

***Herstellung und Prüfung von Lyophilisaten auf
hydrophoben Trägerfolien:
Haftfestigkeit und Bioverfügbarkeit***



Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

ANJA WEICHSELBAUM

aus Otterndorf / Cuxhaven

BONN 2002

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. Richard Süverkrüp
Pharmazeutische Technologie, Universität Bonn
2. Referent: Prof. Dr. Michael Diestelhorst
Augenklinik der Universität zu Köln

Tag der Promotion: 6. Mai 2002

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von
Herrn Professor Dr. Richard Süverkrüp

am Pharmazeutischen Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
angefertigt.

Meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Richard Süverkrüp, danke ich ganz herzlich für seine anregende und wohlwollende Betreuung während der ganzen Zeit und die stete Förderung dieser Arbeit. Unermüdlich sprudelte die Quelle innovativer Ideen, vieler Ratschläge und guter Denkanstöße. Die Arbeit an diesem interessanten und vielseitigen Thema eröffnete mir viele neue Möglichkeiten und die gemeinsamen Kongresse werden in stetiger Erinnerung bleiben.

Herrn Professor Dr. Michael Diestelhorst gilt mein Dank für die Übernahme des Koreferates sowie für die erfolgreiche und gute Zusammenarbeit nicht nur bei der Durchführung der klinischen Studien. Seine großartige Unterstützung war sehr wertvoll für die Durchführung und den Fortgang dieser Arbeit.

Herzlichen Dank außerdem an die Firmen Colorcon, Kent (GB) und Plastic Omnium GmbH, Karben (D) für die großzügige Versorgung an Probematerialien.

Vorabveröffentlichungen aus der vorliegenden Arbeit

- [1] Weichselbaum A, Grunthal S, Dücker KA, Diestelhorst M, Süverkrüp R:
DRY DROPS: Herstellung und Prüfung eines neuen Applikationssystems für die
Augenheilkunde
Jahrestagung der DPhG, Tübingen 6.-8.11.1998
Arch Pharm Pharm Med Chem, Nov. 1998, Vol.331 [Suppl.2], 59 (3.39)

- [2] Süverkrüp R, Weichselbaum A, Diestelhorst M:
Pilocarpine Dry Drops: Miotic Effect and Discomfort upon Administration
compared to Conventional Eyedrops
ARVO, Fort Lauderdale 9.-14. Mai 1999
Invest Ophthalmol Vis Sci (1999) 40:S85, 454 [Abstract]

- [3] Weichselbaum A, Diestelhorst M, Süverkrüp R:
DRY DROPS - In-Vivo-Prüfung eines neuen Applikationssystems für die
Augenheilkunde
Köln, 29.-30. Mai 1999
*Sitzungsbericht der 161. Versammlung des Vereins Rheinisch-Westfälischer
Augenärzte 1999*, S.109-112 (XXV)

- [4] Weichselbaum A, Dinslage S, Diestelhorst M, Süverkrüp R:
Pupillary Reactions after Administration of Pilocarpine and Tropicamide in a new
Lyophilized Dosage Form
*3rd international Symposium on Ocular Pharmacology and Pharmaceutics -
ISOPP 2000*, Lissabon, 10.-13. Februar, S.57 [Abstract]

- [5] Weichselbaum A, Diestelhorst M, Süverkrüp R:
A new Drug Delivery System for Eye Treatment and Diagnostics: Testing in
Humans with Pilocarpine and Tropicamide in Comparison with Conventional
Eyedrops
3rd World Meeting on APV/APVG, 3.-6. Juni Berlin 2000, S.809-810

- [6] Weichselbaum A, Dinslage S, Süverkrüp R, Diestelhorst M:
Tropicamide Lyophilized Eyedrop - Time Course of Mydriatic Effect and
Tolerability compared to Conventional Eyedrops
ARVO, Fort Lauderdale 30. April - 5. Mai 2000
Invest Ophthalmol Vis Sci (2000) 41:S767, 4067 [Abstract]

- [7] Dinslage S, Weichselbaum A, Süverkrüp R, Diestelhorst M:
Fluorescein Lyophilisate - Pharmacokinetics of Fluorescein in the Human
Anterior Segment. A Fluorophotometric Study
ARVO, Fort Lauderdale 30. April - 5. Mai 2000
Invest Ophthalmol Vis Sci (2000) 41:S766, 4063 [Abstract]

Für meine Eltern

**Eine Idee muß Wirklichkeit werden können -
oder sie ist eine eitle Seifenblase.**

(Auerbach, dt. Schriftsteller)

INHALTSVERZEICHNIS

A. PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG	1
B. THEORETISCHER TEIL	6
1. Anatomie des Auges	6
1.1. Allgemeiner Aufbau	6
1.2. Externe Augengewebe (Adnexen)	7
1.2.1. <i>Augenlider (Palpebrae)</i>	7
1.2.2. <i>Bindehaut (Conjunctiva)</i>	8
1.3. Tränenflüssigkeit	9
1.3.1. <i>Physiologie</i>	9
1.3.2. <i>Zusammensetzung</i>	10
1.3.3. <i>Abfluß</i>	12
1.4. Vorderer Augenabschnitt	13
1.4.1. <i>Vorderkammer (Camera oculi anterior)</i>	13
1.4.1.1. <i>Hornhaut (Cornea)</i>	13
1.4.1.2. <i>Trabekelmaschenwerk (Trabeculum corneosclerale)</i> <i>und Schlemmscher Kanal</i>	16
1.4.2. <i>Hintere Augenkammer (Camera oculi posterior)</i>	17
1.4.2.1. <i>Regenbogenhaut (Iris) und Pupille (Pupillae)</i>	17
1.4.2.2. <i>Ziliarkörper (Corpus ciliare)</i>	18
1.4.2.3. <i>Kammerwasser (Humor aquaeus)</i>	18
1.5. Hinterer Augenabschnitt	19
1.5.1. <i>Linse (Lens)</i>	19
1.5.2. <i>Lederhaut (Sclera)</i>	20
1.5.3. <i>Glaskörper (Corpus vitreum)</i>	21
1.6. Aspekte bei der Entwicklung von Applikationssystemen für das Auge	21
1.7. Zusammenfassung	23

2. Applikationsformen für das Auge - Übersicht	25
2.1. Grundlagen	25
2.2. Arzneistoffeigenschaften	26
2.3. Physiologie des Tränenfilms und Kontaktzeit an der Cornea	28
2.4. Resorptionsbarrieren	29
2.5. Systeme zur kontrollierten Freisetzung von Arzneistoffen am Auge	30
2.6. Zubereitungen zur Anwendung am Auge	32
2.6.1. <i>Lösungen zur Anwendung am Auge</i>	32
2.6.1.1. pH-Wert und Pufferkapazität	32
2.6.1.2. Tonizität	33
2.6.1.3. Viskosität	34
2.6.1.4. Konservierungsmittel	36
2.6.1.5. Resorptionspromotoren	37
2.6.1.6. Tenside	38
2.6.1.7. Antioxidantien	38
2.6.1.8. Bioadhäsive Zusätze	38
2.6.1.9. Weitere Zusätze	39
2.6.1.10. Tropfengröße	40
2.6.1.11. Applikationshilfen	41
2.6.1.12. Pulver zur Herstellung von Lösungen	44
2.6.2. <i>Suspensionaugentropfen</i>	44
2.6.3. <i>Augensalben</i>	46
2.6.4. <i>Emulsionen</i>	47
2.6.5. <i>Gele</i>	48
2.6.5.1. Piloplex® Gel	49
2.6.5.2. Pilopine® HS Gel	49
2.6.5.3. In-Situ gelbildende Systeme	49
2.6.5.3.1. Ionenaktivierte Gelbildung	50
2.6.5.3.2. pH-aktivierte Gelbildung	50
2.6.5.3.3. Temperaturempfindliche Gele	51
2.6.6. <i>Sprays</i>	52
2.6.7. <i>Imprägnierte Papierstreifen</i>	53
2.6.8. <i>Augeninserte</i>	53
2.6.8.1. Nicht abbaubare Systeme	54
2.6.8.1.1. Weiche Kontaktlinsen	54
2.6.8.1.2. Darreichungsformen mit membrankontrollierter Freisetzung	56
2.6.8.1.3. Darreichungsformen mit matrixgesteuerter Freisetzung	57
2.6.8.2. Abbaubare Systeme	59
2.6.8.2.1. Kollagenmembranen	60
2.6.8.2.2. Lyophilisate	62
2.6.8.2.3. Sonstige	62
2.6.9. <i>Kolloide Polymerpartikel</i>	65
2.6.9.1. Nanopartikel und Mikropartikel	66
2.6.9.2. Liposomen	67

3. Ophthalmische Lyophilisate zur topischen Anwendung am Auge	69
3.1. Einleitung	69
3.2. Aufbau der Arzneiform	70
3.3. Applikation einer Einzeldosis	71
3.4. Vorteile gegenüber konventionellen Augentropfen	71
3.5. Augentropfen und Lyophilisate - ein Vergleich - tabellarische Übersicht	76
4. Gefriertrocknung	78
4.1. Vakuum-Gefriertrocknung	78
4.2. Einfrierprozeß	80
4.2.1. Zweck und Bedeutung	80
4.2.2. Eisbildung in reinem Wasser	81
4.2.3. Einfriergeschwindigkeit	82
4.2.4. Charakterisierung des Einfriervorgangs	83
4.3. Haupttrocknung	84
4.3.1. Mechanismen des Wärmetransportes	85
4.3.2. Überwachung der Prozeßführung - ein Überblick	86
4.3.3. Mathematische Betrachtung	86
4.4. Nachtrocknung	89
4.5. Nachbehandlung	89
4.6. Zusammenfassung	90

C. EXPERIMENTELLER TEIL	91
5. Untersuchung ausgewählter konventioneller Augentropfen	91
5.1. Materialien	91
5.2. Geräte und Methoden	92
5.2.1. <i>pH-Wert</i>	92
5.2.2. <i>Tonizität</i>	92
5.2.3. <i>Oberflächenspannung</i>	93
5.2.4. <i>Tropfenmasse</i>	94
5.2.5. <i>Tropfenmasse und Dosiergenauigkeit handelsüblicher Pilocarpin-Augentropfen (Pilomann[®] 1 %) in Mehrdosenbehältern</i>	94
5.2.6. <i>Vergleich verschiedener Pilocarpin-Handelspräparate</i>	95
5.2.7. <i>Tropfenmasse und Dosiergenauigkeit handelsüblicher Tropicamid-Augentropfen (Mydriatikum Stulln[®] UD) in Einzeldosenbehältern</i>	95
5.3. Ergebnisse	96
5.3.1. <i>Charakterisierung der Augentropfen</i>	96
5.3.2. <i>Tropfenmasse und Dosiergenauigkeit handelsüblicher Pilocarpin-Augentropfen (Pilomann[®] 1 %) in Mehrdosenbehältern</i>	97
5.3.3. <i>Vergleich verschiedener Pilocarpin-Handelspräparate</i>	100
5.3.4. <i>Tropfenmasse und Dosiergenauigkeit handelsüblicher Tropicamid-Augentropfen (Mydriatikum Stulln[®] UD) in Einzeldosenbehältern</i>	104
5.4. Zusammenfassung	105

6. Ophthalmische Trägerlyophilisate: Ausgangsstoffe und Herstellung - Untersuchungsmethoden	107
6.1. Bestandteile des Applikationssystems	107
6.1.1. Wirkstoffe	108
6.1.2. Hydrophiles Polymer	108
6.1.3. Hydrophobe Trägerfolie	109
6.2. Herstellung und Charakterisierung der Polymerlösungen	111
6.2.1. Herstellung der Polymerlösungen	111
6.2.2. Charakterisierung der Polymerlösungen	113
6.2.2.1. Absolute Dichte	113
6.2.2.2. Brechungsindex	113
6.2.2.3. Rheologie	113
6.2.2.4. Eutektischer Punkt	115
6.3. Charakterisierung der Trägerfolien	117
6.3.1. Sensorische Prüfung	117
6.3.2. Foliendicke	117
6.3.3. Dampfsterilisation	117
6.3.4. Rasterelektronenmikroskopische Charakterisierung	118
6.3.5. Veränderung der Oberflächenbeschaffenheit durch Prägung	118
6.4. Herstellung der Lyophilisate	120
6.4.1. Dosierung der Polymerlösungen	125
6.4.2. Einfriergeschwindigkeit	126
6.4.3. Trocknungsgeschwindigkeit	127
6.4.4. Mikrobiologische Untersuchungen	129
6.5. Charakterisierung der Lyophilisate	133
6.5.1. Rasterelektronenmikroskopische Charakterisierung	133
6.5.2. Entwicklung eines Tests zur Bestimmung des Abstreifverhaltens von Lyophilisaten von ihrem Träger	133
6.5.3. Beurteilung verschiedener Lyophilisate anhand ihres Haft- und Rehydratationsvermögens und ihrer Verträglichkeit am Auge	136
6.5.3.1. Rehydratationsgeschwindigkeit	136
6.5.3.2. Subjektive Haftfähigkeit auf der Folie	137
6.5.3.3. Strukturstabilität	137
6.5.3.4. Verträglichkeit am Auge	137
6.5.4. Entwicklung eines Modells für die Simulation der Applikation von Lyophilisaten am Auge	137
6.5.5. Analytik	141

7. Ophthalmische Trägerlyophilisate: Ausgangsstoffe und Herstellung - Ergebnisse und Auswertung	142
7.1. HPMC-Lösungen	142
7.1.1. <i>Dichte und Brechungsindex</i>	142
7.1.2. <i>Rheologie</i>	143
7.1.2.1. <i>Einfluß der Temperatur und der Autoklavierung auf die Viskosität von HPMC-Lösungen</i>	143
7.1.2.2. <i>Einfluß von Pilocarpinhydrochlorid und der Lagerung auf die Viskosität von HPMC-Lösungen</i>	149
7.1.3. <i>Einfluß von Pilocarpinhydrochlorid und HPMC auf das Einfrier- und Auftauverhalten</i>	153
7.2. Trägerfolien	157
7.2.1. <i>Eigenschaften der PTFE-Folien</i>	157
7.2.2. <i>Oberflächenbeschaffenheit von PTFE-Folien</i>	160
7.2.3. <i>Veränderung der Oberflächenbeschaffenheit durch Prägung</i>	162
7.3. Herstellprozeß	165
7.3.1. <i>Dosiergenauigkeit der Polymerlösungen</i>	165
7.3.2. <i>Einfriergeschwindigkeit</i>	168
7.3.3. <i>Trocknungsgeschwindigkeit der Lyophilisate</i>	179
7.3.4. <i>Mikrobiologische Untersuchungen</i>	184
7.4. Lyophilisate	185
7.4.1. <i>Mikroskopische Charakterisierung der Lyophilisate</i>	185
7.4.2. <i>Abstreifverhalten der Lyophilisate</i>	192
7.4.2.1. <i>Einfluß der Lagerzeit und des Zusatzes von Pilocarpinhydrochlorid und Tropicamid</i>	192
7.4.2.2. <i>Einfluß der Einfriertemperatur</i>	193
7.4.2.3. <i>Einfluß des Autoklavierens der PTFE-Folie</i>	194
7.4.2.4. <i>Einfluß der Oberflächenstruktur der Folie</i>	196
7.4.2.5. <i>Beurteilung der Methode</i>	198
7.4.3. <i>Haft- und Rehydratationsvermögen wirkstoffhaltiger Lyophilisate und deren Verträglichkeit am Auge</i>	201
7.4.3.1. <i>Stabilität, Haft- und Rehydratationsvermögen</i>	201
7.4.3.2. <i>Verträglichkeit am Auge</i>	204
7.4.4. <i>Entwicklung eines Modells für die Simulation der Applikation von Lyophilisaten am Auge</i>	206
7.4.4.1. <i>Quantitative Ablösung von Pilocarpinhydrochlorid von unbehandelten PTFE-Trägern</i>	207
7.4.4.2. <i>Quantitative Ablösung von Pilocarpinhydrochlorid von geprägten PTFE-Trägern</i>	209
7.4.4.3. <i>Quantitative Ablösung von Fluorescein-Natrium von unbehandelten PTFE-Trägern</i>	211
7.4.4.4. <i>Beurteilung der Methode</i>	211

8. Klinische Studien	213
8.1. Klinische Prüfung von Arzneimitteln	213
8.1.1. <i>Aufbau und Durchführung von klinischen Studien</i>	213
8.1.2. <i>Inhalt eines Prüfplans</i>	214
8.1.3. <i>Dokumentationsbogen</i>	217
8.2. Physikochemische und pharmakologische Eigenschaften der verwendeten Arzneistoffe	219
8.2.1. <i>Pilocarpinhydrochlorid</i>	219
8.2.1.1. Allgemeine Grundlagen	219
8.2.1.2. Pilocarpin und seine Wirkungen	221
8.2.1.3. Nebenwirkungen von Pilocarpin am Auge und Kontraindikationen	226
8.2.1.4. Pilocarpin und seine Bioverfügbarkeit	227
8.2.1.5. Einfluß des pH-Wertes auf Stabilität, Wirksamkeit und Verträglichkeit	228
8.2.2. <i>Tropicamid</i>	231
8.2.2.1. Allgemeine Grundlagen	231
8.2.2.2. Tropicamid und seine Wirkungen	232
8.2.2.3. Nebenwirkungen von Tropicamid am Auge und Kontraindikationen	233
8.2.2.4. Tropicamid und seine Bioverfügbarkeit	234
8.2.3. <i>Fluorescein-Natrium</i>	235
8.2.3.1. Allgemeine Grundlagen	235
8.2.3.2. Fluorescein und seine Wirkungen	236
8.2.3.3. Nebenwirkungen von Fluorescein am Auge und Kontraindikationen	237
8.2.3.4. Fluorescein und seine Bioverfügbarkeit	238
8.2.3.5. Stabilität von Fluorescein-Zubereitungen	238
8.3. Meßverfahren für Ophthalmologische Untersuchungen	240
8.3.1. <i>Spaltlampe</i>	240
8.3.1.1. Spaltlampenuntersuchung	240
8.3.1.2. Gerätebeschreibung	240
8.3.2. <i>Refraktometrie</i>	240
8.3.2.1. Refraktion	240
8.3.2.2. Gerätebeschreibung	241
8.3.3. <i>Pupillometrie</i>	242
8.3.3.1. Allgemeines	242
8.3.3.2. Pupillographie	244
8.3.3.3. Begriffserklärung	245
8.3.3.4. Gerätebeschreibung	246
8.3.4. <i>Fluorophotometrie</i>	252
8.3.4.1. Allgemeines	252
8.3.4.2. Gerätebeschreibung	252

8.4. Untersuchung der Arzneistofffreisetzung von Lyophilisaten an gesunden Probanden im Vergleich zu konventionellen Augentropfen - Methoden	256
8.4.1. <i>Verträglichkeit und Verlauf pharmakologischer Effekte von Pilocarpinhydrochlorid</i>	256
8.4.2. <i>Verträglichkeit und Verlauf pharmakologischer Effekte von Tropicamid</i>	269
8.4.3. <i>Pilotstudie zur Pharmakokinetik von Fluorescein-Natrium</i>	276
8.5. Untersuchung der Arzneistofffreisetzung von Lyophilisaten an gesunden Probanden im Vergleich zu konventionellen Augentropfen - Ergebnisse und Auswertung	279
8.5.1. <i>Verträglichkeit und Verlauf der Miosis nach Applikation von Pilocarpinhydrochlorid</i>	279
8.5.2. <i>Verträglichkeit und Verlauf der Mydriasis nach Applikation von Tropicamid</i>	296
8.5.3. <i>Pilotstudie zur Pharmakokinetik von Fluorescein-Natrium</i>	312
D. ZUSAMMENFASSUNG	316
E. ANHANG	325
A. <i>Anwendung von Lyophilisaten</i>	325
B. <i>Informationsbogen und Einverständniserklärung der Pilocarpin-Studie</i>	331
C. <i>Auswertung der Visual-Analog-Skalen der Pilocarpin-Studie mit dem Wilcoxon-Rangsummentest</i>	334
D. <i>Verlauf der Miosis (relative Amplitudenwerte) bei der Pilocarpin-Studie</i>	342
E. <i>Informationsbogen und Einverständniserklärung der Tropicamid-Studie</i>	345
F. <i>Auswertung der Visual-Analog-Skalen der Tropicamid-Studien mit dem Wilcoxon-Rangsummentest</i>	348
G. <i>Verlauf der Mydriasis (relative Amplitudenwerte) bei der Tropicamid-Studie - Teil 1 -</i>	361
H. <i>Verlauf der Mydriasis (relative Amplitudenwerte) bei der Tropicamid-Studie - Teil 2 -</i>	363
I. <i>Programm zur Messung und Speicherung von Wägedaten in variablen Zeitabständen (Autor: S. Göbel, Meckenheim)</i>	365
F. SYMBOLE UND ABKÜRZUNGEN	368
G. LITERATURVERZEICHNIS	371

A. PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Einleitung

Arzneiformen wie Augensalben, -tropfen und -wässer werden bereits seit Jahrhunderten verwendet und wurden zum ersten Mal nachweislich im 'Code des Hammurabi' erwähnt, einer Sammlung von Zivilgesetzen, die von Hammurabi, dem 6. König der ersten babylonischen Dynastie, 2250 a.c. verbreitet wurde. Die medizinische Behandlung bestand größtenteils in der Gabe eines Mittels, das aus verschiedenen Inhaltsstoffen bestand. Der Wirkstoff wurde in Wasser, Wein, Milch oder Öl verabreicht - oder manchmal in Form von „*Tanner's verdigris (shoemaker's vitriol), copper dust, yellow sulphide of arsenic, mix in curd and apply to the man's sick eyes - (Nimm) Grünspan vom Gerber (Schustervitriol), Kupferpulver, gelbes Arsensulfid, mische es mit Quark zusammen und appliziere es am kranken Auge der Person*“ [Sharir, 1997].

Viele Gesichtspunkte hinsichtlich Qualität und Verträglichkeit konnten natürlich im Laufe der Zeit verbessert, optimiert oder eliminiert werden.

Aber trotz ihres heutzutage immer noch großen Anwendungsspektrums bei der Behandlung von Augenerkrankungen, handelt es sich bei Augentropfen im Grunde genommen um eine verhältnismäßig unzureichende Darreichungsform, deren vielfältiger Einsatz heutzutage letztendlich nur durch einen Mangel an Alternativen gerechtfertigt werden kann.

Verschiedene Anstrengungen wurden in den letzten Jahren unternommen, um diesem Punkt Abhilfe zu schaffen. Allerdings konnten sich Innovationen auf diesem Gebiet nicht oder meist nur in begrenzter Form aus den unterschiedlichsten Gründen durchsetzen.

Bei der Anwendung konventioneller Augentropfen tauchen eine ganze Reihe an Problemen auf:

- Die korrekte Dosierung eines einzigen Tropfens ist außerordentlich schwierig. Selbst geübten Anwendern gelingt eine präzise Dosierung selten.
- Die für eine korrekte Applikation notwendige Reklination des Kopfes fällt besonders älteren Patienten schwer.
- Durch den Tropfer kann bei falscher Anwendungsmethodik die Hornhautoberfläche mechanisch gereizt oder sogar beschädigt werden.

- Der Einsatz von Konservierungsmitteln ist für Augentropfen in Mehrdosenbehältnissen obligatorisch. Dadurch treten gehäuft Sensibilisierungserscheinungen und irreversible Schädigungen der Cornea auf.
- Der eingestellte pH-Wert ist meist lediglich ein Kompromiß zwischen der Arzneistoffstabilität im wäßrigen Milieu und der physiologischen Verträglichkeit am Auge. Irritationen und Reizungen am Auge durch unphysiologische pH-Werte sind die Konsequenz.
- Systemische Nebenwirkungen entstehen durch die Resorption von Arzneistoffen aus dem Tränennasenkanal. Der Wirkstoff kommt am Applikationsort nicht vollständig zur Anwendung und der Überschuß wird über die Kanäle abgeleitet.
- Auftretende Nebenwirkungen und Schmerzen bei der Applikation reduzieren erheblich die Patientencompliance, so daß das erfolgreiche Therapieziel in Frage gestellt werden muß.

Auf der Suche nach einer alternativen Arzneiform wurden ophthalmische Lyophilisate auf Trägern entwickelt.

Dabei ist die für eine einmalige Applikation erforderliche Dosis des Arzneistoffes in einem gefriergetrockneten (lyophilisierten) und damit porösen Tropfen eines wasserlöslichen Polymers dispergiert, der auf einem flexiblen hydrophoben Träger einerseits so fest haftet, daß eine Handhabung erfolgen kann, ohne daß er sich dabei ablöst, andererseits aber bei der Applikation am Auge leicht am Rand des etwas heruntergezogenen Unterlids abgestreift werden kann. Das Lyophilisat wird von der Tränenflüssigkeit rehydratisiert und es entsteht ein Gel, welches zur Anwendung am Auge gelangt.

Dieses neue System zeigt gegenüber den konventionellen Augentropfen einige Verbesserungen:

- Die Art der Applikation ist einfach und bequem. Ein Zurücklegen des Kopfes ist nicht erforderlich.
- Die Einzeldosierung sichert die präzise Gabe der erforderlichen Arzneistoffmenge.
- Konservierungsmittel sind nicht notwendig, da einerseits der Wassergehalt sehr niedrig ist, andererseits es sich um Einzeldosen handelt.

- Hilfsstoffzusätze zur Einstellung von pH-Wert und Tonizität sind nicht erforderlich, weil die Tränenflüssigkeit als Lösungsmittel dient.
- Das Risiko von Verletzungen wird gesenkt, da keine harten oder scharfen Hilfsmittel bei der Applikation eingesetzt werden.
- Das Auftreten systemischer Nebenwirkungen kann reduziert werden, da Überdosierungen auszuschließen sind.
- Lokale Reizungen durch entstandene hypertone Lösungen sind, wenn sie vorkommen, nur von kurzer Dauer und können durch Polymer und Wirkstoffkonzentration beeinflusst werden.

Die Bioverfügbarkeit der ophthalmischen Lyophilisate wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Sie hängt u.a. ab von der

- Vollständigkeit der Ablösung des Lyophilisats von dem Träger
- Rehydratationsgeschwindigkeit durch die Tränenflüssigkeit
- Quantität des entstehenden Gels, welches an der Bindehaut haftet
- Diffusionsgeschwindigkeit des Arzneistoffes durch die Cornea
- Menge an Arzneistoff, die über den Tränennasenkanal abgeführt wird

Die aseptische Herstellungstechnik im Labormaßstab wurde durch Grunthal [1996] entwickelt, die auch in einer ersten klinischen Untersuchung unter Leitung von Diestelhorst an gesunden Probanden nachwies, daß das Auge durch wirkstofffreie Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC)-Lyophilisate weniger gereizt wird, als durch eine vergleichbare wäßrige Polymerlösung, die zur Behandlung des 'Dry Eye'-Syndroms im Handel ist und gegen mikrobielle Kontamination konserviert werden muß [Süverkrüp, 1997; Diestelhorst, 1999]. Auf dieser experimentellen Basis wurde ein deutsches Patent beantragt und erteilt [Süverkrüp, 1998]. Mittlerweile ist ebenfalls ein Patent auf 'Lyophilisate auf hydrophoben Trägern' für die USA erteilt worden [Süverkrüp, 2001].

Ziel dieser Dissertation ist die Weiterführung der von Grunthal [1996] begonnenen Arbeiten.

- Die Dosiermethode der Polymerlösungen wurde verändert, um eine personenunabhängigere Herstellung zu erhalten. Das Herstellverfahren wurde genauer charakterisiert, um anhand dieser Erkenntnisse den Vorgang verbessern zu können. Die Einfriergeschwindigkeiten in verschiedenen Systemen (Gefrierschrank -30 °C, Trockeneis -79 °C, Flüssigstickstoff -196 °C) und Trocknungszeiten in unterschiedlichen Gefriertrocknern (Leybold Heraeus GT 2, Christ alpha 2-4) wurden untersucht. Der Herstellprozeß wurde modifiziert, die Zeiten optimiert. Die Chargengröße konnte erhöht werden. Zusätzlich wurden weitere Polymerlösungen (HPMC, PVP, HEC, HEMC, Natriumhyaluronat) und PTFE-Träger unterschiedlicher Fabrikate auf ihre Eignung zur Herstellung von Lyophilisaten untersucht.
- Ein Testsystem wurde entwickelt, um eine Aussage über die Haftung von Lyophilisaten auf ihrem Träger treffen zu können und inwieweit diese Abreißfestigkeit durch Herstellparameter und Produkteinsatz beeinflusst werden können. Die Wirkung der Lyophilisatzusammensetzung, Einfriertemperatur, Oberflächenbeschaffenheit des Trägers und Lagerzeit auf die Hafteigenschaften des Xerogels wurde anhand dieses Verfahrens untersucht.
- Ein zweites Testsystem wurde entwickelt, um die Applikation an einem Auge mit Tränenflüssigkeit zu simulieren. Als Augenersatz diente hierbei eine zuvor in Wasser gequollene Gelatine-Halbkuugel. Die Ablösung des Lyophilisats von seinem Träger wurde photometrisch quantitativ beurteilt.
- Für ausgewählte Modellarzneistoffe (Pilocarpinhydrochlorid, Tropicamid, Fluorescein-Natrium) wurden in kontrollierten klinischen Studien therapeutisch relevante Kenngrößen des neuen Systems mit den konventionellen Referenzpräparaten verglichen. Bei allen Arzneistoffen handelte es sich um in der Ophthalmologie eingesetzte Medikamente. Die Wirkung konnte in allen Fällen durch nicht invasive Verfahren (Pupillometrie, Fluorophotometrie verfolgt werden.
- Die ursprüngliche Zusammensetzung der Lyophilisate mit HPMC E4M erwies sich für tropicamid- und pilocarpinhaltige Zubereitungen als ungeeignet. Die Rezeptur wurde überarbeitet. Alternativen boten die Verwendung niedrig-

viskoser HPMC-Typen und der Einsatz von Natriumhyaluronat in Kombination mit Mannitol. Ebenso mußte die PTFE-Qualität des Trägermaterials verändert werden, da das ursprünglich verwendete sich für die Anwendung wirkstoffhaltiger Xerogele am Auge ebenfalls als unzureichend erwies.

- Von konventionellen Pilocarpin- und Tropicamid Augentropfen inklusive der bei den Studien verwendeten Referenzpräparaten (Pilomann[®] 1 %, Pilocarpin ankerpharm 1 %, Isopto[®]-Pilocarpin 1 %, Mydriatikum Stulln[®] UD) wurden pH-Wert, Tonizität, Oberflächenspannung und Tropfenmasse bestimmt.

B. THEORETISCHER TEIL

1. Anatomie des Auges

1.1. Allgemeiner Aufbau

Im Auge werden Objekte mit Hilfe eines optischen Systems auf der Netzhaut abgebildet, an der die physikalischen Reize in elektrische Erregungen umgewandelt und in das Gehirn weitergeleitet werden.

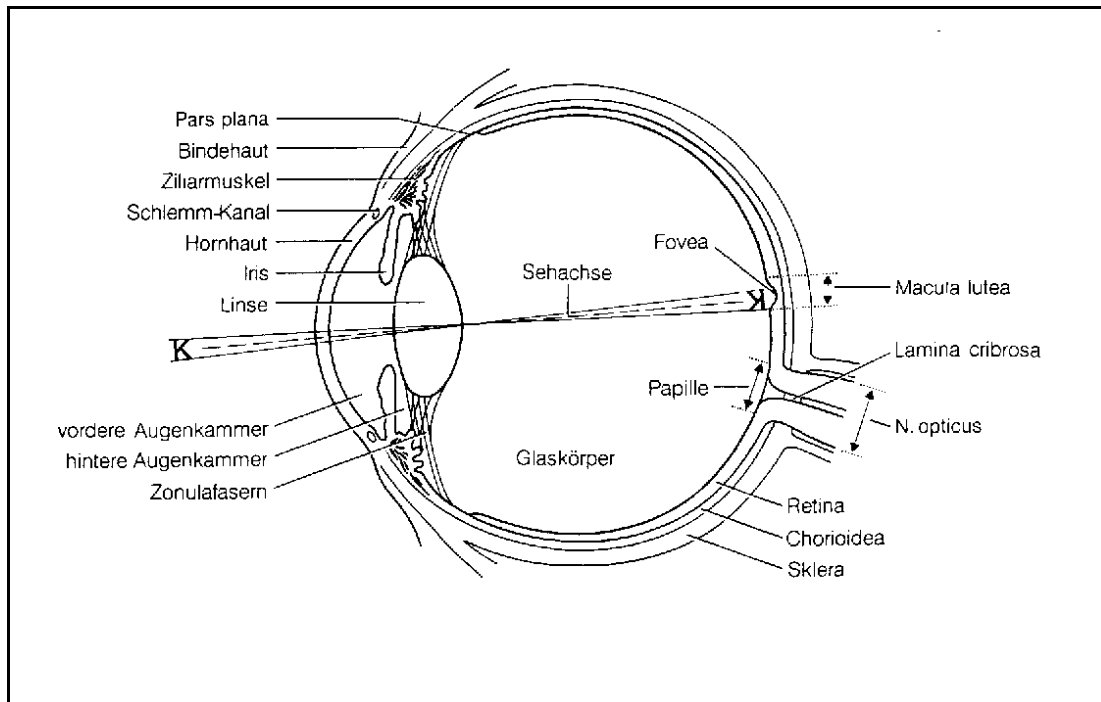


Abb.1.1: Waagerechter schematischer Schnitt durch den rechten Augapfel, von oben gesehen [aus: Leydhecker, 1993]

Die Augäpfel (Bulbi oculi, pl.) liegen je in einer trichterförmigen Knochenhöhle (Orbita) im Schädel. Sie nehmen etwa 20 % dieser Höhlen ein und ruhen in einem weichen Fettpolster.

Störungen der Sehfunktion jeglicher Art haben weitreichende Konsequenzen, so daß eine schnelle Wiederherstellung wünschenswert ist, sei es durch die Behandlung mit Medikamenten oder sogar eine Operation.

Um effektive Applikationssysteme für das Auge entwickeln zu können, ist es notwendig, sich die relevanten anatomischen und physiologischen Zusammenhänge zu verdeutlichen, die die Arzneistoff- und Vehikel-Verfügung beeinflussen und modifizieren.

Im folgenden Kapitel werden die Anatomie und Physiologie des Auges kurz dargestellt, soweit sie für die Resorption von Arzneistoffen relevant sind.

1.2. Externe Augengewebe (Adnexen)

1.2.1. Augenlider (Palpebrae)

Der äußere Teil des Auges wird durch die Augenlider bedeckt. Sie gleiten in periodischen Abständen über die äußere Oberfläche des Auges und reagieren in einer ersten Abwehrreaktion mit einem reflektorischen Lidschluß auf äußere mechanische oder chemische Einflüsse.

Zusätzlich halten die Lider eine zu intensive Lichtstrahlung ab, verteilen die sezernierte Tränenflüssigkeit über die Hornhaut (Cornea) und verzögern die Verdunstung des Tränenfilms von der Augenoberfläche.

Das obere Lid ist beweglicher als das untere. Wenn die Lider geöffnet sind, bedecken sie bei der kaukasischen Bevölkerung trotzdem noch über 1 mm der Cornea, bei der orientalischen ist der Anteil sogar noch größer. Dies ist ein wichtiger Punkt für die Compliance von Augenpräparaten: da die Cornea ein nervenreiches Gewebe ist, kann die Bewegung einer Applikationsform über diesen Bereich durch einen bloßen Lidschlag für den Patienten recht unangenehm sein.

Das Öffnen und Schließen der Augenlider ist eine koordinierte Bewegung. Ein reiverschlussähnlicher Mechanismus transportiert die Tränen vorwärts in den Tränennasenkanal. Ein einzelner Lidschlag dauert durchschnittlich 290-750 ms [Records, 1989].

Der durchschnittliche Druck, der durch die Lider bei einem Lidschlag auf den Augapfel ausgeübt wird, beträgt etwa 10 mmHg. Ist jedoch ein Fremdkörper in das Auge gelangt, nimmt dieser Lidruck bei dem Versuch, den Fremdkörper aus dem Auge zu pressen, erheblich zu (bis 65 mmHg) [Miller, 1967].

Im Durchschnitt blinzelt der Mensch 15-20 mal pro Minute. Allerdings können diese Werte individuell und in Abhängigkeit von den äußeren Umstände weit variieren.

Die Lidkante ist etwa 2 mm dick. Aus ihrem vorderen Teil ragen die Wimpern (Ciliae) hervor. Sie halten Fremdkörper vom Auge fern, leiten den Schweiß um und vermeiden dadurch den direkten Kontakt mit der Augenoberfläche. Die Augenlider enthalten außerdem diverse sezernierende Drüsen. An den Rändern befinden sich winzige Ausführungsgänge von Schweiß- und Talgdrüsen. Die größte Talgdrüse ist in das

hintere Gewebe des Lids eingebettet und wird Meibom-Drüse (Glandula tarsalis) genannt. Sekrete aus diesen Drüsen unterstützen die Benetzung der Cornea, verzögern die Verdunstung der Tränenflüssigkeit und haben eine antimikrobielle Wirkung.

1.2.2. Bindehaut (Conjunctiva)

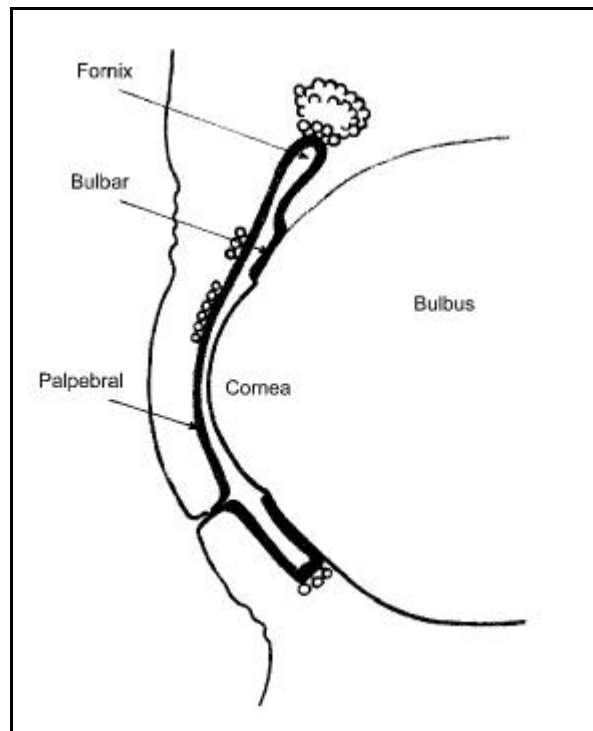
Die Bindehaut ist eine gefäßreiche, durchsichtige Schleimhaut, welche den vorderen Augenabschnitt mit Ausnahme der Cornea bedeckt. Sie ist etwa fünf Mal so groß wie die Cornea und bildet eine Hülle, in der der Augapfel an den Lidern nahezu reibungsfrei entlang gleiten kann.

Außerdem sind in der Conjunctiva mucinproduzierende Becherzellen lokalisiert, die für die Befeuchtung der Augenoberfläche und Stabilität des Tränenfilms wichtig sind [Holly, 1973].

Die Bindehaut besitzt außerdem die Aufgabe, Fremdkörper vom Auge fernzuhalten bzw. zu eliminieren.

Die Conjunctiva wird in drei Bereiche eingeteilt:

1. Palpebrale Conjunctiva
2. Fornix conjunctivae
3. Bulbäre Conjunctiva



*Abb.1.2:
Die Membranen der Conjunctiva
[aus: Mitra, 1993]*

Den Teil der Bindehaut, der auf dem Lid aufliegt, bezeichnet man als palpebral und den auf dem Augapfel liegenden als bulbär. Beide werden durch die Fornix conjunctivae verbunden.

Die bulbäre Conjunctiva ist dünn und transparent, so daß die darunterliegende Hornhaut weiß erscheint. Sie liegt locker auf dem unteren Gewebe und kann deshalb leicht bewegt werden. Aufgrund ihrer ungeschützten Lage treten degenerative Prozesse und Verletzungen verhältnismäßig häufig auf.

Die Versorgung der Conjunctiva erfolgt durch ein System von Kapillargefäßen.

Als ein Gewebe mit Schutzfunktion ist die Conjunctiva reichlich mit sensorischen Nervenenden ausgestattet, die eng mit denen des Augenlids, der Augenbrauen und Cornea verknüpft sind.

1.3. Tränenflüssigkeit

1.3.1. Physiologie

Der Tränenfilm ist ein hochspezialisierter feuchter Film, der sowohl bulbäre und palpebrale Conjunctiva als auch die Cornea bedeckt. Abnormalitäten des Tränenfilms können sich in einer Dysfunktion der Augenlider und der Bindehaut äußern und schlimmstenfalls sogar zu einer Trübung der Cornea führen.

Der Bindehautsack beinhaltet normalerweise 7-9 µl Tränenflüssigkeit, kann aber, wenn man nicht blinzelt, nahezu 20-30 µl aufnehmen.

Unter normalen Bedingungen beträgt die Tränenproduktionsrate 1 µl/min (d.h. annähernd 16 % des Tränenvolumens werden pro Minute ersetzt) [Maurice, 1967]. Zur Bestimmung der Dicke des Tränenfilms werden unterschiedliche Methoden beschrieben, deren Ergebnisse jedoch deutliche Unterschiede aufweisen. So wurde mit der Laserinterferenzmessung eine Dicke von 35 bis 40 µm bestimmt [Prydal, 1992]. Aus nichtoptischen Methoden resultierten Ergebnisse von 7-12 µm [Mishima, 1981; Frauch, 1990; Greaves, 1992]. Eine neue Veröffentlichung zeigte, daß der Film lediglich eine Dicke von 3 µm besitzt [King-Smith, 2000]. Die Bestimmung mit Hilfe von Reflektionsspektren erwies sich als sehr empfindliche Bestimmungsmethode, die damaligen Wissenschaftlern nicht zur Verfügung stand.

Der pH-Wert der Tränen liegt etwa zwischen 6,5 und 7,6. Mehrere Autoren stellen fest, daß die Pufferkapazität des Tränenfilms hoch sein müsse, weil der pH-Wert nach Applikation von sauren Augentropfen rasch wieder seinen Ausgangswert erreicht

[Robinson, 1993]. Vermutlich wird dies jedoch wohl eher durch eine vermehrte Tränenproduktion als durch die gut gepufferte Tränenflüssigkeit erreicht.

Die Tränenproduktionsrate hängt sehr von den äußeren Gegebenheiten ab, vor allem von Temperatur, relativer Luftfeuchtigkeit und Wind, aber auch das Alter und die physiologischen und psychologischen Faktoren spielen eine erhebliche Rolle.

Eine gleichmäßige Benetzung des äußeren Augengewebes wird durch den Lidschlag erreicht, der die sezernierten Tränen über die Cornea und Konjunktiva verteilt. Die Tränen aus den Lacrimaldrüsen fließen nicht quer über das Auge, sondern erst zu den Lidrändern und von dort aus zu den Abflußkanälen.

Der Lidschlag vermischt die neu produzierte mit der bereits vorhandenen Tränenflüssigkeit und verteilt sie über die Augenoberfläche. Zusätzlich ist er für die Weiterleitung der Tränen in den Tränennasenkanal verantwortlich.

Der Abfluß von Tränenflüssigkeit und applizierten Lösungen aus dem Auge ist ein sehr effizienter Vorgang. Nach etwa 90 s ist das Volumen einer etwa 25-50 µl eingetropften Lösung im Prinzip abgeflossen.

1.3.2. Zusammensetzung

Der Tränenfilm besteht aus drei Schichten, wobei jede Schicht ihren eigenen charakteristischen Aufbau hat.

Direkt auf der Oberfläche der Cornea befindet sich eine Mucinschicht. Darüber liegt eine wäßrige Phase, die den Hauptanteil der Tränenflüssigkeit ausmacht. Die äußerste und oberste Schicht bildet eine Lipidschicht.

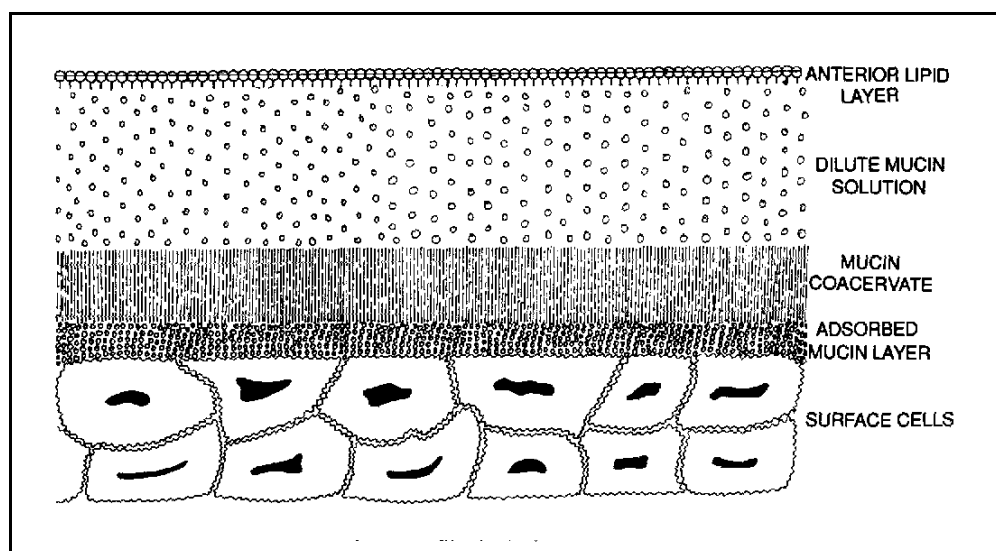


Abb.1.3: Struktureller Aufbau des Tränenfilms des menschlichen Auges
[aus: Robinson, 1993]

Die äußerste Schicht des Tränenfilms besteht vorwiegend aus einer Lipidfraktion sowie aus einem geringen Mucin- und Proteinanteil. Die enthaltenen Schleime und Proteine verzögern nicht die Verdunstung, obwohl sie oberflächenaktiv sein dürften. Allerdings sind die Lipide dazu in der Lage: sie reduzieren die Verdunstung über 10 % im Vergleich zu Flüssigkeiten ohne vergleichbare Oberflächenschicht.

Bei den Lipiden, die von den tarsalen Drüsen entlang der Augenränder sezerniert werden, handelt es sich um

- neutrale Öle (4 %)
- Phospholipide (16 %)
- Sterolester-Fraktionen (32 %)
- Wachsgemische (35 %)
- andere Lipide (13 %)

Produktionsraten für die Drüsen, die diese lipophile Fraktion sezernieren (Meibomsche, Zeissche und Mollsche Drüse), werden nicht angegeben [Robinson, 1993]. Die oberflächenaktiven Komponenten ermöglichen sowohl die Spreitung der Tränen über das präcorneale Gewebe als auch die Verteilung der tarsalen Drüsenlipide über die Oberfläche des Tränenfilms.

Die mittlere Schicht des Tränenfilms macht über 98 % des trilaminaren Films aus. Diese Schicht besteht hauptsächlich aus Wasser, Elektrolyten und verschiedenen Proteinen.

Der osmotische Druck des Tränenfilms beträgt im normalen Auge etwa 311-350 mOsm und wird hauptsächlich durch die anorganischen Ionen Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^- und Proteine reguliert [Mastman, 1961]. Im Vergleich zum Blut ist der osmotische Druck der Tränen aufgrund der permanenten Verdunstung des Tränenfilms leicht erhöht.

Die unterste Schicht des Tränenfilms, die direkt mit den Epithelzellen der Cornea in Berührung kommt, ist eine Mucinschicht. Sie füllt die durch Mikrozotten und -falten entstandenen Zwischenräume der oberen Epithelschicht aus und schafft so eine glatte Hornhautoberfläche, die eine wichtige Voraussetzung für die optische Transparenz der Cornea ist. Mucin ist eine oberflächenaktive Verbindung, die sich an der Grenzfläche des Epithels zum darüberliegenden wäßrigen Tränenfilm so orientiert, daß die Grenzflächenspannung reduziert und das Epithel benetzbar wird. Chemisch ist es eine Mischung aus neutralen und sauren Mucopolysacchariden, die von den nahezu 1,5 Millionen Becherzellen sezerniert werden, die in der conjunctivalen Oberfläche lokalisiert

sind. Mucin besteht aus etwa 1/4 Protein und 3/4 Zucker. Neben einfachen Zuckern wie Mannose und Galactose enthalten die Mucopolysaccharide noch Aminozucker wie Glucosamin oder Galactosamin. Diese Polysaccharide sind an bestimmte Proteine gebunden. Die Zuckeranteile mit den freien OH-Gruppen stellen die hydrophilen Anteile im Molekül dar, hydrophobe Aminosäurereste den Anteil des Moleküls, mit dem sich das Mucin an das hydrophobe Epithel anlagert. Diese schleimigen Bestandteile tragen außerdem zu der Stabilität des Tränenfilms bei.

Lysozym (Muramidase), ein antimikrobiell wirksames Enzym, ist ein wichtiger Proteinbestandteil des Tränenfilms. Lysozym greift ganz spezifisch die glykosidischen Bindungen von Murein an, das ein tragender Bestandteil der Bakterienzellwand ist. Insofern wirkt es vor allem auf gram-positive Bakterien bakteriolysisch, in Gegenwart von Komplexbildnern, wie z.B. EDTA, aber auch auf viele gram-negative. Das Enzym verhindert, daß infektiöse Bestandteile über die conjunctivale Augenoberfläche den Blutstrom erreichen. Die antibakterielle Wirkung von Lysozym im Tränenfilm ist zwar nicht besonders groß, trägt aber dazu bei, daß keimarme Bedingungen an der Augenfront erhalten bleiben.

1.3.3. Abfluß

Die Öffnungen, durch die die Tränen abfließen, werden als Tränenpunkte (Puncta lacrimales) bezeichnet. Jedes Lid besitzt im Lidwinkel einen Tränenpunkt. Sie sind rund oder leicht oval geformt und haben einen maximalen Durchmesser von 0,3 mm. Die Tränenflüssigkeit wird durch das reißverschlußähnliche Öffnen und Schließen der Lider hier hinein geleitet. Von den Puncta fließen die Tränen über entsprechende Kanäle (Canaliculi lacrimales) in den Tränensack (Saccus lacrimalis) weiter. Ein Unterdruck in diesem Tränensack unterstützt den Tränenabfluß.

Von hier gelangt die Flüssigkeit über den Tränennasenkanal (Ductus nasolacrimalis), der zur Nase führt, in den gefäßreichen unteren Nasengang (Meatus nasi inferior).

Tränen und die darin enthaltenen Arzneistoffe werden in diesem Bereich in den systemischen Kreislauf absorbiert.

1.4. Vorderer Augenabschnitt

1.4.1. Vorderkammer (Camera oculi anterior)

Der vordere Augenabschnitt wird nach vorn durch die Hornhaut und durch einen kleinen Teil der Lederhaut (Sclera) begrenzt. Die Iris, Linse und der Ziliarkörper bilden die hintere Grenze. Im äußeren Bereich des Auges liegt auch der sogenannte Kammerwinkel (Angulus irido cornealis). Hier sitzt das Trabekelmaschenwerk (Trabeculum corneosclerale), durch das normalerweise das Kammerwasser abfließt.

Der vordere Augenabschnitt ist im mittleren Bereich am tiefsten und flacht zum Rand hin ab. Das enthaltene Volumen liegt bei etwa 250 µl beim Menschen, mit einer Durchflußrate von etwa 1 %/min [Brubaker, 1989].

1.4.1.1. Hornhaut (Cornea)

Die Cornea, das Fenster des Auges, ist ein optisch transparentes Gewebe, das die Bilder auf den Augenhintergrund projiziert. Änderungen in der Hornhaut, in der Krümmung, die Präsenz von Blutgefäßen, eine exzessive Dicke oder Ödeme stören den Lichtgang. Da die Cornea ein gefäßloses Gewebe ist, muß es mit Nährstoffen und Sauerstoff durch die angrenzenden Areale versorgt werden. Dies geschieht sowohl durch die Tränenflüssigkeit und das Kammerwasser, als auch durch Blutgefäße, die an der Grenze zwischen Bindehaut und Hornhaut verlaufen. Ist die Nährstoff- oder Sauerstoffversorgung unzureichend, kann dies zu erheblichen Problemen führen. Deshalb dürfen Kontaktlinsen mit einer niedrigen Sauerstoffdurchlässigkeit auch nur eine begrenzte Zeit getragen werden. Dann müssen sie wieder entfernt werden, um die Sauerstoffversorgung der Cornea sicherzustellen.

Unter normalen Bedingungen variiert der Sauerstoffdruck des Auges von 140 bis 160 mmHg. Der minimale präcorneale Sauerstoffdruck, der benötigt wird, um Ödeme in der Cornea zu verhindern, liegt etwa bei 74 mmHg [Holden, 1984].

Der Durchmesser der Cornea beträgt bei einem Erwachsenen etwa 11,5 mm mit einem Krümmungsradius auf der vorderen Corneaoberfläche von 7,8 mm. Die Dicke der Cornea schwankt von 0,5 mm im Zentrum auf etwa 0,7 mm in der Peripherie (Limbus) [von Bahr, 1948; Martola, 1968]. Die Oberfläche der Cornea bei einem normalen Erwachsenen beträgt etwa 16 mm².

Die Hornhaut ist stärker gewölbt als die Sklera und ist in diese wie ein Uhrglas in eine Uhr eingelassen.

Die Cornea ist aus den 5 folgenden Schichten aufgebaut:

1. Epithel
2. Bowman Membran
3. Stroma
4. Descemet Membran
5. Endothel

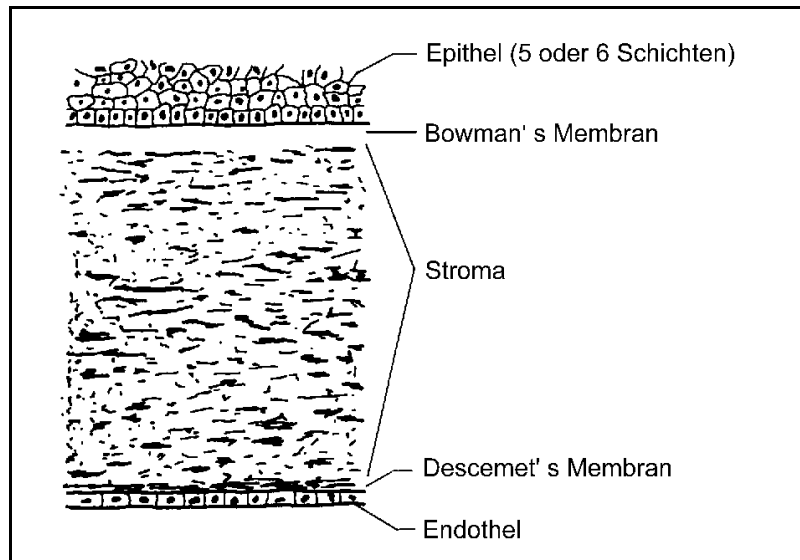


Abb.1.4: Querschnitt durch die Cornea [Hughes, 1993]

Epithel

Das Epithel ist etwa 50 μm dick und stellt das wichtigste Hindernis für Fremdkörper einschließlich Arzneistoffe dar. Es besteht aus fünf oder sechs Lagen Zellen, die permanent mit einer Reproduktionsrate von einer Zellschicht pro Tag erneuert werden. Das Cornea-Epithel ist hydrophob.

Bowman-Membran (Lamina limitans anterior)

Diese Membran ist eine homogene Schicht zwischen dem Epithel und dem Stroma. Sie wird von dem Epithel durch eine scharfe Grenze getrennt und ist azellular. Sie besteht aus feinen, zufällig angeordneten Kollagenfasern, die einen Durchmesser von 20-30 nm besitzen [Forrester, 1996]. Die Membran ist 8-14 μm dick.

Stroma

Die Hornhaut besteht zu 90 % aus Stroma, welches wiederum aus verschiedenen verbindenden Geweben besteht. 70 % des Stroma besteht aus Wasser. Außerdem sind näherungsweise 200-250 Schichten kollagener Lamellen enthalten, die abwechselnd angeordnet sind. In jeder Lamelle (etwa 2 μm dick und 10-25 μm breit) liegen die Fasern parallel zueinander, wohingegen die abwechselnden Schichten in

einem rechtem Winkel zueinander liegen. Auf diese Weise entsteht ein stabiles Gerüst, das optisch durchlässig und transparent ist.

Descemet-Membran (Lumina limitans posterior)

Diese Membran liegt zwischen Endothel und Stroma. Sie ist reich an Glycoproteinen, Laminin und Kollagen und etwa 10-15 µm dick. Sie ist sehr elastisch und bemerkenswert widerstandsfähig gegenüber proteolytischen Enzymen. Sie bleibt oft intakt, während das Epithel und das Stroma durch äußere Einflüsse bereits zerstört ist.

Endothel

Das Endothel ist die unterste Schicht der Cornea und besteht aus einer einzigen Schicht flacher, epithelähnlicher Zellen. Die Zellen sind durch einen beträchtlichen Interzellularraum voneinander getrennt. Tatsächlich werden nur wenige Arzneistoffe in ihrer transcornealen Bewegung durch die Endothelschicht gehindert. Diese Endothelschicht enthält eine Wasserpumpe, die für die Regulierung der Corneadicke verantwortlich ist [Harris, 1955]. Das Hornhautendothel ist nicht regenerationsfähig und muß zeitlebens die oben genannten Funktionen übernehmen.

In der Literatur wird allgemein festgestellt daß Arzneistoffe, die die Cornea durchdringen sollen, möglichst einen Verteilungskoeffizienten größer 1, vorzugsweise einen zwischen 10 und 100 besitzen sollten [Robinson, 1993]. Kishida und Otori [1980] untersuchten die transcorneale Permeabilität von Arzneistoffen in Abhängigkeit von dem Verteilungskoeffizienten und der Molekülgröße. Sie stellten fest, daß die Permeabilität bis zu einem Verteilungskoeffizient von 10 ansteigt. Bei diesem Wert wird eine maximale Permeation der Cornea erreicht, die bis zu einem Wert von 100 wieder leicht abfällt. Zusätzlich resümierten sie, daß hydrophobe Substanzen vorwiegend durch den Verteilungskoeffizienten, hydrophile Stoffe jedoch durch ihre Molekülgröße die Penetration durch die Cornea beeinflussen.

1.4.1.2. Trabekelmaschenwerk (Trabeculum corneosclerale) und Schlemmscher Kanal

Das Trabekelmaschenwerk und der Schlemmsche Kanal (auch Schlemm-Kanal genannt) bilden den normalen Abflußweg des Kammerwassers aus dem vorderen Augensegment. Das Kammerwasser verläßt das Auge durch den Kammerwinkel in das Trabekelmaschenwerk. Durch dieses sickert das Kammerwasser in den ringförmigen Schlemm-Kanal. Von hier aus fließt es weiter in die 25 bis 35 endothelialen Abflußkanäle (Tubuli), die aus der Umgebung des Schlemm-Kanals herausführen. Einige dieser externen Sammelkanäle führen direkt in den tiefen intrascleralen Venenplexus. Allerdings penetriert der größte Teil durch die Sklera und gelangt in den episcleralen Venenplexus, aus dem das Kammerwasser in das venöse Gefäßsystem weitergeleitet wird [Kaufmann, 1984].

Da das Auge eine Hohlkugel ist, muß der innere Druck größer als der der Umgebung sein. Der normale intraoculare Druck liegt bei 13-19 mmHg [Moses, 1981] (bzw. 15-22 mmHg, was etwa 2-3 kPa entspricht).

Der Druck wird primär durch zwei Faktoren bestimmt: durch die Produktions- und die Abflußrate des Kammerwassers. Ein permanent erhöhter Augeninnendruck führt zu Schädigungen des Sehnervs und damit zu Ausfällen des Gesichtsfeldes. Die Ätiologie kann vielseitig sein.

Glaukom

Unter einem Glaukom versteht man das Absterben von Nervenzellen mitsamt ihren Nervenfasern an der Netzhaut. Die Folge ist eine zunehmende Einschränkung des Gesichtsfeldes (Bereich, den das Auge, ohne bewegt zu werden, wahrnimmt). Die Schäden sind irreparabel.

Bei der Entstehung spielen mehrere Faktoren eine Rolle. Neben einer gestörten Durchblutung am Sehnerv ist ein erhöhter Augeninnendruck der wichtigste Risikofaktor für ein Glaukom. Man spricht deshalb von einer multifaktoriellen Erkrankung.

Basierend auf Abflußstörungen des Kammerwassers (durch den Kammerwinkel oder das Trabekelmaschenwerk) können folgende Glaukomformen unterschieden werden:

- angeborenes (kongenitales) Glaukom
- primär chronisches Offenwinkelglaukom
- Chronisches Winkelblockglaukom

- Akutes Winkelblockglaukom

Es gibt zahlreiche Patienten, die einen normalen Augennendruck aufweisen, und trotzdem glaukomtypische Schäden entwickeln:

- Normal- oder Niederdruckglaukom

Weiterhin können Gesichtsfeldausfälle auch durch äußere Einflüsse ausgelöst werden, wie z.B. durch Verletzungen, Tumore, Medikamente etc.

- Sekundärglaukom

1.4.2. Hintere Augenkammer (Camera oculi posterior)

Die hintere Augenkammer hat eine annähernd dreieckige Form. Die Kammer ist mit etwa 50 µl Kammerwasser gefüllt. Das Kammerwasser wird in den Ziliarkörpern mit einer Produktionsrate von 2,0 bis 2,5 µl/min sezerniert, fließt in die hintere Augenkammer und durch die Pupille in die Vorderkammer [Yablonski, 1978].

Das gesamte Kammerwasser wird so in etwa einer Stunde ersetzt.

1.4.2.1. Regenbogenhaut (Iris) und Pupille (Pupillae)

Die Iris trennt die vordere von der hinteren Augenkammer. Das zentrale Loch der Iris, die Pupille, ist die Blende des optischen Systems. Die Pupille ist eine runde Öffnung. Zwei glatte Muskelfasern in der Iris regulieren den Pupillendurchmesser: der Musculus sphincter pupillae und der Musculus dilatator pupillae. Der Pupillensphincter ist vorwiegend parasymphatisch, der Dilator sympathisch innerviert. Der Pupillendurchmesser variiert zwischen 2 und 9mm in Abhängigkeit von Belichtung, emotionaler Verfassung, Müdigkeit und Akkomodationszustand. Im normalen Auge sind Dilator und Sphincter ständig in Aktion und der Pupillendurchmesser ist eine Funktion der relativen Aktivität dieser beiden Muskeln [Thomson, 1981]. Eine Pupillenerweiterung erhöht den Lichteinfall in das Auge und verstärkt die Funktionsfähigkeit der Zapfen. Im Gegensatz dazu erhöht eine Pupillenkontraktion die Fokustiefe des Auges und verringert optische Aberrationen von der Linsenperipherie. Einzelheiten der Pupillenfunktion werden in Kapitel 8.3.3. beschrieben.

Die Iris wird vom Kammerwasser umspült und erlaubt den freien Fluß des Kammerwassers von der hinteren zur vorderen Kammer.

Die Farbe der Iris hängt von dem Melanin-Anteil in ihrem Stroma ab. Wenn nur wenig Melanin vorhanden ist, verursacht die Lichtreflektion der Pigmente in der hinteren

Augenkammer der Iris eine Streuung des Lichtes mit einer blauen Erscheinung. Viel Pigment führt im Gegensatz dazu nur zu einer geringen Lichtstreuung, und deshalb hat die Iris eine braune Farbe.

Der Unterschied zwischen blauen und braunen Augen ist bei der Arzneistoff-Antwort oft beträchtlich [Maurice, 1984]. Einige dieser Unterschiede können auf einfache Arzneistoff-Melanin-Bindungen zurückgeführt werden.

Ein Großteil des topisch applizierten Arzneistoffgehaltes im Kammerwasser verläßt das Auge durch den Ausfluß. Man vermutet außerdem, daß ein Teil in die Iris gelangt und das Gewebe über dieses Gefäßsystem verläßt.

1.4.2.2. Ziliarkörper (Corpus ciliare)

Der Ziliarkörper ist der bindegewebs-muskuläre ringförmige Abschnitt der Gefäßhaut (Tunica vasculosa), der zwischen der Aderhaut (Chorioidea) und der Iris liegt. Er übernimmt viele Funktionen. Das Ziliarepithel sezerniert das Kammerwasser und ernährt somit die Linse und die Hornhaut, liefert die Muskelkraft für die Akkomodation und bildet die Zonulafasern aus. Seine Versorgung erfolgt über ein Gefäßsystem.

Kontrahiert der Ziliarmuskel, erschlaffen die Zonulafasern, der Zug auf die Linsenkapsel läßt nach und die Linse wird konvexer. Dieser Prozeß ist als Akkomodation bekannt (Einzelheiten s. Kapitel 1.5.1.).

Der Ziliarkörpers ist sympatisch, parasympatisch und sensorisch innerviert. Man schätzt, daß 1-2 % der Ziliarmuskel-Innervation sympatischen Ursprungs ist, während der Rest parasympatisch ist [Warwick, 1954].

1.4.2.3. Kammerwasser (Humor aquaeus)

Das Kammerwasser wird sowohl durch aktive Zelltätigkeit (Sekretion) als auch durch Ultrafiltration des Ziliarkörpers gebildet und fließt aus der Hinterkammer zwischen Iris und Linse in die Vorderkammer (etwa 2 mm³/min) [Leydhecker, 1993]. Die treibende Kraft ist ein hydrostatisches Druckgefälle. Nach Schätzungen beträgt der Anteil der aktiven Sekretion unter normalen Bedingungen etwa 80-90 % des Gesamtanteils.

Die Zusammensetzung des Kammerwassers unterscheidet sich im Vergleich zum Blutplasma in einem niedrigeren Protein- und höheren Ascorbat- und Laktatgehalt [Sears, 1981]. Die Gründe dafür liegen darin, daß ein aktives Transportsystems für

organische und anorganische Substanzen durch das Ziliarepithel vorhanden ist und eine permanente Diffusion durch die Blut-Kammerwasserschranke erfolgt.

1.5. Hinterer Augenabschnitt

1.5.1. Linse (Lens)

Die Linse besteht zu etwa 35 % aus Eiweiß und besitzt weder Blutgefäße noch Nerven. Sie kann deshalb auf schädliche Einflüsse von außen (chemische oder physikalische Noxen) nicht mit einer Entzündung reagieren, Schmerzrezeptoren sind nicht vorhanden. Ihre Nährstoffversorgung erfolgt über das Kammerwasser. Die Linse ist an den Zonulafasern aufgehängt, die dem Ziliarkörper entstammen und an der Äquatorebene der Linse anhaften. Sie sind dafür zuständig, daß die Linse in der visuellen Achse gehalten wird.

Die Linse besitzt eine transparente bikonvexe Struktur und ist hinter der Iris lokalisiert. Wie alle Linsen hat die Linse eine Vorder- und Rückseite. Am Äquator ist die Linse etwa 10 mm dick, der Durchschnittsradius der Krümmung der vorderen Oberfläche liegt bei ca. 10 mm, wohingegen der des hinteren Teils bei ca. 6 mm liegt.

Die Linse wächst während des gesamten Menschenlebens, obwohl die Wachstumsrate mit zunehmendem Alter abnimmt. Im Alter von 65 Jahren ist die Linse etwa 1/3 dicker als mit 25 Jahren.

Das normale Altern der Linse ist durch die zunehmende Größe und Verhärtung des Kerns gekennzeichnet. Mit 40-45 Jahren hat die Elastizität der Linse so weit abgenommen, daß normale Druckschrift nicht mehr mühelos gelesen werden kann (Presbyopie). Das Akkomodationsvermögen ist mit 70 Jahren völlig erloschen und die Linse starr. Die Altersangaben können individuell variieren.

Die Farbe der Linse wechselt ebenfalls mit dem Alter. Bei Kindern ist sie gewöhnlich farblos, aber mit den Jahren bekommt sie einen gelblichen Stich, so daß ältere Leute bernsteingelbe Augen haben können.

Akkommodation

Akkommodation ist die Fähigkeit der Linse, sich an verschiedene Entfernungen anzupassen. Diese Einstellung wird durch eine Veränderung des Linsendurchmessers erreicht. Bewegt sich ein Objekt näher an das Auge heran, müssen die Lichtstrahlen, die das Auge erreichen, gebündelt werden, um ein scharfes Bild zu erreichen. Der Focuswechsel wird durch eine Kontraktion des Ziliarmuskels erreicht, was wiederum zu einer Erschlaffung der Zonulafasern führt. Sobald die Zonulafasern entspannt sind, wird die Linse runder, und die Brechkraft nimmt zu. Die Fähigkeit zur Akkommodation nimmt mit zunehmendem Alter ab und wird als Presbyopie bezeichnet.

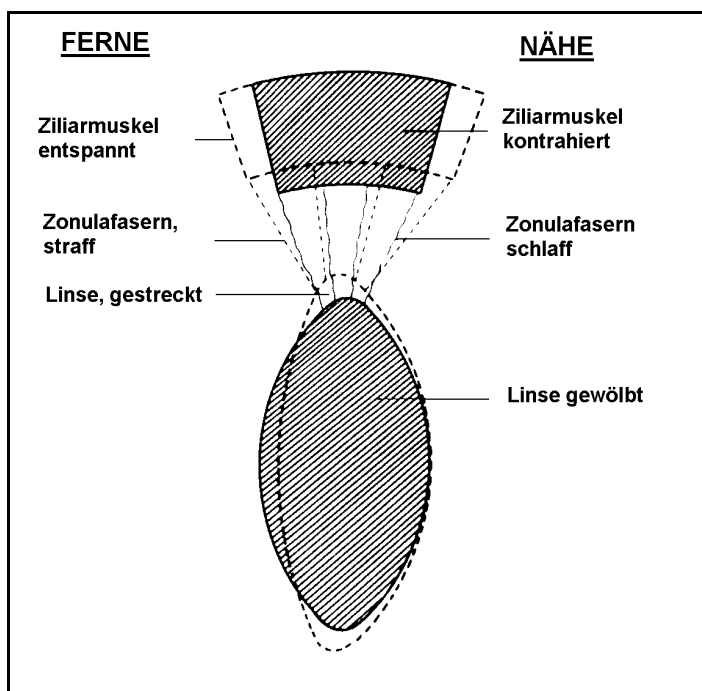


Abb.1.5:

Akkommodationsvorgang an Ziliarmuskel und Linse; Naheinstellung: Ziliarmuskel kontrahiert, Zonulafasern erschlaffen, Linsenkapsel entspannt sich, Linse nimmt kugelige Form an, wodurch die Brechkraft zunimmt.

Ferneinstellung: Ziliarmuskel erschlafft, Zonulafasern und Linsenkapsel gespannt, Linse elliptisch, wodurch ihre Brechkraft abnimmt [Hollwich, 1988].

1.5.2. Lederhaut (Sclera)

Die äußere Hülle des Augapfels hat eine faserige Struktur und dient als Schutz. Die weiße, opake Lederhaut macht etwa 5/6 des Augapfels aus, wobei das letzte Sechstel aus der transparenten Hornhaut besteht.

Der sklerale Schutzmantel hat einen Durchmesser von 22 mm und einen Krümmungsradius von 12 mm. Ihre Dicke schwankt zwischen 0,6 und 1 mm.

Die Sklera besteht aus nahezu zellfreiem Bindegewebe (Kollagenfasern) und enthält nur wenige Gefäße und Nerven. Sie ist zwar ähnlich wie die Hornhaut aufgebaut, ist aber aufgrund ihres höheren Wassergehaltes undurchsichtig [Leydhecker, 1993].

1.5.3. Glaskörper (Corpus vitreum)

Der Glaskörper füllt den Raum hinter der Linse und nimmt ungefähr 80 % des Auges ein. Er wiegt etwa 4 g und hat ein Volumen von 4 ml. Normalerweise ist der Glaskörper ein klares Gel, welches fast ausschließlich aus Wasser besteht (98 %), das an Hyaluronsäure gebunden ist.

Der Glaskörper ist ein wichtiger strukturgebender Bestandteil und der Versorgungsweg für Nährstoffe zur Netzhaut (Retina) und der Linse. Seine Transparenz ist die Voraussetzung für einwandfreies Sehen. Der Brechungsindex entspricht ungefähr dem des Kammerwassers.

1.6. Aspekte bei der Entwicklung von Applikationssystemen für das Auge

Viele Gewebe, die zu dem präcornealen Bereich des Auges gehören, haben einen großen Einfluß auf die Arzneistofffreisetzung am Auge.

Über einige dieser Gewebe gibt es keine und nur wenige Untersuchungen, da in der Analytik Grenzen durch die zur Zeit vorhandenen Methoden gesetzt sind. Andere Gewebeareale wurden jedoch oft und hinreichend untersucht.

Die folgende Liste ist der Versuch, die wichtigsten Aspekte bei der Entwicklung von okularen Freisetzungssystemen noch einmal herauszustellen:

1. *Anatomie*: Physikalisch unbewegliche Formulierungen wie Inserte und Gele können, wenn sie über die hoch innervierte Cornea gerieben werden, Schmerzen verursachen. Aufgrund der verschiedenartigen Anatomie des Augenlides verschiedener Menschentypen können sich Unterschiede bei bestimmten okularen Systemen bemerkbar machen. Ein Insert, das für die nordamerikanische kaukasische Bevölkerung entwickelt wurde, wird von Orientalen meist als äußerst unangenehm empfunden [Robinson, 1993].
⇒ Wegen der Augapfelbewegung und des Lid-drucks während des Blinzeln müssen lösliche und unlösliche Augeninserte klein, dünn und sorgfältig gestaltet sein, damit Bewegungen im Auge oder sogar ein Herausfallen aus dem Auge vermieden werden können.
2. *Verweilzeit*: Da sowohl die Tränensekretion als auch das Blinzeln einen großen Einfluß auf die Verweilzeit von flüssigen Augenarzneistoffpräparaten am Auge hat, scheint die Verträglichkeit dieser Zubereitungen essentiell zu sein.

- ⇒ Eine möglichst tiefe Platzierung des Tropfens, Feststoffes oder halbfesten Systems in den unteren Bindehautsack bietet dem Patienten einen größeren Komfort und verlängert die Verweilzeit. Unterstützt wird dieser Effekt durch eine gute Haftfähigkeit des Systems an der conjunctivalen Oberfläche.
3. *Resorption*: Unter dem Gesichtspunkt der Arzneistoffpenetration ist bemerkenswert, daß die Cornea aus einem lipophilen Epithel, einem dicken hydrophilen Stroma und einem porösem Endothel besteht. So repräsentiert das Epithel die Hauptbarriere für wasserlösliche Arzneistoffe und solche mit einem niedrigen Verteilungskoeffizienten, während das Stroma die primäre Barriere für sehr lipophile Substanzen ist.
- ⇒ Viele ophthalmologisch verwendete Substanzen haben einen ungünstigen Verteilungskoeffizienten, z.B. hohe Verteilung in das Cornea-Epithel, geringe Verteilung in das Stroma. Die Bioverfügbarkeit kann in diesen Fällen durch eine verlängerte Kontaktzeit verbessert werden.
4. *Zielort*: Es ist schwierig, ein Freisetzungssystem genau auf der Cornea zu halten, es sei denn, es handelt sich dabei um eine Kontaktlinse. Applikationssysteme (Drug Delivery Systems, DDS) werden typischerweise irgendwo vorne am Augapfel untergebracht und erleiden einen beträchtlichen Wirkstoffverlust durch die umliegenden Gewebe. Die Bindehaut ist im Vergleich zur Hornhaut etwa fünf mal größer und auch leichter penetrierbar.
- ⇒ Es ist deshalb wahrscheinlich, daß maximal 10-15 % eines extern applizierten Arzneistoffes durch die Cornea absorbiert wird.
5. *Systemische Nebenwirkungen*: Der Bindehautsack kann unter der Voraussetzung, daß der Patient nicht blinzelt, maximal bis zu 30 µl aufnehmen. Die überschüssige Lösung läuft die Wange herunter und/oder wird über den Tränennasengang abgeleitet und resorbiert.
- ⇒ Ein kleiner applizierter Tropfen (5 µl) reduziert die systemischen Nebenwirkungen aufgrund des geringen Abflusses über den Nasengang (s.a. Kap. 2.6.1.10.).
6. *Arzneistoffmetabolismus*: Der Metabolismus von Arzneistoffen in der Cornea wurde bisher wenig untersucht, weil die Werte unterhalb der analytischen Erfassungsgrenze liegen. Ausgehend von der normalen kurzen Kontaktzeit des Arzneistoffs mit dem Auge (auch wenn es sich dabei um einen recht empfindlichen Arzneistoff handelt) ist es unwahrscheinlich, daß ein ausgesprochener precornealer Arzneistoff-Metabolismus vorhanden ist.

⇒ Sobald die Kontaktzeit des Arzneistoffs mit freisetzungsverlängernden Systemen erhöht wird, wird vermutlich auch der Anteil an lokalem Metabolismus-Gewebe entsprechend steigen.

7. *Tier-Modelle*: Es ist schwierig, ein möglichst realitätsnahes Testsystem für die Entwicklung von Applikationsformen für das menschliche Auge zu finden.

⇒ Häufig werden Kaninchen als Versuchstiere bei der Forschung nach okularen Freisetzungssystemen verwendet. Tabelle 1.6. stellt einige der präcornealen Charakteristiken zwischen Kaninchen und Mensch gegenüber.

	Kaninchen	Mensch
Tränenvolumen	7-8 µl	7-8 µl
Tränendurchfluß	7% /min (0,53 µl/min)	16 %/min (1,2 µl/min)
Blinzelrate	alle 15 min	alle 5 sec
Proteingehalt der Tränen	0,5 %	0,7 %
Nickhaut	Ja	Nein

*Tab.1.6: Vergleich einiger präcornealen Charakteristika bei Kaninchen und Mensch
[Daten aus: Kreiner, 1981; Lee, 1986; Robinson, 1993]*

1.7. Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde ein Überblick über die Anatomie und Physiologie des Auges dargestellt, soweit sie für die topische Arzneistofffreisetzung relevant sind. Das Auge ist ein komplexes Organ, dessen gut funktionierender Schutzmechanismus eine effektive Behandlung erkrankter Teile unter Umständen erheblich behindern kann.

Für die Entwicklung eines guten Konzeptes für ein ophthalmisches Präparat ist es sinnvoll, bestimmte grundlegende Mechanismen wie die Resorption eines Arzneistoffes, seine Verteilung, Metabolisierung und Eliminierung im Gewebe zu kennen bzw. zu wissen, wie diese Faktoren optimiert werden können. Weiterhin ist es genauso wichtig, die Reaktion des Auges auf einen Fremdkörper (in diesem Fall die Arzneistoffzubereitung) zu verstehen, damit Abwehrmechanismen minimiert werden können oder zumindest die Relevanz dieser Effekte kompetent beurteilt werden kann.

Die Kenntnisse über die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik am Auge sind nicht so ausgereift wie in anderen Teilen des Körpers, weil die zu bestimmenden Arzneistoffkonzentrationen oft an die Grenzen der zur Verfügung stehenden Analysemethoden stößt. Dieses in vielen Fällen fehlende Wissen führt lediglich zu einer

empirischen oder semi-empirischen Annäherung bei der Bestimmung der Wirkstofffreisetzung, insbesondere dann, wenn sie optimiert werden soll.

2. Applikationsformen für das Auge - Übersicht

2.1. Grundlagen

Arzneistoffe, die am Auge topisch appliziert werden, unterliegen den normalen (oder pathologischen) Gegebenheiten des Bindehautsacks (s. Kap. 1.2.2.), der die Clearance von Arzneistoffen in die Nasennebenhöhlen reguliert. Die meisten Arzneistoffe penetrieren durch die Cornea in das Auge. Da die Augenoberfläche durch einen komplexen Scheibenwischer-Mechanismus geschützt wird, werden auf diese Weise die meisten am Auge applizierten Komponenten innerhalb weniger Minuten leicht wieder weggespült. Die Sekretionsrate der Tränen und deren Clearance sind für die variable Kontaktzeit eines jeden applizierten Arzneistoffes mit der Augenoberfläche verantwortlich.

Maurice und Mishima [1984] erläuterten das Problem der Kontaktzeiten anhand von Fluorescein-Natrium und faßten einige Ergebnisse zusammen: Die Substanz wird in der Tränenflüssigkeit durch deren permanenten Zu- und Abfluß ausgewaschen bzw. über die Conjunctiva absorbiert. Der erst genannte Prozeß wird auch als 'Turnover' bezeichnet. Die Wirkstoffkonzentration in der Tränenflüssigkeit fällt üblicherweise exponentiell ab, die Halbwertszeit liegt bei gesunden Probanden zwischen 2 und 20 Minuten. Die Turnover-Rate kann bereits durch Gähnen, Irritationen oder Emotionen erhöht werden, da dadurch die Tränenproduktion gesteigert wird. Bei erheblichen Schmerzen kann der Arzneistoff bereits nach einer Minute wieder vollständig ausgeschwemmt worden sein. Mit zunehmendem Alter sinkt die Turnover-Rate. Bleiben die Augen nach einer Applikation geschlossen, wird die Eliminationszeit um die Hälfte reduziert.

Mit radioaktiv markierten Tracern, die am Auge appliziert wurden, konnte gezeigt werden, daß diese schnell wieder mit den Tränen ausgewaschen wurden; die Eliminierung erfolgte zu etwa 2/3 innerhalb des ersten 2 Minuten [Van Ooteghem, 1987]. Der Wirkstoff wird über den Tränennasenkanal in die Nasennebenhöhle weitergeleitet, wo die systemische Absorption stattfindet. Beinahe alle am Auge applizierten Stoffe werden systemisch absorbiert und führen manchmal zu substantiellen systemischen Arzneistoffeffekten. So wurden z.B. im Zeitraum von 1978 bis 1985 der FDA 450 Fälle ernsthafter Atmungs- und Herzstörungen und 32 Todesfälle gemeldet, die nach der Gabe von Timolol-Augentropfen auftraten [Nelson, 1986]. Weitere Arzneistoffe, die

hinsichtlich ihrer systemischen Nebenwirkungen kritisch sein können, sind Atropin und Epinephrin.

Eine Übersicht über einige Arzneistoffe und ihren systemisch absorbierten Anteil findet sich bei Lee und Robinson [1986] (Tab. 2.1.).

Arzneistoff	systemisch absorbierte Menge in %
Cortisol	30-35
Epinephrin	84,5
Dipivalylepinephrin	80
Flurbiprofen	76
Tetrahydrocannabinol	23

*Tab.2.1: Systemisch absorbierter Anteil in % von topisch am Auge applizierten Stoffen [aus: Lee, 1986]
(keine Angabe über die Applikationsform)*

2.2. Arzneistoffeigenschaften

Die physiko-chemischen Eigenschaften eines Arzneistoffes beeinflussen im Wesentlichen die Penetration in ein Gewebe. Ein hohes Molekulargewicht und eine entsprechende Molekülgröße kann eine effektive Penetration durch die Cornea behindern. Das Ionen- und Säure-Base-Gleichgewicht sowie die Löslichkeitskonstante und der Octanol-Wasser Verteilungskoeffizient bestimmen die Lösungsgeschwindigkeit des Arzneistoffs in der Tränenflüssigkeit und damit die effektive Arzneistoffkonzentration.

Die Erkenntnis, daß die Penetration von Zellmembranen mit zunehmender Lipophilie des Stoffes ansteigt, hat sich mittlerweile etabliert. Swan und White [1942] untersuchten die Penetration von Naphthylamin durch das Epithel. Wurde die Aminogruppe durch eine andere funktionelle Gruppe, wie z.B. einen Sulfonsäurerest, ersetzt, sank sowohl die Lipophilie als auch die Penetration. Stoffe mit einem substituierten Phenylring penetrierten 100 mal langsamer als Verbindungen mit einem vergleichbaren Naphthylring durch die Cornea. Somit scheint in diesen Fällen die Molekülgröße nicht der geschwindigkeitsbestimmende Faktor zu sein.

Maren et al. [1983; zitiert nach Maurice, 1984] demonstrierten die strenge Korrelation zwischen der Corneapenetration verschiedener Carboanhydrase-Inhibitoren und deren Lipophilie (Abb. 2.2.).

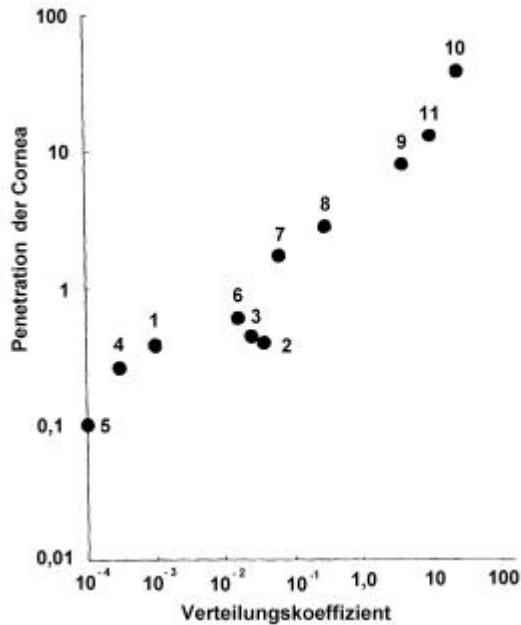


Abb.2.2:

Verhältnis der Arzneistoffpenetration durch die Cornea zu dem Chloroform/pH 7,2 Puffer-Verteilungskoeffizient für eine Reihe von Carboanhydrase Inhibitoren:

1. Azetazolamid, 2. 2-Iso-pentenylamino-1,3,4-thiadiazol-5-sulfonamid, 3. 2-Benzoylamino-1,3,4-thiadiazol-5-sulfonamid, 4. Bromazetazolamid, 5. Benzolamid, 6. 5-Imino-4-methyl-1,3,4-thiadiazol-5-sulfonamid, 7. Methazolamid, 8. Trifluormethazolamid, 9. Trichlormethazolamid, 10. Ethoxzolamid, 11. Chlorzolamid (CL-13580), [aus: Maurice, 1987, nach Maren, 1983]

Viele Arzneistoffe sind schwache Säuren oder Basen, so daß deren Ionisationsgrad und damit ihre Lipophilie erheblich durch den pH-Wert beeinflusst wird. Bereits Swan und White [1942] zeigten, daß die Penetration von Procain um das 10-fache stieg, wenn der pH-Wert von 7 auf 9,5 erhöht wurde. Dieser Bereich entspricht genau dem Übergang der ionisierten in die nicht-ionisierte Form. Prausnitz und Noonan [1998] stellten in ihrem Artikel die Ergebnisse von über 300 Permeabilitätsmessungen für etwa 150 Stoffe inklusive Stoffeigenschaften zusammen. Zusammenfassend kamen sie zu dem Ergebnis, daß

- die Epithel/Stroma-Permeabilität eine Funktion des Verteilungskoeffizienten ist
- die Stroma-Permeabilität erheblich von der Molekülgröße und nur wenig von dem Verteilungskoeffizienten abhängig ist
- die Stroma/Endothel-Permeabilität eine Funktion des Verteilungskoeffizienten ist
- die Endothel-Permeabilität sowohl vom Verteilungskoeffizienten als auch von der Molekülgröße abhängig ist

Faßt man die Gewebeeigenschaften zusammen, ist die Cornea-Permeabilität letzten Endes eine Funktion des Verteilungskoeffizienten.

Für die Permeation der Conjunctiva konnte keine klare Abhängigkeit angegeben werden, bei der Sclera spielt die Molekülgröße ebenfalls eine wichtige Rolle, der Einfluß des Verteilungskoeffizienten ist jedoch auch hier unklar.

2.3. Physiologie des Tränenfilms und Kontaktzeit an der Cornea

Der Bindehautsack und das externe Cornea-Epithel werden ständig von Tränen umspült, deren Sekretionsrate im Durchschnitt 1,2 µl pro Minute beträgt. Das Flüssigkeitsvolumen, das sich im Binde sack befindet, liegt annähernd bei 10 µl (das ist nur 1/3 bis 1/5 des Volumens, welches mit Augentropfen appliziert wird).

Im Falle einer Augenreizung induziert ein Reflex jedoch eine erhöhte Tränensekretion, die bis zu 400 µl betragen kann. Auf diese Weise wird die irritierende Komponente (wie z.B. eine Arzneistofflösung) möglichst schnell wieder ausgewaschen. Zusätzlich können pathologische Gegebenheiten, die die normale Tränenphysiologie behindern (z.B. Trockenes Auge, externe Entzündung mit exzessiver Tränenbildung, etc.), die topische Wirkstofffreisetzung am Auge sowohl verzögern als auch beschleunigen.

Die Oberfläche der Cornea ist reichlich mit Nervenfasern ausgestattet und reagiert empfindlich auf jegliche Änderung der Zusammensetzung der Tränenflüssigkeit. Augentropfen können dieses empfindliche Gleichgewicht stören, was sich im günstigen Fall lediglich in einer leichten Cornea-Reizung bemerkbar macht. Kritische Parameter sind die Osmolalität und der pH-Wert. So ist die Toleranz einer basischen Lösung an der Augenoberfläche gegenüber einer sauren zwar größer, allerdings sind die auftretenden Schäden wesentlich intensiver (s. Kap. 2.6.1.1).

Die bloße Instillation eines Tropfens kann eine Reflextränenproduktion veranlassen, und hohe Viskositäten können unangenehme Empfindungen verursachen [Blaug, 1965].

Darüber hinaus kann der Wirkstoff selbst entweder eine Lacrimation (z.B. Pilocarpin oder Antazolin) oder eine reduzierte Tränenproduktion (z.B. Timolol und Anästhetika) verursachen. Van Ooteghem [1987] führt eine Reihe von Arzneistoffen/gruppen und ophthalmischen Zusätzen auf, die einen Einfluß auf die Tränensekretion, Tränenfilmstabilität und Blinzelfrequenz haben.

Allgemein gilt: je stärker eine chemische Komponente irritiert, desto schwieriger ist es, die Kontaktzeit zu verlängern.

2.4. Resorptionsbarrieren

Die Cornea ist ein komplexes Netzwerk unterschiedlicher Strukturen, die aus diversen Flüssigkeits- und Gewebeschichten bestehen (s. Kap. 1.4.1.1.) und die hindurchdiffundierenden Moleküle aufhalten. Ein Wirkstoffmolekül, das in der Tränenflüssigkeit (s. Kap. 1.3.) gelöst ist, kann leicht von der Cornea-Oberfläche weggespült werden. Sobald jedoch die Komponente das Cornea-Epithel erst einmal penetriert hat, ist die Wahrscheinlichkeit einer intraocularen Penetration viel höher. Daraus folgt, daß eine rasche Resorption chemischer Komponenten aus dem Tränenfilm in das Cornea-Epithel die erste Voraussetzung für eine effiziente Wirkung ist (s.a. Arzneistoffeigenschaften, Kap. 2.2.).

Der Tränenfilm (etwa 10 µl) ist aus einer lipophilen, wäßrigen und mucinhaltigen Schicht zusammengesetzt und ist etwa 3 µm dick. Ein Molekül muß somit in der Lage sein, hydrophile und lipophile Bereiche des Tränenfilms zu überwinden. Darüber hinaus kann ein signifikanter Teil der Wirkstoffmoleküle in der Mucinschicht an Carrierproteine binden, und nur freie Moleküle können das Cornea-Epithel passieren.

Ist der Arzneistoff in die Hornhaut gelangt, muß er auch hier verschiedene Gewebeschichten durchqueren.

Das äußere Cornea-Epithel besteht aus 5 bis 7 Zellschichten, die durch 'tight junctions' verbunden sind, und die nur eine begrenzte Penetration der Komponenten zulassen. Aufgrund des hohen lipophilen Membrananteils gelangen unpolare Substanzen leichter durch das Epithel (s. Kap. 2.2.). Das Epithel besitzt für einige Metaboliten und Glucose ein passives Transportsystem.

Auf der anderen Seite besteht das hydrophile Cornea-Stroma aus einem lockeren Zellzusammenhalt, so daß polare oder kleine Moleküle leicht hindurchdiffundieren können. Für kleine Moleküle ist die Diffusionsgeschwindigkeit im Stroma etwa zweieinhalb mal langsamer als in der Tränenflüssigkeit, für ein Molekül der Größe eines Albumins wird die Geschwindigkeit jedoch auf ein zehntel reduziert [Maurice, 1984].

Das Endothel ist ein zellulärer Monolayer, der im Vergleich zum Epithel die Penetration hydrophiler Stoffe besser erlaubt. Die Durchlässigkeit für kleine Ionen ist im Endothel 200 mal größer als im Epithel [Maurice, 1984].

Unter optimalen Bedingungen werden schätzungsweise nur 1-10 % des auf der Cornea applizierten Wirkstoffs absorbiert.

Ein Rechenbeispiel zeigt, daß diese Werte sehr optimistisch angesetzt wurden. Cekic und Mitarbeiter [1998] untersuchten die Ofloxazin-Konzentrationen im Kammerwasser von Patienten, nachdem diese über einen Zeitraum von sechs Stunden nach einem vorgegebenen Therapieschema behandelt worden sind (die ersten 3 Stunden wurden jede halbe Stunde zwei Tropfen einer 0,3 %igen Lösung appliziert, danach nur noch jede Stunde). Nach dieser Zeit konnten 1,44 µl/ml Arzneistoff im Kammerwasser festgestellt werden. Berechnet man die tatsächlich verabreichte Arzneistoffmenge (unter der Annahme einer Tropfengröße von 40 µl: 2,4 mg Ofloxazin) und vergleicht diese mit der erreichten Kammerwasserkonzentration (0,36 µg in 250 µl Kammerwasser), muß man feststellen, daß sich zu diesem Zeitpunkt lediglich 0,015 % der Wirkstoffdosis am Zielort befanden.

2.5. Systeme zur kontrollierten Freisetzung von Arzneistoffen am Auge

Durch Systeme mit kontrollierter Wirkstofffreisetzung (Drug Delivery Systems, DDS) soll zunächst die Kontaktzeit am Auge verlängert werden. Dadurch wird bei gegebener Dosis das Resorptionsintervall verlängert und ausreichende Konzentrationen in der Tränenflüssigkeit bzw. im Kammerwasser über längere Zeiträume aufrechterhalten. Durch die geringere Schwankungsbreite der Wirkstoffkonzentration im Tränenfilm können lokale Reizungen vermieden werden, wie sie bei Konzentrationsspitzen nicht selten auftreten und die Compliance wird durch längere Applikationsintervalle verbessert.

