

8 Methoden

8.1 Wirkstoffanalytik

8.1.1 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (englisch: high performance liquid chromatography, HPLC) ist eine Sonderform der Säulenchromatographie, bei der das Fließmittel unter Druck durch die Säule gepumpt wird. Sie dient zur Trennung von Substanzgemischen sowie deren qualitativer und quantitativer Analyse. Bei der Trennung an Reversed Phase Materialien wird meistens Wasser im Gemisch mit Methanol oder Acetonitril verwendet. Von besonderer Bedeutung ist die Einstellung eines geeigneten pH-Wertes bei der Analytik von Stoffen, deren Trennung durch Dissoziationsvorgänge beeinflusst wird. In diesem Fall hat die Variation des pH-Wertes im Fließmittel einen intensiveren Einfluss auf die Trennung als eine Optimierung des Fließmittelmisches oder eine Variation des Säulenmaterials (Neue et al. 2001). Die exakte und konstante Einstellung eines geeigneten pH-Wertes im Fließmittel ist insbesondere für Quantifizierungen des MMF unerlässlich.

Für diese Arbeit wurde eine Merck-Hitachi HPLC mit UV/VIS Detektor benutzt (Pumpe L 6200A, UV/VIS Diode Array Detektor L 4500, Interface D 6000, Autosampler AS-2000A, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland). Die Säulentemperatur wurde mit einem Thermostat (Haake GH, D1, Berlin, Deutschland) reguliert. Zur Kalibrierung wurden Stammlösungen angefertigt (50,0 mg Wirkstoff in 50,0 ml Methanol). Aus diesen Stammlösungen wurden durch geeignete Verdünnung Kalibrierlösungen hergestellt und anschließend die Peakflächen mit der HPLC bestimmt. Stammlösung und Kalibrierlösungen wurden nach der Herstellung bei -20 °C max. 6 Monate gelagert. Bei der Bestimmung von Proben unbekannter Konzentration wurde die Richtigkeit und Präzision der Analytik mindestens nach jedem zehnten Lauf mit einer Qualitätskontrollprobe überprüft, deren Konzentration vergleichbar zu den unbekanntem Proben war. Die Lösungen in den HPLC-Vials wurden vor der Vermessung am Vortexmischer homogenisiert (IKA MS Minishaker, IKA works INC, Wilmington, NC; USA). Die Trennbedingungen für die Wirkstoffe sind unter Angabe der herangezogenen Literatur aufgelistet (Tab. 29 und Tab. 30).

Tab. 29: HPLC-Analytik von Ciclosporin (modifiziert nach Jahn 2002) und Mycophenolat Mofetil (modifiziert nach Informationen der Roche Diagnostics GmbH)

	Ciclosporin	Mycophenolat Mofetil
Stationäre Phase	LiChrospher 60 RP-select B 125-4 mm, 5 µm, mit Vorsäule RP-18 (Merck)	LiChrospher 100 RP 8 125-4 mm, 5 µm, mit Vorsäule RP-8 (Merck)
Mobile Phase	Acetonitril/Wasser 70/30 (V/V)	Acetonitril/Wasser/Triethylamin 65/35/0,2 (V/V), auf pH 3,5 eingestellt mit Phosphorsäure 85 %, vorfiltriert durch einen 0,45 µm PTFE-Filter (Sartorius, Göttingen, Deutschland)
Detektionswellenlänge (nm)	210	214
Flussrate (ml/min)	1,0	1,0
Säulentemperatur (°C)	60	45
Injektionsvolumen (µl)	20	20
Retentionszeit (min)	≈ 4	≈ 4
Arbeitsbereich (µg/ml)	10 – 200	10 – 200

Tab. 30: HPLC-Analytik von Sirolimus und Everolimus (modifiziert nach Svensson et al. 1997)

Trennbedingungen	
Stationäre Phase	Purospher RP-18 125-4 mm, 5 µm, mit Vorsäule RP-18 (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Mobile Phase	Acetonitril/Methanol/Wasser 38/34/28 (V/V), vorfiltriert durch einen 0,45 µm PTFE-Filter (Sartorius, Goettingen, Deutschland)
Detektionswellenlänge (nm)	278
Flussrate (ml/min)	0,8
Säulentemperatur (°C)	70
Injektionsvolumen (µl)	20
Retentionszeit (min)	≈ 7
Arbeitsbereich (µg/ml)	5 – 200

Die analytischen Grenzwerte ergeben sich nach DIN 32645 und der Vertrauensbereich nach DIN 38402 aus der Streuung der Kalibrationspunkte um die Ausgleichsgerade (Kromidas 1999). Die Nachweisgrenze (NG) stellt den kleinsten Messwert dar, der mit einer vorgegebenen Sicherheit vom Blindwert zu unterscheiden ist. Besitzt eine Probe genau diesen Gehalt des Analyten, so wird in 50 % der Fälle der konkrete Messwert kleiner als die Nachweisgrenze sein (β -Fehler = 50 %). Erhält man bei einer Analyse Messwerte im Bereich der Nachweisgrenze, kann mit der vorgegebenen Sicherheit

(Signifikanz) von z.B. 95 % entsprechend einer Unsicherheit von 5 % (α -Fehler) davon ausgegangen werden, dass der Analyt vorhanden ist. Die Erfassungsgrenze (EG) stellt den Messwert dar, bei dem der β -Fehler gleich dem des α -Fehlers wird. Angenähert entspricht die Erfassungsgrenze etwa dem zweifachen der Nachweisgrenze.

Im Konzentrationsbereich der Bestimmungsgrenze (BG) wird die Anwesenheit des Analyten vorausgesetzt. Über das die Kalibriergerade umschließende Vertrauensband (VB) errechnet sich der Bestimmungsfehler entsprechend \pm VB. Das Vertrauensband ist in der Arbeitsbereichsmittle am kleinsten und steigt mit zunehmender Entfernung zur Mitte. Es gilt $BG = k \cdot VB$, näherungsweise auch $BG = k \cdot NG$ (k = Faktor). Die Bestimmungsgrenze bezeichnet die Konzentration des Analyten, bei dem der relative Fehler bei Proben steigender Konzentration erstmals die vorgegebene Schranke der Ergebnisunsicherheit unterschreitet z. B. $k = 3$ entsprechend 33,3 %. (Schmitt 2006). Anders ausgedrückt erreicht der relative Fehler an der Bestimmungsgrenze für $k = 3$ die Größenordnung der Nachweisgrenze. Ein Wert von $k = 3$ wird in der Umweltanalytik als praktikable Größe benutzt, im Pharmabereich und nach IUPAC wird ein strengerer Wert von $k = 10$ gefordert.

8.1.2 Konzentrationen von CsA und MMF in den Lipidvesikeln

Die Lipidvesikelformulierungen wurden mit höchster Geschwindigkeit am Vortexmischer geschüttelt (IKA MS Minishaker, IKA works INC, Wilmington, NC; USA) und anschließend für drei min bei $450 \times g$ zentrifugiert (Megafuge 1.0, Hereaus Instruments, Hanau, Deutschland). Aus dem Überstand wurde ein geeignetes Volumen entnommen und die Vesikel durch Auffüllen mit Chloroform/Methanol (1:2) (v/v) auf 1000 μ l aufgelöst. Diese Lösungen wurden am Vortexmischer homogenisiert und direkt mit der HPLC quantifiziert.

8.1.3 Konzentrationen von Sirolimus und Everolimus in den Augentropfen und Löslichkeit von Sirolimus in augenverträglichen Lipiden

100 μ l der CD Lösungen, HM, Poloxamergele oder der Mikroemulsion wurden mit Methanol auf 1000 μ l aufgefüllt und am Vortexmischer homogenisiert. 100 μ l der Liposomen wurden mit Chloroform/Methanol (1:2) auf 1000 μ l aufgefüllt und

anschließend am Vortex-Mischer homogenisiert. Die Konzentrationen in diesen Verdünnungen wurden mit der HPLC bestimmt. Für die Messung der Löslichkeit von Sirolimus in den mittelkettigen Triglyceriden, Isopropylmyristat und Isopropylpalmitat wurden 2-3 mg des Arzneistoffes zu 100 µl des jeweiligen reinen Lipids gegeben und für 1 min mit höchster Geschwindigkeit am Vortex-Mischer aufgeschüttelt. Anschließend wurden die Proben vor Licht geschützt für 24 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt (Thys 2, Labortechnik Ilmenau, Deutschland), um ein Gleichgewicht zwischen gelöstem und ungelöstem Anteil zu erreichen. Die Mischung wurde abschließend bei 10 000×g zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415 C, Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg, Deutschland). 50 µl des klaren Überstandes wurden mit Chloroform/Methanol (1:2) auf 500 µl aufgefüllt und mit der HPLC quantifiziert.

