

Modulation der ungualen und dermalen Penetration von pharmazeutischen Problemarnzneistoffen durch den Einsatz moderner Drug Delivery Systeme

DISSERTATION

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Sandy Naumann
geboren am 23.01.1986 in Dresden

Gutachter/in

1. Prof. Dr. Dr. h.c. Reinhard Neubert
2. Prof. Dr. Johannes Wohlrab
3. Prof. Dr. Jürgen Lademann

Tag der Verteidigung in Halle (Saale), 26.09.2016

Meinen Eltern

„Ein Optimist ist ein Mensch,
der alles halb so schlimm
oder doppelt so gut findet.“

Heinz Rühmann

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
TABELLENVERZEICHNIS	VIII
ABKÜRZUNGS- UND SYMBOLVERZEICHNIS	X
1 EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG	1
2 THEORETISCHER TEIL	3
2.1 Der Nagel als Applikationsort für Arzneimittel.....	3
2.1.1 Aufbau und Eigenschaften des Nagels.....	3
2.1.2 Nagelpilzkrankungen.....	4
2.1.3 Die ungleiche Penetration von Wirkstoffen und deren Verbesserungsstrategien.....	5
2.2 Die Haut als Applikationsort für Arzneimittel.....	7
2.2.1 Aufbau und Eigenschaften der Hautbarriere.....	7
2.2.2 Die Hauterkrankung Psoriasis vulgaris.....	8
2.2.3 Die dermale Penetration von Wirkstoffen.....	9
2.2.4 Verbesserungsstrategien der dermalen Penetration.....	11
2.2.4.1 Dermale Anwendung von Mikroemulsionen.....	12
2.2.4.2 Einsatz von chemischen Penetrationsenhancern.....	13
2.2.4.3 Bedeutung der Ionenpaarbildung.....	13
3 MODERNE VEHIKEL FÜR DIE UNGUALE APPLIKATION DES NEUEN ANTIMYKOTIKUMS EV-086K	15
3.1 Motivation und Zielstellung.....	15
3.2 EV-086K – ein neuer antimykotischer Wirkstoff.....	15
3.2.1 Pharmakologie.....	15
3.2.2 Physikochemische Eigenschaften.....	16
3.2.2.1 Sättigungslöslichkeiten.....	16
3.2.2.2 Kritische Mizellbildungskonzentration.....	17
3.2.2.3 Untersuchungen mit dem Polarisationsmikroskop.....	18
3.2.2.4 Verteilungskoeffizient.....	19
3.2.2.5 Stabilitätsuntersuchungen.....	20
3.3 Entwicklung geeigneter Formulierungen zur ungleichen Applikation.....	21
3.3.1 Nagellacke als Drug Delivery Systeme.....	21
3.3.2 Entwicklung eines geeigneten kolloidalen Vehikelsystems.....	23
3.3.3 Weitere Formulierungen.....	25
3.4 Penetrationsuntersuchungen an equinen und bovinen Hufmembranen mittels FTIR-ATR-Spektroskopie und Diffusionszelle.....	25
3.4.1 Einleitung.....	25
3.4.2 Versuchsanordnung und Auswertung.....	26
3.4.3 Ergebnisse.....	28
3.5 Penetrationsstudien am menschlichen Nagel.....	31
3.5.1 Extraktionsvorversuche.....	31
3.5.2 <i>Ex vivo</i> Penetrationsstudien am humanen Nagel.....	31
3.6 Vergleich der <i>in vitro</i> Penetrationsdaten mit den <i>ex vivo</i> Daten.....	34
3.7 Zusammenfassung: Moderne Vehikel für die ungleiche Applikation.....	35

4	PENETRATIONSSTEIGERUNG VON METHOTREXAT ZUR TOPISCHEN BEHANDLUNG DER SCHUPPENFLECHTE	36
4.1	Motivation und Zielstellung	36
4.2	Der hydrophile Arzneistoff Methotrexat	36
4.2.1	Relevante Fakten zur Pharmakokinetik und Pharmakologie	36
4.2.2	Methotrexat in der dermalen Anwendung	38
4.2.3	Physikochemische Eigenschaften von MTX	40
4.2.3.1	Sättigungslöslichkeiten	40
4.2.3.2	Einteilung in das Biopharmazeutische Klassifizierungssystem (BCS)	42
4.2.3.3	Bestimmung des Isoelektrischen Punktes	42
4.2.3.4	Verteilungskoeffizient in Abhängigkeit vom pH-Wert	43
4.2.3.5	Stabilitätsuntersuchungen	44
4.3	Untersuchungen an Mikroemulsionen zur dermalen Anwendung von Methotrexat	46
4.3.1	Entwicklung von Mikroemulsionen und Phasendreieck	46
4.3.1.1	Entwicklung von Mikroemulsionen	46
4.3.1.2	Pseudoternäre Phasendiagramme	47
4.3.2	Physikochemische Charakterisierung	49
4.3.2.1	Konduktivitätsmessungen	49
4.3.2.2	Polarisationsmikroskopie	51
4.3.2.3	Dichte	51
4.3.2.4	Viskositätsuntersuchungen	52
4.3.2.5	DSC-Messungen	55
4.3.2.6	pH-Wert	59
4.3.2.7	Dynamische Lichtstreuung	59
4.3.2.8	Stabilitätstestung	61
4.3.2.9	Zusammenfassung der physikochemischen Charakterisierung	61
4.3.3	HET-CAM	61
4.3.4	Untersuchungen an MTX-haltigen Mikroemulsionen	62
4.3.4.1	Inkorporation von MTX in Mikroemulsionen	62
4.3.4.2	Vergleichsvehikel	63
4.3.4.3	Stabilität von MTX in den Formulierungen	63
4.3.4.4	Extraktionsvorversuche	64
4.3.5	Ergebnisse der <i>ex vivo</i> Penetrationsuntersuchungen	66
4.3.6	Magistralrezeptur	68
4.3.7	Zusammenfassung	69
4.4	Verbesserung der Penetrationsrate von Methotrexat durch Ionenpaarbildung	70
4.4.1	Identifizierung geeigneter Gegenionen	70
4.4.2	Einfluss der Ionenpaarbildung von MTX auf den Verteilungsprozess	72
4.4.3	Einfluss der Ionenpaarbildung auf die Liberation von MTX in Lipidmembranen	74
4.4.4	Einfluss der Ionenpaarbildung auf das Penetrationsverhalten von MTX in exzidierte Humanhaut	76
4.4.5	Zusammenfassung	79
4.5	Vergleich der Penetrationsergebnisse von MTX	80
4.6	Zusammenfassung: Penetrationssteigerung von MTX	82
5	ZUSAMMENFASSUNG	83
6	EXPERIMENTELLER TEIL	85
6.1	Herstellung der Formulierungen	85
6.2	Herstellung des Dinatriumsalzes von MTX	86
6.3	Wirkstoffanalytik	87
6.3.1	HPLC-Methoden und deren Validierung	87
6.3.2	CZE-Methoden	89
6.3.3	FTIR-ATR-spektroskopische Diffusionsexperimente	89

6.4	Bestimmung physikochemischer Parameter	92
6.4.1	Sättigungslöslichkeiten.....	92
6.4.2	Verteilungskoeffizient	92
6.4.3	Bestimmung der CMC von EV-086K.....	93
6.4.4	Polarisationsmikroskopische Untersuchungen von EV-086K	93
6.4.5	Bestimmung des IEP von MTX.....	93
6.5	Physikochemische Charakterisierung der Mikroemulsionen.....	93
6.5.1	Phasendreieck	93
6.5.2	Polarisationsmikroskopie.....	93
6.5.3	Viskosität	94
6.5.4	Dichte.....	94
6.5.5	Konduktivität	94
6.5.6	Dynamische Lichtstreuung.....	94
6.5.7	Differential Scanning Calorimetry (DSC).....	94
6.5.8	HET-CAM.....	95
6.5.9	pH-Wert.....	95
6.6	Wirkstoffstabilitätsuntersuchungen.....	96
6.7	Extraktion der Wirkstoffe.....	96
6.7.1	Extraktion der Wirkstoffe aus den Formulierungen	96
6.7.2	Extraktion von MTX aus Humanhaut	97
6.7.3	Extraktion von MTX aus Baumwolltupfern	97
6.7.4	Extraktion von EV-086K aus humanem Nagelmaterial	97
6.7.5	Extraktion von MTX in Gegenwart von Gegenionen	97
6.8	Liberationsstudien am Mehrschichtmembranmodell.....	97
6.9	Penetrationsuntersuchungen an Humanhaut.....	99
6.10	Penetrationsuntersuchungen am menschlichen Nagel	100
6.11	Statistik	101
7	ANHANG	102
7.1	Verwendete Substanzen	102
7.2	Verwendete Geräte (allgemein)	103
7.3	Penetrationsverhalten optimierter EV-086K-Formulierungen	104
7.3.1	Formulierungsentwicklung	104
7.3.2	<i>In vitro</i> Penetration von EV-086K aus den optimierten Formulierungen	105
7.4	Pharmakokinetische Daten von MTX.....	106
7.5	Stabilitätsuntersuchungen: Zersetzung von MTX	106
7.6	Zusammensetzung der Dilutionsreihen zur physikochemischen Charakterisierung der ME-Systeme.....	107
7.7	Verbesserung der <i>ex vivo</i> Penetration von MTX durch den Einsatz des Lösungsvermittlers Soluphor® P.	108
8	LITERATUR	110
9	DANKSAGUNG	121
10	PUBLIKATIONSLISTE	123
11	LEBENS LAUF	125
12	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	126

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	Schematischer Aufbau des Nagel modifiziert nach [2].....	3
Abb. 2:	Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme der Oberfläche des menschlichen Nagels (a) entnommen aus [7] und nach Inkubation mit Keratinase (b) entnommen aus [10].....	4
Abb. 3:	Mikroskopische Ansicht der Haut und des darunter liegenden Gewebes (Abdruck mit freundlicher Genehmigung von Pearson Education, Inc., 2015) [53].....	7
Abb. 4:	Penetrationswege durch das Stratum corneum: 1 - interzelluläre, 2 - corneodesmosomale, 3 - transzelluläre Route. Modifiziert nach [74, 75].....	9
Abb. 5:	Strategien zur Verbesserung der dermalen Hautpenetration (modifiziert nach [86, 87] und ergänzt durch [85, 88]).....	11
Abb. 6:	Möglicher Ionenpaartransport durch Membranen bei gleichzeitiger Gabe von Wirkstoff (A ⁻) und Gegenion (K ⁺) modifiziert nach [111].....	14
Abb. 7:	Chemische Struktur von EV-086K.....	15
Abb. 8:	Synthese von Fettsäuren in einer Pilzzelle erstellt in Anlehnung an [122].....	16
Abb. 9:	Polarisationsmikroskopische Aufnahmen von EV-086K mit 500- (a) bzw. 200facher (b) Vergrößerung sowie einer hexagonalen Textur von C16TA-ZnCl-60 (200fach vergrößert) aus [127].....	18
Abb. 10:	Links: Strukturbildung lyotroper Flüssigkristalle in Abhängigkeit von der Tensidkonzentration aus [128] Rechts: Vereinfachte Darstellung einer möglichen inversen Stäbchenmizelle von EV-086K.....	18
Abb. 11:	Chromatogramm der HPLC-Messung zur Ermittlung des log P-Wertes (Retentionszeiten von Thioharnstoff, Nitrobenzol, Toluol, Thymol, Diphenylamin, Biphenyl, n-Butylbenzol, EV-086K: von links nach rechts).....	19
Abb. 12:	Chemische Struktur von Tinogard [®] TT (links) und Tinogard [®] TL (rechts).....	20
Abb. 13:	EV-086K-Stabilität in wässriger Lösung [H ₂ O] und im Ethanol/Isopropanol-Gemisch [E/I] bei Raumtemperatur [RT] und bei Lagerung im Kühlschrank [KS] mit und ohne Zusatz von Antioxidantien [AO] (MW±SD, n=3).....	21
Abb. 14:	Chemische Struktur von Eudragit [®] E 100 (links) und Transcutol [®] P (rechts).....	22
Abb. 15:	Modell eines Nagelpflegestiftes.....	24
Abb. 16:	Schematischer Aufbau einer Diffusionszelle.....	26
Abb. 17:	FTIR-ATR-Spektren (farbig) der einzelnen Bestandteile der entsprechenden Formulierung und ausgewählte Spektren (schwarz) während des Penetrationsprozesses in den Akzeptor der Diffusionszelle.....	27

Abb. 18:	Links: Vergleich der Penetrationsergebnisse von EV-086K nach Applikation der ME (n=2), des Hydrogels (HG, n=3), des Nagellackes (NL, n=2) und der Lösung F11 (L, n=3) in den Akzeptor der Diffusionszelle unter Verwendung von Pferdehufmembranen bezogen auf die applizierte Dosis (MW±SD, p<0,05 vs. der angegebenen Formulierung). Rechts: Vergrößerter Ausschnitt der ersten 180 min des Diffusionsprozesses.....	28
Abb. 19:	Links: Vergleich der Penetrationsergebnisse von EV-086K nach Applikation der ME (n=6), des Hydrogels (HG, n=4), des Nagellackes (NL, n=3) und der Lösung F11 (L, n=3) in den Akzeptor der Diffusionszelle unter Verwendung von Rinderhufmembranen bezogen auf die applizierte Dosis (MW±SD, p<0,05 vs. der angegebenen Formulierung). Rechts: Vergrößerter Ausschnitt der ersten 180 min des Diffusionsprozesses.....	29
Abb. 20:	Vergleich der Penetrationsergebnisse von EV-086K nach Applikation der ME-EV-086K, der Lösung F11 und des Nagellackes in % der applizierten Dosis im Akzeptorkompartiment sowie in der dorsalen, intermediären und ventralen Schicht nach 24 h Inkubationszeit (MW±SD, n=3, Akzeptor n=1, *p<0,01 bzw. #p<0,05 vs. Lösung).....	32
Abb. 21:	Vergleich der absoluten EV-086K-Konzentrationen in den einzelnen Nagelschnitten (links; *p<0,05 ME vs. Lösung F11 oder Nagellack) und Vergleich der relativen EV-086K-Konzentrationen bezogen auf die applizierte Dosis (rechts; *p<0,05 ME oder Nagellack vs. Lösung F11) (MW±SD, n=3).....	33
Abb. 22:	Chemische Struktur von MTX (links) und von Folsäure (rechts).....	37
Abb. 23:	Meilensteine in der Entwicklung topisch applizierbarer MTX-Formulierungen.....	39
Abb. 24:	Elektrophoretische Mobilität von MTX in Abhängigkeit vom pH-Wert (MW±SD; n=3).....	43
Abb. 25:	Stabilität von MTX in wässrigen Lösungen mit verschiedenen pH-Werten bei einer Temperatur von 23 °C (MW±SD, n=9).....	45
Abb. 26:	Stabilität von MTX in Wasser bei einer Temperatur von 23 °C (MW±SD, n=9).....	45
Abb. 27:	Pseudotenäres Phasendiagramm des ME-L595-Systems.....	48
Abb. 28:	Pseudotenäres Phasendiagramm des ME-L1695-Systems.....	48
Abb. 29:	Links: Elektrische Leitfähigkeit als Funktion der Wasserfraktion entlang der Dilutionsreihe A und B (MW±SD, n=3, gemessen bei 25 °C). Rechts: Darstellung der 1. Ableitung gegen die Wasserfraktion.....	49
Abb. 30:	Links: Elektrische Leitfähigkeit als Funktion der Wasserfraktion aller isotropen Mischungen (MW±SD, n=3, gemessen bei 25 °C). Rechts: Darstellung der 1. Ableitung gegen die Wasserfraktion.....	50
Abb. 31:	Aufnahmen mit dem Polarisationsmikroskop des festen Sucroseesters L-595 (A), einer isotropen ME (B), der ME-L595-85%-1 (C) und der ME-L1695-40%-6 (D) mit 200facher bzw. 500facher Vergrößerung.....	51
Abb. 32:	Dynamische Viskosität der isotropen Mischungen des ME-L595-Systems in Abhängigkeit von der Wasserkonzentration (links) und Emulgatorkonzentration (rechts) (MW±SD, n=16).....	52
Abb. 33:	Links: Rheogramm bzw. Rechts: Viskositätskurven der isotropen Mischungen der B-Reihe des ME-L595-Systems in Abhängigkeit von der Scherrate bei 25 °C (Messung bei 16 verschiedenen Scherraten).....	53

Abb. 34:	Viskositätskurven der C-Reihe (links) und der A-Reihe (rechts) des ME-L595-Systems in Abhängigkeit von der Scherrate bei 25 °C (Messung bei 16 verschiedenen Scherraten).....	53
Abb. 35:	Dynamische Viskosität der isotropen Mischungen des ME-L1695-Systems in Abhängigkeit von der Wasserkonzentration (links) und Emulgatorkonzentration (rechts) (MW±SD, n=16).....	54
Abb. 36:	Links: Rheogramm bzw. Rechts: Viskositätskurven verschiedener isotroper Mischungen des ME-L1695-Systems in Abhängigkeit von der Scherrate bei 25 °C (Messung bei 16 verschiedenen Scherraten)	54
Abb. 37:	DSC-Kühlkurven ausgewählter Mischungen der Dilutionsreihe A des ME-L595-Systems sowie deren Einzelkomponenten. *Das Tensidgemisch setzt sich zusammen aus SE:Tego® Care PL4:Pentylenglykol im Verhältnis 1:1:2. Der Wasserpeak ist aus Gründen der Übersichtlichkeit um 60 % verkleinert.....	56
Abb. 38:	DSC-Kühlkurven ausgewählter Mischungen der Dilutionsreihe B des ME-L595-Systems sowie deren Einzelkomponenten. Das Tensidgemisch setzt sich zusammen aus SE:Tego® Care PL4:Pentylenglykol im Verhältnis 1:1:2. Der IPP-Peak ist aus Gründen der Übersichtlichkeit um 60 % verkleinert.	57
Abb. 39:	DSC-Kühlkurven von isotropen Mischungen der Dilutionsreihe 1 (links) und der Dilutionsreihe 40% (rechts) des ME-L1695-Systems sowie deren Einzelkomponenten.....	58
Abb. 40:	Stabilität von MTX in den entwickelten Formulierungen bei einer Temperatur von 23 °C (MW±SD, n=9).....	64
Abb. 41:	Penetrationsprofile von MTX unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Dicken der jeweiligen Hautkompartimente nach Applikation verschiedener Formulierungen (MW±SD jeweils n=4, Basiscreme n=8; p<0,05 *gegenüber BC-DAC-MTX; #gegenüber Rextop® Gel) ermittelt im Franz-Diffusionsmodell. SC = Stratum corneum, EP = vitale Epidermis, DR = Dermis, AK = Akzeptorkompartiment.....	67
Abb. 42:	Vorliegende Ladung des MTX-Moleküls bei unterschiedlichem pH-Wert.....	70
Abb. 43:	Chemische Struktur von BAC (links) als C17H30ClN und BDAC (rechts) als C25H46ClN.....	72
Abb. 44:	Veränderung des Octanol-Puffer-Verteilungskoeffizienten von MTX in Abhängigkeit vom pH-Wert und des molaren Verhältnisses zu BAC (links) und BDAC (rechts) bei 32 °C (MW±SD; n=9; MTX ohne Gegenion: n=3)	72
Abb. 45:	Prozentualer Anteil von MTX in der Puffer- bzw. in der Octanolphase in Gegenwart von BAC (links) und BDAC (rechts) bei einem pH-Wert von 7 (MW±SD; n=9).....	73
Abb. 46:	<i>In vitro</i> Liberation von MTX aus dem Hydrogel mit und ohne Gegenion BAC (MW±SD; n=8; *p<0,01 gegenüber der jeweiligen Membran des Hydrogels ohne BAC).....	75
Abb. 47:	<i>In vitro</i> Liberation von BAC aus dem Hydrogel in die Membranen (MW±SD; n=8).	75
Abb. 48:	Zeitabhängige Zunahme von MTX in Gegenwart von BAC, von BAC in Gegenwart von MTX und von MTX ohne BAC-Zusatz in den drei Membranen des MSMM bezogen auf die applizierte Dosis (MW±SD; n=8)	76

Abb. 49:	Penetrationsergebnisse von MTX mit und ohne Zusatz von Gegenion (rot und grün) und Penetration von BAC (blau) aus dem Hydrogel dargestellt in Anteilen der applizierten Dosis (links) sowie Tiefenprofil unter Berücksichtigung der Dicke der einzelnen Hautschichten in absoluten Konzentrationen [μM] (rechts) nach 300 min Inkubationszeit (MW \pm SD; n=4).....	77
Abb. 50:	Darstellung der zentralen und peripheren Applikation in den <i>ex vivo</i> Experimenten.....	78
Abb. 51:	Anteil der applizierten Dosis von MTX und BAC in den einzelnen Hautschichten nach Applikation des Hydrogels. ST = verbleibender Hautstumpf der Dermis (MW \pm SD; n=4).....	78
Abb. 52:	Vergleich der Tiefenprofile der Formulierungen unter Berücksichtigung der Dicke der jeweiligen Hautschicht. Für den verbleibenden Stumpf wurde eine Dicke von 400 μm angenommen (MW \pm SD; n=4 bzw. n=8 für Basiscreme; p<0,05 *gegenüber Basiscreme, #gegenüber Rextop [®] Gel).....	81
Abb. 53:	Schematische Darstellung der Herstellung des MTX-BAC-haltigen Hydrogels.....	86
Abb. 54:	Aufbau der Teflon-ATR-Diffusionszelle.....	90
Abb. 55:	Aufbau einer Liberationszelle des MSMM nach FÜRST und NEUBERT [289].....	98
Abb. 56:	Aufbau einer Diffusionszelle nach FRANZ.....	99
Abb. 57:	Schematischer Aufbau des Nagel-Penetrations-Experimentes	100
Abb. 59:	Links: Vergleich der Penetrationsergebnisse von EV-086K nach Applikation der ME (n=6), ME-NL (n=3), ME-HG-HEC (n=2) und ME-HG-Lutrol (n=2) in den Akzeptor der Diffusionszelle unter Verwendung von Rinderhufmembranen bezogen auf die applizierte Dosis (MW \pm SD). Rechts: Vergrößerter Ausschnitt der ersten 180 min des Diffusionsprozesses.	105
Abb. 58:	Links: HPLC-Chromatogramm von MTX (I) nach 3 Jahren in wässriger Lösung mit einem pH-Wert von 5 und der Peak des Abbauproduktes N ¹⁰ -Methylfolsäure (II); Rechts: Anteil des Abbauproduktes bezogen auf den MTX-Gehalt (MW \pm SD, n=9)	107
Abb. 60:	Vergleich der Penetrationsergebnisse von MTX mit und ohne Soluphor P [®] -Zusatz (SP) nach Applikation der jeweiligen Formulierung in Anteilen der applizierten Dosis in das Stratum corneum (SC), in die Epidermis (EP), in die Dermis (DR) und in den Akzeptor (AK) nach 300 min Inkubationszeit (MW \pm SD, n=4).	108
Abb. 61:	Penetration der applizierten SP-Menge nach Applikation der Basiscreme und der W/O-ME in die verschiedenen Hautkompartimente nach 300 min Inkubationszeit (MW \pm SD, n=4).....	109

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1:	Epidemiologie der Psoriasis vulgaris [54].....	8
Tab. 2:	Limitierende Grenzen für den dermalen Transport nach [82].....	10
Tab. 3:	Sättigungslöslichkeiten von EV-086K in verschiedenen Medien (MW±SD, n=3)	17
Tab. 4:	Geradengleichungen und deren Schnittpunkt zur Ermittlung der CMC von EV-086K.	17
Tab. 5:	Retentionszeit in min, log <i>K</i> - und log <i>P</i> -Werte der Referenzsubstanzen sowie von EV-086K (MW±SD, n=3).	20
Tab. 6:	Zusammensetzung des Nagellackes	22
Tab. 7:	Zusammensetzung der ME-BIP und ME-EV-086K.....	24
Tab. 8:	Zusammensetzung der Lösung F11	25
Tab. 9:	Vergleich verschiedener Parameter des Diffusionsexperimentes unter Verwendung von Pferdehufmembranen (MW±SD, blau: p<0,01; rot: p<0,05 vs. der angegebenen Formulierung).....	29
Tab. 10:	Vergleich verschiedener Parameter des Diffusionsexperimentes unter Verwendung von Rinderhufmembranen (MW±SD, blau: p<0,01; rot: p<0,05 vs. der angegebenen Formulierung).....	30
Tab. 11:	Wiederfindungsraten (WFR) von EV-086K nach Extraktion aus humanem Nagelmaterial bezogen auf die eingesetzte Dosis (MW±SD, n=3)	31
Tab. 12:	Vergleich der relativen EV-086K-Konzentrationen in den verschiedenen Nagelschichten (MW±SD, n=3, Akzeptor n=1, *p<0,05 vs. Lösung).....	32
Tab. 13:	Vergleich der Fluxwerte von EV-086K aus den unterschiedlichen Experimenten.....	34
Tab. 14:	Sättigungslöslichkeiten von MTX (Säure- & Salzform) in verschiedenen Medien (MW±SD, n=3).....	40
Tab. 15:	Log <i>D</i> -Werte von MTX und MTX-Na bei 25 °C (MW±SD, n=3).....	44
Tab. 16:	Zusammensetzung des ME-L595 Systems (Angaben in %, m/m)	46
Tab. 17:	Zusammensetzung des ME-L1695 Systems (Angaben in %, m/m)	47
Tab. 18:	Zusammensetzung der Mizellaren Lösungen	60
Tab. 19:	Hydrodynamische Radien der untersuchten Proben.....	60
Tab. 20:	Ergebnisse des HET-CAM Tests (MW±SD, n=6).....	61
Tab. 21:	Löslichkeit von MTX in der ME-L1695-OW und relevanten Bestandteilen (MW±SD, n=3).....	62
Tab. 22:	Zusammensetzung der MTX-haltigen ME	63
Tab. 23:	WFR von MTX in % nach Extraktion aus den Formulierungen bezogen auf die eingesetzte Dosis (MW±SD, n=5)	64
Tab. 24:	WFR von MTX in % nach Extraktion aus den Formulierungen in Gegenwart von Humanhaut bezogen auf die eingesetzte Dosis (MW±SD, n=3)	65
Tab. 25:	WFR von MTX in % nach Extraktion aus den Tupfern bezogen auf die eingesetzte Dosis (MW±SD, n=4).....	65
Tab. 26:	<i>Ex vivo</i> Penetration von MTX aus ME-OW (n=4), ME-WO (n=4), Basiscreme (n=8) und Rextop® (n=4) in humane Haut angegeben in % der applizierten Dosis (MW±SD, p<0,05; WFR = 82 %);.....	66
Tab. 27:	pH-Werte verschiedener Formulierungen (MW±SD, n=3).....	68

Tab. 28:	Mögliche Gegenionen und ihre physikochemischen Eigenschaften sowie Färbung der Chloroformphase (CP)	71
Tab. 29:	Verteilungskoeffizienten von MTX in Gegenwart von BAC und BDAC bzw. ohne Gegenion bei verschiedenen pH-Werten bei einer Temperatur von 32 °C (MW±SD, n=9; MTX ohne Gegenion: n=3)	73
Tab. 30:	Sättigungslöslichkeiten des MTX-BAC-IP in PrG und PeG im Vergleich zu MTX ohne Gegenionzusatz (MW±SD, n=3).....	74
Tab. 31:	Vergleich der Penetrationsdaten von MTX aus den verschiedenen Formulierungen dargestellt als Anteil der applizierten Dosis in [%] nach 300 min Inkubationszeit (MW±SD, n=4, Basiscreme n=8; p<0,05 #gegenüber Basiscreme, *gegenüber Rextop, *gegenüber ME-OW-MTX).	80
Tab. 32:	Parameter der HPLC-Analytik für die Quantifizierung von EV-086K, MTX und BAC bzw. BDAC.....	87
Tab. 33:	Parameter der HPLC-Analytik für die Quantifizierung mittels Agilent-Anlagen.....	87
Tab. 34:	Parameter der FTIR-ATR-Analytik für die Quantifizierung von EV-086K.....	89
Tab. 35:	LoD und LoQ Parameter.....	91
Tab. 36:	HPLC-Methode zur Bestimmung des Verteilungskoeffizienten von EV-086K.....	93
Tab. 37:	Rezeptur zur Herstellung der DCM.....	98
Tab. 38:	Probenschema für die Penetrationsstudien an Humanhaut.....	100
Tab. 39:	Probenaufbereitung für die Nagelpenetrationsstudien	101
Tab. 43:	Bewertung der verschiedenen ME-NL-Formulierungen.....	104
Tab. 44:	Zusammensetzung der ME-Gele.....	105
Tab. 40:	Pharmakokinetische Daten von MTX	106
Tab. 41:	Zusammensetzung der Mischungen des ME-L-595-Systems (Angaben in %, m/m)	107
Tab. 42:	Zusammensetzung der Mischungen des ME-L1695-Systems (Angaben in %, m/m)	108
Tab. 45:	Insgesamt penetrierter Anteil des applizierten MTX nach Applikation verschiedener Formulierungen mit und ohne SP-Zusatz (MW±SD, n=4).....	109

ABKÜRZUNGS- UND SYMBOLVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AICAR	Aminoimidazol-4-Carboxamid-Ribonucleotid
AK	Akzeptor
AMP	Adenosinmonophosphat
ATR	Abgeschwächte Totalreflexion, engl. <i>attenuated total reflectance</i>
BAC	Benzalkoniumchlorid
BCS	Biopharmazeutisches Klassifizierungssystem, engl. <i>biopharmaceutical classification system</i>
BDAC	Benzyltrimethylhexadecylammoniumchlorid
BIP	eutektisches Gemisch aus Butyl- und Isopropylphthalimid
BSA	Körperoberfläche, engl. <i>Body surface area</i>
CMC	Kritische Mizellbildungskonzentration, engl. <i>critical micelle concentration</i>
c_s	Sättigungskonzentration
CZE	Kapillarzonenelektrophorese, engl. <i>capillary zone electrophoresis</i>
D	Diffusionskoeffizient
D_{eff}	effektiver Diffusionskoeffizient
DAB	Deutsches Arzneibuch
DAC	Deutscher Arzneimittel-Codex
DCM	Dodecanol-Collodium-Membran
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
DR	Dermis
DSC	dynamische Differenzkalorimetrie, engl. <i>Differential Scanning Calorimetry</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EOF	Elektroosmotischer Fluss
EP	vitale Epidermis
ES-MS	Elektronenspray-Massenspektrometrie
EV-086K	antimykotischer Wirkstoff
FDA	Arzneimittelzulassungsbehörde der Vereinigten Staaten, engl. <i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarot, engl. <i>fourier-transform infrared</i>
HET-CAM	engl. <i>Hen's egg test on chorioallantoic membrane</i>
HG	Hydrogel
HLB	<i>Hydrophilic Lipophilic Balance</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie, engl. <i>high performance liquid chromatography</i>
HWZ	Halbwertszeit
INCI	engl. <i>International Nomenclature of Cosmetic Ingredients</i>
IL	Interleukin
IP	Ionenpaar
IPM	Isopropylmyristat
IPP	Isopropylpalmitat
IS	Irritationsscore

IUPAC	engl. <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
J	Flux
κ	Leitfähigkeit
lag-Zeit	Verzögerungszeit, engl. <i>lag time</i>
LoD	Nachweisgrenze, engl. <i>limit of detection</i>
LoQ	Bestimmungsgrenze, engl. <i>limit of quantification</i>
IEP	Isoelektrischer Punkt
M	Molare Masse
ME	Mikroemulsion
ME-BIP	BIP-haltige ME
ME-EV-086K	EV-086K-haltige ME
MIC	Minimale Hemm-Konzentration, engl. <i>Minimal Inhibitory Concentration</i>
ML	mizellare Lösung
m/m	Gewicht pro Gewicht
MSMM	Mehrschichtmembranmodell
MTX	Methotrexat (Säureform)
MTX-Na	Methotrexat als Dinatriumsalz
MW	arithmetischer Mittelwert
NF- κ B	engl. <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NL	Nagellack
<i>OLE-1</i>	Acyl-CoA Desaturase 1
O/W	Öl in Wasser
P	Permeationskoeffizient
PASI	Schweregrad einer Psoriasis-erkrankung, engl. <i>Psoriasis Area and Severity Index</i>
PeG	1,2-Pentylenglykol
PEG	Polyethylenglykol
Ph. Eur.	Europäisches Arzneibuch
PrG	1,2-Propylenglykol
SC	Stratum corneum
SD	absolute Standardabweichung, engl. <i>standard deviation</i>
SE	Sucroseester
SP	Soluphor® P (2-Pyrrolidon)
Tab.	Tabelle
THF	Tetrahydrofolsäure
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
UV	Ultraviolettstrahlung
V/V	Volumen pro Volumen
WFR	Wiederfindungsraten
W/O	Wasser in Öl

1 EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG

Aufgrund einer Prävalenz von über 2 % stellt die Psoriasis (Schuppenflechte) eine der häufigsten Hauterkrankungen in den westlichen Industrienationen dar. Die Psoriasis wird heutzutage vielmehr als Systemerkrankung angesehen, da sie neben den typischen Hautsymptomen auch charakteristische Komorbiditäten aufweist. Dazu zählen die rheumatoide Arthritis, chronisch entzündliche Darmerkrankungen oder die Onychomykose (Nagelpilz). Die Wahrscheinlichkeit an Nagelpilz zu erkranken, ist bei Psoriatikern im Vergleich zu Nicht-Psoriatikern um ca. 56 % erhöht bei gleichem Alter und Geschlecht (n=561) [1]. Für die Behandlung der Psoriasis oder des Nagelpilzes stehen sowohl systemische als auch topische Therapiemöglichkeiten zur Verfügung. Jedoch besitzen die systemisch verabreichten Wirkstoffe oft ein hohes Potential an unerwünschten Arzneimittelwirkungen und belasten den gesamten Organismus. Ferner erreichen die topisch applizierten Wirkstoffe bei mittelschweren bis schweren Verlaufsformen meist nicht den gewünschten Therapieerfolg. Demzufolge wäre es wünschenswert, systemisch gut wirksame Arzneistoffe ebenso topisch auf die Haut oder auf den Nagel applizieren zu können, um die systemische Belastung für den Patienten zu minimieren und die Therapiecompliance und folglich den Therapieerfolg zu verbessern.

Allerdings stellen die Haut und der Nagel äußerst effiziente Barrieren dar, welche versuchen, den Körper vor Umwelteinflüssen sowie dem Eindringen von Arzneistoffen zu schützen. Daher ist es eine besondere Herausforderung, pharmazeutisch relevante Konzentrationen von Arzneistoffen, mit meist ungünstigen physikochemischen Eigenschaften, in der Haut bzw. im Nagel zu erreichen. Um dennoch eine Wirksamkeit herbeiführen zu können, ist es essentiell geeignete Vehikel zu finden, welche das Eindringen solcher Wirkstoffe überhaupt erst ermöglichen. Neben Salben oder Cremes sind es besonders die modernen kolloidalen Vehikel, wie zum Beispiel Mikroemulsionen, welche die Penetration solcher Problemarzneistoffe verbessern sollen.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Penetration von pharmazeutischen Problemarzneistoffen aus modernen Drug Delivery Systemen in ihr jeweiliges Target zu untersuchen und zu vergleichen. Dabei werden zwei verschiedene Wirkstoffe in den Fokus gestellt. Zum einen soll das heutzutage systemisch verabreichte Methotrexat (MTX) zur Behandlung der Psoriasis vulgaris in eine dermal applizierbare Formulierung überführt und zum anderen soll eine topisch applizierbare Formulierung zur Anwendung auf dem Nagel für einen neuen antimykotischen Wirkstoff (EV-086K) entwickelt werden. Beide Wirkstoffe sind aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften, vor allem hinsichtlich ihrer Hydrophilie bzw. Lipophilie, äußerst ungeeignet für ihr jeweiliges Target und werden daher auch als Problemarzneistoffe bezeichnet. Das extrem hydrophile MTX wird nur schwer in die Haut und das extrem lipophile EV-086K nur schwer in den Nagel penetrieren können. Durch die Entwicklung von hautfreundlichen Mikroemulsionen soll die Penetrationsrate beider Wirkstoffe gesteigert werden. Zusätzlich sollen Enhancer und das Prinzip der Ionenpaarbildung auf ihr Potential hinsichtlich der Steigerung der Penetrationsrate erforscht werden. Um EV-086K unguale applizieren zu können, steht ebenso die Entwicklung eines effizienten Nagellackes im Vordergrund.

Für die Bestimmung der Effektivität der entwickelten Formulierungen werden verschiedene Methoden eingesetzt. Die *ex vivo* Penetrationsstudien an Humanhaut werden mit dem Ziel durchgeführt, den Einfluss der unterschiedlichen Formulierungen auf das Penetrationsverhalten von MTX zu verdeutlichen. Die Penetration der EV-086K-haltigen Formulierungen zur Anwendung am Nagel soll zunächst an tierischen Modellmembranen untersucht werden. Dabei sollen schwingungsspektroskopische Methoden (FTIR-ATR-Spektroskopie) zum Einsatz kommen, die eine Echtzeitmessung der Wirkstoffkonzentration im Akzeptor ermöglichen. Abschließend sollen *ex vivo* Penetrationsstudien am menschlichen Nagel den Einfluss der Formulierung auf die unguale Penetration von EV-086K belegen.

Folglich besteht das Ziel dieser Arbeit darin, jeweils eine topisch anwendbare Arzneiform mit einer verbesserten Bioverfügbarkeit für die beiden Arzneistoffe zu entwickeln und die Behandlungsmöglichkeiten von Psoriasis vulgaris sowie Onychomykosis um eine effektivere und nebenwirkungsarme Therapie zu ergänzen.

Daraus ergaben sich folgende Ziele:

- ❖ Zunächst physikochemische Charakterisierung des noch unbekanntes Wirkstoffes EV-086K und des hydrophilen MTX
- ❖ Entwicklung und Charakterisierung von geeigneten modernen Formulierungen für die Applikation der beiden Problemarzneistoffe
- ❖ Charakterisierung der entwickelten Mikroemulsionen (Polarisationsmikroskopie, DSC-Messungen, rheologische Untersuchungen, dynamische Lichtstreuung, Irritationspotential)
- ❖ Inkorporation der Arzneistoffe in die Formulierungen und Bestimmung der (Langzeit-) Stabilität
- ❖ Entwicklung geeigneter und sensitiver Quantifizierungsmethoden für beide Wirkstoffe (HPLC-UV, FTIR-ATR, CZE)
- ❖ Untersuchung der Freisetzung ausgewählter Formulierungen mit Hilfe des Mehrschichtmembranmodells (MSMM)
- ❖ Entwicklung und Durchführung von FTIR-ATR-Studien zum Vergleich des Penetrationsverhaltens von EV-086K durch tierische Hufmembranen
- ❖ Ermittlung des *ex vivo* Penetrationsverhaltens von MTX und EV-086K aus unterschiedlichen Formulierungen in den menschlichen Nagel bzw. in die Haut
- ❖ Auswahl geeigneter Gegenionen für MTX zur Ionenpaarbildung und Bestimmung des Verteilungskoeffizienten im Octanol/Puffersystem
- ❖ Inkorporation des Ionenpaares in ein geeignetes Vehikel
- ❖ Untersuchung des Einflusses der Ionenpaarbildung auf das Liberationsverhalten und das Penetrationsverhalten des extrem hydrophilen Arzneistoffes MTX unter Einfluss des Gegenions

2 THEORETISCHER TEIL

In dieser Arbeit stand die Entwicklung sowohl ungualer als auch dermaler Formulierungen im Vordergrund. Um daher ein bestmögliches Vehikel für eine topische Arzneistoffapplikation hervorzubringen, ist es jedoch notwendig die Zielstrukturen in ihrem Aufbau und ihren Eigenschaften zu kennen. Dazu soll im folgenden Teil auf grundlegende Kenntnisse bezüglich des Nagels und der Haut sowie hinsichtlich dieser Arbeit relevanter Aspekte eingegangen werden.

2.1 Der Nagel als Applikationsort für Arzneimittel

2.1.1 Aufbau und Eigenschaften des Nagels

Der menschliche Nagel setzt sich aus der Nagelplatte und vier spezifischen Geweben zusammen: dem Nagelbett, der Nagelmatrix, der Nagelfalz und dem Hyponychium (Abb. 1). Der wesentliche Bestandteil des gesamten Nagelorgans ist die durchsichtige Nagelplatte, welche fest mit dem rötlich schimmernden Nagelbett verwachsen ist [2]. Neben dem ästhetischen Aspekt dienen die Nagelplatten hauptsächlich zum Schutz der empfindlichen Finger- und Zehenendglieder und unterstützen die sensorische Diskriminierung, d.h. die Fähigkeit Reize durch den Tastsinn einordnen zu können [3].

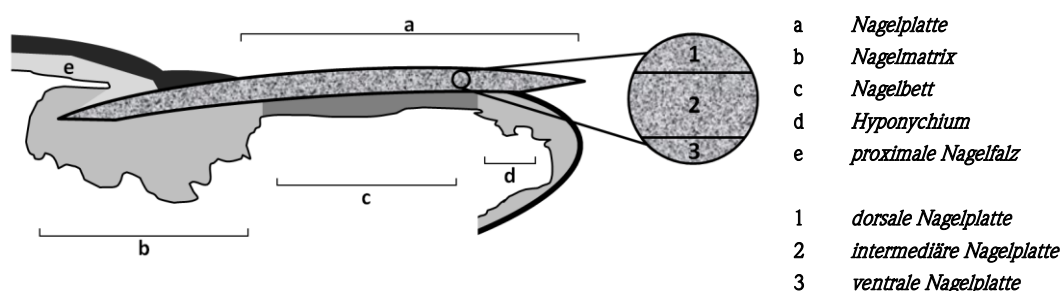


Abb. 1: Schematischer Aufbau des Nagels modifiziert nach [2]

Der Aufbau der Nagelplatte ist viel komplexer als es auf den ersten Blick scheint. Es handelt sich um eine dünne (0,5 bis 1,5 mm), harte, wenig elastische und konvexe Struktur, die sich aus 80 bis 90 Lagen von toten, abgeflachten und verhornten Zellen, den Onychozyten, welche in der Nagelmatrix gebildet werden, zusammensetzt [2, 4]. Die Nagelplatte selbst wird in drei makroskopische Schichten, in die dorsale, intermediäre und ventrale Schicht (Abb. 1), mit einem Schichtdickenverhältnis von 3 : 5 : 2, eingeteilt [2, 5, 6]. Die Zellen auf der dorsalen Nageloberfläche überlappen sich stark und erzeugen somit eine kompakte und undurchlässige Barriere (Abb. 2) [7].

Wie die Keratinozyten der Epidermis bestehen auch die Onychozyten hauptsächlich aus Keratinen [8]. Der Begriff Keratin umfasst Keratinfilamente, Keratinfilament-assoziierte Proteine und andere Proteine, die durch inter- und intramolekulare Disulfidbrücken sowie Wasserstoffbrücken- oder Peptidbindungen miteinander verbunden sind [9]. Die in den Onychozyten enthaltenen Keratinfilamente sind in einer Interfilamentmatrix, bestehend aus schwefelreichen Proteinen mit einem hohen Cysteingehalt, eingebettet. Je höher der Anteil an Cystein-reichen Proteinen in der Matrix ist, desto mehr Disulfidbrücken können zwischen den Keratinfilamenten und dieser ausgebildet werden und umso härter ist die Nagelplatte.

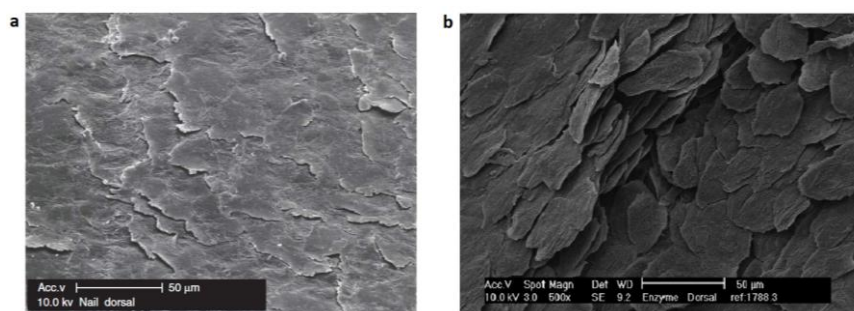


Abb. 2: Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme der Oberfläche des menschlichen Nagels (a) entnommen aus [7] und nach Inkubation mit Keratinase (b) entnommen aus [10]. Die Kerneozyten sind voneinander getrennt, da Keratinase auf die interzelluläre Matrix einwirkt.

Die Arbeitsgruppe von KITAHARA et al. [11] identifizierte zwei Arten von Keratin: zum einen ‘hartes’ (α -Typ, Haarkeratin, ca. 80 - 90 %) und zum anderen ‘weiches’ Keratin (epidermales, Hautkeratin, ca. 10 - 20 %) [12, 13]. Hartes Keratin wurde nur in der intermediären Nagelplatte nachgewiesen und orientiert sich senkrecht zur Wachstumsrichtung des Nagels, wobei sich die Keratinfilamente in der dorsalen und ventralen Schicht senkrecht und parallel anordnen können. Diese Sandwichstruktur verleiht dem Nagel zusätzlich, neben Desmosomen und Tight junctions, seine charakteristische Härte und mechanische Festigkeit [14].

Darüber hinaus hat die Nagelplatte einen geringen Lipidgehalt von maximal 1 %. Die höchsten Lipidkonzentrationen befinden sich in der dorsalen und ventralen Schicht [6]. Die Lipide setzen sich hauptsächlich aus freien Fettsäuren, Ceramiden, Phospholipiden, Squalenen sowie Cholesterol zusammen und sind in Bilayern angeordnet [14, 15]. Der Wassergehalt liegt bei ca. 18 %, kann aber je nach relativer Luftfeuchtigkeit, Alter und Geschlecht stark variieren. Wasser fungiert im Nagel vor allem als Feuchthalter und ist sehr wichtig für dessen Elastizität; andernfalls würde die Nagelplatte spröde und brüchig werden [2, 16].

Des Weiteren wurde aufgezeigt, dass der Nagel tausendmal permeabler für Wasser ist als die Haut. Daher lässt sich zusammenfassend feststellen, dass aufgrund dessen und des stark ausgeprägten Keratinnetzwerkes, des geringen Lipid- sowie hohen Wassergehaltes im Vergleich zum Stratum corneum die Nagelplatte eine hydrophile Permeationsbarriere darstellt [6, 17, 18].

2.1.2 Nagelpilzerkrankungen

Veränderungen im Nagel sind oft ein Zeichen für dermatologische oder systemische Erkrankungen. Die chronische Pilzinfektion der Nagelplatte und / oder des Nagelbettes, auch Onychomykose oder Nagelmykose genannt, ist neben Psoriasis eine der häufigsten Erkrankungen des Nagelorgans. Hauptsächlich wird sie durch den Dermatophyten *Trichophyton rubrum* (80-90 %) und sehr selten durch Hefe- oder Schimmelpilze verursacht [19, 20]. Die Nagelplatte bietet den Dermatophyten einen idealen Nährboden, da diese sich vorwiegend von Keratin ernähren.

Zahlreiche epidemiologische Studien, wie das *European Achilles Foot Screening Project* (n = 13486) und die kanadische Studie von GUPTA et al. (n = 15000), belegen eine Prävalenz in der allgemeinen Bevölkerung von 8 bis 23 %. Mit zunehmendem Alter der Patienten (über 70 Jahre) steigt die Prävalenz sogar bis zu 50 % [21, 22]. Prädisponierende Faktoren wie Diabetes mellitus, Angiopathien, periphere Neuropathien, erbliche Veranlagung, Psoriasis, sportliche Aktivitäten (u.a. Schwimmen), Fußfehlstellungen und zu enge Schuhe begünstigen eine Nagelpilzinfektion [23]. Aufgrund der letzteren Faktoren sind Zehennägel bis zu 19-mal häufiger betroffen als Fingernägel [21].

Die ersten Veränderungen der Nagelplatte werden von den meisten Patienten oft übersehen. Anfangs verliert der Nagel seinen perlmutartigen Glanz und erscheint stumpf. Des Weiteren können sich weißliche Linien bilden. Erst wenn es zu weiß-gelblichen Verfärbungen oder zu Verdickungen der Nagelplatte kommt, wird

der Nagelpilz auch vom Patienten bemerkt. Im fortgeschrittenen Stadium wird die Nagelplatte zunehmend bröselig und brüchig, bis meist der gesamte Nagel befallen ist.

Trotz der zunehmenden Zahl der Erkrankungen gibt es nur wenige Therapiemöglichkeiten, die mehr oder minder effektiv sind. Eine lange Therapiedauer, hohe Rückfallraten und die meist geringe Compliance der Patienten erschweren den Erfolg der Behandlung. Bei schweren Formen der Onychomykose, wenn bereits die Nagelmatrix befallen ist, ist aufgrund der hohen Wirksamkeit systemisch verabreichtes Terbinafin das Mittel der Wahl. Ebenfalls können Triazol-Derivate wie Fluconazol und Itraconazol oral oder als Injektionslösung verabreicht werden [24]. Griseofulvin wird aufgrund verschiedener unspezifischer Nebenwirkungen kaum noch eingesetzt. Systemisch verabreichte Antimykotika müssen in hohen Dosen appliziert werden, damit sie die Nagelplatte in therapeutisch relevanten Konzentrationen überhaupt erreichen können [25]. Dies kann zu massiven Nebenwirkungen wie Dyspepsie, Nausea, Kopfschmerzen, Hautausschlag oder Leberfunktionsstörungen führen. Daher hat sich der Einsatz von therapeutischen Nagellacken, welche Ciclopirox oder Amorolfen enthalten, bei milden bis moderaten Formen der Onychomykose bewährt. Dabei sollten jedoch nicht mehr als 50 % der Nagelplatte und nicht mehr als vier Nägel mit dem Pilz befallen sein. Auch wenn die topisch applizierten Antimykotika nur Heilungsraten zwischen 9 und 38 % erreichen [26, 27], sollten sie der systemischen Therapie gegenüber bevorzugt werden, da unerwünschte Arzneimittelwirkungen, Kontraindikationen sowie Arzneistoffinteraktionen fast vollständig ausgeschlossen werden können [28].

2.1.3 Die ungleiche Penetration von Wirkstoffen und deren Verbesserungsstrategien

Die meisten antimykotischen Wirkstoffe wurden für eine orale oder für eine Applikation auf der Haut entwickelt und sind aus diesem Grunde eher lipophil, um eine gute Membranpermeabilität zu gewährleisten [29]. Der menschliche Nagel stellt aufgrund seiner einzigartigen anatomischen Struktur und seiner Eigenschaften eine extrem widerstandsfähige Penetrations- bzw. Permeationsbarriere für diese Wirkstoffe dar. Die Penetration von Substanzen in den Nagel kann durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst werden [30]:

a) Molekülgröße:

Erwartungsgemäß zeigten Untersuchungen von MERTIN & LIPPOLD, dass die Molekülgröße einen erheblichen Einfluss auf die ungleiche Penetration hat. Kleinere Moleküle diffundieren wesentlich besser durch die Nagelplatte und das dichte Keratinnetzwerk als größere [31]. Allgemein wird angenommen, dass Moleküle, welche eine Größe von 300 Dalton überschreiten, schlecht permeieren [29]. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die Permeabilität von bovinen Hufmembranen 10- bis 30-fach erhöht ist gegenüber der menschlichen Nagelplatte [18]. Es wird vermutet, dass die menschliche Nagelplatte ein dichteres Netzwerk an Keratinfasern besitzt gegenüber Tierhufen und somit kleinere „Poren“ entstehen, welche überlappen können und dadurch der Diffusionsweg für Moleküle erschwert bzw. verlängert wird [31].

b) Hydrophilie/Lipophilie:

Bezüglich der Lipophilie gibt es in der Literatur widersprüchliche Aussagen. Zum einen konnte die Arbeitsgruppe um WALTERS et al. eine Verminderung des Permeationskoeffizienten bei steigender Lipophilie von n-Alkanolen durch den menschlichen Nagel aufzeigen [17]. Zum anderen wurde in zwei weiteren Studien zwar der gleiche Effekt beobachtet, aber mit der zunehmenden Molekülgröße der diffundierenden Substanzen begründet [18, 32]. Die von WALTERS et al. vermutete lipophile Route für stark hydrophobe Substanzen [33] konnte in anderen Untersuchungen nicht nachgewiesen werden [18, 34]. Dennoch zeigen neueste Forschungsergebnisse, dass eine lipophile Route durch Einsatz lipophiler Enhancer „aktiviert“ werden kann [35].

In der Arbeit von HARTMANN wurde zudem gezeigt, dass die Diffusionsgeschwindigkeit von Harnstoff in Rinderhufmembranen *in vitro* 1000fach schneller ist als im isolierten menschlichen Stratum Corneum [36]. Daher führen alle Studien zu dem Schluss, dass sich der menschliche Nagel vielmehr wie ein Hydrogel als wie eine lipophile Membran verhält und hydrophile sowie gut wasserlösliche Stoffe sich im Vergleich zu lipophilen besser in dieses verteilen können.

c) Vehikel

Im Vehikel enthaltenes Wasser kann die Nagelplatte hydrieren, welche dadurch quillt. Wenn man nun die Nagelplatte als Hydrogel betrachtet, führt deren Quellung zu größeren Abständen zwischen den Keratinfasern, folglich zu größeren Poren, durch diese die Moleküle besser diffundieren können. Höhere Permeationsraten sind die Folge [30]. Studien zeigten, dass die Permeationskoeffizienten von verdünnten Alkoholen durch die Nagelplatte im Vergleich zu unverdünnten um das Fünffache erhöht waren. Ersetzte man das Wasser durch unpolare Lösungsmittel, welche nicht zu einer Quellung der Nagelplatte führten, dann nahm die Permeation ab [33]. Zwar wären lipophile Vehikel für eine topische Applikation wesentlich praktischer als wässrige, da diese besser auf dem Nagel haften und nicht so leicht abwaschbar sind. Für die Wirkstoffpenetration sind sie allerdings von Nachteil.

d) pH-Wert des Vehikels und Ladung der gelösten Substanz

Der pH-Wert einer wässrigen Formulierung beeinflusst die Ionisation schwach saurer oder basischer Arzneistoffe. Dies wiederum beeinflusst die Löslichkeit des Arzneistoffes in der Formulierung sowie in der Nagelplatte und führt zu Interaktionen mit der Keratin-Matrix [30, 37]. Da Keratin einen isoelektrischen Punkt (IEP) von ungefähr 5 besitzt [38], liegt es bei einem pH-Wert < 5 positiv, bei einem pH-Wert > 5 negativ geladen vor. Bei einem physiologischen pH-Wert der Formulierung würde es, aufgrund der negativen Abstoßung zwischen einem sauren Arzneistoffmolekül und der Keratinmatrix, zu einer geringeren Affinität und folglich zur verminderten Diffusion kommen. Vergleichend dazu würden basische Arzneistoffe zwischen einem pH-Wert von 5 und 7 aufgrund ihrer positiven Ladung eine höhere Affinität zum Nagelkeratin und demzufolge eine bessere ungleiche Permeation aufweisen [18, 30].

e) Verbesserung der ungleichen Penetration – Aktueller Stand der Wissenschaft

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden nur wenige Versuche unternommen, um die ungleiche Penetration bzw. die transunguale Permeation zu verbessern [39]. Beispielsweise wurden ein Spray mit Terbinafin-haltigen Transfersomen [40], ein Mikroemulsionsgel, ebenfalls Terbinafin-haltig [41], ein bioadhäsives Pflaster mit 5-Aminolävulinsäure zur Phototherapie der Onychomykose [42] und ein wasserlöslicher Nagellack auf Basis von Hydroxypropylchitosan (Ciclopoli[®]) entwickelt. Die Applikation des Nagellackes verkürzte signifikant die Verzögerungszeit (lag-Zeit, engl. *lag time*) von Ciclopirox und Amorolfin im Vergleich zu den Standardpräparaten Penlac[®] und Loceryl[®] [43]. Auch Transfersomen zeigten eine verbesserte antimykotische Aktivität (MIC) gegenüber Formulierungen ohne Transfersomen [40]. Ebenso konnte das Mikroemulsionsgel die Penetration von Terbinafin gegenüber dem Standardvehikel verbessern. Diese Studie wurde allerdings an Humanhaut durchgeführt, was für die Behandlung eines Nagelpilzes wohl eher fraglich ist. HUI et al. untersuchten die *in vitro* Penetration von vier Verbindungen neuer Antimykotika, den Oxaborolen. Eine Verbindung (AN2690, $M = 152 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) konnte eine verbesserte Penetration aus einem Propylenglykol-Ethanol-Gemisch im Vergleich zur kommerziellen Ciclopiroxformulierung (Penlac[®]) aufweisen [44].

Eingesetzte Enhancer wie Acetylcystein, Mercaptoethanol oder Tiopronin unterstützten zwar die ungleiche Arzneistoffpenetration, jedoch ging diese immer mit einer irreversiblen Schädigung der Nagelbarriere durch Reduzierung der Disulfidbrücken einher [37, 45, 46].

Formulierungen, die ein Keratolytikum wie Harnstoff oder Hautpenetrationenhancer wie z.B. Propylenglykol, Ethanol oder EDTA enthielten, ergaben keinen positiven Effekt auf den ungleichmäßigen Arzneistofftransport [47]. Auch physikalische Methoden wie Iontophorese hatten keinen Einfluss auf die Permeationsrate sondern führten nur zu einer erhöhten Hydratation des Nagels [46]. Derzeit wird auch der Einsatz von Laserlicht zur Nagelpilztherapie diskutiert. Es gibt jedoch noch keine brauchbaren Studienergebnisse bezüglich der Heilungsquote bzw. der Erfolgsrate. Ebenso scheint die alleinige Lasertherapie nur in Kombination mit einer topischen Therapie sinnvoll zu sein [48]. Daher besteht weiterhin die Notwendigkeit die ungleiche Penetration durch neuartige Drug Delivery Systeme oder Enhancer zu verbessern.

2.2 Die Haut als Applikationsort für Arzneimittel

2.2.1 Aufbau und Eigenschaften der Hautbarriere

Die Haut ist eine äußerst effiziente Barriere, erschaffen „to keep our insides in and the outsides out“ [49] und stellt gleichermaßen einen Kontakt zwischen Umwelt und Organismus her. Sie schützt den Organismus gegen mechanische und chemische Einflüsse, vor Strahlung und reguliert den Wasser- sowie den Wärmehaushalt [50].

Die Haut ist aus den drei Schichten Epidermis, Dermis, Subkutis und den Hautanhangsgebilden (Adnexen) wie Haare, Nägel, Schweiß- und Talgdrüsen aufgebaut (Abb. 3). Die äußerste Hautschicht, die Epidermis, lässt sich von außen nach innen in folgende Schichten unterteilen: Stratum corneum (Hornschicht), Stratum granulosum (Körnerschicht), Stratum spinosum (Stachelzellschicht) und Stratum basale (Basalzellschicht). Im Stratum basale werden die Keratinozyten der Epidermis gebildet. Unter Volumenzunahme, Abflachung und Keratinisierung wandern diese als kernlose Hornzellen, den sog. Korneozyten, ins Stratum corneum. Dort liegen die Korneozyten ziegelsteinähnlich geschichtet in einer interzellulären Lipidmatrix vor, welche hauptsächlich für die Barriereeigenschaft des Stratum corneums verantwortlich ist (Ziegelstein-Mörtel-Modell) [51, 52]. Die Lipidmatrix setzt sich hauptsächlich aus Ceramiden (ca. 40 %), freien Fettsäuren (ca. 25 %), Cholesterol (ca. 25 %), Anteilen von Cholesterolsulfat (ca. 6 %) und Triglyceriden zusammen und ist in multiplen Bilayern angeordnet [51]. Neben den Keratinozyten befinden sich auch Melanozyten, Merkel-Zellen und Langerhans-Zellen in der Epidermis.

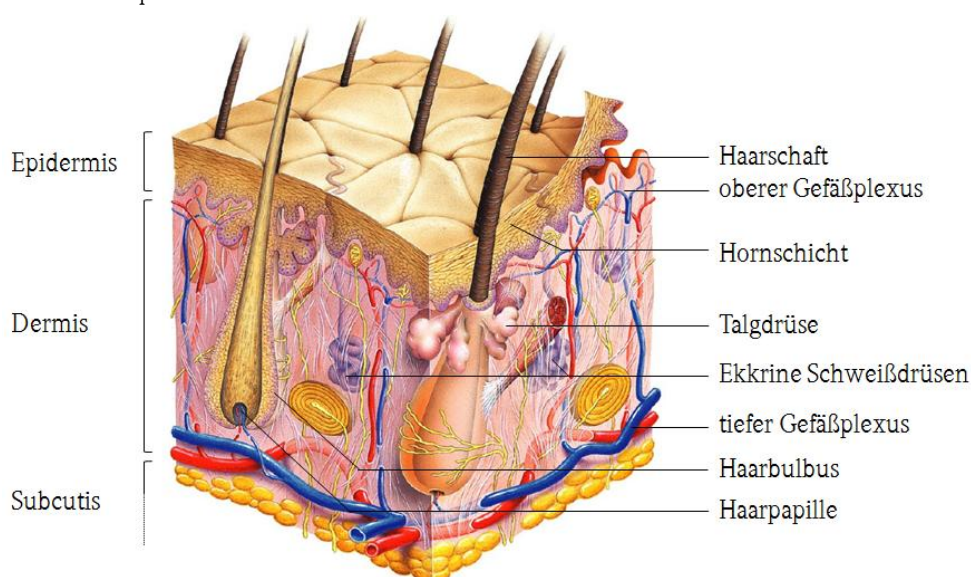


Abb. 3: Mikroskopische Ansicht der Haut und des darunter liegenden Gewebes (Abdruck mit freundlicher Genehmigung von Pearson Education, Inc., 2015) [53]

Durch Reifung der Langerhans-Zellen bei Antigenkontakt und durch Wanderung in die peripheren Lymphknoten aktivieren diese Zellen native T-Helfer-Zellen und leiten folglich die Immunantwort ein [50]. Unterhalb der Epidermis schließt sich die Dermis, getrennt durch die Basalmembranzzone, an. Sie besteht aus Kollagenfasern sowie elastischen Fasern, in denen zahlreiche Blut- und Lymphgefäße eingeflochten sind. Die Hauptaufgaben der Dermis sind einerseits die Versorgung der gefäßarmen Epidermis mit Nährstoffen, die Abwehrfunktion sowie der Informationsfluss und andererseits ist sie ebenso verantwortlich für die äußere Erscheinung der Haut hinsichtlich Elastizität und Straffheit.

Die unterste Schicht, die Subkutis, besteht im Wesentlichen aus Fettzellen, dient als Nährstoff- und Wasserspeicher und dem mechanischen sowie wärmenden Schutz [50].

2.2.2 Die Hauterkrankung Psoriasis vulgaris

Die Psoriasis (*Schuppenflechte*) kann nach ihrem klinischen Bild in zwei Formen eingeteilt werden: in die pustulöse und in die Plaque-Typ Psoriasis (Psoriasis vulgaris) [54]. Dabei zählt der letztgenannte Typ zu der am häufigsten auftretenden Form (80 %) und hat in den westlichen Industrienationen eine Prävalenz von 1,5 - 2 % [55, 56]. Somit leben in Deutschland knapp 2 Millionen Betroffene. Je nach Erstmanifestation der Krankheit im Alter kann sie in den Frühtyp und in den Spättyp unterschieden werden (Tab. 1), wobei der häufiger auftretende Frühtyp meist mit einem schwereren, chronischen Verlauf einhergeht [57]. Aufgrund der übermäßigen Proliferation der Keratinozyten kommt es bei der Psoriasis vulgaris zur Entstehung breiter, rot-schuppiger (erythrosquamöser) Plaques, welche eine scharfe Begrenzung sowie eine Infiltration aufweisen.

Tab. 1: Epidemiologie der Psoriasis vulgaris [54]

	Typ-1-Psoriasis (Frühtyp)	Typ-2-Psoriasis (Spättyp)
Prävalenz in Deutschland	ca. 2 % (ca. zwei Millionen Patienten)	
Verteilung	60 %	40 %
Erstmanifestation	< 40. Lebensjahr	> 40. Lebensjahr
Familienanamnese	meist positiv	meist negativ
Verlauf	eher schwer	eher leicht

Meist sind die Streckseiten der Ellenbogen oder Knie, die Sakralregion oder der behaarte Kopf betroffen. Bei Kindern können zusätzlich auch das Gesicht und die Genito-Analregion involviert sein [58]. Im Gegensatz zu dem früheren Glauben, dass die Schuppenflechte nicht pruritisch sei, tritt bei zwei Drittel der Patienten dennoch zusätzlich Juckreiz auf [59].

Um den Schweregrad der Erkrankung festzustellen, können der PASI (*Psoriasis Area and Severity Index*) sowie der BSA (*Body surface area*; Prozentsatz der befallenen Körperoberfläche) bestimmt werden. Der PASI berücksichtigt die Ausprägung der Symptome (Rötung/Erythem, Schuppung und Infiltration) sowie das Ausmaß des Befalls an den vier Körperregionen Kopf, Rumpf, Arme und Beine. Ein PASI bzw. BSA von ≤ 10 wird der leichten Form der Psoriasis zugeordnet; ein PASI bzw. BSA von > 10 der mittelschweren bis schweren Form. Zusätzlich kann man mit dem dynamischen PASI 50, 75 oder 90 den Prozentsatz an Patienten angeben, die eine mindestens 50, 75 bzw. 90 %-ige Verbesserung des PASI innerhalb eines bestimmten Zeitraumes erreicht haben [54].

Betrachtet man die Ähnlichkeiten im Entzündungsprozess, so zählt auch die Psoriasis, neben dem Morbus Crohn oder der rheumatoiden Arthritis, zu den „*immune-mediate inflammatory diseases*“ (IMIDs; immunvermittelten entzündlichen Erkrankungen) [58, 60]. Dabei spielt das proinflammatorische Zytokin Tumornekrosefaktor (TNF) eine zentrale Rolle [61]. Es triggert die Keratinozytenproliferation, stimuliert die Expression weiterer Entzündungsmediatoren und erleichtert die Einwanderung von Immunzellen durch das Gefäßendo-

thel [62]. Für exakte Erklärungen des Entzündungsprozesses wird auf weitere Arbeiten verwiesen [61, 63, 64]. Die Teilung der Keratinozyten erfolgt achtmal schneller als bei gesunder Haut. Das führt dazu, dass die Keratinozyten unausgereift sind und der Aufbau der Epidermis gestört wird. Auslöser für dieses Zusammenspiel von Zytokinen und Immunzellen sind genetische Disposition, Traumata, Infektionen, Stress oder Medikamente [58, 62].

Die Therapie der Psoriasis vulgaris orientiert sich an dem Schweregrad der Erkrankung. Dabei stehen topische (für die leichte Form) sowie systemische (für die schwere Form) Optionen und/oder die Phototherapie zur Verfügung, welche ausführlich in der Leitlinie zur Therapie der Psoriasis vulgaris erläutert werden [54]. Aufgrund von unerwünschten Arzneimittelwirkungen, schlechter Verträglichkeit, Angst und mangelnder Aufklärung des Patienten bestehen jedoch Complianceprobleme seitens der Patienten bei der Einnahme systemischer Therapeutika [65]. Daher scheint es sinnvoll, ein systemisch wirksames Therapeutikum auch der topischen Anwendung zur Behandlung der Psoriasis vulgaris zugänglich zu machen, um die Lebensqualität des Patienten und dessen Compliance zu verbessern.

2.2.3 Die dermale Penetration von Wirkstoffen

Wenn ein Arzneistoff auf die Haut appliziert wird, soll er entweder lokal oder systemisch wirken. Dabei kann der Arzneistoff über zwei Transportwege in die Haut gelangen: durch das Stratum corneum selbst (interzellulär, transzellulär oder corneodesmosomal; Abb. 4) oder über Hautanhangsgebilde (transglandulär bzw. transfollikulär) [50]. Da die Adnexen der Haut nur 0,1 % der Hautoberfläche beanspruchen, spielen die transglanduläre und die transfollikuläre Route eher eine untergeordnete Rolle [66]. Dennoch scheint der Arzneistofftransport über die transfollikuläre Route für langsam diffundierende sowie höher molekulare Verbindungen, wie Nanopartikel, bedeutender zu sein als bislang angenommen [67].

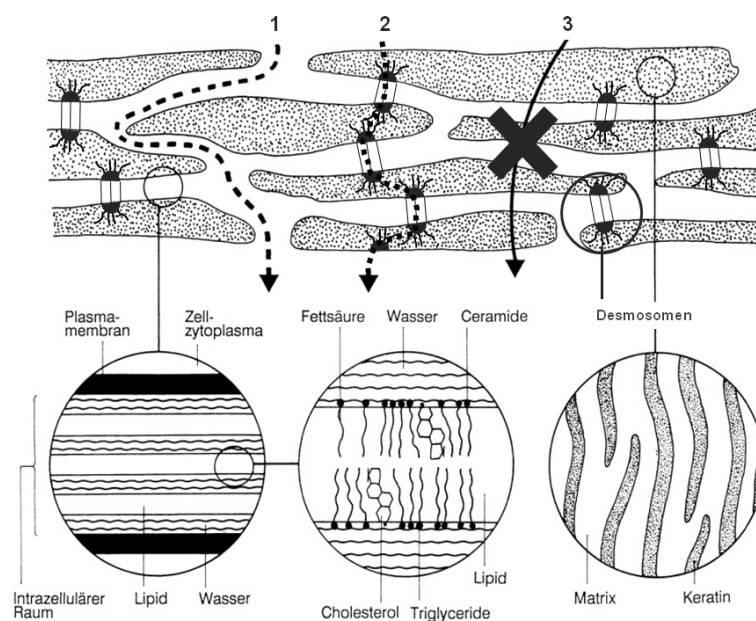


Abb. 4: Penetrationswege durch das Stratum corneum: 1 - interzelluläre, 2 - corneodesmosomale, 3 - transzelluläre Route. Modifiziert nach [68, 69]

Zwischen der interzellulären und der transzellulären Route konnte lange Zeit nur schwer unterschieden werden. Allein durch den häufigen Wechsel von lipophilen und hydrophilen Domänen (Korneozyten und Lipidmatrix) ist die letztgenannte Route eher unwahrscheinlich. *In vivo* Studien mit Nikotinsäureestern ermittelten einen Diffusionsweg von 350 μm [70]. Dieser Weg ist somit 20-mal länger als das Stratum corneum selbst und lässt schlussfolgern, dass dem interzellulären (lipophilen/unpolaren) Weg die größte Bedeu-

tung zukommt [71]. Spätere Experimente zeigten die diffundierenden Moleküle im Interzellularraum [72, 73] und es wurde bestätigt, dass sogar kleine polare Moleküle diesen kurvenreichen Weg entlang diffundieren können [74].

Dabei wandern lipophile Stoffe entlang der lipophilen Kohlenwasserstoffketten der interzellulären Lipide und die kleinen polaren Moleküle entlang der hydrophilen Kopfgruppen. Mit Hilfe der Neutronendiffraktion sowie geeigneten Präparationstechniken wurde nachgewiesen, dass die Wasserschicht zwischen den hydrophilen Kopfgruppen weniger als eine Monolayer dick ist (0,16 nm) und somit nur sehr kleine Arzneistoffmoleküle diese Route nutzen können [75]. Daher wäre es, aufgrund der hohen Anzahl an Desmosomen, denkbar, dass die hydrophile Route für größere Moleküle entlang dieser corneodesmosomalen Strukturen verläuft [69].

Physikochemisch betrachtet, unterliegt der Transportprozess von Molekülen durch die Hornschicht einer einfachen passiven Diffusion und kann mit dem 1. Fickschen Diffusionsgesetz beschrieben werden. Die treibende Kraft bei der Diffusion ist der Konzentrationsgradient. Daher kann die Penetrationsrate mit steigender Konzentration oder durch Abnahme der Löslichkeit des Arzneistoffes im Vehikel sowie durch Verbesserung der Löslichkeit des Arzneistoffes im Stratum corneum erhöht werden [71]. Letzteres könnte zum Beispiel durch Schaffung von Okklusionsbedingungen oder durch Cotransport von Formulierungsbestandteilen (*solvent drag*-Mechanismus) begünstigt werden [50].