Die Abbildung 2.3. zeigt den typischen Verlauf eines Konzentrations-Zeitprofils in der Tränenflüssigkeit nach der Applikation von konventionellen Augentropfen [Shell, 1987]. Nach einem hohen Anfangspeak, der weit über das erforderliche Wirkungsniveau hinaus geht (Überdosierung), nähert sich die Kurve asymptotisch der Ordinate und erreicht nach einiger Zeit den Bereich der Unterdosierung. Der Zeitraum einer optimalen Wirkstoffkonzentration ist in Abhängigkeit der therapeutischen Breite eines Arzneistoffes sehr kurz.

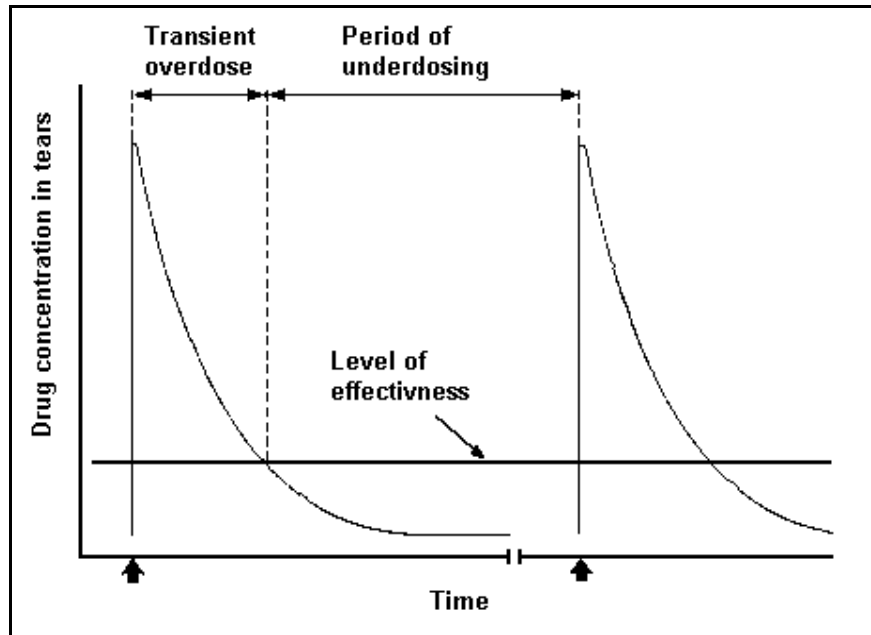


Abb.2.3: Verlauf eines Konzentrations-Zeitprofils (in der Tränenflüssigkeit) nach der Applikation von konventionellen Augentropfen [Shell, 1987]

Eine andere Zielsetzung ist die Reduktion der Arzneistoffpenetration in die Vorderkammer hinein, wenn der Wirkstoff lediglich für externe okulare Indikationen benötigt wird, jedoch potentielle intraokulare Nebeneffekte besitzt, wie das bei topischen Steroiden der Fall ist. Diese werden bei äußerlichen Beschwerden am Auge eingesetzt, können jedoch nach ihrer intraocularen Resorption zu einem Anstieg des Augeninnendrucks führen, so daß vor ihrem Einsatz eine sorgfältige Risikoabwägung erfolgen muß. Eine Möglichkeit, die Penetration topischer Corticosteroide in die Vorderkammer zu reduzieren ohne gleichzeitig die Konzentration an der Augenoberfläche zu verringern, würde eine sichere Applikation des Arzneistoffs für externe Indikationen (z.B. allergische Konjunktivitis) schaffen.

Eine weitere Perspektive kann die Minimierung systemischer Nebenwirkungen sein.

Die Ansprüche an ein optimales Freisetzungssystem hängen also letztendlich von dem Arzneistoff ab. Zum Beispiel erhält man mit Pilocarpin die erwünschte intraoculare Augendrucksenkung mit nur minimalen Nebenwirkungen (Miosis und Akkomodationsstörung), wenn der Wirkstoff die Vorderkammer in kleinen gleichmäßigen Mengen erreicht (z.B. Pilocarpin Ocusert[®], s. Kap. 2.6.8.1.2.). Pilocarpin sollte deshalb mit konstanter Geschwindigkeit ($\mu\text{g/h}$) oder in kleinen,

aufeinanderfolgenden Dosen appliziert werden, um auf diese Weise geringe Nebenwirkungen und trotzdem eine ausreichende Wirkung zu erzielen.

Im Gegensatz dazu können jedoch für andere Medikamente anfänglich hohe Wirkstoffpeaks vorteilhafter sein (z.B. Antibiotika und Steroide).

Im folgenden Abschnitt werden verschiedene Formulierungen bzw. Darreichungsformen zur Anwendung am Auge betrachtet.

2.6. Zubereitungen zur Anwendung am Auge

2.6.1. Lösungen zur Anwendung am Auge

Wäßrige Augentropfen sind sterile Lösungen, frei von Fremdkörpern und konzipiert für die Anwendung am Auge [EUAB, 1997]. Wäßrige Lösungen sind die gebräuchlichste topische Darreichungsform zur Anwendung am Auge und im Vergleich zu anderen Alternativen die preiswerteste Formulierung. Alle Inhaltsstoffe sind vollständig gelöst, so daß eine Sichtbehinderung selten eintritt. Der größte Nachteil wäßriger Lösungen allerdings ist ihre kurze Kontaktzeit mit der arzneistoffabsorbierenden Oberfläche (Cornea, Conjunctiva und Sclera).

Außer dem Wirkstoff enthalten diese Lösungen Hilfsstoffe, um verschiedene Eigenschaften wie Tonizität, Pufferkapazität, pH-Wert und Viskosität der Lösung einzustellen (Verbesserung der Verträglichkeit) und um die antimikrobielle Konservierung sicherzustellen. Obwohl diese Stoffe als 'nichtaktive Stoffe' aufgeführt werden, können sie sehr wohl die Penetration eines Arzneistoffs durch die okularen Barrieren verändern (z.B. verstärken oder reduzieren) und so den therapeutischen Effekt eines verabreichten Stoffes signifikant verändern. Beispiele werden in den Abschnitten 'pH-Wert und Pufferkapazität', 'Viskosität', 'Konservierungsmittel', 'Absorptionspromotoren', 'Tenside' und 'Bioadhäsive Zusätze' erläutert.

Weil sich die Wirkungen verschiedener Zusätze allerdings meist behindern, ist das Endprodukt normalerweise eher ein Kompromiß aus widersprüchlichen Zusätzen als die optimale Rezeptur für individuelle Ansprüche.

2.6.1.1. pH-Wert und Pufferkapazität

Der pH-Wert einer wäßrigen Lösung kann eine wichtige Rolle für den therapeutischen Effekt eines Arzneistoffes spielen.

Die meisten ophthalmologischen Wirkstoffe sind schwache Säuren oder Basen, die in Lösung sowohl in dissoziierter als auch in undissoziierter Form vorliegen. Da die undissoziierte Form lipophiler ist, diffundiert sie durch die Zellbarrieren hindurch. Der Ionisationsgrad eines Arzneistoffs in Lösung wird durch seinen pK-Wert und den pH-Wert der Lösung bestimmt. Ein pH-Wert, der die nichtionische Form favorisiert, sollte eine höhere transcorneale Permeabilität zur Folge haben, was auch von Mitra und Mikkelson bestätigt werden konnte [Mitra, 1988]. Sie zeigten, daß die Permeabilität von Pilocarpin durch eine isolierte Kaninchencornea von

$4,72 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}^{-1}$ bei pH 4,67 (99 % des Pilocarpins liegen in ionisierter Form vor) um das Doppelte auf $8,85 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}^{-1}$ bei einem pH-Wert von 7,40 steigt, wenn 84 % des Arzneistoffes in nichtionisierter Form vorliegt. Ähnliche Ergebnisse wurden mit verschiedenen Carboanhydrase-Inhibitoren erhalten [Jankowska, 1986].

Das Auge reagiert auf pH-Wert-Schwankungen sehr empfindlich. Lösungen zwischen pH 6,5 und 9 werden vom Auge toleriert, davon abweichende Lösungen verursachen Schmerzen. Diesbezügliche Versuche von Trolle-Lassen [1958] ergaben, daß Lösungen mit einem pH unter 5,8 und über 11,4 in 99 % der Fälle eine Reizung verursachen, während Lösungen vom pH 7,3 bis 9,7 nur in 1 % der Fälle reizten. Saure Lösungen sind zwar unangenehmer als basische, richten am Auge aber weniger Schaden an.

Eine Untersuchung von 253 Augentropfen-Fertigarzneimitteln von Krämer et al. [1992] ergab, daß 105 Präparate (entsprechend 42 %) außerhalb des Toleranzintervalls von pH 5,8 bis 11,4 lagen.

2.6.1.2. Tonizität

Um unnötige Reizungen zu vermeiden, sollten ophthalmische Formulierungen zur topischen Anwendung annähernd isotonisch mit der Tränenflüssigkeit sein. Die Tränenflüssigkeit ist im Vergleich zum Blutplasma isotonisch oder leicht hyperton (etwa 300 mOsmol/kg bzw. 0,9 bis 1,01 NaCl-Äquivalente [Frauch, 1990]). Von signifikanten inter- und intra-individuellen Unterschieden bezüglich der Tonizität von Tränenflüssigkeiten wurde berichtet; der Bereich liegt zwischen 260 und 440 mOsmol [Benjamin, 1983].

Verschiedene Studien haben belegt, daß das Auge einen beträchtlichen Bereich toleriert, bevor Schmerz oder Unwohlsein auftritt. Trolle-Lassen [1958] stellte in einer statistischen Untersuchung Reizlosigkeit in 99 % der untersuchten Augen mit Natriumchlorid-Konzentrationen zwischen 0,7 und 1,4 % (222 bis 445 mOsmol) fest, während etwa die Hälfte der Versuchspersonen bei 0,4 % oder 1,8 % (127 oder 572 mOsmol) Natriumchlorid Reizungen empfanden und Konzentrationen von 0,1 % bzw. 2,1 % Natriumchlorid von 99 % als schmerzhaft empfunden wurden.

Eine hypertone Lösung wird unverzüglich durch Osmose im Auge verdünnt [Maurice, 1971].

Die Tonizität einer Lösung kann zwischen 0,2 und 2,0 % in NaCl-Äquivalenten oder 220 und 640 mOsmol liegen, ohne daß der Sicherheitsbereich verlassen wird. Die meisten Formulierungen zur Anwendung am Auge, die in der Roten Liste 2000 aufgeführt sind, übersteigen den Anteil von 5 % an aktivem Arzneistoff nicht. Und sogar mit den Zusätzen zur pH-Regulierung, Konservierungsmittel und Tensiden bleiben sie innerhalb dieses Tonizitäts-Bereichs. Nur einige wenige ophthalmische Lösungen (z.B. Pilocarpin 8 % (*Isopto CarpineTM* 8 % Augentropfen, Alcon, USA), Sulfacetamid 10 % (*Albucid[®] liquidum* 10 % Augentropfen, Chauvin Ankerpharm GmbH, Rudolstadt), 15 % und 30 % (*Ak SulfTM* 15 % bzw. 30 % *forte* Augentropfen, Akorn, USA), Phenylephrin 10 % (*Neo-Mydrial[®]* 10 % Augentropfen, Dr. Winzer Pharma GmbH, Olching) haben eine Osmolarität von 700 bis 1000 mOsmol und rufen ein starkes Brennen nach der Applikation hervor.

In der Kategorie der hypertonen Lösungen, die vorübergehend bei Cornea-Ödemen verwendet werden, wird NaCl als osmotisch wirksamer Inhaltsstoff angegeben. Vermutlich wird ein ähnlicher Effekt bei der Behandlung mit anderen hypertonen Lösungen erzielt.

2.6.1.3. Viskosität

Durch eine Viskositätserhöhung topisch applizierter Formulierungen wird erwartet, daß die Abflußgeschwindigkeit reduziert wird, die Verweilzeit sich dadurch im Bindehautsack verlängert, die Penetration durch die Cornea damit steigt und ebenfalls der therapeutische Effekt. Substanzen wie Methylcellulose (MC), Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC), Hydroxypropylcellulose (HPC), Hydroxyethylcellulose (HEC) und Polyvinylalkohol (PVAL) sind in der USP 24 als

viskositätserhöhende Stoffe aufgeführt und werden von Herstellern Augenpräparaten häufig hinzugesetzt [Saettone, 1984].

Über die Verwendung von MC zur Verlängerung der Kontaktzeit wurde vor etwa 50 Jahren von Swan [1945] berichtet. Blaug und Canada [1965] dokumentierten den Zusammenhang zwischen der Viskosität einer MC-Lösung und ihrer Kontaktzeit auf dem Auge bei Mäusen. Die Wirkungsdauer konnte bei Scopolaminhydrobromid verlängert werden, wobei ab einer bestimmten Viskosität jedoch ein Plateau-Effekt eintrat. Zusätzlich zeichnete sich ab, daß bei MC-Zusatz auch eine Verstärkung der Wirkungsintensität erreicht werden konnte. Viskositäten oberhalb 55 cps waren aufgrund der hohen Viskositäten nicht verwendbar, da dies zu Schwierigkeiten bei der Instillation oder zu Verklebungen an der Lidkante führte. Linn und Jones [1968] zeigten am Menschen, daß der Anstieg der Drainagezeit topisch applizierter Fluorescein-Lösung direkt proportional der hinzugefügten HPMC-Konzentration ist. Eine Lösung, die 0,25 % HPMC enthält, erhöht die Abflußzeit (verglichen mit der reinen Lösung) um das 1,5-fache, ein 1 %iger Zusatz bereits um das 3,5-fache. Obwohl eine 2,5 %ige HPMC-Lösung die Abflußzeit um das 4,5-fache verlängerte, verursachte diese Zubereitung solche Irritationen, daß die Zubereitung für die klinische Verwendung unbrauchbar war. Mueller und Deardorff [1956] berichteten, daß, obwohl durch eine 0,25 %ige Homatropinhydrobromid-Lösung keine Zykloplegie (vollständige Lähmung der Akkomodationsmuskeln) oder Mydriasis beim Menschen ausgelöst werden konnte, ein Zusatz von 1 % MC 4000 cps zu dieser Lösung die Akkomodation um 80 % reduzierte und zu einer signifikanten Pupillendilatation führte.

Später zeigten Chrai und Robinson [1974] am Kaninchen, daß sich der Viskositätsanstieg (mit MC) einer Pilocarpin-Lösung über einen Bereich von 1 bis 100 cps in einer signifikanten Reduktion der Abflußratenkonstanten (bis zu 10-fach) und einem Anstieg der Pilocarpin-Kammerwasser-Konzentration (bis 2-fach) äußert. Patton und Robinson [1975] berichteten, daß bei Kaninchen die größte Verbesserung mit PVAL in einem Viskositätsbereich von 1 bis 15 cps beobachtet worden ist. Sie schlugen vor, daß die optimale Viskosität in einem Bereich von 12-15 cps liegen sollte. Der Gebrauch von Formulierungen höherer Viskosität verursacht Irritationen, die Reflexblinzeln und eine vermehrte Tränenbildung auslösen und einen erhöhten Abfluß der Formulierung zur Folge haben.

Saettone et al. [1984] verglichen die Effekte verschiedener Polymere (PVAL, PVP, HPC, CMC) auf eine 0,2 %ige Tropicamid-Lösung am menschlichen und Kaninchenauge. Die Testlösungen waren isoviskos (73 cps). Sie fanden, daß gleiche Viskositäten nicht automatisch eine gleiche Wirkungssteigerung (Messung des Pupillendurchmessers) zur Folge haben. Die PVAL-haltige Lösung hatte die höchste Aktivität: eine 3,7-fache Wirkungssteigerung verglichen mit der reinen wäßrigen Lösung und eine zweifache im Vergleich zu den anderen Polymeren. Der Autor nimmt an, daß der oberflächenaktive Effekt von PVAL, den die anderen getesteten Polymere nicht aufwiesen, verantwortlich für den beobachteten Vorteil des PVALs sein könnte.

Der Vorteil der PVAL-Tropicamid-Formulierung konnte nur bei Menschen beobachtet werden, nicht aber bei Kaninchen. Die niedrigere Blinzelrate und Tränenproduktion der Kaninchen im Vergleich zum Menschen könnte diese Diskrepanz erklären und erhöht die Wichtigkeit klinischer Studien bei der Definition aktueller Vorteile von Modifikationen bei DDS am Auge.

Weiterhin ist es wichtig, die Lipophilie des Arzneistoffs in Betracht zu ziehen. Grass und Robinson [1984] zeigten, daß der Anstieg der Vehikelviskosität von 1 bis 90 cps bei Stoffen mit einem Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten größer 10 zu keinem statistisch signifikanten Anstieg der Wirkstoffkonzentration im Kammerwasser führt. Diese lipophilen Stoffe penetrieren bereits so leicht das Cornea-Epithel, so daß eine längere Verweilzeit einer Lösung am Auge zu keinem signifikanten Anstieg der absorbierten Arzneistoffmenge führt.

Zusammenfassend kann man sagen, daß Viskositätserhöhungen nur begrenzt in der Lage sind, den absorbierten Arzneistoffbetrag signifikant zu erhöhen, weil die Verweilzeit im Bindehautsack nicht bemerkenswert verlängert werden kann.

Diese Beobachtungen gelten auch für ölige Augentropfen.

2.6.1.4. Konservierungsmittel

Wäßrige Augentropfen in Mehrdosenbehältnissen müssen geeignete Zusätze enthalten, um Mikroorganismen abzutöten oder ihr Wachstum zu verhindern, wenn der Behälter während des Gebrauchs geöffnet wird [EUAB, 1997]. Quartäre Ammoniumbasen (Benzalkoniumchlorid), organische Quecksilbersalze (Thiomersal), Parahydroxybenzoate, Chlorbutanol und aromatische Alkohole sind gebräuchliche Konservierungsmittel in Augenarzneien. Eine Übersicht über handelsübliche

Konservierungsmittel, eingesetzte Konzentrationen, Verträglichkeit und auftretende Nebenwirkungen geben Diestelhorst [1990] und Müller-Lierheim [1994]. Für das am häufigsten verwendete Konservierungsmittel Benzalkoniumchlorid (BAK) wurde nachgewiesen, daß es die Permeabilität der Cornea für verschiedene Arzneistoffe erhöht. Eine 50- bis 80-fache erhöhte Permeabilität von Carbaminocholinchlorid durch 0,02 % BAK wurde von O'Brien und Swan berichtet [1942]. Eine 10- bis 18-fache erhöhte Permeabilität von Inulin erhielt Keller mit 0,01 % und 0,02 % BAK [Keller, 1980]. Berichte über eine Erhöhung der Permeabilität von Pilocarpin [Green, 1975] und Fluorescein [Green, 1971; Burstein, 1984] liegen ebenfalls vor.

Bei Kaninchen wirken die in Augentropfen verwendeten Konservierungsmittel sowohl an der Oberfläche nach topischer Applikation als auch nach intravitrealer Applikation auf die Retina toxisch [Dormanns, 1982; Gasset, 1974; Mietz, 1994].

Die klinische Bedeutung der toxischen Effekte und verstärkter Penetration im Zusammenhang mit den Konservierungsmitteln sind jedoch nicht völlig klar.

Die meisten dieser Studien wurden an Kaninchen durchgeführt, die allerdings für eine Augenoberflächendrainage und Permeabilitätsänderungen empfänglicher als Menschen sind [Burstein, 1984].

2.6.1.5. Resorptionspromotoren

Nicht nur diverse Konservierungsmittel, sondern auch andere Substanzen sind in der Lage, die Permeabilität von Epithelgeweben zu verändern. Tenside (z.B. Polidocanol, Brij[®] 78, Polysorbat[®] 80) verändern die physikalischen Eigenschaften der Zellmembranen, z.B. durch Entfernen der Phospholipide bis zur Membransolubilisation. EDTA hingegen lockert die 'tight junctions' zwischen den Epithelzellen und erleichtert dadurch den parazellulären Transport.

EDTA, Taurocholsäure, Caprinsäure und Saponin wurden von Sasaki [1995] auf ihre Promotoreigenschaften bei der Anwendung von beta-Blockern geprüft. Signifikante Anstiege bezüglich der Cornea-Penetration waren in-vitro im Zweikammersystem zu verzeichnen, wobei die hydrophilen Komponenten besonders hervortraten. Die Conjunctiva-Penetration wurde nur gering erhöht. Interessant ist, daß z.B. Saponin und Caprinsäure die Cornea-Durchlässigkeit erhöhten, jedoch nicht die der Conjunctiva. Taurocholsäure zeigte ein entgegengesetztes Verhalten. Saponin verursachte leichte Irritationen.

Diese Ansätze eröffnen die Möglichkeit, daß der Diffusionsweg eines Arzneistoffes durch Zusatz entsprechender Faktoren nach Wunsch beeinflußt werden könnte.

2.6.1.6. Tenside

Die Verwendung oberflächenaktiver Substanzen ist bei Augenpräparaten sehr eingeschränkt. Generell gilt für die Reihenfolge der Toxizität: Anionisch > Kationisch > Nichtionisch [Hecht, 1990]. Diverse nichtionische Tenside werden in relativ geringen Konzentrationen eingesetzt, um z.B. Steroide in Suspensionsaugentropfen besser zu dispergieren oder sogar klare Lösungen zu erhalten. Üblicherweise werden Polysorbat 20 und 80, Tyloxapol (4-Isooctylpolyoxyethylenformaldehyd-Polymer) und Polyoxyl-40-stearat verwendet. Um den gewünschten Effekt zu erzielen, wird möglichst die niedrigste Konzentration verwendet. Bei ihrem Einsatz muß somit berücksichtigt werden, daß sie eventuell die Effektivität von Konservierungsmitteln beeinflussen, Bindungen mit Makromolekülen eingehen können und Irritationen am Auge erzeugen.

2.6.1.7. Antioxidantien

Dies sind Zusätze, die den Zerfall des Wirkstoffes durch einen speziellen Mechanismus verhindern oder verzögern sollen. Antioxidantien sind gängige Stabilisatoren bei einigen Augenpräparaten, hauptsächlich bei solchen, die Epinephrinsalze enthalten. Zu den Antioxidantien zählen u.a. Ascorbinsäure, Acetylcystein, Natriumbisulfit und 8-Hydroxychinolin [Hecht, 1990].

2.6.1.8. Bioadhäsive Zusätze

Eine weitere Möglichkeit, die Kontaktzeit am Auge zu verlängern, ist der Einsatz von Polymeren, die aufgrund nicht-kovalenter Bindungen an der Cornea-Oberfläche über einen längeren Zeitraum haften bleiben (bioadhäsive Polymere). Park und Robinson [1984] untersuchten eine große Anzahl wasserlöslicher und -unlöslicher ionischer und nichtionischer Polymere auf ihre Bindungsaffinität zu Mucin und Epithelienoberflächen. Ausgehend von dieser Arbeit kamen sie zu dem Schluß, daß wasserunlösliche Polymere die größte Kapazität besitzen, um effektive Freisetzungssysteme entwickeln zu können. Typischerweise handelt es sich dabei um leicht quervernetzte Acrylsäure-Polymere mit einer großen Wasserbindungskapazität.

Hui et al. [1985] konnten anhand von Bioverfügbarkeitsstudien an Kaninchen nachweisen, daß durch den Zusatz von Acrylsäure-Derivaten die Progesteron-Konzentration im Auge signifikant über einen längeren Zeitraum erhöht werden konnte. Krishnamoorthy [1993] zählt einige mucoadhäsive Polymere nach ihrer Bindungsstärke auf, wobei z.B. Carboxymethylcellulose (CMC), Carbopol, Polycarbophil und Natriumalginat eine sehr gute und Povidon (PVP) nur sehr geringe Adhäsivität besitzt. Lemp und Szymanski [1975] bestimmten das Ausmaß der Cornea-Adsorption wasserlöslicher Polymere auf der Epitheloberfläche. Dabei zeigten 1,4 % Polyvinylalkohol (PVAL), 0,5 % Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) und 2 % Hydroxyethylcellulose (HEC) eine beträchtliche Adhäsivität an Mucin. Da jedoch nur geringfügige Verbesserungen der Bioverfügbarkeit mit diesen Stoffen bisher erreicht worden sind, sind diese adsorbierten Substanzen entweder nicht in der Lage den Arzneistoff zu halten oder sie werden wieder schnell von der Oberfläche mit der Tränenflüssigkeit weggespült.

Saettone [1989] untersuchte verschiedene Polymere (Hyaluronsäure (Natriumsalze, Ethylester), Carbopol 910, 934, 940, 941) auf ihren Einfluß auf den pharmakologischen Effekt von Pilocarpin und Tropicamid im Kaninchenauge. Aus dieser Studie trat Hyaluronsäure als vielversprechendstes Agens hervor. Die Daten jedoch lassen erkennen, daß letztendlich die physiko-chemischen Eigenschaften des Arzneistoff selbst einen großen Einfluß auf die Effektivität hat. 1994 erweiterte Saettone die Liste der untersuchten Polymere um Polygalacturonsäure, Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat, Heparansulfat und Mesoglycan.

2.6.1.9. Weitere Zusätze

Viel Hoffnung wird zur Zeit auf den Einsatz von Cyclodextrinen gelegt. Sie sollen einen positiven Einfluß auf die Löslichkeit, die Stabilität und die Bioverfügbarkeit der eingesetzten Arzneistoffe haben. Freedman und Kollegen [1993] erreichten mit Pilocarpinlösungen, die einen 5 %igen Zusatz Hydroxypropyl-beta-Cyclodextrin enthielten, eine verstärkte Pupillenreaktion. Dieses Ergebnis ließ sich nicht lediglich mit der erhöhten Viskosität der Zubereitung erklären. Auch das Epithel wurde durch diesen Stoff nicht beschädigt. Ammar et al. [1998] untersuchten Interaktionen zwischen Azetazolamid, einem in Wasser praktisch unlöslichem Glaukommittel, und Beta-Cyclodextrin, Dimethyl-beta-Cyclodextrin und Trimethyl-beta-Cyclodextrin. Die

Cyclodextrine erhöhten die Löslichkeit des Wirkstoffes und verbesserten seine Bioverfügbarkeit am Kaninchenauge.

Rettkowski und Keipert [2000] beschrieben, daß in Abhängigkeit von Typ und Konzentration des eingesetzten Cyclodextrins die Hydrolyse von Dipivefrin (Prodrug, Dipivalinester des Epinephrins) im Vergleich zur Pufferlösung signifikant reduziert werden konnte. Thorgeirsson [2000] konnte mit dexamethasonhaltigen Beta-Cyclodextrinzubereitungen an Probanden keine unerwünschten Nebenwirkungen nachweisen, wobei die Wirksamkeit allerdings nicht untersucht wurde.

2.6.1.10. Tropfengröße

Augentropfen gehören zu den wenigen Arzneiformen, die ohne Kenntnis des genauen Gewichts oder Volumens der Einzeldosis verabreicht werden. Trotzdem hat sich diese unpräzise Dosiermethode bisher etablieren können.

Der Bindehautsack des Auges enthält im Normalfall nur etwa 7 µl Tränenflüssigkeit und kann im Extremfall kurzfristig bis 30 µl aufnehmen, wenn das Lid nicht geschlossen wird. Das Tropfenvolumen kommerzieller Augentropfen liegt in einer Größenordnung von 25 bis 56 µl mit einem Durchschnittswert von 39 µl [Lederer, 1986]. Nach Fiscella [1998] liegt der Bereich sogar zwischen 25 und 70 µl.

Die Tropfengröße ist abhängig von den physiko-chemischen Eigenschaften der Formulierung, besonders der Oberflächenspannung, dem Design und der Geometrie der Flasche und im Besonderen von der Tropferspitze, dem Winkel, in dem getropft wird, wie die Flasche gehalten wird, das heißt also auch individuell von dem Patienten [Van Santfliet, 1998; 1999]. Einen nicht zu unterschätzenden Einfluß hat die Größe des applizierten Tropfens sowohl auf die Wirkung des Arzneimittels als auch auf die systemischen Nebenwirkungen.

Eine Vorrichtung zur Bestimmung der Tropfenmasse entwickelten Van Santfliet und Ludwig [2000]. Sie verglichen die Ergebnisse in Abhängigkeit von Flaschendesign und Tropfer mit dem Tropfverhalten von jungen gesunden Probanden und älteren Patienten und stellten erhebliche Unterschiede fest. Unter anderem ergab ein schnelles Zusammendrücken der Flasche ebenso wie ein größerer Außendurchmesser der Tropferspitze schwerere Tropfen.

Zwar kann das Tränenvolumen ohne zu Blinzeln bis auf 30 µl ansteigen, überschüssige Flüssigkeit wird jedoch entweder über den Tränennasenkanal abgeleitet oder läuft über

den Lidrand heraus. Die Anwendung von Augentropfen führt deshalb zu einer schnellen Entfernung der wirksamen Bestandteile vom Auge. Typischerweise werden 80 bis 90 % in der ersten Minute ausgespült [Shell, 1982]. Im Tränennasenkanal wird der Arzneistoff systemisch resorbiert und kann Nebenwirkungen hervorrufen. Dies machte sich besonders bei dem steigenden Einsatz der Betablocker (z.B. Timolol) durch auftretende Bradykardien, Bronchialspasmen und sogar Herzversagen bemerkbar [Nelson, 1986; s.a. Kap. 2.1]. Chrai [1974] und Mitarbeiter zeigten am Kaninchenaugenauge, daß auf der einen Seite durch ein größeres Tropfenvolumen zwar kurzfristig höhere Wirkstoffkonzentrationen im Tränenfilm erreicht werden können, auf der anderen Seite aber ebenfalls der Abfluß über den Tränennasenkanal und damit die systemische Resorption erhöht ist. Als Konsequenz schlagen sie vor, die Arzneistoffkonzentration der zu applizierenden Lösung zu erhöhen und das Volumen des Tropfens zu reduzieren. Da das Auge hinsichtlich der Tonizität der Lösungen einen recht weiten Spielraum hat, dürfte die erhöhte Konzentration bezüglich dieses Punktes kein Problem darstellen.

Bei Mehrfachapplikationen ist bei Kaninchen ein Zeitintervall von 5 Minuten für eine optimale Wirkung einzuhalten, bei Menschen ist die Spanne vermutlich etwas niedriger. In der gängigen Literatur gibt man heute einen Zeitraum von 3 bis 5 Minuten an.

Brown und Mitarbeiter [1985] entwickelten eine Tropferspitze, mit der das Volumen der Flüssigkeit, die in den Bindehautsack appliziert wird, auf 11 µl Flüssigkeit reduziert werden kann. Martini und Mitarbeiter [1997] verwendeten für eine effektive Volumenreduktion von 5 µl eine Sprühvorrichtung. Sie wiesen für dieses Pilocarpinspray bei Kaninchen den gleichen miotischen Effekt wie nach Gabe von 30 µl Augentropfen nach. Beide Zubereitungen besaßen die gleiche Ausgangskonzentration.

2.6.1.11. Applikationshilfen

Üblicherweise werden Augentropfen in den unteren Bindehautsack appliziert. Für eine ordnungsgemäße Applikation muß der Patient den Kopf zurücklegen, an die Decke blicken, das Unterlid leicht herabziehen und solange auf die Flasche drücken, bis ein einzelner Tropfen herab fällt. Bei der Applikation ist zu beachten, daß die Hände gewaschen sind. Die Tropferspitze darf weder das Auge noch das umliegende Gewebe berühren, das Auge darf nicht zugekniffen werden und die Lider dürfen nicht flattern. Der Tropfen sollte in den Bindehautsack und nicht auf den Augapfel plaziert werden. Nach erfolgter Applikation sollte das Auge für einige Zeit geschlossen bleiben.

Die meisten Patienten entwickeln jedoch nach einiger Zeit ihre eigene Methodik. So wird z.B. die Tropferspitze auf die Lidkante aufgesetzt und die Flasche bis zur vermeintlich ausreichenden Menge zusammengedrückt. Als Hinweis, daß genügend Flüssigkeit appliziert worden ist, dient meist das Überlaufen des Auges. Allerdings haben besonders ältere, arthritische, schlecht sehende und glaukomatöse Patienten oft erhebliche Probleme, die Tropfen selbst zu applizieren und benötigen meist eine zweite Person dafür. Kass et al. [1982] untersuchten das Applikationsverhalten von Augentropfen an 141 Patienten. Kriterien waren u.a. die Anzahl der Tropfen, die aus dem Behälter gedrückt wurden, die in den Bindehautsack gelangten, die Position, die der Patient zum Tropfen einnahm, ob der Patient sein Auge offen hielt oder ob der Tropfer das Auge oder umliegende Gewebe berührte. Sie mußten feststellen, daß fast die Hälfte aller Patienten versuchten, zwei oder mehr Tropfen in den Bindehautsack einzubringen, wobei über 70 % der Gruppe mindestens einen Tropfen neben das Auge applizierte. 49,6 % der Patienten berührten dabei den Augapfel oder die Lider.

Tiefere Einblicke in das Tropfverhalten (Compliance) lieferte ein speziell dafür entwickeltes elektronisches System [Kaas, 1984; 1986; 1987].

Die Prozedur ist besonders für Kinder schwierig. Hecht [1990] gibt für solche Fälle einen allerdings etwas seltsam anmutenden Tip: 'Damit diese Aufgabe einfacher ist, sollte sich das Elternteil auf den Boden oder eine ebene Oberfläche setzen, wobei der Kopf des Kindes fest zwischen die Oberschenkel plaziert wird. Die Beine werden gekreuzt über den unteren Rumpf und die Beine des Kindes gelegt. Auf diese Weise hat das Elternteil die Hände frei, um das Lid herab zu ziehen und den Tropfen zu applizieren.' Ob bei dieser Methode die Applikation tatsächlich besser durchführbar ist, bleibt zweifelhaft.

Strasser präsentiert in einer Firmenbroschüre für *Chibro-Timoptol*[®] einen sogenannten Augenspiegel als Applikationshilfe für Augentropfen. Es handelt sich dabei um einen Spiegel mit einer Haltevorrichtung für das Fläschchen, so daß der Tropfvorgang vom Patienten verfolgt werden kann. In einer Untersuchung gaben geübte Patienten an, daß dies keinen Vorteil mit sich bringe. Keine Hilfe stellte er bei weitsichtigen Patienten dar, bewährte sich aber bei Anfängern.

Ein weiteres Hilfsmittel zur leichteren Applikation von Augentropfen ist die sogenannte *Drip-Aid*[®] (Abb. 2.4.). *Drip-Aid*[®] wird an die Tropfflasche montiert; mit der einen Hand wird das Lid herabgezogen, *Drip-Aid*[®] auf die Umgebung des Auges aufgesetzt und ein

Tropfen kann sicher appliziert werden. Von Nachteil ist, daß diese Vorrichtung lediglich auf Apothekentropfflaschen und nicht auf industrielle Versionen paßt.

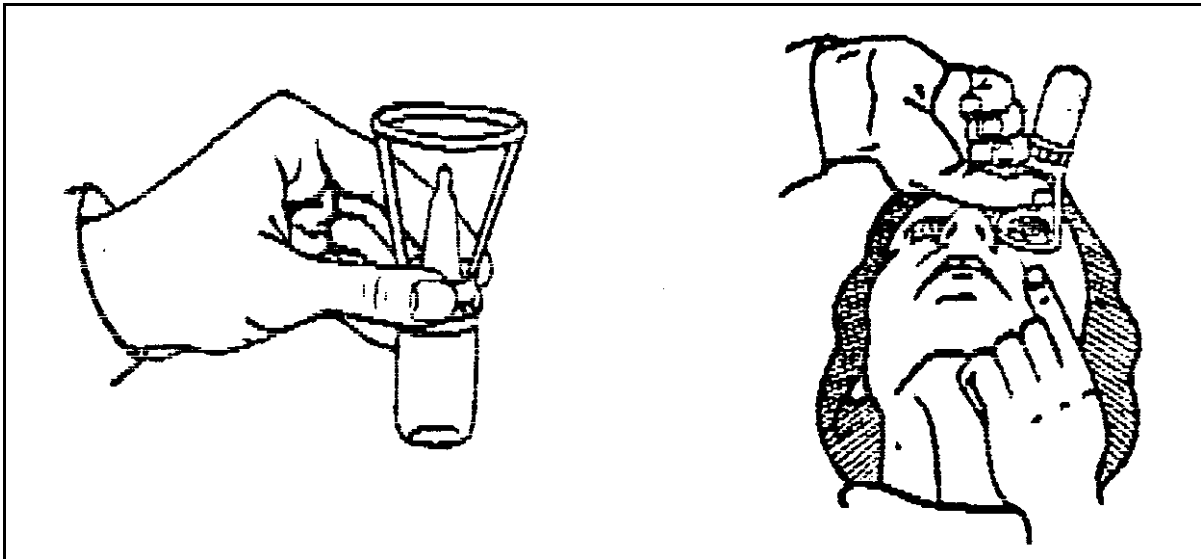


Abb.2.4: Ein Hilfsmittel zur leichteren Applikation von Augentropfen ist das sogenannte *Drip-Aid*[®]

Eine ähnliche Vorrichtung existiert in Schweden unter dem Namen *Sonyl Novum*[®] Tropfbehälter [Frauch, 1990].

Busche und Gramer [1997] untersuchten in einer Studie Compliance und Tropfverhalten von Glaukompatienten. Trotz einer vorangegangenen Unterweisung zum richtigen Tropfverhalten berührten immer noch über 40 % der Probanden (vorher: 76 %) bei der Applikation mit dem Tropfer das Auge. Mit einer Tropfhilfe, Autodrop, gelang es zwar 81 %, sich den Tropfen korrekt zu verabreichen, allerdings lag die Akzeptanz lediglich bei 46 %. 16 % der Patienten waren nicht in der Lage, in die Mitte konzentrischer Kreise (Innendurchmesser: 1,5 cm, entspricht in etwa einem Auge), die auf einer Vorlage gezeichnet waren, zu treffen.

Hinsichtlich der ohnehin bereits schwierigen Tropfmethodik sind Kombinationspräparate für eine bessere Compliance wünschenswert.

2.6.1.12. Pulver zur Herstellung von Lösungen

Einige Augenarzneistoffe werden als sterile Pulver hergestellt, um vor der Abgabe an den Patienten durch den Apotheker aufgelöst zu werden. Zu diesen Stoffen gehören unter anderem Aceclidin (*Glaucoat*[®] Augentropfen, Chibret Pharmazeutische GmbH, Haar), Pirenoxin (*Clarvisor*[®] Augentropfen, Alcon Pharma GmbH, Freiburg), Erythromycin/Colistin (*Ecolicin*[®] Augentropfen, Chauvin Ankerpharm GmbH, Rudolstadt) und Dapiprazol (*Remydrial*[®] Augentropfen, Dr. Winzer Pharma GmbH, Olching).

Das sterile Pulver wird üblicherweise durch Lyophilisation hergestellt und wird getrennt vom Lösungsmittel verpackt. Die Stoffe haben auf diese Weise eine wesentlich längere Halbwertszeit als in Lösung. Als inertes Füllmittel wird meistens Mannitol verwendet. Die Restfeuchte des Lyophilisates liegt zwischen 1 und 2 %.

Als Alternative zur Lyophilisation wird auch die Vakuumtrocknung bei nicht wässrigen Lösungsmitteln verwendet [Hecht, 1990].

2.6.2. Suspensionsaugentropfen

Suspensionsaugentropfen sind sterile Formulierungen, in denen ein schwer löslicher Arzneistoff in Form fester Partikel in einem flüssigen Vehikel dispergiert ist. Weil die kleinen Arzneistoff-Partikel länger als die wässrige Lösung im Bindehautsack verbleiben, wird die Arzneistofffreisetzung einer Suspension durch zwei aufeinanderfolgende Phasen charakterisiert: die erste, schnelle Freisetzung des bereits gelösten Arzneistoffes, die zweite, langsamere, verlängerte Freisetzung aufgrund der Auflösung der zurückgehaltenen Partikel.

Um mit einer Suspension eine höhere Bioverfügbarkeit als mit einer gesättigten Lösung zu erhalten, muß sie eine hohe Auflösungsrate im Tränenfilm besitzen [Sieg, 1975].

Die Bioverfügbarkeit topisch applizierter Suspensionen korreliert mit der Partikelgröße [Schoenwald, 1980]: (a) die verfügbare Auflösungsfläche und somit die Auflösungsgeschwindigkeit hängt von der Partikelgröße ab; (b) größere Partikel können zu einer erhöhten Reizung und dadurch durch eine erhöhte Tränensekretion zu einem Wirkstoffverlust über den Tränennasenkanal führen. Schoenwald [1980] erzielte im Kaninchenauge mit 6 µm großen Dexamethasonpartikeln im Vergleich zur 22 µm-Suspension sowohl wesentlich höhere Kammerwasserkonzentrationen (mehr als doppelt so hoch) als auch höhere Werte in der Hornhaut des Kaninchenauges. Auf der

anderen Seite werden kleinere Wirkstoffteilchen im Vergleich zu größeren wieder leichter aus dem Auge herausgespült. Sieg [1980] postuliert somit für Suspensionsaugentropfen zwei Schwellenwerte hinsichtlich der Partikelgröße: Einen unteren Grenzwert, um die Arzneistoffpartikel über einen längeren Zeitraum zurückzuhalten, und einen oberen, um die Irritationen am Auge möglichst gering zu halten.

Die Verwendung von Arzneistoffen in mikronisierter Form mit einer Partikelgröße $<10\ \mu\text{m}$ sollte Unbehagen und Reizerscheinungen minimieren [Sieg, 1975].

Nach EuAB [1997] dürfen Partikel in Suspensionsaugentropfen lediglich eine maximale Größe von $90\ \mu\text{m}$ aufweisen. Ein unterer Grenzwert wird nicht angegeben. In $10\ \mu\text{g}$ Substanz dürfen höchstens 20 Teilchen oberhalb $25\ \mu\text{m}$ liegen, 2 Teilchen dürfen größer als $50\ \mu\text{m}$ sein. Unter den bereits oben erläuterten Gesichtspunkten sind diese Grenzwerte im Grunde zu hoch angesetzt, auch wenn mit ihnen eine Konglomeratbildung berücksichtigt wird.

Formulierungsfaktoren wie pH-Wert, Pufferkapazität, Tonizität und Viskosität beeinflussen wie bei Lösungen die Bioverfügbarkeit der Suspensionen.

Da die Sedimentation das Hauptproblem bei diesen Suspensionsaugentropfen ist, müssen sie vor Gebrauch resuspendiert werden. Der Resuspendierungsgrad handelsüblicher Formulierungen schwankt beträchtlich unter Patienten und Präparaten [Apt, 1979].

Das Arzneibuch fordert zwar, daß Sedimente aufschüttelbar sein müssen, macht aber keine Angaben darüber, wie das zu prüfen ist. Kwon [1996] und Deicke [1999] entwickelten eine spezielle, mechanische Schüttelapparatur, um die Redispergierbarkeit von Suspensionsaugentropfen vergleichbar machen zu können. Untersuchte Dexamethason-Handelspräparate zeigten erhebliche Schwankungen in der Dosis aufgrund unzureichender Aufschüttelbarkeit.

2.6.3. Augensalben

Für Salben gelten die gleichen Voraussetzungen wie für Suspensionen und Lösungen. Die im Vergleich zu Tropfen höhere Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen hat mehrere Gründe: Es können höhere Arzneistoffkonzentrationen am Auge erzielt werden, die Kontaktzeit am Auge wird verlängert, die Verdünnung durch Tränenflüssigkeit ist begrenzt und der Abfluß durch den Tränennasenkanal wird erschwert. Während die physiologische Ersatzrate der Tränen 16 %/min beträgt, liegt sie für Stoffe, die in Salben in den Bindehautsack appliziert werden, bei lediglich 0,5 %/min [Hardberger, 1975; Shell, 1987].

Die Depotwirkung ist abhängig von dem Verteilungskoeffizienten des Arzneistoffs. Die Bioverfügbarkeit eines wasserlöslichen Stoffes wie Pilocarpin als 0,01 M-Salbe (Vaseline) resultiert in einer 4-fach stärkeren Wirkung im Vergleich zu einer 0,01 M-Lösung. Die Bioverfügbarkeit lipidlöslicher Stoffe, z.B. Fluorometholon, in einer Formulierung als Salbe ist mehr als 8-fach höher als bei der Behandlung mit einer gesättigten Fluorometholon-Lösung [Sieg, 1975; 1979].

Auf der anderen Seite weist Riegelman [1974] darauf hin, daß die Löslichkeit der meisten Stoffe in handelsüblicher Vaselinegrundlage sehr gering ist. Deshalb wird der Großteil dieser hydrophilen Arzneistoffe in der Salbe in Form von Mikrokristallen vorliegen. Diese müssen erst an die Grenzfläche Salbengrundlage/Tränenfilm gelangen, um dort in Lösung gehen zu können und ihre Wirksamkeit zu entfalten. Unter dem Gesichtspunkt, daß ein niedriger Tränenabfluß vorliegt (z.B. beim Schlafen), kann es sein, daß der Arzneistoff den Tränenfilm mit einer niedrigeren Rate erreicht, als es therapeutisch erforderlich wäre, was bei verschiedenen Neomycin-Zubereitungen (5 mg/g) eingetreten ist. Aus diesem Grund können Salben gegenüber Lösungen oder Suspensionen nicht immer vorteilhaft sein [Riegelman, 1974].

Der größte Nachteil von Augensalben ist die Sichtbeeinträchtigung nach erfolgter Applikation. Aus diesem Grund werden sie meist vor dem Schlafengehen verwendet. Hinzu kommen die Schwierigkeiten einer korrekten Dosisapplikation, die im Vergleich zu den Tropfen noch schwieriger ist, und die anfänglich verzögerte Wirkstofffreisetzung. Wasserhaltige Salbengrundlagen tendieren zu einer Phasentrennung. Steigende Temperaturen können ein Schmelzen zur Folge haben und/oder Inhomogenitäten innerhalb der Salbentube.

2.6.4. Emulsionen

Emulsionen sind definitionsgemäß Zwei-Phasen-Systeme, wobei eine flüssige Phase in der anderen, ebenfalls flüssigen Phase, dispergiert ist. Oberflächenaktive Substanzen sind zur Stabilisierung ebenso notwendig wie Konservierungsmittel gegen den mikrobiellen Befall [EUAB, 1997].

Emulsionen können diverse Vorteile bieten: die Möglichkeit, fettlösliche Stoffe in einer lösungsähnlichen Form zu applizieren, eine erhöhte Bioverfügbarkeit, den Schutz hydrolyse- und oxidationsempfindlicher Stoffe und eine erhöhte Patientencompliance, wenn der Stoff selbst sehr reizend ist (s.a. Kap. 2.3.). Die Pharmaindustrie ist allerdings sehr zurückhaltend, da es sich bei Emulsionen um sehr komplexe Zubereitungen handelt.

Meistens werden Emulsionen, wie bereits erwähnt, als Salben verwendet, selten jedoch in flüssiger Form. Studien von Stenbeck-Gjertz [1954] mit O/W-Emulsionen zeigten, daß die Zubereitungen das Auge zu sehr reizten. Hauptursache war das zur Stabilisierung verwendete ionische Tensid.

Als eine weitere Stabilisierungsmöglichkeit wird zur Zeit amphiphile Stärke (chemisch modifizierte Stärke, bei der an die Hydroxylgruppen des Polymers Octenylsuccinat-Ketten eingeführt wurden) diskutiert [Baydoun, 2000]. Sie ist gut wasserlöslich und dient einerseits zur Herstellung stabiler Emulsionen und ist andererseits in der Lage, schlecht lösliche Arzneistoffe zu solubilisieren. Bei den Zubereitungen konnte keine hämolytische Aktivität auf Zellen nachgewiesen werden.

Verhältnismäßig neu sind Submikroemulsionen (SME) mit einer Tröpfchengröße von 0,1-0,3 µm. Ihre Tröpfchengröße ist kleiner als die bei klassischen Makroemulsionen, aber größer als bei den typischen Mikroemulsionen. Zur Stabilisierung werden nichtionische Tenside verwendet. Im Vergleich zu wäßrigen Lösungen und Suspensionen konnte eine verbesserte Bioverfügbarkeit, Wirkung und Reizreduktion festgestellt werden (z.B. bei Pilocarpin). Grund für die verbesserte Bioverfügbarkeit ist vermutlich ein längere Kontaktzeit [Beilin, 1995]. Die Begründung für die Reizminderung ist noch nicht bekannt.

Die zweimalige tägliche Applikation von Pilocarpin SME 2 % hatte bei gesunden Probanden die gleiche Wirkung (IOP-Senkung, Miosis) wie eine viermal tägliche Gabe

von Pilocarpin-Tropfen (2 %). Stärkere Nebenwirkungen traten nicht auf [Melamed, 1993; Garty, 1994].

2.6.5. Gele

Die schlechte Patientencompliance bei Salben führte dazu, daß im Laufe der Jahre wäßrige Gele entwickelt wurden, um die Bioverfügbarkeit von hydrophilen und lipophilen Arzneistoffe zu erhöhen.

Die Möglichkeiten zur Herstellung von Gelen ist vielfältig. Typischerweise bestehen sie aus wäßrigen Zubereitungen mit Polymerzusätzen wie PVAL, Polyacrylamid (PA), Polymethylvinyl-ethermaleinanhidrid, Poloxamer 407, Carbopol, HEC, EHEC oder HPC. Sie werden in verschiedenen Konzentrationen und Molekulargewichten eingesetzt, wobei in vielen Literaturstellen jedoch keine konkreten Angaben zu den Polymerqualitäten gemacht werden.

Außer dem Poloxamer, das bei Raumtemperatur flüssig ist und bei Körpertemperatur ein Gel bildet, sind alle diese Gele von der Konsistenz her mit Salben vergleichbar. Der Übergang zwischen viskositätserhöhenden Zusätzen (s.a. Kap. 2.6.1.3) und einem Gel ist fließend, und es ist schwer, eine genaue Trennung zu vollziehen.

Verschiedene Arzneistoffzubereitungen wurden auf ihre Wirksamkeit getestet. Miller [1982] untersuchte die Wirkung von Pilocarpin in einer 25 %igen Poloxamer 407-Zubereitung am Kaninchenauge. Der Einfluß von Pilocarpin [March, 1982; Saettone 1982] und Tropicamid [Saettone, 1980] in verschiedenen Polymergelen wurde miteinander verglichen. Ähnliche Untersuchungen existieren für Steroide und Anästhetika. Im Durchschnitt wurde eine 3- bis 5-fache Wirkungssteigerung dokumentiert. Die Einzelheiten können den Literaturstellen entnommen werden.

Der Mechanismus der Arzneistofffreisetzung ist eine Kombination aus Diffusion und Erosion der Geloberfläche. Aufgrund der hydrophilen Natur der Gele diffundieren die Tränen leicht in das Gel und lösen den wasserlöslichen Arzneistoff wie z.B. das Pilocarpinsalz heraus. Das Gel wird währenddessen immer stärker hydratisiert, geht in ein Sol über und wird schließlich aus dem Auge über den Tränennasenkanal ausgeschwemmt.

Vermutlich kommt es durch die schnelle anfängliche Freisetzung eines hohen Wirkstoff-Anteils zu einer Sättigung des Cornea-Gewebes, welches deshalb als Arzneistoff-

Reservoir fungieren kann. Dies ist besonders für eine abendliche Anwendung vorteilhaft, weil die Wirkung über Nacht anhält.

2.6.5.1. Piloplex® Gel

Bei *Piloplex*® handelt es sich um ein disperses System, welches ein Polymer-Pilocarpin-Salz enthält. Das Polymer ist ein Copolymer aus Laurylmethacrylat und Acrylsäure. Pilocarpin liegt in Form des Aminsalzes mit einer Carboxylgruppe vor. Tierversuche am Kaninchen zeigten, daß der augeninnendrucksenkende Effekt von *Piloplex*® (3,4 % Pilocarpin) bei einer zweimal täglichen Gabe dem einer 2%igen Pilocarpinhydrochloridlösung bei einer viermal täglichen Applikation entspricht. In klinischen Studien wurde die verlängerte Wirkung von *Piloplex*® im Vergleich zu 2 %igen wäßrigen Lösungen bestätigt [Ticho, 1974, 1979; Duzman, 1982; Klein, 1985]. *Piloplex*® ist in Portugal als 3,4 %ige Zubereitung unter diesem Namen heute auf dem Markt.

2.6.5.2. Pilopine® HS Gel

Ein Carbopol 940-Gel (ein quervernetztes Polymer der Acrylsäure) wurde von der Firma Alcon für die einmalige, tägliche Applikation von Pilocarpin entwickelt. Bei Kaninchen wurde mit *Pilopine*® HS eine größere Effektivität im Vergleich zu den wäßrigen Tropfen erreicht, obwohl dies bei Rhesusaffen nicht bestätigt werden konnte [Cheeks, 1989]. Klinische Studien zeigten, daß diese Formulierung als Pilocarpin-Ein-Tages-Dosis zur IOP-Kontrolle durchaus geeignet ist [March, 1982; Samples, 1989]. Heute ist *Pilopine*® HS 4 % unter diesem Namen in den USA und Kanada erhältlich.

2.6.5.3. In-Situ gelbildende Systeme

Hierbei entsteht das Gel erst bei dem Kontakt der Augentropfenlösung mit der Tränenflüssigkeit. Diese Systeme kombinieren den Vorteil einer wäßrigen Lösung mit der viskositätsbedingten längeren Verweildauer am Auge. Die Gelbildung kann durch verschiedene externe Faktoren ausgelöst werden, wie z.B. durch

- Temperaturveränderungen
- pH-Wert-Veränderungen
- Ionenzusätze

2.6.5.3.1. Ionenaktivierte Gelbildung

Gelrite[®], entwickelt von Merck Sharp und Dohme (MSD)-Chibret, ist eine niedrig-acetylierte Gellan-Verbindung. Es handelt sich dabei um ein Polysaccharid, das von einer *Pseudomonas*-Art gebildet wird [Sintzel, 1996]. Es gehört zur gleichen Gruppe wie die Dextrane und Xanthane. Bei Anwesenheit ein- und mehrwertiger Ionen entsteht ein klares Gel. Die Natriumionenkonzentration in der Tränenflüssigkeit reicht für die Gelbildung im Bindehautsack aus, auch wenn nur eine geringe Polymerkonzentration verwendet wird (0,6 %).

Von dem Gel wurde berichtet, daß die Bioverfügbarkeit (u.a. Vergleich der Kammerwasserkonzentrationen) von Timololmaleat und Pilocarpin in Kaninchen im Vergleich zu wäßrigen Lösungen doppelt so groß war [Rozier, 1989; Chastaing, 1995]. Gunning [1993] hingegen konnte nur eine geringe Wirkungsverlängerung bei der Verwendung von Sezolamid und Dorzolamid (Carboanhydrasehemer) in einem *Gelrite*[®]-Vehikel feststellen.

Nelson [1996] untersuchte die Verträglichkeit von Timololmaleat in *Gelrite*[®] (*Timoptic-XE*[®] Augengel, Merck & Co, USA) im Vergleich zu entsprechenden Augentropfen. Unmittelbar und eine Minute nach der Applikation waren Sichtbehinderung und Tränenbildung bei der Polymerzubereitung signifikant stärker als bei den konventionellen Augentropfen. Allerdings hielten diese Effekte nur kurz an und waren vorübergehender Natur. Nach 15 min ließen sich keine Unterschiede mehr nachweisen.

2.6.5.3.2. pH-aktivierte Gelbildung

Dieses wäßrige System besteht aus einem anionischen Polymer in Form einer Nanodispersion mit einer sehr niedrigen Viskosität und einem pH-Wert von ≤ 5 . Bei Kontakt mit dem Tränenfilm, der einen pH-Wert von 7,2 - 7,4 besitzt, agglomerieren die Partikel, koazervieren und bilden ein Gel. Der Gelbildungsprozeß wird durch die Neutralisation der Säuregruppen der Polymerkette und Wasserabsorption ausgelöst, was zu einem Anschwellen der Partikel führt. Der Kaninchentest bestätigte für 2% Pilocarpin in Celluloseacetatphthalat Latex (CAP), daß der Arzneistoffgehalt, der an der Augenoberfläche zurückgehalten wurde, 3,8 mal so groß war wie der einer 2%igen Lösung [Gurny, 1985]. Pharmakokinetische Studien von Pilocarpin im Kammerwasser

von Kaninchen zeigten, daß eine CAP-Pilocarpin-Formulierung eine doppelt so hohe Bioverfügbarkeit wie die wäßrige Pilocarpin-Lösung hatte.

Kumar [1995] untersuchte den Einsatz von Carbomeren. Problematisch stellte sich die Neutralisation des großen Anteils der enthaltenen Polyacrylsäure mit der Tränenflüssigkeit dar, so daß ein viskoses Gel entstehen konnte. Als Lösungsansatz schlug er einen Zusatz von HPMC vor, so daß der Säureanteil verringert werden könnte, die Gel-Eigenschaften aber erhalten bleiben würden.

2.6.5.3.3. Temperaturempfindliche Gele

Miller und Donovan [1982] verwendeten ein 25 %iges Poloxamer 407-Gel, welches Thermogelierung zeigt. Das bedeutet, daß die Viskosität mit steigender Temperatur ebenfalls ansteigt, von der Umgebungstemperatur (etwa 25 °C) auf Augenoberflächentemperatur (etwa 32 bis 34 °C). Die Fläche unter der Pupillendurchmesser/Zeitkurve eines Pilocarpinnitrats-Gel war doppelt so groß wie die einer wäßrigen Lösung vergleichbarer Konzentration.

Siebenbrodt und Keipert [1992] untersuchten verschiedene Poloxamer-Typen (P85, F68, F127, F108) auf ihre Gelbildungseigenschaften bei 25 °C und 32 °C. Die eingesetzten Polymer-Konzentrationen lagen zwischen 10 und 20 %. Während P85 keine Viskositätserhöhung bei einer Temperatursteigerung zeigte, stieg sie bei den übrigen leicht an. F127 (20 %) und F108 (15 %) bildeten feste Gele aus. Die Anwendung am Auge wurde nicht untersucht. In in-vitro Tests konnte die Arbeitsgruppe jedoch feststellen, daß diese Poloxamer-Systeme gute Solubilisierungseigenschaften für schwerlösliche Arzneistoffe (z.B. Indometazin, Diclofenac-Natrium) besaßen.

Edsman [1998] beobachtete, daß höhere Poloxamer-Konzentrationen zwar zu einer etwas verlängerten Kontaktzeit am Auge führten (die maximal beobachtete verlängerte Zeit betrug eine Stunde), der Autor beurteilt das Poloxamer jedoch eher als ein ungeeignetes Beispiel für temperaturempfindliche Gelsysteme für das Auge. Diese Ergebnisse stimmen insofern mit den Resultaten von Siebenbrodt et al. [1992] überein, da sich dort bei einer Temperaturerhöhung nur ein geringer Anstieg der Viskositäten verzeichnen ließ.

Polymerlösung		Dynamische Viskosität [mPa·s]	
		25 °C	32 °C
P85	15 %	5,61	4,66
	20 %	13,46	13,25
F68	15 %	9,83	16,84
	20 %	14,30	20,68
F127	15 %	23,19	26,06
	20 %	94,55	128,46
F108	10 %	42,34	57,83
	15 %	1854,82	Gel

Tab.2.5: Dynamische Viskositäten verschiedener Poloxamer-Lösungen nach der Herstellung [nach: Siebenbrodt, 1992]

2.6.6. Sprays

Ein Spray für die Augenheilkunde wurde 1975 von Halberg und Mitarbeiter vorgestellt und getestet. Verschiedene Pilocarpin-Konzentrationen wurden auf die Konjunktiva gesprüht und die Augeninnendrucksenkung gemessen. Die Sprüh-Vorrichtung, mit deren Hilfe lediglich 5 µl Flüssigkeitsvolumen appliziert werden kann, wurde bereits in Kapitel 2.6.1.10. erwähnt.

Um die Applikation in das Auge zu umgehen, wurden Untersuchungen über die Wirkung extern auf das Auge gesprühter Zubereitungen gemacht. Bartlett [1993] und Wesson [1993] beschrieben die Verwendung eines Zykloplegium-Sprays (Tropicamid) auf den Augenlidern von Kindern. Unabhängig von der Position des Augenlids (offen oder geschlossen) wurden gleiche Wirkungen erzielt. Ebenfalls erfolgreiche Ergebnisse mit Tropicamid erhielt Benavides [1997]. Zwischen der Wirkung von wässrigen Tropfen im Auge und dem des Sprays auf dem geschlossenen Lid fand er nach 40 min keinen signifikanten Unterschied und befürwortet die Anwendung besonders in der Pädiatrie.

Doe und Campagna führten 1998 mit Pilocarpin (4 %ige Lösung) vergleichbare Versuche am geschlossenen Augenlid durch und erzielten auf diesem Wege in allen Augen eine Miosis. Die augeninnendrucksenkende Wirkung wurde nicht untersucht.

2.6.7. Imprägnierte Papierstreifen

Mit Fluorescein imprägnierte Papierstreifen (Fluorescein Sodium Ophthalmic Strips [USP 24, 1999], mit 0,6 mg, 1 mg und 9 mg Wirkstoff) werden für diagnostische Zwecke verwendet, indem sie in das untere Segment des Auges gehalten werden. Der sterile Streifen ist mit einer ausreichenden Menge Wirkstoff versehen, der sich in der Tränenflüssigkeit nach Kontakt mit der Bindehaut löst.

Sollte ein direkter Kontakt des Papiers mit dem Auge aus diversen Gründen nicht erwünscht oder nicht möglich sein, kann der Arzneistoff mit Hilfe von sterilem Wasser oder isotonischer Kochsalzlösung abgespült werden. Wie viele andere okuläre Freisetzungssysteme enthalten diese Papierstreifen außer dem Wirkstoff zusätzlich ein Konservierungsmittel, Tensid und Pufferstoffe [Bar-Ilan, 1997].

Untersuchungen von Snyder [1998], den Farbstoff Bengalrosa in Form von Papierstreifen für die Diagnostik zu verwenden, ergaben, daß die auf diese Weise freigesetzten Mengen recht gering sind und Ergebnisse klinischer Studien nicht direkt mit denen, die mit Augentropfen erzielt worden sind, vergleichbar sind.

2.6.8. Augeninserte

Inserte sind dünne, unter Umständen poröse Scheibchen, Flocken oder Plättchen aus inertem Material, die mit dem Arzneistoff imprägniert sind. Sie können in den Bindehautsack eingelegt werden oder auf der Cornea zur Anwendung kommen. Der Wirkstoff wird verzögert freigegeben, was entweder durch ein Herauslösen desselben aus dem Insert mit der Tränenflüssigkeit oder durch ein allmähliches Auflösen des Arzneiträgers erfolgen kann.

Mit diesen sogenannten therapeutischen Systemen bezweckt man eine Verminderung der täglich notwendigen topischen Applikationen, vor allem bei Langzeitbehandlungen. Es handelt sich um topische Depotformen, die eine möglichst konstante Wirkstofffreisetzung am Auge gewährleisten sollen.

Hinsichtlich Form, Größe und Freisetzungskinetik ist die Vielfalt dieser Inserte enorm groß. Der Einfachheit halber werden die Systeme hier in 'nicht abbaubare' und 'abbaubare' unterschieden, wobei allerdings einige Systeme in Abhängigkeit der verwendeten Stoffe beiden Gruppierungen zugeordnet werden können.

Eines dieser Systeme ist die *Minidisc* [Bawa, 1993]. Bei der *Minidisc* handelt es sich um ein effektives und vielseitiges System mit einer verzögerten Wirkstofffreisetzung. Obwohl es bisher noch nicht vermarktet worden ist, wurden bisher eine große Anzahl an Untersuchungen durchgeführt. Sie ist wie eine kleine Kontaktlinse mit einer konvexen Vorderseite und einer konkaven Rückseite konzipiert, besitzt allerdings lediglich einen Durchmesser von 4 bis 5mm. Sie wird mit dem Zeigefinger wie eine Kontaktlinse eingesetzt und kann auf diese Weise leicht unter das obere oder untere Augenlid plaziert werden, ohne Unbehagen zu verursachen, die Sicht zu beeinflussen oder die Sauerstoffversorgung zu beeinträchtigen. Im Vergleich zu Kontaktlinsen ist zum Einsetzen der *Minidisc* keine große Fingerfertigkeit notwendig, da das DDS nicht nur auf der Hornhaut, sondern irgendwo im Auge plaziert werden kann. Ein Vergleich zwischen wirkstofffreien *Lacriserten* (s. Kap. 2.6.8.2.3.) und *Minidiscs* zeigte, daß die Probanden für eine Applikation eines *Lacriserts* im Schnitt 39,5 s benötigten, für eine *Minidisc* lediglich 16,6 s [Bawa, 1993]. Sechs der 24 Patienten gelang es nicht, das *Lacrisert* zu applizieren.

Diese *Minidiscs* können sowohl als *Nonerodible Minidiscs* als auch als *Erodible* (HPC) hergestellt werden, wobei die ersteren wiederum unterschieden werden können in hydrophile (HEMA mit EGDMA quervernetzt) und lipophile (Silikone, EVA). Ausführlich wird die *Minidisc* in Bawa [1993] beschrieben.

2.6.8.1. Nicht abbaubare Systeme

Nicht abbaubare Inserte werden in das Auge eingesetzt und setzen den incorporierten Arzneistoff über einen bestimmten Zeitraum frei. Je nach Konzept (konstante Arzneistofffreigabe über einen gewissen Zeitraum) kann eine Freisetzungskinetik Nullter Ordnung erreicht werden. Der große Nachteil dieser Systeme liegt jedoch auf der Hand: wenn das Wirkstoffreservoir leer ist, müssen diese Vorrichtungen wieder aus dem Auge entfernt werden. Allerdings kann dieser Zeitpunkt nicht immer konkret festgelegt werden. Ebenso können Irritationen durch das unlösliche Insert nicht ausgeschlossen werden.

2.6.8.1.1. Weiche Kontaktlinsen

Kontaktlinsen, die aus einem Hydrogel bestehen, sind in der Lage bis zu 80 % ihres Gewichtes an Wasser absorbieren. Sie können also in eine Arzneistofflösung gelegt

werden und anschließend auf der Hornhaut plaziert werden. Auf diese Weise kann die Kontaktzeit des Wirkstoffs verlängert und somit die Penetration erhöht werden. Waltman und Kaufman [1970] zeigten, daß mit Fluorescein-Lösung gesättigte Kontaktlinsen (HEMA (Poly-2-hydroxyethylmethacrylat) *Bionite*[®] *hydrophilic lens*, - heute: *Softcon*[®] *lens*, American Optical Cooperation, Southbridge, MA [Lamberts, 1980]), die auf der Cornea plaziert wurden, bei Kaninchen eine bis zu 4-fache und bei Menschen eine sogar bis zu 8-fache Vorderkammerwasserkonzentration im Vergleich zu in regelmäßigen Intervallen applizierten Lösung erreicht werden konnte. Verschiedene im Handel befindliche Kontaktlinsen wurden daraufhin auf ihr Freisetzungsverhalten untersucht (Bausch & Lomb Lens (*Softlens*[®]), Griffin hydrogel Lens (*Bionite*[®]), Hefilcon-A Hydrogel lens). Ähnliche Ergebnisse wie die von Waltman und Kaufman wurden später für verschiedene andere Stoffe berichtet, einschließlich einiger Antibiotika, Steroide und Antiglaukomatosa (z.B. Pilocarpin [Podos, 1972]). Außerdem wurde festgestellt, daß die Linsen effektiver sind, wenn sie direkt auf der Cornea und nicht im Bindehautsack plaziert werden [Maddox, 1972].

Rootman et al. [1992] untersuchten die *Morgan Therapeutic Lens* (MTL) als Freisetzungssystem für Gentamycin am Kaninchenauge. Trotz diverser Nachteile resümierte der Autor, daß das System ein nützliches Therapeutikum sein könnte.

Hehl und Kollegen [1999] fanden in einer klinischen Studie heraus, daß hydrophile, wirkstoffhaltige Linsen (*Acuvue*[®], *Vistacon*, beladen mit Aminoglykosiden bzw. Fluorozinolonen) zwar im Vergleich zu Augentropfen eine beträchtlich geringere Wirkstofffreisetzung aufwiesen, jedoch im Kammerwasser des Auges wesentlich höhere Arzneistoffkonzentrationen erzielen konnten.

Die Arzneistofffreisetzung dieser Hydrogel-Kontaktlinsen erfolgt pulsartig (Anfangspeak), mit einem anschließenden Abfall der Arzneistoffkonzentration (Kinetik 1. Ordnung). Unter diesem Gesichtspunkt bieten Linsen im Vergleich zu Salben oder Tropfen keinen Vorteil, obwohl sich die Freisetzung natürlich über einen längeren Zeitraum hinzieht.

Vor der eigentlichen Anwendung muß die Linse mit Arzneistoff gesättigt werden, was für den Patienten diverse logistische Probleme mit sich bringt. Schwierig erwies sich die Festlegung eines zeitlichen Rahmens, in dem die Linse vom Patienten ersetzt werden muß. Zu klären bleibt, ob Patienten Linsen selbst mit Arzneistofflösung sättigen können, wenn ja, wie lange diese Beladung zu erfolgen hat und ob die Linsen überhaupt

wiederholt verwendet werden können. Bei der Anwendung von Kontaktlinsen als therapeutische Systeme, stellt sich weiterhin die Frage nach der für den Wirkstoff geeigneten Linse und die Möglichkeit einer Kombinationstherapie.

Trotz der gezeigten nachweisbaren Freisetzung konnte dieses System keine breite Anwendung finden und ist lediglich auf wenige klinische Versuche begrenzt.

2.6.8.1.2. Darreichungsformen mit membrankontrollierter Freisetzung

Die erste vermarktete Vorrichtung dieser Art, die das Ziel einer Freisetzungskinetik 0. Ordnung erreichte, war das *Ocusert*[®]. Der Wirkstoff Pilocarpin ist an Alginsäure als freie Base gebunden und befindet sich in einem Reservoir, welches aus zwei dünnen, transparenten Ethylvinylacetat (EVA)-Membranen besteht. Ein opaker Titandioxid-EVA-Ring dient zur besseren Handhabung und Erkennung des *Ocuserts*. Das hydrophobe Polymer erschwert die Permeation von Wasser in das Hilfsmittel, und die Freisetzungsrates wird durch den Diffusionskoeffizienten und Konzentrationsgradienten bestimmt. Das elliptische *Ocusert* (13,4 x 5,7 mm, 0,3 mm dick) setzt 20 µg/h (*Pilo-20*) oder 40 µg/h (*Pilo-40*) frei. Die höhere Freisetzungsrates wird durch den Zusatz eines Flux-Enhancers (Di(2-ethylhexyl)phthalat) erreicht. Die Tragedauer eines *Ocuserts* beträgt 7 Tage. Die anfänglichen klinischen Studien mit dem *Ocusert* [Armaly, 1973; Worthen, 1974] zeigten, daß die 20 µg/h-Version, die 480 µg/Tag freisetzt, den IOP genauso niedrig hielt, wie die Standardbehandlung mit Tropfen von 4 mg/Tag (entspricht einer 8-fachen Reduktion der Tagesdosis). Brinchmann-Hansen [1979] beschrieb den Vorteil der *Ocusert*-Anwendung vor allem in den frühen Morgenstunden im Vergleich zu konventionellen Augentropfen. Nachteilig zeigte sich das *Ocusert* insofern, daß etwa 20 % der Patienten das eingesetzte Insert innerhalb von 24 Stunden aus dem Auge verloren, welches bis auf einen Fall wieder eingesetzt wurde. Hinweise auf unbemerkte *Ocusert*-Verluste und daraus resultierende akute Glaukomanfälle tauchen in der Literatur immer wieder auf [Meyer, 1977]. Das *Ocusert* kann auch in Kombination mit anderen antiglaukomatösen Wirkstoffen verwendet werden, wie z.B. Epinephrin.

Der größte Vorteil dieses Systems ist der erreichte therapeutische Erfolg trotz niedrigerer Dosis, einhergehend mit einer geringeren Miosis- und Myopie-Rate und damit eine geringere Sehbeeinflussung.

Die *Ocusert*-Therapie ist allerdings wesentlich teurer als die Standardtherapie mit Augentropfen. Außerdem müssen die Patienten regelmäßig kontrollieren, ob das Insert nicht herausgefallen ist, noch an der richtigen Position im unteren Bindehautsack liegt und nicht über die Oberfläche des Augapfels wandert. Das *Ocusert* muß einmal die Woche entfernt und durch ein neues ersetzt werden. Starke Fremdkörpergefühle können unter Umständen zu einem Abbruch der Therapie führen. Fälle von einem plötzlichen Leck wurden berichtet [Armaly, 1973].

Die Idee, auch Tabletten am Auge anwenden zu können, wurde u.a. in den sogenannten *Ocular Mini-Tablets (MT)* verwirklicht. Bei diesen *MTs* handelt es sich um eine zu Tabletten verpreßte wirkstoffhaltige Mischung (Durchmesser: 3,5 mm; Dicke: 1,5 mm), die mit einem dünnen, diffusionskontrollierenden Film aus einem Acryl-copolymer überzogen sind. Die Resultate von Chetoni und Mitarbeiter [1996] zeigten, daß *MTs*, die in-vitro gleichbleibende Freisetzungsraten von Timolol aufwiesen, im Kaninchenauge keinen konstanten Verlauf zeigten. Im Vergleich zu konventionellen Augentropfen war die Wirkungsdauer verlängert. Trotz der unphysiologischen Form kam es im Kaninchenauge zu keinen offensichtlichen Reizerscheinungen.

Chetoni und Mitarbeiter [1998] entwickelten später ein stäbchenförmiges, mucoadhäsives Insert, das in den unteren oder oberen Bindehautsack eingelegt werden kann. Der Durchmesser liegt bei 0,9 mm, es ist 6 bis 12 mm lang und wiegt 3 bis 6 mg. Es besteht ebenfalls aus einem Silikonelastomer, welches als Wirkstoff Oxytetracyclinhydrochlorid enthält. Mit Acrylatüberzügen konnte die Freisetzung modifiziert werden. Bei einigen Inserten gelang es sogar in-vitro, eine Freisetzungskinetik 0. Ordnung für den Zeitraum von einer Woche zu erreichen.

2.6.8.1.3. Darreichungssysteme mit matrixgesteuerter Freisetzung

Eine andere Methode, die Freisetzung zu verlängern, ist die Verwendung von hydrophoben Inserten. Ein hydrophobes Polymergerüst enthält den Arzneistoff, der in fester Form in dieser Matrix eingebettet ist. Hierdurch wird eine Diffusionsbarriere aufgebaut. Aus diesem Reservoir diffundiert der Wirkstoff nach seiner Auflösung langsam heraus. Eine weitere Steigerung ist der Einsatz schlechtlöslicher Arzneistoffe

in diesen hydrophoben Inserten, so daß die Freisetzungsrates vorwiegend von der Arzneistoffauflösung abhängig ist.

Bei der homogenen, porenfreien Matrix ist die Wirkstofflöslichkeit im Polymer von entscheidender Bedeutung. Das Quadratwurzelgesetz läßt erkennen, daß in einem nicht abbaubaren Formkörper die Wirkstofffreigabe im Grunde genommen nicht mit konstanter Geschwindigkeit ablaufen kann. Die gelösten Moleküle müssen mit fortschreitendem Herauslösen aus dem Gerüst eine zunehmend längere Wegstrecke zurücklegen. Die Freigabe nimmt mit der Quadratwurzel der Zeit ab [Bauer, 1993].

Allerdings ist die Formel nur bedingt anwendbar, da hierbei immer nur eine Flächeneinheit betrachtet wird.

$$Q = \sqrt{D - (2A - C_S) \cdot C_S \cdot t} \quad (\text{Suspensionsmatrix})$$

Q : nach der Zeit t aus der Matrix je Flächeneinheit abgegebener Wirkstoffmenge

D : Diffusionskoeffizient

A : Gesamtwirkstoffmenge in der Matrix

C_S : Löslichkeit des Wirkstoffes im Auflösungsmedium

Systeme, deren Freisetzungsprinzip auf dieser Grundlage beruhen, wurden ebenfalls entwickelt, wobei verschiedene Größen und Formen existieren. Sie reichen von einem dünnen, flachen Film bis zu einem dreidimensionalen Gebilde, das dem Bindehautsack nachempfunden wurde.

Die Arzneistofffreisetzung erfolgt bei diesen Systemen über einen längeren Zeitraum in einer nahezu konstanten Rate, die von Größe und Beladung abhängig ist. Ersteres wird jedoch wiederum durch den Tragekomfort am Auge begrenzt. Eine sinnvolle Zeitspanne ist ein Zeitraum von etwa 2 Wochen [Gale, 1980; Jones, 1978].

Bei *Ocufit SR[®] insert* handelt es sich ebenfalls um ein Insert, welches nach einem ähnlichen Prinzip funktionieren soll. Escalon Ophthalmics Inc. ließ sich dieses System bereits 1992 patentieren (SR: Sustained Release). Dieses stäbchenförmige, wirkstoffhaltige Silikonelastomer wird ebenfalls in den unteren Bindehautsack eingelegt und soll über einen Zeitraum von Wochen bis Monate den Arzneistoff freisetzen. Dieses System wurde jedoch bisher nur anhand von in-vitro-Methoden getestet [Hubbell, 1999].

Nach einer kurzen Verzögerung stiegen bei Diclofenac (10 mg/Insert) die transscleralen Arzneistoffkonzentrationen an und erreichten nach 5 Stunden ein Maximum. Ein scheinbares Gleichgewicht stabilisierte sich nach 15 Stunden auf etwa 1/3 bis 1/5 des zuvor erreichten Maximums.

Der Vorteil dieser Systeme ist, daß eventuell auftretende Konstruktionsfehler oder Lecke nicht so weitreichende Konsequenzen haben, wie das bei membrankontrollierten Systemen der Fall sein würde. Solche Systeme können somit auch für stärker wirksame Stoffe gut eingesetzt werden.

2.6.8.2. Abbaubare Systeme

Verschiedene bioabbaubare Applikationssysteme wurden in den letzten Jahren entwickelt, patentiert und getestet. Allerdings schafften es nur wenige zur Marktreife.

Die Bioerosion beruht auf einem oberflächlichen langsamen Auflösen oder Abbau der Matrix in der Tränenflüssigkeit. In dem Maße, wie dies erfolgt, wird der eingebettete Wirkstoff freigegeben. Zur Erzielung einer Freigabegeschwindigkeit 0. Ordnung muß eine reine Oberflächenerosion bei konstant bleibender Oberfläche vorliegen.

Bei einer hydrophilen Matrix wird der Arzneistoff zwar langsam aus der Matrix ausgelaugt, aber eine konstante Freisetzungskinetik 0. Ordnung wird nie erreicht. Diese Systeme verlieren relativ schnell ihre feste Konsistenz und können durch Blinzeln oder Zusammenkneifen des Auges aus diesem herausgedrückt werden.

Aus diesen Inserten ist die Arzneistofffreisetzung zwar nicht kontrollierbar, aber sie verlängern die Kontaktzeit am Auge. Ist der Wirkstoff in einem quellbaren Polymer eingebettet, erfolgt von außen eine Hydratisierung mit beginnender Gelbildung. Bei Beginn des Quellungsprozesses findet ein relativ schnelles Herauslösen von an der Oberfläche befindlichen Wirkstoffpartikeln statt. Nach Ausbildung der Gelschicht ist die Freigabe jedoch wieder matrixgesteuert und damit diffusionskontrolliert. Eine ganze Reihe unterschiedlicher Materialien können als Grundlage verwendet werden. In erster Linie können Systeme auf HPMC- und PAS-Basis solche Inserte darstellen [Bauer, 1993], aber auch eine ganze Reihe anderer Materialien können verwendet werden, wie z.B. Fibrin-Filme (Miyazaki [1982] untersuchte die Pilocarpinwirkung am Kaninchenauge), PVAL [Maichuk, 1975] oder auch Gelatine (Phenylephrin, Tropicamid,

[Lee, 1999]), um nur einige zu nennen. Einen Überblick über den Einsatz diverser Polymere in hydrophilen, hydrophoben und abbaubaren Inserten gibt Deshpande [1998]. Gegenüber ähnlichen, nicht abbaubaren Zubereitungen haben sie den Vorteil, daß sie sich am Ende der Freisetzung aufgelöst haben und nicht aus dem Auge entfernt werden müssen.

Eine Möglichkeit, eine annähernd konstante Freisetzungsrates erodierender Systeme zu erreichen, ist die Verwendung hydrophober Matrizes. Diese Systeme verhindern, daß der Arzneistoff mit der Tränenflüssigkeit aus dem Auge gespült wird.

Ein in der Literatur beschriebenes System unterliegt bei Kontakt mit der Tränenflüssigkeit lediglich einer Oberflächenhydrolyse, was nur zu einer Auflösung und Erosion der äußeren Schichten führt und des darin enthaltenen Wirkstoffs (Naltrexon). Ein Fortschreiten dieses Prozesses, Schicht für Schicht von einer verhältnismäßig konstanten Oberfläche resultiert in einer nicht-pulsierenden, konstanten Freisetzungsrates des Arzneistoffes [Capozza, 1978].

Der Nachteil hydrophober Inserte besteht allerdings darin, daß es am Auge zu Irritationen kommen kann.

2.6.8.2.1. Kollagenmembranen

Hill [1993] führt Bloomfield [1978] als ersten auf, der mit Gentamycin imprägnierte Kollagenmembranen am Kaninchenauge einsetzte und auf diese Weise höhere Arzneistoffkonzentrationen erreichte als mit konventionellen Methoden. Nach Bar-Ilan [1997] wurden Kollagenmembranen von Fyodorov [1985] für den Gebrauch als eine Art Verband für die Hornhaut nach Operationen oder Hornhauterosionen entwickelt.

Anders als die vielen bisher behandelten experimentellen Zubereitungen besitzen diese eine gewisse wirtschaftliche und therapeutische Bedeutung.

Die kommerziell verfügbaren *Collagen Shields* (*Bio-Cor*[®], Bausch & Lomb Pharmaceuticals, Clearwater, Florida, USA., *MediLens*[®], Chiron Ophthalmics, Irvine, California, USA., *ProShield*[®] Alcon Surgical, Fort Worth, Texas) sind bioabbaubare, kontaktlinsenförmige klare Filme aus Schweinesclera-Kollagen oder Rindercorium-Gewebe. Sie lösen sich in Abhängigkeit von dem Vernetzungsgrad des Kollagens über einen Zeitraum von etwa 12 bis 72 Stunden auf. Verschiedene Vernetzungsgrade können während der Kollagenherstellung durch UV-Bestrahlung erreicht werden. Die

Collagen Shields werden als Schutz für Hornhautoberflächen und zur Förderung der cornealen Wundheilung eingesetzt. Im Gegensatz zu den Kontaktlinsen ist mit ihnen keine Refraktionskorrektur möglich. Sie vermindern die Sicht, weil sie optisch nicht völlig durchsichtig sind.

Da diese *Collagen Shields* über 60 % Feuchtigkeit enthalten, können sie ebenfalls als Arzneistoffdepot für ophthalmologische Freisetzungssysteme verwendet werden. Die Arzneistoffe können bei der Herstellung mit der Kollagenmatrix verbunden werden, während der Rehydratation adsorbiert werden, vor der Applikation oder auf das sich bereits am Auge befindliche Schild aufgetragen werden. Tierversuche zeigten, daß mit diesem System verschiedene Stoffe (Antibiotika, Fungizide, Steroide, etc.) besser als mit der konventionellen Tropfenmethode am Auge freigesetzt werden konnten. Eine Zusammenfassung darüber gibt Hill [1993]. Allerdings existieren bisher nur wenige Veröffentlichungen über die Verwendung von *Collagen Shields* als Arzneistoffträger in klinischen Studien. Die Verträglichkeit ist ausgesprochen gut, allerdings fehlen genauere Untersuchungen, für welche Stoffe und welche Indikationen das System geeignet ist.

1998 verglich Taravella in einer kleinen klinischen Studie die Resorption von Tobramycin aus Augentropfen und Kollagenmembranen und fand in den Kammerwasserkonzentrationen keinen signifikanten Unterschied. Mit beiden Zubereitungen wurden nicht die notwendigen minimalen Hemmkonzentrationen erreicht.

Eine ähnliche Zubereitung schlug Kaufman [1993] zur Behandlung des trockenen Auges vor, bestehend aus Kollagen und in Methylcellulose suspendierten Cetylalkohol-Partikeln (*Lacrisomes*). Das System kann auch einen Wirkstoff enthalten (*Collasomes*). Sie sollen einfach zu applizieren sein, und kaum die Sicht beeinträchtigen.

Eine Variante dieses Systems ist das Augeninsert der Firmen Pharmacia & Upjohn, *Gelfoam*[®] disc. Dabei handelt es sich um eine Gelatinescheibe mit einem Durchmesser von 3 mm, die jedoch mit einem Hilfsmittel, wie z.B. einer Pinzette, von einer zweiten Person in den unteren Bindehautsack eingelegt werden muß. In-vitro-Versuche 1993 [Nadkarni et al.] bestätigten die Möglichkeit, mit quervernetzten, unlöslichen Gelatinescheiben (4 x 4 x 2 mm) durch diverse Zusätze eine retardierte Freisetzung zu erreichen. Negvesky et al. [1999] zeigten anhand der Wirkstoffe Phenylephrin und

Tropicamid, daß dieses System eine Alternative zu regelmäßig applizierten Augenarzneien sein kann [Lee, 1999]. Versuche, auf diese Weise eine neue, injektionsfreie Insulinapplikation zu entwickeln, laufen [Lee, 1997; Lee, 1999].

Die Marktreife ist aber auch hier bis jetzt nicht erreicht worden.

2.6.8.2.2. Lyophilisate

Zatloukal veröffentlichte 1990 einen Bericht über die in-vitro-Freisetzung von Pilocarpinhydrochlorid aus HPMC-Lyophilisaten. Bei seinen Untersuchungen stellte er fest [Zatloukal, 1990], daß diverse ophthalmologische Arzneistoffe wie Atropinsulfat, Scopolaminbromid und Pilocarpinhydrochlorid zu einer deutlichen Volumenverringerng des Lyophilisates führten. Erst bei dem Einsatz einer 6 %igen HPMC-Lösung wurde der Einfluß des Arzneistoffes vernachlässigbar. Überraschenderweise wurde mit Tetracainhydrochlorid ein gegenteiliger Effekt erreicht.

Die Porenverteilungen seiner untersuchten Xerogele folgten einer logarithmischen Normalverteilung [Zatloukal, 1996], weitere Freisetzungsstudien und Untersuchungen wurden durchgeführt [Zatloukal, 1996; 1997; 1998; 1999]. Bis heute sind keine Daten über einen in-vivo-Einsatz bekannt.

2.6.8.2.3. Sonstige

Lacrisert

Das *Lacrisert*[®] ist ein steriles, konservierungsmittelfreies, stäbchenförmiges Hilfsmittel aus HPC (5 mg), das zur Behandlung des 'Trockenes Auge'-Syndroms entwickelt worden ist. Es wurde von Merck, Sharp & Dohme 1981 eingeführt [LaMotte, 1985]. Es wiegt 5 mg und mißt 1,27 mm Durchmesser mit einer Länge von 3,5 mm. Mit Hilfe eines Applikators wird es in den unteren Bindehautsack eingelegt. Hier entsteht daraus eine gelartige Masse, von der langsam das Polymer erodiert. Dadurch wird der Tränenfilm dicker, und der Gleiteffekt wird erhöht. Die Anwendung erfolgt gewöhnlich ein bis zwei mal täglich. Obwohl erste Studien darauf hinwiesen, daß dieses System gegenüber künstlicher Tränenflüssigkeit von Patienten besser angenommen wurde, stellte man in einer späteren Studie fest, daß die Akzeptanz aufgrund der Sehbeeinträchtigung und auftretenden Augenreizungen schlechter war. Von einem Verkleben der Augenlider wurde ebenfalls berichtet [nach: Bawa, 1993]. Dieses System ist heute noch u.a. in den USA und Kanada erhältlich.

Ophthalmic Rod

Eine weitere Entwicklung, um einige Nachteile konventioneller Augentropfen zu lösen, ist das *Ophthalmic Rod (OR)*. Erstmalig wurde es von Alani [1978] beschrieben. Es handelt sich dabei um ein etwa 55 mm langes, aus einer Acrylverbindung bestehendes Stäbchen, dessen Spitze von einer dünnen, konservierungsmittelfreien Wirkstoffschicht überzogen ist. Zur Applikation wird das untere Augenlid herabgezogen und das Stäbchenende etwa 2-3 Sekunden gegen die palpebrale Bindehaut gerieben. Untersuchungen zeigten, daß die Fluorescein-Dosis auf den ORs $\pm 20\%$ schwankte und die Ablösung 90,5 % bis 93,3 % betrug. Studien mit Pilocarpin, Tropicamid und Oxybuprocain am Kaninchen und Menschen zeigten vergleichbare Wirkungen von OR und Augentropfen. An der Bindehaut konnten keine Epithelschäden im Menschen entdeckt werden, bei Kaninchen entstanden solche allerdings durch plötzliche und unerwartete Bewegungen des Tieres bei der Applikation [Alani, 1990].

BODI

Verhältnismäßig neu ist ein weiteres System, das *Bioadhesive Ophthalmic Insert - BODI*. Gurtler [1995] untersuchte das neue, retardierte Freisetzungssystem mit Gentamycin als Inhaltsstoff an gesunden Hunden und Kaninchen. Als Resultat resümierte er, daß dies eine gute Alternative zu Augentropfen seien, um die Therapie zu intensivieren und das Dosierungsintervall zu verlängern.

SODI

Bei dem *SODI* (Soluble Ocular Drug Insert) handelt es sich um ein schmales, ovales Plättchen (9 mm lang; 4,5 mm breit; 0,35 mm dick), das von den sowjetischen Wissenschaftlern Maichuk und Khromov für Kosmonauten entwickelt worden ist, weil die Verwendung von Augentropfen in der Schwerelosigkeit nicht möglich ist.

Es besteht aus Polyacrylamid (Ethylacrylat-Vinylpyrrolidon-Copolymer), das mit dem Wirkstoff imprägniert ist.

Das *SODI* löst sich nach der Applikation innerhalb von 30 bis 90 Minuten im Auge auf. Die Patienten spüren während den ersten Minuten jedoch einen Fremdkörper im Auge.

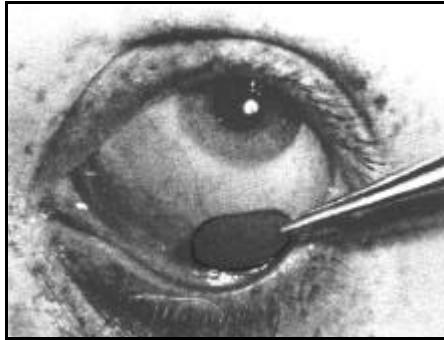


Abb.2.6: Applikation eines SODI
[Maichuk, 1975]

Klinische Studien scheinen zu zeigen, daß u.a. mit Pilocarpin (2,6 mg/SODI) oder Neomycin imprägnierte SODI günstiger sein könnten als entsprechende Augentropfen [Maichuk, 1975; Bawa, 1993].

NODS

Eine weitere Alternative sollte das *New Ophthalmic Drug Delivery System (NODS)* (Smith & Nephew Pharmaceuticals, Britain) darstellen.

Dabei handelt es sich um einen Papierstreifen von etwa 55 mm Länge und 5 mm Breite mit einem wirkstoffüberzogenem Ende (s.a. Kap. 3, Abb. 3.1.). Der Arzneistoff ist in einen wasserlöslichen PVAL (Polyvinylalkohol)-Film eingearbeitet, der sich von dem übrigen Träger ablösen soll, sobald er im unteren Bindehautsack plaziert wird. Dieser Film (4 mm lang, 6,3 mm breit, 20 µm dick) löst sich in der Tränenflüssigkeit, und der Arzneistoff wird innerhalb weniger Minuten aus dem PVAL freigesetzt. Konservierungsmittel sind nicht enthalten.

In einer Studie wurde die miotische Pupillenreaktion in Abhängigkeit von der Zeit nach Applikation von Pilocarpinnitrat in NODS (40, 80 oder 170 µg) oder einer 2%igen Lösungen (Einzeldosis 518 µg) erfaßt. Die Ergebnisse ergaben, daß die Dosis von Pilocarpin in NODS im Vergleich zu den Tropfen auf ein Achtel reduziert werden kann, um eine vergleichbare Wirkung zu erzielen [Kelly, 1989]. Auch Lawrenson [1993] bestätigte die bessere Wirksamkeit der NODS gegenüber Augentropfen.

In einer Verträglichkeitsstudie an 30 Probanden mit wirkstofffreien NODS [Diestelhorst, 1994] stellte sich allerdings heraus, daß die Akzeptanz der NODS im Vergleich zu Augentropfen wesentlich schlechter war und in einigen Fällen sich die wirkstoffhaltige Spitze nicht ablöste.

Hyalobend

Die Freisetzung von Methylprednisolon aus einem Hyaluronsäurederivat in Form einer Membran, die auf der Hornhaut aufliegt (*Hyalobend*), wurde auf seinen entzündungshemmenden Effekt in-vitro und in-vivo am Kaninchenauge untersucht. Die Wirkstofffreisetzung aus *Hyalobend* folgte der Kinetik 0. Ordnung. Ein Vergleich zu einer Steroidsuspension zeigte, daß der Wirkstoffpegel in der Tränenflüssigkeit des Kaninchens über einen Zeitraum bis zu 48 Stunden nahezu konstant blieb. Im Gegensatz dazu erreichte die Methylprednisolon-Suspension in den ersten 30 Minuten sehr hohe Werte, der Wirkstoff war aber bereits nach 200 Minuten nicht mehr detektierbar [Bucolo, 1996].

2.6.9. Kolloide Polymerpartikel

Eine weitere Möglichkeit, die Eliminationsrate von Arzneistoffen aus dem Auge zu erniedrigen und dadurch die absorbierte Menge zu erhöhen, ist die Verwendung partikulärer, polymerhaltiger Wirkstoffträger.