8.1.4 Immunoassay für Sirolimus (IMX[®]-System)

Die HPLC erwies sich als nicht empfindlich genug für eine Quantifizierung von Sirolimus im therapeutischen Konzentrationsbereich (Vollblut 7-12 ng/ml). Die Proben aus dem Akzeptormedium des Permeationstests wurden daher mit einem Mikropartikel-Enzym-Immunoassay (MEIA) analysiert. Das IMX[®]-System (Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland), ein automatisches Immunoassay-Analysengerät, wurde gemäß der beiliegenden Gebrauchsanweisung verwendet. 150 µl der Akzeptorprobe, der Kalibrator- oder Kontrollösung wurden mit 300 µl Fällungsreagenz in einem Eppendorf-Gefäß mit einem Vortexmischer (IKA MS Minishaker, IKA works INC, Wilmington, NC; USA) für 15 s mit höchster Stufe zu einer homogenen Mischung homogenisiert. Die Eppendorf-Gefäße wurden anschließend für 4 min bei 10 000×g zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415 C, Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg, Deutschland). Der Überstand wurde in die Probenöffnung einer IMX[®] Reaktionszelle dekantiert und in das Probenkarussell des IMX[®] Moduls gestellt.

Die gemessenen Werte der sechs Kalibratorlösungen A-F sind in Tab. 31 dargestellt. Es kann kein linearer Zusammenhang gefunden werden. Der automatische Analyzer erstellt eine 4-Parameter-Regressionsfunktion zur Anpassung an den Kurvenverlauf.

Die Kalibrierung wird akzeptiert, wenn die folgenden Werte im Toleranzbereich der Methode liegen:

$$\text{RERR (Rate error)} \pm 20; \text{RMSE (Root mean square error)} < 10$$

Der Messbereich beträgt 1,5 bis 30 ng/ml. Proben mit einer höheren Konzentration dürfen vor der Bestimmung maximal 1:4 verdünnt werden. Richtigkeit und Präzision der Methode werden vor jeder Testserie mit dem Mode 1 Kalibrator (6 ng/ml) in Position 1 und 2 des Probenkarusells überprüft. Vor dem ersten Permeationsversuch wurden durch Verdünnung mit BR aus einer Stammlösung von 2,6 µg/ml Sirolimus in Methanol/Wasser 50/50 (v/v) zwei Qualitätskontrollproben mit 11,5 bzw. 23 ng/ml hergestellt und mit dem Immunoassay quantifiziert. Die gemessenen Konzentrationen betragen 11 bzw. 24,8 ng/ml.

Tab. 31: Kalibrierung des Immunoassays für Sirolimus*

Calibrator	c (ng/ml)	Rate 1	Rate 2	Range	Rate Avr	RERR
A	0	482.0	506.9	24.9	494.5	0.0
B	3	391.2	388.3	2.9	389.8	0.7
C	6	291.9	266.5	25.4	279.2	-0.8
D	12	176.4	160.7	15.7	168.6	-0.3
E	20	117.4	116.0	1.4	116.7	1.9
F	30	83.0	92.9	9.9	88.0	-1.4

* Die Tabelle zeigt die erhaltenen Werte in Anlehnung an die Bedienungsanleitung des Herstellers
c: Konzentration; Rate Avr: Average rate; RERR: Rate error; RMSE: Root mean square error = 0.932

8.2 Herstellung der Lipidvesikel zur Anwendung auf der Haut

Tab. 32: Zusammensetzung der Vesikelformulierungen (mg/ 1000 µl hydrophile Phase)

Formulierung Vesikel mit Hydrophiler Phase 1^a

CER(-)	Ceramid IIIB/Cholesterol/Laurinsäure/ Brij [®] 58 (15,5/7,5/2/25)
CER(+)	Ceramid IIIB/Cholesterol/Phytosphingosin/ Brij [®] 58 (15,5/9,5/5/20)
CER(I)	Ceramid IIIB/Cholesterol/Laurinsäure/Imwitor [®] 375/Brij [®] 58 (11/7/2/30/10)
DAG(B)	Imwitor [®] 742/Cholesterol/Brij [®] 58 (29/7/14)
DAG(I)	Imwitor [®] 742/Cholesterol/Imwitor [®] 375 (29/7/14)
PC(-)	Lipoid [®] S 75/Cholesterol/Laurinsäure/Polysorbat 80 (28/7/5/10)
PC(+)	Lipoid [®] S 75/Cholesterol/Phytosphingosin/Polysorbat 80 (28/7/5/10)

Vesikel mit Hydrophiler Phase 2^b

CER(-)	Ceramid IIIB/Cholesterol/Laurinsäure/ Brij [®] 58 (15,5/7,5/2/25)
CER(+)	Ceramid IIIB/Cholesterol/Phytosphingosin/ Brij [®] 58 (15,5/9,5/5/20)
PC(-)	Lipoid [®] S 75/Cholesterol/Laurinsäure/Polysorbat 80 (28/7/5/10)
PC(+)	Lipoid [®] S 100-3/Cholesterol/Phytosphingosin/Polysorbat 80 (28/7/5/10)

Liposomen mit hydrophiler Phase 3^c

DLPC 1:1	Lipoid [®] S 100/Dilaurylphosphatidylcholin (56,3/43,7)
DLPC 3:1	Lipoid [®] S 100/Dilaurylphosphatidylcholin (79,4/20,6)

Transfersomen[®] mit hydrophiler Phase 4^d

TSCH*	Lipoid [®] S 100/Natriumchololat (86/14)
TSCHEt**	Lipoid [®] S 100/Natriumchololat (86/14)

Liposomen mit hydrophiler Phase 4^d als Referenz

SPC	Lipoid [®] S 100 (100)
-----	---------------------------------

^a Hydrophile Phase 1: 100 µl Propylenglycol und Wasser ad 1000 µl

^b Hydrophile Phase 2: 4 mg Milchsäure, 100 µl Propylenglycol und Wasser ad 1000 µl

^c Hydrophile Phase 3: Phosphatpuffer pH 7,3 ad 1000 µl (Zusammensetzung des Phosphatpuffers: 2,38 g Na₂HPO₄·12 H₂O + 0,19 g KH₂PO₄, Wasser ad 1000,0 ml, auf pH 7,3 eingestellt mit 0,1 m HCl oder 0,1 m NaOH)

^d Hydrophile Phase 4: 0,2 m Triethanolamin HCl Puffer pH 6,5 ad 1000 µl

* 3 Frier/ Tauzyklen

** 8,5 % Ethanol wurde der Hydrophilen Phase 4 zugesetzt, aber keine Frier/Tauzyklen durchgeführt

Lipidvesikel wurden nach der Filmbildemethode unter Hydratisierung am Ultraschallbad und abschließender Membranextrusion hergestellt. Für die Lipide und Arzneistoffe wurden in Chloroform/Methanol (2:1) bzw. Methanol Stammlösungen hergestellt. Zur Herstellung der Lipidfilme wurden geeignete Volumina dieser Stammlösungen miteinander kombiniert. Die Zusammensetzung der Lipide wurde in verschiedenen Mischungen variiert, um eine ausreichende Arzneistofflöslichkeit, kleine Partikelgrößen und angemessene Stabilität zu erzielen. Die Zusammensetzungen der erhaltenen Formulierungen sind in Tab. 32 aufgelistet. Zur Herstellung der Vesikel mit CsA und MMF wurden 10 mg Arzneistoff pro ml fertiger Zubereitung verwendet. Die Lösungsmittel der Mischungen wurden im Vakuum am Rotationsverdampfer (Buechi, Flawil, Schweiz) bei 40 °C abgedampft. Restlösungsmittel wurden durch Inkubation in einem Vakuumtrockenschrank (Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland) für 8 h bei 40 °C und 0,1 kPa Druck entfernt. Die Lipidfilme wurden in Abhängigkeit vom Hauptlipid bei 20, 60 oder 80 °C für 30 min in einem Ultraschallbad (Bandelin Sonorex RK 255 H, Berlin, Deutschland) mit der jeweiligen hydrophilen Phase (Tab. 32) hydratisiert. Die Lipidvesikel wurden bei 20, 60 oder 80 °C in einem Wasserbad (GFL 1083, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland) mit einem Liposofast[®] Extruder (Avestin Inc., Ottawa, Kanada) 21fach durch Polycarbonatmembranen (Nucleopore, CA, USA) der Porengröße 200 oder 400 nm extrudiert.

