zubereitung sein Maximum und bleibt bei noch höherer Konzentration auf diesem Niveau. Der löslichkeitsverbessernde Effekt der CD kann darüber hinaus durch Zusatz organischer Salze wie Natriumacetat, Natriumsalicylat oder Benzalkoniumchlorid gesteigert werden (Loftsson et al. 2003). Substanzen mit einer hohen Affinität für den lipophilen CD Innenraum können auch die Löslichkeit anderer Substanzen mit einer niedrigeren Affinität für diesen Innenraum steigern. Für die beiden Derivate HP- β -CD und HP- γ -CD wurde HPC als geeignetes Polymer zur Löslichkeitsverbesserung nach der Autoklaviermethode identifiziert (Tab. 25). Die Löslichkeiten in den autoklavierten Formulierungen mit HPC lagen allerdings kaum höher als bei den nach der Schüttelmethode hergestellten Formulierungen. Während der Dampfsterilisation unter Standardbedingungen von 121 °C und 2 bar für 15 min wurde eine Zersetzung des Wirkstoffes festgestellt. Dieses Problem trat ebenfalls bei der Sterilisation der Poloxamergele und Mikroemulsionen auf. Das Ausmaß der Zersetzung stieg in der Reihenfolge Mikroemulsion (enthält 25 % Wasser) und Poloxamergel (85 % Wasser). Folglich ist der Grad des Arzneistoffabbaus vermutlich proportional zum Wassergehalt der Formulierung.

Tab. 25: Löslichkeit von Sirolimus in autoklavierten Cyclodextrinlösungen mit 0,25 % wasserlöslichem Polymer

Cyclodextrinderivat	Löslichkeit von Sirolimus ($\mu\text{g/ml}$)		
	HPMC	HPC	HEC
HP- β -CD	57,7	87,5	58,9
HP- γ -CD	73,5	112,3	52,0

HPMC: Hydroxypropylmethylcellulose; HPC: Hydroxypropylcellulose; HEC: Hydroxyethylcellulose

Neben einer erhöhten Sättigungslöslichkeit soll der Polymerzusatz auch eine zunehmende Viskosität der Augentropfen hervorrufen. Die dadurch ansteigende corneale Verweildauer der Zubereitung vermindert wiederum den verfrühten Abtransport des Wirkstoffes über die nasolacrimale Drainage. Die okulare Bioverfügbarkeit der Wirkstoffe lässt sich daher durch Zusatz hydrophiler Polymere gleich über zwei Mechanismen steigern. Die dynamischen Viskositäten der Augentropfen sind durch den Polymerzusatz im Vergleich zum Wasser etwa verdreifacht (Tab. 26). Eine stärkere Erhöhung dieser Viskosität auf etwa 15 mPa s wäre durch höheren Polymerzusatz als 0,25 % noch machbar, allerdings ohne dadurch die Löslichkeit noch weiter steigern zu können.

Tab. 26: Physikochemische Eigenschaften von Augentropfen auf Cyclodextrinbasis

	HP- β -CD NaCl	HP- γ -CD NaCl	HP- γ -CD Mannitol
pH-Werte	6,50	6,60	7,19
Osmolalität (mOsmol/kg)	308	286	330
Dichte (g/ml)	1,030	1,031	1,039
Dynam. Viskosität (mPa s)	3,215	3,109	3,878

In weiteren Versuchen wurde die Löslichkeit von Sirolimus in isotonischer Lösung gemessen (Abb. 42). Dabei wurden Mannitol und NaCl als Isotonisierungsmittel geprüft und Benzalkoniumchlorid als Konservierungsstoff ausgewählt. Ein Vergleich der Löslichkeit zum Zeitpunkt null in Abb. 42 mit den Daten in Tab. 25 zeigt, dass die Löslichkeit von Sirolimus in isotonischen CD Lösungen niedriger ist als ohne Zusatz von NaCl oder Mannitol. HP- γ -CDs erzielen höhere Arzneistoffkonzentrationen als HP- β -CDs. Der Wirkstoffgehalt in CD Zubereitungen verringerte sich in nur 6 Monaten um etwa 50 %. Mannitol hat einen kleinen Vorteil im Vergleich zu NaCl im Hinblick auf

die maximale Löslichkeit und die Stabilität der Formulierungen. Es konnte kein Arzneistoff mehr nach einer Lagerzeit von 12 Monaten bei Raumtemperatur detektiert werden. Dieses Ergebnis kann sowohl der geringen Stabilität der Sirolimus-CD Komplexe als auch der geringen Stabilität von Sirolimus in wässriger Lösung zugeschrieben werden.

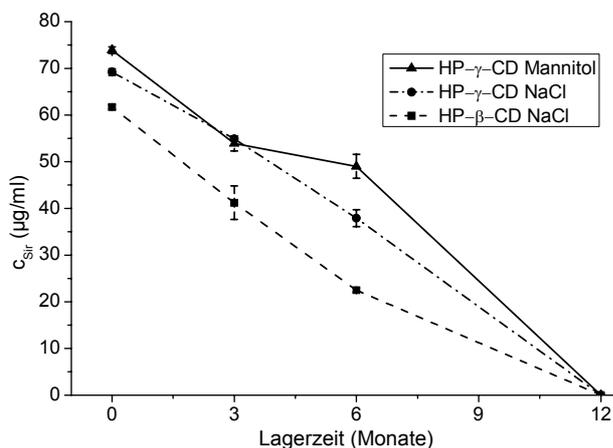


Abb. 42: Stabilität von gesättigten Cyclodextrinkomplexen mit Sirolimus in isotonischer Lösung