Eine Steigerung der Arzneistoffkonzentration im Vehikel, führt folglich zu einem Anstieg der thermodynamischen Aktivität (Verhältnis der Konzentration des Wirkstoffes (c_{Vehikel}) zu dessen Sättigungslöslichkeit (c_s) im Vehikel (c_{Vehikel}/c_s)) und fördert dessen Liberation aus der Formulierung [76]. Entspricht die Arzneistoffkonzentration im Vehikel der Sättigungslöslichkeit, erreicht dito die thermodynamische Aktivität ihr Maximum; d.h., dass eine 5 %-ige und eine 10 %-ige Suspension des gleichen Wirkstoffes im selben Vehikel den gleichen Flux ergeben [71, 77]. Jedoch sind neben der thermodynamischen Aktivität auch andere Parameter entscheidend für die Wirkstoffaufnahme in die Haut: der Arzneistoff, das Vehikel und die Haut selbst.

a) Arzneistoff

Hinsichtlich der Tatsache, dass das Stratum corneum insgesamt einen stark lipophilen Charakter aufweist, sollten dermal applizierte Arzneistoffe eine ausreichende Lipophilie besitzen. Primär steigt die Penetrationsrate bei Zunahme des Verteilungskoeffizienten ($Vk_{\text{SC/Vehikel}}$ oder $Vk_{\text{Octanol/Wasser}}$) an [76, 78]. Dennoch würde eine zu ausgeprägte Lipophilie zu einer Depotbildung im Stratum corneum führen und einer Penetration in die weniger lipophilen Epidermisschichten entgegenstehen. Daher wird postuliert, dass eine Substanz gut penetriert, wenn ihr Verteilungskoeffizient einen Wert nahe 1 aufweist [79]. Ebenso wird angenommen, dass eine Molekülgröße von kleiner 500 Da sich positiv auf die Transportrate auswirkt [80, 81]. Bei geladenen Molekülen wäre es zusätzlich sinnvoll, den pH-Wert der Formulierung nahe des isoelektrischen Punktes (IEP) einzustellen, da an diesem das Molekül seine größtmögliche Lipophilie besitzt (siehe auch Kapitel 4.2.3.3). Die physikochemischen Grenzen für einen passiven transdermalen Transport sind in Tab. 2 kurz zusammengefasst:

Tab. 2: Limitierende Grenzen für den dermalen Transport nach [82]

Eigenschaft	Grenzwert
Wasserlöslichkeit	> 1 mg · ml ⁻¹
Verteilungskoeffizient (log <i>P</i>)	~ 1 oder größer
Molekulargewicht	< 500 Da
Schmelzpunkt	< 200 °C
Dosis	< 10 mg / d
pH-Wert der gesättigten, wässrigen Lösung	5 - 9

b) Vehikel

Die Wahl des Vehikels wirkt sich ebenfalls auf die Hydratation und Permeabilität der Haut aus. Okklusive Verbände und Lipidgrundlagen, wie Silikone oder Öle, verhindern einen Wasserverlust, führen zu einer starken Hauthydratation und somit zu einem starken Anstieg der Permeabilität, was vor allem für hydrophile Stoffe vorteilhaft wäre. Jedoch sind solche Formulierungen aus kosmetischer Sicht wenig elegant. Emulsionen oder Cremes vom W/O-Typ reduzieren den Wasserverlust und führen ebenfalls zu einer gesteigerten Hautpermeabilität. W/O-Präparate sind häufig als Nacht-, Fett- oder Cold Cremes im Handel. Bei O/W-Systemen ist der Hydratationseffekt nur noch gering ausgeprägt [79]. Jedoch kann sich bei diesen Systemen die Eigenpenetration von dem in den Formulierungen enthaltenen Wasser positiv auf den Verlauf der Penetration von wasserlöslichen Stoffen auswirken (*solvent drag*) [50]. Der Zusatz von penetrationsfördernden Substanzen sowie der Einsatz übersättigter Lösungen kann die Transportrate von Arzneistoffen ebenfalls verbessern [83].

c) Haut

Der Aufbau und die Zusammensetzung der Haut an unterschiedlichen Körperstellen nehmen ebenfalls starken Einfluss auf das Penetrationsverhalten von Wirkstoffen. So kann zum Beispiel die Hornschichtdicke stark variieren (Fußsohle ca. 500 μm vs. Unterarm ca. 10 μm), was zu einem Anstieg der lag-Zeit (Erreichen eines Fließgleichgewichtes) führt. Auch ist der Lipidgehalt von Region zu Region verschieden und beeinflusst die Penetrationsbarriere. Dass ferner sich die Durchlässigkeit mit dem Alter ändert, ist allgemein bekannt. Der Gesamtwassergehalt im Stratum corneum beträgt unter Normalbedingung (*in vivo*) 5 bis 15 %. Unter dem Einfluss von Okklusion kann dieser auf 50 % gesteigert werden, was vor allem für die Penetration von hydrophilen Arzneistoffen nützlich wäre [50, 79].

2.2.4 Verbesserungstrategien der dermalen Penetration

Gegenwärtig gibt es zahlreiche Wege, die dermale Penetration von Wirkstoffen zu verbessern. Abb. 5 soll einen Überblick über die verschiedenen und gängigsten Methoden geben. Die in der Arbeit fokussierten Möglichkeiten sind in der Übersicht rot markiert.



Abb. 5: Strategien zur Verbesserung der dermalen Hautpenetration (modifiziert nach [84, 85] und ergänzt durch [86, 87])

Darüber hinaus sind auch Kombinationen der einzelnen Methoden möglich. Zum Beispiel wurde der Einsatz von Mikronadeln kombiniert mit der Magnetophorese für die Penetration von Peptiden in einem aktuellen Artikel diskutiert [88]. In einer weiteren kürzlich veröffentlichten Studie wurde der Einfluss der Partikelform auf die Penetration von Vitamin A und B₃ untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass längliche (engl. *elongate*) Mikropartikel im Gegensatz zu runden Partikeln zu einer gesteigerten Penetrationsrate führten [86].

Für viele der genannten Methoden wurden vielversprechende Produkte entwickelt. Rapydan[®], ein Pflaster zur lokalen Analgesie mit einer eutektischen Mischung aus Lidocain und Tetracain, welche sich auf 26 bis 34 °C erwärmt und zu einem schnellen Wirkeintritt (20-30 min) in der Haut führt, ist in Europa seit 2008 zugelassen [89]. Bekannte Systeme, die auf dem Prinzip der Iontophorese basieren, sind zum Beispiel Zecuity[™] (enthält Sumatriptan), Lidosite[™] (Lidocain-Hydrochlorid/Epinephrin) oder Ionsys[™] (Fentanyl, Zulassung entzogen). Ebenso rücken die Prinzipien beruhend auf photomechanischen Wellen oder Ultraschall immer weiter in den Fokus der Forschung [90, 91].

2.2.4.1 Dermale Anwendung von Mikroemulsionen

Heutzutage ist allgemein bekannt, dass Mikroemulsionen zu den modernen, kolloidalen Wirkstoffträgersystemen gehören. Seit ihrer ersten Erwähnung im Jahr 1943 von HOAR & SCHULMANN [92] wurden sie bis zum jetzigen Zeitpunkt zum Gegenstand zahlreicher Studien [93]. Mikroemulsionen werden als Systeme bestehend aus Wasser, Öl und Emulgator, welche transparent, optisch isotrop und thermodynamisch stabil sind, definiert [94, 95]. Der Begriff Mikroemulsion (ME) ist im Angesicht ihrer physikochemischen Eigenschaften zweifach irreführend: Erstens, es handelt sich nicht um eine Emulsion (milchiges Erscheinungsbild), sondern um eine kolloidale Lösung (opaleszentes/transparentes Erscheinungsbild) und zweitens, die Größe der kolloidalen Phase liegt im Nanometer- und nicht im Mikrometerbereich [96]. Mikroemulsionen sind aufgrund ihrer speziellen Eigenschaften als galenisches Vehikel äußerst attraktiv. Sie sind prinzipiell einfach herzustellen, da sie sich spontan bilden können, sie bieten eine hohe Stabilität, besitzen ein exzellentes Solubilisierungsvermögen für hydrophile sowie für lipophile Stoffe und fördern die Penetration in die Haut. Ebenso sind sie gut applizierbar, da sie eine niedrige Viskosität besitzen. Dass ihr Einsatz zu einer Verbesserung der dermalen Penetration von Arzneistoffen führt, konnte in zahlreichen Arbeiten belegt werden und ist in dem Übersichtsartikel von HEUSCHKEL et al. [93] umfassend dargestellt.

Jedoch konnte sich trotz der vielen Vorteile bis heute kein Marktprodukt zur dermalen Anwendung etablieren. Einerseits spielt der meist hohe Tensidgehalt hier eine entscheidende Rolle, da in höheren Konzentrationen irritative Hautreaktionen zu erwarten sind. Daher ist es ein hoher Anspruch an den Forscher, Mikroemulsionen mit einem geringen Gehalt an hautverträglichen Tensiden zu entwickeln. Andererseits ist eine ME zwar einfach herzustellen, wenn man erst einmal das richtige Verhältnis zwischen Öl, Wasser, Tensid und Cotensid gefunden hat. Allerdings kann es, bei einem Chargenwechsel von einem der Bestandteile, zu einer Verschiebung des Mikroemulsionsgebietes im Phasendiagramm und somit zum Verlust der Mikroemulsionseigenschaften kommen.

Abseits der dermalen Anwendung konnten sich in anderen Bereichen der Pharmazie einige Mikroemulsionspräparate beweisen. So konnte zum Beispiel durch Einsatz einer ME die orale Resorption des Peptides Ciclosporin verbessert sowie interindividuelle und intraindividuelle Schwankungen stark minimiert werden (Handelsname: Sandimmun[®] Optoral) [97]. Des Weiteren existieren Augentropfen in Form einer ME zur Anwendung bei trockenem Auge oder zur Reepithelisierung der Hornhaut nach Augenoperationen bzw. -verletzungen, welche die physiologische Lipidbarriere wiederherstellen (Handelsname: LIPIMIX[™]). Die lipophile Phase besteht aus den physiologischen Bestandteilen des Tränenfilms [98].

2.2.4.2 *Einsatz von chemischen Penetrationenhancern*

Obwohl es heutzutage eine Vielzahl an chemischen Substanzen gibt, welche die dermale Penetration nachweislich verbessern, besitzen die meisten von ihnen nicht die idealen Voraussetzungen für eine Anwendung an der menschlichen Haut. Wünschenswerte Eigenschaften sind vor allem, dass Enhancer kein irritatives oder allergisches Potential besitzen und die Hautbarriere nur reversibel beeinflussen [49]. Die Wirkungsweise von Penetrationenhancern auf molekularer Ebene ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Je nach Enhancer gibt es unterschiedliche Mechanismen. Es wird angenommen, dass es zu einer Fluidisierung der Stratum corneum Lipide kommt, deren lamellare Ordnung gestört wird und dass eine Phasenseparation herbeigeführt werden kann [99, 100]. Ebenso können sie die Arzneistofflöslichkeit im Stratum corneum verbessern, die Proteinbestandteile modifizieren oder die Wasserstruktur zerstören [101].

In der Arbeit von KARANDE et al. [102] konnten mit Hilfe von Gemischen nicht irritativer Enhancer sogar Makromoleküle (< 10 kDa) transdermal appliziert werden. Jedoch weisen auch diese Wissenschaftler darauf hin, dass größere, hydrophile Moleküle für eine dermale Gabe wenig geeignet sind. Für weiterführende Informationen kann auf die zahlreichen Übersichtsarbeiten, wie von LANE [103], WILLIAMS [49] oder BARRY [68], verwiesen werden. Sie haben die Penetrationenhancer nach verschiedenen Gruppen eingeteilt, deren Wirkmechanismen beschrieben, deren mögliche Anwendung auf der Haut beurteilt und den penetrationssteigernden Effekt quantifiziert [76].

2.2.4.3 *Bedeutung der Ionenpaarbildung*

Im Jahre 1926 wurde von BJERRUM erstmalig die Bildung von Ionenassoziaten beschrieben [104]. Seit diesem Zeitpunkt wird das Konzept der Ionenpaarbildung in vielen Bereichen der Chemie und Pharmazie genutzt. Es können durch den Einsatz von geeigneten Gegenionen Arzneistoffe extrahiert und analysiert werden [105]. Auch wird die Ionenpaarchromatographie seit langer Zeit in der Analytik angewandt [50, 106]. Neben den analytischen Methoden stellt die Ionenpaarbildung ebenso eine Möglichkeit dar, geladene Arzneistoffe mit vorwiegend hydrophilem Charakter einer dermalen Anwendung besser zugänglich zu machen.

Da die interzelluläre Route, entlang der lipophilen Regionen des Stratum corneums, die Hauptroute für die perkutane Absorption von Arzneistoffen darstellt, ist es offensichtlich, dass Wirkstoffe mit lipophilen Eigenschaften eher durch diese Barriere diffundieren als mit hydrophilen. Somit ist es auch nachvollziehbar, dass Moleküle in ihrer nicht-ionisierten Form bessere Transportparameter durch biologische Membranen aufweisen als deren ionisierte Form. Der Zusatz eines lipophilen Gegenions zu einem hydrophilen, geladenen Molekül scheint sinnvoll, da der resultierende „Ionen-Komplex“ elektrisch neutral ist und messbare lipophile Eigenschaften besitzt (Bestimmung des $V_{k_{\text{Octanol/Wasser}}}$) [107]. Die entstandenen Ionenpaare werden durch Coulombsche Kräfte zusammengehalten und stehen mit ihren freien Ionen im Gleichgewicht [108]. Voraussetzung für die Bildung eines Ionenpaares sind strukturelle Eigenschaften wie Molekülgröße und -form, Flexibilität des Moleküls sowie Solvatationseigenschaften [109]. Damit das entstandene Ionenpaar auch erfolgreich durch die Membran diffundieren kann, spielen die physikochemischen Eigenschaften beider Moleküle eine entscheidende Rolle. Somit sollte ein Gegenion folgende Eigenschaften besitzen:

1. *hohe Lipophilie bei ausreichender Löslichkeit,*
2. *physiologische Verträglichkeit,*
3. *allgemeine und metabolische Stabilität.*
4. *gute analytische Bestimmbarkeit [110, 111].*

Der letzte Punkt ist entscheidend, um Informationen über den Transportmechanismus zu erhalten. In Abb. 6 ist der mögliche Ionenpaartransport durch lipophile Membranen dargestellt. Das Ionenpaar diffundiert in jedem Fall durch die Membran entlang eines Konzentrationsgefälles. Im wässrigen Akzeptor angelangt, kann das Ionenpaar wieder in seine geladene Form dissoziieren.

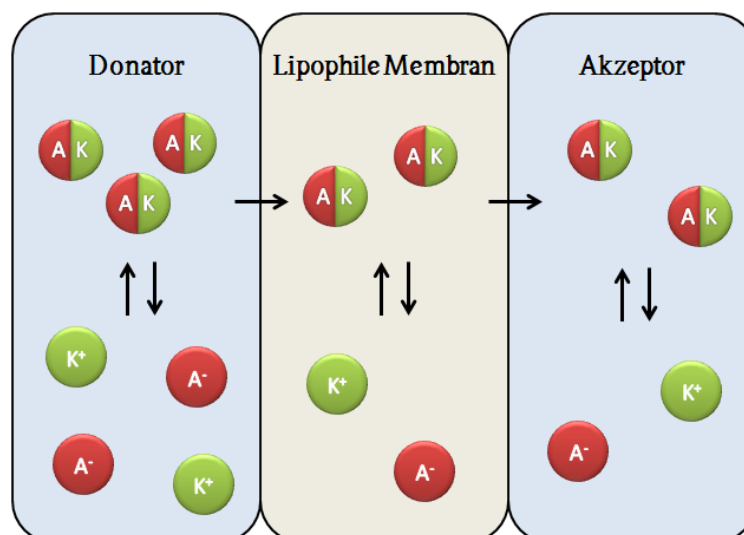


Abb. 6: Möglicher Ionenpaartransport durch Membranen bei gleichzeitiger Gabe von Wirkstoff (A⁻) und Gegenion (K⁺) modifiziert nach [111]

In den Übersichtsarbeiten von JONKMAN & HUNT sowie von NEUBERT ist eine Vielzahl von Forschungsergebnissen zusammengefasst, welche kontrovers diskutiert werden [111, 112]. Jedoch zeigen die Ergebnisse aktueller Studien, dass die Anwendung des Ionenpaarkonzeptes durchaus eine erfolgsversprechende Methode sein kann. Es konnte zum Beispiel die Konzentration von Adefovir (Virustatikum zur Behandlung der chronischen Hepatitis B) in der lebenden Epidermis und in der Dermis durch den Einfluss eines möglichen Gegenions um das 30fache bis 60fache gesteigert werden [113]. In einer Studie von VALENTA et al. verbesserte sich der Flux von Lidocain ebenfalls durch Zugabe eines Gegenions [114]. Und die Arbeitsgruppe um MA et al. berichtete, dass der Flux von Flurbiprofen durch Ionenpaarbildung deutlich gesteigert werden konnte als durch Zusatz einiger Penetrationenhancer [115]. Interessanterweise gab es 2007 eine Studie, in der die Löslichkeit des Ionenpaars durch Inkorporation in eine ME stark angehoben werden konnte. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass sich die Kombination aus ME und Ionenpaar sehr nützlich auf die Hautpermeation von Diclofenac auswirkte [116]. Somit bleibt zusammenfassend festzustellen, dass durch das Konzept der Ionenpaarbildung die dermale Penetration von hydrophilen Arzneistoffen verbessert werden könnte.

3 MODERNE VEHIKEL FÜR DIE UNGUALE APPLIKATION DES NEUEN ANTIMYKOTIKUMS EV-086K

3.1 Motivation und Zielstellung

Der Nagelpilz ist eine chronische Erkrankung, welche ohne Behandlung nicht von allein ausheilt. Jedoch ist die Therapie sehr langwierig und ebenso aufwendig. Oft kommt es zum Wiederbefall des noch nicht ausgeheilten Nagels oder zum Befall weiterer Nägel. Neben dem unangenehmen Gefühl, durch die Verdickung der Nagelplatte, leiden die Patienten teilweise stark unter dem ästhetischen Aspekt. Die Therapieoptionen sind begrenzt und durch die Non-Compliance des Patienten nicht immer erfolgversprechend.

Die Firma Evolva Holding SA, welche sich unter anderem auch auf Pflanzenschutzmittel spezialisiert, entdeckte eine Substanz (EV-086K) mit sehr guten antimykotischen Eigenschaften. Daraufhin initiierte die Firma die Idee, diesen Wirkstoff ebenfalls unguale gegen Nagelpilz anzuwenden. Das folgende Kapitel befasst sich mit den physikochemischen Eigenschaften des neuen Antimykotikums sowie der Entwicklung geeigneter Formulierungen für eine topische Applikation auf der Nagelplatte. Zusätzlich soll dieses Kapitel beleuchten, inwieweit eine Formulierung Einfluss auf das unguale Penetrationsverhalten nehmen kann.

3.2 EV-086K – ein neuer antimykotischer Wirkstoff

3.2.1 Pharmakologie

Bei EV-086K (Pomecin™ A) handelt es sich um das Kaliumsalz einer pflanzlichen Diin-Furan-Fettsäure-Verbindung, synthetisiert von der Firma Evolva Holding SA (IUPAC-Name = Kaliumsalz der (9Z)-14-(2-Furyl)Tetradec-9-en-11,13-Diinsäure; Abb. 7). Diine sind organische Verbindungen mit zwei Dreifachbindungen. Diese Diin-Verbindungen sollen das *OLE1*-Protein in Pilzen und Hefen inhibieren bzw. dessen Transkriptionscoaktivatoren MGA2 und SPT2 hemmen [117, 118].

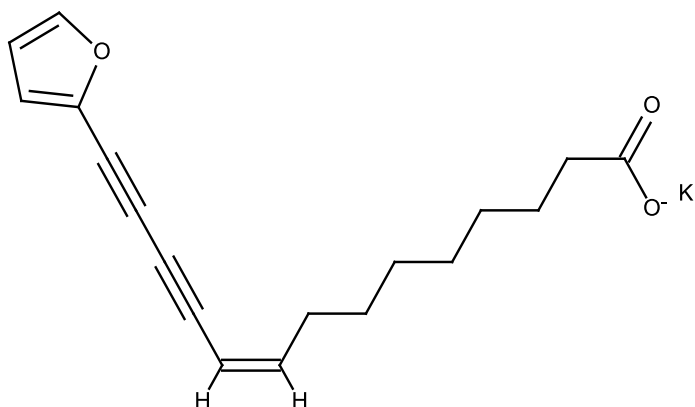


Abb. 7: Chemische Struktur von EV-086K

Das *OLE1*-Protein ist ein wichtiges Enzym für die Synthese von ungesättigten Fettsäuren in diesen Organismen. Als sogenannte Desaturase überträgt es Elektronen von einem Substrat auf ein anderes und kann somit Doppelbindungen erzeugen [119]. Das *OLE1*-Protein katalysiert die Entstehung einer Doppelbindung zwischen C9 und C10 von Palmitoyl-CoA (16:0) und Stearyl-CoA (18:0) und ermöglicht so die Synthese von

Palmitoleinsäure (16:1) und Ölsäure (18:1) (Abb. 8) [120]. Durch die Hemmung des *OLE1*-Proteins steht den Organismen keine Ölsäure mehr zur Verfügung. Dies führt in der Zellmembran zu einem Ungleichgewicht zwischen gesättigten und ungesättigten Fettsäuren. Somit kann die Fluidität der Membran nicht mehr aufrechterhalten werden und deren Funktionalität geht verloren [121]. In *in vitro* Versuchen zeigte EV-086K eine potente Aktivität gegen ein breites Spektrum an Erregern, wie *Candida*, *Aspergillus* oder *Trichophyton rubrum* (MIC = 4 ng·ml⁻¹) [117]. Es stellt ein Antimykotikum mit einem neuartigen Wirkmechanismus dar und könnte in Zukunft zur Behandlung von Pilzkrankungen wie z.B. der Onychomykose eingesetzt werden.

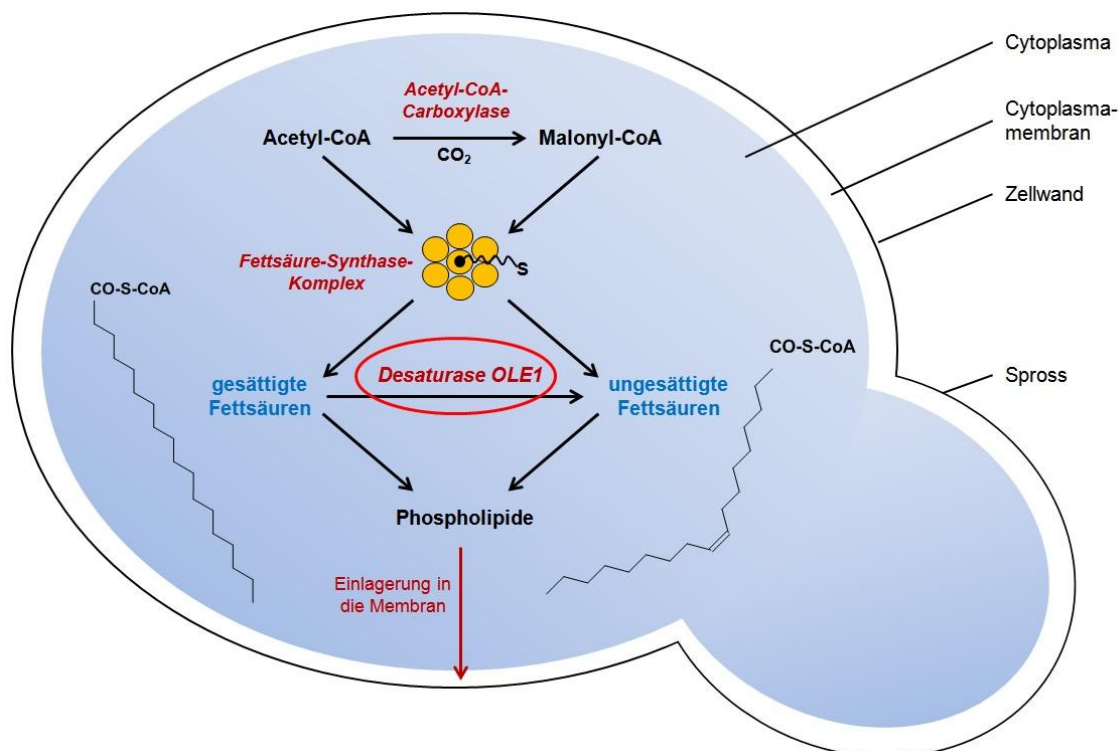


Abb. 8: Synthese von Fettsäuren in einer Pilzzelle erstellt in Anlehnung an [122]

3.2.2 Physikochemische Eigenschaften

Da es sich bei EV-086K ($M = 322,44 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) um ein neu synthetisiertes Molekül handelt, sind gegenwärtig keine physikochemischen Eigenschaften bekannt. Für die Entwicklung geeigneter Analyseverfahren, Extraktionsmethoden und Formulierungen ist jedoch die Bestimmung dieser Eigenschaften notwendig. Mit Hilfe der Software MarvinSketch [123] konnten erste Parameter berechnet werden: Der pK_b -Wert der deprotonierten Carboxylgruppe beträgt 9,01. Demzufolge liegt oberhalb eines pH-Wertes von 7 zu 99 % die dissoziierte Form vor. Bei diesem pH-Wert ist folglich mit einer elektrostatischen Abstoßung zwischen dem negativ geladenen Arzneistoff und den negativ geladenen Keratinfilamenten der Nagelplatte zu rechnen, was zu einer verminderten Penetration in den Nagel führen könnte.

3.2.2.1 Sättigungslöslichkeiten

Für die Entwicklung geeigneter Formulierungen und für die Bestimmung von effektiven Extraktionsmitteln für den Wirkstoff wurden die Sättigungslöslichkeiten in verschiedenen Medien bestimmt:

Tab. 3: Sättigungslöslichkeiten von EV-086K in verschiedenen Medien (MW±SD, n=3)

Medium	c_s [mg·ml ⁻¹]	Löslichkeit nach Ph. Eur. [124]	
Wasser	327,9 ± 5,2	Leicht löslich	100 - 1000 mg·ml ⁻¹
Propylenglykol	607,9 ± 67,4	Leicht löslich	100 - 1000 mg·ml ⁻¹
Pentylenglykol	554,9 ± 63,9	Leicht löslich	100 - 1000 mg·ml ⁻¹
Methanol	2152,4 ± 65,2	Sehr leicht löslich	über 1 g·ml ⁻¹
Ethanol	47,3 ± 2,2	Löslich	33 - 100 mg·ml ⁻¹
Transcutol® P	1634,2 ± 138,2	Sehr leicht löslich	über 1 g·ml ⁻¹
Soluphor® P	720,2 ± 67,6	Leicht löslich	100 - 1000 mg·ml ⁻¹
Glycerol	0,4 ± 0,1	Sehr schwer löslich	0,1 - 1 mg·ml ⁻¹
Isopropanol	3,6 ± 0,1	Schwer löslich	1-10 mg·ml ⁻¹

Methanol scheint im Vergleich zu Ethanol oder Isopropanol ein exzellentes Extraktionsmedium für diesen Wirkstoff darzustellen. Überraschenderweise ist EV-086K leicht löslich in Wasser. Dies könnte zum einen durch die Salzform (Kaliumsalz) des Wirkstoffes und zum anderen durch die Bildung von Mizellen erklärt werden (siehe Kapitel 3.2.2.3). Es konnten sogar noch höhere Mengen EV-086K in Wasser gelöst werden (bis zu 2,5 g·ml⁻¹). Allerdings kam es oberhalb der angegebenen Konzentration zu einer deutlichen Viskositäts-erhöhung der wässrigen Phase. Dies könnte durch die Ausbildung flüssigkristalliner Strukturen hervorgerufen worden sein. Substanzen wie Transcutol® P, Soluphor® P (SP) und Propylenglykol lösen den Arzneistoff ebenfalls in hohen Mengen und stellen geeignete Inhaltsstoffe für eine mögliche topische Formulierung dar, die zusätzlich die Wirkstoffpenetration steigern könnten.

3.2.2.2 Kritische Mizellbildungskonzentration

Die Kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) ist eine charakteristische Größe für ein Tensid in einem bestimmten Lösungsmittel und gibt an, ab welcher Konzentration die Tensidmonomere sich zu Mizellen zusammenlagern. Oberhalb der CMC bleibt demzufolge die Monomerenkonzentration konstant und es entstehen bei weiterer Erhöhung der Tensidkonzentration nur noch weitere Mizellen bzw. höhere Ordnungszustände wie Flüssigkristalle. Durch Messung der Leitfähigkeit, der Oberflächenspannung oder durch Ermittlung des Trübungspunktes kann die CMC bestimmt werden. Eine weitere, einfache und schnelle Methode stellt die Messung der elektrischen Stromstärke mittels Kapillarzonenelektrophorese (CZE) dar [125, 126]. Da es sich bei EV-086K um ein ionisches Molekül handelt, kam diese Methode zum Einsatz.

Die gemessenen Stromstärken (in μA , $n=3$) wurden in einem Diagramm gegen die verschiedenen EV-086K-Konzentrationen (0,86 bis 110 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ in wässriger Lösung) aufgetragen. Zwei Geraden mit den folgenden Parametern (Tab. 4), deren Schnittpunkt die CMC in Wasser darstellt, wurden ermittelt:

Tab. 4: Geradengleichungen und deren Schnittpunkt zur Ermittlung der CMC von EV-086K

Geradengleichung I	Geradengleichung II	r^2 I	r^2 II
$Y = 0,83356 + 0,01938 X$	$Y = 1,1 + 0,00545 X$	0,99995	1
Schnittpunkt beider Geraden		Y = 1,2	X = 19,13

Demzufolge bilden sich bereits über einer EV-086K-Konzentration von 19 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ in Wasser Mizellen, bei denen die lipophilen Bereiche nach innen gerichtet sind und die hydrophilen Kopfgruppen nach außen.

3.2.2.3 Untersuchungen mit dem Polarisationsmikroskop

Mit Hilfe von polarisiertem Licht ist es möglich, flüssigkristalline Strukturen näher zu untersuchen bzw. zu unterscheiden. Im Gegensatz zu Mikroemulsionen, welche optisch isotrop sind und keine Doppelbrechung zeigen, können durch Einsatz von polarisiertem Licht die verschiedenen Phasen (lyotrope Flüssigkristalle und Mesophasen) anhand ihrer spezifischen Strukturen identifiziert werden.

Da der Wirkstoff EV-086K eine sehr niedrige CMC besitzt und in Wasser bis zu einer Konzentration von $2,5 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$ eine ausgeprägte Viskositätserhöhung zeigte, sollte nun aufgeklärt werden, ob sich flüssigkristalline Strukturen ausbilden. In Abb. 9 a-c sind die mikroskopischen Aufnahmen von EV-086K in Wasser dargestellt. Die Bilder zeigen, dass es sich wahrscheinlich um eine lyotrope nematische Phase handelt. Entsprechend den Untersuchungen von MARTIN et al. [127] kann ferner eine hexagonale Phase vermutet werden (Vergleich Abb. 9 c). Bei Konzentrationen unterhalb der c_s von $328 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ wurden keine anisotropen Strukturen beobachtet, was ein Hinweis auf isotrope Systeme, wie Mizellen oder Lösungen, sein kann.

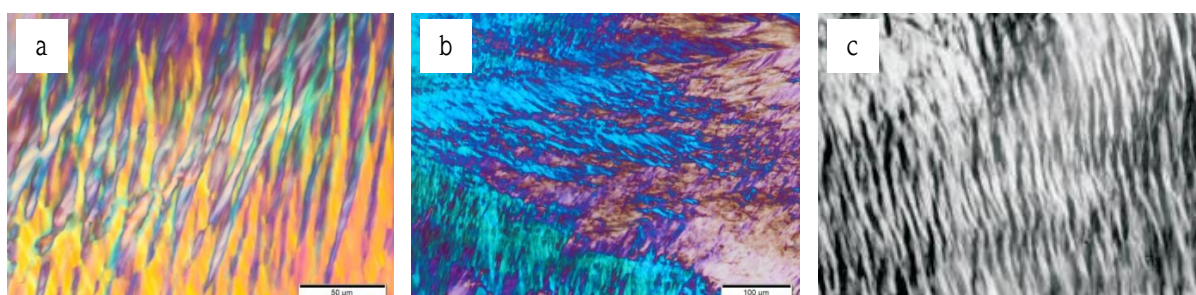


Abb. 9: Polarisationsmikroskopische Aufnahmen von EV-086K mit 500- (a) bzw. 200facher (b) Vergrößerung sowie einer hexagonalen Textur von C16TA-ZnCl-60 (200fach vergrößert) aus [127]

Da die Bildung flüssigkristalliner Strukturen von der Tensidkonzentration abhängt, lässt sich vermuten, dass die EV-086K Monomere bei niedrigen Konzentrationen Mizellen bilden, welche dann bei Konzentrationserhöhung zu Stäbchenmizellen werden. Diese wiederum können nematische Phasen ausbilden und gehen bei weiterer Konzentrationserhöhung in hexagonale Phasen über (Abb. 10 - links).

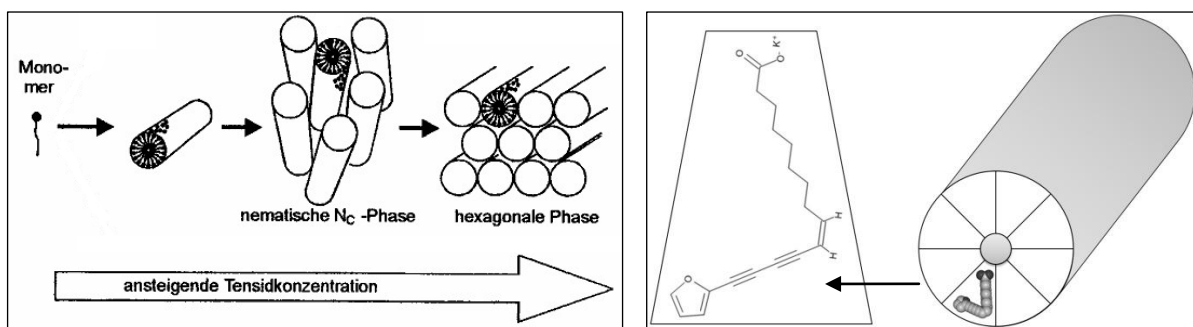


Abb. 10: Links: Strukturbildung lyotroper Flüssigkristalle in Abhängigkeit von der Tensidkonzentration aus [128] Rechts: Vereinfachte Darstellung einer möglichen inversen Stäbchenmizelle von EV-086K

Aufgrund der Geometrie des EV-086K-Moleküls (Abb. 10 - rechts), welches aus einem kleinen polaren Kopf und aus einem ausgeprägten lipophilen Teil besteht, ist es ebenfalls sehr wahrscheinlich, dass sich ab hohen Konzentrationen inverse Stäbchenmizellen und folglich invers-hexagonale Phasen bilden. Dadurch können sich die Strukturen verhaken und es kommt zu einer starken Viskositätserhöhung der Lösung. Letztlich wären auch Gelstrukturen denkbar, die sich vor allem bei niedrigen Temperaturen bilden, unspezifische Texturen aufweisen und sehr inhomogen sind. Denn der überwiegende Teil der flüssigkristallinen Phasen wird nicht aus einer kristallinen Phase, sondern aus Gelphasen gebildet [128].

3.2.2.4 Verteilungskoeffizient

Um Aussagen über die Lipophilie von EV-086K und dessen Penetrationsverhalten zu erhalten, sollte der Verteilungskoeffizient ermittelt werden. Während für die Penetration in die Haut ein $\log P$ -Wert von 1 ein Optimum darstellt, kann angenommen werden, dass für die Penetration in den Nagel, der sich wie eine hydrophile Gelmembran verhält, eine höhere Hydrophilie, folglich ein kleinerer Verteilungskoeffizient von Vorteil ist (siehe Kapitel 2.1.3) [18, 34]. Aufgrund der emulgierenden Eigenschaften von EV-086K konnte die übliche Schüttelmethode unter Verwendung des Octanol-Wasser-Systems nicht zum Einsatz kommen, da beide Phasen sich zu einer Emulsion vereinten. Deshalb wurde eine alternative Methode nach VALKO et al. verwendet [129], die zeigen konnte, dass die Retentionszeit einer Verbindung in der Umkehrphasen-HPLC von deren Lipophilie abhängt und daher mit dem Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient korreliert. Die Retentionszeiten von sieben Referenzsubstanzen mit bekannten $\log P$ -Werten als auch von EV-086K konnten erfolgreich bestimmt werden und sind in Abb. 11 dargestellt.

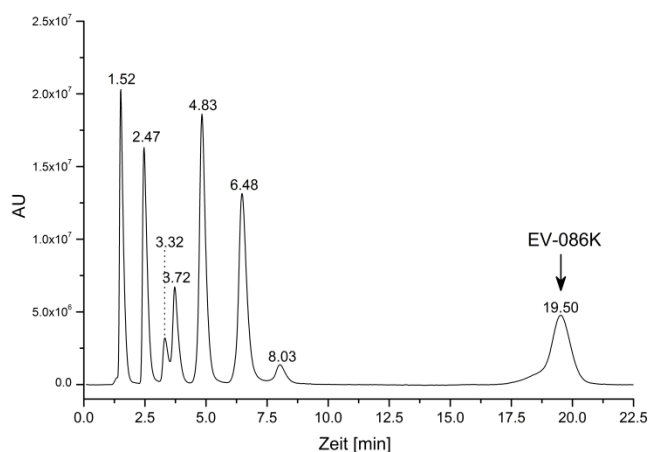


Abb. 11: Chromatogramm der HPLC-Messung zur Ermittlung des $\log P$ -Wertes (Retentionszeiten von Thioharnstoff, Nitrobenzol, Toluol, Thymol, Diphenylamin, Biphenyl, n-Butylbenzol, EV-086K: von links nach rechts).

Aus den erhaltenen Retentionszeiten kann für jede Verbindung der Kapazitätsfaktor K nach Gleichung (1) errechnet werden [130]. Die logarithmierten K -Werte werden nun in einem Diagramm gegen den bereits bekannten $\log P$ -Wert aufgetragen (Tab. 5).

$$K = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Gleichung (1)

K Kapazitätsfaktor t_R Retentionszeit t_0 Totzeit

Mittels Geradengleichung konnte für EV-086K ein $\log P$ -Wert von $5,77 \pm 0,01$ bei einer Temperatur von 32°C errechnet werden. Dieser Wert entspricht in etwa dem von der Software ermittelten Wert von $4,54 \pm 1,38$ und weist auf eine starke Lipophilie des Moleküls hin [131]. Die ausgeprägte Lipophilie von EV-086K könnte demzufolge hinderlich für die Penetration durch die Nagelplatte sein.

Tab. 5: Retentionszeit in min, log K- und log P-Werte der Referenzsubstanzen sowie von EV-086K (MW±SD, n=3)

Substanz	Retentionszeit [min]	log K	log P
Nitrobenzol	2,45 ± 0,02	- 0,210 ± 0,009	1,85
Toluol	3,29 ± 0,04	0,068 ± 0,008	2,73
Diphenylamin	4,76 ± 0,09	0,330 ± 0,010	3,50
Biphenyl	6,36 ± 0,14	0,504 ± 0,011	3,98
n-Butylbenzol	7,86 ± 0,20	0,622 ± 0,012	4,38
Thioharnstoff	1,52 ± 0,01	-	- 1,08
EV-086K	19,51 ± 0,43	1,066 ± 0,009	4,54 ± 1,38*

* berechnet mit ALOGPS 2.1

3.2.2.5 Stabilitätsuntersuchungen

Aufgrund der zwei vorhandenen Dreifachbindungen und der Doppelbindung ist EV-086K oxidationsempfindlich. Unter Lichteinfluss kommt es zur starken Braunfärbung der wässrigen EV-086K-Lösung. Deshalb wurde die Stabilität in wässriger und alkoholischer Lösung (Ethanol/Isopropanol 85/15 %, m/m) mit jeweils 1 %igem EV-086K-Gehalt bei Raumtemperatur und kühler Lagerung (8 bis 12 °C) untersucht. Alle Proben wurden stets unter Lichtausschluss gelagert. Dem alkoholischen Gemisch wurden zwei Antioxidantien hinzugesetzt: je 0,05 % (m/m) Tinogard® TT und Tinogard® TL (Abb. 12).

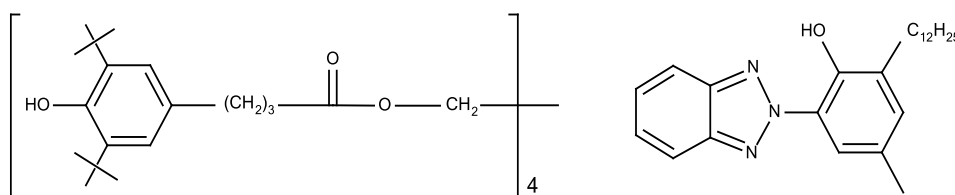


Abb. 12: Chemische Struktur von Tinogard® TT (links) und Tinogard® TL (rechts)

Tinogard® TT (INCI: *Pentaerythrityl-tetra-di-t-butyl-hydroxyhydrocinnamate*) ist ein effektives Mittel, um oxidationsempfindliche Bestandteile zu schützen. Typisch eingesetzte Konzentrationen liegen zwischen 0,02 bis 0,3 %. **Tinogard® TL** (INCI: *Benzotriazolyl-dodecyl-p-cresol*) soll als UV-Stabilisator in Konzentrationen von 0,03 bis 0,1 % die Verfärbung des Produktes nach Lichteinwirkung verhindern [132, 133]. Da beide Antioxidantien nicht in Wasser löslich sind, wurde für die wässrige Lösung Ascorbinsäure in 0,1 %iger Konzentration eingesetzt. Die Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen sind in Abb. 13 dargestellt.

a) Stabilität von EV-086K in wässriger Lösung:

Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass der Wirkstoff bei kühler Lagerung ohne Ascorbinsäurezusatz in wässriger Lösung über drei Monate stabil war. Bei Raumtemperatur nahm der EV-086K-Gehalt in Wasser geringfügig ab. Der Zusatz von Ascorbinsäure führte zu einer starken Abnahme der Wirkstoffkonzentration, was anscheinend auf eine Esterreaktion zwischen der Carboxylatgruppe von EV-086K und den Hydroxylgruppen der Ascorbinsäure zurückzuführen ist. Aufgrund der Stabilitätsdaten in wässriger Lösung ist der Zusatz eines Antioxidans nicht notwendig.

b) Stabilität von EV-086K in alkoholischer Lösung:

Nach drei Monaten war der EV-086K-Gehalt in allen Proben größer als 90 %, unabhängig von der Lagerungstemperatur und von dem Zusatz an *Tinogard*[®] *TT* oder *TL*. Es konnten keine Instabilitäten festgestellt werden. Aufgrund der ausreichenden Stabilität in alkoholischer Lösung kann, auch in diesem Fall, auf einen Zusatz von Antioxidantien verzichtet werden.

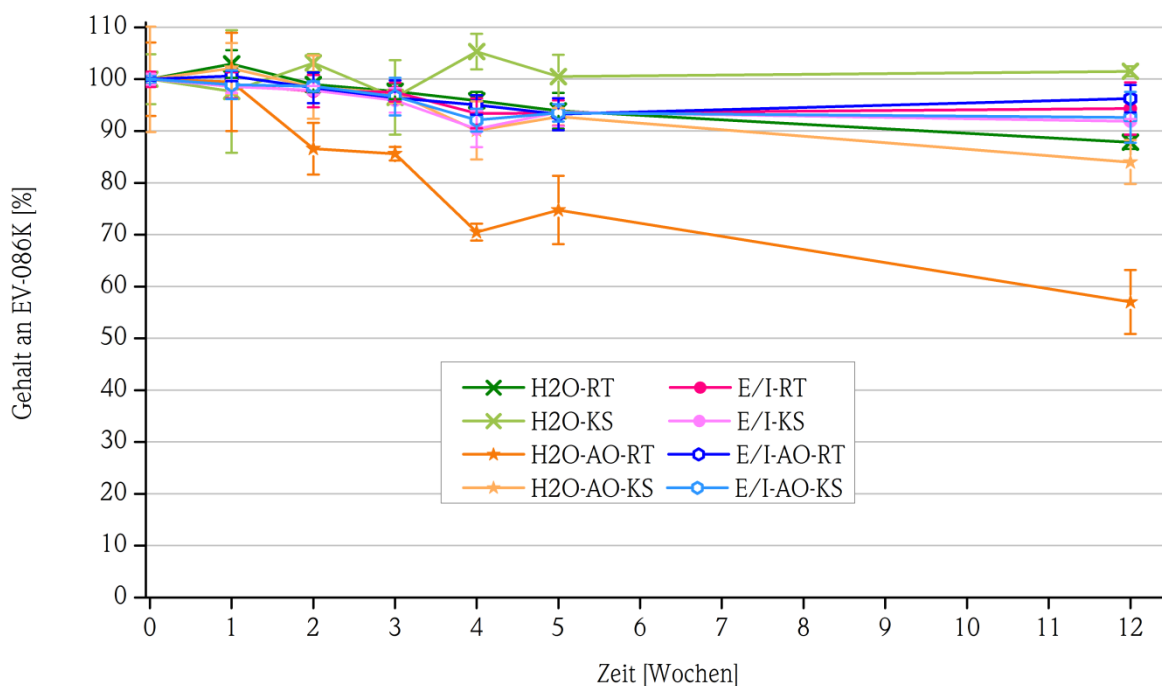


Abb. 13: EV-086K-Stabilität in wässriger Lösung [H2O] und im Ethanol/Isopropanol-Gemisch [E/I] bei Raumtemperatur [RT] und bei Lagerung im Kühlschrank [KS] mit und ohne Zusatz von Antioxidantien [AO] (MW±SD, n=3)

Für die Entwicklung geeigneter Formulierungen kann sowohl Wasser als auch ein Ethanol/Isopropanol-Gemisch verwendet werden. Eine Lagerung bei kühleren Temperaturen und unter Lichtausschluss wird zusätzlich empfohlen, um die Stabilität des Wirkstoffes über einen langen Zeitraum zu gewährleisten. Zugleich kann man davon ausgehen, dass EV-086K bei Experimenten mit langen Versuchszeiten ausreichend stabil ist, da nach einer Woche keine Instabilitäten beobachtet wurden. Eine Anwendung des Antimykotikums am Nagel sollte aufgrund seiner langen Stabilität in Wasser keinen negativen Einfluss auf die Wirkung haben. Eine minimale Braunfärbung des Nagels durch die Einwirkung von UV-Licht auf EV-086K wäre allerdings denkbar.

3.3 Entwicklung geeigneter Formulierungen zur ungalen Applikation

In der vorliegenden Arbeit sollten verschiedene Formulierungen für die Applikation des neuen Antimykotikums EV-086K auf der Nagelplatte entwickelt werden, um diese anschließend hinsichtlich ihrer lokalen Bioverfügbarkeit vergleichen zu können.

3.3.1 Nagellacke als Drug Delivery Systeme

Nagellacke, welche Arzneistoffe enthalten, sind relativ neuartige Formulierungen und gehören zu den *Transungalen Delivery Systemen* [30, 134]. Sie stellen aufgrund ihrer guten Haftung auf der Nagelplatte ein optimales Vehikel zur topischen Applikation dar.

Im Allgemeinen bestehen Nagellacke aus einem Lösungsmittel, einem filmbildenden Polymer, Harzen und Weichmachern. Harze verstärken die Haftung des Filmes auf der Nagelplatte, während Weichmacher dessen Elastizität sowie die Haltbarkeit verbessern [30]. Nach Verdunstung des Lösungsmittels kommt es zu einem 5fachen Anstieg der Arzneistoffkonzentration im Polymerfilm. Teilweise können auch Übersättigungsphänomene beobachtet werden. Dadurch werden die thermodynamische Aktivität und ebenso der Diffusionsgradient erhöht, was eine Erhöhung der ungleichmäßigen Wirkstoffpenetration zur Folge hat [135, 136].

Wie jeder Nagellack sollten auch die wirkstoffhaltigen Nagellacke chemisch und physikalisch stabil sein. Die verschiedenen Komponenten müssen miteinander kompatibel sein und die Viskosität sollte so gewählt werden, dass nach Applikation des Nagellackes dieser in die Rillen und in die Ränder der Nagelplatte fließen kann. Einmal appliziert, muss der Lack, unter Bildung eines gleichmäßigen Filmes, schnell trocknen (3 bis 5 min). Ebenfalls sollte der wirkstoffhaltige Nagellack farb- und glanzlos sein, damit er auch von männlichen Patienten akzeptiert wird [137].

Nagellacke werden üblicherweise mit einem kleinen Pinsel auf die Nagelplatte aufgetragen. Der zurückgebliebene, meist wasserunlösliche Polymerfilm muss durch Abschleifen mittels Nagelfeile oder Lösungsmittel, nach einer Einwirkzeit von meist einer Woche, wieder entfernt werden. Danach erfolgt die erneute Applikation des Nagellackes. Insgesamt kann die topische Behandlung von Nagelmykosen über ein Jahr dauern. Diese relativ aufwendige Art der Anwendung könnte sich vor allem für ältere Patienten nachteilig auf deren Compliance auswirken. Da der Wirkstoff EV-086K eine hohe Wasserlöslichkeit (siehe Kapitel 3.2.2) besitzt, würde dieser sich nach dem Händewaschen aus einem herkömmlichen Polymerfilm nach und nach herauslösen. Deshalb wurde ein neuartiger Nagellack entwickelt, welcher nur abends vor dem Schlafengehen aufgetragen wird und sich am nächsten Morgen mit Wasser einfach abwaschen lässt:

Tab. 6: Zusammensetzung des Nagellackes

Komponente	Funktion	% (m/m)
Eudragit® E 100	Polymer	5
Ethanol	Lösungsmittel	85
Transcutol® P	Lösungsvermittler, Penetrationsenhancer	5
EV-086K	Wirkstoff	5

Die Inhaltsstoffe sollten arzneibuchkonform, gut verträglich und kompatibel mit dem Wirkstoff sein. Eudragit® E 100 (Dimethylaminoethylmethacrylat-Butylmethacrylat-Methylmethacrylat-Copolymer, abgekürzt: DMA-MMA; mittlere $M = 47.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) gehört zur Gruppe der Methacrylsäure-Acrylat-Copolymere und stellt das filmbildende Polymer dar (Abb. 14, links).

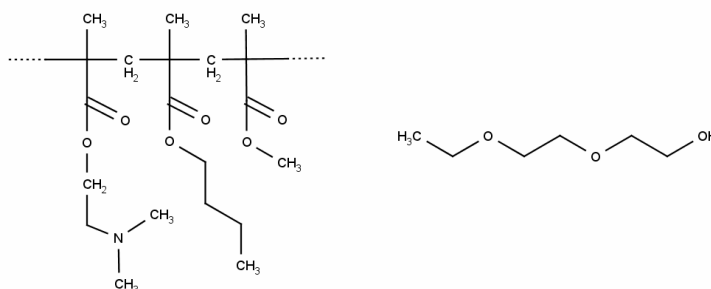


Abb. 14: Chemische Struktur von Eudragit® E 100 (links) und Transcutol® P (rechts)

Es ist in Wasser oberhalb eines pH-Wertes von 5 unlöslich, da die tertiären Aminogruppen undissoziiert vorliegen. Folglich können ionische Wechselwirkungen zwischen der negativ geladenen Carboxylgruppe von EV-086K und den Aminogruppen des Polymers ausgeschlossen werden. In polaren organischen Lösungsmitteln und in Ethanol/Wasser-Gemischen mit einem maximalen Wassergehalt von 40 % ist das Polymer löslich [138].

Um den Nagellack trotzdem mit reinem Wasser abwaschen zu können, wurde der Lösungsvermittler Transcutol® P hinzugesetzt (Abb. 14, rechts). Transcutol® P, ein Diethylenglykolmonoethylether, ist ein exzellenter Lösungsvermittler für wasserunlösliche Stoffe und besitzt zusätzlich die Fähigkeit die Penetration von Wirkstoffen zu verbessern [139]. Transcutol® P führt dazu, dass sich das Polymer bei Kontakt mit Wasser auflöst und somit einfach abwaschen lässt. Des Weiteren besitzt Transcutol® P ein hohes Solubilisierungsvermögen für EV-086K. Ethanol würde den Wirkstoff nicht in ausreichend hohen Mengen lösen können. Durch Einsatz des Lösungsvermittlers konnten bis zu 5 % EV-086K in den Nagellack inkorporiert werden, was für eine ausreichende Wirkung essentiell ist. Transcutol® P ist toxikologisch unbedenklich und wird in kosmetischen und topischen Formulierungen eingesetzt [140].

Voraussetzung für einen solchen Nagellack ist jedoch ferner, dass der Arzneistoff in hohen Mengen und innerhalb eines Zeitraumes von maximal 6-8 h aus dem Polymerfilm freigesetzt wird und in den Nagel penetriert. Die tägliche Applikation des wasserlöslichen Lackes könnte schneller zu einem ausreichend hohen Wirkstoffdepot in der Nagelplatte führen und dadurch die Behandlungsdauer, im Vergleich zu herkömmlichen, wasserunlöslichen Nagellackformulierungen, verkürzen. Dies konnte in Studien von MONTI et al. zu einem wasserlöslichen Nagellack auf Hydroxypropylchitosanbasis (Handelsname: Ciclopoli®) bestätigt werden. Es wurden deutlich kürzere lag-Zeiten und höhere Fluxwerte von Ciclopirox und Amorolfin durch Anwendung dieses wasserlöslichen Nagellackes im Vergleich zu kommerziellen Präparaten nachgewiesen (Loceryl® und Penlac®) [43, 141]. In einer multizentrischen, randomisierten Studie mit 467 Nagelpilzpatienten konnte Ciclopoli® gegenüber einem Placebo sowie gegenüber einem 8 %igen Ciclopirox-Referenzlack höhere Heilungsraten aufweisen [142].

Insgesamt ist festzuhalten, dass für wasserlösliche Arzneistoffe ein wasserlöslicher Lack viele Vorteile bezüglich einer unqualen Applikation bietet: Die Anwenderfreundlichkeit kann verbessert, das Wirkstoffdepot im Nagel und somit die Heilungsrate erhöht und das Kontaminationsrisiko, durch Wegfall des Abfeilens der Nagelplatte, minimiert werden [143].

3.3.2 Entwicklung eines geeigneten kolloidalen Vehikelsystems

Aufgrund der bekannten guten penetrationsfördernden Eigenschaften von Mikroemulsionen und aufgrund des hohen Solubilisierungsvermögens für lipophile sowie hydrophile Arzneistoffe sollte ebenfalls ein solches Vehikelsystem entwickelt werden, welches in der Lage ist, die Penetration des extrem lipophilen Arzneistoffes EV-086K in den Nagel zu steigern bzw. zu ermöglichen. Auch wäre es wünschenswert, dass die enthaltenen Komponenten sich im IR-Spektrum nicht mit dem Arzneistoff überlagern, was folglich eine erschwerte Quantifizierung hinsichtlich der *online*-Penetrationsstudien zur Folge hätte. Und schließlich sollte das verwendete System ein ausreichend hohes Solubilisierungspotenzial für den lipophilen Wirkstoff besitzen.

Um diese Bedingungen zu erfüllen, wurde das bewährte Mikroemulsionssystem ME-BIP, welches aus der Arbeit von K. JAHN [144] hervorging und in der Arbeit von S. HEUSCHKEL [145] weiterentwickelt wurde, verwendet. Das System von Frau Heuschkel bietet vor allem im Hinblick auf die lange Lagerstabilität (über drei Jahre), eine mögliche Lagerung bei kühlen Temperaturen, das ausgeprägte isotrope Gebiet im Phasendreieck (über 33 % der Gesamtfläche) und die Quantifizierung mittels IR-Spektroskopie wesentliche Vorteile. Zusätzlich existieren isotrope Mischungen mit geringen Tensidkonzentrationen, was hinsichtlich des immer wieder

diskutierten Irritationspotentials von Mikroemulsionen nützlich ist. In der vorliegenden Arbeit gelang es nun, die ME-BIP so zu modifizieren, dass der Wirkstoff EV-086K in einer Konzentration von 10 % eingearbeitet und die Tensidkonzentration auf 10 % reduziert werden konnte (Tab. 7):

Tab. 7: Zusammensetzung der ME-BIP und ME-EV-086K

Komponente	Funktion	ME-BIP	ME-EV-086K
EV-086K	Wirkstoff	-	10 %
Pelemol® BIP-PC	lipophile Phase	5 %	5 %
Tagat® O2V ¹ / Synperonic® PE/L101 ² (2:3, m/m)	Emulgatorsystem	20 %	10 %
Propylenglykol/Wasser (2:1, m/m)	hydrophile Phase	75 %	75 %

¹ PEG-20 Glyceryloleate HLB-Wert: 15 [146]

² Poloxamer 331 HLB-Wert: 1 [147]

Höhere Wirkstoffkonzentrationen konnten ebenso eingearbeitet werden, was jedoch mit einer Viskositätserhöhung einherging. Die lipophile Komponente Pelemol® BIP-PC (BIP) ist ein eutektisches Gemisch aus N-Butylphthalimid ($M = 203 \text{ g/mol}$; $\log P\text{-Wert} = 2.838 \pm 0.253$) und Isopropylphthalimid ($M = 189 \text{ g/mol}$; $\log P\text{-Wert} = 2.173 \pm 0.256$) [148]. Vor allem zeichnet sich BIP durch seine hautfreundlichen Eigenschaften [149] und sein exzellentes Solubilisierungsvermögen für viele Verbindungen aus [150]. Zusätzlich ist es analytisch sehr gut zugänglich und wurde deshalb nicht durch ein anderes Öl ersetzt. Auf den Austausch von Propylenglykol durch Pentylenglykol wurde aufgrund der besseren Löslichkeit von EV-086K im Erstgenannten verzichtet.

Hinsichtlich der hohen Wirkstoffmenge in der ME ($> 10 \%$) und der geringen Verfügbarkeit von EV-086K ist eine Erstellung und ausführliche Charakterisierung eines Phasendiagramms der ME-EV-086K nicht möglich. Deshalb wurde auf die bereits untersuchten Eigenschaften der ME-BIP aus der Arbeit von S. HEUSCHKEL zurückgegriffen. Die ME-BIP zeigte bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ und bei $32 \text{ }^\circ\text{C}$ NEWTONSches Fließverhalten. Der Radius der kolloidalen Phase betrug $12,0 \pm 0,5 \text{ nm}$ und konnte somit einer ME zugeordnet werden [151]. Die ME ist thermodynamisch stabil und zeigte bei kühler Lagerung keine Trübungen oder eine Phasentrennung. Damit konnte der Wirkstoff in die ME-BIP eingearbeitet werden, da dieser im Kühlschrank eine längere Stabilität aufzeigte (siehe Kapitel 3.2.2). Dass die ME-EV-086K optisch isotrop ist, konnte mit Hilfe polarisationsmikroskopischer Untersuchungen bestätigt werden. Für eine saubere und einfache Applikation auf dem Nagel, würde sich ein Nagelpflegestift, wie in Abb. 15 dargestellt, gut eignen.

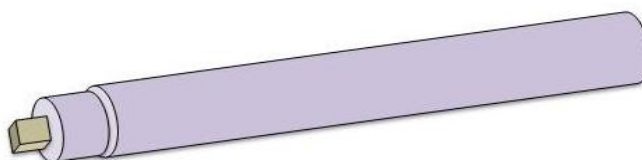


Abb. 15: Modell eines Nagelpflegestiftes

Stabilität

Zusätzlich wurde die Stabilität der ME-EV-086K über einen Zeitraum von zwölf Wochen untersucht. Die Lagerung der ME erfolgte in einem dicht verschlossenen Gefäß unter Lichtausschluss und im Kühlschrank. Der Gehalt von EV-086K betrug nach dem Versuchszeitraum $102,3 \pm 0,5 \%$, bezogen auf die Ausgangskonzentration von 10% (m/m), und ist somit unter den angegebenen Bedingungen stabil.

3.3.3 Weitere Formulierungen

Hydrogel

Als Standard- bzw. Vergleichsvehikel sollte ein Hydrogel dienen. Dieses wurde nach DAB hergestellt [152]. Dabei kam als Gelbildner Hydroxyethylcellulose (Tylose[®] H 30.000 P2 PHA) in einer Konzentration von 1 % zum Einsatz. EV-086K konnte in einer Konzentration von 10 % eingearbeitet werden. Zu beachten war bei der Herstellung vor allem die lange Quellungszeit und dass nach Einarbeitung des Wirkstoffes das Gel erneut über Nacht quellen musste. Das Gel wurde stets im Kühlschrank gelagert.

Lösung F11

Die Lösung F11 wurde von der Firma Evolva Holding SA entwickelt und sollte ebenfalls hinsichtlich des Penetrationsverhaltens von EV-086K im menschlichen Nagel und in tierischen Hufmembranen untersucht werden. Die Lösung setzte sich aus den folgenden Bestandteilen zusammen:

Tab. 8: Zusammensetzung der Lösung F11

Komponente	% (m/m)
EV-086K	5,7
Transcutol [®] P	5,0
Butylhydroxyanisol	0,1
EDTA	0,1
Natriumdihydrogenphosphat	0,05
Citronensäure	0,05
Ethanol	30
gereinigtes Wasser	ad 100

3.4 Penetrationsuntersuchungen an equinen und bovinen Hufmembranen mittels FTIR-ATR-Spektroskopie und Diffusionszelle

Das Ziel dieser Studien war es, das *in vitro* Penetrationsverhalten von EV-086K durch Anwendung unterschiedlicher Vehikel voraussagen und vergleichen zu können. Es sollte vor allem ein penetrationssteigernder Effekt durch Anwendung einer ME nachgewiesen werden. Da menschliches Nagelmaterial schwer erhältlich ist, wurden für dieses Experiment verschiedene Hufmembranen verwendet: Pferde- (equine) und Rinder- (bovine) Hufmembranen. Unter Verwendung der FTIR-ATR-Spektroskopie in Kombination mit einer Diffusionszelle konnte die Penetration des Arzneistoffes in Echtzeit verfolgt werden. Zusätzlich sollten die erhaltenen Resultate mit *ex vivo* Penetrationsdaten an menschlichem Nagelmaterial (siehe Kapitel 3.5) verglichen werden, um eine mögliche Korrelation zwischen den Hufmembranen und der humanen Nagelplatte zu etablieren.

3.4.1 Einleitung

Die Fourier-Transform-Infrarot (FTIR) Spektroskopie ist eine der wichtigsten qualitativen als auch quantitativen Methoden in der Pharmazie und Chemie, welche unter anderem zur Substanzidentifizierung, zur Aufklärung des Aufbaus von Molekülen oder für Strukturuntersuchungen von Stratum corneum Lipiden eingesetzt wird [153, 154]. Die abgeschwächte Totalreflexion (ATR) stellt dabei eine besondere Messtechnik dar, mit welcher das IR-Spektrum der Oberfläche einer Probe erhalten wird. Dafür befindet sich die Probe auf

einem speziell angeschliffenen Internen Reflexionselement (meist ein Zinkselenidkristall) mit hohem Brechungsindex. Der Laserstrahl wird üblicherweise völlig an der Grenzfläche beider Medien reflektiert. Jedoch dringt ein minimaler Anteil in das optisch dünnere Medium, die Probe, ein und folglich wird die Intensität des reflektierten Lichtes durch Absorption teilweise geschwächt. Entscheidend für ein gutes ATR-Spektrum ist der bestmögliche Kontakt zwischen Probe und Kristall [153].

In jüngster Zeit wurden insbesondere spektroskopische Methoden (FTIR-ATR) in Kombination mit einer Diffusionszelle eingesetzt, um die Penetration oder Permeation von Substanzen in bzw. durch Membranen und das Stratum corneum online verfolgen zu können [154-157]. Die Kombination dieser Techniken vereint die Vorteile der jeweiligen Methode: schnelle Messung, einfache Probenaufbereitung, hohe Quantität und Qualität der Daten, hohe Empfindlichkeit und Genauigkeit der Daten (Mehrfachscans), zerstörungsfreie (nicht invasive) Messung, definierter Akzeptor und Donator sowie Mehrkomponentenmessung sind möglich [158]. Voraussetzung ist lediglich, dass auch die zu untersuchenden Stoffe auswertbare IR-Banden im Gesamtspektrum der Probe aufweisen.

Zur besseren Beurteilung des unqualen Permeationsverhalten von Arzneistoffen, können aufgrund ähnlicher Eigenschaften hinsichtlich des Keratin- und Proteingehaltes tierische Hufmembranen anstelle von menschlichen Nägeln eingesetzt werden [159]. Es wurden seither die unterschiedlichsten Barrieren verwendet: Rinderhuf [43], Huf des Schafes [160], Schweinehuf [42], Keratinfilme [161], Nagelabschnitte vom gesunden Menschen [162] und menschliche Kadavernägel [35]. Pferdehufe kamen bislang nur für Quellungsexperimente zum Einsatz [163]. Jedoch wurden diese noch nicht herangezogen, um die ungleiche Permeabilität eines Arzneistoffes zu bestimmen. Ebenso fehlt bis heute ein Vergleich bezüglich der Permeabilität zwischen den verschiedenen Hufmembranen.

3.4.2 Versuchsanordnung und Auswertung

Für die Penetrationsmessung des lipophilen Arzneistoffes EV-086K durch Hufmembranen kam die von HARTMANN et al. [164] entwickelte und nach GÜNTHER [165] modifizierte Teflondiffusionszelle zum Einsatz (Abb. 16 und Abb. 54).

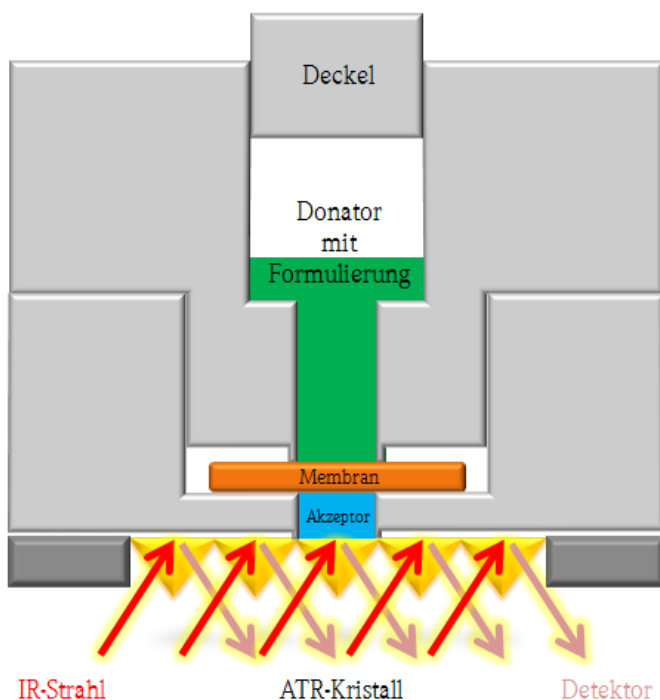


Abb. 16: Schematischer Aufbau einer Diffusionszelle

Sie besteht aus einem Donator- und einem Akzeptorkompartiment, zwischen denen sich die jeweilige Membran befindet. Der Akzeptor bedeckt einen Teil des Zinkselenidkristalls. Der IR-Strahl dringt 1-2 μm in das Akzeptormedium ein und ermöglicht dadurch die Messung der zunehmenden Arzneistoffkonzentration in Echtzeit. Aufgrund des kleinen Akzeptorvolumens von 50 μl konnten keine *sink* Bedingungen realisiert werden. Um dennoch einseitig konstante Verhältnisse innerhalb der Diffusionszelle zu schaffen, wurde ein Überschuss an Formulierung in den Donator gegeben. Die Diffusionsprozesse erreichen somit im Akzeptor ein Sättigungsgleichgewicht.

Die beobachteten Probleme aus früheren Experimenten [165], wie das Austrocknen des Akzeptors durch Rückdiffusion des Akzeptormediums in den Donator (hauptsächlich bei Lackformulierungen), konnte durch Einsatz eines mit Akzeptormedium-gesättigten Wattebausches im Deckel der Diffusionszelle weitgehend unterbunden werden. Außerdem wurden die Hufmembranen im Vorfeld bis zu 24 h in der Akzeptorlösung hydratisiert und der Deckel mit zusätzlichen Dichtungsschrauben verschlossen.

Eine besondere Rolle bei der Untersuchung der Penetration spielte die Wahl des Akzeptormediums, welche unter anderem von der Art der verwendeten Membran abhängt. Für Penetrationsuntersuchungen sollte das Akzeptormedium ähnliche physikochemische Eigenschaften aufweisen wie die Membran. Dadurch wird, hinsichtlich der gleichen physikochemischen Eigenschaften, ein zusätzlicher Verteilungsschritt des Arzneistoffes zwischen Membran und Akzeptor ausgeschlossen. Da sowohl die Nagelplatte als auch die Hufmembranen sich wie eine hydrophile Gelmembran verhalten, würde sich ein hydrophiles Medium, wie Wasser, als Akzeptor hervorragend eignen.

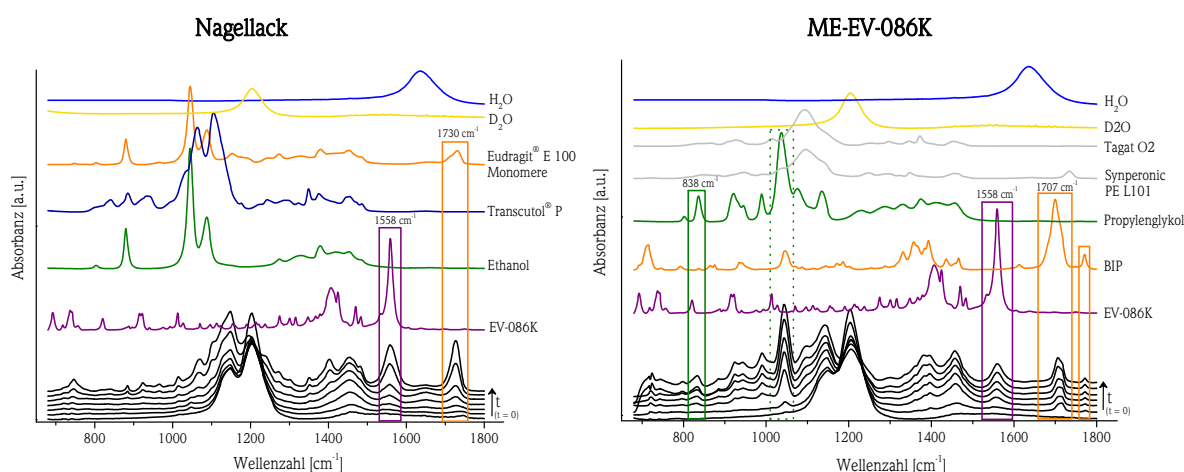


Abb. 17: FTIR-ATR-Spektren (farbig) der einzelnen Bestandteile der entsprechenden Formulierung und ausgewählte Spektren (schwarz) während des Penetrationsprozesses in den Akzeptor der Diffusionszelle

Für die Quantifizierung von EV-086K ist es notwendig, dass dessen spezifische Bande im Spektrum nicht von anderen Banden, resultierend aus den Bestandteilen der Formulierungen bzw. der Membran oder des Akzeptormediums, überlagert wird. In Abb. 17 sind die FTIR-ATR-Spektren der einzelnen Bestandteile des Nagellacks (links) und der ME-EV-086K (rechts) dargestellt. Zunächst geht aus beiden Abbildungen hervor, dass Wasser als Akzeptormedium ungeeignet ist, da sich die Bande der Deformationsschwingung (blau) bei 1630 cm^{-1} mit der Bande von EV-086K (purpur) im Bereich 1558 cm^{-1} überschneidet und eine eindeutige Quantifizierung erschwert. Da der Diffusionskoeffizient einer deuterierten seiner undeuterierten Verbindung kongruent ist, wurde schließlich D_2O als Akzeptormedium ausgewählt [36]. Aufgrund der schwereren Masse von Deuterium verschieben sich die Bandenpositionen der Deformationsschwingung zu 1200 cm^{-1} und der O-D-Streckschwingung zu 2480 cm^{-1} [166]. Die Formulierungen wurden demzufolge mit D_2O statt Wasser hergestellt, die Membranen mit D_2O hydratisiert und der Wattebausch mit D_2O getränkt.

Des Weiteren ist aus den Spektren ersichtlich, dass die Bestandteile beider Formulierungen sich nicht mit der spezifischen Bande von EV-086K überschneiden. Die Lösung F11 enthält wie der Nagellack D_2O , Ethanol und Transcutol® P. Somit können auch für diese Formulierung Überlagerungen ausgeschlossen werden. Die Bestandteile des Hydrogels, ausgenommen EV-086K und D_2O , waren ebenfalls nicht im Spektrum des Akzeptors sichtbar. Folglich ist eine eindeutige Quantifizierung von EV-086K nach Applikation aller Formulierungen über die Intensitätszunahme der substanzspezifischen Bande möglich.