Zu diesen werden sowohl Mikro- als auch Nanopartikel gezählt, wobei der Unterschied lediglich in ihrer Größe liegt (Mikropartikel (Mikrosphären, Mikrokapseln): $> 1 \mu\text{m}$, Nanopartikel (genaue Charakterisierung schwierig): $< 100 \mu\text{m}$ [Kreuter, 1993].

Die Größenordnung für die Anwendung von Mikropartikeln am Auge liegt maximal bei etwa 5 bis 10 μm . Oberhalb dieser Grenzwerte tritt ein Scheuergefühl im Auge auf.

Kleine Partikel werden schnell über den Tränennasenkanal abgeleitet, ein kleiner Prozentsatz verbleibt jedoch längere Zeit am Auge. Aus diesen Gründen ist es vorteilhafter, prinzipiell bioabbaubare Polymere zu verwenden.

Mikropartikel werden nur sehr selten als Applikationssysteme am Auge verwendet.

2.6.9.1. Nanopartikel und Mikropartikel

Als Polymere zur Applikation von Arzneistoffen am Auge werden hauptsächlich Polyalkylcyanoacrylate verwendet. Sie bieten den Vorteil, daß sie in wäßriger Lösung bei Raumtemperatur polymerisierbar sind, biologisch schnell abbaubar und sehr gut verträglich sind. Die Arzneistofffreisetzung kann durch die Wahl der Herstellungsbedingungen und der Polymersorte variiert werden. Darüber hinaus besitzen diese Nanopartikel leicht bioadhäsive Eigenschaften.

In einer Studie fand Diepold [1989] nach dem Einsatz von Poly-hexyl-2-cyano-[3-¹⁴C]acrylat-Nanopartikeln in entzündeten Kaninchenaugen eine etwa 3 bis 5-fache Kammerwasser-Konzentration im Vergleich zu gesunden Augen. Das lieferte vielversprechende Ansätze bezüglich eines Drug Targeting. Es könnte also möglich sein, mit Hilfe dieser Nanopartikel Wirkstoffe gezielt in das Kammerwasser zu befördern.

Versuche allerdings, Pilocarpin an Poly(butylcyanoacrylat)-Nanopartikel (PBCA) zu binden, in Form einer niedrigviskosen, wäßrigen Suspension zu applizieren und auf diese Weise eine retardierte Wirkung zu erzielen, waren nicht sehr erfolgreich. Diepold und Mitarbeiter [1989] führten in-vitro und in-vivo verschiedene Ansätze durch. So konnten sie z.B. bei PBCA-Pilocarpin einen schnelleren Wirkungseintritt und doppelt so hohe Kammerwasserkonzentrationen im Kaninchenauge im Vergleich zu konventionellen Augentropfen (1 %ige Pilocarpinnitrat-Lösung) feststellen, wobei das Wirkungsmaximum bei beiden Zubereitungen nach 30 Minuten erreicht wurde. Eine Erklärung liefert Diepold nicht. Vermutet werden sowohl alternative Resorptionswege für Nanopartikel als auch gewebeadhäsive Eigenschaften dieser Partikel.

Eine Übersicht über Nano- und Mikropartikel liefert Kreuter [1993]. Dieser Arbeitsgruppe [Zimmer, 1994] gelang es auch, erfolgreich Pilocarpin-Nanopartikel herzustellen und am Kaninchenauge zu testen. Sie konnten im Vergleich zu Tropfen eine Wirkungsverlängerung feststellen.

Auf der Basis kleiner Partikel entwickelte Alcon eine galenisch interessante Rezeptur [Jani, 1994]. Betaxolol HCl (*Betoptic S*[®]) Augentropfen bestehen aus einer Suspension, in denen der Arzneistoff an einen Ionenaustauscher (Harzpartikel) gebunden ist. Zusätze sind so gewählt, daß ein geflocktes System vorliegt. Carbomer 934P ist als strukturgebende Komponente zugesetzt, um die physikalische Stabilität und die

Redispergierbarkeit zu erhöhen. Die 0,25 %ige Suspension besitzt eine vergleichbare Bioverfügbarkeit wie eine 0,5 %ige Lösung.

2.6.9.2. Liposomen

Der Einsatz von Liposomen eröffnet die Möglichkeit einer kontrollierten Arzneistofffreisetzung, Schutz des Arzneistoffs vor metabolisierenden Enzymen und einen engen Kontakt mit der Augenoberfläche, um auf diese Weise die Arzneistoffabsorption zu erhöhen [Lee, 1985]. Die Herstellung ist verhältnismäßig einfach, sie sind gut verträglich, biologisch abbaubar und beeinträchtigen nicht die Sicht. Die Oberflächeneigenschaften können durch Hilfsstoffzusätze beeinflusst werden. Der Einsatz von Liposomen als topische Augenarznei ist allerdings bisher aufgrund ihrer kurzen Lebensdauer, geringen Arzneistoffkapazität und Sterilisationsschwierigkeiten recht beschränkt [Davies, 1993].

Liposomen sind mikroskopische Strukturen (0,01 - 10 µm), die aus Vesikeln einer Doppelmembran bestehen und einen wässrigen Inhalt besitzen. Liposomale Zubereitungen können entweder aus einem einzelnen Bilayer bestehen, die nochmals in kleine (small unilamellar vesicles (SUV), < 100 nm) und große Vesikel (large unilamellar vesicles (LUV), >100 nm) unterschieden werden. Oder sie bestehen aus mehreren konzentrischen Kompartimenten (multilamellar vesicles (MLV)) [Lee, 1985].

Als Hilfsstoffe werden meist glycerolhaltige Phospholipide eingesetzt, wie z.B. Phosphatidylcholin (Lecithin), Phosphatidylethanolamin (Cephalin), Phosphatidylserin und -glycerol. Steroidcholesterol und Derivate werden oft als Membranzusatz hinzugegeben, um die Stabilität der Membran bei Anwesenheit biologischer Flüssigkeiten zu erhöhen.

Die Verwendung von Liposomen in der Ophthalmologie wurde erstmalig von Smolin [1981] in Betracht gezogen, als er im Tierversuch feststellte, daß Idoxuridin zur Behandlung herpesinduzierter Keratitis in Form von Liposomen effektiver war als die konventionelle Methode.

Seit dieser Zeit wurden viele Versuche mit verschiedenen Arzneistoffgruppen durchgeführt, wobei der Erfolg allerdings von der Lipophilie des Wirkstoffs abzuhängen scheint. Lipophile Wirkstoffe in Liposomen zeigen eine Wirkungsverstärkung, während hydrophile Stoffe im Gegensatz dazu eine Wirkungsverschlechterung im Vergleich zur Lösung zeigen. Eine Übersicht über die Versuche liefern Davies und Mitarbeiter [1992].

Fresta et al. [1999] stellten im Zusammenhang mit dem Wirkstoff Aciclovir fest, daß Phospholipide unterschiedliche Bindungsaffinitäten und Wirkungsgrade besitzen. Eine individuelle Rezepturoptimierung erscheint notwendig.

Bochot [1998] stellte fest, daß Liposomen nicht das geeignete Applikationssystem für Oligonukleotide sind.

Wie Liposomen mit Zellen interagieren, ist nicht genau bekannt; diskutiert werden verschiedene Möglichkeiten, wie z.B. Membranaustausch, Freisetzung bei Kontakt, Adsorption, Fusion und Phago- bzw. Endocytose [Davies, 1993].

3. Ophthalmische Lyophilisate zur topischen Anwendung am Auge

3.1. Einleitung

Die gängigsten Formulierungen für ophthalmologische Indikationen sind Lösungen, Suspensionen und Salben. Die Vor- und Nachteile dieser Zubereitungen wurden bereits im zweiten Kapitel ausführlich erläutert. Seit Jahren geben unter anderem die Dosiergenauigkeit, Bioverfügbarkeit, Verträglichkeit und Stabilität dieser Zubereitungen sowie enthaltene Konservierungsmittel wiederholt Anlaß zur Diskussion [Krämer, 1992]. Alternative Formulierungen oder Darreichungsformen, die diese Punkte verbessern, sind somit wünschenswert (s.a. Kap. 2).

Bei den sogenannten *NODS* (Abb. 3.1., s.a. Kap. 2.6.8.2.3.) handelt es sich um ein Applikationssystem, bei dem Prinzipien wie

- Applikation einer Einzeldosis
- Verbesserte Bioverfügbarkeit
- Konservierungsmittelfreiheit
- Wirkungsverlängerung und
- Reduktion systemischer Nebenwirkungen

verwirklicht werden konnten.

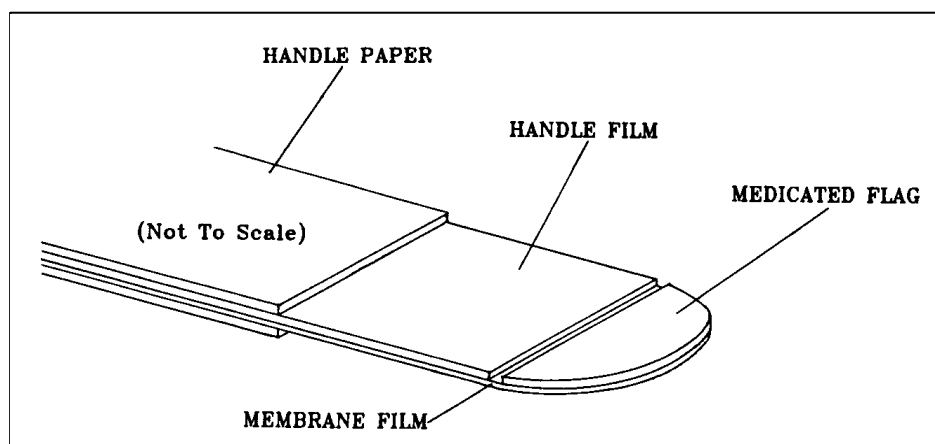


Abb.3.1: *NODS – New Ophthalmic Delivery System* [Richardson, 1993]

Allerdings war die Akzeptanz bei den Patienten aufgrund der nicht zuverlässigen Anwendbarkeit und wegen Beschwerden nach der Applikation nicht zufriedenstellend (s.a. Kap. 2.6.8.2.3) [Diestelhorst, 1994].

So wurde das Konzept eines ophthalmischen, topisch anzuwendenden Applikationssystems unter besonderer Berücksichtigung der Verbesserung der Handhabbarkeit und Patientencompliance weiterentwickelt [Grunthal, 1996].

3.2. Aufbau der Arzneiform

Bei der neuen Arzneiform handelt es sich um ein Lyophilisat. Dieses besteht aus einem hydrophilen, quellbaren Polymer, welches konservierungsmittelfrei ist und jeweils eine Einzeldosis eines oder mehrerer Arzneistoffe enthält. Der Wirkstoff kann in gelöster oder suspendierter Form eingebettet sein. Dieses Xerogel haftet auf einem hydrophoben, inertem Träger. Der komplette Streifen ist etwa 40 mm lang und 10 mm breit, wobei der hydrophobe Anteil des Trägers ungefähr 10 bis 15 mm in Anspruch nimmt. Diese abgerundete Trägerspitze muß einerseits ausreichend weich und flexibel sein, um Verletzungen am Auge zu vermeiden. Andererseits muß die Folie genügend Stabilität aufweisen, um eine entsprechende Handhabung gewährleisten zu können. Der Griffbereich ist deshalb zusätzlich verstärkt.

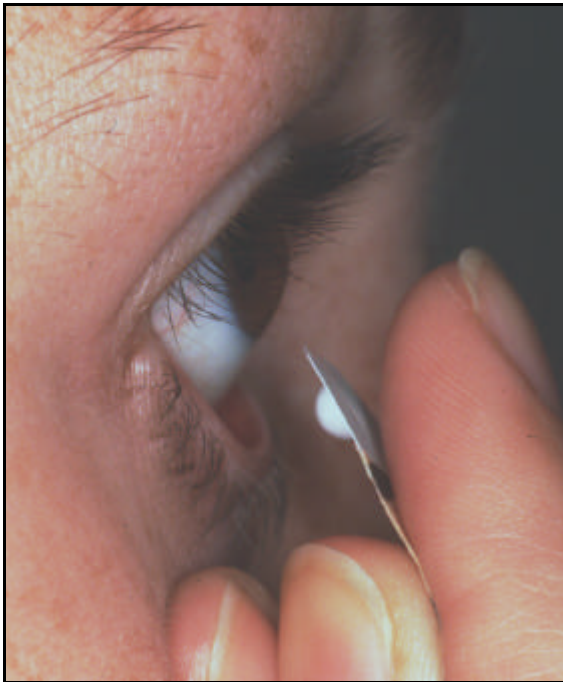
Für die benötigten Materialien (Polymer, Folie, Arzneistoff) können bei entsprechender Eignung verschiedene Rohstoffe eingesetzt werden.



Abb.3.2: Dargestellt ist ein Lyophilisat (A), auf Methocel[®] E4M-Basis (0,125 mg) mit Fluorescein-Natrium (0,250 mg) als Wirkstoff auf einem PTFE-Träger (B, Gewindeband, 100 µm) und einem Griff aus Autoklavierklebeband (C) [Foto: Grunthal, 1996]

3.3. Applikation einer Einzeldosis

Bei der Applikation wird das Lyophilisat an der unteren Lidkante des Auges in den Bindehautsack abgestreift. Dort bleibt es an der Bindehaut haften, rehydratisiert mit der Tränenflüssigkeit zu einem Gel. Dieses setzt den Arzneistoff allmählich frei, so daß er am Auge zur Wirkung kommen kann.



*Abb.3.3:
Applikation am Auge
[Foto: Diestelhorst]*

3.4. Vorteile gegenüber konventionellen Augentropfen

Ein Vergleich mit konventionellen Augentropfen zeigt, daß diese neue Arzneiform zahlreiche Vorteile bietet:

- Präzise Applikation einer Einzeldosis
- Konservierungsmittelfreiheit
- Leichte Applikation, einfache Handhabung, keine Reklination notwendig
- Minimale Verletzungsgefahr von Binde- und Hornhaut
- Verbesserte topische Verträglichkeit
- Erhöhte Lagerstabilität (chemischer und mikrobieller Aspekt)
- Geringes Allergiepotehtial
- Geringere systemische Nebenwirkungen
- Retardierte Wirkung möglich
- Applikation in der Schwerelosigkeit (Raumflug) möglich

Präzise Applikation einer Einzeldosis

Jedes Lyophilisat enthält eine Einzeldosis eines oder mehrerer Wirkstoffe. Deshalb ist eine Überdosierung praktisch ausgeschlossen. Im Gegensatz dazu gehören Augentropfen bzw. Augensalben zu den wenigen Arzneiformen, die nur grob dosiert werden können. Die Variationen in Tropfengröße und Salbenmenge sind erheblich (s. Kap. 2.6.1.10.).

Konservierungsmittelfreiheit

Bei der neuen Arzneiform sind bezüglich des mikrobiellen Befalls zwei Aspekte zu erwähnen. Zum einen handelt es sich bei dem Lyophilisat um eine trockene Arzneiform, die während der Lagerung potentiellen Mikroorganismen nur suboptimale Bedingungen für eine Vermehrung bietet. Zum anderen enthält das Lyophilisat eine Einzeldosis eines Wirkstoffes. Augentropfen, die lediglich eine Einzeldosis enthalten, benötigen bei Nachweis eines validierten Herstellverfahrens ebenfalls keine Konservierungsmittel [EuAB, 1997]. Lösungen in Mehrdosenbehältnissen sind dagegen immer auf ein geeignetes Konservierungsmittel angewiesen, was sich besonders bei Langzeittherapien nachteilig auswirkt (s. Kap. 2.6.1.4.).

Abgesehen von diesem Problem treten bei Augentropfen oft Interaktionen zwischen den verwendeten Behältnis-Werkstoffen und den Konservierungsmitteln auf. Die daraus resultierenden Konservierungsmittelverluste können die Qualität von Augentropfen erheblich in Frage stellen [Partilla, 1990].

Leichte Applikation, einfache Handhabung, keine Reklination notwendig

Der Patient muß für eine korrekte Applikation von konventionellen Augentropfen den Kopf zurücklegen (reklिनieren) und genau einen Tropfen in dieser Stellung applizieren.



*Abb.3.4:
Applikation konventioneller Augentropfen
[Foto: Weichselbaum, 2000]*

Besonders älteren Leuten bereitet dies Probleme, so daß sie Augentropfen häufig nur in liegender Position unter Zuhilfenahme einer zweiten Person erfolgreich anwenden können (s. Kap. 2.6.1.11.).

Lyophilisate können in aufrechter und liegender Position bei leicht herab gezogenem Lid einfach und unkompliziert verabreicht werden (s. Abb.3.3.). Dieser Vorgang entspricht einer reibenden Wischbewegung, wie sie auch zur Entfernung von Fremdkörpern aus dem Auge dient.

Minimale Verletzungsgefahr von Binde- und Hornhaut

Aus Unkenntnis, aufgrund fehlender Erfahrung oder geringer manueller Fingerfertigkeit erfolgt die Applikation von Augenarzneien oft nicht so, wie sie von den Herstellern (z.B. im Beipackzettel oder speziellen Broschüren [Alcon Pharma, Dr. Mann Pharma]) oder von verschiedenen Organisationen (z.B. Glaucoma Foundation: 'A Guide to Placing Eyedrops in Your Eye') empfohlen wird. Häufig wird die Augenarznei nach individuellem Gutdünken verabreicht (s.a. Kap.2.6.1.11.). Eine zweite Person muß zu Hilfe genommen werden.

Die Tropferspitze wird bei der Applikation auf die Augenoberfläche aufgesetzt, und der Vorgang währt so lange, bis ein Zuviel an Flüssigkeit die Wange herabläuft. Gerade bei

dieser Methode besteht eine permanente Verletzungsgefahr. Der Tropfer einer Augentropfenflasche besteht meist aus hartem Kunststoff. Hornhauterosionen sind keine Seltenheit. So stellten Kass et al. [1982] bei ihren Untersuchungen fest, daß fast die Hälfte der Personen ihrer Untersuchungsgruppe die Spitze ihrer Flasche auf dem Augapfel oder Augenlid aufsetzten. Kass konnte als Folge jedoch statisch keine höhere Nebenwirkungsrate feststellen.

Das Lyophilisat hingegen befindet sich auf einem weichen Träger, der keine scharfen Kanten oder Ecken besitzt. Die Gefahr einer Verletzung bei der Anwendung besteht nicht.

Verbesserte topische Verträglichkeit

Viele Arzneistoffe sind in wäßriger Lösung nur bei unphysiologischen pH-Werten ausreichend stabil. Deshalb wird der pH-Wert meist so eingestellt, daß die chemische Stabilität des Wirkstoffes ausreicht, gleichzeitig aber die unvermeidbare Reizung für den Patienten noch erträglich bleibt (s. Kap. 2.6.1.1., 2.6.1.2.). Diese Überlegung entfällt bei Lyophilisaten. Zusätze zur pH-Wert- und/oder Tonizitätseinstellung entfallen. Als Rehydratisierungsmittel dient die eigene Tränenflüssigkeit. Lokal können Reizungen durch die entstandene hypertone Arzneistofflösung auftreten, diese sind jedoch nur von kurzer Dauer. Zusätzlich mindert die viskose Arzneistofflösung diese Reizeffekte, u.a. die des inkorporierten Arzneistoffes (s. Kap. 2.6.1.3.).

Erhöhte Lagerstabilität

Viele ophthalmologische Arzneistoffe sind in wäßriger Lösung instabil und benötigen entsprechende Stabilisierungsmaßnahmen. Ihre Haltbarkeit wird erheblich eingeschränkt, wobei natürlich auch der wirtschaftliche Aspekt eine wichtige Rolle spielt. Lyophilisate sind als Trockengelapplikatoren eine sinnvolle Alternative, um speziell die Stabilität hydrolyseempfindlicher Stoffe, wie z.B. Pilocarpinhydrochlorid, zu erhöhen (s. Kap. 2.6.1.1.).

Geringeres Allergiepotehtial

Da keine Konservierungsmittel bzw. weitere Stabilisierungszusätze notwendig sind (die Inhaltsstoffe des Lyophilisates konnten auf ein Minimum reduziert werden), ist auch die Anzahl potentieller Allergene gesenkt worden. Einzig vorhandenes Allergen ist lediglich

der inkorporierte Arzneistoff. Der verwendete PTFE-Träger ist inert und physiologisch unbedenklich. Die Wahl eines geeigneten Polymers sollte ebenfalls so getroffen werden, daß bei diesem Material keine Gegenanzeigen bekannt sind.

Geringere systemische Nebenwirkungen

Für eine geringere Nebenwirkungsrate sprechen zwei Faktoren:

Erstens ist im Gegensatz zu Augentropfen, von denen unter Umständen versehentlich mehrere Tropfen in den unteren Bindehautsack eingebracht werden können, eine Überdosierung bei der Anwendung der Lyophilisate ausgeschlossen.

Zweitens bildet sich aus dem Xerogel bei Kontakt mit der Tränenflüssigkeit eine viskose Wirkstofflösung oder -suspension. Dieses im allgemeinen reizarme Gel verhindert eine zusätzliche Tränensekretion, die den Arzneistoff über den Tränennasenkanal schnell wieder herauspült. Außerdem wird bei der Applikation keine zusätzliche Flüssigkeit in den Bindehautsack eingebracht, so daß ein Überschuß über den Schlemmschen Kanal abgeführt werden müßte und von dort aus in den systemischen Kreislauf gelangt (s. Kap. 2.6.1.10.). Diese Behauptung müßte allerdings noch experimentell geprüft werden.

Retardierte Wirkung möglich

Die Art des verwendeten Polymers und seine Konzentration bestimmen die Rehydratisierungsgeschwindigkeit und die Viskosität des entstehenden Gels. Das hat wiederum Auswirkungen auf die Bioverfügbarkeit des eingesetzten Arzneistoffs hat. Die Möglichkeit einer Verlängerung der Wirkungsdauer durch Bildung einer viskosen Lösung oder sogar eines Polymerschwamms, der langsam erodiert, ist gegeben (s. Kap. 2.6.1.3. und 2.6.5.). Ebenso kann der Einsatz bioadhäsiver Polymere das gleiche Ziel verfolgen (s. Kap. 2.6.1.8.).

Applikation in der Schwerelosigkeit (Raumflug)

Bei Mikrogravitation ist die Applikation von Augentropfen wesentlich schwieriger als unter Normalbedingungen. Um sicherzustellen, daß die aus der Tropferspitze austretende Flüssigkeit durch Oberflächenkräfte an der Bindehaut haftet und nicht unkontrolliert umherschwebt, muß die Spitze bei der Anwendung auf weniger als einen Tropfendurchmesser, d.h. 1-2 mm an den Applikationsort herangeführt werden. Dabei

ist es kaum möglich, den Abstand visuell zu schätzen. Bei konventionellen Augentropfen in Ein- oder Mehrdosenbehältern besteht immer das Risiko, die Augenoberfläche durch Berührung mit der Tropferspitze zu verletzen.

Eine Recherche im Index Medicus ergab keine Hinweise auf die Anwendung von Augentropfen bei Raumflügen. In einem Bericht über den Gebrauch von Medikamenten bei 79 Space-Shuttle-Missionen wurden topische Augenarzneimittel nicht erwähnt [Putch, 1999]. Für das sowjetische Raumfahrtprogramm wurde dagegen eine spezielle ophthalmologische Darreichungsform entwickelt (s. Kap. 2.6.8.2.3.).

3.5. Augentropfen und Lyophilisate - ein Vergleich - tabellarische Übersicht

In der folgenden Tabelle werden die Eigenschaften von Augentropfen und Lyophilisaten noch einmal übersichtlich zusammengefaßt:

	Augentropfen		Lyophilisate	
Dosierung	mangelhaft	--	Einzeldosis	++
Konservierungsmittel	MDO: notwendig EDO: nicht erforderlich	+-	nicht erforderlich	++
systemische Nebenwirkungen	treten unter Umständen in erheblichem Maße auf	-	* können in geringem Maße auftreten	+-
Applikation	Reklination des Kopfes, aufrecht oder liegend, meist 2. Person erforderlich	--	* aufrecht, liegend, einfache Wischbewegung (bisher keine Eigenapplikation)	++
Verletzungsgefahr	groß	--	* minimal	++
Lagerstabilität	wäßrige Lösung: problematisch bei empfindlichen Arzneistoffen	-	* Xerogel, vielversprechend bei trockener und lichtgeschützter Lagerung	++
topische Verträglichkeit	gut bis mangelhaft (pH- und Puffer-Zusätze, Konservierungsmittel)	+-	vorübergehend leichtes Fremdkörpergefühl zu Beginn der Applikation	+-

	Augentropfen		Lyophilisate	
Retardierte Wirkung	möglich (Viskositätserhöhung)	+	möglich (polymerabhängig)	+
Bioadhäsion	Polymerzusatz möglich	+	Polymerzusatz möglich	+
Verpackung	Flaschen, EDOs, bei EDOs viel Verpackungsmaterial (Recycling möglich)	+ -	EDOs viel Verpackungsmaterial (Recycling möglich)	-
Arzneistoff-Abfall	EDOs: nur Bruchteil wird verwendet	-	Dosis wird vollständig verwendet	++
Therapiewechsel (für Klinik relevant)	Vernichtung einer angebrochenen MDO	+ -	ohne Verlust möglich	++
Kombinations- therapie (Einsatz mehrerer Arzneistoffe in einem Präparat)	möglich (mit Einschränkungen)	+ -	* möglich (theoretisch)	+
Lebensqualität	befriedigend	+ -	*	
Compliance	schlecht	-	* (ungewohnt)	
Pharmakokinetik	von Arzneistoff abhängig, befriedigend bis mangelhaft	+ -	* (Daten liegen z.T. vor, noch nicht in allen Fällen befriedigend)	+

Tab.3.5: Übersicht über die Eigenschaften von Augentropfen und Lyophilisaten

* zu diesen Punkten liegen bisher noch keine Erfahrungswerte vor; das Ziel ist natürlich eine Verbesserung des Ausgangszustandes

4. Gefriertrocknung

4.1. Vakuum-Gefriertrocknung

In der pharmazeutischen Technologie wird die Gefriertrocknung (Lyophilisation) überwiegend zur Trocknung von Lösungen eingesetzt, z.B. bei der Herstellung von Parenteralia, die in Form einer wäßrigen Lösung instabil sind. Besonders bewährt hat sich dieses Verfahren bei der Verarbeitung von Proteinen oder Antibiotika, die in der Regel als Lösung eine sehr geringe Stabilität aufweisen.

Bei der Gefriertrocknung geht man von einer anwendungsfertigen, gegebenenfalls sterilen Lösung aus, der im gefrorenen Zustand das Lösungsmittel (meist Wasser) durch Sublimation entzogen wird. Da die Wirk- und Hilfsstoffzusätze oft sehr gering sind, bildet sich beim Trocknen nur ein dünner Film oder Trockenkuchen aus. Deshalb werden der Formulierung zusätzliche Gerüstbildner, wie z.B. Mannitol oder Glycerin, zugesetzt, die dazu beitragen, daß ein voluminöses Lyophilisat entsteht. Zusätzlich wird dadurch die Lösungsgeschwindigkeit der Substanzen erhöht.

Bei vielen Proteinen, Enzymen und Bakterien ist ein Zusatz von Ionen und/oder organischen Molekülen notwendig, um zu einfrierbaren, gefrierzutrocknenden und lagerfähigen Endprodukten zu kommen [Finn-Aqua, Produktinformation,].

Die Sublimationsfähigkeit von Eis bildet die Grundlage der Gefriertrocknung. Wie der Abb. 4.1. zu entnehmen ist, weist Eis noch einen erheblichen Dampfdruck auf. Am Tripelpunkt $T=0,0098\text{ °C}$ beträgt er noch 6,103 mbar [Murgatroyd, 1997].

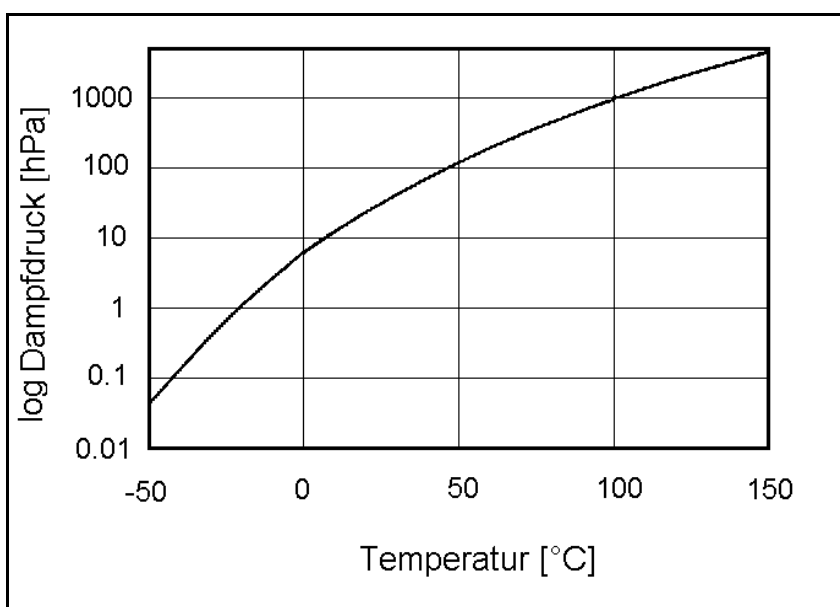


Abb.4.1:
Dampfdruck von reinem
Wasser/Eis in
Abhängigkeit von der
Temperatur
[nach: Gnielinski, 1993]

(Obwohl die SI-Einheit für die Temperatur 'K' ist, wird hier zum schnelleren Verständnis davon abgesehen). Die Sublimationstemperatur wird durch die Höhe des angelegten Unterdrucks bestimmt. Um wirtschaftliche Trocknungszeiten zu erreichen, erfolgt die Gefriertrocknung im Vakuum. Unter Atmosphärendruck ist bei -20 °C das Verhältnis Wasserdampf-/Luftmoleküle etwa 1:1000. Die Luftmoleküle behindern erheblich die Diffusion der Wassermoleküle, und deshalb läuft der Trocknungsvorgang nur sehr langsam ab.

Aus Tabelle 4.2. wird ersichtlich, daß für eine effektive und schnelle Trocknung die Produkttemperatur möglichst hoch sein sollte, ohne dabei jedoch den eutektischen Punkt oder die Kollapstemperatur der Zubereitung zu überschreiten.

T [°C]	20	0	-10	-20	-30	-40	-80	-150
p [mbar]	23,38	6,11	2,6	1,04	0,39	0,13	$5,33 \cdot 10^{-4}$	$7 \cdot 10^{-12}$

Tab.4.2: Dampfdruck über Eis [aus: Murgatroyd, 1997]

Unter Kollapstemperatur versteht man die Temperatur, bei der das Gefriergut in einem zähflüssigen Zustand vorliegt. Längeres Verweilen in diesem Zustand kann z.B. bei Proteinen zu einem irreversiblen Kollaps führen [Rupprecht, 1993]. Die Kollapstemperaturen liegen unterhalb des tiefsten eutektischen Punktes, aber oberhalb der Glasübergangstemperatur.

Bei raschem Abkühlen wäßriger Lösungen, insbesondere in Gegenwart gelöster Kohlenhydrate und Polymere findet vielfach auch unterhalb des tiefsten eutektischen Punktes keine oder nur unvollständige Kristallbildung statt, es bildet sich ein isotropes Glas. Dieser Temperaturbereich, bei dem dieser Übergang in den festen Zustand erfolgt, wird als Glasübergangstemperatur bezeichnet [Rupprecht, 1993].

Gefriertrocknung ist eine Technik, die viele Vorteile mit sich bringt:

- minimale Veränderung der Form, die äußere Struktur bleibt erhalten
- kein bzw. geringer Aktivitätsverlust empfindlicher oder thermolabiler Materialien
- Entstehung einer porösen, leicht zerbrechlichen Struktur
- schnelle und vollständige Rehydratation möglich
- genaue und saubere Dosierung im Endbehältnis möglich

- sterile Produkte herstellbar
- gut geeignet für thermolabile, schwer lösliche und wasserempfindliche Stoffe

Leider überwiegen unter wirtschaftlichem Aspekt betrachtet die Nachteile, so daß das Verfahren oft nur angewendet wird, wenn sich alle anderen Herstellungsmethoden als ungeeignet erweisen:

- hohe Kapitalkosten wegen des erheblichen apparativen Aufwands
- hoher Energieverbrauch
- lange Prozeß- bzw. Trocknungszeiten
- geringe Chargengrößen
- Batchprozeß

Für den Prozeß der Gefriertrocknung sind vier aufeinanderfolgende Verfahrensschritte notwendig:

- Einfrieren
- Haupt- bzw. Primärtrocknung
- Nach- bzw. Sekundärtrocknung
- Nachbehandlung

4.2. Einfrierprozeß

4.2.1. Zweck und Bedeutung

Der erste und wesentlichste Schritt bei der Lyophilisation ist die Einfrierphase. Das Einfrieren des Trockengutes erfolgt üblicherweise unter Atmosphärendruck. In dieser Phase wird das Kristallgerüst geschaffen, aus dem die nachfolgende Sublimation erfolgt. Dies ist ein sehr komplexer Vorgang. Die Produktstruktur, Gestalt und Größe wird durch das Einfrieren fixiert, was wiederum Einfluß auf den Sublimationsvorgang und die anderen Produkteigenschaften hat.

Ungeeignetes Einfrieren (zu schnell oder zu langsam, produktabhängig) führt zu schlecht löslichen, meist schlecht zu trocknenden Präparaten und kann zur Zerstörung der biologischen Eigenschaften und zur mangelhaften Lagerfähigkeit beitragen.

Da das zu trocknende Gut stets gelöste Stoffe enthält, ist der Gefrierpunkt des Wassers herabgesetzt. Das Einfrieren, was üblicherweise auf temperierbaren Platten erfolgt, muß daher immer unterhalb des eutektischen Punktes erfolgen.

In der Einfrierphase wird, abhängig vom Verlauf, die Qualität des Produktes entscheidend beeinflusst. Deshalb ist das Einfrieren einer der kritischsten Schritte in dem ganzen Trocknungsprozeß.

4.2.2. Eisbildung in reinem Wasser

Die Eisbildung kann einsetzen, sobald die Temperaturen unter 0 °C fallen. Handelt es sich um sehr reines Wasser, kann dieses bis -40 °C unterkühlt werden, ohne daß es zu einer Kristallisation kommt. Die Ursache hierbei ist die erschwerte Bildung von Kristallkeimen bzw. das Nichtvorhandensein von Partikeln, die als solche dienen könnten und die die Voraussetzung für das Wachstum von Eiskristallen sind. Ist Wasser extrem gut von Fremdpartikeln gereinigt, befinden sich im Wasser nur Molekülcluster. Bei diesen Clustern handelt es sich um einen Zusammenschluß von Wassermolekülen. Sie sind keine festen Gebilde, die über längere Zeit aus denselben Molekülen bestehen, sondern stehen mit ihrer Umgebung in einem ständigen, dynamischen Wechsel bei einer mittleren Lebensdauer von 10^{-10} bis 10^{-1} Sekunden [Gnielinski, 1993].

Kristallkeime entstehen in reinem Wasser an ausreichend großen, hexagonalen Clustern. Diesen Vorgang bezeichnet man auch als homogene Keimbildung (homogene Nukleation). Mit sinkender Temperatur nimmt die Lebensdauer, die Zahl und Größe der Cluster und damit ihre Fähigkeit zur Nukleation zu. Sind im Wasser Teilchen dispergiert, erleichtert dies die Keimbildung, da an ihnen die energetisch günstigere heterogene Keimbildung erfolgt.

Kristallkeime können ebenfalls durch äußere Einflüsse (Schaben, Erschütterungen) entstehen.

Amorphe Strukturen können sich z.B. durch sehr rasches Abkühlen bilden. Bei gleichmäßigem Wärmeentzug entstehen glatte Eisschichten. Erstarrt unterkühltes Wasser oder eine Lösung, wird die freiwerdende Erstarrungswärme lokal rasch auf die umgebende Flüssigkeit übertragen, so daß ein inhomogenes System entsteht, in dem verzweigte Kristalle (Dendriten) wachsen. Eis kann in Abhängigkeit vom Druck und von der Temperatur acht verschiedene Modifikationen bzw. Kristallformen aufweisen. Es bildet oberhalb von -150 °C (bis 0 °C) bei normalem Druck eine stabile Kristallmodifikation mit hexagonalem Gitter aus, das große Hohlräume besitzt. Alle

anderen Strukturen sind in diesem Temperaturbereich instabil und wandeln sich in die hexagonale Form um.

Zu bedenken ist auch, daß eine einmal erzeugte Eisstruktur bei konstant gehaltener Endtemperatur (das gilt allerdings nicht für Temperaturen unterhalb -100 °C) in praktisch allen Fällen instabil ist. Die Eiskristalle wachsen im Laufe der Zeit deutlich. So stellte Willemer [1977] fest, daß sich nach raschem Abkühlen bei -18 °C bereits innerhalb von nur 10 Minuten die Kristallstruktur von Eis erheblich verändert hat und die Kristalle gewachsen sind.

4.2.3. Einfriergeschwindigkeit

Die Größe der beim Einfrieren entstehenden Eiskristalle hat einen großen Einfluß auf die Produktqualität.

Thijssen und Rulkens stellten bereits 1969 bei der Gefriertrocknung von Dextrinlösungen (10 bis 40 %) fest, daß die Porengröße von der Einfriertemperatur abhängig ist.

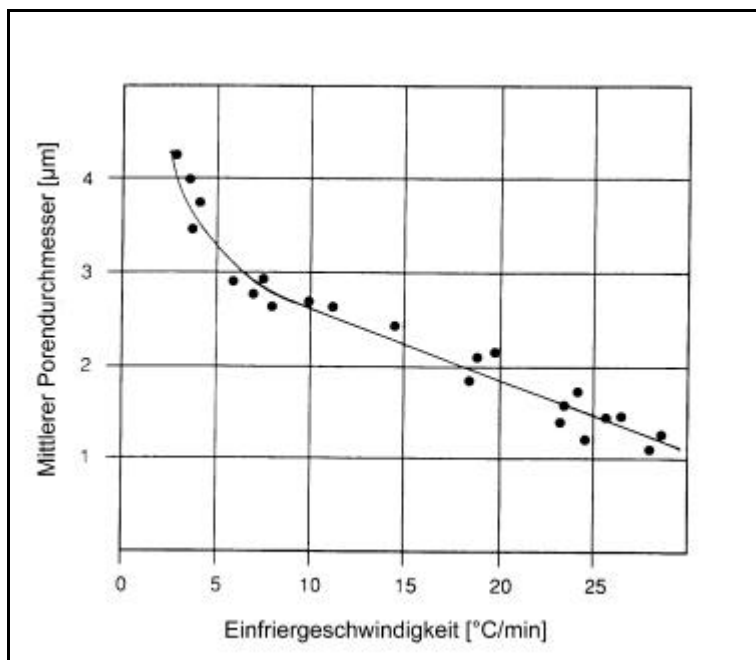


Abb.4.3:
Abhängigkeit der mittleren
Porendurchmesser
gefriergetrockneter
Dextrinlösungen von der
Einfriergeschwindigkeit
[Thijssen, 1969]

Beim langsamen Einfrieren ($0,2$ bis 10 °C/min) entstehen wenige Kristallkeime, die anschließend zu großen Kristallen heranwachsen. Wird schnell eingefroren ($>20\text{ °C/min}$) entstehen jedoch viele Kristallkeime, aus denen entsprechend viele kleine Kristalle entstehen. Wird sehr langsam eingefroren ($<0,2\text{ °C/min}$) und dabei die Proben erschütterungsfrei gelagert, kommt es zu einer deutlichen Unterkühlung. Die

Kristallisationsprozesse verlaufen dann jeweils sehr rasch und führen ebenfalls zu kleinen Kristallen [Rupprecht, 1993].

Große Kristalle hinterlassen beim Trocknen im Vergleich zu kleinen Eiskristallen große Poren und ein lockereres Lyophilisat.

Kleine Poren führen zu einer Erhöhung des Diffusionswiderstandsfaktors und damit zu einer Verlängerung der Trocknungszeit. In den engen Poren ist der Druckverlust des Dampfes höher als im grobporigen Material. Es kommt zur Bildung weniger durchlässiger Poren und Kanalsysteme, wenn sich Kristallkeime nicht nur in eine Richtung bilden, sondern in Form von Nadeln oder dendritischen Gebilden in das Produkt hineinwachsen. In gleicher Weise verzögern sie bei einer Resolvatation das Eindringen der Flüssigkeit.

Ein schneller Einfriervorgang beeinträchtigt somit den Dampftransport bei der Trocknung dicker Schichten.

4.2.4. Charakterisierung des Einfriervorgangs

In der Einfrierphase wird, wie bereits erwähnt, die Qualität des Produktes entscheidend beeinflusst. Da das Einfrierverfahren die Trocknungsgeschwindigkeit und damit die Kosten bestimmt, ist es wichtig, frühzeitig die optimale Einfriermethodik zu finden.

In der Phase der Präformulierung und Rezepturentwicklung werden aufwendige Arbeiten zur Ermittlung von Einfrierparametern durchgeführt (u.a. Bestimmung wichtiger Stoffparameter, wie z.B. eutektischer Punkt, Kollapstemperatur).

Es gibt verschiedene Methoden, die es erlauben, den Einfriervorgang quantitativ zu verfolgen:

- Messung des elektrischen Widerstandes der Probe beim Abkühlen und Wiedererwärmen
- Differential-Thermoanalyse (DTA), die den unterschiedlichen Temperaturverlauf zwischen Probe und einer Kontrollvergleichssubstanz meistens beim Wiederaufwärmen mißt
- Dynamische Differenzkalorimetrie (DDK bzw. Differential Scanning Calorimetry, DSC), die die unterschiedlichen Wärmeströme von und zu einer Vergleichssubstanz erfaßt
- Gefriermikroskopie, bei der die Entstehung von Kristallen beim Einfrieren beobachtet wird

4.3. Haupttrocknung

Im Prozeßschritt der Haupt- oder Primärtrocknung wird das gefrorene Wasser durch Sublimation entfernt. Durch Anlegen eines Vakuums und Erhöhung der Stellflächentemperatur (die Wärmeübertragung ist dabei abhängig von dem Druck des vorhandenen Restgases, s.a. Kap.4.3.1.) wird gewährleistet, daß ca. 95 % des Wasseranteils sublimieren. Sowohl bei der Haupt- als auch bei der Nachtrocknung muß darauf geachtet werden, daß die Produkttemperatur nie den kritischen Temperaturbereich überschreitet, um ein Anschmelzen oder gar einen Kollaps des Lyophilisats zu verhindern.

Der maximal mögliche Gehalt an Wasser in einer wasserdampfgesättigten Inertgasatmosphäre beträgt bei einer Temperatur von 0 °C 4 g Wasser/kg Luft.

Bei -20 °C sinkt der Wert auf 0,65 g Wasser/kg Luft. Wird im Vakuum Wasserdampf erzeugt, steigt das Gasvolumen von 1 g Wasser von 1,2 l bei 1 bar auf etwa 1.000 l bei 1,3 mbar und auf etwa 10.000 l bei 0,13 mbar an. Der Versuch, diese Gasvolumina abzupumpen, wäre völlig unökonomisch [Rupprecht, 1993]. Sie können aber an Flächen mit sehr tiefen Temperaturen (tiefer als jene des gefrorenen Präparats) von etwa -50 bis -80 °C kondensiert werden.

Die aktive Fläche des Kondensators sollte sich möglichst nahe am Trockengut befinden, um auf kürzestem Weg Wasser vom Eis im Gut über die Gasphase wieder in Eis mit niedrigerem Partialdruck (bei tieferen Temperaturen) zu überführen. Das Temperaturgefälle zwischen Eisoberfläche des Gutes und der Kondensator-Oberfläche stellt die thermodynamische Voraussetzung für den Trockenvorgang dar, da daraus eine Dampfdruckdifferenz resultiert.

Während der Haupttrocknung muß die Temperatur im gefrorenen Eis so gehalten werden, daß kein Antauen erfolgen kann. Diese Grenztemperatur läßt sich mit einem Tieftemperatur-Widerstandsmeßgerät oder im Gefriermikroskop bestimmen. Das Problem ist die Ermittlung der maximalen Eistemperatur.

Eine Trocknung bei zu niedriger Eistemperatur verlängert die Trockenzeit unnötig.

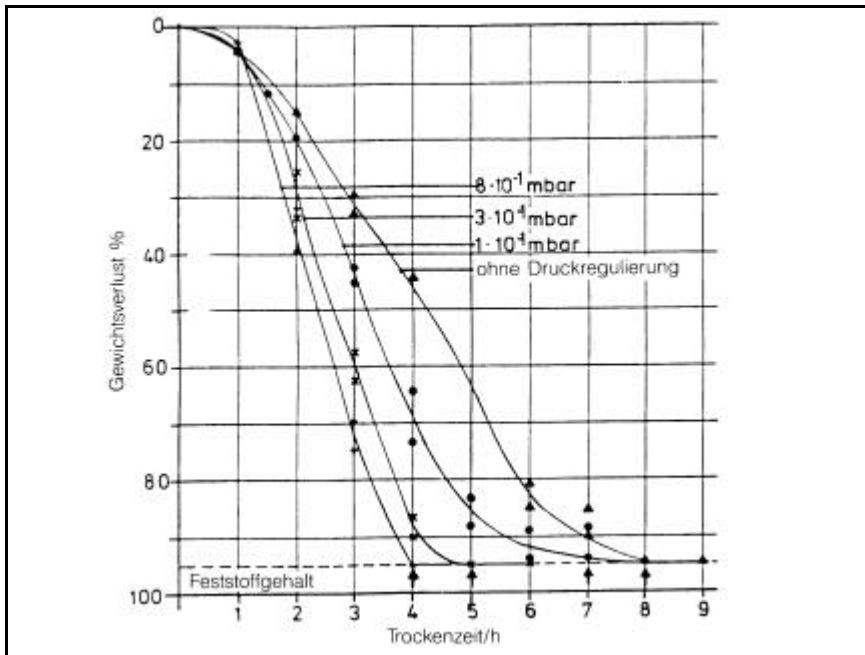


Abb.4.4:
Gewichtsverlust
während der
Gefriertrocknung
einer 5%igen Mannit-
Lösung; Einfluß des
Druckes in der
Trockenkammer auf
die Trockenzeit [aus:
Finn-Aqua®]

4.3.1. Mechanismen des Wärmetransportes

Beim Trocknen wird für den Sublimationsvorgang viel Energie benötigt, etwa 3800 kJ/kg Wasser. Für die Wärmeübertragung sind verschiedene Wege von Bedeutung. Die Trocknungsverfahren lassen sich nach der Art der Wärmezufuhr unterscheiden. Wärmeenergie kann durch Strahlung, Strömung (Konvektion) oder Leitung (Kontakt) transportiert werden.

Wärmestrahlung ist elektromagnetischer Natur wie das Licht. Sie ermöglicht die Abgabe von Wärme auch ins Vakuum. *Wärmeströmung* setzt makroskopische Bewegungen in der Flüssigkeit oder dem Gas voraus, deren Wärmeinhalt auf diese Weise an andere Stellen transportiert wird. *Wärmeleitung* erfolgt nur in Materie, ist aber nicht mit deren makroskopischer Bewegung verbunden, sondern nur mit Energieübertragung durch Molekülstöße. Sie setzt örtliche Unterschiede in der Molekülenergie, also ein Temperaturgefälle voraus. Wird die Wärme im Gut selbst durch ein hochfrequentes Wechselfeld erzeugt, so spricht man von *Dielektrischer Trocknung*.

Um die Trocknungszeit zu minimieren, muß der Wärmeübergang effizient sein. Dies wird in erster Linie meist durch Erhöhung des Kammerdrucks erreicht: die höhere Anzahl von Gasmolekülen in der Kammer führt dem Produkt mehr Wärme zu. Die

Trocknungsdauer verkürzt sich bei Erhöhung der Produkttemperatur um 5 °C um den Faktor 2 [Kruss, 1993].

Unter der Voraussetzung, daß während der Trocknungsphase der Dampfdruck des Wassers am Kondensator vernachlässigt werden kann, steht die Trockenzeit in folgender Abhängigkeit zur Schichtdicke: $t_r \sim d^{1.5}$.

Zum Trocknen einer 1cm dicken Schicht werden etwa 10 bis 20 Stunden benötigt. Halbkugelförmige Partikel mit etwa 3 mm Durchmesser können schon innerhalb von ein bis drei Stunden getrocknet werden [Rupprecht, 1993].

Die Haupttrocknung ist dann beendet, wenn das gesamte Eis sublimiert ist.

4.3.2. Überwachung der Prozeßführung - ein Überblick

Die Prozeßsteuerung erfolgt auf Basis vorgegebener Produkt-Kenndaten, wie Gefriertemperatur, Sublimationsdruck, Nachtrocknungsdruck und Restfeuchte bei vorgegebener Produkttemperatur.

Die Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit des eingefrorenen Präparates dient vor allem zur Validierung des Einfrierprozesses.

Eine exakte Überwachung der Temperatur ist bei den aus Metall bestehenden Teilen der Gefriertrocknungsapparatur, wie z.B. den Stellplatten, problemlos. Eine Temperaturmessung über Thermofühler im Produkt selbst setzt eine gleichmäßige, homogene Struktur und eine entsprechende Wärmeleitfähigkeit voraus. Im bereits getrockneten, porösen Anteil des Gutes sind die erhaltenen Meßwerte daher nicht mehr repräsentativ.

Während der Haupttrocknung empfiehlt sich die barometrische Temperaturmessung (BTM-Methode). Die Methode beruht darauf, daß der Partialdruck des Wasserdampfes über dem Eis unmittelbar von der Temperatur an der Eis/Gasgrenze abhängt.

4.3.3. Mathematische Betrachtung

Die Gefriertrocknung ist im wesentlichen ein Prozeß, der in erster Linie durch das 1. Ficksche Gesetz beschrieben werden kann, wobei der Term der Konzentrationsänderung über die Wegstrecke durch die Dampfdruckänderung ersetzt wird:

$$\frac{dm}{dt} = -q * D * \frac{dp}{dx} \quad \text{Gl. 4.1}$$

Eine Diffusion findet statt, wenn der Druck eines Gases bzw. der Partialdruck eines Bestandteils des Gasgemisches (allgemein: die Teilchenzahldichte n) von Ort zu Ort verschieden ist. Der Vorgang kommt erst durch den Ausgleich der Teilchenzahldichte aller Teilchen des Systems zum Stillstand. Der Transport von Wasserdampf durch Diffusion nimmt natürlich in Gegenwart von Fremdgasen mehr Zeit als in einem Vakuum in Anspruch, weil die mittlere freie Weglänge durch Kollisionen abnimmt.

Dieser Vorgang kann nach Vogel [1995] wie folgt formuliert werden.

Der Teilchentransport in der Diffusion wird durch den Gradienten der Teilchenzahldichte, $\text{grad } n$, angetrieben.

Die Teilchenstromdichte j_n ist ein Vektor, dessen Betrag die Anzahl von Teilchen darstellt, die in einer Sekunde durch die Flächeneinheit treten und ist dem n -Gefälle proportional (1. Ficksches Gesetz):

$$j_n = -D \times \text{grad } n \quad \text{Gl. 4.2}$$

Der Diffusionsstrom fließt immer in die Richtung, in der n am schnellsten abnimmt. D ist der Diffusionskoeffizient, der die Beweglichkeit der Teilchen kennzeichnet. Seine Einheit [m^2/s^{-1}] ergibt sich aus der obigen Gleichung. Wenn aus einem Volumen mehr Teilchen ausströmen als hineinfließen, nimmt die Teilchenzahldichte dort ab.

$$\dot{n} = -\text{div } j_n \quad \text{Gl. 4.3}$$

Mit obiger Gleichung erhält man die allgemeine Diffusionsgleichung (2. Ficksches Gesetz):

$$\dot{n} = D \cdot \text{div grad } n = D \cdot \Delta n \quad \text{Gl. 4.4}$$

Liegt in einem Vakuumsystem ein geringerer Druck als 0,001 mbar vor, ändern sich die Strömungsverhältnisse vollkommen. Bei diesem geringen Druck stoßen die Moleküle praktisch nicht mehr untereinander, sondern nur noch mit den Gefäßwänden zusammen. Die mittlere freie Weglänge, die ein Molekül zwischen zwei Stößen mit anderen Teilchen zurücklegen kann, ist größer geworden als die Gefäßabmessung [Vogel, 1995]. Daher strömt das Gas nicht mehr als kontinuierliches Fluid, sondern in Gestalt der Einzelmoleküle.

Ein sehr schnelles Teilchen vom Radius r_1 wird in ein Gas hineingeschossen, dessen Moleküle sich ebenfalls als Kugeln vom Radius r_2 auffassen lassen und praktisch runde Zielscheiben für das schnelle Teilchen darstellen. Ein Stoß findet dann statt, wenn der Mittelpunkt des schnellen Teilchens sich dem eines Moleküls auf weniger als $r_1 + r_2$ nähert.

Man erhält das gleiche Ergebnis, wenn man Gasmoleküle als Punkte auffaßt und dafür dem schnellen Teilchen eine Scheibe vom Radius $r_1 + r_2$ mit dem *Stoßquerschnitt* $\sigma = \pi(r_1 + r_2)^2$ anheftet. Wenn das Teilchen den Weg x zurücklegt, überstreicht sein Stoßquerschnitt einen Kanal mit dem Volumen σx .

Ein Stoß ist eingetreten, wenn in diesem Volumen der Mittelpunkt eines Moleküls liegt. Wenn das Gas die Teilchenzahldichte n hat, liegen im Volumen σx , im Mittel $n \sigma x$ Teilchen. Wenn diese Zahl 1 wird, tritt im Mittel auf der Strecke x gerade ein Stoß ein, d.h. dieses x ist die mittlere freie Weglänge l :

$$l = \frac{1}{n\sigma} \quad \text{Gl. 4.5}$$

Wenn die Gasmoleküle sich ebenso schnell bewegen wie das betrachtete Teilchen, werden die Stöße etwas häufiger und die freie Weglänge etwas kleiner:

$$l = \frac{1}{\sqrt{2}n\sigma} \quad \text{Gl. 4.6}$$

Auf einer Wegstrecke dx des einfliegenden Teilchens besteht die Wahrscheinlichkeit $dP = n \sigma dx$, daß ein Gasmolekül im überstrichenen Volumen liegt. Läßt man also einen Strahl aus N Teilchen einfallen, dann erleiden davon im Mittel $N dP = n \sigma dx$ auf der Strecke einen Stoß.

Nach Murgatroyd [1997] kann man die mittlere freie Wegstrecke folgendermaßen direkt berechnen:

$$l = \frac{6,4 \cdot 10^{-3}}{p [\text{mbar}]} \quad [\text{cm}] \quad \text{Gl. 4.7}$$

Die Teilchenzahldichte n ist proportional dem Druck:

$$n = \frac{p}{kT}, \text{ also } l = \frac{kT}{\sigma n} \quad \text{Gl. 4.8}$$

Bei 300 K mit $\sigma = 10^{-19} \text{ m}^2$ (Molekülradius knapp 2 \AA) folgt bei $p=1 \text{ bar}$: $l=0,4 \text{ }\mu\text{m}$. Mit fallendem Druck nimmt l stark zu und erreicht im Hochvakuum ($p=1 \text{ }\mu\text{bar}$) die Größenordnung von etwa 1 Meter. In den Bereich der Gefäßdimension (ca. 10 cm) kommt man bei einem Druck von 0,004 mbar. Ab diesem Vakuum, das mechanische Vorpumpen gerade erreichen, Diffusionspumpen aber leicht überschreiten, fliegen die Moleküle des Restgases ungehindert durch die ganze Apparatur, sie stoßen nicht mehr miteinander an. Die Strömungsgesetze, die ein Kontinuum wechselwirkender Teilchen voraussetzen, gelten nicht mehr.

4.4. Nachtrocknung

Am Ende der Primärtrocknung ist noch 'Restwasser' im Gefriergut physikalisch oder chemisch in Form von Hydrat-/Quellungswasser oder Konstitutionswasser adsorbiert. Das Ziel der Nachtrocknung ist es, den Restwassergehalt soweit zu senken, wie es für eine sichere Lagerung des Produktes erforderlich ist. Anhand von Desorptions-Isothermen kann man den Restwassergehalt bei vorgegebener Produkttemperatur mit Hilfe des vorgewählten Dampfdruckes einstellen.

Zur weiteren Entfernung des Wassers erfordert die Nachtrocknung meist einen deutlich niedrigeren Wasserdampfpartialdruck im Bereich von 0,01-0,001 mbar mit einer entsprechenden niedrigen Kondensatortemperatur (ca. $-80 \text{ }^\circ\text{C}$). Im Verlauf können Endtemperaturen bis zu $50 \text{ }^\circ\text{C}$ im Gut ohne merkliche Qualitätsverluste toleriert werden, da nach der Haupttrocknung bereits ein verhältnismäßig stabiler Zustand erreicht wird.

Nach dem Trocknen ist das Gut meist hochporös und aufgrund der Hydrophilie der Oberfläche und des niedrigen Dampfdruckes über den Kapillaren äußerst hygroskopisch.

4.5. Nachbehandlung

Ist der gewünschte Restwassergehalt eingestellt, wird die Trockenkammer entweder mit getrockneter Luft oder Inertgasen geflutet. Ist das Produkt in Flaschen mit Stopfen (in geöffneter Stellung) getrocknet, werden diese Stopfen in der Kammer mit einer Hydraulikvorrichtung in die Hälse hineingedrückt. Handelt es sich um Produkte in

Schalen oder offenen Gefäßen, muß die Weiterverarbeitung nicht nur unter sterilen Bedingungen, sondern unter Umständen auch sehr rasch erfolgen, um die Wasserdampf- oder Sauerstoffaufnahme zu begrenzen.

Die Lagerfähigkeit und die Löslichkeit des gefriergetrockneten Produktes hängen außer von den Produkteigenschaften auch von dem Restwassergehalt, den Eigenschaften des Stopfens und der Art des Flutgases ab.

4.6. Zusammenfassung

Der Prozeß der Lyophilisation ist äußerst komplex. Viele Faktoren beeinflussen den Vorgang des Gefriertrocknens und entscheiden über Erfolg oder Mißerfolg. Obwohl dieses Kapitel nur ein kleiner Abriss über diese Materie ist und hier auf viele weitere Details, wie z.B. Wärmeübergänge beim Einfrieren und Trocknen, nicht näher eingegangen wird, kann man jedoch jetzt schon feststellen, daß es verschiedene Möglichkeiten gibt, möglichst kurze Prozeßzeiten bei der Gefriertrocknung zu erreichen, um schnell und ökonomisch arbeiten zu können.

Tieferen Einblick in dieses Gebiet gewährt u.a. Pikal [1999], der die Abläufe von Wärme- und Massenübergängen bei der Gefriertrocknung unter niedrigen Drücken näher beschreibt.

An folgenden Faktoren kann angegriffen werden, um den Vorgang zu optimieren:

- genaue Kenntnis der Stoffeigenschaften und Einfriercharakteristika
- Einfriergeschwindigkeit so wählen, daß eine grobporige Struktur entsteht
- geringe Schichtdicken
- temperaturgeregelte Stellflächen
- hohe Produkttemperatur (unterhalb des eutektischen Punktes)
- hohe Temperaturdifferenz zwischen Produkt und Kondensator
(Produkttemperatur erhöhen bzw. Kondensatortemperatur erniedrigen)
- kurze Wegstrecken zwischen Produkt und Kondensator
- leistungsstarkes, genau regelbares Pumpsystem

C. EXPERIMENTELLER TEIL

5. Untersuchung ausgewählter konventioneller Augentropfen

Im Rahmen einer Probandenstudie sollten ophthalmische Lyophilisate mit konventionellen Augentropfen verglichen werden. Zur Beurteilung der Wirkungen und Verträglichkeit wurden pH-Wert, Tonizität und Tropfenmasse der Augentropfen bestimmt. Die ermittelte mittlere Tropfenmasse wurde als Grundlage zur Berechnung des Arzneistoffgehaltes in den Lyophilisaten verwendet, um vergleichbare Dosen in den Darreichungsformen zu erhalten.

5.1. Materialien

Pilomann[®] 1 %, Dr. Mann Pharma, Berlin

1 ml Lösung enthalten:

10,0 mg Pilocarpinhydrochlorid

Cetrimid, Natriumchlorid, Edetinsäure, Dinatriumsalz, Natriumhydroxidlösung, Wasser

Charge: 068-1 (Verfall: 07/2001)

Isopto[®]-Pilocarpin 1 % Augentropfen, Alcon Pharma GmbH, Freiburg

1 ml Lösung enthalten:

10,0 mg Pilocarpinhydrochlorid, 0,1 mg Benzalkoniumchlorid,

Borsäure, Natriumcitratdihydrat, Hypromellose, Wasser für Injektionszwecke

Charge: 97K17 (Verfall: 11/2000)

Pilocarpin ankerpharm 1 % Augentropfen, Chauvin ankerpharm GmbH, Rudolstadt

1 ml Lösung enthalten:

10,0 mg Pilocarpinhydrochlorid, Benzalkoniumchlorid,

Natriumacetattri-hydrat, Edetinsäure, Dinatriumsalzdihydrat, Natriumchlorid, Wasser für Injektionszwecke

Charge: 010398 (Verfall: 01/2000)

Mydriatikum Stulln[®] UD, Pharma Stulln GmbH, Nabburg

1 ml Lösung enthalten:

5,0 mg Tropicamid, 0,01 mg Phenylquecksilbernitrat,

Natriumcitrat, Salpetersäure, Wasser

Charge: 990217 (Verfall: 01/2001)

Die Firmen Dr. Mann Pharma und Alcon Pharma geben für ihre Präparate eine Haltbarkeitsdauer von 3 Jahren an, Pharma Stulln für ihr Präparat 2 Jahre [Schwendinger, 2000].

5.2. Geräte und Methoden

5.2.1. pH-Wert

Meßgerät:

pH-Meter, pH 90, Wissenschaftliche Technische Werke, Weilheim

Glaselektrode: Ingold Typ 405-S7/165, pH-Meßkette, pH 0...14, Elektrolyt 9811, 0...80°C, Best.-Nr. 104058019,

Durchführung:

Unverdünnte Lösung bis zur Konstanz

Kalibrierung:

2-Punkt-Messung:

Pufferkapseln pH 4,01 ± 0,02 (25 °C), Art. Nr. 8069, Merck, Darmstadt

Pufferkapseln pH 7,00 ± 0,02 (25 °C), Art. Nr. 8071, Merck, Darmstadt

Die Lösungen wurden nach Gebrauchsanweisung in demineralisiertem Wasser hergestellt.

5.2.2. Tonizität

Meßgerät:

Halbmikro-Osmometer, Typ ML, Nr. A0299, Knauer GmbH, Berlin

Meßkopf 7878, Knauer GmbH, Berlin

Durchführung:

Die Lösung wurde unter Zuhilfenahme einer Insulinspritze (BD-Micro-Fine, 1 ml U-40 Insulin, Becton Dickenson GmbH, Heidelberg) in das Meßgefäß gefüllt (0,15 ml) und vermessen. Jede Messung wurde zwei mal mit der gleichen Lösung durchgeführt, die Messungen wurden mit neuer Lösung zwei mal wiederholt.

Kalibrierung:

2-Punkt-Messung:

0 mOsmol/kg (destilliertes Wasser) und 400 mOsmol/kg (Eichlösung)

Eichlösung: 2 ml Ampulle, 400 mOsmol/kg (12,687 g NaCl/kg Wasser), Art.Nr. Y1241, Charge: 5484C41, Knauer GmbH, Berlin

Meßbereich: 400 mOsmol/kg

Temperaturabsenkung im Kühlfach: -16°C

Probenvolumen: 0,15 ml

Meßgefäß: 0,15 ml, A 0913, Knauer GmbH, Berlin

5.2.3. Oberflächenspannung

Meßgerät:

Krüss-Gerät K12, Krüss GmbH, Wissenschaftliche Laborgeräte, Hamburg

Plattenmethode, Wilhelmi-Platin-Platte

Breite: 19,900 mm

Dicke: 0,200 mm

Eintauchtiefe: 1 mm

Empfindlichkeit der Waage: 0,01 g

Dichte: Wasser: 0,998000 g/cm³

500 Meßwerte alle 5 Sekunden

Software: K121 Kontaktwinkel- und Adsorptionsmeßsystem, Version 2.13a-D Plus

Temperatur: 20,0 °C +/- 0,5 °C

Durchführung

Vor jeder Messung wurden die Platinplatte und das Probengefäß mit Aceton gereinigt, ausgeglüht und erkalten gelassen. Die Lösung wurde in ein Glasgefäß gefüllt und temperiert. Die Plattenunterkante wurde mit der Flüssigkeit in Kontakt gebracht und dadurch benetzt. Gemessen wurde die Kraft K , mit der die benetzte Platte in die Flüssigkeit gezogen wurde.

Entsprechend der benetzten Länge L_b gilt:

$$\sigma = \frac{K}{L_b \cdot \cos \theta}$$

σ = Oberflächenspannung [mN/m]

K = gemessene Kraft [mN]

L_b = benetzte Länge [m]

θ = Benetzungswinkel [°]

θ bezeichnet den Kontaktwinkel (Winkel zwischen der Tangente der Benetzungslinie und der Plattenoberfläche; eine vollständige Benetzung (Spreiten) ergibt einen Kontaktwinkel von Null), der für die üblicherweise verwendeten aufgerauhten Platinplatten bei Wasser und wäßrigen Lösungsmitteln praktisch gleich Null gesetzt werden kann.

Die Daten wurden über einen Zeitraum von 40 Minuten aufgenommen. Der Endwert wurde notiert. Die Messungen wurden mit neuer Lösung drei mal durchgeführt und daraus der Mittelwert gebildet.

5.2.4. Tropfenmasse

Meßgerät:

Analysenwaage Sartorius, BP 210S, d=0,1 mg, Nr. 50711009, Sartorius GmbH, Göttingen

Durchführung:

Der Vorgang des Tropfens wurde nach Gebrauchsanweisung durchgeführt. Mit Daumen und Zeigefinger wurde Druck auf die Vorrichtung ausgeübt, bis ein Tropfen in das Becherglas herabfiel. Die Tropfen wurden einzeln gewogen und das Gewicht notiert. Nach jeder Wägung wurde die Flasche um 180° gedreht, um eine erneute Applikation zu simulieren. Der Zeitabstand zwischen zwei Tropfen betrug 5 Sekunden.

5.2.5. Tropfenmasse und Dosiergenauigkeit handelsüblicher Pilocarpin-Augentropfen (*Pilomann*[®] 1 %) in Mehrdosenbehältern

Die Literaturangaben über die Tropfengröße handelsüblicher Augentropfen sind recht unterschiedlich (s. Kap. 2.6.1.10.). Rezeptureigenschaften, Flaschendesign und Tropfmethodik spielen dabei eine wesentliche Rolle. In der Praxis wird bei Augentropfen in Mehrdosenbehältnissen häufig ein mittleres Tropfengewicht von 40 µl angenommen. Anhand von konventionellen Pilocarpin-Augentropfen sollte überprüft werden, ob dies zutrifft und inwieweit das Gewicht des Tropfens und damit der Arzneistoffgehalt bei der Applikation schwanken kann.

Durchführung:

Die Tropfflasche wurde, wie in der Gebrauchsanweisung beschrieben, während des Tropfvorganges senkrecht gehalten. Mit Daumen und Zeigefinger wurde Druck auf die Kunststoffflasche ausgeübt, bis ein Tropfen in das Becherglas herabfiel. Es wurden 250 Tropfen ausgewertet. Die Raumtemperatur betrug 23 °C (s.a. Kap. 5.2.4.).

5.2.6. Vergleich verschiedener Pilocarpin-Handelspräparate

Um die Ergebnisse des vorigen Versuchs zu bestätigen, wurde eine weitere Testreihe aufgestellt. Drei pilocarpinhydrochloridhaltige wässrige Augentropfen-Handelspräparate unterschiedlicher Preiskategorien wurden willkürlich aus der Roten Liste [1997] ausgewählt:

<i>Pilocarpin ankerpharm 1 % Augentropfen, 10 ml</i>	DM: 4,90 (10 ml); 12,50 (30 ml)
<i>Pilomann[®] 1 % Augentropfen, 10 ml</i>	DM: 5,96 (10 ml); 14,97 (30 ml)
<i>Isopto[®]-Pilocarpin Augentropfen 1 %, 10 ml</i>	DM: 7,08 (10 ml); 18,53 (30 ml)

Durchführung:

Der Versuch wurde von 3 Probanden (2 Frauen, 1 Mann, gesund, 27-30 Jahre) über einen Zeitraum von etwa 4 Wochen durchgeführt. Jeden Tag wurde das Gewicht von 10 Tropfen notiert, was ungefähr der Tagesdosis eines Glaukompatienten entspricht. Der Tropfvorgang wurde nach der jeweiligen Gebrauchsanweisung durchgeführt (s.a. Kap. 5.2.4.). 250 Tropfen wurden ausgewertet. Die Raumtemperatur schwankte zwischen 20 und 24 °C. Zusätzlich wurden die Probanden angewiesen, alle Auffälligkeiten schriftlich festzuhalten. Die Ergebnisse wurden einer Varianzanalyse unterzogen, um zu ermitteln, ob das Tropfverhalten personen- oder produktabhängige Abweichungen zeigte.

5.2.7. Tropfenmasse und Dosiergenauigkeit handelsüblicher Tropicamid-Augentropfen (*Mydriatikum Stulln[®] UD*) von Einzeldosenbehältern

Da in einer Studie Tropicamid-Tropfen aus Einzeldosisbehältern (EDOs) zum Einsatz kommen sollten, waren Informationen zur Tropfengröße unerlässlich.

Durchführung:

Der Behälter wurde während des Tropfvorganges senkrecht gehalten. Aus einem EDO wurden 3 Tropfen entnommen. Es wurden 50 EDOs mit jeweils 3 Tropfen ausgewertet. Die Raumtemperatur betrug 23 °C (s.a. Kap. 5.2.4.).

5.3. Ergebnisse

5.3.1. Charakterisierung der Augentropfen

pH-Wert

Die Bestimmung der pH-Werte der Handelspräparate lieferte folgende Ergebnisse:

	Pilocarpin ankerpharm 1 %	Pilomann[®] 1 %	Isopto[®] - Pilocarpin 1 %	Mydriatikum Stulln[®] UD
pH-Wert	5,12	4,79	4,48	5,61

Tab.5.1: pH-Werte einiger Handelspräparate

Alle Lösungen lagen außerhalb des schmerzfreien Toleranzbereichs am Auge, der zwischen pH 7 und 9 liegt (s. Kap. 2.6.1.1.). Bei einer Applikation müßten alle diese Tropfen zu Reizungen am Auge führen, was sich in einem Brennen und erhöhten Tränenfluß bemerkbar machen wird (s.a. Kap. 8.5.1., 8.5.2.: aufgetretene Nebenwirkungen).

Bei den Pilocarpin-Präparaten mußte der Hersteller einen Kompromiß zwischen der Verträglichkeit am Auge und einer ausreichenden Stabilität des Arzneimittels über einen längeren Zeitraum finden.

Bei Tropicamid ist dieser niedrige pH-Wert nicht erforderlich. Stabilitätsprobleme von Tropicamid in neutraler Lösung sind nicht bekannt (s. Kap. 8.2.2.).

Tonizität

Die Bestimmung der Tonizität der Handelspräparate ergab folgende Resultate:

	1. Messung [mOsmol/kg]		2. Messung [mOsmol/kg]		3. Messung [mOsmol/kg]		Mittelwert [mOsmol/kg]
	A	B	A	B	A	B	
Messung							
Pilocarpin ankerpharm 1 %	273	274	270	271	276	274	273
Pilomann[®] 1 %	306	307	310	309	305	305	307
Isopto[®] - Pilocarpin 1 %	-	-	-	-	-	-	- *
Mydriatikum Stulln[®] UD	258	257	263	265	255	256	259

Tab.5.2: Tonizitäten einiger Handelspräparate

* Die Bestimmung der Tonizität von Isopto-Pilocarpin[®] war nicht mit dieser herkömmlichen Methode möglich. Vermutlich verhinderte der viskositätserhöhende Zusatz HPMC unter den gegebenen Versuchsbedingungen ein spontanes Ausfrieren der Lösung.

Obwohl die Toleranz des Auges gegenüber osmotischen Abweichungen recht groß ist und über genaue Grenzwerte in der Literatur verschiedene Angaben gemacht werden (s. Kap. 2.6.1.2.), waren die Handelspräparate nahezu isotonisch.

Die Verträglichkeit der oben genannten Produkte ist hinsichtlich ihrer Tonizität ohne weiteres gegeben.

Oberflächenspannung

Die Bestimmung der Oberflächenspannung der Handelspräparate lieferte folgende Ergebnisse:

Produkt	1. Messung [mN/m²]	2. Messung [mN/m²]	3. Messung [mN/m²]	Mittelwert [mN/m²]
Pilocarpin ankerpharm 1 %	34,7	35,2	35,1	35,0
Pilomann[®] 1 %	36,6	37,3	38,0	37,3
Isopto[®] - Pilocarpin 1 %	38,0	37,0	36,9	37,3

Tab.5.3: Oberflächenspannungen einiger Handelspräparate

Die Oberfläche des Hornhautepithels ist stark hydrophob. Als kritische Oberflächenspannung des Auges wurde ein Wert von 28 mN/m bestimmt [nach Dolder, 1990]. Die Angaben über die Oberflächenspannung des Tränenfilms schwanken; je nach Literaturstelle liegen sie zwischen 37 und 46 mN/m.

Die untersuchten Lösungen liegen alle in der Nähe dieses Bereiches und dürften keine Probleme durch eine unzureichende Benetzung der Augenoberfläche bereiten.

5.3.2. Tropfenmasse und Dosiergenauigkeit handelsüblicher Pilocarpin-Augentropfen (Pilomann[®] 1 %) in Mehrdosenbehältern

Das Tropfendurchschnittsgewicht lag bei 28,8 mg. Der kleinste Tropfen hatte ein Gewicht von 19,2 mg, der größte 40,8 mg. Die Werte schwankten teilweise erheblich um den Mittelwert. Die relative Standardabweichung ergibt einen Wert von 10,7 %, die Standardabweichung beträgt 3,1 mg.

Der Wirkstoffgehalt der Tropfen schwankte somit zwischen 0,192 mg und 0,408 mg Pilocarpinhydrochlorid pro Einzeldosis; es traten Dosisschwankungen bis zu 50 % auf.

Anhand der vorliegenden Daten kann man die Änderung des Tropfengewichtes im Verlauf der Zeit erkennen (s. Abb. 5.4.).

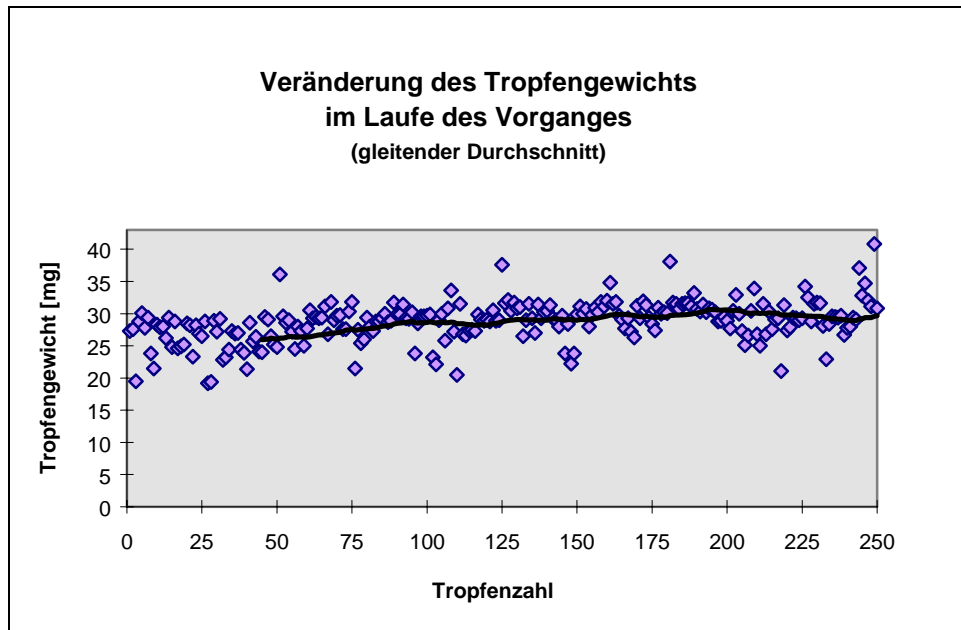


Abb.5.4: Tropfengewichte, Pilomann 1 % Augentropfen, 10 ml-Flasche

Um einen Trend in der grafischen Anzeige deutlicher zu erkennen, wurde zur Analyse der gleitende Durchschnitt herangezogen, der die Datenfluktuation glätten sollte. Als Periode wurde hier '40' eingesetzt, um einen ausreichenden Effekt zu erreichen.

Im Laufe der Zeit ist ein leichter Anstieg des Tropfengewichtes zu erkennen. Es ist allerdings unklar, worin dies seine Ursache hat. Eine Möglichkeit könnte sein, daß Flüssigkeitsreste am Tropfer hängen bleiben oder sogar herablaufen, der Wirkstoff auskristallisiert und die Abtropfoberfläche sich im Laufe der Zeit so verändert, daß dies einen Einfluß auf die Tropfengröße hat.

Eine vergleichbare Beobachtung machte ebenfalls Klinke [2000] bei ihren Untersuchungen über das Tropfverhalten von Dexamethason-Augentropfen. Auch sie erhielt im Vergleich zu den Anfangswerten erhöhte Endwerte und machte Rückstände am Tropfer dafür verantwortlich.

Werden die Tropfgewichte in einem Häufigkeitsdiagramm aufgetragen, so erhält man folgende Verteilung:

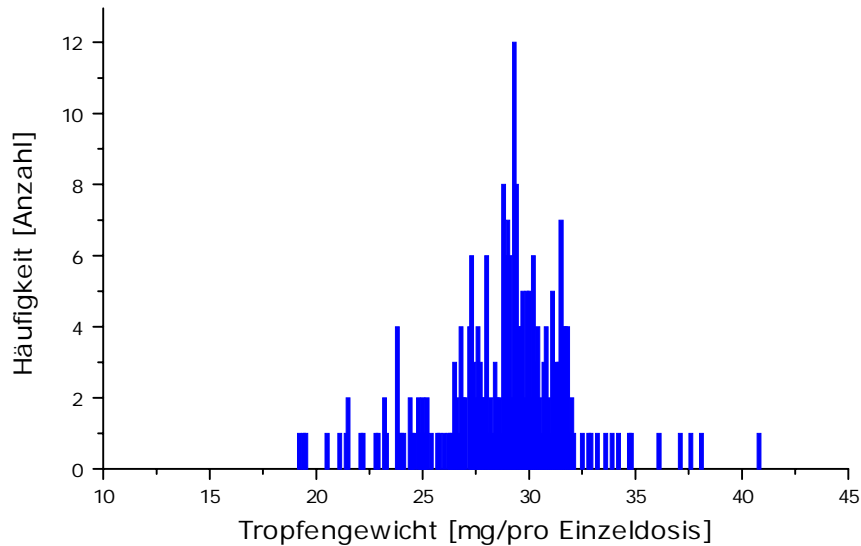


Abb.5.5: Tropfgewichtverteilung von Pilomann 1 % Augentropfen, Dr. Mann Pharma, Berlin, bei senkrechter Applikation; Anzahl der Tropfen: 250

Der größte Anteil lag zwischen 28 und 32 mg, wobei es allerdings immer wieder zu größeren Abweichungen gekommen ist. Die Verteilung ähnelt einer Normalverteilung.

5.3.3. Vergleich verschiedener Pilocarpin-Handelspräparate

Die Bestimmung der Tropfengewichte von konventionellen Augentropfen ergab folgende Ergebnisse:

Proband	Pilocarpin ankerpharm 1 % Augentropfen			Pilomann® 1 % Augentropfen			Isopto®-Pilocarpin 1 % Augentropfen		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Tropfenanzahl	250	250	250	250	250	250	250	250	227*
Mittelwert [mg]	31,74	31,00	30,51	28,28	27,14	32,53	30,37	33,79	36,03
Minimum [mg]	19,3	21,2	22,4	21,9	18,5	18,2	26,2	22,6	26,3
Maximum [mg]	60,0	39,8	28,9	46,8	34,5	75,6	34,4	39,0	68,1
s [mg]	3,810	3,332	2,998	2,743	2,318	7,568	1,672	3,435	4,114
s_{rel} [%]	12,004	10,748	9,824	9,702	8,541	23,264	5,506	10,167	11,417

Tab.5.6: Übersicht der Tropfengewichte handelsüblicher Pilocarpinpräparate

* bei diesem Probanden war die Flasche bereits nach 227 Tropfen leer

Die Daten zeigen, daß das Tropfengewicht dieser handelsüblichen Pilocarpinpräparate im Durchschnitt um die 30 mg (entspricht etwa 30 µl) schwankte, und nicht, wie üblicherweise angenommen, um die 40 µl oder, wie teilweise in der Literatur beschrieben, sogar bis 70 µl. Dies ist ein verhältnismäßig niedriges Gewicht, was für eine Applikation am Auge durchaus positiv zu werten ist (s. Kap. 2.6.1.10.).

Bei allen Produkten traten Dosisschwankungen bis über 50% auf.

Zweifache Varianzanalyse

Zur Auswertung wurde eine zweifache Varianzanalyse mit ungleichen Zellumfängen herangezogen [nach Zöfel, 1992]. Als Faktoren werden einerseits die Probanden und andererseits die Präparate angesehen.

Die Berechnung lieferte folgendes Ergebnis:

Ursprung der Variabilität	df	SS	MS	F	Signifikanz
Präparat (fester Effekt)	2	8023	4012	265,8	***
Probanden (zufälliger Effekt)	2	5794	2879	191,9	***
Fehler (unerklärter Restfehler)	2223	33549	15,09		
Summe	2227	47366			

Tab.5.7: Varianzanalyse, $F(\alpha=0,001; 2;2223): 6,91$
 [Varianzanalyse nach Zöfel, 1992]

Sowohl zwischen den Präparaten an sich als auch zwischen den Probanden besteht bezüglich der ermittelten Tropfenmassen ein statistisch hoch signifikanter Unterschied. Gleiche Präparate liefern also bei verschiedenen Personen abhängig von einem individuellen Tropfverhalten unterschiedliche Tropfengrößen.

Beurteilung der Präparate:

Pilocarpin ankerpharm 1 % Augentropfen

Die verwendeten Flaschen dieses Herstellers sind sehr weich und flexibel. Sie wurden aus einem Guß hergestellt und besitzen somit keinen speziellen Tropfer-Aufsatz. Bei zwei Probanden tauchte wiederholt das Problem auf, daß der erste Tropfen bereits bei dem Umdrehen der Flasche herabfiel, und nicht erst bei der beabsichtigten Druckausübung. Bei einer tatsächlichen Applikation würde somit ein Tropfen herunterfallen, ohne daß der Patient die Kontrolle darüber hat.

Auf der anderen Seite stellte es sich heraus, daß man leicht etwas zu viel Druck ausüben konnte, und in diesem Fall zwei Tropfen direkt hintereinander erhielt. Die Gefahr einer Fehl- bzw. Doppelapplikation war groß. Laut Gebrauchsanweisung soll die Flasche lediglich 'nach unten' gehalten werden. Die Variation der Tropfengröße in Abhängigkeit der sich permanent ändernden Abtropffläche liegt auf der Hand. Es wurde festgestellt, daß die beste Kontrolle möglich ist, wenn die Flasche fast in der Waagerechten gehalten wird. Der Nachteil ist hier allerdings die schlecht definierte Abtropffläche. Zusätzlich lief der Inhalt an der Flasche herab, die Flasche wurde naß und verklebte (Inhaltsstoffe kristallisierten an der äußeren Oberfläche), die Substanz verteilte sich auf der Hautoberfläche und der Flüssigkeitsverlust war somit recht hoch.

Gelegentlich blieb ein kleiner Tropfen an der Naht hängen. Ein zweiter Tropfen floß mit diesem zusammen und es fiel als ein ausgesprochen großer Tropfen herab. Für

eine richtige Applikation sähe bei diesem Präparat der Vorgang folgendermaßen aus: Zielen - Flasche umdrehen - Tropfen fällt herab - Treffen. Dies wird in keinem Fall die Compliance fördern und den Therapieerfolg sichern.

In der Gebrauchsanweisung steht der Hinweis, daß die Augen nach der Applikation geschlossen werden sollten, damit sich die Flüssigkeit gut verteilen kann.

Allerdings wird ein Schließen der Augenlider bei der Applikation unvermeidlich sein, da es aufgrund des niedrigen pH-Wertes zu Reizungen und Augenbrennen kommen wird.

Isopto[®]-Pilocarpin 1 % Augentropfen

Die Firma Alcon bietet ihre Augentropfen in einem Applikationssystem an, das speziell für eine genauere Dosierung entwickelt worden ist: die sogenannte Drop-Tainer[®]-Flasche. Die Applikation eines Tropfens soll durch 'leichten Druck auf den Flaschenboden der Drop-Tainer[®]-Flasche' erfolgen, und nicht durch das übliche Zusammenquetschen der Flaschenwände.

Auch bei diesem System ließ es sich nicht vermeiden, daß der Inhalt an der Außenseite der Flasche entlang lief. Es kam dort zur Salzbildung, die Inhaltsstoffe kristallisierten sichtbar aus.

Positiv zu vermerken ist die Tatsache, daß kein Tropfen herabfiel, wenn die Flasche herumgedreht wurde. Die Flasche besteht aus stabilem, verhältnismäßig starrem Kunststoff. Für ein vorschriftsmäßiges Tropfen ist allerdings verhältnismäßig viel Kraft im Zeigefinger notwendig. Es stellt sich die Frage, ob ältere Leute diese aufbringen können.

Pilomann[®] 1 % Augentropfen

Bei diesem Produkt handelte es sich ebenfalls um eine stabile Kunststoffflasche aus steifem Material, die zum Tropfen gut geeignet ist. Der Hersteller weist als einziger von den drei untersuchten Präparaten darauf hin, die Flasche bei der Applikation senkrecht zu halten und hat entsprechendes Bild im Beipackzettel abgebildet.

Im Gegensatz zum erstgenannten Präparat wird hier der Hinweis gegeben, das Auge nach erfolgter Applikation möglichst offen zu halten und es zu bewegen, damit eine gute Verteilung der Flüssigkeit gewährleistet ist. Allerdings wird auch hier ein Schließen der Augenlider bei der Applikation unvermeidlich sein, da es aufgrund des

niedrigen pH-Wertes zu Reizungen und Augenbrennen kommen wird, was einen Reflexlidschlag zur Folge haben wird.

Bei diesen Tropfen trat gehäuft das Problem auf, daß die Lösung nach Bewegungen stark schäumte und Blasen bildete, was zu erheblichen Schwankungen im Tropfengewicht führte. Bei einem Transport des Präparates ist es unvermeidlich, daß sich eine schäumende Lösung bildet, die über einen langen Zeitraum in dieser Form beständig ist. Um Fehldosierungen zu vermeiden sind ausreichende Wartezeiten unvermeidlich.

Dieses Präparat ergab das niedrigste Tropfendurchschnittsgewicht, was für eine Applikation am vorteilhaftesten ist (s. Kap. 2.6.1.10.).

Bei allen Präparaten trat das Problem der Schaumbildung der Zubereitung auf. Die Konsequenz war eine schlechtere Dosiermöglichkeit. Da die Schaumbildung mit zunehmender Entleerung der Flasche zunahm, wäre ein Hinweis für die Patienten sinnvoll, nie zu versuchen, die Flasche vollständig zu entleeren, obwohl dies auf Unverständnis des Patienten stoßen könnte, der das Arzneimittel bezahlt hat und insofern auch vollständig nutzen möchte.

5.3.4. Tropfenmasse und Dosiergenauigkeit handelsüblicher Tropicamid-Augentropfen (*Mydriatikum Stulln*[®] UD) in Einzeldosenbehältern

Die Bestimmung der Tropfengewichte aus den Einzeldosenbehältern ergab folgende Resultate:

	1. Tropfen	2. Tropfen	3. Tropfen
Mittelwert [mg]	29,72	27,98	29,46
Minimum [mg]	19,0	7,9	9,8
Maximum [mg]	43,1	39,5	53,7
s [mg]	5,274	6,993	7,269
S_{rel} [%]	12,469	17,705	13,536

Tab.5.8: Übersicht der Tropfengewichte von *Mydriatikum Stulln*[®] UD, ausgewertete EDOs: 50 Stück

Im Mittel betrug die Tropfenmasse bei diesem EDO-Präparat um die 30 mg, was etwa 30 µl entspricht. Im Vergleich zu den Mehrdosenbehältern wurden niedrigere Minimal- und Maximalwerte erreicht. Die Größenordnungen von Mittelwert, Standardabweichung und relativer Standardabweichung sind vergleichbar.

Beurteilung von Mydriatikum Stulln[®] Augentropfen

Bei der Handhabung tauchten verschiedene Probleme auf. So spritzte beim Öffnen durch Abdrehen des Kunststoffverschlusses der EDOs regelmäßig ein Teil des Inhalts heraus und verteilte sich auf den Händen. Der Versuch, die im oberen Bereich der EDO vorhandene Flüssigkeitsmenge vor dem Öffnen herunterzuschütteln, gelang nicht immer. Durch diese Bewegung entstanden jedoch zusätzlich Blasen, die wiederum die Tropfenbildung beeinträchtigten.

Nach dem Öffnen hing am Rand der EDO gelegentlich bereits ein kleiner Tropfen, der dazu führte, daß der herabfallende Tropfen besonders groß wurde. Das Abwischen einer EDO vor einer Applikation wäre eine entsprechende Maßnahme, um dies in Zukunft zu vermeiden.

War der Druck, der auf die EDOs ausgeübt wurde, zu groß, erhielt man anstatt eines Tropfens einen feinen Flüssigkeitsstrahl, der jegliche genaue Applikation verhinderte. Die Bestimmung des vollständigen Inhalts von 20 EDOs ergab im Durchschnitt das angegebene Nenngewicht von 0,4 ml/EDO. Trotz dieser Menge war es oft nur möglich, bis zu drei Tropfen (etwa 0,1 ml) ohne Probleme zu erhalten. Der restliche Inhalt verblieb im hinteren Teil der EDO und mußte verworfen werden.

Der Einsatz von Phenylquecksilbernitrat als Konservierungsmittel im Einzeldosisbehälter ist nicht erforderlich. Die Konzentration dieser Organoquecksilberverbindung liegt nach USP 22 mit 0,01% an der oberen Grenze. Zusätzlich liegt das pH-Optimum dieses Konservierungsmittels zwischen pH 7 und 9, was dieses Präparat mit einem pH-Wert von 5,61 ebenfalls nicht erfüllt [nach Bauer, 1993]. Im Allgemeinen sollten Organoquecksilberverbindungen so weit wie möglich vermieden werden. Ein anderer Hersteller (*Mydrum[®] Augentropfen*, Chauvin ankerpharm) verwendet Benzalkoniumchlorid als Konservierungsmittel in Mehrdosenbehältern.

Mydriatikum Stulln[®] UD sind die einzigen Tropicamid-Augentropfen, die in Form von EDOs auf dem deutschen Markt erhältlich sind.

5.4. Zusammenfassung

Alle untersuchten Präparate (*Pilomann[®] 1 %*, Dr. Mann Pharma, Berlin; *Isopto[®]-Pilocarpin 1 %* Augentropfen, Alcon Pharma GmbH, Freiburg; *Pilocarpin ankerpharm 1 %* Augentropfen, Chauvin ankerpharm GmbH, Rudolstadt) erreichten hinsichtlich Tonizität und Oberflächenspannung Werte, die keine Probleme bei der Anwendung am Auge erwarten lassen. Lediglich die pH-Wert-Einstellung scheint ein schwieriger Faktor zu sein. Die Pilocarpin-Präparate wurden aus Stabilitätsgründen zwischen pH 4,48 und 5,12 gepuffert. Die Tropicamid-Augentropfen (*Mydriatikum Stulln[®] UD*, Pharma Stulln GmbH, Nabburg) wiesen einen pH von 5,61 auf. Alle Tropfen lagen außerhalb des verträglichen pH-Wertes und werden zu Augenbrennen und einem erhöhten Tränenfluß führen.

Es hat sich herausgestellt, daß das Durchschnittsgewicht der Tropfen in den untersuchten Präparaten nicht, wie zuvor angenommen, 40 µl beträgt, sondern im Durchschnitt lediglich bei etwa 30 µl liegt.

Die gemessenen Minimal- und die Maximalwerte zeigen, daß der Wirkstoffgehalt eines Tropfens im Extremfall sowohl die doppelte Menge, als auch nur die Hälfte des Durchschnittswertes an Arzneistoff enthalten kann. Die Konsequenzen dieser Schwankungen machen sich entweder in einer unzureichenden Wirkung oder in einem Auftreten systemischer Nebenwirkungen bemerkbar.

Die Tropfenmasse stieg im Verlauf der Flaschenentleerung von etwa 25 mg im Schnitt auf fast 30 mg an. Gründe könnten eine Auskristallisation der Inhaltsstoffe an

der Flaschenöffnung sein und eine dadurch bedingte Veränderung des Abtropfverhaltens.

Die Applikation von Augentropfen unterliegt individuellen Schwankungen und kann trotz gleicher Präparate nicht miteinander verglichen werden. Da das Tropfengewicht von dem auf die Flasche ausgeübten Druck und der Geschwindigkeit abhängig ist, ist dies wahrscheinlich der Grund für diese Abweichungen.

Schwierigkeiten bei der Applikation können bereits aufgrund eines unzureichenden Flaschendesigns auftreten (s.a. Kap. 2.6.1.10.).

Abschließend sollte noch angemerkt werden, daß diese Versuche alle einer optischen Kontrolle unterlagen: der Proband konnte den Tropfvorgang genau beobachten und optisch die Kraft entsprechend dosieren. Außerdem konnte der Vorgang nach jedem Tropfen gut unterbrochen werden. Bei einer Eigenapplikation würden die Resultate sicherlich noch größeren Schwankungen unterliegen.