Tab. 33: Lipidzusammensetzung der vesikularen Formulierungen C(B), Ch(B) und PS(B) zur Vermessung mit der DSC

Formulierung	Lipide (mg)
C(B)	Ceramid IIIB/Brij [®] 58 (15,5/25)
Ch(B)	Cholesterol/Brij [®] 58 (9,5/25)
PS(B)	Phytosphingosin/Brij [®] 58 (5/20)

Hydrophile Phase 1: 100 µl Propylenglycol und Wasser ad 1000 µl

8.3 Charakterisierung der Lipidvesikel

8.3.1 Photonenkorrelationspektroskopie (PCS)

Bei der PCS handelt es sich um ein dynamisches Streulichtverfahren zur Analyse von Partikelgrößen zwischen ca. 3 nm und 5 µm. Das Verfahren wurde in der Literatur bereits ausführlich beschrieben (Müller 1983; Müller und Heinemann 1992; Müller und Schuhmann 1996). Ausgewertet werden zeitabhängige Schwankungen der Intensität von Laserlicht. Das Laserlicht streut an Teilchen, die sich aufgrund ungerichteter Diffusionsbewegung (Brownsche Molekularbewegung) durch das Messmedium bewegen. Die Detektion der Intensitätsschwankungen erfolgt normalerweise in einem Winkel von 90°; eine Mehrwinkelanalyse kann aber ebenfalls durchgeführt werden. Man erhält einen mittleren Teilchendurchmesser und den Polydispersitätsindex (PI). Der dimensionslose PI kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen und ist ein Maß für die Größenverteilungsbreite der Teilchen (Tab. 34).

Tab. 34: Charakterisierung der Größenverteilungsbreite anhand des Polydispersitätsindex (nach Müller und Schuhmann 1996)

Polydispersitätsindex	Größenverteilung
0,03 bis 0,06	unimodal
0,10 bis 0,25	eng
0,25 bis 0,50	breit
über 0,50	multimodal

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Proben bei 25 °C mit einem Zetasizer 4 (Malvern Instruments, UK, Software Version Zetasizer 4 + 7032) vermessen, mit dem auch das Zetapotenzial bestimmt werden kann. Standardmäßig wurde im 90°-Winkel mit einem He-Ne-Laser der Wellenlänge 633 nm gemessen. Die Proben wurden vor dem Vermessen mit partikelfreiem Reinstwasser auf eine geeignete Streulichtintensität verdünnt. Somit wurde eine Mehrfachstreuung weitgehend vermieden.

8.3.2 Zetapotenzial

Das Zetapotenzial beschreibt die Oberflächenladung von dispersen Systemen, z. B. Emulsionen, Liposomen oder Suspensionen. Das unter Einwirkung eines elektrischen Feldes an der Scherebene messbare Potenzial eines diffundierenden Teilchens ist das Zetapotenzial. Die Scherebene befindet sich zwischen der diffusen Schicht aus nicht-fixierten beweglichen Ionen, die das diffundierende Teilchen umgeben, und dem nicht mitbewegten Medium. Das Zetapotenzial bestimmt den Grad der Abstoßung zwischen benachbarten und ähnlich geladenen Partikeln und dient damit zur Abschätzung der physikalischen Stabilität des Systems. Für die physikalische Stabilität ist der Absolutbetrag des Zetapotenzials wichtig, das Vorzeichen der Ladung spielt eine geringere Rolle. Wird ein bestimmter Absolutbetrag unterschritten, kann ein System aus elektrostatischer Sicht zu Aggregation oder Ausflockung neigen (Müller 1996). Die für mineralische Suspensionen vorgenommene Einteilung wurde auf Lipidvesikel übertragen (Tab. 35).

Tab. 35: Klassifizierung der Stabilität mineralischer Suspensionen anhand des Zetapotenzials (Müller 1996)

Zetapotenzial (mV)	Kennzeichen der Stabilität
+60 bis +80	gute Stabilität
+3 bis +5	obere Grenze der Ausflockung
-5 bis +3	maximale Ausflockung
-10 bis -15	untere Grenze der Ausflockung
-30 bis -60	mäßige bis mittlere Stabilität
-61 bis -80	sehr gute Stabilität
-81 bis -100	extrem gute Stabilität

Die Bestimmung des Zetapotenzials erfolgt nach dem Prinzip der Laser Doppler Anemometrie. Die Messung erfolgte bei 25 °C und einer Feldstärke von 20 V/cm mit einem Zetasizer 4 in einer Messzelle ZET 5104 mit einem Durchmesser von 4 mm (Malvern Instruments, UK-Malvern). Das Gerät wurde mit einem – 50 mV Latex Standard (Malvern) kalibriert. Die Messlösung wurde mit gereinigtem Wasser hergestellt, das mit 0,9 % Kochsalzlösung auf eine Leitfähigkeit von 50 µS/cm eingestellt wurde. Bereits geringe Schwankungen in der Leitfähigkeit können die Zetapotenzialmessung beeinflussen. Der pH-Wert der Messlösung wurde bestimmt (pH-

Meter WTW 522, Wissenschaftlich Technische Werkstaetten, Weilheim i. OB, Deutschland).

8.3.3 Kryoelektronenmikroskopie

Um Strukturinformationen von Objekten, die ihre Raumstruktur ausschließlich in einer wässrigen Umgebung einnehmen, in ihrem nativen, hydratisierten Zustand zu erhalten, müssen Dehydratisierungs-, Kristallisations- und Neuordnungseffekte auf molekularer Ebene vermieden werden. Durch rasches Einfrieren in geeigneten Kühlmitteln bei hohen Abkühlgeschwindigkeiten von ca. 10^4 K/s können ultradünne Probenschichten in ihrem nativen Zustand durch amorphe Verfestigung des Lösungsmittels („Vitrifikation“) fixiert werden (Adrian et al. 1984, Dubochet et al. 1988). Die Objekte, die in eine feste, glasartige und ultradünne Schicht (100 – 200 nm) des Lösungsmittels eingebettet sind, können mit einem Transmissions-Elektronenmikroskop unter Anwendung des Phasenkontrastverfahrens (= Defokussierung der Objektlinse) relativ kontrastreich abgebildet werden (Lin et al. 2002, Danino et al. 2003). Es sind in der Regel keine zusätzlichen Kontrastmittel erforderlich. Durch fortwährende Kühlung des Präparates (94 K) während der Bildaufzeichnung wird die native Struktur bewahrt und auch der Strahlenschaden reduziert.

Zur Probenvorbereitung wurde ein Tropfen der Probe (5 μ l) auf ein kohlenstoffbefilmtes (perforierter Kohlefilm, Lochgröße 1 μ m) Trägernetz (200 mesh, Quantifoil Micro Tools GmbH, Jena, Deutschland) aufgebracht. Die Hydrophilisierung des Kohlefilms erfolgte vor Gebrauch durch Plasmabehandlung für 60 s bei 8 W in einer BALTEC MED 020 Apparatur (BALTEC, Liechtenstein). Der flüssige Überstand wurde solange mit Filterpapier abgesaugt, bis nur noch eine ultradünne Schicht der Probenflüssigkeit (100-200 nm) die Löcher des Kohlefilms überspannte. Die so präparierten Trägernetze wurden sofort in flüssiges Ethan an seinem Gefrierpunkt (90 K) geschossen. Dazu wurde eine guillotineähnliche Einschussapparatur benutzt, die über ein feuchtigkeits- und temperaturreguliertes Kammersystem verfügt (CEVS-System = Controlled Environment Vitrification System), mit dessen Hilfe temperatur- und eintrocknungsbedingte Effekte vermieden werden. So entstehen ca. 100 nm dicke, gefrorene, in den Löchern aufgespannte Probenfilme. Diese Probenfilme werden unter flüssigem Stickstoff mit Hilfe eines Gatan Kryopräparatehalters Model 626 (Gatan Inc.,

Californien, USA) in ein Philips Transmissionselektronenmikroskop CM 12 (FEI Company, Oregon, USA) eingebracht. Mikroskopiert wurde bei 94 K Proben­temperatur unter Verwendung der Low-Dose-Steuerung des Mikroskops bei einer Primärvergrößerung von 58 300 und einer Beschleunigungsspannung von 100 kV (LaB6 Kathode als Strahlungsquelle, Cs = 2 mm). Zur Erzeugung des Phasen­kontrastes wurde der Defokus auf 1,2 µm eingestellt, was einem ersten Nulldurchgang der Phasen­kontrastübertragungsfunktion bei 2,1 nm entspricht. Die Abbildungen wurden auf großformatigen Negativen aufgenommen (Kodak SO 136, 8 × 10 cm, Kodak GmbH, Stuttgart, Deutschland) und mit einem Flachbettscanner digitalisiert (Epson Perfection 1640SU, Auflösung 1200 dpi).