Der Durchmesser des Innenraumes beträgt für native α -, β - und γ -CD jeweils etwa 0,49, 0,62 bzw. 0,79 nm (van Doorne 1993). Anhand der Länge einer C-C Bindung von 0,133 - 0,154 nm (Hauptmann 1982) kann abgeschätzt werden, dass ein unsubstituierter Cyclohexan- oder Benzenring eine räumliche Ausdehnung von etwa 0,3 - 0,4 nm besitzt. Folglich sollten in CD einschließbare Moleküle nicht deutlich größer als derivatisierte Benzenringe sein, also etwa die Größe von Acetylsalicylsäure haben. Häufig werden aber auch nur Seitenketten oder andere passende Molekülteile komplexiert. Es kann geschlussfolgert werden, dass der Durchmesser des Sirolimusmoleküls vermutlich zu groß für einen stabilen Einschluss in CD-Komplexen ist. Die Löslichkeit von Sirolimus in CD liegt bei etwa 60 – 70 $\mu\text{g/mL}$. Diese 20-fache Erhöhung der Sättigungslöslichkeit wird wahrscheinlich durch Einschluss der Seitenkette des Sirolimusmoleküls in die CD Komplexe verursacht. Im Vergleich dazu wurden auch für CsA mit seinem großen Ringdurchmesser in CD Lösungen eher niedrige Konzentrationen von 0,025 % (Kanai et al. 1989) und 0,075 % gemessen (Sasamoto et al 1991). Vermutlich erfolgte der CsA Einschluss ebenfalls nur an den Aminosäureseitenketten. Dagegen war die Löslichkeit von MMF mit 1 % sehr gut, was für eine Komplexierung des gesamten Moleküls spricht (Scholz 2003).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die CD Formulierungen mit Sirolimus eine geringe Stabilität, niedrige Reproduzierbarkeit und hohe Empfindlichkeit auf Puffersalze und Isotonisierungsmittel aufweisen. Wegen der niedrigen Löslichkeit konnte kein Wirkstoff in Akzeptorproben von cornealen Permeationsversuchen nachgewiesen werden. Folglich sollte eine alternative Formulierung nicht nur eine höhere Löslichkeit für den Wirkstoff haben, sondern möglichst auch die corneale Permeation erhöhen.

5.6.2 Liposomen

Phospholipid-Liposomen wurden für eine ophthalmologische Applikation optimiert. Die Vesikel wurden durch Zusatz von Stearylamin oder Dicetylphosphat positiv bzw. negativ aufgeladen. Für die Hydratisierung der kationischen Liposomen wurde ein isotonischer Puffer mit einem pH-Wert von 5,4 benutzt, um die Extrusion zu erleichtern. Der Zusatz von 15 % Propylenglycol in PC(+) PG und PC(-) PG führt bereits zu hypertonen Lösungen, so dass keine weitere Isotonisierung erforderlich ist. Partikelgrößen zwischen 100 und 165 nm mit einer engen Teilchengrößenverteilung ($PI < 0,25$) wurden erzielt (Tab. 27).

Tab. 27: Charakterisierung der Liposomen zur ophthalmologischen Applikation

Formulierung	Größe (nm) ^a	PI ^{a,b}	Zetapotenzial (mV) ^a	pH-Werte ^{a,c}
PC(+) PG ^{d,e}	129,2 – 133,0	0,122 – 0,22	44,0 – 45,3	6,63 – 6,69
PC(-) PG ^{d,e}	108,1 – 110,1	0,144 – 0,24	-49,3 – -51,3	3,91 – 3,99
PC(+)pH 5,4 ^f	156,9 – 162,7	0,076 – 0,11	41,0 – 42,8	6,36 – 6,43
PC(-)pH 7,4 ^f	160,6 – 166,0	0,164 – 0,22	-16,6 – -18,4	6,13 – 6,19

^a Spannweite, n=3; ^b Polydispersitätsindex; ^c Werte der Proben im Zetasizer; ^d PC: Phosphatidylcholin; ^e PG: 15 % Propylenglycol in der wässrigen Phase; ^f pH 5,4 oder 7,4: isotoniert mit Phosphatpuffer pH 5,4 oder 7,4

Zetapotenziale über + 30 mV oder unter -30 mV sind günstig für eine mittlere Stabilität. Die extrudierten Lipidvesikel können nach der Herstellung in eleganter Weise durch eine 0,2 µm Polycarbonatmembran bakterienfrei filtriert werden.

Leider konnte mit der HPLC kein Sirolimus in diesen Liposomen detektiert werden. Folglich sind Liposomen auch nicht zur Solubilisierung von Sirolimus geeignet.

Vermutlich ist der Wirkstoff zu hydrophob, um bei der Hydratisierung der Lipidfilme solubilisiert zu werden. Möglicherweise ist der Wirkstoff während der Herstellung auch zu sehr dem Einfluss von Licht, Sauerstoff und hydrolytischen Prozessen ausgesetzt. Dies würde erklären, warum das strukturell ähnliche Tacrolimus in Liposomen mit 4,8 mg/ml inkorporiert werden konnte (Pleyer et al. 1993, Whitcup et al. 1998). Dabei muss allerdings auch die deutlich höhere Lipophilie von Sirolimus im Vergleich zu Tacrolimus beachtet werden (vgl. Kapitel 5.9). Wegen der fehlenden Löslichkeit von Sirolimus wurden keine Permeationsexperimente mit Liposomen als Donatorlösung durchgeführt.

5.6.3 Hydrotrope Mischungen (HM) unter Zusatz von Kosolventien

Die Löslichkeit von Sirolimus in HM mit 40 proz. Propylenglycol (HM PG 40 %, vgl. 8.4.3) war > 1 mg/ml und in HM PG 30 % zwischen 0,31 und 0,45 mg/ml. HM enthalten üblicherweise 10 proz. Ethanol, aber Augentropfen sollten ohne Ethanol hergestellt werden. Eine Verringerung des Propylenglycolanteils unter 30 proz. war ohne Ethanol nicht möglich, da dann die Benzoesäure wieder auskristallisierte. Die Solubilisierbarkeit hydrophober Substanzen in Wasser steigt durch Kosolventien üblicherweise leicht bei niedrigen, aber exponentiell bei hohen Kosolventienkonzentrationen an (Yalkowsky 1999). Folglich liegt eine Konzentration unter 30 proz. bereits im subexponentiellen Bereich. Darüber hinaus zeigten aber auch alle anderen HM ohne Ethanol eine hohe Neigung, nach einigen Tagen Lagerung bei Raumtemperatur große nadelförmige Kristalle abzuscheiden. Daher wurde der Anteil der lipophileren Benzoesäure zugunsten des hydrophileren Natriumbenzoats verringert, was die Kristallisationsneigung aber nicht wesentlich abschwächte. Während der Permeationsversuche wurde eine Eintrübung der isolierten Schweinecornea beobachtet, was vermutlich auf ausgefällte Salze oder Proteine zurückführbar ist. Es kann geschlussfolgert werden, dass HM zwar ein gutes Lösungsvermögen für Sirolimus besitzen, aber die Stabilität und die Verträglichkeit der Formulierungen für eine okulare Applikation nicht ausreichend sind.