6. Ophthalmische Trägerlyophilisate:

Ausgangsstoffe und Herstellung - Untersuchungsmethoden

6.1. Bestandteile des Applikationssystems

Das Applikationssystem besteht, wie bereits im 3. Kapitel ausführlich beschrieben, aus den drei Hauptkomponenten:

- Wirkstoff(e)
- hydrophiles Polymergerüst
- hydrophobe Trägerfolie

In Abhängigkeit von Therapieziel und Arzneistoff können diese Komponenten variiert werden.

Die Anforderungen an die verwendeten Folien und Polymere wurden bereits von Grunthal [1996] im Einzelnen erläutert.

Für Polymere und Trägerfolien forderte sie:

- Physiologische Verträglichkeit und gesundheitliche Unbedenklichkeit
- Chemische Kompatibilität mit Wirk- und Hilfsstoffen
- Sterilisierbarkeit

Spezielle Anforderungen an die Trägerfolien waren:

- Elastizität und Reißfestigkeit
- Ausreichende Hydrophobie
- Haftung der Lyophilisate auf der Trägerfolie während der Herstellung und Lagerung
- Alterungsbeständigkeit
- Preis

Die Polymere sollten diese Kriterien erfüllen:

- Zulassung für die Anwendung am Auge
- Klarheit, Durchsichtigkeit und Schwebstofffreiheit nach ihrer Auflösung
- Brechungsindex wie Tränenflüssigkeit
- Keine Beeinträchtigung des Lidschlages

6.1.1. Wirkstoffe

Anhand einiger Modellarzneistoffe wurden die Eigenschaften der Lyophilisate untersucht. Verschiedene Versuche wurden mit entsprechenden wirkstoffhaltigen Lösungen oder Lyophilisaten durchgeführt.

<i>Pilocarpinhydrochlorid</i>	Ch.-B. K2 4040822 723, Merck, Darmstadt
	Ch.-B. K9 1682311 845, Merck, Darmstadt
<i>Tropicamid</i>	Ch.-B. 9903 B020, Synopharm, Barsbüttel
	Ch.-B. 9809 B012, Synopharm, Barsbüttel
<i>Fluorescein-Dinatrium</i>	Ch.-B. 01476, Krämer und Martin, St. Augustin

6.1.2. Hydrophiles Polymer

Das Lyophilisat besteht unter anderem aus einer oder mehreren Gerüstsubstanzen. Verschiedene Polymere wurden auf ihre Verwendbarkeit untersucht.

Hydroxypropylmethylcellulose

Methocel E4M Premium EP,

Ch.-B. MM 91102511 E, Colorcon Limited, Orpington, GB

Ch.-B. JD 22012N11, Colorcon Limited, Orpington, GB

Ch.-B. LB 25012N11, Colorcon Limited, Crossways Dartford, Kent, GB

Methocel E50-LV Premium EP,

Ch.-B. LL 17012N21, Colorcon, Crossways Dartford, Kent, GB

Methocel E15-LV Premium EP,

Ch.-B. LL 28012N21, Colorcon, Crossways Dartford, Kent, GB

Hydroxyethylmethylcellulose

Tylose MH20, Ch.-B. E 11230155, Hoechst AG, Frankfurt/Main

Tylose MH4000, Ch.-B. 11230594, Hoechst AG, Frankfurt/Main

Hydroxyethylcellulose

Tylose H300 G4 PHA, Ch.-B. 611380185, Clariant GmbH, Wiesbaden

Tylose H4000 G4 PHA, Ch.-B. 61138190, Clariant GmbH, Wiesbaden

Polyvinylpyrrolidon

Kollidon[®] 25, Ch.-B. 90-7475, BASF AG, Ludwigshafen

Kollidon[®] 90F, Ch.-B. 80-6936, BASF AG, Ludwigshafen

Natriumhyaluronsäure

Hyaluronic acid, sodium salt, Genzyme Fine Chemicals, Ch.-B. B 2919/3,
Haverhill, GB

Mannitol, Ch.-B. 74590088, Caesar & Loretz GmbH, Hilden

6.1.3. Hydrophobe Trägerfolie

PTFE

Polytetrafluorethylen (PTFE, Teflon[®], Hostaflon[®]) ist ein thermoplastischer Kunststoff von milchig weißer Farbe, der sich wachsartig anfühlt. PTFE ist chemisch inert und biokompatibel. Zurückzuführen sind diese Merkmale auf die Eigenschaften von Fluor-Kohlenstoff-Verbindungen. Die Kohlenstoff-Hauptkette verleiht, aufgrund den extremen Bindungsenergien von Fluor- und Kohlenstoff-Atomen, dem Makromolekül eine sehr hohe Stabilität. Zusätzlich wirkt sich die Größe von Fluor- und Kohlenstoff-Atomen positiv auf eine symmetrische Kettenkonfiguration aus. Die Fluor-Atome bilden eine Art dichte, spiralförmig verlaufende Ummantelung der Kohlenstoff-Atomkette und verhindern so eine Reaktion bei Kontakt mit anderen chemischen Verbindungen. Die Oberfläche von PTFE ist so glatt und gleitfähig, daß kaum eine Fremdschubstanz daran haften bleibt. Die sehr niedrigen Kohäsionskräfte führen u.a. dazu, daß PTFE von allen festen Werkstoffen den geringsten Reibungskoeffizienten besitzt. Feuchtigkeit und UV-Strahlung verursachen weder Verwitterung noch Versprödung. Die Dichte von PTFE ist abhängig von den Verarbeitungsbedingungen und der damit verbundenen Kristallinität.

Virginales oder compoundiertes (mit Zusätzen wie z.B. Glasfaser, Graphit und Bronze versehenes) PTFE-Pulver wird unter hohem Druck zu einem Rohling verdichtet, der bei rund 350 °C gesintert wird (Preßsintern). Je nach Temperatur- und Druckführung entstehen kompakte oder poröse Formkörper. Eine Alternative ist die Verwendung ungesinterter Materialien.

Durch ein besonderes Schälverfahren entstehen anschließend PTFE-Folien [Produktinformation Norton]. PTFE ist von -200 °C bis +260 °C temperaturbeständig.

Folgende PTFE-Folien wurden auf ihre Eignung untersucht:

- PTFE Dichtungsmaterial für Metallene Verbindungen, Type-Nr. R10D7,
 - Dicke: 100 µm,
 - Sauerstoff 928/86, DIN DVGW 94.01 e581
 - Sauerstoff 5570/88, DIN DVGW 90.01 e828
- Hoechst Hostafon[®] ET 6235, Hoechst AG, Frankfurt
 - Dicke 50 µm
 - Dicke 100 µm
- Norton Pampus PTFE-Folie, virginal, Type 0100, Norton Pampus GmbH, Willich
 - Dicke 50 µm
 - Dicke 100 µm
- 3P GmbH, Plastic Omnium GmbH, Karben
 - ungesintertes PTFE-Band, Dicke 100 µm
 - geschältes gesintertes PTFE-Band, Dicke 100 µm
- Thomaplast[®], Reichelt High-Tech Teflon-Folie, Reichelt Chemietechnik GmbH und Co., Heidelberg
 - Dicke 120 µm
 - Dicke 250 µm
 - Dicke 500 µm
- Thomaplast[®], PTFE-Band, Dicke 100 µm, Reichelt Chemietechnik GmbH und Co., Heidelberg
- Thomafoil[®], PTFE-Folie, Reichelt Chemietechnik GmbH und Co., Heidelberg
 - Dicke 10 µm
 - Dicke 50 µm
- Gore Preclude[®] Pericardial Membrane, W.L.Gore & Associates GmbH, Putzbrunn
- Schleicher & Schuell, Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
 - TE 35 Membranfilter, Porendurchmesser 0,2 µm
 - TE 36 Membranfilter, Porendurchmesser 0,45 µm
 - TE 37 Membranfilter, Porendurchmesser 1 µm
 - TE 38 Membranfilter, Porendurchmesser 5 µm

Haltegriff

- Autoklavierband: Autoclave Tape 3M Medical Products Division, St. Paul, USA

6.2. Herstellung und Charakterisierung der Polymerlösungen

6.2.1. Herstellung der Polymerlösungen

Die Polymerlösungen wurden nach dem im Folgenden beschriebenen Verfahren jeweils frisch hergestellt. Bis zu ihrer Verwendung wurden sie bei Raumtemperatur in Weithalsflaschen aus Braunglas gelagert. Bei der Verwendung verschieden konzentrierter Polymerlösungen wurde eine Stammlösung hergestellt, die entsprechend verdünnt wurde.

Geräte:

Magnet- und Heizrührer, Typ RMHK, Gerhardt, Bonn

Materialien:

Wasser für Injektionszwecke, 5 ml Ampullen, Bayer AG, Leverkusen oder Ciba Geigy GmbH, Wehr

- *HPMC-Lösung*

1. Das destillierte Wasser wurde mit einem Heizrührer auf 85 - 90 °C erhitzt.
2. Die erforderliche Masse HPMC wurde auf die Wasseroberfläche aufgestreut und eingerührt, so daß eine agglomeratfreie Suspension entstand.
3. Die Dispersion wurde zu einer klaren Lösung kaltgerührt.
4. Das verdunstete Wasser wurde ersetzt.
5. Die Lösung wurde in ein Braunglasgefäß abgefüllt.

- *HEMC-Lösung*

1. Das destillierte Wasser wurde mit einem Heizrührer auf 85 - 90 °C erhitzt.
2. Die erforderliche Masse HEMC wurde auf die Wasseroberfläche aufgestreut und eingerührt, so daß eine agglomeratfreie Suspension entstand.
3. Die Dispersion wurde zu einer klaren Lösung kaltgerührt.
4. Das verdunstete Wasser wurde ersetzt.
5. Die Lösung wurde in ein Braunglasgefäß abgefüllt.

- *HEC-Lösung*

1. Die erforderliche Masse HEC wurde unter Rühren bei etwa 20 °C langsam in destilliertes Wasser gegeben.
2. Die Dispersion wurde gerührt, bis eine klare Lösung entstanden war.
3. Das verdunstete Wasser wurde ersetzt.
4. Die Lösung wurde in ein Braunglasgefäß abgefüllt.

- *PVP-Lösung*

1. Die erforderliche Masse PVP wurde auf die Oberfläche des destillierten Wassers bei etwa 20 °C aufgestreut und eingerührt.
2. Die Lösung wurde bis zur klaren Lösung gerührt.
3. Verdunstetes Wasser wurde ersetzt und die fertige Lösung in ein Braunglasgefäß abgefüllt.

- *Natriumhyaluronat-Lösung*

1. Die erforderliche Masse Natriumhyaluronat wurde bei etwa 20 °C auf die Wasseroberfläche langsam und vorsichtig aufgestreut und bis zur Bildung einer klaren Lösung gerührt.
2. Das verdunstete Wasser wurde ersetzt.
3. Die fertige Lösung wurde in ein Braunglasgefäß abgefüllt und kühl gelagert.

- *Polymer-Lösung mit Arzneistoff*

1. Auf die frisch hergestellte, kalte Polymerlösung wurde der Arzneistoff aufgestreut und bis zur vollständigen Lösung auf dem Magnetrührer bei Raumtemperatur gerührt.
2. Die fertige Lösung wurde in ein Braunglasgefäß abgefüllt und kühl und lichtgeschützt gelagert.

6.2.2. Charakterisierung der Polymerlösungen

Zur Charakterisierung der Lösungen wurden deren Dichte, Viskosität, Brechungsindex und eutektischer Punkt bestimmt.

6.2.2.1. Absolute Dichte

Die Dichte ρ [g/cm³] wurde nach der Pyknometermethode bestimmt [DIN 51 757, s.a. DIN 1306, 53 217].

Geräte:

Pyknometer: Schott Geräte GmbH, Hofheim/Ts., Füllvolumen 50 ml

Wasserbad: Thermostat Lauda, K2, Temperatur: $20 \pm 0,5$ °C

Durchführung:

Es wurde ein Pyknometer mit Bohrung im Stopfen verwendet. Nach dem Füllen wurde das Pyknometer in ein Wasserbad gestellt und nach 20 Minuten die Dichte [g/cm³] der Polymerlösungen bei $20 \pm 0,1$ °C bestimmt.

6.2.2.2. Brechungsindex

Der Brechungsindex wurde mit dem Abbé-Refraktometer bestimmt [DIN 51 423].

Gerät:

Abbé-Refraktometer, Carl-Zeiss, Oberkirchen

Durchführung:

Die erforderliche Probenmenge (mind. 0,5 ml) der zu untersuchenden Polymerlösung wurde auf die mit Wasser und Methanol gereinigte Glasfläche des Refraktometers aufgetragen. Der Brechungsindex n_D^{20} der Probe wurde bei einer konstant gehaltenen Temperatur von $20 \pm 0,1$ °C mit monochromatischem Licht gemessen.

6.2.2.3. Rheologie

Die Viskosität der Polymerlösungen wurde nach zwei verschiedenen Methoden bestimmt.

Es wurde sowohl ein Kapillarviskosimeter nach DIN 51 562 [Ubbelohde-Viskosimeter mit hängendem Kugelniveau zur Bestimmung der kinematischen Viskosität] als auch ein Rotationsviskosimeter verwendet [DIN 53 018, Messung der dynamischen Viskosität newtonscher Flüssigkeiten mit Rotationsviskosimetern].

*Kapillarviskosimeter nach Ubbelohde**Geräte:*

Kapillarviskosimeter: KPG[®]-Ubbelohde Viskosimeter, Schott-Geräte GmbH, Hofheim/Ts.

Folgende Kapillarviskosimeter wurden verwendet:

Nummer der Kapillare	Konstante <i>K</i> der Kapillare
I	0,00978
II	0,101
IIc	0,300
III	0,9903
IIIc	3,080
IV	9,711

Thermostat: Lauda Typ K2-D, Meßgerätewerk Lauda Dr. Wobser KG, Lauda

Durchführung:

1. Die Größe der Kapillare wurde so gewählt, daß die der Hagenbach-Korrektur anhaftende Unsicherheit den für die Zeitmessung zugelassenen Fehler nicht überschritt.
2. Etwa 15 ml Lösung wurden in das Vorratsgefäß gefüllt.
3. Das gefüllte Viskosimeter wurde in den Thermostaten gehängt. Die Messung begann nach einer Wartezeit von 15 Minuten.

Zahl der Einzelmessungen: 4

Mindestflußzeiten: 250(I), 100(II), 100(III) Sekunden

Die Viskositäten wurden unter verschiedenen Bedingungen bestimmt:

- Methocel E4M: 0,5 %, 1,0 %, 2,0 % (m/m), Temperatur: 20 °C
- Methocel E4M: 0,5 %, 1,0 %, 2,0 % (m/m), Temperatur: 20 °C

Die Polymerlösung wurde in 500 ml Infusionsflaschen aus Glas gefüllt, verbördelt und einer Dampfsterilisation (121 °C / 15 min / 2 bar) unterzogen. Beim Abkühlen wurde die Flasche wiederholt kräftig geschüttelt, damit die durch Dehydration bewirkte Ausflockung wieder in Lösung ging. Die klare Lösung wurde vermessen

- Methocel E4M: 0,25 %, 0,5 %, 0,75 %, 1,0 %, 1,5 %, 2,0 % (m/m), Temperatur: 30 °C

Rotationsviskosimeter Kegel/Platte

Geräte:

Rotationsviskosimeter: Rheometrics Mod.Nr. DSR (Dynamic Stress Rheometer), Rheometrics, Piscataway, NJ, USA

Meßsystem: Kegel - Platte, aus Titan

Abmessungen: Durchmesser: 50 mm, Winkel: 0,04 rad bzw. 2,29 °

Arbeitsabstand: 50 µm

Probenmenge: 1,3 ml ± 0,03 ml

Schubspannung: Sweep Mode, Linear

Anfangsschubspannung: 0,06 Pa

Endschubspannung: 1,0 Pa

Schubspannungsänderung: 0,01 Pa

Temperatur: 20,0 ± 0,1 °C

Software: Rheometric Scientific Rhios V4.4.4

Durchführung:

Das Probenvolumen wurde mit einer Pipettierhilfe auf die untere Platte blasenfrei aufgegeben und der Kegel vorsichtig abgesenkt. Nach erfolgter Temperierung (5 min) wurde die Messung gestartet, wobei die Schubspannung schrittweise von 0,06 Pa auf 1,0 Pa erhöht wurde.

Von jeder untersuchten Lösung wurden drei Proben vermessen.

- Methocel E4M: 0,5 %, 1,0 % (m/m), innerhalb von 5 Stunden nach der Herstellung
- Methocel E4M: 0,5 %, 1,0 % (m/m), 3 Wochen nach der Herstellung
- Pilocarpinhydrochlorid: 1,6 % in Methocel E4M: 0,5 %, 1,0 % (m/m), innerhalb von 5 Stunden nach der Herstellung
- Pilocarpinhydrochlorid: 1,6 % in Methocel E4M: 0,5 %, 1,0 % (m/m), 3 Wochen nach Herstellung

6.2.2.4. Eutektischer Punkt

Die nach DIN 51 005 als Dynamische Differenzkalorimetrie (DDK) bezeichnete, englisch Differential Scanning Calorimetry (DSC), ist eine thermoanalytische Methode, bei der durch die Messung der Heizleistung zwischen Probe und Referenz, die gleichzeitig demselben Temperaturprogramm unterworfen sind, die quantitative Erfassung der Wärmestromdifferenz ermöglicht wird.

Phasenübergänge wie Schmelzprozesse sind mit sprunghaften Enthalpie-Änderungen verbunden und können auf diese Weise detektiert werden.

Geräte:

Modell DSC-2 C, Differential Scanning Calorimeter, Perkin-Elmer, Norwalk, Connecticut, USA

Arbeitsbereich: - 40 bis 725 °C

Kühlrate: 0,1325 bis 320 °C/min

Aluminiumtiegel 50 µl, Deckel mit Öffnung, Perkin Elmer

Durchführung:

Etwa 5 mg Polymerlösung wurde in einen Tiegel eingewogen und mit dem zugehörigen Deckelchen verschlossen. Die Proben wurden einem Temperaturprogramm unterworfen, bei dem sie, wenn nichts anderes angegeben ist, mit einer Geschwindigkeit von 2,5 °C/min abgekühlt und mit 2,5 °C/min wieder aufgetaut wurden.

Zur Auswertung der erhaltenen Kurven wurde die jeweilige Peakanfangstemperatur der Kurve (Temperatur der ersten Abweichung der Meßkurve von der extrapolierten Anfangsbasislinie), die auch als Onset bezeichnet wird, herangezogen. Dieser Wert charakterisiert die Temperatur, bei der der thermische Effekt einsetzt [Widmann, 1990].

Vermessen wurden folgende Lösungen:

- Methocel E4M: 0,5 %, 0,75 %, 1,0 %, 5 %, 10 %, 20 % (m/m)
- Pilocarpinhydrochlorid: 1,6 % in Methocel E4M: 0,5 %, 0,75 %, 1,0 % (m/m)

6.3. Charakterisierung der Trägerfolien

6.3.1. Sensorische Prüfung

Bei der Applikation eines ophthalmischen Lyophilisates wird die Trägerfolie am Auge entlang gewischt. Dabei löst sich das Xerogel von dem Träger ab und wird mit der Tränenflüssigkeit rehydratisiert. Der verwendete Träger darf bei diesem Vorgang keine Verletzungen verursachen, muß andererseits jedoch ausreichend stabil sein, damit er nicht mit dem Lyophilisat umklappt und eine Applikation unmöglich wird.

Durchführung:

Aus den Folien wurden nach Vorlage Trägerstreifen hergestellt. Der leere Streifen wurde wiederholt in einem Selbstversuch am Auge entlang gewischt, um den Vorgang einer Applikation zu simulieren. Verursachte dieser Test Unannehmlichkeiten, Schmerzen oder besaß der Träger sogar ein gewisses Verletzungspotential, wurde das Material für die weitere Verwendung abgelehnt.

6.3.2. Foliendicke

Gerät:

Mikrometerschraube

Durchführung:

Die Folie wurde an drei willkürlich ausgesuchten Stellen vermessen. Der Mittelwert wurde gebildet und notiert.

6.3.3. Dampfsterilisation

Für eine aseptische Herstellung der Lyophilisate sind keimfreie Ausgangsmaterialien erforderlich. Das Mittel der Wahl ist eine Dampfsterilisation des Trägers. Durch diesen Prozeß könnte sich jedoch die Folienqualität verändern.

Geräte:

Autoklav: NF 1080PV 190727 ATE 2-1-9-1972, Fedegari, Pavia, Italien

Trockenschrank: Modell 500, Memmert GmbH & Co.KG, Schwabach

Durchführung:

Die nach einer Vorlage vorbereiteten Streifen wurden in einer Petrischale aus Glas in Autoklavierfolie eingeschweißt. Nach der Dampfsterilisation unter DAB-Bedingungen (121 °C, 15 min, 2 bar) wurden die Streifen optisch beurteilt und einer sensorischen Prüfung unterzogen.

6.3.4. Rasterelektronenmikroskopische Charakterisierung

Geräte:

Rasterelektronenmikroskop Hitachi S-2460N, Scanning Electron Microscope,
Tokio, Japan

Sputter Coater S150B, Edwards High Vacuum Internation, West Sussex, United
Kingdom

Bedingungen beim Sputtern:

Probenträger: gereinigte Aluminiumniete (Durchmesser: 0,8 cm)

Argondruck von ca. 0,1-0,2 hPa

Stromstärke: 20 mA

Dauer: 2 Minuten, 4 Durchläufe

Bedingungen beim Rasterelektronenmikroskop:

Arbeitsabstand: 25 mm

Beschleunigungsspannung: 15-20 kV

Printer: Mitsubishi Video Copy Processor P67E, Mitsubishi Electronic Corporation,
Tokyo, Japan

Durchführung:

Die Folie wurde auf einer Aluminiumniete mit UHU-Schnellkleber hart, Uhu GmbH, Bühl/Baden aufgeklebt. Silbersuspension wurde als leitende Verbindung zwischen Probenteller und Probe aufgetragen. Im Sputtercoater wurden die Proben mit Gold bedampft und unter Verwendung eines SE-Detektors im Rasterelektronenmikroskop betrachtet.

6.3.5. Veränderung der Oberflächenbeschaffenheit durch Prägung

Barthlott [1998] stellte fest, daß bestimmte Mikrostrukturen auf Oberflächen die Kohäsionskräfte soweit erniedrigen können, daß Partikel auf diesen Oberflächen nicht haften bleiben können. Dabei ist darauf zu achten, daß der Abstand zwischen den Erhebungen der Oberflächenstruktur im Bereich von 5 bis 200 µm, vorzugsweise 10 bis 100 µm und die Höhe der Erhebungen im Bereich von 5 bis 100 µm, vorzugsweise 10 bis 50 µm liegen. Eine solche Struktur kann u.a. durch geeignete Prägevorgänge erzeugt werden.

Um eine äußerst hydrophobe PTFE-Oberfläche zu erhalten, wurde eine Mikrostruktur nach einem Prägeverfahren eingestanz.

Geräte:

Metallstempel wurden nach Vorgaben von der Firma Brandt & Co., Leipzig gefertigt.

Prägestempel 1 nach Vorlage, Brandt & Co., Leipzig

Prägestempel 2 nach Vorlage, Brandt & Co., Leipzig

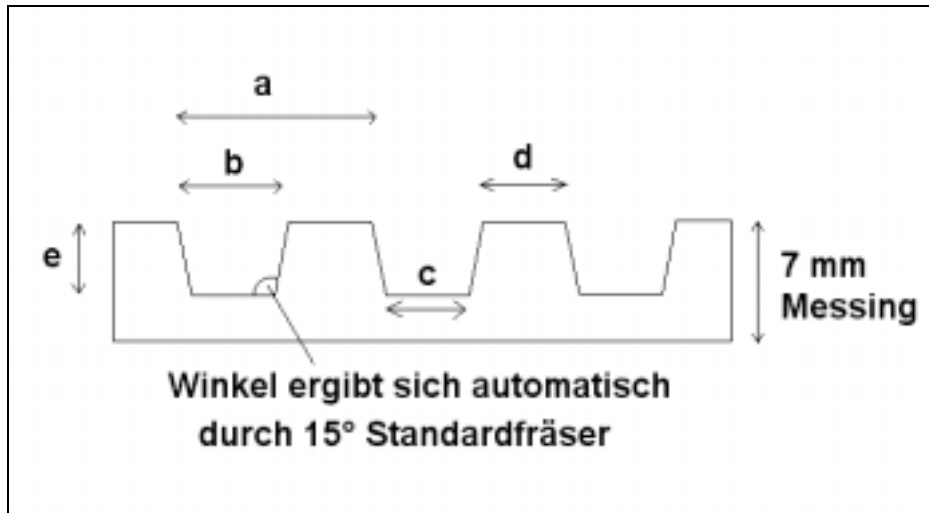


Abb.6.1: Vorlage für Prägestempel, Längsrillen

Vorgaben für Matrize:

Abmessung	Stempel 1 Maße [μm]	Stempel 2 Maße [μm]
a	200	150
b	100	50
c	k.A.*	k.A.*
d	100	100
e	50	100

Tab.6.2: Abmessungen der bestellten Matrizen

* k.A.: keine Angaben

Gegenpatrize: Silikonkunststoff (Dicke: 1 mm)

Hydraulische Presse, manuell bedienbar

Durchführung:

Auf die Silikonpatrize wurde der präparierte PTFE-Streifen und darauf die Matrize gelegt. Zwei Metallblöcke schlossen diese Konstruktion ein. Der Pressdruck wurde anschließend auf $p = 5 \text{ bar}$ angehoben und für einen Zeitraum von $t = 10 \text{ s}$ gehalten, bevor wieder entlastet wurde.

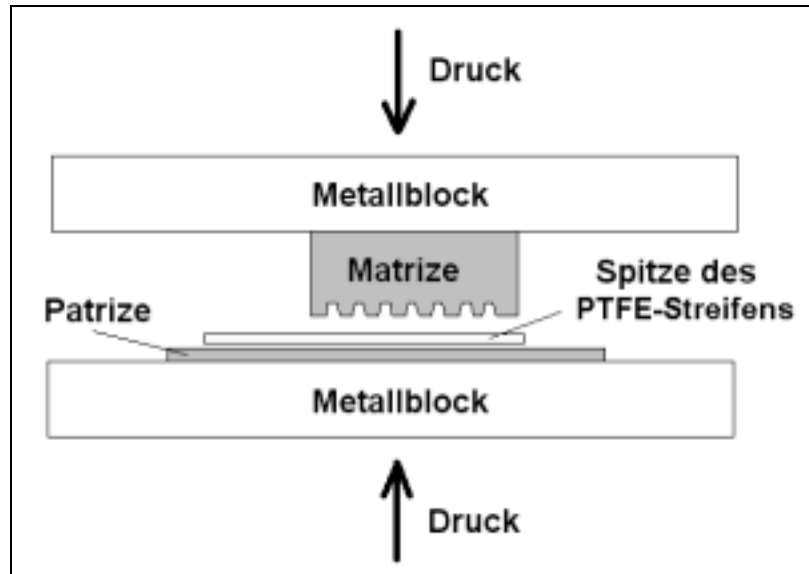


Abb.6.3:
Prägung von PTFE-Folie

6.4. Herstellung der Lyophilisate

Der Herstellprozeß der ophthalmischen Lyophilisate besteht aus mehreren Teilschritten, die im Folgenden erläutert werden.

Geräte:

Autoklaven:

- NF 1080PV 190727 ATE 2-1-9-1972, Fedegari, Pavia, Italien
- VST 40/60, Nr. 91/410, max. Temp.: 132 °C, max. Druck: 2,2 bar, Apparatebau Zirbus, Osterode/Harz

Trockenschränke:

- Modell 500, Memmert GmbH & Co.KG, Schwabach
- Typ FT 420, Nr. 7104640, WC Heraeus, Hanau

Laminar Air Flow (LAF): Laminar Geräte Büttner-Schilde-Haas AG

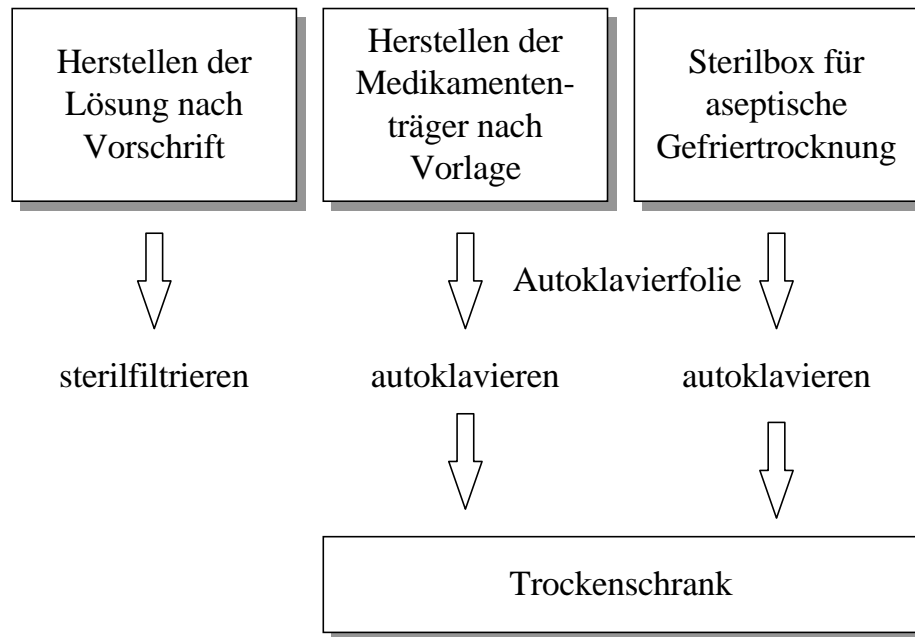
Folienschweißgerät: Melaseal® Komfort 101, Melag

Autoklavierfolie: Melafol 1502, Melag®, Breite: 150 mm

Autoklavierband: Autoclave Tape, 3M Medical Products Division, St. Paul, USA

Sterilbox (s. Abb. 6.4.)

Vorbereitung der Ausgangsmaterialien



Polymerlösung

Die Polymerlösung wurde nach Vorschrift frisch unter der reinen Werkbank (LAF) hergestellt. Die fertige Lösung wurde über einen Membranfilter (Nalgene[®], Einmalfilter, Cat.No. 190-2520, Celluloseacetat, 0,22 µm, Schleicher und Schüll, Dassel) einer Entkeimungsfiltration unterzogen und sofort weiter verwendet.

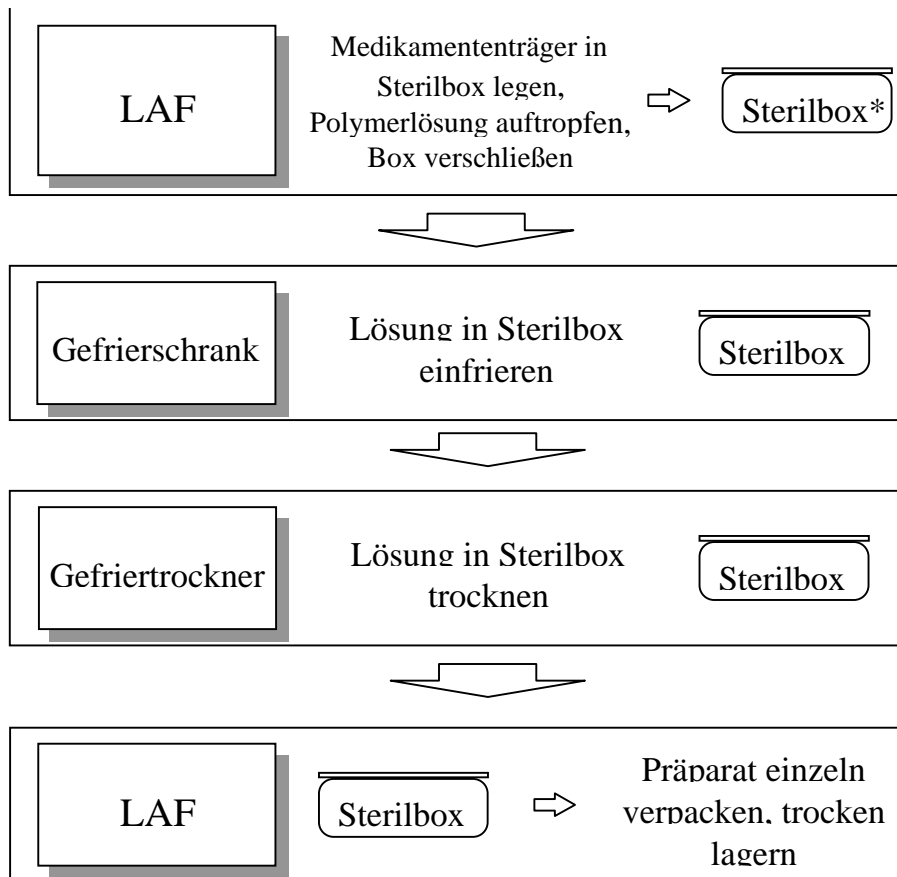
Medikamententräger/Trägerfolie

Die Herstellung des Trägers erfolgte unter keimarmen Bedingungen. In sauberer, desinfizierter Umgebung wurden Folie und Griff nach einer Vorlage (etwa 50 mm Länge und 10 mm Breite) zugeschnitten. Dabei wurden desinfizierte Vinyl-Einmalhandschuhe getragen, um die Keimbelastung zu reduzieren und Verunreinigungen zu verhindern. Ablagerungen auf der Oberfläche könnten den Kontaktwinkel der Lösung auf dem Träger verändern, was später zu Haftproblemen des Lyophilisates auf der Folie führen könnte.

Zur Stabilisierung der weichen PTFE-Folie wurde ein Griff benötigt. Autoklavierklebeband wurde deshalb zur besseren Handhabung des Medikamententrägers befestigt. Die fertigen Träger wurden nebeneinander in Petrischalen aus Glas gelegt, in Autoklavierfolie eingeschweißt und unter DAB-

Bedingungen (121 °C, 15 min in gespanntem gesättigten Wasserdampf) sterilisiert. Der Sterilisationsindikator bestätigte die bei dem Prozeß erreichte Temperatur von 121 °C. Die sterilisierten Streifen wurden im Trockenschrank im Folienbeutel bei 60 °C vollständig getrocknet.

Aseptische Gefriertrocknung



*Sterilbox: s. Übersicht Abb. 6.4

Auftropfen

Die vorbereiteten Trägerfolien wurden unter aseptischen Bedingungen unter einer Laminar-Air-Flow Bank ihrer Verpackung entnommen und nebeneinander in die sogenannte Sterilbox (s. Abb. 6.4.) gelegt, die ebenfalls dampfsterilisiert wurde. Diese Box wurde speziell für die aseptische Gefriertrocknung im Labormaßstab entwickelt, da die verwendete Gefriertrocknungsanlage nicht für eine aseptische Herstellung der Produkte geeignet war.

Im Deckel der Sterilbox befand sich eine Öffnung, in die ein Metallsieb mit auswechselbarem Membranfilter (ME 24, Ref.Nr. 401 721, Schleicher & Schuell, Dassel, autoklavierbar, 0,22 µm, Ø 100 mm) integriert war. Die frisch hergestellte, filtrierte Polymerlösung wurde mit einer Eppendorf-Pipette auf die Träger aufgetragen. Das Volumen betrug 25 µl. Nach beendeter Arbeit wurde die Box verschlossen.

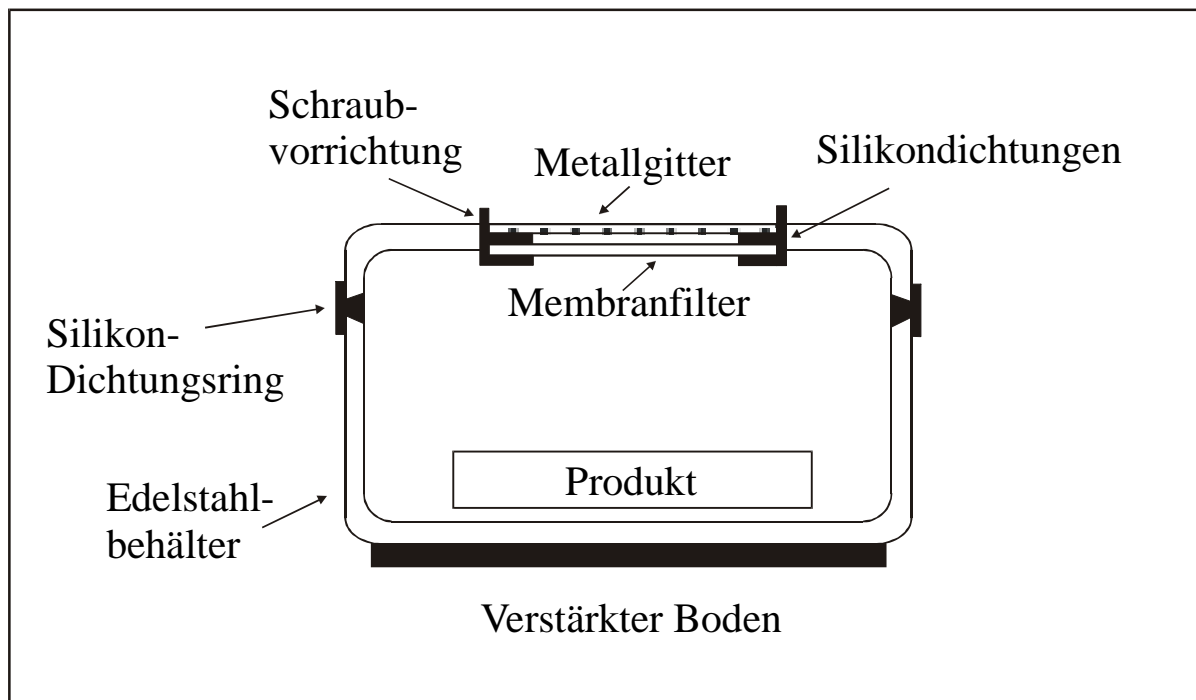


Abb.6.4: Konstruktionsübersicht der Sterilbox (Durchmesser: 18 cm, Höhe: 10 cm)

Einfrieren

Die Box wurde komplett eingefroren. Um ein gleichmäßiges Einfrieren der Lösungen zu erreichen, wurde die Box auf eine bereits temperierte, 2 cm dicke Metallplatte gestellt. Zur Auswahl standen drei Methoden. Wenn nichts anderes angegeben ist, wurde der Gefrierschrank als die Methode der Wahl verwendet. Die Einfrierdauer war von der Einfriertemperatur abhängig (s. Kap. 7.3.2., Tab.7.51.).

Gerät	Gefrierschrank	Trockeneis	flüssiger Stickstoff
Temperatur [°C]	-30	-79	-196

Tab.6.5: Endtemperaturen zum Einfrieren

Trocknen

Nach dem Einfriervorgang wurde die Sterilbox in den Gefriertrockner überführt. Um ein Antauen der Proben zu verhindern, wurde die zum Einfrieren verwendete Metallplatte ebenfalls transferiert. Zur Gefriertrocknung wurde die Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4 der Firma Christ, Osterode am Harz verwendet. Der nach einem Zweikammerverfahren arbeitende Trockner (die Proben sind räumlich durch ein Zwischenventil vom Kondensator getrennt) besteht aus einer Trockenkammer und einem spiralförmigen Kondensator (-50 bis -80 °C) zum Abscheiden des Lösungsmittels. Der gewünschte Kammerdruck ist manuell einstellbar und wird automatisch über eine Vakuumpumpe geregelt. Die Proben stehen auf elektrisch beheizbaren Stellflächen, so daß die Zufuhr von Sublimationsenergie während der Trocknung möglich ist.

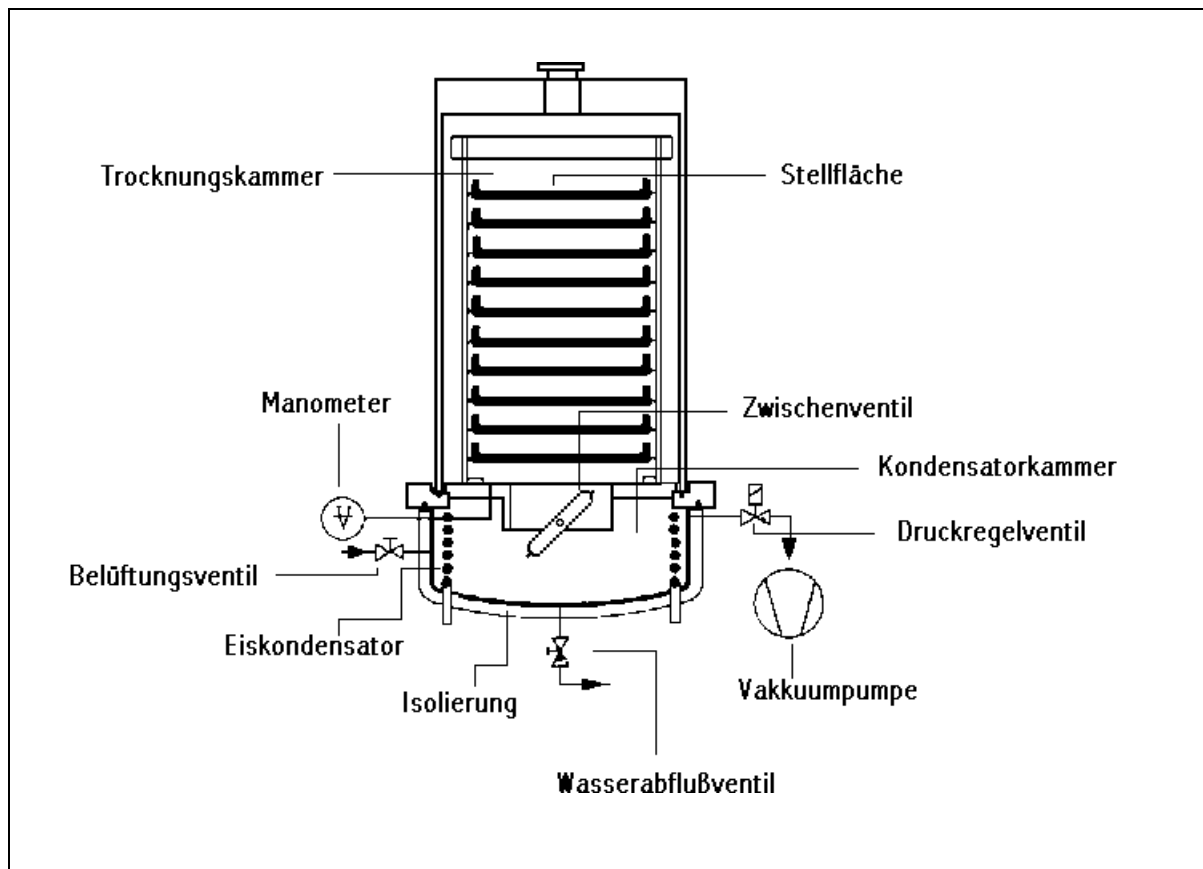


Abb.6.6: Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4 [Produktinformation Christ]

Verpackung

Nach abgeschlossener Trocknung wurde die Sterilbox unter dem LAF geöffnet. Die Medikamententräger wurden einzeln in getrocknete, sterile Reagenzgläser

(Innendurchmesser: 1 cm, Länge: 7,5 cm) verpackt und mit einem sterilen Gummistopfen luftdicht verschlossen. Die Lagerung des fertigen Produktes erfolgte trocken und lichtgeschützt.

6.4.1. Dosierung der Polymerlösungen

Da die früher verwendete Methode zur Dosierung der Lösungen sehr unpräzise war (Plastipak BD Microfine-Insulinspritze U 40, 1 ml, Becton-Dickinson Ltd., Dublin) und besonders bei höher viskosen Lösungen Probleme bereitete, wurde ein neues Dosiersystem verwendet.

Es handelt sich dabei um einen Handdispenser der Firma Eppendorf, bestehend aus einem Handgriff, in den spezielle, wiederverwendbare Kunststoffspritzen (sogenannte Kombitips) eingerastet werden. Diese Spritzen sind einzeln verpackt und sterilisiert. Durch verschiedene Spritzengrößen in Kombination mit der gewählten Dispensierstufe ergeben sich die dosierten Volumina. Dispenser dieser Art garantieren das schnelle Arbeiten langer Testserien mit hoher Genauigkeit.

Die Dosierung erfolgte anhand eines manuellen Direktverdrängersystems ('positive displacement'). Ein Kolben hat direkten Kontakt mit der Flüssigkeit und übernimmt den eigentlichen Dosiervorgang.

Geräte:

Eppendorf Multipette[®] plus, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg

Combitip Biopur[®] 2,5 ml, SollwertEinstellung: 25 µl, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg

Waage: Sartorius, Typ BP 210S (d=0,1 mg), Sartorius GmbH, Göttingen

Testflüssigkeiten:

Folgende Lösungen wurden vermessen:

- destilliertes Wasser
- 0,5 %ige, 1,0 %ige HPMC-Lösung (m/m) (Methocel E4M)

Durchführung:

Jeweils 30 Tropfen wurden einzeln gewogen. Die SollwertEinstellung für die Tropfenvolumina betrug 25 µl. Die Prüfung wurde mit drei verschiedenen Biopur[®]-Aufsätzen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet und überprüft. Die Raumtemperatur lag zwischen 22 und 23 °C.

6.4.2. Einfriergeschwindigkeit

Die Polymerlösungen wurden mit unterschiedlichen Methoden eingefroren. Zur Verfügung standen:

- Gefrierschrank (-30 °C)
- Trockeneis (-79 °C)
- flüssiger Stickstoff (-196 °C)

Da diese Temperaturen lediglich die Endtemperaturen des Einfriervorgangs angeben, jedoch keine Rückschlüsse auf die eigentlichen Einfriergeschwindigkeiten zulassen, wurden die letztere bestimmt, da diese auf die spätere Produktqualität großen Einfluß haben können (s. Kap. 4.2.3.).

Geräte:

Gefrierschrank: Liebherr GS 5302, Liebherr, Lienz, Österreich,

Temperatur: $-30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

Styroporbox, quadratisch, Innenhöhe: 30 cm, Innenbreite: 30 cm

Sterilbox

PTFE-Folie, Dichtungsband

Digitalthermometer: Newport Omega INFT-1001, Infinity[®] TM Meters, Meßsignal TC,

Newport Omega, Deckenfronn

Meßbereich: -200 bis +900 °C

Auflösung: 0,01 °C

Meßrate: 3 Messungen/Sekunde

Genauigkeit: $\pm 0,6^{\circ}\text{C}$

mit Thermofühler: Thermoelement L DIN 43710 (Fe-Konstantan), 10/90 FD, 90.165-F43

Durchführung:

Die PTFE-Folie wurde auf den Boden der Sterilbox gelegt. Darauf wurde der Thermofühler befestigt. Auf diese Weise sollten die Bedingungen simuliert werden, denen ein Lösungstropfen beim Einfrieren ausgesetzt ist, da aufgrund des geringen Lösungsmittelvolumens eine direkte Messung der Tropfentemperatur nicht möglich war. Der Deckel der Box wurde verschlossen. Die Konstruktion wurde in die vorgesehene Einfriervorrichtung gestellt, Zeit und Temperatur wurden notiert.

Gefrierschrank -30 °C

Die Metallplatte wurde über Nacht temperiert. Die Sterilbox wurde auf die Platte gestellt und die Temperatur alle 10 Sekunden aufgezeichnet.

Trockeneis: -79 °C

In die verschließbare Styropor-Box wurde Trockeneis gelegt und das System äquilibriert. Nach 30 Minuten wurde die Sterilbox hineingestellt, der Styropor-Deckel verschlossen und im Abstand von 10 Sekunden die erreichte Temperatur notiert.

Stickstoff, flüssig: -196 °C

In die Styropor-Box wurde eine Metallplatte auf Metallblöcke gelegt und mit Flüssigstickstoff gefüllt. Das System wurde äquilibriert. Nach 5 Minuten wurde die Sterilbox hineingestellt, der Styropor-Deckel verschlossen und alle 5 Sekunden die Temperatur notiert.

6.4.3. Trocknungsgeschwindigkeit

Die Gefriertrocknung ist ein wichtiger Teilschritt bei der Herstellung der ophthalmischen Lyophilisate. Um einen besseren Einblick in diesen Bereich zu erhalten, wurde der Trocknungsverlauf in den Gefriertrocknern verfolgt.

Die bisherigen Trocknungszeiten von Lyophilisaten belaufen sich bei Grunthal [1996] je nach Befüllungsgrad des Gefriertrockners der Firma Leybold-Heraeus GT 2 auf 3 bis 6 Stunden. Bei genauer Kenntnis der tatsächlich notwendigen Trocknungszeiten kann der Prozeß optimiert und auf diese Weise die Verweilzeit der Proben im Trockner erheblich reduziert werden, was den Vorteil einer enormen Zeitersparnis bei größeren Ansätzen mit sich bringt, ohne daß die Qualität darunter leidet.

Der Trocknungsvorgang in den Gefriertrocknern Leybold-Heraeus GT 2 und Christ Alpha 2-4 wurde anhand von 25 mg Tropfen einer 0,5 %igen HPMC-Lösung auf PTFE-Folie betrachtet. Zur Bestimmung der Trocknungsgeschwindigkeit der Lyophilisate wurde der Restwassergehalt der Produkte analysiert. Die Untersuchungen stützten sich auf Ergebnisse, die sowohl mit Differenzwägung als auch auf analytischem Weg ermittelt wurden. Grundlage der analytischen Daten war eine Titration auf der Basis von Karl-Fischer, um ebenfalls auf diese Weise Aufschluß auf den in der Probe vorhandenen Wassergehalt zu erhalten.

Geräte:

Gefriertrockner:

- Leybold-Heraeus GT2 Nr. 0017, Leybold-Heraeus, Köln

Kondensatortemperatur: -45 °C

mit Drehschieberpumpe -trivac-, Typ Nr. D8A, Leybold-Heraeus, Köln

Nennsaugvermögen: 12,8 m³/h, erreichbarer Druck: 0,00025 mbar

erreichbarer Druck der Trocknungsanlage nach 2 Stunden Laufzeit: 0,05 mbar

- Christ Alpha 2-4, Typ 100402, Osterode am Harz,

Kondensatortemperatur: -85 °C

mit Drehschiebervakuumpumpe Vacuubrand Typ RZ2, Vacuubrand GmbH & Co,
Wertheim

Leistung: 2,2 m³/h, erreichbarer Druck: 0,0004 mbar

Gefrierschrank: Liebherr GS 5302, Einfriertemperatur -30 °C ± 3 °C, Liebherr, Lienz,
Österreich

- *gravimetrische Methode:*

Gerät:

Analysenwaage: Sartorius BP 210S (d=0,1 g) Sartorius GmbH, Göttingen

- *Karl-Fischer-Titration*

Geräte:

KF-Titrino 701, Metrohm, Herisau, Schweiz

mit KF-Titrino 701 Keyboard und Ti-Stand 703

Trockenperlen blau, Engelhard Process Chemicals GmbH, Nienburg/Weser

Molekularsieb - Trockenmittel, Metrohm, Poren: 0,3 µm, Herisau, Schweiz

Titratoren: Einkomponentenreagenz Hydranal Composite 1 für volumetrische Karl-
Fischer-Titration, Nr. 34827, Riedel de Haen AG, Seelze

1ml ≈ 0,7 - 1,0 mg Wasser

Methanol, wasserfrei, Riedel de Haen AG, Seelze

Titerbestimmung: di-Natriumtartrat-Dihydrat

Durchführung:

Die Träger wurden nach Vorschrift hergestellt und bis zu ihrer Verwendung in einem Exsiccator aufbewahrt.

Der einzelne Streifen wurde gewogen, eine definierte Menge (≈ 25 mg) der Polymerlösung (Methocel E4M Premium, 0,5 % (m/m)) auf den vorbereiteten Träger aufgetropft und das Gewicht ein zweites Mal notiert.

Die Streifen wurden in eine PVC-Petrischale gelegt, verschlossen und bei -30 °C im Tiefkühlschrank mehrere Stunden eingefroren.

Anschließend wurde die Petrischale in den Gefriertrockner überführt und die Abdeckung entfernt. Um das vorzeitige Auftauen der Tropfen sowohl bei der Überführung in den Trockner als auch bis zum Erreichen des Vakuums zu unterbinden, befand sich die Petrischale auf einem gekühlten Metallblock.

Die Meßzeit wurde bei Einschalten des Vakuums gestartet.

Der Vorgang wurde in 10-Minuten-Intervallen bis zu 100 Minuten nach Versuchsbeginn abgebrochen, die Proben gewogen und titriert.

Die Streifen wurden sofort gewogen und das Gewicht notiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung des Wassergehaltes mittels Karl-Fischer-Titration. Dazu wurde die PTFE-Zunge des Trägers mit der Probe abgeschnitten und in die Methanol-Mischung der zuvor äquilibrierten Karl-Fischer-Anlage überführt. Die Öffnungszeiten der Apparatur wurden dabei so kurz wie möglich gehalten, um das Eindringen von Luftfeuchtigkeit so gering wie möglich zu halten.

Für den Gefriertrockner der Firma Leybold-Heraeus GT 2 wurden die Versuche mit je 5 Streifen für jeden Zeitpunkt drei mal durchgeführt, für das Gerät der Firma Christ mit je 3 Streifen zwei mal.

Die Daten der Wägungen werden denen der durch Karl-Fischer-Titration ermittelten Werte zum Vergleich gegenübergestellt.

6.4.4. Mikrobiologische Untersuchungen

Um sicherzustellen, daß die angewandten Methoden die aseptische Herstellung des Arzneimittels gewährleisten, wurden sie überprüft. Zusätzlich wurde die Funktionalität des LAFs getestet. Da die Direktbeschickungsmethode für eine Anwendung in bewegter Luft nur unzureichend ist, wurde zusätzlich ein Luftkeimsammler eingesetzt.

Geräte:

Laminar Air Flow (LAF): Laminar Geräte Büttner-Schilde-Haas AG

Sterilbox

aseptisch hergestellte Polymerlösung (Methocel E4M, 0,5 % (m/m))

aseptisch hergestellte Lyophilisate (Methocel E4M, 0,125 mg/Lyophilisat)

Isopropanol 70 %ig zur Desinfektion

Einmalhandschuhe, steril

Folienschweißgerät: Melaseal® Komfort 101, Melag

Autoklavierfolie: Melafol 1502, Melag®, Breite: 150 mm

Autoklavierband: Autoclave Tape, 3M Medical Products Division, St. Paul, USA

Brutschränke: Trockenschränke KT 500 und FT 420, Heraeus, Hanau

Luftkeimsammler

Der eingesetzte Luftkeimsammler ist ein tragbares, batteriebetriebenes Gerät. Die Luftprobenmenge wird über die Betriebszeit eingestellt. Die zu untersuchende Luft wird angesaugt und direkt auf einen gebrauchsfertigen, flexiblen Nährbodenstreifen (CASO-Agar) aufgeschleudert. Die Laufzeit wird automatisch geregelt und garantiert die Einhaltung des Luftprobevolumens.

Gerät: Luftkeimsammler RCS, Biotest Air Sampler, Biotest-Serum-Institut GmbH, Frankfurt/M.

Durchführung:

Die Messungen wurden unter dem LAF an drei verschiedenen Stellen etwa 30 cm oberhalb der Arbeitsfläche (gerätebedingt) durchgeführt, wobei sich zwei Meßstationen mittig und eine an dem Übergang LAF / Umgebung befand. Die Meßdauer betrug 8 Minuten; das überprüfte Luftvolumen errechnete sich daraus mit 320 l Luft.

Bestimmung der Luftkeimzahl durch Sedimentation

Man läßt die Luftkeime auf offen ausgelegte Nährbodenplatten sedimentieren. Verwendet wurden folgende Nährböden:

CASO-Agar (allg.)

Caseinpepton (Pankreashydrolysat)	15,0	g
Sojapepton (Papainhydrolysat)	5,0	g
Natriumchlorid	5,0	g
Agar	15,0	g
Gereinigtes Wasser	1000	ml

Abb.6.7: Zusammensetzung Caso-Agar

Chinablau-Lactose-Agar (S.aureus)

Art. Nr.: CM 209, Firma Oxoid, Basingstoke, GB

Zusammensetzung:

Pepton	5,0	g
Fleischextrakt: Lap Lemco-Extrakt (Leber)	3,0	g
Lactose	10,0	g
Natriumchlorid	5,0	g
Chinablau	0,375	g
Agar Agar	12,0	g
Gereinigtes Wasser	1000	ml

Abb.6.8: Zusammensetzung Chinablau-Lactose-Agar

Durchführung:

- *Überprüfung des LAFs:*

Sechs Agarplatten wurden auf der Arbeitsfläche des LAF verteilt, wobei es sich um vier Caso-Agarplatten und zwei Chinablau-Agarplatten handelte. Mit letzteren können besonders Staphylokokken deutlich angezeigt werden, was im Hinblick auf ein Vorkommen von Staphylococcus aureus, einem Keim, der oft die Ursache von Augenentzündungen ist, sinnvoll ist. Während dieser Zeit wurden die üblichen Handgriffe unter dem LAF durchgeführt. Eine weitere Platte wurde als Kontrollplatte bewußt kontaminiert. Die Platten wurden 20 Minuten unter dem LAF ausgelegt und anschließend bebrütet.

- *Überprüfung der Sterilbox*

Ober- und Unterteil der Sterilbox wurden in Autoklavierfolie eingeschweißt und autoklaviert (121 °C, 15 min, 2 bar). Anschließend wurden die sterilverpackten Teile im Trockenschrank bei 60 °C etwa 24 Stunden getrocknet. Unter dem LAF wurde eine CASO-Agarplatte in die Sterilbox gesetzt, die Box verschlossen und bebrütet.

- *Überprüfung der Polymerlösung*

Die Polymerlösung wurde wie bereits beschrieben (s. Kap. 6.4.) aseptisch hergestellt. Die Lösung wurde auf einen CASO-Agar aufgetragen und bebrütet.

- *Überprüfung der Lyophilisate*

Die Lyophilisate (n=10) wurden wie zuvor beschrieben (s. Kap. 6.4.) aseptisch hergestellt. Die Lyophilisate wurden in einen flüssigen CASO-Agar gegeben und bebrütet.

Die Inkubation aller Nährmedien erfolgte bei 30 bis 35 °C in den Brutschränken für fünf Tage. Eine Agarplatte aus dem LAF wurde zusätzlich bei 20 bis 25 °C bebrütet.

6.5. Charakterisierung der Lyophilisate

6.5.1. Rasterelektronenmikroskopische Charakterisierung

Geräte:

Rasterelektronenmikroskop Hitachi S-2460N, Scanning Electrone Microscope, Tokio, Japan

Sputter Coater S150B, Edwards High Vacuum Internation, West Sussex, United Kingdom

Bedingungen beim Sputtern:

Probenträger: gereinigte Aluminiumniete (Durchmesser: 0,8 cm)

Argondruck von ca. 0,1-0,2 hPa

Stromstärke: 15/15/25/25 mA

Dauer: 2 Minuten, 4 Durchläufe

Bedingungen beim Rasterelektronenmikroskop:

Arbeitsabstand: 15 mm

Beschleunigungsspannung: 5 bis 15 kV

Printer: Mitsubishi Video Copy Processor P67E, Mitsubishi Electronic Corporation, Tokyo, Japan

Durchführung:

Das Lyophilisat wurde vorsichtig von seinem PTFE-Träger abgelöst und auf einer Aluminiumniete mit UHU-Schnellkleber hart, Uhu GmbH, Bühl/Baden aufgeklebt. Silbersuspension wurde als leitende Verbindung zwischen Probenteller und Probe aufgetragen. Im Sputtercoater wurden die Proben mit Gold bedampft und unter Verwendung eines SE-Detektors im Rasterelektronenmikroskop untersucht.

6.5.2. Entwicklung eines Tests zur Bestimmung des Abstreifverhaltens von Lyophilisaten von ihrem Träger

Die ophthalmischen Lyophilisate müssen einerseits eine ausreichende Haftfestigkeit auf der Trägerfolie besitzen, damit das Arzneimittel bei leichten Erschütterungen (wie z.B. bei einem Transport) nicht herunterfällt. Auf der anderen Seite muß sich das Xerogel bei einer Applikation am Auge leicht ablösen, damit es nicht auf dem Träger verschmiert, sondern am erwünschten Ort zur Wirkung kommen kann. Da in-vivo-Testreihen für solche Fragestellungen recht aufwendig sind und kein in-vitro-Testsystem für diese Problematik existiert, wurde versucht, einen aussagekräftigen Test zu entwickeln.

Bei dieser Methode handelt es sich um eine Bestimmung der erforderlichen Abstreifkraft des Lyophilisates von seinem Träger im trockenen Zustand.

Geräte:

Für diesen Test wurde folgende Konstruktion entwickelt:

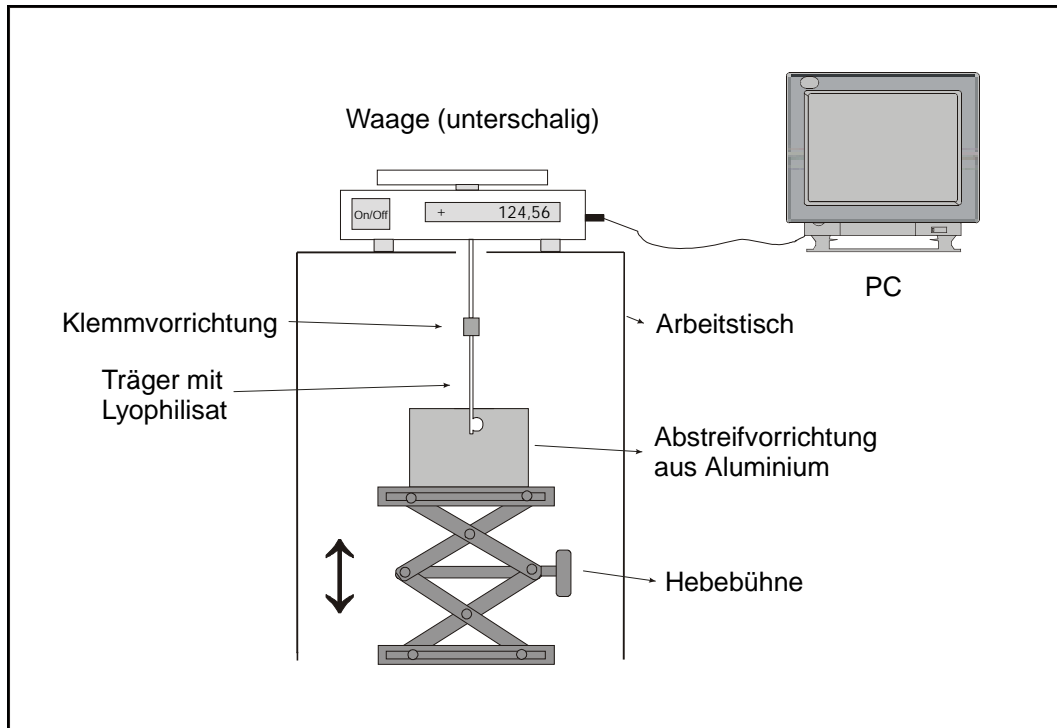


Abb.6.9: Aufbau der Testvorrichtung

Waage: Sartorius L 2200S (d=0,01 g) Sartorius GmbH, Göttingen

serielle Schnittstelle:

Einstellung: Datenausgabe auf Printbefehl ohne Stillstand (dynamische Messung möglich, PC fordert den momentanen Meßwert an)

Baudrate: 1200 Bd

Parity-Bit: Odd

PC-Notebook: MBC-17NB, Sanyo Electric Co. Ltd., Japan

Serielle Schnittstelle: RS 232

Datenerfassung: Programm zur Erfassung von Wägedaten im Sekundentakt

Ausgabeformat: ASCII-Datei (*.DAT), (Programm s. Anhang I)

Arbeitstisch

Gestell aus Aluminium, mit Schlitz (0,5 mm) an der Oberseite

Laborboy, manuell

Grafik-Programm: Origin 3.5, Microcal Software Inc., Northhampton, USA

Durchführung:

Die Lyophilisate wurden nach Vorschrift hergestellt. Dabei wurden die Einfriertemperatur, die Oberfläche des Trägerstreifens, die Zusammensetzung und die Lagerzeit des fertigen Lyophilisats verändert, um deren Einfluß auf das Haftvermögen zu bestimmen.

Nach dem Gefriertrocknen wurden zehn bzw. zwölf Lyophilisate sofort auf ihre Haftfestigkeit geprüft. Weitere zehn bzw. zwölf wurden bei Raumtemperatur vier Wochen gelagert und dann getestet (in einem Trocknungsprozeß wurden maximal bis zu 35 Streifen pro Charge hergestellt).

Der Trägerstreifen wurde mit seinem Griff an der Klammer befestigt. Das andere Ende wurde oberhalb des Lyophilisates in den Schlitz des Metallgestells geschoben. Sobald der Streifen frei hing, erfolgte das Trieren der Waage und das Wägeprogramm des an die Waage angeschlossenen Computers wurde gestartet. Die Hebebühne wurde langsam und gleichmäßig herabgesenkt. Der PC zeichnete jede Sekunde die Kraft auf, die dem anhaftenden Lyophilisat entgegengesetzt wurde. Bei der Ablösung des Lyophilisats wurde die Messung beendet. Der höchste Meßwert wurde dokumentiert. Die erhaltenen Meßwerte wurden in Klassen eingeteilt und grafisch gegenübergestellt.

Untersucht wurden folgende Lyophilisate (jeweils nach der Herstellung und nach 4 Wochen Lagerzeit):

- HPMC E50, 1,0 % (m/m) in der Ausgangslösung bzw. 0,250 mg/Lyophilisat, eingefroren bei -30 °C oder -196 °C, auf autoklavierter und nicht autoklavierter Folie (PTFE-Dichtungsband) bzw. oberflächenbehandelter Folie (Prägung mit Matrize 1 bzw. 2, Prüfung der Ober- und Unterseite)
- HPMC E50 1,0 % (m/m) in der Ausgangslösung bzw. 0,250 mg/Lyophilisat, Pilocarpinhydrochlorid 1,6 % (m/m) in der Ausgangslösung bzw. 0,400 mg/Lyophilisat, eingefroren bei -30 °C oder -196 °C, auf autoklavierter und nicht autoklavierter Folie (PTFE-Dichtungsband) bzw. oberflächenbehandelter Folie (Prägung mit Matrize 2, Prüfung der Unterseite)

- HPMC E50 1,0 % (m/m) in der Ausgangslösung bzw. 0,250 mg/Lyophilisat, Tropicamid 0,6 % (m/m) in der Ausgangslösung bzw. 0,150 mg/Lyophilisat, eingefroren bei -30 °C, auf nicht autoklavierter Folie (PTFE-Dichtungsband) bzw. oberflächenbehandelter Folie (Prägung mit Matrize 2, Prüfung der Unterseite)

6.5.3. Beurteilung verschiedener wirkstofffreier Lyophilisate anhand ihres Haft- und Rehydratationsvermögens und ihrer Verträglichkeit am Auge

Verschiedene Polymere sind für die Anwendung am Auge zugelassen und können als Gerüstsubstanz für wirkstoffhaltige Lyophilisate dienen.

Kriterien im Hinblick auf die Fertigung und Anwendung könnten u.a. sein:

- Viskosität der Polymerlösung
- Stabilität des Lyophilisats
- Verträglichkeit am Auge
- Gelbildungsverhalten am Auge

Von folgenden Polymeren wurden Lyophilisate nach Vorschrift in verschiedenen Konzentrationen hergestellt und beurteilt:

- HPMC E15, E50, E4M
- HEMC MH20, MH4000
- HEC H300, H4000
- PVP 25, 90
- Natriumhyaluronat, mit Mannitol

Trägerfolie: PTFE-Dichtungsband

6.5.3.1. Rehydratationsgeschwindigkeit

Durchführung:

Das fertige Lyophilisat wurde vorsichtig von seinem Träger abgelöst und mit der gerundeten Oberfläche auf die Oberfläche eines mit demineralisierten Wasser gefülltem Becherglas gelegt. Die Zeit bis zur vollständigen Rehydratisierung, was sich in der Bildung eines klaren Gels darstellte, wurde gestoppt.

6.5.3.2. Subjektive Haftfestigkeit auf der Folie

Durchführung:

Der Träger mit dem Lyophilisat wurde flach auf eine Unterlage gelegt und mit einem Spatel seitlich Druck auf das Lyophilisat ausgeübt. Das Haftvermögen wurde subjektiv nach einer willkürlich festgelegten Werteskala beurteilt: kaum < leicht < gut < fest < sehr fest

6.5.3.3. Strukturstabilität

Durchführung:

Das Lyophilisat wurde vorsichtig von dem Träger abgelöst und einem sensorischen Test unterzogen. Dabei wurde das Lyophilisat zwischen Daumen und Zeigefinger gelegt und zusammengedrückt. Auf diese Weise sollte beurteilt werden, wie stabil das Lyophilisat ist und bei welchen Polymeren bzw. Konzentrationen Probleme bei der Applikation am Auge zu erwarten sind. Die subjektive Unterscheidung erfolgte in weiche und harte Lyophilisaten, wobei alle zusätzlichen Beobachtungen notiert wurden.

6.5.3.4. Verträglichkeit am Auge

Durchführung:

Das von der Folie vorsichtig abgelöste Lyophilisat wurde auf die Fingerspitze gelegt und in einem Selbstversuch in den unteren Bindehautsack bei leicht heruntergezogenem Lid hineingelegt. Die Empfindungen wurden notiert und die Zeit gestoppt, bis das Lyophilisat vollständig im Bindehautsack rehydratisiert worden war bzw. keine Bestandteile mehr erkennbar waren. Die Kontrolle erfolgte optisch anhand eines Spiegels.

6.5.4. Entwicklung eines Modells für die Simulation der Applikation von Lyophilisaten am Auge

Ein Problem ist die fehlende Existenz eines realitätsnahen Modells für die Applikation eines Lyophilisates am Auge. Bisherige Tests wiesen lediglich auf bestimmte Eigenschaften der Lyophilisate hin, konnten jedoch auf die Anwendung am Menschen nicht direkt übertragen werden.

Dies ist der Versuch, mit einem einfachen Modell möglichst ähnliche Bedingungen zu schaffen. Dabei sollte das Lyophilisat wie bei der Anwendung am Auge über eine

feuchte, gewölbte Oberfläche abgestreift werden. Als Material für das künstliche Auge diente Glycerol-Gelatine, die zuvor quellen gelassen wurde. Der Rückstand auf dem PTFE-Träger wurde anschließend photometrisch vermessen.

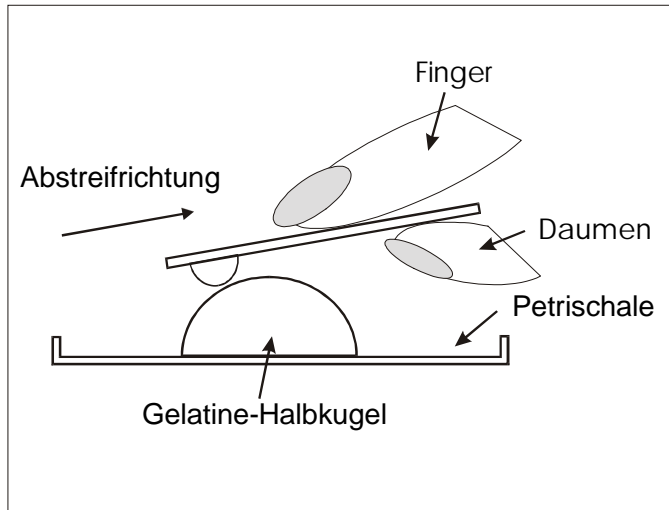


Abb.6.10: Abstreifen des Lyophilisates auf einer Gelatine-Halbkugel

Herstellung der Gelatine-Halbkugeln

Es wurde eine Glycerol-Gelatine-Lösung nach folgender Rezeptur hergestellt:

Gelatine	1 Teil
Glycerol 85 %	5 Teile
Aqua dest.	2 Teile

Dieses Gel wurde lauwarm und blasenfrei in handelsübliche Toffifee®-Formen gegossen und erhärten gelassen. Der Vorteil dieser Ausgußformen ist, daß sie etwa die Größe eines Augapfels besitzt und in der Oberfläche Längsrillen besitzt, die eine Lidkante simulieren können. Sobald das Modell ausgekühlt war, wurde es herausgetrennt und verwendet.

Ermittlung der Wassermenge

Bevor die Gelatine-Halbkugel für die Versuche eingesetzt wurde, wurde sie im Wasser quellen gelassen, um einen gleichmäßigen Feuchtigkeitsfilm auf der Oberfläche zu erhalten. Dazu wurde die Gelatine-Halbkugel an einen Haken gehängt und ihr Gewicht mit Hilfe einer unterschaligen Wägeeinrichtung bestimmt. Auf diese Weise wurde jegliche Verunreinigung verhindert. Anschließend wurde das Modell 30 Sekunden lang in ein mit Wasser gefülltes Becherglas gehängt, so daß nur die Wölbung völlig eintauchte. Danach wurde wiederum das Gewicht ermittelt. Die

Differenz der beiden Wägungen beschreibt die Wassermenge, die als Oberflächenfilm an der Gelatine haften geblieben ist.

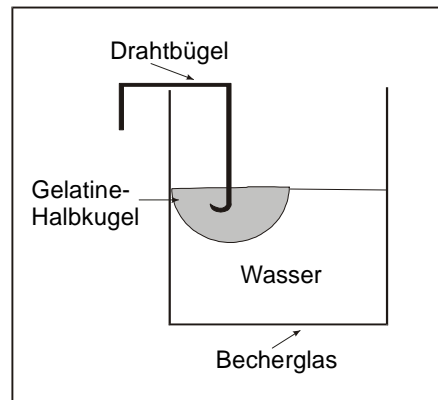


Abb.6.11:
Benetzung der Gelatine-
Halbkugel

Herstellung der Lyophilisate

Die Lyophilisate wurden nach Vorschrift hergestellt. Das Abstreifverhalten von wirkstoffhaltigen Arzneistoffträgern wurde quantitativ bestimmt. Die Einfriertemperatur betrug $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Untersucht wurden folgende Lyophilisate:

- *Pilocarpin-Lyophilisat*

Ein Lyophilisat enthielt:

Pilocarpinhydrochlorid	0,300 mg
HPMC E50	0,250 mg

Träger: PTFE-Gewindeband

- *Pilocarpin-Lyophilisat auf geprägter PTFE-Folie*

Ein Lyophilisat enthielt:

Pilocarpinhydrochlorid	0,300 mg
HPMC E50	0,250 mg

Träger: PTFE-Gewindeband, geprägt mit Matrize 2, Verwendung der Unterseite

Um die Haftung der Lyophilisate hinsichtlich ihrer Ablösung positiv zu beeinflussen, wurde das verwendete PTFE-Band mit einem Rillenmuster geprägt. Der genaue Vorgang ist in Kap. 6.3.5. beschrieben. Damit sollte die Kontaktfläche zwischen Polymer und Folie verringert werden und geringere Kräfte zum Ablösen nötig werden. Verwendet wurde die Matrize 2 und die Unterseite der geprägten PTFE-Folie, weil diese Kombination bei der Bestimmung der Abreißkräfte im trockenen Zustand die besten Ergebnisse lieferte (s. Kap. 7.4.2.4.).

- *Fluorescein-Natrium-Lyophilisat*

Ein Lyophilisat enthielt:

Fluorescein-Natrium 0,068 mg

HPMC E50 0,250 mg

Träger: PTFE-Gewindeband

Ermittlung des durchschnittlichen Wirkstoffgehaltes als Vergleich

Als Vergleichswert wurden n=16 (bzw. n=9, n=14) Lyophilisate vermessen, um den Durchschnittsgehalt der wirkstoffhaltigen Lyophilisate zu bestimmen. Dazu wurde der vordere Teil der PTFE-Zunge inclusive Xerogel abgeschnitten und in einem 10 ml Meßkolben in 0,1 N-HCl bis zur vollständigen Lösung der Polymer-Arzneistoffmischung geschüttelt. Der Gehalt von Pilocarpin wurde photometrisch vermessen (s. Kap. 6.5.).

Bestimmung der abgestreiften Arzneistoffmenge

Eine Gelatine-Halbkugel wurde an einem Haken in destilliertes Wasser gehängt und 30 Sekunden lang quellen gelassen. Anschließend wurde sie mit der flachen Seite nach unten auf eine Petrischale gelegt und das Lyophilisat wurde an der Oberfläche mit einer einzigen Bewegung entlang gestreift (s. Abb. 6.11.).

Die benutzte PTFE-Zunge wurde anschließend abgeschnitten und der Rückstand photometrisch bestimmt. Aus der Differenz zwischen wiedergefundenem Rückstand und berechnetem Mittelwert ergibt sich der abgestreifte Arzneistoffgehalt.

Die Untersuchung wurde mit n=20 (bzw. n=30, n=23) Medikamententrägern durchgeführt. Zur Kontrolle wurde zusätzlich die verwendete Gelatine-Halbkugel vor und nach der Quellzeit gewogen und die Differenz berechnet, um die aufgenommene Wassermenge zu bestimmen.

6.5.5. Analytik

Gerät

Shimadzu Zweistrahlphotometer, Typ UV-260, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan
Quarzküvette (Typ QS blau, Hellma GmbH & Co., Müllheim, Baden),

Schichtdicke: 10,0 mm

Kalibrierung

Vor jeder Meßreihe wurde eine Kalibriergerade aus fünf getrennt eingewogenen Konzentrationen bestimmt. Der Regressionskoeffizient betrug mindestens $R=0,999$.

Durchführung

Die Lösung wurde in einem Absorptionsbereich zwischen 0,3 und 0,8 vermessen, der Gehalt wurde anhand der mit der Kalibriergeraden erhaltenen Werte berechnet.

Arzneistoff	Wellenlänge [nm]	Extinktions- koeffizient [$E_{1cm}^{1\%}$]	Medium
Pilocarpinhydrochlorid	215	241	0,1N-HCl
Tropicamid	253	174	0,1N-HCl
Flourescein-Dinatrium	480	-	0,1N-HCl

Tab.6.12: Photometrische Daten der Arzneistoffe

7. Ophthalmische Trägerlyophilisate:

Ausgangsstoffe und Herstellung - Ergebnisse und Auswertung

7.1. HPMC-Lösungen

7.1.1. Dichte und Brechungsindex

Die Brechungsindices und absoluten Dichten der eingesetzten Methocel E4M-Lösungen sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt. Die Werte wurden bei 20 °C jeweils nach der Herstellung der Lösung bzw. nach einer Dampfsterilisation unter DAB-Bedingungen und bei 30 °C gemessen.

Konzentration [%]	20 °C		20 °C, nach Dampfsterilisation		30 °C	
	absolute Dichte [g/cm ³]	Brechungsindex [n_D^{20}]	absolute Dichte [g/cm ³]	Brechungsindex [n_D^{20}]	absolute Dichte [g/cm ³]	Brechungsindex [n_D^{20}]
0,25					0,9998	1,3320
0,50	0,9960	1,3335	0,9910	1,3330	0,9994	1,3325
0,75					1,0011	1,3330
1,0	0,9990	1,3335	0,9940	1,3335	1,0011	1,3335
1,50					1,0026	1,3330
2,0	1,0190	1,3335	0,9980	1,3335	1,0084	1,3335

Tab.7.1: Dichten und Brechungsindices von HPMC E4M-Lösungen

Der Brechungsindex der Tränenflüssigkeit liegt zwischen 1,336 und 1,357 [Frauch, 1990]. Zubereitungen, die am Auge eingesetzt werden, sollten diesen Wert möglichst wenig beeinflussen. Die Brechungsindices der vermessenen Lösungen liegen alle um 1,333. Ein Anstieg der HPMC-Konzentration oder Temperatur hat wenig Einfluß auf diesen Wert. Die Dichten der Lösungen weichen in diesem Konzentrationsbereich nur wenig von der des reinen Wassers ab.

Der Brechungsindex 2 %iger HPMC-Lösungen liegt nach Wade [1994] ungefähr bei $n_D^{20} = 1,3336$, wobei keine nähere Angabe zur HPMC-Qualität gemacht wird. Fiedler [1981] gibt für 2 %ige Methylcellulose-Derivate $n_D^{20} = 1,3355$ an.

7.1.2. Rheologie

Die Viskosität einer Polymerlösung stellt bei der Lyophilisat-Herstellung ein wichtiges Kriterium dar. Im Hinblick auf ihre Tropfbarkeit und Filtrationsfähigkeit ist eine niedrige Viskosität wünschenswert. Die Folge zu niedrigviskoser Lösungen ist allerdings, daß der Tropfen auf dem PTFE-Träger gegenüber äußeren Einflüssen, wie z.B. Erschütterungen, recht sensibel reagiert und vor dem Einfrieren leicht die halbkugelartige Form verändert werden kann. Die produzierte Charge wird inhomogen. Die Kontaktfläche zwischen Polymer und Träger vergrößert sich, das Lyophilisat läßt sich schlechter ablösen.

Hochviskose Polymerlösungen jedoch bereiten einerseits beim Pipettieren Schwierigkeiten, zum anderen wird eine Sterilfiltration für eine aseptische Herstellung nahezu unmöglich.

Weiterhin hat die Viskosität Einfluß auf die Verweilzeit am Auge. Bei der Anwendung entsteht durch Rehydratation des Lyophilisates ein viskoses Gel im Bindehautsack. Auf diese Weise kann die Kontaktzeit des Wirkstoffes am Auge verlängert und damit die Bioverfügbarkeit eines Arzneistoffes verbessert werden. Niedrigviskose Lösungen werden schneller als höherviskose Zubereitungen über die Tränenkanäle abgeführt (s.a. Kap. 2.6.1.3.).

7.1.2.1. Einfluß der Temperatur und der Autoklavierung auf die Viskosität von HPMC-Lösungen

HPMC gehört zu den Celluloseethern, die ein pseudoplastisches Verhalten zeigen. Mit ansteigender Schubspannung nimmt die Viskosität ab. Dies geht auf eine zunehmende Orientierung der Fadenmoleküle in Strömungsrichtung zurück. Es ist zwar eine gängige Methodik mit einem Kapillarviskosimeter die Viskosität von Cellulose-Derivaten zu bestimmen, allerdings ist dies nicht ganz korrekt, da es sich um Ein-Punkt-Messungen handelt, die im Grunde genommen nur für Newtonsche Flüssigkeiten geeignet sind.

Die kinematische Viskosität ν [mm²/s] ist das Produkt der mittleren Durchflußzeit t [s] und der kapillarspezifischen Konstante K [mm²/s²].

$$\nu = K \cdot t \qquad \text{Gl. 7.1}$$

Die dynamische Viskosität η [mPa·s] ist das Produkt der kinematischen Viskosität und der absoluten Dichte ρ [g/cm³] der Lösung.

$$\eta = \nu \cdot \rho \quad \text{Gl. 7.2}$$

Der Hagenbach-Korrekturfaktor ν [s] kompensiert den Meßfehler, der durch die Veränderung des hydrostatischen Druckgefälles im Verlauf einer Messung entsteht. Er ist von dem Kapillardurchmesser und der Meßzeit abhängig. Die Korrektursekunden werden von der Zeit in Gleichung 7.1 subtrahiert.

$$\nu = K \cdot (t - \nu) \quad \text{Gl. 7.3}$$

Die Viskositäten von Methocel E4M-Lösungen wurden bei 20 °C jeweils nach der Herstellung der Lösung bzw. nach einer Dampfsterilisation unter DAB-Bedingungen und bei 30 °C gemessen.

Temperatur: 20 °C

Bei einer Temperatur von 20 °C ergaben sich folgende Werte. Die Viskosität einer 2 %igen Methocel E4M-Lösung soll bei 20 °C um die 4000 mPa·s liegen, was hier bestätigt werden kann.

Konzentration [%]	Kapillare	Durchflußzeit t [s]	kinemat. Viskosität ν [mm ² /s]	dynam. Viskosität η [mPa·s]
0,5	II	315,8	31,9	31,8
1,0	III	346,8	343,4	343,1
2,0	III	3990,3	3951,6	4026,7

Tab.7.2: Viskositäten von HPMC E4M bei 20 °C, in allen Fällen betrug der Hagenbach-Korrekturfaktor $\nu = 0$

Temperatur: 20 °C, nach einer Dampfsterilisation unter DAB-Bedingungen

Anstelle einer Sterilfiltration könnte sich bei thermostabilen Arzneistoffen die Autoklavierung der Ausgangslösung anbieten. Sowohl Dolder und Skinner [1990] als auch Wade [1994] geben ohne die Angabe von Einschränkungen oder Hinweisen auf Qualitätsverluste das Autoklavieren als Sterilisationsmöglichkeit an.

Die Bestimmung der Viskosität der reinen Polymerlösungen nach dem Abkühlen lieferte jedoch folgende Ergebnisse:

Konzentration [%]	Kapillare	Durchflußzeit t [s]	Hagenbach-Korrekturfaktor ν	kinemat. Viskosität ν [mm ² /s]	dynam. Viskosität η [mPa·s]
0,5	II	194,5	0,01	19,6	19,4
1,0	II	1218,8	0	123,1	122,4
2,0	III	1690,3	0	1673,9	1670,6

Tab.7.3: Viskositäten von HPMC E4M bei 20 °C nach einer Dampfsterilisation

Im Vergleich zu den nicht hitzebehandelten Polymerlösungen wurde die Viskosität durch diesen Prozeß erheblich herabgesetzt. Deutlich wird dies in einer graphischen Gegenüberstellung der HPMC-Lösungen vor und nach dem Autoklavieren.

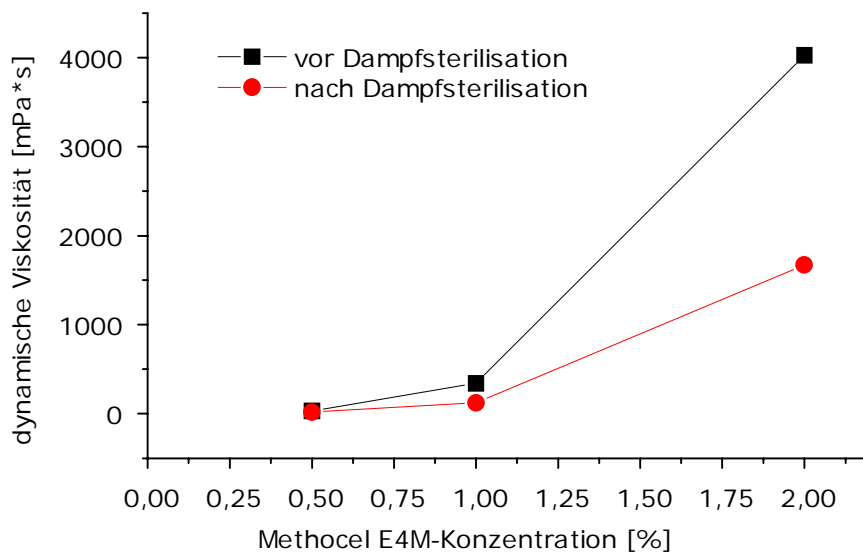


Abb.7.4: Vergleich der dynamischen Viskosität bei 20 °C von HPMC vor und nach einer Dampfsterilisation unter DAB-Bedingungen

Bestätigt werden diese Ergebnisse u.a. durch List et al. [1977], die eine Depolymerisation der Cellulosederivate bei höheren Temperaturen für die Viskositätserniedrigung verantwortlich machen. In der Regel nimmt die Viskosität von HPMC-Lösungen nach dem Autoklavieren um 20 bis 30 % ab. Auch Fiedler [1981] weist bei den Celluloseethern wiederholt darauf hin, daß diese bei Hitzeeinwirkung depolymerisieren und dadurch die Viskosität abnimmt. Es wird auf verschiedene Literaturstellen hingewiesen.

Obwohl Dolder [1990] und Wade [1994] das Autoklavieren als Standardmethode angegeben haben, kann dies hier nicht empfohlen werden, da die Änderung der Viskosität hoch ist. HPMC ist ein halbsynthetisches Produkt, dessen Eigenschaften nur innerhalb gewisser Grenzen reproduzierbar sind. Deshalb sollte die Variationsbreite der Eigenschaften nicht durch eine Hitzebehandlung weiter erhöht werden.

Wenn nach einer Dampfsterilisation dennoch ein eng begrenzter Viskositätsbereich erreicht werden soll, besteht die Möglichkeit der Verwendung höhervisköser Lösungen, die nach dem Sterilisationsprozeß auf eine bestimmte Viskosität eingestellt werden können.

Temperatur: 30 °C

Die Temperatur an der Augenoberfläche liegt nach Frauch [1990] zwischen etwa 30 und 35 °C. Viskositäten für Polymerlösungen werden jedoch im allgemeinen immer für 20 °C angegeben

Die nach der Rehydratation am Auge entstehende Polymerlösung wird jedoch nicht 20 °C, sondern eher eine Temperatur von 30 °C besitzen.

Viskositätsuntersuchungen von Zubereitungen, die am Auge angewendet werden sollen, erfolgen in der Regel bei einer Temperatur von 30 °C [Saettone 1982, 1984].

Konzentration [%]	Kapillare	Durchfluß- zeit t [s]	Hagenbach- Korrektur- faktor v	kinemat. Viskosität ν [mm ² /s]	dynam. Viskosität η [mPa·s]
0,25	I	428,8	0	4,2	4,2
0,50	II	173,3	0,01	17,5	17,5
0,75	IIc	181,5	0	54,5	54,6
1,00	III	155,0	0	153,5	153,7
1,50	IIIc	212,8	0	655,3	657,0
2,00	IV	203,0	0	1971,3	1987,9

Tab.7.5: Viskositäten von HPMC E4M bei 30 °C

In diesem Beispiel wird die Viskosität der 2 %igen Lösung fast auf die Hälfte des bei 20 °C gemessenen Wertes reduziert. Daß mit zunehmender Temperatur die Viskosität erheblich abnehmen kann, wird ebenfalls von List und Mitarbeitern [1977] anschaulich dargestellt. Bei einer Temperaturerhöhung von 20 auf 30 °C kommt es in der Regel zu einer Viskositätserniedrigung um 20 bis 30 %.

Sucker [1978] gibt an, daß die Viskosität von Wasser 0,8 % pro °C und die von Ölen bis zu 10 % pro °C bei ansteigenden Temperaturen abnimmt. Da es sich bei einer HPMC-Lösung um eine wäßrige Lösung handelt, erhält man bei einer Abschätzung der Viskosität bei 30 °C im Vergleich zu der bei 20 °C lediglich eine Abnahme um etwa 10 %, und nicht, wie experimentell ermittelt, um 50 %.

Trägt man die dynamische Viskosität gegen die Polymerkonzentration auf, erhält man folgenden Verlauf:

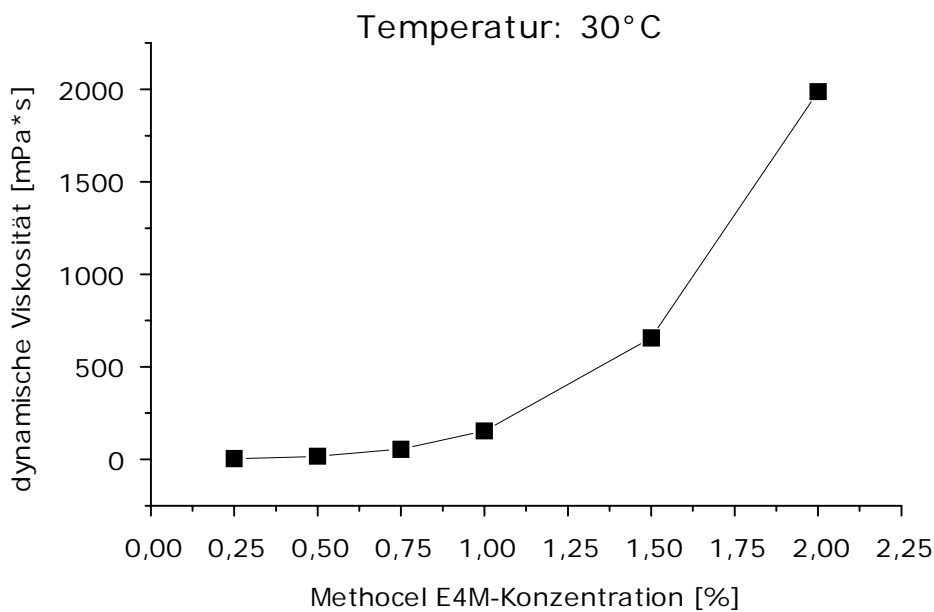


Abb.7.6: Abhängigkeit der dynamischen Viskosität von der HPMC-Konzentration

Einen annähernd linearen Verlauf erhält man, wenn man die 8. Wurzel der Viskosität aufträgt [Produktinformation Colorcon]. Dies kann hier ebenfalls bestätigt werden. Der Regressionskoeffizient beträgt 0,997.

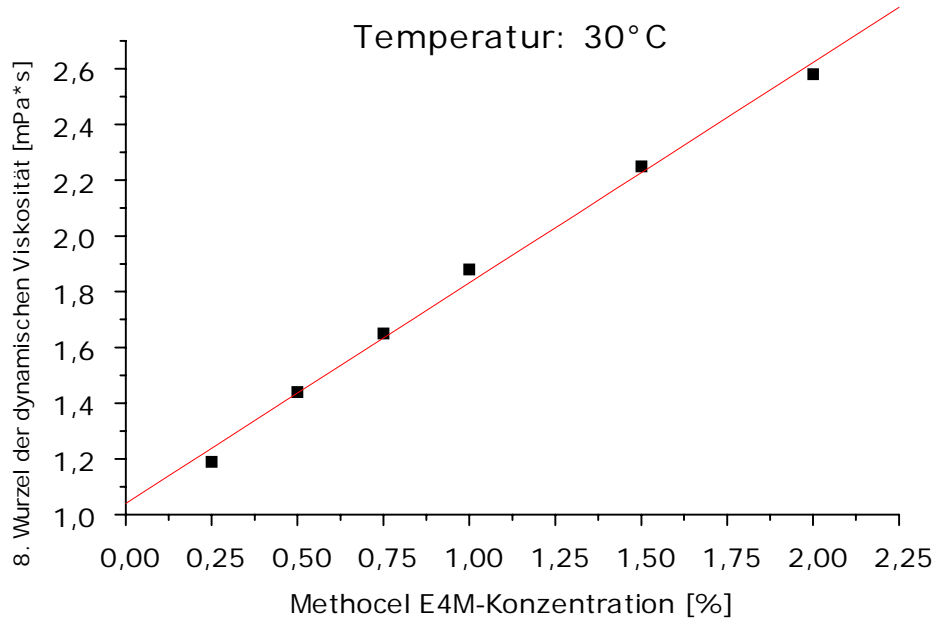


Abb.7.7: Abhängigkeit der 8. Wurzel der dynamischen Viskosität von der HPMC-Konzentration

Die Gleichung nach Phillipoff:

$$\eta = (1 + K \cdot c)^8 \quad \text{Gl. 7.4}$$

η : Viskosität [mPa·s]
 K : Polymerkonstante
 c : Konzentration

findet bei der Bestimmung der Freisetzungsrates von Arzneistoffen aus Gelmatrices Anwendung [Produktinformation Colorcon; Bikales, 1980].