8.3.4 Lichtmikroskopie

Nach einer Lagerzeit von sechs Monaten bei 4 °C wurden die arzneistoff­freien CER-Formulierungen in hydrophiler Phase 1 im Leica-Lichtmikroskop (Ernst Leitz GmbH, Wetzlar, Deutschland) auf Kristallisationserscheinungen von Ceramid IIIB oder Phytosphingosin untersucht. Das Mikroskop war mit einer Digitalkamera für Mikroskope (DCM 130) ausgerüstet. Die Betrachtung erfolgte mit 1000facher Vergrößerung unter Nutzung von Immersionsöl.

8.3.5 Dynamische Differenzkalorimetrie

Mit Hilfe der Dynamischen Differenzkalorimetrie (engl. Differential Scanning Calorimetry, abgekürzt DSC) können Prozesse verfolgt werden, die zu einer veränderten Enthalpie führen. Man bezeichnet einerseits Prozesse als endotherm, welche zu einer Erhöhung der Enthalpie führen (Schmelzen, Verdampfen, Glasübergänge) und andererseits Prozesse als exotherm, welche die Enthalpie erniedrigen (Kristallisation, chemische Reaktionen, Zersetzungen) (Ehrenstein et al. 2003). Zur Messung wird die Differenz der Wärmeströme zwischen einem Proben- und einem leeren Referenztiegel während eines kontrollierten Temperaturprogrammes erfasst. Eine Unterscheidung flüssiger, amorpher und kristalliner Strukturen ist auf diese Weise möglich. Die DSC liefert daher wertvolle Informationen über die Phasenübergangstemperaturen von Membranen sowie den Aggregatzustand schwer

dispergierbarer Lipide (z. B. Ceramid IIIB, Phytosphingosin). Instabilitäten wie Kristallisationen oder Phasenseparationen während der Lagerzeit können erkannt werden.

Für diese Arbeit wurde eine Mettler DSC 821e verwendet (Mettler Toledo, Giessen, Deutschland). Exakt eingewogene Lipidvesikel-Formulierungen (ca. 100 mg) wurden in Mitteldrucktiegel (Mettler Toledo ME 29990) mit 7 mm Durchmesser gefüllt und gasdicht verschlossen. Die DSC-Kurven der vesikularen Formulierungen wurden von 20 – 170 °C mit einer Heizrate von 5 K/min im Vergleich zu einem mit 100 mg Reinstwasser/Propylenglycol 90/10 (v/v) gefüllten Mitteldrucktiegel aufgenommen. Die DSC-Kurven der reinen und trockenen Lipide wurden in 40 µl Aluminiumtiegel in derselben Masse eingewogen, die auch in 100 mg Vesikelformulierung enthalten ist und gegen einen leeren 40 µl Aluminiumtiegel vermessen. Der Ofen wurde mit 80 ml Stickstoff pro Minute gespült. Die Schmelzpunkte der reinen Lipide stimmen mit den Maxima der entsprechenden DSC Kurve überein.

8.3.6 Protonenresonanzspektroskopie (^1H NMR)

Die Kernresonanzspektroskopie (engl. nuclear magnetic resonance, abgekürzt NMR) ist eine spektroskopische Methode, die auf der magnetischen Wechselwirkung von Atomkernen miteinander, mit der Elektronenhülle des Moleküls und mit äusseren Magnetfeldern beruht. Da die exakte Lage der Resonanzlinien und ihre Feinstruktur durch die chemische Umgebung der Kerne beeinflusst wird, hat die Kernresonanzspektroskopie große Bedeutung als analytisches Werkzeug in der Chemie und Biologie (Galla 1988, Canet 1994). Das gilt vor allem für Messungen in Lösung, da dort die Resonanzlinien sehr schmal sind (hochauflösende NMR). NMR-Messungen an Festkörpern sind dagegen experimentell bedeutend anspruchsvoller. Anwendung finden sie daher nur in sehr eingeschränktem Maße. Welche Atomkerne einen Spin und damit ein Magnetfeld besitzen, hängt von ihrem Aufbau ab. Atome mit gerader Ordnungs- und Massenzahl haben keinen von außen messbaren Spin. Sind Ordnungs- und Massenzahl oder beide Zahlen ungerade, so tritt ein Kernspin und damit ein nach außen wirksames magnetisches Moment auf. Die folgenden Kerne sind daher unter anderem für NMR-Messungen geeignet: ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P . Untersucht man Wasserstoffkerne

(Protonen), spricht man auch von Protonenresonanzspektroskopie (^1H NMR-Spektroskopie).

^1H NMR Spektren wurden bei 20 °C mit einem Avance DPX 400 Spektrometer (Bruker, Rheinstätten, Deutschland) mit einer Betriebsfrequenz von 400 MHz aufgenommen. Vesikelformulierungen wurden zur Vermessung mit D_2O /Propylenglycol 90/10 (v/v) (D_2O = Deuteriumoxid, schweres Wasser) in der hydrophilen Phase hergestellt. Als Vergleich wurden Mischungen der Lipide in gleichen Gewichtsanteilen wie in der vesikulären Formulierung in deuteriertem Chloroform/deuteriertem Methanol 2:1 gelöst und vermessen. Die Peakintensitäten bei 1,6 und 0,9 ppm in den Spektren der Chloroform/Methanol Lösungen wurden gleich 100 % gesetzt und mit den Intensitäten der analogen Peaks in den Spektren der Membranvesikel verglichen. Reine Lipide wurden zwei Prozentig (m/m) in deuteriertem Chloroform/deuteriertem Methanol 2:1 gelöst und vermessen. Eine Ausnahme bildete Phytosphingosin, welches nur ein Prozentig löslich war und daher in dieser Konzentration vermessen wurde.

8.3.7 Elektronen Spin Resonanz (ESR) Spektroskopie

Mit Hilfe der ESR-Spektroskopie wird die resonante Mikrowellenabsorption einer Probe in einem Magnetfeld gemessen. Dies macht sie zu einer hervorragend geeigneten Methode zur Untersuchung von Proben, die über ein permanentes magnetisches Moment (ungepaarte Elektronen) verfügen. Im wesentlichen untersucht die ESR-Spektroskopie daher drei Arten von Proben: a) Übergangsmetalle, z. B. in Proteinen und Enzymen b) freie Radikale, z. B. als Zwischenstufe bei chemischen Reaktionen c) Spinsonden, das sind stabile organische Radikale, die als Reportermoleküle in das zu untersuchende System inkorporiert werden (Galla 1988).

Die ersten ESR-Experimente wurden 1944 in Kasan von Jewgeni Konstantinowitsch Sawoiski an paramagnetischen Salzen wie Kupfersulfat und Manganchlorid durchgeführt (Jeschke 1998). Für sein Spektrometer hatte Sawoiski das Klystron aus dem Radargerät eines erbeuteten deutschen Panzers benutzt. Bis heute arbeitet man in der ESR am häufigsten bei Frequenzen von etwa 9-10 GHz (X-Band, $\lambda = 3$ cm), weil preiswerte und zuverlässige Komponenten durch die Entwicklung der Radartechnik im Zweiten Weltkrieg in diesem Bereich zuerst zur Verfügung standen.

8.3.7.1 Messprinzip

Durch ein äußeres Magnetfeld mit einer magnetischen Induktion B_0 wird eine parallele oder antiparallele Anordnung der Elektronenspins hervorgerufen, die in Abhängigkeit von B_0 in unterschiedliche Energieniveaus aufgespalten werden (Zeeman-Aufspaltung, Abb. 49). Durch Bestrahlung der Probe mit einer Mikrowelle, deren Strahlungsenergie genau der Energiedifferenz zwischen den verschiedenen Zeeman-Niveaus entspricht, kommt es zur Absorption (Resonanzbedingung). Die Messung dieser Energiedifferenz ist die Grundlage der ESR-Untersuchungen.