5.6.4 Poloxamergele

Die Poloxamere können halbfeste Gele in situ nach der Applikation bilden. Neben der guten Verträglichkeit ist dies im Hinblick auf eine verlängerte corneale Verweildauer der Formulierung sehr vorteilhaft. Die Löslichkeit von Sirolimus in einem 15 proz. Poloxamer 407 Gel betrug 0,12 mg/mL. Leider ist dies deutlich niedriger als notwendig. Permeationsversuche wurden daher nicht durchgeführt. Eine Filtration der Gele durch ein bakterienzurückhaltenden Filter ist wegen der hohen Viskosität von 70 – 100 mPa s bei 20 °C und 3200-3600 mPa s bei 32 °C nicht möglich. Eine Filtration durch ein 5 µm PTFE Filter ist allerdings bei 4 °C praktikabel, um kontaminierende Partikel abzutrennen. Eine aseptische Herstellung ist wegen der aufwendigen Herstellungsprozedur schwierig.

Zu diesem Zeitpunkt stand auch Everolimus für die Arbeiten zur Verfügung. Die Löslichkeit von Everolimus in einem 15 proz. Poloxamer 407 Gel betrug > 1mg/ml. Dies zeigt, dass sich die etwa achtfach höhere Wasserlöslichkeit von Everolimus im Vergleich zu Sirolimus auf wässrige Poloxamergele übertragen lässt. Allerdings löst sich das eingesetzte Everolimus nicht vollständig auf. Es bleibt immer ein feiner weißer Schleier in den Zubereitungen zurück, der sich aber abfiltrieren lässt. Durch die Filtration sinkt der Wirkstoffgehalt der Gele.

Um eine vollständige Auflösung zu erreichen, sollte der Wirkstoff in einer niedrigeren Konzentration von 0,5 mg/ml eingearbeitet werden. Zu diesem Zweck wurde zunächst eine Optimierung der Gelviskosität durchgeführt. Die Gele sollten bei 20 °C tropfbar und bei 32 °C halbfest sein. Die dynamischen Viskositäten von Poloxamer 407 Gelen bei 32 °C stiegen in Konzentrationen zwischen 9 und 13 % schwach an, zwischen 13 und 14 % etwas stärker und darüber sprunghaft (Abb. 43). Um die Viskositäten verschiedener Chargen möglichst reproduzierbar zu gestalten, wurde eine Konzentration von 13,4 % ausgewählt. Gele mit dieser Konzentration hatten bei 20 °C dynamische Viskositäten von 19,9 - 20,4 mPa s (Schubspannung 0,64 – 0,65 Pa) und waren damit tropfbar, während bei 32 °C mit 146,3 – 218,0 mPa s (Schubspannung 3,4 – 7,7 Pa) eine zähflüssige Konsistenz beobachtet wurde. Letztlich bleibt aber die geringe Reproduzierbarkeit der Viskositäten von Charge zu Charge problematisch.

Für 15 proz. Poloxamer 407 Gele wurden von anderen Autoren auch Viskositäten von 23,19 und 26,06 mPa s bei 25 und 32 °C gemessen, während Gelkonsistenz erst in 20 proz. Gelen bei 32 °C beobachtet wurde (Siebenbrodt 1989).

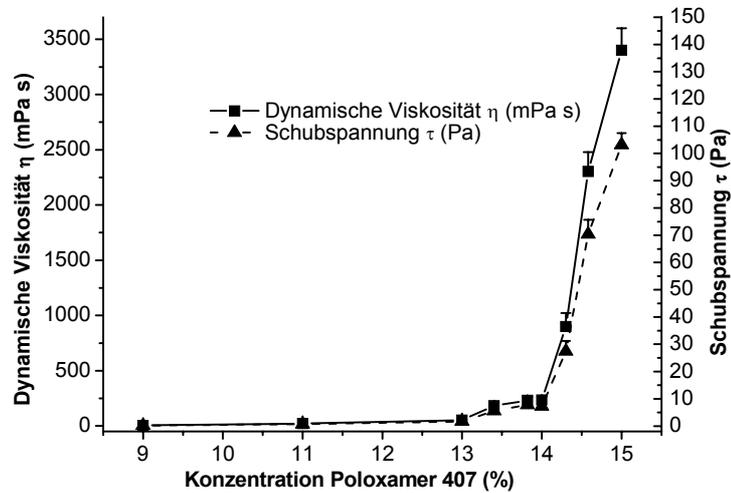


Abb. 43: Dynamische Viskosität η und Schubspannung τ von Poloxamergelen bei 32 °C (\bar{x} und R, $n = 3$)

Zur Einstellung der Osmolalität in den Augengelen wurde die Messreihe in Abb. 44 aufgenommen.

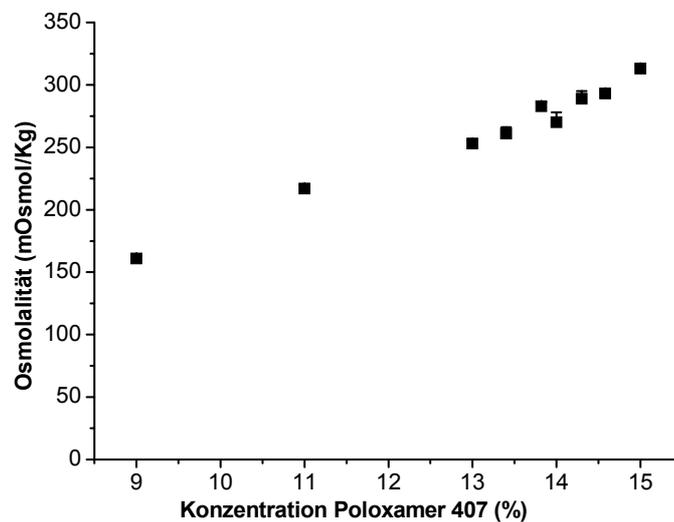


Abb. 44: Osmolalitäten von Augengelen in Abhängigkeit von der Konzentration an Poloxamer 407 (\bar{x} und R, $n=3$)

Während das 15 proz. Poloxamergel bereits ohne weitere Zusätze schwach hyperton war, wurde das 13,4 proz. Poloxamergel mit 0,15 % NaCl isotoniert.

Tab. 28 zeigt die pH-Werte und Osmolalitäten der fertigen Everolimus-Formulierungen.