3.4.3 Ergebnisse

Die *in vitro* Penetration von EV-086K wurde an zwei verschiedenen Barrieren untersucht: Pferdehufmembranen und Rinderhufmembranen. Es wurden zunächst vier Formulierungen (Mikroemulsion (ME), Nagellack (NL), Hydrogel (HG), Lösung F11 (L)) getestet, um den jeweiligen Einfluss auf das Penetrationsverhalten zu prüfen und miteinander vergleichen zu können. Aufgrund der unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen in den Formulierungen wurden für Vergleichszwecke die relativen EV-086K-Konzentrationen angegeben. Für den Nagellack wurde eine EV-086K-Konzentration von 12 % (m/m), nach partieller Verdunstung des Lösungsmittels Ethanol im Donator, ermittelt.

Weiterhin konnten dazugehörige Diffusionskoeffizienten, Fluxwerte, Permeabilitätskoeffizienten und lag-Zeiten berechnet werden. Für die lag-Zeit musste die EV-086K-Konzentration im Akzeptor oberhalb der jeweiligen LoD liegen (siehe Kapitel 6.3.3). Ebenso wurde die Penetration von EV-086K nach Applikation von optimierten Formulierungen im Vergleich zur ME an Rinderhufmembranen geprüft (siehe Anhang 7.3).

a) Penetration von EV-086K durch Pferdehufmembranen

In Abb. 18 sind die Penetrationsergebnisse von EV-086K unter Verwendung von Pferdehufmembranen dargestellt. Aufgrund der großen Anzahl von Datenpunkten wurden die Werte nach 90 min, nach 180 min und dann aller 3 h auf signifikante Unterschiede geprüft. Tab. 9 zeigt die berechneten Parameter des Diffusionsprozesses.

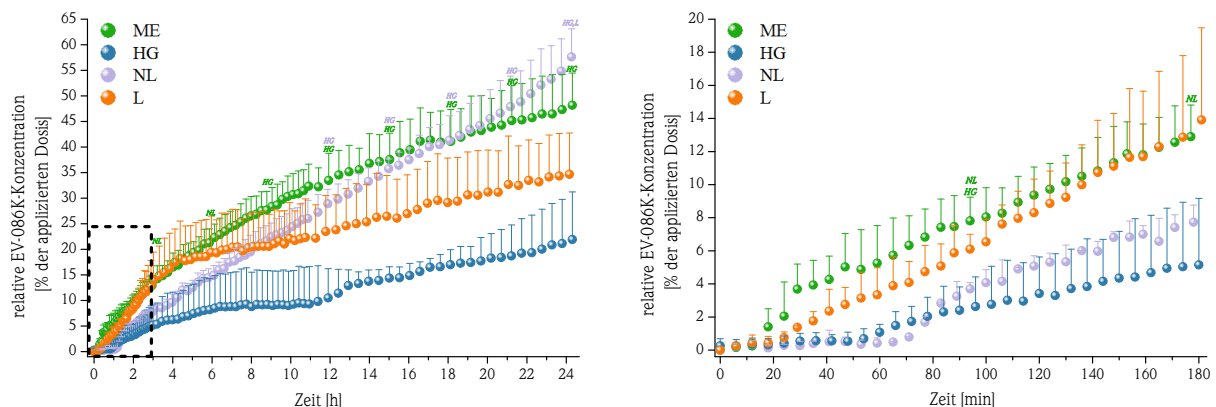


Abb. 18: Links: Vergleich der Penetrationsergebnisse von EV-086K nach Applikation der ME (n=2), des Hydrogels (HG, n=3), des Nagellackes (NL, n=2) und der Lösung F11 (L, n=3) in den Akzeptor der Diffusionszelle unter Verwendung von Pferdehufmembranen bezogen auf die applizierte Dosis (MW \pm SD, p<0,05 vs. der angegebenen Formulierung). Rechts: Vergrößerter Ausschnitt der ersten 180 min des Diffusionsprozesses.

Die signifikant höchsten EV-086K-Konzentrationen im Akzeptor konnten durch Applikation der ME und des Nagellackes nach 24 h erreicht werden. Über die Hälfte der applizierten Dosis penetrierten in den Akzeptor durch Anwendung dieser beiden Formulierungen. Mit einer geringen Verzögerungszeit von ca. 30 min konnte die ME den Arzneistoff bereits nach 3 h in hohen Konzentrationen in den Akzeptor befördern.

Die Diffusionskurve des Nagellackes zeigte zu Beginn eine lag-Zeit von knapp 80 min mit einem anschließend linearen Verlauf, ohne einen Sättigungszustand zu erreichen. Durch die Penetration von Lackbestandteilen könnte die Löslichkeit des Arzneistoffes im Akzeptormedium erhöht werden, was dazu führt, dass dessen Konzentration immer weiter anstieg. Ferner könnte die Versuchszeit für die Penetration aus dem Lack zu kurz sein. In früheren Experimenten wurden die Diffusionsprozesse für Lackformulierungen über mehrere Tage bis Wochen gemessen [165]. Da aber der Akzeptor nach 24 h zu starkem Austrocknen neigte, vor allem bei Formulierungen mit einem geringen Wasser- bzw. D₂O-Anteil, erwies sich eine Verlängerung der Versuchszeit als unpraktikabel.

Tab. 9: Vergleich verschiedener Parameter des Diffusionsexperimentes unter Verwendung von Pferdehufmembranen (MW±SD, blau: p<0,01; rot: p<0,05 vs. der angegebenen Formulierung)

Formulierung C _{EV-086K} [%]	n	C _{24h} [% appl. Dosis]	D _{Pferd} [x10 ⁻⁹ cm ² /s]	t _{lag-Pferd} [min]	linearer Bereich [min]*	J _{Pferd} [μg/cm ² min ⁻¹]	P _{Pferd} [x10 ⁻⁴ cm/min]	
NL	12	2	58 ± 6 ^{HG,L}	4,6 ± 0,8 ^{ME}	83 ± 0,1 ^{ME}	83 - 190 222 - 1440	36,4 ± 0,7 ^L 23,2 ± 0,7 ^L	3,0 ± 0,1 1,9 ± 0,1 ^{L,ME}
HG	10	3	22 ± 9 ^{NL,ME}	3,2 ± 1,6 ^{ME}	124 ± 67	84 - 180	16,1 ± 10,9	1,6 ± 1,1 ^L
L	5,7	3	35 ± 8 ^{NL}	11,3 ± 5,9 ^{ME}	57 ± 18	59 - 200 279 - 1440	25,9 ± 4,1 ^{NL} 4,3 ± 0,9 ^{NL,ME}	4,5 ± 0,7 ^{HG} 0,8 ± 0,2 ^{NL,ME}
ME	10	2	48 ± 6 ^{HG}	11,3 ± 1,2 ^{NL,HG,L}	25 ± 6 ^{NL}	29 - 200	33,3 ± 4,0 ^L	3,3 ± 0,4 ^{NL,L}

* R² ≥ 0,995

Die Diffusion von EV-086K aus der Lösung F11 folgte einem biphasischen Verlauf, wobei vor allem am Anfang des Penetrationsprozesses eine hohe Penetrationsrate existent war. In der zweiten Phase verlief die Diffusion deutlich langsamer, was somit nur zu einer Endkonzentration von 35 % des applizierten EV-086K führte. Das Hydrogel zeigte die größte lag-Zeit und den kleinsten Diffusionskoeffizienten auf. Nach 10 h kam es zu einem erneuten Anstieg der EV-086K-Konzentration im Akzeptor. Jedoch verblieb die Konzentration bis zum Ende des Versuches bei knapp 22 % der applizierten Dosis.

b) Penetration von EV-086K durch Rinderhufmembranen

Betrachtet man nun die Penetrationsergebnisse von EV-086K unter Verwendung von Rinderhufmembranen zeigte sich teilweise ein anderes Bild. Wie aus Abb. 19 hervorgeht, kann durch Applikation der Lösung eine sehr hohe EV-086K-Konzentration von 64 % nach 24 h nachgewiesen werden. Erneut ist ein biphasischer Verlauf erkennbar.

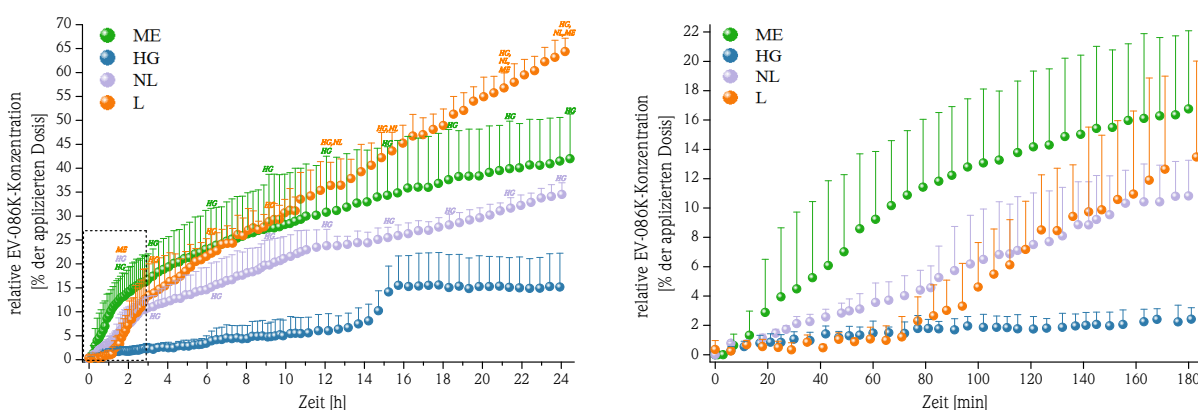


Abb. 19: Links: Vergleich der Penetrationsergebnisse von EV-086K nach Applikation der ME (n=6), des Hydrogels (HG, n=4), des Nagellackes (NL, n=3) und der Lösung F11 (L, n=3) in den Akzeptor der Diffusionszelle unter Verwendung von Rinderhufmembranen bezogen auf die applizierte Dosis (MW±SD, p<0,05 vs. der angegebenen Formulierung). Rechts: Vergrößerter Ausschnitt der ersten 180 min des Diffusionsprozesses.

Das Penetrationsverhalten für EV-086K nach Applikation der ME ähnelt dem wie unter Einsatz der Pferdehufmembranen. Ca. 40 % der applizierten Dosis wurden nach 24 h im Akzeptor quantifiziert und die kürzeste lag-Zeit gegenüber den anderen Formulierungen festgestellt (Tab. 10). Die Verzögerungszeit des Nagellackes verkürzte sich bei diesem Experiment zwar um 30 min im Vergleich zu dem Wert bei den Pferdehufmembranen, aber die Endkonzentration betrug nur noch 35 % von der applizierten Dosis.

Das Hydrogel wies wiederholt eine schlechte Penetrationsrate und eine ausgedehnte lag-Zeit auf. Aus der Diffusionskurve geht hervor, dass sich die EV-086K-Konzentration im Akzeptor nur sehr langsam erhöht. Nach ca. 14 h kam es zu einem plötzlichen Anstieg der Arzneistoffkonzentration, welche nach 16 h schließlich auf einem konstanten Niveau blieb. In diesem Fall wird eine D₂O-Rückdiffusion aus dem Akzeptor vermutet. Dadurch kommt es zunächst zur Erhöhung der scheinbaren EV-086K-Konzentration in diesem. Die tatsächliche EV-086K-Konzentration liegt jedoch unterhalb der gemessenen, da das Volumen des Akzeptormediums abnimmt. Dadurch geht der Kontakt zwischen Akzeptor und Membran verloren und der Diffusionsprozess von EV-086K wird unterbrochen, was folglich an dem Plateau der Diffusionskurve erkennbar ist. Diese Vermutung konnte durch die Intensitätsabnahme der D₂O-Bande bestätigt werden. Der eingebaute und mit D₂O-gesättigte Wattebausch erzielte in diesem Fall keinen Vorteil. In den Pferdehufmembranversuchen konnte dieses Phänomen in diesem Ausmaß nicht beobachtet werden.

Tab. 10: Vergleich verschiedener Parameter des Diffusionsexperimentes unter Verwendung von Rinderhufmembranen (MW±SD, blau: p<0,01; rot: p<0,05 vs. der angegebenen Formulierung)

Formulierung C _{EV-086K} [%]	n	C _{24h} [% appl. Dosis]	D _{Rind} [x10 ⁻⁹ cm ² /s]	t _{lag-Rind} [min]	linearer Bereich [min]*	J _{Rind} [µg/cm ² min ⁻¹]	P _{Rind} [x10 ⁻⁴ cm/min]
NL	12	35 ± 2 ^{HG,L}	3,0 ± 1,0 ^{HG,L}	60 ± 18 ^{ME}	60 - 156 163 - 694	43,9 ± 10,0 ^{HG} 15,4 ± 2,3 ^{HG}	3,7 ± 0,8 ^{HG,L} 1,3 ± 0,2 ^{HG}
HG	10	15 ± 7 ^{NL,L,ME}	0,8 ± 0,6 ^{NL}	290 ± 238 ^{ME}	290 - 760	4,1 ± 1,7 ^{NL,L,ME}	0,4 ± 0,2 ^{NL,L,ME}
L	5,7	64 ± 3 ^{HG,ME,NL}	1,2 ± 0,5 ^{NL}	96 ± 21 ^{ME}	96 - 171 171 - 1440	33,8 ± 6,4 ^{HG} 11,7 ± 0,4	5,9 ± 1,1 ^{NL,HG} 2,1 ± 0,1 ^{HG}
ME	10	42 ± 9 ^{HG,L}	11 ± 10,4	29 ± 9 ^{NL,HG,L}	19 - 79 79 - 324	76,8 ± 35,9 ^{HG} 22,9 ± 8,8	7,7 ± 3,6 ^{HG} 2,3 ± 0,9

* R² ≥ 0,993 außer das HG mit R² = 0,977

Für die Applikation der entwickelten Formulierungen ist es essentiell, dass der Wirkstoff schnell, also mit kurzen lag-Zeiten, und in hohen Konzentrationen in die Nagelplatte transportiert wird, da sie im Alltag nicht länger als 6-8 h auf dieser verweilen. Daher wird sich eine Anwendung über Nacht, wie beim Lack Ciclopoli[®], als vorteilhaft erweisen. Es kann angenommen werden, dass sich hinsichtlich der lag-Zeit sowohl die ME als auch der Nagellack für die Behandlung des Nagelpilzes eignen.

Zusammenfassung und Vergleich beider Experimente

Insgesamt lässt sich feststellen, dass sich das Penetrationsverhalten von EV-086K im Bezug auf die verschiedenen Hufmembranen ähnelt und nur die Penetrationsraten variieren. Die niedrigviskose Lösung zeigte eine höhere Penetrationsrate durch Rinderhufmembranen als durch Pferdehufmembranen. Der zweiphasige Verlauf wurde bei beiden Membranen beobachtet. Auch die Diffusionskurve der ME konnte in beiden Versuchen durch einen sigmoidalen Verlauf beschrieben werden. Aus dem Hydrogel diffundierten in beiden Experimenten nur sehr geringe Arzneistoffmengen in den Akzeptor.

Hinsichtlich der Reproduzierbarkeit ist aus beiden Tabellen 9 und 10 ersichtlich, dass die Experimente mit Rinderhufmembranen öfter durchgeführt werden mussten, um uniforme Ergebnisse zu erhalten (60 % der Versuche waren auswertbar) als mit Pferdehufmembranen. Letztere führten häufiger zu vergleichbaren Ergebnissen, denn 91 % der Versuche waren verwertbar. Möglicherweise könnte die Dauer der Hydratisierung der Membran die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse beeinflussen. Bei einer Zeit von 24 h, wie bei den Pferdehufmembranen angewendet, sind die Rinderhufschritte labil und weich geworden. Dies führte zur Rissbil-

derung in der Membran, vor allem bei dem Einbau in die Diffusionszelle. Daher durften die Rinderhufmembranen maximal 3 h in D₂O eingelegt werden. Jedoch ging die schnelle Hydratisierung auch mit einer schnelleren Trocknung der Membran einher. Bei der zehnmaligen Messung der Schichtdicke der Rinderhufmembranen vor Einbau in die Diffusionszelle konnte beobachtet werden, wie die Membranen sich vom Rand her einrollten. Deshalb mussten die Rinderhufmembranen erneut für kurze Zeit in D₂O getränkt werden, bevor sie schließlich verwendet werden konnten. Es kann angenommen werden, dass innerhalb der Diffusionszelle die Rinderhufmembranen schneller austrockneten als die Pferdehufmembranen und darum eine Rückdiffusion des D₂O aus dem Akzeptor erfolgte. Bei den Pferdehufschnitten wurde dieses Phänomen nicht beobachtet. Die Membranen wiesen im Allgemeinen eine bessere Härte auf. Insgesamt liefern beide Hufmembranen ähnliche Ergebnisse, jedoch wird der Einsatz der Pferdehufmembranen aufgrund der besseren Handhabung und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse empfohlen.

3.5 Penetrationsstudien am menschlichen Nagel

3.5.1 Extraktionsvorversuche

Für die Durchführung von Penetrationsstudien am humanen Nagel ist es notwendig, vorab ein geeignetes Extraktionsmittel zu finden. Ebenso soll in diesem Vorversuch ausgeschlossen werden, dass Bestandteile der Formulierung oder der Nagelplatte sich mit dem Arzneistoffpeak im HPLC-UV Chromatogramm überlagern. Zunächst wurde EV-086K aus der ME und aus dem Nagellack mit Methanol extrahiert. Die Wiederfindungsrate betrug jeweils $103 \pm 1 \%$ (MW \pm SD, $n=3$). Für die Extraktion in Gegenwart von humanem Nagelmaterial wurden Methanol und ein Methanol-Wasser-Gemisch (80/20 %, V/V) als Extraktionsmittel getestet. Die Formulierungen ohne Arzneistoff zeigten nach Extraktion keinen Peak bei der Retentionszeit von EV-086K. Stellvertretend für alle Formulierungen wurde EV-086K aus der ME und aus dem Nagellack nach 24-stündiger Applikation auf dem Nagelmaterial extrahiert. Da beide Lösungsmittel EV-086K vollständig aus dem Nagelmaterial extrahierten (Tab. 11), aber der Arzneistoff in Wasser bei Raumtemperatur Instabilitäten aufzeigte (siehe Kapitel 3.2.2), wird Methanol als Extraktionsmedium für die nachfolgenden Penetrationsexperimente eingesetzt.

Tab. 11: Wiederfindungsraten (WFR) von EV-086K nach Extraktion aus humanem Nagelmaterial bezogen auf die eingesetzte Dosis (MW \pm SD, $n=3$)

Formulierung	Extraktionsmedium (5 ml)	WFR [%]
ME	Methanol 100 %	101,0 \pm 3,1
ME	Methanol/Wasser 80/20 % (V/V)	105,5 \pm 2,9
NL	Methanol 100 %	104,1 \pm 3,8
NL	Methanol/Wasser 50/50 % (V/V)	104,6 \pm 3,1

3.5.2 *Ex vivo* Penetrationsstudien am humanen Nagel

Um nun den Einfluss der Formulierungen auf das Penetrationsverhalten von EV-086K einschätzen zu können, wurden *ex vivo* Penetrationsexperimente am menschlichen Nagel durchgeführt. Hinsichtlich der geringen Verfügbarkeit von menschlichen Nägeln wurden nur drei Formulierungen (ME-EV-086K, Lösung F11 und Nagellack) und eine Applikationszeit von 24 h ausgewählt. Das Hydrogel diente nur als Vergleichsformulierung und kann in den Penetrationsstudien vernachlässigt werden.

Die penetrierten bzw. permeierten EV-086K-Mengen wurden in der dorsalen, intermediären und ventralen Schicht sowie im Akzeptor quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Abb. 20 und Tab. 12 als Anteil der applizierten Dosis dargestellt.

Es ist eindeutig erkennbar, dass die Konzentrationen von EV-086K nach Applikation des Nagellackes (16 %) und der ME-EV-086K (6 %) in der obersten Nagelschicht beträchtlich höher sind als nach Applikation der Lösung F11 (2 %). Betrachtet man die intermediäre Schicht, konnte der Nagellack die höchste EV-086K-Konzentration erzielen, gefolgt von der ME. Allerdings waren die Unterschiede nicht sehr ausgeprägt. In der untersten Schicht konnten bei allen drei Formulierungen nur minimale Konzentrationen detektiert werden.

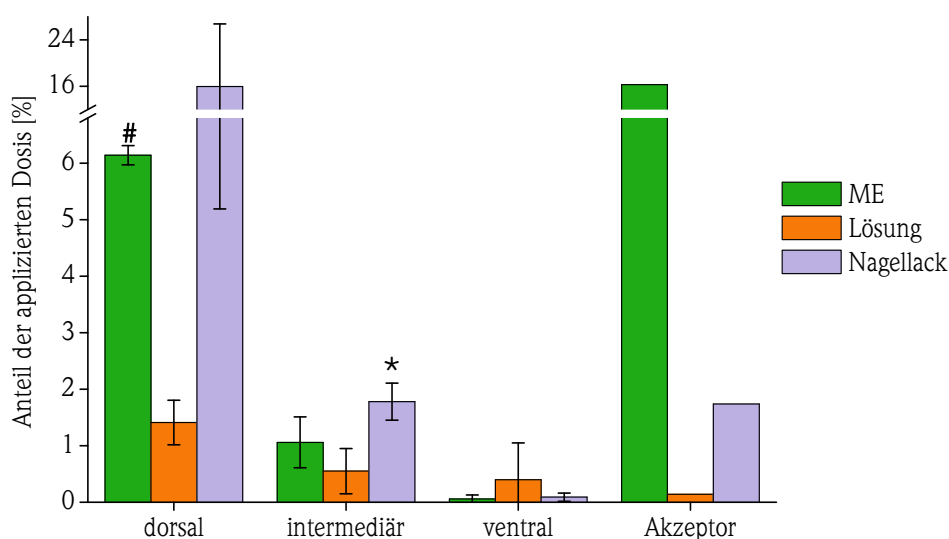


Abb. 20: Vergleich der Penetrationsergebnisse von EV-086K nach Applikation der ME-EV-086K, der Lösung F11 und des Nagellackes in % der applizierten Dosis im Akzeptorkompartiment sowie in der dorsalen, intermediären und ventralen Schicht nach 24 h Inkubationszeit (MW±SD, n=3, Akzeptor n=1, *p<0,01 bzw. p<0,05 vs. Lösung).

Überraschenderweise wurde nach Applikation der ME über 16 % der applizierten EV-086K-Dosis im Akzeptor nachgewiesen. Die beiden anderen Formulierungen zeigten in diesem Kompartiment nur geringe Arzneistoffkonzentrationen. Im Vergleich zur Lösung konnte die ME den lipophilen Arzneistoff in signifikant höheren Konzentrationen in die Nagelplatte transportieren. Insgesamt penetrierten und permeierten 23,5 % EV-086K unter Anwendung der ME und 19,6 % unter Anwendung des Nagellackes. Nach Applikation der Lösung F11 waren es nur 2,5 %.

Die gemessenen Arzneistoffkonzentrationen nach Applikation des Nagellackes waren mit hohen Schwankungen behaftet (Tab. 12). Dies lässt sich vor allem mit einer unvollständigen oder ungleichmäßigen Entfernung der restlichen Formulierung auf der Nageloberfläche (dorsale Schicht) nach Ablauf der Versuchszeit erklären.

Tab. 12: Vergleich der relativen EV-086K-Konzentrationen in den verschiedenen Nagelschichten (MW±SD, n=3, Akzeptor n=1, *p<0,05 vs. Lösung)

Proben	EV-086K als prozentualer Anteil der applizierten Dosis [%]		
	Lösung F11	ME-EV-086	Nagellack
Dorsale Nagelschicht	1,41 ± 0,39	6,14 ± 0,17*	15,96 ± 10,77
Intermediäre Nagelschicht	0,55 ± 0,40	1,06 ± 0,45	1,78 ± 0,33*
Ventrale Nagelschicht	0,40 ± 0,65	0,06 ± 0,07	0,09 ± 0,07
Gesamt-penetrierter Anteil	2,36 ± 0,34	7,25 ± 0,30*	17,84 ± 10,41
Permeierter Anteil (Akzeptor)	0,14	16,27	1,74
Permeierter & penetrierter Anteil	2,50 ± 0,34	23,52 ± 0,31*	19,58 ± 10,41*

Die mittlere Wiederfindungsrate bei allen drei Versuchen betrug $73,0 \pm 3,7\%$. Da die Nageloberfläche größer war als die Applikationsfläche kann angenommen werden, dass die Formulierungen (ausgenommen der Nagellack) über den Versuchszeitraum weiter spreiteten. Dies würde zu kleineren Arzneistoffkonzentrationen bezogen auf die Applikationsfläche führen. Zusätzlich wäre auch eine laterale Diffusion des Arzneistoffes innerhalb der Nagelplatte denkbar, womit dieser analytisch nicht mehr erfasst werden kann [167].

Folgend wurden Tiefenprofile in absoluten Konzentrationen erstellt, um die Verteilung des Arzneistoffes in den einzelnen Nagelschichten betrachten zu können (Abb. 21 - links). Da jedoch unterschiedliche Arzneistoffdosen auf den Nagel appliziert wurden, sind zu Vergleichszwecken ebenfalls die Tiefenprofile bezogen auf die applizierte Dosis dargestellt (Abb. 21 - rechts).

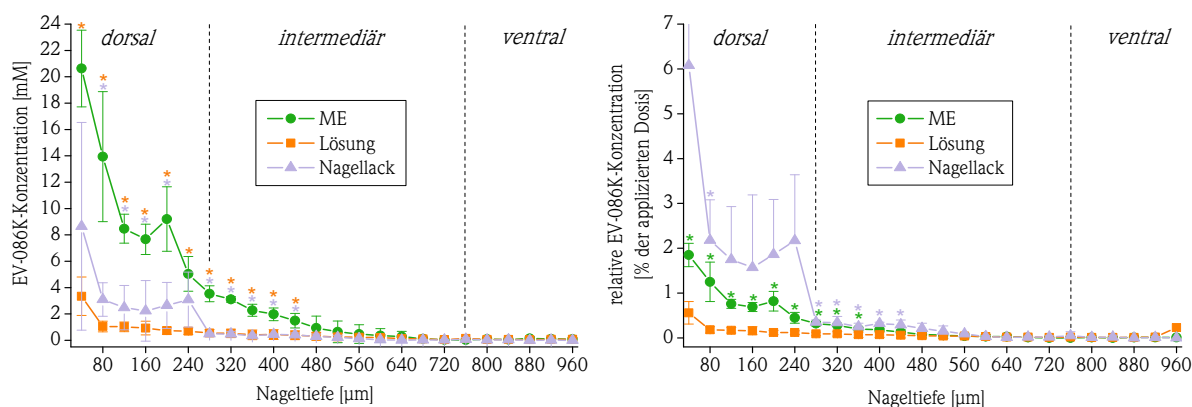


Abb. 21: Vergleich der absoluten EV-086K-Konzentrationen in den einzelnen Nagelschnitten (links; * $p < 0,05$ ME vs. Lösung F11 oder Nagellack) und Vergleich der relativen EV-086K-Konzentrationen bezogen auf die applizierte Dosis (rechts; * $p < 0,05$ ME oder Nagellack vs. Lösung F11) ($MW \pm SD$, $n=3$).

Betrachtet man die absoluten Arzneistoffkonzentrationen, so konnten signifikant höhere Konzentrationen mit Hilfe der ME-EV-086K, vor allem in der dorsalen und in der intermediären Schicht, im Vergleich zum Nagellack und der Lösung erreicht werden. Der Nagellack zeigte nur geringfügig höhere Konzentrationen als die Lösung. In der ventralen Schicht wurde kaum Arzneistoff detektiert. Berücksichtigt man die applizierte Dosis, so erreichte der Nagellack die höchsten EV-086K-Konzentrationen. Aufgrund der hohen Schwankungen kann jedoch keine endgültige Aussage bzgl. der Effektivität des Nagellackes getroffen werden. Die ME zeigte erneut signifikant höhere Konzentrationen im Vergleich zur Lösung.

Die relativ guten Penetrationseigenschaften des Nagellackes legen den Wunsch nahe, diesen mit einem höheren Wirkstoffgehalt zu beladen, um höhere absolute EV-086K-Konzentrationen in der Nagelplatte zu erzielen. Doch aufgrund der bereits erreichten Sättigungslöslichkeit von EV-086K im Lack konnte dies nicht umgesetzt werden. Deshalb scheint die Applikation der ME sinnvoll, da diese aufgrund ihres höheren Wirkstoffgehaltes auch zu höheren Wirkstoffkonzentrationen in der Nagelplatte und im Akzeptor führt.

Obwohl das penetrationssteigernde Potential der Mikroemulsionen weitgehend akzeptiert wird, ist der dazugehörige Mechanismus bis heute nur teilweise aufgeklärt [93]. Zum einen wird eine Erhöhung der thermodynamischen Aktivität diskutiert, welche aufgrund des exzellenten Lösungsvermögens für lipophile Stoffe und der hohen Aufnahmekapazität für hydrophile Stoffe zustande kommt [168-171]. Zum anderen scheint die geringe Viskosität dieser Systeme einen Einfluss auf das Penetrationsvermögen zu haben. Dieser Zusammenhang wurde in Versuchen von HUA et al. [172] bestätigt. Sie zeigten, dass die Permeabilität von Vinpocetin mit abnehmender Viskosität anstieg. Schließlich können auch Fluktuationen der Domänen innerhalb einer ME zu einer höheren Arzneistoffmobilität führen und folglich dessen Diffusion verbessern [169].

Die hohe Penetrationsrate von EV-086K nach Applikation des Nagellackes geht ebenfalls mit einer gesteigerten thermodynamischen Aktivität einher. Nach Verdunstung des Lösungsmittels entsteht ein übersättigtes System, was einen hohen Konzentrationsgradienten zwischen Vehikel und Nagelplatte verursacht.

Gegenwärtig wurden bereits andere neu entwickelte Antimykotika, wie die Benzoxaborole, von HUI et al. untersucht und befinden sich in der späten Phase der klinischen Entwicklung. Diese Bor-haltigen Heterozyklen bieten durch die Hemmung der fungalen Proteinbiosynthese einen neuen Wirkmechanismus an [173]. Eine Penetrationssteigerung des neuen Wirkstoffes Tavaborol (AN-2690) wurde durch Einsatz einer 10 %-igen Lösung aus Propylenglykol und Ethanol im Vergleich zur Ciclopiroxformulierung (Penlac®) sowie zu drei weiteren Tavaborol-haltigen Nagellacken bestätigt. Nach einer 14-tägigen Behandlung mit einer 1-mal täglichen Applikation des Gemisches wurden aber nur 1,7 % der applizierten Tavaborol-Dosis in der dorsalen und intermediären Nagelschicht detektiert. In der ventralen Schicht betrug die Menge 0,7 %. Im Akzeptor konnten nach 14 Tagen 12 % des applizierten Tavaborol gefunden werden [44]. EV-086K erreichte bereits nach 24 h eine Konzentration von 16 % im Akzeptorkompartiment und scheint daher ein höheres Potential bei der Behandlung der Onychomykose zu bieten. Beide Studien sind aufgrund ihres unterschiedlichen Versuchszeitraums (1 Tag vs. 14 Tage), der unterschiedlichen Applikationshäufigkeit und der unterschiedlichen Behandlung der Nagelplatte (20 Schnitte vs. 2 Schnitte) nur eingeschränkt miteinander vergleichbar.

3.6 Vergleich der *in vitro* Penetrationsdaten mit den *ex vivo* Daten

Aufgrund des unterschiedlichen experimentellen Aufbaus ist es schwierig, eine Korrelation zwischen den eingesetzten Hufmembranen und der menschlichen Nagelplatte sowie den erhaltenen Ergebnissen zu etablieren. Um die Experimente besser vergleichen zu können, wurden die Fluxwerte (J) herangezogen (Tab. 13). Es wurden die Endkonzentrationen von EV-086K im Akzeptor aus den FTIR-Studien sowie die permeierten und penetrierten Anteile aus den *ex vivo* Studien herangezogen. Da der menschliche Nagel durchschnittlich zwanzigmal so dick ist wie ein Hufmembranschnitt mit 100 μm , wurden die Fluxwerte der *in vitro* Studien mit dem Faktor 20 dividiert. Ebenso wurden die unterschiedlichen Applikationsflächen bei der Berechnung berücksichtigt.

Tab. 13: Vergleich der Fluxwerte von EV-086K aus den unterschiedlichen Experimenten

Vehikel	$c_{\text{Rind}24\text{h}}$ [% appl. Dosis]	$J_{\text{Rind}/20}$ [% / cm^2h^{-1}]	$c_{\text{Pferd}24\text{h}}$ [% appl. Dosis]	$J_{\text{Pferd}/20}$ [% / cm^2h^{-1}]	$c_{\text{Mensch}24\text{h}}$ [% appl. Dosis]	J_{Mensch} [% / cm^2h^{-1}]	$J_{\text{Rind}/}$ J_{Mensch}	$J_{\text{Pferd}/}$ J_{Mensch}
NL	35 ± 2	0,75 ± 0,05	58 ± 6	1,25 ± 0,13	19,58 ± 10,41	0,41 ± 0,22	1,8	3,1
Lösung	64 ± 3	1,4 ± 0,07	35 ± 8	0,75 ± 0,18	2,50 ± 0,34	0,05 ± 0,01	28	15
ME	42 ± 9	0,9 ± 0,20	48 ± 6	1,05 ± 0,13	23,52 ± 0,31	0,49 ± 0,01	1,8	2,1

(Diffusionsfläche der Diffusionszelle: 0,0962 cm^2 ; Penetrationsfläche der Nagelplatte: 2,01 cm^2 ; Zeit: 24 h, n siehe Tabellen 9,10 & 12)

Insgesamt lässt sich ein höherer Arzneistoffflux durch die tierischen Hufmembranen feststellen als in bzw. durch die Nagelplatte, wie bereits in anderen Arbeiten beschrieben [174]. Betrachtet man die permeierten bzw. penetrierten Konzentrationen oder die Fluxwerte, so zeigen die Experimente unter Verwendung der Pferdehufmembranen und der menschlichen Nägel ähnliche Ergebnisse. In beiden Studien konnten die ME und der Nagellack die höchsten Arzneistoffkonzentrationen im Akzeptor erreichen. Die Lösung zeigte jeweils niedrigere Konzentrationen. Die Experimente mit den Rinderhufmembranen wiesen dagegen eine entgegengesetzte Reihenfolge auf. Die Applikation der Lösung erreichte in diesem Fall die höchsten Arzneistoffkonzentrationen im Akzeptor.

Trotz der höheren Fluxwerte (1,8 - 28mal höher) ist es sinnvoll, FTIR-Studien mit tierischen Membranen, vor allem mit Pferdehufmembranen, durchzuführen, um erste Hinweise auf das Penetrationsverhalten eines Arzneistoffes aus unterschiedlichen Formulierungen zu erhalten. Zukünftig sollten die *in vitro* Experimente mit dünnen Nagelschnitten (100 µm) ergänzt werden, um eine quantitative Korrelation etablieren zu können.

3.7 Zusammenfassung: Moderne Vehikel für die unguale Applikation

Es ist gelungen, für den neuen antimykotischen Wirkstoff EV-086K, aufgrund der umfangreichen Bestimmung seiner physikochemischen Eigenschaften, geeignete und stabile Formulierungen zur ungualen Anwendung zu entwickeln. Es wurde ein moderner Nagellack hervorgebracht, welcher sich mit Wasser einfach abwaschen lässt. Dies ist für die Patienten besonders günstig, da das Abfeilen von Nagellackresten entfällt und somit die Verbreitung von Erregern eingedämmt wird. Weiterhin wurde eine ME entwickelt, welche in der Lage ist, große Mengen an EV-086K zu inkorporieren, ohne dabei ihre speziellen Eigenschaften zu verlieren. Die ME bildet einen dünnen Film auf der Nagelplatte und ist einfach für den Patienten anzuwenden.

Zugleich konnte gezeigt werden, dass es möglich war, hohe Konzentrationen des extrem lipophilen Arzneistoffes in die Nagelplatte penetrieren zu lassen. Dabei konnte besonders die ME gute Penetrationsergebnisse erzielen. Auch der Nagellack zeigte *ex vivo* adäquate Penetrationsraten. Beide Formulierungen waren dem Vergleichsvehikel (Lösung F11) signifikant überlegen.

Der Einsatz der FTIR-Spektroskopie im Zusammenschluss mit der Diffusionszelle erwies sich als eine äußerst effiziente Methode, um die Penetration von EV-086K durch tierische Hufmembranen zu bestimmen. In Folge dessen konnten erste Hinweise auf dessen Penetrationsvermögen aus unterschiedlichen Formulierungen erhalten werden.

Zur Bestätigung der Ergebnisse sollten weitere *ex vivo* Penetrationsuntersuchungen an weiteren Nägeln unterschiedlicher Patienten durchgeführt werden. Auch die Wirksamkeit der Formulierungen und des Arzneistoffes bei erkrankten Nägeln sollte untersucht werden. Ebenso werden klinische Studien und Langzeitstabilitätsuntersuchungen benötigt, um zu entscheiden, ob eine neue Möglichkeit zur Behandlung der Onychomykose geschaffen wurde.

4 PENETRATIONSSTEIGERUNG VON METHOTREXAT ZUR TOPISCHEN BEHANDLUNG DER SCHUPPENFLECHTE

4.1 Motivation und Zielstellung

In der deutschen und in der europäischen Leitlinie (Klasse: S3, gültig bis 31.12.2015) wird Methotrexat (MTX) als konventionelles Arzneimittel zur Langzeitbehandlung der Psoriasis vulgaris (mittelschwere bis schwere Verlaufsform) empfohlen [175, 176]. Aus einer Studie, welche in Deutschland an 1511 Patienten durchgeführt wurde, geht hervor, dass MTX, nach den Fumarsäureestern, von den Dermatologen am häufigsten systemisch eingesetzt wird. Zur topischen Applikation finden hauptsächlich die Glucocorticoide der Klasse III und Calcipotriol Anwendung [177]. Aufgrund irreversibler, unerwünschter Arzneimittelwirkungen wie Hautatrophien oder Teleangiektasien (sichtbar erweiterte Kapillargefäße der Haut) sollte jedoch eine Langzeitanwendung von Glucocorticoiden vermieden werden.

Somit wäre es wünschenswert, den hochpotenten Wirkstoff MTX für die Langzeitbehandlung der Psoriasis vulgaris in eine dermal applizierbare Formulierung transferieren zu können. Einerseits würden die starken Schwankungen hinsichtlich der oralen Bioverfügbarkeit von MTX ($75 \pm 20\%$) und der *First-pass* Effekt umgangen werden. Andererseits könnten die zahlreichen unerwünschten Arzneimittelwirkungen wie u.a. gastrointestinale Beschwerden in Verbindung mit Übelkeit, Erbrechen und Diarrhö sowie Leukopenie und Lebertoxizitäten vermieden werden [178]. Jedoch stellen die physikochemischen Eigenschaften von MTX selbst als auch die hoch geordnete Struktur des Stratum corneums limitierende Faktoren dar, die es scheinbar unmöglich machen, diesen Applikationsweg zu nutzen.

Die folgenden Kapitel beleuchten, welche Möglichkeiten moderne Formulierungen, Enhancer und die Bildung von Ionenpaaren bieten, um die Behandlung der Psoriasis vulgaris mit einer topischen Applikationsform von MTX zu verbessern bzw. deren Therapieoptionen zu erweitern.

Ein alter Arzneistoff geht neue Wege...

4.2 Der hydrophile Arzneistoff Methotrexat

4.2.1 Relevante Fakten zur Pharmakokinetik und Pharmakologie

Seit der Entwicklung der Folsäureantagonisten im Jahre 1948 von FARBER et al. [179] wird der Arzneistoff MTX bis heute als Chemotherapeutikum bei verschiedenen malignen Erkrankungen eingesetzt [180, 181]. Entwickelt wurde MTX von dem indischen Biochemiker und langjährigen Labormitarbeiter der Firma Lederle *Yellapragada Subbarow* [182]. Außerhalb der Onkologie ist MTX seit Jahrzehnten ein bewährtes Therapeutikum für Autoimmunkrankheiten. Bereits im Jahre 1951 berichtete die Arbeitsgruppe um GUBNER über die zusätzliche Wirksamkeit von Folsäureantagonisten, insbesondere Aminopterin, bei Psoriasis vulgaris und rheumatoider Arthritis [183].

Aufgrund der größeren therapeutischen Breite und der besseren Stabilität von MTX im Vergleich zu Aminopterin wurde letzteres in den kommenden Jahrzehnten durch MTX vollständig verdrängt [184]. 1971 wurde MTX von der Food and Drug Administration (FDA) erstmalig in den USA und 1991 in Deutschland (Lantarel®) zur Behandlung der schweren Verlaufsformen der Psoriasis vulgaris zugelassen.

Im Jahre 2013 erfolgte eine zusätzliche Erweiterung des Indikationsgebietes, indem MTX erstmalig in Form einer Fertigspritze weltweit zur Behandlung des Morbus Crohn eine Zulassung erhielt [185]. Im Gegensatz zu onkologischen Indikationen wird MTX bei Autoimmunerkrankungen niedrigdosiert (max. 25 mg / Woche) eingesetzt. Hierbei ist MTX im Allgemeinen gut verträglich und stellt eine Substanz mit einem ausgewogenen Sicherheitsprofil dar [186].

a) Pharmakokinetik

MTX wird oral, intravenös, intramuskulär oder subkutan verabreicht. Eine ausführliche Übersicht über die pharmakokinetischen Daten von MTX befindet sich im Anhang (siehe Kapitel 7.4).

Nach der Resorption im Jejunum [187] erfolgt die Aufnahme in die Zellen hauptsächlich durch aktiven Transport. Zum einen wird MTX über den reduzierten Folattransporter aufgenommen und zum anderen können auch die spezifischen Folatrezeptoren, FR- α und FR- β , MTX in die Zelle transportieren [188]. Die Halbwertszeit (HWZ) von MTX liegt bei ca. sechs Stunden. Interessanterweise zeigten Untersuchungen der Arbeitsgruppe um SEIDEMAN [189], dass die HWZ umso länger wurde, je länger die Probenentnahme erfolgte (Tab. 42). Sogar nach sieben Tagen konnten kleinste MTX-Konzentrationen im Plasma nachgewiesen werden. Dies ist auf die pharmakologische Besonderheit von MTX, der **Polyglutaminierung**, zurückzuführen. Normalerweise würde natives MTX sehr schnell wieder die Zelle verlassen und renal ausgeschieden werden. Durch das Enzym Folypolyglutamatsynthetase werden bis zu vier weitere Glutamatreste an das Molekül gebunden. Diese Polyglutaminierung bewirkt, dass MTX solange in der Zelle verbleibt, bis es wieder als Monoglutamat vorliegt [188, 190].

Die Polyglutaminierung und die Deglutaminierung laufen sehr langsam ab und sind individuell sehr verschieden. Daher tritt die klinische Wirkung bei der Behandlung der Psoriasis vulgaris frühestens nach acht bis zehn Wochen, die maximale Wirksamkeit nach 16 Wochen, ein [191]. Ferner verweilen die MTX-Glutamate nach Absetzen des Arzneistoffes noch bis zu vier Wochen in den Zellen und damit im Körper [190]. Dies erklärt, warum MTX nur einmal wöchentlich gegeben werden muss und warum ein neuer Schub meist verzögert auftreten kann. Auch das unterschiedliche Therapieansprechen der Patienten kann mit dem Ausmaß der Polyglutamat-Bildung, welches von Mensch zu Mensch verschieden ist, teilweise begründet werden [186].

b) Wirkmechanismus

MTX ist ein Analogon der Folsäure und gehört zur Gruppe der Antimetabolite. Strukturell unterscheidet es sich von der Folsäure im Pteridinteil durch eine Amidinstruktur anstelle der Säureamidstruktur an C(4) und durch eine Methylierung an N(10) (Abb. 22) [192].

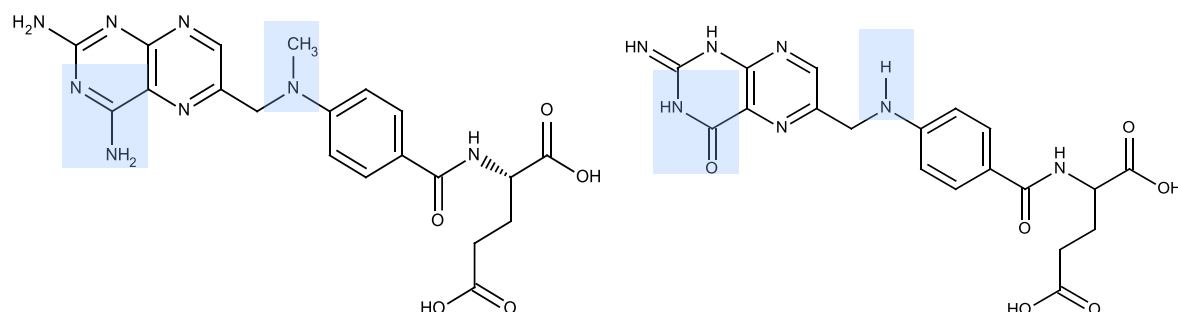


Abb. 22: Chemische Struktur von MTX (links) und von Folsäure (rechts)

Als Antimetabolit hemmt MTX das Enzym Dihydrofolatreduktase (DHFR) und die Thymidylat-Synthase reversibel. Dabei haben die oben erwähnten Polyglutamate einen wesentlich stärkeren Hemmeffekt als das Monoglutamat [193], weshalb MTX auch als Prodrug bezeichnet wird [194].

Die DHFR ist ein Schlüsselenzym für die DNA-Synthese. Durch dessen Hemmung kann die Dihydrofolsäure nicht mehr in die Tetrahydrofolsäure (THF) umgewandelt werden. THF überträgt die C₁-Bausteine bei der Biosynthese von Thymidin und Purinen. Folglich kann bei deren Abwesenheit keine DNA-Verdopplung mehr stattfinden. Besonders proliferierende Zellen, wie epidermale oder maligne Zellen, mit gesteigerter DNA-Synthese werden bevorzugt angegriffen [192]. Daraufhin kommt es zu einer Verlangsamung der pathologisch gesteigerten Keratinozytenproliferation in der psoriatischen Epidermis [195, 196].

Neben dem antiproliferativen Effekt von MTX rückt heutzutage zunehmend ein antientzündlicher Wirkmechanismus in den Fokus. Neben der DHFR inhibiert MTX das Enzym 5-Aminoimidazol-4-Carboxamid-Ribonucleotid (AICAR)-Transformylase, welches für die Herstellung von Purinbasen benötigt wird. Diese Hemmung führt zu einer intrazellulären Akkumulation von AICAR, wodurch die Enzyme des Adenosin-Stoffwechsels AMP-Desaminase und Adenosin-Desaminase blockiert werden [197]. Erhöhte extrazelluläre und intrazelluläre Adenosinspiegel sind die Folge [181, 198-200]. Die antientzündlichen Effekte von Adenosin und die Wirkung auf verschiedene Zellen des Immunsystems, wie Makrophagen und Granulozyten, sind gut belegt: So kommt es zu einer Hemmung des proentzündlichen Transkriptionsfaktors NF- κ B und zu einer gesteigerten Produktion des antientzündlichen Zytokins Interleukin-(IL)-10 [201]. Dadurch wird die Expression von pathogenen Faktoren (z.B. Adhäsionsmolekülen, IL-6, IL-8 und TNF- α) [202-205] als auch die Migration von Entzündungszellen in entzündetes Gewebe gehemmt [200].

Schließlich werden bezüglich der Psoriasis vulgaris gegenwärtig immunmodulatorische Wirkmechanismen vermutet. Dabei diskutiert man einerseits eine Inaktivierung von Makrophagen und eine Hemmung der Produktion von Entzündungsmediatoren [206]. Andererseits konnte in einer *in vitro* Studie von JEFFES et al. [207] aufgezeigt werden, dass MTX eine über tausendfach höhere Affinität zu proliferierenden Lymphzellen (Makrophagen/THP-1) und T-Zellen (MOLT-4) besitzt im Vergleich zu den eingesetzten humanen Keratinozyten. Deshalb wird auch die Proliferation von diesen Lymphzellen gehemmt und deren Apoptose stimuliert.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bis heute noch viele Fragen über den Wirkmechanismus von MTX bei Psoriasis vulgaris offen bleiben. Es ist wahrscheinlich, dass eine Kombination aus dem antiproliferativen, antiinflammatorischen und immunsuppressiven Wirkmechanismus die Wirkung von MTX verursachen [197].

c) Klinische Wirksamkeit

Obwohl MTX seit über 50 Jahren zur Therapie der Psoriasis vulgaris eingesetzt wird, ist die Zahl der qualitativ hochwertigen Studien gering. In der S3-Leitlinie erfüllen nur insgesamt 14 Studien die Einschlusskriterien. Durchschnittlich haben 25 bis 50 % der Patienten am Ende der Induktionsphase von 16 Wochen eine 75 %ige Verbesserung des PASI [54]. In einer Langzeittherapiestudie (n=248, Dauer 1 bis 9 Jahre) erfuhren 90 % der Patienten eine nahezu vollständige bis vollständige Abheilung der Läsionen [208]. Seit 2003 existiert eine moderne, kontrollierte Studie zur Wirksamkeit von MTX im Vergleich zu Cyclosporin A. Dabei erreichten 60 % der Patienten einen PASI 75 und 40 % einen PASI 90. Zwischen den beiden Therapieoptionen ist hinsichtlich der Effizienz kein Unterschied festgestellt worden [197, 209]. In einer anderen großangelegten Studie von 2007 hatten 35,5 % der Patienten einen PASI 75 [210]. Die klinischen Studien und die zahlreichen Publikationen sowie die langjährige klinische Erfahrung belegen die effektive Wirksamkeit von MTX bei der Behandlung der Psoriasis vulgaris.

4.2.2 Methotrexat in der dermalen Anwendung

Aufgrund der ausgeprägten Hepatotoxizität bei der oralen Gabe von MTX sind bislang viele Möglichkeiten versucht worden, MTX über die Haut applizieren zu können (Abb. 23). Eine tabellarische Übersicht über die von 1959 bis 2011 entwickelten Formulierungen bzw. Methoden und durchgeführten Studien sind in der

Veröffentlichung von PRASAD & KOUL sehr umfangreich aufgeführt [211]. Zunächst wurden in den 60er Jahren herkömmliche Vehikel wie Cremes und wässrige Lösungen untersucht. Jedoch zeigten die meisten dieser Studien unbefriedigende Erfolge hinsichtlich der klinischen Wirksamkeit von MTX bei Psoriasis. Ebenso konnte der Einsatz chemischer Penetrationenhancer, wie DMSO, keine Effekte herbeiführen [211]. 1982 wurde erstmalig die Penetration von MTX in Humanhaut (*in vitro*) durch Zusatz von Propylenglykol und Isopropanol im Vergleich zu Wasser oder wässriger DMSO-Lösung gesteigert [196].

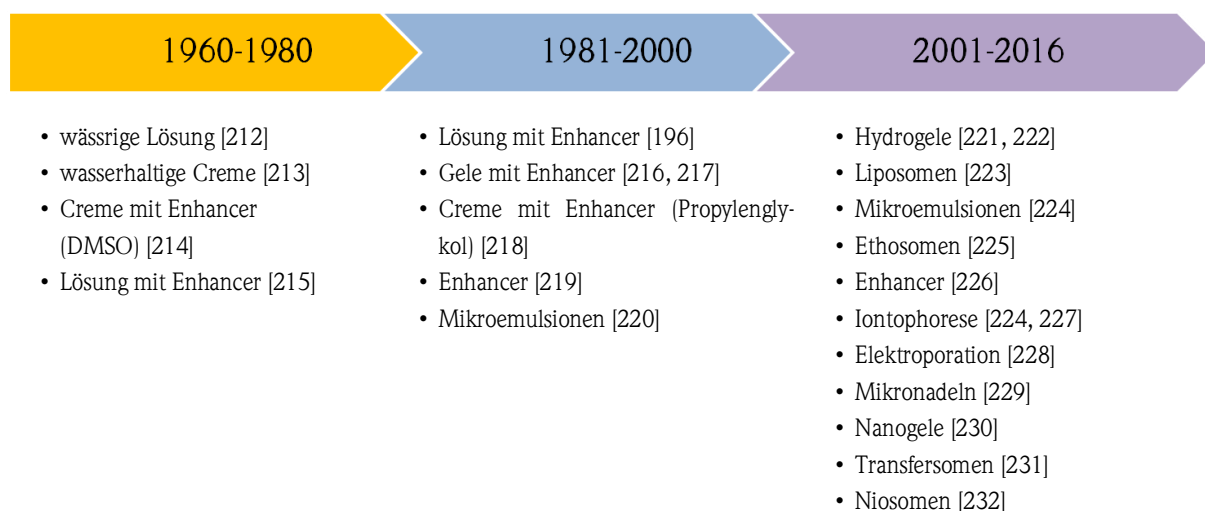


Abb. 23: Meilensteine in der Entwicklung topisch applizierbarer MTX-Formulierungen

In späteren Studien führten Enhancer wie Laurocapram (Azone) in einem Gel und eine optimierte Creme aus Fettalkoholen und Propylenglykol zur Penetrationsverbesserung [216, 218]. Im Jahre 1996 wurde erstmals über eine Permeationssteigerung von MTX durch Einsatz einer ME auf Basis von Lecithin, Propylenglykol und Benzylalkohol und aufgrund von Ionenpaarbildung berichtet. Jedoch sind die erhaltenen Resultate kritisch zu hinterfragen, da die eingesetzten Gegenionen die gleiche Ladung wie MTX aufwiesen und sich daher kein Ionenpaar bilden konnte [220]. Neueste Forschungen über Nanogelee zeigten keine signifikanten Unterschiede zu MTX-gesättigten, wässrigen Lösungen hinsichtlich der Permeation [230]. Auch der Einsatz von deformierbaren Liposomen, den Transfersomen, konnte nur eine geringfügige Steigerung der Permeation bewirken [231].

Physikalische Methoden, wie die Iontophorese, Mikronadeln oder Elektroporation, beeinflussen die dermale Penetration von MTX ebenfalls positiv. Dennoch gibt es bis heute kein MTX-haltiges Präparat zur dermalen Anwendung auf dem Arzneimittelmarkt. Eine Ausnahme stellte lediglich das Rextop® Gel dar - ein 0,25 % MTX-haltiges Gel auf Hydroxyethylcellulosebasis, welches in Indien zugelassen war. Inzwischen wurde dieses Produkt aus unbekanntem Gründen vom Markt genommen. Interessanterweise führte 2001 die Arbeitsgruppe um SYED et al. [221] eine doppelblinde und placebokontrollierte Studie an 60 Psoriasispatienten mit einem MTX-Hydrogel (0,25 %) durch. In dieser wurden sowohl die klinische Wirksamkeit als auch eine gute Verträglichkeit belegt. Penetrationsdaten sind jedoch nicht bekannt.

Viele der o.g. Studien zwischen 2000 und 2015 konnten zwar eine Penetrationssteigerung erzielen, doch oft waren die entwickelten Formulierungen für eine dermale Anwendung hinsichtlich der Verträglichkeit ungeeignet. Hohe Emulgatorkonzentrationen (55-75 %), der Zusatz reizender Stoffe (Azon, Benzylalkohol, DMSO) oder hohe Alkoholgehälter (> 70 %) führen im Allgemeinen zu Irritationen auf der Haut. Deshalb ist es weiterhin notwendig und sinnvoll, an einer potentiellen, effektiven und vor allem auch hautfreundlichen Formulierung für die dermale Applikation von MTX zu forschen, um eine zusätzliche Therapieoption für die Psoriasis vulgaris zu schaffen.

4.2.3 Physikochemische Eigenschaften von MTX

Bei MTX (auch Amethopterin, internationaler Freiname: 4-Amino-4-desoxy- N^{10} -methylfolsäure, Summenformel = $C_{20}H_{22}N_8O_5$) handelt es sich um ein gelbes bis orangefarbenes kristallines Pulver mit einer Molmasse von $454,44 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Der Schmelzpunkt liegt bei 182 bis 189 °C [233]. Das MTX-Molekül besteht aus einem heterozyklischen Anteil (2,4-Diamino-substituierter Pterinring) verknüpft mit einer p -Aminobenzoyl-Einheit, welche wiederum über eine Amidbindung an Glutaminsäure gebunden ist (Abb. 22). Somit weist das Molekül verschiedene pK_s -Werte auf: zum einen 3,4 und 4,7 für die α - und γ -Carboxylfunktion der Glutaminsäure und zum anderen 5,7 für das N-1 des Pteridinringes. Dadurch erklärt sich die pH-abhängige Wasserlöslichkeit von MTX, welche ab einem pH-Wert von 7 zunimmt [234]. In Wasser oder Ethanol ist MTX praktisch unlöslich, in anorganischen Säuren sowie im alkalischen Bereich löslich. Trotz der schlechten Löslichkeit in Wasser stellt MTX ein Molekül mit einer ausgeprägten Hydrophilie dar. Der theoretische Verteilungskoeffizient $\log P$ liegt zwar bei $-0,45 \pm 0,87$ [131], vergleicht man aber die $\log D$ -Werte bei pH 3 und 9, so steigen diese von $-2,95$ auf $-5,19$ [148]. Dies spricht für eine extreme Hydrophilie vor allem im Bereich des physiologischen pH-Wertes.

4.2.3.1 Sättigungslöslichkeiten

Für eine optimale Formulierungsentwicklung mit ausreichend hohen Arzneistoffkonzentrationen und für die Entwicklung von Extraktions- oder Quantifizierungsmethoden sind umfangreiche Kenntnisse über die Löslichkeit von MTX erforderlich. Wie aus Tab. 14 hervorgeht, besitzt MTX nur eine geringe Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln, wässrigen Lösungen und hydrophilen Lösungsmitteln. In Wasser ist MTX praktisch unlöslich.

Die ermittelten Sättigungskonzentrationen zeigen ebenfalls, dass mit steigendem pH-Wert die Löslichkeit von MTX in wässriger Lösung zunimmt. Lediglich bei einem pH-Wert von 3 sinkt die Löslichkeit, da hier das Molekül elektrisch neutral vorliegt (siehe Kapitel 4.2.3.3).

Tab. 14: Sättigungslöslichkeiten von MTX (Säure- und Salzform) in verschiedenen Medien (MW \pm SD, n=3)

Medium	c_s MTX [mg·ml ⁻¹]	Löslichkeit nach Ph. Eur. [124]	c_s MTX-Na [mg·ml ⁻¹]	Löslichkeit nach Ph. Eur. [124]
<i>Organische Lösungsmittel</i>				
Methanol	0,43 \pm 0,03	sehr schwer löslich	6,1 \pm 1,5	wenig löslich
Methanol/Wasser (80:20 %, V/V)	0,46 \pm 0,03	sehr schwer löslich	74,1 \pm 6,2	löslich
DMSO	259,35 \pm 15,9	leicht löslich	<i>n.b.</i>	-
<i>Wässrige Lösungen</i>				
Wasser	0,07 \pm 0,01	praktisch unlöslich	257,8 \pm 0,6	leicht löslich
Citratpuffer pH 2	0,26 \pm 0,03	sehr schwer löslich	80,5 \pm 0,6	löslich
Citratpuffer pH 3	0,14 \pm 0,02	sehr schwer löslich	39,1 \pm 0,3	löslich
Citratpuffer pH 4	0,32 \pm 0,02	sehr schwer löslich	62,9 \pm 3,7	löslich
Phosphatpuffer pH 5	0,24 \pm 0,00	sehr schwer löslich	<i>n.b.</i>	-
Phosphatpuffer pH 5,5	0,47 \pm 0,01	sehr schwer löslich	<i>n.b.</i>	-
Phosphatpuffer pH 6	0,87 \pm 0,02	sehr schwer löslich	<i>n.b.</i>	-
Phosphatpuffer pH 6,4	3,56 \pm 0,02	schwer löslich	<i>n.b.</i>	-
Phosphatpuffer pH 7	10,75 \pm 0,10	wenig löslich	263,2 \pm 1,1	leicht löslich
Phosphatpuffer pH 7,4	13,68 \pm 0,08	wenig löslich	278,2 \pm 2,2	leicht löslich
Phosphatpuffer pH 8	16,12 \pm 0,58	wenig löslich	312,0 \pm 0,7	leicht löslich
Boratpuffer pH 9	18,98 \pm 1,05	wenig löslich	322,8 \pm 1,2	leicht löslich

<i>Hydrophile Lösungsmittel</i>	c_s MTX [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Löslichkeit nach Ph. Eur. [124]	c_s MTX-Na [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Löslichkeit nach Ph. Eur. [124]
1,2-Propylenglykol (PrG)	1,51 ± 0,1	schwer löslich	<i>n.b.</i>	-
1,2-Pentylenglykol (PeG)	0,90 ± 0,0	sehr schwer löslich	<i>n.b.</i>	-
1,2-Hexylenglykol	0,78 ± 0,1	sehr schwer löslich	<i>n.b.</i>	-
1,2-Caprylylglykol	0,15 ± 0,0	sehr schwer löslich	<i>n.b.</i>	-
Wasser/PrG (1:1)	0,30 ± 0,0	sehr schwer löslich	135,9 ± 0,5	leicht löslich
Wasser/PrG/DMSO (1:2:1)	0,29 ± 0,0	sehr schwer löslich	40,5 ± 3,8	löslich
Wasser/PeG (1:2)	0,47 ± 0,0	sehr schwer löslich	61,8 ± 2,8	löslich
Wasser/PeG/DMSO (1:2:1)	0,47 ± 0,0	sehr schwer löslich	50,3 ± 0,7	löslich
Glycerol	14,43 ± 0,4	wenig löslich	<i>n.b.</i>	-
Lutrol® E 300 (PEG 6)	15,03 ± 0,6	wenig löslich	<i>n.b.</i>	-
Lutrol® E 400 (PEG 8)	8,31 ± 0,2	schwer löslich	<i>n.b.</i>	-
Transcutol® P	2,74 ± 0,0	schwer löslich	<i>n.b.</i>	-
Transcutol® P/Wasser (1:1)	0,62 ± 0,0	sehr schwer löslich	29,8 ± 0,8	wenig löslich
Soluphor® P	51,89 ± 2,6	löslich	<i>n.b.</i>	-
<i>Lipophile Lösungsmittel</i>				
Capryol™ 90 (Propylenglykol Monocaprylat Typ II)	0,1 ± 0,0	praktisch unlöslich	<i>n.b.</i>	-
Cetiol® OE (Dicaprylyl Ether)	2,7 ± 0,6	praktisch unlöslich	<i>n.b.</i>	-
Cetiol® LC (Coco- Caprylate/Caprinate)	1,2 ± 0,0	praktisch unlöslich	<i>n.b.</i>	-
Cetiol® B (Dibutyladipat)	1,2 ± 0,1	praktisch unlöslich	<i>n.b.</i>	-
Eutanol® G16 (Hexyldecanol)	1,2 ± 0,0	praktisch unlöslich	<i>n.b.</i>	-
Eutanol® G (2-Octyldodecanol)	1,6 ± 0,1	praktisch unlöslich	<i>n.b.</i>	-
Isopropylmyristat	0,2 ± 0,1	praktisch unlöslich	0,8 ± 0,3	praktisch unlöslich
Isopropylpalmitat	8,6 ± 1,6	praktisch unlöslich	0,8 ± 0,1	praktisch unlöslich
Lauroglycol™ 90 (Propylenglykol Monolaurat Typ II)	0,1 ± 0,0	praktisch unlöslich	<i>n.b.</i>	-
Miglyol® 812	< LoD	praktisch unlöslich	<i>n.b.</i>	-
Octanol	8,2 ± 0,2	praktisch unlöslich	1,0 ± 0,1	praktisch unlöslich
Octanol/Dodecanol (9:1)	6,4 ± 0,8	praktisch unlöslich	3,9 ± 0,9	praktisch unlöslich
Tegosoft® CI (Cetearyl Isononanoate)	0,6 ± 0,1	praktisch unlöslich	6,2 ± 0,1	praktisch unlöslich
Transcutol® P/Tegosoft® DEC (1:1)	109,9 ± 1,3	sehr schwer löslich	27,7 ± 0,3	praktisch unlöslich
Tegosoft® DEC (Diethylhexyl Carbonate)	21,5 ± 3,6	praktisch unlöslich	1,6 ± 0,4	praktisch unlöslich
Varonic APM (PPG-3 Myristyl Ether)	4,8 ± 0,8	praktisch unlöslich	3,5 ± 0,3	praktisch unlöslich
<i>sehr leicht löslich</i>	$> 1000 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	<i>schwer löslich</i>	$1 - 10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	
<i>leicht löslich</i>	$100 - 1000 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	<i>sehr schwer löslich</i>	$0,1 - 1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	
<i>löslich</i>	$33 - 100 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	<i>praktisch unlöslich</i>	$< 100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	
<i>wenig löslich</i>	$10 - 33 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	<i>n.b.= nicht bestimmt</i>		

Ab einem pH-Wert von 7 ist MTX in Konzentrationen über $10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ wenig löslich. Die in der Arbeit von RUBINO et al. angegebenen Löslichkeiten bei pH 5 mit $0,41 \text{ mg/ml}$ und bei pH 7 mit $9,1 \text{ mg/ml}$ [234] sind kongruent zu den hier experimentell ermittelten Werten. Daher empfiehlt sich der Einsatz einer Pufferlösung als hydrophile Phase für Formulierungen mit einem sehr niedrigen Wasseranteil um ausreichend MTX inkorporieren zu können. Als Lösungsvermittler könnten vor allem DMSO, Glycerol oder Soluphor® P eingesetzt werden. Zusätzlich sind kurzkettige Glykole wie Propylenglykol eher geeignet als langkettige Glykole. In allen getesteten lipophilen Medien ist MTX praktisch unlöslich. Die hier durchgeführten Löslichkeitsstudien bestätigen die ausgeprägte Hydrophilie des MTX-Moleküls.

Um zusätzlich die Löslichkeit von MTX zu verbessern, wurde das Dinatriumsalz (MTX-Na) synthetisiert (siehe Kapitel 6.2) und dessen Sättigungslöslichkeit bestimmt. Das MTX-Na zeigte eine deutliche Steigerung der Sättigungskonzentrationen insbesondere in wässrigen Lösungen. Nach der Einteilung des Europäischen Arzneibuches ist MTX-Na in den geprüften Pufferlösungen ab einem pH-Wert von 5 leicht löslich. Die Löslichkeit in lipophilen Medien blieb unverändert. Hinsichtlich der hohen Löslichkeit in wässrigen Medien kann MTX-Na auch in Formulierungen mit einem geringen Wasseranteil eingearbeitet werden.

4.2.3.2 Einteilung in das Biopharmazeutische Klassifizierungssystem (BCS)

Die Bioverfügbarkeit eines Arzneistoffes wird im Wesentlichen von der Löslichkeit und Permeabilität durch biologische Membranen bestimmt. Betrachtet man die niedrige Permeabilität (< 90 % Absorption), so kann MTX nur in die BCS-Klasse III oder IV eingeteilt werden [178, 235]. Die Unterscheidung in einer der beiden Klassen hängt daher nur noch von der Löslichkeit von MTX und von der höchsten verabreichten Dosis ab. Um in Klasse III eingeteilt zu werden, muss die höchste MTX-Dosis in 250 ml wässrigem Medium (pH 1 bis 7,5) vollständig gelöst sein. Bei der schweren Form der Psoriasis vulgaris wird wöchentlich eine Dosis von 2,5 bis 10 mg oral verabreicht [236]. Nach den in dieser Arbeit durchgeführten Löslichkeitsstudien (siehe Kapitel 4.2.3.1) wäre MTX ein Arzneistoff der BCS-Klasse III. Bei der Therapie von onkologischen Erkrankungen sind jedoch weitaus höhere Dosen üblich (25 bis 1000 mg/m² Körperoberfläche). Folglich würde MTX in die Klasse IV eingeteilt werden, wie auch in anderen Studien angegeben [237]. Durch die Verabreichung von hohen MTX-Dosen als Injektions- oder Infusionslösung bei der antineoplastischen Therapie kann eine Bioverfügbarkeit von 100 % erreicht werden. Um MTX vollständig in den Infusionslösungen zu lösen, wird das MTX-Na eingesetzt und dieses zählt aufgrund seiner hohen Löslichkeit zur BCS-Klasse III [238].

4.2.3.3 Bestimmung des Isoelektrischen Punktes

Der Isoelektrische Punkt (IEP) entspricht dem pH-Wert, bei dem ein Stoff (ein sogenanntes Polyion) in einem elektrischen Feld aufgrund seiner intramolekularen Neutralisierung nicht mehr wandert. Die Summe der elektrischen Ladungen ist demzufolge null. Am IEP ist die Wasserlöslichkeit eines Stoffes am geringsten und seine Lipophilie üblicherweise am größten, was einen entscheidenden Einfluss auf den Penetrationsprozess ins Stratum corneum hat [239, 240].

Die CZE erwies sich bis heute als eine geeignete Methode, um den IEP einfach und schnell zu bestimmen [241]. Das Prinzip der CZE beruht auf der Fähigkeit von geladenen Teilchen, in einem elektrischen Feld zu wandern. Dabei kommen sehr dünne Kapillaren mit einer Länge von bis zu 100 cm zum Einsatz, welche den störenden Einfluss thermisch induzierter Konvektion stark vermindern. Durch Anlegen einer hohen Spannung (bis zu 30 kV) können die verschieden geladenen Moleküle einer Probe aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe, Form und Ladung getrennt als auch detektiert werden. Die Probenmoleküle wandern in sogenannten Probenzonen entsprechend ihrer Ladung und Mobilität mit unterschiedlichen Migrationszeiten zur Kathode bzw. Anode. Diese elektrophoretische Wanderung ist immer von dem elektroosmotischen Fluss (EOF) überlagert, welcher nur zum Transport und nicht zur Trennung der Probenzonen beiträgt. Der EOF wird vom pH-Wert des Puffers sowie von der Oberflächenbeschaffenheit der Kapillare beeinflusst. Die Silanolgruppen der häufig eingesetzten Quarzglas kapillaren sind in den meisten Puffern negativ geladen und induzieren positive Ladungen in der Nähe der Wand. Deshalb geht der EOF in Richtung Kathode, weswegen sich auch in diesem Bereich der Detektor befindet. Der EOF kann so groß sein, dass sogar die negativ geladenen Anionen entgegen ihrer elektrophoretischen Migration zur Kathode wandern. Folglich werden zuerst die Kationen, dann die ungeladenen Moleküle und schließlich die Anionen detektiert [242, 243]. Die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit der Ionen und damit die Analysengeschwindigkeit kann durch Erhöhung der Spannung beschleunigt werden.

Die Wanderungsgeschwindigkeit der Ionen bzw. deren Mobilität kann aus der effektiven Aufenthaltsdauer der Probe in der Kapillare zwischen Probenaufgabe und dem Detektor ermittelt werden. Dieser Zusammenhang wird mit Gleichung (2) beschrieben [243].

$$\mu_e = \frac{L_{ges} \cdot L_{eff}}{U} \left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_0} \right) \quad \text{Gleichung (2)}$$

μ_e	elektrophoretische Mobilität [$\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$]	U	Spannung [V]
L_{ges}	totale Kapillarlänge [cm]	t_m	Migrationszeit des Analyten [s]
L_{eff}	Kapillarlänge bis zum Detektor [cm]	t_0	Migrationszeit des EOF (Neutralsubstanz) [s]

Ist die Migrationszeit des Analyten kleiner als die des EOFs, dann werden Kationen mit einer positiven elektrophoretischen Mobilität detektiert. Umgekehrt weisen Anionen eine negative elektrophoretische Mobilität auf. Neutrale Moleküle besitzen die gleiche Geschwindigkeit wie der EOF und die elektrophoretische Mobilität ergibt null. Dementsprechend kann der IEP, durch Messung der elektrophoretischen Mobilität von MTX im Bezug auf den EOF bei verschiedenen pH-Werten, ermittelt werden.

Hierfür wurden Pufferlösungen mit pH-Werten zwischen 3 und 8 hergestellt und jeweils die elektrophoretische Mobilität berechnet. In Abb. 24 ist deutlich zu erkennen, dass bei einem pH-Wert von 3,4 keine Mobilität von MTX ermittelt werden konnte, da ein Wert von null erreicht wird.