In der Praxis wird die zu untersuchende Probe in einem veränderlichen Magnetfeld B_0 mit einer Mikrowelle fester Frequenz bestrahlt. Das aufgezeichnete Absorptionsspektrum erlaubt Rückschlüsse auf die magnetische Umgebung der ungepaarten Elektronen. Daraus lassen sich Informationen wie Mikroviskosität, Polarität oder pH-Wert in der molekularen Umgebung des ungepaarten Elektrons, beispielsweise einer Spinsonde, ableiten.

Die beiden elektromagnetischen Resonanzmethoden ESR und NMR lassen sich anhand der unterschiedlichen Frequenz der zur Anregung benutzten elektromagnetischen Welle und der Stärke des angelegten Magnetfeldes unterscheiden. Während zur Anregung der schwereren Atomkerne Frequenzen zwischen 90 und 400 MHz ($\lambda = 3,3 - 0,75$ m) bei hohen Feldstärken zwischen 2 und 10 Tesla nötig sind, werden die leichteren Elektronen mit Frequenzen im GHz Bereich ($\lambda = 1 - 10$ cm) bei niedrigeren Feldstärken von etwa 0,3 Tesla angeregt.

In den letzten Jahren wurde die Anwendung der ESR unter Nutzung von Spinsonden für die Arzneimittelforschung etabliert (Mäder et al. 1994, Stösser et al. 1995, Mäder 1998). Da nur die ungepaarten Elektronen selektiv detektiert werden, ermöglicht die ESR die Untersuchung der molekularen Spinsondenumgebung in komplexen Systemen ohne vorherige Probenvorbereitung. Darüber hinaus ist ihre Anwendbarkeit auf alle Aggregatzustände und ihre Nutzbarkeit für nichttransparente Proben vorteilhaft.

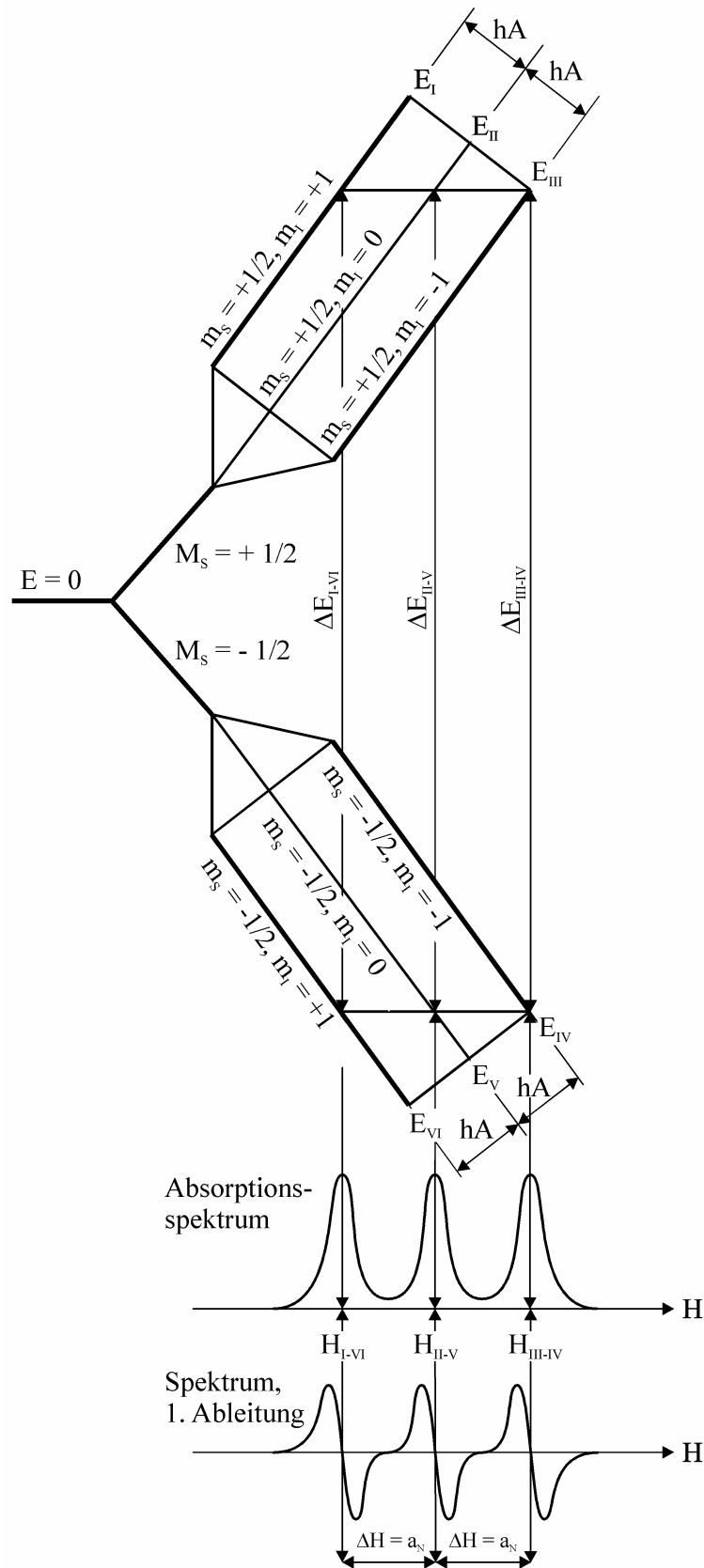
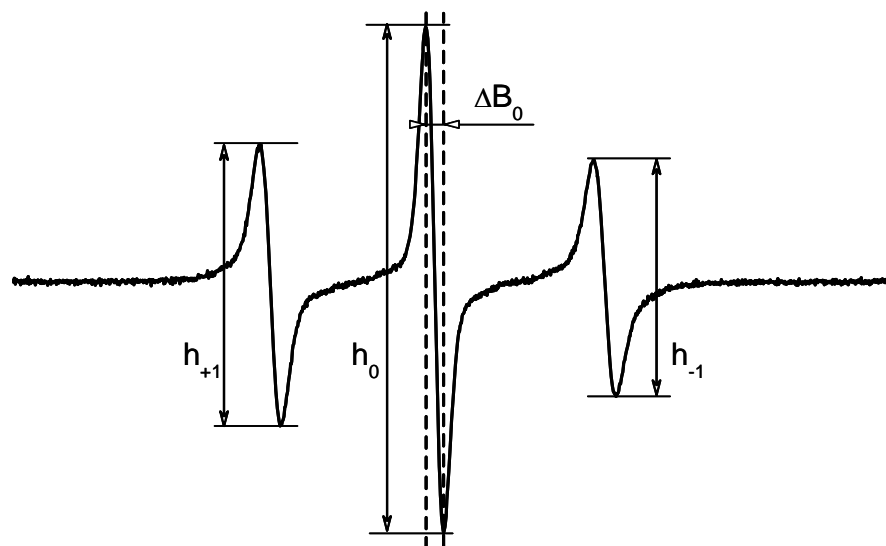


Abb. 49: Aufspaltung der Energieniveaus eines ungepaarten Elektrons (Elektronenspin = $\frac{1}{2}$) im homogenen Magnetfeld durch Wechselwirkungen mit dem magnetischen Moment eines Stickstoffkerns (Kernspin = 1) (Ranby und Rabek 1977)

8.3.7.2 Bestimmung der Rotationskorrelationszeiten

Die Rotationskorrelationszeit (τ_c) ist ein Maß für die Beweglichkeit der ESR-Sonde in ihrer unmittelbaren molekularen Umgebung. Sie steht über die Stokes-Einstein Gleichung mit der Viskosität in Beziehung (vgl. 5.4.1). Im Bereich zwischen $0.01 \text{ ns} \leq \tau_c \leq 3 \text{ ns}$ (der sogenannten "fast motional region") kann τ_c in vereinfachter Weise aus dem anisotropen drei Linien Spektrum mit Hilfe einer empirischen Beziehung ermittelt werden (Evans et al. 2005, Abb. 50). Insbesondere das Hochfeldsignal reagiert sehr empfindlich auf Viskositätsänderungen.



$$\tau_c = 6 \cdot 10^{-10} \Delta B_0 \left[\sqrt{\frac{h_0}{h_{+1}}} + \sqrt{\frac{h_0}{h_{-1}}} - 2 \right]$$

ΔB_0 : Linienbreite der mittleren Linie

h_{+1}, h_0, h_{-1} : Intensitäten des Tieffeld-, Mittelfeld und Hochfeldsignals

Abb. 50: Gewinnung der Parameter zur Berechnung von Rotationskorrelationszeiten τ_c aus dem anisotropen ESR-Spektrum

Zur Herstellung eines Zusammenhangs zwischen τ_c und dynamischer Viskosität η wurden die in den Bilayern gemessenen τ_c Werte der Spinsonde DPME mit den τ_c Werten derselben Spinsonde in acht unterschiedlichen MCT/Ricinusöl-Mischungen bekannter Viskosität verglichen.