Tab. 28: pH-Werte und Osmolalitäten von Augentropfen mit Poloxamer 407 (Spannweite, n = 3)

Poloxamerkonzentration (%)	15 %	13,4 %
pH-Werte	7,36-7,41	7,19-7,21
Osmolalität (mOsmol/kg)	355-377	341-356

Das 13,4 proz. Poloxamergel mit 0,5 mg/ml Everolimus wurde einem Stabilitätstest über sechs Monate bei 20 °C unterzogen (Abb. 45).

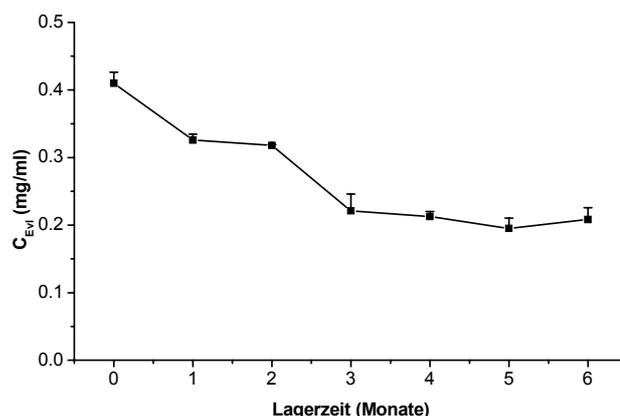


Abb. 45: Stabilität von Everolimus in 13,4 proz. Poloxamer 407 Gelen (\bar{x} und R, n=3)

Die Konzentration von Everolimus lag zum Zeitpunkt null bereits bei 0,41 mg/ml. Dies zeigt, dass schon bei der Herstellung ein Anteil des Everolimus ungelöst blieb und abfiltriert wurde. Während der Lagerzeit geht der Wirkstoffgehalt relativ schnell zurück und beträgt bereits nach drei Monaten nur noch etwa die Hälfte des Ausgangswertes. Folglich wird der Wirkstoff in der wässrigen Zubereitung relativ rasch durch Hydrolyse und/oder Oxidation abgebaut. Wegen der unvollständigen Auflösung und der geringen Arzneistoffstabilität wurde auf eine weitergehende Verbesserung von Poloxamergelen mit Everolimus schließlich zugunsten einer Mikroemulsion verzichtet.

5.6.5 Mikroemulsion

Die folgenden Ausgangsstoffe sind in Mikroemulsionen zur ophthalmologischen Applikation üblich:

- Lipophile Phase: Isopropylmyristat, Isopropylpalmitat, mittelkettige Triglyceride und Triacetin in Konzentrationen von ca. 5-15 %
- Tenside: Lecithine, Poloxamere, Polysorbate oder deren Mischungen in Konzentrationen von ca. 2-15 %
- Kotenside: Propylenglycol oder Butanol in Konzentrationen von ca. 10-40 %.

Die lipophilen Komponenten mit der größten Verträglichkeit sind die beiden Wachse Isopropylpalmitat und Isopropylmyristat sowie die mittelkettigen Triglyceride. Leider sind diese Lipide zur Solubilisierung von Sirolimus nicht geeignet. Ein Löslichkeitstest zeigte, dass Sirolimus in Isopropylpalmitat, Isopropylmyristat und mittelkettigen Triglyceriden eine Löslichkeit von jeweils nur 0,5, 0,8, und 1,5 mg/ml aufwies. Diese Ergebnisse belegen, dass die extrem hydrophobe Substanz Sirolimus auch in apolaren Lipiden nur eine schlechte bis sehr schlechte Löslichkeit hat. Die beobachtete Löslichkeit von etwa 1 mg/ml steht in guter Übereinstimmung mit der in apolarem Maiskeimöl (Simamora et al. 2001). Der Arzneistoff hat eine moderate Löslichkeit in polaren Lipiden wie Triacetin (< 20 mg/ml) und mit Wasser mischbaren Lösungsmitteln wie Propylenglycol (< 15 mg/ml) und Polyethylenglycol 400 (< 30 mg/ml). Eine gute Löslichkeit weist Sirolimus in polaren Lösungsmitteln wie Dimethylformamid (> 300 mg/ml), Dimethylsulfoxid (> 500 mg/ml) oder Benzylalkohol (> 400 mg/ml) auf, aber diese Materialien sind für Augentropfen nicht verwendbar. Nur Benzylalkohol ist in einer niedrigen Konzentration von bis zu 1 % in Augentropfen als Konservierungsstoff in Gebrauch (Dolder 1990). Zufriedenstellende Löslichkeit von Sirolimus (> 1 mg/ml) wurde in einer Mikroemulsion mit 20 % Triacetin und 40 % Propylenglycol erzielt, die für die okulare Applikation anderer lipophiler Arzneistoffe beschrieben wurde (Siebenbrodt und Keipert 1993). Die weiteren Untersuchungen wurden mit dieser Mikroemulsion als Lösungsmittel für Sirolimus durchgeführt. Auch die Löslichkeit von Everolimus war in dieser Zubereitung > 1 mg/ml. Während Sirolimus in der lipophilen Phase der Mikroemulsion (enthält Triacetin und Poloxamer 184) mehrere Stunden bis

zur klaren Lösung gerührt werden muss, gelingt die Auflösung von Everolimus sehr schnell.

Die Mikroemulsion selbst ist im Temperaturbereich von 15 – 35 °C stabil, wurde aber bei Abkühlung auf 4 – 8 °C trüb. Diese Trübung löst sich nach Erwärmung auf Raumtemperatur vollständig wieder auf. Die Mikroemulsionen sollten daher bei 20 °C und geschützt vor Licht erfolgen, da Sirolimus und Everolimus aufgrund ihrer kumulierten Doppelbindungen sehr lichtempfindlich sind. Abb. 46 zeigt, dass die beiden Arzneistoffe unter diesen Bedingungen über 12 Monate annähernd stabil waren.