7.1.2.2. Einfluß von Pilocarpinhydrochlorid und der Lagerung auf die Viskosität von HPMC-Lösungen

Mit Hilfe eines Rotationsviskosimeters wurden Fließkurven aufgenommen, aufgrund derer man die untersuchten HPMC-Lösungen zuordnen kann. Man erhält die dynamische Viskosität unter definierten, aber nach Betrag und Einwirkungsdauer variablem Schubspannungsgefälle.

Bei allen Lösungen handelte sich um strukturviskose Flüssigkeiten ohne Fließgrenze. Im untersuchten Schubspannungsbereich wurden in allen Fällen lineare Verläufe erhalten und für diesen Abschnitt die Viskosität berechnet:

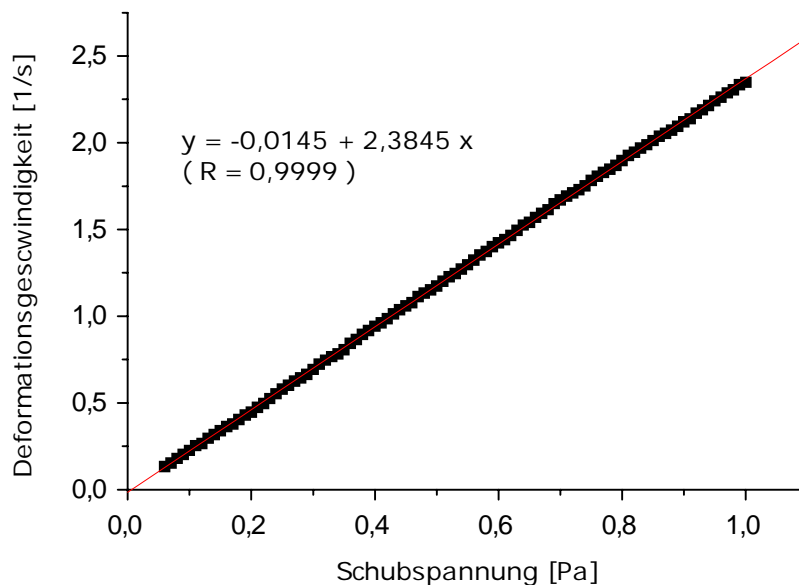


Abb.7.8: Rheogramm einer 1,0 %igen HPMC-Lösung, am Tag der Herstellung

Die Lösungen wurden jeweils am Tag der Herstellung und nach 3 Wochen Lagerzeit vermessen (F: Frisch, L: Lagerung). Im Einzelnen ergaben sich für die Lösungen folgende Werte:

Lösung	*	Viskosität [mPa·s]			Statistik (n=3)	
		1	2	3	Mittelwert	VK** [%]
Wasser, destilliert		1,02	1,01	1,04	1,02	0,697
HPMC E4M 0,5%	F	42,07	43,45	37,15	40,89	8,099
HPMC E4M 0,5%	L	48,77	41,83	48,19	46,26	8,323
HPMC E4M 1,0%	F	485,03	441,42	508,75	478,4	7,139
HPMC E4M 1,0%	L	521,5	452,64	585,14	519,76	12,75
HPMC E4M 0,5%, Pilocarpin 1,6%	F	35,02	35,88	36,54	35,81	2,128
HPMC E4M 0,5%, Pilocarpin 1,6%	L	37,47	39,29	37,40	38,05	2,816
HPMC E4M 1,0%, Pilocarpin 1,6%	F	436,44	404,81	387,03	409,43	6,113
HPMC E4M 1,0%, Pilocarpin 1,6%	L	740,3	520,05	541,89	600,75	20,2

Tab.7.9: Viskositäten der HPMC E4M-Lösungen

* Alter der Lösung:

L: 3 Wochen nach der Herstellung

F: innerhalb 5 Stunden nach der Herstellung

**VK: Variationskoeffizient

Der Literaturwert von Wasser bei 20 °C liegt bei 1,002 cP [Sucker, 1978], was 1,022 mPa·s entspricht. Mit dem Rheometer konnte dieser Wert ebenfalls erzielt werden.

Die Werte der HPMC-Lösungen unterlagen teilweise erheblichen Schwankungen, wobei Fehler bei der Versuchsdurchführung und Messung nicht festgestellt werden konnten.

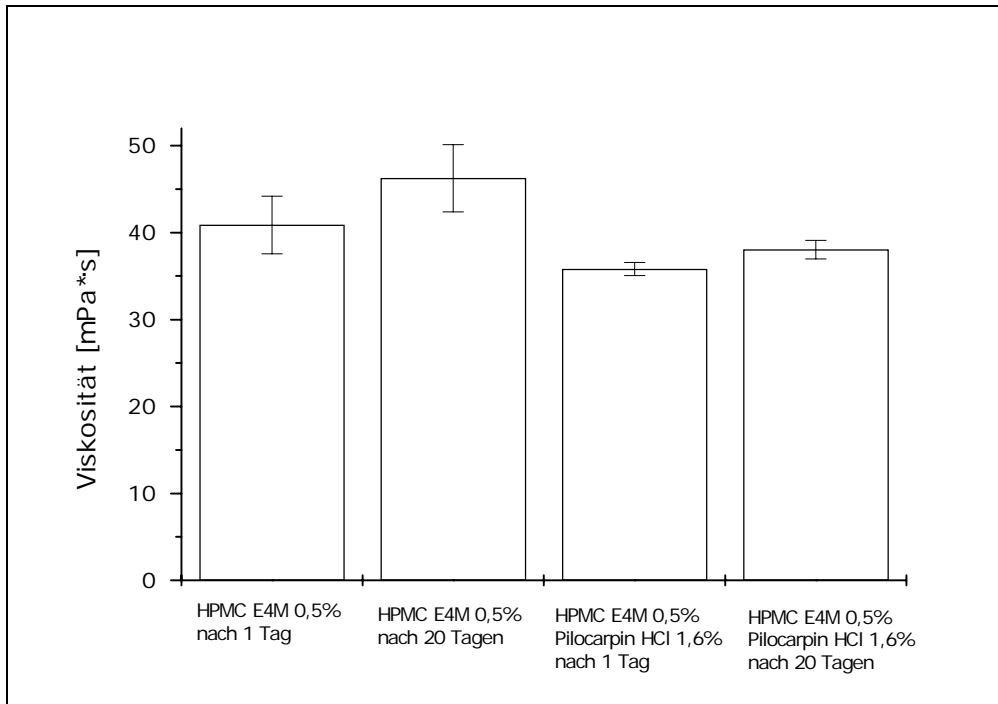


Abb.7.10: Viskositäten von 0,5 %igen HPMC-Lösungen (n=3)

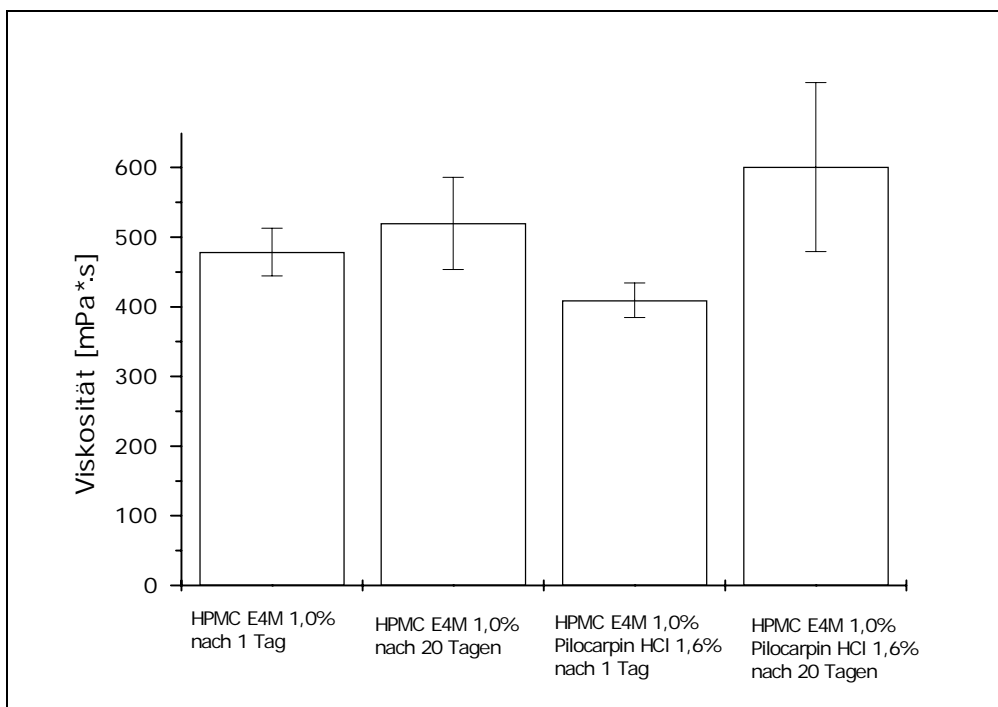


Abb.7.11: Viskositäten von 1,0 %igen HPMC-Lösungen (n=3)

Die Viskositäten drei Wochen alter HPMC-Lösungen lagen im Vergleich zu denen der frischen Lösungen höher, da die Cellulose-Derivate vermutlich nicht in der Lage

waren, innerhalb der verhältnismäßig kurzen Zeit vor der ersten Meßreihe vollständig zu quellen.

Ein mikrobieller Befall der Lösung kann während der Lagerung zu einer Abnahme der Viskosität führen, da die Ether enzymatisch hydrolytisch gespalten werden [Wade, 1994]. In keinem der betrachteten Fälle kam es nach drei Wochen zu einer Viskositätsabnahme. Es trat kein bakteriell bedingter Abbau der Polymere auf.

Der Zusatz von Pilocarpinhydrochlorid zu HPMC-Lösungen erniedrigte in drei von vier Fällen die Viskosität der Lösungen etwas. Fiedler [1981] weist auf die Möglichkeit einer Viskositätserniedrigung durch Zusatz höherer Elektrolytkonzentrationen hin. Pergande et al. [1990] stellten fest, daß bereits durch einen Zusatz von 2 % Pilocarpinhydrochlorid die Viskosität von Polymerlösungen (CMC, PVP, PAS) in der Regel erniedrigt werden kann. Lediglich bei einem einzigen PAS-Präparat führte der Zusatz zu einem geringfügigen Anstieg.

Snibson et al. [1992] vertreten die Meinung, daß sich pseudoplastische Polymerlösungen am Auge angenehmer verhalten als newtonsche Lösungen mit gleicher Viskosität. Die Deformationsgeschwindigkeit, die beim normalen Augenzwinkern auftritt, wird auf ein Intervall zwischen 0 bis maximal 40 s^{-1} geschätzt. Aussagekräftige Viskositätsmessungen sollten insofern nur in diesem Bereich erfolgen.

7.1.3. Einfluß von Pilocarpinhydrochlorid und HPMC auf das Einfrier- und Auftauverhalten

Im Hinblick auf einen erfolgreichen Herstellprozeß der Lyophilisate ist die Kenntnis des Gefrier- bzw. Schmelzbereiches der eingesetzten Polymerlösungen unerlässlich (s. Kap. 4). Die Grafiken, die mit der DSC erhalten wurden, boten folgende Kurvenverläufe:

Einfrieren:

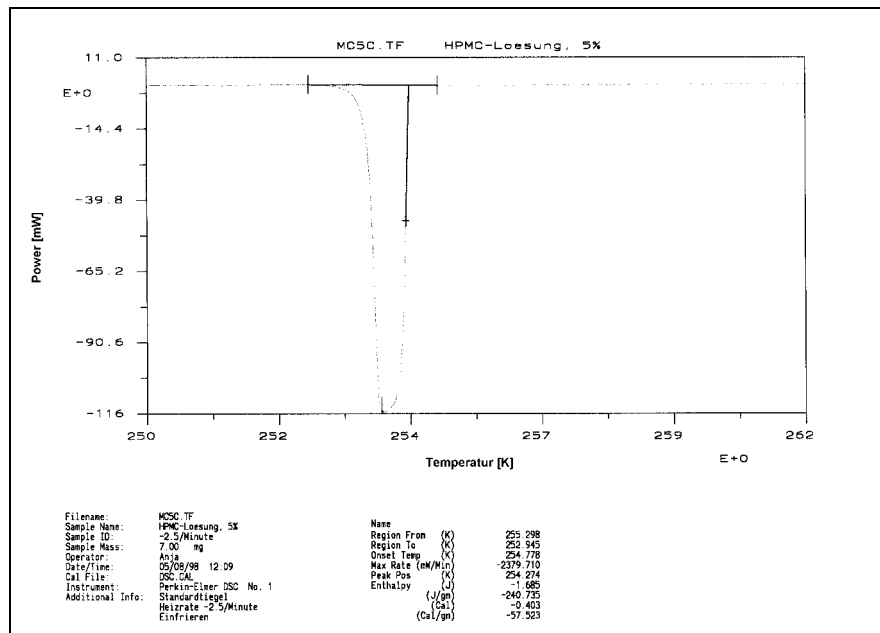


Abb.7.12:
HPMC-Lösung 5 %

Auftauen:

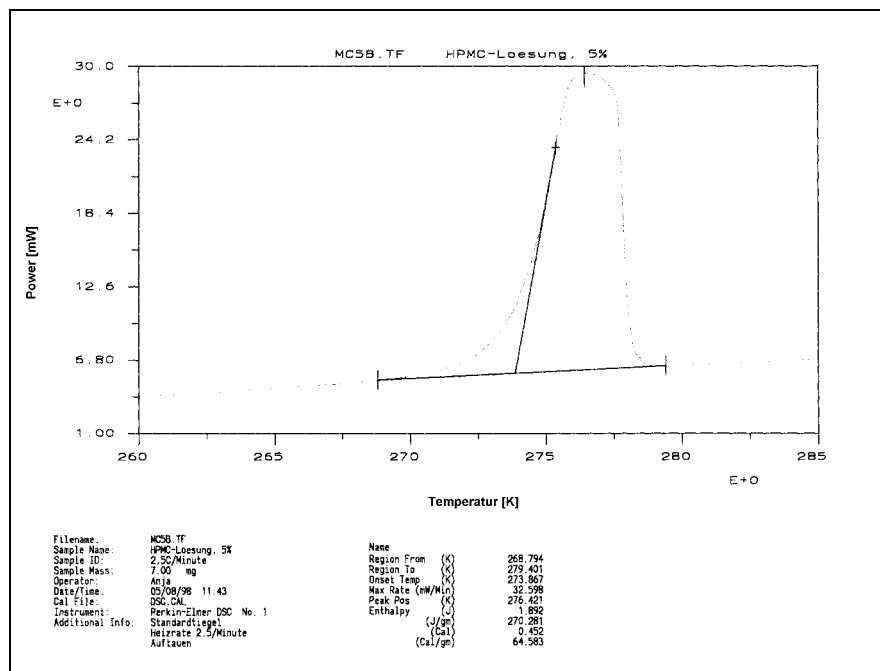


Abb.7.13:
HPMC-Lösung 5 %

Einfluß der Pilocarpin-Konzentration

Bei einer Kühl- bzw. Heizrate von 2,5 °C/Minute wurden folgende Daten erhalten:

HPMC E4M Premium

HPMC-Konzentration [%]	Peakanfangstemperatur Einfrieren [K]	Peakanfangstemperatur Auftauen [K]
0,50	257,564	275,3*
0,75	258,922	275,257
1,00	263,387	277,185

Tab.7.14: Peakanfangstemperaturen von HPMC E4M-Lösungen

*die automatisch berechnete Peakanfangstemperatur mußte korrigiert werden

HPMC E4M Premium mit 1,6 % Pilocarpinhydrochlorid

HPMC-Konzentration [%]	Peakanfangstemperatur Einfrieren [K]	Peakanfangstemperatur Auftauen [K]
0,50	257,600	275,3*
0,75	262,416	275,286
1,00	266,4*	275,1*

Tab.7.15: Peakanfangstemperaturen von HPMC E4M-Lösungen mit Pilocarpinhydrochlorid

*die automatisch berechnete Peakanfangstemperatur mußte korrigiert werden

Trägt man diese Werte in einem Diagramm auf, werden die Unterschiede sichtbar:

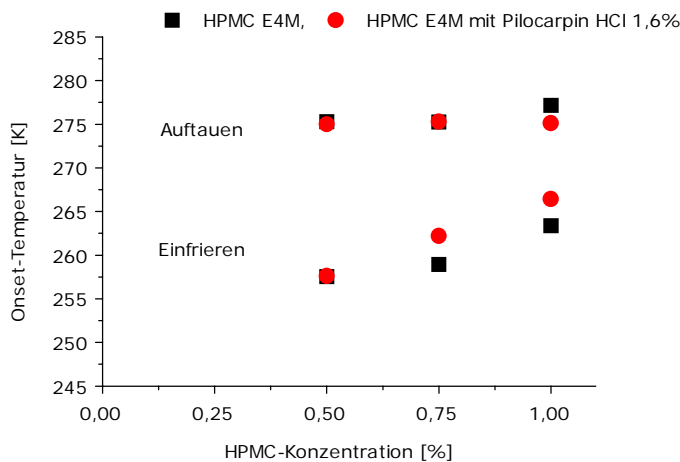


Abb.7.16:
Peakanfangstemperaturen von
HPMC E4M-Lösungen

Der Einfluß des Pilocarpin- und HPMC-Zusatzes auf die Auftautemperatur ist gering. Lediglich bei der Einfriertemperatur macht sich der Zusatz der Substanzen in einer geringeren Unterkühlung bemerkbar. Dies ist verständlich, da durch die Zusätze mehr Kristallkeime in der Lösung sind und dadurch die Kristallisation bereits bei niedrigeren Temperaturen eintritt (s.a. Kap. 4).

Die 0,5 %ige HPMC-Lösung mußte fast auf -16 °C abgekühlt werden, bevor die Kristallisation eintrat. Der Pilocarpinzusatz hatte wenig Einfluß darauf.

Die 1,0 %ige Lösung fror bereits bei etwa -10 °C ein. Der enthaltene Arzneistoff erhöhte die Temperatur auf etwa -7 °C .

Warum die Auftautemperaturen alle über 0 °C trotz zuvor kalibrierter Anlage liegen, kann hier nicht erklärt werden.

Einfluß der HPMC-Konzentration

Bei den Messungen einer 5, 10 und 20 %igen Lösungen ergaben sich folgende Ergebnisse:

HPMC-Konzentration [%]	Peakankangstemperatur Einfrieren [K]		Peakankangstemperatur Auftauen [K]	
	Mittelwert	s	Mittelwert	s
5	255,583	1,872	273,825	0,043
10	255,391	1,697	273,142	0,355
20	253,971	1,092	272,241	0,091

Tab.7.17: Peakankangstemperaturen von HPMC E4M-Lösungen ($n=5$)

In einer Grafik ergibt sich folgendes Bild:

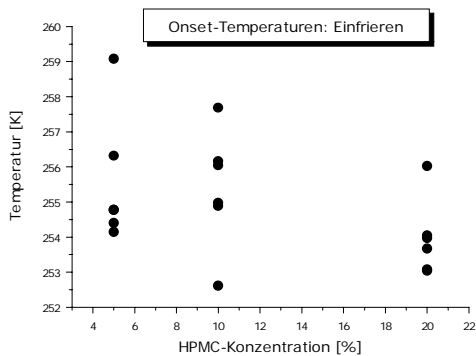


Abb.7.18: Peakankangstemperaturen Einfrieren

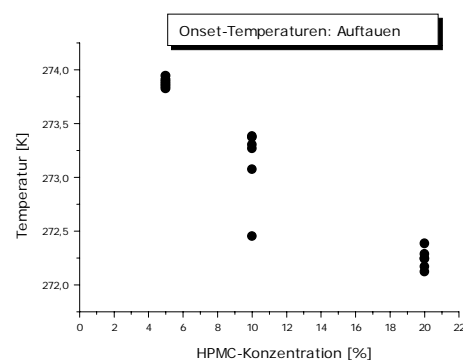


Abb.7.19: Peakankangstemperaturen Auftauen

Überraschenderweise ergibt sich hier auf den ersten Blick ein gegenteiliges Bild: je höher die Polymerkonzentration, desto tiefer ist die benötigte Einfriertemperatur. Das läßt sich damit erklären, daß die 20 %ige Polymerlösung bereits so viskos war, daß die Kristallbildung nur mit Schwierigkeiten erfolgen konnte. Eine Glasbildung, wie sie

bei hoch konzentrierten Polymerlösungen zu sehen ist [Rupprecht, 1993], konnte bei diesen Temperaturen und Konzentrationen nicht nachgewiesen werden.

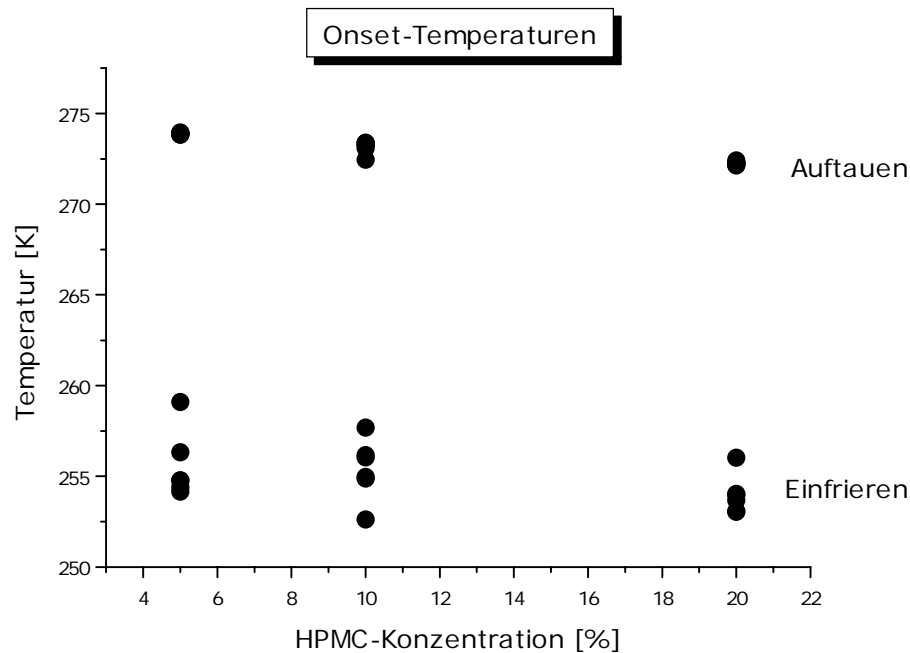


Abb.7.20: Peakanfängstemperaturen HPMC E4M-Lösungen

Zusammenfassend kann man sagen, daß HPMC in den für Lyophilisate eingesetzten Konzentrationen nur einen geringen Einfluß auf das Auftau- und Einfrierverhalten der Lösung zeigte.

Fiedler [1981] gibt für wäßrige Lösungen von Celluloseethern einen Gefrierpunkt von 0 °C an.

Bei der Gefriertrocknung zur Herstellung der ophthalmischen Lyophilisate sollte darauf geachtet werden, daß, obwohl der Schmelzpunkt der untersuchten Lösungen nur unwesentlich unter 0 °C liegt, die Lösung durchaus sehr tief unterkühlt werden kann, ohne daß der Kristallisationsprozeß einsetzt. Rupprecht [1993] berichtet, daß unter üblichen Arbeitsbedingungen durchaus Unterkühlungen bis zu -15 °C auftreten können. Dies war auch hier der Fall.

Entsprechend sollten die Versuchsbedingungen so gewählt werden, daß ein vollständiges Durchfrieren der Lösung gewährleistet ist.

7.2. Trägerfolien

Da das bisher verwendete PTFE-Gewindeband einige Mängel aufwies, sollte eine Alternative gefunden werden. Als Probleme tauchten auf:

- Folie verzog sich beim Autoklavieren unregelmäßig
- Folie war zu weich und klappte teilweise bei der Applikation des Lyophilisats um
- es existiert kein Datenblatt bzw. Spezifikation über die Folieneigenschaften

Da PTFE chemisch inert und biokompatibel ist, sollte die neue Folie wiederum aus diesem Material bestehen.

7.2.1. Eigenschaften der PTFE-Folien

Die Dicke, Dichte (soweit Angaben vorhanden) und das Verhalten der Folien nach dem Autoklavieren sind in einer Tabelle zusammengefaßt worden.

Produkt	Nenn-Dicke* [µm]	Dicke* [µm]	Poren- Ø* [µm]	Dichte* [g/cm ³]	Art*	Dampf- sterilisa- tion ¹⁾
PTFE Dichtungsmaterial ²⁾	100	120	-	k.A.	gereckt, ungesintert	1
Hoechst Hostafon [®] ET 6235	100	-	-	k.A.	gesintert,	2
Hoechst Hostafon ET 6235	50	-	-	k.A.	gesintert,	2
Norton Pampus Type 0100	50	55	-	≈2,2	gesintert,	2
Norton Pampus Type 0100	100	100	-	≈2,2	gesintert,	2
3P GmbH, ungesintertes PTFE-Band	100	105	-	≈1,6	ungesintert	0
3P GmbH, geschältes gesintertes PTFE-Band	100	112	-	≈2,2	gesintert, geschält	2
Thomaplast [®] , PTFE-Folie	120	-	-	≈2,2	gesintert,	2
Thomaplast [®] , PTFE-Folie	250	-	-	≈2,2	gesintert,	2
Thomaplast [®] , PTFE-Folie	500	-	-	≈2,2	gesintert,	2
Thomaplast [®] , PTFE-Band	100	-	-	k.A.	gereckt	1
Thomafoil [®] , PTFE-Folie	10	-	-	≈2,2	gesintert,	2
Thomafoil [®] , PTFE-Folie	50	-	-	≈2,2	gesintert,	2
Gore Preclude [®] Pericardial Membrane	100	100	-	k.A.	k.A.	0

(Fortsetzung nächste Seite)

Produkt	Nenn-Dicke* [µm]	Dicke* [µm]	Poren- Ø* [µm]	Dichte* [g/cm ³]	Art*	Dampfsterilisation ¹⁾
Schleicher & Schuell TE 35 Membranfilter	-	-	0,2	-	-	1,2
Schleicher & Schuell TE 36 Membranfilter	-	-	0,45	-	-	1,2
Schleicher & Schuell TE 37 Membranfilter	-	-	1,0	-	-	1,2
Schleicher & Schuell TE 38 Membranfilter	-	-	5,0	-	-	1,2

Tab.7.21: Übersicht über die untersuchten PTFE-Folien

* Firmenangaben

¹⁾Dampfsterilisation, 0: keine Veränderungen, 1: verzieht sich, 2: zu hart

²⁾ von Grunthal [1996] verwendete PTFE-Folie

Die sensorische Prüfung am Auge bestanden nur vier der untersuchten Folien.

- PTFE Dichtungsmaterial
- 3P GmbH, ungesintertes PTFE-Band
- Thomaplast[®], PTFE-Band
- Gore Preclude[®] Pericardial Membrane

In allen Fällen handelte es sich um ungesinterte PTFE-Folien, die eine geringere Dichte ($\approx 1,6$) als die gesinterte Version ($\approx 2,2$) aufwiesen. Die eigentliche Dicke der Folie spielte keine Rolle. Sowohl dünne (10 µm) als auch dicke (100 µm) gesinterte Folien besaßen nach dem Herstellen der Träger scharfe Schnittkanten, die zu Verletzungen hätten führen können. Deshalb mußten sie von einer Verwendung als Trägermaterial ausgeschlossen werden.

Die getesteten Membranfilter bestanden aus einer Kombination von PTFE und einem Stützgewebe. Trotz der Herstellerangabe, daß die Filter zwischen -250 und +180 °C thermostabil sind, trennte sich beim Autoklavierprozeß die PTFE-Folie von ihrer Unterlage und rollte sich zusammen. Zusätzlich lösten sich Fäden aus dem Filter heraus, was bei einer Anwendung am Auge ausgeschlossen werden muß.

Der Vorteil der Gore Preclude[®] Pericardial Membrane ist, daß sie bereits als Medizinprodukt zugelassen ist (Einsatz: Rekonstruktion oder Ersatz des Pericards) und ebenfalls hervorragende Eigenschaften aufwies. Die gute gleichbleibende Qualität und ihre Verträglichkeit sind gewährleistet und der Hersteller gibt an, daß die Membran mittels Dampf- und Gasverfahren bis zu dreimal resterilisierbar ist, ohne

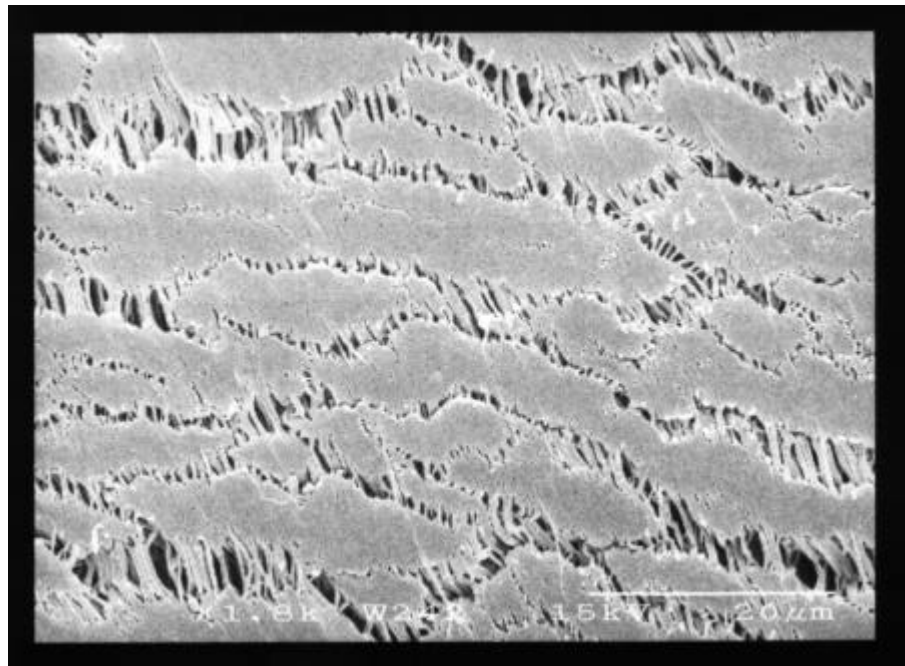
daß sich die physikalischen und chemischen Eigenschaften ändern. Der große Nachteil der Gore Preclude[®] Pericardial Membrane ist allerdings der hohe Preis (ca. 850 DM/24 cm²). Weitere Versuche fanden deshalb mit dieser Folie nicht statt. Für weitere Experimente erwies sich von den untersuchten PTFE-Folien am zweckmäßigsten das ungesinterte 3P GmbH PTFE-Band der Plastic Omnium GmbH.

Die Firmenspezifikation weist die Folie als 'Unsintered Gaflon[®] PTFE Tape' aus:

<i>Dicke:</i>	100 µm
<i>Toleranz:</i>	± max. 5 µm
<i>Tensile Strength:</i>	(longitudinal) ≥ 11 N/mm ² (transversal) ≥ 1,5 N/mm ²
<i>Streckung:</i>	(longitudinal) ≥ 60 % (transversal) ≥ 600 %
<i>spezifische Dichte:</i>	1,6 ± 0,1

7.2.2. Oberflächenbeschaffenheit von PTFE-Folien

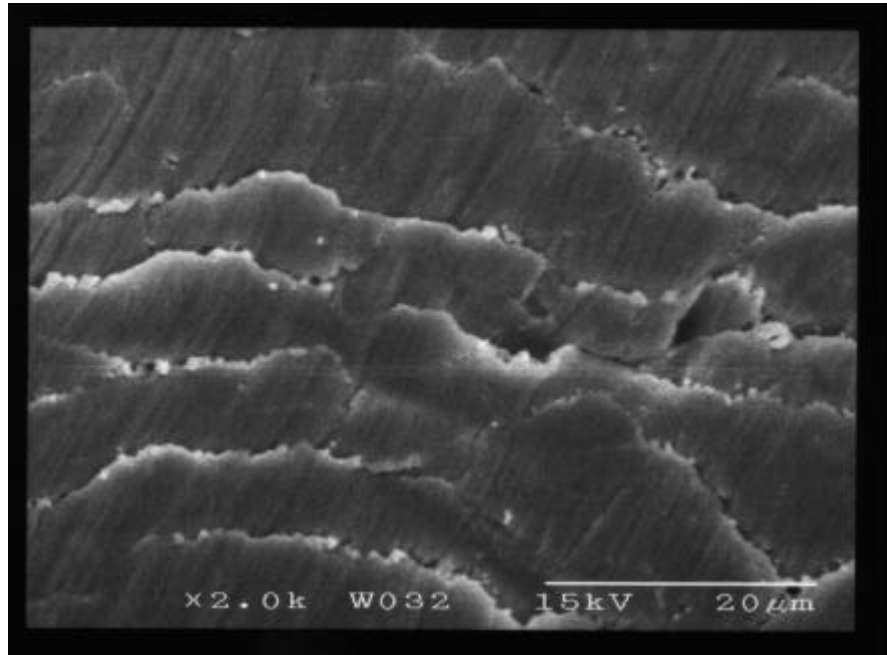
Bei den Versuchen stellte sich heraus, daß sowohl das PTFE-Dichtungsmaterial als auch das Thomaplast® PTFE-Band das gleiche Verhalten nach der Dampfsterilisation zeigten: das Material verzog sich ungleichmäßig und schrumpfte. Mit dem Rasterelektronenmikroskop konnte dieses Verhalten geklärt werden. Beide Typen bestanden aus ungesintertem, gerecktem Material, das im unbehandelten Zustand eine netzartige Struktur besaß, die unterschiedlich stark ausgeprägt war (Abb. 7.22.).



*Abb.7.22:
PTFE-Dichtungsband,
vor
dem Autoklavieren
ungesintert, gereckt
Vergrößerung: 1:1800*

Nach der Wärmebehandlung hatten sich die Lücken fast völlig geschlossen (Abb. 7.23). Die Konsequenz war ein unregelmäßiges Schrumpfen der Folie, so daß die Foliengröße unter Umständen nur noch Zweidrittel der ursprünglichen Länge betrug. Vermutlich kam es hier bereits bei niedrigen Temperaturen zu Sinterprozessen.

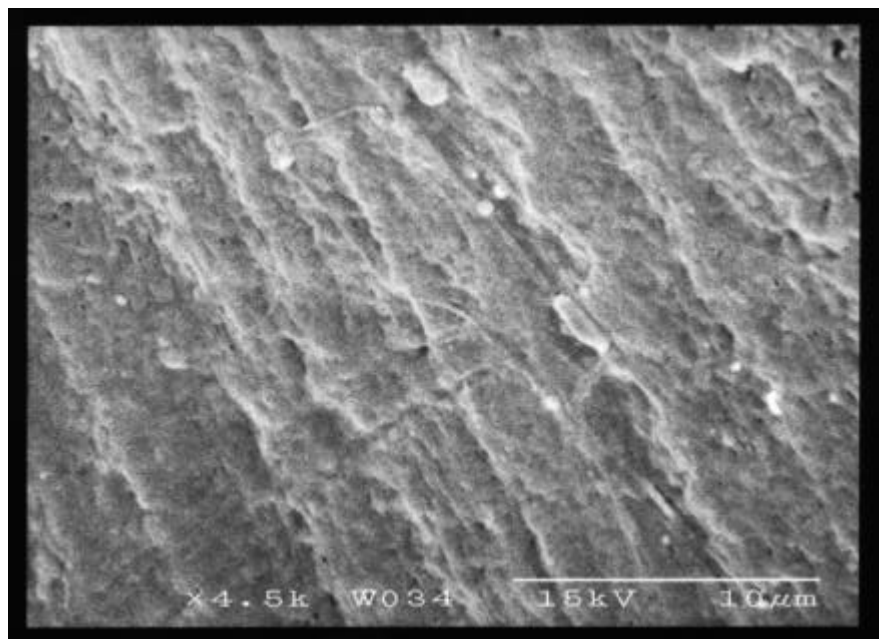
Abb.7.23:
PTFE-Dichtungsband,
nach dem
Autoklavieren
Vergrößerung: 1:2000



Die zwei anderen ungesinterten Folientypen (3P GmbH, Gore) zeigten keine Veränderungen nach einer Wärmebehandlung und besaßen nicht diese Netzstruktur.

Alle gesinterten Folien wiesen unter dem Mikroskop ein einheitliches Bild auf: eine ebene Fläche ohne besondere Charakteristika.

Abb.7.24:
PTFE-Folie, Norton
Pampus Type 0100,
50 µm, gesintert,
Vergrößerung: 1:4500



7.2.3. Veränderung der Oberflächenbeschaffenheit durch Prägung

Wie bereits in Kap. 6.3.5. beschrieben, kann u.a. durch Prägung eine so hydrophobe Oberfläche erzeugt werden, daß jegliche Ablagerungen leicht mit Flüssigkeit von dieser Fläche abgespült werden können [Neinhuis, 1999]. Mit dieser Zielsetzung wurden die als Träger eingesetzten PTFE-Folien entsprechend behandelt und auf diese Eigenschaften hin untersucht.

Die gelieferten Stempelvorlagen der Firma Brandt & Co. hatten makroskopisch diese Abmessungen. Die Prägung bestand aus Längsrillen.

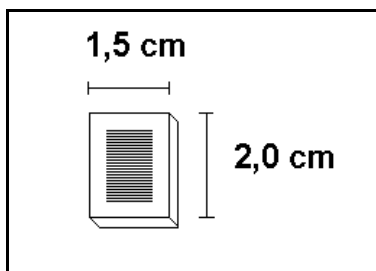


Abb.7.25: Prägestempel

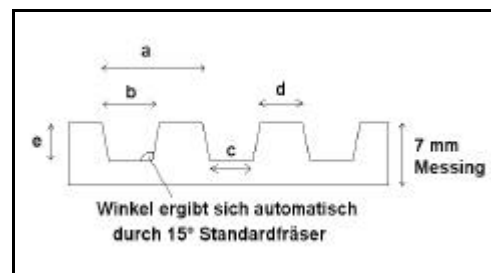


Abb.7.26: Vorlage für die Abmessungen der Prägestempel

Rasterelektronische Untersuchungen zeigten, daß die gewünschten Angaben der Prägestempel nur mit Einschränkungen realisiert werden konnten.

Ergebnisse:

Abmessung	Stempel 1 Maße [µm]		Stempel 2 Maße [µm]	
	Vorlage	Original	Vorlage	Original
a	200	347	150	315
b	100	286	50	236
c	k.A.	200	k.A.	160
d	100	61	100	79
e	50	160*	100	142*

Abb.7.27: Abmessungen der Matrizen, bestimmt anhand der Rasterbilder

* berechnet

Mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops konnten die einzelnen Strukturen deutlich gemacht werden.

Abb.7.28:
Matrize 1
Vergrößerung 1:35

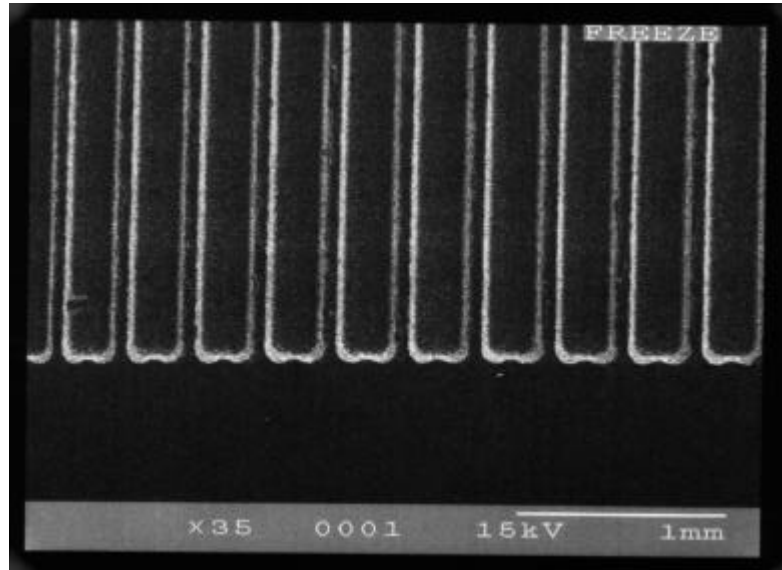
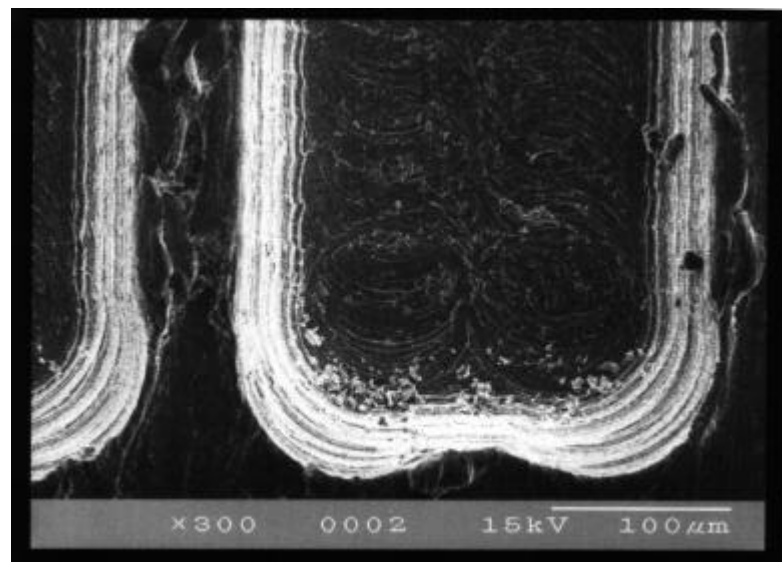
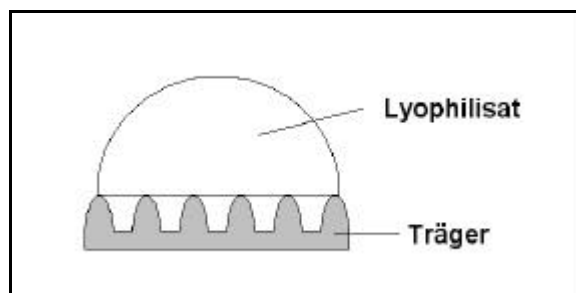


Abb.7.29:
Matrize 1
Vergrößerung 1:300

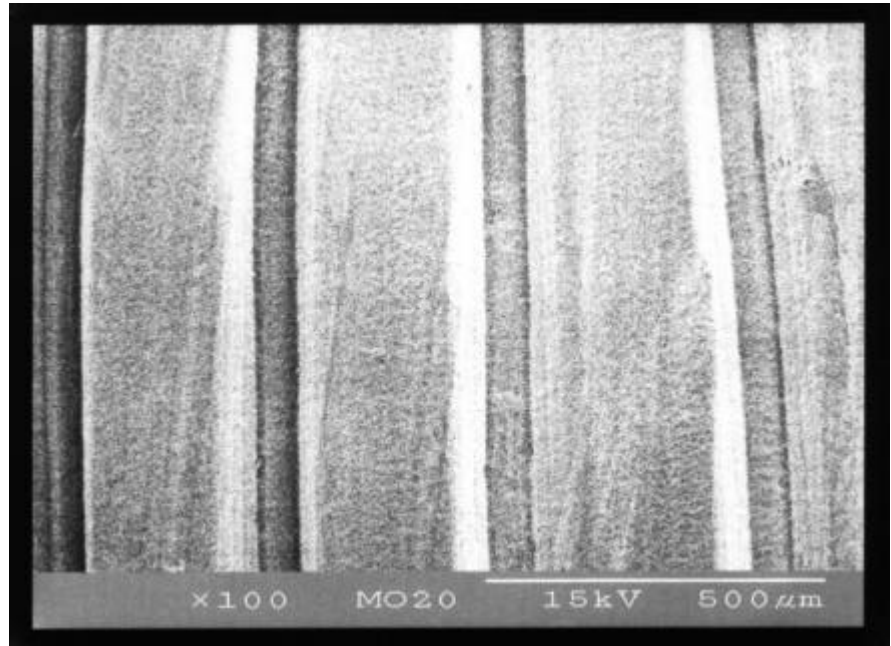


Das Lyophilisat sollte nach folgender Vorstellung auf dem Träger sitzen und durch die geringere Zahl an Haftpunkten sollten die Adhäsionskräfte vermindert werden.

Abb.7.30:
Vorstellung geprägte PTFE-Folie
mit Lyophilisat



Der Blick auf die geprägte PTFE-Folie zeigte jedoch, daß diese Idee nicht so realisiert werden konnte. Die Oberfläche der Folie konnte mit diesem Verfahren nur unwesentlich verringert werden. Die Erhebungen waren zu breit, die Vertiefungen zu schmal. Ein großer Einfluß im Hinblick auf eine Verringerung der Haftfähigkeit von Lyophilisaten auf den Folien dürfte nicht zu erwarten sein (s.a. Kap. 7.4.2.2.).



*Abb.7.31:
geprägte PTFE-Folie
Vergrößerung 1:100*

7.3. Herstellprozeß

7.3.1. Dosiergenauigkeit der Polymerlösungen

Die Überprüfung der Dosiergenauigkeit der Eppendorf Multipette plus ergab folgende Ergebnisse:

Destilliertes Wasser:

	Meßreihe 1	Meßreihe 2	Meßreihe 3
Anzahl der Messungen	30	30	30
Maximum [mg]	25,1	25,4	25,6
Minimum [mg]	24,5	24,4	23,9
Mittelwert [mg]	24,8	24,8	24,8
Standardabweichung [mg]	0,2	0,2	0,4
rel. Standardabweichung [%]	0,8	0,8	1,5

Tab.7.32: Dosiergenauigkeit mit destilliertem Wasser

HPMC E4M 0,5 %:

	Meßreihe 1	Meßreihe 2	Meßreihe 3
Anzahl der Messungen	30	30	30
Maximum [mg]	25,4	25,3	25,4
Minimum [mg]	24,1	24,2	24,4
Mittelwert [mg]	24,9	24,9	24,9
Standardabweichung [mg]	0,3	0,2	0,3
rel. Standardabweichung [%]	1,1	0,9	1,0

Tab.7.33: Dosiergenauigkeit mit HPMC E4M-Lösung 0,5 %

HPMC E4M 1,0 %:

	Meßreihe 1	Meßreihe 2	Meßreihe 3
Anzahl der Messungen	30	30	30
Maximum [mg]	25,5	25,6	25,6
Minimum [mg]	24,4	24,3	24,2
Mittelwert [mg]	24,9	24,9	24,8
Standardabweichung [mg]	0,3	0,3	0,3
rel. Standardabweichung [%]	1,1	1,1	1,2

Tab.7.34: Dosiergenauigkeit mit HPMC E4M-Lösung 1,0 %

Bei einem eingestellten Dosiervolumen von 25 µl betrug das durchschnittliche Tropfengewicht von destilliertem Wasser bei allen Biopur-Aufsätzen 24,8 mg, mit HPMC 0,5 % 24,9 mg und mit HPMC 1,0 % ergab sich ein Mittelwert von 24,87 mg.

Ein Vergleich mit den in einer früheren Arbeit von Grunthal [1996] verwendeten Insulinspritzen zeigt, daß die Dosiergenauigkeit auf diese Weise erheblich verbessert werden konnte. Die relativen Standardabweichungen wurden im Schnitt auf ein Viertel reduziert.

Der Vorteil dieses Systems ist, daß die Ergebnisse praktisch unabhängig von Personen und der Dichte, Viskosität, dem Benetzungsverhalten und Dampfdruck der Flüssigkeiten sind.

Gegenüberstellung Dosierung konventioneller Augentropfen mit der von Lyophilisaten

Zur Veranschaulichung der besseren Dosiermöglichkeit dieses Systems wurden aus den Mittelwerten und Standardabweichungen dieser Vorrichtung und der drei Augenpräparaten (s.a. Kap. 5) die Verteilungen berechnet und graphisch aufgetragen.

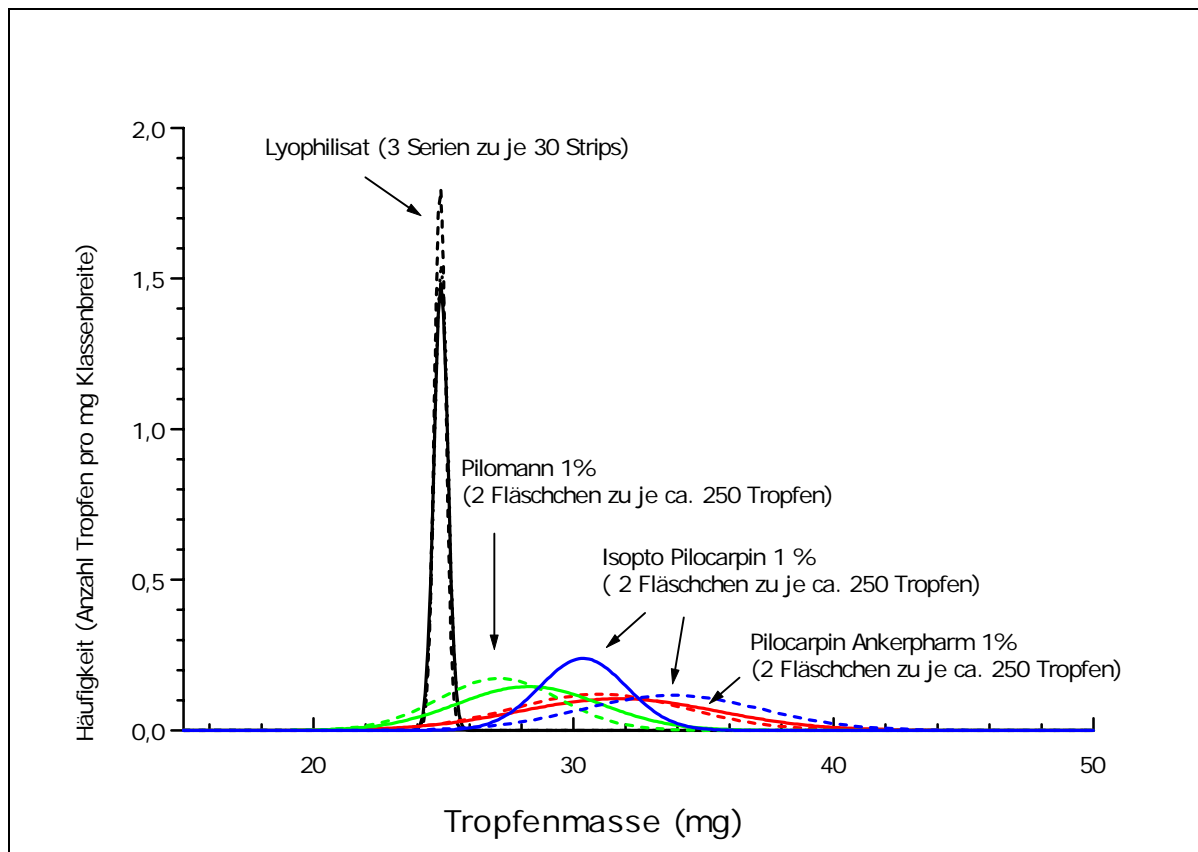


Abb.7.35: Normalverteilungen der Tropfen aus drei Handelspräparaten und der Eppendorf-Pipette

Während die Normalverteilungen der Tropfenmassen von Handelspräparaten flach und breit verlaufen, sind die von Lyophilisaten sehr schmal und hoch.

Bezüglich der Arzneistoffdosierung kann - unter der Voraussetzung, daß sich das Trockengel vollständig von seinem Träger ablöst - resümiert werden, daß es sich bei der Anwendung von Lyophilisaten im Vergleich zu konventionellen Augentropfen um eine Verbesserung handelt, die auch die Arzneistoffsicherheit erhöht.

7.3.2 Einfriergeschwindigkeit

Zur Untersuchung des Einfrierverhaltens der eingesetzten Lösungen wurde ein Thermofühler auf die PTFE-Folie geklebt (s.a. Kap. 6.4.2.) und der Temperaturverlauf aufgezeichnet.

Einfrieren im Gefrierschrank, -30 °C

Abbildung 7.37 zeigt drei Temperaturverläufe, die im Zeitraum von 2,5 Stunden im Gefrierschrank aufgenommen worden sind. Der Thermofühler auf der PTFE-Folie erreichte mit dieser Methode bei allen Messungen bereits nach 5 Minuten eine Temperatur von -25 °C. Nach 10 Minuten sank die Temperatur nur noch sehr langsam von -25 °C auf den Endwert von -30 °C, der erst nach über zwei Stunden erreicht wurde.

Da das Tropfenvolumen mit 25 µl nur gering ist, ist zu erwarten, daß sich eine auf dem Träger befindliche Lösung ähnlich wie der Thermofühler verhalten wird. Allerdings wird der Temperaturverlauf in einem Tropfen aufgrund der auftretenden Kristallisationsprozesse und damit freiwerdenden Kristallisationswärme etwas langsamer verlaufen.

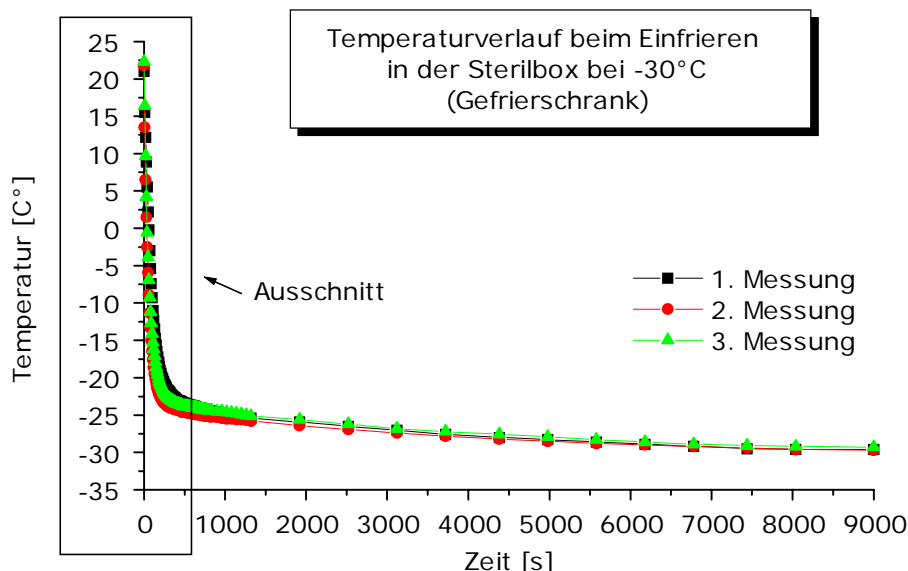


Abb.7.36: Temperatur-Zeitverlauf im Gefrierschrank bei einer eingestellten Endtemperatur von -30 °C in einem Zeitraum von 2,5 Stunden

Da alle untersuchten Polymerlösungen trotz Unterkühlungserscheinungen spätestens bei -20 °C durchgefroren waren (s. Kap. 7.1.3.), werden auf den PTFE-

Trägern aufgetropfte Lösungen vermutlich bei Erreichen dieser Temperaturen ebenfalls erstarrt sein. Tiefere Temperaturen sind an dieser Stelle nicht von Interesse.

Um die anfänglichen Unterschiede in den Kurvenverläufen herauszustellen, wurde das Zeitintervall von 0 bis 600 Sekunden gesondert dargestellt:

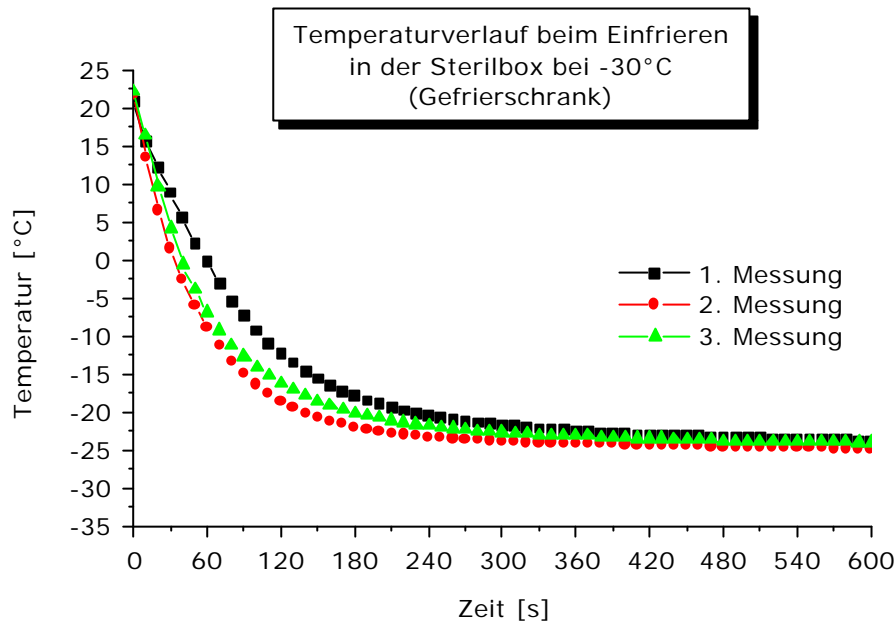


Abb.7.37: Temperatur-Zeitverlauf im Gefrierschrank bei einer eingestellten Endtemperatur von -30 °C in einem Zeitraum von 10 Minuten

Die Kurven verliefen ähnlich. Da der Beginn der Zeitmessung experimentell bedingt variierte, waren die Kurven geringfügig verschoben.

Es ist nicht möglich, eine konkrete Einfriergeschwindigkeit für dieses System anzugeben, da die Einfriergeschwindigkeit durch ein Temperaturgefälle bestimmt wurde, welches innerhalb einer schmalen Spanne kontinuierlich geringer wurde. Insofern veränderte sich auch fortwährend die Abkühlgeschwindigkeit. Man kann somit nur für einen bestimmten Temperaturbereich eine Einfriergeschwindigkeit angeben.

Um diesen Kurvenverlauf in eine lineare Funktion zu überführen und um damit besser miteinander vergleichbare Daten zu erhalten, wurde die Abszisse logarithmiert. Man erhält mit Ausnahme der Anfangs- und Endwerte einen annähernd linearen Verlauf.

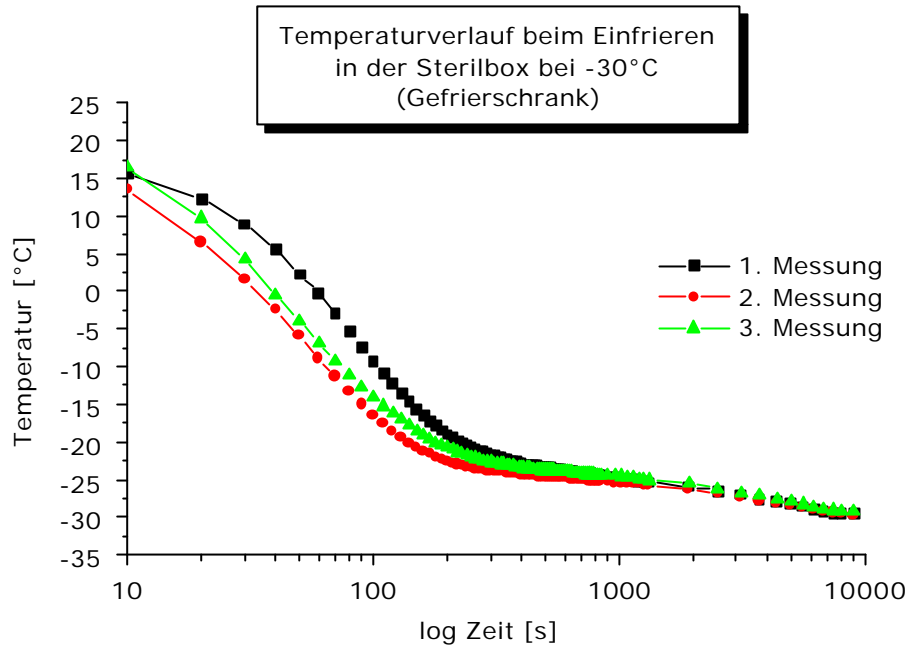


Abb.7.38: Temperatur-Zeitverlauf im Gefrierschrank bei einer eingestellten Endtemperatur von -30 °C; logarithmierte Auftragung der Abszisse

Die mittels DSC ermittelten Einfriertemperaturen der Lösungen (s. Kap. 7.1.3.) ergaben Werte zwischen -5 und -20 °C. Von besonderem Interesse wird hier also dieser Temperaturbereich sein. Im Bereich von 20 und 100 Sekunden bzw. zwischen 5 und -20 °C ist der Verlauf annähernd linear (s. Abb. 7.38). Durch diese Werte wird eine Regressionsgerade gelegt und die zugehörige Funktion berechnet.

Die Funktionen für die Geradengleichung $y = a \times \log x + b$ in diesem Bereich lauten:

Parameter	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>R</i>	<i>n</i>
1. Messung	-38,7	68,4	-0,9994	10
2. Messung	-34,1	51,8	-0,9994	10
3. Messung	-32,5	51,0	-0,9981	10

Tab.7.39: Funktionen für Einfrieren im Gefrierschrank

R: Korrelationskoeffizient

n: Anzahl der Datenpunkte

Es ist davon auszugehen, daß spätestens bei -20 °C die Polymerlösungen durchgefroren sind. Die Einfriergeschwindigkeit wird in Grad pro Minute angegeben. Um die tatsächlichen Verhältnisse im Gefrierschrank zu veranschaulichen, werden die Geschwindigkeiten zwischen 0 und -20 °C in 2-Grad-Schritten berechnet:

	Einfriergeschwindigkeit im Temperaturbereich von				
	0 - -2 °C [°C/min]	-2 - -4 °C [°C/min]	-4 - -6 °C [°C/min]	-6 - -8 °C [°C/min]	-8 - -10 °C [°C/min]
Messung 1	16,2	14,4	12,8	11,4	10,1
Messung 2	25,1	21,9	19,2	16,8	14,6
Messung 3	21,3	18,4	16,0	13,9	12,1
Mittelwert	20,9	18,3	16,0	14,0	12,3
	-10 - -12 °C [°C/min]	-12 - -14 °C [°C/min]	-14 - -16 °C [°C/min]	-16 - -18 °C [°C/min]	-18 - -20 °C [°C/min]
Messung 1	8,9	7,9	7,1	6,3	5,6
Messung 2	12,8	11,2	9,8	8,5	7,4
Messung 3	10,5	9,1	7,9	6,8	5,9
Mittelwert	10,7	9,4	8,2	7,2	6,3

Tab.7.40: Übersicht über Einfriergeschwindigkeiten in verschiedenen Temperaturbereichen beim Einfrieren im Gefrierschrank (-30 °C)

Von 0 bis -20 °C nahm die Geschwindigkeit im Durchschnitt von etwa 21 °C/min auf etwa 6 °C/min ab. Wie bereits in Kapitel 4 erwähnt, ist der Bereich von 0,2 bis 10 °C/min dem langsamen Einfrieren zuzuordnen. Es entstehen wenige Kristallkeime, die zu großen Kristallen heranwachsen können.

Kommt es im Gefrierschrank aufgrund von Vibrationen zu einer Kristallisation bereits knapp unterhalb des Gefrierpunktes, so sind die Einfriergeschwindigkeiten größer und erreichen bis zu 20 °C/min.

Einfrieren auf Trockeneis, -79 °C

Folgende Temperatur-Zeit-Kurven wurden aufgezeichnet, als die Sterilbox unter Zuhilfenahme von Trockeneis eingefroren wurde.

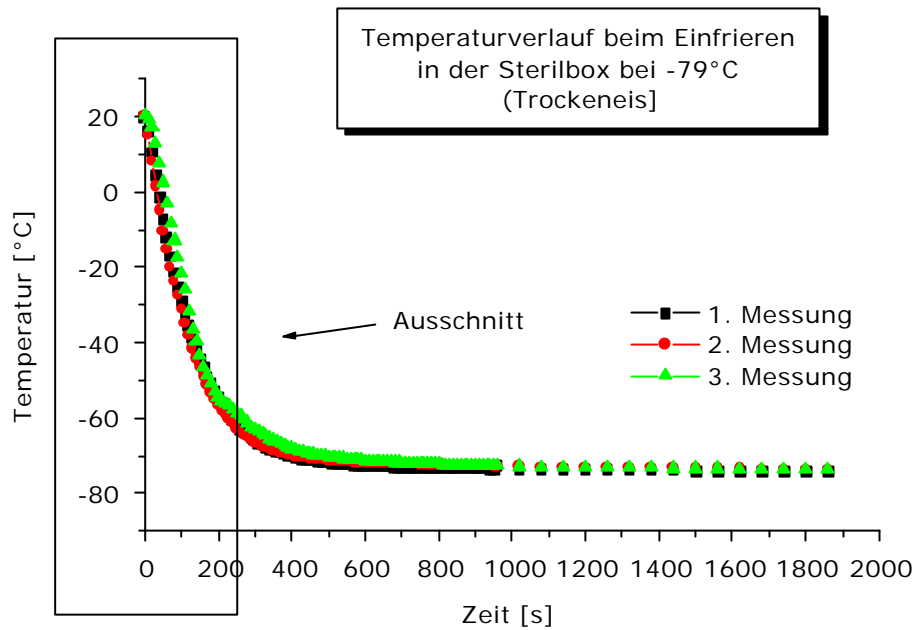


Abb.7.41: Temperatur-Zeitverlauf auf Trockeneis (-79 °C) während eines Zeitraums von 30 Minuten

Da der Thermofühler schon nach 200 s eine Temperatur von -60 °C erreicht hat, werden Tropfen von Polymerlösungen bis zu diesem Zeitpunkt mit Sicherheit bereits vollständig durchgefroren sein. Prozeßrelevante Einflüsse werden also innerhalb der ersten 4 Minuten nach dem Beginn des Einfrierens stattfinden.

Auch von diesem Prozeß wurde der relevante Ausschnitt, das Intervall von 0 bis 200 Sekunden, vergrößert dargestellt:

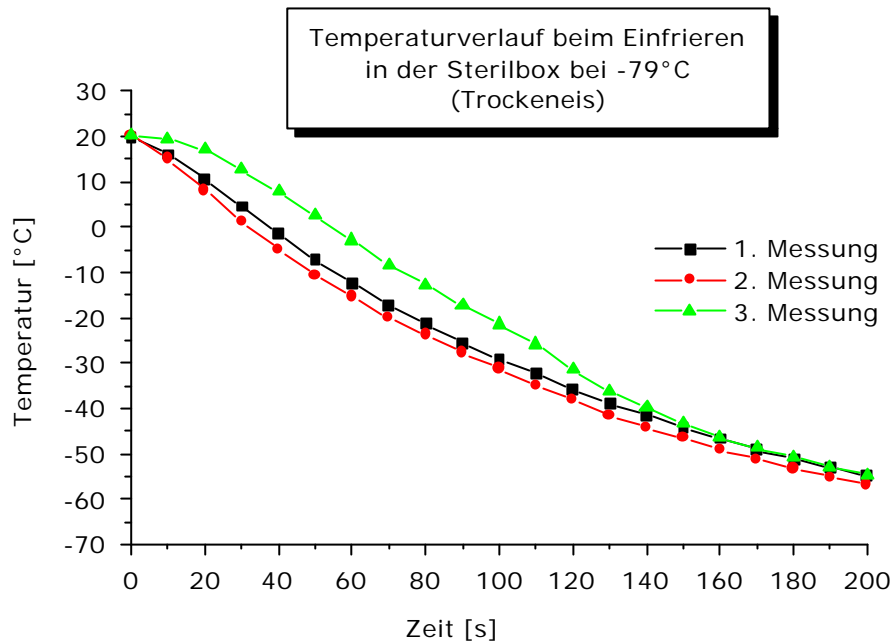


Abb.7.42: Temperatur-Zeitverlauf auf Trockeneis (-79°C) während den ersten 200 Sekunden des Einfrierprozesses

Wie bereits im ersten Beispiel kam es auch hier experimentell bedingt zu leicht verschobenen Kurven. Da in diesem Fall die Temperaturdifferenzen sehr hoch waren, war der Graph in dem relevanten Temperaturabschnitt (zwischen 0 und -30°C) im Gegensatz zum Einfrieren im Gefrierschrank bei -30°C bereits annähernd linear.

Die Logarithmierung der Abszisse wie bei der Einfriertemperatur von -30 °C ergibt ein vergleichbares Bild.

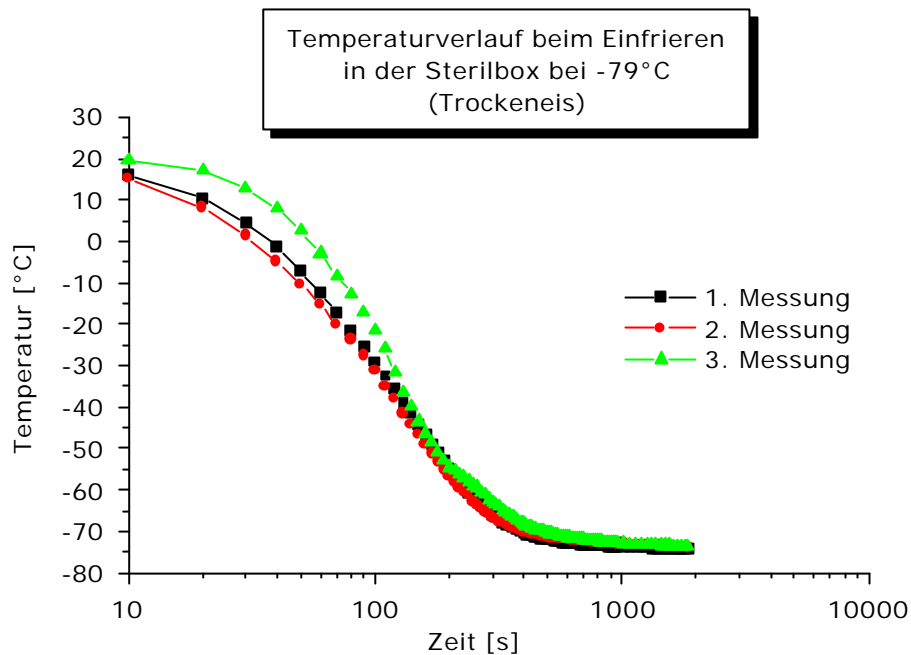


Abb.7.43: Temperatur-Zeitverlauf auf Trockeneis (-79 °C) während den ersten 200 Sekunden des Einfrierprozesses, logarithmierte Auftragung der Abszisse

Die Verläufe waren zwischen 0 und -50 °C bzw. zwischen 30 und 200 s weitgehend linear.

Die Funktionen für die Geradengleichung $y = a \times \log x + b$ in diesem Bereich lauten:

Parameter	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>R</i>	<i>n</i>
1. Messung	-77,2	124,4	-0,9978	12
2. Messung	-73,8	115,3	-0,9965	12
3. Messung	-105,6	187,5	-0,9952	12

Tab.7.44: Funktionen für Einfrieren im Trockeneis

R: Korrelationskoeffizient

n: Anzahl der Datenpunkte

Die Berechnung der Einfriergeschwindigkeiten zwischen 0 und -20 °C für diesen Temperaturbereich in 2-Grad-Schritten ergab folgende Werte:

	Einfriergeschwindigkeit im Temperaturbereich von				
	0 - -2 °C [°C/min]	-2 - -4 °C [°C/min]	-4 - -6 °C [°C/min]	-6 - -8 °C [°C/min]	-8 - -10 °C [°C/min]
Messung 1	47,8	45,0	42,4	39,9	37,6
Messung 2	51,1	48,0	45,1	42,3	39,8
Messung 3	45,1	43,2	41,4	39,6	37,9
Mittelwert	48,0	45,4	42,9	40,6	38,4
	-10 - -12 °C [°C/min]	-12 - -14 °C [°C/min]	-14 - -16 °C [°C/min]	-16 - -18 °C [°C/min]	-18 - -20 °C [°C/min]
Messung 1	35,4	33,4	31,5	29,6	27,9
Messung 2	37,4	35,1	33,0	31,0	29,1
Messung 3	36,3	34,7	33,3	31,8	30,5
Mittelwert	36,4	34,4	32,6	30,8	29,2

Tab.7.45: Übersicht über Einfriergeschwindigkeiten in verschiedenen Temperaturbereichen beim Einfrieren in Trockeneis (-79 °C)

Bei allen drei Messungen wurden ähnliche Werte ermittelt. Diese Methode ist recht gut reproduzierbar, die Schwankungen innerhalb eines Temperaturbereiches waren nur gering. Mit diesen Werten wird dieses Verfahren zu den sehr schnellen Einfriermethoden gezählt. Aus vielen Kristallkeimen entstehen viele kleine Kristalle. Da diese kleinen Kristalle im Laufe der Zeit wachsen (s.a. Kap. 4.2.2.), ist auf eine zügige Weiterverarbeitung der eingefrorenen Lösungen zu achten, damit, falls erwünscht, diese Struktur auch im Lyophilisat später erhalten bleibt.

Einfrieren im flüssigen Stickstoff, $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$

Das Einfrieren in einer mit flüssigen Stickstoff gekühlten Umgebung ergab folgendes Bild:

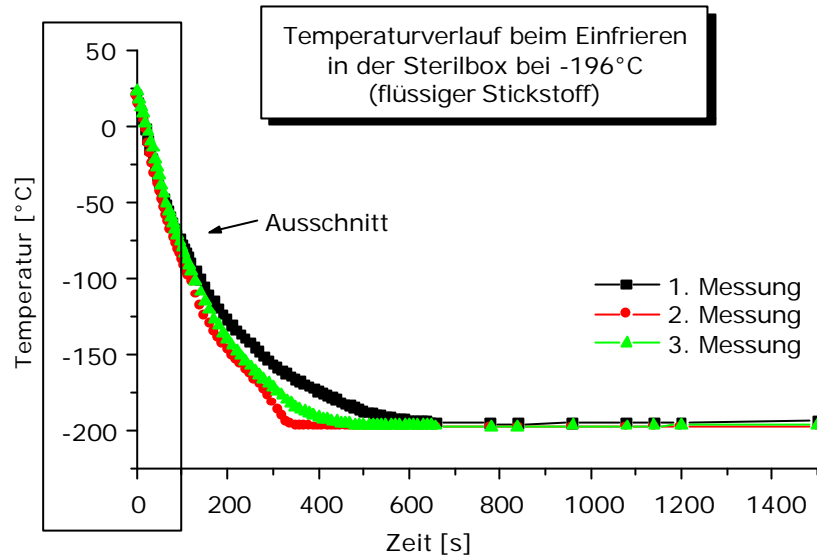


Abb.7.46: Temperatur-Zeitverlauf in flüssigem Stickstoff ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) während eines Zeitraums von 50 Minuten

Innerhalb 100 Sekunden nach Versuchsbeginn ist der Thermofühler bereits auf Temperaturen von $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ heruntergekühlt. Eine Vergrößerung des Ausschnittes zu Beginn der Messungen zeigt, daß der Verlauf hier linear ist.

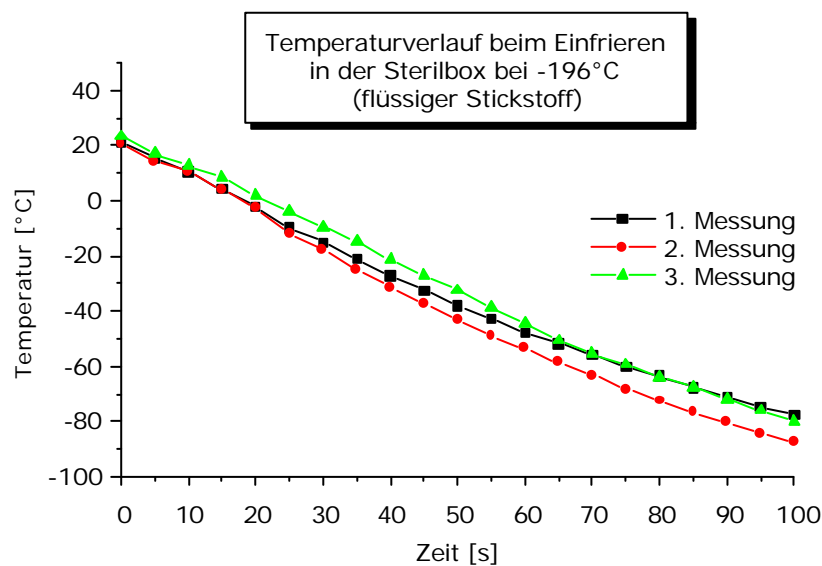


Abb.7.47: Temperatur-Zeitverlauf in flüssigem Stickstoff ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) während eines Zeitraums von 100 Sekunden

Logarithmische Auftragung:

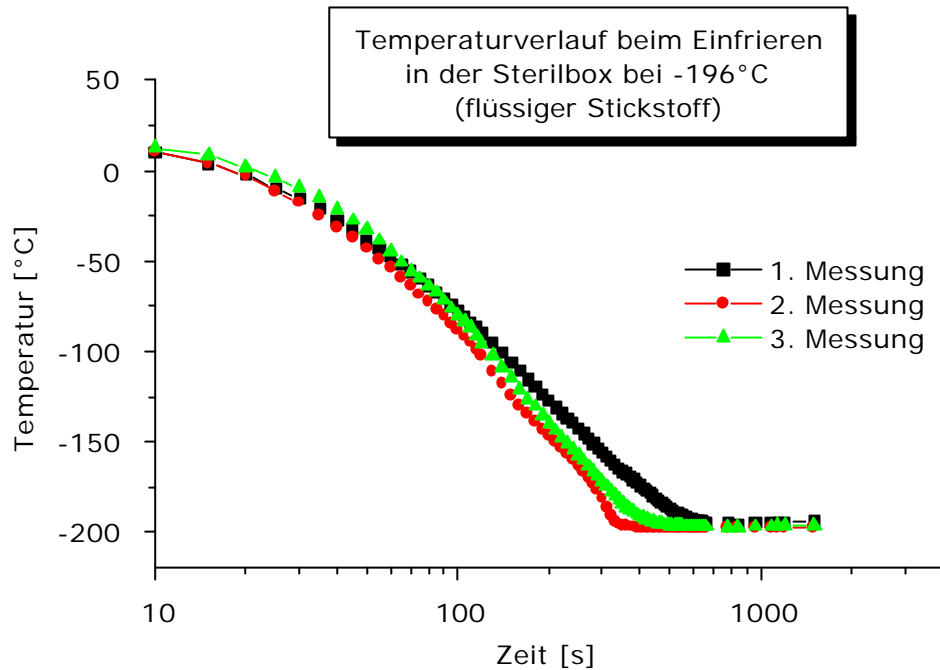


Abb.7.48: Temperatur-Zeitverlauf in flüssigem Stickstoff (-196 °C) während eines Zeitraums von 100 Sekunden, logarithmierte Auftragung der Abszisse

Für den sich daraus ergebenden linearen Bereich zwischen 20 und 300 Sekunden bzw. zwischen -5 und -160 °C wurde wie zuvor eine Regressionsgerade berechnet.

Die Funktionen für die Geradengleichung $y = a \times \log x + b$ in diesem Bereich lauten:

Parameter	a	b	R	n
1. Messung	-160,3	242,2	-0,9995	25
2. Messung	-178,5	265,9	-0,9972	25
3. Messung	-187,4	292,7	-0,9986	25

Tab.7.49: Funktionen für das Einfrieren im flüssigen Stickstoff

Die Berechnung der Einfriergeschwindigkeit für den Temperaturbereich von etwa 2 bis etwa -35 °C ergibt folgende Werte:

	Einfriergeschwindigkeit im Temperaturbereich von				
	0 - -2 °C [°C/min]	-2 - -4 °C [°C/min]	-4 - -6 °C [°C/min]	-6 - -8 °C [°C/min]	-8 - -10 °C [°C/min]
Messung 1	127,0	123,4	119,9	116,5	113,2
Messung 2	148,7	144,9	141,2	137,6	134,1
Messung 3	132,3	129,1	125,9	122,9	119,9
Mittelwert	136,0	132,4	129,0	125,7	122,4
	-10 - -12 °C [°C/min]	-12 - -14 °C [°C/min]	-14 - -16 °C [°C/min]	-16 - -18 °C [°C/min]	-18 - -20 °C [°C/min]
Messung 1	110,0	106,9	103,8	100,9	98,0
Messung 2	130,7	127,4	124,1	121,0	117,9
Messung 3	117,0	114,1	111,4	108,7	106,0
Mittelwert	119,2	116,1	113,1	110,2	107,3

Tab.7.50: Übersicht über Einfriergeschwindigkeiten in verschiedenen Temperaturbereichen beim Einfrieren in flüssigen Stickstoff (-196 °C)

In diesem Verfahren wurden Geschwindigkeiten bis zu 136°C/min erreicht. Für einen wässrigen Tropfen bedeutet dies, daß er innerhalb einer halben Minute durchgefroren sein müßte. Bei dem Verfahren dürften sich theoretisch nur kleine Eiskristalle bilden können (s. Kap. 4.2.).

Beurteilung der Verfahren:

Das Einfrieren auf Trockeneis lieferte sehr reproduzierbare Werte. Ein Nachteil dieses Verfahrens war allerdings, daß die Lagerfähigkeit des Trockeneises recht gering war und es nicht jederzeit zur Verfügung stand.

Bei allen Methoden handelt es sich um schnelle Einfrierprozesse (s.a. Kap. 4.2.3.).

Die Prozeßzeiten von 4 Stunden [Grunthal, 1996] zum Einfrieren bei -30 oder -80°C der Proben können in Abhängigkeit des verwendeten Verfahrens auf 0,5 bis 10 Minuten reduziert werden.

Für die verschiedenen Systeme werden diese Einfrierzeiten vorgeschlagen:

	Gefrierschrank (-30 °C)	Trockeneis (-80 °C)	Stickstoff, flüssig (-196 °C)
Einfrierzeiten [min]	5-10	3-5	0,5-3

Tab.7.51: Einfrierzeiten für die Lyophilisat-Herstellung (Vorschlag)

7.3.3. Trocknungsgeschwindigkeit der Lyophilisate

Der Wassergehalt der Lyophilisate wurde nach vorgegebenen Prozeßzeiten des Gefriertrockners bestimmt. Die zwei zur Verfügung stehenden Geräte der Firmen Leybold-Heraeus (GT 2) und Christ (Alpha 2-4) wurden auf ihre Prozeßgeschwindigkeit hin verglichen.

Die Zeitmessungen begannen bei Einschalten der Vakuumpumpe.

Die gravimetrisch ermittelten Daten wurden denen mit Karl-Fischer-Titration erhaltenen gegenübergestellt. Zum besseren Vergleich wurde der prozentuale Wasserverlust der Proben berechnet und als Vergleichsgrundlage verwendet.

Die Mittelwerte und relative Standardabweichungen der Prozentwerte werden graphisch dargestellt.

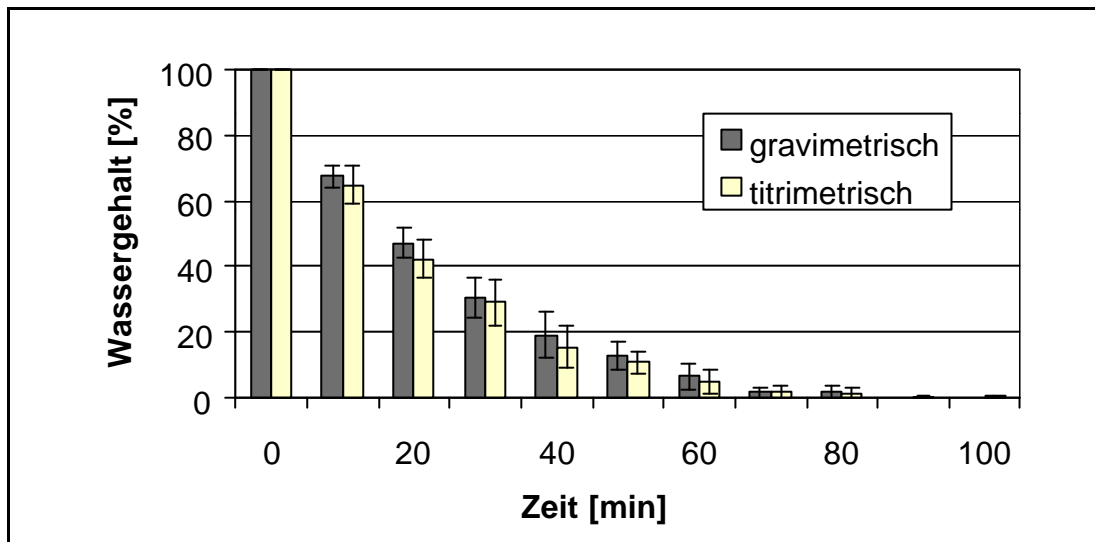


Abb.7.52: Trocknungsprozeß von Lyophilisaten im Gefriertrockner Leybold Heraeus (n=5)

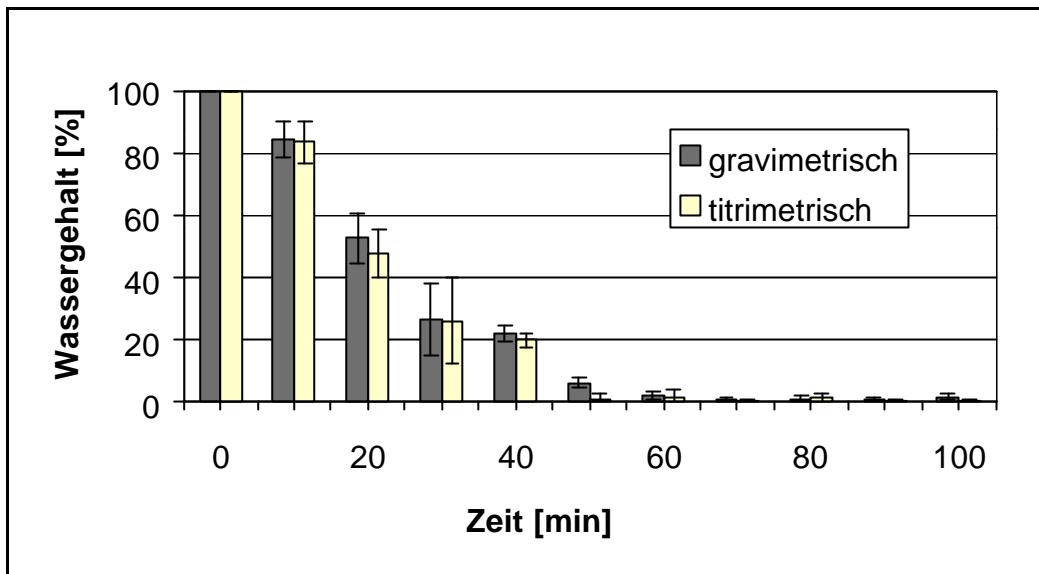


Abb.7.53: Trocknungsprozeß von Lyophilisaten im Gefriertrockner Christ Alpha 2-4 (n=3)

Diese Trocknungsvorgänge lassen sich mit Hilfe einer Exponentialfunktion beschreiben:

$$y = a \times e^{-bx}$$

Daraus ergibt sich für den Gefriertrockner der Firma Leybold-Heraeus

- gravimetrisch: $y = 107 \times e^{-0,044x}$
- titrimetrisch: $y = 105 \times e^{-0,046x}$

Die Trocknungsgeschwindigkeit für Lyophilisate in dem Gefriertrockner der Firma Christ läßt sich mit folgenden Gleichungen charakterisieren:

- gravimetrisch: $y = 148 \times e^{-0,054x}$
- titrimetrisch: $y = 152 \times e^{-0,059x}$

Ein Vergleich zeigt, daß der Trocknungsprozeß in dem Gerät der Firma Christ schneller abläuft. Ein statistisch signifikanter Unterschied (t-Test) ergibt sich allerdings nur nach einer Trocknungszeit von 10 Minuten zugunsten des Gefriertrockners von Leybold Heraeus. Nach etwa einer halben Stunde Betriebszeit verläuft die Exponentialfunktion für die Trocknungsgeschwindigkeit in dem Gefriertrockner von der Firma Christ unterhalb der für den der Firma Leybold Heraeus. Diese Unterschiede sind jedoch nicht signifikant.

Im Laufe des Trocknungsprozesses näherte sich der Kurvenverlauf asymptotisch der Nulllinie an. Je trockener das Produkt wurde, desto langsamer erfolgte der Vorgang.

Nach 20 Minuten war bereits über 50 % des enthaltenen Wassers sublimiert, für die restlichen 50 % wurde jedoch das Vierfache dieser Zeit benötigt.

Die Werte innerhalb einer Versuchsreihe schwankten teilweise erheblich. Die Gefriertrocknung verlief innerhalb desselben Prozesses sehr unterschiedlich.

Die Eigenschaften der beiden Gefriertrockner werden noch einmal gegenübergestellt:

Gefriertrockner	Leybold-Heraeus GT 2	Christ Alpha 2-4
Kondensatortemperatur	- 45 °C	- 85 °C
Trocknungsdruck	nicht regelbar	1,650 mbar
Stellfläche	heizbar	heizbar
Stellflächentemperatur	+ 20 °C	+ 40 °C

Tab.7.54: Eigenschaften der Gefriertrockner

Ein Vergleich der gemessenen Werte des in den Proben enthaltenen Wassers zeigte, daß der Gefriertrockner der Firma Leybold-Heraeus in den ersten 20 Minuten des Prozesses effektiver ist als der Trockner der Firma Christ.

Die an den Trockner GT 2 angeschlossene Vakuumpumpe war leistungsstärker als die an der Anlage Alpha 2-4. Das gewünschte Vakuum wurde im ersten Fall bereits nach einer Zeitspanne von etwa drei Minuten erreicht, im zweiten Fall erst nach über fünfeinhalb Minuten.

Bei der Betrachtung des gesamten Trocknungsprozesses ist die Anlage von Christ schneller. Der Kondensator in diesem Gerät kann mit -85 °C wesentlich tiefere Temperaturen erreichen als der im Leybold-Heraeus eingebaute Kondensator mit maximal -45 °C. Dadurch entsteht im Trockner ein größeres Dampfdruckgefälle, welches die Trocknungsgeschwindigkeit beschleunigt. Weiterhin besitzt das erste Gerät ein genau regelbares Vakuumsystem, so daß der Prozeß unterhalb des Schmelzpunktes gefahren werden kann und die Produkttemperatur mit Hilfe des Vakuums (1,650 mbar) inclusive eines Sicherheitszuschlags auf -15 °C eingestellt werden kann. Der Gefriertrockner von Leybold Heraeus ist nur ungenau regelbar, besitzt beim Trocknen ein Vakuum von etwa 0,2 mbar, was einer Produkttemperatur von -36 °C

entsprechen würde. Dies bedeutet einen wesentlich niedrigeren Dampfdruck des Eises und zieht damit unweigerlich eine Prozeßverlängerung nach sich.

Die titrimetrisch bestimmten Werte lagen alle unterhalb den gravimetrischen Daten. Verantwortlich wird der Versuchsablauf dafür gemacht. Nach Versuchsabbruch wurden die Proben zuerst gewogen. Anschließend wurden sie nacheinander in das Versuchsgefäß überführt. In dieser experimentell bedingten Zeitverzögerung verdunstete ein Teil des Wasser bei Raumtemperatur. Dies führte bei der zweiten Analyse zu niedrigeren Werten.

Lyophilisate, die im Gefriertrockner Christ Alpha 2-4 hergestellt wurden, ergaben trotz längerer Trocknungszeiten weder gravimetrisch noch titrimetrisch Werte, die eine vollständige Trocknung bestätigten. Ursache sind die jahreszeitlich bedingten Temperatur- und vor allem Luftfeuchtigkeitsschwankungen, da keine konditionierten Räumlichkeiten zur Verfügung standen. Die Lyophilisate aus der Anlage von Leybold-Heraeus wurden bei 18 bis 22 °C Raumtemperatur und bei 30 bis 50 % Luftfeuchtigkeit untersucht, die Lyophilisate der zweiten Versuchsreihe (Christ-Anlage) bei 21 bis 25 °C und 60 bis 90 % Luftfeuchtigkeit.

Bei der Probenzugabe in die verwendete Karl-Fischer-Apparatur gelangte unweigerlich Luftfeuchtigkeit in das zuvor getrocknete System. Zusätzlich kondensierte die Luftfeuchtigkeit auf dem Trägerstreifen und die fertigen Lyophilisate waren hygroskopisch.

Obwohl die Lyophilisate sich optisch in einwandfreiem Zustand befanden, daß heißt, sie enthielten keine gefrorenen Wasserreste mehr, die nach dem Auftauen zu einer Zerstörung der Struktur geführt hätten, wurde mit den analytischen Methoden trotzdem Wasser detektiert (nach 90 Minuten Trocknungszeit: GT Leybold-Heraeus: titrimetrisch: 0,28 % (0,070 mg), gravimetrisch: 0 % (0,0 mg); GT Christ: titrimetrisch: 0,47 % (0,118 mg), gravimetrisch: 0,61 % (0,153 mg). Im Vergleich: ein Lyophilisat enthielt 0,5 % HPMC E4M (0,125 mg)).

Alle hergestellten Lyophilisate wurden zusätzlich einer visuellen Kontrolle unterzogen. Nach 80 Minuten Trocknungszeit in der Christ-Apparatur traten keine Schmelzeffekte mehr auf, was nach 70 Minuten Betriebszeit noch bei der Hälfte der Produktionscharge sichtbar war. Die Prozeßzeit im Gerät Christ Alpha 2-4 wird zwischen 70 und

80 Minuten liegen. Die Sekundärtrocknung ist bei dieser Betrachtung nicht berücksichtigt worden.

Im Vergleich dazu erreichten Lyophilisate aus der GT 2-Anlage erst nach 90 Minuten ein vergleichbares Ergebnis.