Für diese Arbeit wurden 50 µl der jeweiligen Formulierung in Mikropipetten aufgesaugt und in einem X-Band Spektrometer ERS 220 (ZWG, Berlin Adlershof, Deutschland) mit den folgenden Einstellungen vermessen: B₀-Feld 337,5 mT, Mikrowellenfrequenz 9,5 Ghz, Mikrowellenleistung 2 mW, Modulationsamplitude 0,1 mT, B₀-Scan 8 oder 12 mT, 1024 Punkte. Die Konzentration der eingesetzten Spinsonde DPME betrug 5 mM. Die Rotationskorrelationszeiten (τ_C) der Spinsonde wurden gemäß der Gleichung von Evans et al. (2005) berechnet. Die Temperatur im Resonator betrug 20 °C.

8.3.8 Freisetzungstests

Die in vitro Freisetzungstests der dermal applizierbaren Lipidvesikel mit CsA und MMF wurden mit einem Mehrschichtmembranmodell durchgeführt (Neubert et al. 1995). Dieses System wurde bereits für Freisetzungstests mit CsA (Jahn 2002) und MMF (Jahn et al. 2001) aus Mikroemulsionen genutzt. Das Modell besteht aus einer Grund- und einer Deckplatte aus Polyacryl[®], zwischen denen 4 Einzelzellen verschraubt werden können. Jede dieser Zellen setzt sich aus einer Grundscheibe, einer Schablone mit einer Aussparung von 4 cm² zum Auftragen der Formulierung und einer Deckscheibe zusammen. Zwischen Grundscheibe und Schablone werden die je nach Versuch benötigte Anzahl Dodecanol-Collodium-Membranen luftblasenfrei übereinander angeordnet und durch eine Nephrophan[®]-Membran (Filmfabrik Wolfen, Deutschland) von der Grundscheibe abgegrenzt. Die Nephrophan[®]-Membran besteht aus regenerierter Cellulose (Porengröße: 2,4 nm, Dicke 14-15 µm) und ist mit Sorbitol und Glycerol als Weichmacher imprägniert, der vor der Verwendung durch Vorwässern über 1 h entfernt wurde. Die Herstellung der Akzeptormembranen erfolgte gemäß nachstehender Rezeptur:

Membranrezeptur	Ciclosporin	Mycophenolat Mofetil
Dodecanol/Octanol 90:10 (m/m)	4,0 g	8,0 g
Ether-Ethanol-Mischung 85:15 (V/V)	96,0 g	92,0 g
Collodiumlösung 4 % DAC 2003	ad 200,0 g	ad 200,0 g

Quadratische Glasplatten einer Kantenlänge von 26 x 12,5 cm und einer 0,5 cm breiten Umrandung aus Silikon wurden mit der Wasserwaage genau waagrecht ausgerichtet und 20 ml Membranlösung in einer gleichmäßigen Schicht ausgegossen. Nach dem Abdampfen der Lösungsmittel (ca. 6 h) konnte die Membran mittels einer Schablone

und einem Skalpell in Stücke mit einer Kantenlänge von 4 cm geschnitten werden, deren Aufbewahrung bis zu ihrer Verwendung im Exsikkator zwischen Filterpapierblättern erfolgte.

Für diese Arbeit wurden drei lipophile Dodecanolmembranen als Akzeptor für CsA und vier Membranen für MMF eingesetzt. Eine Nephrophan[®]-Membran diente auch zur Abdeckung der Akzeptormembranen und zur Abgrenzung der Schablone mit der Auftrageöffnung bei der Freisetzung der Zubereitungen mit MMF. Die Formulierungen wurden mit 3 % Hydroxypropylcellulose in einen halbfesten Zustand überführt. Eine genau ausgewogene Menge der Formulierung (zwischen 19 und 21 mg) wurde gleichmäßig in der Schablone auf die zur Verfügung stehende Membranoberfläche von 4 cm² verteilt. Zellen mit arzneistofffreiem Vehikel dienten als Blindwert, um eine Beeinflussung der Arzneistoffanalytik durch Grundlagenbestandteile auszuschließen. Die Freisetzungszellen wurden verschraubt und bei 32 ± 1 °C über festgelegte Zeiten (30, 100, 300 und 1000 min) inkubiert. Die freigesetzte Formulierung wurde vollständig mit Zellstoff abgetupft, die Membranen wurden entnommen und mit 5 ml Ethanol 80 % (V/V) für 30 min auf einer Schüttelmaschine extrahiert (Thys 2, Labortechnik Ilmenau, Deutschland). Der Arzneistoffgehalt in der Extraktionsflüssigkeit wurde direkt mittels HPLC quantifiziert. Drei genau ausgewogene Proben jeder Formulierung (19-21 mg) wurden direkt mit 5 ml Ethanol 80 % (V/V) extrahiert, ohne sie vorher auf die Freisetzungszellen aufzutragen. Diese Proben dienten der Bestimmung des insgesamt extrahierbaren Wirkstoffanteils (100 %). Eine Probe jedes Zeitintervalls wurde vor der Extraktion nicht mit Zellstoff abgetupft. Die Membranen dieser Freisetzungszellen wurden zusammen mit der geleerten Formulierung extrahiert und dienten der Bestimmung der Wiederfindungsrate zu jedem Zeitpunkt.

8.4 Herstellung der Arzneiformen zur Anwendung am Auge

Die Herstellung der HM, der Poloxamergele und der Mikroemulsion erfolgte unter aseptischen Bedingungen.

8.4.1 Herstellung der Cyclodextrin (CD) Lösungen

Die Herstellung der Cyclodextrinlösungen erfolgte unter Abwandlung bereits publizierter Anweisungen (Loftsson 1998, Scholz 2003, Knapp-Ullrich 2003). 1 mg Sirolimus pro ml fertiger Augentropfen wurde in Methanol gelöst und das Lösungsmittel im Vakuum am Rotationsverdampfer (Buechi, Flawil, Schweiz) oder in einem Vakuumtrockenschrank (Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland) bei 40 °C abgedampft. Die Zusammensetzung der Formulierungen wird in Tab. 36 aufgelistet.

Tab. 36: Zusammensetzung der cyclodextrinhaltigen Augentropfen

Bestandteil	Augentropfen		
	HP- β -CD NaCl	HP- γ -CD NaCl	HP- γ -CD Mannitol
HP- β -CD (mg)	1 000		
HP- γ -CD (mg)		1 000	1 000
HPC (mg)	25	25	25
NaCl (mg)	70	70	
Mannitol (mg)			420
BAC (μ l)	100	100	100
Wasser ad (ml)	10	10	10

HPC: Hydroxypropylcellulose; BAC: Benzalkoniumchlorid Stammlösung (1 %)

Das Auflösen der Cyclodextrine erfolgte unter leichtem Erwärmen auf 50 °C. Die fertigen Mischungen wurden entweder nach Abkühlen auf Raumtemperatur für 24 h bei 20 °C unter Lichtschutz geschüttelt (GFL 3032, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland) oder im Autoklaven (Selectomat S 2000, Münchener Medizin Mechanik GmbH, Deutschland) bei 121 °C und 2 bar für 15 min erhitzt, auf Raumtemperatur abgekühlt und unter aseptischen Bedingungen durch einen 0,8 μ m Filter (Sartorius, Goettingen, Deutschland) ins Endbehältnis filtriert.