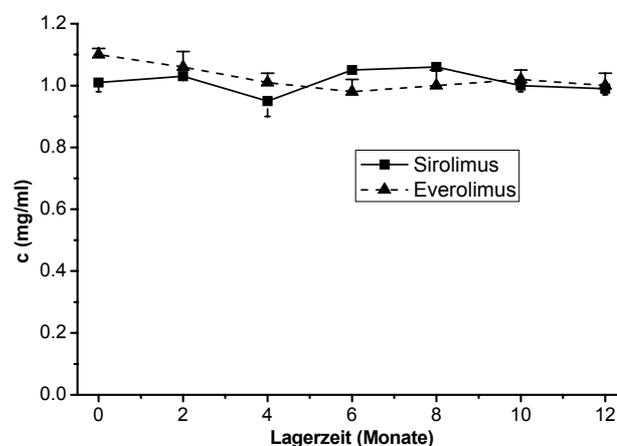


Abb. 46: Stabilität von Sirolimus und Everolimus in der Mikroemulsion (\bar{x} und R, n=3)

Es ist bekannt, dass Mikroemulsionen die Stabilität aufgelöster Wirkstoffe im Vergleich zu anderen wässrigen Systemen erhöhen können (Siebenbrodt und Keipert 1991). Die Makrolactone Sirolimus und Everolimus sind empfindlich gegenüber Hydrolyse, erhöhter Temperatur und durch Licht induzierte Oxidation. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass die Wirkstoffmoleküle in der Mikroemulsion vor Sauerstoff und Wasser geschützt vorliegen. Daher stellt sich die Frage, wo in den Mikroemulsionen hydrophobe Stoffe bevorzugt eingelagert werden. Zu dieser Frage konnten zwar aus der Literatur keine Studien über immunsuppressive Makrolactone gefunden werden, dafür aber für andere hydrophobe Substanzen. Es konnte durch ^1H NMR Messungen gezeigt werden, dass das schwer wasserlösliche Antibiotikum Chloramphenicol in den hydrophilen Schichten einer Mikroemulsion zur okularen Applikation vorliegt (Lv et al. 2006). Diese hydrophilen Schichten werden durch Oxyethylenreste gebildet. Darüber hinaus wurde die hohe Mobilität von Protonen in den Methylgruppen von Poloxameren in Formulierungen wie Nanoemulsionen oder NLC

nachgewiesen (Jores et al. 2003). Offenbar zeigen solche hochbeweglichen polaren Gruppen mit vielen Sauerstoffatomen in den Grenzflächen von Lipidformulierungen die besten Lösungseigenschaften für hydrophobe Stoffe. Daher hat Sirolimus eine akzeptable Löslichkeit in Systemen aus Poloxameren, Propylenglycol, Benzylalkohol oder Triacetin, die viele polare lipophile Domänen bereitstellen. Diese Vermutung wird durch den vorliegenden Löslichkeitstest von Sirolimus gestützt. Sirolimus besitzt in apolaren Lipiden nur eine sehr schlechte Löslichkeit. Es sollte weiterhin beachtet werden, dass die Reinsubstanzen Sirolimus und Everolimus durch den Hersteller mit lipophilen Antioxidantien wie 2,6-Di-tert-Butyl-4-hydroxytoluol (BHT) in Konzentrationen von etwa 0,2 % versetzt werden (Navarro et al. 2000). Diese Antioxidantien sind in der Mikroemulsion gut löslich, weniger gut aber in wässrigen Formulierungen wie CD Lösungen oder Poloxamergelen. Daher erhöht sich die Stabilität der beiden mTOR-Inhibitoren in der Mikroemulsion.

Die Mikroemulsion hatte einen scheinbaren pH-Wert von 5,85 – 5,93. Der pH-Wert wird als scheinbar bezeichnet, weil eine Mikroemulsion kein rein wässriges System ist. Die dynamische Viskosität der Mikroemulsion beträgt 27,7 – 28,5 mPa s bei 20 °C und 15,0 – 16,6 mPa s bei 32 °C. Die Zubereitung ist daher gut tropfbar. Die Filtration der Mikroemulsion durch ein bakterienzurückhaltendes 0,2 µm PTFE Filter ist dagegen wegen der Viskosität und/oder der geringen Benetzbarkeit des Filters ein Problem. Deshalb ist ein aseptischer Herstellungsprozess nötig. Allerdings ist eine mikrobielle Besiedlung durch den Gehalt von 40 % Propylenglycol sehr unwahrscheinlich. Eine Entfernung kontaminierender Partikel kann mit einem 5 µm PTFE Filter durchgeführt werden.

Die in vivo Toxizitäts-Daten der Mikroemulsionsbestandteile sind akzeptabel. Triacetin erhielt den Status eines generell sicheren Lebensmittelbestandteiles (GRAS – generally accepted as safe) von der FDA. Unverdünntes Triacetin hatte keine oder nur schwache Effekte auf das Auge (Laillier et al. 1976, Conquet et al. 1977). Poloxamer 184 (Synperonic® L 64) ist ein gut etabliertes nichtionisches Tensid zur Herstellung peroraler, parenteraler und ophthalmologischer Formulierungen. Die Toxizität der Poloxamere ist generell sehr niedrig ($LD_{50} > 2\text{g/kg}$), steigt allerdings mit sinkender Kettenlänge und erhöhter Lipophilie an (Leaf 1967, Produktinformation ICI). Lösungen mit bis zu 50 proz. Propylenglycol riefen keine Irritationen am Kaninchenaugen hervor, während unverdünnte Applikation mit schwacher conjunctivaler Rötung assoziiert

wurde. Beobachtete osmotisch bedingte Reizungen hielten nur wenige Sekunden lang an. Augensalben und -lösungen mit bis zu 70 proz. Propylenglycol zeigten keine oder nur schwache Irritationen am Menschenaugen oder waren wirksam zur Behandlung von Patienten mit Corneaödemen (Grant 1993, Bietti et al. 1973). Neben der guten Löslichkeit von Sirolimus und Everolimus ist die ophthalmologische Verträglichkeit der Mikroemulsion deutlich besser als die der hydrotropen Mischungen. Es konnte im HET CAM Verträglichkeitstest am inkubierten Hühnerei (Hühnereitest an der Chorion Allantoin Membran) nachgewiesen werden, dass die Mikroemulsion nur ein sehr niedriges Irritationspotenzial hat (schwache Blutinjektion in die Membranmukosa, aber weder Koagulation noch Lyse, Siebenbrodt und Keipert 1993). Hydrolisiertes Triacetin oder die hohen Konzentrationen an Tensid/Kotensid könnten für dieses Ergebnis verantwortlich sein. Der HET CAM Test kommt ohne Versuchstiere aus, liefert aber äquivalente Ergebnisse wie der Draize-Test am Kaninchenauge (Luepke 1985, Luepke et al. 1986, Spielmann et al. 1996).