Ergebnis:

Durch das Verfolgen des Trocknungsvorganges konnte festgestellt werden, daß die ursprünglich angesetzte Trockenzeit von drei bis sechs Stunden [Grunthal, 1996] zu hoch ist und Prozeßzeiten von 80 bis 90 Minuten ausreichend sind. Allerdings erlauben beide Methoden keine zuverlässige Aussage über den Restwassergehalt der Lyophilisate. Insofern kann hier keine Aussage getroffen werden, inwieweit dieser Faktor durch die vorgegebenen Versuchsbedingungen beeinflusst wird.

Weder Differenzwägung noch eine empfindliche Karl-Fischer-Titration sind geeignet, um die Restfeuchte der Lyophilisate nach erfolgreichem Abschluß der Gefriertrocknung zu bestimmen, da keine ausreichende Genauigkeit bei diesen geringen Wassermengen gegeben ist.

Bei 25 mg einer 0,5 %igen Polymerlösung enthält das fertige Lyophilisat 0,250 mg HPMC. Lyophilisate besitzen in der Regel eine Restfeuchte zwischen 1 und maximal 5 %. Bezogen auf das Gesamtgewicht könnte somit zwischen 0,0025 und 0,0125 mg Wasser enthalten sein. Da bereits allein der Bürettenfehler bei $\pm 0,03$ ml liegt [Produktinformation Metrohm, bei der Titration entspricht 1 ml Lösung etwa 1 mg Wasser], könnten keine aussagekräftigen Ergebnisse erreicht werden.

Ein geeignetes Verfahren zur Bestimmung der Restfeuchte ist die Thermogravimetrie. Außerdem muß geklärt werden, welche Restfeuchte für die Lyophilisate ideal ist. Die spätere Verpackung der Lyophilisate muß so erfolgen, daß sich die gewünschte Restfeuchte durch Adsorption nicht verändert. Eine niedrige Luftfeuchtigkeit in den Herstellungsräumen bei der Überführung der Lyophilisate von dem Gefriertrockner in das Primärpackmittel ist für reproduzierbare Ergebnisse notwendig. Konditionierte Räumlichkeiten wären von Vorteil.

7.3.4. Mikrobiologische Untersuchungen

Zur Kontrolle der aseptischen Herstellungsweise wurden die Prozesse einer mikrobiologischen Prüfung unterzogen, um potentielle Kontaminationsquellen aufzudecken.

Unter den gewählten Bedingungen konnte jedoch in allen Fällen kein Wachstum von Mikroorganismen nachgewiesen werden. Lediglich auf der Kontrollplatte kam es zur Bildung von Kolonien.

Die Schritte zur Herstellung von Lyophilisaten zur Anwendung am Auge entsprechen den Anforderungen an eine aseptische Arbeitsweise. Das beschriebene Verfahren (s.a. Kap. 6.3.3.) ist geeignet, die Qualität der im Labormaßstab hergestellten Lyophilisate sicherzustellen.

7.4. Lyophilisate

7.4.1. Mikroskopische Charakterisierung der Lyophilisate

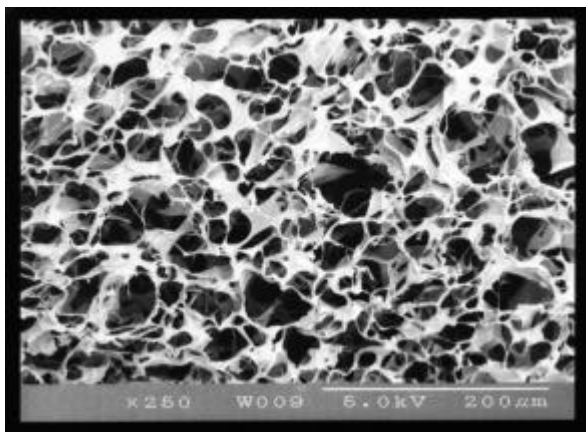
Die Porenstruktur eines Lyophilisats hängt ab von

- Art und Konzentration der Polymere
- Art und Konzentration der Arzneistoffe
- Einfrierbedingungen

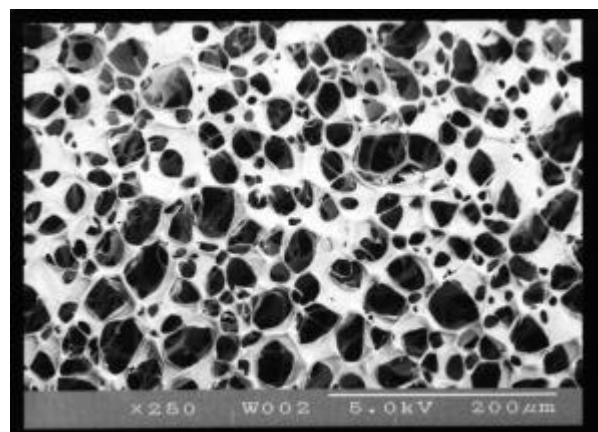
Die Prozentzahlen geben die jeweiligen Konzentrationen der eingesetzten Ausgangslösungen an. Die Gewichtsangaben beziehen sich auf die tatsächliche Zusammensetzung der Lyophilisate. Alle gezeigten Lyophilisate wurden bei $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Gefrierschrank eingefroren und anschließend getrocknet.

HPMC-Lyophilisate

Bestand das Lyophilisat lediglich aus dem Celluloseether, ergab sich ein homogenes Bild. Es stellte sich heraus, daß die Porosität der Oberfläche von der zugesetzten Polymerkonzentration abhängig war. Das Xerogel aus HPMC E4M 0,5 % (m/m, 0,125 mg HPMC) zeigte eine gröbere und offenerere Porenstruktur als das aus HPMC E4M 1,0 % (m/m, 0,250 mg).



*Abb.7.55: HPMC E4M-Lyophilisat, 0,5 % (m/m) in der Ausgangslösung, 0,125 mg HPMC pro Lyophilisat
Vergrößerung: 1:250*



*Abb.7.56: HPMC E4M-Lyophilisat, 1,0 % (m/m) in der Ausgangslösung, 0,250 mg HPMC pro Lyophilisat
Vergrößerung: 1:250*

Wurde jedoch der HPMC-Lösung Pilocarpinhydrochlorid hinzugesetzt, schrumpfte die zuvor halbrunde und homogene Form des Lyophilisats (s. Abb. 7.57.) ungleichmäßig zusammen (s. Abb. 7.58.).

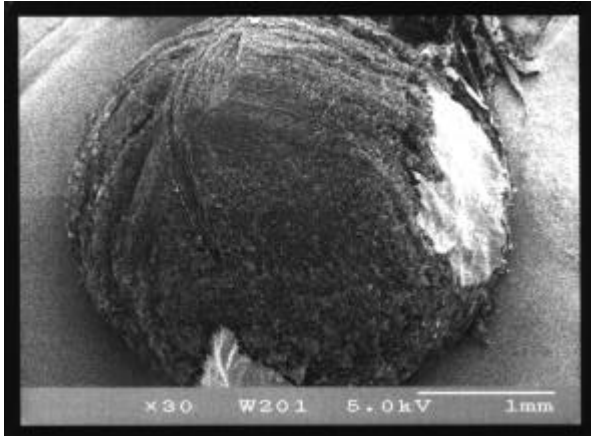


Abb.7.57: HPMC E4M-Lyophilisat 0,5 % (m/m) in der Ausgangslösung, 0,125 mg HPMC pro Lyophilisat
Vergrößerung: 1:30

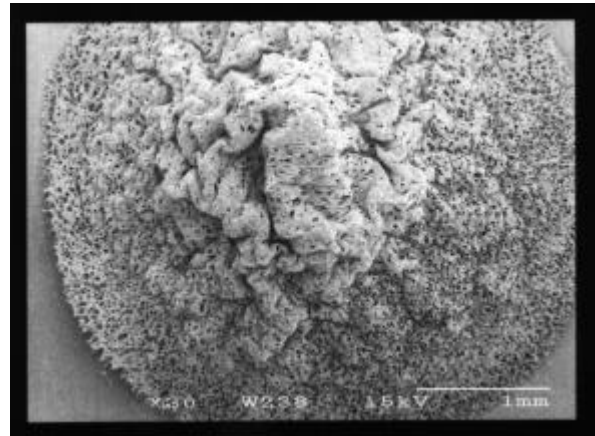


Abb.7.58: HPMC E4M-Lyophilisat 0,5 % (m/m), Pilocarpinhydrochlorid 1,6 % (m/m) in der Ausgangslösung (0,125 mg HPMC, 0,400 mg Pilocarpinhydrochlorid pro Lyophilisat)
Vergrößerung: 1:30

Die zugesetzte Menge Wirkstoff orientierte sich an einer Einzeldosis 1 %iger konventioneller Augentropfen, aufgrund der Annahme, daß ein Tropfen ein Volumen von etwa 40 µl hat. Das arzneistoffhaltige Lyophilisat enthielt somit 0,125 mg HPMC E4M und 0,400 mg Pilocarpinhydrochlorid.

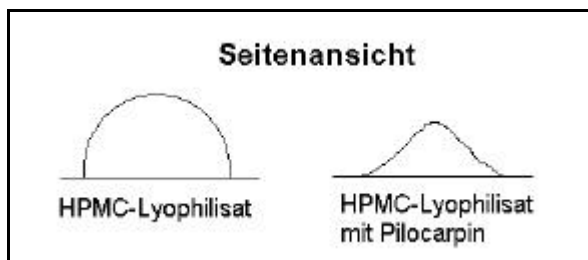
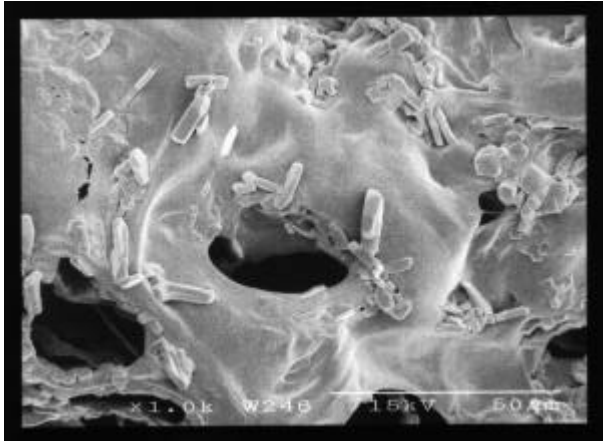


Abb.7.59:
Vergleich der Seitenansicht wirkstofffreier und pilocarpinhaltiger HPMC-E4M-Lyophilisate

Untersuchungen, ob Pilocarpin mit HPMC interagiert, wie es z.B. bei EHEC und Tensiden wie Natriumlaurylsulfat der Fall ist [Holmberg, 1992], was sich in einer Veränderung des Trübungspunktes bemerkbar machen könnte, blieben ergebnislos.

Bei genauerer Betrachtung dieser Pilocarpin-Lyophilisate konnten bei starker Vergrößerung an der Oberfläche viele Kristalle entdeckt werden. Dabei handelte es sich um den zugesetzten Wirkstoff Pilocarpinhydrochlorid.



*Abb.7.60: HPMC E4M-Lyophilisat 0,5 % (m/m), Pilocarpinhydrochlorid 1,6 % (m/m) in der Ausgangslösung (0,125 mg HPMC, 0,400 mg Pilocarpinhydrochlorid pro Lyophilisat)
Vergrößerung: 1:1000*



*Abb.7.61: HPMC E4M-Lyophilisat 0,5 % (m/m), Pilocarpinhydrochlorid 1,6 % (m/m) in der Ausgangslösung (0,125 mg HPMC, 0,400 mg Pilocarpinhydrochlorid pro Lyophilisat)
Vergrößerung 1:3500*

Diese Kristalle sind in ihrer Menge vermutlich jedoch so schwer, daß sie das sehr leichte HPMC-Gerüst zusammendrücken. Der Anteil des Cellulose-Derivats (0,125 mg) betrug nur $\frac{1}{4}$ der Gesamtmasse (0,525 mg) des Lyophilisats. Die halbkugelartige Form (s. Abb. 7.58., 7.59.) veränderte sich. Insofern lag die Schlußfolgerung nahe, daß es sich hier hauptsächlich um ein ungünstiges Mengenverhältnis der Bestandteile handeln könnte. Abhilfe könnte durch eine Erhöhung der eingesetzten Polymerkonzentrationen geschaffen werden.

Zu Beachten ist dabei allerdings die Viskositätszunahme bei Verwendung des gleichen Celluloseethers. Sinnvoller wäre der Einsatz eines anderen HPMC-Typs für Pilocarpin-Lyophilisate. Als Alternative wurde HPMC E50 eingesetzt. Verwendet wurde in diesem Fall eine 1%ige Lösung. Die Lyophilisate bestanden aus 0,250 mg HPMC E50 und 0,300 mg Pilocarpinhydrochlorid und behielten auch nach dem Trocknungsprozeß ihre Form bei.

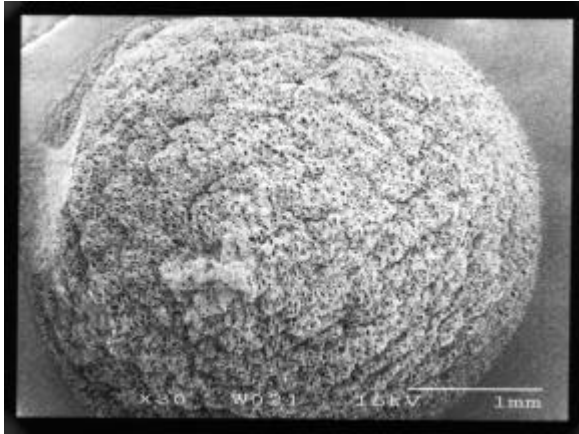


Abb.7.62:
HPMC E50-Lyophilisat 1,0 %
Pilocarpinhydrochlorid 1,2 %
(Studiencharge), eingefroren bei -30 °C
Vergrößerung: 1:40

Diese Lyophilisate wurden im zweiten Teil der ersten Probanden-Studie eingesetzt. Die Pilocarpin-Dosis wurde ebenfalls reduziert, da sich in einer Untersuchung herausgestellt hatte, daß die als Referenz eingesetzten Pilocarpinlösungen im Durchschnitt eine Tropfenmasse von nur 30 mg besaßen (s. Kap. 5).

Die Lyophilisate wurden vorsichtig von ihrem Träger abgelöst und die Unterseite betrachtet. Dabei bot sich ein homogenes Bild:

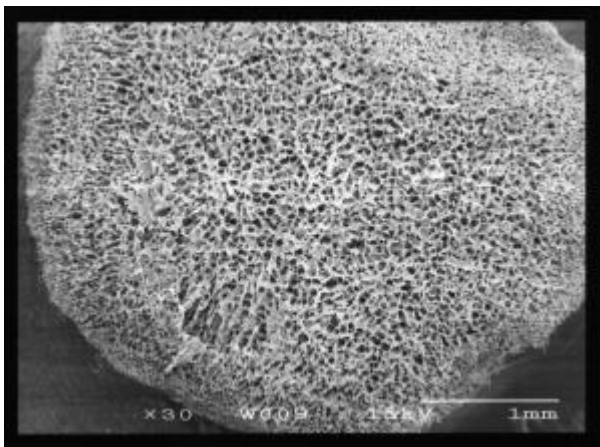


Abb.7.63: HPMC E50-Lyophilisat 1,0 %
(m/m) Pilocarpinhydrochlorid 1,2 % (m/m)
in der Ausgangslösung,
(0,250 mg HPMC,
0,300 mg Pilocarpinhydrochlorid pro
Lyophilisat), Unterseite
Vergrößerung: 1:30

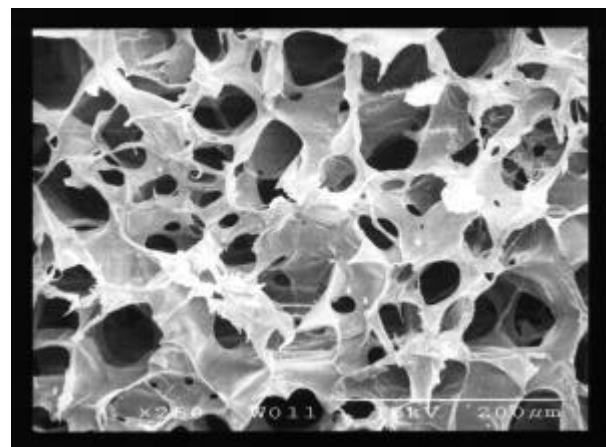
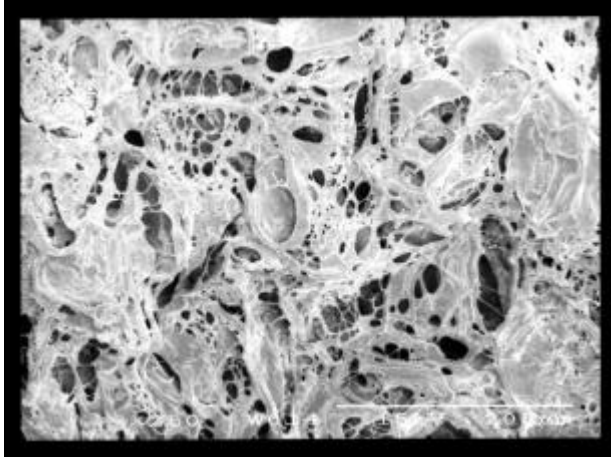
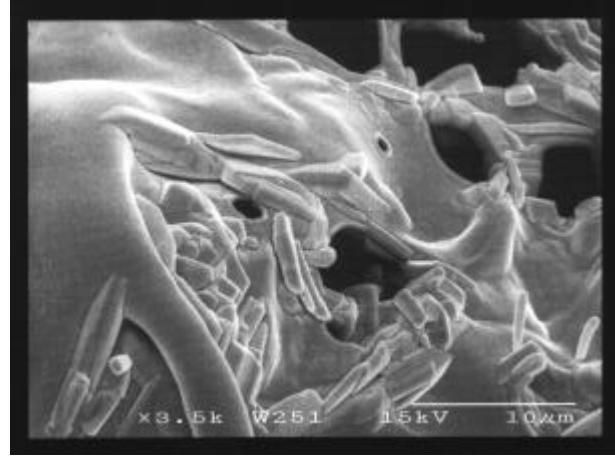


Abb.7.64: HPMC E50-Lyophilisat 1,0 %
(m/m), Pilocarpinhydrochlorid 1,2 % (m/m) in
der Ausgangslösung,
(0,250 mg HPMC,
0,300 mg Pilocarpinhydrochlorid pro
Lyophilisat), Unterseite
Vergrößerung: 1:250

Trotz intensiver Suche konnten an der Unterseite keine Kristalle gefunden werden. Wurde hingegen die Oberseite des gleichen Lyophilisats betrachtet, stellte sich ein völlig anderes Bild dar:



*Abb.7.65: HPMC E50-Lyophilisat 1,0 % (m/m), Pilocarpinhydrochlorid 1,2 % (m/m) in der Ausgangslösung, (0,250 mg HPMC, 0,300 mg Pilocarpinhydrochlorid pro Lyophilisat) Oberseite
Vergrößerung: 1:250*



*Abb.7.66: HPMC E50-Lyophilisat 1,0 % (m/m), Pilocarpinhydrochlorid 1,2 % (m/m) in der Ausgangslösung, (0,250 mg HPMC, 0,300 mg Pilocarpinhydrochlorid pro Lyophilisat), Oberseite
Vergrößerung: 1:3500*

Die Oberfläche der Oberseite sah inhomogener als die Unterseite der Lyophilisate aus. Zusätzlich fanden sich hier wieder viele Kristalle.

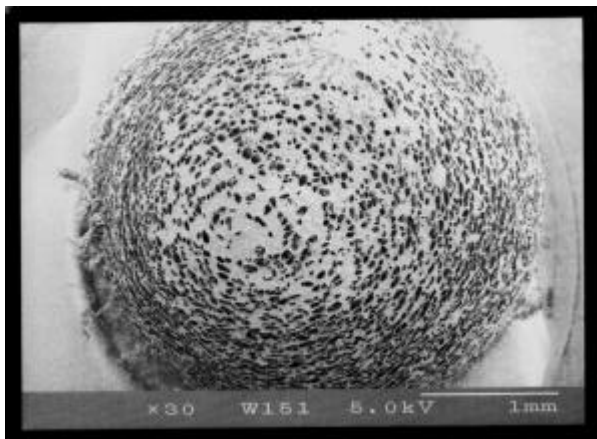
Das spricht dafür, daß die wäßrigen Tropfen bei dem verwendeten Herstellverfahren (Einfrieren bei -30 °C auf einer vorgekühlten Platte) von der Unterseite zur Oberseite eingefroren sind. Es kam zu einer Aufkonzentrierung des Wirkstoffes an der Oberseite des Lyophilisats, an der schließlich auch Pilocarpin auskristallisierte. Im Hinblick auf eine Applikation muß dies jedoch nicht hinderlich sein, sondern könnte eher Vorteile mit sich bringen, da selbst bei einer unvollständigen Ablösung des Lyophilisats von dem Träger der Großteil des incorporierten Arzneistoffes zur Anwendung kommen würde.

Die Beobachtung, daß das Volumen von HPMC-Xerogelen durch den Zusatz von Pilocarpinhydrochlorid und anderen Arzneistoffen erheblich reduziert werden kann, beschrieb auch Zatloukal [1990] (s.a. Kap. 2.6.8.2.2). Er lieferte allerdings keine Erklärung dafür. Für stabile Lyophilisate setzte er 4-6 %ige HPMC-Lösungen ein, machte aber keine Angaben über die Qualität der HPMC.

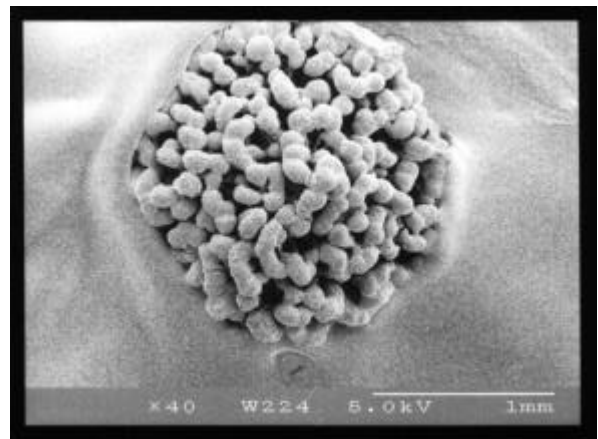
Bei Pilocarpinhydrochlorid handelt es sich um einen hygroskopischen Stoff. Bei der Kombination dieses Wirkstoffes mit einem Lyophilisat erhält man somit ein sehr feuchtigkeitsempfindliches und damit vorsichtig zu händelndes Präparat.

Natriumhyaluronat-Lyophilisate

Ohne weitere Zusätze ergab sich bei Natriumhyaluronat-Lyophilisaten wie zuvor bei HPMC unter dem Mikroskop optisch ebenfalls ein homogenes Bild. Der Zusatz von 1,6 % Pilocarpinhydrochlorid zu einer 0,5 %igen bzw. 1,0 %igen Lösung führte auch hier zu erheblichen Veränderungen, die noch gravierender als bei HPMC war.

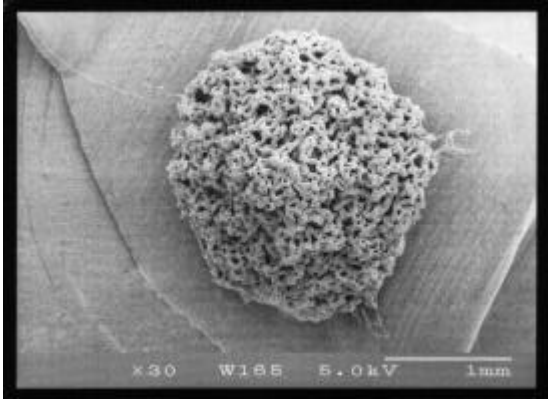


*Abb.7.67: Natriumhyaluronat 0,5 % (m/m) in der Ausgangslösung (0,125 mg pro Lyophilisat)
Vergrößerung: 1:30*



*Abb.7.68: Natriumhyaluronat 0,5 % (m/m), Pilocarpinhydrochlorid 1,6 % (m/m) in der Ausgangslösung (0,125 mg Natriumhyaluronat, 0,400 mg Pilocarpinhydrochlorid pro Lyophilisat)
Vergrößerung 1:40*

Die Lyophilisate bestanden aus 0,125 mg (0,5 %) bzw. 0,250 mg (1,0 %) Polymer und einem Zusatz von 0,400 mg Pilocarpinhydrochlorid.



*Abb.7.69: Natriumhyaluronat 1,0 % (m/m),
Pilocarpinhydrochlorid 1,6 % (m/m) in der
Ausgangslösung,
(0,125 mg Natriumhyaluronat, 0,400 mg
Pilocarpinhydrochlorid pro Lyophilisat)
Vergrößerung 1:30*

Eine 0,5 %ige Natriumhyaluronat-Lösung ließ sich nur unter Schwierigkeiten sterilfiltrieren. Aus diesem Grund kann die Polymerkonzentration nicht weiter erhöht werden, wenn die Lyophilisate aseptisch hergestellt werden sollen. Als Konsequenz müßte ein weiterer Stoff oder Polymer zur Stabilisierung zugesetzt werden, um ein wirkstoffhaltiges Lyophilisat auf Natriumhyaluronat-Basis zu realisieren.

Es ist an dieser Stelle nicht möglich, eine Aussage über die Abhängigkeit der Porengröße von der Einfriertemperatur zu machen. Innerhalb gleicher Herstellungschargen wurden unterschiedliche Strukturen gefunden, die je nach Betrachtungsweise verschiedene Porengrößen ergaben.

7.4.2. Abstreifverhalten der Lyophilisate

Die Abhängigkeit der Haftfähigkeit der Lyophilisate auf ihren Trägern von verschiedenen Variablen wurde in mehreren Versuchsreihen untersucht (s.a. Kap. 6.5.2.). Dabei wurde der Träger durch einen Schlitz gezogen und die Kraft gemessen, die erforderlich war, das Lyophilisat von seinem Träger abzulösen.

7.4.2.1. Einfluß der Lagerzeit und Zusatz von Pilocarpinhydrochlorid und Tropicamid

HPMC E50- (0,250 mg HPMC E50) und Pilocarpin-Lyophilisate (0,250 mg HPMC E50, 0,400 mg Pilocarpinhydrochlorid) wurden direkt nach der Herstellung (Einfriertemperatur: $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$) und nach einer Lagerzeit von 4 Wochen vermessen. Die graphische Auswertung ergibt folgendes Bild:

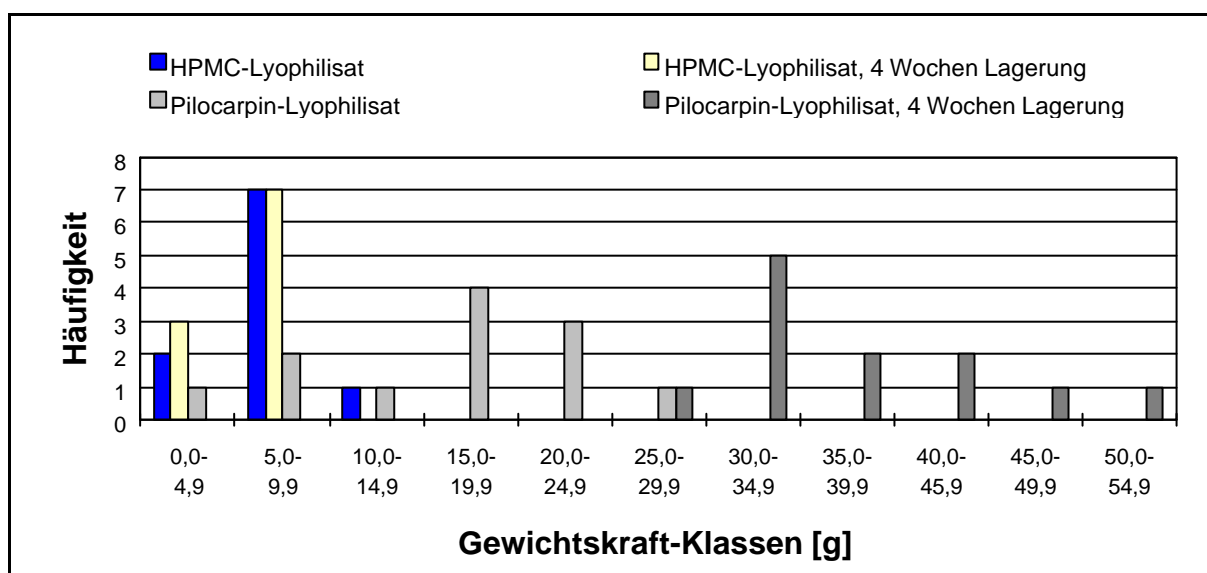


Abb.7.70: Einfluß von Pilocarpin und der Lagerzeit auf die Haftkräfte (HPMC-Lyophilisate: $n=10$; Pilocarpin-Lyophilisate: $n=12$)

Es zeigte sich, daß die Haftfestigkeit von HPMC-Lyophilisaten nach der Herstellung gering war und sich auch nach der Lagerzeit nicht wesentlich veränderte. Der Pilocarpin-Zusatz führte allerdings schon im Vergleich zu dem reinen HPMC-Lyophilisat dazu, daß die Haftung auf dem PTFE-Träger fester wurde (der Maximalwert verschob sich zu höheren Werten), und nach 4 Wochen konnten die Pilocarpin-Lyophilisate nur noch mit Schwierigkeiten abgelöst werden. In einigen Fällen wurde das Lyophilisat bei dem Versuch es abzustreifen, zusammengequetscht und löste sich in diesen Fällen bei hohem Kraftaufwand nur noch als flaches Plättchen von dem Träger. Wurde das PTFE-

Band bei der Herstellung der Träger nicht in der Längsrichtung, sondern quer verwendet, überstiegen die eingesetzten Kräfte die Stabilität des PTFE-Bandes: es zog sich entsprechend der Gewichtskraft in die Länge.

Die Haftfestigkeit der Tropicamid-Lyophilisate direkt nach der Herstellung war mit der der HPMC-Lyophilisate vergleichbar. Allerdings bestehen große Abweichungen zu den Pilocarpin-Lyophilisaten (s.a. Abb. 7.76).

7.4.2.2. Einfluß der Einfriertemperatur

Unterschiedliche Einfriertemperaturen ziehen unterschiedliche Produkteigenschaften nach sich. Bereits Grunthal [1996] gab an, daß subjektiv die Haftung von Lyophilisaten auf dem Träger bei sinkender Einfriertemperatur zunehmen würde. Die Lyophilisate wurden einerseits im Gefrierschrank bei -30 °C , andererseits im flüssigem Stickstoff bei -196 °C eingefroren und nach der Trocknung verglichen.

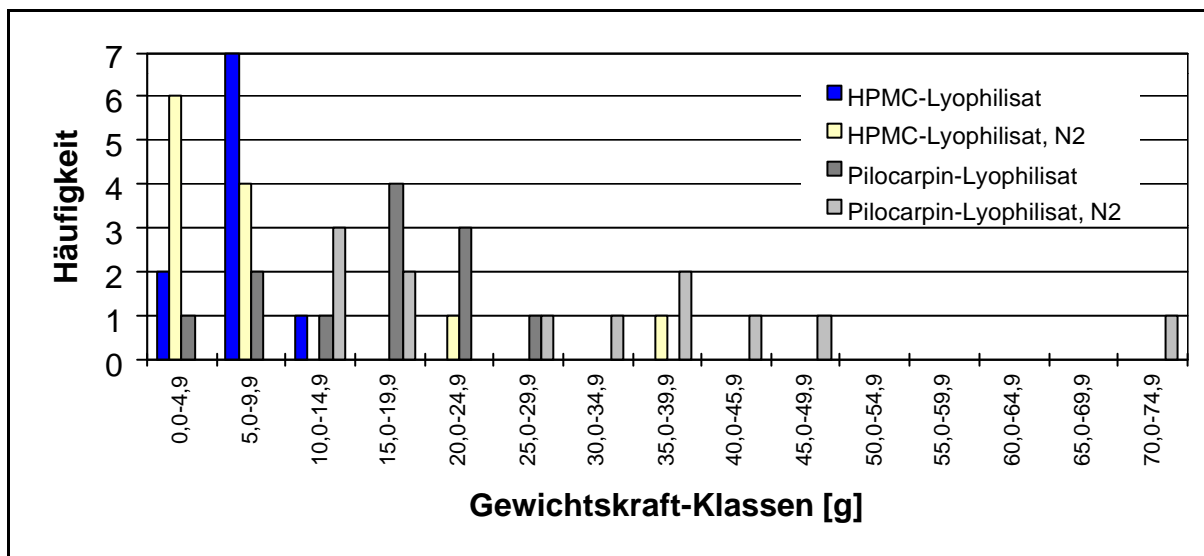


Abb.7.71: Einfluß der Einfriertemperatur auf die Haftkräfte (HPMC-Lyophilisate (-30 °C): $n=10$; HPMC-Lyophilisate (-196 °C), Pilocarpin-Lyophilisate: $n=12$); nach der Herstellung

Bei den HPMC-Lyophilisaten spielte die Einfriertemperatur keine herausragende Rolle, die erhaltenen Werte lagen eng beieinander.

Bei Pilocarpin-Lyophilisaten nahm die zum Abstreifen erforderliche Kraft zu. Beim Einfrieren bei -30 °C lagen die erfaßten Kräfte zwischen 0 und 30 g, wobei die Verteilung einer Gaußschen Kurve um einen Mittelwert von 15-20 g ähnelt.

Wurden die Pilocarpin-Polymerlösungen allerdings bei -196 °C eingefroren, waren zwischen 10 und 75 g erforderlich, um das Lyophilisat abzulösen. Der Bereich, über den die Werte streuten, war verhältnismäßig breit. Die Lyophilisate hafteten unterschiedlich fest auf den Trägern, weil das Einfrieren unregelmäßig verlief.

7.4.2.3. Einfluß des Autoklavierens der PTFE-Folie

Die Oberfläche des PTFE-Dichtungsbandes änderte sich beim Autoklavieren. Inwieweit dies einen Einfluß auf die Haftfestigkeit haben könnte, sollte geklärt werden.

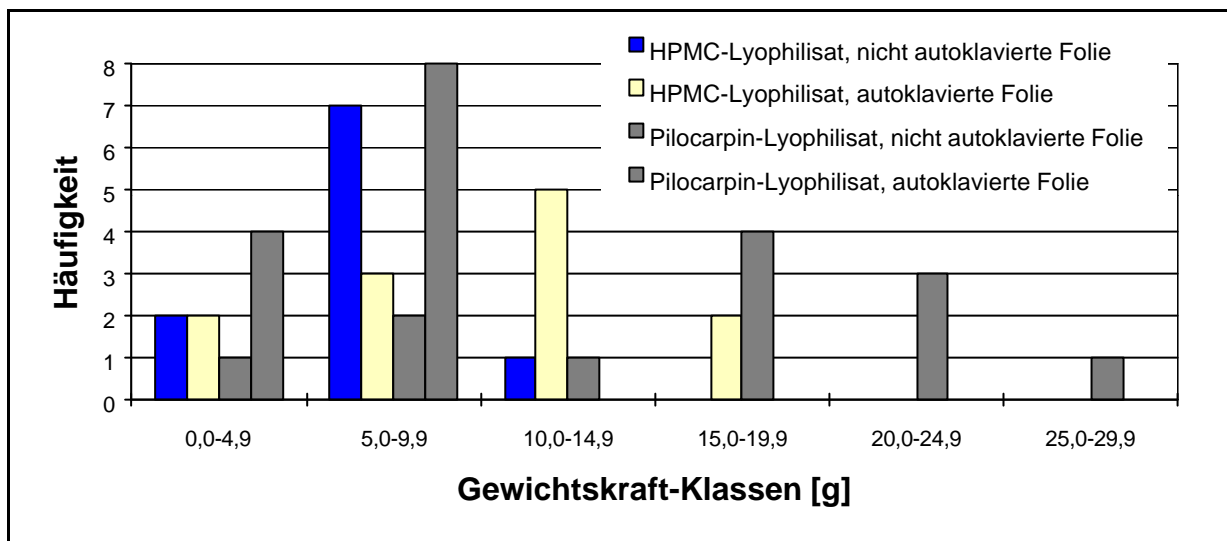


Abb.7.72: Einfluß des Autoklavierens der PTFE-Folie auf die Haftkräfte (HPMC-Lyophilisat (nicht autoklavierte Folie): $n=10$, HPMC-Lyophilisat (autoklavierte Folie), Pilocarpin-Lyophilisate: $n=12$)

Die Gegenüberstellung zeigt, daß unmittelbar nach der Herstellung die Haftung zwischen HPMC-Lyophilisat und Folie zunahm, wenn diese zuvor autoklaviert wurde. Überraschenderweise war dies im Vergleich dazu bei dem Pilocarpin-Lyophilisat nicht der Fall. Hier schien sich die Dampfsterilisation auf die Hafteigenschaften sogar in dem Sinne positiv auszuwirken, da die Kräfte durch diese Behandlung reduziert werden konnten.

Als die Versuche nach 4 Wochen Lagerzeit wiederholt wurden, ergab sich jedoch ein anderes Bild (s. Abb.7.73). Wie bereits zuvor (s. Kap.7.4.2.1.) wirkte sich die Lagerung auf die Haftfähigkeit insofern aus, daß auch zum Ablösen der wirkstoffhaltigen Lyophilisate von der autoklavierten PTFE-Folie wesentlich mehr Kraft aufgewendet werden mußte, als es zum Zeitpunkt direkt nach der Herstellung der Fall war (Pilocarpin-

Lyophilisate nach der Herstellung: 0 bis 10 g, nach
4-wöchiger Lagerung: 25 bis 40 g).

Bei einem reinen HPMC-Lyophilisat wurde der Halt nicht wesentlich beeinflusst, die gemessenen Werte wurden sogar etwas niedriger. Allerdings wurden bei der autoklavierten Folie nicht mehr so hohe Werte erzielt, wie bei einer unbehandelten PTFE-Folie (HPMC-Lyophilisate auf nicht autoklavierter Folie, nach 4-wöchiger Lagerung: 0 bis 15 g, HPMC-Lyophilisate auf autoklavierter Folie, nach 4wöchiger Lagerung: 0 bis 10 g).

Die erreichten Werte der Pilocarpin-Lyophilisate sind jedoch alle zu hoch und würden eine erfolgreiche Applikation unmöglich machen.

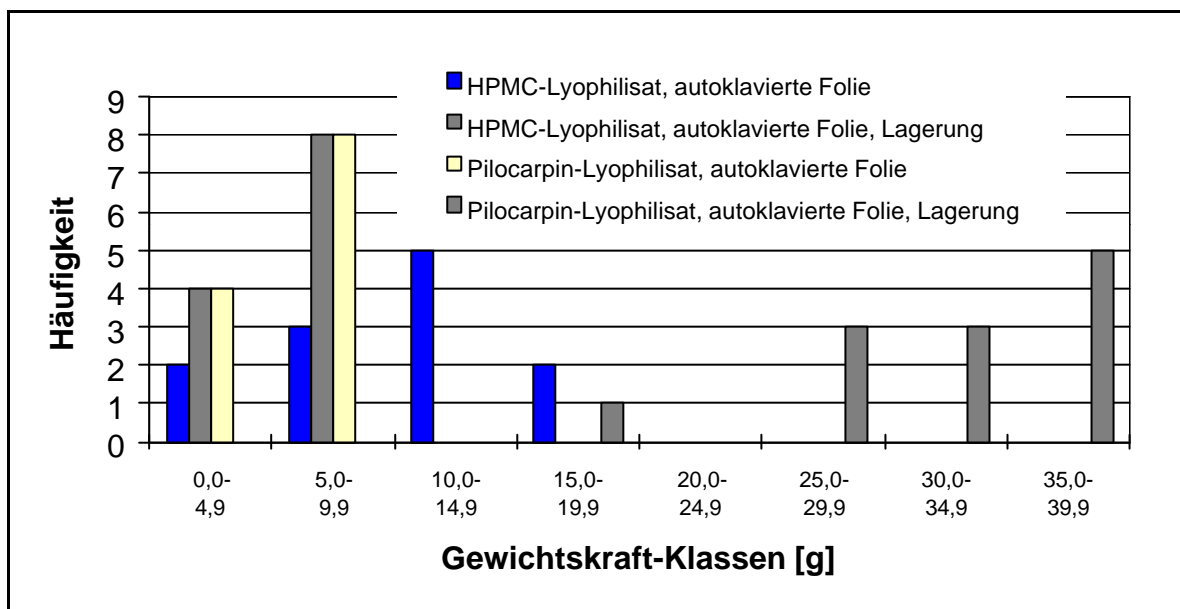


Abb.7.73: Einfluß des Autoklavierens der PTFE-Folie und vierwöchiger Lagerung auf die Haftkräfte (Lyophilisate: n=12)

7.4.2.4. Einfluß der Oberflächenstruktur der Folie

Bestimmte Oberflächen, wie sie auch in der Natur bei Lotus-Blättern vorkommen, sind in der Lage, Flüssigkeiten ohne Rückstände abperlen zu lassen (Lotus-Effekt). Durch ihre besondere Struktur (Profilierung) sind diese Oberflächen außerordentlich hydrophob.

Wie in Kapitel 6.3.5. erwähnt, können solche Oberflächen ebenfalls künstlich erzeugt werden. Partikel können mit Leichtigkeit von ihnen abgelöst werden können.

Die PTFE-Folie wurde mit Hilfe von zwei verschiedenen Matrizen nach beschriebener Methode geprägt. Verglichen wurden jeweils die Ober- und Unterseiten der behandelten Folien. In allen Versuchen wurden bei -30 °C eingefrorene reine HPMC-Lyophilisate eingesetzt.

Matrize 1:

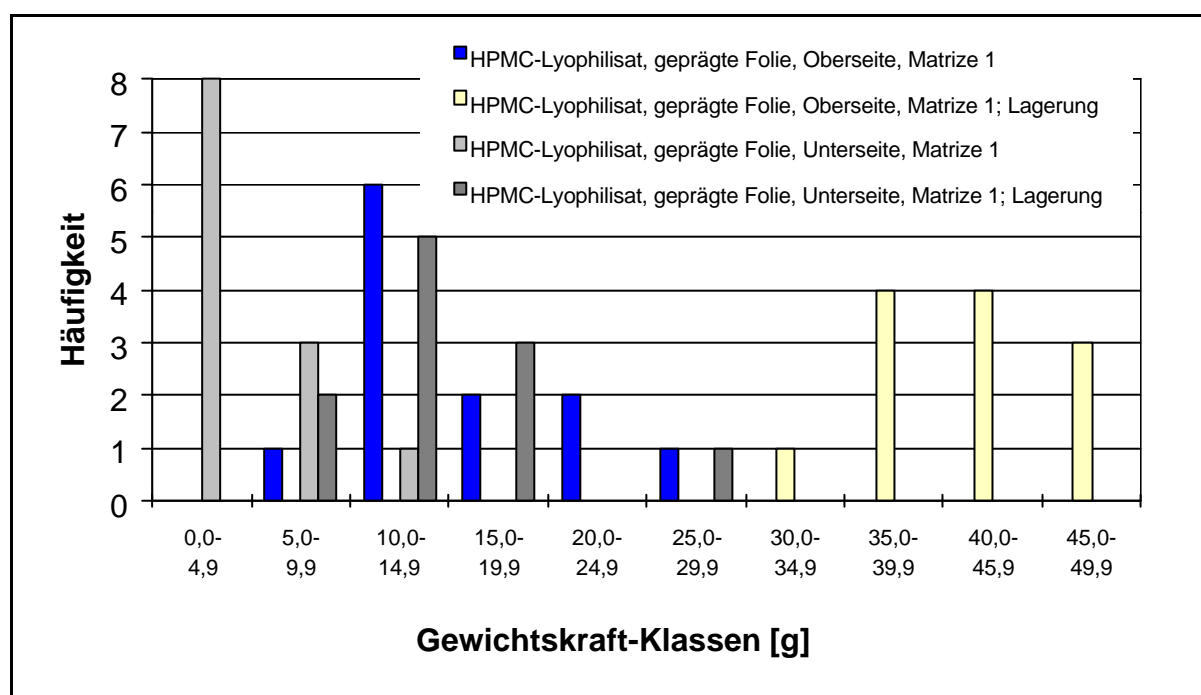


Abb.7.74: Einfluß der Oberflächenbeschaffenheit und vierwöchige Lagerung auf die Haftkräfte (Lyophilisate: n=12, Lyophilisat, Unterseite, gelagert: n=11)

Es stellte sich heraus, daß durch die Prägung der Folien mit Matrize 1 eine Verstärkung der Haftfestigkeit erreicht wurde. Ein Vergleich der Resultate zu den unter 7.4.2.1. erhaltenen Werten zeigt, daß die Prägung die Ablösung der HPMC-Lyophilisate nicht verbesserte, sondern sogar zu einer schlechteren Ablösung führte.

HPMC-Lyophilisate auf einer unbehandelten Folie (s. Abb. 7.70.) waren anfangs und auch nach vierwöchiger Lagerzeit mit Leichtigkeit abzulösen (<15 g). Für Lyophilisate,

die sich auf der Oberseite des geprägten Träger befanden, mußten direkt nach der Herstellung bereits bis zu 30 g aufgewendet werden. Nach der vierwöchigen Lagerung erhöhte sich der Wert auf 50 g.

Bei der Unterseite war dieser Effekt nicht so ausgeprägt. Obwohl nach der Herstellung der HPMC-Lyophilisate die Ablösung von dieser Seite sogar etwas leichter als bei den HPMC-Lyophilisaten auf unbehandelter Folie gelang, führte auch hier die Lagerung zu einem erhöhten Kraftaufwand (bis zu 30 g).

Matrize 2:

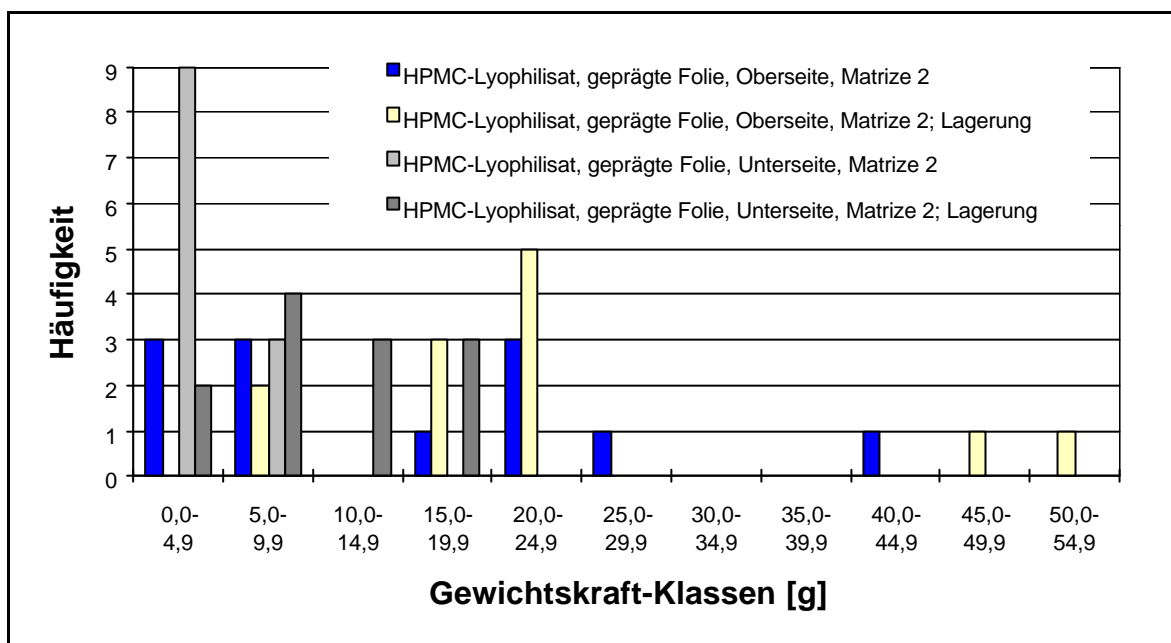


Abb.7.75: Einfluß der Oberflächenbeschaffenheit und Lagerung auf die Haftkräfte (Lyophilisate: n=12)

Ein vergleichbares Bild ergab sich auch bei der zweiten Matrize. Hier waren die Unterschiede jedoch nicht so ausgeprägt. Lyophilisate von der Oberseite der mit Matrize 2 geprägten PTFE-Folie abzulösen, erforderte nach der Herstellung bereits bis zu 45 g, nach der Lagerung sogar bis zu 55 g, wobei die alle Werte über einen sehr breiten Bereich streuen. Die Haftfestigkeit ist sehr unregelmäßig.

Die Verwendung der Unterseiten lieferte anfänglich recht gute Werte. Alle befanden sich unterhalb 10 g. Durch die Lagerung verschoben sich die Werte bis auf 20 g, was aber immer noch akzeptabel für eine Anwendung am Auge wäre.

Da die Unterseite der mit Matrize 2 geprägten Folien die besten Werte lieferte, wurde die Haftung tropicamid- und pilocarpinhydrochloridhaltiger Lyophilisate direkt nach der Herstellung ebenfalls untersucht. Im Vergleich dazu wurden gleiche Lyophilisate auf unbehandelten Folien diesen Ergebnissen gegenübergestellt.

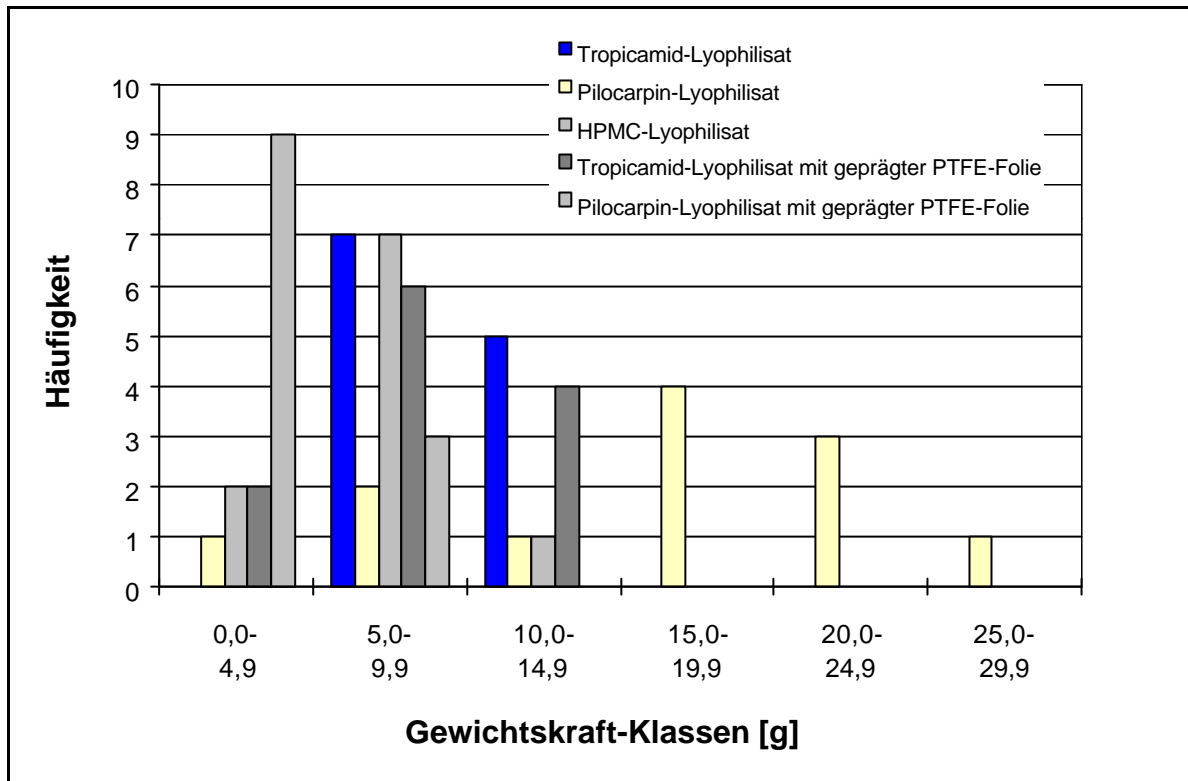


Abb.7.76: Übersicht der Einflüsse von Tropicamid und Pilocarpin auf die Haftkräfte von HPMC-Lyophilisaten (Lyophilisate: n=12)

Die Haftfestigkeit der Tropicamid-Lyophilisate wurde durch Prägung kaum beeinflusst. Bei den Pilocarpin-Lyophilisaten konnte die Haftfestigkeit von 30 g auf einen Maximalwert von 10 g reduziert werden. Ob dieser Effekt allerdings ebenfalls nach der Lagerung erhalten bleibt, müsste noch untersucht werden.

7.4.2.5. Beurteilung der Methode

Mit Hilfe dieses Abstreifverfahrens erhält man gute Anhaltspunkte über die Haftfähigkeit der Lyophilisate auf ihren Trägern. Es wird offensichtlich, daß es vielfältige Faktoren geben kann (z.B. Rezepturzusammensetzung, Folienqualität und deren Oberfläche, Einfrierbedingungen, Lagerzeiten), die die Haftung beeinflussen können, wobei die Auswirkungen aber nicht in jedem Fall zum Tragen kommt.

HPMC-Lyophilisate (0,250 mg) ließen sich von ihren Trägern leicht lösen, wobei die zur Abtrennung benötigte Kräfte nur wenig durch Folienoberfläche, Einfriertemperatur oder Lagerung beinflusst wurden. So konnte Grunthal [1996] bei ihrer Probandenstudie zur Verträglichkeit wirkstofffreier HPMC-Lyophilisate auch keine Probleme feststellen.

Durch eine Prägung der PTFE-Folie konnte allerdings auch bei den wirkstofffreien HPMC-Lyophilisaten die Haftung erheblich erhöht werden.

In allen untersuchten Fällen tropicamidhaltiger (0,150 mg) bzw. pilocarpinhydrochloridhaltiger (0,300 mg) Lyophilisate wurde die im Vergleich zu den wirkstofffreien Lyophilisaten bereits höhere Haftfestigkeit zusätzlich durch die vierwöchige Lagerung, das Einfrieren bei tieferen Temperaturen, eine Autoklavierung oder Prägung des PTFE-Trägers gesteigert. Nur bei der Verwendung der Unterseite eines Trägers, der mit der Matrize 2 behandelt wurde, war eine leichtere Ablösung nach der Herstellung zu verzeichnen.

Warum der Zusatz der Arzneistoffe die Lyophilisateigenschaften bezüglich der Haftung so veränderte, konnte hier nicht geklärt werden.

Bei Zusatz von Fluorescein-Natrium (0,068 mg) tauchten diese Probleme nicht auf.

Im Hinblick auf diese Werte läßt sich auch die schlechte Ablösung der Pilocarpin-Lyophilisate bei der Probandenstudie im Nachhinein erklären (s.a. Kap. 8.5.1.).

Allerdings gab es hierbei auch keine Hinweise auf Schwierigkeiten bei der Anwendung von tropicamidhaltigen Lyophilisaten dieser Zusammensetzung, wie sie schließlich bei dem ersten Teil der Probandenstudie in Erscheinung traten (s.a. Kap. 8.5.2.).

Insofern kann dieses System als erste Testinstanz für wirkstoffhaltige, ophthalmische Lyophilisate verwendet werden, sollte jedoch nicht ausschließlich als Kriterium dienen.

Lyophilisate, für deren Ablösung über 20 g erforderlich sind, lassen sich nicht mehr ohne Probleme am Auge abstreifen. Ebenso können Lyophilisate mit Werten unter 2 g nur mit Schwierigkeiten transportiert werden, da geringe äußere Einwirkungen bereits zu einer Abtrennung von dem Träger führen können. Beide Erscheinungen sind unerwünscht.

Verbesserungsfähig ist das manuelle Absenken des Tisches. Die Absenkgeschwindigkeit hatte ebenfalls einen gewissen Einfluß auf die Meßwerte. Der

Vorgang war personenabhängig. Durch eine Automatisierung des Prozesses ließe sich die Versuchsstreuung verringern.

Hydrophobe Oberflächen mit Lotus-Effekt werden mittlerweile in Form von Fassadenanstrichen auf dem Markt angeboten. Diese haben selbstreinigende Eigenschaften. Verunreinigungen können durch den Regen abgespült werden.

Dieses Prinzip konnte hier nicht umgesetzt werden. Ursache für diese Ergebnisse könnten die erheblichen Abweichungen der Prägeformen von den bestellten Abmessungen sein. Die gelieferten Reliefe wichen zu sehr von denen von Barthlott [1998] geforderten Werten ab, um effektiv zu sein (s.a. Kap. 6.3.5.). Da jedoch die Werte, die bei der Ablösung von Pilocarpin-Lyophilisaten von der Unterseite der mit Matrize 2 geprägten PTFE-Folie direkt nach der Herstellung erhaltenen wurden, in einem niedrigeren Bereich liegen, als die mit unbehandelte Folie, könnten Folien mit dem erforderlichen Rillenprofil tatsächlich zu dem erhofften Erfolg führen. Dies müsste allerdings noch untersucht werden.

7.4.3. Haft- und Rehydratationsvermögen wirkstoffhaltiger Lyophilisate und deren Verträglichkeit am Auge

7.4.3.1. Stabilität, Haft- und Rehydratationsvermögen

Viskosität und Tropfverhalten der Polymerlösungen

Die von den Herstellern angegebenen Viskositäten für entsprechend konzentrierte Lösungen und ihr Tropfverhalten bei der Lyophilisatherstellung wurden in folgender Tabelle zusammengestellt. Die Konzentrationen wurden so gewählt, daß die Viskosität der entstehenden Lösungen eine Sterilfiltration zuläßt.

Nr.	Polymer	Typ	Konz. [%]	Nennviskosität [mPa*s]*	Bemerkung zum Tropfverhalten
1	HPMC	E15	2,0	15	+
2	HPMC	E15	3,0	32	+
3	HPMC	E15	5,0	150	+
4	HPMC	E50	2,0	50	aufgrund niedriger Viskosität ist Tropfen sehr formempfindlich
5	HPMC	E50	3,0	150	+
6	HPMC	E4M	1,0	200	+
7	HPMC	E4M	1,5	1000	zieht beim Tropfen Fäden, Genauigkeit problematisch
8	HEMC	MH20	2,0	20	+, trübe Lösung
9	HEMC	MH20	3,0	45	+, trübe Lösung
10	HEMC	MH4000	1,0	200	+, trübe Lösung
11	HEC	H300	1,0	30	+
12	HEC	H300	2,0	300	+
13	HEC	H4000	1,0	200	+
14	Na-hyaluronat		0,5	k.A.	+, trübe Lösung, >800-1000 mPa*s
15	Na-hyaluronat + Mannitol		0,5 1,0	k.A.	+, trübe Lösung, >800-1000 mPa*s
16	PVP	25	10,0	3,5	+
17	PVP	90	2,0	4	+
18	PVP	90	5,0	35	+
19	PVP	90	7,0	100	+

Tab.7.77: Eigenschaften der Polymerlösungen

k.A.: keine Angabe vorhanden

* Herstellerangaben

+ keine Beanstandung

Nach der Entkeimungsfiltration waren alle Lösungen klar.

Stabilität der Lyophilisate

Das Polymergerüst der Lyophilisate sollte so beschaffen sein, daß es sich leicht verformen läßt, um auf diese Weise eine angenehme Applikation am Auge zu ermöglichen. Eine grobe Möglichkeit bietet ein sensorischer Test mit den Fingern.

Nr.	Polymer	Typ	Konz. [%]	Oberfläche	Stabilität
1	HPMC	E15	2,0	glänzend	stabil, aber weich, läßt sich zusammendrücken, angenehm
2	HPMC	E15	3,0	glänzend	hart, läßt sich noch zusammendrücken, ergibt hartes Komprimat
3	HPMC	E15	5,0	glänzend	styropor-artig, hart, läßt sich noch zusammendrücken,
4	HPMC	E50	2,0	glänzend, 'Nase' (mittig)	weich, etwas stabiler als (1) und (2), läßt sich zusammendrücken,
5	HPMC	E50	3,0	glänzend	sehr stabil, härter als (3), läßt sich jedoch noch gut zusammendrücken
6	HPMC	E4M	1,0	glänzend, 'Nase' (mittig)	weich, flauschig
7	HPMC	E4M	1,5	glänzend, 'Nase' (mittig)	weich, flauschig, läßt sich zusammendrücken, kaum spürbar
8	HEMC	MH20	2,0	glänzend	weich, stabil, kann leicht zusammengedrückt werden
9	HEMC	MH20	3,0	glänzend	styropor-artig, hart, sehr stabil, läßt sich zusammendrücken,
10	HEMC	MH4000	1,0	glänzend	weich und flauschig, läßt sich leicht zusammendrücken
11	HEC	H300	1,0	etwas glänzend	weich, flauschig, leicht zusammendrückbar
12	HEC	H300	2,0	etwas glänzend	weich, flauschig, ausreichend stabil
13	HEC	H4000	1,0	glänzend	sehr weich, flauschig, verformt beim Ablösen vom Träger
14	Na-hyaluronat		0,5	matt	besonders leicht, weich, flauschig, kann leicht komprimiert werden, kaum Restbestandteile
15	Na-hyaluronat + Mannitol		0,5 1,0	matt	weich, aber stabil genug, läßt sich zusammendrücken
16	PVP	25	10,0	matt	styropor-artig, hart, fest
17	PVP	90	2,0	matt	stabil, läßt sich zusammendrücken
18	PVP	90	5,0	matt	hart,
19	PVP	90	7,0	matt, Tropfen zieht sich beim Herstellprozeß leicht zusammen, Folge: PTFE-Folie schlägt Falten	styropor-artig, hart, läßt sich komprimieren

Tab.7.78: Eigenschaften der Lyophilisate

Bei allen Lyophilisaten blieb die runde Tropfenform auch nach dem Trocknen erhalten. Alle Lyophilisate ließen sich zwischen den Fingern komprimieren. Einige Xerogele waren sehr stabil und hart, was erwarten ließ, daß eine Applikation am Auge mit Schwierigkeiten verbunden sein würde.

Haftfestigkeit auf dem Träger und Rehydratationsgeschwindigkeit

Die Rehydratationsgeschwindigkeit wird einen Einfluß auf die spätere Verträglichkeit der Lyophilisate am Auge und deren Verweildauer haben. Alle Lyophilisate lösten sich vollständig ohne Rückstände von ihrem PTFE-Träger ab. Optisch waren keine Rückstände zu erkennen.

Nr.	Polymer	Typ	Konz. [%]	Haftfestigkeit*	Rehydratation [s]
1	HPMC	E15	2,0	fest	20
2	HPMC	E15	3,0	fest	120
3	HPMC	E15	5,0	fest	150
4	HPMC	E50	2,0	gut	150
5	HPMC	E50	3,0	fest	182
6	HPMC	E4M	1,0	gut	220
7	HPMC	E4M	1,5	gut	631
8	HEMC	MH20	2,0	gut	79
9	HEMC	MH20	3,0	sehr fest	180
10	HEMC	MH4000	1,0	leicht	400
11	HEC	H300	1,0	leicht	81
12	HEC	H300	2,0	leicht	126
13	HEC	H4000	1,0	leicht	103
14	Na-hyaluronat		0,5	kaum	2
15	Na-hyaluronat + Mannitol		0,5 1,0	kaum	1
16	PVP	25	10,0	fest	17
17	PVP	90	2,0	gut	33
18	PVP	90	5,0	fest	55
19	PVP	90	7,0	fest	180

Tab.7.79: *Eigenschaften der Lyophilisate*

** Die Reihenfolge der Haftfestigkeit wurde willkürlich nach folgender Reihenfolge festgelegt: kaum < leicht < gut < fest < sehr fest*

Mit steigender Polymerkonzentration stieg die benötigte Rehydratationszeit auf der Wasseroberfläche an, wobei bei gleicher Konzentration höher viskose Lösungen mehr Zeit in Anspruch nahmen. Erstaunlich war der sehr kurze Wert für das Natriumhyaluronat-Polymer, der durch einen Zusatz von Mannitol noch weiter erniedrigt werden konnte.

7.4.3.2. Verträglichkeit am Auge

Die aseptisch hergestellten Lyophilisate wurden in einem Selbstversuch am Auge appliziert und bewertet. Die Beobachtungen zu den einzelnen Versuchen können im Anhang A nachgeschlagen werden. In keinem Fall traten am Auge Reiz-erscheinungen auf.

Nr.	Polymer	Typ	Konz. [%]	Applikation	Fremdkörpergefühl	Verweilzeit [min]	Sichtbehinderung	Bemerkung
1	HPMC	E15	2,0	++	gering	15		
2	HPMC	E15	3,0	+	Schmerzen	30		
3	HPMC	E15	5,0	+	Schmerzen	50		
4	HPMC	E50	2,0	+	leicht	15		
5	HPMC	E50	3,0	+	Schmerzen	mind. 22	zeitweise	Lyophilisat verrutschte
6	HPMC	E4M	1,0	++	leicht	mind. 70	zeitweise	Lyophilisat verrutschte
7	HPMC	E4M	1,5	++	leicht	120	zeitweise	
8	HEMC	MH20	2,0	-	Stechen	mind. 30	zeitweise	Lyophilisat verrutschte
9	HEMC	MH20	3,0	nicht möglich	-	-	-	-
10	HEMC	MH4000	1,0	++	gering	mind. 60	zeitweise	Lyophilisat verrutschte
11	HEC	H300	1,0	++	gering	15		
12	HEC	H300	2,0	++	gering	15		
13	HEC	H4000	1,0	++	gering	12		
14	Na-hyalur.		0,5	++	gering	10		
15	Na-hyalur. + Mannitol		0,5 1,0	++	kein	17		
16	PVP	25	10,0	nicht möglich	kein	-		
17	PVP	90	2,0	++	gering	10		
18	PVP	90	5,0	+	Stechen	17		
19	PVP	90	7,0	-	gering	20		

Tab.7.80: Verträglichkeit am Auge

++ Applikation gut möglich, angenehm

+ Applikation möglich

- Applikation schwierig

In zwei Fällen war eine Applikation nur nach wiederholten Versuchen (HEMC MH20 2 %, PVP 90 7 %) und in zwei weiteren Fällen (HEMC MH20 3 %, PVP 25 10 %) überhaupt nicht möglich. Die Lyophilisatform war in diesen Fällen so stabil, daß sie sich beim Einlegen in den Bindehautsack nicht verformte und nur langsam rehydratisierte, so daß sie wiederholt aus der elastischen Lidfalte heraussprang.

Zudem zeigte sich, daß mit ansteigender Polymerkonzentration das Fremdkörpergefühl zu Beginn der Applikation zunahm. Weiterhin konnten in Abhängigkeit von Polymertyp und Konzentration unterschiedlich lange Verweilzeiten des Geldepots am Auge notiert werden. Die Möglichkeit einer Wirkstoffsteuerung durch Wahl eines entsprechenden Polymers könnte dadurch durchaus gegeben werden.

Es wurde außerdem beachtet, daß ein Geldepot nicht immer an dem ursprünglichen Applikationsort (Bindehautsack) verblieb, sondern durch reibende Handbewegungen (veranlaßt durch ein Jucken oder Stechen) auf dem Augapfel wandern konnte. Dies führte einerseits zeitweise zu einer Sehbeeinträchtigung, andererseits wurde das Depot unbeabsichtigt gänzlich aus dem Auge entfernt.

Faßt man die Ergebnisse zusammen, kann man folgende Polymer-Typen in diesen Konzentrationen benennen, die von den 19 untersuchten Lyophilisaten die besten Voraussetzungen zeigten. Allerdings ist nur eines aufgelistet, welches eine Verweilzeit von über 60 Minuten besaß. Bei den übrigen Gelen war nur eine Verweilzeit bis zu einer Viertelstunde makroskopisch nachweisbar.

- HPMC E15 2 %
- HPMC E4M 1 %
- HEC H300 2 %
- PVP 90 2 %
- Natriumhyaluronat 0,5 % mit Mannitol 1 %
- HEMC MH 4000 1 %

Untersuchungen, wie sich diese in Kombination mit einem Arzneistoff verhalten, müßten sich anschließen.

7.4.4. Entwicklung eines Modells für die Simulation der Applikation von Lyophilisaten am Auge

Durch einfache Hilfsmittel sollte ein weiteres Testsystem zur Beurteilung der quantitativen Ablösung der Lyophilisate von ihrem Träger geschaffen werden, wobei ein Auge mit Tränenfilm durch eine angefeuchtete Gelatine-Halbkugel simuliert werden sollte (s.a. Kap. 6.5.4.).

Durch ein vorangegangenes Quellen der Gelatine-Halbkugel soll ein gleichmäßiger Flüssigkeitsfilm auf der Oberfläche entstehen.

Berechnung der Halbkugel-Oberfläche

Die Berechnung der Wassermengen, die in einer Zeit von 30 Sekunden an der Gelatine-Halbkugel verbleiben, ergaben für 20 Halbkugeln einen Mittelwert von 130 mg Wasser pro Kugel, welches teilweise haften blieb bzw. als Quellwasser diente. 130 mg Wasser auf einer Oberfläche von 8,75 cm² (Gl. 7.5), d.h. 14,9 mg/cm², entspricht etwa 15 mg/cm² bzw. 15 µl/cm². Die erhaltenen Werte sind mit der Augenoberfläche und dem Volumen der Tränenflüssigkeit annähernd vergleichbar.

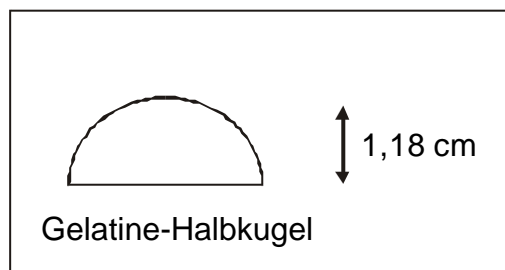


Abb.7.81:
Abmessung Gelatine-Halbkugel

Berechnung der Oberfläche:

$$O = \frac{1}{2} \cdot 4\pi r^2 = 2\pi (1,18)^2 = 8,75 \text{ cm}^2 \quad \text{Gl. 7.5}$$

Der Versuch zeigte, daß unter den gegebenen Bedingungen ein gleichmäßiger Oberflächenfilm von etwa 15 µl/cm² erhalten werden kann.

7.4.4.1. Quantitative Ablösung von Pilocarpinhydrochlorid von unbehandelten PTFE-Trägern

Die Pilocarpin-Lyophilisate wurden hergestellt und auf ihr Anwendungsverhalten getestet. Dazu wurden sie an den angefeuchteten Gelatine-Halbkugeln abgestreift und die Restmengen des Arzneistoffes auf den Trägerfolien bestimmt.

Bestimmung des durchschnittlichen Gehalts an Pilocarpinhydrochlorid in einem Lyophilisat

Die Pilocarpin-Konzentration in 16 Lyophilisaten wurde photometrisch bestimmt. Der Sollgehalt der Pilocarpin-Lyophilisate betrug 0,300 mg/Lyophilisat. Praktisch wurde ein Gehalt von 0,298 mg ermittelt. Bei der Vermessung der 16 Proben ergab sich eine Standardabweichung von $s = 0,036$ mg und eine relative Standardabweichung von $s_{rel} = 11,922$ %.

Ergebnisse des Tests

Die Lyophilisate wurden einmal über die Gelatine-Halbkugel abgestreift (s.a. Kap. 6.5.4.). Die photometrischen Messungen der Rückstände ergaben folgende Ergebnisse:

Nummer	Wasseraufnahme der Gelatine [mg]	Wirkstoff-Rückstand auf dem Träger [mg]
1	0,14	0,233
2	0,18	0,049
3	0,21	0,128
4	0,22	0,097
5	0,19	0,249
6	0,21	0,019
7	0,16	0,296
8	0,20	0,293
9	0,22	0,313
10	0,23	0,318
11	0,22	0,207
12	0,22	0,298
13	0,18	0,355
14	0,25	0,327

(Fortsetzung nächste Seite)

Nummer	Wasseraufnahme der Gelatine [mg]	Wirkstoff-Rückstand auf dem Träger [mg]
15	0,23	0,311
16	0,24	0,301
17	0,12	0,245
18	0,17	0,304
19	0,15	0,270
20	0,15	0,135
Mittelwert	0,19	0,237
<i>s</i>	0,036	0,098
<i>s_{rel}</i> [%]	18,384	41,624

Tab.7.82: Restgehalt Pilocarpinhydrochlorid auf benutztem, unbehandeltem PTFE-Träger

Die Ablösung der Lyophilisate war sehr unvollständig. In 10 Fällen wurde die vollständig eingesetzte Wirkstoffmenge wiedergefunden, so daß daraus geschlossen werden kann, daß von diesen Applikatoren nichts abgelöst worden ist. In vielen Fällen verschmierte lediglich das Lyophilisat auf dem PTFE-Träger bei dem Versuch, das Xerogel auf der Gelatine-Halbkugel abzustreifen.

Im Durchschnitt blieben 0,237 mg (entsprechen 79,5 % des Gehaltes) Pilocarpinhydrochlorid nach einem einmaligen Abstreifen auf dem PTFE-Träger zurück und wurden wiedergefunden.

Dieses Ergebnis stimmt mit den Resultaten überein, die in der Pilocarpin-In-vivo-Studie erhalten worden sind (s. Kap. 8.5.1.). Die Ablösung war ebenfalls häufig unvollständig und das Lyophilisat verschmierte am Auge des Probanden. Dort wurden Durchschnittswerte von Pilocarpinhydrochlorid auf dem benutzten Träger von 0,253 mg (81,2 %) bzw. 0,273 mg (85,3 %) gefunden.

Die Vermutung, daß das Ablöseverhalten eventuell von der Menge des Flüssigkeitsfilmes abhängig sein könnte, konnte nicht bestätigt werden.

Trägt man die von der Gelatine aufgenommene Menge Wasser in Abhängigkeit von der rechnerisch ermittelten abgelösten Arzneistoffmenge auf, erhält man folgendes Diagramm. Zwischen diesen beiden Faktoren ist kein Zusammenhang erkennbar.

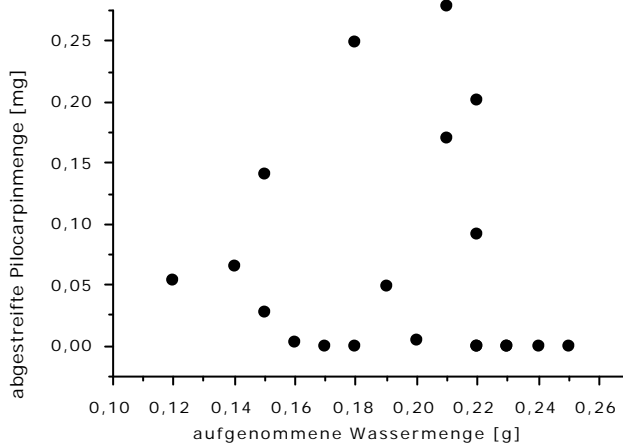


Abb. 7.83:
Bezug abgestreifte
Pilocarpinmenge/von Gelatine
aufgenommene Wassermenge

7.4.4.2. Quantitative Ablösung von Pilocarpinhydrochlorid von geprägten PTFE-Trägern

Die Lyophilisate wurden auf geprägten PTFE-Folien (Unterseite, Matrize 2) hergestellt, die nach dem bereits beschriebenen Verfahren (s. Kap. 6.3.5.) präpariert wurden. Die Vorgehensweise war dem Versuch im vorangegangenen Kapitel analog.

Bestimmung des durchschnittlichen Gehalts an Pilocarpinhydrochlorid in einem Lyophilisat

Die Pilocarpin-Konzentration in 9 Lyophilisaten wurde als Vergleich photometrisch bestimmt. Der Sollgehalt der Pilocarpin-Lyophilisate betrug 0,300 mg/Lyophilisat. Praktisch wurde ein Gehalt von 0,310 mg ermittelt. Bei der Vermessung der 9 Proben ergab sich eine Standardabweichung von $s = 0,029$ mg und eine relative Standardabweichung von $s_{rel} = 9,203$ %.

Ergebnisse des Tests

Die Gehaltsbestimmung der abgestreiften 30 Medikamententrägern ergab folgendes Bild:

Nr.	Wirkstoff-Rückstand auf dem Träger [mg]	Nr.	Wirkstoff-Rückstand auf dem Träger [mg]
1	0,176	18	0,238
2	0,219	19	0,247
3	0,214	20	0,164
4	0,144	21	0,224
5	0,157	22	0,283
6	0,238	23	0,138
7	0,235	24	0,241
8	0,237	25	0,231
9	0,244	26	0,139
10	0,204	27	0,210
11	0,174	28	0,155
12	0,213	29	0,233
13	0,255	30	0,154
14	0,148		
15	0,014	MW	0,197
16	0,145	<i>s</i>	0,054
17	0,224	<i>s_{rel}</i> [%]	27,445

Tab.7.84: Restgehalt Pilocarpinhydrochlorid auf benutztem, geprägtem PTFE-Träger (MW: Mittelwert)

Die Ablösung der Lyophilisate war immer noch sehr unvollständig. Allerdings konnte im Vergleich zu der unbehandelten PTFE-Folie in allen Fällen ein etwas größerer Anteil des wirkstoffhaltigen Polymers abgestreift werden. Aber auch hier kam es zu dem bereits zuvor erwähnten Schmiereffekt.

Im Durchschnitt wurden 0,197 mg (63,5 %) Pilocarpinhydrochlorid auf dem benutzten Träger wiedergefunden. Die Effektivität des Applikationssystems konnte im Vergleich zur unbehandelten Folie (0,237 mg im Mittel) durch diese Methode um 16 % gesteigert werden.

Trotzdem ist dieser Wert immer noch nicht zufriedenstellend.

7.4.4.3. Quantitative Ablösung von Fluorescein-Natrium von unbehandelten PTFE-Trägern

Die Vorgehensweise war analog den vorangegangenen Versuchen.

Bestimmung des durchschnittlichen Gehalts an Fluorescein-Natrium in einem Lyophilisat

Die Fluorescein-Konzentration in 14 Lyophilisaten wurde als Vergleich photometrisch bestimmt. Der Sollgehalt der Fluorescein-Lyophilisate betrug 0,068 mg/Lyophilisat. Praktisch wurde ein Gehalt von 0,071 mg ermittelt. Bei der Vermessung der 14 Proben ergab sich eine Standardabweichung von $s = 0,004$ mg und eine relative Standardabweichung von $s_{rel} = 4,898$ %.

Ergebnisse des Tests

Die Untersuchung wurde mit 23 Medikamententrägern durchgeführt. In allen Fällen lag die Absorption des Rückstandes unterhalb der Nachweisgrenze, so daß die ermittelten Konzentrationen 0,00 mg Fluorescein-Natrium ergaben. Dies bedeutet, daß in allen Beispielen das Lyophilisat vollständig abgelöst werden konnte und keine Rückstände auf dem Medikamententräger gefunden werden konnten.

Auch diese Feststellung bestätigt die bei der Pilotstudie mit Fluorescein-Natrium-Lyophilisaten erhaltenen Ergebnisse (s.a. Kap.8.5.3), bei denen in keinem Fall Rückstände auf den verwendeten Trägern gefunden werden konnten.

7.4.4.4. Beurteilung der Methode

Dieser Versuchsaufbau ist eine weitere Möglichkeit, ein aussagekräftiges System für das Abstreifen von Lyophilisaten zu finden, bevor sie endgültig in einem in-vivo-Test auf ihre Eigenschaften untersucht werden.

Die Methode kann noch verbessert werden. So besitzen die verwendeten Toffifee®-Formen zwar bereits leichte Vertiefungen, diese reichen als Abstreifkanten in Analogie zu einem Augenlid jedoch nicht aus. Ein Möglichkeit wäre der Einsatz von zusätzlichen Prägungen, Bindfäden oder künstlichen Wimpern.

Als problematisch stellte sich auch dar, den für eine angenehme und erfolgreiche Anwendung erforderlichen Druck seitens der applizierenden Person präzise und vergleichbar zu dosieren. Da die Feinmotorik von Menschen unterschiedlich ist und die Lyophilisate entsprechend unterschiedlich fest auf der Halbkugel abgestreift wurden, wäre es auch hier sinnvoll, den Abstreifvorgang zu automatisieren, und auf diese Weise reproduzierbarere Ergebnisse zu erhalten.

Offensichtlich ist die Problematik, die sich mit einem Arzneistoff ergeben kann. Während sich mit Fluorescein-Natrium als Arzneistoff in dieser Dosierung offensichtlich keine Probleme bei der Anwendung ergaben, waren sie bei Pilocarpinhydrochlorid recht erheblich. Worin dieser Unterschied liegt, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden.

Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch die Resultate, die in den in-vivo-Studien mit Pilocarpinhydrochlorid und Fluorescein-Natrium erhalten wurden. In der Pilotstudie wurden die fünf Fluorescein-Lyophilisate vollständig von ihrem Träger abgelöst und auf keinem der verwendeten PTFE-Träger konnten Rückstände des eingesetzten Wirkstoffes wiedergefunden werden (s.a. Kap. 8.5.3). Im Gegensatz dazu bereitete die Ablösung von Pilocarpin-Lyophilisaten sowohl in-vivo als auch bei diesem Test erhebliche Probleme. Die Lyophilisate verschmierten und über die Hälfte der eingesetzten Wirkstoffmenge verblieb nach der Anwendung des Applikators auf diesem zurück und wurde wiedergefunden (s.a. Kap. 8.5.1.).

8. Klinische Prüfung ophthalmischer Lyophilisate

8.1. Klinische Prüfung von Arzneimitteln

In der Pharmazeutischen Technologie sind Planung und Durchführung klinischer Studien eher selten. Deshalb wird hier zunächst ein Überblick über den regulatorischen Rahmen gegeben, in dem die folgenden Untersuchungen durchgeführt wurden.

8.1.1. Aufbau und Durchführung von klinischen Studien

Ein Arzneimittel durchläuft auf dem Weg bis zur Zulassung verschiedenen Phasen der klinischen Prüfung. In diesen Phasen wird klinisches Basiswissen über das Arzneimittel sowohl hinsichtlich seines therapeutischen Nutzens als auch seiner relativen Sicherheit ermittelt. Das zugehörige Studiendesign ist klar definiert:

Phase I

Prospektive klinische Studie mit einem neuen Wirkstoff an wenigen, meist gesunden Probanden. Ziel ist eine Verträglichkeits- und Wirksamkeitsprüfung im Menschen (Beschreibung des pharmakokinetischen bzw. pharmakodynamischen Profils).

Phase II

Prospektive klinische Studie mit meist geringer Patientenzahl, die die zu behandelnde Krankheit aufweisen. Ziel ist die Bestätigung und Untersuchung der pharmakologischen Wirkung, die Bewertung der kurzfristigen Sicherheit des Arzneimittels und die Dosisfindung. Meist handelt es sich bei dem Studiendesign um einen kontrollierten Placebo-Verum-Vergleich.

Phase III

Prospektive klinische Studie mit einer größeren Patientenzahl mit der interessierenden Indikation. Ziel ist die Validierung der Wirksamkeit und der Sicherheit des jeweiligen Arzneimittels über einen längeren Zeitraum. Das Studiendesign sollte bevorzugt 'doppeblind' sein.

Phase IV

Geplante und kontrollierte Langzeitversuche nach der erteilten Zulassung zur genauen Bestimmung der therapeutischen Wirkung, des therapeutischen Risikos eines Arzneimittels und Erfassung der bis dahin unbekanntem Nebenwirkungen.

Das Arzneimittelgesetz läßt grundsätzlich die klinische Prüfung eines Medikamentes nur dann zu, wenn *'die Risiken, die mit ihr für die Person verbunden sind, bei der sie*

durchgeführt werden soll, gemessen an der voraussichtlichen Bedeutung des Arzneimittels für die Heilkunde, ärztlich vertretbar sind', §40 Abs.1, Ziff.1 AMG. Daraus folgt, daß ein Arzt diese Studien stets an ethischen Maßstäben mit Rücksicht auf die Humanität zu überprüfen hat, wobei er die 'Deklaration von Helsinki' mit ihren Empfehlungen und Richtlinien zu Rate ziehen sollte.

Die Ärztekammern haben die Aufsicht über jene Ärzte und deren Berufspflichten, die bei klinischen Prüfungen tätig sind. Ethik-Kommissionen (z.B. der jeweiligen Landesärztekammern oder der Universitätskliniken) überprüfen die Versuchsprotokolle und überwachen die Studien.

Die Studie muß gemäß §67 AMG (Allgemeine Anzeigepflicht) der/n zuständigen Behörde/n gemeldet werden (Regierungspräsident des zuständigen Bundeslandes). Desweiteren darf die Studie erst nach dem positiven Votum der Ethik-Kommission beginnen, die Studieninhalte und Durchführung unter ethischen Gesichtspunkten prüft. Gemäß §40 des AMG (Abs.1, Ziff.8) muß für den Fall studienbedingter gesundheitlicher Schädigungen eine Versicherung zugunsten der betroffenen Personen bestehen.

Bei medizinischen Studien benötigt der Arzt die Einwilligung für seine Tätigkeit die schriftliche Einverständniserklärung des Patienten, die nur dann wirksam ist, wenn er weiß, in was er einwilligt. Die Patientenaufklärung muß durch einen Arzt erfolgen (§40 AMG, Abs.1, Ziff.2).

8.1.2. Inhalt eines Prüfplans

Ein Prüfplan muß aus klinischer Sicht alles enthalten, was das Arzneimittelgesetz dazu fordert und was in der 'Bekanntmachung von Grundsätzen für die ordnungsgemäße Durchführung der klinischen Studien von Arzneimitteln' (vom 09.12.1987) beschrieben ist. Daneben ist für Mediziner die 'Berufsordnung für die deutschen Ärzte' bindend, die seit 1976 aufgrund der Beschlüsse des Deutschen Ärztetages jeweils in unregelmäßigen Zeitabständen aktualisiert wird. Dazu zählt auch der Beschluß zur 'Überwachung der klinischen Prüfung' von Arzneimitteln des Ausschusses Arzneimittel-, Apotheken- und Gefahrstoffwesen der AGLMB (Arbeitsgemeinschaft der leitenden Medizinalbeamten der Bundesländer) [Feiden, 1.54, 2000] sowie die 'Deklaration von Helsinki' (The World Medical Association: Declaration of Helsinki) [Feiden 9.1, 2000]. Relativ neu hinzugekommen sind die 'Guten Praktiken' für klinische Studien in den Länder der europäischen

Gemeinschaft ('GCP: Good Clinical Practice for Trials on Medicinal Products in the European Community') [Feiden, 1992].

Diese Lektüren im Originalwortlaut sind für alle in der klinischen Forschung tätigen Mediziner und Biowissenschaftler unverzichtbar. Bei internationalen Zulassungsstudien sind natürlich die jeweiligen nationalen Vorschriften und Gesetze zu beachten.

Der Aufbau eines Prüfplans läßt sich grob standardisieren.

Einleitung des Prüfplans

In der Einleitung sollten Motivation bzw. Gründe inklusive Angabe der Medikation und Indikation für diese Studie ausgeführt werden. In einigen Fällen ist die Beschreibung der historischen Entwicklung und der aktuelle Stand der Therapie mit inhaltlicher Kurzwiedergabe der zitierten Literatur angezeigt, gegebenenfalls sollte eine Diskussion des Für und Wider erfolgen.

Zielsetzung der Studie

Hier erfolgt eine genaue Beschreibung der Hauptfragestellung, und, falls vorhanden, der untergeordneten Fragestellungen.

Studienablauf

- *Studienmedikation, Charakterisierung der Studie, Studienpopulation*

Im Studienablauf wird die Studienmedikation (verwendete Präparate und Dosierungen) geschildert und die Studie charakterisiert. Dazu gehören Studiendesign, die Fallzahlberechnung, die Randomisierung und die Studiendauer. Desweiteren wird die Studienpopulation beschrieben, die aus der Beachtung der Ein- und Ausschlußkriterien sowie des Drop-out-Handlings resultiert.

- *Variablenbeschreibung*

Zu den Variablen gehören die Patientenbasisdaten (Demographie etc.), die primären und gegebenenfalls sekundären Zielgrößen (Effektivitätsparameter, 'efficacy variables'), die in der Studie vorgesehenen Sicherheitsparameter ('safety variables', subjektive und objektive) und die sonstigen Parameter. Sogenannte 'harte', objektive klinische Parameter sind z.B. Laborwerte, zu den 'weichen', subjektiven gehört das Patienten- oder Arzturteil. Außerdem werden hier

Begleiterkrankungen und Begleitmedikationen aufgeführt, die Untersuchungstermine definiert und die Kontrolle der Compliance geschildert.

- *Unerwünschte Ereignisse, vorzeitige Beendigung der Studie*

Jedes unerwünschte Ereignis [Feiden, 8.2., 2000], auch jeder Verdachtsfall muß vom Prüfarzt dokumentiert und unter Einhaltung der diesbezüglichen aktuellen gesetzlichen Bestimmungen gemeldet werden. Schwerwiegende und nicht schwerwiegende Ereignisse sollten im Prüfprotokoll exakt definiert sein.

Methodik

Zur Methodik gehört die Beschreibung der klinischen und Laboruntersuchungen mit Bezug auf die jeweiligen Normalwerte. Möglicherweise ist hier auch noch einmal eine detailliertere Definition der Wirksamkeit angebracht, als dies bei der Variablenbeschreibung der Fall war. Die Methoden für die biometrische Auswertung sollten ausführlich beschrieben werden. Dazu gehört auch, durch wen und wie die Analysen durchgeführt werden sollen, sowie wer und wie die Daten erfaßt werden. Zum Umgang mit den Daten ('Daten-handling') kann auch eine genaue Beschreibung der Kodierung und/oder Anonymisierung gehören. Die Planung von Zwischenauswertungen kann von erheblicher Tragweite für die Fallzahlbestimmung sein (ob überhaupt, wenn ja: wie viele und wann).

- *Statistische Verfahren*

Angaben (mit verwendeter Literatur) über die statistische Auswertung der Fallzahlschätzung, Progressionsfreiheit / Überlebenszeit, Response und Lebensqualität, sonstige Variablen (explorativ und/oder deskriptiv) und Zwischenauswertung(en) sind erforderlich.

- *Umgang mit den Daten ('data handling procedures')*

Angaben über die Art der Datenerhebung, Aufbewahrung von Daten und Unterlagen (Patientenunterlagen, Originaldokumente, Erhebungsbögen, Präparatebestands-listen) sowie die Korrespondenz mit der Ethik-Kommission und den Herstellerfirmen der Prüfpräparate in Zusammenhang mit der Studie sind zu archivieren. Die Aufbewahrungszeit der Unterlagen beim Prüfer beträgt mindestens 15 Jahre.

8.1.3. Dokumentationsbogen

Der Prüf- bzw. Dokumentationsbogen ('CRF': 'Case Report Form') dient zur Erfassung der Daten aus klinischen Studien und ist Bestandteil des Prüfplans.

Es existieren amtliche Richtlinien für die Gestaltung dieser Dokumentationsbögen. In den FDA-Guidelines werden jedoch lediglich sehr allgemeine inhaltliche Vorgaben gemacht. Konkrete und damit bessere Anhaltspunkte hingegen liefern die GCP-Richtlinien der Europäischen Gemeinschaft. Aber auch diese Auflistung erhebt nicht den Anspruch auf Vollständigkeit und muß in Abhängigkeit vom Prüfpräparat ergänzt werden. Die 3. amtliche Quelle zur Gestaltung von Prüfbögen sind die im Bundesanzeiger Nr. 243 vom 30.12.1987, S. 16617-16618 vom Bundesminister für Jugend, Familie, Frauen und Gesundheit veröffentlichten 'Grundsätze für die Ordnungsgemäße Durchführung der klinischen Prüfung von Arzneimitteln' [1991].

Der CRF muß sicherstellen, daß die Minimalanforderungen der amtlichen Richtlinien erfüllt und alle im Prüfplan genannten Variablen dokumentiert sowie alle für eine vollständige Auswertung notwendige Informationen abgefragt werden.

Im Dokumentationsbogen muß mindestens enthalten sein:

- Dokumentation der Einwilligung nach Aufklärung
- Erfüllen der Einschlußkriterien und Nichtvorliegen der Ausschlußkriterien
- Identifikation des Patienten
- Demographische Daten
- Etwaige Schwangerschaft
- Wichtige prognostische Faktoren
- Verordnungsrelevante Diagnose
- Begleiterkrankungen
- Anwendung der Prüfmedikation
- Beginn und Ende des Beobachtungszeitraums
- Dokumentation der Therapie-Compliance
- Begleittherapien
- Relevante Vortherapien
- Wirksamkeitsparameter
- Verträglichkeitsparameter
- Unerwünschte Ereignisse

- Beendigung der Prüfung
- Raum für Kommentare
- Name und Adresse des Prüfarztes
- Hinweise zum Verfahren bei Korrekturen

Studienergebnisse müssen publiziert werden, auch wenn sie nicht den Erwartungen der Initiatoren / Sponsoren entsprechen. Diese 'Veröffentlichungspflicht' vermeidet eine einseitige Bewertung von Arzneimitteln unter Ausnutzung des alpha-Fehlers.

8.2. Physikochemische und pharmakologische Eigenschaften der verwendeten Arzneistoffe

8.2.1. Pilocarpinhydrochlorid

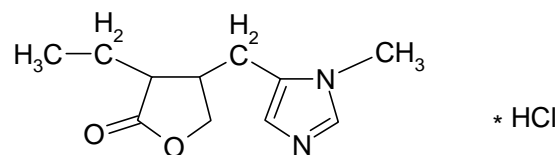
8.2.1.1. Allgemeine Grundlagen

Pilocarpin ist das Hauptalkaloid aus den Blättern von Pilocarpus-Sträuchern (*Pilocarpus jaborandi*, *Pilocarpus microphyllus*, Rutaceae), die vorwiegend im tropischen Amerika beheimatet sind. Das hauptsächliche Verbreitungsgebiet ist Brasilien.

Die besondere Wirkung der Inhaltsstoffe der Jaborandiblätter war den Einheimischen schon früh bekannt [Kronfeld, 1970]. Der Einsatz beschränkte sich früher jedoch lediglich auf die Verwendung als anregendes Genußmittel aufgrund der vermehrten Speichel- und Schweißabsonderung und als Gegengift [Wollensack, 1976]. 1648 gelangte die Droge nach Europa [Engelmayer, 1981].