8.4.2 Herstellung der Liposomen zur ophthalmologischen Anwendung

Liposomen wurden in Abwandlung der Vorschrift von Law et al. 2000 nach der Filmbildemethode unter Hydratisierung am Ultraschallbad und abschließender Membranextrusion hergestellt. Für die Lipide und den Arzneistoff wurden in Chloroform/Methanol (2:1) Stammlösungen hergestellt. Für die Lipidmischungen wurden geeignete Volumina dieser Stammlösungen miteinander kombiniert. Zur Herstellung von 1 ml der liposomalen Formulierungen PC(-) PG und PC(-) pH 7,4 wurden 36,2 mg Lipoid[®] S 100, 12 mg Cholesterol und 1,8 mg Dicetylphosphat eingesetzt. Pro ml der liposomalen Formulierung PC(+) PG und PC(+) pH 5,4 wurden 36,5 mg Lipoid[®] S 100, 13 mg Cholesterol und 0,5 mg Stearylamin verwendet. Die Lösungsmittel dieser Mischungen wurden im Vakuum am Rotationsverdampfer (Buechi, Flawil, Schweiz) bei 40 °C abgedampft. Restlösungsmittel wurden durch Inkubation in einem Vakuumtrockenschrank (Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland) für 8 h bei 40 °C und 1 mbar Druck entfernt. Die Lipidfilme wurden bei 60 °C für 15 min in einem Ultraschallbad (Bandelin Sonorex RK 255 H, Berlin, Deutschland) mit der vorgesehenen hydrophilen Phase hydratisiert. Für PC(-) PG und PC(+) PG wurde eine Mischung aus Wasser/Propylenglycol 85/15 (V/V) benutzt, so dass kein weiterer Konservierungsstoff in diesen Zubereitungen notwendig ist. Die Zubereitungen PC(+) pH 5,4 und PC(-) pH 7,4 wurden mit Phosphatpuffer hydratisiert (Zusammensetzung unten). Die Lipidkonzentration in der fertigen Formulierung betrug 5 % (m/v). Die Liposomen wurden bei 60 °C in einem Wasserbad (GFL 1083, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland) mit einem Liposofast[®] Extruder (Avestin Inc., Ottawa, Kanada) 21 fach durch Polycarbonatmembranen (Nucleopore, CA, USA) der Porengröße 200 nm extrudiert. Die Liposomen wurden zum Schluss durch einen 0,2 µm Polycarbonatfilter (Sartorius, Goettingen, Deutschland) bakterienfrei filtriert.

Die Phosphatpuffer hatten folgende Zusammensetzung:

pH 5,4: 3,58 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ + 0,175 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ + 7,3 g NaCl + BAC 1 %
10 ml, Wasser ad 1000,0 ml

pH 7,4: 1,183 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ + 0,19 g KH_2PO_4 + 8,0 g NaCl + BAC 1 %
10 ml, Wasser ad 1000,0 ml,

pH-Werte gegebenenfalls eingestellt mit 0,1 m HCl oder 0,1 m NaOH

8.4.3 Herstellung der Hydrotropen Mischungen (HM)

Die Herstellung der HM erfolgte gemäß der Anweisungen von Simamora et al. 2001. Die Zusammensetzung der untersuchten HM wird in Tab. 37 gezeigt. Propylenglycol und Benzylalkohol wurden miteinander gemischt, 1 mg Sirolimus pro ml fertiger Formulierung zugefügt und zu einer klaren Lösung verrührt. Die Benzoesäure und das Natriumbenzoat wurden ergänzt und die Lösung nach und nach bei 50 °C mit Wasser gemischt. Abschließend wurde die Lösung durch einen 0,8 µm Filter (Sartorius, Goettingen, Deutschland) filtriert, um kontaminierende Partikel zu entfernen.

Tab. 37: Zusammensetzung der hydrotropen Mischungen (HM)

Bestandteil	HM PG 30 %	HM PG 40 %
Propylenglycol % (m/m)	30	40
Benzylalkohol % (m/m)	2	2
Benzoessäure % (m/m)	2,5	1,5
Natriumbenzoat % (m/m)	2,5	3,5
Wasser % (m/m)	63	53

8.4.4 Herstellung der Poloxamergele

Die Herstellung der Poloxamergele erfolgte in Abwandlung der Vorschriften von Saettone 1988 und Siebenbrodt und Keipert 1992. Die erforderlichen Mengen an Poloxamer 407, Benzylalkohol und NaCl (Tab. 38) wurden gemeinsam mit 10 mg Sirolimus oder Everolimus bei 60 °C erwärmt, bis das Poloxamer komplett geschmolzen ist. Die Schmelze wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, mit Phosphatpuffer pH 7,4 aufgefüllt und ein autoklavierter Magnetprüher zugefügt. Bei 4-8 °C wurde mit dem Magnetprüher gerührt, bis der Bodensatz sich komplett aufgelöst

hatte. Die Auflösung des Wirkstoffs konnte anschließend durch Erwärmen des Geles im Wasserbad auf 60 °C gefördert werden. Das Gel wurde abschließend auf 4 °C abgekühlt und durch ein 5 µm PTFE Filter (Sartorius, Göttingen, Deutschland) filtriert.

Tab. 38: Zusammensetzung der Poloxamergele

Poloxamerkonzentration	15 %	13,4 %
Poloxamer 407 (g)	1,5	1,34
Benzylalkohol (g)	0,1	0,1
NaCl (mg)	0,0	15,0
Phosphatpuffer ad (g)	10,0	10,0

Zusammensetzung des Phosphatpuffers: 2,38 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ + 0,19 g KH_2PO_4 , Wasser ad 1000,0 ml, auf pH 7,4 eingestellt mit 0,1 m HCl oder 0,1 m NaOH

8.4.5 Herstellung der Mikroemulsion

Die Herstellung der Mikroemulsion wurde unter Modifikation der Vorschrift von Siebenbrodt und Keipert 1993 durchgeführt. Triacetin und Poloxamer 184 wurden bei 180 °C für 30 min heißluftsterilisiert (Heraeus SUT 6200, Hanau, Deutschland), die Propylenglycol/Wasser Mischung bei 121 °C und 2 bar für 15 min autoklaviert (Selectomat S 2000, Münchener Medizin Mechanik GmbH, Deutschland). 10 mg Sirolimus wurden mit 2,0 g Triacetin angelöst. Anschliessend wurden 1,5 g Poloxamer unter andauerndem Rühren mit einem Magnetrührer zugefügt. Everolimus löst sich deutlich schneller als Sirolimus auf. Eine Mischung aus 4,0 g Propylenglycol und 2,5 g Wasser wurde unter fortgesetztem Rühren zugefügt und die Mikroemulsion durch ein 5 µm PTFE Filter (Sartorius, Göttingen, Deutschland) filtriert. Achtung, übliche Filtermaterialien wie Celluloseacetat oder Cellulosenitrat lösen sich in der Mikroemulsion auf!

8.5 Permeationsversuche mit isolierter Schweinecornea

Für die in-vitro Permeationsversuche wurden Permeations Zellen (Ussing Kammern) aus Acrylglas (Gründberg Kunststoffe, Rödermark, Deutschland) mit 0,5 cm² Permeationsfläche verwendet, die in der Literatur bereits beschrieben wurden (Siefert und Keipert 1997, Scholz 2003). Neben einer sicheren Fixierung der Cornea zwischen den beiden Halbzellen gewährleistet diese Konstruktion, dass die anatomisch bedingten

Krümmungen der Cornea erhalten bleiben. Die Permeationszellen wurden in einem Wasserbad auf 33 ± 1 °C temperiert (Lauda T, Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland). Die Augen frisch geschlachteter Hausschweine wurden von einem landwirtschaftlichen Versuchszentrum (Lehr- und Versuchsanstalt für Tierzucht und Tierhaltung Teltow, LVAT, Ruhlsdorf, Deutschland) bezogen. Die Corneas wurden präpariert wie bereits beschrieben (Siefert und Keipert 1997, Scholz 2003). Nach makroskopischer Kontrolle der cornealen Integrität wurde das anhaftende Muskelgewebe entfernt und der Augapfel mit Bicarbonat-Ringerlösung pH 7,4 (BR) gespült. Mit einem Skalpell und einer Präparationsschere wurde die Cornea so isoliert, dass sich um das ungeschädigte Gewebe noch ein 2-3 mm breiter Sklerarring befand. Das Skalpell wurde ebenfalls zum Entfernen des Epithels für die Permeationsversuche unter Nutzung von Cornea ohne Epithel verwendet. Die isolierte Cornea wurde abschließend in BR gespült und mit der Epithelseite zum Donorkompartiment in die Permeationszelle eingespannt. Ein Volumen von 1 ml der zu untersuchenden Arzneiform wurde als Donor verwendet. Das Akzeptorvolumen von 15 ml BR wurde kontinuierlich durch eine Laborpumpe Ismatec IPS 12 (Glattbrugg-Zürich, Schweiz) mit einer Flussrate von 5 ml/min durch die Akzeptorhalbzelle gepumpt. Zu vorgesehenen Zeiten (30, 60 und 240 min) wurden mit Vollpipetten aus dem Akzeptor Proben von 5,0 ml gezogen und durch frischen, vortemperierten BR gleichen Volumens ersetzt. Die gesammelten Proben wurden bis zur Quantifizierung am nächsten Tag bei -20°C gelagert. Die Vitalität des cornealen Gewebes wurde mit einer Trypanblaulösung 0,4 % geprüft, welche tote Zellen anfärbt. Direkt nach der Isolierung waren punktuell abgestorbene Zellen erkennbar, die nach der Permeation häufiger und großflächiger auftraten. Frisch isolierte Cornea und mit 1 % Triton[®]-X-100 Lösung behandelte Cornea wurden als Positiv- und Negativkontrolle eingesetzt.