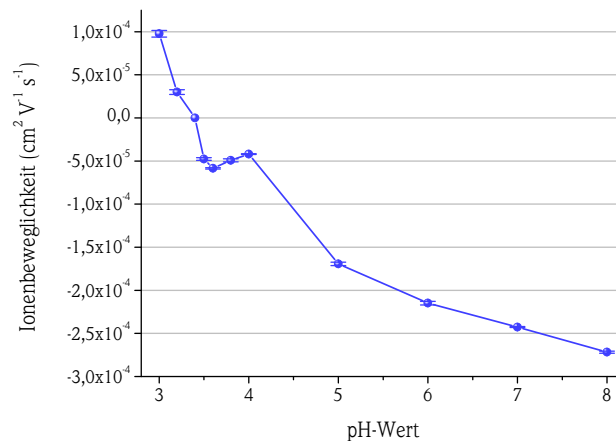


Abb. 24: Elektrophoretische Mobilität von MTX in Abhängigkeit vom pH-Wert (MW \pm SD; n=3)

Unterhalb eines pH-Wertes von 3,4 liegt eine positive Mobilität und folglich MTX als Kation vor; oberhalb eines pH-Wertes von 3,4 als Anion. Mit der Software Marvin Sketch konnte ein IEP von 3,6 errechnet werden, was das gemessene Ergebnis bestätigt. Des Weiteren ist zwischen den pH-Werten 3,6 und 4 ein Plateau erkennbar. Dieses könnte durch die Existenz unterschiedlicher Dissoziationsformen des Moleküls (MTX⁺⁺ MTX⁺ MTX⁰ MTX⁻ MTX⁻) verursacht worden sein. Insgesamt kann man festhalten, dass MTX zur Applikation auf der Haut überwiegend als Anion vorliegt.

4.2.3.4 Verteilungskoeffizient in Abhängigkeit vom pH-Wert

Um Hinweise auf die Verteilung zwischen Formulierung und Stratum corneum bzw. zwei nicht mischbaren Medien zu erhalten, sollte der Verteilungskoeffizient von MTX und MTX-Na bei verschiedenen pH-Werten bestimmt werden. Hierfür wurde der pH-Wert von 4 ausgewählt, da dieser sich in der Nähe des IEP befindet und MTX dort seine größte Lipophilie besitzt. Verteilungskoeffizienten in Lösungen mit pH-Werten kleiner 4 wurden im Hinblick auf eine gute Hautverträglichkeit nicht ermittelt.

Der log D -Wert in einer basischen Lösung (pH-Wert = 9) und am physiologischen pH-Wert wurde ebenfalls bestimmt. Wie aus Tab. 15 hervorgeht, nimmt der Verteilungskoeffizient für MTX (Salz- und Säureform) mit steigendem pH-Wert einen immer negativeren Wert an. Das bedeutet, das MTX-Molekül wird zunehmend hydrophiler. Oberhalb des physiologischen pH-Wertes stagniert der Verteilungskoeffizient von MTX bei einem Wert von -4,1, da die Säureform nahezu vollständig dissoziiert vorliegt. Das Dinatriumsalz hingegen kann aufgrund der besseren Löslichkeit sogar noch hydrophilere Eigenschaften in basischer Lösung annehmen. Andere Wissenschaftler ermittelten in Studien ähnliche log D -Werte: CHATTERJEE et al. erhielten einen log $D_{Octanol/Wasser}$ von $-1,23 \pm 0,03$ [219] und TROTTA et al. einen log $D_{Octanol/Wasser}$ von $-2,05$ [220] für MTX bei einem pH-Wert von 4. Alle experimentell bestimmten Verteilungskoeffizienten bestätigen die ausgeprägte Hydrophile des MTX-Moleküls.

Tab. 15: Log D -Werte von MTX und MTX-Na bei 25 °C (MW \pm SD, n=3)

pH-Wert	log D_{MTX}	log D_{MTX-Na}
4	$-1,77 \pm 0,07$	$-4,35 \pm 0,02$
7,4	$-4,07 \pm 0,09$	$-4,51 \pm 0,11$
9	$-4,13 \pm 0,01$	$-5,18 \pm 0,09$

4.2.3.5 Stabilitätsuntersuchungen

Die Stabilität von MTX wurde über einen Zeitraum von drei Jahren in unterschiedlichen Medien untersucht. Es sollten erste Hinweise auf mögliche Instabilitäten durch den Einfluss des pH-Wertes oder von UV-Licht erhalten werden. Es wurden jeweils drei Chargen hergestellt. Normalerweise würde man für jeden Messzeitpunkt je eine Probe einer Charge einlagern. Damit kann gewährleistet werden, dass die Probe bis zur Prüfung nicht in Kontakt mit der Umgebungsluft kommt und dadurch Oxidationsprozesse begünstigt werden. Jedoch würde dies im Rahmen dieser Arbeit den Materialaufwand unverhältnismäßig steigern, sodass jede Charge nur viermal in Braunglasvials abgefüllt wurde (1., 2., 3. und 4. Anbruch). Der MTX-Gehalt wurde zum einen aus dem geschlossenen Gefäß heraus für vier Zeitpunkte bestimmt (Startwert, 8 Wochen, 52 Wochen und 3 Jahre). Für alle dazwischenliegenden Messungen erfolgte die Quantifizierung aus dem bereits geöffneten Gefäß. Alle Proben wurden bei einer Temperatur von 23 °C und einer relativen Luftfeuchte von 60 % unter Lichtausschluss im Klimaschrank gelagert. Lediglich eine wässrige MTX-Charge wurde bei Raumtemperatur ohne Lichtschutz in Vials aus Weißglas gelagert. Für die Überprüfung der Stabilität wurde aus jeder Charge dreimal eine Probe entnommen, entsprechend verdünnt und mittels HPLC-UV quantifiziert. Um die mikrobielle Stabilität über den gesamten Prüfungszeitraum zu gewährleisten, wurden die wässrigen Proben mit einem 20 %igen Pentylenglykolgehalt hergestellt. Aufgrund der besseren Löslichkeit wurde das MTX-Na verwendet. Nach Einstellung des pH-Wertes kam es jedoch bei den Proben mit pH 3 und pH 4 zu einem Ausfällen des Stoffes, da dessen Löslichkeit unterschritten wurde. Deshalb wurde die Arzneistoffstabilität in einem pH-Bereich von 5 bis 8 untersucht.

Wie man aus Abb. 25 erkennen kann, ist ein neutraler bis leicht basischer pH-Wert optimal für eine Lagerung in wässriger Lösung. Eine Lagerung im Kühlschrank ist nicht erforderlich. Der MTX-Gehalt ist bei den Proben mit einem pH-Wert von 7,4 bzw. 8 nach drei Jahren nicht unter 90 % abgesunken und MTX in diesen Lösungen stabil. Bei einem pH-Wert von 5 wurde diese Grenze schon nach einem Jahr unterschritten. Insgesamt war bei allen Proben der MTX-Gehalt niemals kleiner als 80 %. Zusätzlich kann man erkennen, dass der MTX-Gehalt innerhalb eines Anbruchs stetig abnimmt und somit Oxidationsprozesse durch den Kontakt mit Luft begünstigt werden.

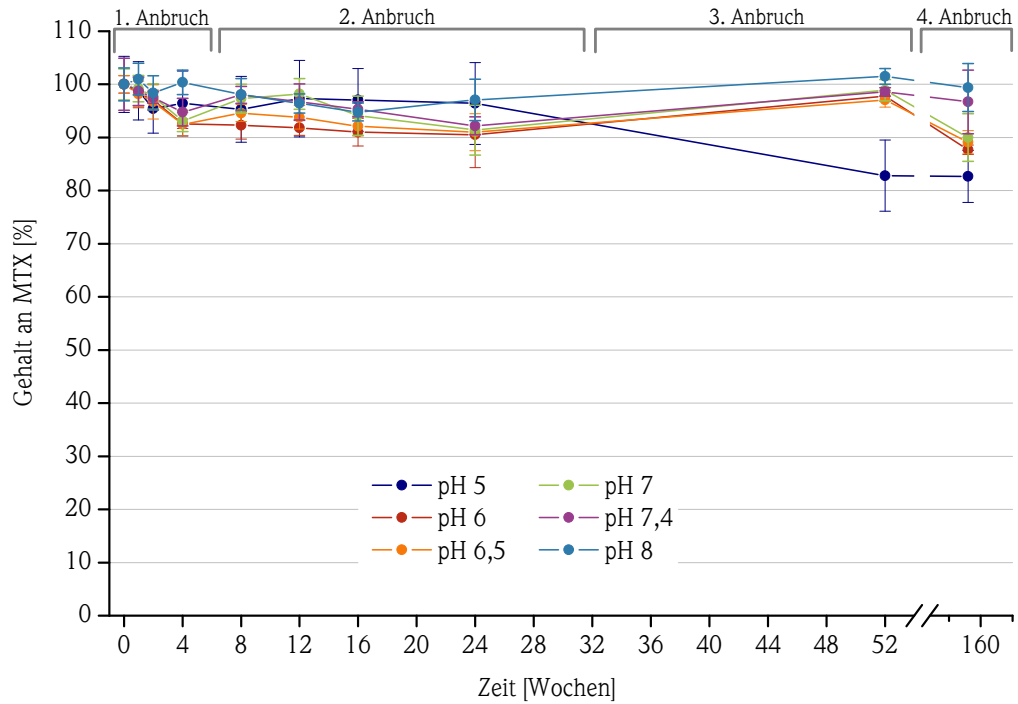


Abb. 25: Stabilität von MTX in wässrigen Lösungen mit verschiedenen pH-Werten bei einer Temperatur von 23 °C (MW±SD, n=9)

Zusätzlich wurde die Stabilität in Wasser unter Einfluss von Licht sowie unter Zusatz des Lösungsvermittlers Soluphor® P (SP) untersucht (Abb. 26). MTX ist in wässriger Lösung bis zu einem Jahr stabil. Der Zusatz von SP hat die Stabilität von MTX nicht negativ beeinflusst. Die Messung der Stabilität unter Lichteinfluss war deshalb interessant, weil allgemein behauptet wird, dass MTX photolabil sei. Es sollte nun herausgefunden werden, wie schnell dieser Zerfall vonstattengeht, um auszuschließen, dass es bereits während langandauernder Experimente oder während der Applikation auf die Haut, zu Abbauprozessen kommt. Überraschenderweise wurde nachgewiesen, dass MTX für mindestens vier Wochen in wässriger Lösung stabil ist (siehe Pfeil in Abb. 26).

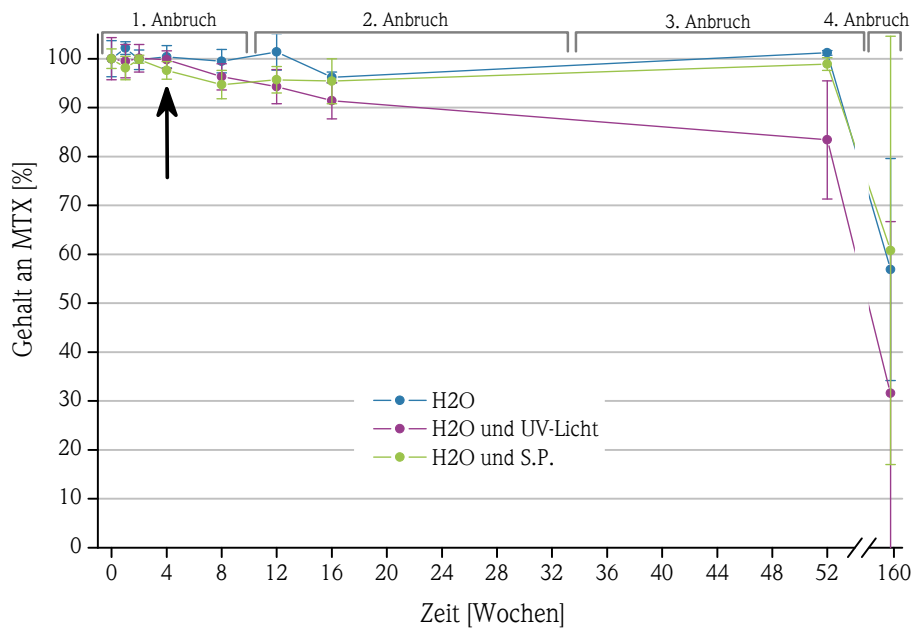


Abb. 26: Stabilität von MTX in Wasser bei einer Temperatur von 23 °C (MW±SD, n=9)

Daher kann MTX problemlos auf die Haut appliziert werden bzw. bei Experimenten mit längeren Versuchszeiten in wässriger Lösung unter Einfluss von UV-Licht verwendet werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass zukünftige Formulierungen, die MTX enthalten, auf einen neutralen pH-Wert eingestellt und vor Luft sowie vor Licht geschützt gelagert werden sollten, um eine lange Stabilität zu gewährleisten. Ebenfalls sollte die Haltbarkeit für bereits geöffnete Gefäße verkürzt bzw. eine Aufbrauchfrist nach Anbruch angegeben werden.

4.3 Untersuchungen an Mikroemulsionen zur dermalen Anwendung von Methotrexat

Hinsichtlich der guten Solubilisierungseigenschaften wie auch dem bekannten und heute akzeptierten penetrationssteigernden Effekt sollten stabile Mikroemulsionen zur dermalen Anwendung von MTX entwickelt und eingesetzt werden. Da oft der hohe Emulgatorgehalt bei Mikroemulsionen eine kritische Komponente darstellt, war das Ziel für die Entwicklung, nur hautfreundliche Emulgatoren in möglichst niedrigen Konzentrationen zu verwenden.

4.3.1 Entwicklung von Mikroemulsionen und Phasendreieck

4.3.1.1 Entwicklung von Mikroemulsionen

In dieser Arbeit sollten sowohl W/O- also auch O/W-Mikroemulsionssysteme entwickelt werden, welche maximal einen Tensidgehalt von 25 % und einen Anteil der kolloidalen Phase von mindestens 5 % aufweisen. Inzwischen findet man in der aktuellen Literatur bereits zahlreiche Mikroemulsionsgemische, welche u.a. auf Polysorbaten, Sorbitanfettsäureestern, Phospholipiden oder Macrogolfettsäureestern basieren [93]. Für die Etablierung eines neuartigen Systems sollte daher der Fokus auf den Einsatz von hautfreundlichen Tensiden gelegt werden. Polyethylenglykol (PEG) oder PEG-Derivate wurden, aufgrund des kontrovers diskutierten Einsatzes in der Kosmetikbranche, nicht verwendet. Insgesamt wurden ca. 400 Mischungen hergestellt, die Emulgatoren wie Betaine, Polyglycerole, Sucroseester (SE), Poloxamere und Propylenglykolfettsäureester beinhalteten. Speziell Gemische aus Sucroseestern mit Polyglycerolen und mit Propylenglykolfettsäureestern erwiesen sich als vielversprechende Kombinationen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst eine ME ausgewählt, welche mit einem Anteil der kolloidalen Phase von 5 % eine O/W- und ebenso eine W/O-Phasenlage ausbilden kann. Die Inhaltsstoffe und deren Zusammensetzung sind in Tab. 16 dargestellt. Aufgrund des enthaltenen SE L-595 (HLB-Wert: 5) wird die ME mit ME-L595-WO bzw. ME-L595-OW bzw. ohne spezifische Zusammensetzung als ME-L595 abgekürzt.

Tab. 16: Zusammensetzung des ME-L595 Systems (Angaben in %, m/m)

Komponente	ME-L595-WO	ME-L595-OW	ME-L595
SE L-595	12,50	10,00	15 - 90
Tego® Care PL4	12,50	10,00	
IPP*	70,00	5,00	5 - 80
Wasser	1,67	25,00	5 - 75
Pentylenglykol	3,33	50,00	

*Cetiol® B und Eutanol® G16 ebenfalls als lipophile Komponente möglich

Der SE L-595 setzt sich aus 30 % Mono- und 70 % Di-, Tri- und Polyestern von Laurinsäure und Saccharose zusammen [244]. Er wurde bereits in Experimenten von LERK als PEG-freier Emulgator mit vielversprechenden Solubilisierungseigenschaften für schlecht wasserlösliche Arzneistoffe entdeckt [245]. Als Co-Emulgator

kam Polyglyceryl-4-laurat (Handelsname: Tego[®] Care PL4, HLB-Wert: 11) zum Einsatz. Isopropylpalmitat (IPP), ein synthetisches Wachs, wurde als lipophile Phase gewählt. Jedoch erwiesen sich auch Cetiol[®] B und Eutanol[®] G16 als geeignete lipophile Komponenten. Die hydrophile Phase setzt sich aus Wasser und Pentylenglykol zusammen. Der Einsatz von Glykolen begünstigt die Ausbildung von Mikroemulsionen, da sie sich in die emulgatorreichen Grenzflächen lagern und für eine bessere Krümmung und Fluidität sorgen [246, 247]. Aufgrund des Wasser-Pentylenglykol-Verhältnisses von 1:2 enthält das dazugehörige O/W-System einen relativ hohen Glykolanteil und könnte zu Irritationen auf der Haut führen. Demzufolge wurde eine weitere ME entwickelt, welche einen Pentylenglykolgehalt von maximal 20 % bezogen auf die Wasserphase besitzt und auf dem SE L-1695 (HLB-Wert: 16) basiert (Bez.: ME-L1695 bzw. ME-L1695-OW):

Tab. 17: Zusammensetzung des ME-L1695 Systems (Angaben in %, m/m)

Komponente	ME-L1695-OW	ME-L1695
SE L-1695	13,75	15 - 40
Lauroglycol [™] 90	6,25	
IPM	5,00	5 - 30
Wasser	60,00	30 - 80
Pentylenglykol	15,00	

Der hier eingesetzte SE L-1695 enthält im Gegensatz zum SE L-595 einen wesentlich höheren Anteil an Monoestern (80 %) und besitzt daher einen HLB-Wert von 16 [248]. Propylenglykolmonolaurat (Handelsname: Lauroglycol[™] 90, HLB-Wert: 5) diente als Co-Emulgator. Als lipophile Phase wurde Isopropylmyristat (IPM) verwendet, da der Einsatz von IPP nicht zur Ausbildung einer ME führte.

In der Literatur sind nur wenige ME-Systeme mit Sucroseestern beschrieben bzw. physikochemisch charakterisiert [249-255]. Ebenso wurden sie teilweise in Kombination mit Alkoholen, zum Beispiel mit Butanol oder Pentanol [256, 257], in Mikroemulsionen eingearbeitet, was für die Hautverträglichkeit nachteilig ist. Die beiden eingesetzten SE zeigten in Untersuchungen kein irritatives Potential und sind somit ideal für hautverträgliche Formulierungen geeignet [249].

4.3.1.2 Pseudoternäre Phasendiagramme

Mikroemulsionen existieren stets in einem begrenzten Konzentrationsbereich eines speziellen Wasser-Öl-Emulgator-Verhältnisses. Für die Darstellung dieses Existenzbereiches wird typischerweise ein Dreiecksdiagramm verwendet [257-259], wobei jeder Ecke eine Komponente zugeordnet wird: Öl, Wasser und Tensid. Da hydrophile Komponenten wie Wasser und Glykole oder die Tenside als gemeinsame Komponente aufgetragen werden, findet der Begriff pseudoternäres Phasendiagramm hier Anwendung.

a) ME-L595-System

Das Phasendreieck der ME-L595 zeigt ein ausgeprägtes isotropes Gebiet (Abb. 27 - hellgrün dargestellt), welches die Ausbildung einer ME indiziert. Der blaue Bereich markiert die Kompositionen, die ein milchiges Erscheinungsbild hatten oder Phasenseparation aufzeigten. Ab einer Konzentration von 55 % Emulgatormischung wurde bei der Herstellung ein Anstieg der Viskosität festgestellt. Es wird vermutet, dass es bei höheren Tensidkonzentrationen zur Ausbildung lamellarer Phasen kommt (siehe Kapitel 4.3.2.2). Interessanterweise konnten mit diesem ME-System verschiedene Phasenlagen erhalten werden. Je nach Mischungsverhältnis sind O/W-, W/O- und bikontinuierliche Mikroemulsionen herstellbar, welche in dem anschließenden Kapitel genauer charakterisiert werden.

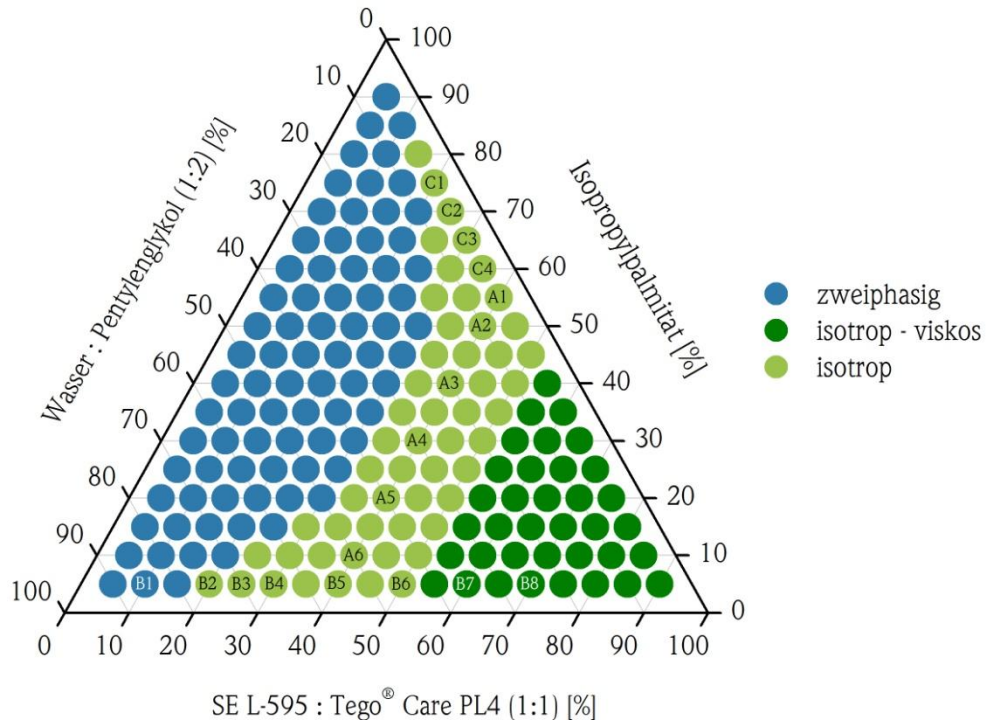


Abb. 27: Pseudoternäres Phasendiagramm des ME-L595-Systems

b) ME-L1695-System

Das Phasendreieck der ME-L1695 wies ein deutlich kleineres isotropes Gebiet auf (Abb. 28). Dies kann vor allem auf den stark reduzierten Glykolgehalt zurückgeführt werden. Des Weiteren konnten einige Mischungen (grau markiert) nicht hergestellt werden, da der Wassergehalt zum Lösen des Emulgators zu gering war. Es wird davon ausgegangen, dass es sich bei allen isotropen Mischungen um O/W-Systeme handelt.

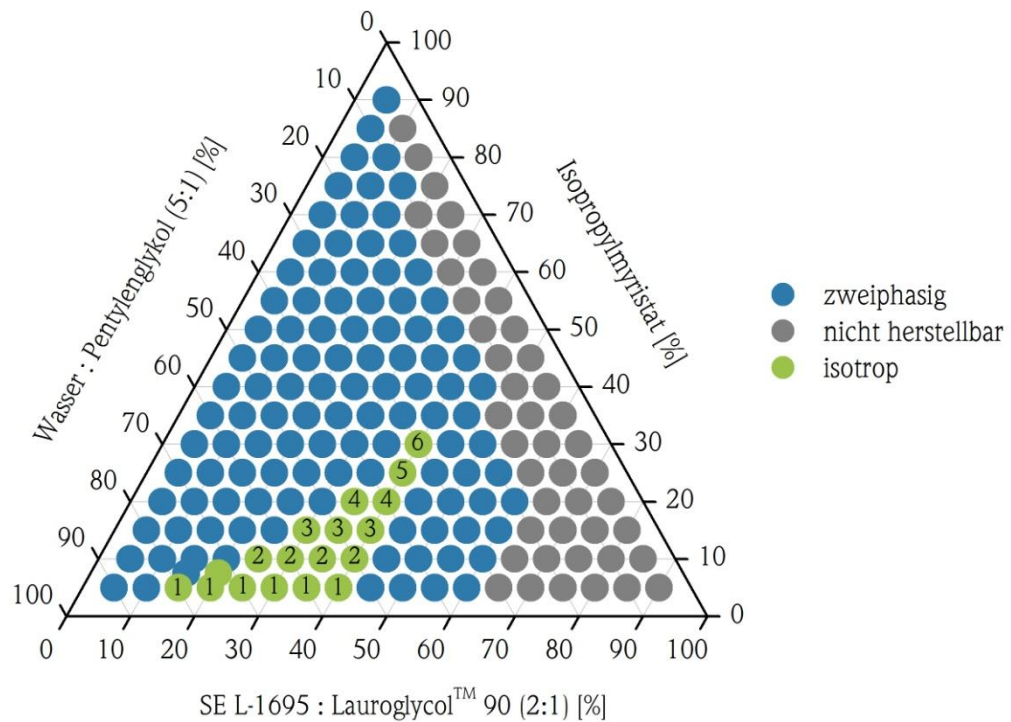


Abb. 28: Pseudoternäres Phasendiagramm des ME-L1695-Systems

4.3.2 Physikochemische Charakterisierung

Da die Erstellung der Phasendiagramme keine Aussage zur Mikrostruktur der entwickelten Systeme liefert, sondern lediglich die einphasigen, isotropen Gebiete markiert, sind weitere Untersuchungen zur physikochemischen Charakterisierung nötig. Mit Hilfe verschiedenster Methoden sollen folgend die verschiedenen kolloidalen Strukturen (O/W-, W/O-, bikontinuierliche ME, lamellare Phasen) identifiziert und die Größe der kolloidalen Phase ermittelt werden. Dafür ist es sinnvoll, festgelegte Dilutionsreihen zu verwenden. Für das System ME-L595 wurden die Reihen A, B und C untersucht, welche auch im Phasendreieck abgebildet sind. Zusätzlich wurden Mischungen außerhalb des isotropen Phasengebietes in die Untersuchungen eingebunden, um die Übergangsgrenze genauer bestimmen zu können. Die Zusammensetzungen sind in Tab. 43 (Anhang 7.6) aufgeführt. Für das System ME-L1695 wurden aufgrund des kleinen Phasengebietes alle isotropen Mischungen in die physikochemische Untersuchung eingebunden (Tab. 17, Anhang 7.6).

4.3.2.1 Konduktivitätsmessungen

Die Eigenschaft, das Wasser den elektrischen Strom leitet, wird häufig genutzt, um die Phasenlage bzw. Phasenübergänge innerhalb eines Mikroemulsionsystems mittels Leitfähigkeitsmessungen zu bestimmen [260, 261]. Demgemäß leitet eine ME vom W/O-Typ den elektrischen Strom kaum, denn nur durch die Bewegung einzelner Tröpfchen kann Ladung transportiert werden. Nimmt der Anteil der Wassertröpfchen innerhalb des Gemisches zu, kommt es zur Ausbildung von zusammenhängenden Gebilden (Clustern), was als Perkolation bezeichnet wird. Entlang dieser Wasserpfade innerhalb des dynamischen Netzwerkes kann der elektrische Strom geleitet werden. Der kritische Wert des dafür benötigten Volumenanteils wird auch als Perkolationsschwelle bezeichnet [262]. Diese geht mit einem starken Anstieg der elektrischen Leitfähigkeit κ einher. Trägt man folglich κ gegen die Wasserfraktion ϕ_w in einem Diagramm auf und bildet die 1. Ableitung, stellt das daraus resultierende Maximum die Perkolationsschwelle dar [263].

a) ME-L595-System

Betrachtet man zunächst die gemessenen Leitfähigkeiten der Dilutionsreihen A und B des ME-L595-Systems (Abb. 29), so nimmt die elektrische Leitfähigkeit mit steigendem Wasseranteil zu. Bei den Proben der Dilutionsreihe A (konstanter Tensidgehalt von 40 %) kann ein starker Anstieg der Leitfähigkeit ab einer Wasserfraktion von 10 % (\triangleq 30 % hydrophile Phase) beobachtet werden.

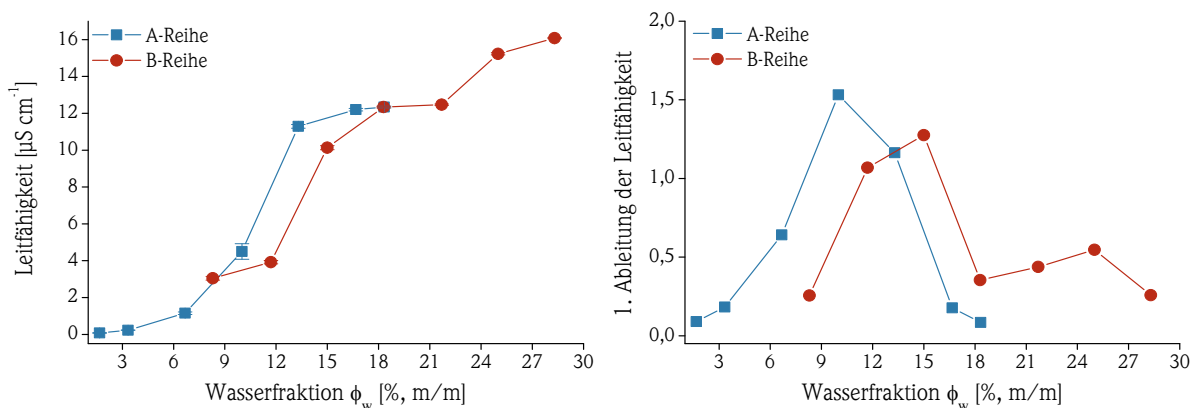
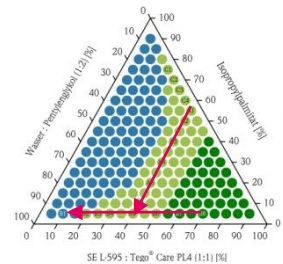


Abb. 29: Links: Elektrische Leitfähigkeit als Funktion der Wasserfraktion entlang der Dilutionsreihe A und B ($MW \pm SD$, $n=3$, gemessen bei 25 °C). Rechts: Darstellung der 1. Ableitung gegen die Wasserfraktion.

Der Wendepunkt und das Maximum der 1. Ableitung zeigen eine deutliche Perkolationschwelle. Es kommt zur Ausbildung stromleitender Wasserkanäle und zu einem Übergang von einem W/O- zu einem bikontinuierlichen System [260]. Da die Probe mit 10 % Wasser (Probe A4) sich genau im Zentrum des pseudoternären Phasendiagramms befindet, bestätigt das erhaltene Ergebnis die Vermutung von einem bikontinuierlichen Charakter. Erhöht man den Wasseranteil im System weiter, bleibt die Leitfähigkeit ab einer Wasserfraktion von 13,3 % auf einem hohen Niveau relativ konstant. Es wäre denkbar, dass die Tensidmoleküle nun vollständig hydratisiert sind und eine Erhöhung des Wassergehaltes keinen weiteren Einfluss auf die Konduktivität hat. Ein Übergang zur O/W-Phase war zwar nicht messbar, ist aber ab 13,3 % Wasserfraktion (entspricht einem Anteil der hydrophilen Phase von 40 %) wahrscheinlich.

Die gemessenen Leitfähigkeiten der Dilutionsreihe B scheinen ebenfalls sehr interessante Aspekte aufzuweisen. Die Kurve der 1. Ableitung zeigt sogar zwei Maxima auf. Das erste Maximum und somit ein deutlicher Anstieg der Leitfähigkeit tritt ab einer Wasserfraktion von 15 % (\cong 45 % hydrophile Phase, Probe B6) auf. Dies könnte auf einen Übergang von einer lamellaren Phase zu einer bikontinuierlichen oder O/W-ME hinweisen [261]. Das Wasser ist nahezu vollständig in die lamellaren Strukturen eingebunden und konnte erst durch Erhöhung der Wasserfraktion wieder stromleitende Bahnen ausbilden. Die Ausbildung von lamellaren Phasen unter der Verwendung von Sucroseestern in Mikroemulsionen konnte bereits in anderen Arbeiten beobachtet werden [252]. Das zweite, aber kleinere Maximum tritt bei einem Volumenanteil von 25 % Wasser auf. Dies lässt vermuten, dass erst in diesem Bereich eine tröpfchenartige ME vom O/W-Typ existiert und diese aus einer bikontinuierlichen Struktur hervorgegangen ist.

Für die vier Proben der Dilutionsreihe C konnte nur eine sehr niedrige elektrische Leitfähigkeit von $0,07 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ gemessen werden. Durch den geringen Anteil an Tröpfchen kann ein minimaler Teil der Ladung im Vergleich zu der reinen Ölphase transportiert werden. Folglich liegen in diesem Bereich Mikroemulsionen vom W/O-Typ vor.

b) ME-L1695-System

Die gemessenen Leitfähigkeiten aller isotropen Mischungen des ME-L1695-Systems sind in Abb. 30 dargestellt. Zunächst lässt sich feststellen, dass alle Proben sich durch hohe Leitfähigkeiten kennzeichnen und es sich vermutlich um O/W-Systeme handelt. Das Wasser bildet die äußere kontinuierliche Phase, in der die lipophile Phase dispergiert vorliegt. Es konnte kein starker Anstieg der Konduktivität oder ein Maximum beobachtet werden, welches auf eine Perkolation hinweisen könnte.

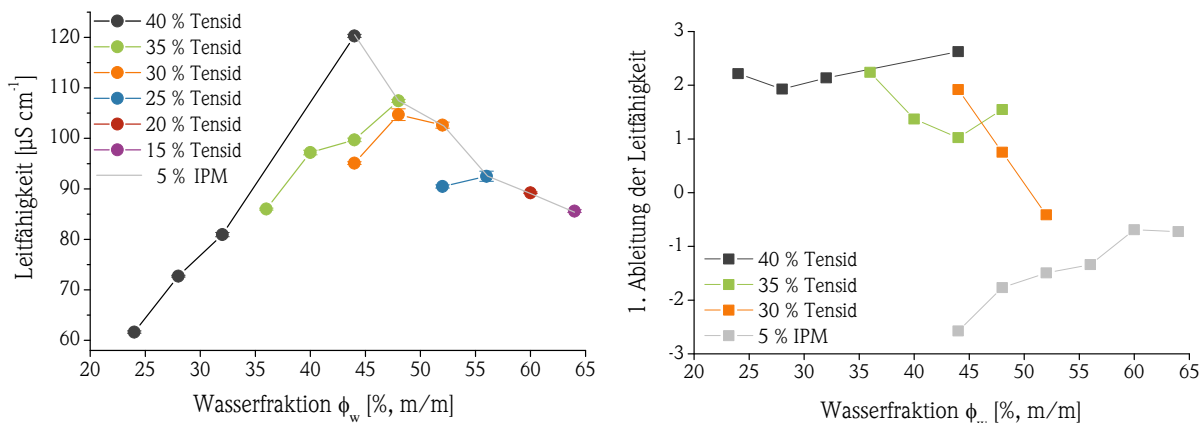
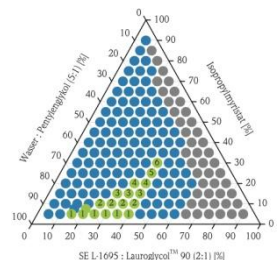


Abb. 30: Links: Elektrische Leitfähigkeit als Funktion der Wasserfraktion aller isotropen Mischungen (MW \pm SD, n=3, gemessen bei 25 °C). Rechts: Darstellung der 1. Ableitung gegen die Wasserfraktion.

Aus diesem Grund konnte ein Übergang zu anderen Strukturen (bikontinuierlich oder flüssig-kristallin) mit Hilfe der Leitfähigkeit für dieses System nicht nachgewiesen werden. Mit steigendem Tensid-, jedoch mit sinkendem Wassergehalt nimmt die elektrische Leitfähigkeit zu. Folglich besitzt die ME aus 40 % Tensid, 55 % Wasser und 5 % Öl die größte Konduktivität. Dies lässt sich damit erklären, dass wahrscheinlich herstellungsbedingt das Tensid ionische Bestandteile enthält, die den elektrischen Strom leiten. Innerhalb einer Tensidreihe mit gleichbleibendem Tensidgehalt kommt es durch Erhöhung des Volumenanteils von Wasser zu einem Anstieg der Konduktivität. Jedoch wird auch in diesem Fall kein Maximum erreicht. Die gemessenen Konduktivitätswerte des ME-L1695-Systems ($> 60 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) waren deutlich höher als die des ME-L595-Systems ($< 16 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$), was auf den deutlich höheren Wasseranteil zurückzuführen ist.

Zusammenfassung

Es konnte festgestellt werden, dass die isotropen Mischungen des ME-L595-Systems je nach Lage im Phasendreieck, W/O-, bikontinuierliche oder O/W-Charakter aufweisen können. Durch Messung der Leitfähigkeit konnten weitere Hinweise auf die Existenz einer lamellaren Phase erhalten werden. Das ME-L1695-System dagegen scheint nur Mikroemulsionen vom O/W-Typ auszubilden.

4.3.2.2 *Polarisationsmikroskopie*

Zur Unterscheidung verschiedener kolloidaler Strukturen kann man die Polarisationsmikroskopie einsetzen. Da bei einigen Mischungen des ME-L595-Systems hohe Viskositäten festgestellt wurden, wird angenommen, dass sich bei höheren Tensidkonzentrationen flüssig-kristalline Phasen ausbilden. Die eingesetzten SE zeigen ebenfalls, aufgrund ihrer Kristallstruktur, ein typisches Bild unter dem Einfluss von polarisiertem Licht (Abb. 31-A) und es wäre möglich, ungelöste Partikel zu detektieren. Alle Proben des ME-L595-Systems mit einem Tensidgehalt zwischen 20 und 75 % wiesen im Polarisationsmikroskop isotrope Strukturen auf (Abb. 31-B). Erst bei Tensidgehalten über 80 % (Proben ME-L595-85%-1 und ME-L595-80%-1) wurden anisotrope Strukturen beobachtet. Diese zeigten eindeutig Malteserkreuze (Abb. 31-C) und können den lyotropen flüssig-kristallinen Mesophasen (lamellar) zugeordnet werden [264, 265]. Die Proben, welche isotrop waren und trotzdem eine erhöhte Viskosität aufzeigten, könnten Gemische aus tröpfchenförmigen, bikontinuierlichen oder lamellaren Strukturen darstellen.

Bei den Proben des ME-L1695-Systems handelte es sich mehrheitlich um isotrope Strukturen. Lediglich die Proben 40 %-5 und 40 %-6 zeigten vereinzelt Malteserkreuze (Abb. 31-D). Möglich wäre, dass auch in diesem Fall tröpfchenartige und lamellare Strukturen koexistieren.

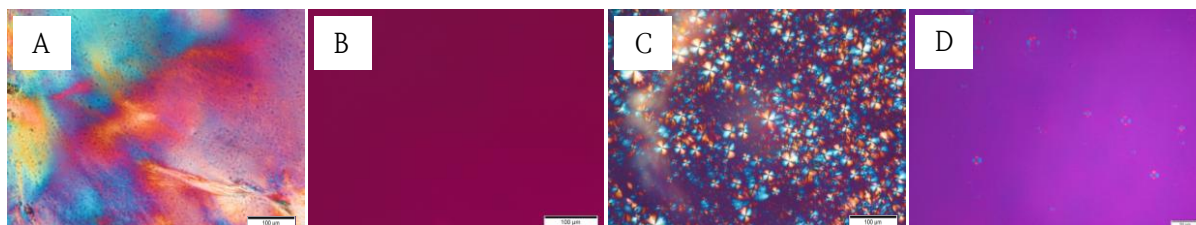


Abb. 31: Aufnahmen mit dem Polarisationsmikroskop des festen Sucroseesters L-595 (A), einer isotropen ME (B), der ME-L595-85%-1 (C) und der ME-L1695-40%-6 (D) mit 200facher bzw. 500facher Vergrößerung

4.3.2.3 *Dichte*

Die Dichte der ME-L1695-OW betrug $1,006 \pm 0,001 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$; der ME-L595-OW $1,002 \pm 0,001 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ und der ME-L595-WO $0,963 \pm 0,008 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ (MW \pm SD; $n=3$). Die mittlere Dichte der niedrig-viskosen isotropen Mischungen beider ME-Systeme betrug $1,007 \pm 0,011 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Aufgrund der niedrigeren Dichte von IPM bzw. IPP im Vergleich zu Wasser nahmen die Dichten der Mischungen mit zunehmendem Ölanteil ab [266].

4.3.2.4 Viskositätsuntersuchungen

Im Allgemeinen haben Mikroemulsionen eine niedrige Viskosität in einem Bereich von 10 bis 150 mPa·s [255-257], wodurch sie sich leichter auf die Haut applizieren lassen, z.B. mit einem geeigneten Sprühsystem, um eine gute Spreitung auf der Haut zu ermöglichen. Bei der Erstellung der Phasendiagramme war jedoch bereits aufgefallen, dass die Viskositäten der isotropen Mischungen stark variierten. Vor allem bei dem System ME-L-595 erreichten die tensidreichen Mischungen eine fast gelartige Konsistenz. Durch Bestimmung der Viskosität kann eine ME deutlich von anderen isotropen Fluiden wie flüssigkristallinen Phasen oder Gelen abgegrenzt werden. Lamellare Strukturen z. B. weisen eine erhöhte Viskosität und scherverdünnendes Fließverhalten auf [261]. Weiterhin ist es möglich, durch die Bestimmung der Viskosität Übergänge von tröpfchenartigen zu bikontinuierlichen Systemen zu identifizieren [255, 267, 268]. Die Viskosität der O/W- oder W/O-Mikroemulsionen sollte im Vergleich zu bikontinuierlichen Mikroemulsionen bezüglich des sphärischen Aufbaus folglich niedriger sein.

Demzufolge wurde zum einen die kinematische bzw., unter Berücksichtigung der Dichte, die dynamische Viskosität unter Einsatz eines UBBELOHDE Viskosimeters bestimmt. Zum anderen wurde mit einem Rotationsviskosimeter durch Veränderung der Scherrate ermittelt, ob idealviskoses Fließverhalten vorliegt. Beide Messmethoden lieferten vergleichbare Ergebnisse.

b) ME-L595-System

Betrachtet man die Viskositäten des ME-1595-Systems (Abb. 32), ist festzustellen, dass mit sinkender Wasserfraktion oder mit steigendem Emulgatorgehalt die Viskositäten anstiegen. Für fast alle Proben lagen die gemessenen Viskositätswerte in dem üblichen Bereich für Mikroemulsionen. Da Pentylenglykol eine Viskosität von 135 mPa·s besitzt und bei diesem System in einer dreimal höheren Konzentration in der hydrophilen Phase enthalten ist als in dem ME-L1695-System, ergeben sich insgesamt höhere Viskositätswerte (30 bis 400 mPa·s) [269].

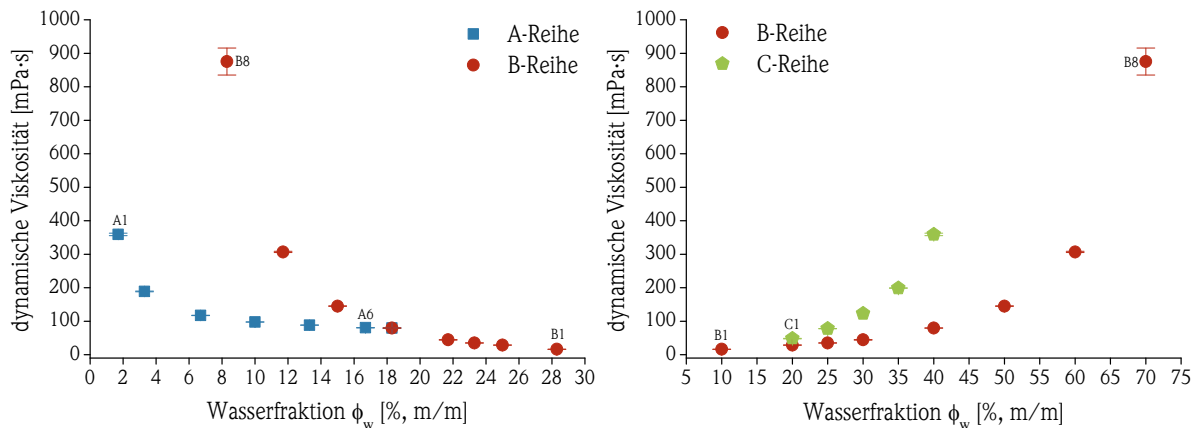
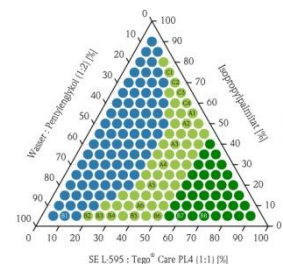


Abb. 32: Dynamische Viskosität der isotropen Mischungen des ME-L595-Systems in Abhängigkeit von der Wasserkonzentration (links) und Emulgatorkonzentration (rechts) ($MW \pm SD$, $n=16$)

Die Probe B-1 lag außerhalb des isotropen Phasengebietes und zeigte eine sehr geringe Viskosität von 16 mPa·s. Ein Übergang zur isotropen Phase (Probe B-2) war nicht erkennbar. Ein sehr starker Anstieg der Viskosität auf einen Wert von 850 mPa·s konnte bei Probe B-8 (Wassergehalt 8,3 %; Emulgatorgehalt 70 %) beobachtet werden. Bei dieser Probe handelt es sich wahrscheinlich um eine flüssigkristalline Phase.

Ob sich ein Fluid idealviskos verhält, kann mit Hilfe eines Rheogramms überprüft werden. Trägt man die Scherrate $\dot{\gamma}$ (auch Schergeschwindigkeit, früher D) über die Schubspannung τ auf, erhält man für idealviskose Flüssigkeiten eine Gerade. Die erhaltenen Rheogramme (Abb. 33 - links) lassen zunächst vermuten, dass alle

Proben NEWTONSCHES Fließverhalten besitzen. Es ist jedoch auch erkennbar, dass die Anstiege der Geraden mit steigender Tensidkonzentration abnehmen (B-1 zu B-8) und sich die Viskosität, besonders bei der Probe B-8, stark erhöht. Trägt man nun die Viskosität in Abhängigkeit von der Scherrate auf (Abb. 33 - rechts, Abb. 34), sollte diese bei idealviskosen Fluiden unabhängig von der Scherrate sein.

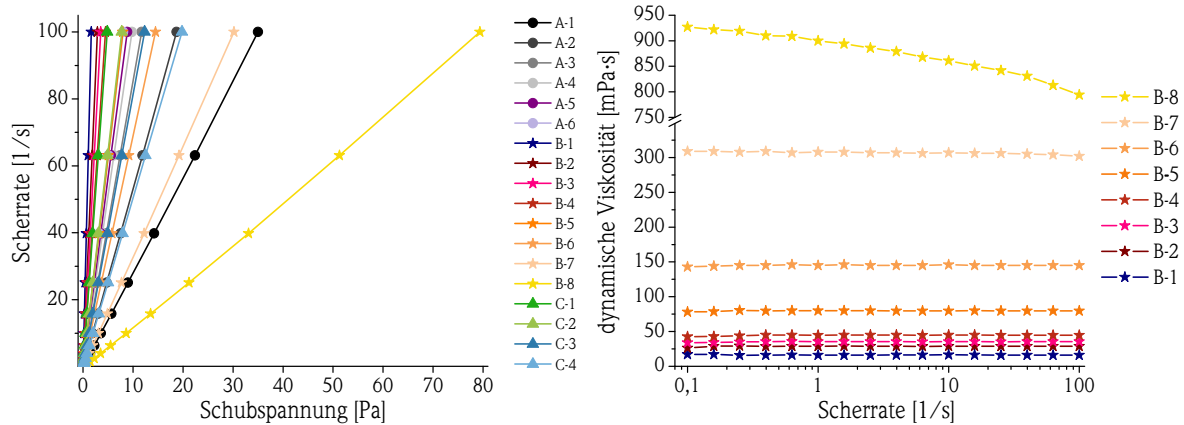


Abb. 33: Links: Rheogramm bzw. Rechts: Viskositätskurven der isotropen Mischungen der B-Reihe des ME-L595-Systems in Abhängigkeit von der Scherrate bei 25 °C (Messung bei 16 verschiedenen Scherraten)

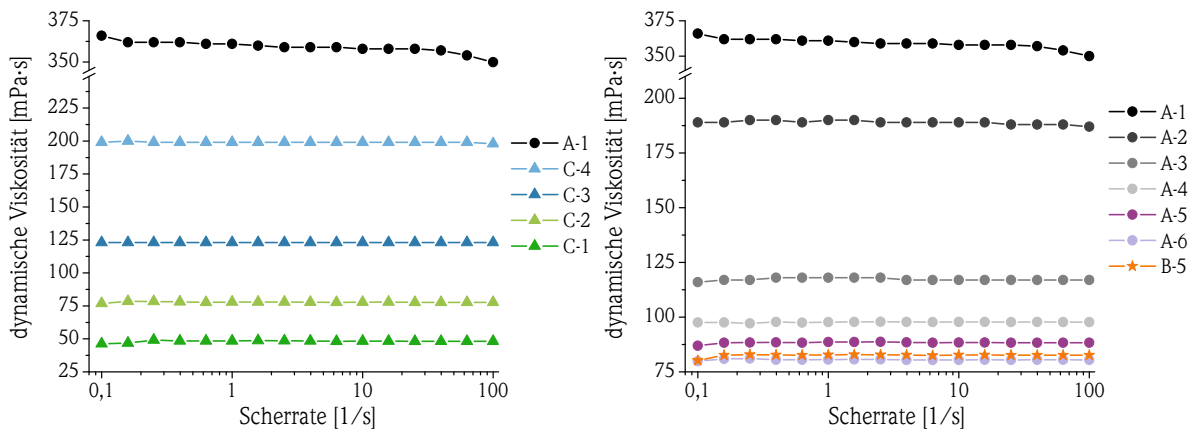


Abb. 34: Viskositätskurven der C-Reihe (links) und der A-Reihe (rechts) des ME-L595-Systems in Abhängigkeit von der Scherrate bei 25 °C (Messung bei 16 verschiedenen Scherraten)

Diese Bedingung erfüllen fast alle gemessenen Proben. Betrachtet man jedoch die Viskositätskurve der Probe B-8, so nimmt die Viskosität mit steigender Scherrate ab. Diese Scherverdünnung könnte ein Hinweis auf eine lamellare Phase sein, wie es in der Arbeit von SADTLER et al. [267] beschrieben wurde. Die Probe B-7 wies zwar keine scherverdünnenden Eigenschaften auf, aber eine hohe Viskosität von über 300 mPa·s. Möglicherweise könnte es sich auch in diesem Fall um eine L_3 -Phase (bikontinuierliche Struktur oder Schwammphase) handeln, da diese Systeme ebenso idealviskoses Fließverhalten besitzen können [255]. Für die Probe A-1 (Abb. 34) wurden Viskositäten von über 350 mPa·s gemessen. Ein idealviskoses Fließverhalten konnte nicht zweifelsfrei festgestellt werden. Die gemessenen Viskositäten der Proben A-2 und C-4 lagen ebenfalls außerhalb des typischen Bereiches für Mikroemulsionen. Insofern kann man annehmen, dass es sich bei den isotropen Mischungen A-1, A-2, B-7, B-8 und C-4 um lamellare Strukturen oder bikontinuierliche Systeme handelt. Alle anderen isotropen Mischungen der A-, B- und C-Reihe, inklusive der für spätere Experimente ausgesuchten ME-L595-WO (C-2), zeigten niedrige Viskositäten, welche mit den Angaben in der Literatur vergleichbar waren [256]. Bei diesen Mischungen kann man davon ausgehen, dass es sich um niedrig-viskose, monokontinuierliche Systeme mit Mikroemulsionscharakter handelt.

b) ME-L1695-System

Aus Abb. 35 (links) kann man sehr gut erkennen, dass die dynamische Viskosität mit steigendem Wassergehalt bei allen Tensidkonzentrationen abnimmt. Durch die niedrige Viskosität des Wassers mit 1,0087 mPa·s wird die kontinuierliche Phase erhöht und die gesamte Mischung fließfähiger. Betrachtet man die Zunahme des Emulgatoranteils bei gleichbleibender Ölkonzentration (Abb. 35 - rechts), so steigt die Viskosität an. Der SE ist ein Feststoff und erhöht die Viskosität. Die Viskositäten aller isotropen Mischungen und der ME-L1695-OW (20%-1) mit einer Viskosität von $12,59 \pm 0,21$ mPa·s liegen in einem Bereich von 5 bis 160 mPa·s [256, 257].

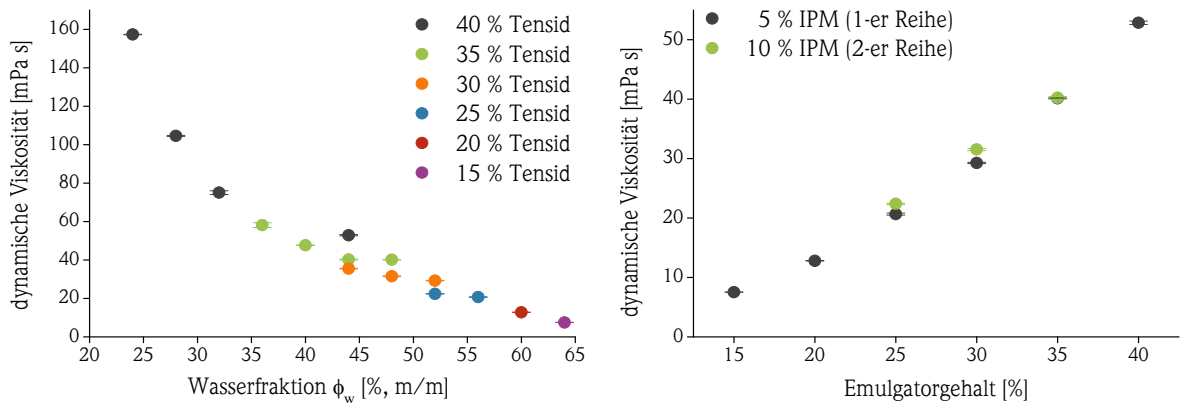
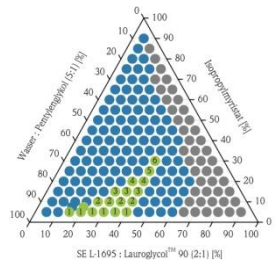


Abb. 35: Dynamische Viskosität der isotropen Mischungen des ME-L1695-Systems in Abhängigkeit von der Wasserkonzentration (links) und Emulgatorkonzentration (rechts) (MW±SD, n=16)

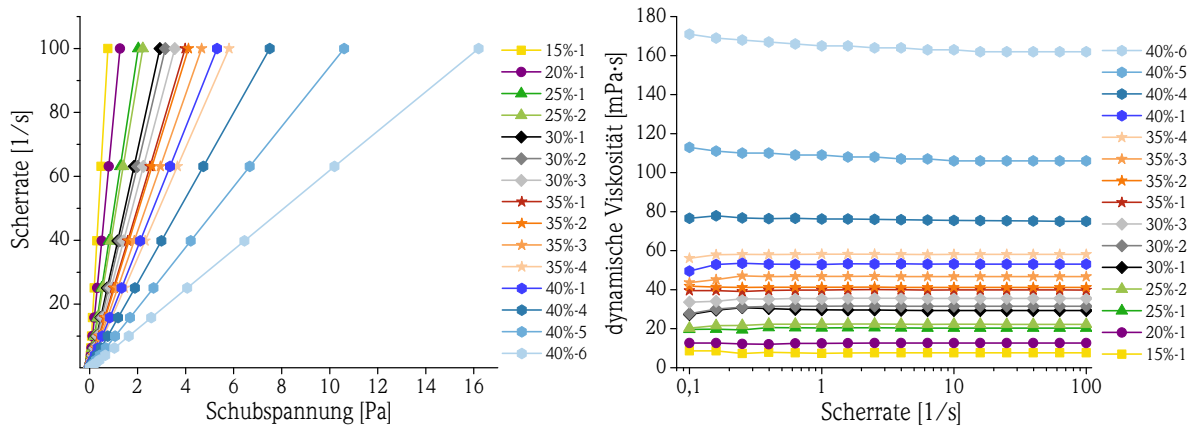


Abb. 36: Links: Rheogramm bzw. Rechts: Viskositätskurven verschiedener isotroper Mischungen des ME-L1695-Systems in Abhängigkeit von der Scherrate bei 25 °C (Messung bei 16 verschiedenen Scherraten)

Sowohl aus den erstellten Rheogrammen als auch aus den erhaltenen Viskositätskurven (Abb. 36) geht hervor, dass sich alle Proben idealviskos verhalten. Wie bereits im System ME-L595 gesehen, nimmt mit steigender Tensidkonzentration die Viskosität zu. Auch wenn die Proben 40%-6 und 40%-5 höhere Viskositäten aufwiesen, war ein Übergang zwischen verschiedenen Strukturen oder Phasenlagen nicht erkennbar. Es kann angenommen werden, dass mehrheitlich tröpfchenartige Mikroemulsionen vom O/W-Typ vorliegen.

4.3.2.5 DSC-Messungen

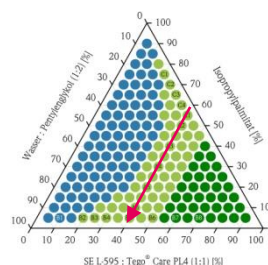
Die dynamische Differentialkalorimetrie (DSC, engl. *Differential Scanning Calorimetry*) ist die am häufigsten verwendete thermische Methode überhaupt, mit welcher unter anderem Phasenumwandlungserscheinungen und Zustandsänderungen in amphiphilen Systemen analysiert werden können [128]. Interessanterweise nutzte bereits GARTI et al. im Jahr 2000 die DSC im Minusgradbereich, um die Mikrostruktur seiner Sucroseestermikroemulsionen näher beschreiben zu können [270]. Dabei liefert vor allem der physikalische Zustand des Wassers Rückschlüsse auf die Mikrostruktur des Systems. Zum einen kann das Wasser als „freies“ Bulkwasser vorliegen und besitzt die gleichen Eigenschaften wie reines Wasser. Zum anderen kann das Wasser, wenn es mit den Tensidmolekülen in Wechselwirkung tritt, als „stark gebundenes“ Wasser vorliegen und unterscheidet sich hinsichtlich der thermodynamischen Eigenschaften (Erstarrungspunkt sowie Schmelzpunkt, Wärmekapazität, Enthalpie) von reinem Wasser [271]. Das heißt, dass „gebundenes“ Wasser erst bei niedrigeren Temperaturen unter 0 °C gefriert. Dies kann aus den aufgenommenen DSC-Kurven anhand der Größe und Position des Wasserpeaks ermittelt werden. Aus diesem lassen sich dann Rückschlüsse auf die Struktur innerhalb einer ME erschließen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden analog PODLOGAR alle isotropen Mischungen des ME-1695-Systems und ausgewählte Mischungen der drei Dilutionsreihen A, B und C (A: Tensidgehalt konstant; B: IPP-Gehalt konstant; C: Wassergehalt konstant) des ME-L595-Systems untersucht [272]. Ebenfalls wurden die DSC-Kurven aller verwendeten Komponenten aufgezeichnet, um die erhaltenen DSC-Thermogramme besser interpretieren zu können. Zur Beurteilung der Mikrostruktur werden folgend nur die Kühlkurven gezeigt, welche ausnahmslos einen exothermen Verlauf aufwiesen. Die ebenfalls aufgenommenen Aufheizkurven sind nicht dargestellt, da aus diesen keine neuen Erkenntnisse erhalten werden konnten.

a) ME-L595-System: Dilutionsreihe A

Zunächst wurde die Dilutionsreihe A mit einer gleichbleibenden Tensidkonzentration von 40 % betrachtet. Die Kühlkurven der Proben, welche 1,7 % bis 13,3 % Wasser enthielten (Abb. 37), wiesen den größten Peak bei einer Temperatur von ca. -3 °C auf. Dieser Peak zeigt die Erstarrung der lipophilen Komponente IPP und nimmt mit sinkendem IPP-Gehalt flächenmäßig linear ab. Bei einer Temperatur von -12,5 °C wurde ein weiterer, aber kleinerer Peak detektiert. Höchstwahrscheinlich kann dieser einer Verunreinigung von IPP zugeordnet werden (Reinheit: 99 %). Da das Thermogramm von IPP, welches kein Wasser enthält, ebenfalls diesen Peak aufzeigt, kann ausgeschlossen werden, dass der Peak zu irgendeiner Form des Wassers gehört. Die Kurve der Mischung mit 10 % Wasser zeigte außerdem eine Veränderung der Form von diesem Peak. Es wäre möglich, dass es hier zu einer Veränderung der Struktur der ME kommt, da wir uns nun in der Mitte des Phasendiagramms befinden und es wahrscheinlich ist, dass eine bikontinuierliche ME vorliegt. Ab einem Wassergehalt von 15 % verschiebt sich die Erstarrungstemperatur von IPP zu niedrigeren Temperaturen. Das könnte bedeuten, dass die Wechselwirkungen zwischen IPP und den Tensidmolekülen zunehmen und IPP nicht mehr frei vorliegt. Es wird vermutet, dass ab 15 % Wassergehalt die ME nicht mehr als W/O-Typ existiert. Da ebenfalls kein Wasserpeak detektiert werden konnte, ist es wahrscheinlich, dass bikontinuierliche Mikroemulsionen vorliegen.

Ab einem Wassergehalt von 18,3 %, d.h. der Anteil der hydrophilen Phase beträgt nun insgesamt 55 %, erscheint bei einer sehr niedrigen Temperatur von -65 °C ein unscharfer Peak. Dieser Peak gehört mit hoher Wahrscheinlichkeit zum Wasser, da dessen Erstarrungstemperatur durch den Einfluss von Pentylenglykol zu niedrigen Temperaturen verschoben wird.



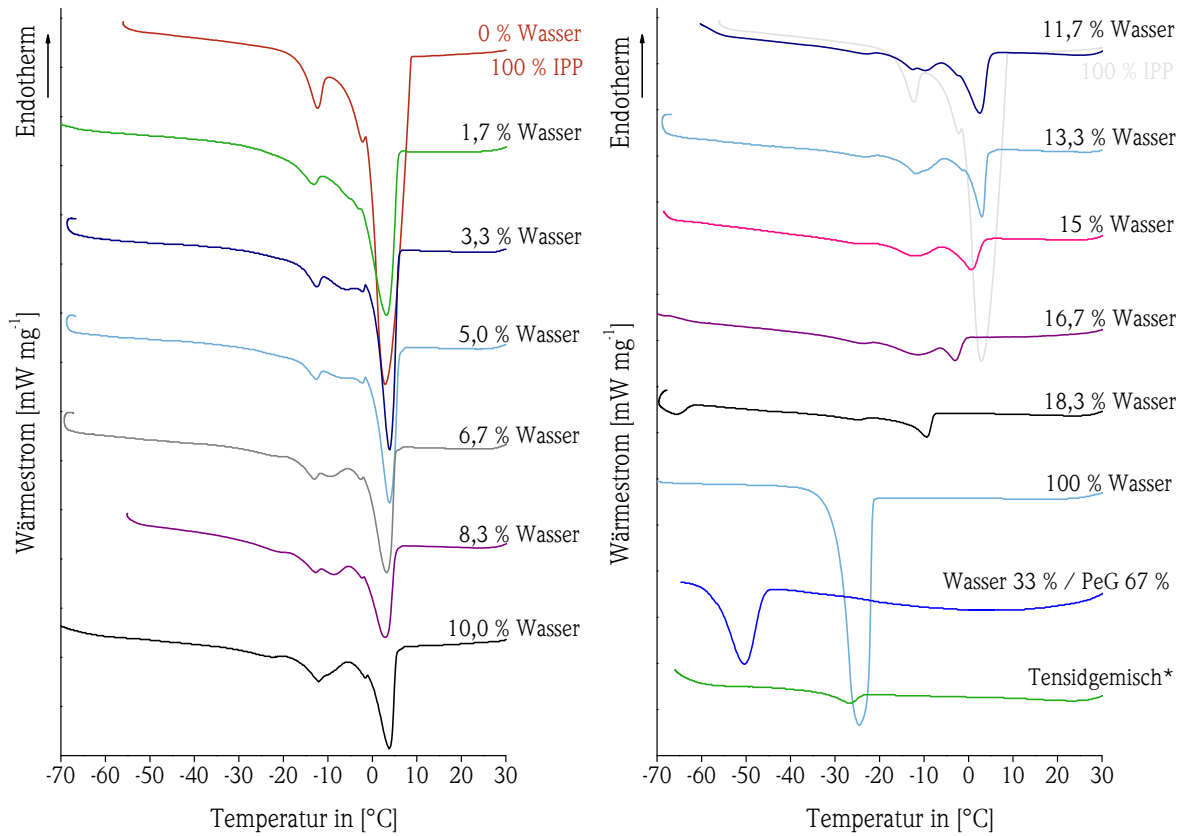
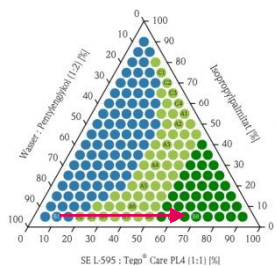


Abb. 37: DSC-Kühlkurven ausgewählter Mischungen der Dilutionsreihe A des ME-L595-Systems und deren Einzelkomponenten. *Das Tensidgemisch setzt sich zusammen aus SE:Tego® Care PL4:Pentylenglykol im Verhältnis 1:1:2. Der Wasserpeak ist aus Gründen der Übersichtlichkeit um 60 % verkleinert.

Reines Wasser erstarft bei diesen Messungen bei -25 °C (Unterkühlungseffekt) und durch Zusatz des Glykols erst bei -50 °C. Da im Falle der Dilutionsreihe A der Tensidgehalt mit 40 % verhältnismäßig hoch ist, sind Wechselwirkungen zwischen Wasser und den Tensidmolekülen wahrscheinlich. Die Möglichkeit, freies Bulkwasser zu erkennen und damit eine ME vom O/W-Typ zu identifizieren, ist aufgrund des hohen Glykolgehaltes und des damit verbundenen niedrigen Wassergehaltes nicht gegeben.

b) ME-L595-System: Dilutionsreihe B

Bei der Dilutionsreihe B wurden alle Mischungen mit gleichbleibender IPP-Konzentration von 5 % untersucht. Wie aus Abb. 38 hervorgeht, ist bei allen Thermogrammen mit einem Wassergehalt größer 16,7 % ein Peak mit einem Maximum bei -65 °C zu erkennen. Dieser Peak kann, wie bereits oben erwähnt, dem Wasser zugeordnet werden. Jedoch erscheint der Peak bei sehr niedrigen Temperaturen von unter -60 °C und lässt vermuten, dass das Wasser stark mit den Glykol- oder den Tensidmolekülen interagiert und nicht als freies Bulkwasser vorliegt. Mit steigendem Tensidgehalt verkleinert sich ebenfalls die Fläche des Peaks, da nun die Wechselwirkungen immer weiter zunehmen. Ab einem Wassergehalt kleiner gleich 15 % (entspricht einem Anteil hydrophiler Phase von 45 %) ist dieser Peak vollständig verschwunden. Somit scheint das Wasser komplett mit den Tensidmolekülen in Wechselwirkung getreten zu sein. Ein Übergang zu flüssig-kristallinen Strukturen wäre ebenso vorstellbar. Ab einer Tensidkonzentration von 30 % bzw. einem Wassergehalt von 21,7 % kann man ebenfalls einen flachen Peak bei einer Temperatur von -25 °C beobachten.



Dieser kann mit hoher Wahrscheinlichkeit dem Tensidgemisch zugeordnet werden, da er mit steigender Tensidkonzentration deutlicher wird. Schließlich ist bei allen isotropen Mischungen ein kleiner, spitzer Peak zwischen -2 und -10 °C erkennbar, welcher der lipophilen Komponente IPP entspricht. Die Verschiebung zu niedrigeren Temperaturen lässt sich erneut mit den ausgeprägten Wechselwirkungen zwischen Tensid- und Ölmolekülen begründen. Man kann annehmen, dass das Öl bei allen Proben vollständig integriert vorliegt und demzufolge eine ME vom O/W-Typ vorliegt, welche sich mit steigendem Tensidgehalt zu einer flüssig-kristallinen Phase umwandelt.

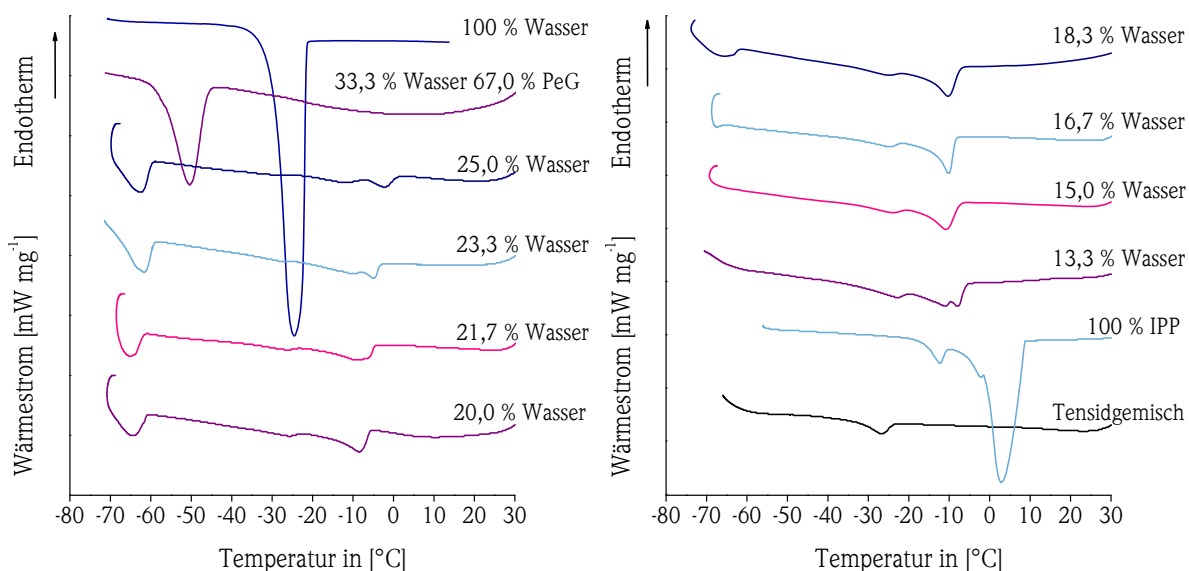
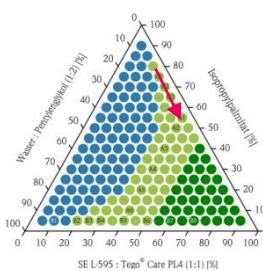


Abb. 38: DSC-Kühlkurven ausgewählter Mischungen der Dilutionsreihe B des ME-L595-Systems sowie deren Einzelkomponenten. Das Tensidgemisch setzt sich zusammen aus SE:Tego® Care PL4:Pentylenglykol im Verhältnis 1:1:2. Der IPP-Peak ist aus Gründen der Übersichtlichkeit um 60 % verkleinert.

c) ME-L595-System: Dilutionsreihe C

Die Thermogramme der Dilutionsreihe C mit einem konstanten Wassergehalt von 5 % und steigendem Tensidgehalt glichen den Kühlkurven der Dilutionsreihe A mit geringem Wassergehalt und zeigten keinen Wasserpeak (Ergebnisse nicht gezeigt). Lediglich der IPP-Erstarrungspeak war erkennbar und lässt vermuten, dass das Wasser vollständig in das Öl-Tensid-Gemisch integriert ist und daher die Mikroemulsionen einen W/O-Charakter aufweisen.



d) ME-L1695-System

Betrachtet man die Thermogramme des ME-L1695-Systems erhält man ein völlig anderes Bild (Abb. 39). Dabei stellt die **1er-Reihe** die Proben mit zunehmendem Tensidgehalt und konstantem Ölgehalt von 5 % dar. Die Proben der **40 %-Reihe** enthalten einen gleichbleibenden Tensidgehalt von 40 %.

Die Kühlkurven der isotropen Mischungen der **1er-Reihe**, zeigen zunächst einen ausgeprägten, scharfen Peak bei ca. -30 °C. Dieser Peak kann eindeutig der Kristallisation von Wasser zugeordnet werden. Aufgrund des stark reduzierten Glykolanteils ist dieser Peak überhaupt erkennbar. Andere Peaks sind in den Kühlkurven nicht zu erkennen. Die Emulgatoren und die Ölphase scheinen vollständig in das ME-System integriert zu sein. Folglich kann vermutet werden, dass freies Bulkwasser in den Proben vorhanden ist und eine ME vom O/W-Typ vorherrscht. Die DSC-Kurve der Probe mit einem Wassergehalt von 56 % zeigt einen Peak bei -20 °C auf und passt nicht zu den anderen Thermogrammen. Ein unbekannter Fehler bei der Messung könnte hier zu der Abweichung geführt haben.