Aber erst Adolf Weber aus Gießen machte 1877 die Öffentlichkeit auf die Verwendbarkeit des Pilocarpins in der Ophthalmologie aufmerksam, als er Pilocarpin in einer seiner Veröffentlichungen zur Glaukomtherapie empfahl. Seit 1930 gilt Pilocarpin ganz allgemein als Standardtherapeutikum bei Glaukom. Es werden 1 bis 4 %ige Lösungen bis zu 4x täglich zur Behandlung eingesetzt [Rote Liste, 2000].

Pilocarpinhydrochlorid



Eigenschaften	
Löslichkeit	Wasser in 0,3 Teilen Ethanol 95% in 3 Teilen
pH-Wert	4,8 (1 %ige Lösung), 4,2 (2 %ige Lösung)
Aufbewahrung	gut verschlossen unter Lichtschutz, hygroskopisch
Stabilität	Das Salz ist im Sauren relativ stabil, weist jedoch eine zunehmende Instabilität bei wachsendem pH-Wert auf, v.a. bei höheren Temperaturen (Abb.3.2.2)
Inkompatibilitäten	Alkalisch reagierende Stoffe (Zersetzung), Iod, Silbersalze (Fällung)
Sterilisationsempfehlung	Keimfiltration

Tab.8.2.1: Eigenschaften von Pilocarpinhydrochlorid [aus: Dolder, 1990]

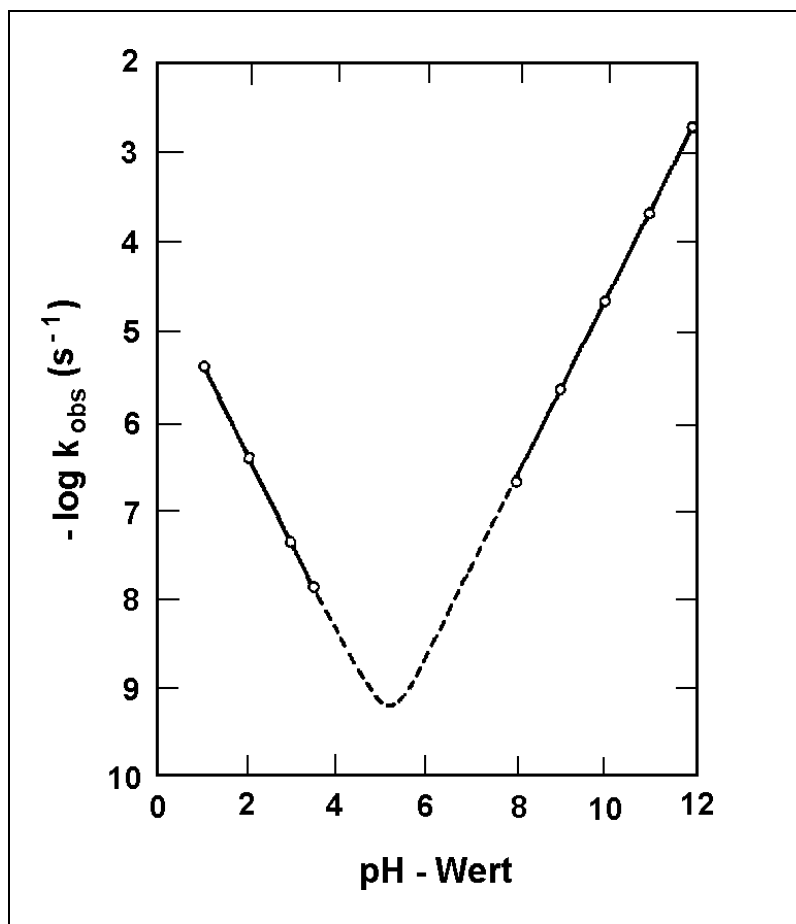


Abb.8.2.2: log k-pH-Profil von Pilocarpin bei 25°C; die durchgezogene Linie basiert auf experimentellen Werten, die gestrichelte Linie wurde berechnet [Connors, 1986].

8.2.1.2. Pilocarpin und seine Wirkungen

Da Pilocarpin bereits sehr lange bekannt ist, gehört dieser Wirkstoff wohl zu den am häufigsten untersuchten und erforschten Arzneistoffen am Auge.

Pilocarpin erregt die parasymphatisch innervierten Strukturen des Auges. Als wichtigste sind hier der Ziliarmuskel und der Musculus sphincter pupillae zu nennen. Das therapeutische Prinzip des Pilocarpins besteht darin, das Mißverhältnis zwischen Kammerwassereinstrom und -abfluß zu beseitigen. Es senkt den Abflußwiderstand und somit den intraokularen Druck (s.a. Glaukom, Kap. 1.4.1.2.).

Pilocarpin hat am Auge auf viele Bereiche einen Einfluß:

- Pupille
- Trabekelwerk und Schlemmscher Kanal
- Uveo-skleraler Abfluß
- Kammerwasser-Bildung
- Intraokularer Druck
- Gefäße der vorderen Augenabschnitte
- Blut-Kammerwasser-Schranke
- Linse und vordere Augenkammer

Eine Übersicht über die entsprechenden Wirkungen gibt Abb. 8.2.3. wieder.

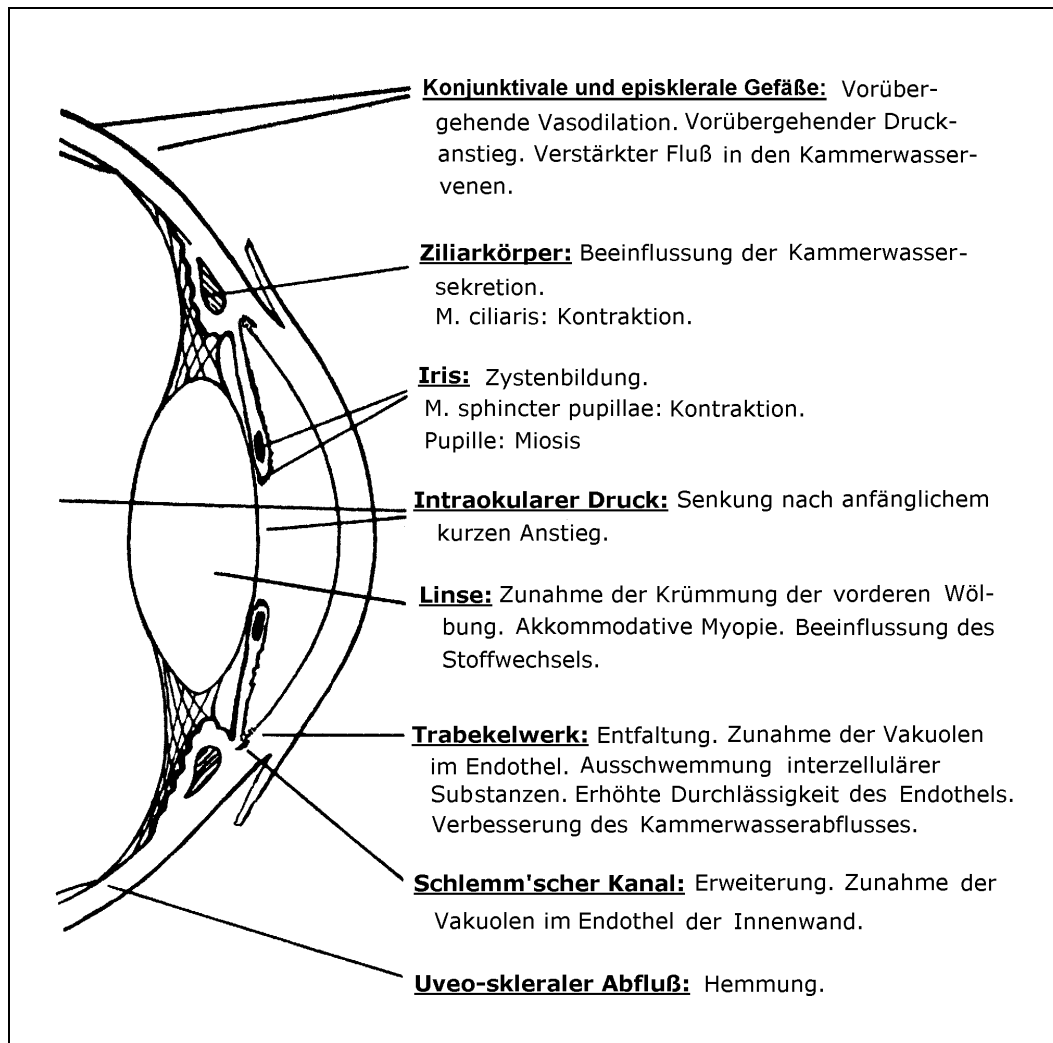


Abb.8.2.3: Übersicht über die Wirkungen des Pilocarpins [aus: Engelmayr, 1981]

Pupille

Die Verengung der Pupille ist die auffälligste Wirkung des Pilocarpins und sicherlich die am längsten bekannte. Die miotische Reaktion ist wesentlich sensibler als zum Beispiel die Reaktion des Ziliarmuskels: eine halbmaximale Miosis wird bereits durch eine Pilocarpinkonzentration verursacht, die ungefähr 100 mal geringer ist, als die, die für einen halbmaximalen Akkomodationswechsel nötig ist [Törnquist, 1964]. Die Miosis beginnt nach der Gabe einer 1 %igen Pilocarpinlösung nach etwa 10 Minuten, nimmt dann ständig zu, erreicht die maximale Wirkung innerhalb von 30 Minuten und nimmt schließlich über einen Zeitraum von mindestens 6 Stunden langsam ab [Lowenstein, 1956].

Sowohl für die Latenzperiode (Eintritt der Pupillenverengung), wie in der Geschwindigkeit, dem Ausmaß und der Dauer der Kontraktion bestehen erhebliche individuelle Unterschiede [Lowenstein, 1953].

Mit zunehmender Miosis wird die Lichtreaktion der Pupille immer schwieriger erkennbar, erfolgt aber zeitlich unverändert [Lowenstein, 1956].

Durch die Kontraktion des M. sphincter pupillae entfaltet sich die Regenbogenhaut. Durch die Miosis werden die Reservefalten der Iris aus dem Kammerwinkel gezogen. In einem Auge mit engem Kammerwinkel kann die Disposition zum Glaukomanfall vermindert werden. Da die Iris nicht direkt dem Trabekelwerk verbunden ist, beeinflußt sie auch nicht den im Trabekelwerk gelegenen Abflußwiderstand. Daß die Pupillengröße in keiner Beziehung zum Abflußwiderstand steht, zeigen auch pharmakologische Studien: eine parasympatische Stimulation erhöht die Leichtigkeit des Abflusses und verursacht eine Miosis. Die Zugabe eines Sympathomimetikums erweitert die Pupille, ohne den Abflußwiderstand zu ändern [Havener, 1978].

Die Miosis nützt deshalb nur bei Glaukom mit engem Kammerwinkel, nicht bei Glaucoma simplex.

Trabekelwerk und Schlemmscher Kanal

Der größte Teil des Abflußwiderstandes ist im Trabekel lokalisiert. Die Wirkung des Pilocarpins liegt darin, daß es den Ziliarmuskel kontrahiert. Dieser setzt an der Sklera und den Trabekeln an. Wenn er sich kontrahiert entfaltet sich das Trabekelwerk und der Abflußwiderstand verringert sich [Grierson, 1978].

Daß die Abflußverbesserung nach Pilocarpin von einer Wirkung auf glatte Muskulatur abhängen muß, zeigen folgende Untersuchungen: gibt man, nachdem die Pilocarpin-Wirkung ausgeprägt ist, intravenös Atropin, so sinkt die Abflußleichtigkeit nach 10 Minuten fast völlig auf den ursprünglichen Wert [Bárány, 1962]. Eine intravenöse Pilocarpin-Injektion hat einen sehr raschen Abfall des intraokularen Druckes zur Folge, der bereits nach 2 Minuten sein Minimum erreicht hat. Zu diesem Zeitpunkt ist die Kammerwasser-Konzentration aber noch zu niedrig, als daß auf diesem Weg Änderungen im Abflußsystem erreicht werden könnten. Man muß daher einen Einfluß des Ziliarmuskels annehmen, der unmittelbar über das Blut von dem Pilocarpin erreicht wird [Bárány, 1967].

Uveo-skleraler Abfluß

Neben dem Abflußweg über das Trabekelwerk und den Schlemmschen Kanal besteht noch eine zweite Drainage, die als uveo-skleraler Abfluß bezeichnet wird. Pilocarpin vermindert den Kammerwasserfluß über diesen Weg [Bill, 1967].

Kammerwasser-Bildung

Nach Macri und Cevario [Macri, 1974] kann Pilocarpin die Kammerwasserbildung sowohl erhöhen als auch vermindern. Verantwortlich dafür sollen zwei verschiedene Rezeptoren sein [Engelmayr, 1981].

Intraokularer Druck

Die Senkung des intraokularen Druckes durch Pilocarpingabe wurde in zahllosen Studien nachgewiesen. Allerdings steigt der Druck kurze Zeit nach der Instillation des Pilocarpins zuerst vorübergehend um 2 bis 5,5 mmHg an, erst nach 40 bis 60 Minuten ist er dann in der Regel niedriger [Wilke, 1974].

Pilocarpin senkt den Druck sowohl in gesunden als auch in glaukomatösen Augen. Neben der reinen Drucksenkung sind auch die tageszeitlichen Schwankungen geringer. Die größte drucksenkende Wirkung zeigte sich zwischen 9 und 18 Uhr.

Gefäße der vorderen Augenabschnitte

Ein bis zwei Minuten nach Instillation einer 2 %igen Pilocarpinlösung zeigt sich eine ausgeprägte Vasodilatation der konjunktivalen und episkleralen Gefäße, die ungefähr 20 Minuten anhält. Sogar die Kammerwasser-Venen sind vollständig mit Blut gefüllt. Pilocarpin erhöht den Blutfluß durch die Iris, die Ziliarfortsätze und den Ziliarmuskel um das 1- bis 2-fache, während der Blutfluß durch die Chorioidea und die Netzhaut unverändert bleibt (vermutlich durch Erregung über vaskuläre Muskarinrezeptoren) [Alm, 1973].

Blut-Kammerwasser-Schranke

Pilocarpin erhöht zwar die Durchlässigkeit der Blut-Kammerwasser-Schranke, anscheinend jedoch weniger als andere Miotika. Dieser Effekt ist unabhängig von der Pupillengröße oder der Irisfläche.

Linse und vordere Augenkammer

Die von Pilocarpin verursachte Kontraktion des Ziliarmuskels bewirkt nicht nur die erwünschte Verbesserung des Abflusses, sondern auch über die Entspannung des Halteapparates der Linse eine Zunahme des axialen Durchmessers der Linse und damit eine akkomodative Myopie. Die Ursache ist eine Zunahme der vorderen Wölbung der Linse (entsprechend der normalen Akkomodation) und eine Verringerung der Tiefe der Vorderkammer [Abramson, 1972].

Bei jungen Versuchspersonen nahm die Dicke der Linse nach der Instillation einer 2 %igen Pilocarpin-HCl-Lösung durchschnittlich um 0,32 mm zu, die Tiefe der Vorderkammer um 0,29 mm ab.

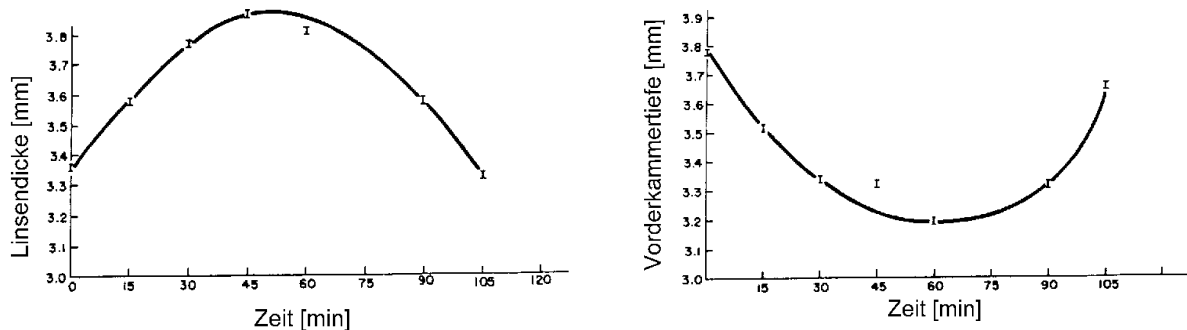


Abb.8.2.4: Veränderung der Linsendicke und Vorderkammertiefe nach Instillation einer 2 %igen Pilocarpinhydrochlorid-Lösung [Abramson, 1972]

Die Zunahme des axialen Linsendurchmessers und die Abnahme der Vorderkammertiefe beginnen 15 Minuten nach der Pilocarpin-Applikation, erreichen ihr Maximum in 45 bis 60 Minuten und erreichen wieder ihren ursprünglichen Zustand.

Wird die Wirkstoffkonzentration erhöht, werden die Vorgänge beschleunigt, ein höheres Maximum wird erreicht und die Wirkung hält länger an [Abramson, 1974].

Da mit zunehmendem Alter die Akkomodationsfähigkeit nachläßt, reagieren die Linsen älterer Patienten nicht so stark auf Pilocarpin wie bei jüngeren Patienten. Im Durchschnitt betrug die Zunahme der Linsendicke 0,21 mm und die Abnahme der Vorderkammer 0,19 mm (44-76 Jahre) [Abramson, 1976].

8.2.1.3. Nebenwirkungen von Pilocarpin am Auge und Kontraindikationen

Nebenwirkungen, die durch Pilocarpin verursacht werden, können in Lang- und Kurzzeitwirkungen unterschieden werden. Akut toxische oder allergische Reaktionen sind selten. Viele Effekte treten erst bei Dauerbehandlung oder sogar erst bei Vergiftungen in Erscheinung.

lokale Nebenwirkungen

Miosis (selten Mydriasis), Sichtbehinderung, Akkomodationsspasmus, vorübergehende Myopie, IOP-Änderung, Abnahme der Vorderkammertiefe (Auslösung eines akuten Winkelblock-Glaukoms), allergische Reaktion, Hyperämie, folliculäre Konjunctivitis, Muskelspasmus, Hämorrhagie, erhöhte Tränensekretion, Brennen, Blutungen oder sogar Ablösung der Retina, epitheliale Microzysten, Cornea-Ödem, Punctate Keratitis, verminderte Dunkeladaptation, Iriszysten, zunehmender axialer Linsendurchmesser, Kataraktausbildung, Iritis, Glaskörperhämorrhagie.

systemische Nebenwirkungen

Kopfschmerzen (im Augen- und Stirnbereich), erhöhte Schweiß- und Speichelabsonderung, Magen-Darmbeschwerden (Übelkeit, Erbrechen, Krämpfe, Durchfall), Tremor, Tachycardie (bei niedrigen Dosen), Bradycardie (bei hohen Dosen), Blutdruckabfall, Bronchospasmus, Lungenödem, geistige Verwirrungszustände (z.B. Depression, kurzfristiger Verlust des Erinnerungsvermögens) Epistaxis, Rhinorhea, Tenesmus, verstärkter Harndrang, Hautrötung.

Kontraindikationen

Harte Kontaktlinsen sollten frühestens 15 Minuten nach Verabreichung der Augentropfen wieder eingesetzt werden, weiche Linsen dürfen nicht getragen werden, Iritis acuta, bestimmte Formen von Linsentrübungen, Überempfindlichkeit gegen den Wirkstoff, Herzmuskelschwäche, Bronchialasthma, Schilddrüsenüberfunktion, Magen- oder Zwölffingerdarmgeschwür, Blasenentleerungsstörungen durch Behinderung des Harnabflusses, krankhafte Verengungen im Verdauungstrakt (z.B. Darmverschluss), Schwangerschaft, Stillzeit

Wechselwirkungen

Die herzs Schlagverlangsamende Wirkung bestimmter herzwirksamer Arzneimittel (Glycoside) kann durch Pilocarpin verstärkt werden.

[aus: Fraunfelder, 1996; Beipackzettel Isopto[®]-Pilocarpin; Beipackzettel Pilocarpin ankerpharm, Beipackzettel Pilomann[®]].

8.2.1.4. Pilocarpin und seine Bioverfügbarkeit

Pilocarpin wird auf die sichtbare Oberfläche des Auges aufgebracht, soll seine Wirkung aber an Strukturen entwickeln, die im Innern des Bulbus liegen. Wenn der Weg vom Ort der Applikation zu den wichtigen Geweben - dem Ziliarkörper und der Iris - nur wenige Millimeter lang ist, so besitzt das Sehorgan doch viele Barrieren.

Die Pharmakokinetik in Abhängigkeit von den Stoffeigenschaften und biologischen Gegebenheiten wird in den entsprechenden Kapiteln behandelt (s. Kap. 1 und 2).

Viskositätserhöhende Hilfsstoffe, insbesondere Methylcellulose (MC), Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) und Polyvinylalkohol (PVAL), werden bei der Formulierung von Pilocarpin-Augentropfen für Langzeitmedikationen oft verwendet. Brown et al. [1966] konnten eine Verbesserung der Stabilität durch MC feststellen. Unlü et al. [1988] fanden, daß Formulierungen mit 30 % Polyethylenglykol 300 oder Propylenglykol bei gleichem pH-Wert und Pufferung signifikant stabiler waren als Lösungen mit MC oder PVAL. Haas und Merril [1962] konnten eine Wirkungserhöhung durch Zusatz von MC nachweisen, während dies Mattila et al [1968] mit einer 2 %igen Pilocarpin-Lösung mit MC nicht gelang. Trautmann [1967] fand eine Verbesserung von Verträglichkeit und Wirksamkeit der 2 %igen Pilocarpin-Augentropfen bei Zusatz von 1,4 % PVAL. Mit einem hochviskosen 4 %igen Pilocarpin-Gel auf Carbomerbasis konnten March et al. [1982] eine Wirkung über einen Zeitraum von 24 Stunden erreichen. Eine signifikant erhöhte Bioverfügbarkeit am Kaninchenauge wurde mit einer Pilocarpin-Lösung erreicht, welche 5 % PVAL enthielt (Viskosität 73 cps) [Saettone, 1982].

Einfluß der Irisfarbe

Borgmann [1973] untersuchte die Abhängigkeit der Pupillenverengung von der eingesetzten Pilocarpinkonzentration und dem Vehikel. Der Einsatz von 0,5 %, 1 %, 2 % und 4 %igen Lösungen ergaben zwar unterschiedliche, aber nicht signifikante

Pupillenverengungen. Bei schwach pigmentierten Iriden war die Miosis ausgeprägter als bei den stark pigmentierten. Konzentrationsabhängige Wirkungen ließen sich nur bei dunklen Iriden feststellen. Hierbei ergaben sich unterschiedliche Kontraktionszeiten und -dauer.

Die untersuchten Trägersubstanzen (wäßrige, MC-haltige (*Isoptopilocarpin*[®]) und ölige (*Pilocarpol*[®]) 2 %ige Pilocarpin-Lösungen) führten, abgesehen von der länger anhaltenden Miosis nach öliger Lösung, nur bei stärker pigmentierter Regenbogenhaut zu einer unterschiedlich ausgeprägten Pupillenverengung. Kontraktionszeiten und -dauer der ausgeprägten Miosis wurden nur bei dunklen Iriden durch das Vehikel beeinflusst. Borgmann erklärte diese Beobachtung damit, daß die Trägersubstanzen die Hornhautpenetration des Pilocarpinmoleküls unterschiedlich verändern.

Zusätzlich weist er noch einmal darauf hin, daß die Miosis-Reaktion keine Rückschlüsse auf den Grad der IOP-Senkung zuläßt.

Pilocarpin-Tropfen in höheren Konzentrationen (4 %) werden zur Glaukombehandlung vorwiegend in Ländern eingesetzt, deren Populationen sehr stark pigmentierte Iriden aufweisen (z.B. Afrika) und bei denen mit in z.B. Europa gängigen Konzentration (1 bis 2 %) keine ausreichende Wirkung erzielt werden kann (s.a. Kap. 1.4.2.1.).

8.2.1.5. Einfluß des pH-Wertes auf Stabilität, Wirksamkeit und Verträglichkeit

Stabilität

Pilocarpin ist bei niedrigeren pH-Werten stabiler als bei höheren. Der Grund dafür ist der in der Struktur enthaltene Lacton-Ring. In Abhängigkeit von der Ringspannung dieser Verbindung können hydrolytische Spaltungen sehr schnell ablaufen und deshalb in kurzer Zeit zum Wirksamkeitsverlust dieser Arzneimittel führen [Thoma,1978].

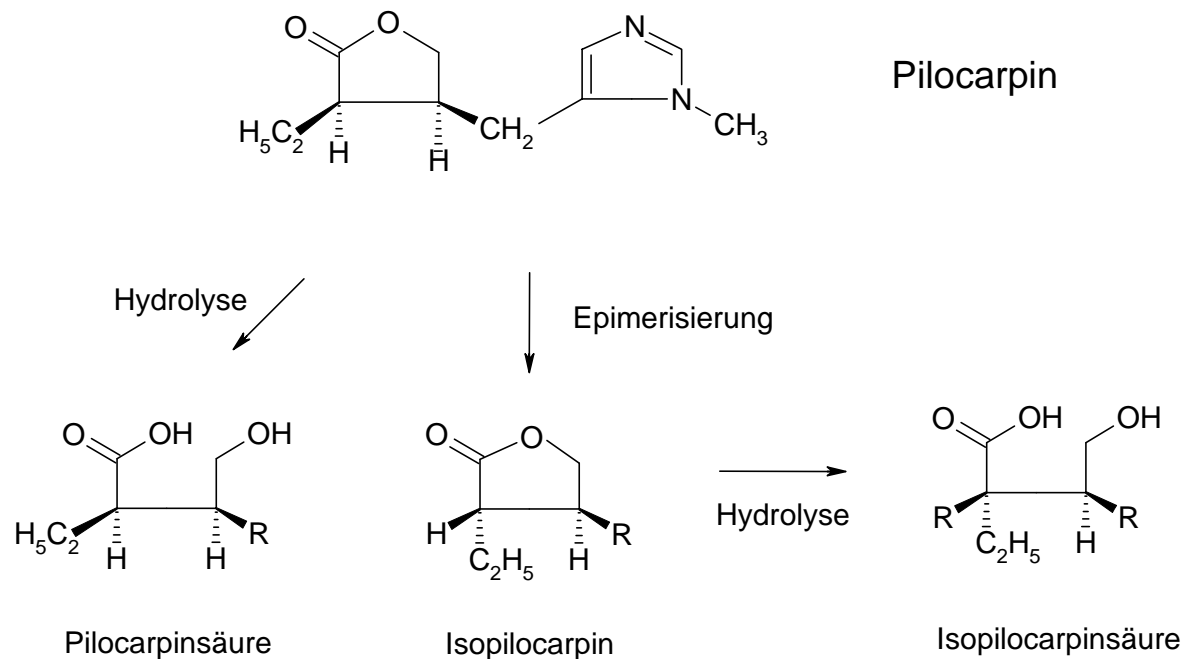
Hier können zwei Reaktionen ablaufen, die von pharmazeutischer Relevanz sind, da die Umsetzungsprodukte unwirksam sind:

- Hydrolyse des Esters des Lacton-Rings zur Pilocarpinsäure
- Epimerisierung über das α -C-Atom zum Isopilocarpin und Isopilocarpinsäure

Die Hydrolyse ist quantitativ von größerer Bedeutung als die Epimerisierung.

Die Hydrolyse ist säure-basenkatalysiert und irreversibel. Die Epimerisierung wird vorwiegend OH^- -katalysiert und ist reversibel. Die Reaktion kann durch H^+ wieder umgekehrt werden [Chung, 1970].

Zersetzungsprodukte



Der für die Haltbarkeit von Pilocarpin-Lösungen günstige pH-Wert von 4-5 (die USP 24 gibt hier einen pH-Wert von 3,5 bis 5,5 für Pilocarpinhydrochlorid-Augentropfen an) führt am Auge zu Reizerscheinungen und setzt die biologische Verfügbarkeit des Pilocarpins herab. Die Einstellung auf physiologisch besser verträgliche Konzentrationen führt nach kurzer Zeit in wässrigen Augentropfen zu starken Wirkungsverlusten.

Untersuchungen des Deutschen Arzneiprüfungs-Instituts über die Stabilität von handelsüblichen Pilocarpin-Augentropfen ergaben, daß von 33 geprüften Spezialitäten sechs einen Gehaltsverlust von mehr als 10 % aufwiesen [Ermer, 1975]. Die Präparate waren 5 bis 12 Monate alt.

Da Zersetzungsreaktionen bei erhöhten Temperaturen nach der Arrhenius-Gleichung mit entsprechender Beschleunigung ablaufen, ist eine Hitzesterilisation von Augentropfen mit instabilen Arzneistoffen wie z.B. Pilocarpin nicht möglich. In diesen Fällen muß eine Entkeimung durch Filtration vorgenommen werden.

Arzneistoff	pH 5,0		pH 6,8	
	25°C	120°C	25°C	120°C
Pilocarpin	einige Jahre	> 24 Stunden	66 Tage	< 34 Minuten

Tab.8.2.5: Stabilität von Augenarzneien: Zeitdauer bis zur 50 %igen Zersetzung [aus: Martin, 1971]

Zusätze und Komponenten wie Puffersysteme können großen Einfluß sowohl auf die Absorption von Pilocarpin am Auge als auch auf die Stabilität der Lösung haben. Mitra et al. [1982] stellten fest, daß Citrat-Puffersysteme die pharmakologische Wirkung entscheidend beeinflussen können. Sie stellten eine bis zu 5-fach verringerte Fläche der Miosis-Zeit-Profile fest.

Brown et al. [1966] konnten nachweisen, daß ein Zusatz von Methylcellulose die Stabilität von Pilocarpin erhöht, während die Anwesenheit eines Sörensen-Phosphat-Puffers die Stabilität erniedrigt.

Bei Mäusen, Ratten und Meerschweinchen verursacht Pilocarpin im Gegensatz zu vielen anderen Tieren überraschenderweise eine Mydriasis [Koval, 1985].

8.2.2. Tropicamid

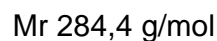
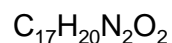
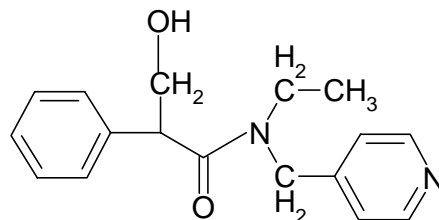
8.2.2.1. Allgemeine Grundlagen

Tropicamid ist ein synthetisches Derivat der Tropasäure, das speziell für die topische Verwendung in der ophthalmologischen Diagnostik entwickelt wurde [Dolder, 1990]. Bereits zwischen 1956 und 1958 wurde sein möglicher Einsatz als potentes schnell- und kurzwirksames Mydriatikum beschrieben. Der Wirkstoff wurde in den Vereinigten Staaten von Alcon Laboratories eingeführt. 1960 beschrieben Merrill et al. den Tropicamid-Effekt am menschlichen Auge. Die maximale Mydriasis erscheint nach 30 Minuten. Die Akkomodationsänderung kann ein Maximum von 1.0 bis 1.5 Dioptrien 30 Minuten nach der Applikation erreichen. Nach 6 Stunden sind keine Wirkungen mehr feststellbar. Tropicamid hat keinen Einfluß auf den intraocularen Druck (IOP) und führt weder zu Allergien noch Reizungen.

Heute ist Tropicamid das am häufigsten verwendete kurzwirksame Mydriatikum und Cycloplegium. Anticholinerge Substanzen, die topisch appliziert werden, um die Akkomodation zu hemmen, werden als Cycloplegica bezeichnet (objektive Bestimmung der Refraktion bei Esotropia (abwechselndes Einwärtsschielen) bei Kindern. Sobald diese Stoffe auch den Sphinctermuskel der Iris hemmen, sind sie effektive Mydriatika. Unter den Anticholinergika wird Tropicamid als einzige Substanz routinemäßig als Mydriatikum verwendet.

Anticholinerge Substanzen (Cholin-Antagonisten) verhindern die Antwort des Sphinctermuskels der Iris und der Muskeln des Ciliarkörpers auf eine cholinerge Stimulation, verursachen eine Pupillendilatation (Mydriasis) und Paralyse der Akkomodation (Cycloplegie).

Tropicamid



Eigenschaften	
Löslichkeit	in Wasser schlecht, in Ethanol gut löslich, in Chloroform: sehr leicht löslich
pH-Wert	<i>pKa</i> : 5,2
Aufbewahrung	luftdicht verschlossen, vor Licht geschützt
Stabilität	Als Zersetzungsprodukte wurden bei saurem pH Atropicamid (Apotropicamid), bei alkalischem pH Atropasäure, gamma-Tropasäure, gamma-Picolylethylamin und Atropicamid gefunden [Pohloudek-Fabini, 1982]. In einer Lagerungsstudie mit Augentropflösung wurde bei 0 bis 45°C innerhalb von 12 Wochen keine Wirkstoffzersetzung gefunden [Florey, 1983]. Aus reaktionskinetischen Untersuchungen ergab sich für neutrale und saure wässrige Lösungen sowie für kristallines Tropicamid eine Haltbarkeit von mindestens 20 Jahren bei 20°C. In alkalischem Milieu ist die Stabilität im Vergleich zum Atropin etwa 1000 mal größer [Timm, 1977].
Inkompatibilitäten	Alkalisches reagierende Stoffe (Zersetzung), Iod, Silbersalze (Fällung)
Sterilisationsempfehlung	Keimfiltration

Tab.8.2.6: Eigenschaften von Tropicamid [aus: Dolder, 1990]

8.2.2.2. Tropicamid und seine Wirkungen

Tropicamid ist ein schnell-wirkender parasymphatolytischer Wirkstoff, der mit Acetylcholin um die Bindungsstellen an den Muscarin-Rezeptoren konkuriert. Es hemmt die ACh-Wirkung kompetitiv an den Rezeptoren des Iris sphincters und des Ziliarkörpers. Der Effekt ist dosisabhängig und durch eine Erhöhung der ACh-Konzentration umkehrbar. Tropicamid erweitert Pupillen selbst in geringen Dosen wie 0,25 % bis wenigstens 6 mm [Pollack, 1981]. Der mydriatische Effekt beginnt 5 Minuten nach Applikation und erreicht nach 25 bis 30 Minuten ein Maximum. In der mydriatischen Dosisantwort gibt es keine Unterschiede zwischen 0,25 %, 0,5 %, 0,75 % und 1,0 %-Konzentrationen. Die maximale Mydriasis liegt bei 7,7 bis 8,2 mm und hält mindestens 30 Minuten lang an. Der Akkomodationsverlust ist dosisabhängig; eine klinisch signifikante Cycloplegie tritt erst ab höheren Konzentrationen (0,75 % bis 1,0 %) auf. Ein einziger Tropfen induziert eine Akkomodationsänderung von 1,5 Dioptrien, verglichen mit 1,8 und 2,2 Dioptrien mit 0,5 % beziehungsweise 0,25 %. Der Cycloplegie-Effekt beginnt nach 5 Minuten und

hält maximal 20 bis 40 Minuten an. In weniger als 3 Stunden hat sich die Akkomodation und die Pupillengröße wieder völlig erholt.

Weitere verwendete Mydriatika sind Atropin (Wirkungsdauer bis zu 10 Tagen!), Scopolaminhydrobromid (Wirkdauer 2-3 Tage) und Cyclopentolathydrochlorid (Wirkdauer 2 Tage).

8.2.2.3. Nebenwirkungen von Tropicamid am Auge und Kontraindikationen

Die Nebenwirkungen, die durch Tropicamid verursacht werden, treten nur sehr selten auf. Bei der Pupillenerweiterung kommt es zu einer Verdickung der Iriswurzel, die unter Umständen den Kammerwinkel und damit das für den Kammerwasserabfluß aus dem Auge entscheidend wichtige Trabekelwerk verlegen kann. Bei engem Glaukomwinkel, der genetisch veranlagt sein kann, Glaukom oder durch die mit einer Linsentrübung einhergehende Dickenzunahme der Linse ist eine Auslösung eines akuten Glaukomanfalls durch Mydriatika ohne weiteres möglich (Glaukom, s.a. Kap. 1.4.2.1.).

Systemische Nebenwirkungen kommen besonders bei Kindern vor.

lokale Nebenwirkungen

Lichtempfindlichkeit (Photophobie), unscharfes Sehen, IOP-Anstieg, vorübergehendes Brennen oder Schmerzen, Irritationen bei längerer Anwendung (z.B. allergische Reaktionen an Augenlid oder Bindehaut, Hyperämie, Entzündungen an Lidrand und Bindehaut (Blepharokonjunctivitis), Ödembildung), Keratitis, Verwachsungen der Iris mit der Hornhaut oder Linse (Synechia).

systemische Nebenwirkungen

parasympatische Stimulationen, Trockenheit im Mund und Haut, Beeinflussung des ZNS (vorwiegend bei Kindern; visuelle Halluzinationen, Psychose, Ataxie, Sprachprobleme, Verwirrungszustände) Kopfschmerzen, Somnolenz, Erschlaffungssymptome (Parese), Magen-Darmbeschwerden, Urinretention, Vasodilatation, Fieber, Tachycardie, Tod (Kinder).

Kontraindikationen

Primäres Glaukom oder eine Tendenz zu einem engen Kammerwinkel [aus: Fraunfelder, 1996].

8.2.2.4. Tropicamid und Bioverfügbarkeit

Viskose Augentropfen mit HPMC erwiesen sich am Menschen gegenüber den nicht-viskosen Augentropfen (0,5% bis 1% in gepufferter(pH 4-5) und konservierter Lösung [USP, 24] überlegen, ebenso eine Hydrogel-Augensalbe auf Grundlage von Carbopol[®] 940 gegenüber einer Fettsalbe aus gelber Vaseline und Paraffinöl [Saettone, 1984].

Signifikant erhöhte Bioverfügbarkeit beim Menschen ergab sich bei 0,05 - 0,2 %Tropicamid mit 0,7 % HPMC gegenüber der Dispersion in Polyacrylat-Gel und der wässrigen Tropfenlösung [Saettone, 1980].

Bei den Poloxameren erwiesen sich Pluronic[®] L64 und P85 als am günstigsten [Saettone, 1988].

Eine in den Vehikeln HPMC, HPC, PVAL und PVP in Gegenwart von Benzalkoniumchlorid festgestellte reduzierte Tropicamid-Wirksamkeit wurde auf eine Herabsetzung der Adhäsion dieser Lösungen an der Cornea zurückgeführt [Saettone, 1984].

8.2.3. Fluorescein-Natrium

8.2.3.1. Allgemeine Grundlagen

Fluorescein, ein Hydroxyxanthen Abkömmling, wurde zum ersten Mal von Adolf von Baeyer [1871] beschrieben. Die Fluoreszenzeigenschaften wurden zwar sofort erkannt, aber bis zu seinem Einsatz bei der Diagnose von Augenkrankheiten vergingen noch mehr als zehn Jahre. 1882 beschrieb Pflüger [Campbell, 1950] den ersten Gebrauch von Fluorescein, um den Zusammenhalt der Cornea-Epithelzellen festzustellen.

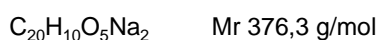
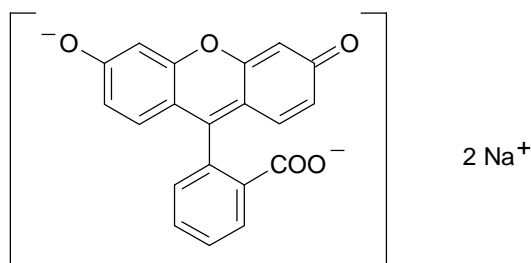
Heute wird Fluorescein hauptsächlich zu diagnostischen Zwecken verwendet (s.a. Kap. 8.2.3.2.). Der Einsatz erfolgt sowohl lokal am Augenäußeren als auch über die Blutbahn zur Darstellung des Augenhintergrundes.

Im allgemeinen wird in der Ophthalmologie das Natriumsalz verwendet, welches im Gegensatz zum nicht-ionisierten Stoff eine ausgezeichnete Wasserlöslichkeit besitzt. Das Absorptionsspektrum besitzt bei etwa 490 nm (blau) ein Maximum, während das Intensitätsmaximum für das emittierte grüne Licht bei 520 nm liegt.

Die Konversion von Absorption zur Emission beträgt nahezu 100 % und benötigt etwa 4×10^{-9} Sekunden. Dieses Intervall ist somit kürzer, als bei den meisten bekannten organischen Substanzen dieser Art. Auf diese Weise ist in-vitro noch ein sicherer Nachweis bis zu einer Konzentration von 10^{-9} g/ml möglich.

Aufgrund der nur schwach sauren Eigenschaften des Fluoresceins wird es nicht an Gewebe gebunden. Dies erklärt auch die geringe Toxizität des Fluoresceins.

Fluorescein-Dinatrium



Eigenschaften	
Löslichkeit	Wasser in 1,5 Teilen Ethanol in 10 Teilen In unpolaren Lösungsmitteln weitgehend unlöslich.
pH-Wert	8,2-8,7 (0,5 %ige Lösung)
Aufbewahrung	gut verschlossen unter Lichtschutz, hygroskopisch
Stabilität	wässrige Lösungen, insbesondere mit viel gelöstem CO ₂ , sind thermolabil (Trübungen)
Inkompatibilitäten	Säuren und sauer reagierende Stoffe fallen die freie Säure aus
Sterilisationsempfehlung	Lösungen, deren pH-Wert auf 8,8 eingestellt wurde, sind autoklavierbar, sonst Keimfiltration

Tab.8.2.7: Eigenschaften von Fluorescein [aus: Dolder, 1990]

8.2.3.2. Fluorescein und seine Wirkungen

Fluorescein ist ein gelber, wasserlöslicher Phthalein-Farbstoff, der bei pH-Werten oberhalb von 5 eine intensiv grüne Fluoreszenz zeigt. Es handelt sich um das Dinatriumsalz des Resorcinphthaleins. Der Farbstoff wird bei normaler Applikation nicht resorbiert, jedoch lässt sich durch Zusätze wie 0,5 % Hydroxypropylmethylcellulose oder Benzalkoniumchlorid die Permeabilität erhöhen [Waltman, 1970].

Die Anwendbarkeit in der Ophthalmologie ist vielschichtig.

- Überprüfung der Integrität des Cornea- und Conjunctiva-Epithels
- Anpassen von Kontaktlinsen
- Erkennen von Fremdkörpern
- Überprüfung der Tränenproduktion und des Abflusses
- Bestimmung der Tränenfilm-Aufreißzeit (tear break-up time)
- Fluorophotometrie (Messung von Fluorescein-Konzentrationen im Auge)
- Applanationstonometrie (Bestimmung des IOP)
- Chirurgie im vorderen Augenbereich
- Augenhintergrundbetrachtung (Angiographie)
- Erfassung des Kammerwasserflusses (Seidel Test)
- Antidot gegen Anilinfarbstoffe

Nach der Einfärbung erscheint der Tränenfilm gelb oder orange. Nach topischer Applikation von Fluorescein am Auge verhindert der hohe Lipidgehalt des intakten Cornea-Epithels die Aufnahme des wasserlöslichen Fluoresceinmoleküls. In Bereichen jedoch, in denen das Epithel beschädigt worden ist (z.B. durch ein Trauma oder eine Infektion), gelangt der Wirkstoff leicht in das hydrophile Stroma, in welches es schnell hineindiffundiert. Diese Stellen leuchten hellgrün und können mit dieser Methode leicht sichtbar gemacht werden.

Eine leichte Verfärbung der Bindehaut und der Augenlider tritt nach Applikation immer auf, aber da das Fluorescein chemisch nicht an Gewebe bindet, ist der Effekt nur vorübergehend (unter 30 Minuten). Restliche Verfärbungen des Kammerwassers aufgrund der Diffusion durch die Cornea in die Vorderkammer können noch einige Stunden lang sichtbar bleiben. Dies macht man sich bei der Bestimmung der Kammerwasserabflußgeschwindigkeit mittels Fluorophotometrie zu nutze.

Die optimale Konzentration ist von der gewünschten Information abhängig. Verdünnte Lösungen (0,125 %) werden verwendet, um Epitheldefekte aufzudecken, höher konzentrierte Lösungen (2 %), um den Kammerwasserabfluß zu bestimmen.

Eine 2 %ige Lösung wird für den sogenannten Fluorescein-Test verwendet. Die Lösung wird in den Bindehautsack getropft und mit einem Tupfer in der Nase unter Lokalanästhesie geprüft, ob der Farbstoff aus dem unteren Ende des Tränensacks austritt, was etwa innerhalb von 90 Sekunden erfolgen soll. Eine Alternative dazu ist aber auch die Messung der verbliebenen Fluorescein-Konzentration am Auge.

Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung zur Bestimmung der Aufreißzeit des Tränenfilms. Man färbt die Tränen mit Fluorescein an und hält dem Patienten die Lider offen, um den Lidschlag zu verhindern. An der Spaltlampe beobachtet man mit der Stoppuhr, wie lange es dauert, bis die ersten trockenen Flecken auftreten. Eine Aufreißzeit unter 30 Sekunden zeigt einen verminderten Mucingehalt der Tränen an.

Für die Applanationstonometrie dient eine Lösung, die aus einer Kombination von Fluorescein-Natrium und einem Lokalanästhetikum besteht (z.B. *Thilorbin*[®], Fa. Dr. Thilo).

8.2.3.3. Nebenwirkungen von Fluorescein am Auge und Kontraindikationen

Die topische Anwendung von Fluorescein wird nur mit minimalen Nebenwirkungen verbunden, schwere Nebenwirkungen sind selten. Die topische Applikation der Fluorescein-Anästhetikum-Kombination verursacht bei fast allen Patienten ein

vorübergehendes und mildes Stechen oder Brennen an der Conjunctiva. Ursache ist teilweise der niedrige pH-Wert [Goldmann, 1957], der wegen der mikrobiellen Stabilität notwendig ist [Quickert, 1967].

lokale Nebenwirkungen

gelb gefärbte Tränenflüssigkeit oder Gewebe, Brennen oder Schmerzen bei der Applikation, allergische Reaktionen (Hyperämie, Urticaria), Ekzem.

systemische Nebenwirkungen

nicht bekannt bei topischer Applikation.

Kontraindikationen

Überempfindlichkeiten gegenüber dem Wirkstoff oder anderer Komponenten der Zubereitung. Nicht mit weichen Kontaktlinsen verwenden, die Linsen können gelb verfärben [aus: Fraunfelder, 1996].

8.2.3.4. Fluorescein und seine Bioverfügbarkeit

Linn et al. (1968) stellten bei dem Einsatz von fluoresceinhaltigen Augentropfen bei Zusatz von HPMC 4000 als 0,25 und 2,5 %ige Lösung jeweils eine Wirkungsverstärkung beim Menschen fest. Wurde anstatt HPMC eine 1,4 %ige PVAL-Lösung verwendet, konnte kein Retardeffekt beobachtet werden. Waltmann [1970] konnte mit einem 0,5 %igen Zusatz von HPMC 4000 diese Ergebnisse bestätigen. Adler [1971] beobachtete hingegen sowohl mit MC 2500 und PVAL-Zubereitungen wirkungsverlängernde Effekte.

Die Angaben in der Literatur sind teilweise recht widersprüchlich. Eine Auswertung ist schwierig, da verschiedene Autoren keine näheren Angaben zu den Polymerqualitäten oder sogar zu den eingesetzten Konzentrationen machen.

8.2.3.5. Stabilität von Fluorescein-Zubereitungen

Üblicherweise werden 0,5 bis 2 %ige Fluorescein-Lösungen eingesetzt, sofern nicht andere Konzentrationen erforderlich sind.

Da die Konservierung von Fluorescein-Lösungen problematisch ist (wässrige Fluorescein-Lösungen sind ein ausgezeichneter Nährboden für viele Bakterien, besonders für *Pseudomonas aeruginosa*; die Konservierung ist problematisch, da Fluorescein die gebräuchlichen antimikrobiellen Wirkstoffe inaktiviert), wird die

Verwendung von Fluorescein-Papierstreifen empfohlen (z.B. sogenannte *Fluorets*) - die bakterielle Kontamination wird minimiert, wenn die Streifen trocken aufbewahrt werden. Die Streifen werden mit Wasser angefeuchtet, der Wirkstoff vom Streifen gelöst und kann am Auge appliziert werden, indem man ihn vorsichtig mit der Bindehaut in Kontakt bringt (Fluorescein Sodium Ophthalmic Strips, USP 24). Die Alternative dazu sind Einzeldosen-Behältnisse [Richards, 1969].

Eine weitere Möglichkeit ist das Hinzufügen des Anästhetikums Benoxinat (Fluorescein Sodium and Benoxite Hydrochloride Ophthalmic Solution, USP 24) und des Konservierungsmittels Chlorobutanol, die eine beträchtliche antibakterielle Wirkung haben [Duffner, 1990; Lee, 1972].

8.3. Meßverfahren für Ophthalmologische Untersuchungen

8.3.1. Spaltlampe

8.3.1.1. Spaltlampenuntersuchung

Mit Hilfe der Spaltlampe können die Strukturen des vorderen Augenabschnittes sichtbar gemacht werden. Iris, Linse und Glaskörper können aus unterschiedlichen Blickwinkeln mit verschiedenen Beleuchtungsarten und Vergrößerungen betrachtet werden. Anatomische und pathologische Veränderungen können auf diese Weise schnell erkannt und diagnostiziert werden.

8.3.1.2. Gerätebeschreibung

Gerät:

Spaltlampe Modell B 900, Haag-Streit, Bern

Eine Beleuchtungseinrichtung erzeugt einen in der Länge, Breite und Lage veränderlichen hellen Lichtstrahl, das sogenannte Spaltbild. Das schmale Lichtbündel der Spaltlampe legt einen optischen Schnitt durch die transparenten Augengewebe, so daß die Feinstrukturen und die Lage der Gewebe weit besser als im diffusen Licht erkennbar sind. Als Lichtquelle dienen hierbei Halogen- oder Xenon-Gasentladungslampen.

Das zur Spaltlampe ebenfalls gehörige Spaltlampenmikroskop ermöglicht die 5- bis 50-fache Vergrößerung des ausgewählten Blickfeldes. Meist wird eine 10- bis 16-fache Vergrößerung verwendet [Leydhecker, 1993]. Die Vergrößerung ist stufenlos wählbar. Helligkeit, Tiefenschärfe, Betrachtungswinkel und Auflösung beeinflussen entscheidend die Qualität des Bildes. Wenn man eine scharfe Sammellinse (+90 dpt) vorschaltet, können auch Glaskörper, Netzhaut und Papille binokular mikroskopisch untersucht werden.

8.3.2. Refraktometrie

8.3.2.1. Refraktion

Unter der Refraktion versteht man die Brechkraft einer Linse. Durch eine Änderung der Linsenbrechkraft können Gegenstände in der Bildebene fokussiert (Akkommodation) und damit scharf sichtbar gemacht werden.

Bei einer Nahakkomodation kommt es zu einer Kontraktion des Ziliarmuskels und die Zonulafasern erschlaffen. Die Eigenelastizität der Linse führt zu einer stärkeren Krümmung der Linse, die mit einer Erhöhung der Brechkraft verbunden ist.

Bei einer Fernakkomodation entspannt sich der Ziliarmuskel, die Zonulafasern spannen sich, die Linse wird flacher (s.a. Kap. 1.5.1.).

Mit zunehmendem Alter eines Menschen nimmt die Eigenelastizität der Linse ab. Bei dieser Alterssichtigkeit werden zur Unterstützung der Nahakkomodation Lesebrillen verwendet.

Der Ziliarmuskel ist hauptsächlich parasymphatisch innerviert, er kann allerdings auch sympathisch beeinflusst werden (s.a. Kap. 1.2.2.2.).

Durch verschiedene Wirkstoffe kann die Refraktion der Linse künstlich verändert werden (z.B. durch Pilocarpin).

8.3.2.2. Gerätebeschreibung

Gerät:

Autorefraktometer RM-A7000B, TopCon Inc., Tokyo, Japan

Die Brechkraft der Linse läßt sich objektiv und vollautomatisch bestimmen. Der Patient blickt mit beiden Augen in die Öffnungsschlitze des Tischgerätes. Ein Infrarotstrahl tastet die Netzhaut optisch ab und gibt die Meßergebnisse an einen Rechner weiter. Am Schluß der etwa 1-3 Minuten andauernden Untersuchung werden die Daten ausgegeben, aus denen für jedes Auge getrennt die sphärischen und zylindrischen Korrekturen (gleichmäßige und ungleichmäßige Hornhautwölbungen) und sowie die astigmatischen Achsenlagen (Aussage über die Symmetrie der gewölbten Hornhaut) entnommen werden können [Schober, 1977; Leydhecker, 1993].

Der Nachteil dieser Geräte ist allerdings, daß zur Untersuchung eine relativ große Pupille mit einem Durchmesser von mindestens 4 mm benötigt wird. Bei sehr starker Miosis, bei Medientrübungen oder bei unregelmäßigem Astigmatismus können deshalb Schwierigkeiten entstehen, die unter Umständen eine Verwendung des Refraktometers unmöglich machen.

8.3.3. Pupillometrie

8.3.3.1. Allgemeines

Pupillenfunktion / Pupillenreflex

Die wesentliche Aufgabe der Pupillen ist es, den Lichteinfall auf die Netzhaut zu regulieren und konstant zu halten und diese damit vor größeren Schäden zu bewahren. Pupillendurchmesser können normalerweise zwischen 1,5 und 7 bis 8 mm variieren. Die Regelung des Lichteinfalls erfolgt dabei in Sekundenbruchteilen (Latenz). Dieser Pupillenreflex beginnt etwa 0,2 bis 0,5 Sekunden nach dem Lichtimpuls (0,2 Sekunden bei hellem Licht und 0,5 Sekunden bei geringerer Beleuchtung). Das Kontraktionsmaximum ist nach etwa einer Sekunde erreicht. Wird nur ein Auge beleuchtet, verengt sich nicht nur das beleuchtete Auge (direkte Lichtreaktion), sondern auch die Pupille des benachbarten Auges (konsensuelle Lichtreaktion) [Wilhelm, 1991].

Die Größe der Pupille wird durch den Tonus zweier glatter Muskeln bestimmt. Der Sphincter wird parasympathisch innerviert; er verengt die Pupille (Miosis). Der Dilator wird sympathisch innerviert und erweitert die Pupille (Mydriasis). Der Überträgerstoff am Sphincter ist Acetylcholin, am Dilator Noradrenalin.

Der Musculus sphincter pupillae ist etwa 1 mm breit, 0,1 mm dick, in das Irisstroma eingebettet und fest mit diesem verwachsen. Im Gegensatz dazu besteht der Musculus dilatator pupillae aus Epithelzellen, die einige Muskelfasern enthalten. Er ist als sehr dünnes und feines Netz in den pupillenfernen Zweidritteln des Irisstromas aufgespannt. Er ist somit der weitaus schwächere der beiden Pupillenmuskeln.

Der Sympathikus ist im wesentlichen für die Grundeinstellung der Pupillenweite entsprechend dem vegetativen Gleichgewicht des Individuums zuständig, während der Parasympathikus für die Lichtreaktion zuständig ist und auch für die anderen reflektorischen Pupillenreaktionen entscheidend ist.

Dunkeladaptation

Das Verhalten der Pupille auf Hell- und Dunkeladaptation wurde u.a. von Borgmann [1967] beschrieben. Er untersuchte den Einfluß verschieden langer Helladaptationen des Auges auf die Geschwindigkeit und die Dauer der Dilatation der Pupille im Dunkeln. Es stellte sich heraus, daß die Dilatation bei Belichtungszeiten bis 3 Minuten im Wesentlichen bereits vor der zweiten Minute erfolgt ist, bei einer Belichtung von 5 bis

10 Minuten jedoch 4 bis 5 Minuten notwendig sind. Die im Laufe der Messung aufgetretenen individuellen Schwankungen des Pupillendurchmessers (ca. $\pm 0,5$ mm) entsprachen der bekannten Variabilität. Bei ausreichender Intensität des Lichtblitzes ist die Pupillenreaktion unabhängig von ihrer Ausgangsweite [Borgmann, 1972].

Borgmann [1972] stellte ebenfalls fest, daß der Pupillendurchmesser in der Dunkelheit vom Alter abhängig ist. Eine Berechnung der Pupillenfläche zeigte, daß diese im Laufe der Lebensjahre permanent abnahm.

Aus diesen Untersuchungen ergibt sich für Personen, bei denen pupillographische Messungen vorgenommen werden sollen, für die Dunkeladaptation ein sinnvoller Zeitraum von 10 Minuten. Ein voriger Aufenthalt in ausgesprochen hellem Licht, wie z.B. im Sonnenlicht, sollte vermieden werden.

Abhängigkeit der Pupillenreaktion von der Lichtfarbe

Entscheidend für die Geschwindigkeit und Amplitude der Pupillenreaktion ist die Helligkeit des Lichtes, nicht seine spektrale Zusammensetzung. Wenn allerdings die retinale Empfindlichkeit für bestimmte Spektralfarben reduziert ist (z.B. Protanopie), so ist auch die pupillometrische Antwort auf einen Lichtreiz in dieser Farbe herabgesetzt [Adrian, 1973].

Abhängigkeit der Pupillenmotorik von Alter und Geschlecht

Im Kindesalter nimmt die Pupillenweite ebenso wie die Kontraktionsamplitude und -geschwindigkeit allmählich zu. Im mittleren Lebensalter (20 bis 60 Jahre) sind Kontraktionsamplitude und -geschwindigkeit am größten und jenseits der 60 nehmen sie wieder ab.

Die Pupillenweite im Dunkeln ist in der zweiten Lebensdekade am größten und nimmt bis zum 60. Lebensjahr gering, dann stärker ab.

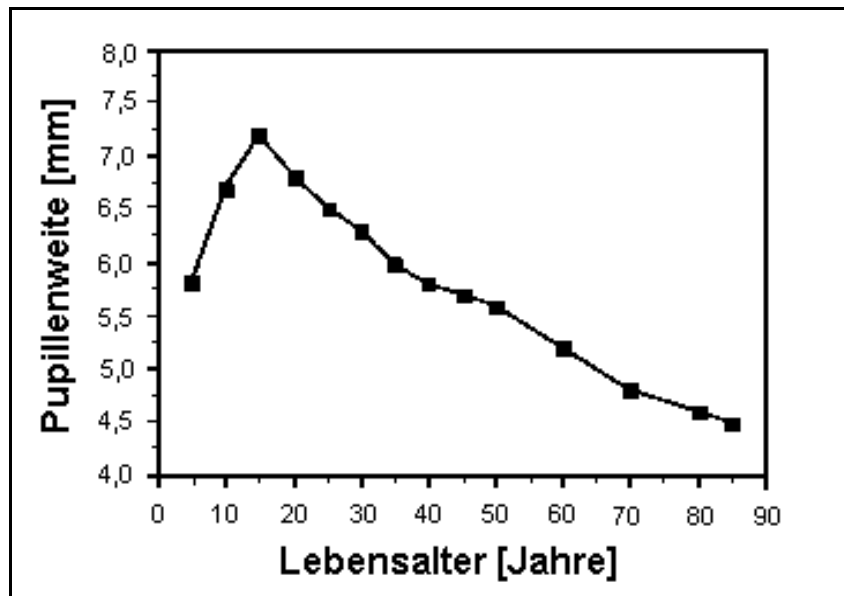


Abb.8.3.1: Altersabhängigkeit der Pupillenweite [nach Loewenfeld, 1979]

Ein signifikanter Geschlechtsunterschied bei der Pupillengröße und -reaktion ist nicht nachweisbar [Jones, 1990].

8.3.3.2. Pupillographie

Bei der Pupillographie handelt es sich um ein Verfahren, bei dem die Änderung des Durchmessers oder der Fläche der Pupille in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt wird. Es existieren verschiedene Registrierungsmethoden. Die Verwendung von infrarotem Licht ermöglicht die Untersuchung der Pupille auch in der Dunkelheit. Im einfachsten Fall erfaßt man mit einer Fozelle, die in einer Brille eingebaut sein kann, das von der Iris reflektierte Infrarotlicht. Bei einer engen Pupille wird viel Licht, bei einer weiten Pupille wenig Licht reflektiert. Eine andere Methode bedient sich der digitalen Bildverarbeitung. Das von einer infrarotsensiblen Kamera aufgezeichnete Bild wird einem Computer übermittelt, der die Fläche des Fundusreflexes in der Pupille berechnet.

Diese Methode ist recht genau, benötigt aber Computer mit hoher Rechenleistung und entsprechende Software, wenn eine befriedigende zeitliche Auflösung erzielt werden soll. Aus diesem Grund sind kommerziell angebotene Geräte, die nach diesem Prinzip arbeiten, außerordentlich teuer.

Abb. 8.3.2. zeigt ein solches Pupillogramm. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Pupillenweite nach einem kurzen Lichtreiz. Die wichtigsten Parameter der Pupillenreaktion (Latenzzeit, Gipfelzeit, Redilatationszeit) sind eingezeichnet.

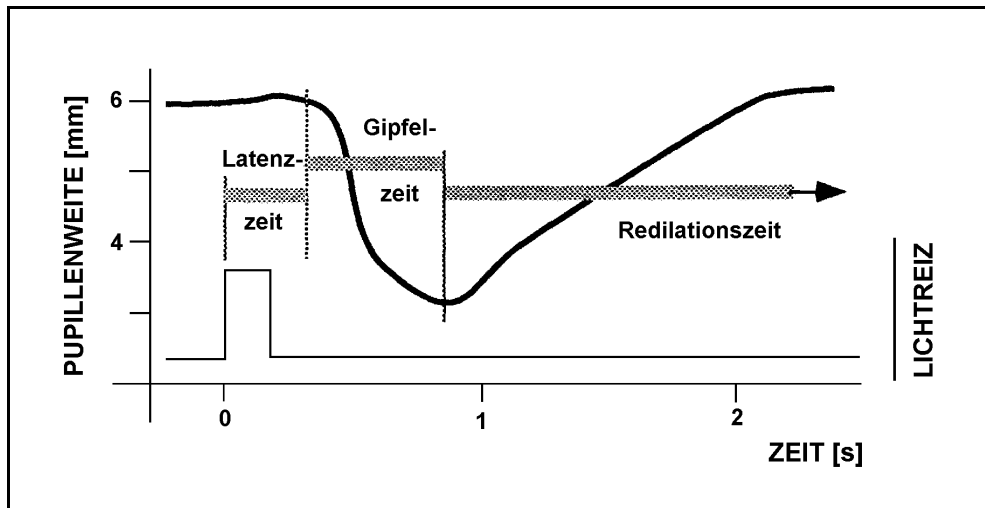


Abb.8.3.2: Pupillogramm [Wilhelm, 1991]

Die Redilatationszeiten sind inter- und intraindividuell sehr variabel, deshalb wird meist die konstantere partielle Redilatationszeit angegeben. Es handelt sich dabei um die Zeitspanne, in der die Pupille 63 % oder 75 % ihrer Ausgangsweite erreicht hat. Für diesen Anteil gibt es noch keine Norm.

8.3.3.3. Begriffserklärungen

Latenz

Die Latenz ist die Zeitspanne zwischen Lichtreiz und dem Beginn der Pupillenkonstriktion und ist abhängig von der Helligkeit des Lichtstimulus. Sie beträgt bei hellem Stimulus 0,2 Sekunden, bei schwelennahem Stimulus bis 0,5 Sekunden [Cibis, 1977]. Die Latenzzeit läßt sich nur pupillographisch bestimmen.

Kontraktionsgeschwindigkeit

Die Geschwindigkeit, mit der sich die Pupille auf einen Lichtreiz hin kontrahiert, ist sehr variabel. Normalerweise dauert es vom Beginn der Pupillenkonstriktion an etwa 0,5 Sekunden, bis der Sphincter aus größtmöglicher Mydriasis im Dunkeln seinen maximalen Kontraktionszustand erreicht (Gipfelzeit im Pupillogramm) [DriscHEL, 1957].

Dieser Wert ist sehr variabel, er kann unter gleichen Meßbedingungen interindividuell zwischen 0,26 und 0,7 Sekunden variieren.

Ein Problem, mit dem man immer wieder konfrontiert wird, ist die große natürliche inter- und intraindividuelle Variabilität aller pupillographischen Parameter.

8.3.3.4. Gerätebeschreibung

Gerät:

modifizierter Infrarot-Pupillograph CIP 900, Amtech, Weinheim

CCD-Infrarot-Teilkamera (880 nm)

Auflösung: 0,01 mm

Meßfrequenz: 250 Hz (entspricht 500 Meßpunkte)

Meßdauer: 2 Sekunden

Stimulusfarbe: weiß

Stimulusdauer: 0,1 Sekunde

Stimulusintensität: 104 cd/m²

Auswertung:

Software: Origin 3.5

Meßfehler wurden manuell korrigiert.

Bei diesem Pupillographen handelt es sich um ein hochpräzises Meßgerät zur Aufzeichnung und Auswertung von Pupillen- und Augenbewegungen.

Der direkte Pupillenreflex auf kurzdauernde Einzelreize kann bestimmt werden (Abb. 8.3.3.). Die CCD-Infrarot-Teilkamera bestimmt aufgrund der unterschiedlichen Reflektivität von Iris und Pupille den Pupillendurchmesser mit einer Auflösung von 0,01 mm und einer Meßfrequenz von 250 Hz über einen Zeitraum von 2 Sekunden.

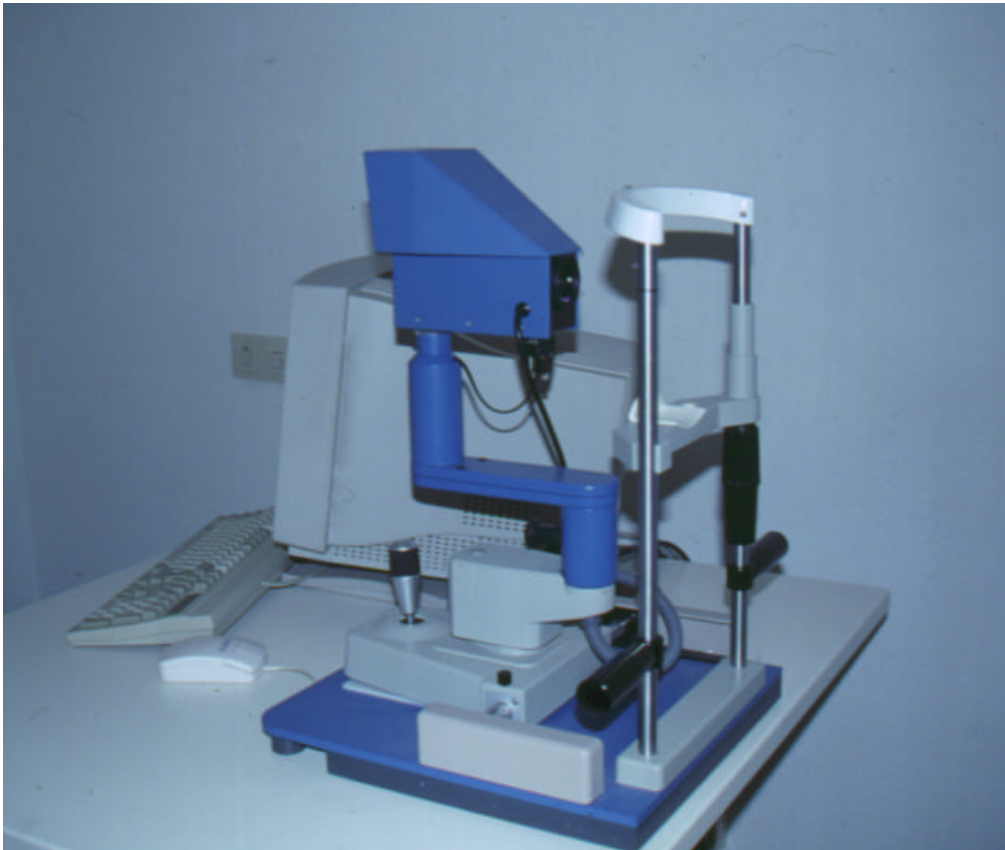


Abb.8.3.3: Infrarot-Pupillographen CIP 900, Amtech, Weinheim [Foto: Dinslage]

Das Gerät besteht aus einem integrierten Computer und einem Meßkopfsystem.

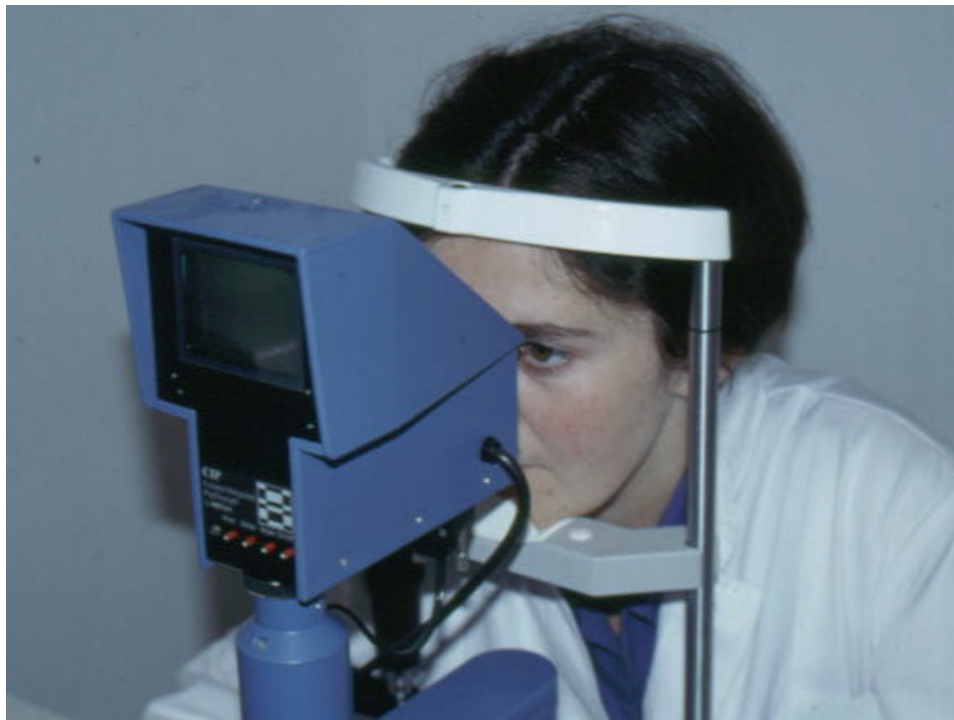


Abb.8.3.4: Anwendung des Infrarot-Pupillographen CIP 900 [Foto: Dinslage]

An der Vorderseite des Meßkopfes befindet sich die Öffnung der Meßoptik. Abb. 8.3.5. zeigt den modifizierten Meßkopf mit den dreieckig angeordneten Infrarotlichtquellen (graublau LED: nicht sichtbare IR-Lichtquellen (880 nm) zur Beleuchtung des Auges), der zentralen Meßoptik und der LED Reizlichtquelle in der 6 Uhr Position (klare LED: unterschiedliche Stimulusfarben (blau, gelb, weiß) möglich).

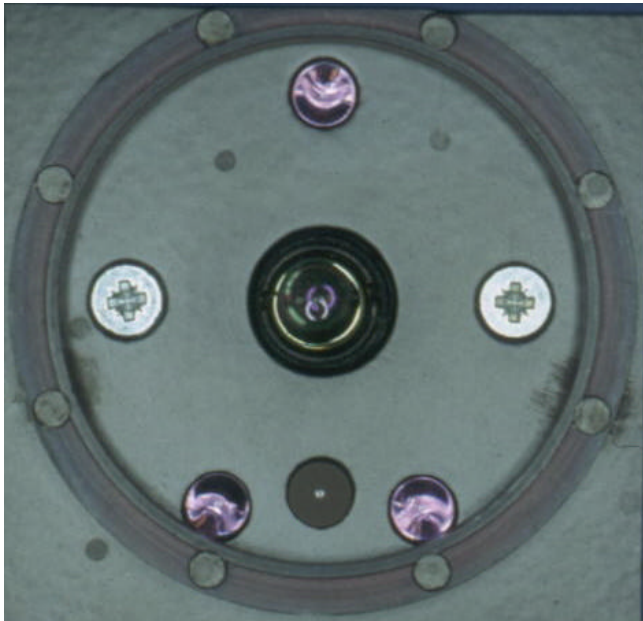


Abb.8.3.5:
Meßkopf des Infrarot-Pupillographen
CIP 900 [Foto: Dinslage]

Die Stimulusdauer ist von 0,1 bis 2,0 Sekunden frei wählbar, der Lichtreflex wird dabei für die Dauer von 2 Sekunden aufgezeichnet. Die maximale Helligkeit des Stimulus entspricht dabei 104 cd/m^2 .

Wird ein Pupillensignal vom Detektor erkannt, erscheinen 2 Balken entlang einer Meßlinie und markieren die Pupillenränder. Diese werden positionsrichtig in ein Videobild eingeblendet. Das Meßgerät sucht die Ränder automatisch. Die Balken folgen der Pupillen- und Augenbewegung exakt und ermöglichen eine korrekte Messung auch bei unruhigen Patienten. Zusätzlich erscheinen runde IR-Reflexe auf der Hornhaut, an denen die Schärfe des Bildes erkennbar und einstellbar ist.

Das Meßgerät beinhaltet vier verschiedene Meßmodi:

- 1.) Messung der Pupillenreaktion auf einen optischen Reiz. Dabei werden unter anderem die Latenz der Reaktion, Modulationstiefe, Zeitpunkt der maximalen Kontraktion sowie verschiedene automatisch berechnete Geschwindigkeiten zusammen mit dem Anfangswert des Pupillendurchmessers zu Beginn der Messung angezeigt.
- 2.) Messung der spontanen Pupillenbewegung, zum Beispiel zur Kontrolle der Vigilanz (Wachsamkeit; Fähigkeit, das Auge auf einen neuen Punkt zu fixieren [Pschyrembel, 1990])
- 3.) Messung des Nystagmus (Augenzittern, unwillkürliche Augenbewegungen [Pschyrembel, 1990])
- 4.) Messung von Sakkaden (ruckartige Augenbewegungen, z.B. beim Blickwechsel [Pschyrembel, 1990])

Relevant für die Studiendurchführung zur Untersuchung der Pharmakologie der Wirkstoffe aus ophthalmischen Lyophilisaten im Vergleich zu Augentropfen war allerdings nur der erste Meßmodus.

Die Auswertung des Pupillenreflexes erfolgt automatisch. Für jede Messung werden 38 Daten angegeben bzw. berechnet. Einzelne Meßphasen werden zum besseren Verständnis in der Grafik 8.3.6. dargestellt.

1. Auswertfehler	Bewertung der Messung; Messung O.K., Buchstaben A bis J, Plausibilitätsüberprüfung der Meßergebnisse: der Bediener wird auf unlogische Meßergebnisse hingewiesen (Artefakte, Lidschläge, schlechte Einstellung, etc.); Meßergebnisse auch ohne 'Messung O.K.' sind ganz oder teilweise richtig, allerdings ist eine Überprüfung notwendig
2. Amplitude	Amplitude der Kontraktion [mm], maximale Änderung des Pupillendurchmessers
3. Y-Achsenab_Plat	Y-Achsenabschnitt einer Geraden, die durch das 1. Plateau gelegt wird [mm]
4. Steigung_Plat	Steigung dieser Geraden [mm/s]
5. PlatInterv_Anf	Intervallanfang, in dem die Plateaugerade definiert wird [s]
6. PlatInterv_Ende	Intervallende [s]

7. Y-Achsenab_Kont	Y-Achsenabschnitt einer Geraden, die durch das Kontraktionsintervall gelegt wird [mm]
8. Steigung_Kont	Steigung dieser Geraden (Kontraktionsgeschwindigkeit) [mm/s]
9. KontInterv_Anf	Intervallanfang der Kontraktion [s]
10.KontInterv_Ende	Intervallende der Kontraktion [s]
11.Y-Achsenab_Dil1	y-Achsenabschnitt einer Geraden, die durch die 1. Phase der Dilation gelegt wird [mm]
12.Steigung_Dil1	Steigung dieser Geraden (1. Dilationsgeschwindigkeit) [mm/s]
13.Dil1Interv_Anf	Intervallanfang 1. Phase [s]
14.Dil1Interv_Ende	Intervallende 1. Phase [s]
15.Y-Achsenab_Dil2	y-Achsenabschnitt einer Geraden, die durch die 2. Phase der Dilation gelegt wird [mm]
16.Steigung_Dil2	Steigung dieser Geraden 2. Dilationsgeschwindigkeit [mm/s]
17.Dil2Interv_Anf	Intervallanfang 2. Phase [s]
18.Dil2Interv_Ende	Intervallende 2. Phase [s]
19.Am_Anfang	Pupillendurchmesser zu Beginn der Messung [mm]
20.Min_erreicht	zu diesem Zeitpunkt wurde ein Minimum erreicht [s]
21.Latenz	Reaktionszeit [s]; Zeit vom Stimulusbeginn (=Meßbeginn) bis zum Beginn der Pupillenreaktion
22.Stimulus_Intens	Intensität des Lichtreizes: 248,000 [cd]
23.Stimulus_Start	zeitlicher Beginn des Lichtreizes: 0,000 [s]
24.Stimulus_Ende	Dauer des Lichtreizes: 0,200 [s]
25.Reaktionsdauer	Zeit vom Reaktionsbeginn bis zum Erreichen des minimalen Durchmessers
26.Stimulusquelle	intern
27.AmplRel	relative Amplitude
28.Uhrzeit	Angabe der aktuellen Uhrzeit
29.Datum	Angabe des aktuellen Datums
30.Messmodus	Angabe des verwendeten Messmodi
31.CIPVersion	verwendete Software-Version
32.FileName	Dateibezeichnung der abgespeicherten Messung
33.Sub_Type	Bezeichnung der untersuchten Person (Buchstabe)
34.Sub_Nr	Bezifferung der untersuchten Person
35.Sitzung	Numerierung der Untersuchungen
36.Auge	Angabe rechtes oder linkes Auge

37.Farbe	Farbe des verwendeten Stimuli
38.Mess_Nr	Anzahl der vom gleichen Typ durchgeführten Messungen

Folgende Angaben der erhaltenen Messungen waren von besonderem Interesse:

- *Bewertung der Messung*
- *Anfangsamplitude*
- *Amplitude*
- *Relative Amplitude*
- *Latenz*
- *Kontraktionsgeschwindigkeit*

Die Messungen müssen immer auf ihre Plausibilität geprüft werden. Abweichungen sind möglich.

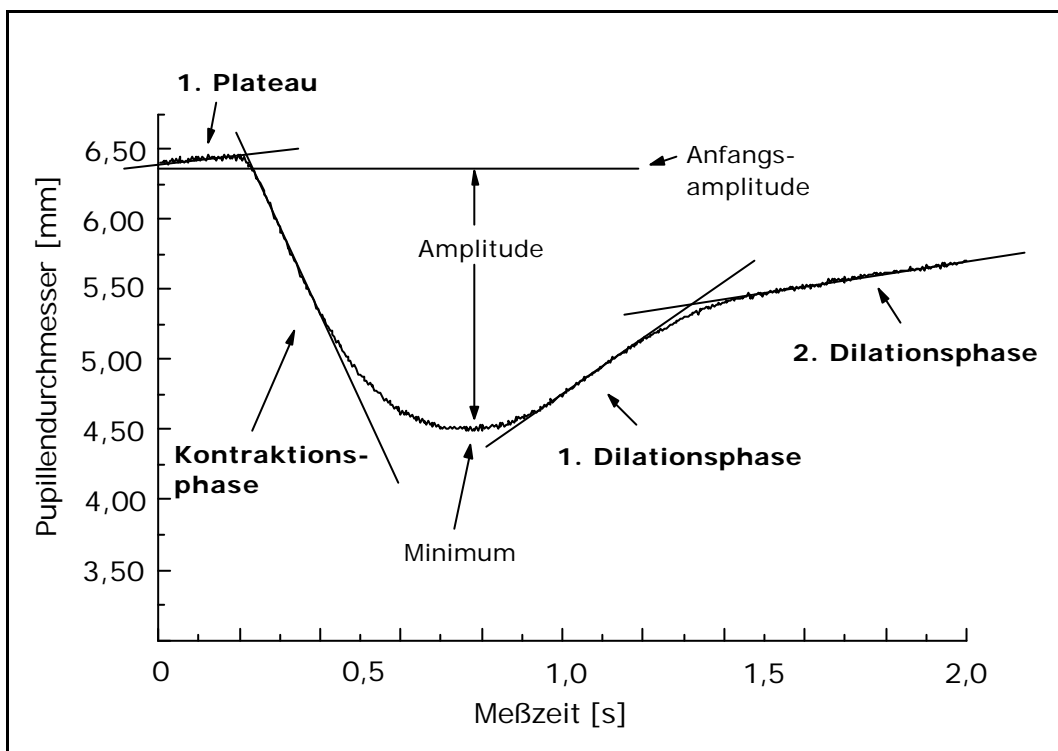


Abb.8.3.6: Darstellung einer Pupillenreaktion auf einen Lichtblitz mit den wesentlichen, vom Pupillographen erfaßten Daten

8.3.4. Fluorophotometrie

8.3.4.1. Allgemeines

Das vordere Augensegment besitzt vier durchsichtige Gewebe bzw. Flüssigkeiten: Tränenfilm, Cornea, Linse und Kammerwasser. Diese können durch direkte Beleuchtung mit Hilfe einer optischen Vorrichtung gut betrachtet werden.

Prinzipiell wird die Fluorophotometrie verwendet, um die Fluoreszenz-Intensitäten in den oben erwähnten Medien zu messen. Fluorescein-Konzentrationen, die sich abhängig von Gewebeporosität, Diffusionsgeschwindigkeiten und Abflußraten verändern, können mit Hilfe dieser Methode über einen längeren Zeitraum verfolgt werden.

Die lokale Applikation erfolgt meist über die Instillation einer Fluorescein-Lösung in den Bindehautsack, da dies im Rahmen der klinischen Anwendung problemlos ist. Der Farbstoff diffundiert in die Vorderkammer, aus der er in erster Linie durch den Kammerwasserfluß eliminiert wird.

Fluorescein-Moleküle passieren das Hornhautendothel interzellulär [Maurice 1960]. Der Umfang ihrer transendothelialen Permeation ist somit in erster Linie von dem Durchmesser und der Anzahl der zur Verfügung stehenden interzellulären Kanäle abhängig (s.a. Kap. 2.2.). Die Fluorescein-Permeabilität gibt daher quantitativ Auskunft über die passive endotheliale Barrierefunktion [Mishima, 1971].

Während dieses Vorgangs wird dann die photometrisch beobachtete Fluorescein-Umverteilung in der Hornhaut und in der Vorderkammer z.B. auf der Basis des Zweikammermodells zur Berechnung sogenannter Transferkoeffizienten herangezogen. Außerdem bietet die Fluorophotometrie dem Kliniker die Möglichkeit einer nicht invasiven Bestimmung des Kammerwasserabflusses, ohne eine gleichzeitige Beeinflussung des intraokulären Druckes [Schalnus, 1988].

Die pharmakologischen und pharmakokinetischen Einzelheiten können in der gängigen Literatur nachgeschlagen werden, z.B. in Brubaker [1990], Zeimer [1990] und Schalnus [1988].

8.3.4.2. Gerätebeschreibung

Mit diesem computergesteuerten Gerät können eindimensionale Fluoreszenz-Profile durch alle optischen Medien des Auges erstellt werden.

Gerät:

Fluorotron® Master, Coherent Inc., Palo Alto, CA

bestehend aus Computer und Photometer,

Lichtquelle: 5 V-Wolfram-Quarzhalogenlampe (Farbtemperatur: 2750 K)

Detektor: Photomultiplier - Kathodenröhre

Filter lichtquellenseitig: 2 Filter: Transmissionsmaximum bei 469 nm

Filter detektorensseitig: 2 Filter: Transmissionsmaximum bei 514 nm

Ungenauigkeit: Lösungen mit einer Fluorescein-Konzentration über 5 ng/ml: 3 %

Empfindlichkeit: 0,1 ng/ml

Spannweite der noch meßbaren Fluorescein-Konzentration: 0,1 ng/ml - 10.000 ng/ml

Einsatz eines Vorderkammeradapters:

Spaltbild: 0,05 mm (breit) x 0,85 mm (hoch)

axiale Spannweite: 9,4 mm

axiale Auflösung: 0,35 mm

kleinstmögliche Schrittweite: 0,15 mm

Anzahl axialer Meßpunkte: 148

benötigte Zeit für eine axiale Messreihe: 12 Sekunden

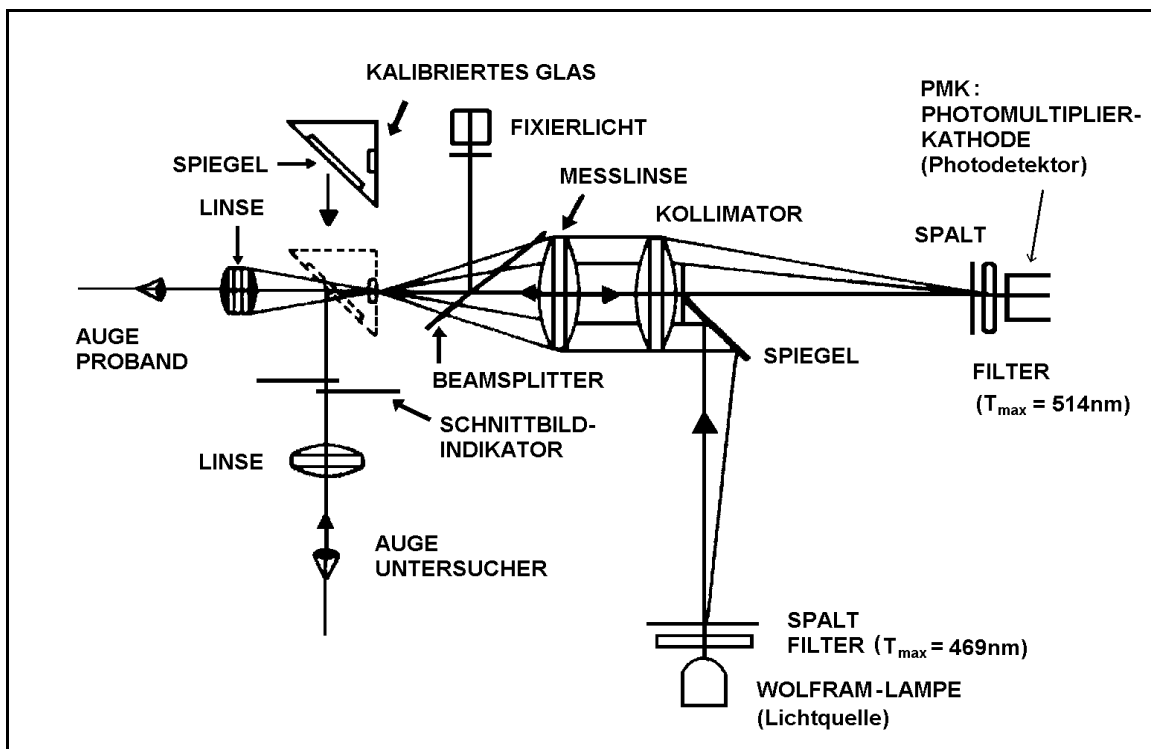


Abb.8.3.7: Strahlengang im Fluorophotometer [nach: Zeimer, 1990]

Durch variable Kinn- und Stirnstützen wird der Kopf der Probanden und somit das zu untersuchende Auge optimal zur Photometeroptik positioniert. Während der Messung selbst fixiert der Proband durch die Optik hindurch ein rotes Leitlicht. Verwendet wird ein spezieller Vorderkammeradapter, um die Auflösung des vorderen Augensegmentes zu verbessern.

Im Verlauf einer Messung bewegt sich der Schnittraum auf einer Achse von der Retina weg. Auf diese Weise werden bei einer kontinuierlichen 12 Sekunden dauernden Messung mit einer Schrittweite von 0,15 mm 148 Meßpunkte registriert. So gewinnt man ein eindimensionales Profilbild der vorhandenen Fluoreszenz-Intensität im vorderen Augenabschnitt entlang dieser Achse.

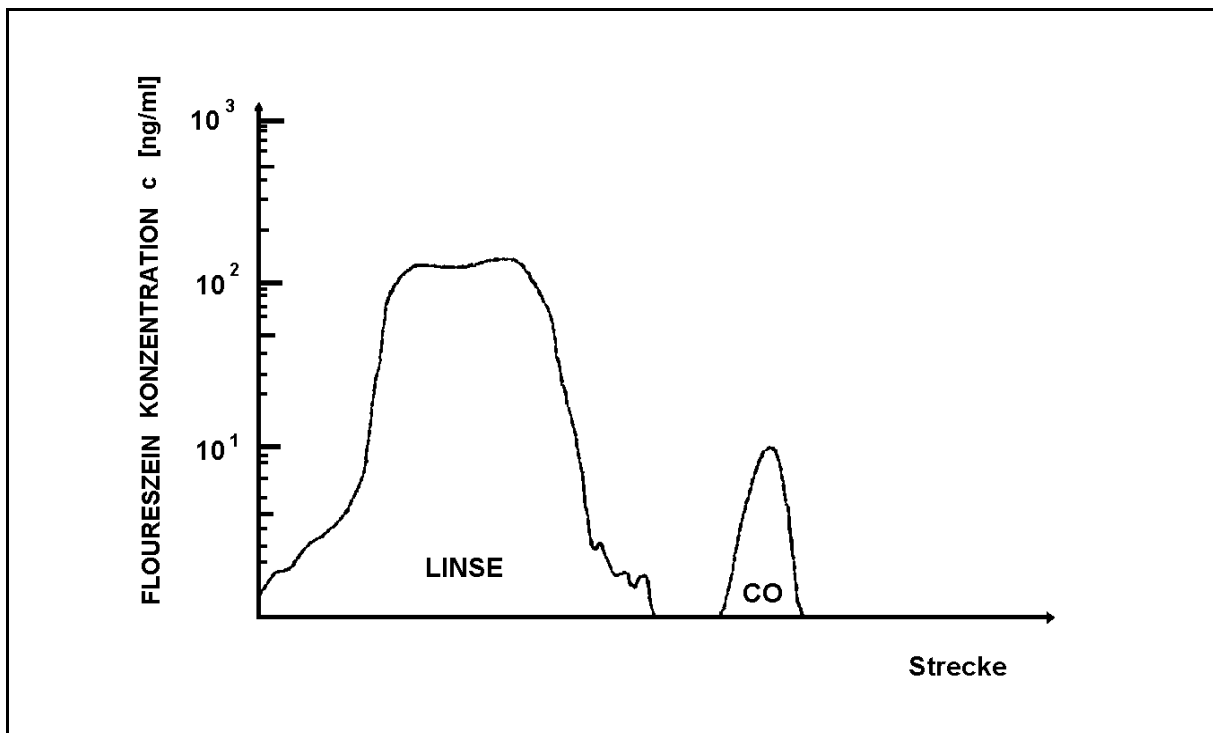


Abb.8.3.8: Fluoreszenz-Messung durch das vordere Augensegment, Eigenfluoreszenz von Linse und Cornea (CO, Leerwertmessung mit dem Fluorophotometer) [nach: Schalnus, 1988]

Vor Applikation des Fluoresceins ist nur die Eigenfluoreszenz der Hornhaut (CO) und der Linse erkennbar, während die Vorderkammer praktisch keine Eigenfluoreszenz zeigt (s. Abb. 8.3.8.). Im gesunden Auge liegt die Eigenfluoreszenz der Linse um etwa eine Zehnerpotenz über derjenigen der Cornea.

Bereits eine Stunde nach der Applikation einer Fluorescein-Lösung findet sich eine erhebliche Zunahme der Fluoreszenz-Intensität in Hornhaut und Kammerwasser (s. Abb. 8.3.9.). Ersteres ist durch die Anreicherung von Fluorescein im Corneastroma bedingt, letzteres durch die Zunahme von Fluorescein im Kammerwasser, das nach einer Endothelpassage in die Vorderkammer übertritt.

Neben der im Vergleich zum Kammerwasser etwa um eine Zehnerpotenz höheren Fluoreszenz der Hornhaut fällt insbesondere die deutliche Zunahme der Fluorescein-Konzentration im Kammerwasser auf, die sich erstmals etwa eine halbe Stunde nach Beendigung der lokalen Verabreichung der Fluorescein-Tropfen nachweisen läßt. Ein Maximum der Fluorescein-Konzentration ist in der Hornhaut normalerweise nach einer Stunde und im Kammerwasser nach zwei Stunden erreicht.