Bicarbonat-Ringerlösung pH 7,4

BR I: NaCl 7,14 g + KCl 0,38 g + 0,526 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ + NaHCO_3 2,29 g
Wasser ad 500,0 ml,

BR II: 0,154 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ + 0,2 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ + Glucose 0,92 g, Wasser ad 500 ml

BR I und BR II wurden getrennt hergestellt, gemischt und auf pH 7,4 mit 0,1 m HCl oder 0,1 m NaOH eingestellt.

8.6 Penetrierende Keratoplastik

Die Keratoplastiken wurden an weiblichen Lewis-Ratten als Empfänger und mit weiblichen Dark Agouti Ratten als Spender durchgeführt. Diese Stämme sind MHC I/II inkompatibel. Die Ratten wogen zwischen 200 und 250 g und wurden von der Firma Charles River (Kisslegg, Deutschland) bezogen. Der durchschnittliche Hornhautdurchmesser betrug 3,5 mm. Alle Versuchstiere wurden unter Einhaltung kontrollierter Hell/Dunkel Zyklen mit Standard-Laborfutter ernährt und hatten freien Zugang zu Leitungswasser. Die Tiere wurden im Einklang mit den Bestimmungen des US-amerikanischen National Institute of Health (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) und den Richtlinien der Berliner Senatsverwaltung für die Tierhaltung zu Forschungszwecken gehalten.

Chirurgie und Definition der Transplantatabstoßung. Zur Durchführung der orthotopen Transplantationen (Transplantat wird anstelle des entfernten eigenen Organs implantiert) wurden die Versuchstiere durch intramuskuläre Injektion einer Mischung aus Ketamin 90 mg/kg (Ketavet; Pharmacia GmbH, Erlangen, Deutschland) und Xylazin (7,5 mg/kg, Rompun 2 %; Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) verdünnt in isotonischer Kochsalzlösung anästhesiert. Vor der Operation wurde den Spendertieren zur Pupillenerweiterung 1 % Atropinsulfat appliziert (Ciba Vision, Wefling, Deutschland), um eine durch die chirurgische Intervention induzierte Schädigung der Iris sowie Fibrinschleier (Synechien) bei flacher Vorderkammer zu vermeiden. Die Spendercornea wurde mit Hilfe eines 3,0-mm oder 3,5-mm Trepanes und gebogener Scheren unter sterilen Bedingungen auf das rechte Auge des Empfängertieres übertragen. Das Transplantat wurde in das Empfängerbett mit Hilfe einer laufenden Naht fixiert (10-0 Mersilene; Ethicon, Hannover, Deutschland). Die Naht wurde nicht entfernt. Eine antibiotische Augensalbe (Ofloxacin, Floxal[®], Dr. Mann Pharma, Berlin, Deutschland) wurde sofort nach der Hornhauttransplantation, sowie in den folgenden Wochen appliziert. Versuchstiere mit chirurgischen Komplikationen wie intraokulare Blutungen, Verlust der vorderen Augenkammer oder Linsentrübungen wurden aus der Untersuchung ausgeschlossen. Die Durchsichtigkeit der transplantierten Cornea wurde als Indikator der Funktionsfähigkeit des cornealen Endothels täglich begutachtet. Die Bewertung erfolgte nach folgender vierstufiger Skala: 0 = klares Transplantat, 1 = leicht trüb, aber die Gefäße der Iris sind noch gut sichtbar, 2 = moderate corneale Trübung, aber die Irisgefäße sind gerade noch sichtbar,

3 = corneale Trübung, nur noch der Pupillenrand ist sichtbar, 4 = trübes, undurchsichtiges Transplantat, Pupillen nicht mehr sichtbar. Transplantate wurden als abgestoßen eingestuft, wenn Grad 3 oder höher erreicht wurde.

Die transplantierten Tiere wurden in die folgenden Gruppen eingeteilt: Syngene Transplantate (Spender und Empfänger sind genetisch identische Individuen, z. B. eineiige Zwillinge oder Inzuchtstämme) in 4 Lewis Empfängern wurden als Kontrollgruppe zur Erkennung technischer Fehler genutzt. Allogene Transplantate wurden an Lewis Ratten mit Dark Argouti Spendern durchgeführt und nach dem Zufallsprinzip in Gruppen zu je acht Versuchstieren mit folgenden Behandlungen eingeteilt: (1) 0,1 % Sirolimus (2) 0,1 % Everolimus (3) 0,05 % Everolimus (4) 0,025% Everolimus (5) Vehikel ohne Wirkstoff. Alle Behandlungen begannen am Tag der Operation und wurden mit fünf mal täglich 20 µl für 35 Tage fortgeführt.

Statistische Auswertung. Da einige Daten nicht normalverteilt waren und keine Varianzgleichheit erzielt wurde, kamen nichtparametrische statistische Verfahren zur Anwendung (Mann-Whitney Test), um die mittleren Überlebenszeiten miteinander zu vergleichen. $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant definiert.

8.7 Physikochemische Charakterisierung der Formulierungen

8.7.1 Viskositätsmessungen

Kapillarviskosimeter nach Ubbelohde. Die kinematischen Viskositäten der Cyclodextrin-Augentropfen sowie der MCT/Ricinusöl-Mischungen wurden bei 20 °C mit einem elektronisch gesteuerten Kapillarviskosimeter nach Ubbelohde (Schott Durchsichtthermostath CT 1450, mit AVS 350, Hofheim a. Ts., Deutschland) vermessen ($n = 8$) und anschließend mit der Dichte multipliziert, um die dynamischen Viskositäten zu erhalten.

Kegelviskosimeter. Zur rheologischen Charakterisierung der Poloxamergele und der Mikroemulsion bei 20 und 32 °C wurde ein Kegelviskosimeter Haake Rheostress RS 100 (Karlsruhe, Deutschland) benutzt. Dabei wurden je nach untersuchtem Viskositätsbereich Kegel mit 60 mm Durchmesser und einem Winkel von 1° bzw. 20 mm Durchmesser und einem Winkel von 4° verwendet.

8.7.2 Dichte

Die Dichte wurde bei 20 °C mit einem Densimeter DMA 38 (PAAR, Graz, Österreich) gemessen. Dabei wird die untersuchte Flüssigkeit in einem U-förmig gebogenen Rohr in Schwingungen versetzt. Mit steigender Dichte erhöht sich die schwingende Masse und damit die Dauer der Schwingung. Nach Kalibrierung des Gerätes mit Reinstwasser kann die Dichte der Untersuchungslösung mit einer Präzision von $\pm 0,001 \text{ g/cm}^3$ errechnet werden. Die Formulierungen wurden jeweils zweimal vermessen.

8.7.3 Osmolalität

Die Osmolalitäten wurden mit einem Osmometer 3/B (Hermann Roebling Messtechnik, Berlin, Deutschland) gemessen, welches nach dem Prinzip der Gefrierpunktserniedrigung arbeitet. Die Kalibrierung des Gerätes erfolgte mit Reinstwasser (0 mOsmol/kg) und einer 1,2687 proz. wässrigen Natriumchloridlösung (400 mOsmol/kg).

8.7.4 pH-Wert

Die pH-Werte wurden mit einem pH Meter WTW 522 (Wissenschaftlich Technische Werkstaetten, Weilheim i. OB, Deutschland) gemessen. Die Kalibrierung erfolgte mit drei Standardpufferlösungen pH 2,00, pH 4,00, pH 7,00, pH 9,00 (Merck Eurolab GmbH, Bruchsal, Deutschland) bei Raumtemperatur.