Bei den isotropen Mischungen der **40 %-Reihe**, mit einem Wassergehalt von 32 bis 44 %, konnte ebenfalls der scharfe Kristallisationspeak des Wassers detektiert werden. Es scheint auch in diesem Fall freies Bulkwasser und somit eine O/W-ME vorzuliegen. Bei den Proben mit nur noch 28 % bzw. 24 % Wassergehalt (40%-5 und 40%-6) verschiebt sich der Peak zu niedrigeren Temperaturen um die -30 °C. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass nun wieder verstärkt Wechselwirkungen zwischen den Wassermolekülen und den Tensidmolekülen auftreten. Dies bestätigten auch die Viskositätsmessungen, da diese beiden Proben erhöhte Viskositäten aufwiesen im Vergleich zu den anderen Mischungen der **40 %-Reihe**.

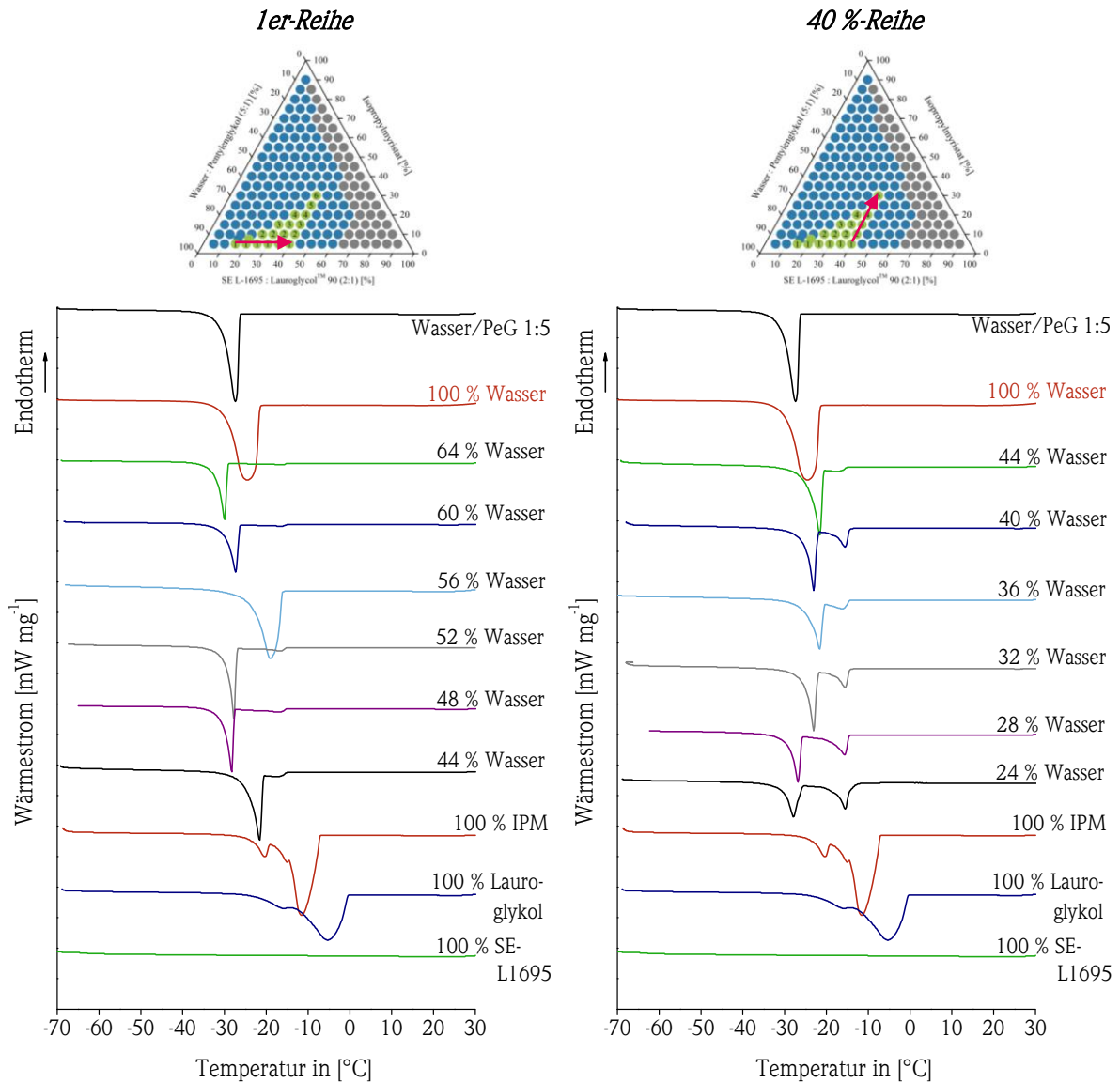


Abb. 39: DSC-Kühlkurven von isotropen Mischungen der Dilutionsreihe 1 (links) und der Dilutionsreihe 40% (rechts) des ME-L1695-Systems sowie deren Einzelkomponenten

Zusätzlich lässt sich bei den Proben mit einem Tensidgehalt von 40 % und einem Wassergehalt kleiner 40 % ein weiterer scharfer Peak bei -16 °C beobachten. Es ist möglich, dass es sich um den Erstarrungspeak von IPM handelt, welches dementsprechend frei vorliegt. Da bei Stabilitätsuntersuchungen die Proben 40%-3 und 40%-4 Phasenseparation aufzeigten, könnte dies ein mögliches Indiz für erste Instabilitäten sein.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die gemessenen DSC-Kurven darauf hinweisen, dass es sich bei allen isotropen Mischungen des ME-1695-Systems um Mikroemulsionen vom O/W-Typ handelt und keine Änderungen innerhalb der Mikrostruktur beobachtet werden konnten.

4.3.2.6 pH-Wert

Der pH-Wert einer Formulierung spielt eine wesentliche Rolle im Hinblick auf die Hautverträglichkeit. Er sollte, wie der pH-Wert der Hautoberfläche, in einem neutralen bis leicht sauren Bereich liegen, um mögliche Hautirritationen zu vermeiden [273]. Der pH-Wert aller isotropen Mischungen des ME-L1695-Systems betrug $6,2 \pm 0,1$. Der pH-Wert der ME-L1695-OW betrug $6,2 \pm 0,0$ (MW \pm SD, $n=3$). Die gemessenen pH-Werte des ME-L595-Systems waren etwas niedriger und lagen im Durchschnitt bei $5,4 \pm 0,4$. Der pH-Wert der ME-L595-OW betrug $5,8 \pm 0,1$ und der ME-L595-WO $4,8 \pm 0,1$ (MW \pm SD, $n=3$). Alle Mikroemulsionen sind bezüglich des pH-Wertes für eine Anwendung auf der Haut geeignet.

4.3.2.7 Dynamische Lichtstreuung

Die dynamische Lichtstreuung (DLS), auch Photonenkorrelationsspektroskopie oder Quasielastische Lichtstreuung genannt, ist eigentlich ein Verfahren zur Ermittlung von Partikel- und Strömungsgeschwindigkeiten sowie Diffusionskoeffizienten. Aufgrund der BROWNSCHEN Molekularbewegung bewegen sich Partikel im Dispersionsmedium. Durch Bestrahlung mit Laserlicht wird das Licht an diesen Partikeln gestreut. Jedoch wird bei der DLS nicht die absolute Streulichtintensität ausgewertet, sondern die Fluktuation der Streulichtintensität in Abhängigkeit von der Zeit. Aufgrund der größeren Diffusionsgeschwindigkeit von kleinen Teilchen schwankt folglich die Intensität schneller als bei großen Teilchen. Aus der sogenannten Autokorrelationsfunktion ergibt sich eine Exponentialfunktion, aus deren Exponenten sich der effektive, wechselwirkungsfreie Diffusionskoeffizient D_{eff} ermitteln lässt. Dieser gilt nur für sphärische Partikel und Interaktionen von Teilchen mit Nachbarpartikeln bzw. mit Lösungsmittelmolekülen werden vernachlässigt. Unter Verwendung des Diffusionskoeffizienten, der Viskosität des Mediums und der Boltzmann Konstante lässt sich der hydrodynamische Radius mittels STOKES-EINSTEIN-Gleichung errechnen:

$$r_{hyd} = \frac{kT}{6\pi\eta D_{eff}} \quad \text{Gleichung (3)}$$

r_{hyd}	hydrodynamische Radius	k	Boltzmann Konstante
D_{eff}	effektiver Diffusionskoeffizient	T	absolute Temperatur [K]
η	Viskosität		

Daher kann die Partikelgröße sehr kleiner Teilchen (Bereich: 3 nm bis 3 μ m) indirekt durch DLS-Messungen abgeschätzt werden [274, 275]. Um nicht nur eine einzige Größe zu erhalten, kann durch Anwendung des CONTIN Algorithmus eine Partikelgrößenverteilung ermittelt werden [276].

Der Einsatz der DLS gehört heute zu den gängigen Methoden zur Bestimmung der kolloidalen Tröpfchengröße von Mikroemulsionen [277-279]. Erkenntnisse über die Tröpfchengröße dienen vor allem der Abgrenzung zu anderen kolloidalen Systemen, wie z. B. Mizellen und der Untersuchung der thermodynamischen Stabilität von Mikroemulsionen.

Um zu überprüfen, ob die Tröpfchengröße der entwickelten Systeme in dem typischen Bereich für Mikroemulsionen liegen, wurde daher dieses Verfahren angewandt. Es wurden aus dem System ME-L595 jeweils eine O/W- und eine W/O-ME sowie ein System aus dem Gebiet von bikontinuierlichen Strukturen ausgewählt. Zum Vergleich wurde die mizellare Lösung (ML-L595-WO) untersucht. Ebenso wurde die Partikelgröße der ME-L1695-OW und dessen entsprechende mizellare Lösung (ML-L1695-OW) bestimmt. Die Zusammensetzung der mizellaren Lösungen ist in Tab. 18 aufgeführt.

Tab. 18: Zusammensetzung der mizellaren Lösungen

ML-L595-WO		ML-L1695-OW	
Komponente	% (m/m)	Komponente	% (m/m)
Sucroseester L-595	12,5	Sucroseester L-1695	13,75
Tego® Care PL4	12,5	Lauroglycol™ 90	6,25
IPP	75,0	IPM	-
Wasser	-	Wasser	64,0
Pentylenglykol	-	Pentylenglykol	16,0

Die gemessenen hydrodynamischen Radien (Tab. 19) wurden bei 13 verschiedenen Winkeln bestimmt (30 bis 150°). Es gilt die Annahme, dass es sich um sphärische und feste Teilchen handelt. Auf die sonst gängige Verdünnung der gemessenen Proben wurde verzichtet, da sonst die Mikrostruktur des Systems verfälscht wird. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass alle tröpfchenförmigen Mikroemulsionen hydrodynamische Radien der kolloidalen Partikel in einem akzeptablen Bereich von 10 bis 100 nm aufweisen und demnach der Definition von ME entsprechen [96, 280].

Tab. 19: Hydrodynamische Radien der untersuchten Proben
(Messung bei 13 unterschiedlichen Winkeln, MW±SD)

Formulierung	hydrodynamischer Radius [nm]
ME-L1695-OW (20%-1)	12,6 ± 1,3
ML-L1695-OW	8,3 ± 0,7
ME-L595-WO (C-2)	16,5 ± 1,8
ML-L595-WO	11,6 ± 1,4
ME-L595-OW (B-4)	35,1 ± 5,1
ME-L595-BC (A-4)	<i>keine sphärischen Partikel messbar 6 ± 2 nm und 5,8 ± 5,4 µm</i>

Ebenso ist eine Abgrenzung zu den mizellaren Lösungen eindeutig erkennbar. Die Größe der kolloidalen Phasen war bei den Mikroemulsionen stets größer als bei der entsprechenden mizellaren Lösung. Daher kann man davon ausgehen, dass die innere Phase (Öl bzw. Wasser) der Mikroemulsionen innerhalb der Tensidmoleküle solubilisiert vorlag. Da sich das Glykol ebenfalls in die Grenzfläche einlagert, resultiert bei der ME-L595-WO ein kleinerer hydrodynamischer Radius aufgrund des geringen Anteils der kolloidalen Phase (Wasser: 1,6 %) im Vergleich zum O/W-System (IPP: 5 %). Die Messung bei 13 verschiedenen Winkeln konnte zusätzlich belegen, dass es sich um runde Teilchen handelt. Demzufolge liegt die innere Phase der ME tröpfchenförmig vor. Jedoch bleibt zu berücksichtigen, dass Mikroemulsionen hochdynamische Systeme mit stark fluktuierenden Strukturen sind und die kolloidal dispergierte Phase einem ständigen Auf- und Abbau unterliegt [281]. Folglich schwankt die Teilchengröße und es handelt sich bei den gemessenen Radien nur um Durchschnittswerte.

Für die bikontinuierliche ME konnte kein eindeutiger Radius für die kolloidale Phase ermittelt werden. Das Vorhandensein von sphärischen Partikeln kann daher ausgeschlossen werden. Die berechnete Verteilung war sehr inhomogen. Es gab einen deutlichen Anteil an großen Partikeln (5 - 6 µm) und einen Anteil an sehr kleinen Partikeln. Jedoch variierten diese Radien stark bei unterschiedlichen Messwinkeln, was beweist, dass es sich nicht um sphärische Partikel handelte. Es wäre denkbar, dass lange zylinderähnliche Strukturen die Mikrostruktur bestimmen. Durch Einsatz der Polarisationsmikroskopie konnte ebenfalls ausgeschlossen werden, dass es sich um ungelöste Sucroseesterpartikel handelt. Daher ist DLS nicht für die Größenmessung von bikontinuierlichen Strukturen geeignet. Für genauere Betrachtungen dieser Mikrostrukturen müssten andere Methoden wie Röntgen- oder Neutronenstreuung eingesetzt werden [282].

4.3.2.8 Stabilitätstestung

Alle in dieser Arbeit untersuchten isotropen Mischungen bzw. Mikroemulsionen wurden luftdicht verschlossen bei Raumtemperatur aufbewahrt und nach einem Jahr und anschließend nach zwei Jahren einer erneuten Begutachtung auf optische Transparenz unterzogen. Bei fast keinem der Systeme traten während oder nach dieser Zeit Anzeichen für Instabilitäten wie Trübungserscheinungen oder Phasentrennungen auf. Lediglich die Proben 40%-3 und 40%-4 des ME-L1695-Systems zeigten leichte Trübungserscheinungen und werden daher als instabil deklariert. Alle anderen Proben der entwickelten Mikroemulsionen bzw. alle anderen isotropen Mischungen sind thermodynamisch stabil.

4.3.2.9 Zusammenfassung der physikochemischen Charakterisierung

Aus den vorangegangenen Experimenten geht hervor, dass es sich bei den entwickelten Mikroemulsionen auch tatsächlich um Mikroemulsionen handelt. Durch die Anfertigung von Phasendiagrammen konnten die isotropen Gebiete eindeutig identifiziert werden. Das Phasendreieck des ME-L595-Systems zeigte zudem W/O-, O/W-, bikontinuierliche und lamellare Strukturen, welche mit den angewandten Methoden näher charakterisiert werden konnten.

4.3.3 HET-CAM

Um das irritative Potential einer ME bestimmen zu können, wurde der von LÜPKE in den 1980er Jahren entwickelte HET-CAM (engl. *Hen's egg test on chorioallantoic membrane*) durchgeführt [283]. Der HET sollte vor allem die Zahl des äußerst umstrittenen Kaninchenaugentests (Draize-Test) reduzieren. Das Verfahren ist international validiert und wird nach genauen Kriterien durchgeführt [284]. Es wurden die wirkstofffreien Formulierungen getestet. Zur Bewertung des irritativen Potentials wurde der Irritationsscore (IS) berechnet (siehe Kapitel 6.5.8) [284, 285]. Als Kontrolllösungen dienten steriles Wasser und 1 %ige Natriumlaurylsulfat (SLS)-Lösung.

Tab. 20: Ergebnisse des HET-CAM Tests (MW±SD, n=6)

Prüfformulierung	berechneter IS	Schweregrad			irritatives Potential
		Hämorrhagie	Gefäßlyse	Koagulation	
Wasser	0	0	0	0	kein
1 % SLS	9,3	2,5	0,2	6,7	stark
ME-L1695-OW	4,9 ± 2,1	3,6 ± 0,4	0,6 ± 1,5	0,7 ± 1,7	leicht
ME-L1695-OW*	4,1 ± 3,0	1,6 ± 1,2	0	2,5 ± 2,7	leicht
ME-L595-WO	0,4 ± 0,9	0,4 ± 0,9	0	0	kein

*enthält Propylenglykol statt Pentylenglykol

Aus Tab. 20 geht hervor, dass die O/W-Systeme eine leichte Irritation auf der Schleimhaut hervorrufen könnten. Laut den HET-CAM-Untersuchungen von ALANY et al. verursachen vor allem 1,2-Alkandiole ab einer Kettenlänge von C₅, unverdünnt aufgetragen, starke Reizungen [286]. Daher wurde vermutet, dass das eingesetzte Pentylenglykol die hauptsächlich hämorrhagischen Ereignisse hervorruft. Jedoch nahm der IS nach Austausch des Pentylenglykol mit Propylenglykol (ME-OW-L1695*) nur geringfügig ab. Ob die eingesetzten Sucroseester die Irritationen herbeiführten, konnte nicht nachgewiesen werden. Im Allgemeinen gilt diese Emulgatorgruppe als sehr verträglich und zeigte in den HET-CAM-Studien von LEHMANN et al. kein irritatives Potential [249]. Möglicherweise enthalten diese Sucroseester herstellungsbedingt kleine Mengen freier Laurinsäure, welche zu Irritationen führen könnten. Doch auch die Bestimmung der Säurezahl (kleiner 0,7) zeigte keinen wesentlichen Anteil an freien Fettsäuren.

Insgesamt kann man nicht davon ausgehen, dass die entwickelten O/W-Mikroemulsionen zu Reizerscheinungen auf der Haut führen, da der Test ursprünglich für die Ermittlung des Augenirritationspotentials entwickelt wurde. So besitzt z. B. eine Chlorhexidinlösung (0,5 %), welche als Mundantiseptikum eingesetzt wird, einen IS von 20 und deshalb ein wesentlich höheres Risiko, Reaktionen in der Mundschleimhaut hervorzurufen als die oben genannten Systeme [287]. Für die ME vom W/O-Typ konnte kein Irritationspotential festgestellt. Zur abschließenden Klärung über das irritative Potential sollte die physiologische Verträglichkeit an gesunder Haut im Rahmen eines klinischen Versuches überprüft werden.

4.3.4 Untersuchungen an MTX-haltigen Mikroemulsionen

Für die *ex vivo* Penetrationsuntersuchungen wurden das W/O-System ME-L595-WO und das O/W-System ME-L1695-OW mit einem Pentylenglykolgehalt von 20 % bezogen auf die Wasserphase ausgewählt. Zunächst galt es, MTX in einer Konzentration von 0,5 % einzuarbeiten.

4.3.4.1 Inkorporation von MTX in Mikroemulsionen

Da der Verteilungskoeffizient der Säureform von MTX bei leicht sauren pH-Werten weniger hydrophil und somit günstiger für eine dermale Applikation ist als die Salzform, sollte zunächst versucht werden, diese in die Mikroemulsionen zu inkorporieren. Dafür wurde die Sättigungslöslichkeit von MTX in der O/W-ME als auch in einigen Bestandteilen dieser bestimmt (Tab. 21).

Tab. 21: Löslichkeit von MTX in der ME-L1695-OW und relevanten Bestandteilen (MW \pm SD, n=3)

Medium	c _s MTX [mg·ml ⁻¹]	Löslichkeit nach Ph. Eur. [124]
Wasser	0,07 \pm 0,01	praktisch unlöslich
ME-L1695-OW	0,45 \pm 0,03	sehr schwer löslich
Soluphor [®] P (SP)	51,89 \pm 2,60	löslich
ME-L1695-OW + 15 % SP	0,39 \pm 0,02	sehr schwer löslich
Phosphatpuffer pH 7	10,75 \pm 0,10	wenig löslich
ME-L1695-OW (pH 6,7)	7,92 \pm 0,34	schwer löslich

Die Löslichkeit von MTX in der ME konnte gegenüber Wasser versechsfacht werden. Jedoch reicht die Löslichkeit nicht aus, um 0,5 % des Wirkstoffes (entspricht 10 mg in 2 g) ME zu lösen. Auch ein 15 %iger Zusatz des hydrophilen Lösungsvermittlers Soluphor[®] P erreichte keine Steigerung der Sättigungslöslichkeit von MTX. Schließlich konnte durch Einsatz einer Pufferlösung mit einem pH-Wert von 7 MTX in einer 0,5 %igen Konzentration erfolgreich eingearbeitet werden. Die Sättigungskonzentration war etwa 110mal höher im Vergleich zu Wasser. Durch Zugabe von MTX resultiert ein pH-Wert von 6,7 für die ME-L1695-OW.

Für das W/O-System wurde aufgrund des geringen Anteils der hydrophilen Phase (5 %) und des hohen Ölgehaltes auf eine Bestimmung der Sättigungskonzentration verzichtet und das MTX-Na in der kolloidalen Phase gelöst. Eine Messung des pH-Wertes ist aufgrund der äußeren öligen, kohärenten Phase nicht möglich.

Die exakte Zusammensetzung der resultierenden MTX-haltigen Mikroemulsionen ist in Tab. 22 aufgeführt. Beide Formulierungen werden für die folgenden Untersuchungen (Stabilität und *ex vivo* Penetrationsstudien) verwendet und mit der Bezeichnung ME-WO-MTX und ME-OW-MTX abgekürzt.

Tab. 22: Zusammensetzung der MTX-haltigen ME

ME-WO-MTX		ME-OW-MTX	
Komponente	% (m/m)	Komponente	% (m/m)
MTX-Na	0,50	MTX	0,50
Sucroseester L-595	12,44	Sucroseester L-1695	13,68
Tego® Care PL4	12,44	Lauroglycol™ 90	6,22
IPP	69,65	IPM	4,98
Wasser	1,66	Citrat-Phosphatpuffer (pH 7)	59,70
Pentylenglykol	3,31	Pentylenglykol	14,92

4.3.4.2 Vergleichsvehikel

MTX wurde in die Basiscreme DAC (BC-DAC-MTX) mit einer 0,5 %igen Konzentration mittels Fantaschale und Pistill eingearbeitet. Basiscreme soll in den Penetrationsstudien als Vergleichsvehikel dienen. Zusätzlich wurde ein Muster eines Hydrogels mit einer 0,25 %igen MTX-Konzentration (Fertigpräparat: Rextop® Gel) als Vergleichsformulierung getestet. Rextop® Gel wurde in Indien und in den USA von der Firma Systopic Laboratories Ltd. vertrieben. Mittlerweile wurden die Produktion und der Vertrieb aus unbekanntem Gründen eingestellt.

4.3.4.3 Stabilität von MTX in den Formulierungen

Die Stabilität von MTX in den neu entwickelten Formulierungen und in der Basiscreme DAC wurde in Anlehnung an die ICH-Guideline „STABILITY TESTING OF NEW DRUG SUBSTANCES AND PRODUCTS Q1A (R2)“ durchgeführt. Voraussetzung für einen Langzeitstabilitätstest ist eine Einlagerung von mindestens einem Jahr. Die Testfrequenz sollte so gewählt werden, dass ein ausreichendes Stabilitätsprofil des Arzneistoffes erstellt werden kann. Jedoch sollte die Überprüfung der Stabilität mindestens alle drei Monate im ersten Jahr erfolgen. Im Vorfeld waren keine Hinweise über die Stabilität von MTX in den entwickelten Formulierungen bekannt, da keine beschleunigten Stabilitätstests durchgeführt wurden. Daher wurde vor allem am Anfang des Versuchszeitraumes eine Testfrequenz von einer Woche ausgewählt. Nach den ersten vier Wochen erfolgte die Prüfung monatlich. Anschließend wurde nach 16, 24 und 52 Wochen getestet. Zum Abschluss wurde nach drei Jahren der Gehalt in den eingelagerten Proben bestimmt.

Die Chargen wurden analog zu den Stabilitätsuntersuchungen in Pufferlösungen hergestellt (siehe Kapitel 4.2.3.5). Der MTX-Gehalt im geschlossenen Gefäß wurde für vier Zeitpunkte bestimmt: Startwert, 12 Wochen, 52 Wochen und drei Jahre (Ausnahme: Für die ME-WO-MTX erfolgte der zweite Anbruch erst nach 24 Wochen). Anderenfalls erfolgte die Quantifizierung aus dem bereits geöffneten Gefäß. Die Lagerung der Proben erfolgte in einem Klimaschrank mit einer eingestellten Temperatur von 23 °C und einer relativen Luftfeuchte von 60 %.

Die Ergebnisse der Langzeitstabilität sind in Abb. 40 dargestellt. Zunächst lässt sich sehr gut erkennen, dass innerhalb eines Jahres MTX in allen drei Formulierungen stabil war, das heißt, der Gehalt nicht unter 90 % gesunken war. Ebenfalls lässt sich ablesen, dass ein Anbruch der Proben sich geringfügig negativ auf die Stabilität auswirkte. Der Gehalt in den geschlossenen Proben war stets höher als in den zuletzt gemessenen, bereits geöffneten Proben. Betrachtet man die Gehälter nach drei Jahren, kann man erkennen, dass der MTX-Gehalt in der Basiscreme und in der O/W-ME noch immer über den erforderlichen 90 % lag und MTX eine sehr gute Stabilität aufwies. Lediglich in der W/O-ME sank der MTX-Gehalt auf 70 bis 80 %. Die Haltbarkeit eines möglichen Präparates sollte für dieses Vehikel auf ein Jahr begrenzt werden.

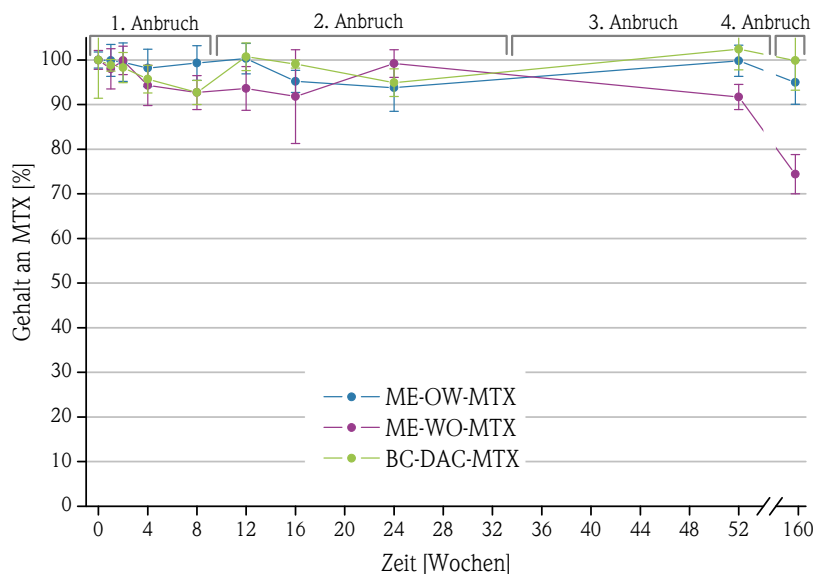


Abb. 40: Stabilität von MTX in den entwickelten Formulierungen bei einer Temperatur von 23 °C (MW±SD, n=9)

Die mikrobielle Stabilität ist in allen Formulierungen aufgrund ihrer Zusammensetzung über drei Jahre gewährleistet. Die Basiscreme enthält 20 % Propylenglykol bezogen auf die wässrige Phase und ist damit ausreichend konserviert. Die Mikroemulsionen wurden mit einem 20 %igen Zusatz an Pentylenglykol bezogen auf die Wasserphase ebenfalls mikrobiell stabilisiert. Zusammenfassend konnten innerhalb des Untersuchungszeitraumes von drei Jahren keine organoleptischen Veränderungen bei allen drei Formulierungen festgestellt werden.

4.3.4.4 Extraktionsvorversuche

Extraktionsvorversuche sind wichtig, um zu bestätigen, dass mit einem geeigneten Extraktionsmittel die eingesetzte MTX-Menge mittels der entwickelten analytischen Methoden auch wiedergefunden werden kann. Ebenfalls soll ausgeschlossen werden, dass Bestandteile der Formulierung oder der Haut die Analytik stören oder verfälschen.

a) Extraktion aus der Formulierung:

Zunächst erfolgte die Extraktion von MTX aus den Formulierungen mit reinem Methanol. Jedoch waren die Wiederfindungsraten (WFR) nicht zufriedenstellend (Tab. 23). Daher wurden ebenso Mischungen mit Wasser im Verhältnis 80/20 % (V/V) und 50/50 % (V/V) erprobt. Letzteres führte jedoch zur Trübung der Probe, welche auch nach Filtration nicht behoben und somit nicht der HPLC-Analytik zugänglich gemacht werden konnte. Das Methanol-Wasser-Gemisch (80/20 %, V/V) zeigte dagegen sehr gute und akzeptable WFR und es wurden klare Lösungen erhalten. Insofern wurde dieses Gemisch als Extraktionsmedium ausgewählt. Die Basiscreme wurde zusätzlich zur Verbesserung der Extraktion für 15 min auf ein Ultraschallbad bei 40 °C gestellt.

Tab. 23: WFR von MTX in % nach Extraktion aus den Formulierungen bezogen auf die eingesetzte Dosis (MW±SD, n=5)

Formulierung	Methanol 100 %, 2 ml	Methanol/Wasser 80/20 % (V/V), 2 ml
ME-WO-MTX	83,3 ± 2,4	92,3 ± 2,4
ME-OW-MTX	81,0 ± 2,5	107,6 ± 3,3
BC-DAC-MTX	92,8 ± 2,6	98,7 ± 2,2
Rextop® Gel	-	106,2 ± 2,4

b) Extraktion in Gegenwart von Humanhaut:

Da Extraktionsmittel Bestandteile aus der Haut lösen können, sollte ebenfalls geprüft werden, ob MTX nach Applikation auf die Haut einwandfrei extrahiert und ohne Störungen detektiert sowie vollständig quantifiziert werden kann. Dafür wurden die in der Tab. 24 aufgeführten Formulierungen, stellvertretend für alle Vehikel, getestet und für 300 min auf Humanhaut appliziert. Danach erfolgte die Zugabe des Extraktionsmediums.

Tab. 24: WFR von MTX in % nach Extraktion aus den Formulierungen in Gegenwart von Humanhaut bezogen auf die eingesetzte Dosis (MW \pm SD, n=3)

Formulierung	Methanol 100 %, 1 ml	Methanol/Wasser 80/20 % (V/V), 1 ml
ME-WO-MTX	43,1 \pm 4,9	93,2 \pm 11,3
ME-OW-MTX	50,9 \pm 14,8	94,9 \pm 1,9
Rextop [®] Gel	34,5 \pm 12,4	78,8 \pm 4,6

Die Extraktion von MTX in Gegenwart von Humanhaut nach Applikation der Formulierungen zeigt ein ähnliches Ergebnis wie in Abwesenheit von Humanhaut. Ebenfalls konnte durch einen 20 %igen Wasseranteil im Lösungsmittel Methanol die WFR deutlich gesteigert werden. Die Löslichkeit von MTX in reinem Methanol ist zwar höher, aber wahrscheinlich führt eine Quellung der Haut durch den Wasserzusatz zu einer Verbesserung der Extraktionsrate.

c) Extraktion aus Tupfern:

In Vorversuchen waren Unregelmäßigkeiten bezüglich der WFR von MTX aufgefallen. Es wurde vermutet, dass MTX aus den verwendeten Tupfern, welche zum Abwischen von Formulierungsresten auf Membranen oder Hautstücken dienen, nicht vollständig extrahiert werden konnte. Deshalb wurde mit dem Gel, stellvertretend für alle Formulierungen, geprüft, mit welchem Extraktionsmedium MTX wieder vollständig aus den Tupfern gewonnen werden konnte. Ebenfalls wurde untersucht, ob der Einsatz eines Ultraschallbades (10 min, 40 °C) einen Einfluss auf die Extraktion hat. Jedoch konnte diesbezüglich kein Unterschied festgestellt werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Aus Tab. 25 geht hervor, dass der Wasserzusatz erneut die Extraktion von MTX begünstigt. Aus analytischen Zwecken wurde daher der Einsatz des Methanol-Wasser-Gemisches (80/20 %, V/V) ausgewählt. Da die WFR nicht 100 % betragen, wurden die in den Tupfern quantifizierten MTX-Mengen mit einem Faktor von 1,16 (=100:85,9 %) korrigiert.

Tab. 25: WFR von MTX in % nach Extraktion aus den Tupfern bezogen auf die eingesetzte Dosis (MW \pm SD, n=4)

Formulierung	Extraktionsmedium, 5 ml	WFR [%]
Rextop [®] Gel	Methanol 100 %	67,1 \pm 1,9
Rextop [®] Gel	Methanol/Wasser 80/20 % (V/V)	85,9 \pm 1,6
Rextop [®] Gel	Methanol/Wasser 50/50 % (V/V)	88,7 \pm 1,9

4.3.5 Ergebnisse der *ex vivo* Penetrationsuntersuchungen

Die Penetration von MTX in humane Haut wurde aus vier verschiedenen Formulierungen untersucht. Es wurden die entwickelten Mikroemulsionen vom W/O- und vom O/W-Typ getestet und zum Vergleich die Basiscreme DAC sowie das Fertigpräparat Rextop® Gel. Die Inkubationszeit betrug bei allen Versuchen 300 min.

Tab. 26: Ex vivo Penetration von MTX aus ME-OW-MTX (n=4), ME-WO-MTX (n=4), Basiscreme (BC-DAC-MTX)(n=8) und Rextop® (n=4) in humane Haut angegeben in % der applizierten Dosis (MW±SD, p<0,05; WFR = 82 %); SC = Stratum corneum, EP = vitale Epidermis, DR = Dermis, AK = Akzeptorkompartiment

Hautschicht	ME-OW-MTX	ME-WO-MTX	BC-DAC-MTX	Rextop® Gel
SC	1,62 ± 0,61	1,68 ± 0,42	4,20 ± 1,54 ^{OW,WO,Gel}	1,02 ± 0,42
EP	2,29 ± 0,89 ^{Gel}	2,14 ± 0,67 ^{Gel}	5,87 ± 0,40 ^{OW,WO,Gel}	0,90 ± 0,30
DR	3,61 ± 1,72	5,61 ± 1,66	4,88 ± 0,97 ^{Gel}	2,81 ± 0,77
AK	2,51 ± 0,10 ^{Gel}	3,14 ± 0,19 ^{Gel}	2,32 ± 1,22 ^{Gel}	0,00 ± 0,00
Penetrierter Anteil	7,53 ± 2,48 ~ 7,5 %	9,43 ± 2,59 ~ 9,4 %	14,95 ± 0,96 ~ 15 %	4,72 ± 0,71 ~ 4,7 %

Betrachtet man zunächst den penetrierten MTX-Anteil im Verhältnis zur applizierten Dosis (Tab. 26), wird MTX aus dem Standardvehikel Basiscreme DAC am besten in die Haut transportiert. In der lebenden Epidermis konnten ca. 6 % und in der Dermis ca. 5 % des applizierten MTX quantifiziert werden. In allen Hautschichten war die Basiscreme dem Rextop® Gel signifikant überlegen.

Im Vergleich zu den Mikroemulsionen konnte durch Applikation der Basiscreme signifikant höhere MTX-Konzentration im Stratum corneum und im gewünschten Zielkompartiment Epidermis erreicht werden. Auch der insgesamt penetrierte MTX-Anteil war durch Applikation der Basiscreme fast doppelt so hoch im Vergleich zu den Mikroemulsionen.

Die Ergebnisse zwischen den jeweiligen Mikroemulsionen zeigten keine signifikanten Unterschiede. Tendenziell erreichte die W/O-ME etwas höhere Konzentrationen des Wirkstoffes in der Dermis als die O/W-ME. Durch den Einsatz dieser kolloidalen Systeme konnte die MTX-Konzentration im Zieltarget gegenüber dem Hydrogel Rextop® signifikant gesteigert werden.

MTX konnte nach Applikation aller Formulierungen nur in geringen Konzentrationen das Akzeptorkompartiment erreichen. Eine genaue Aussage über die *in vivo* Situation kann nicht getroffen werden, aber unter Anwendung einer Modellrechnung können die Konzentrationen im Akzeptor nachfolgend bezüglich der systemischen Bioverfügbarkeit bewertet werden (siehe Kapitel 4.3.6).

Da die verschiedenen Hautkompartimente unterschiedliche Dicken aufweisen, ist es zusätzlich sinnvoll, Tiefenprofile zu erstellen, um die Dicke der jeweiligen Hautschicht mit in die Berechnung der MTX-Konzentration einfließen zu lassen.

In Abb. 41 sind die verschiedenen Tiefenprofile von MTX dargestellt. Die signifikant höchsten MTX-Konzentrationen werden ebenfalls nach Applikation der Basiscreme in den oberen Hautschichten wie Stratum corneum, vitaler Epidermis und oberster Dermis erreicht. Die Tiefenprofile zeigen eine günstige Verteilung des Wirkstoffes für die Behandlung der Schuppenflechte, da vor allem hohe MTX-Konzentrationen in der lebenden Epidermis und in der oberen Dermis zu finden sind. In den tieferen Hautschichten und im Akzeptor wurden nur geringe MTX-Konzentrationen quantifiziert.

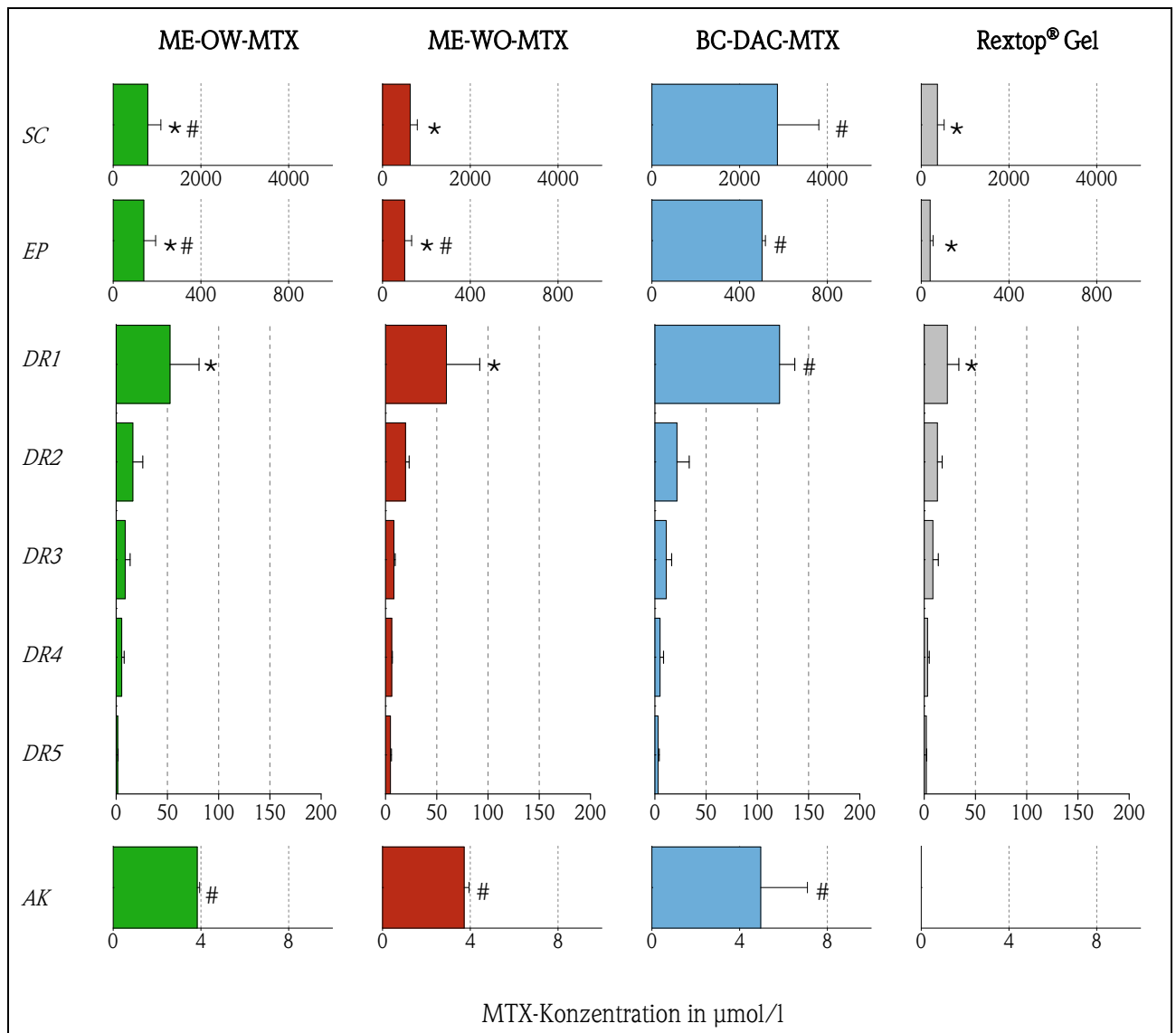


Abb. 41: Penetrationsprofile von MTX unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Dicken der jeweiligen Hautkompartimente nach Applikation verschiedener Formulierungen (MW \pm SD jeweils n=4, Basiscreme n=8; p<0,05 *gegenüber BC-DAC-MTX; #gegenüber Rextop® Gel) ermittelt im Franz-Diffusionsmodell. SC = Stratum corneum, EP = vitale Epidermis, DR = Dermis, AK = Akzeptorkompartiment.

Prinzipiell stellt sich nun die Frage, warum die Basiscreme relativ gute Penetrationsergebnisse im Vergleich zu den Mikroemulsionen lieferte:

1. **Thermodynamische Aktivität:** In mikroskopischen Untersuchungen wurde festgestellt, dass MTX in der Basiscreme nur teilweise gelöst bzw. suspendiert vorlag. Dies lässt vermuten, dass die thermodynamische Aktivität ihr Maximum erreicht und die Liberation durch den hohen Konzentrationsgradienten begünstigt wird. In den Mikroemulsionen und im Rextop® Gel wurden keine ungelösten MTX Partikel gefunden. Das Verhältnis c_{Vehikel}/c_s lag bei 0,8. Folglich konnte die maximale thermodynamische Aktivität nicht erreicht werden.
2. **pH-Wert:** Der IEP von MTX liegt bei 3,4. Es kann angenommen werden, dass ein saurer pH-Wert des Vehikels sich positiv auf die Penetrationsrate von MTX auswirkt. Eine Untersuchung von SIDDIQUI et al. bezüglich der topischen Absorption von MTX zeigte, dass mit steigendem pH-Wert der eingesetzten MTX-

Lösung die lag-Zeit erheblich zu- und gleichzeitig der Flux abnahm. Bei einem pH-Wert von 3,4 lag die Verzögerungszeit unter einer Stunde, bei einem pH-Wert von 8 bereits bei elf Stunden [288]. Betrachtet man die pH-Werte der in dieser Arbeit eingesetzten Vehikel (Tab. 27), so konnte dieser Zusammenhang nicht festgestellt werden. Die Basiscreme, welche eine hohe Penetrationsrate erzielen konnte und das Hydrogel mit den schlechtesten Penetrationsergebnissen wiesen einen vergleichbaren pH-Wert auf.

Tab. 27: pH-Werte verschiedener Formulierungen (MW \pm SD, n=3)

	ME-OW-MTX	ME-WO-MTX	BC-DAC-MTX	Rextop® Gel
pH-Wert	6,7 \pm 0,2	(5-6)	5,4 \pm 0,1	5,2 \pm 0,2

3. **Liberation:** Es stellt sich ebenfalls die Frage, ob MTX aus den entwickelten Formulierungen überhaupt freigesetzt werden konnte. Vorangegangene Freisetzungsuntersuchungen unter Verwendung des MSMM [289] (Ergebnisse nicht gezeigt) belegen, dass durch Cotransport von Lösungsmittelbestandteilen (*solvent drag Effekt*) eine hohe Freisetzung von MTX aus den ME-Systemen erzielt werden konnte. Auch die Freisetzung von MTX aus der amphiphilen Creme konnte unter *sink*-Bedingungen nachgewiesen werden.
4. **Wasseranteil:** Zusätzlich könnte der Wasseranteil für die Penetration von hydrophilen Arzneistoffen eine wesentliche Rolle spielen. Die Arbeitsgruppe um OSBORNE et al. konnte aufzeigen, dass die Penetration von Glucose, einem hydrophilen Molekül, mit steigendem Wasseranteil der ME zunahm [290]. In den hier eingesetzten Formulierungen Hydrogel (ca. 90 % Wasser), Basiscreme (40 % Wasser), O/W-ME (60 % Wasser), W/O-ME (1,7 % Wasser) wurde allerdings kein Einfluss des Wasseranteils auf die Penetrationsrate von MTX gefunden.
5. **Enhancer:** Schließlich bleibt noch die Vermutung, dass das in der Basiscreme enthaltene Propylenglykol im Sinne des *solvent drag* Effektes einen besseren Penetrationenhancer für MTX darstellt als das in den Mikroemulsionen verwendete Pentylenglykol. Aufgrund der besseren Löslichkeit von MTX in Propylenglykol im Vergleich zu Pentylenglykol liegt diese Vermutung nahe. Ebenso konnte in einer Studie aus dem Jahr 1982 eine MTX-haltige Formulierung, welche Propylenglykol enthielt, im Vergleich zu Wasser und zu einer 2,5 %igen DMSO-Lösung die DNA-Synthese in der behandelten Haut inhibieren. Es wurde geschlossen, dass nur ausreichend penetriertes MTX diesen Effekt hervorrufen konnte [196]. Daher soll in weiteren Experimenten der penetrationssteigernde Effekt von Propylenglykol näher untersucht werden (siehe Kapitel 4.4.4).

4.3.6 Magistralrezeptur

Aufgrund der vielversprechenden Penetrationsergebnisse nach Applikation der Basiscreme DAC wurde in Zusammenarbeit mit der *Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie* unter der Leitung von Prof. Dr. Johannes Wohlrab eine Magistralrezeptur für die dermale Anwendung von MTX entwickelt [291]. Diese soll dem fachkundigen Arzt eine sinnvolle Therapieoption bieten, um insbesondere Einzelfälle mit der Indikation Mycosis fungoides, lymphomatoide Papulose sowie Psoriasis vulgaris zu behandeln. Die entwickelte Magistralrezeptur ist unter der Berücksichtigung des Arbeitsschutzes für Zytostatika einfach herzustellen, ausreichend physikalisch sowie mikrobiell stabil und entspricht den Anforderungen der ApBetrO.

Mittels pharmakokinetischer Daten (siehe Kapitel 4.2.1) und den ermittelten Akzeptorkonzentrationen konnte abgeschätzt werden, wie hoch das Risiko ist, dass MTX den systemischen Kreislauf erreicht und zu unerwünschten Arzneimittelwirkungen führt [291]. Die errechneten potenziellen Plasmakonzentrationen (in der Arbeit [291] gezeigt) lagen mindestens zehnfach bis 87fach unter den ermittelten Plasmakonzentrationen nach oraler Gabe von 15 mg MTX [178, 292]. Dementsprechend besitzt MTX ein unbedenkliches Sicherheitsprofil für die topische Anwendung [291]. Bei wiederholter Applikation können systemische Wirkungen wahrscheinlicher werden, da MTX über einen längeren Zeitraum im Körper in Form von Polyglutamaten intrazellulär gespeichert wird (siehe Kapitel 4.2.1). Deshalb ist bei Mehrfachapplikation auf ein ausreichend großes Dosierungsintervall zu achten.

Die Hautverträglichkeit von MTX wurde im Rahmen einer klinischen Studie (Phase I) an 30 Probanden getestet [232]. Im RIPT (*engl.* repeated Insult-Patch-Test), einem gängigen Hautverträglichkeitstest für Kosmetika, zeigten weder die Placeboformulierung ohne MTX, das Rextop® Gel noch ein MTX-haltiges Niosomalgel (0,25 % MTX) Reizerscheinungen oder Sensibilisierungen der Haut. Auch im Rahmen einer größer angelegten klinischen Studie zur Wirksamkeit bei Psoriasis vulgaris wurde die Behandlung mit einem MTX-Gel von allen 60 Patienten sehr gut vertragen [221]. Insgesamt kann man annehmen, dass topisch appliziertes MTX allgemein gut verträglich ist.

4.3.7 Zusammenfassung

Zunächst konnten sehr erfolgversprechende Mikroemulsionen auf Zuckeresterbasis entwickelt werden, welche charakteristisch sehr mannigfaltig sind. Besonders das ME-L-595-System stellt mit der Existenz von drei Phasenlagen (O/W, W/O, bikontinuierlich) ein außergewöhnliches Vehikel dar. Mit einer Vielzahl von Untersuchungen wurden die Systeme umfangreich charakterisiert und die Existenz der Mikroemulsionen belegt. Ferner war es gelungen, MTX, trotz seiner schlechten Löslichkeit, in ausreichend hohen Konzentrationen in die kolloidalen Systeme einzuarbeiten. Auch die physikalische und mikrobielle Stabilität über einen Zeitraum von einem Jahr bzw. drei Jahren wurde durch den Einsatz der ME gewährleistet.

Infolgedessen konnten Studien zur Penetration an Humanhaut durchgeführt werden. Mit den dafür entwickelten analytischen Methoden (HPLC-UV) konnten besonders geringe Konzentrationen in den einzelnen Hautschichten nachgewiesen werden. Die Penetration von MTX konnte durch die Applikation der Mikroemulsionen verbessert werden (Vergleich zur Literatur und zum Gel). Überraschenderweise penetrierte MTX aus der Basiscreme DAC wesentlich besser in die Haut als durch den Einsatz der kolloidalen Systeme. Aus den gewonnenen Daten konnte eine Magistralrezeptur zur dermalen Anwendung von MTX entwickelt werden. Es ist somit erwiesen, dass durch den Einsatz geeigneter Vehikel die Penetration von MTX verbessert werden konnte. Aufgrund dessen, dass die ME-L-595 als O/W-, W/O- und bikontinuierliches System existiert, wäre es in weiterführenden Untersuchungen interessant, die Penetration eines Modellarzneistoffes zu bestimmen und damit den Einfluss der Phasenlage zu ermitteln.

Ebenso wäre es für die Verifizierung der erhaltenen Ergebnisse wichtig, die Hautpenetrationsversuche mit einer größeren Anzahl an Spenderhäuten durchzuführen. Jedoch ist dies angesichts der geringen Verfügbarkeit an Spenderhäuten äußerst problematisch. Trotz der aussichtsreichen Ergebnisse muss die klinische Wirksamkeit der Formulierungen in weiterführenden Studien, speziell an psoriatischer Haut, belegt werden, um ein geeignetes Vehikel zur Therapie der Psoriasis auswählen zu können.

4.4 Verbesserung der Penetrationsrate von Methotrexat durch Ionenpaarbildung

Bedauerlicherweise konnte durch den Einsatz der entwickelten kolloidalen Carriersysteme nicht die gewünschte Penetrationssteigerung des hydrophilen Arzneistoffes MTX erzielt werden. Demzufolge wurde nach weiteren Möglichkeiten gesucht, um hohe MTX-Konzentrationen in den Zielkompartimenten Epidermis und obere Dermis zu erreichen. In den letzten Jahren hat das Ionenpaarkonzept aufgrund der Vielzahl an anderen Möglichkeiten (Nanopartikel, Liposomen, Mikroemulsionen) nur wenig Beachtung in der dermalen und transdermalen Anwendung erhalten. Jedoch stellt die Bildung eines Ionenpaars in diesem Fall ein interessantes Konzept dar. Betrachtet man die Ladung des MTX-Moleküls bei verschiedenen pH-Werten (Abb. 42), liegt MTX bei leicht sauren und physiologischen pH-Werten überwiegend als Anion vor.

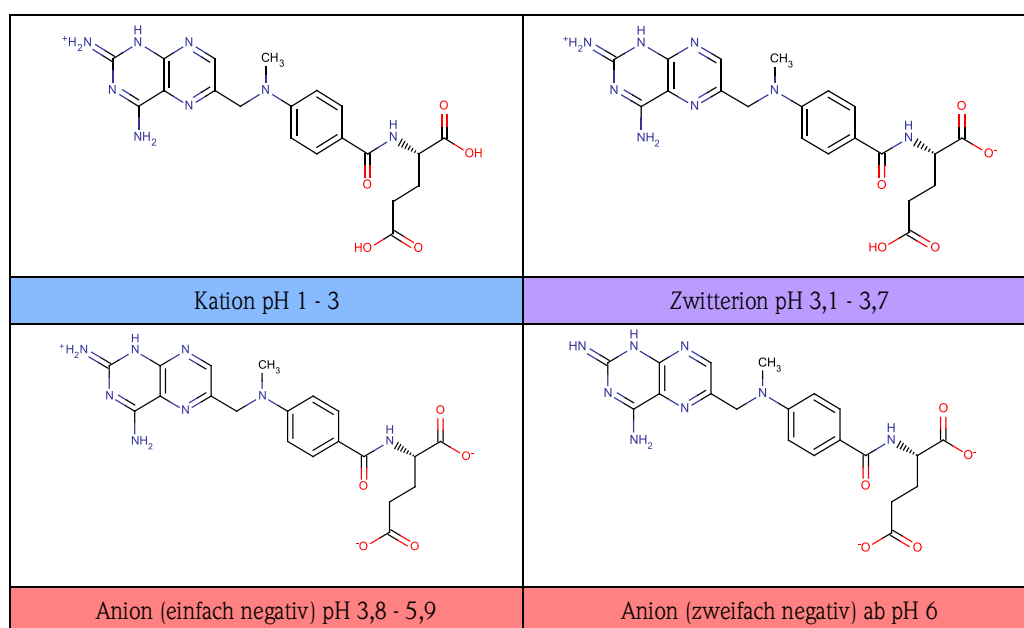


Abb. 42: Vorliegende Ladung des MTX-Moleküls bei unterschiedlichem pH-Wert

Ab einem pH-Wert von 6 liegt das Molekül zu 55 % als zweifach-negativ geladenes Anion vor und ab einem pH-Wert von 7 zu 99 %. Die angegebenen Prozenzte der vorliegenden Spezies wurden mittels der Software MarvinSketch berechnet [123].

Aus diesem Grund sollte ein geeignetes Gegenion kationisch sein, eine hohe Lipophilie besitzen, physiologisch kompatibel und metabolisch stabil sein. Für die Ionenpaarbildung ist es ebenso wichtig, dass das Gegenion geringfügig im gewünschten Medium löslich ist, um überhaupt ein Ionenpaar bilden zu können [111].

4.4.1 Identifizierung geeigneter Gegenionen

a) Physikochemische Charakterisierung möglicher Gegenionen

Zunächst wurde nach möglichen, bei physiologischen Bedingungen kationisch vorliegenden, Gegenionen gesucht, die den eben aufgeführten Anforderungen entsprechen. Diese wurden hinsichtlich ihrer physikochemischen Eigenschaften wie Verteilungskoeffizient, Molekulgewicht, IEP und Ladung bei einem pH-Wert von 7 bewertet (Tab. 28).

Tab. 28: Mögliche Gegenionen und ihre physikochemischen Eigenschaften sowie Färbung der Chloroformphase (CP)

Gegenion	M [g·mol ⁻¹]	IEP	Log P	Log D _{pH 7}	Ladung _{pH 7}	Färbung der CP
BAC	284 ^a	-	0,9	0,9	1 fach positiv	gelb
	424 ^b		5,3	5,3		
BDAC	396 ^c	-	4,4	4,4	1 fach positiv	gelb
Cetylpyridiniumchlorid	340	-	3,5	3,5	1 fach positiv	schwach gelb
DODAB [293]	631	-	11,1	11,1	1 fach positiv	-
DOETAB [293]	673	-	12,4	12,4	1 fach positiv	-
Dodecyltrimethylammoniumbromid	308	-	0,9	0,9	1 fach positiv	farblos
Hexadecylpyridiniumbromid	384	-	3,5	3,5	1 fach positiv	farblos
Lidocain	234	10,8	1,5	0,7	1 fach positiv	farblos
Lysin [294]	146	9,8	-0,7	-5,8	1 fach positiv	farblos
Ornithin	132	9,8	-1,2	-6,1	1 fach positiv	farblos
Phytosphingosin	318	11,2	3,7	1,8	1 fach positiv	farblos
Salicyloyl-Phytosphingosin	438	3,6	5,7	5,7	neutral	-
Spermin	202	-	-1,5	-10,5	4fach positiv	farblos
Spermidin	145	-	-1,2	-8,5	3fach positiv	farblos
Sphingosin	300	11,7	4,6	2,4	1 fach positiv	farblos
Triethylamin [295]	101	-	1,3	-1,8	1 fach positiv	(flüchtig)

^a berechnet als C17H30CIN (R=C8), ^b berechnet als C27H50CIN (R=C18); ^c berechnet als C25H46CIN

Das Molekulgewicht beider Ionen sollte nicht zu groß sein, da das resultierende Ionenpaar entsprechend größer und eine dermale Penetration zusätzlich erschwert wird. Daher wurden die beiden kationischen Lipide, Dioctadecyldimethylammoniumbromide (DODAB) und Dioctadecyltrimethylammoniumbromide (DOETAB), welche in Arbeiten von BHATTACHARYA et al. [293] eingesetzt wurden, in weiteren Untersuchungen nicht berücksichtigt. Die aufgeführten Aminosäuren und die beiden Polyamine Spermin und Spermidin könnten hinsichtlich ihres log *D* bzw. log *P* Wertes zu hydrophil sein, um ein ausreichend lipophiles Ionenpaar zu bilden. Durch den Einsatz der Software MarvinSketch [123] konnte zusätzlich berechnet werden, welche Ladung die Moleküle bei einem pH-Wert von 7 besitzen. Fast alle ausgesuchten Substanzen liegen bei einem pH-Wert von 7 als Kation vor und sind prinzipiell als Gegenion geeignet.

b) Extraktion der Ionenpaare

Um festzustellen, ob die ausgesuchten Gegenionen einen Ionenpaar-Komplex mit MTX bilden, wurden diese mit MTX in Puffern verschiedener pH-Werte (5, 6 und 7) und in verschiedenen Stoffmengenverhältnissen (MTX:Gegenion 1:2, 1:4, 1:6) gelöst und anschließend mit Chloroform extrahiert. Das MTX-Molekül besitzt zwei negative Ladungen aufgrund der zwei vorhandenen Carboxylgruppen, welche bei einem pH-Wert von 7 negativ geladen vorliegen. Es sind also zwei Moleküle eines einfach-positiv geladenen Gegenions nötig, um ein neutrales Ionenpaar zu bilden. Da MTX in Chloroform nicht löslich ist und eine gelbe Farbe aufweist, konnten anhand der Gelbfärbung der Chloroformphase (CP) erste Hinweise auf einen Einfluss des Gegenionenzusatzes erhalten werden.

Wie aus Tab. 28 hervorgeht, zeigten nur die quartären Ammoniumverbindungen Benzalkoniumchlorid (BAC) und Benzyltrimethylhexadecylammoniumchlorid (BDAC) (Abb. 43) eine ausgeprägte Gelbfärbung. Die Intensität der Gelbfärbung nahm mit steigendem Anteil an Gegenion (1:10) zu. Gegensätzlich zu den Arbeiten von NAM et al. [294] oder IVATURI et al. [296] scheint die Hydrophilie der Aminosäuren Lysin und Ornithin sich ungünstig auf eine Ionenpaar-Bildung mit MTX auszuwirken. Sphingosin und Phytosphingosin wurden ferner für erfolgversprechende Kandidaten gehalten, konnten jedoch in den Pufferlösungen trotz verschiedenster

Bedingungen (Erhitzen, Rühren, Ultraschallbad) nicht gelöst werden. Durch Synthese des Phytosphingosin Hydrochlorids (durch die Firma Evonik) könnte dies in zukünftigen Experimenten eingesetzt werden. Betaine, Amphetamine oder kationische Farbstoffe könnten ebenfalls mögliche Gegenionen darstellen.

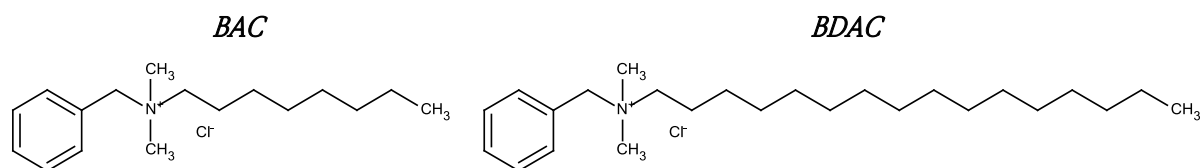


Abb. 43: Chemische Struktur von BAC (links) als C₁₇H₃₀ClN und BDAC (rechts) als C₂₅H₄₆ClN

Beide quartäre Ammoniumverbindungen kommen als Gegenion für MTX in Frage. Bei BAC handelt es sich um ein Gemisch von Alkylbenzyltrimethylammoniumchloriden, deren Alkylrest aus C₈- bis C₁₈-Ketten besteht. BAC ist ein bekanntes kationisches Tensid und wird als Konservierungsmittel in Ophthalmika in Konzentrationen von 0,01 % eingesetzt [297].

BDAC, auch Cetalkoniumchlorid genannt, weist ebenfalls eine amphiphile Struktur auf und gehört zur Gruppe der Desinfektionsmittel. Es wird aufgrund seiner antiseptischen Wirkung vor allem in der Mundhöhle angewendet (0,01 % Tenderdol[®] Mundgel; CH).

4.4.2 Einfluss der Ionenpaarbildung von MTX auf den Verteilungsprozess

Die Bestimmung des Verteilungskoeffizienten ($\log D$) von MTX unter Zusatz der Gegenionen BAC sowie BDAC sollte nun die Entstehung eines lipophilen Ionenpaar-Komplexes bestätigen. Hierfür wurde das bekannte n-Octanol/Puffer-System verwendet. Aufgrund der guten Löslichkeit von MTX und der Möglichkeit, nur eine Pufferlösung für die pH-Werte 5, 6 und 7 zu verwenden, kam der Citrat-Phosphat-Puffer nach McIlvaine zum Einsatz.

Da der Transport eines Ionenpaars nicht in äquimolaren Verhältnissen erfolgen muss [111], wurde der Verteilungskoeffizient für verschiedene molare Verhältnisse (MTX:Gegenion 1:2, 1:4, 1:6 und 1:10) bestimmt. Durch Quantifizierung der MTX-Konzentrationen sowohl in den Puffer- als auch in den Octanolphasen konnte die WFR zur Absicherung der Ergebnisse ermittelt werden. Diese betrug bei allen Versuchen $96 \pm 1\%$. Zum Vergleich wurde ebenfalls der Verteilungskoeffizient von MTX ohne Gegenion bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 29 und in Abb. 44 dargestellt.

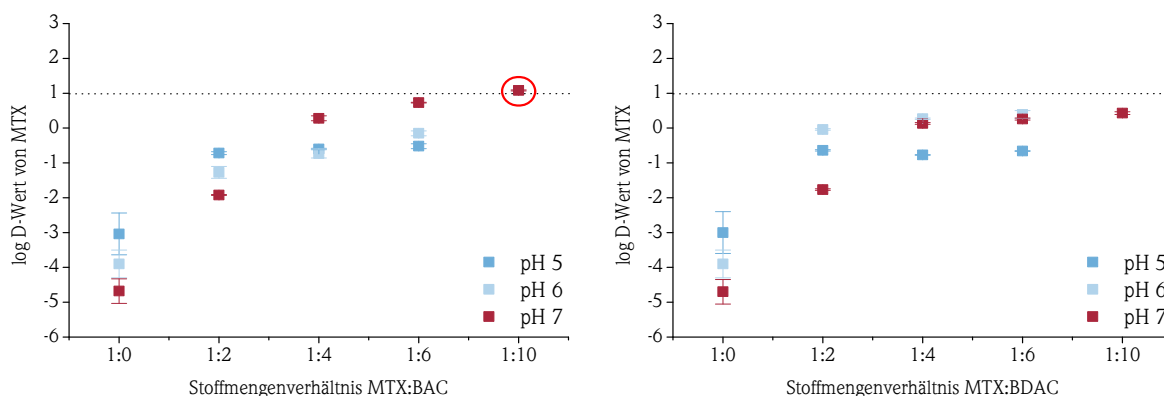


Abb. 44: Veränderung des Octanol-Puffer-Verteilungskoeffizienten von MTX in Abhängigkeit vom pH-Wert und des molaren Verhältnisses zu BAC (links) sowie BDAC (rechts) bei 32 °C (MW \pm SD; n=9; MTX ohne Gegenion: n=3)

Tab. 29: Verteilungskoeffizienten von MTX in Gegenwart von BAC und BDAC bzw. ohne Gegenion bei verschiedenen pH-Werten bei einer Temperatur von 32 °C (MW±SD, n=9; MTX ohne Gegenion: n=3)

pH-Wert	log <i>D</i> -Werte für MTX:BAC				log <i>D</i> -Werte für MTX:BDAC				log <i>D</i> MTX
	1:2	1:4	1:6	1:10	1:2	1:4	1:6	1:10	
5	-0,72±0,04	-0,60±0,02	-0,52±0,07	-	-0,64±0,02	-0,77±0,01	-0,66±0,01	-	-3,0±0,6
6	-1,27±0,17	-0,73±0,13	-0,15±0,07	-	-0,04±0,02	0,27±0,02	0,39±0,11	-	-3,9±0,4
7	-1,92±0,01	0,28±0,07	0,73±0,01	1,08±0,02	-1,29±0,02	0,13±0,02	0,26±0,03	0,43±0,04	-4,7±0,4

Normalerweise wird der Verteilungskoeffizient von MTX mit steigendem pH-Wert immer kleiner (negativer Wert), da der IEP bei 3,5 liegt. Jedoch geht aus den Untersuchungen deutlich hervor, dass durch Zugabe beider Gegenionen der log *D*-Wert bei allen pH-Werten signifikant größer wurde, MTX folglich unpolarer wird bzw. ein lipophiles Ionenpaar entsteht.

Bei einem pH-Wert von 7 und einem Verhältnis von 1:10 (MTX:BAC) konnte sogar ein log *D*-Wert von 1 erreicht werden, was dem Idealwert für eine dermale Penetration entspricht (Abb. 44 - links) [298]. Die Abhängigkeit vom pH-Wert ist mit dem größer werdenden Anteil an negativ geladenen MTX-Molekülen bei steigendem pH-Wert relativ einfach erklärbar. Ab einem pH-Wert von 7 liegt MTX nahezu vollständig dissoziiert vor.

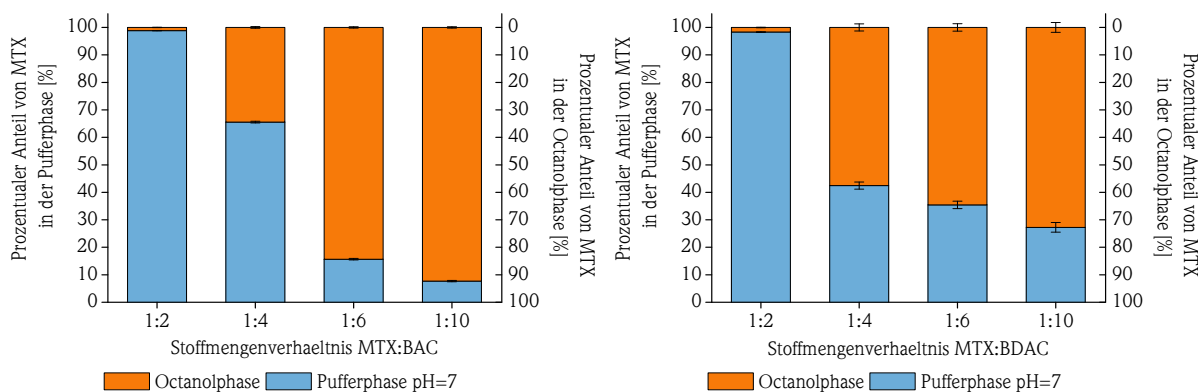


Abb. 45: Prozentualer Anteil von MTX in der Puffer- bzw. in der Octanolphase in Gegenwart von BAC (links) sowie BDAC (rechts) bei einem pH-Wert von 7 (MW±SD; n=9)

Überdies bewirkte bereits ein molares Stoffmengenverhältnis von 1:6 (MTX:Gegenion) bei einem pH-Wert von 7 einen starken Anstieg der Lipophile. Unter Einsatz von BAC lagen bei diesem Verhältnis ca. 84 % der Gesamtmenge des eingesetzten MTXs in der Octanolphase vor. Bei einem 1:2-Verhältnis waren es dagegen nur 2 %. Bei BDAC diffundierten ca. 65 % in die lipophile Phase wenn das Verhältnis 1:6 betrug, wohingegen sich bei einem Verhältnis von 1:2 nur maximal 2 % des eingesetzten MTX quantifizieren ließen (Abb. 45). Der Einfluss von BAC auf den Verteilungskoeffizienten von MTX scheint demnach wirkungsvoller zu sein als der von BDAC.

Durch die Entwicklung geeigneter analytischer Methoden konnte nicht nur MTX in beiden Phasen quantifiziert werden, sondern auch das jeweilige Gegenion. BAC und BDAC können mittels HPLC-Trennung und massenspektrometrischer Analyse in Konzentrationen ab 1 ng/ml erfasst werden. Dabei wurde festgestellt, dass BAC in allen Fällen nahezu vollständig in die Octanolphase übergang. Es konnten nur geringe Konzentrationen von kleiner 10 µg/ml in den Pufferphasen detektiert werden. Ebenso konnte BDAC, trotz der hohen Empfindlichkeit dieser Methode, nicht mehr in den Pufferphasen nachgewiesen werden.

Die Resultate zeigen, dass durch Ionenpaarbildung mit BAC und BDAC der Verteilungskoeffizient von MTX signifikant erhöht werden konnte. Es war gelungen, MTX in großen Mengen in die Octanolphase zu überführen. Dies lässt vermuten, dass ein pH-Wert von 7 und ein molares Stoffmengenverhältnis von mindestens 1:6 die dermale Penetration von MTX deutlich verbessern könnten.

4.4.3 Einfluss der Ionenpaarbildung auf die Liberation von MTX in Lipidmembranen

Mit Hilfe des MSMM nach FÜRST und NEUBERT [289] und unter Verwendung von Dodecanol-Colloidum-Membranen (DCM) sollte das Liberationsverhalten von MTX in Gegenwart eines Gegenions untersucht werden. Da BAC einen etwas besseren Effekt auf den Verteilungskoeffizienten hatte, wurde es als Gegenion für die MSMM-Versuche ausgewählt.

Um ausschließlich den Einfluss des Gegenions ermitteln zu können, musste eine Formulierung mit wenigen, nicht-ionischen Inhaltsstoffen verwendet werden. Dafür eignete sich in erster Linie ein Hydrogel auf Hydroxyethylcellulosebasis (1,5 %). Der pH-Wert dieser Formulierung wurde auf 7 eingestellt. Das Verhältnis MTX zu BAC wurde 1:10 gewählt, da der ermittelte Verteilungskoeffizient ($\log D_{\text{pH } 7} = 1$) bei diesem pH-Wert am höchsten war. Die eingesetzte MTX-Konzentration betrug 0,5 %. Aufgrund der besseren Löslichkeit des Ionenpaars in Propylenglykol als in Pentylenglykol (Tab. 30) wurden 20 % Propylenglykol zur Konservierung in das Hydrogel eingearbeitet. Die genaue Herstellungsvorschrift ist in Kapitel 6.1, Abschnitt II-d beschrieben.

Tab. 30: Sättigungslöslichkeiten des MTX-BAC-Ionenpaars (IP) in Propylenglykol (PrG) und Pentylenglykol (PeG) im Vergleich zu MTX ohne Gegenionzusatz (MW \pm SD, n=3)

	c_s in PrG	c_s in PeG
IP-MTX+BAC (1:10, m/m)	4,5 \pm 0,2 mg/ml	3,9 \pm 0,1 mg/ml
MTX	1,5 \pm 0,1 mg/ml	0,9 \pm 0,0 mg/ml

Das Vorliegen von *sink*-Bedingungen ist eine wichtige Voraussetzung zum Erreichen von optimalen Liberationsergebnissen. Aufgrund der guten Löslichkeit von MTX in Gegenwart von BAC in der Octanolphase (siehe Kapitel 4.4.2) wurde die Aufnahmekapazität in den drei Membranen des MSMM berechnet. Bei vollständiger Freisetzung des Wirkstoffes (10 mg Formulierung enthalten 50 μ g MTX) ist mit einer Akzeptorbelegung von 20 % zu rechnen und demgemäß sind noch vertretbare *sink*-Bedingungen (< 10 %) gewährleistet.