5.7 Permeationsversuche mit Sirolimus gelöst in der Mikroemulsion

Die Permeationsversuche mit Sirolimus wurden mit frisch isolierter Schweinecornea durchgeführt. Das Donorvolumen von 1 ml ist über 240 min in Kontakt mit der Cornea. Abb. 47 zeigt die zeitabhängigen Sirolimuskonzentrationen im Akzeptormedium, die mit dem IMX[®] Immunoassay gemessen wurden (Bestimmungsgrenze 1,5 ng/ml).

Die Permeation durch intakte Cornea war sehr langsam. Mittlere Konzentrationen unterhalb von 4,3 ng/ml wurden nach 240 min registriert. Akzeptorkonzentrationen zwischen 6,7 und 9,8 ng/ml wurden nach dieser Zeit gemessen, wenn das Corneaepithel entfernt wurde. Es kann daher geschlossen werden, dass das hydrophile Stroma das Haupthindernis für die Sirolimuspermeation ist. Die corneale Permeation des extrem hydrophoben Arzneistoffs Sirolimus erfolgt wegen der starken Hydrophilie des Stromas nichtlinear. Es kann zwar auch nach mehr als 30 min kein striktes Plateau beobachtet werden, aber die Permeationsgeschwindigkeit sinkt nach dieser Zeit vermutlich wegen einer partiellen Sättigung des Stromas mit Sirolimus. Ein steady state der Permeation würde sich wahrscheinlich nach längeren Zeiten als 240 min einstellen, was aber keine praktische Relevanz mehr für eine okuläre Applikation in vivo besitzt.

Die Integrität der Cornea wurde im Vitalitätstest mit 0,4 % Trypanblau Lösung geprüft. Dabei wurden sehr kleine punktförmige Bereiche toter Zellen in frisch isolierten Corneas beobachtet, die makroskopisch nur sehr schwer erkennbar waren. Nach der Permeationszeit wurden diese Bereiche etwas größer. Diese Beobachtungen wurden in ähnlicher Form bereits beschrieben, wenn mit Trypanblau und 0,5 % Fluoresceinlösung gearbeitet wurde (Norn 1979). Folglich kann die Richtigkeit der Permeationsversuche festgestellt werden.

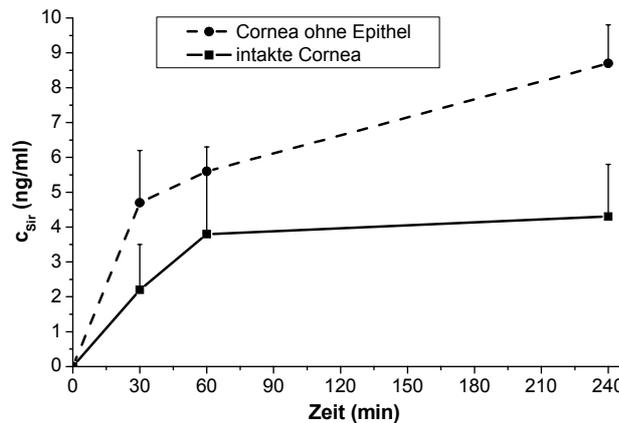


Abb. 47: Permeation von Sirolimus durch frisch isolierte Schweinecornea (Konzentrationen im Akzeptorkompartiment) bei Verwendung einer Mikroemulsion mit 0,1 % Arzneistoff im Donorkompartiment; intakte Cornea: n = 4; Cornea ohne Epithel: n = 3 (\bar{x} und R).

Die entscheidende Lokalisation der Abstoßungsreaktion transplantierte Cornea ist nicht sicher festlegbar. Es gibt epitheliale und endotheliale Abstoßungsreaktionen. Die epitheliale wird meistens nicht behandelt, weil vom Limbus her in kurzer Zeit epitheliales Gewebe des Empfängers nachwächst. Die endotheliale Abstoßungsreaktion führt zur Trübung des Transplantates und ist am gefährlichsten, weil die Endothelzellen sich nach der Transplantation nicht mehr zur Regeneration von Schäden teilen können und auch vom Limbus her keine neuen mehr nachwachsen. Die Abstoßung kann sowohl chronisch als auch akut sein. Im allgemeinen ist die Zahl der Endothelzellen nach spätestens 15 – 20 Jahren so gesunken, dass die Transplantatüberlebenszeit dadurch begrenzt wird. Es können aber zeitliche Abweichungen nach unten oder nach oben bis zu max. 40 Jahren vorkommen.

Für eine systemische Applikation von Sirolimus wird davon ausgegangen, dass eine Vollblutkonzentration von mindestens 7 - 12 ng/ml eine Abstoßungsreaktion allotransplantierte Nieren verhindert (Svensson et al. 1997). Obwohl die wirksame

Sirolimuskonzentration im Bereich des Endothels hinter dem Stroma und im Kammerwasser zur Verhinderung der Abstoßungsreaktion allotransplantierte Cornea bis heute nicht bekannt ist, dürfte die Permeationsrate durch intakte Cornea für eine topische Applikation zu niedrig liegen.

Eine hohe Kammerwasserkonzentration ist lediglich der Nachweis, dass der Wirkstoff am richtigen Wirkort vorliegt. Sie garantiert trotzdem noch nicht den Erfolg der immunsuppressiven Therapie. Umgekehrt schließt die Abwesenheit von Sirolimus im Kammerwasser die praktische Wirksamkeit nicht aus, da möglicherweise die Anwesenheit des Wirkstoffes an der Operationswunde schon ausreicht. Daher wurden trotz des negativen Permeationstests praktische Versuche an der Ratte durchgeführt.

5.8 Topische Applikation von Sirolimus und Everolimus nach penetrierender Keratoplastik

In Zusammenarbeit mit der Augenklinik der Charité war es möglich, die Mikroemulsion mit Sirolimus oder Everolimus im praktischen Versuch zur Verlängerung der Überlebenszeit allotransplantierte Rattencornea zu testen.

Zu diesem Zweck erhielten weibliche Lewis Ratten 3,5 mm große Corneatransplantate von weiblichen Dark Agouti Ratten. Da die Gewebe von Spender und Empfänger sowohl MHC I als auch MHC II inkompatibel sind, erfolgt ohne Behandlung nach ca. 12 – 14 Tagen eine Abstoßungsreaktion. Zur Prüfung der Frage, ob die lokale Applikation von Sirolimus und Everolimus die Überlebenszeit verlängern kann, wurde fünf mal täglich 20 µl der Mikroemulsion mit (1) 0,1 proz. Sirolimus, (2) 0,1 proz. Everolimus, (3) 0,05 proz. Everolimus, (4) 0,025 proz. Everolimus oder (5) Vehikel ohne Arzneistoff appliziert. Jede Gruppe enthielt acht Versuchstiere. Die Behandlung begann direkt nach der Operation und wurde für max. 35 Tage fortgesetzt. Die Transplantate wurden täglich begutachtet und das Voranschreiten der Abstoßungsreaktion anhand einer vierstufigen Skala beurteilt. Über die näheren Bedingungen bei der Durchführung der Studie informiert Kap. 8.6.