Weiterhin wurde der Versuchsaufbau des MSMM optimiert, so dass nun für jede einzelne Zelle ($n=8$) die Wiederfindungsrate bestimmt wird, indem man die restliche Formulierung mit einem Tupfer abwischt. In früheren Untersuchungen wurde immer nur von einer Zelle die WFR bestimmt und von den restlichen sieben Zellen abgezogen. Dadurch, dass der nicht-liberierte MTX-Anteil für jede Zelle einzeln ermittelt wird, erhält man die Wiederfindungsrate pro Zelle, was zu einer sehr guten Ergebnisqualität führt. Für die Liberationsversuche mit Gegenion wurde eine durchschnittliche Wiederfindungsrate von 85,6 \pm 13,5 % erhalten, für die Versuche ohne Gegenion von 91,8 \pm 7,8 % (MW \pm SD; $n=50$). Weitere Details zum Aufbau des MSMM sind in Kapitel 6.8 beschrieben.

Ergebnisse

In Abb. 46 sind die Liberationsergebnisse von MTX in An- und Abwesenheit des Gegenions nach sieben verschiedenen Versuchszeiten dargestellt. Durch Zugabe des Gegenions BAC (1:10) konnte eine signifikante Verbesserung der MTX-Liberation herbeigeführt werden. Bereits nach 15 min diffundierten über 65 % der applizierten MTX-Dosis in die oberste Membran (A). Nach weiteren 15 min konnte MTX bereits in der zweiten Membran (B) nachgewiesen werden und nach insgesamt 60 min sogar in der untersten Membran (C). Die insgesamt-liberierte MTX-Menge betrug nach 15 min 65 % und nach 30 min 80 %. Vergleichend dazu wurden aus dem Hydrogel ohne dem Zusatz des Gegenions nach 15 min lediglich 15 % und nach 30 min 50 % freigesetzt. Zu keinem Zeitpunkt konnte MTX in Abwesenheit von BAC in der mittleren oder untersten Membran detektiert werden.

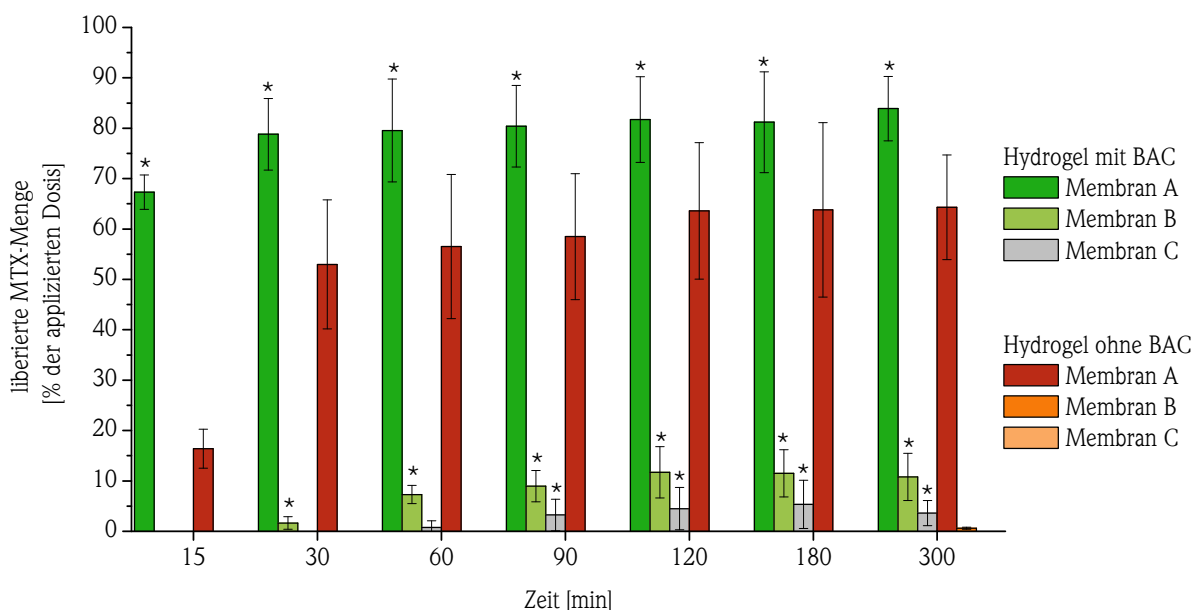


Abb. 46: In vitro Liberation von MTX aus dem Hydrogel mit und ohne dem Gegenion BAC (MW \pm SD; n=8; *p<0,01 gegenüber der jeweiligen Membran des Hydrogels ohne BAC)

Da das Hydrogel aufgrund seines hohen Wassergehaltes zum Austrocknen neigte, erwies es sich als schwierig, die restliche Formulierung nach Ende der Versuchszeit wieder vollständig zu entfernen, ohne Arzneistoff aus der obersten Membran zu extrahieren. Daher resultierten etwas höhere Standardabweichungen in den obersten Membranen nach längeren Versuchszeiten als in den anderen beiden Membranen.

Zusätzlich war es möglich, die liberierte Menge des Gegenions BAC mittels einer geeigneten HPLC-UV Methode (siehe Kapitel 6.3.1) in den Membranen des MSMM zu quantifizieren (Abb. 47) und dadurch zusätzliche Hinweise auf das Liberationsverhalten von MTX und BAC zu erhalten. Bereits nach 15 min konnten über 60 % des BAC in der obersten Membran und minimale Mengen in der mittleren Membran nachgewiesen werden. Nach 60 min stiegen die BAC-Konzentrationen in der mittleren und untersten Membran weiter an. Aufgrund des simultanen Liberationsverhalten zum hydrophilen MTX und der Verteilung in den drei Membranen lässt sich vermuten, dass beide Stoffe als Ionenpaar zusammen diffundieren.

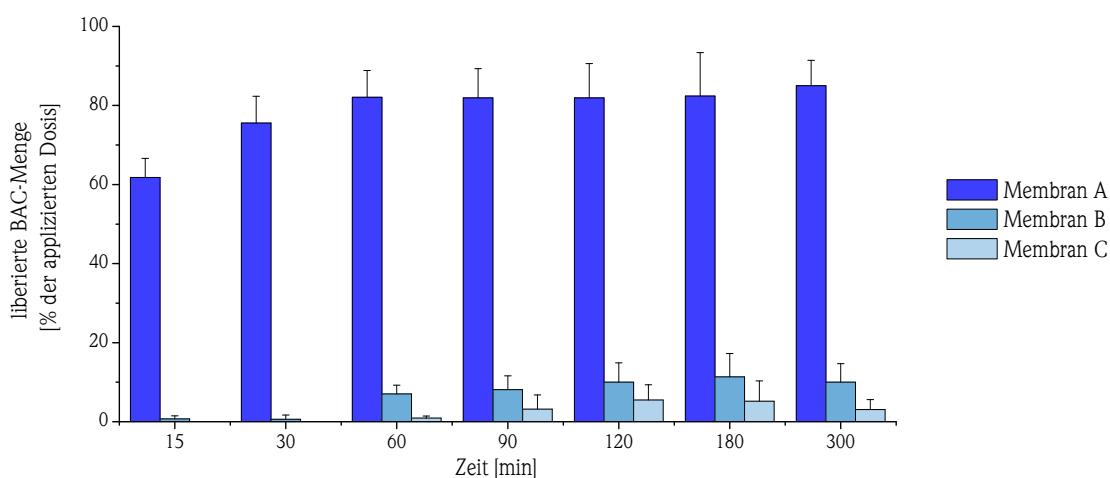


Abb. 47: In vitro Liberation von BAC aus dem Hydrogel in die Membranen (MW \pm SD; n=8).

Diese Vermutung lässt sich auch verdeutlichen, wenn man die insgesamt liberierte Menge von MTX und BAC (Abb. 48) betrachtet. Es wurde immer der gleiche Anteil der applizierten Dosis beider Substanzen freige-

setzt. Das bestehende Verhältnis (1:10) in der Formulierung blieb daher auch während des Diffusionsprozesses in den Akzeptor bestehen. Nach 30 min wurden bereits 80 % des applizierten Ionenpaars in den drei Membranen gefunden und nach 120 min erreichte die Liberation bereits den Maximalwert von 98 %. Zu jeder Versuchszeit war das Gel mit dem Ionenpaar dem Gel mit MTX allein signifikant überlegen. Das Gel ohne Gegenion konnte zu keiner Versuchszeit eine nahezu vollständige Liberation von MTX erreichen. Nach 120, 180 und 300 min wurden maximal 60 % des applizierten MTX freigesetzt.

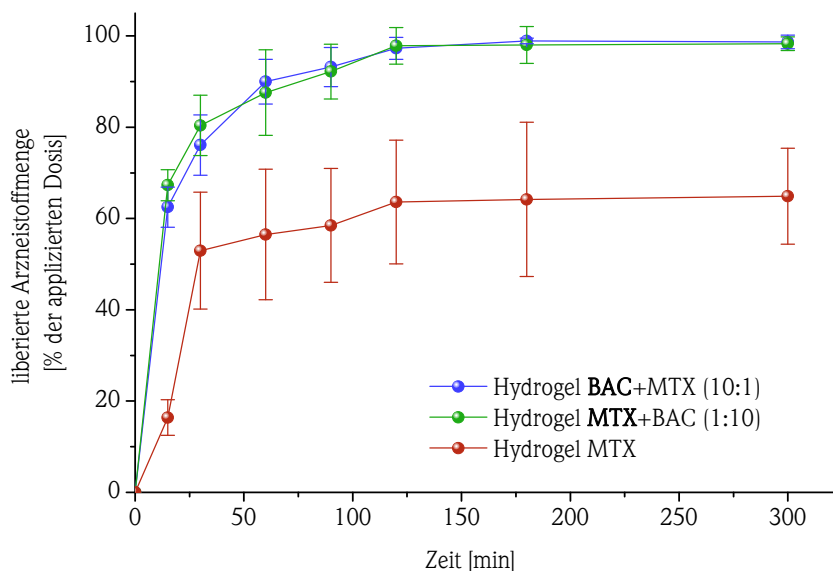


Abb. 48: Zeitabhängige Zunahme von MTX in Gegenwart von BAC, von BAC in Gegenwart von MTX und von MTX ohne BAC-Zusatz in den drei Membranen des MSMM bezogen auf die applizierte Dosis (MW \pm SD; n=8)

Zusammenfassend kann man feststellen, dass die Freisetzung des hydrophilen Arzneistoffes MTX aus dem Hydrogel in die lipophilen Membranen des MSMM durch die Zugabe eines Gegenions signifikant gesteigert werden konnte. Außerdem kann man davon ausgehen, dass MTX und BAC simultan, folglich als Ionenpaar, in die Membranen diffundieren.

4.4.4 Einfluss der Ionenpaarbildung auf das Penetrationsverhalten von MTX in exzidierte Humanhaut

Abschließend stellt sich nun die spannende Frage, ob durch Ionenpaarbildung, neben der gesteigerten Lipophilie und Liberation von MTX, auch eine Verbesserung der dermalen Penetrationsrate herbeiführt werden kann. Der Einsatz von FRANZ-Diffusionszellen sollte *ex vivo* Penetrationsstudien an exzidierte Humanhaut ermöglichen. Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit von Humanhaut wurde jeweils eine Haut von einem Patienten verwendet und geviertelt ($n=4$). Wie in den Liberationstudien (siehe Kapitel 4.4.3) wurde das Hydrogel mit Ionenpaar (MTX:BAC - 1:10) und ohne getestet. Die eingesetzte MTX-Konzentration betrug 0,5 %. Die MTX- und die BAC-Konzentrationen in den verschiedenen Hautschichten (Stratum corneum, lebende Epidermis und Dermis) sowie im Akzeptor wurden nach einer Applikationszeit von 300 min bestimmt. In Abb. 49 (links) sind die penetrierten Anteile an MTX bzw. BAC nach Applikation der Hydrogele in Anteilen der applizierten Dosis grafisch dargestellt. Des Weiteren wurden Tiefenprofile erstellt, um das jeweilige Volumen der entsprechenden Hautkompartimente mit einbeziehen zu können (rechts).

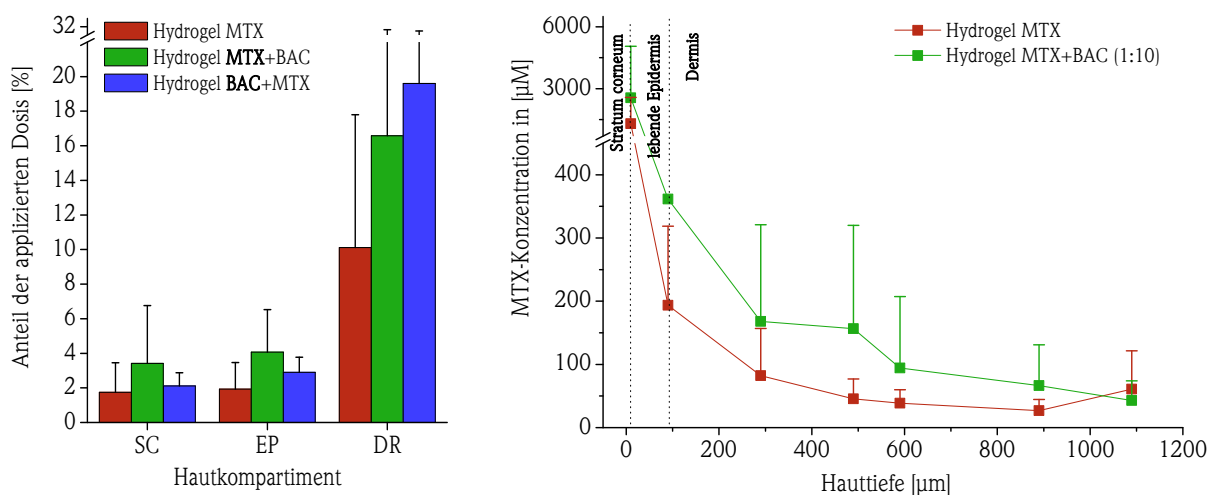


Abb. 49: Penetrationsergebnisse von MTX mit und ohne Zusatz von Gegenion (rot und grün) und Penetration von BAC (blau) aus dem Hydrogel dargestellt in Anteilen der applizierten Dosis (links) sowie Tiefenprofil unter Berücksichtigung der Dicke der einzelnen Hautschichten in absoluten Konzentrationen [µM] (rechts) nach 300 min Inkubationszeit (MW±SD; n=4).

Zunächst ist festzustellen, dass tendenziell höhere MTX-Konzentrationen im Stratum corneum und in der lebenden Epidermis durch Einsatz des Ionenpaares erreicht werden konnten als ohne Zusatz des Gegenions. Besonders in der Dermis wurden hohe MTX-Konzentrationen nachgewiesen. Dabei erreichte das Hydrogel ohne Gegenion eine MTX-Menge von 10,1 % in allen Dermissschichten und das Hydrogel mit Gegenion 16,6 %, jeweils bezogen auf die applizierte Dosis. Im Akzeptorkompartiment konnte weder MTX noch BAC detektiert werden. Dies lässt sich einerseits mit der ausgeprägten Lipophilie des Ionenpaares begründen, welches sich eher schlecht in das hydrophile Akzeptormedium (Aqua dest.) verteilt und andererseits mit der schlechten Wasserlöslichkeit von MTX.

Betrachtet man die Tiefenprofile der beiden Hydrogele, dann ist gut erkennbar, dass in allen Hauttiefen die MTX-Menge fast doppelt so hoch war in Gegenwart von BAC, als wenn die Penetration von MTX allein erfolgte. Die niedrigsten MTX-Konzentrationen (100 µM) wurden in den unteren Dermissschichten für beide Gele quantifiziert. Die MTX-Konzentration im Stratum corneum konnte durch den Einsatz von BAC, von 1306 µM auf 2554 µM, verdoppelt werden. Aufgrund der Lipophilie des Ionenpaares scheint es daher eher zu einer Kumulation der aktiven Komponente in der Epidermis, dem gewünschten Zielkompartiment zu kommen.

Derzeit existieren nur zwei Studien zur Steigerung der Permeation von MTX durch die Bildung von Ionenpaaren. TROTTA et al. [220] zeigten eine Erhöhung des Fluxes von MTX bei einem pH-Wert von 4 durch Zugabe von Natriumlaurylsulfat bzw. Docusat-Natrium. Jedoch scheint diese Studie äußerst fragwürdig zu sein, da es sich bei beiden Gegenionen um negativ geladene Ionen handelt. Folglich ist es eher unwahrscheinlich, dass ionische Wechselwirkungen zwischen zwei negativ geladenen Molekülen bestehen. Die andere Studie befasste sich mit der Permeation von MTX durch die Nasenschleimhaut von Ratten. Als Gegenion kam L-Arginin zum Einsatz, welches den Flux signifikant erhöhen konnte [296]. Jedoch wurde im Rahmen dieser Arbeit, mit dem verwandten Molekül Lysin, welches den gleichen IEP von 10 besitzt (siehe Kapitel 4.4.1), kein Ionenpaar mit MTX erhalten werden.

Aufgrund der hohen Standardabweichung wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet. Die hohen Standardabweichungen können in diesem Fall durch eine mögliche periphere Applikation des Hydrogels auf der Hautoberfläche, wie in Abb. 50 dargestellt, erklärt werden. Diese periphere Applikation ist hauptsächlich auf die Konsistenz und Viskosität des Gels zurückzuführen, was eine homogene Verteilung erschwert. Durch diese Verschiebung wurde in einem Viertel der Haut ein sehr großer Teil der applizierten Dosis quantifiziert (b) und in dem gegenüberliegenden Viertel ein sehr kleiner Teil (c). Die beiden angrenzenden Teile (a und d)

zeigten ähnliche Werte. Als weitere Möglichkeit können in der Haut vorhandene Poren oder Follikel ursächlich für die relativ hohe Standardabweichung sein. Da es sich bei der Haut um biologisches Material handelt, kann man nicht von einer gleichmäßigen Beschaffenheit ausgehen.

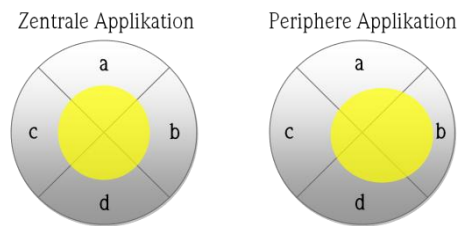


Abb. 50: Darstellung der zentralen und peripheren Applikation in den ex vivo Experimenten

Im Rahmen dieser Penetrationsstudie konnte durch die Entwicklung einer hoch sensitiven Quantifizierungsmethode die Konzentration des applizierten Gegenions BAC in den Hautschichten ebenfalls ermittelt werden. Damit ist es gelungen, weitere Hinweise über den Ionenpaartransportmechanismus zu erhalten. In der Dermis wurden 20 % der applizierten BAC-Dosis nachgewiesen. Insgesamt penetrierten 24,4 % des applizierten BAC in die Haut. Die gleiche Menge (24,1 %) wurde auch für MTX nach Applikation des gleichen Gels ermittelt. Daher wird angenommen, dass MTX und BAC zusammen als Ionenpaar in die Haut penetrieren und das Stoffmengenverhältnis von 1:10 weitgehend bestehen bleibt. Aufgrund der geringeren Konzentration von BAC im Stratum corneum, in der Epidermis und in den obersten Dermissschichten DR1-2 (Abb. 51), aber der höheren Konzentrationen in den Schichten DR3 bis ST, kann angenommen werden, dass BAC schneller in die Haut diffundiert als MTX. Infolge der Kumulation von BAC werden für MTX bessere Penetrationsbedingungen in der Haut geschaffen. Dieser Zusammenhang wurde bereits in Arbeiten von NEUBERT et al. [111] aufgezeigt.

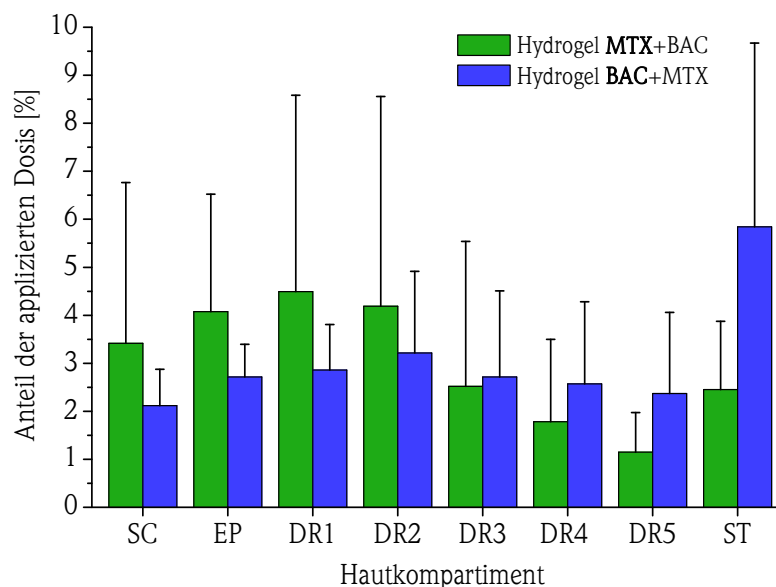


Abb. 51: Anteil der applizierten Dosis von MTX und BAC in den einzelnen Hautschichten nach Applikation des Hydrogels. ST = verbleibender Hautstumpf der Dermis (MW \pm SD; n=4)

Angesichts der Tatsache, dass es sich bei BAC um ein Tensid handelt, sind auch weitere Erklärungen vorstellbar, warum die Penetration von MTX gesteigert wurde: Neben der Theorie, dass BAC auf das Arzneistoffion einwirkt und zur Bildung eines Ionenpaares führt, wäre auch die Entstehung von Mizellen möglich, welche

das MTX-Molekül einschließen. Zusätzlich könnte BAC die Hautbarriere modifizieren oder schädigen, was die Penetration der aktiven Komponente erleichtern würde (Penetrationenhancer) [107].

Für eine genauere Charakterisierung des Ionenpaars sind jedoch weitere Untersuchungen wie beispielsweise Leitfähigkeitsmessungen, massenspektrometrische (ES-MS) und H-NMR-Analysen notwendig [115].

Abschließend soll auf die Hautverträglichkeit von BAC hingewiesen werden. Es ist allgemein bekannt, dass BAC auf der Haut ab einer Konzentration von 0,5 % zu Irritationen oder Reizerscheinungen führen kann [299]. Jedoch wurde in einem Übersichtsartikel von BASKETTER et al. auch gezeigt, dass es zu keiner Sensibilisierung der Haut kommt und BAC eher ein extrem seltenes Allergen darstellt [300]. BAC ist laut der Roten Liste 2015 in 193 und als Wirkstoff in zwölf Fertigarzneimitteln enthalten. Die bekanntesten FAM sind: Dorithricin® Halstabletten (1 mg BAC/Lutschtablette), Dequonal® Gurgellösung (35 mg BAC/100 g Lösung), Gelclair® Mundgel (keine Angabe zum BAC-Gehalt) und Hexaquart® S (7,6 g BAC/100 g zur Verdünnung) zur Vorbeugung von Fußpilz. Ebenso kommt es in vielen Desinfektionsmitteln, als Konservierungsmittel in Ophthalmika, in Sagrotan Flüssigseife und in zahlreichen anderen Kosmetika zum Einsatz. Insofern handelt es sich bei BAC um einen langjährig eingesetzten Stoff mit hohem Erfahrungswert. Eine Überprüfung der Hautverträglichkeit des entwickelten Hydrogels sollte dennoch erfolgen.

4.4.5 Zusammenfassung

Es ist gelungen, zwei geeignete Gegenionen für das hydrophile MTX zu finden. Beide Ionen, BAC und BDAC, waren in der Lage, den Verteilungskoeffizient von MTX signifikant zu erhöhen. Das für die Libera-tions- und Penetrationsstudien ausgewählte BAC konnte eine wesentliche Erhöhung der Freisetzungsrates wie auch der Penetrationsrate von MTX in die Haut herbeiführen. Zur Fundierung der Ergebnisse sollten die Experimente mit einer größeren Anzahl an Hautproben von unterschiedlichen Patienten ergänzt und klinische Untersuchungen für die Bestätigung der Ergebnisse durchgeführt werden.

Letztendlich sind auch weitere Substanzen auf die Eignung als Gegenion zu prüfen, u.a. kationische Farbstoffe. Die angewandte Methode zum Ausschütteln des entstandenen Ionenpaars könnte insofern optimiert werden, dass wasserunlösliche Gegenionen bereits in der Chloroformphase gelöst werden. MTX würde in diesem Fall an der Grenzfläche mit dem Gegenion ein Ionenpaar ausbilden und in die lipophile Phase übergehen. Eine genaue Charakterisierung des entdeckten Ionenpaars könnten ebenfalls interessante Einblicke in den Aufbau des Komplexes geben.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass BAC sowohl prinzipiell als auch aus wissenschaftlicher Sicht ein ausgezeichnetes Gegenion für die Erhöhung der dermalen Penetrationsrate von MTX darstellt.

4.5 Vergleich der Penetrationsergebnisse von MTX

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Formulierungen hinsichtlich ihrer Fähigkeit, MTX in ausreichend hohen Konzentrationen in die Haut zu transportieren, entwickelt und getestet. Abschließend sollen nun die Ergebnisse der Ionenpaar-Studien mit den vorangegangenen *ex vivo* Penetrationsdaten der 0,5 % MTX-haltigen Basiscreme, den Mikroemulsionen und des Fertigpräparates Rextop® Gel verglichen werden.

Da die Penetrationsuntersuchungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten stattfanden, wurde eine Penetrationsstudie unter Einsatz der Basiscreme (BC-MTX) erneut durchgeführt. Zusätzlich handelt es sich um eine validierte Methode. Es wurden vergleichbare Ergebnisse, wie bei der ersten Durchführung, erhalten. Daher ist ein Vergleich zwischen den verschiedenen Penetrationsdaten möglich.

Tab. 31: Vergleich der Penetrationsdaten von MTX aus den verschiedenen Formulierungen dargestellt als Anteil der applizierten Dosis in [%] nach 300 min Inkubationszeit (MW±SD, n=4, Basiscreme n=8; p<0,05 #gegenüber Basiscreme, *gegenüber Rextop, +gegenüber ME-OW-MTX); IP=Ionenpaar MTX+BAC; PrG=Propylenglykol

Formulierung	SC	EP	DR	Gaze / Akzeptor	Penetrierter MTX-Anteil
<i>BC-DAC-MTX</i>	4,2 ± 1,5*	5,9 ± 0,4*	4,9 ± 1,0	- / 2,3 ± 1,2	15,0 ± 1,0*
<i>ME-OW-MTX</i>	1,6 ± 0,6	2,3 ± 0,9*	3,6 ± 1,7	- / 2,5 ± 0,1	7,5 ± 2,5
<i>ME-WO-MTX</i>	1,7 ± 0,4	2,1 ± 0,7*	5,6 ± 1,7	- / 3,1 ± 0,2	9,4 ± 2,6
<i>Hydrogel (Rextop®)</i>	1,0 ± 0,4#	0,9 ± 0,3##	2,8 ± 0,8	- / 0	4,7 ± 0,7#
<i>Hydrogel+PrG</i>	1,8 ± 1,7	1,9 ± 1,5	10,1 ± 4,8##*	0,8 ± 0,1 / 0	13,7 ± 10,6
<i>Hydrogel+PrG+IP</i>	3,4 ± 3,3	4,1 ± 2,4*	16,6 ± 14,2#	4,1 ± 0,1 / 0	24,1 ± 20,4

Zunächst lässt sich aus den Daten in Tab. 31 sehr gut erkennen, dass sich das Hydrogel Rextop® ohne jegliche Zusätze am ungünstigsten auf die Penetration von MTX auswirkt. Nur knapp 5 % der applizierten Dosis konnten in die Haut transportiert werden. Schon der alleinige Zusatz von Propylenglykol zu dem Gel (20 %, m/m) wirkte sich sehr positiv auf die Penetrationsrate aus. Knapp 14 % der applizierten MTX-Menge konnten in die Haut penetrieren. Dieses Ergebnis ist ähnlich den Daten nach Applikation der Basiscreme. Jedoch konnte in der Dermis eine doppelt so hohe MTX-Konzentration nach Applikation des Gels mit Propylenglykolzusatz erreicht werden als nach Applikation der Basiscreme, welche ebenfalls Propylenglykol enthält. Die ME-Systeme erreichten nur eine moderate Penetrationsrate, aber waren tendenziell immer noch besser als das Marktpräparat Rextop®. Zudem ist auffällig, dass MTX aus keiner der Gelformulierungen in einer quantifizierbaren Konzentration in den Akzeptor diffundieren konnte.

Vergleicht man die Tiefenprofile der Formulierungen (Abb. 52) wird deutlich, dass die Konzentration von MTX in der oberen Dermis und in der vitalen Epidermis nach Applikation der Basiscreme und des Gels mit dem Ionenpaar am höchsten war. Das Hydrogel ohne Ionenpaar, aber mit einem Propylenglykolgehalt von 20 %, erreicht moderate MTX-Konzentrationen in den verschiedenen Hautschichten, jedoch wurden auch nennenswerte MTX-Mengen in der unteren Dermis und im verbleibenden Dermisstumpf gefunden. Eventuell führt Propylenglykol durch einen *solvent drag* Mechanismus zu einer gesteigerten Penetration von MTX in tiefere Hautschichten und zu einer Veränderung des Penetrationsprofils.

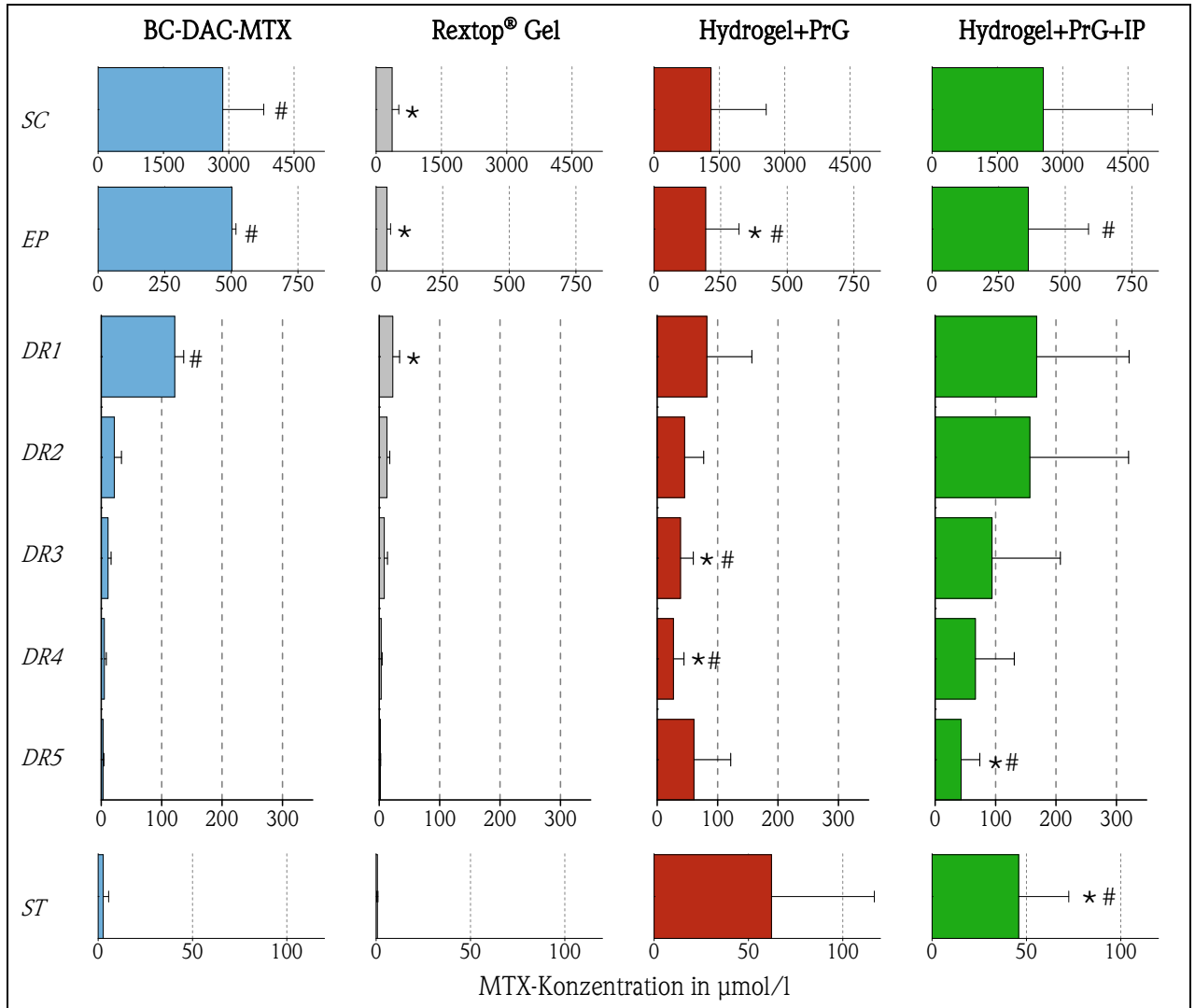


Abb. 52: Vergleich der Tiefenprofile der Formulierungen unter Berücksichtigung der Dicke der jeweiligen Hautschicht. Für den verbleibenden Stumpf wurde eine Dicke von 400 µm angenommen (MW±SD; n=4 bzw. n=8 für Basiscreme; p<0,05 *gegenüber Basiscreme, #gegenüber Rextop® Gel) IP=Ionenpaar MTX+BAC; PrG=Propylenglykol

Bemerkenswert ist, dass das Marktprodukt, welches ebenfalls auf Hydroxyethylcellulose basiert, bei diesen Untersuchungen sich nicht bewähren konnte. Es transportierte nur geringe MTX-Mengen in alle Schichten der Haut. Durch den Zusatz von Propylenglykol neben dem Gegenion konnte die MTX-Konzentration im Stratum corneum um den Faktor 7, in der Epidermis um den Faktor 9 und in der Dermis um den Faktor 11 teilweise signifikant gesteigert werden. Betrachtet man die absoluten Konzentrationen, dann konnte durch Einsatz des Ionenpaares die Konzentration in allen Hautschichten, im Vergleich zu dem Hydrogel mit Propylenglykol aber ohne Ionenpaar, verdoppelt werden.

Daraus lässt sich ableiten, dass sowohl die Basiscreme als auch das Hydrogel mit dem Gegenion am besten für eine topische Anwendung von MTX geeignet sind. Hinsichtlich der verdickten Hautbarriere bei Psoriasispatienten wäre wahrscheinlich die Applikation des Hydrogels mit Ionenpaar noch zweckmäßiger, da die insgesamt penetrierte Arzneistoffmenge im Vergleich zur Basiscreme fast doppelt so hoch war.

4.6 Zusammenfassung: Penetrationssteigerung von MTX

Das vorangegangene Kapitel beschäftigte sich mit dem Arzneistoff MTX zur Anwendung auf der Haut bei der Therapie der Psoriasis vulgaris. Dabei wurde zunächst ausführlich auf die pharmakologischen und pharmakokinetischen Aspekte von MTX eingegangen. Die durchgeführten physikochemischen Untersuchungen konnten bestätigen, dass MTX ein Stoff mit extrem hydrophilen Eigenschaften ist und damit schwer in die Hautbarriere diffundieren kann. Infolgedessen wurden hautfreundliche Mikroemulsionen auf Sucroseesterbasis entwickelt und ausführlich charakterisiert. Mit ausgewählten Verfahren konnte bestätigt werden, dass es sich um isotrope Systeme, welche thermodynamisch stabil sind, handelt. In *ex vivo* Penetrationsuntersuchungen an Humanhaut wurde gezeigt, dass die Mikroemulsionen die Penetrationsrate im Vergleich zu dem Fertigpräparat Rextop[®] tendenziell steigern konnte, jedoch nicht in dem Ausmaß, wie man es von solchen kolloidalen Systemen erwartet hätte. Im Gegensatz dazu steigerte sich die Penetrationsrate von MTX nach Applikation der Basiscreme DAC erheblich. Es wird vermutet, dass der Penetrationenhancer Propylenglykol das Penetrationsverhalten des hydrophilen Arzneistoffes positiv beeinflusst.

Schließlich wurde der Einfluss der Ionenpaarbildung auf die dermale Penetration von MTX untersucht. Nach einem ausführlichen Screening konnten zwei potentielle Gegenionen gefunden werden: BAC und BDAC. Beide führten dazu, dass die Lipophilie von MTX enorm gesteigert werden konnte. Auch die *in vitro* Libationsstudien unter Verwendung des MSMM bestätigten den positiven Einfluss der Ionenpaarbildung. Es wurde eine nahezu vollständige Freisetzung von MTX aus dem entwickelten Hydrogel erreicht. In den *ex vivo* Penetrationsstudien an Humanhaut konnte der Zusatz von BAC die Penetrationsrate von MTX im Vergleich zu den Mikroemulsionen und dem Rextop[®] Gel erheblich steigern.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch den Einsatz von modernen Drug Delivery Systemen pharmazeutische Problemarzneistoffe mit ungünstigen physikochemischen Eigenschaften einer Anwendung auf der Haut bei der Therapie der Psoriasis vulgaris bzw. auf dem Nagel zur Behandlung der Onychomykosis zugänglich zu machen. Am Beispiel des extrem hydrophilen Arzneistoffes MTX sollte vor allem der penetrationsfördernde Effekt von Mikroemulsionen genutzt und untersucht werden. Zusätzlich sollte festgestellt werden, welchen Einfluss die Ionenpaarbildung auf das dermale Penetrationsverhalten von MTX hat. Für den extrem lipophilen Wirkstoff EV-086K sollten hauptsächlich moderne Vehikel entwickelt werden, welche eine ausreichend hohe Bioverfügbarkeit des Antimykotikums in der Nagelplatte erzielen.

Moderne Vehikel für die unguale Applikation des neuen Antimykotikums EV-086K

Der neu entdeckte Wirkstoff EV-086K könnte aufgrund seiner guten antimykotischen Eigenschaften einen wesentlichen Beitrag zur Therapie der Onychomykosis leisten. Jedoch zeigte die physikochemische Charakterisierung, dass der Wirkstoff ungünstige Eigenschaften für eine unguale Applikation aufweist. Aufgrund seiner ausgeprägten Lipophilie scheint eine Diffusion in die eher hydrophile Nagelplatte, im Vergleich zum Stratum corneum, schwer möglich zu sein. Daher wurden verschiedene Formulierungen für eine unguale Anwendung entwickelt. Es war möglich EV-086K in ausreichend hohen Konzentrationen in einen innovativen Nagellack, in ein Hydrogel und in eine ME einzuarbeiten. Als Vergleichsvehikel stand eine wässrige Lösung aus unterschiedlichen Komponenten zur Verfügung.

Die darauffolgenden *in vitro* FTIR-Diffusionsstudien an tierischen Hufmembranen bewiesen, dass die ME und der Nagellack der Lösung und dem Hydrogel signifikant überlegen waren. Die ME konnte stets die kürzesten lag-Zeiten von weniger als 30 min aufweisen, was auf ein sehr gutes Diffusionsvermögen in die Nagelplatte rückschließen lässt. Ebenso zeigte die ME einen hohen Permeationskoeffizienten für EV-086K. Der Nagellack konnte EV-086K zwar nicht so schnell in die Nagelplatte transportieren wie die ME, aber dafür erreichte dieser nach 24 h die höchsten Konzentrationen. Eine Anwendung des Hydrogels am Nagel erwies sich für das Antimykotikum als ungünstig. EV-086K erreichte nur mit ausgedehnten lag-Zeiten und in nur sehr niedrigen Konzentrationen den Akzeptor. Mit Hilfe der Vergleichslösung konnte EV-086K ebenfalls durch die Rinder- und Pferdehufmembranen in adäquaten Konzentrationen diffundieren. Allerdings betrug die lag-Zeit 96 min. Es stellt sich hier die Frage, ob eine wässrige Lösung praktisch gesehen eine ausreichend lange Haftung auf der Nagelplatte besitzt um ausreichend in diese zu penetrieren.

Für die Bestätigung der Ergebnisse aus den FTIR-Diffusionsstudien, wurden *ex vivo* Penetrationsstudien an menschlichen Nägeln durchgeführt. Dabei konnte nach Applikation der ME und des Nagellackes der Wirkstoff EV-086K in hohen Konzentrationen in und durch die Nagelplatte diffundieren. Besonders die ME erreichte sehr hohe Wirkstoffkonzentrationen in der dorsalen Nagelplatte und im Akzeptor. Bezogen auf die applizierte Dosis, konnte der Nagellack die höchsten Konzentrationen in der dorsalen Schicht erreichen. Es war jedoch nicht möglich, eine höhere Arzneistoffkonzentration in den Nagellack einzuarbeiten und folglich die absolute Konzentration weiter zu steigern. Daher ist es sinnvoll, die ME mit ihrer kurzen lag-Zeit und ihrer hohen Wirkstoffbeladung auf die Nagelplatte zu applizieren. Geeignet wäre dafür ein passender Nagelpflegestift. Die wässrige Lösung erreichte im Vergleich zu den beiden Formulierungen nur sehr geringe Konzentrationen im Nagel. Der permeierte sowie der penetrierte Anteil von EV-086K konnte durch Anwendung der ME um das 10fache und durch Anwendung des Nagellackes um das 8fache gesteigert werden. Beide Formulierungen besitzen ihre Vorteile und stellen geeignete Applikationsformen für die Anwendung von EV-086K am Nagel dar.

Penetrationssteigerung von Methotrexat zur topischen Behandlung der Schuppenflechte

Aufgrund der schlechten physikochemischen Eigenschaften von MTX für eine dermale Applikation sollte durch den Einsatz von kolloidalen Vehikeln die Bioverfügbarkeit in der Haut verbessert und eine topische Therapie der Psoriasis vulgaris mit MTX ermöglicht werden. Daraufhin wurden hautfreundliche Mikroemulsionen auf der Basis von Zuckertensiden entwickelt. Die erhaltenen Systeme wiesen einen niedrigen Emulgatorgehalt von kleiner 25 % auf und wurden durch die Anwendung verschiedener Methoden charakterisiert. Es ist hervorzuheben, dass ein ME-System mit drei verschiedenen Phasenlagen (O/W, W/O, bikontinuierlich) entdeckt und eindeutig identifiziert werden konnte.

Durch die guten Solubilisierungseigenschaften der Mikroemulsionen konnte MTX in ausreichend hohen Konzentrationen inkorporiert werden. In Langzeitstabilitätsstudien wurde nachgewiesen, dass MTX in den zwei Mikroemulsionen eine ausreichende Stabilität bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von einem Jahr bzw. drei Jahren besitzt.

In den anschließenden *ex vivo* Penetrationsstudien an Humanhaut konnten die penetrationsfördernden Eigenschaften dieser kolloidalen Systeme nur teilweise bestätigt werden. Im Vergleich zu einem ehemals in Indien zugelassenen Fertigpräparat (Rextop® Gel) war die Penetrationsrate von MTX nach Applikation der Mikroemulsionen zwar erhöht, aber überraschenderweise erzielte die Applikation einer MTX-haltigen Basiscreme DAC noch bessere Penetrationsergebnisse. Aufgrund des unbedenklichen Sicherheitsprofils und der relativ einfachen Herstellung einer MTX-haltigen Basiscreme, unter Berücksichtigung des Arbeitsschutzes, ist eine Magistralrezeptur aus dieser Arbeit hervorgegangen, welche dem fachkundigen Arzt die topische Anwendung von MTX ermöglichen soll.

Da der wissenschaftliche Anspruch dieser Dissertation durch Anwendung einer Basiscreme DAC dem Autor nicht ausreichte, wurde nach weiteren innovativen Konzepten gesucht, um eine wesentliche Erhöhung der Penetrationsrate von MTX zu erzielen. Dabei schien vor allem das Konzept der Ionenpaarbildung ein enormes Potential zu bieten. Aufgrund der Tatsache, dass MTX hauptsächlich dissoziiert und zusätzlich noch als Anion in wässriger Lösung vorliegt, wurden diverse positiv geladene Gegenionen getestet.

BAC und BDAC konnten den Verteilungskoeffizienten von MTX im Octanol/Puffersystem in hohem Maße positiv beeinflussen. So wurde ein optimaler Wert für die Hautpenetration von 1 erreicht. Die entwickelte Formulierung mit dem Ionenpaar MTX+BAC zeigte in *in vitro* Freisetzungstudien eine signifikant bessere Liberation der aktiven Komponente als die Formulierung, welche MTX allein enthielt. Ebenso konnte festgestellt werden, dass die beiden Ionen simultan in die Membranen diffundieren und das Verhältnis von 1:10 (MTX: BAC) bestehen blieb. Darüber hinaus konnte durch den Einsatz des Ionenpaarkonzeptes eine sehr gute Penetrationsrate von MTX in Humanhaut erzielt werden. Gegenüber dem Fertigpräparat Rextop® erreichte das Ionenpaar-haltige Hydrogel 7 - 11fach höhere MTX-Konzentrationen in den jeweiligen Hautkompartimenten Stratum corneum, Epidermis und Dermis. Zusätzlich wurde festgestellt, dass Propylenglykol ein exzellenter Penetrationenhancer für MTX ist, da bereits das Hydrogel ohne Gegenion, aber mit einem 20 %igen Propylenglykolgehalt wesentlich bessere Penetrationsraten erreichen konnte als das einfache Gel auf Hydroxyethylcellulosebasis. Gegenüber der Basiscreme konnte durch den Zusatz von Propylenglykol und BAC der gesamt-penetrierte MTX-Anteil von 15 % auf 24 % gesteigert werden.

Sowohl zusätzliche Hautstudien an erkrankter Haut, Studien an erkrankten Nägeln als auch klinische Studien sind dennoch erforderlich, um die Aussagekraft der erhaltenen Ergebnisse zu unterstreichen und zu bestätigen. Abschließend kann man jedoch sagen, dass durch den Einsatz von modernen Drug Delivery Systemen, dem Ionenpaarkonzept und durch innovative Ideen es gelungen ist, auch pharmazeutische Problemarzneistoffe einer lokalen Therapie für die Psoriasis vulgaris und der Onychomykosis zugänglich zu machen und infolgedessen neue Möglichkeiten und Forschungsansätze zu schaffen.

6 EXPERIMENTELLER TEIL

6.1 Herstellung der Formulierungen

I) EV-086K-HALTIGE FORMULIERUNGEN

I-a) EV-086K-haltiger Nagellack

Das Polymer Eudragit® E 100 (5 %) wurde mit 96 %igem Ethanol (85 %) in ein Reagenzglas eingewogen und geschüttelt, bis es vollständig gelöst war. Außerdem wurden EV-086K (5 %) und Transcutol® P (5 %) in ein separates Braunglasgefäß eingewogen und geschüttelt, bis eine klare Lösung entstand. Anschließend wurde das Polymer-Ethanolgemisch zu dem Wirkstoff-Transcutol® P-Gemisch hinzugefügt und geschüttelt, bis ein klarer, leicht-bräunlich gefärbter Nagellack erhalten wurde.

I-b) EV-086K-haltiges Hydrogel

Hydroxyethylcellulose (1 %, Tylose H 30.000 P2 PHA) wurde mit gereinigtem Wasser (87,5 %) gemischt und konnte dann über Nacht im Kühlschrank quellen. In die fertige Grundlage wurden anschließend 85 %iges Glycerol (1,5 %) und der Wirkstoff (10 %) eingearbeitet.

I-c) EV-086K-haltige Mikroemulsion

Zunächst wurde EV-086K in ein Braunglasgefäß eingewogen und in einem Wasser-Propylenglykol-Gemisch (1:2, m/m) gelöst. Dann wurde das Emulgatorgemisch (Tagat® O2 V:Synperonic™ PE/L 101, 2:3, m/m) hinzugefügt und schließlich die Ölkomponente Pelemol® BIP eingearbeitet. Eine klare, bräunlich gefärbte ME wurde erhalten.

I-d) EV-086K-haltige Lösung der Firma Evolva

EV-086K (5,7 %) wurde in einem Gemisch aus Ethanol (30 %) und Wasser (63,75 %) gelöst. Transcutol® P (5 %), Citronensäure (0,05 %), Natriumdihydrogenphosphat (0,05 %), Butylhydroxytoluol (0,1 %) und EDTA (0,1 %) wurden ebenfalls in die Lösung eingearbeitet.

II) ANDERE FORMULIERUNGEN

II-a) MTX-haltige Mikroemulsionen bzw. Mikroemulsionssysteme ohne Wirkstoff

Die Herstellung der Mikroemulsionen erfolgte in einem Jodzählkolben mit Schliff oder in Schnappdeckelgläschen. Jedoch wurden die beiden verwendeten Systeme auf unterschiedliche Weise hergestellt:

ME-L1695-O/W-(MTX):

Zunächst wurden der Sucroseester L-1695 und das Wasser eingewogen und solange geschüttelt, bis eine klare Lösung entstand. Anschließend erfolgte die Zugabe des Pentylenglykols und des zweiten Emulgators Laurglycol™ 90. Erst zum Schluss wurde die Ölphase (IPM) eingearbeitet und die Mischung vorsichtig geschüttelt. Das MTX-Na konnte im Anschluss in der ME gelöst werden. Bei Verwendung der Säureform wurde statt Wasser ein Citrat-Phosphat-Puffer nach McIlvaine pH 7 verwendet.

ME-L595-W/O-(MTX):

Als erstes wurde der Sucroseester L-595 zerkleinert und eingewogen. Die ölige Komponente (IPP) und der Emulgator Tego® Care PL4 wurden hinzugefügt. Das Gefäß wurde verschlossen, mit Parafilm versiegelt und für ca. 3 bis 5 h in ein Wasserbad bei ca. 60 bis 70 °C gestellt, bis der Sucroseester vollständig geschmolzen war. Die Zeit variierte je nach Gehalt des Sucroseesters. In die abgekühlte Mischung konnte dann die hydrophile Phase, bestehend aus Wasser und Pentylenglykol in einem Verhältnis von 1:2, eingearbeitet werden. Aufgrund des geringen Wassergehaltes konnte nur das MTX-Na in die Wasserphase eingearbeitet werden.

II-b) MTX-haltige Basiscreme DAC

Die Basiscreme wurde gemäß der Vorschrift des DACs (Stand 2013) hergestellt. Der Wirkstoff MTX wurde anteilig mit der Basiscreme in einer Fantaschale zu einer homogenen Creme mit einem Wirkstoffgehalt von 0,5 % verrieben. 100 g Basiscreme DAC setzen sich zusammen aus 4 g Glycerolmonostearat 60, 6 g Cetylalkohol, 7,5 g MCT, 25,5 g weißes Vaseline, 7,0 g Macrogol-20-Glycerolmonostearat, 10 g Propylenglykol und 40 g Wasser.

II-c) Hydrogel (Rextop®)

Das aus Indien stammende Fertigarzneimittel der Firma Systopic Laboratories Ltd. (India) setzt sich aus 0,25 % MTX und einer 1 %igen Hydroxyethylcellulose-Grundlage zusammen [221, 232]. Rextop® wurde ohne weitere Verarbeitung verwendet.

II-d) MTX-BAC-haltiges Hydrogel

Das Hydrogel enthält MTX und BAC in einem Stoffmengenverhältnis von 1:10 (mol/mol). Dies entspricht einer Konzentration von 0,5 % MTX und 3,12 % BAC. Die beiden Stoffe mussten getrennt eingewogen und die resultierenden Pufferlösungen konnten erst nach Lösen des jeweiligen Stoffes und unter erneuter Einstellung des pH-Wertes auf 7 unter vorsichtigem Rühren vereinigt werden (Abb. 53). Durch den Verlust beim Umfüllen der MTX-Lösung in die BAC-Lösung wurde ein Überschuss von 20 % verwendet. Zu dem erhaltenen MTX-BAC-Gemisch (78,5 %) wurde nun das Propylenglykol (20 %) hinzugeetropt und unter starkem Rühren die Hydroxyethylcellulose (1,5 %, Natrosol™ 250 HHX PHARM (HH= ultra-high M, X=fine grind particle size, Pharmaceutical quality) eingearbeitet. Das erhaltene Hydrogel wurde über Nacht zum Quellen im Kühlschrank gelagert.

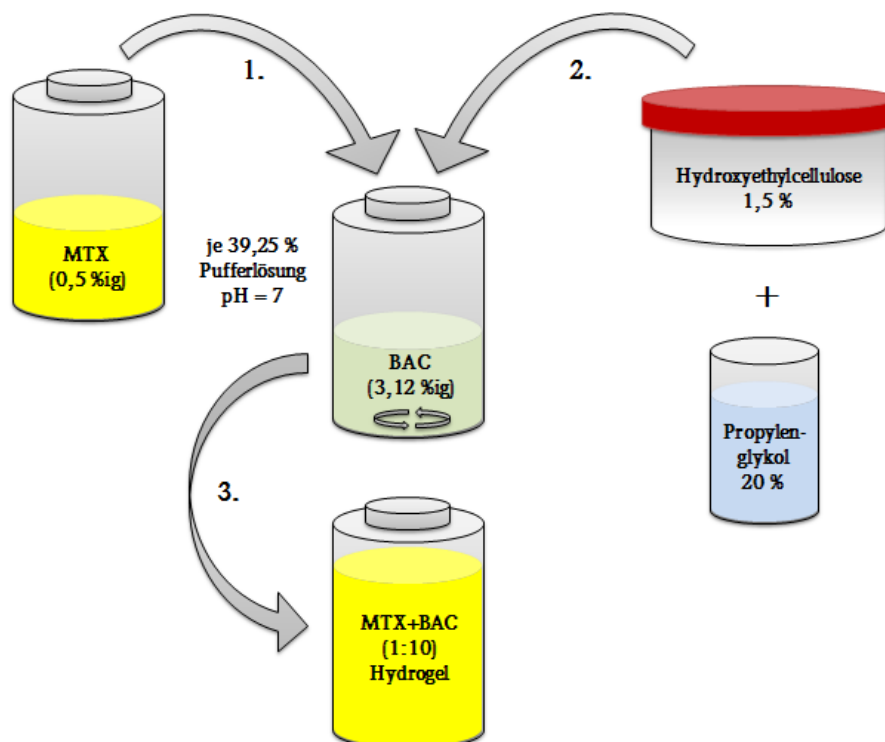


Abb. 53: Schematische Darstellung der Herstellung des MTX-BAC-haltigen Hydrogels

Alle wirkstoffhaltigen Formulierungen wurden stets im Kühlschrank und unter Lichtausschluss gelagert.

6.2 Herstellung des Dinatriumsalzes von MTX

Um die Löslichkeit von MTX zu verbessern, wurden 10 g Arzneistoff in ca. 150 ml Ethanol gelöst und mit 440 ml 0,1 N Natriumhydroxid-Lösung umgesalzen. Anschließend wurde die Lösung am Rotationsverdampfer eingengt und mit Phosphorpentoxid getrocknet.

6.3 Wirkstoffanalytik

6.3.1 HPLC-Methoden und deren Validierung

Für die untersuchten Substanzen konnten erfolgreiche HPLC-Methoden entwickelt und validiert werden. Die Quantifizierung der meisten Proben erfolgte mit der HPLC-Anlage Waters Delta (Waters GmbH, Eschborn, Deutschland), bestehend aus Water Controller 600 Pumpe, Waters 717plus Autosampler, Waters Ofen und Waters 2996 Photodiodenarraydetektor, mit folgenden Parametern:

Tab. 32: Parameter der HPLC-Analytik für die Quantifizierung von EV-086K, MTX und BAC bzw. BDAC

Parameter	EV-086K	MTX	BAC bzw. BDAC
<i>Säule</i>	X-Terra C-18 150 · 3,9 mm Waters	Eurospher C-18 250 · 4,6 mm Knauer	EC-150/4 Nucleodur Hilic, 5 µm Macherey-Nagel
<i>mobile Phase</i>	ACN/H ₂ O/FA 65/35/0,1 % (V/V)	ACN/H ₂ O/FA 15/85/0,1 % (V/V)	ACN/H ₂ O/Ammoniumacetat 80 %/20 %/30 mM (V/V)
<i>Flow (ml·min⁻¹)</i>	1	1	1,5
<i>Temperatur (°C)</i>	30	40	40
<i>Injektionsvolumen (µl)</i>	10	10	20
<i>UV-Detektion (nm)</i>	251 nm	304 nm	262 nm
<i>Software</i>	MassLynx V4.0 SP4 software (Micromass Ltd., Manchester, England)		
<i>LoD (µg·ml⁻¹)</i>	0,05	0,06	10
<i>LoQ (µg·ml⁻¹)</i>	0,1	0,1	20
<i>r (MW±SD, n=10)</i>	0,9999 ± 0,0002	0,9998 ± 0,0003	> 0,999
<i>Linearer Bereich (µg·ml⁻¹)</i>	1 - 100	0,2 - 100	-
<i>Messpräzision (RSD in %)</i>	80 µg/ml: 0,4	50 µg/ml: 0,20	-
	10 µg/ml: 0,7	5 µg/ml: 2,37	
	4 µg/ml: 2,0	0,5 µg/ml: 1,37	
	1 µg/ml: 1,8	0,1 µg/ml: 3,98	
<i>Methodenpräzision (RSD in %)</i>	80 µg/ml: 1,6	50 µg/ml: 4,56	-
	10 µg/ml: 2,2	5 µg/ml: 4,68	
	4 µg/ml: 2,9	0,5 µg/ml: 7,57	
	1 µg/ml: 6,3	0,1 µg/ml: 13,2	
<i>Richtigkeit in der Serie (WFR in %)</i>	80 µg/ml: 97	50 µg/ml: 97,2	-
	10 µg/ml: 101	5 µg/ml: 99,7	
	4 µg/ml: 101	0,5 µg/ml: 98,2	
	1 µg/ml: 99	0,1 µg/ml: 90,0	
<i>Richtigkeit zwi. den Serien (WFR in %)</i>	80 µg/ml: 98	50 µg/ml: 98,6	-
	10 µg/ml: 101	5 µg/ml: 98,9	
	4 µg/ml: 99	0,5 µg/ml: 89,4	
	1 µg/ml: 104	0,1 µg/ml: 72,1	

Die Quantifizierung der Proben aus den *ex vivo* Studien wurde mit Hilfe einer HPLC-Anlage HP 1100 (Agilent, Waldbronn, Deutschland), bestehend aus Vakuumentgaser, Autosampler, binärer Pumpe, Diodenarray-Detektor und Säulenofen, mit den nachfolgend aufgelisteten Parametern durchgeführt:

Tab. 33: Parameter der HPLC-Analytik für die Quantifizierung mittels Agilent-Anlagen

Parameter	EV-086K	MTX-I & Soluphor® P	MTX-II
<i>HPLC-Anlage</i>	HP 1100 Agilent	HP 1100 Agilent	1220 Infinity LC
<i>Säule</i>	Eurospher C-18 100-5 100-2 mm Knauer	Eurospher C-18 100-5 250-4,6 mm Knauer	Eurospher C-18 100-5 100-2 mm Knauer
<i>mobile Phase</i>	ACN/H ₂ O/FA 65/35/0,1 % (V/V)	ACN/H ₂ O/FA 20/80/0,5 % (V/V)	ACN/H ₂ O/FA 15/85/0,2 % (V/V)
<i>Flow (ml·min⁻¹)</i>	0,4	1,0	0,4
<i>Temperatur (°C)</i>	40	40	30

Parameter	EV-086K	MTX-I & Soluphor® P	MTX-II
<i>Injektionsvolumen (µl)</i>	5	5	5
<i>UV-Detektion (nm)</i>	251	304 / 217	304
<i>Software</i>	ChemStation (Agilent, Waldbronn, Deutschland)		
<i>LoD (µg·ml⁻¹)</i>	0,02	0,04	
<i>LoQ (µg·ml⁻¹)</i>	0,04	0,06	
<i>r (MW±SD, n=3)</i>	0,9995 ± 0,0003	0,9995 ± 0,0006	
<i>Linearer Bereich (µg·ml⁻¹)</i>	0,04 - 100	0,04 - 100	
<i>Messpräzision (RSD in %)</i>	1 µg/ml: 0,7	50 µg/ml: 0,33	
	0,4 µg/ml: 2,0	5 µg/ml: 0,37	
	0,1 µg/ml: 3,3	0,5 µg/ml: 0,61	
	0,04 µg/ml: 3,2	0,1 µg/ml: 7,51	
<i>Methodenpräzision (RSD in %)</i>	1 µg/ml: 0,7	50 µg/ml: 12,9	
	0,4 µg/ml: 1,2	5 µg/ml: 13,7	
	0,1 µg/ml: 1,4	0,5 µg/ml: 17,4	
	0,04 µg/ml: 13,7	0,1 µg/ml: 17,8	
<i>Richtigkeit in der Serie (WFR in %)</i>	1 µg/ml: 101	50 µg/ml: 98	
	0,4 µg/ml: 101	5 µg/ml: 101	
	0,1 µg/ml: 113	0,5 µg/ml: 98	
	0,04 µg/ml: 91	0,1 µg/ml: 107	
<i>Richtigkeit zwi. den Serien (WFR in %)</i>	1 µg/ml: 101	50 µg/ml: 96	
	0,4 µg/ml: 101	5 µg/ml: 99	
	0,1 µg/ml: 85	0,5 µg/ml: 106	
	0,04 µg/ml: 114	0,1 µg/ml: 102	

Vor jedem Experiment wurden Eichwerte vermessen, um die bestehende Kalibrierung zu bestätigen. Im Falle einer Abweichung wurde eine neue Kalibrierung erstellt und vermessen. Die Validierungsparameter in Tab. 32 und Tab. 33 wurden wie folgt berechnet (nach EMEA-Richtlinie) [301]:

Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze:

Die Nachweisgrenze (LoD) entspricht der kleinsten nachweisbaren Menge und die Bestimmungsgrenze (LoQ) entspricht der kleinsten quantifizierbaren Menge. Für die Ermittlung der LoD wird ein Signal/Rausch-Verhältnis von 1:3, für LoQ von 1:10, angenommen [302].

Linearität:

Die Linearität ist die Fähigkeit einer Methode, innerhalb eines Konzentrationsbereiches Ergebnisse zu liefern, die der Analytkonzentration direkt proportional sind und kann durch eine Kalibrierfunktion (Gerade) beschrieben werden. Ein Korrelationskoeffizient r von größer 0,999 gilt als akzeptabel. Jedoch sollte zusätzlich der Responsefaktor R_c berechnet werden, da dieser ein strenges Linearitätskriterium darstellt [302]. Hierfür wurden sechs verschiedene Kalibriergeraden je dreimal vermessen. Der Responsefaktor wurde anschließend mit dem Quotient aus Signal (Peakfläche) und Konzentration berechnet, gegen die Konzentration aufgetragen und sollte innerhalb einer 5 % Grenze konstant sein [302].

Präzision:

Die *Messpräzision* ist ein Maß für die Schwankungen, die durch das Gerät selbst verursacht werden (Präzision innerhalb der Serie). Dafür werden vier verschiedene Proben mindestens fünffach vermessen: eine Probe mit einer hohen, einer mittleren, einer niedrigen Konzentration und eine an der Bestimmungsgrenze (LoQ). Aus den Peakflächen kann der Variationskoeffizient (RSD) ermittelt werden.

Die *Methodenpräzision* ist ein Maß für die Schwankungen, die durch Probenahme, Wiegen, Probenvorbereitung, Filtration, Messung und Auswertung verursacht werden (Präzision zwischen den Serien). Hierfür wurden ebenfalls vier Proben mit einer hohen, einer mittleren, einer niedrigen Konzentration und an der Bestimmungsgrenze (LoQ) jeweils dreimal hergestellt und an mindestens zwei verschiedenen Tagen vermessen und der Variationskoeffizient bestimmt [301, 302]. Die RSD sollte höchstens 15 % betragen, für die Konzentration am LoQ maximal 20 %. In Tab. 32 und Tab. 33 sind stets die höchsten Werte angegeben. Alle Werte liegen innerhalb der Grenzen.

Richtigkeit:

Die Richtigkeit ist ein Maß für die Übereinstimmung zwischen dem ermittelten Wert und dem richtigen Wert, dem Sollwert (ausgedrückt in Prozent) [302]. Die Proben wurden analog der Präzision vermessen. Die ermittelte Konzentration darf nicht mehr als 15 % vom Sollwert abweichen bzw. an der LoQ nicht mehr als 20 %. In Tab. 32 und Tab. 33 sind die Wiederfindungsraten (WFR) in % angegeben.

6.3.2 CZE-Methoden

Zur Quantifizierung der Proben aus der Bestimmung der CMC von EV-086K und des IEP von MTX wurde die CZE-Methode nach Mrestani et al. [126, 303] verwendet.

Die Messungen wurden mit einem BECKMAN COULTER P/ACE™ MDQ Molecular Characterization System (Beckman Coulter, Krefeld, D) mit anschließender UV-Detektion durchgeführt. Für die Datenauswertung und -erfassung sowie die Instrumentenkontrolle diente die 32 Karat Software Version 5.0 (Beckman Coulter, Fullerton, Californien, USA) und die Software Origin Lab 7.5 (OriginLab, Northampton, UK). Die verwendete Quarzglas Kapillare (Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, D) hatte eine Gesamtlänge von 40,5 cm und einen Innendurchmesser von 50 µm. Die Länge zum Detektor betrug 31 cm. Die Kapillare wurde vor der ersten Verwendung für 10 min mit 1,0 M NaOH bei einem Druck von 20 psi gewaschen. Anschließend wurde diese für weitere 10 min bei gleichem Druck mit Wasser gespült.

Vor jeder Messung bzw. Injektion wurde die Kapillare mit 0,1 N NaOH für 5 min, mit destilliertem Wasser für 2 min und mit der entsprechenden Pufferlösung für 3 min gespült. Die Temperatur wurde konstant auf 25 °C gehalten. DMSO 0,1 % wurde für die Messung des EOFs verwendet. Die Probeninjektion erfolgte bei einem Druck von 1 psi für 10 sec (hydrodynamischer Injektion). EV-086K konnte bei einem pH-Wert von 11 erfolgreich detektiert und quantifiziert werden (LoD = 1,5 µg·ml⁻¹ und LoQ = 2,5 µg·ml⁻¹). Um die CMC zu ermitteln, wurde eine Spannung von 20kV angelegt.

Für die Messung des IEPs von MTX wurde eine Spannung von 30 kV verwendet. Es war keine Bestimmung von LoD und LoQ erforderlich, da in diesem Fall nur die elektrophoretische Mobilität von MTX im Bezug zum EOF ermittelt wurde.

6.3.3 FTIR-ATR-spektroskopische Diffusionsexperimente

Die Diffusionsexperimente von EV-086K an bovinen und equinen Hufmembranen wurden mit einer Teflondiffusionszelle gekoppelt an FTIR-ATR-Spektroskopie unter Verwendung folgender Geräte und Parameter durchgeführt:

Tab. 34: Parameter der FTIR-ATR-Analytik für die Quantifizierung von EV-086K

Parameter	Pferdehufmembran	Rinderhufmembran
<i>Spektrometer</i>	IFS 28 (Bruker optics, Ettlingen, D)	Vertex 70 (Bruker optics, Ettlingen, D)
<i>ATR</i>	Horizontale ATR Einheit (Thermo Spectra Tech, Shelton, CT, USA)	
<i>Kristall</i>	Zinkselenidkristall (Fresnel-Typ, Durchmesser 20 mm, Einfallswinkel 45°)	
<i>Detektor</i>	DTGS	
<i>Software</i>	OPUS 5.5 (Bruker optics, Ettlingen, D)	
<i>Aufnahme der Spektren:</i>	Anzahl Proben- und Hintergrundscans:	32
	Auflösung:	2 cm ⁻¹
	Akquisitionsmodus:	doppelseitig, vorwärts-rückwärts
	Phasenauflösung:	16
	Phasen-Korrelationsmodus:	Mertz
	Zerofilling Faktor:	2
	Apodisationsfunktion:	Blackman-Harris 3-Term
<i>Temperatur</i>	konstant 32 °C	

Vor jedem Experiment wurde ein Hintergrundspektrum des ATR-Kristalls mit aufgeschraubter und geschlossener Diffusionszelle aufgenommen. Diese Spektren dienten bei der Probenmessung für die Berechnung der Transmissions- bzw. Absorptionsspektren. Ebenfalls wurde der Probenraum kontinuierlich mit trockener, CO₂-armer Luft gespült, um Störungen durch Wasser(dampf) und CO₂ zu vermeiden. Mit Hilfe der Funktion „*atmosphärische Kompensation*“ der o.g. Software wurden zusätzlich störende Wasser- oder CO₂-Banden aus dem Spektrum, vor der eigentlichen Datenanalyse, entfernt. Ebenfalls wurden für alle Spektren eine Grundlinienkorrektur und eine Offset-Normierung im Bereich 1605 bis 1615 cm⁻¹ durchgeführt (OPUS 5.5). Alle Experimente wurden mindestens zweimal durchgeführt.

Versuchsaufbau

Der Aufbau und die einzelnen Bestandteile der Diffusionszelle sind in Abb. 54 dargestellt (mechanische Werkstatt, Institut für Pharmazie, MLU Halle-Wittenberg, D).

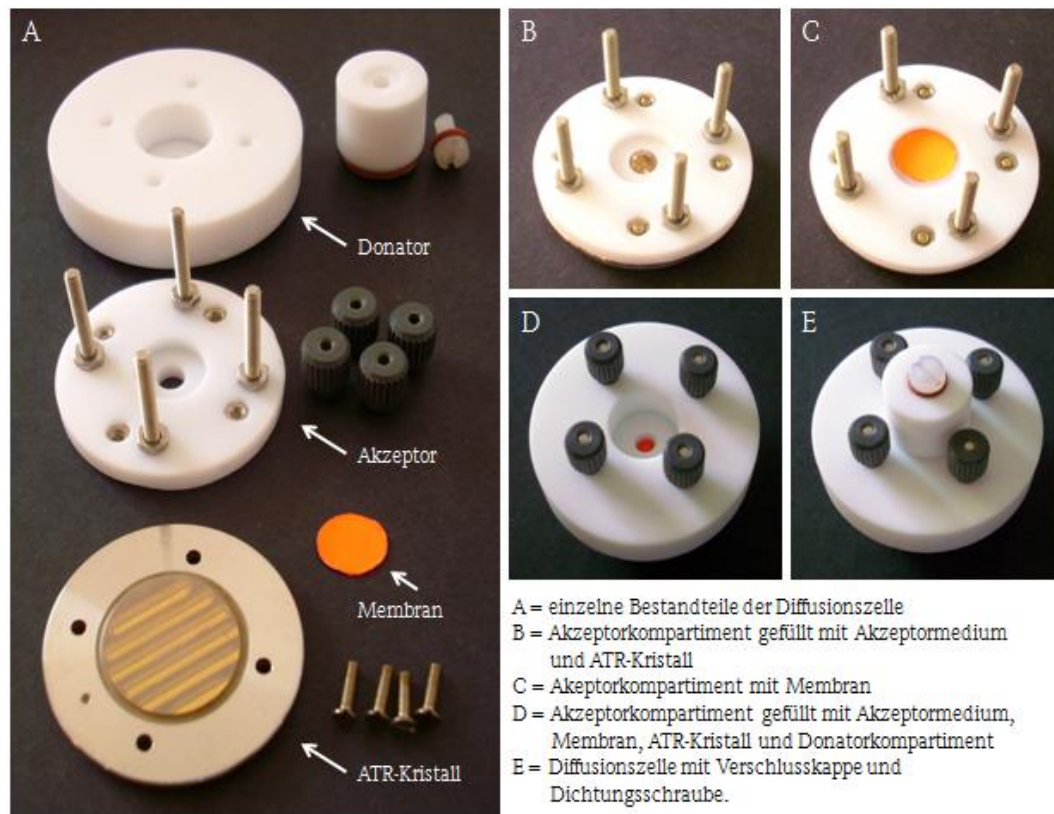


Abb. 54: Aufbau der Teflon-ATR-Diffusionszelle

Der Akzeptor wurde mit D₂O befüllt (Volumen: 50 µl) und bedeckt einen Teil des ZnSe-ATR-Kristalls. Die Probenahme erfolgt bei einer Tiefe von 1 bis 2 µm. Die Diffusionsfläche beträgt 0,0962 cm². Auf den Akzeptor wurden die Hufschritte gelegt. In dem darüber angebrachten Donator wurden die Formulierungen im Überschuss (ca. 500 µl) eingefüllt. Der Donator konnte mit einem dicht schließenden Deckel verschlossen werden. Ebenso wurde in den Deckel ein D₂O-getränkter Wattebausch gegeben, um ein Austrocknen der Formulierung zu vermeiden.

Tierische Membranen

Das Pferdehufmaterial wurde von einem neun Jahre alten Wallach erhalten. Für die Membranpräparation wurde der Vorderbereich des Hufes (Wall) verwendet, da diese anatomisch dem menschlichen Nagel ähnelt. Das Rinderhufmaterial wurde aus dem Schuh einer zwei Jahre alten Kuh erhalten. Das vollhydratisierte Hufmaterial wurde in dünne Membranen mit einer Schichtdicke von 60 bis 150 µm parallel zur Oberfläche unter Anwendung eines rotierenden Mikrotoms (HM 355 Universal, MICROM Laborgeräte GmbH, Walldorf, D)

nach der Methode von MERTIN UND LIPPOLD geschnitten [18]. Die erhaltenen Membranen wurden nun getrocknet und bei 8 °C im Kühlschrank bis zur Verwendung gelagert.

Vor jedem Experiment wurden die Membranen mit einem Stopfenbohrer auf die passende Größe ausgestanzt und in D₂O für eine bestimmte Zeit hydratisiert: die Pferdehufmembranen für ca. 24 h bzw. die Rinderhufmembranen für ca. 3 h. Die Schichtdicke der vollständig hydratisierten Membranen wurde vor dem Einbau in die Diffusionszelle mit einem Messtaster (MT-25B, Heidenhain, D) zehnfach bestimmt.

Quantifizierung von EV-086K

Ein spezifischer Peak für EV-086K konnte in einem Wellenzahlbereich von 1547 bis 1563 cm⁻¹ detektiert werden (Abb. 17). Um eine Überlagerung durch die spezifische Bande von Wasser (1650 cm⁻¹) auszuschließen, wurde statt Wasser in allen Formulierungen D₂O verwendet. Alle anderen Bestandteile in den verwendeten Formulierungen zeigten keine Banden in diesem Wellenzahlbereich. Zur Quantifizierung wurde die Intensitätszunahme der substanzspezifischen IR-Bande von EV-086K herangezogen.

Kalibrierung

Durch die Verwendung der Diffusionszelle konnte eine Korrelation zwischen der Peakhöhe von EV-086K (Bandenintensität) und dessen Konzentration im Akzeptor hergestellt werden. Da verschiedene Bestandteile der Formulierungen ebenfalls in den Akzeptor diffundieren können, wurde für jede Formulierung eine separate Kalibrierung erstellt. Dafür wurden jeweils verschiedene Konzentrationsreihen im Bereich von 0 bis 5 % bzw. 10 % (m/V) hergestellt. Jede Probe wurde dreimal in den Akzeptor eingefüllt und jeweils fünfmal vermessen.

Somit wurde für jede Formulierung eine separate Kalibrierfunktion erhalten. Die dazugehörigen Korrelationskoeffizienten lagen in einem akzeptablen Bereich von 0,9856 bis 0,9996. LoD und LoQ (Tab. 35: LoD und LoQ Parameter) wurden nach DIN 32645 unter Verwendung der Daten aus den Kalibrierungen und deren Vertrauensbereichen (Irrtumswahrscheinlichkeit 5 %) mit Hilfe der Software DINTTEST ermittelt (Institut für forensische Medizin, Heidelberg, D).

Tab. 35: LoD und LoQ Parameter

Formulierung	LoD [mg/ml]	LoQ [mg/ml]
NL	3,71	11,08
HG	2,69	9,28
S	1,85	6,43
ME	2,53	8,92

Auswertung der Diffusionskurven

Der Diffusionskoeffizient D (cm²/s) wurde nach Gleichung (4) berechnet [304].

$$D = h^2 / (6 \cdot t_{lag}) \quad \text{Gleichung (4)}$$

h Dicke der Membran

t_{lag} Zeit bis eine Konzentration im Akzeptor gemessen werden kann, > LoD

Um die unterschiedlichen EV-086K-Konzentrationen in den Formulierungen zu berücksichtigen, wurde zusätzlich der Permeationskoeffizient P (cm/min) nach Gleichung (5) berechnet.

$$P = Q / (c_0 \cdot A \cdot (t - t_{lag})) \quad \text{Gleichung (5)}$$

$Q / (t - t_{lag})$ Flux J

A Diffusionsfläche (cm²)

c_0 Anfangskonzentration in der Formulierung

Der Flux J wurde aus dem Anstieg der Geraden (penetrierte Menge Q in µg/cm² gegen die Zeit t in min) ermittelt.

6.4 Bestimmung physikochemischer Parameter

6.4.1 Sättigungslöslichkeiten

Für die Bestimmung der Sättigungslöslichkeiten von MTX (Salz- und Säureform) sowie von EV-086K wurde ein Überschuss des jeweiligen Arzneistoffes in 0,2 bis 1,5 ml des jeweiligen Mediums gegeben, bis sich ein Bodensatz bildete. Die Proben wurden über Nacht bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss geschüttelt. Nach anschließender Zentrifugation oder Filtration (0,45 µm Porengröße, Rotilabo Nylon-Syringe Filter, Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, D) wurden die gesättigten Lösungen entsprechend verdünnt und quantifiziert (siehe Kapitel 6.3.1). Drei Probenansätze wurden hergestellt und jeder Ansatz dreimal verdünnt.

6.4.2 Verteilungskoeffizient

a) Schüttelmethode:

Die Bestimmung des **Verteilungskoeffizienten von MTX** (Salz- und Säureform) sowie von MTX in Gegenwart von BAC bzw. BDAC wurde mit Hilfe der klassischen Schüttelmethode unter Anwendung des n-Octanol-Puffer-Systems durchgeführt. Zunächst wurden die gewünschten Pufferlösungen hergestellt (pH 4, 5, 6, 7, 7,4 und 9) und gleiche Volumina (je 100 ml) Puffer und Octanol zusammengefügt und 24 h geschüttelt. Hierbei wurden Citratpuffer, Phosphatpuffer, Boratpuffer und Citronensäure-Phosphat-Puffer nach McIlvaine verwendet. Die gegenseitig gesättigten Lösungen wurden anschließend mit einem Scheidetrichter getrennt. MTX wurde nahe der Sättigungskonzentration des jeweiligen pH-Wertes in ein Reagenzglas eingewogen und die Pufferlösung hinzugegeben. Dann wurde das gleiche Volumen an puffergesättigtem Octanol hinzupipetiert. Die Proben wurden für 24 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gerüttelt. Anschließend wurden die MTX-Konzentrationen in beiden Phasen nach entsprechender Verdünnung mittels HPLC quantifiziert.

Für die Bestimmung des **Verteilungskoeffizienten von MTX in Gegenwart der Gegenionen BAC bzw. BDAC** wurde MTX in 10 ml Citronensäure-Phosphat-Puffer separat eingewogen. BAC bzw. BDAC wurden ebenfalls in 10 ml Pufferlösung eingewogen. Es wurden verschiedene äquimolare Verhältnisse von 1:2, 1:6 und 1:10 für MTX:BAC/BDAC untersucht. Der pH-Wert der Lösungen wurde nach der Einwaage der jeweiligen Substanz überprüft und mit 0,1 N NaOH gegebenenfalls korrigiert. Anschließend wurde die MTX-Lösung unter stetigem Rühren mit einem Magnetrührer langsam zur BAC-Lösung hinzugegeben. Klare gelbe Lösungen wurden erhalten. Jeweils 3 ml des Gemisches wurden in eine Glasampulle überführt und mit 3 ml puffergesättigter Octanol-Lösung ergänzt. Die Glasampullen wurden mit einem Bunsenbrenner verschmolzen und in ein mit einem Wasserbad-temperierten Rüttler bei 32 °C unter Lichtabschluss über 24 h gerüttelt. Anschließend wurden die beiden Phasen entsprechend verdünnt und MTX sowie BAC/BDAC vermessen. Es wurden je drei Probenansätze hergestellt und jede Phase wurde dreimal verdünnt. Da bei der pH-Wert-Korrektur teilweise hohe Volumina (bis zu 5 ml) verwendet wurden, wurde die Ausgangslösung ebenfalls vermessen, um anschließend die Wiederfindungsrate überprüfen zu können. Für die Kalibrierung der HPLC-Methode wurde das entsprechende Gegenion im Verhältnis 1:1 zur Stammlösung hinzugegeben.

b) HPLC-Methode:

Für die Bestimmung des Verteilungskoeffizienten von EV-086K wurde die HPLC-Methode nach VALKO et al. [129] verwendet. Um die Korrelation zwischen der Retentionszeit und dem Verteilungskoeffizienten zu erstellen, wurden die Retentionszeiten von sieben Verbindungen (Nitrobenzol, Toluol, Thymol, Diphenylamin, Biphenyl, n-Butylbenzol, Thioharnstoff) mit bereits bekannten $\log P$ -Werten mit der in

Tab. 36 dargestellten HPLC-Methode ermittelt. Die Konzentration von EV-086K und der Vergleichssubstanzen betrug in Wasser 1 µg/ml. Die Retentionszeit von EV-086K wurde ermittelt und der Verteilungskoeffizient konnte erfolgreich bestimmt werden. Es wurden vier HPLC-Läufe durchgeführt.

Tab. 36: HPLC-Methode zur Bestimmung des Verteilungskoeffizienten von EV-086K

Parameter	
<i>HPLC-Anlage</i>	Waters Delta
<i>Säule</i>	X-Terra C-18 150·3,9 mm Waters
<i>mobile Phase (isokratisch)</i>	MeOH/H ₂ O/FA 60/40/0,1 % (V/V)
<i>Flow (ml·min⁻¹)</i>	1
<i>Temperatur (°C)</i>	32
<i>Injektionsvolumen (μl)</i>	10

6.4.3 Bestimmung der CMC von EV-086K

Für die Bestimmung der CMC wurde die elektrische Stromstärke I , unter Verwendung der CZE-Methode (siehe Kapitel 6.3.2) für unterschiedlich konzentrierte EV-086K-Lösungen ($0,9-110 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ in Boratpuffer pH-Wert = 11 nach Raucher et al. [305]) gemessen. Die angelegte elektrische Spannung betrug 20 kV. EV-086K wurde bei einer Wellenlänge von 246 nm detektiert.

6.4.4 Polarisationsmikroskopische Untersuchungen von EV-086K

Das Polarisationsmikroskop Axiolab Pol (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, D) wurde für mikroskopische Untersuchungen verwendet. Mit Hilfe der Software Stream Motion 1.7 (OLYMPUS Corporation, Tokyo, Japan) und einer Olympus Kamera konnten die Bilder aufgenommen werden. Die Untersuchungen erfolgten bei Raumtemperatur.

6.4.5 Bestimmung des IEP von MTX

Für die Bestimmung des IEP mit Hilfe der CZE-Methode (siehe Kapitel 6.3.2) wurden MTX-haltige Pufferlösungen mit pH-Werten zwischen 2 und 8 hergestellt (Citrat- und Phosphatpuffer nach Sörensen). Die MTX-Konzentration in den Pufferlösungen betrug 0,05 % (m/V). Es wurde eine elektrische Spannung von 30 kV angelegt. Aus der ermittelten Migrationszeit von MTX und des EOFs konnte die elektrophoretische Mobilität nach Gleichung (2) (siehe Kapitel 4.2.3.3) berechnet werden.

6.5 Physikochemische Charakterisierung der Mikroemulsionen

6.5.1 Phasendreieck

Zur Ermittlung von isotropen Gebieten im Phasendreieck wurden verschiedene Mischungen aus den einzelnen Komponenten in 5 %-Schritten hergestellt. Diese wurden gut durchmischt und nach einem Tag, einer Woche und nach drei Jahren begutachtet. Nur optisch klare, einphasige und niedrig viskose Mischungen wurden als ME identifiziert und im Phasendiagramm entsprechend gekennzeichnet. Die klaren, einphasigen, aber höher viskosen Mischungen wurden als isotrop-viskos deklariert. Anisotrope oder 2-phasige Systeme wurden nicht weiter charakterisiert.

6.5.2 Polarisationsmikroskopie

Um die optisch-isotropen Gebiete innerhalb des Phasendreiecks unterscheiden zu können, wurden diese mittels Polarisationsmikroskopie untersucht (siehe Kapitel 6.4.4).

6.5.3 Viskosität

Die dynamische Viskosität wurde für Zubereitungen verschiedener Verdünnungsreihen in den Phasendreiecken bestimmt. Hierfür wurde mit Hilfe eines Rotationsviskosimeters mit Zylindermesszelle und Doppelspalt (Physica MCR 501 Rheometer, Anton Paar GmbH, Graz, A) die Viskosität bei zunehmender Scherrate von $0,1 \text{ s}^{-1}$ bis 100 s^{-1} gemessen. Die Temperierung des Systems auf $25,0 \pm 0,2 \text{ °C}$ erfolgte mittels Peltiersystem (Anton Paar GmbH, Graz, A). Die Messdaten wurden mit dem Programm Physica RheoPlus 3.4 (Anton Paar GmbH, Graz, A) erfasst und ausgewertet.

Die kinematischen Viskositäten wurden mit dem UBBELOHDE Viskosimeter (Schott AG, Mainz, D) bei einer Raumtemperatur von 25 °C bestimmt. Es wurden verschiedene Kapillaren (Ic, II und III) verwendet. Die kinematische Viskosität wurde aus der bestimmten Durchflusszeit der Lösung errechnet. Die dynamische Viskosität konnte daraus unter Einbeziehung der Dichte kalkuliert werden. Das Volumen der Proben betrug bei allen Methoden 15 ml.

Kinematische Viskosität ν :

$$\nu = k * t \text{ [m}^2\text{/s]}$$

$t = \text{Auslaufzeit}$

$k = 0,1004 \text{ m}^2\text{/s}^2 \text{ für Kapillare Ic}$

Gleichung (6)

Dynamische Viskosität η :

$$\eta = \rho * k * t \text{ [Ns/m}^2 \text{ oder mPa/s]} \quad \text{Gleichung (7)}$$

$\rho = \text{Dichte}$

6.5.4 Dichte

Die Dichte wurde durch Einsatz eines Pyknometers und einer Temperiereinheit gemessen. Die Temperatur betrug 20 °C . Zum Erreichen der vorgegebenen Temperatur wurde Eis mit in die Temperiereinheit gegeben.

6.5.5 Konduktivität

Die elektrische Leitfähigkeit wurde mit dem Gerät CyberScan CON 11 (Eutech Instruments, Europe B.V., Nijkerk, NL) bei Raumtemperatur ermittelt. Die Zellkonstante betrug $1,0 \text{ cm}^{-1}$. Nach Einstellung des Gleichgewichtes wurde der Messwert abgelesen.

6.5.6 Dynamische Lichtstreuung

Zur Ermittlung der Teilchengröße von Mikroemulsionen mittels DLS wurden vor jeder Messung alle Proben mit einem Spritzenfilter filtriert (Porengröße $0,45 \text{ }\mu\text{m}$; Rotilabo Nylon-Spritzenfilter, Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, D) und in zylindrische Quarzglas-Küvetten (Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim, D) gefüllt. Die Proben wurden in ein Teflonbad gestellt und für 15 min auf 32 °C temperiert. Die Messungen wurden mit einem Kompakt-Goniometer ALV/SP 86 (ALV-Laser Vertriebsgesellschaft mbH, Langen, D) und mit einem grünen Nd:YAG-Laser (Coherent, Auburn, California, USA) der Wellenlänge 532 nm sowie einer Leistung von 200 mW durchgeführt. Mit Hilfe eines Photomultiplier-Detektors wurden die Proben in einem Winkelbereich von 30 bis 140 Grad vermessen. Die Intensitäts-Zeit-Korrelations-Funktion wurde mit einem Digital ALV-Korrelator (ALV-Laser Vertriebsgesellschaft mbH, Langen, D) aufgezeichnet. Die minimale Messzeit des Korrelators betrug $12,5 \text{ ns}$. Für den verwendeten CONTIN-Algorithmus wurden für O/W-Proben die Viskosität und der Brechungsindex von Wasser zugrunde gelegt. Bei den W/O-Proben wurden die Daten für IPP verwendet.

6.5.7 DSC-Messungen

Die DSC-Untersuchungen wurden am DSC 200 Gerät (Netzsch-Gerätebau GmbH, Selb, D) durchgeführt. Die Proben wurden exakt (maximal 10 mg) in $40\text{-}\mu\text{l}$ -Aluminiumtiegel eingewogen. Um die Verdunstung von Wasser auszuschließen, wurden diese hermetisch abgeschlossen. Ein leerer Aluminiumtiegel gleicher Bauart wurde als Referenz verwendet. Zum Spülen ($10 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) diente während der Messung Stickstoff.

Die Aufnahme der Thermogramme für das ME-L1695-System erfolgte nach folgendem Schema: Proben auf 40 °C erwärmen, dann Abkühlung auf -70 °C (Abkühlrate: 10 K·min⁻¹); Proben für 5 min bei -70 °C belassen; danach erfolgte die Aufheizphase auf 80 °C (Aufheizrate: 10 K·min⁻¹). Die Proben des ME-L595-Systems wurden auf -60 °C abgekühlt und auf 120 °C erwärmt. Die Raten wurden nicht verändert.

6.5.8 HET-CAM

Es wurden natürlich befruchtete Hühnereier der Rasse *New Hampshire* verwendet, die am Legetag durch das Nutztierwissenschaftliche Zentrum Merbitz der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg bereitgestellt wurden. Die Eier wurden nach dem Transport über acht Tage bei 37 °C und 55 % Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank bebrütet und dabei (außer in den letzten 24 h) alle 12 h gewendet. Nach Ablauf der Brutzeit wurden die Eier einzeln mikrochirurgisch unter einer Laminar Air Flow Box präpariert. Nach Durchleuchten der Eipole mit einer lichtstarken Taschenlampe wurde ein etwa kreisrundes Loch mit einem Durchmesser von 1,5 cm im Bereich der Luftkammer in den schwächer konvexen Ei-Pol geschnitten. Der durch die Öffnung entstehende Staub wurde vorsichtig mit einem Gummiblasebalg von der Eihaut abgeblasen. Die Eihaut wurde im Folgenden mit 37 °C warmer physiologischer Kochsalzlösung benetzt. Die CAM wurde durch Entfernung der äußeren Eihaut freigelegt. Zur Verwendung kamen nur Eier mit einem gut ausgebildeten Gefäßsystem sowie einem deutlich vitalen Embryo. Es wurden jeweils 300 µl der Testformulierung auf die CAM von sechs Eiern appliziert.

Zur Bewertung des irritativen Potenzials einer Testformulierung wurde der Irritationsscore (IS) nach den ICCVAM (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*)-Kriterien berechnet. Dafür wurden die Eier über einen Zeitraum von 5 min beobachtet und die folgenden Veränderungen der CAM hinsichtlich des Zeitpunktes ihres Auftretens dokumentiert:

1. Hämorrhagie (Auftreten von Blutungen)
2. Gefäßlyse (Transparentwerden von Gefäßen)
3. Koagulation (Stagnieren des Blutflusses)

und in die folgende Gleichung eingesetzt:

$$IS = [(301 - sekH)/300] \cdot 5 + [(301 - sekL)/300] \cdot 7 + [(301 - sekK)/300] \cdot 9$$

Gleichung (8)

IS = Irritationsscore

sek = Sekunden bis zum Beginn des Ereignisses

H = Hämorrhagie

L = Lyse

K = Koagulation

Der Bewertung des IS erfolgte nach den aufgeführten Grenzwerten [284, 285]:

IS ≤ 0,9	kein Hinweis für irritatives Potential
IS ≤ 4,9	leichtes irritatives Potential
IS ≤ 8,9	mäßiges irritatives Potential
IS > 9	starkes irritatives Potential

Nach Beendigung der Versuche wurden alle Eier im Tiefkühlschrank bei -20 °C über 48 h abgetötet und anschließend hygienisch über den Krankenhausmüll entsorgt.

6.5.9 pH-Wert

Die pH-Wert-Messungen erfolgten unter Verwendung eines pH-Meters Typ 1120 (Mettler Toledo GmbH, Gießen, D). Dabei kamen für niedrig-viskose Formulierungen eine Elektrode Knick SE 101 (Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland) und für halb feste bzw. hochviskose Formulierungen eine Mikroelektrode In Lab Micro (Mettler Toledo GmbH, Gießen, D) zum Einsatz.

6.6 Wirkstoffstabilitätsuntersuchungen

a) MTX:

Die Wirkstoffstabilität von MTX wurde bei unterschiedlichen pH-Werten überprüft. Aufgrund des breiten pH-Bereiches wurde der Citronensäure-Phosphat-Puffer nach McIlvaine (pH-Bereich 3 bis 8) verwendet. Zusätzlich erfolgten auch Stabilitätsuntersuchungen in 0,05 N und 0,075 N NaOH-Lösung, in 15 % Soluphor® P-Lösung, in wässriger Lösung und in den entwickelten Formulierungen (Mikroemulsionen und Basiscreme DAC). Aufgrund der besseren Löslichkeit wurde für die Lagerstabilität das MTX-Na in einer Konzentration von 0,5 % eingesetzt. Die wässrigen Lösungen wurden zusätzlich mit 20 % Pentylenglykol bezogen auf die Wasserphase hergestellt, um einen mikrobiellen Verderb über den Lagerzeitraum von drei Jahren zu verhindern. Von jeder Probe wurden drei Chargen hergestellt. Diese wurden jeweils viermal in Braunglasvials (1,5 ml) abgefüllt und Luftdicht verschlossen. Alle Proben wurden im Klimaschrank unter Lichtausschluss gelagert (relative Luftfeuchtigkeit: 60 %; Temperatur: 23 °C). Vergleichend wurden drei Chargen wässriger MTX-Lösung in Weißglasvials unter UV-Einfluss gelagert.

Zu bestimmten Zeitpunkten wurde für jede Charge 100 µl Probenvolumen jeweils dreimal entnommen (n=9) und mit 9,9 ml Methanol verdünnt (1:100). Aufgrund der geringen Löslichkeit von MTX bei einem pH-Wert von 5 wurden diese Proben nur 1:20 verdünnt. Um den MTX-Gehalt in der Basiscreme und in der ME-WO-L595 zu bestimmen, wurden 10 mg Probe in ein Reagenzglas eingewogen (exakte Menge notiert) und mit 5 ml Methanol versetzt. Anschließend wurden die Proben mit einem Vortexer gemischt und in ein Ultraschallbad für 15 min bei 50 °C gestellt. Nach erneutem Vortexen wurden die Proben 1 h auf einem Laborschüttler belassen. Die wässrigen Proben mit einem pH-Wert von 7,4 und 8 sowie die extrahierten Proben aus der Basiscreme mussten abschließend filtriert werden. Die Quantifizierung erfolgte mit der entsprechenden HPLC-Methode (siehe Kapitel 6.3.1).

b) EV-086K:

Die Lagerstabilität von EV-086K wurde in wässriger und alkoholischer Lösung über einen Zeitraum von drei Monaten unter verschiedenen Lagerbedingungen untersucht. Der Gehalt der Proben betrug 1 % EV-086K (m/m). Ebenso wurde die Stabilität von EV-086K in der ME untersucht. Dafür wurden 10 % EV-086K in die ME eingearbeitet. Alle Proben wurden in Braunglasvials abgefüllt und stets unter Lichtausschluss gelagert. Um die Oxidationsprozesse von EV-086K zu minimieren, wurden verschiedene Antioxidantien hinzugefügt und deren Einfluss auf die Lagerstabilität bestimmt. In regelmäßigen Zeitabständen wurden nun von jeder Probe dreimal 10 µl Volumen entnommen und 1:200 mit Methanol verdünnt. Anschließend erfolgte die EV-086K-Quantifizierung mit der in Kapitel 6.3.1 beschriebenen HPLC-Methode.

6.7 Extraktion der Wirkstoffe

6.7.1 Extraktion der Wirkstoffe aus den Formulierungen

a) MTX:

Für die Ermittlung der MTX-Konzentration in den entwickelten Formulierungen wurde eine definierte Menge des entsprechenden Vehikels (ca. 10 mg) in fünf Reagenzgläser eingewogen und mit 2 ml des gewünschten Extraktionsmediums versetzt (n=5). Anschließend wurden die Proben auf einem Vortexmischer geschüttelt. Der MTX-Gehalt in den Mikroemulsionen und in dem Gel konnte so problemlos ermittelt werden. Für die MTX-Extraktion aus der Basiscreme mussten die Proben zusätzlich für 15 min bei 40 °C in ein Ultraschallbad (Bandelin Sonorex super RK 255H, Schalltec GmbH, Mörfelden-Walldorf, D) und anschließend für eine Stunde auf einen Laborschüttler gestellt werden. Bevor die Quantifizierung mittels HPLC-UV erfolgte, wurden diese Proben mit einem Spritzenfilter von trüben Bestandteilen befreit.

b) EV-086K:

Für die Gehaltsbestimmung von EV-086K in den Formulierungen wurden ca. 10 mg in ein Eppendorfgefäß eingewogen und mit 1 ml Methanol verdünnt. Anschließend wurden die Proben auf einem Vortexmischer gut durchmischt und mittels der entwickelten HPLC-Methode quantifiziert. Es wurden jeweils drei Parallelversuche durchgeführt.

6.7.2 Extraktion von MTX aus Humanhaut

Für die Extraktion von MTX aus Vollhaut (Rückenhaut, Fettschicht wurde fast vollständig entfernt) wurden ca. 5 mg MTX-haltiger Formulierung auf ca. 25 mm² große Hautstücke aufgetragen. Die Proben wurden für 300 min bei 32 °C in einen Inkubator gegeben. Danach wurden die Proben mit 1 ml des entsprechenden Extraktionsmediums versetzt und für 12 h mit dem Laborschüttler unter Lichtausschluss bewegt. Ebenfalls wurden zum Vergleich drei Hautstücke ohne Formulierung extrahiert. Die Extrakte wurden anschließend zentrifugiert, filtriert (Einmalfilter: MULTOCLEAR 0,45 µm PTFE 4 mm) und mittels HPLC-UV vermessen.

6.7.3 Extraktion von MTX aus Baumwolltupfern

Vor der Extraktion wurde zunächst ca. 10 mg MTX-haltiges Gel auf Baumwolltupfer (mit Holzgriff) aufgetragen und in Reagenzgläser überführt. Zur Extraktion von MTX wurden 5 ml des jeweiligen Extraktionsmediums hinzugefügt. Anschließend wurden die Proben eine Stunde lang unter Lichtschutz geschüttelt. Die Hälfte der Proben wurde zusätzlich für 10 min in ein Ultraschallbad (Bandelin Sonorex super RK 255H, Schalltec GmbH, Mörfelden-Walldorf, D) bei einer Temperatur von 40 °C gestellt. Die Quantifizierung wurde mittels HPLC-UV durchgeführt. Die Versuche erfolgten in vierfacher Ausführung.

6.7.4 Extraktion von EV-086K aus humanem Nagelmaterial

Für die Extraktion von EV-086K wurden frische Abschnitte (ca. 4 bis 5 mm²) des Nagelrandes humaner Fußnägel verwendet. Diese wurden mit destilliertem Wasser und mit einem Isopropanol-befeuchteten Tupfer kurz gereinigt. Die trockenen und gereinigten Nagelschnitte wurden vorsichtig in ein austariertes Eppendorfgefäß gelegt und ebenfalls gewogen. Anschließend wurden die Formulierungen (ca. 6 mg) auf die dorsale Nagelplatte mit einer Eppendorf-Pipette aufgetragen. Durch Verwendung eines kleinen Filterpapierplättchens bei der Applikation der ME wurde sichergestellt, dass diese auf dem Nagel haften blieb. Danach wurden die Proben in Aluminiumfolie eingewickelt und für 24 h bei einer Temperatur von 32 ± 1 °C inkubiert (Inkubator, Spezialanfertigung, Mechanische Werkstatt, Institut für Pharmazie, MLU Halle-Wittenberg, D). Zur Extraktion wurde Methanol und zum Vergleich ein Methanol-Wasser-Gemisch 80/20 % (V/V) verwendet. Jeweils 1 ml des entsprechenden Extraktionsmittels wurde zu den Nagelschnitten hinzugefügt und über Nacht geschüttelt. Nach Verdünnung der Proben erfolgte die Quantifizierung mittels HPLC. Jeder Versuch wurde dreimal durchgeführt.

6.7.5 Extraktion von MTX in Gegenwart von Gegenionen

Für die Identifizierung geeigneter Gegenionen wurde MTX nahe der Sättigungskonzentration in Pufferlösungen mit pH-Werten von 5, 6 und 7 eingewogen. Die Gegenionen wurden in molaren Verhältnissen (MTX:Gegenion) von 1:2, 1:6 und 1:10 hinzugegeben. Danach wurde mit Chloroform ausgeschüttelt. Im Falle einer Gelbfärbung der Chloroformphase durch Übergang von MTX in diese wurde das identifizierte Gegenion für weitere Experimente verwendet.

6.8 Liberationsstudien am Mehrschichtmembranmodell

Für die *in vitro* Liberationsstudien von MTX aus den Hydrogelen unter Einfluss eines Gegenions wurde das FÜRST & NEUBERT Mehrschichtmembranmodell (MSMM) verwendet [289].

a) Modellaufbau

Insgesamt wurden für acht Parallelversuche acht Liberationszellen (mechanische Werkstatt, Institut für Pharmazie, MLU Halle-Wittenberg, D), wie in Abb. 55 dargestellt, eingesetzt. Jede Zelle besteht aus drei Polyacrylatscheiben, einer unteren Grundscheibe und einer oberen Deckscheibe sowie einer Scheibe mit einer 4 cm² großen Aussparung. Dazwischen befanden sich drei Dodecanol-Collodium-Membranen (DCM). Dodecanol (im Gemisch mit 10 % Octanol) diente als Akzeptormedium, Collodium als Gerüstsubstanz. Auf die Basisplatte wurde zusätzlich eine Nephrophan[®]-Folie gelegt, die zum Schutz der Polyacrylatscheiben und zum Auffangen penetrierter Formulierung dienen sollte und gegebenenfalls extrahiert wurde.

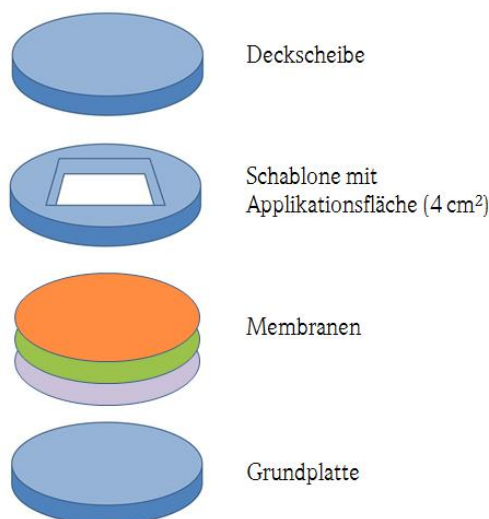


Abb. 55: Aufbau einer Liberationszelle des MSMM nach FÜRST und NEUBERT [289]

b) Herstellung der Membranen:

Es wurden 110 ml (97 g) der Membranlösung auf eine Glasplatte eines Filmziehgerätes ausgegossen und mit einer bei konstanter Geschwindigkeit laufenden Schiene mit einer definierten Spaltbreite (0,81 mm) gleichmäßig verteilt. Nach Verdunstung des Lösungsmittels wurden aus dem Film mit Hilfe einer Stanze die einzelnen Membranen ausgestochen. Diese wurden bis zur Verwendung in einem Exsikkator, separiert zwischen Filterpapier, gelagert.

Tab. 37: Rezeptur zur Herstellung der DCM

Komponente	Einwaage [g]
Dodecanol/Octanol 90/10 % (m/m)	8
Ether/Ethanol 85/15 % (m/m)	zu 100
4 %ige Collodiumlösung DAC	zu 200

c) Versuchsdurchführung

In die Aussparung der Schablonen wurden jeweils entsprechende Mengen der Zubereitung (etwa 10 mg) mit Hilfe einer Kolbenpipette oder eines Salbenspatels aufgetragen. Die Zellen wurden bei 32 °C in einem Inkubator für die entsprechende Versuchszeit temperiert. Um die Temperierzeiten genau einhalten zu können, wurde für jede Zelle die Versuchszeit einzeln erfasst. Die einzelnen Zellen wurden zusätzlich in Aluminiumfolie eingewickelt, um den Arzneistoff vor UV-Licht zu schützen. Es wurden Inkubationszeiten zwischen 15 und 300 min angewandt. Nach Ablauf der Versuchszeit wurde die restliche Formulierung mit einem Tupfer entfernt. Die Tupfer wurden in Reagenzgläser überführt und mit 5 ml Ethanol/Wasser (80/20 %, V/V) extrahiert. Die Membranen wurden mit 2 ml des Extraktionsmediums versetzt. Alle Proben wurden 60 min unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur geschüttelt. Abschließend wurden die Membranen bzw. Tupfer entfernt, die Lösungen zentrifugiert und mittels HPLC-UV quantifiziert. Somit konnte für jede Zelle die WFR einzeln bestimmt werden.

Für die Erstellung einer Kalibriergeraden wurde MTX in Methanol gelöst (Stammlösung 200 µg/ml) und diese mit dem Ethanol-Wasser-Gemisch (80/20 %, V/V) auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt. Der Zusatz einer DCM hatte keinen Einfluss auf die Quantifizierungsmethode.

6.9 Penetrationsuntersuchungen an Humanhaut

Um die *ex vivo* Penetration von MTX in Humanhaut untersuchen zu können, wurden Diffusionszellen nach FRANZ (Crown Glass Company, Somerville, N.Y., USA) verwendet [306]. Der Aufbau ist schematisch in Abb. 56 dargestellt. Die dafür eingesetzte Haut wurde aus Mammareduktionsplastiken verschiedener Patientinnen gewonnen. Nach dem Waschen mit isotonischer Kochsalzlösung und der Entfernung der subkutanen Fettschicht wurden kreisrunde Hautstücke mit einem Durchmesser von 2 cm ($A = 3,14 \text{ cm}^2$) bei -40 °C eingelagert. Vor Versuchsbeginn wurden die benötigten Hautstücke bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend auf einem Membranfilter (Gaze) in der Diffusionszelle platziert. Dabei war die dermale Hautseite stets im Kontakt mit dem Akzeptormedium, welches durch einen Magnetrührer kontinuierlich gerührt wurde. Als Akzeptormedium diente destilliertes Wasser. Auf den Einsatz des sonst üblichen PBS-Puffersystems (pH 7,4) musste aufgrund analytischer Schwierigkeiten und aufgrund von Stabilitätsproblemen seitens MTX verzichtet werden. Die Temperatur der Diffusionszelle betrug stets 32 °C . Somit konnten annähernd physiologische Bedingungen geschaffen werden. Das Donatorkompartiment wurde mit Parafilm verschlossen, um Verdunstungsprozesse während des Experimentes zu vermeiden.

Von jeder Formulierung wurden $20 \pm 2 \text{ mg}$ (halbfest) bzw. 20 µl (flüssig) auf die Hautoberfläche mit einer Kolbenpipette oder einer Eppendorf-Pipette aufgetragen und gleichmäßig verteilt. Die Inkubationszeit betrug bei allen Formulierungen 300 min. Nach der Versuchszeit wurde die restliche Formulierung mit einem Baumwolltupfer entfernt und dieser in ein Reagenzglas überführt. Jedes Hautstück wurde anschließend in vier gleichgroße Sektionen geteilt ($A = 0,7854 \text{ cm}^2$). Mit Hilfe eines Gefriermikrotoms (Jung, Heidelberg, D) konnten bei -40 °C horizontale Schnitte angefertigt werden. Das gesamte Probenschema ist in Tab. 38 übersichtlich zusammengefasst.

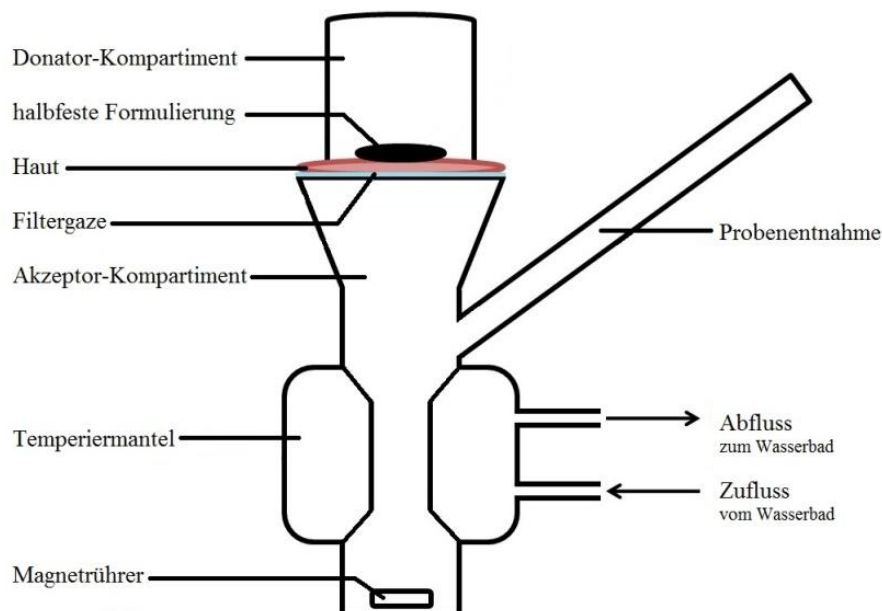


Abb. 56: Aufbau einer Diffusionszelle nach FRANZ

Die erhaltenen Schnitte wurden in Eppendorfgefäße überführt und mit definierten Volumina an entsprechendem Extraktionsmedium versetzt (Tab. 38). Die Proben wurden für 12 h auf dem Laborschüttler unter Lichtausschluss bewegt und anschließend zentrifugiert. Der Überstand und der Akzeptor wurden entsprechend mit den oben genannten HPLC-Methoden quantifiziert.

Tab. 38: Probenschema für die Penetrationsstudien an Humanhaut

Hautprobe	Anzahl der Schnitte x Dicke des Schnittes	Extraktionsmedium und Volumen
SC	1 x 10 μm	300 μl MeOH/H ₂ O (80/20 %, V/V)
EP	4 x 20 μm	300 μl MeOH/H ₂ O (80/20 %, V/V)
DR 1-5	5 x 40 μm und verbleibender Stumpf	300 μl MeOH/H ₂ O (80/20 %, V/V)
Nicht penetrierter Anteil	Tupfer	2 ml MeOH/H ₂ O (80/20 %, V/V)
Permeierter Anteil	Akzeptormedium und Gaze	Akzeptor wurde nicht verdünnt; 2 ml MeOH/H ₂ O (80/20 %, V/V)

6.10 Penetrationsuntersuchungen am menschlichen Nagel

Die *ex vivo* Penetrationsuntersuchungen wurden an exzidierten humanen Zehennägeln durchgeführt. Die gewonnenen Gewebesektionen wurden mit isotonischer Kochsalzlösung gereinigt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Zu Beginn des Experimentes wurde der Nagel mit einem Skalpell vom zuvor aufgetauten Zeh entfernt. Aufgrund der geringen Verfügbarkeit und der hohen Variabilität von humanen Nägeln wurde für jede Formulierung jeweils nur ein Nagel verwendet.

Auf kleine Filterpapierplättchen mit einem Durchmesser von 16 mm ($A = 2,01 \text{ cm}^2$) wurden jeweils 30 μl der flüssigen Formulierungen (Mikroemulsionen oder Lösungen) aufgetragen und gleichmäßig verteilt. Diese Filterplättchen wurden auf die Oberfläche des Nagels (äußere dorsale Schicht) gelegt und verblieben dort für die gesamte Versuchszeit. Nagellackformulierungen (10 μl) wurden ohne Filterplättchen auf die Nageloberfläche appliziert und für 3 min getrocknet. Eine Applikation mit Filterplättchen konnte keinen Kontakt zwischen Nagellack und Nagelplatte gewährleisten. Die untere (ventrale) Seite der Nagelplatte wurde auf einen mit PBS-Puffer (pH 7,4) getränkten Wattebausch gelegt. Dieser fungierte als Nagelbett und verhinderte ein Austrocknen des Nagels während des Versuches. Abb. 57 zeigt eine schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus.

Der gesamte Nagel mit der applizierten Formulierung und dem befeuchteten Wattebausch wurde zum Lichtschutz in Aluminiumfolie eingewickelt und in einem Inkubator bei 32 °C platziert. Nach Ablauf der Versuchszeit von 24 h wurden die Filterplättchen entfernt und die restliche Formulierung mit einem Wattetupfer vorsichtig abgewischt. Zur Entfernung des Nagellackes wurde der Wattetupfer vorher mit 60 μl destilliertem Wasser befeuchtet.

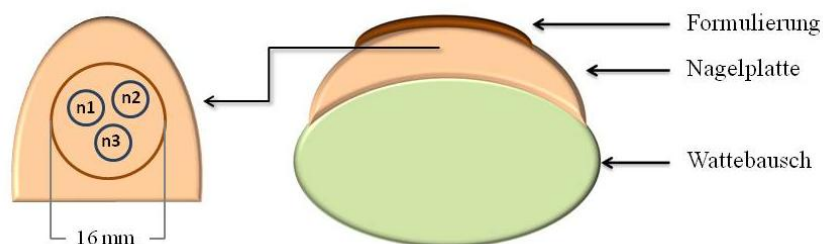


Abb. 57: Schematischer Aufbau des Nagel-Penetrations-Experimentes

Alkoholische Lösungsmittel hätten zwar den Nagellack entfernt, aber möglicherweise zu einer zusätzlichen Penetration des Wirkstoffes geführt oder diesen aus den oberen Nagelschichten herausgelöst.

Aus den Nagelplatten wurden nun drei Stanzbiopsien mit einem Durchmesser von 6 mm ($A = 0,2827 \text{ cm}^2$) genommen (Kromayerstanze, Stiefel-Laboratorium, Offenbach, Deutschland). Die erhaltenen Stanzbiopsien wurden horizontal in 40 μm dicke Sektionen unter Verwendung eines Gefriermikrotoms (Jung, Heidelberg, D) bei -40 °C geschnitten. Die Anzahl der erhaltenen Schnitte für die jeweilige Formulierung und die Einteilung der Proben ist in Tab. 39 dargestellt.

Tab. 39: Probenaufbereitung für die Nagelpenetrationsstudien

Formulierung:	ME-EV-086K	Lösung F11	Nagellack
Nicht penetrierter Anteil	Filterplättchen + Tupfer	Filterplättchen + Tupfer	Tupfer + 60 µl Wasser
Stanzbiopsie 1 (Anzahl der Schnitte)	18 x 40 µm	21 x 40 µm	21 x 40 µm
Stanzbiopsie 2 (Anzahl der Schnitte)	23 x 40 µm	26 x 40 µm	26 x 40 µm
Stanzbiopsie 3 (Anzahl der Schnitte)	30 x 40 µm	23 x 40 µm	29 x 40 µm
Permeierter Anteil	Akzeptorflüssigkeit + Wattebausch		
Mittlere Dicke der Stanzbiopsien	947 µm	933 µm Mittelwert = 960 µm	1013 µm
dorsale Schicht	7 Schnitte à 40 µm = 280 µm		
intermediäre Schicht	12 Schnitte à 40 µm = 480 µm		
ventrale Schicht	5 Schnitte à 40 µm = 200 µm		

Die durchschnittliche Dicke aller Stanzbiopsien betrug 960 µm. Entsprechend dem Verhältnis von KOBAYASHI et al. [6] von 3:5:2 (dorsale : intermediäre : ventrale Schicht) betrug die Dicke der dorsalen Schicht 280 µm, der intermediären Schicht 480 µm und der ventralen Schicht 200 µm. Die erhaltenen Nagelschnitte wurden in Eppendorfgläsern mit 200 µl Methanol extrahiert, über Nacht geschüttelt, anschließend 10 min zentrifugiert und der Überstand analysiert. Die Tupfer, die Filterplättchen und die Wattebausche wurden ebenfalls mit Methanol über Nacht extrahiert. Schließlich erfolgte die Quantifizierung von EV-086K mit Hilfe der entwickelten HPLC-Methode (siehe Kapitel 6.3.1).

6.11 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurden die einfaktorielle Varianzanalyse (1-way ANOVA) und der t-Test verwendet. Mit Hilfe dieser Verfahren können Unterschiede zwischen verschiedenen Gruppen, Bedingungen oder Stichproben herausgefunden werden. Dazu werden im Allgemeinen die Mittelwerte verwendet. Die Varianzanalyse kann drei oder mehr Gruppen bzw. Stichproben miteinander vergleichen, der t-Test nur zwei. Anschließend konnten die Daten mit multiplen Vergleichstests (Post-Hoc-Tests) wie dem Dunnett's Test (Vergleich zu einer Kontrolle) und dem Tukey's Test (Paarweiser Vergleich der Mittelwerte) ausgewertet werden (Software: inerSTAT-a 1.3, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Mexiko City, Mexiko). Unterschiede wurden bei $p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$ als signifikant gewertet.

7 ANHANG

7.1 Verwendete Substanzen

Acetonitril (HPLC Gradient Grade)	J.T. Baker, Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, NL
Ameisensäure (Formic acid, FA)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze, D
Ammoniumacetat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
BAC	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze, D
BDAC Hydrat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze, D
Butylhydroxytoluol	Caelo, Hilden, D
Capryol™ 90	Gattefossé, Saint-Priest, Lyon, FR
Caprylylglykol	Dr. Straetmans GmbH, Hamburg, D
Cetiol® B / LC / OE	Cognis, Monheim, D (<i>seit 2011 BASF</i>)
Cetylalkohol	Croda GmbH, Nettetal, D
Chloroform	Merck, Darmstadt, D
Citronensäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Collodium-4%-Lösung DAC	Caelo, Hilden, D
Deuterium oxid 99.8 At-%	ARMAR Chemicals GmbH, Leipzig, D
DMSO	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Dodecanol	Merck, Darmstadt, D
Ethanol 96 %	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Eudragit® E 100 (Ph.Eur.)	Evonik Industries AG, Essen, D
Eutanol G / G16	Cognis, Monheim, D (<i>seit 2011 BASF</i>)
EV-086K	Evolva Holding SA, Reinach, CH
Glycerol 85%ig	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Glycerolmonostearat 60	Caelo, Hilden, D
Hexylenglykol	Symrise AG, Holzminden, D
IPM	Caelo, Hilden, D
IPP (Tegosoft® P)	Evonik Industries AG, Essen, D
Lauroglycol™ 90	Gattefossé, Saint-Priest, Lyon, FR
Lutrol® E 300 & 400	BASF SE, Ludwigshafen, D
Lutrol® F127 / Poloxamer 407	BASF SE, Ludwigshafen, D
Macrogol-20-glycerolmonostearat	Caelo, Hilden, D
Methanol (HPLC Gradient Grade)	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Methodrextat (Säure)	Excella GmbH, Feucht, D
Miglyol 812	Fagron GmbH & Co. KG, Barsbüttel, D
Natrium-EDTA	Caelo, Hilden, D
Natrosol™ 250 HHX PHARM	Ashland, Convington, USA
1-Octanol	Grüssing GmbH, Filsum, D
Pelemol® BIP	Phoenix Chemical, Inc., Somerville, New Jersey, USA

Pentylenglykol	BASF SE, Ludwigshafen, D
Propylenglykol	BASF SE, Ludwigshafen, D
Puffersubstanzen	Merck, Darmstadt, D
Ryoto Sucroseester L-595	Mitsubishi-Kagaku Foods Corporation, Tokyo, J
Ryoto Sucroseester L-1695	Mitsubishi-Kagaku Foods Corporation, Tokyo, J
Solphor® P	BASF SE, Ludwigshafen, D
Synperonic™ PE/L 101 Poloxamer 331	Croda International Plc, East Yorkshire, UK
Tagat® O2 V (PEG-20 Glyceryl Oleate)	Evonik Industries AG, Essen, D
Tinogard® TT	BASF ChemTrade GmbH, 91593 Burgbernheim, D
Tinogard® TL	BASF ChemTrade GmbH, 91593 Burgbernheim, D
Transcutol® P (Ph.Eur.)	Gattefossé, Saint-Priest , Lyon, FR
Tylose® H 30.000 P2 PHA	SE Tylose GmbH & Co. KG, Wiesbaden, D
Tego® Care PL4	Evonik Industries AG, Essen, D
Tegosoft® CI / DEC	Evonik Industries AG, Essen, D
Varonic® APM	Evonik Industries AG, Essen, D
Weißes Vaseline	Bombastus, Freital, D
(destilliertes) Wasser	Hausleitung, Institut für Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale), D

7.2 Verwendete Geräte (allgemein)

Analysenwaage AG 204 Delta Range	Mettler Toleda GmbH, Gießen, D
Inkubator & Ampullenrüttler	Spezialanfertigungen, Mechanische Werkstatt, Institut für Pharmazie, MLU Halle-Wittenberg, Halle, D
Laborschüttler	Schüttler GFL 3006, GFL-Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, D
Vortexer IKA Genius	IKA Werke GmbH und Co. KG, Staufen, D
Zentrifuge I	VWR-Zentrifuge 1814, VWR International GmbH, Darmstadt, D
Zentrifuge II	MLW T 52.1, Zentrifugenbau Engelsdorf, D

7.3 Penetrationsverhalten optimierter EV-086K-Formulierungen

7.3.1 Formulierungsentwicklung

a) Inkorporation der ME-EV-086K in einen Nagellack (ME-NL):

Es sollte versucht werden, die ME-EV-086K in einen Nagellack einzuarbeiten. Die Idee war hierbei, dass nach Verdunstung des Lösungsmittels ein Polymergerüst mit der ME in den Zwischenräumen zurückbleibt. Dies könnte zu einer besseren Haftung der ME auf der Nagelplatte beitragen und ebenfalls ein übersättigtes System herbeiführen. Demzufolge wurden verschiedene Polymer-Ethanol-Gemische hergestellt, verschiedene Anteile ME hinzugegeben und der entstandene Film anschließend hinsichtlich seiner Eigenschaften untersucht (Tab. 40). In Formulierung Nr. 3 und Formulierung Nr. 7 konnten 10 % der ME eingearbeitet werden, ohne dass der Film klebrig wurde. Es wurden feste und gut haftende Filme erhalten, wobei Nr. 3 im Vergleich zu Nr. 7 langsamer spreitete und damit zu einer besseren Verteilung auf der Nagelplatte führte. Insgesamt konnten 5 % EV-086K in Formulierung Nr. 3 inkorporiert werden. Bei weiterer Erhöhung des ME-Anteils klebte der Film und die Formulierung wurde unbrauchbar.

Tab. 40: Bewertung der verschiedenen ME-NL-Formulierungen (+++ gut/stark, ++ mittel, + schwach, - kein)

Formulierung	Anteil der Inhaltsstoffe (m/m)			Eigenschaften			
	EtOH	E 100	ME-EV-086K	Bildung eines festen Films	Haftung nach Kratzen	Klebrigkeit	Spreitung
1	88%	10%	2%	+++	+++	-	+
2	85%	10%	5%	+++	++	+	+
3	80%	10%	10%	+++	+++	-	+
4	70%	10%	20%	++	+	+++	+
5	93%	5%	2%	+++	+++	-	++
6	90%	5%	5%	+++	+++	-	++
7	85%	5%	10%	+++	+++	-	++
8	75%	5%	20%	-	-	++	++

b) Inkorporation der ME-EV-086K in ein Hydrogel (ME-HG):

In diesem Fall konnten zwei Varianten entwickelt werden, um eine Viskositäts-erhöhung der ME herbeizuführen. Zunächst wurden verschiedene Gelbildner getestet. Carbomere zeigten mit EV-086K Inkompatibilitäten und können als Gelbildner nicht verwendet werden. Das Einarbeiten von kleinen Anteilen (1 %) verschiedener Hydroxyethylcellulosen in die hydrophile Phase der ME führte immer zu Instabilitäten der kolloidalen Formulierung (Trübung der ME). Demzufolge wurde versucht die ME in das oben genannte Hydrogel zu inkorporieren. Es konnte ein klares Gel mit einem ME-Anteil von 10 % und einem Wirkstoffgehalt ebenfalls von 10 % erhalten werden (Tab. 41, ME-HG-HEC). Das Gel lässt sich leicht auf dem Nagel applizieren und zieht überraschenderweise schnell ein.

Eine zweite Möglichkeit, die Viskosität der ME zu erhöhen, wurde in Anlehnung an eine Studie von CHUDASAMA et al. [307] erreicht. In dieser konnte ein ME-basiertes Gel durch Zusatz von Carbopol 934, Xanthan Gum oder Lutrol® F127 erreicht werden. Die *in vitro* Permeation von Itraconazol wurde ebenfalls untersucht und die Lutrol® F127-basierte ME konnte hier die besten Resultate erzielen, da das eingesetzte Poloxamer zusätzlich als Penetrationenhancer fungierte. Folglich wurde die wirkstofffreie ME-EV-086K mit 10 % des Poloxamers versetzt und im Wasserbad bei 50 °C bis zur vollständigen Lösung erhitzt (Tab. 41, ME-HG-Lutrol). Nach Abkühlung wurde in die nun viskose, aber klare ME der Wirkstoff eingearbeitet. Die erhaltene Formulierung ließ sich sogar noch besser applizieren als ME-HG-HEC und der Film haftet auch sehr gut auf der Nagelplatte.

Tab. 41: Zusammensetzung der ME-Gele

Komponenten	ME-HG-HEC	ME-HG-Lutrol
ME-EV-086K	10 %	90 %
HEC (Tylose® H P2 PHA 30.000)	1 %	-
Glycerol 98 %	1 %	-
Wasser	79 %	-
Poloxamer 407 (Lutrol® F127)	-	10 %
EV-086K	9 %	-

c) Wasserfreie Hydrogele:

Es konnten einige wasserfreie Hydrogele entwickelt werden. Die eingesetzten Gelbildner zeigten aber stets Inkompatibilitäten mit dem Wirkstoff. Des Weiteren neigen wasserfreie Gele zu einer ausgeprägten Klebrigkeit, die eine Anwendung am Nagel erschwert. Und schließlich sind wasserfreie Formulierungen für eine ungleiche Penetration hinderlich, da sie dem Nagel Wasser entziehen und somit eine Diffusion behindern. Zusätzlich führen sie, in den durchgeführten FTIR-Studien, durch eine Rückdiffusion des D_2O , zum Austrocknen des Akzeptors.

7.3.2 *In vitro* Penetration von EV-086K aus den optimierten Formulierungen

Die folgenden getesteten Formulierungen wurden entwickelt, um durch Erhöhung der Viskosität (ME-HG-HEC und ME-HG-Lutrol) oder durch Inkorporation in eine Lackformulierung (ME-NL) die Haftung der ME auf der Nagelplatte zu optimieren. In Abb. 58 sind nun die Diffusionskurven dieser Formulierungen im Vergleich zu der zuvor gezeigten ME unter Verwendung von Rinderhufmembranen dargestellt.

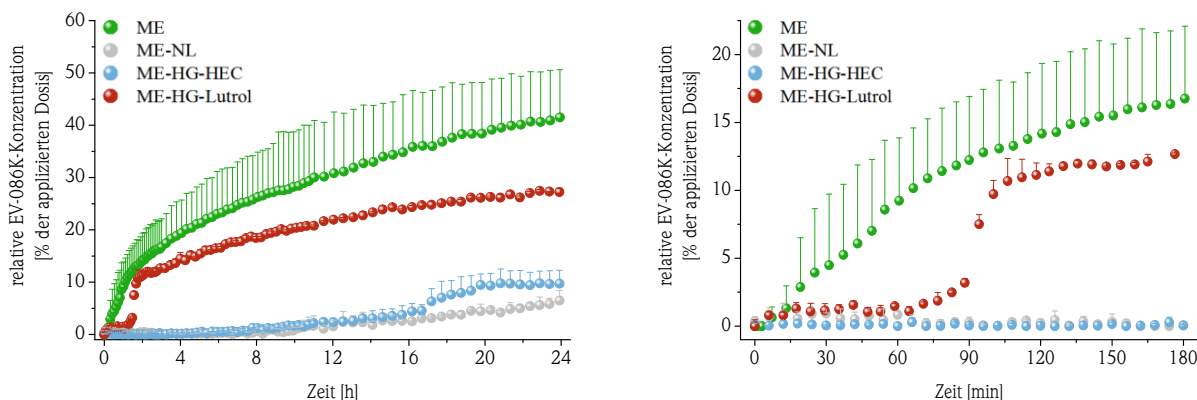


Abb. 58: Links: Vergleich der Penetrationsergebnisse von EV-086K nach Applikation der ME (n=6), ME-NL (n=3), ME-HG-HEC (n=2) und ME-HG-Lutrol (n=2) in den Akzeptor der Diffusionszelle unter Verwendung von Rinderhufmembranen bezogen auf die applizierte Dosis ($MW \pm SD$). Rechts: Vergrößerter Ausschnitt der ersten 180 min des Diffusionsprozesses.

Aus den beiden Diagrammen geht eindeutig hervor, dass die Inkorporation in ein HEC-Gel oder in eine Lackformulierung zu einer beträchtlichen Verminderung der Diffusion des Arzneistoffes führt. Nach 3 h liegt die Konzentration des Arzneistoffes bezogen auf die applizierte Dosis im Akzeptor unter 1 %. Die viskose ME mit Lutrol-Zusatz konnte zwar weitaus höhere Konzentrationen erreichen als ME-NL bzw. ME-HG-HEC, aber im Vergleich zur ME wurden geringere Penetrationsraten, mit einer ausgedehnten Verzögerungszeit von 1,5 h, beobachtet.

7.4 Pharmakokinetische Daten von MTX

Tab. 42: Pharmakokinetische Daten von MTX

Prozess / Parameter	Population	Applikationsform & Dosis	Ergebnisse der pharmakokinetischen Untersuchungen	Ref.
Resorption	-	p.o.	primär über aktiven Transport, Sättigungskinetik; passive Diffusion ab einer Konzentration von 100 µmol/l	[308, 309]
	n=10	15 mg p.o./i.v.	nicht von der Nahrung beeinflusst	[310-312]
Bioverfügbarkeit	174 Patienten	p.o., i.m., s.c. 15 mg	oral: 75±20 %, i.m.: 100 %, s.c.: 94 %; keine Abhängigkeit von Geschlecht, Alter oder BMI der Patienten; hohe interindividuelle und niedrige intraindividuelle Schwankungen	[178, 313]
Distribution	20/50 Patienten	i.m., p.o. 10 mg	intrazelluläres $V_d = 0,87-1,43$ l/kg; intrazelluläre Speicherung als Polyglutamate vor allem in Leber, Niere, Milz, Erythrozyten, Haut.	[308, 311, 314-316]
Plasmaeiweißbindung	20 Patienten	p.o., 10 mg/Woche	50 % als MTX, 90 % des Hauptmetabolites (7-OH-MTX) gebunden;	[193, 308, 316]
First-Pass-Effekt	10 Patienten	p.o., 15 mg/Woche	ca. 10 % intrahepatisch zum Hauptmetabolit 7-OH-MTX	[189, 308, 317]
C_{max}	174 Patienten	p.o., i.v., i.m. 15 mg	p.o.: 0,56±0,25 bzw. i.m.: 0,78±0,36 µmol/l	[178]
t_{max}	174 Patienten	p.o., i.v., i.m. 15 mg	p.o.: 0,75-2 h bzw. i.m.: 1,32 h	[178],[310, 317, 318]
terminale HWZ	-	p.o.	1. HWZ: 1 h (Verteilung), 2. HWZ: 2-4 h (renale Ausscheidung), 3. HWZ: 15-21 h (enterohepatische Rezirkulation) → Mittel aller 3 HWZ: 6-7 h	[193, 318, 319]
	9 Patienten	p.o., i.v., i.m. 15 mg	55-116 h; je länger die Probenentnahme, desto längere $t_{1/2}$ werden berichtet	[189]
Elimination	9/20 Patienten	p.o., i.v., i.m. 10/15 mg	80-90 % werden innerhalb von 24 h unverändert renal durch Filtration und aktive Sekretion im proximalen Tubulus ausgeschieden (zwei- oder dreiphasig)	[189, 316]
	-	p.o.	5-20 % bzw. 10-30 % werden biliär ausgeschieden	[308, 314]
	9/50 Patienten	p.o., i.v., i.m. 10 mg	wesentlicher Enterohepatischer Kreislauf (L-MTX)	[315, 320, 321]

7.5 Stabilitätsuntersuchungen: Zersetzung von MTX

In den HPLC-Chromatogrammen von MTX in wässriger Lösung bei pH-Werten zwischen 5 und 8 sind nach einem und drei Jahren zusätzliche Peaks aufgetreten (Abb. 59 - links). Dabei handelt es sich um Abbauprodukte von MTX. Vor allem bei einer relativen Retentionszeit von 1,3 zu der Retentionszeit von MTX trat ein deutlicher Peak auf. Dieser wurde durch das Haupthydrolyseprodukt N^{10} -Methylfolsäure (II) verursacht [322]. Die N^{10} -Amino-Gruppe am Pteridinring wird mit Hydroxidionen der basischen Lösung ausgetauscht [323].

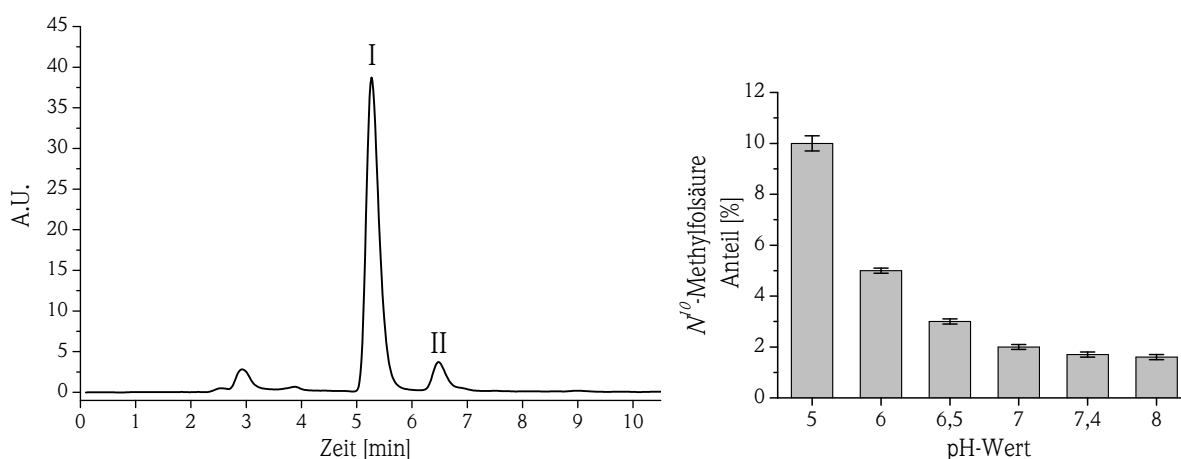


Abb. 59: Links: HPLC-Chromatogramm von MTX (I) nach drei Jahren in wässriger Lösung mit einem pH-Wert von 5 und der Peak des Abbauproduktes N-Methylfolsäure (II); Rechts: Anteil des Abbauproduktes bezogen auf den MTX-Gehalt (MW±SD, n=9)

Der Anteil von N^0 -Methylfolsäure wurde ebenfalls nach drei Jahren bestimmt (Abb. 59 - rechts). In sauren Lösungen war deren Anteil deutlich höher und betrug ca. 10 % bezogen auf den MTX-Gehalt. Je neutraler die Lösung wurde, desto weniger des Zersetzungsproduktes konnte quantifiziert werden. Bei einem pH-Wert von 7,4 und 8 betrug der Anteil nur noch 1,7 %. Diese Beobachtungen entsprechen auch den Untersuchungen der Arbeitsgruppe um HANSEN et al. [322]. Anhand des Zersetzungsproduktes und der oben erhaltenen Ergebnisse kann man feststellen, dass eine Lösung mit einem physiologischen pH-Wert sich äußerst positiv auf die Stabilität von MTX auswirkt.

7.6 Zusammensetzung der Dilutionsreihen zur physikochemischen Charakterisierung der ME-Systeme

Tab. 43: Zusammensetzung der Mischungen des ME-L-595-Systems (Angaben in %, m/m)

Probe	Tensid	SE L-595 : Tego® Care PLA (1:1, m/m)	Hydrophile Phase	Wasser : Pentylenglykol (1:2, m/m)	IPP		
A-1	40 %	20 %	20 %	5 %	1,7 %	3,3 %	55 %
A-2	40 %	20 %	20 %	10 %	3,3 %	6,7 %	50 %
A-3	40 %	20 %	20 %	20 %	6,7 %	13,3 %	40 %
A-4	40 %	20 %	20 %	30 %	10 %	20 %	30 %
A-5	40 %	20 %	20 %	40 %	13,3 %	26,7 %	20 %
A-6	40 %	20 %	20 %	50 %	16,7 %	33,3 %	10 %
B-1	10 %	5 %	5 %	85 %	28,3 %	56,7 %	5 %
B-2	20 %	10 %	10 %	75 %	25 %	50 %	5 %
B-3	25 %	12,5 %	12,5 %	70 %	23,3 %	46,7 %	5 %
B-4	30 %	15 %	15 %	65 %	21,7 %	43,3 %	5 %
B-5	40 %	20 %	20 %	55 %	18,3 %	36,7 %	5 %
B-6	50 %	25 %	25 %	45 %	15 %	30 %	5 %
B-7	60 %	30 %	30 %	35 %	11,7 %	23,3 %	5 %
B-8	70 %	35 %	35 %	25 %	8,3 %	16,6 %	5 %
C-1	20 %	10 %	10 %	5 %	1,7 %	3,3 %	75 %
C-2	25 %	12,5 %	12,5 %	5 %	1,7 %	3,3 %	70 %
C-3	30 %	15 %	15 %	5 %	1,7 %	3,3 %	65 %
C-4	35 %	17,5 %	17,5 %	5 %	1,7 %	3,3 %	60 %

Tab. 44: Zusammensetzung der Mischungen des ME-L1695-Systems (Angaben in %, m/m)

Probe	Tensid	SE L-1695 : Lauroglycol™ 90 (2:1, m/m)	Hydrophile Phase	Wasser : Pentylenglykol (5:1, m/m)	IPM		
15%-1	15 %	10 %	5 %	80 %	64 %	16 %	5 %
20%-1	20 %	13,3 %	6,7 %	75 %	60 %	15 %	5 %
25%-1	25 %	16,7 %	8,3 %	70 %	56 %	14 %	5 %
25%-2	25 %	16,7 %	8,3 %	65 %	52 %	13 %	10 %
30%-1	30 %	20 %	10 %	65 %	52 %	13 %	5 %
30%-2	30 %	20 %	10 %	60 %	48 %	12 %	10 %
30%-3	30 %	20 %	10 %	55 %	44 %	11 %	15 %
35%-1	35 %	23,3 %	11,7 %	60 %	48 %	12 %	5 %
35%-2	35 %	23,3 %	11,7 %	55 %	44 %	11 %	10 %
35%-3	35 %	23,3 %	11,7 %	50 %	40 %	10 %	15 %
35%-4	35 %	23,3 %	11,7 %	45 %	36 %	9 %	20 %
40%-1	40 %	26,7 %	13,3 %	55 %	44 %	11 %	5 %
40%-2	40 %	26,7 %	13,3 %	50 %	40 %	10 %	10 %
40%-3	40 %	26,7 %	13,3 %	45 %	36 %	9 %	15 %
40%-4	40 %	26,7 %	13,3 %	40 %	32 %	8 %	20 %
40%-5	40 %	26,7 %	13,3 %	35 %	28 %	7 %	25 %
40%-6	40 %	26,7 %	13,3 %	30 %	24 %	6 %	30 %

7.7 Verbesserung der *ex vivo* Penetration von MTX durch den Einsatz des Lösungsvermittlers Soluphor® P

In den Löslichkeitsstudien von MTX (siehe Kapitel 4.2.3.1) wurde ein besonderes hydrophiles Lösungsmittel gefunden, welches hervorragende Lösungseigenschaften für MTX besitzt ($c_s = 52 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$): Soluphor® P (SP). SP, chemisch 2-Pyrrolidon, ist ein kleines Molekül, welches penetrationsfördernde Eigenschaften, speziell für hydrophile Stoffe, besitzt [103]. Es wird angenommen, dass durch Einarbeitung von SP in die ME-Systeme und in die Basiscreme sowohl die MTX-Konzentration aufgrund der verbesserten Löslichkeit als auch die thermodynamische Aktivität gesteigert werden kann. Folglich könnte die Zugabe von SP zu einer Erhöhung der Penetrationsrate von MTX in Humanhaut führen. Um dies zu untersuchen, wurde Soluphor® P in alle drei Formulierungen mit einer Konzentration von 10 % eingearbeitet. Die Ergebnisse sind in Abb. 60 dargestellt.

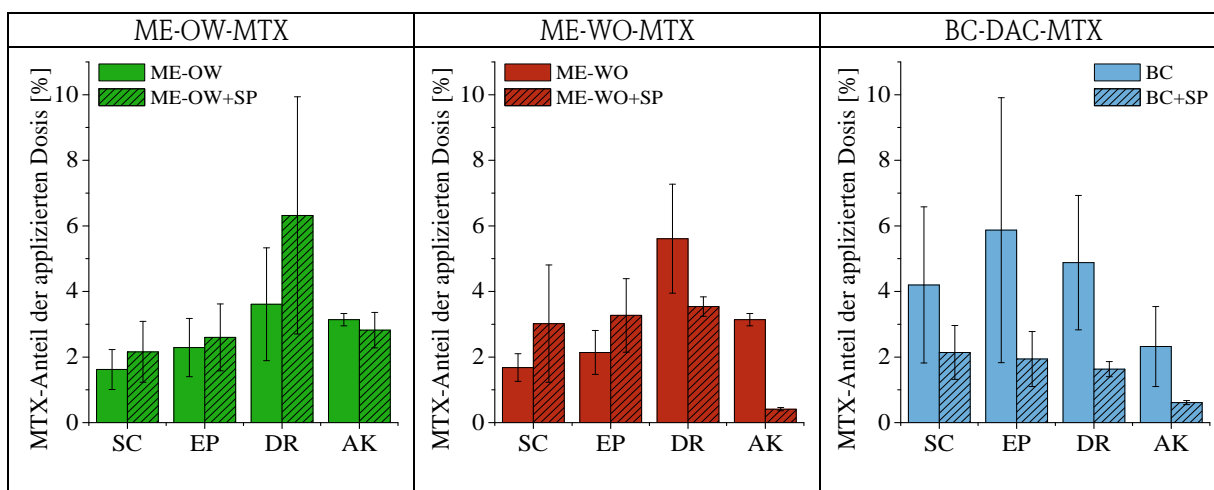


Abb. 60: Vergleich der Penetrationsergebnisse von MTX mit und ohne Soluphor P®-Zusatz (SP) nach Applikation der jeweiligen Formulierung in Anteilen der applizierten Dosis in das Stratum corneum (SC), in die Epidermis (EP), in die Dermis (DR) und in den Akzeptor (AK) nach 300 min Inkubationszeit ($MW \pm SD$, $n=4$).

Betrachtet man zunächst das O/W-ME-System, so konnten tendenziell höhere MTX-Mengen unter SP-Zusatz, vor allem in die Dermis, transportiert werden. Bei der ME vom W/O-Typ hingegen, kam es zu einer Verschiebung des Penetrationsprofils. Unter dem Einfluss von SP wurden höhere MTX-Konzentrationen im Stratum corneum und in der Epidermis gefunden. Die Arzneistoffkonzentrationen in den Dermis-schichten und im Akzeptormedium nahmen dagegen ab. Jedoch konnten bei beiden Mikroemulsionen keine signifikanten Unterschiede zwischen einem bzw. keinem SP-Zusatz festgestellt werden.

Die Penetrationsergebnisse der Basiscreme zeigen ein ganz anderes Bild. Durch den SP-Zusatz kam es zu einem starken Abfall der MTX-Penetrationsrate in allen Kompartimenten der Haut. Auch die insgesamt penetrierte Menge des applizierten MTX nahm um zwei Drittel, von 15 % auf 5,7 %, ab (Tab. 45).

Tab. 45: Insgesamt penetrierter Anteil des applizierten MTX nach Applikation verschiedener Formulierungen mit und ohne SP-Zusatz (MW \pm SD, n=4)

	ME-OW-MTX	ME-WO-MTX	BC-DAC-MTX
<i>Penetrierter Anteil mit SP</i>	11,1 \pm 5,3	9,8 \pm 2,5	5,7 \pm 1,8
<i>Penetrierter Anteil ohne SP</i>	7,5 \pm 2,5	9,4 \pm 2,6	15,0 \pm 7,5

Durch die Entwicklung einer geeigneten HPLC-Methode konnte ebenso das Penetrationsverhalten von SP bestimmt werden. Jedoch scheint kein Zusammenhang zwischen der Penetration von MTX und SP zu existieren. SP penetriert in hohem Ausmaß in das Akzeptormedium. Bei den beiden Formulierungen Basiscreme und W/O-ME wurden in diesem Kompartiment die höchsten SP-Konzentrationen gefunden (77 % bzw. 35 % der applizierten Dosis). Betrachtet man die Verteilung in den einzelnen Hautschichten (Abb. 61), dann ist erkennbar, dass mehr als 26 % (W/O-ME) bzw. 19 % (BC-DAC) der verabreichten SP-Menge in den Dermis-schichten quantifiziert werden konnten. In der vitalen Epidermis und im Stratum corneum wurden nur kleine Mengen SP gefunden.