Alle mit wirkstofffreiem Vehikel behandelten Transplantate wurden erwartungsgemäß innerhalb von etwa zwei Wochen abgestoßen, und zwar mit einer mittleren Überlebenszeit von $13,3 \pm 1,7$ Tagen. Bei den Tieren, die mit 0,1 proz. Sirolimus oder 0,1 proz. Everolimus behandelt wurden, erfolgte die Abstoßungsreaktion sogar noch

schneller, vor allem bei den mit Sirolimus behandelten Tieren. Dies wurde auf Wundheilungsstörungen zurückgeführt. Die mit Everolimus in geringerer Konzentration behandelten Transplantate hatten signifikant verlängerte mittlere Überlebenszeiten von $21,4 \pm 7,0$ Tagen in der 0,05 proz. Gruppe ($P = 0,006$) und $16,4 \pm 2,3$ Tagen in der 0,025 proz. Gruppe ($P = 0,015$). Diese Daten belegen, dass topisch appliziertes Everolimus die Überlebenszeit transplantierte Cornea in einem experimentellen Keratoplastikmodell signifikant verlängern kann. Allerdings waren die erzielten Überlebenszeiten deutlich kürzer als bei systemischer Applikation von 1,5 und 2,5 mg/kg Everolimus mit $32,3 \pm 11,3$ und $37,7 \pm 12,5$ Tagen oder im Vergleich zu systemischem CsA 10/mg/kg mit $39,7 \pm 12,5$ Tagen (Reis et al. 2001). Dabei ist zu beachten, dass diese systemischen Dosierungen auch sehr hoch gewählt waren (vgl. Tab. 1). Es wurde eine stark synergistische Wirksamkeit bei der systemischen Applikation einer Kombination aus Everolimus und MMF festgestellt (Reis et al. 2000). Es sollte daher überprüft werden, ob sich diese Synergie auch auf die topische Applikation der beiden Wirkstoffe übertragen lässt.

Da Sirolimus die Cornea nicht permeieren kann (vgl. Kapitel 5.6), ist der Wirkstoff vermutlich nur an der Operationswunde in wirksamer Konzentration lokal bioverfügbar. Die Wundheilungsstörungen überwiegen hier die geringe immunsuppressive Wirkung. Everolimus hat offenbar durch seine höhere Hydrophilie Vorteile in Bezug auf die Ausprägung der Immunsuppression.

Die Wundheilungsstörungen belegen, dass sich die proliferationshemmende Wirkung der mTOR Inhibition nicht auf T-Lymphozyten beschränken lässt. Es konnte gezeigt werden, dass Sirolimus in vitro die mit FGF (fibroblast growth factor) induzierte Proliferation und Migration von humanen dermalen Kapillarendothelzellen stark inhibierte (Kwon und Kim 2006, vgl. Kapitel 3.2.1). In vivo war die FGF induzierte Neovascularisation von Kaninchencornea signifikant vermindert. Darüber hinaus war auch die Expression von VEGF (vascular endothelial growth factor) verringert. Es konnte gezeigt werden, dass Sirolimus die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen der Ratte hemmte (Park et al. 2005). Daher soll in Zukunft geprüft werden, ob sich Sirolimus und Everolimus für eine Verwendung in der Glaukomchirurgie eignen. Wenn die Beherrschung von Glaukomen trotz Applikation von zwei verschiedenen augeninnendrucksenkenden Wirkstoffen nicht gelingt, wird chirurgisch mit Hilfe einer Skleralamelle der Abfluß des Kammerwassers ermöglicht. Zur Aufrechterhaltung der

Wirkung muss häufig die Vernarbung des Sickerkissens medikamentös verhindert werden. Die derzeit genutzten Zytostatika Mitomycin C oder 5-Fluoruracil hemmen wegen ihrer zu starken Wirksamkeit die Wundheilung in manchen Fällen irreversibel, so dass Bedarf an einem schwächer wirksamen Arzneistoff besteht.

5.9 Bewertung der Ergebnisse mit Sirolimus und Everolimus

In dieser Untersuchung wurde nach einer okular applizierbaren Darreichungsform für den extrem schlecht in Wasser löslichen Wirkstoff Sirolimus und sein etwas besser lösliches Derivat Everolimus gesucht. Neben einer ausreichenden Löslichkeit sind viele Faktoren bei der Entwicklung eines solchen Systems zu berücksichtigen, z. B. einfache Anwendbarkeit, hohe Verträglichkeit, fehlende Toxizität und keine Sichtbeeinträchtigung. Die mechanischen Eigenschaften sind vor allem wichtig, um eine physikalische Irritation des Auges zu vermeiden, vor allem während einer Langzeitapplikation. Wässrige Systeme haben deshalb entscheidende Vorteile im Vergleich zu Augenölen, Cremes oder Salben. Ihre leichtere Applikation, ihre Durchsichtigkeit und niedrigere Viskosität tragen zu einer besseren Patientencompliance bei, die auf ein ausreichendes Ansprechen auf die Behandlung entscheidenden Einfluss hat.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass eine Mikroemulsion ein geeignetes Lösungsmittel zur Herstellung von Augentropfen mit einer ausreichenden Konzentration von 1 mg/ml und akzeptabler Verträglichkeit ist. Die niedrige Viskosität dieser Mikroemulsion erlaubt eine einfache Applikation. Ein aseptischer Herstellungsprozess ist notwendig, weil übliche Sterilisationsverfahren nicht angewendet werden können. Die beiden Arzneistoffe sind empfindlich gegenüber Hydrolyse, erhöhter Temperatur und durch Licht induzierte Oxidation.

Die Permeationsversuche zeigten, dass Sirolimus die intakte Cornea nicht durchdringen kann. Die Augentropfen sind folglich nicht in der Lage, wirksame Konzentrationen an Sirolimus im Corneaendothel oder im Kammerwasser aufzubauen. Daher eignen sie sich nicht zur Prävention von Abstoßungsreaktionen allotransplantierte Cornea oder der autoimmun-Uveitis, aber sie sind zur Behandlung chronisch entzündlicher Erkrankungen der Augenoberfläche anwendbar, z.B. trockene Bindehautentzündung, allergische Bindehautentzündung oder atopische Lidrandentzündung. Diese Einschätzung wurde durch die Ergebnisse aus der experimentellen Keratoplastik

gestützt, bei denen topisch appliziertes Sirolimus aufgrund seiner wundheilungsstörenden Wirkung die Transplantatabstoßung sogar beschleunigte. Dagegen ermöglichte die topische Applikation von 0,05 und 0,025proz. Everolimus eine verlängerte Transplantatüberlebenszeit von $21,4 \pm 7,0$ d und $16,4 \pm 2,3$ d. Es muss aber noch in Permeationsversuchen geklärt werden, ob Everolimus zum Erreichen dieser Wirksamkeit auch im Kammerwasser vorliegt.

Da keine Ergebnisse anderer Autoren zur cornealen Penetration oder Permeation von Sirolimus ($M_r = 914$) oder Everolimus ($M_r = 958$) in der Literatur gefunden wurden, erscheint ein Vergleich zu anderen schwerlöslichen Makrolactonen mit ähnlicher Struktur sinnvoll. Ähnliche Strukturen haben Tacrolimus ($M_r = 822$) und Pimecrolimus ($M_r = 810$). Die kleineren Ringdurchmesser und geringeren Molekulargewichte von Tacrolimus und Pimecrolimus sind günstiger für eine ausreichende corneale Permeation. Die Verteilungskoeffizienten zwischen lipophilen und hydrophilen Phasen sind ebenfalls sehr wichtig zur Beurteilung der Permeationsraten von Arzneistoffen. Leider können bisher gemessene Verteilungskoeffizienten wegen verschiedener Bestimmungssysteme häufig nicht direkt verglichen werden. Mit einer chromatographischen Methode wurden experimentelle Verteilungskoeffizienten zwischen Octanol und einer Pufferlösung pH 7,4 ($\log D_{Oct}$) von 6,09 und 6,99 für Tacrolimus und Pimecrolimus gemessen (Billich et al. 2004). Es wurde geschlussfolgert, dass Tacrolimus etwa acht mal hydrophiler als Pimecrolimus ist. In einem Zweiphasensystem aus Hexan/tert-Butylmethylether/Methanol/Wasser (1:3:6:5) wurden Verteilungskoeffizienten von jeweils $K = 0,917$ ($\log K = -0,038$), $K = 0,996$ ($\log K = -0,002$) und $K = 1,401$ ($\log K = 0,146$) für Tacrolimus, Everolimus und Sirolimus bestimmt, wobei sich $\log K$ aus der Differenz der logarithmischen Konzentrationen in lipophiler und hydrophiler Phase berechnete (Wang Fan et al. 2000). Folglich ist Tacrolimus etwas hydrophiler als Everolimus, während Sirolimus die geringste Hydrophilie aufweist. Es kann geschlussfolgert werden, dass Tacrolimus und Everolimus weniger hydrophob sind als Pimecrolimus und Sirolimus. Obwohl wenig über die corneale Permeation von Everolimus bekannt ist, können die Permeationsraten der anderen Makrolacton-Immunsuppressiva unter Berücksichtigung von molaren Massen und Verteilungskoeffizienten in die folgende Reihenfolge eingeordnet werden: Tacrolimus > Pimecrolimus > Sirolimus.

Dies stimmt gut mit bereits publizierten Studien über die topische Applikation von Pimecrolimus und Tacrolimus am Auge überein. Eine relativ hohe Konzentration von

1 proz. Pimecrolimus gelöst in einer Mischung aus Maiskeimöl/2,2-Dimethyl-1,3-Dioxalan-4-Methanol (24/1) wurde zur topischen Behandlung der trockenen Bindehautentzündung (Keratokonjunktivitis sicca) und chronischen oberflächlichen Hornhautentzündung (Keratitis) in Hunden eingesetzt (Nell et al. 2005). 6 von 8 Hunden mit trockenem Auge sowie 4 von 6 Hunden mit Keratitis zeigten eine deutliche Verbesserung der Symptome, während die anderen 4 Hunde nicht profitierten. Die Studie zeigt, dass Pimecrolimus in einer hohen Konzentration von 1 proz. (10 mg/ml) nur zur Behandlung von Augenkrankheiten im äusseren Bereich in Betracht kommt. Offensichtlich ist Pimecrolimus ähnlich wie Sirolimus für eine Permeation zu hydrophob. Im Gegensatz zu Pimecrolimus und Sirolimus wurde die Permeation von Tacrolimus durch die Cornea nachgewiesen. Bei der topischen Applikation von liposomalen Zubereitungen am Kaninchenauge konnten signifikant höhere Konzentrationen in allen okulären Geweben gemessen werden als bei Applikation öligere Formulierungen (Pleyer et al. 1993). Insbesondere konnten im Kammerwasser sowie im Glaskörper therapeutische Konzentrationen gefunden werden. Folglich ist Tacrolimus hydrophil genug, um die Cornea und Sklera zu permeieren und löst sich darüber hinaus ausreichend in zellfreien wässrigen Medien. Liposomales Tacrolimus konnte ebenso die Endotoxin induzierte Uveitis in Ratten lindern (Whitcup et al. 1998). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine zweimal tägliche Applikation einer 0,02 proz. Suspension von Tacrolimus die Tränenproduktion von Hunden mit trockener Bindehautentzündung signifikant erhöhte (Berdoulay et al. 2005).

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass liposomal verkapseltes Tacrolimus in einer höheren Konzentration von 4,8 mg/ml die Cornea permeieren kann und sich daher zur topischen Therapie der Abstoßungsreaktion transplantierte Cornea sowie der Autoimmun-Uveitis eignet. Die Arzneistoffe Pimecrolimus, Sirolimus und niedrig dosierte wässrige Suspensionen von Tacrolimus können dagegen zur Therapie externer Augenerkrankungen angewendet werden. Für diese Indikationen sind Pimecrolimus und Sirolimus sicherer als Tacrolimus, weil das Auftreten toxischer Effekte durch einen Wirkstofftransport in die systemische Zirkulation unwahrscheinlicher ist. Sirolimus sollte aber nicht bei Erkrankungen mit offenen Wunden genutzt werden.