Überraschenderweise konnte, bezüglich der Verteilung der SP-Konzentrationen in den jeweiligen Hautschichten, nach Applikation der beiden Formulierungen kaum ein Unterschied festgestellt werden. Dies lässt vermuten, dass SP unabhängig vom Vehikel in die Haut penetriert und sich mit hoher Wahrscheinlichkeit in hydrophileren Regionen, wie dem Akzeptor, anreichert. Ein *solvent drag* Mechanismus für MTX scheidet damit aus.

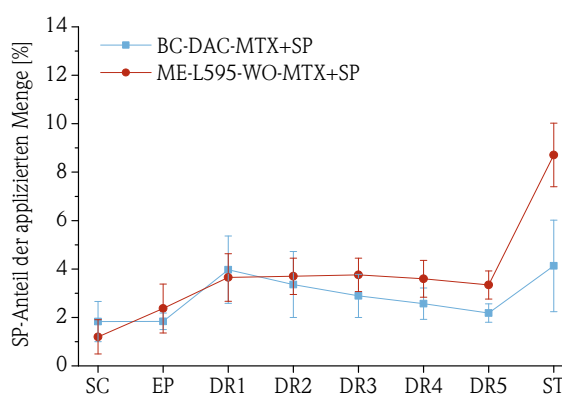


Abb. 61: Penetration der applizierten SP-Menge nach Applikation der Basiscreme und der W/O-ME in die verschiedenen Hautkompartimente nach 300 min Inkubationszeit (MW \pm SD, n=4).

Zusammenfassend konnte nur ein geringer, nicht signifikanter Vorteil auf die Transportrate von MTX in Humanhaut durch einen SP-Zusatz bei Mikroemulsionen festgestellt werden. Bei halbfesten Vehikeln, wie der Basiscreme, wurde sogar ein negativer Effekt beobachtet. Dennoch ist SP in der Lage, in tiefe Hautschichten bzw. in hohem Maße in den Akzeptor zu penetrieren.

8 LITERATUR

- [1] Gupta A, Lynde C, Jain H et al. "A higher prevalence of onychomycosis in psoriatics compared with non-psoriatics: a multicentre study". *Br. J. Dermatol.*, 136(5):786-789 (1997).
- [2] Runne U, Orfanos CE. "The Human Nail: Structure, Growth and Pathological Changes" In: *Curr. Probl. Dermatol.* Mali JWH. Basel: *S. Karger AG*, 9: 102-149 (1981).
- [3] Tosti A, Piraccini BM. "Biology of Nails" In: *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine.* Freedberg IM et al. New York: *McGraw-Hill*, 1: 159-163 (2003).
- [4] Achten G, Andre J, Laporte M. "Nails in Light and Electron-Microscopy". *Semin. Dermatol.*, 10(1):54-64 (1991).
- [5] Forslind B, Thyresson N. "Structure of Normal Nail - Scanning Electron-Microscope Study". *Arch Dermatol Forsch*, 251(3):199-204 (1975).
- [6] Kobayashi Y, Miyamoto M, Sugibayashi K et al. "Drug permeation through the three layers of the human nail plate". *J. Pharm. Pharmacol.*, 51(3):271-278 (1999).
- [7] Murdan S. "Enhancing the nail permeability of topically applied drugs". *Expert Opin. Drug Deliv.*, 5(11):1267-1282 (2008).
- [8] Paus R, Peker S, Sundberg JP. "Biology of hair and nails" In: *Dermatology.* Bologna J et al. St. Louis, USA: *Mosby Elsevier*, 2nd Edition: 978-986 (2008).
- [9] Bragulla HH, Homberger DG. "Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia". *J. Anat.*, 214(4):516-559 (2009).
- [10] Mohorcic M, Torkar A, Friedrich J et al. "An investigation into keratinolytic enzymes to enhance unguinal drug delivery". *Int. J. Pharm.*, 332(1-2):196-201 (2007).
- [11] Kitahara T, Ogawa H. "The extraction and characterization of human nail keratin". *J. Dermatol. Sci.*, 2(6):402-406 (1991).
- [12] Lynch MH, Oguin WM, Hardy C et al. "Acidic and basic hair nail (hard) keratins: their colocalization in upper cortical and cuticle cells of the human hair follicle and their relationship to soft keratins". *J Cell Biol*, 103(6):2593-2606 (1986).
- [13] De Berker D, Wojnarowska F, Sviland L et al. "Keratin expression in the normal nail unit: markers of regional differentiation". *Br. J. Dermatol.*, 142(1):89-96 (2000).
- [14] Garson JC, Baltenneck F, Leroy F et al. "Histological structure of human nail as studied by synchrotron X-ray microdiffraction". *Cell Mol Biol*, 46(6):1025-1034 (2000).
- [15] Helmdach M, Thielitz A, Ropke EM et al. "Age and sex variation in lipid composition of human fingernail plates". *Skin Pharmacol Appl. Skin Physiol.*, 13(2):111-119 (2000).
- [16] Farran L, Ennos AR, Eichhorn SJ. "The effect of humidity on the fracture properties of human fingernails". *J. Exp. Biol.*, 211(23):3677-3681 (2008).
- [17] Walters KA, Flynn GL, Marvel JR. "Physicochemical characterization of the human nail: permeation pattern for water and the homologous alcohols and differences with respect to the stratum corneum". *J. Pharm. Pharmacol.*, 35(1):28-33 (1983).
- [18] Mertin D, Lippold BC. "In-vitro permeability of the human nail and of a keratin membrane from bovine hooves: Influence of the partition coefficient octanol/water and the water solubility of drugs on their permeability and maximum flux". *J. Pharm. Pharmacol.*, 49(1):30-34 (1997).
- [19] Elewski BE. "Onychomycosis: Pathogenesis, diagnosis, and management". *Clin. Microbiol. Rev.*, 11(3):415-429 (1998).
- [20] Thomas J, Jacobson GA, Narkowicz CK et al. "Toenail onychomycosis: an important global disease burden". *J. Clin. Pharm. Ther.*, 35(5):497-519 (2010).
- [21] Gupta A, Jain H, Lynde C et al. "Prevalence and epidemiology of onychomycosis in patients visiting physicians' offices: a multicenter canadian survey of 15,000 patients." *J. Am. Acad. Dermatol.*, 43(2-1):244-248 (2000).
- [22] Roseeuw D. "Achilles foot screening project: preliminary results of patients screened by dermatologists". *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 12(1):6-9; discussion page 17 (1999).
- [23] Abeck D, Haneke E, Nolting S et al. "Onychomykose: Aktuelle Daten zu Epidemiologie, Erregerspektrum, Risikofaktoren sowie Beeinflussung der Lebensqualität". *Deutsches Ärzteblatt*, 97:1984-1986 (2000).
- [24] Finch JJ, Warshaw EM. "Toenail onychomycosis: current and future treatment options". *Dermatol Ther*, 20(1):31-46 (2007).
- [25] Repka MA, O'Haver J, See CH et al. "Nail morphology studies as assessments for onychomycosis treatment modalities". *Int. J. Pharm.*, 245(1-2):25-36 (2002).
- [26] Lauharanta J. "Comparative efficacy and safety of amorolfine nail lacquer 2% versus 5% once weekly". *Clin. Exp. Dermatol.*, 17:41-43 (1992).
- [27] Gupta A, Fleckman P, Baran R. "Ciclopirox nail lacquer topical solution 8% in the treatment of toenail onychomycosis." *J. Am. Acad. Dermatol.*, 43(4):70-80 (2000).
- [28] Shivakumar H, Repka MA, Murdan S et al. "Topical Nail Formulations" In: *Topical Nail Products and Ungual Drug Delivery.* Murthy SN et al. New York: *CRC Press Taylor and Francis*: 61 (2012).

- [29] Alley MR, Baker SJ, Beutner KR et al. "Recent progress on the topical therapy of onychomycosis". *Expert Opin. Investig. Drugs*, 16(2):157-167 (2007).
- [30] Murdan S. "Drug delivery to the nail following topical application". *Int. J. Pharm.*, 236(1-2):1-26 (2002).
- [31] Mertin D, Lippold BC. "In-vitro permeability of the human nail and of a keratin membrane from bovine hooves: Prediction of the penetration rate of antimycotics through the nail plate and their efficacy". *J. Pharm. Pharmacol.*, 49(9):866-872 (1997).
- [32] Brown MB, Khengar RH, Turner RB et al. "Overcoming the nail barrier: A systematic investigation of unguinal chemical penetration enhancement". *Int. J. Pharm.*, 370(1-2):61-67 (2009).
- [33] Walters KA, Flynn GL, Marvel JR. "Physicochemical characterization of the human nail: solvent effects on the permeation of homologous alcohols". *J. Pharm. Pharmacol.*, 37(11):771-775 (1985).
- [34] Kobayashi Y, Komatsu T, Sumi M et al. "In vitro permeation of several drugs through the human nail plate: relationship between physicochemical properties and nail permeability of drugs". *Eur. J. Pharm. Sci.*, 21(4):471-477 (2004).
- [35] Hafeez F, Hui X, Selner M et al. "Ciclopirox delivery into the human nail plate using novel lipid diffusion enhancers". *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 40(6):838-844 (2013).
- [36] Hartmann M. "Nichtinvasive Diffusionsuntersuchungen wässriger harnstoffhaltiger Systeme an künstlichen und biologischen Membranen". Dissertation. Halle (Saale): Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (2005).
- [37] Kobayashi Y, Miyamoto M, Sugibayashi K et al. "Enhancing effect of N-acetyl-L-cysteine or 2-mercaptoethanol on the in vitro permeation of 5-fluorouracil or tolnaftate through the human nail plate". *Chem Pharm Bull*, 46(11):1797-1802 (1998).
- [38] Marshall RC. "Characterization of the Proteins of Human-Hair and Nail by Electrophoresis". *J. Invest. Dermatol.*, 80(6):519-524 (1983).
- [39] Walters KA, Abdalghafor HM, Lane ME. "The human nail-barrier characterisation and permeation enhancement". *Int. J. Pharm.*, 435(1):10-21 (2012).
- [40] Ghannoum M, Isham N, Herbert J et al. "Activity of TDT 067 (terbinafine in Transfersome) against agents of onychomycosis, as determined by minimum inhibitory and fungicidal concentrations". *J. Clin. Microbiol.*, 49(5):1716-1720 (2011).
- [41] Barot BS, Parejiya PB, Patel HK et al. "Microemulsion-based gel of terbinafine for the treatment of onychomycosis: optimization of formulation using D-optimal design". *AAPS PharmSciTech*, 13(1):184-192 (2011).
- [42] Donnelly RF, McCarron PA, Lightowler JM et al. "Bioadhesive patch-based delivery of 5-aminolevulinic acid to the nail for photodynamic therapy of onychomycosis". *J. Control. Release*, 103(2):381-392 (2005).
- [43] Monti D, Saccomani L, Chetoni P et al. "In vitro transungual permeation of ciclopirox from a hydroxypropyl chitosan-based, water-soluble nail lacquer". *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 31(1):11-17 (2005).
- [44] Hui X, Baker SJ, Wester RC et al. "In vitro penetration of a novel oxaborole antifungal (AN2690) into the human nail plate". *J. Pharm. Sci.*, 96(10):2622-2631 (2007).
- [45] Malhotra GG, Zatz JL. "Investigation of nail permeation enhancement by chemical modification using water as a probe". *J. Pharm. Sci.*, 91(2):312-323 (2002).
- [46] Benzeval I, Bowen CR, Guy RH et al. "Effects of Iontophoresis, Hydration, and Permeation Enhancers on Human Nail Plate: Infrared and Impedance Spectroscopy Assessment". *Pharm. Res.*, 30(6):1-11 (2013).
- [47] Hui X, Wester RC, Barbadillo S et al. "Ciclopirox delivery into the human nail plate". *J. Pharm. Sci.*, 93(10):2545-2548 (2004).
- [48] Nenoff P, Grunewald S, Paasch U. "Laser therapy of onychomycosis". *J Dtsch Dermatol Ges*, 12(1):33-38 (2014).
- [49] Williams AC, Barry BW. "Penetration enhancers". *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 64(Supplement):128-137 (2012).
- [50] Neubert R, Wohlrab W, Marsch W. "Dermatopharmazie". Stuttgart: *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH* (2001).
- [51] Elias PM. "Epidermal lipids, barrier function, and desquamation". *J. Invest. Dermatol.*, 80:44-49 (1983).
- [52] Michaels A, Chandrasekaran S, Shaw J. "Drug permeation through human skin: Theory and invitro experimental measurement". *AIChE Journal*, 21(5):985-996 (1975).
- [53] Marieb EN. "Figure 4.3 - Skin Structure" In: *ESSENTIALS OF HUMAN ANATOMY & PHYSIOLOGY*. Upper Saddle River, NJ, USA: *Pearson Education, Inc.*, 11th: 114 (2014).
- [54] Nast A, Boehncke W, Mrowietz U et al. S3 - Leitlinie zur Therapie der Psoriasis vulgaris - Update 2011. *Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) - Ständige Kommission Leitlinien*. 127-136. (2011). Verfügbar: <http://www.awmf.org/leitlinien/awmf-regelwerk.html> (Zugriff am 25.09.2014).
- [55] Nevitt GJ, Hutchinson PE. "Psoriasis in the community: prevalence, severity and patients' beliefs and attitudes towards the disease". *Br. J. Dermatol.*, 135(4):533-537 (1996).
- [56] Augustin M, Reich K, Glaeske G et al. "Co-morbidity and age-related prevalence of psoriasis: analysis of health insurance data in Germany". *Acta Derm-Venereol*, 90(2):147-151 (2010).
- [57] Henseler T, Christophers E. "Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris". *J. Am. Acad. Dermatol.*, 13(3):450-456 (1985).
- [58] Mrowietz U, Reich K. "Psoriasis-neue Erkenntnisse zur Pathogenese und Therapie". *Deutsches Ärzteblatt*, 106(1-2):11-19 (2009).
- [59] Sampogna F, Gisondi P, Melchi C et al. "Prevalence of symptoms experienced by patients with different clinical types of psoriasis". *Br. J. Dermatol.*, 151(3):594-599 (2004).

- [60] Kuek A, Hazleman BL, Östör AJK. "Immune-mediated inflammatory diseases (IMIDs) and biologic therapy: a medical revolution". *Postgrad. Med. J.*, 83(978):251-260 (2007).
- [61] Lowes MA, Bowcock AM, Krueger JG. "Pathogenesis and therapy of psoriasis". *Nature*, 445(7130):866-873 (2007).
- [62] AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG. Pathogenese der Plaque-Psoriasis. *AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG*. Stand: 2015. <http://www.chronisch-entzuendliche-erkrankungen.de/plaque-psoriasis-pathogenese/> (Zugriff am 27.01.2015).
- [63] Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. "Psoriasis - Mechanisms of disease". *N. Engl. J. Med.*, 361(5):496-509 (2009).
- [64] Nickoloff BJ. "Cracking the cytokine code in psoriasis". *Nat. Med.*, 13(3):242-244 (2007).
- [65] Richards HL, Fortune DG, O'Sullivan TM et al. "Patients with psoriasis and their compliance with medication". *J. Am. Acad. Dermatol.*, 41(4):581-583 (1999).
- [66] Scheuplein RJ. "Mechanism of Percutaneous Absorption - II. Transient diffusion and the relative importance of various routes of skin penetration". *J. Invest. Dermatol.*, 48(1):79-88 (1967).
- [67] Lademann J, Richter H, Schanzer S et al. "Penetration and storage of particles in human skin: Perspectives and safety aspects". *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 77(3):465-468 (2011).
- [68] Barry BW. "Mode of action of penetration enhancers in human skin". *Journal of Controlled Release*, 6(1):85-97 (1987).
- [69] Wepf R, Neubert RH. "Stratum corneum: Struktur und Morphologie einer hoch effizienten Barriere". *Pharmazeutische Zeitung*, 152(17):14-21 (2007).
- [70] Albery W, Hadgraft J. "Percutaneous absorption: in vivo experiments". *J. Pharm. Pharmacol.*, 31(1):140-147 (1979).
- [71] Hadgraft J. "Skin, the final frontier". *Int. J. Pharm.*, 224(1-2):1-18 (2001).
- [72] Nemanic MK, Elias PM. "In situ precipitation: a novel cytochemical technique for visualization of permeability pathways in mammalian stratum corneum". *J. Histochem. Cytochem.*, 28(6):573-578 (1980).
- [73] Boddé HE, Kruithof MAM, Brussee J et al. "Visualisation of normal and enhanced HgCl₂ transport through human skin in vitro". *Int. J. Pharm.*, 53(1):13-24 (1989).
- [74] Potts RO, Francoeur ML. "The influence of stratum corneum morphology on water permeability". *J. Invest. Dermatol.*, 96(4):495-499 (1991).
- [75] Kiselev M, Ryabova NY, Balagurov A et al. "New insights into the structure and hydration of a stratum corneum lipid model membrane by neutron diffraction". *Eur. Biophys. J.*, 34(8):1030-1040 (2005).
- [76] Bach M, Lippold BC. "Percutaneous penetration enhancement and its quantification". *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 46(1):1-13 (1998).
- [77] Lippold BC, Schneemann H. "The influence of vehicles on the local bioavailability of betamethasone-17-benzoate from solution- and suspension-type ointments". *Int. J. Pharm.*, 22(1):31-43 (1984).
- [78] Le VH, Lippold BC. "The influence of physico-chemical properties of homologous nicotinic acid esters on the permeability and maximum flux through an octanol membrane". *Int. J. Pharm.*, 163(1-2):11-22 (1998).
- [79] Ziegenmeyer J. "Biopharmazeutische Aspekte bei der Anwendung von Dermatika" In: *Dermatika*. Ziegenmeyer J, *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart*: (1992).
- [80] Bos JD, Meinardi MM. "The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs". *Exp. Dermatol.*, 9(3):165-169 (2000).
- [81] Magnusson BM, Anissimov YG, Cross SE et al. "Molecular Size as the Main Determinant of Solute Maximum Flux Across the Skin". *J. Invest. Dermatol.*, 122(4):993-999 (2004).
- [82] Naik A, Kalia YN, Guy RH. "Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function". *Pharm Sci Technol Today*, 3(9):318-326 (2000).
- [83] Moser K, Kriwet K, Naik A et al. "Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro". *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 52(2):103-112 (2001).
- [84] Barry BW. "Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery". *Eur. J. Pharm. Sci.*, 14(2):101-114 (2001).
- [85] Daniels R. Strategien zur Verbesserung der Hautpenetration. *Skin Care Forum Band 37* (www.scf-online.com). (2004).
- [86] Raphael AP, Primiero CA, Ansaldo AB et al. "Elongate microparticles for enhanced drug delivery to ex vivo and in vivo pig skin". *J. Control. Release*, 172(1):96-104 (2013).
- [87] Fernando GJP, Chen X, Primiero CA et al. "Nanopatch targeted delivery of both antigen and adjuvant to skin synergistically drives enhanced antibody responses". *J. Control. Release*, 159(2):215-221 (2012).
- [88] Prow TW, Mohammed YH, Ansaldo AB et al. "Topical Microneedle Drug Delivery Enhanced with Magnetophoresis" In: *Advances in Dermatological Sciences*. Robert C et al. London: *RSC Publishing*, 1: 169-177 (2014).
- [89] Soltész S, Dittrich K, Teschendorf P et al. "Topical anesthesia before vascular access in children. Comparison of a warmth-producing lidocaine-tetracaine patch with a lidocaine-prilocaine patch". *Anaesthesist*, 59(6):519-523 (2010).
- [90] Park D, Park H, Seo J et al. "Sonophoresis in transdermal drug deliveries". *Ultrasonics*, 54(1):56-65 (2014).
- [91] Lee S, Kollias N, McAuliffe D et al. "Topical Drug Delivery in Humans with a Single Photomechanical Wave". *Pharm. Res.*, 16(11):1717-1721 (1999).
- [92] Hoar T, Schulman J. "Transparent water-in-oil dispersions: the oleopathic hydro-micelle". *Nature*, 152:102-103 (1943).

- [93] Heuschkel S, Goebel A, Neubert RH. "Microemulsions--modern colloidal carrier for dermal and transdermal drug delivery". *J. Pharm. Sci.*, 97(2):603-631 (2008).
- [94] Danielsson I, Lindman Br. "The definition of microemulsion". *Colloids and Surfaces*, 3(4):391-392 (1981).
- [95] Kreilgaard M. "Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery". *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54:77-98 (2002).
- [96] Junginger HE. "Systematik der Dermatika - Kolloidchemischer Aufbau" In: *Dermatika*. Niedner R et al. Stuttgart: *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft*: 475-516 (1992).
- [97] Kovarik JM, Mueller EA, Van Bree JB et al. "Reduced inter- and intraindividual variability in cyclosporine pharmacokinetics from a microemulsion formulation". *J. Pharm. Sci.*, 83(3):444-446 (1994).
- [98] Pharma Stulln GmbH. Phospholipidhaltige Mikroemulsion zur Anwendung am Auge. *Pharma Stulln GmbH*. Stand: 2014. <http://www.pharmastulln.de/index.php?id=lipimix> (Zugriff am 31.01.2015).
- [99] Engelbrecht TN, Demé B, Dobner B et al. "Study of the Influence of the Penetration Enhancer Isopropyl Myristate on the Nanostructure of Stratum Corneum Lipid Model Membranes Using Neutron Diffraction and Deuterium Labelling". *Skin Pharmacol. Physiol.*, 25(4):200-207 (2012).
- [100] Engelbrecht TN, Schroeter A, Hauß T et al. "Lipophilic penetration enhancers and their impact to the bilayer structure of stratum corneum lipid model membranes: Neutron diffraction studies based on the example Oleic Acid". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1808(12):2798-2806 (2011).
- [101] Aungst BJ, J. Rogers N, Shefter E. "Enhancement of naloxone penetration through human skin in vitro using fatty acids, fatty alcohols, surfactants, sulfoxides and amides". *Int. J. Pharm.*, 33(1-3):225-234 (1986).
- [102] Karande P, Jain A, Mitragotri S. "Discovery of transdermal penetration enhancers by high-throughput screening". *Nat Biotech.*, 22(2):192-197 (2004).
- [103] Lane ME. "Skin penetration enhancers". *Int. J. Pharm.*, 447(1):12-21 (2013).
- [104] Bjerrum NJ. "Untersuchungen über Ionenassoziation". Kopenhagen: *Host* (1926).
- [105] Schill G. "Isolation of drugs and related organic compounds by ion-pair extraction" In: *Ion exchange and solvent extraction* Dekker, New York, 6: 1-57 (1974).
- [106] Eksborg S, Lagerström P-O, Modin R et al. "Ion-pair chromatography of organic compounds". *J. Chromatogr. A*, 83:99-110 (1973).
- [107] Matschiner S, Neubert R, Wohlrab W. "The use of ionpairing to facilitate percutaneous penetration of drugs" In: *Percutaneous Penetration Enhancers*. New York: *CRC Press*: 407-417 (1995).
- [108] Lippold BC, Schneider G. "Ionenpaarbildung von Tetraalkylammonium- und Cholinesterbromiden in n-Octanol und n-Octanol-Wassergemischen". *Arch. Pharm. (Weinheim)*, 307(1):63-73 (1974).
- [109] Takács-Novák K, Szász G. "Ion-pair partition of quaternary ammonium drugs: the influence of counter ions of different lipophilicity, size, and flexibility". *Pharm. Res.*, 16(10):1633-1638 (1999).
- [110] Neubert RHH. "Beiträge zur biopharmazeutischen Bedeutung der Ionenpaarbildung". Habilitation. Halle (Saale): Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (1987).
- [111] Neubert R. "Ion pair transport across membranes". *Pharm. Res.*, 6(9):743-747 (1989).
- [112] Jonkman J, Hunt C. "Ion pair absorption of ionized drugs - fact or fiction?" *Pharm. Weekbl.*, 5(2):41-48 (1983).
- [113] Vavrova K, Lorencova K, Novotny J et al. "Permeation enhancer dodecyl 6-(dimethylamino) hexanoate increases transdermal and topical delivery of adefovir: influence of pH, ion-pairing and skin species". *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 70(3):901-907 (2008).
- [114] Valenta C, Siman U, Kratzel M et al. "The dermal delivery of lignocaine: influence of ion pairing". *Int. J. Pharm.*, 197(1):77-85 (2000).
- [115] Ma X, Fang L, Guo J et al. "Effect of counter-ions and penetration enhancers on the skin permeation of flurbiprofen". *J. Pharm. Sci.*, 99(4):1826-1837 (2010).
- [116] Kamal MAHM, Limura N, Nabekura T et al. "Enhanced skin permeation of diclofenac by ion-pair formation and further enhancement by microemulsion". *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 55(3):368-371 (2007).
- [117] Knechtel P, Diefenbacher M, Greve KBV et al. "The Natural Diyne-Furan Fatty Acid EV-086 Is an Inhibitor of Fungal Delta-9 Fatty Acid Desaturation with Efficacy in a Model of Skin Dermatophytosis". *Antimicrob. Agents Chemother.*, 58(1):455-466 (2014).
- [118] Knechtel P, Meyer J-P. Diyne compositions. In *IFI CLAIMS Patent Services*. (2011).
- [119] Kajiwara S, Aritomi T, Suga K et al. "Overexpression of the OLE1 gene enhances ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*". *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53(5):568-574 (2000).
- [120] Zhang SR, Skalsky Y, Garfinkel DJ. "MGA2 or SPT23 is required for transcription of the Delta 9 fatty acid desaturase gene, OLE1, and nuclear membrane integrity in *Saccharomyces cerevisiae*". *Genetics*, 151(2):473-483 (1999).
- [121] Carratu L, Franceschelli S, Pardini CL et al. "Membrane lipid perturbation modifies the set point of the temperature of heat shock response in yeast". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93(9):3870-3875 (1996).
- [122] Zamora F. "Biochemistry of Alcoholic Fermentation" In: *Wine Chemistry and Biochemistry*. Moreno-Arribas MV et al. New York: *Springer Verlag*: 14-18 (2009).
- [123] MarvinSketch 5.3.8. *Chemaxon Ltd*. <http://www.chemaxon.com>. (2010).
- [124] "Europäisches Arzneibuch, 7.0 - 7.8, Grundwerk 2011, Amtliche deutsche Ausgabe". Stuttgart: *Deutscher Apotheker Verlag* (2013).

- [125] Cifuentes A, Bernal JL, Diez-Masa JC. "Determination of critical micelle concentration values using capillary electrophoresis instrumentation". *Anal. Chem.*, 69(20):4271-4274 (1997).
- [126] Mrestani Y, Claussen S, Neubert RHH. "Determination of CMC of sodium glucocorticoid hemisuccinates by CE". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 30(3):869-873 (2002).
- [127] Martin JD, Keary CL, Thornton TA et al. "Metallophilic liquid crystals formed by surfactant templating of molten metal halides". *Nat. Mater.*, 5(4):271-275 (2006).
- [128] Dörfler H-D. "Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme: Physik und Chemie". Berlin: *Springer-Verlag GmbH* (2002).
- [129] Valko K. "Application of high-performance liquid chromatography based measurements of lipophilicity to model biological distribution". *J. Chromatogr. A*, 1037(1-2):299-310 (2004).
- [130] EU-Richtlinie "RL 67 / 548 / EWG" Anhang V chapter A.8. *Umwelt-Online (Demo-Version)*. Stand: 2011. http://www.umwelt-online.de/recht/eu/65_69/va_gs.htm (Zugriff am 23.11.2011).
- [131] ALOGPS 2.1 program VCCLAB. *Virtual Computational Chemistry Laboratory*. Stand: 2011. <http://www.vcclab.org/lab/alogps/start.html> (Zugriff am 26.05.2014).
- [132] Tinogard TT Technical Information. Ludwigshafen: *BASF SE - Care Chemicals Division*. (2011).
- [133] Tinogard TL Technical Information. Ludwigshafen: *BASF SE - Care Chemicals Division*. (2011).
- [134] Baran R. "Amorolfine nail lacquer: a new transungual delivery system for nail mycoses". *J. Am. Med. Assoc. Southeast Asia*, 9(4):5-6 (1993).
- [135] Müller RH. "Pharmazeutische Technologie: moderne Arzneiformen: Lehrbuch für Studierende der Pharmazie, Nachschlagewerk für Apotheker in Offizin, Krankenhaus und Forschung; 72 Tabellen". Stuttgart: *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft* (1998).
- [136] Marty J-PL. "Amorolfine nail lacquer: a novel formulation". *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 4:17-21 (1995).
- [137] Mitsui T. "New cosmetic science". Amsterdam: *Access Online via Elsevier* (1997).
- [138] Technische Information Eudragit E 100, Evonik Industries AG. (2014).
- [139] Produktinformation Transcutol P, Gattefossé, 2015.
- [140] "European Commission, Health & Consumer Protection DG, Public Health and Risk Assessment, Scientific Committee on Consumer Products, Opinion on Diethylene Glycol Monoethyl Ether, 2006".
- [141] Monti D, Saccomani L, Chetoni P et al. "Validation of bovine hoof slices as a model for infected human toenails: in vitro ciclopirox transungual permeation". *Br. J. Dermatol.*, 165(1):99-105 (2011).
- [142] Baran R, Tosti A, Hartman I et al. "An innovative water-soluble biopolymer improves efficacy of ciclopirox nail lacquer in the management of onychomycosis". *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 23(7):773-781 (2009).
- [143] Iorizzo M. Ciclopirox 8% hydrolacquer once a day versus amorolfine 5% twice a week administered in mild-to-moderate onychomycosis: a randomized, parallel group, blinded assessor trial. In *12th EADV Spring Symposium*. Valencia (Spain). (2015).
- [144] Jahn K. "Moderne galenische Zubereitungen zur dermalen Anwendung von Ciclosporin A und Mycophenolatmofetil". Dissertation. Halle (Saale): Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (2002).
- [145] Heuschkel S. "Untersuchungen zum Mechanismus der Penetrationserhöhung durch Mikroemulsionen und neue Enhancer bei der dermalen Applikation von Wirkstoffen". Dissertation. Halle (Saale): Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (2009).
- [146] Fiedler HP. "Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete". Aulendorf, Germany: *Editio Cantor Verlag* (2002).
- [147] Müller RH. "Colloidal Carriers for Controlled Drug Delivery and Targeting: Modification, Characterization and in Vivo Distribution". Stuttgart: *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft* (1991).
- [148] SciFinderScholar TM2006. *Calculated using Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02*. Stand: 1994-2012 ACD/Labs. (Zugriff am 13.03.2014).
- [149] Repeated Insult Patch Test - Final Report. Phoenix Chemicals, Inc., Somerville, NJ, USA. (2000).
- [150] Phoenomenon. Technical Information of Pelemol BIP-PC. Phoenix Chemicals, Inc., Somerville, NJ, USA. (2006).
- [151] Heuschkel S. "Untersuchungen zum Mechanismus der Penetrationserhöhung durch Mikroemulsionen und neue Enhancer bei der dermalen Applikation von Wirkstoffen". Dissertation. Halle (Saale): Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (2009).
- [152] DAC/NRF-Redaktion. "Standardisierte Rezepturen - Formelsammlung für Ärzte". Eschborn: *GOVI-Verlag Pharmazeutischer Verlag GmbH*. 145 pp (2012).
- [153] Günzler H. "IR-Spektroskopie - Eine Einführung". Weinheim: *VCH Verlagsgesellschaft mbH* (1996).
- [154] Guenther U, Wartewig S, Metz H et al. "Skin absorption as studied by spectroscopic methods" In: *Dermal Absorption and Toxicity Assessment*. Roberts MS et al. New York, NY, USA: *Taylor & Francis*: 161-178 (2008).
- [155] Wartewig S, Neubert RH. "Pharmaceutical applications of Mid-IR and Raman spectroscopy". *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 57(8):1144-1170 (2005).
- [156] Guenther U, Smirnova I, Neubert RHH. "Hydrophilic silica aerogels as dermal drug delivery systems - Dithranol as a model drug". *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 69(3):935-942 (2008).
- [157] Hanh BD, Neubert RH, Wartewig S. "Investigation of drug release from suspension using FTIR-ATR technique: part I. Determination of effective diffusion coefficient of drugs". *Int. J. Pharm.*, 204(1):145-150 (2000).

- [158] Guenther U, Hartmann M, Wartewig S et al. "Diffusion of urea through membranes". *Diffusion Fundamentals*, 4:4.1-4.5 (2006).
- [159] Shivakumar H, Juluri A, Desai B et al. "Ungual and transungual drug delivery". *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 38(8):901-911 (2012).
- [160] Vignardet C, Guillaume YC, Michel L et al. "Comparison of two hard keratinous substrates submitted to the action of a keratinase using an experimental design". *Int. J. Pharm.*, 224(1-2):115-122 (2001).
- [161] Lusiana, Reichl S, Müller-Goymann CC. "Keratin film made of human hair as a nail plate model for studying drug permeation". *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 78(3):432-440 (2011).
- [162] Dutet J, Delgado-Charro MB. "Assessment of iontophoretic and passive unguinal penetration by laser scanning confocal microscopy". *Pharm. Res.*, 29(12):3464-3474 (2012).
- [163] Khengar RH, Jones SA, Turner RB et al. "Nail swelling as a pre-formulation screen for the selection and optimisation of unguinal penetration enhancers". *Pharm. Res.*, 24(12):2207-2212 (2007).
- [164] Hartmann M, Hanh BD, Podhaisky H et al. "A new FTIR-ATR cell for drug diffusion studies". *Analyst*, 129(10):902-905 (2004).
- [165] Guenther U. "Schwingungsspektroskopische Methoden zur biopharmazeutischen Untersuchung von aerogelhaltigen Zubereitungen und der Diffusion von Arzneistoffen durch Membranen". Dissertation. Halle (Saale): Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (2010).
- [166] Smith BC. "Infrared Spectral Interpretation: A Systemic Approach". New York: *CRC Press* (1999).
- [167] Gotter B, Faubel W, Neubert R. "FTIR microscopy and confocal Raman microscopy for studying lateral drug diffusion from a semisolid formulation". *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 74(1):14-20 (2010).
- [168] Dreher F, Walde P, Walther P et al. "Interaction of a lecithin microemulsion gel with human stratum corneum and its effect on transdermal transport". *J. Control. Release*, 45(2):131-140 (1997).
- [169] Kreilgaard M, Pedersen EJ, Jaroszewski JW. "NMR characterisation and transdermal drug delivery potential of microemulsion systems". *J. Control. Release*, 69(3):421-433 (2000).
- [170] Kriwet K, Müller-Goymann CC. "Diclofenac release from phospholipid drug systems and permeation through excised human stratum corneum". *Int. J. Pharm.*, 125(2):231-242 (1995).
- [171] Delgado-Charro MB, Iglesias-Vilas G, Blanco-Mendez J et al. "Delivery of a hydrophilic solute through the skin from novel microemulsion systems". *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 43(1):37-42 (1997).
- [172] Hua L, Weisan P, Jiayu L et al. "Preparation, evaluation, and NMR characterization of vinpocetine microemulsion for transdermal delivery". *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 30(6):657-666 (2004).
- [173] Rock FL, Mao W, Yaremchuk A et al. "An antifungal agent inhibits an aminoacyl-tRNA synthetase by trapping tRNA in the editing site". *Science*, 316(5832):1759-1761 (2007).
- [174] Elkeeb R, AliKhan A, Elkeeb L et al. "Transungual drug delivery: current status". *Int. J. Pharm.*, 384(1-2):1-8 (2010).
- [175] Pathirana D, Ormerod A, Saiag P et al. "European S3-Guidelines on the systemic treatment of psoriasis vulgaris". *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 23(2):1-70 (2009).
- [176] Nast A, Boehncke W-H, Mrowietz U et al. "S3-Guidelines on the treatment of psoriasis vulgaris Update 2011". *J Dtsch Dermatol Ges*, 9(2):1-95 (2011).
- [177] Augustin M, Krüger K, Radtke M et al. "Disease severity, quality of life and health care in plaque-type psoriasis: a multicenter cross-sectional study in Germany". *Dermatology*, 216(4):366-372 (2008).
- [178] Kabisch S, Weigand T, Plischke H et al. "Bioavailability of methotrexate (MTX) following different routes of application". *Akt Rheumatol*, 29(4):197-200 (2004).
- [179] Farber S, Diamond LK, Mercer RD et al. "Temporary Remissions in Acute Leukemia in Children Produced by Folic Acid Antagonist, 4-Aminopteroyl-Glutamic Acid (Aminopterin)". *N. Engl. J. Med.*, 238(23):787-793 (1948).
- [180] Wright JC, Prigot A, Wright BP et al. "An Evaluation of Folic Acid Antagonists in Adults with Neoplastic Diseases". *J. Natl. Med. Assoc.*, 43(4):211 (1951).
- [181] Mohr K, Herzig S. "Methotrexat". *Dtsch. Med. Wochenschr.*, 125(47):1435-1438 (2000).
- [182] Gupta SPK, Bansal S, Ramesh V. "Remembering Yellapragada SubbaRow". *Int. J. Dermatol.*, 52(7):882-886 (2013).
- [183] Gubner R, August S, Ginsberg V. "Therapeutic Suppression of Tissue Reactivity 2: Effect of Aminopterin in Rheumatoid Arthritis and Psoriasis". *Am. J. Med. Sci.*, 221(2):176-182 (1951).
- [184] Goldin A, Venditti JM, Humphreys SR et al. "Studies on the management of mouse leukemia (L1210) with antagonists of folic acid". *Cancer Res.*, 15(11):742-747 (1955).
- [185] Fachinformation. Metex® 50 mg/ml Injektionslösung - Fertigspritze. Frankfurt: *Rote Liste Service GmbH*. (2013).
- [186] Koch U. Autoimmunerkrankungen und Methotrexat. Stand: 2013. <http://www.pharmazeutische-bedenken.de/index.php?id=170> (Zugriff am 26.09.2014).
- [187] Songsiridej N, Furst DE. "Methotrexate - the rapidly acting drug". *Baillière's clinical rheumatology*, 4(3):575-593 (1990).
- [188] Fiehn C. "Methotrexat in der Rheumatologie". *Z. Rheumatol.*, 68(9):747-757 (2009).
- [189] Seideman P, Beck O, Eksborg S et al. "The pharmacokinetics of methotrexate and its 7-hydroxy metabolite in patients with rheumatoid arthritis". *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 35(4):409-412 (1993).

- [190] Dalrymple JM, Stamp LK, O'Donnell JL et al. "Pharmacokinetics of oral methotrexate in patients with rheumatoid arthritis". *Arthritis Rheum.*, 58(11):3299-3308 (2008).
- [191] Reich K. "Therapie mit Methotrexat in der Dermatologie". *J Dtsch Dermatol Ges*, 5(10):363-371 (2012).
- [192] Steinhilber D, Schubert-Zsilavec M, Roth HJ. "Medizinische Chemie". Stuttgart: *Deutscher Apotheker Verlag*. 536 pp (2005).
- [193] Rau R. "Methotrexatbehandlung der chronischen Polyarthrit: eine Übersicht". *Z. Rheumatol.*, 53(4):199-229 (1994).
- [194] Chabner BA, Allegra CJ, Curt GA et al. "Polyglutamation of methotrexate. Is methotrexate a prodrug?" *J. Clin. Invest.*, 76(3):907-912 (1985).
- [195] Weinstein GD, Jeffes E, McCullough JL. "Cytotoxic and immunologic effects of methotrexate in psoriasis". *J. Invest. Dermatol.*, 95(5):49-52 (1990).
- [196] Ball MA, McCullough JL, Weinstein GD. "Percutaneous absorption of methotrexate: effect on epidermal DNA synthesis in hairless mice". *J. Invest. Dermatol.*, 79(1):7-10 (1982).
- [197] Rau R. "Die Therapie von Hauterkrankungen mit Methotrexat" In: *Das Methotrexat-Buch: aktuelle Therapiekonzepte in der Rheumatologie und Dermatologie*. Bremen: *UNI-MED-Verlag AG*, 1: 75-77 (2007).
- [198] Cronstein BN, Naime D, Ostad E. "The antiinflammatory mechanism of methotrexate. Increased adenosine release at inflamed sites diminishes leukocyte accumulation in an in vivo model of inflammation". *J. Clin. Invest.*, 92(6):2675-2682 (1993).
- [199] Allegra CJ, Drake JC, Jolivet J et al. "Inhibition of phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide transformylase by methotrexate and dihydrofolic acid polyglutamates". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 82(15):4881-4885 (1985).
- [200] Chan ES, Cronstein BN. "Molecular action of methotrexate in inflammatory diseases". *Arthritis Res*, 4(4):266-273 (2002).
- [201] Le Moine O, Stordeur P, Schandené L et al. "Adenosine enhances IL-10 secretion by human monocytes." *J. Immunol.*, 156(11):4408-4414 (1996).
- [202] Mühl H, Pfeilschifter J. "Pharmakogenetik und Pharmakogenomik von Methotrexat". *Z. Rheumatol.*, 70(2):101-107 (2011).
- [203] Parmely MJ, Zhou W, Edwards Cd et al. "Adenosine and a related carbocyclic nucleoside analogue selectively inhibit tumor necrosis factor-alpha production and protect mice against endotoxin challenge." *J. Immunol.*, 151(1):389-396 (1993).
- [204] Sajjadi FG, Takabayashi K, Foster AC et al. "Inhibition of TNF-alpha expression by adenosine: role of A3 adenosine receptors." *J. Immunol.*, 156(9):3435-3442 (1996).
- [205] Bouma MG, Stad RK, Van den Wildenberg F et al. "Differential regulatory effects of adenosine on cytokine release by activated human monocytes." *J. Immunol.*, 153(9):4159-4168 (1994).
- [206] Johnson W, DiMartino M, Meunier P et al. "Methotrexate inhibits macrophage activation as well as vascular and cellular inflammatory events in rat adjuvant induced arthritis." *J. Rheumatol.*, 15(5):745-749 (1987).
- [207] Jeffes EW, McCullough JL, Pittelkow MR et al. "Methotrexate therapy of psoriasis: differential sensitivity of proliferating lymphoid and epithelial cells to the cytotoxic and growth-inhibitory effects of methotrexate". *J. Invest. Dermatol.*, 104(2):183-188 (1995).
- [208] Nyfors A. "Benefits and adverse drug experiences during long-term methotrexate treatment of 248 psoriatics". *Dan. Med. Bull.*, 25(5):208-211 (1978).
- [209] Heydendael VMR, Spuls PI, Opmeer BC et al. "Methotrexate versus Cyclosporine in Moderate-to-Severe Chronic Plaque Psoriasis". *N. Engl. J. Med.*, 349(7):658-665 (2003).
- [210] Saurat J-H, Stingl G, Dubertret L et al. "Efficacy and safety results from the randomized controlled comparative study of adalimumab vs. methotrexate vs. placebo in patients with psoriasis". *Br. J. Dermatol.*, 158(3):558-566 (2008).
- [211] Prasad R, Koul V. "Transdermal delivery of methotrexate: past, present and future prospects". *Therapeutic delivery*, 3(3):315-325 (2012).
- [212] van Scott EJ, Reinertson RP. "Morphologic and Physiologic Effects of Chemotherapeutic Agents in Psoriasis". *J. Invest. Dermatol.*, 33(6):357-369 (1959).
- [213] Fry L, McMinn RM. "Topical methotrexate in psoriasis". *Arch. Dermatol.*, 96(5):483-488 (1967).
- [214] Comaish S, Juhlin L. "Site of action of methotrexate in psoriasis". *Arch. Dermatol.*, 100(1):99-05 (1969).
- [215] McCullough JL, Snyder DS, Weinstein GD et al. "Factors Affecting Human Percutaneous Penetration of Methotrexate and Its Analogs Invitro". *J. Invest. Dermatol.*, 66(2):103-107 (1976).
- [216] Weinstein GD, McCullough JL, Olsen E. "Topical methotrexate therapy for psoriasis". *Arch Dermatol*, 125(2):227-230 (1989).
- [217] Lu G, Jun H, Suh H. "Percutaneous absorption and disposition studies of methotrexate in rabbits and rats". *Biopharm. Drug Dispos.*, 18(5):409-422 (1997).
- [218] Hwang GC, Lin AY, Chen W et al. "Development and optimization of a methotrexate topical formulation." *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 21(17):1941-1952 (1995).
- [219] Chatterjee DJ, Li WY, Koda RT. "Effect of vehicles and penetration enhancers on the in vitro and in vivo percutaneous absorption of methotrexate and edatrexate through hairless mouse skin". *Pharm. Res.*, 14(8):1058-1065 (1997).
- [220] Trotta M, Pattarino F, Gasco MR. "Influence of counter ions on the skin permeation of methotrexate from water-oil microemulsions". *Pharm. Acta Helv.*, 71(2):135-140 (1996).
- [221] Syed TA, Hadi SM, Qureshi ZA et al. "Management of psoriasis vulgaris with methotrexate 0.25% in a hydrophilic gel: A placebo-controlled, double-blind study". *J Cutan Med Surg*, 5(4):299-302 (2001).

- [222] Eskicirak B, Zemheri E, Cerkezoglu A. "The treatment of psoriasis vulgaris: 1% topical methotrexate gel". *Int. J. Dermatol.*, 45(8):965-969 (2006).
- [223] Ali MFM, Salah M, Rafea M et al. "Liposomal Methotrexate hydrogel for treatment of localized psoriasis: Preparation, characterization and laser targeting". *Med. Sci. Monitor*, 14(12):66-74 (2008).
- [224] Alvarez-Figueroa MJ, Blanco-Mendez J. "Transdermal delivery of methotrexate: iontophoretic delivery from hydrogels and passive delivery from microemulsions." *Int. J. Pharm.*, 215(1-2):57-65 (2001).
- [225] Dubey V, Mishra D, Dutta T et al. "Dermal and transdermal delivery of an anti-psoriatic agent via ethanolic liposomes". *J. Control. Release*, 123(2):148-154 (2007).
- [226] Prasad R, Koul V, Anand S et al. "Effect of DC/mDC iontophoresis and terpenes on transdermal permeation of methotrexate: In vitro study". *Int. J. Pharm.*, 333(1-2):70-78 (2007).
- [227] Stagni G, Shukla C. "Pharmacokinetics of methotrexate in rabbit skin and plasma after iv-bolus and iontophoretic administrations". *J. Control. Release*, 93(3):283-292 (2003).
- [228] Wong T-W, Zhao Y-L, Sen A et al. "Pilot study of topical delivery of methotrexate by electroporation". *Br. J. Dermatol.*, 152(3):524-530 (2005).
- [229] Vemulapalli V, Yang Y, Friden PM et al. "Synergistic effect of iontophoresis and soluble microneedles for transdermal delivery of methotrexate". *J. Pharm. Pharmacol.*, 60(1):27-33 (2008).
- [230] Samah NA, Williams N, Heard CM. "Nanogel particulates located within diffusion cell receptor phases following topical application demonstrates uptake into and migration across skin". *Int. J. Pharm.*, 401(1-2):72-78 (2010).
- [231] Trotta M, Peira E, Carlotti ME et al. "Deformable liposomes for dermal administration of methotrexate". *Int. J. Pharm.*, 270(1-2):119-125 (2004).
- [232] Lakshmi PK, Devi GS, Bhaskaran S et al. "Niosomal methotrexate gel in the treatment of localized psoriasis: phase I and phase II studies". *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 73(3):157-161 (2007).
- [233] RÖMPP 4.0 Online-Enzyklopädie - Thieme Chemistry. *Georg Thieme Verlag KG*. Stand: 2008. (Zugriff am 19.05.2011).
- [234] Rubino FM. "Separation methods for methotrexate, its structural analogues and metabolites". *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, 764(1-2):217-254 (2001).
- [235] Wu CY, Benet LZ. "Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/ elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system". *Pharm. Res.*, 22(1):11-23 (2005).
- [236] FachInfo-Service. Fachinformation Methotrexat "Lederle" Tabletten 2,5 mg/10 mg. *Pfizer*. (2014).
- [237] Bergström CA, Strafford M, Lazorova L et al. "Absorption classification of oral drugs based on molecular surface properties". *J. Med. Chem.*, 46(4):558-570 (2003).
- [238] Lindenberg M, Kopp S, Dressman JB. "Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system". *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 58(2):265-278 (2004).
- [239] Menczel E, Touitou E. "Cutaneous permeation of lipophilic molecules: effects of enhancers" In: *Percutaneous Absorption: Mechanisms-Methodology-Drug Delivery*. Bronaugh RL et al. New York: *Marcel Dekker*, 2: 121-133 (1989).
- [240] Trommer H, Neubert R. "Overcoming the stratum corneum: the modulation of skin penetration". *Skin Pharmacol. Physiol.*, 19(2):106-121 (2006).
- [241] Yao YJ, Khoo KS, Chung MCM et al. "Determination of isoelectric points of acidic and basic proteins by capillary electrophoresis". *J. Chromatogr. A*, 680(2):431-435 (1994).
- [242] Galensa R, Bahadir M, Engelhardt U et al. "Lebensmittel-und Umwelanalytik mit der HPLC: Tips, Tricks und Beispiele für die Praxis". *John Wiley & Sons* (2009).
- [243] Engelhardt H, Beck W, Kohr J et al. "Kapillarelektrophorese: Methoden und Möglichkeiten". *Angewandte Chemie*, 105(5):659-680 (1993).
- [244] Produktionformation SUGAR ESTER L-595. *Mitsubishi-Kagaku Foods Corporation*. Stand: 2002. <http://www.mfc.co.jp/english/1595.htm> (Zugriff am 28.07.2015).
- [245] Lerk PC, Sucker HH, Eicke HF. "Micellization and solubilization behavior of sucrose laurate, a new pharmaceutical excipient". *Pharm. Dev. Technol.*, 1(1):27-36 (1996).
- [246] Aboofazeli R, Lawrence C, Wicks S et al. "Investigations into the formation and characterization of phospholipid microemulsions. III. Pseudo-ternary phase diagrams of systems containing water-lecithin-isopropyl myristate and either an alkanolic acid, amine, alkanediol, polyethylene glycol alkyl ether or alcohol as cosurfactant". *Int. J. Pharm.*, 111(1):63-72 (1994).
- [247] De Gennes P, Taupin C. "Microemulsions and the flexibility of oil/water interfaces". *J. Phys. Chem.*, 86(13):2294-2304 (1982).
- [248] Produktinformation SUGAR ESTER L-1695. *Mitsubishi-Kagaku Foods Corporation*. Stand: 2002. <http://www.mfc.co.jp/english/11695.htm> (Zugriff am 28.07.2015).
- [249] Lehmann L, Keipert S, Gloor M. "Effects of microemulsions on the stratum corneum and hydrocortisone penetration". *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 52(2):129-136 (2001).
- [250] Gloor M, Haus G, Keipert S. "Keratolytic activity of microemulsions". *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, 16(3):151-155 (2002).
- [251] Bolzinger M, Thevenin CC, Poelman M. "Bicontinuous sucrose ester microemulsion: a new vehicle for topical delivery of niflumic acid". *Int. J. Pharm.*, 176(1):39-45 (1998).

- [252] Thevenin MA, Grossiord JL, Poelman MC. "Sucrose esters/cosurfactant microemulsion systems for transdermal delivery: Assessment of bicontinuous structures". *Int. J. Pharm.*, 137(2):177-186 (1996).
- [253] Vermeire A, De Muyneck C, Vandebossche G et al. "Sucrose Laurate Gels as a Percutaneous Delivery System for Oestradiol in Rabbits". *J. Pharm. Pharmacol.*, 48(5):463-467 (1996).
- [254] Ntawukulilyayo JD, Bouckaert S, Remon JP. "Enhancement of dissolution rate of nifedipine using sucrose ester coprecipitates". *Int. J. Pharm.*, 93(1-3):209-214 (1993).
- [255] Bolzinger-Thevenin M, Grossiord J, Poelman M. "Characterization of a sucrose ester microemulsion by freeze fracture electron micrograph and small angle neutron scattering experiments". *Langmuir*, 15(7):2307-2315 (1999).
- [256] Garti N, Clement V, Fanun M et al. "Some Characteristics of Sugar Ester Nonionic Microemulsions in View of Possible Food Applications". *J. Agric. Food Chem.*, 48(9):3945-3956 (2000).
- [257] Fanun M, Wachtel E, Antalek B et al. "A study of the microstructure of four-component sucrose ester microemulsions by SAXS and NMR". *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 180(1-2):173-186 (2001).
- [258] Attwood D, Mallon C, Taylor C. "Phase studies on oil-in-water phospholipid microemulsions". *Int. J. Pharm.*, 84(2):5-8 (1992).
- [259] Aboofazeli R, Lawrence M. "Investigations into the formation and characterization of phospholipid microemulsions. I. Pseudo-ternary phase diagrams of systems containing water-lecithin-alcohol-isopropyl myristate". *Int. J. Pharm.*, 93(1):161-175 (1993).
- [260] Lagues M, Sauterey C. "Percolation transition in water in oil microemulsions. Electrical conductivity measurements". *J. Phys. Chem.*, 84(26):3503-3508 (1980).
- [261] Alany RG, Tucker IG, Davies NM et al. "Characterizing colloidal structures of pseudoternary phase diagrams formed by oil/water/amphiphile systems". *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 27(1):31-38 (2001).
- [262] Georges J, Chen J. "Microemulsions studies: correlation between viscosity, electrical conductivity and electrochemical and fluorescent probe measurements". *Colloid and Polymer Sci.*, 264(10):896-902 (1986).
- [263] Mehta S, Bala K. "Volumetric and transport properties in microemulsions and the point of view of percolation theory". *Physical Review E*, 51(6):5732 (1995).
- [264] Park BD, Youm JK, Jeong SK et al. "The Characterization of Molecular Organization of Multilamellar Emulsions Containing Pseudoceramide and Type III Synthetic Ceramide". *J. Invest. Dermatol.*, 121(4):794-801 (2003).
- [265] Rosevear F. "Liquid crystals: the mesomorphic phases of surfactant compositions". *J. Soc. Cosmetic Chemists*, 19:581-594 (1968).
- [266] Bruchhausen Fv. "Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis: Stoffe E-O. Band 8". Heidelberg: *Springer-Verlag* (1993).
- [267] Sadtler V, Guely M, Marchal P et al. "Shear-induced phase transitions in sucrose ester surfactant". *J Colloid Interf Sci*, 270(2):270-275 (2004).
- [268] Snabre P, Porte G. "Viscosity of the L3 phase in amphiphilic systems". *EPL (Europhysics Letters)*, 13(7):641 (1990).
- [269] Park KH, Im SH, Park OO. "The size control of silver nanocrystals with different polyols and its application to low-reflection coating materials". *Nanotechnology*, 22(4):045602 (2011).
- [270] Garti N, Aserin A, Tiunova I et al. "A DSC study of water behavior in water-in-oil microemulsions stabilized by sucrose esters and butanol". *Colloids and surfaces A: Physicochemical and engineering aspects*, 170(1):1-18 (2000).
- [271] Garti N, Aserin A, Ezrahi S et al. "Water behavior in nonionic surfactant systems I: subzero temperature behavior of water in nonionic microemulsions studied by DSC". *J Colloid Interf Sci*, 178(1):60-68 (1996).
- [272] Podlogar F, Gasperlin M, Tomsic M et al. "Structural characterisation of water-Tween 40/Imwitor 308-isopropyl myristate microemulsions using different experimental methods". *Int. J. Pharm.*, 276(1):115-128 (2004).
- [273] Ackermann P. "Qualitätskontrolle im industriellen Rahmen" In: *Dermatika*. Ziegenmeyer J. Stuttgart: *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft*. 517-633 (1992).
- [274] Shukla A, Janich M, Jahn K et al. "Investigation of pharmaceutical oil/water microemulsions by small-angle scattering". *Pharm. Res.*, 19(6):881-886 (2002).
- [275] Keck C, Müller R. *Moderne pharmazeutische Technologie*. Freie Universität Berlin. Stand: 2009. www.pharmazie-lehrbuch.de (Zugriff am 27.05.2014).
- [276] Benutzerhandbuch: ALV-5000 MULTIPLE TAU DIGITAL CORRELATOR - Software Version 5. Langen: *ALV Laser Vertriebsgesellschaft mbH*. (1993).
- [277] Aboofazeli R, Barlow DJ, Lawrence MJ. "Particle size analysis of concentrated phospholipid microemulsions: II. Photon correlation spectroscopy". *AAPS PharmSci*, 2(3):1-10 (2000).
- [278] Goebel AS, Neubert RH, Wohlrab J. "Dermal targeting of tacrolimus using colloidal carrier systems". *Int. J. Pharm.*, 404(1-2):159-168 (2011).
- [279] Glatter O, Orthaber D, Stradner A et al. "Sugar-Ester Nonionic Microemulsion: Structural Characterization". *J Colloid Interf Sci*, 241(1):215-225 (2001).
- [280] Moulik S, Paul B. "Structure, dynamics and transport properties of microemulsions". *Adv. Colloid Interface Sci.*, 78(2):99-195 (1998).
- [281] Lam AC, Schechter RS. "The theory of diffusion in microemulsion". *Journal of colloid and interface science*, 120(1):56-63 (1987).
- [282] Kumar P, Mittal KL. "Handbook of microemulsion science and technology". New York: *CRC Press* (1999).

- [283] Luepke N, Kemper F. "The HET-CAM test: an alternative to the Draize eye test". *Food Chem. Toxicol.*, 24(6):495-496 (1986).
- [284] ICCVAM Test Method Evaluation Report - Appendix B3: ICCVAM-Recommended Protocol for Future Studies Using the HET-CAM Test Method. *NIH Publication No. 10-7553*. Stand: 2010. <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm> (Zugriff am 16.11.2014).
- [285] Spielmann H, Liebsch M. INVITTOX - Protocol No. 47 - HET-CAM Test. Stand: 1992. http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/ocubrdr/hetcam/hetcamappa1.pdf (Zugriff am 16.11.2014).
- [286] Alany R, Rades T, Nicoll J et al. "W/O microemulsions for ocular delivery: Evaluation of ocular irritation and precorneal retention". *J. Control. Release*, 111(1):145-152 (2006).
- [287] Kalteis T, Lüring C, Schaumburger J et al. "Gewebetoxizität lokaler Antiseptika". *Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete*, 141(02):233-238 (2003).
- [288] Siddiqui O, Roberts MS, Polack AE. "Topical Absorption of Methotrexate - Role of Dermal Transport". *Int. J. Pharm.*, 27(2-3):193-203 (1985).
- [289] Neubert R, Bendas C, Wohlrab W et al. "A Multilayer Membrane System for Modeling Drug Penetration into Skin". *Int. J. Pharm.*, 75(1):89-94 (1991).
- [290] Osborne D, Ward A, O'Neill K. "Microemulsions as topical drug delivery vehicles: in-vitro transdermal studies of a model hydrophilic drug". *J. Pharm. Pharmacol.*, 43(6):451-454 (1991).
- [291] Wohlrab J, Neubert RHH, Michael J et al. "Methotrexat für die topische Applikation in magistraler Rezeptur". *J Dtsch Dermatol Ges*, 13(9):891-902 (2015).
- [292] Chladek J, Grim J, Martinkova J et al. "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of low-dose methotrexate in the treatment of psoriasis". *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 54(2):147-156 (2002).
- [293] Bhattacharya S, Haldar S. "Interactions between cholesterol and lipids in bilayer membranes. Role of lipid headgroup and hydrocarbon chain-backbone linkage". *Biochim. Biophys. Acta*, 1467(1):39-53 (2000).
- [294] Nam SH, Xu YJ, Nam H et al. "Ion pairs of risedronate for transdermal delivery and enhanced permeation rate on hairless mouse skin". *Int. J. Pharm.*, 419(1-2):114-120 (2011).
- [295] Hao J, Sun Y, Wang Q et al. "Effect and mechanism of penetration enhancement of organic base and alcohol on Glycyrrhetic acid in vitro". *Int. J. Pharm.*, 399(1):102-108 (2010).
- [296] Ivaturi VD, Kim SK. "Enhanced permeation of methotrexate in vitro by ion pair formation with L-arginine". *J. Pharm. Sci.*, 98(10):3633-3639 (2009).
- [297] "Deutscher Arzneimittel-Codex Anlage A". Stuttgart: *Govi-Verlag Pharmazeutischer Verlag GmbH, Deutscher Apotheker Verlag* (1999).
- [298] Ziegenmeyer J. "Biopharmazeutische Aspekte bei der Anwendung von Dermatika" In: *Dermatika*. Niedner R et al. Stuttgart: *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH*: 243-307 (1992).
- [299] Willis CM, Stephens CJM, Wilkinson JD. "Experimentally-induced irritant contact dermatitis". *Contact Dermatitis*, 18(1):20-24 (1988).
- [300] Basketter DA, Marriott M, Gilmour NJ et al. "Strong irritants masquerading as skin allergens: the case of benzalkonium chloride". *Contact Dermatitis*, 50(4):213-217 (2004).
- [301] Committee for Medicinal Products for Human Use: Guideline on bioanalytical method validation. *EMA*. Stand: 2011. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf. (Zugriff am 14.03.2014).
- [302] Kromidas S, Gruber U, Klein W. "Validierung in der Analytik". Weinheim: *WILEY-VCH Verlag GmbH* (1999).
- [303] Mrestani Y, Marestani Z, Neubert RHH. "Characterization of micellar solubilization of antibiotics using micellar electrokinetic chromatography". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 26(5-6):883-889 (2001).
- [304] Crank J. "The mathematics of diffusion". New York: *Oxford University Press*. 414 pp (1975).
- [305] Raucher K, Voigt J., Wilke, K.-T. "Chemische Tabellen und Rechentafeln für die analytische Praxis". Leipzig: *Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie* (1997).
- [306] Franz TJ. "Percutaneous Absorption - On The Relevance of In Vitro Data". *J. Invest. Dermatol.*, 64(3):190-195 (1975).
- [307] Chudasama A, Patel V, Nivsarkar M et al. "Investigation of microemulsion system for transdermal delivery of itraconazole". *J. Adv. Pharm. Tech. Res.*, 2(1):30 (2011).
- [308] FachInfo-Service. Fachinformation metex 7,5 mg/10 mg Tabletten. (2009).
- [309] Fachinformation. Methotrexat Sandoz® Infusionskonzentrat. *Arzneimittel-Kompendium der Schweiz*. Stand: 2010. <http://www.compendium.ch/mpro/mnr/21193/html/de> (Zugriff am 09.08.2012).
- [310] Oguey D, Köllinker F, Gerber NJ. "Effect of food on the bioavailability of low-dose methotrexate in patients with rheumatoid arthritis". *Arthritis Rheum.*, 35:611-614 (1992).
- [311] van Roon EN, van de Laar MAFJ. "Methotrexate bioavailability". *Clin. Exp. Rheumatol.*, 28(5):27-32 (2010).
- [312] Kozloski GD, De Vito JM, Kisicki JC et al. "The effect of food on the absorption of methotrexate sodium tablets in healthy volunteers". *Arthritis Rheum.*, 35(7):761-764 (1992).

-
- [313] Lebbe C, Beyeler C, Gerber NJ et al. "Intraindividual Variability of the Bioavailability of Low-Dose Methotrexate after Oral-Administration in Rheumatoid-Arthritis". *Ann. Rheum. Dis.*, 53(7):475-477 (1994).
- [314] Grim J, Chladek J, Martinkova J. "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methotrexate in non-neoplastic diseases". *Clin Pharmacokinet*, 42(2):139-151 (2003).
- [315] Edno L, Bressolle F, Gomeni R et al. "Total and free methotrexate pharmacokinetics in rheumatoid arthritis patients". *Ther Drug Monit*, 18(2):128-134 (1996).
- [316] Combe B, Edno L, Lafforgue P et al. "Total and free methotrexate pharmacokinetics, with and without piroxicam, in rheumatoid arthritis patients". *Br. J. Rheumatol.*, 34(5):421-428 (1995).
- [317] Chladek J, Martinkova J, Simkova M et al. "Pharmacokinetics of low doses of methotrexate in patients with psoriasis over the early period of treatment". *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 53(6):437-444 (1998).
- [318] Herman RA, Veng-Pedersen P, Hoffman J et al. "Pharmacokinetics of low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis patients". *J. Pharm. Sci.*, 78(2):165-171 (1989).
- [319] Nuernberg B, Koehnke R, Solsky M et al. "Biliary elimination of low-dose methotrexate in humans". *Arthritis Rheum.*, 33(6):898-902 (1990).
- [320] Hendel J, Brodthagen H. "Entero-Hepatic Cycling of Methotrexate Estimated by Use of the D-Isomer as a Reference Marker". *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 26(1):103-107 (1984).
- [321] Olsen EA. "The Pharmacology of Methotrexate". *J. Am. Acad. Dermatol.*, 25(2):306-318 (1991).
- [322] Hansen J, Kreilgard B, Nielsen O et al. "Kinetics of degradation of methotrexate in aqueous solution". *Int. J. Pharm.*, 16(2):141-152 (1983).
- [323] Chatterji DC, Gallelli JF. "Thermal and photolytic decomposition of methotrexate in aqueous solutions". *J. Pharm. Sci.*, 67(4):526-531 (1978).

9 DANKSAGUNG

Da eine wissenschaftliche Arbeit nicht das Werk einer einzigen Person ist, möchte ich mich an dieser Stelle bei allen Menschen bedanken, die mir die Erstellung meiner Dissertation ermöglicht haben.

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Reinhard Neubert für die Überlassung des hochinteressanten Themas und für die warmherzige Betreuung zu jeder Zeit. Prof. Neubert hatte stets ein offenes Ohr für Fragen und konnte in konstruktiven Gesprächen mich jederzeit mit hilfreichen Anregungen unterstützen. Besonders danke ich ihm für die Freiheit, welche er mir bei dem gesamten Forschungsprojekt gewährt hatte. Erst diese trug zum Gelingen der Arbeit bei.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Johannes Wohlrab für seine außerordentlich sachkundigen, erfahrenen und wertvollen Hinweise sowie für seine Diskussionsbereitschaft hinsichtlich der Penetrations- und HET-CAM-Studien bedanken, welche an der Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt wurden. Gedankt sei auch seinen Mitarbeiterinnen Frau Schramm und Frau Bruhne für die technische Assistenz.

Ein herzlicher Dank gilt besonders Frau Manuela Woigk und Frau Heike Rudolf. Beiden danke ich für die wunderbare Zeit im Labor und für die Unterstützung bei der Durchführung von zahlreichen Messungen sowie für die kompetente Hilfe bei analytischen Fragen. Die Zusammenarbeit mit ihnen war mir stets eine große Freude.

Desweiteren möchte ich allen Arbeitsgruppen danken, welche zur Charakterisierung der Mikroemulsionssysteme beigetragen haben. Gedankt sei Herrn Dr. K. Busse von Institut für Chemie für die Hilfe bei den Lichtstreuexperimenten sowie Herrn Dr. K. Schröter und Frau K. Herfurt vom Institut für Physik für die Durchführung der rheologischen Messungen. Ich bedanke mich bei Frau K. Schwarz für die Durchführung der DSC-Messungen.

Herrn Dr. Andreas Kiesow danke ich für die Anfertigung der Hufmembranen und für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Herrn Dr. Y. Mrestani danke ich für die Durchführung der CZE-Experimente.

Herrn Dr. H. Metz danke ich für die ständige Diskussionsbereitschaft hinsichtlich statistischer Fragestellungen.

Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn D. Reese und seinen Mitarbeitern der feinmechanischen Werkstatt für die Anfertigung meiner speziellen Wünsche bedanken.

Frau Martina Heidler und Anna Huguet Ninou danke ich für die Unterstützung bei den umfangreichen Freisetzungsexperimenten.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Arbeitsgruppe, besonders Frau Elfi Sommer, Frau Dr. Annett Schröter, Frau Josefin Müller und Frau Alexandra Reuhl für den hilfreichen fachlichen Austausch und dafür, dass sie mir in schwierigen Phasen stets Mut gemacht haben und wir auch nach langen Labortagen eine tolle gemeinsame Zeit hatten. Ihr habt meine Dissertationszeit unvergesslich gemacht. Desweiteren danke ich Frau Josefin Müller für die gründliche Durchsicht des angefertigten Manuskriptes.

Eine herausragende Stellung in jeglicher Hinsicht nimmt meine Familie ein. Ich danke meinen Eltern für die beständige Unterstützung, für ihr immerwährendes Vertrauen und ihre Motivation. Ohne euch wäre diese Arbeit niemals möglich gewesen.

10 PUBLIKATIONSLISTE

Patent

Naumann, S.; Microemulsion formulation for treating onychomycosis; *vorläufige US Patentanmeldung*; eingereicht am: 11. September 2012; Anmeldenummer: 61/699 468.

Fachzeitschriftenbeiträge mit Gutachtersystem

S. Naumann, S. Lange, G. Polak, V. Kalhoelfer, L. Motlagh, A. Goebel, J. Wohlrab, R. Neubert: Penetration Studies of an Extremely Lipophilic Active Model Substance from an Oil-in-Water Emulsion: Influence of the Lipophilicity of the Formulation in Human Skin - Part 2; *Skin Pharmacology and Physiology*. 27 (2013): 97-105.

Naumann, S., Meyer, J. P., Kiesow, A., Mrestani, Y., Wohlrab, J., Neubert, R.: Controlled nail delivery of a novel lipophilic antifungal agent using various modern drug carrier systems as well as in vitro and ex vivo model systems. *Journal of Controlled Release*. 180 (2014): 60-70.

Wohlrab, J., Neubert, R.H.H., Michael, J. and Naumann, S.: Methotrexat für die topische Applikation in magistraler Rezeptur. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 13:891-902 (2015).

Tagungsbeiträge

S. Naumann, Y. Mrestani, R.H.H. Neubert:
Development and characterization of microemulsions for cutaneous delivery of extremely hydrophilic drugs.
DPhG Jahrestagung; Braunschweig, Germany; 2010 (Poster)

S. Naumann, J. Wohlrab, R.H.H. Neubert:
A new colloidal vehicle system for topical delivery of Methotrexate.
Skin Forum 12th Annual Meeting; Frankfurt, Germany; 2011 (Poster)

S. Naumann, J. Wohlrab, R.H.H. Neubert:
Penetration and stability studies of microemulsions incorporating Methotrexate.
Gordon Research Conference - Barrier Function of Mammalian Skin; Waterville Valley, USA; 2011 (Poster)

S. Naumann, J. Wohlrab, R.H.H. Neubert:
Influence of vehicles and enhancers on liberation behavior and drug delivery of Methotrexate;
International conference and workshop on biological barriers; Saarbrücken, Germany; 2012 (Poster)

S. Naumann, J. Wohlrab, R.H.H. Neubert:
The influence of vehicles on the diffusion behavior of antimycotic drugs using FTIR-ATR;
13th International Conference on Perspectives in Percutaneous Penetration; La Grande Motte, France; 2012 (Vortrag & Poster)

S. Naumann, S. Lange, G. Polak, V. Kalhoelfer, L. Motlagh, A. Goebel, J. Wohlrab, R. Neubert:
Influence of the lipophilicity of the vehicle on the penetration behavior of an extremely lipophilic active model substance; *14th International Conference on Perspectives in Percutaneous Penetration; La Grande Motte, France; 2014* (Poster)

11 LEBENSLAUF

Persönliche Angaben

Name: Sandy Naumann
 Geburtsdatum, -ort: 23. Januar 1986 in Dresden
 Staatsangehörigkeit: Deutsch
 Familienstand: ledig
 Kinder: Magdalena Naumann, geb. 02.01.2013

Schulbildung

06/2004: Allgemeine Hochschulreife
 1996 - 2004: Gymnasium Dresden-Cotta
 1992 - 1996: 37. Grundschule Dresden

akademische Ausbildung

12/2009: Erteilung der Approbation als Apothekerin
 11/2009: 3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
 10/2008: 2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
 08/2006: 1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
 10/2004 - 09/2008: Studium der Pharmazie an der Martin-Luther-Universität
 in Halle-Wittenberg

Berufserfahrung

Seit 10/2014: **Apotheke im World Trade Center, Dresden**
 Filialleiterin

07/2014 - 09/2014: **Benno-Apotheke, Dresden**
 Apothekerin

04/2010 - 06/2014: **Arbeitsgruppe Biopharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**
 wissenschaftliche Mitarbeiterin

11/2009 - 03/2010: **Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie,
 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**
 wissenschaftliche Mitarbeiterin

05/2009 - 10/2009: **Bayer Bitterfeld GmbH, Bitterfeld-Wolfen**
 Pharmaziepraktikantin in der Abteilung Prozesstechnologie

11/2008 - 04/2009: **Apotheke am Händelhaus, Halle (Saale)**
 Pharmaziepraktikantin

12 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich gemäß §5 Absatz 2b der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät I (Biowissenschaften) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, dass ich die vorgelegte Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Weiterhin habe ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Die Dissertationsschrift habe ich an keiner anderen Universität oder Hochschule vorgelegt und mich zu keinem früheren Zeitpunkt um den Doktorgrad beworben.

Sandy Naumann
Dresden, 01.02.2016