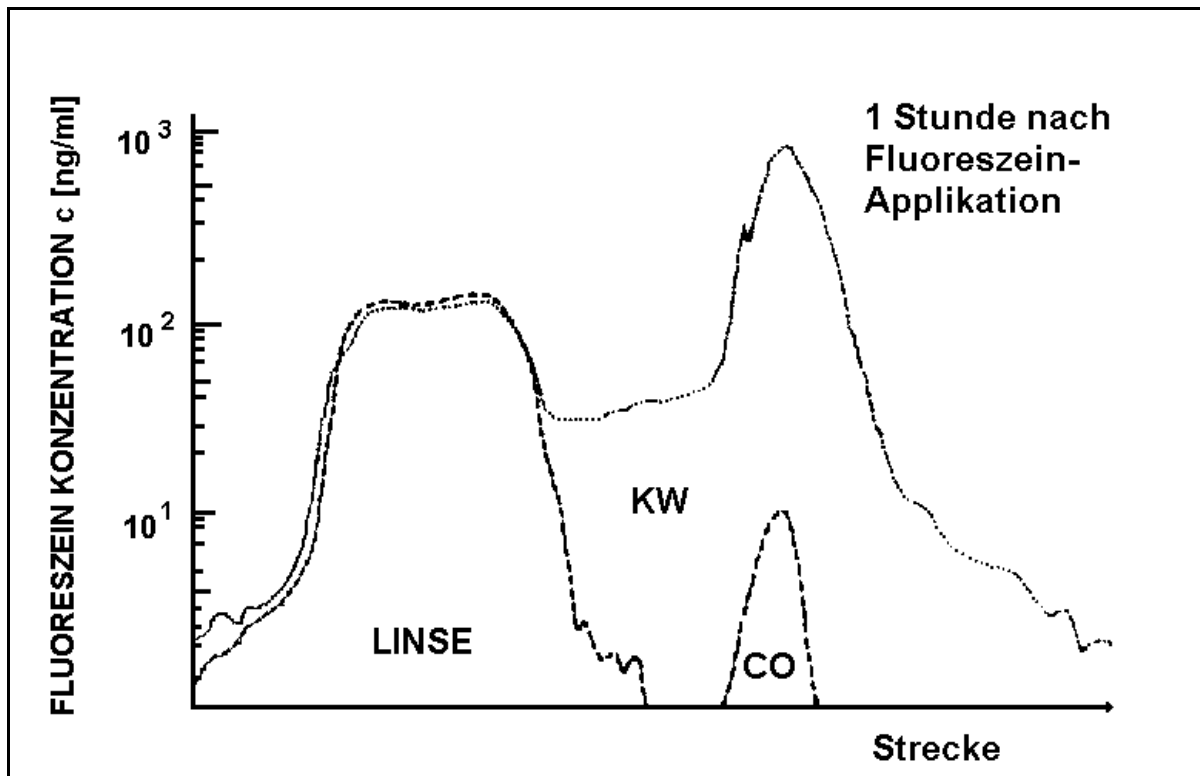


Abb.8.3.9: Fluoreszenz-Messung durch das vordere Augensegment eine Stunde nach lokaler Fluorescein-Applikation (KW: Kammerwasser, CO: Cornea); zum Vergleich ist das Ergebnis der Leerwertmessung ebenfalls dargestellt [nach: Schalnus, 1988]

Bei gesunden Augen ergeben sich für das Hornhautstroma Fluorescein-Konzentrationen zwischen 700 und 3500 ng/ml und für das Kammerwasser zwischen 30 und 500 ng/ml [Schalnus, 1988].

8.4. Untersuchung der Arzneistofffreisetzung von Lyophilisaten an gesunden Probanden im Vergleich zu konventionellen Augentropfen

- Methoden

In einer bereits 1995 durchgeführten Studie konnte an 32 gesunden Probanden gezeigt werden, daß sich wirkstofffreie Lyophilisate (Polymer: Methocel E4M, ein Lyophilisat enthielt 0,125 mg HPMC E4M) in ihrer Verträglichkeit nicht signifikant von handelsüblicher künstlicher Tränenflüssigkeit unterschieden [Grunthal, 1996].

Basierend auf dieser Erfahrung wurden weitere Studien geplant, die neue Erkenntnisse über die pharmakologischen Wirkungen arzneistoffhaltiger Xerogele im Vergleich zu Tropfen liefern sollten.

In der Augenklinik der Universität in Köln wurden unter ärztlicher Leitung von Diestelhorst klinische Studien über die Wirkung von pilocarpin-, tropicamid- und fluoresceinhaltigen Lyophilisaten durchgeführt und mit konventionellen Augentropfen verglichen. Die Studien wurden bei der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln beantragt und genehmigt (s. Anlagen B und E).

8.4.1. Verträglichkeit und Verlauf pharmakologischer Effekte von Pilocarpinhydrochlorid

In der ersten Studie wurde Pilocarpinhydrochlorid als Modellarzneistoff gewählt. Aufgrund dessen bereits langjährigem erfolgreichen Einsatz als Antiglaukom-Mittel (nähere Einzelheiten s. Kap. 8.2.1.) waren Stabilität, Pharmakokinetik und Metabolismus ausführlich untersucht. Das Auftreten unbekannter Nebenwirkungen konnte somit ausgeschlossen werden. Die Risikofaktoren sind bekannt und wurden auf ein Minimum reduziert. Zusätzlich ist Pilocarpinhydrochlorid analytisch leicht quantifizierbar.

Pilocarpin senkt nicht nur sowohl bei kranken als auch bei gesunden Personen den Augeninnendruck. Zusätzlich wirkt es als Parasympathomimetikum auf die Pupillenweite, da diese Ringmuskeln sympathisch und parasympathisch innerviert werden können. Die Veränderung des Pupillendurchmessers unter Pilocarpineinfluß kann leicht und schmerzfrei ohne großen Aufwand bei einer Person bestimmt werden (s. Kap. 8.3.2.).

Bei dieser Studie wurden die Pupillenreaktionen der Probanden in Abhängigkeit von der Zeit erfaßt und ausgewertet (s. Kap. 8.3.3.).

Lyophilisate und Augentropfen

Test

Die aseptische Herstellung der Lyophilisate wurde bereits in Kapitel 6 beschrieben. Die Testzubereitung war theoretisch folgendermaßen zusammengesetzt:

Inhaltsstoff	Ausgangslösung	Lyophilisat
HPMC E50	1,0 %	0,250 mg
Pilocarpinhydrochlorid	1,2 %	0,300 mg
gereinigtes Wasser	ad 100 %	-
Gesamtgewicht	100 %	0,550 mg

Tab.8.4.1: Zusammensetzung der Testzubereitung

Der Berechnung der Pilocarpin-Konzentration in einem einzelnen Lyophilisat wurde zugrunde gelegt, daß ein Tropfen des Handelspräparates einem Gewicht von 30 mg entspricht.

Als Träger wurde handelsübliches PTFE Gewindeband nach DIN DVGW 90.01e828 verwendet.

Referenz

Isopto[®]-Pilocarpin-Augentropfen 1 %, Alcon-Thilo, Freiburg, Deutschland

Charge: 97D15

Die Lösung enthielt 1,0 % Pilocarpinhydrochlorid und 0,01 mg/ml Benzalkoniumchlorid als Konservierungsmittel in gepufferter Lösung. Die experimentell ermittelte Durchschnittsmasse eines Tropfens lag zwischen 30,4 mg ($n = 250$, $s \pm 1,67$ mg) und 36,0 mg ($n = 227$, $s \pm 4,11$ mg) (s.a. Kap. 5).

Probandenauswahl

16 gesunde Probanden beider Geschlechter zwischen 22 und 57 Jahren (Altersdurchschnitt: 28 ± 8 Jahre Standardabweichung) wurden in die Studie aufgenommen.

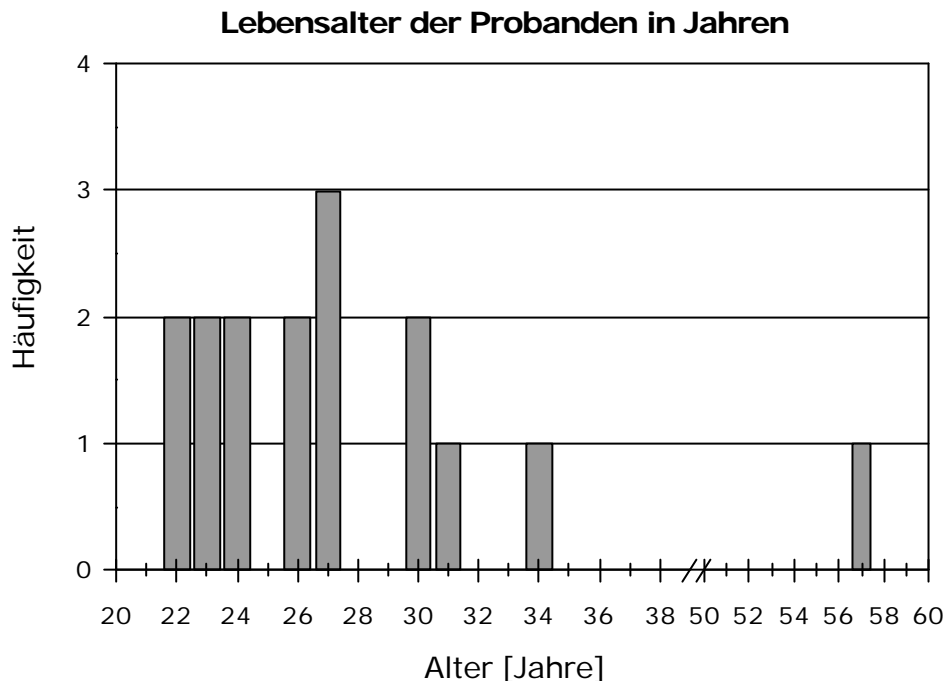


Abb.8.4.2: Altersstruktur der Probanden bei der Pilocarpin-Studie

Dabei handelte es sich um 9 weibliche und 7 männliche Teilnehmer. Die Charakteristika der Probanden sind in der Tabelle 8.4.3. zusammengefaßt.

Bei zwei Personen handelte es sich um Raucher. Vier Probandinnen nahmen zur Zeit der Studie Kontrazeptiva ein. Fünf Probanden gaben eine saisonabhängige Heuschnupfenallergie an, ein Proband eine Katzenhaarallergie. Dies wurde jedoch als unkritisch beurteilt, da die Studie im Spätherbst durchgeführt wurde und kein Teilnehmer Anzeichen einer allergischen Reaktion zeigte. Eine Probandin litt im Kindesalter unter Neurodermitis. Das Krankheitsbild war jedoch seit mehreren Jahren nicht mehr aufgetreten. Eine Probandin gab einen leichten Husten im Rahmen einer abgeklungenen Erkältung an, der sich während des Beobachtungszeitraums allerdings nicht bemerkbar machte.

Bei einer Probandin wurde bei der augenärztlichen Untersuchung am linken Auge eine Amblyopie (Schwachsichtigkeit des Auges) festgestellt.

Proband	Geschlecht	Augenfarbe	Alter	Proband	Geschlecht	Augenfarbe	Alter
S21	w	blau	23	S29	w	blau	24
S22	m	braun	30	S30	w	braun	23
S23	w	blau	27	S31	w	blau-grün	22
S24	m	braun	27	S32	m	braun-grün	32
S25	w	grau-grün	27	S33	w	blau	22
S26	m	braun	24	S34	w	blau	26
S27	m	braun-grün	33	S35	w	blau	26
S28	m	blau	30	S36	m	blau	57

Tab.8.4.3: Eigenschaften der Probanden, Pilocarpin-Studie; w: weiblich, m: männlich

Vor der Studie wurden die Probanden in einem Aufklärungsbogen (siehe Anhang B) und von dem zuständigen Arzt über die Intension, Durchführung und Risiken der Studie aufgeklärt und über ihren derzeitigen Gesundheitszustand befragt. Zusätzlich mußte ein Anamnesebogen ausgefüllt werden, um das Risiko zu minimieren, daß während der Studie unvorhergesehene Komplikationen auftreten.

Als Ausschlußkriterien wurden folgende Punkte aufgeführt:

- Minderjährige
- Schwangere oder Stillende
- Diabetiker
- Kontaktlinsenträger (evtl. reduzierte Empfindlichkeit)
- Teilnahme an einer Studie innerhalb der letzten 4 Wochen
- Operationen am Auge innerhalb der letzten 3 Monate
- akute Allgemeinerkrankungen
- Klaustrophobie oder Beklemmungsgefühle in engen, dunklen Räumen
- akute oder chronische Veränderungen des Auges oder der angrenzenden Gesichtspartie
- schwere akute oder chronische Allergien
- gleichzeitige Einnahme anderer Arzneimittel mit Ausnahme oraler Kontrazeptiva
- Anwendung von Augenarzneien

Die Probanden mußten ihr schriftliches Einverständnis zu dieser Studie geben. Weibliche Probanden bestätigten zusätzlich, daß bei Ihnen zum Zeitpunkt der Studie eine Schwangerschaft mit Sicherheit ausgeschlossen war.

Studiendesign

Das Studiendesign wurde von der bereits oben erwähnten, vorhergehenden Studie übernommen [Grunthal, 1996]. Bei dieser Studie handelte es sich um einen randomisierten Cross-over-Vergleich am rechten und am linken Auge eines jeden Probanden. Nach einem vorgegebenen Versuchsschema wurden Test- und Referenz-Zubereitung unmittelbar aufeinander in das jeweilige Auge appliziert.

Um lokale oder temporale Einflüsse (linkes oder rechtes Auge, Reihenfolge von Test- und Referenz-Präparat) bei der Applikation möglichst auszuschließen, wurden die Teilnehmer nach einem 2²-Versuchsdesign eingeteilt:

Faktor	Niveau	Reihenfolge	
		1. Auge	2. Auge
A (Zeitsequenz)	+	Test	Referenz
	-	Referenz	Test
B (Ortssequenz)	+	rechts	links
	-	links	rechts

Tab.8.4.4: 2²-Design zur Randomisierung [nach Grunthal, 1996]

‘+’: hohes Niveau, ‘-’: niedriges Niveau;

Test: Lyophilisat, Referenz: Augentropfen

Aufgrund folgender Matrix

Faktor B	(+)	b	ab
	(-)	0	a
		(-)	(+)
		Faktor A	

ergab sich ein entsprechendes Behandlungsschema:

Behandlung (2 ² -Design)	Zeitsequenz (Reihenfolge der Applikation)	Ortssequenz (Reihenfolge der Augen)	Behandlungs- weise	Zuordnung zu einem Block
0	R / T	links / rechts	1. links Referenz 2. rechts Test	A
a	T / R	links / rechts	1. links Test 2. rechts Referenz	B
b	R / T	rechts / links	1. rechts Referenz 2. links Test	C
ab	T / R	rechts / links	1. rechts Test 2. links Referenz	D

Tab.8.4.5: Randomisierung nach 2²-Faktoren-Versuchsplan [nach Grunthal, 1996]

R: Referenz, T: Test

Die Zuordnung der Probanden zu den vier Blöcken wurde nach dem Prinzip eines 'Lateinischen Quadrates' vorgenommen:

A	B	C	D
B	C	D	A
C	D	A	B
D	A	B	C

Die Probanden wurden den Blöcken entsprechend ihrer zeitlichen Teilnahme zugeordnet, die zufällig erfolgte. Die Folge wurde reihenweise von oben links nach unten rechts festgelegt.

Da nach Abschluß einer Studie aus dem Datenmaterial für Außenstehende nicht mehr ersichtlich sein darf, um welche Personen es sich handelte, wurden die Probanden bei der Auswertung nicht namentlich erwähnt, sondern verschlüsselt.

Ablauf der Studie

Der zeitliche Ablauf verlief für alle Studienteilnehmer gleich. Am Tag der Studie durften morgens keine koffeinhaltigen Getränke zu sich genommen werden. Damit starke Raucher während der langen Studiendauer von 7 bis 8 Stunden keine Entzugssymptome entwickelten, wurde ihnen das Rauchen erlaubt.

Die Eingangsuntersuchung vor Beginn der Studie umfaßte folgende Schritte:

1. Ausführliche Befragung zur gesundheitlichen Vorgeschichte unter besonderer Berücksichtigung der Augen; augenärztliche Untersuchung mit der Spaltlampe vor Studienbeginn, um mögliche Risiken und Ausschlußkriterien zu ermitteln.
2. 10 minütige Dunkeladaptation (Aufenthalt in einem abgedunkelten Raum).
3. Leermessung der Pupillenreaktion mit Pupillograph (Pupillenreaktion auf Lichtblitz).
4. Messung der Brechkraft der Linsen mit einem Autorefraktometer.
5. Verabreichung der beiden Zubereitungen (je eine Zubereitung in jedes Auge) durch den die Studie leitenden Augenarzt nach dem vorgegebenen Schema.
6. Ausfüllen des Fragebogens zur Verträglichkeit der beiden Zubereitungen jeweils während der Applikation, 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min und 360 min nach der Applikation.
7. Pupillographische Messung nach vorangegangener zehn-minütiger Dunkeladaptation in folgenden Zeitabständen: vor Versuchsbeginn eine Leermessung, dann nach 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 120 min, 180 min, 240 min, 300 min und 360 min.
8. Messung der Linsenrefraktion nach 120 min, 180 min, 240 min, 300 min und 360 min.
9. Augenärztliche Abschlußuntersuchung.

Spaltlampenuntersuchung

Zu Beginn der Studien wurden die Augen der Probanden einer eingehenden Untersuchung unterzogen. Die genaue Funktionsweise des Gerätes wird in Kapitel 8.3.1. beschrieben.

Beurteilung der Verträglichkeit

Alle im Laufe der Behandlung auftretenden Nebenwirkungen subjektiven und objektiven Ursprungs wurden von dem Probanden oder Betreuer auf einem vorgefertigten Beurteilungsbogen während der Studie festgehalten. In vorgegebenen Zeitintervallen wurde die Verträglichkeit beurteilt (während der Applikation, nach 5, 10, 15, 30, 45 und 60 Minuten und zum Abschluß nach 6 Stunden). Nach Studienende mußte jeder Proband eine abschließende Beurteilung über beide Zubereitungen abgeben.

Zusätzlich wurde auf einer visuellen Analog-Skala von 0 bis 10 die Intensität der unangenehmen Empfindungen festgehalten, wobei der Wert '0' 'keinen Schmerz' bedeutete und der Wert '10' den 'größten vorstellbaren Schmerz' symbolisierte. Der Proband zeichnete ohne Angabe eines konkreten Zahlenwertes einen senkrechten Strich auf eine vorgegebene Linie.

A. Während der Anwendung (Angabe des Beurteilungszeitpunktes)**1. Wie unangenehm ist Ihnen die Anwendung?**

linkes Auge: 0 _____ 10

rechtes Auge: 0 _____ 10

2. Vergleich: An welchem Auge empfinden Sie die Anwendung stärker?**Bitte kreuzen Sie an und bewerten Sie die stärkere Empfindung auf der Visual-Analog Skala**

linkes Auge: 0 _____ 10

rechtes Auge: 0 _____ 10

3. Weitere Notizen:*Abb.8.4.6: Beurteilungsbogen*

Die Beantwortung der zweiten Frage diente noch einmal zur Bestätigung der Antwort auf die erste Frage.

Die Berechnung der Reizscores ergab sich aus folgendem Verfahren:

Die Länge des Striches der VA-Skala betrug genau 10,0 cm. Der Abstand zwischen dem Beginn der Skala und der Markierung des Probanden wurde manuell vermessen und ein Wert anhand einer Gleichung ausgerechnet:

Definition Reizscore:

$$R = \frac{l}{l_{ges}} \quad \text{Gl. 8.1}$$

R: Reizscore

l: eingetragene Länge des Probanden auf der VA-Skala [cm]

l_{ges}: Gesamtlänge der VA-Skala [cm]

Um beide Zubereitungen direkt miteinander vergleichen zu können, wurde eine Reizscoredifferenz berechnet:

Definition Reizscoredifferenz:

$$\Delta R = R_T - R_R \qquad \text{Gl. 8.2}$$

DR: Reizscoredifferenz
R_T: Reizscore der Testzubereitung
R_R: Reizscore der Referenzzubereitung

Diese Reizscoredifferenzen nahmen lediglich Werte zwischen - 1 und + 1 an. Anhand dieser berechneten Werte konnte die Verträglichkeit statistisch ausgewertet werden. Zusätzlich wurde der Verlauf der mittleren Reizscores beider Zubereitungen einschließlich ihrer Standardabweichungen graphisch beschrieben.

Bestimmung der Wirkungsintensität und Dauer

Pilocarpin beeinflusst als Parasympathomimetikum den Pupillendurchmesser. Zusätzlich verändert es die Brechungseigenschaften der Linse (s. Kap. 8.2.1.).

Um eine Aussage über die Wirkung zu erhalten, wurden deshalb zwei Meßmethoden zu Hilfe genommen. Bei der einen Methode handelte es sich um die Pupillographie (s. Kap. 8.3.3.), bei der zweiten um die Refraktometrie (s. Kap. 8.3.2.). Die Vorteile dieser Methoden ist ihr völlig schmerzloser Einsatz und ihre einfache Handhabbarkeit ohne die Verwendung zusätzlicher Medikamente, wie das bei der Bestimmung des Augeninnendruckes der Fall gewesen wäre.

Pupillographie

Miotische Aktivität

Um die pharmakologischen Effekte des Wirkstoffes am Auges und damit die Wirkungsdauer der Zubereitung zu bestimmen, wurden die miotischen Reaktionen der Pupillen auf einen kurzen, künstlich erzeugten Blitz gemessen. Die Pupillengröße wurde anhand eines modifizierten, computergesteuerten Pupillographen CIP 900 (Amtech GmbH, Weinheim, Deutschland) bestimmt. Die genaue Funktionsweise und das Meßprinzip dieses Gerätes wird in Kapitel 8.3.3. im Einzelnen erläutert.

Die Pupillenreaktionen beider Augen wurden vor der Applikation und in gewissen Intervallen danach (15, 30, 45 und 60 Minuten und im Stundenintervall bis zu 6 Stunden nach der Gabe) aufgenommen.

Vor den Messungen wurden die Personen jeweils 10 Minuten in einem völlig abgedunkelten Raum adaptiert. Zusätzlich mußten sie über diesen Zeitraum Gesichtsmasken tragen. Ein voriger Aufenthalt in ausgesprochen hellem Licht, wie z.B. im Sonnenlicht, wurde vermieden (s.a. Kap. 8.3.3.1.).

Die Messungen wurden stets unter gleichen Belichtungsbedingungen durchgeführt. Jedes Auge eines Probanden wurde zweimal vermessen. Zwischen den einzelnen Messungen lag ein Zeitraum von mindestens 15 Sekunden, da sich die Pupille nur langsam wieder auf den Ausgangsdurchmesser erweitert [Gerätebeschreibung Amtech, Weinheim].

Zur Bewertung wurden folgende, bei den Messungen erhaltene Daten herangezogen:

- Pupillendurchmesser zu Beginn der Messung
- Amplitude der Kontraktion
- Zeitpunkt, an dem ein Minimum erreicht wird
- Reaktionszeit (Latenz)
- minimaler Pupillendurchmesser während der Kontraktion
- relative Amplitude

Die Messungen wurden auf ihre Plausibilität geprüft, Abweichungen wurden bei Bedarf manuell korrigiert. Aus beiden Messungen wurden die Mittelwerte gebildet.

Pharmakokinetik

Die sogenannte relative Amplitude diente zur Auswertung. Die Fläche unter der Kurve der relativen Amplitudenwerte wurde berechnet, um einen Hinweis über die Wirkungsintensität und Dauer zu erhalten.

Die relative Amplitude ergab sich aus dem nach dem Lichtblitz erreichten, geringsten Pupillendurchmesser, dividiert durch den zu Beginn der Messung bestehenden Pupillendurchmesser, multipliziert mit hundert.

In einer Formel zusammengefaßt resultierte daraus:

$$A_{rel}(\%) = \frac{A_{post.min}}{A_{prior}} \cdot 100 \quad \text{Gl. 8.3}$$

A_{rel} : relative Amplitude [%]

$A_{post.min}$: nach dem Lichtblitz erreichter, minimaler Pupillendurchmesser [mm]

A_{prior} : Pupillendurchmesser [mm] zu Beginn der Messung

Aus den sich daraus ergebenden Kurvenverläufen wurde die Fläche zwischen dieser Kurve und einer gebildeten Nulllinie für den kompletten Beobachtungszeitraum mit Hilfe der Trapezregel berechnet und statistisch ausgewertet. Die Fläche wurde hier als $AUC_{A_{rel}}$ bezeichnet.

Refraktometrie

Die Refraktion (Brechkraft) der Linse wurde mit einem Autorefraktometer RM-A-7000 B (TopCon, Tokyo, Japan) bestimmt. Vor und nach der Gabe pilocarpinhaltiger Zubereitungen wurde die Brechung der Linse in bestimmten Zeitabständen (nach 120, 180, 240, 300 und 360 Minuten) bestimmt. Die Messungen wurde an einem Auge mindestens drei mal durchgeführt und daraus ein Mittelwert berechnet.

Die Funktionsweise wird in Kapitel 8.3.2. genauer beschrieben.

Zur Auswertung wurden lediglich die berechneten sphärischen Korrekturen (notwendige Korrektur der Brechkraft in Dioptrien, um ein scharfes Bild auf der Netzhaut zu erzeugen) herangezogen.

Analytik

Der Arzneistoffgehalt wurde in 0,1 N HCl photometrisch bei einer Wellenlänge von 215 nm bestimmt.

Zur Bestimmung des Durchschnittsgehaltes der bei der Studie verwendeten Lyophilisate wurde von fünf Xerogelen jeweils der Pilocarpinanteil bestimmt. Dazu wurde die Spitze des PTFE-Trägers inklusive Lyophilisat in einen 10 ml Meßkolben überführt, mit 0,1 N HCl aufgefüllt und gut geschüttelt. Nach 5 Minuten wurde die Lösung vermessen. Ein Mittelwert wurde aus den Werten gebildet.

Als Vergleich wurde der Pilocarpingehalt in 10 Tropfen der Referenzlösung unter gleichen Versuchsbedingungen bestimmt.

In zwölf Fällen wurde der Arzneistoffgehalt, der nach der Applikation am Auge der Probanden auf dem PTFE-Träger zurückgeblieben ist, quantifiziert. Mit dem benutzten PTFE-Träger wurde ebenfalls nach bereits oben beschriebener Vorgehensweise verfahren.

Aus diesen Ergebnissen wurde die theoretisch maximal applizierte Pilocarpinmenge berechnet (Reanalyse), wobei als Berechnungsgrundlage jeweils der ermittelte Durchschnittsgehalt der verwendeten Charge diente.

Statistische Auswertung

Die statistische Signifikanz der Unterschiede der Visual-Analog-Werte wurde mit Hilfe des paarweisen Wilcoxon-Rangsummen-Test bestimmt [Sokal, 1987; 1995].

Zum Vergleich der mittleren Bioverfügbarkeit von Lyophilisaten im Vergleich zu Augentropfen wurde ein ANOVA-Test des Typs 'Two-factor-mixed-effect-model' (Zweifaktorielles Modell mit festen und zufälligen Effekten) herangezogen.

$$A_{ij} = \bar{A} + \mathbf{a} \times x_i + \mathbf{b} \times x_j + \mathbf{e}_j \quad \text{Gl. 8.4}$$

A_{ij} : Meßwert der Flächen

\bar{A} : Mittelwert aller Flächen unter den Zeit-Effekt-Kurven

x_i : 1,2: Formulierung, fester Effekt \mathbf{a}

x_j : 1,2,.....16: Probanden, zufälliger Effekt \mathbf{b}

\mathbf{e}_j : experimenteller Fehler

8.4.2. Verträglichkeit und Verlauf pharmakologischer Effekte von Tropicamid

In der zweiten Studie wurde Tropicamid als Modellarzneistoff gewählt. Auch dieser Arzneistoff wird seit vielen Jahren erfolgreich zur Pupillenerweiterung in der Diagnostik eingesetzt (nähere Einzelheiten s. Kap. 8.2.2.). Das Auftreten unbekannter Nebenwirkungen kann somit auch hier ausgeschlossen werden. Für diesen Wirkstoff existieren nur wenige Risikofaktoren. Tropicamid ist analytisch leicht quantifizierbar.

Tropicamid führt als Anticholinergikum u.a. zu einer Lähmung des Sphinctermuskels am Auge. Die Kontraktionsfähigkeit der Pupille läßt nach und dies kann ebenfalls anhand der Pupillographie verfolgt werden (s. Kap. 8.3.3.). Die Auswertung erfolgte analog der zuvor beschriebenen Studie (Kap. 8.4.1.).

Aufgrund der Verwendung von zwei in der Zusammensetzung unterschiedlichen Test-Lyophilisaten mußte diese Studie in zwei Teile unterschieden werden:

Lyophilisate und Augentropfen

Zur Berechnung der Tropicamidkonzentration in einem einzelnen Lyophilisat wurde zugrunde gelegt, daß ein Tropfen des Handelspräparates einem Gewicht von 30 mg entspricht.

Tropicamid-Testzubereitung 1

Die aseptische Herstellung der Lyophilisate wurde bereits in Kapitel 6 beschrieben. Die Testzubereitung 1 war theoretisch folgendermaßen zusammengesetzt:

Inhaltsstoff	Ausgangslösung	Lyophilisat
HPMC E50	1,0 %	0,250 mg
Tropicamid	0,6 %	0,150 mg
gereinigtes Wasser	ad 100 %	-
Gesamtgewicht	100 %	0,400 mg

Tab.8.4.7: Zusammensetzung der Testzubereitung 1

Als Träger wurde handelsübliches PTFE Gewindeband nach DIN DVGW 90.01e828 verwendet.

Tropicamid-Testzubereitung 2

Die Testzubereitung 2 war theoretisch folgendermaßen zusammengesetzt:

Inhaltsstoff	Ausgangslösung	Lyophilisat
Natriumhyaluronat	0,5 %	0,125 mg
Mannitol	1,0 %	0,250 mg
Tropicamid	0,6 %	0,150 mg
gereinigtes Wasser	ad 100 %	-
Gesamtgewicht	100 %	0,525 mg

Tab.8.4.8: Zusammensetzung der Testzubereitung 2

Als PTFE-Träger wurde die ungesinterte Folie von 3P GmbH verwendet.

Referenz

Mydriatikum Stulln[®] UD 0,5 %, Pharma Stulln, Stulln, Deutschland

Charge: 990217

Die Lösung enthielt 0,5 % Tropicamid und 0,01 mg/ml Phenylquecksilberniträt als Konservierungsmittel in gepufferter Lösung.

Die experimentell ermittelte Durchschnittsmasse eines Tropfens lag zwischen 28,0 mg ($n = 50$, $s \pm 7,0$ mg) und 29,7 mg ($n = 50$, $s \pm 5,3$ mg) (s.a. Kap.5.3.6).

Probandenauswahl**Tropicamid-Testzubereitung 1:**

8 gesunde Probanden beider Geschlechter zwischen 18 und 29 Jahren (Altersdurchschnitt: 23 ± 3 Jahre Standardabweichung) wurden in die Studie aufgenommen. Dabei handelte es sich um 3 weibliche und 5 männliche Teilnehmer. Die Charakteristika der Probanden sind in einer Tabelle (Tab. 8.4.9.) zusammengefaßt.

Eine Probandin nahm Kontrazeptiva. Zwei Probanden gaben eine saisonabhängige Heuschnupfenallergie an. Dies wurde als unkritisch beurteilt, da die Studie im Spätherbst durchgeführt wurde und kein Teilnehmer Anzeichen einer allergischen Reaktion zeigte. Eine Probandin litt im Vorfeld unter einer Erkältung, die zu Beginn der Studie jedoch fast völlig ausgeheilt war und nicht in Erscheinung trat. In der Familienanamnese eines Probanden trat das Krankheitsbild des Glaukoms auf.

Proband	Geschlecht	Augenfarbe	Alter	Proband	Geschlecht	Augenfarbe	Alter
S40	w	blau	18	S44	m	blau	23
S41	m	blau	23	S45	m	grün	23
S42	w	braun	29	S46	m	braun	23
S43	m	braun	18	S47	w	blau	23

Tab.8.4.9: Eigenschaften der Probanden, Tropicamid-Studie Teil 1

Tropicamid-Testzubereitung 2:

10 gesunde Probanden beider Geschlechter zwischen 18 und 43 Jahren (Altersdurchschnitt: 23 ± 7 Jahre Standardabweichung) wurden in die Studie aufgenommen. Dabei handelte es sich um 8 weibliche und 2 männliche Teilnehmer. Die Charakteristika der Probanden sind in der folgenden Tabelle (Tab.8.4.10.) zusammengefaßt.

Eine Probandin nahm zur Zeit der Studie Kontrazeptiva ein, eine andere wurde aufgrund einer Schilddrüsenunterfunktion medikamentös dauertherapiert. Zwei Probanden gaben eine saisonabhängige Heuschnupfenallergie an. Alle Faktoren wurden als unkritisch beurteilt. Die Familienanamnese eines Probanden wies einen Glaukomfall auf.

Proband	Geschlecht	Augenfarbe	Alter	Proband	Geschlecht	Augenfarbe	Alter
1	w	blau	18	6	w	grün	26
2	w	grün-blau	18	7	w	blau-grün	20
3	w	grün	23	8	w	blau	21
4	w	grün	22	9	m	braun	25
5	w	li: grün-braun re: braun	18	10	m	grün-braun	43

Tab.8.4.10: Eigenschaften der Probanden, Tropicamid-Studie Teil 2

li: linkes Auge, re: rechtes Auge

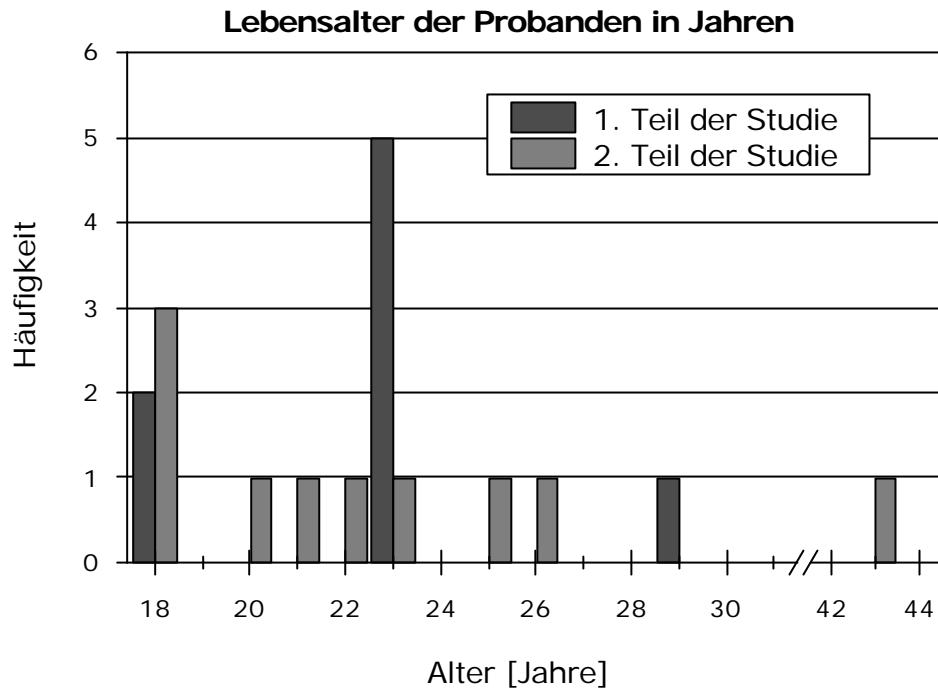


Abb.8.4.11: Altersstruktur der Probanden bei den Tropicamid-Studien

Der Ablauf war mit dem der Pilocarpin-Studie identisch. Vor der Studie wurden die Probanden ebenfalls in einem Aufklärungsbogen (siehe Anhang E) und von dem zuständigen Arzt über die Intention, Durchführung und Risiken der Studie aufgeklärt und über ihren derzeitigen Gesundheitszustand befragt. Zusätzlich mußte ein Anamnesebogen ausgefüllt werden, um das Risiko zu minimieren, daß während der Studie unvorhergesehene Komplikationen auftreten.

Als Ausschlußkriterien galten bei dieser Studie:

- Minderjährige
- Schwangere oder Stillende
- Diabetiker
- Kontaktlinsenträger (evtl. reduzierte Empfindlichkeit)
- Teilnahme an einer Studie innerhalb der letzten 4 Wochen
- Operationen am Auge innerhalb der letzten 3 Monate
- Anwendung von Augenarzneien
- akute oder chronische Veränderungen des Auges oder der angrenzenden Gesichtspartie
- akute Allgemeinerkrankungen
- Schilddrüsenüberfunktion, obstruktive Harnwegserkrankungen, kardiovaskuläre Probleme
- akute oder chronische Allergien, Atopiker
- gleichzeitige Einnahme anderer Arzneimittel mit Ausnahme oraler Kontrazeptiva
- Klaustrophobie oder Beklemmungsgefühle in engen, dunklen Räumen

Die Probanden mußten ihr schriftliches Einverständnis zu dieser Studie geben. Weibliche Probanden unterschrieben zusätzlich ein Formular, daß bei Ihnen zum Zeitpunkt der Studie eine Schwangerschaft mit Sicherheit ausgeschlossen war.

Studiendesign

Das Studiendesign wurde von der bereits oben erwähnten, vorhergehenden Studie übernommen. Die Daten wurden entsprechend verschlüsselt.

Ablauf der Studie

Der zeitliche Ablauf verlief für alle Studienteilnehmer gleich. Am Tag der Studie durften morgens keine koffeinhaltigen Getränke zu sich genommen werden. Das Rauchen wurde in den langen Pausen kurz nach dem Ende einer Messung erlaubt.

Der Ablauf war mit dem aus der vorangegangenen Studie bis auf zwei Ausnahmen identisch. Die Studiendauer wurde auf 240 Minuten reduziert. Es wurden keine refraktometrischen Messungen durchgeführt.

Spallampenuntersuchung

Zu Beginn der Studien wurden die Augen der Probanden einer eingehenden Untersuchung unterzogen. Die genaue Funktionsweise des Gerätes wird in Kapitel 8.3.1. beschrieben.

Beurteilung der Verträglichkeit

Die auftretenden Nebenwirkungen wurden von dem Probanden oder Betreuer auf einem vorgefertigten Beurteilungsbogen während der Studie festgehalten und die Verträglichkeit anhand von VA-Skalen beurteilt. Bei der Verträglichkeitsbeurteilung wurden Empfindungen während der Applikation, nach 15, 30, 45 und 60 Minuten und zum Abschluß nach 4 Stunden beurteilt. Die auszufüllenden Bögen entsprachen im Wesentlichen den Unterlagen der Pilocarpinstudie.

Bestimmung der Wirkungsintensität und Dauer

Tropicamid verändert als Sympathomimetikum den Pupillendurchmesser (s.a. Kap. 8.2.2.). Mit Hilfe der Pupillographie (s. Kap. 8.3.2.) kann auch hier der Verlauf der pharmakologischen Wirkung des Wirkstoffes verfolgt werden.

Pupillographie

Mydriatische Aktivität

Die miotische Reaktion der Pupillen auf einen kurzen, künstlich erzeugten Blitz gemessen, um die pharmakologische Wirkung des Arzneistoffes auf das Auge und damit die Wirkungsdauer der Zubereitung genau zu bestimmen. Die Vorgehensweise erfolgte analog zur Pilocarpinstudie (s. Kap. 8.4.1. und 8.3.3).

Die Messung der Pupillen beider Augen wurde vor der Applikation und in gewissen Intervallen danach (15, 30, 45 und 60 Minuten und im Stundenintervall bis zu 4 Stunden nach der Gabe) durchgeführt.

Der weitere Ablauf und die Auswertung wurden ebenfalls übernommen.

Pharmakokinetik

Zur Auswertung wurde die relative Amplitude herangezogen. Aus den sich daraus ergebenden Kurvenverläufen wurde die Fläche zwischen dieser Kurve und einer gebildeten Nulllinie für den kompletten Beobachtungszeitraum mit Hilfe der Trapezregel

berechnet und statistisch ausgewertet, um einen Hinweis über die Wirkungsintensität und Dauer zu erhalten.

Analytik

Der Arzneistoffgehalt wurde in 0,1 N HCl photometrisch bei einer Wellenlänge von 253 nm bestimmt.

Zur Bestimmung des Durchschnittsgehaltes der bei der Studie verwendeten Lyophilisate wurden von jeweils fünf Xerogelen der Tropicamidanteil bestimmt. Dazu wurde die Spitze des PTFE-Trägers inklusive Lyophilisat in einen 10 ml Meßkolben überführt, mit 0,1 N HCl aufgefüllt und gut geschüttelt. Nach 5 Minuten wurde die Lösung vermessen. Ein Mittelwert wurde aus den Werten gebildet.

Als Vergleich wurde der Tropicamidgehalt in 10 Tropfen der Referenzlösung unter gleichen Versuchsbedingungen bestimmt.

In allen Fällen wurde der Arzneistoffgehalt, der nach der Applikation am Auge der Probanden auf dem PTFE-Träger zurückgeblieben ist, quantifiziert. Mit dem benutzten PTFE-Träger wurde ebenfalls nach bereits oben beschriebener Vorgehensweise verfahren.

Aus diesen Ergebnissen wurde die theoretisch maximal applizierte Tropicamidmenge berechnet (Reanalyse), wobei als Berechnungsgrundlage jeweils der ermittelte Durchschnittsgehalt der verwendeten Charge diente.

Statistische Auswertung

Die statische Signifikanz der Unterschiede der Visual-Analog-Werte wurde mit Hilfe des paarweisen Wilcoxon-Rangsummen-Test bestimmt [Sokal, 1987; 1995].

Zum Vergleich der mittleren Bioverfügbarkeit von Lyophilisaten im Vergleich zu Augentropfen wurde ein ANOVA-Test des Typs 'Two-factor-mixed-effect-model' herangezogen (s. Kap. 8.4.1.).

8.4.3. Pilotstudie zur Pharmakokinetik von Fluorescein-Natrium

In einer dritten Studie wurde Fluorescein-Natrium eingesetzt. Auch dieser Arzneistoff wird seit vielen Jahren erfolgreich in der Diagnostik angewendet (nähere Einzelheiten s. Kap. 8.2.3.), und das Auftreten unbekannter Nebenwirkungen kann ausgeschlossen werden. Risikofaktoren sind nicht bekannt. Fluorescein-Natrium ist analytisch leicht quantifizierbar.

Fluorescein-Natrium dient u.a. zur Darstellung von Hornhautverletzungen und kleinen Fremdkörpern, wird für die Augenhintergrunddiagnostik und zur Überprüfung des Sitzes von Haftschalen eingesetzt.

Die Fluoreszenz des Wirkstoffes wird bei der Fluorophotometrie ausgenutzt, anhand der die Konzentrationen des Farbstoffs in den verschiedenen Augengeweben bestimmt werden kann (s. Kap. 8.3.4.).

Lyophilisate und Augentropfen

Test

Verwendet wurden zwei Zubereitungen, die unterschiedliche HPMC-Derivate als hydrophile Polymerbasis besaßen. Ein Lyophilisat enthielt theoretisch:

Inhaltsstoff	Ausgangslösung	Lyophilisat 1	Lyophilisat 2
HPMC E50	1,0 %	0,250 mg	-
HPMC E4M	0,5 %	-	0,125 mg
Fluorescein-Natrium	0,272 %	0,068 mg	0,068 mg
gereinigtes Wasser	ad 100 %	-	-
Gesamtgewicht	100 %	0,318 mg	0,193 mg

Tab.8.4.12: Zusammensetzungen der Testzubereitungen

Zur Berechnung der Fluorescein-Konzentration in einem einzelnen Lyophilisat wurde angenommen, daß ein Tropfen des Handelspräparates einem Gewicht von 40 mg entspricht.

Als Träger wurde die ungesinterte Folie von 3P GmbH verwendet.

Referenz

Fluoreszein SE Thilo[®], Augentropfen in Einmaldosen, Dr. Thilo, Freiburg, Deutschland
Charge: TH 039

Die Lösung enthielt 1,7 mg/ml Dinatriumfluorescein in gepufferter Lösung. Die experimentell ermittelte Durchschnittsmasse eines Tropfens lag zwischen 48,0 mg ($n = 7$, $s \pm 3,9$ mg) und 54,0 mg ($n = 7$, $s \pm 6,2$ mg).

Probandenauswahl

3 gesunde Probanden beider Geschlechter zwischen 28 und 43 Jahren wurden in die Pilotstudie aufgenommen.

Studiendesign

Bei dieser Pilotstudie erfolgte die Applikation der drei Zubereitungen am rechten und am linken Auge eines jeden Probanden, wobei ein Proband immer zwei verschiedene Präparate erhielt.

Ablauf der Studie

In jedes Auge wurden unterschiedliche Zubereitungen appliziert. Fluorophotometrische Messungen erfolgten vor, 5, 10, 15, 20, 25, 30 und 60 bzw. 70 Minuten nach der Applikation. Bei einem Probanden wurde die Messung auf 130 und 190 Minuten verlängert.

Jedes Auge wurde zu jedem Zeitpunkt nur einmal vermessen.

Bestimmung der Wirkungsintensität und Dauer

Mithilfe eines Fluorophotometers konnten die Fluoreszenzen der verschiedenen Augengewebe und des sich darin befindlichen Fluorescein ermittelt und mit Hilfe eines Computers ausgewertet werden. Das Meßprinzip wird in Kapitel 8.3.4. im Einzelnen erklärt. Entsprechend wurden Rückschlüsse auf die Arzneistoffkonzentrationen in diesen Geweben in Abhängigkeit von der Zeit und der Zubereitung gezogen.

Pharmakokinetik

Die Veränderungen der Fluorescein-Konzentrationen im vorderen Augenabschnitt (Cornea, Kammerwasser, Linse) wurden bestimmt und ausgewertet. Aus den sich ergebenden Kurvenverläufen wurde sowohl die erreichte Maximalkonzentration in der Cornea als auch die durchschnittliche Konzentration des Fluoresceins im Kammerwasser zu den vorgegebenen Zeitpunkten bestimmt und graphisch aufgetragen.

Für eine statistische Auswertung sind die erhaltenen Daten nicht ausreichend, aber sie ermöglichen eine Aussage über eine Tendenz.

Analytik

Der Arzneistoffgehalt wurde in 0,1 N HCl photometrisch bei einer Wellenlänge von 480 nm bestimmt.

Zur Bestimmung des Durchschnittsgehaltes der bei der Studie verwendeten Lyophilisate wurden von jeweils fünf Xerogelen der Fluoresceinanteil bestimmt. Dazu wurde die Spitze des PTFE-Trägers inklusive Lyophilisat in einen 10 ml Meßkolben überführt, mit 0,1 N HCl aufgefüllt und gut geschüttelt. Nach 5 Minuten wurde die Lösung vermessen. Ein Mittelwert wurde aus den Werten gebildet.

In allen Fällen wurde der Arzneistoffgehalt, der nach der Applikation am Auge der Probanden auf dem PTFE-Träger zurückgeblieben ist, quantifiziert. Mit dem benutzten PTFE-Träger wurde ebenfalls nach bereits oben beschriebener Vorgehensweise verfahren.

8.5. Untersuchung der Arzneistofffreisetzung von Lyophilisaten an gesunden Probanden im Vergleich zu konventionellen Augentropfen

- Ergebnisse und Auswertung

8.5.1. Verträglichkeit und Verlauf der Miosis nach Applikation von Pilocarpinhydrochlorid

Verträglichkeit: Auswertung der VA-Skala

Die Beurteilung der Verträglichkeit durch die Probanden erfolgte zu den vorgegebenen Zeiten (bei Applikation, nach 5, 10, 15, 30, 45, 60 und 360 Minuten). Je niedriger der Wert, desto geringer waren die verursachten Reizerscheinungen der jeweiligen Applikationsform (s. Kap. 8.4.1.).

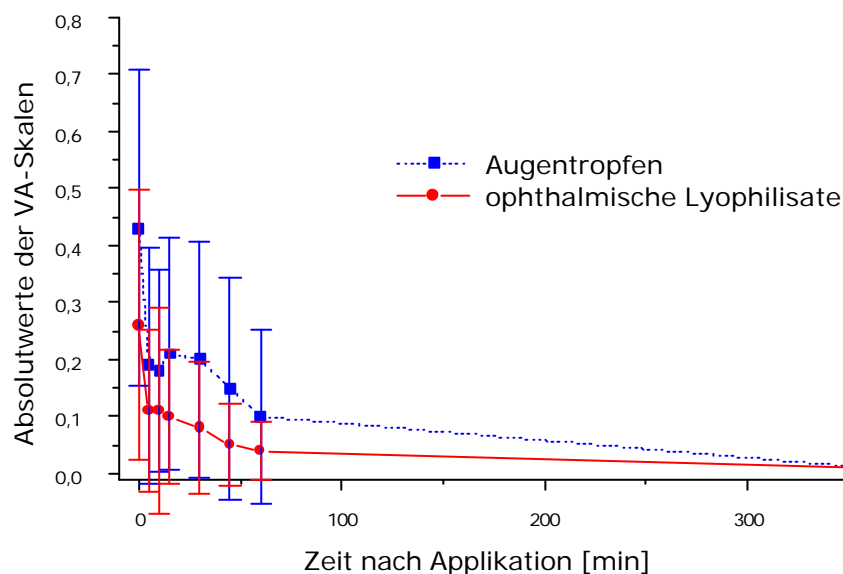


Abb.8.5.1: Mittelkurven der VA-Skalenauswertung
(Fehlerbalken: Standardabweichung, n=16)

Im Mittel lagen die Werte für das Testpräparat (Lyophilisat) auf der Visual-Analog-Skala in der ersten Stunde immer unterhalb der entsprechenden Werte für das Referenzpräparat. Innerhalb der ersten Stunde gab es bezüglich der Verträglichkeit bis auf 5 Minuten nach der Applikation signifikante Unterschiede.

Pilocarpinhaltige, ophthalmische Lyophilisate waren in den ersten 60 Minuten besser verträglich als die konventionellen Augentropfen. Der Wilcoxon-Rangsummentest ergab bei der Applikation, nach 10, 15, 30, 45 und 60 Minuten einen statistisch signifikanten Unterschied (siehe Anhang C).

Bei vier Probanden tauchten widersprüchliche Angaben bei der Beurteilung der Verträglichkeit auf. Die Antworten aus Frage 1 und Frage 2 (s. Abb. 8.4.6.) zur unangenehmsten Zubereitung stimmten nicht überein. Eine Korrektur wurde nicht vorgenommen. Die unstimmigen Eintragungen veränderten jedoch nicht die endgültige Aussage.

Die Resultate bestätigten die gute Verträglichkeit von Lyophilisaten, die am Auge angewendet wurden. Auch Grunthal [1996] fand bei einer Studie, in der wirkstofffreie Lyophilisate an 32 Probanden im Cross-over-Design mit künstlicher Tränenflüssigkeit verglichen wurden, zwischen den Präparaten keinen signifikanten Unterschied.

Verträglichkeit: Unerwünschte Nebenwirkungen

Folgende Nebenwirkungen wurden von den Testpersonen während der Studie festgestellt und notiert:

Nebenwirkungen	Augentropfen	Lyophilisat
Sichtbehinderung	12	2
vermehrte Tränensekretion	10	0
einseitiger Kopfschmerz	9	6
Fremdkörpergefühl	1	1
angeschwollenes Gefühl	1	0
Kältegefühl	1	0
Ziliarspasmus	1	0
Wärmegefühl	0	2
Stechen	0	1
Juckreiz	0	1

Tab.8.5.2: Aufgetretene Nebenwirkungen

Als wichtigster Unterschied ist hierbei auf den erhöhten Tränenfluß nach der Augentropfen-Applikation hinzuweisen, der bei $\frac{2}{3}$ der Probanden auftrat. In der Lyophilisat-Gruppe wurde dies bei keiner Testperson notiert. Die Ursache wird hauptsächlich in dem niedrigen pH-Wert der Tropfen zu suchen sein. Die Folge dieses

Reizes ist eine schnellere Arzneistoffelimination aus dem Auge, damit eine Verringerung der Kontaktzeit des Wirkstoffes und eine niedrigere Bioverfügbarkeit.

Die Angabe 'Sichtbehinderung' beruhte vorwiegend auf dem Wirkmechanismus des Pilocarpins. Aufgrund der Veränderung der Brechkraft der Linse kam es zu unscharfen Abbildungen auf der Netzhaut, die als verschwommenes Sehen wahrgenommen und als unangenehm empfunden wurden.

Die Kontraktion des Ziliarmuskels führte zu Kopf- und Augenschmerzen (s.a. Kap. 8.2.1.2.) [Rote Liste, 1997]. In einem Fall hatte die Kontraktion des Ziliarmuskels bei einem hellhäutigen Probandin mit hellblauen Augen einen sehr schmerzhaften Muskelspasmus zur Folge, der erst nach einigen Stunden wieder nachließ (Pupillenreaktion > 12 Stunden).

In einem Fall wurde ein leichtes Fremdkörpergefühl nach Lyophilisat- Applikation erwähnt, das aber innerhalb kurzer Zeit wieder verschwand. Auch bei der Anwendung der Augentropfen wurde dies angegeben.

Die Ursachen der Angaben 'Stechen', 'Jucken' und 'angeschwollenes Auge' sind nicht eindeutig einzuordnen. Es könnten Hinweise auf allergische Reaktionen sein, aber auch der mechanische Reiz bei der Applikation durch den Arzt ist ein möglicher Grund, weil der Druck bei der Anwendung durch eine fremde Person nicht an die individuell unterschiedliche Reizschwelle angepaßt werden kann. Drei Probanden empfanden den bei der Applikation angewendeten Druck als unangenehm und beurteilten deshalb die Lyophilisat-Zubereitung zu diesem Zeitpunkt negativer. Eine Eigenapplikation von Lyophilisaten wäre in jedem Fall von Vorteil.

Auch die Ursachen einer Kälte- oder Wärmeempfindung konnten nicht erklärt werden.

88 % der Probanden würden Pilocarpin-Lyophilisate als Applikationsform bevorzugen.

Veränderung der Brechkraft der Linsen

Bei einem sehr kleinen Pupillendurchmesser konnte mit dem Autorefraktometer das Auge nicht vermessen werden (s.a. Kap. 8.3.2.2.). Die erhaltenen Werte zeigen, daß die Brechkraft der Linsen durch Pilocarpin verändert wurde, wobei die Tendenz vorwiegend zu negativeren Dioptrie-Werten bestand (Myopie, s.a. Kap. 8.2.1.2.). Wodurch sich allerdings hohe positive Abweichungen ergeben haben (s. Abb. 8.5.5., 8.5.6.) kann hier nicht erklärt werden.

Die Resultate werden im folgenden graphisch dargestellt. Die Differenzen zwischen den Werten nach der Applikation und dem Ursprungswert wurden aufgetragen. War es nicht möglich, die Messung durchzuführen, wurde dies rechts im Diagramm vermerkt (k. Mess. = keine Messung möglich).

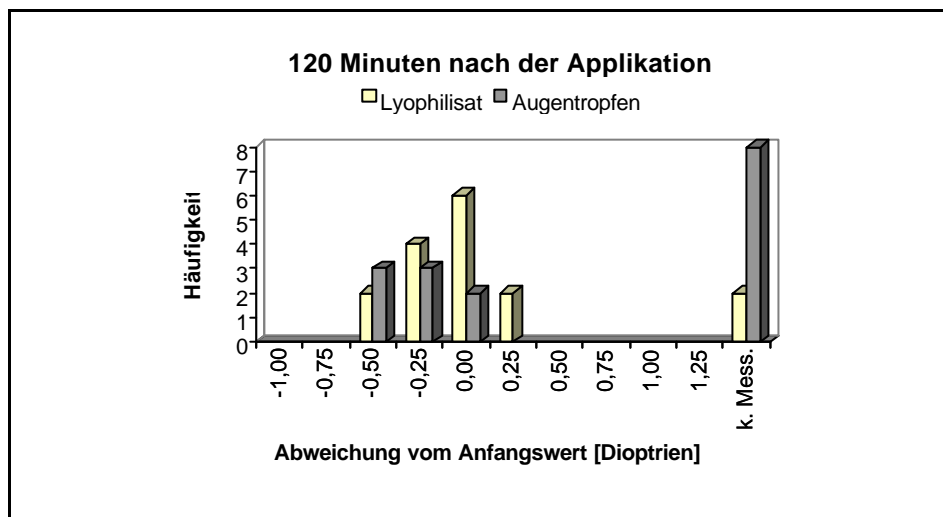


Abb.8.5.3: Veränderung der Linsenrefraktion, 120 Minuten nach Pilocarpin-Applikation

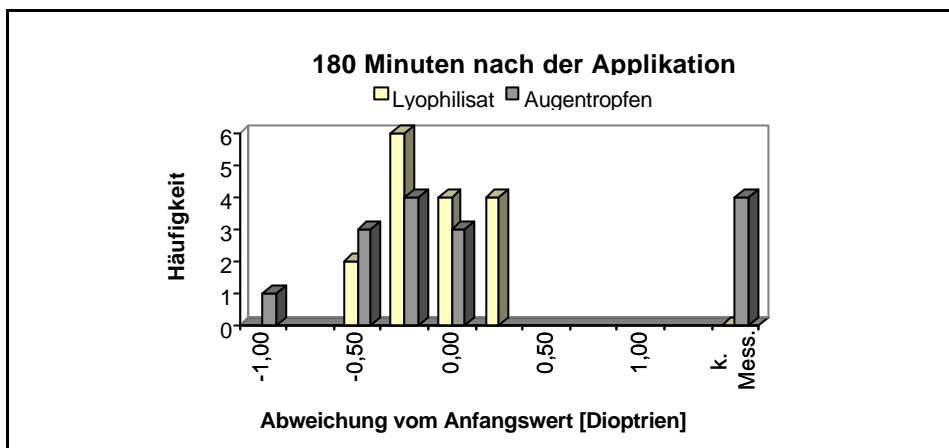


Abb.8.5.4: Veränderung der Linsenrefraktion, 180 Minuten nach Pilocarpin-Applikation

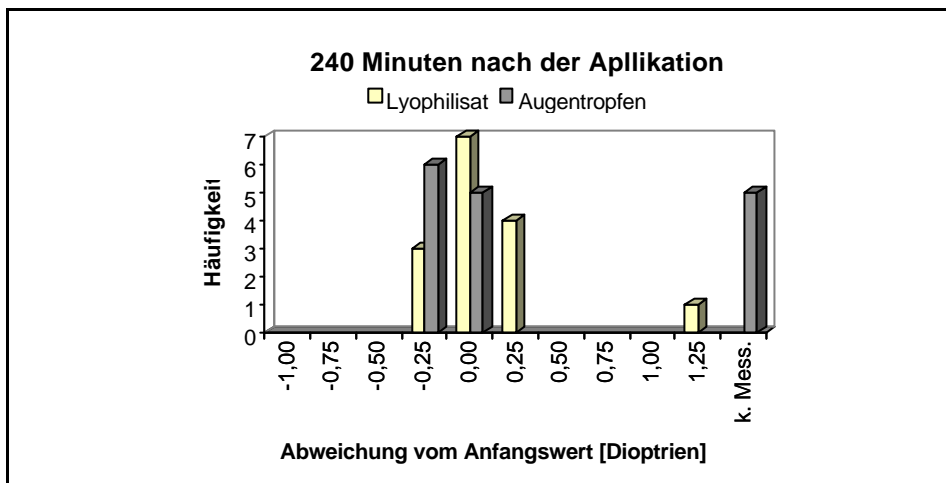


Abb.8.5.5: Veränderung der Linsenrefraktion, 240 Minuten nach Pilocarpin-Applikation

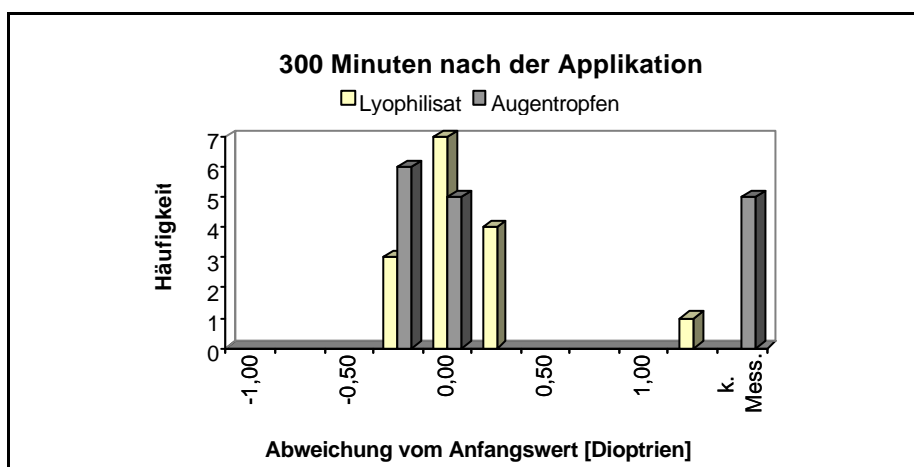


Abb.8.5.6: Veränderung der Linsenrefraktion, 300 Minuten nach Pilocarpin-Applikation

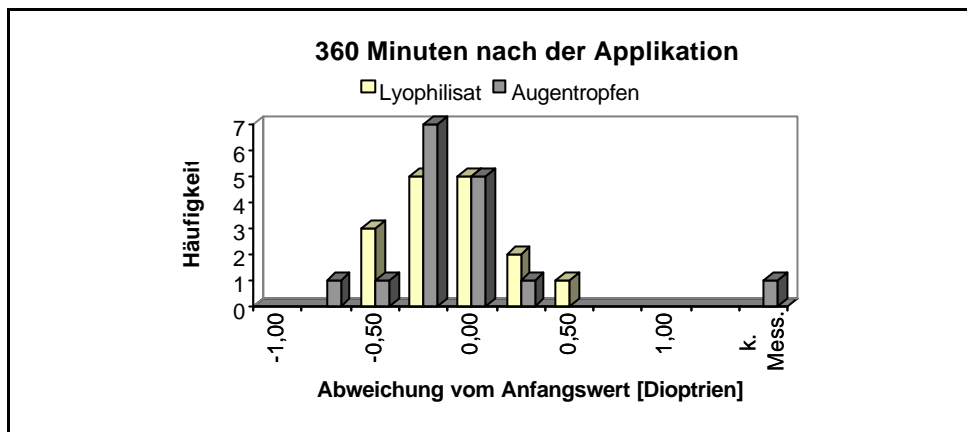


Abb.8.5.7: Veränderung der Linsenrefraktion, 360 Minuten nach Pilocarpin-Applikation

Diese Methode ist nicht geeignet, um eine Aussage über die Bioverfügbarkeit von Pilocarpin aus ophthalmischen Zubereitungen treffen zu können.

Relative Amplituden-Kurven

Der Ablauf bei der Pupillometrie und die Auswertung der dabei erhaltenen Daten wird in Kapitel 8.3.3. anschaulich erläutert.

Bei dieser Studie wurde nach einer zehnminütigen Dunkeladaptation die Pupillenreaktion auf einen Lichtblitz mit dem Pupillographen 2 Sekunden lang gemessen.

Ein Effekt-Zeit-Profil, aus dem Anflutungsgeschwindigkeit und Wirkdauer berechnet werden können, erhält man durch Auftragen der relativen Amplitude gegen die Zeit seit der Applikation.

In Abb. 8.5.8. und Abb. 8.5.9. werden die entsprechenden Kurven für das Test (Lyophilisat)- und Referenzpräparat (Augentropfen) bei einem Probanden als Beispiel gezeigt.

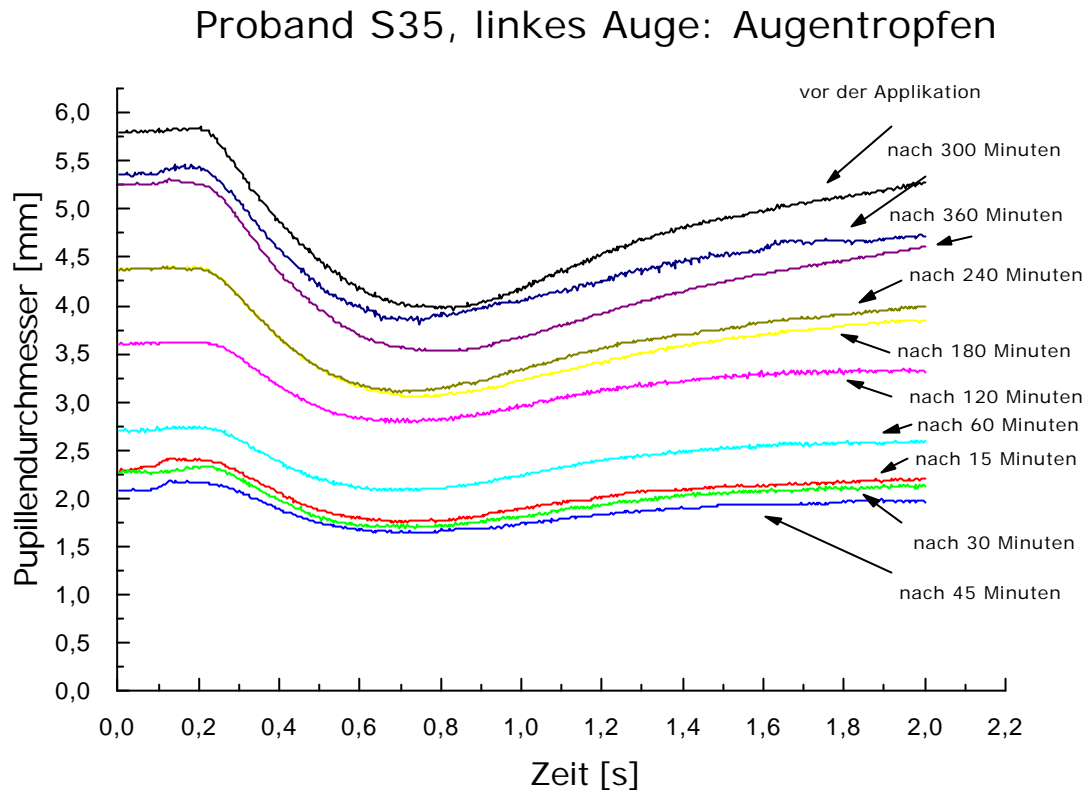


Abb.8.5.8: Änderung der Pupillendurchmesser bei Proband S35 zu unterschiedlichen Zeiten nach der Applikation von Augentropfen

Proband S35, rechtes Auge: Lyophilisat

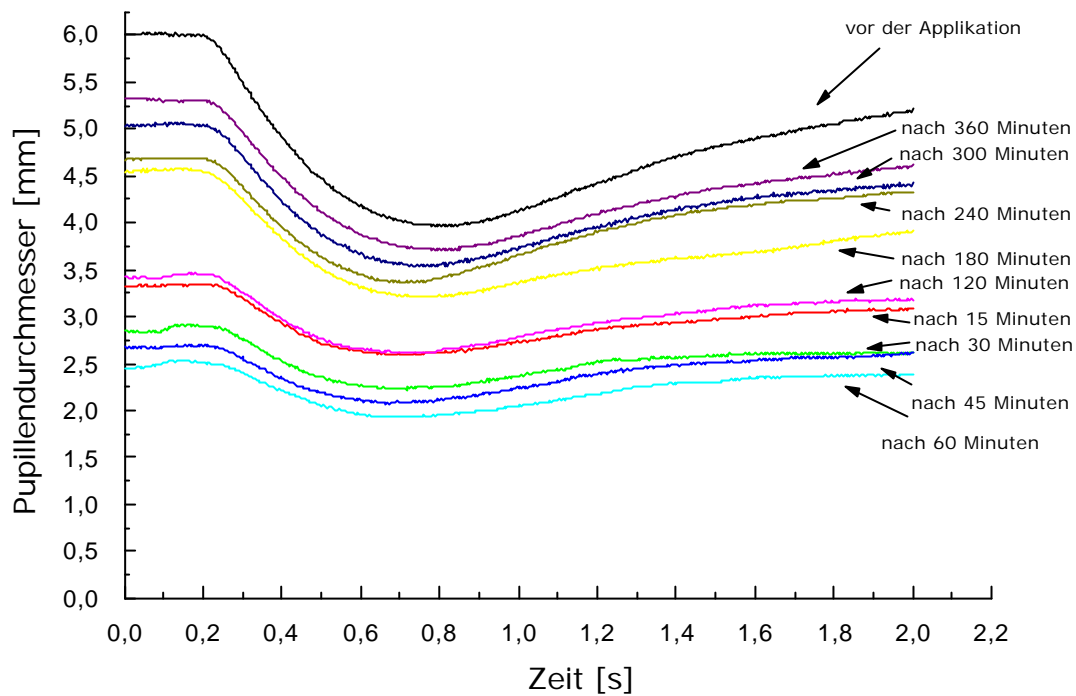


Abb.8.5.9: Änderung der Pupillendurchmesser bei Proband S35 zu unterschiedlichen Zeiten nach der Applikation eines Lyophilisats

Verschiedene Daten, die aus diesen Verläufen erhalten werden, können zur Interpretation herangezogen werden. Da, wie in Kapitel 8.3. bereits beschrieben, pupillographische Parameter inter- und intraindividuell sehr verschieden sein können, wurden die relativen Amplitudenwerte ausgewertet.

Trägt man bei diesem Probanden diese Werte auf, erhält man folgende Verläufe für beide Zubereitungen:

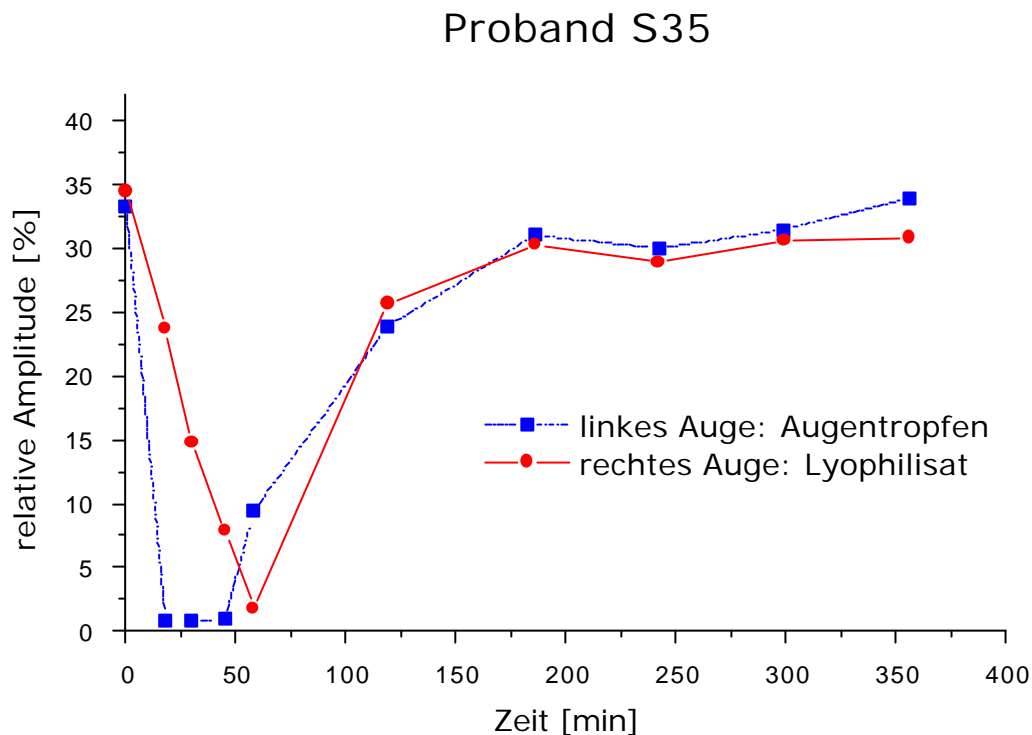


Abb.8.5.10: Verlauf der relativen Amplitudenwerte bei Proband S35 zu unterschiedlichen Zeiten nach der Applikation von Test- und Referenzzubereitung

Ein kleiner Wert der relativen Amplitude bedeutet, daß sich die Pupille bereits soweit durch den Pilocarpineinfluß verkleinert hat, daß eine zusätzliche Kontraktion durch Lichteinfluß nicht oder nur kaum noch möglich ist. Es ist erkennbar, daß die Pupillenreaktion in diesem Beispiel nach der Applikation von Pilocarpin aus Augentropfen im Vergleich zur lyophilisierten Zubereitung schneller und intensiver eintritt. Der Verlauf der Kurven ist ähnlich. Die Analytik ergab, daß sich auf dem Träger dieses Xerogels ein Pilocarpinrückstand von 205 mg (60,62 %, s. Tab. 8.5.17) befand, der nicht zur Anwendung am Auge gelangt ist. Das bedeutet, daß, obwohl nur etwa ein Drittel der Dosis, die in den Augentropfen enthalten ist, mit dem ophthalmischen Lyophilisat appliziert werden konnten, in diesem Fall die AUC_{Arel} -Werte beider Zubereitungen in der gleichen Größenordnung lagen (s. Tab.8.5.12). Bei diesem Probanden wurde bei dieser Studie (n=12) auf dem Träger der geringste Rückstand gefunden. Vier von 12 Probanden (S22, S23, S24, S35) zeigten nach der Lyophilisat-Applikation stärkere Pupillenreaktionen als nach der Anwendung von Tropfen (s.

Anhang D). Bei der überwiegenden Anzahl der Teilnehmer (12 von 16) löste sich nur wenig Pilocarpin von dem Träger ab, so daß die pharmakologische Wirkung bei der Lyophilisat-Anwendung schwach war.

Die Kurvenverläufe für die übrigen Probanden sind im Anhang D zu finden.

Ähnlich wie sich der Pupillendurchmesser unter Pilocarpineinfluß verringerte, verlängerte sich die Latenz. Dieses Ergebnis widerspricht der Beobachtung von Lowenstein [1956], der nach der Gabe von Pilocarpin durch die zunehmende Miosis die Lichtreaktion schwerer erkennen konnte, aber angab, daß die Latenz zeitlich unverändert bleiben würde.

Beschreibende Statistik der Zeit-Effekt-Kurven

Als allgemeines Maß für die Dauer und Intensität der Wirkung wurde bei jedem Probanden die Fläche zwischen der relativen Amplitudenkurve und einer Null-Linie berechnet.

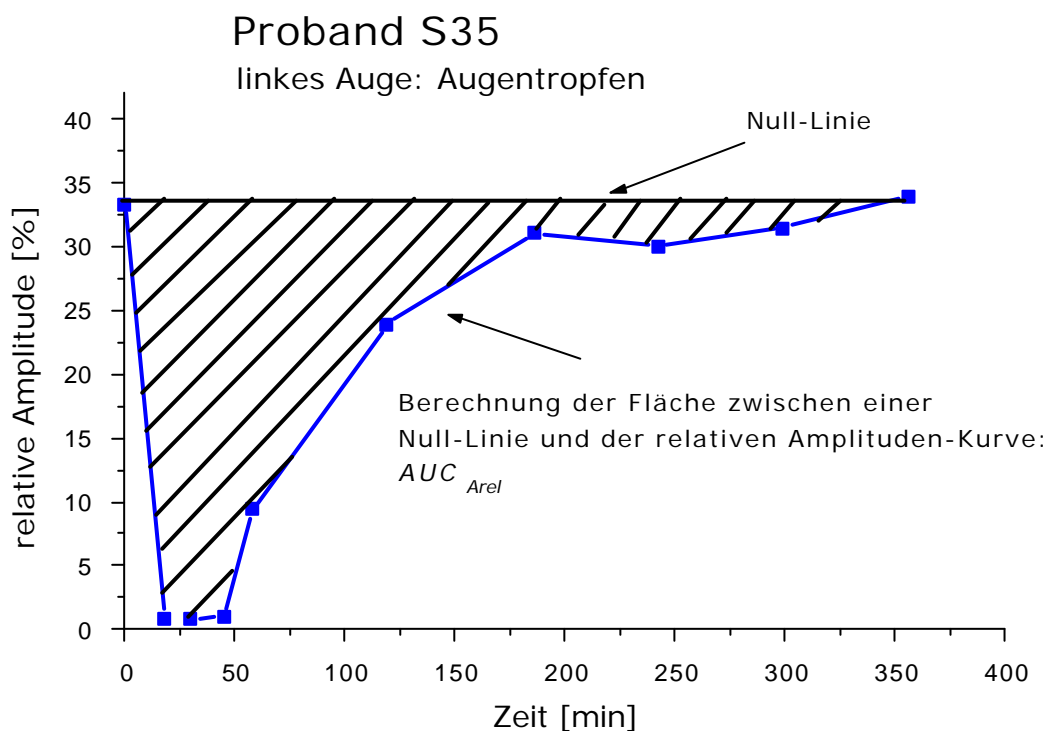


Abb.8.5.11: Verlauf der relativen Amplitudenwerte bei Proband S35: Berechnung der AUC_{Arel} nach der Applikation der Referenzzubereitung (Beispiel)

Dabei stellte sich heraus, daß die Werte im Mittel bei Augentropfen höher, die Variationskoeffizienten beider Zubereitungen jedoch vergleichbar waren (s. Tab.

8.5.12.). Obwohl sowohl die Augentropfen als auch die Lyophilisate von einem Augenarzt appliziert wurden und somit von einer einheitlichen Applikationsweise auszugehen ist, zeigten sich bei den Probanden große Schwankungen. Die individuelle Variabilität war sehr hoch. Grund sind vermutlich die bereits erwähnten ausgeprägten Schwankungen bei pupillographischen Daten.

Proband*	AUC_{Arel} Augentropfen [%·min]	AUC_{Arel} Lyophilisat [%·min]
S21	1.097	970
S22	2.819	3.407
S23	407	2.189
S24	204	3.707
S25	2.971	66
S26	10.956	3.230
S27	5.396	316
S28	9.759	2.253
S29	11.127	3.469
S30	5.226	2.089
S31	1.394	0
S32	8.741	3.667
S33	4.626	2.054
S34	6.694	0
S35	3.058	3.473
S36	9.816	1.358
Mittelwert	5.268	2.016
Standardabweichung	3.828	1.406
Variationskoeffizient [%]	72,7	69,8

Tab.8.5.12: AUC_{Arel} bei allen Probanden nach der Applikation von Test- und Referenz-Zubereitung

* die Probandennummern wurden durch den Arzt vergeben

Die Fläche unter den Effekt-Zeit-Kurven für die relativen Amplituden-Werte betrug 2.016 %-min ($s \pm 1.406$ %-min) für Lyophilisate und 5.268 %-min ($s \pm 3.828$ %-min) für konventionelle Augentropfen. Der Variationskoeffizient war für beide Zubereitungen etwa gleich (Augentropfen: 72,7 % bzw. Lyophilisate: 69,8 %).

Der Median für Augentropfen betrug 4.926 %-min, der für Augentropfen 2.139 %-min.

Eine graphische Gegenüberstellung verdeutlicht die Unterschiede:

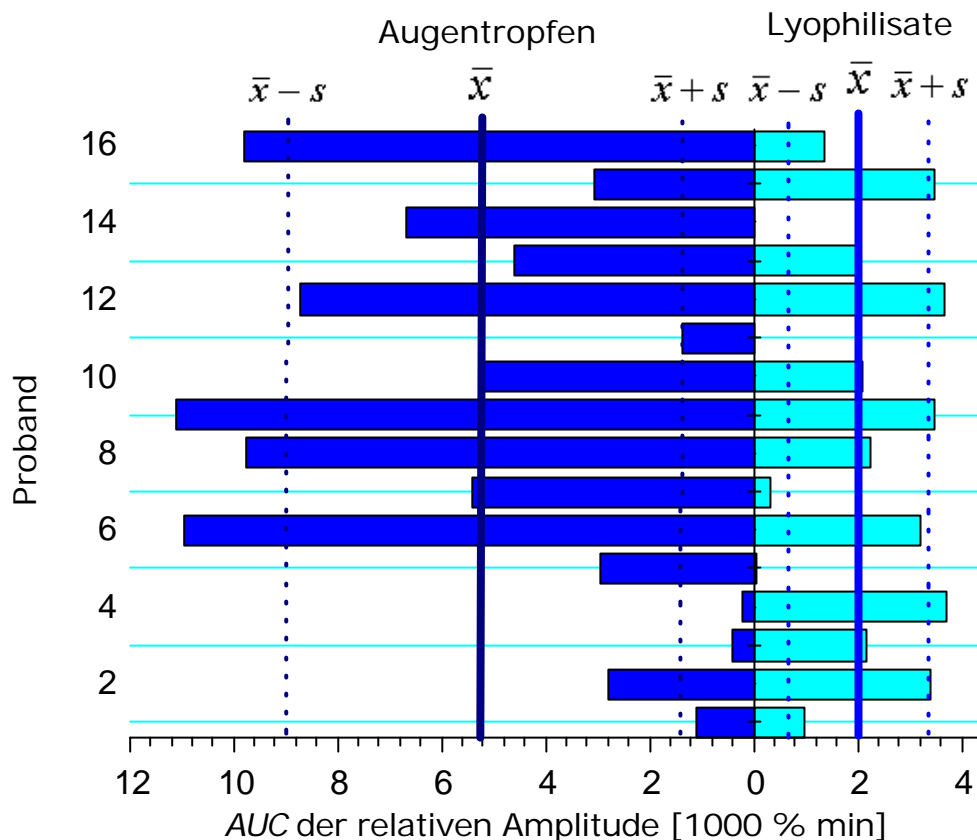


Abb.8.5.13: Gegenüberstellung von AUC_{Arel} bei allen Probanden nach der Applikation von Test- und Referenz-Zubereitung, Proband 1-8: 1. Block, Proband 9-16: 2. Block

Varianzanalyse

Unterschiede der AUC_{Arel} -Werte wurden mit einem ANOVA Two-factor-mixed-model (Zweifaktorielles Modell mit festen und zufälligen Effekten) auf ihre Signifikanz geprüft.

Die Berechnung ergab folgende Daten:

Ursprung der Variabilität	df	SS	MS	F	Signifinz
Formulierung (fester Effekt)	1	84,65	84,65	11,65	$\alpha < 0,005$
Probanden (zufälliger Effekt)	15	141,38	9,43	1,31	-
Fehler (unerklärter Restfehler)	15	108,19	7,21		
Summe	31	334,22			

Tab.8.5.14: Varianzanalyse von AUC_{Arel} nach der Applikation von Test- und Referenzzubereitung [nach Sokal, 1987]

df: Anzahl der Freiheitsgrade (degrees of freedom)

SS: Summe der Abweichungsquadrate (sum of squares)

MS: Mittleres Abweichungsquadrat (Varianzen) (meansquares)

F: Prüfgröße bzw. Varianzenquotient (variance ratio)

Zwischen den beiden Zubereitungen wurde ein signifikanter Unterschied gefunden, wobei die Reihenfolge der Applikation keine Rolle spielte. Die Wirkung der Augentropfen bezüglich einer Pupillenreaktion war statistisch signifikant stärker.

Analytik

Die Studie wurde im Block mit jeweils 8 Personen innerhalb von zwei Tagen durchgeführt, für die jeweils vor Versuchsbeginn ophthalmische Lyophilisate hergestellt wurden. Insofern wurden zwei Chargen für die Studie verwendet.

Der Pilocarpingehalt von fünf Lyophilisaten der gleichen Charge, die bei der Studie verwendet worden ist, wurde photometrisch bestimmt.

Der Durchschnittsgehalt Pilocarpinhydrochlorid pro Lyophilisat betrug im 1. Block 310,6 µg ($s \pm 12,07$ µg; VK: 3,89 %) und im zweiten Block 338,2 µg ($s \pm 12,77$ µg; VK: 3,78 %). Standardabweichungen und Variationskoeffizienten der beiden Chargen sind vergleichbar.

Diese Werte dienten jeweils als Berechnungsgrundlage zur Bestimmung der zur Anwendung gelangten Arzneistoffmenge am Auge.

Im Vergleich wurde bei dem Handelspräparat Isopto-Pilocarpin 1% aus zehn einzelnen Tropfen ein Mittelwert bestimmt, wobei ein Durchschnittsgehalt von 340,9 µg ($s \pm 10,0$ µg; VK: 2,84 %) ermittelt wurde.

Eine Gegenüberstellung des aufgrund der Einwaage bestimmbareren theoretischen Gehaltes und des tatsächlich bestimmten Gehaltes ergab bei diesem Präparat eine Arzneistoffdosis, die im Durchschnitt 4,48 % über dem deklarierten Wert lag.

Bei 12 Probanden wurde der nach der Applikation auf dem Träger verbliebene Rest Pilocarpinhydrochlorid photometrisch bestimmt:

Proband	mittlerer Pilocarpin-gehalt [μg]	Rückstand Pilocarpin [μg]	appliziertes Pilocarpin [μg]	Rückstand Pilocarpin [%] der Dosis	appliziertes Pilocarpin [%] der Dosis
1. Block					
S25	310,6	260,0	50,60	83,71	16,29
S26	310,6	247,0	63,60	79,52	20,48
S27	310,6	257,0	53,60	82,74	17,26
S28	310,6	246,0	64,60	79,20	20,80
Mittelwert	310,6	252,5	58,10	81,29	18,71
VK [%]	0,00	2,79	12,13	2,79	12,13
2. Block					
S29	338,2	278,0	60,20	82,20	17,80
S30	338,2	270,0	68,20	79,83	20,17
S31	338,2	312,0	26,20	92,25	7,75
S32	338,2	276,0	62,20	81,61	18,39
S33	338,2	293,0	45,20	86,64	13,36
S34	338,2	323,0	15,20	95,51	4,49
S35	338,2	205,0	133,20	60,62	39,38
S36	338,2	225,0	113,20	66,53	33,47
Mittelwert	329,0	272,75	65,45	85,27	19,35
VK [%]	0,00	13,84	57,66	13,84	57,66

Tab.8.5.15: Photometrische Gehaltsbestimmung des nach der Applikation auf dem PTFE-Träger verbliebenen Pilocarpins, VK: Variationskoeffizient

Während im ersten Block die Ablösung der Lyophilisate mäßig um eine Wiederfindungsrate von 80 % schwankte (Variationskoeffizient = 12,13 %), unterlag sie im zweiten Block einer hohen Streuung (Variationskoeffizient = 57,66 %). Dabei gelang es, in zwei Fällen mehr als ein Drittel, aber bei zwei anderen Probanden auch nur einen kleinen Bruchteil der beabsichtigten Dosis zu applizieren.

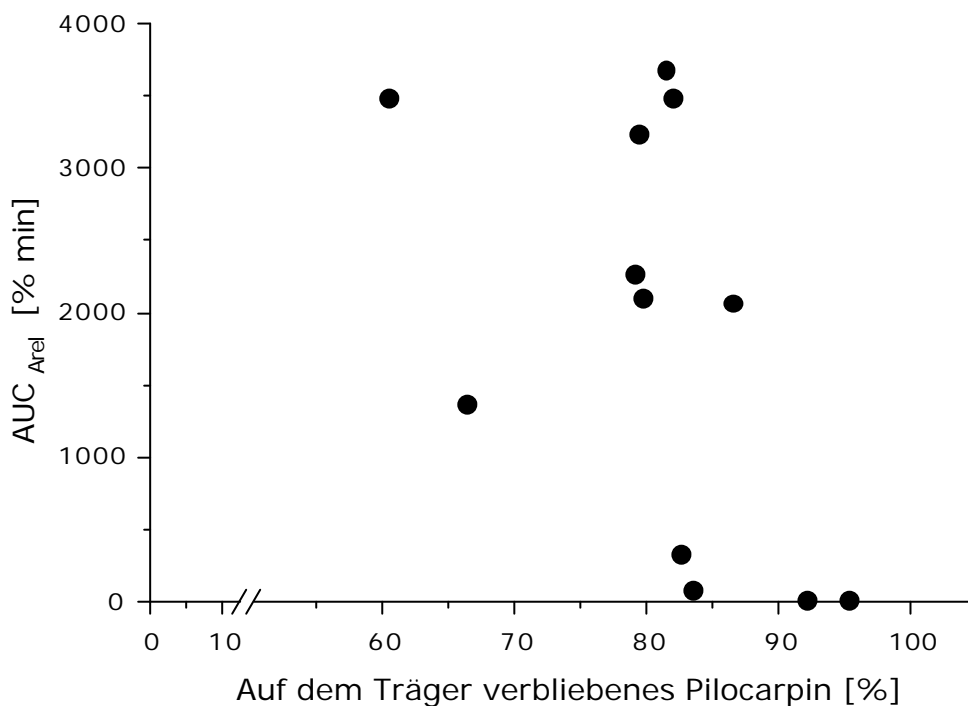
Die Analyse des Wirkstoffgehaltes auf 12 Trägern ergab, daß im Durchschnitt 0,266 mg ($s \pm 0,034$ mg) Pilocarpinhydrochlorid nach der Applikation auf der Trägeroberfläche zurückgeblieben ist. Dies bedeutet, daß im Durchschnitt lediglich 0,063 mg ($s \pm 0,031$ mg) statt der vorgesehenen 0,300 mg Pilocarpin mit Hilfe von Lyophilisaten am Auge appliziert werden konnten.

Im Mittel gelangten also nur 19,14 % ($s \pm 9,59$ %) der beabsichtigten Dosis an den Applikationsort.

Der Median ergab für die nach der Applikation auf dem Träger bestimmte Pilocarpinmenge im ersten Block 0,252 mg, im 2. Block 0,277 mg. Der Median für den gesamten Probandenumfang betrug 0,265 mg.

Zusammenhang zwischen abgelöster Menge Pilocarpinhydrochlorid und dem pharmakologischen Effekt

Eine Grafik soll einen möglichen Zusammenhang zwischen der applizierten Dosis und der AUC_{Arel} verdeutlichen.

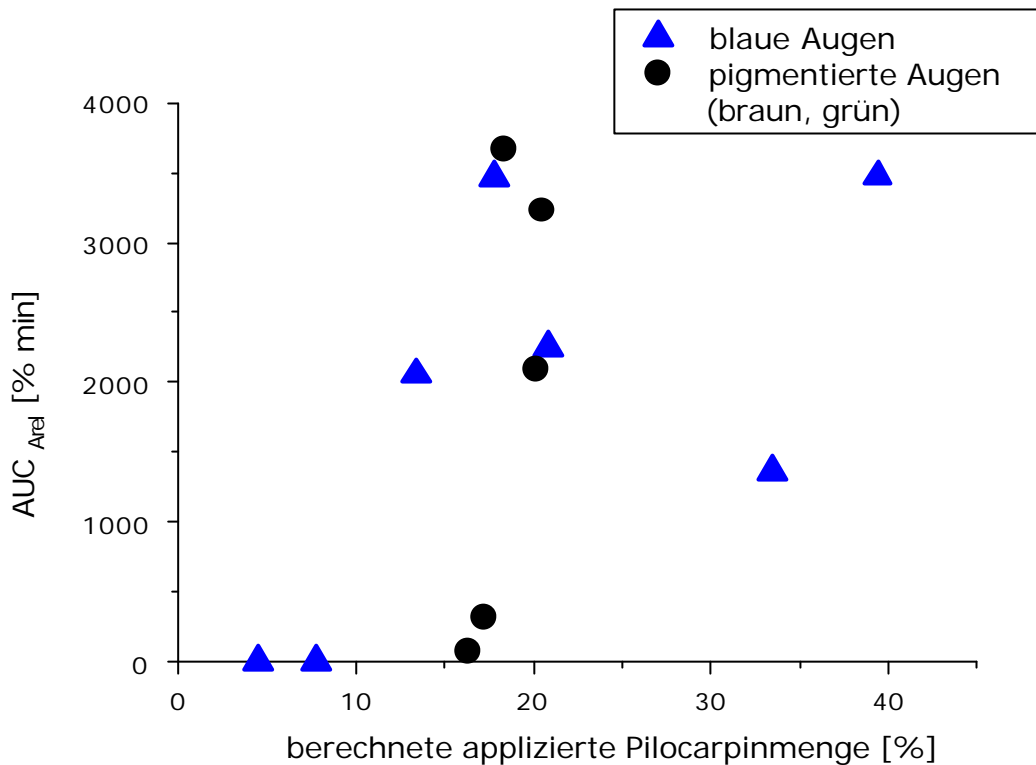


Tab.8.5.16: Zusammenhang zwischen wiedergefundenem Pilocarpinhydrochlorid und pharmakologischem Effekt

Eine Korrelation zwischen der applizierten Pilocarpinmenge und der Intensität des pharmakologischen Effektes ist nicht zu erkennen. Bereits bei geringen Mengen wurden ausgeprägte Kontraktionen beobachtet.

Borgmann [1973] fand bei schwach pigmentierten (blauen) Iriden eine ausgeprägtere Miosis als bei den stark pigmentierten. Konzentrationsabhängige Wirkungen mit unterschiedlich langen Kontraktionszeiten beobachtete er nur bei dunklen Iriden (s.a. Kap. 8.2.1.4). Die Pupillenverengungen wiesen jedoch keine Signifikanz auf.

Dieser Unterschied in der Empfindlichkeit war in dieser Studie nicht deutlich ausgeprägt. Während bei blauen Augen tendenziell mit steigender Pilocarpinkonzentration eine stärkere Pupillenreaktion zu erkennen ist, kann dies bei pigmentierten Augen nicht festgestellt werden.



Tab.8.5.17: Zusammenhang zwischen der applizierten Pilocarpinmenge und dem pharmakologischen Effekt in Abhängigkeit von der Augenfarbe

Zusammenfassung

Pilocarpin-Lyophilisate waren besser verträglich als Augentropfen, die aus Stabilitätsgründen auf einen pH von 4,8 gepuffert sind und ein Konservierungsmittel enthalten. Aus Lyophilisaten wurde der Wirkstoff langsam und meist weniger vollständig freigesetzt und resorbiert.

Nach der Applikation konventioneller Augentropfen war in sechs von sechzehn Fällen die Miose zeitweise maximal. Eine blauäugige, hellhäutige Person erlitt nach Augentropfenapplikation einen Ziliarspasmus, dessen Wirkung noch Stunden nach Versuchsende andauerte. Vergleichbare Nebenwirkungen traten nach der Lyophilisat-Anwendung nicht auf.

Durch Wahl des Polymers und der Herstellbedingungen könnte auch ein Depot-Effekt erreicht werden. Die Bioverfügbarkeit der Lyophilisate ist niedrig und noch verbesserungsbedürftig, aber die individuelle Variabilität ist bei beiden Zubereitungen gleich hoch. Da mit einem Drittel der Dosis eine vergleichbare Wirkung erzielt werden konnte, ist die Dosis-Wirkungs-Beziehung sogar besser als bei Augentropfen.

Es wurde gezeigt, daß man mit ophthalmischen Lyophilisaten Medikamente effektiv lokal am Auge applizieren kann.

8.5.2. Verträglichkeit und Verlauf der Mydriasis nach Applikation von Tropicamid

Wie bereits in Kapitel 8.4.2. erläutert, wurden für diese Studie zwei Lyophilisat-Zubereitungen verwendet, die sich hinsichtlich ihres hydrophilen Gerüstpolymers unterschieden. Die Tropicamid-Testzubereitung 1 enthielt außer dem Wirkstoff (0,150 mg) HPMC E50 (0,250 mg), während bei der Tropicamid-Testzubereitung 2 eine Mischung aus Natriumhyaluronat (0,125 mg) und Mannitol (0,250 mg) eingesetzt wurde.

Verträglichkeit: Auswertung der VA-Skala

Die Beurteilung der Verträglichkeit durch die Probanden erfolgte wie in Kapitel 8.5.1. zu den vorgegebenen Zeiten (bei Applikation, nach 5, 10, 15, 30, 60 und 240 Minuten). Je niedriger der Wert, desto geringer wurden die verursachten Reizerscheinungen der jeweiligen Applikationsform empfunden.

Tropicamid-Testzubereitung 1

Polymer: HPMC E50

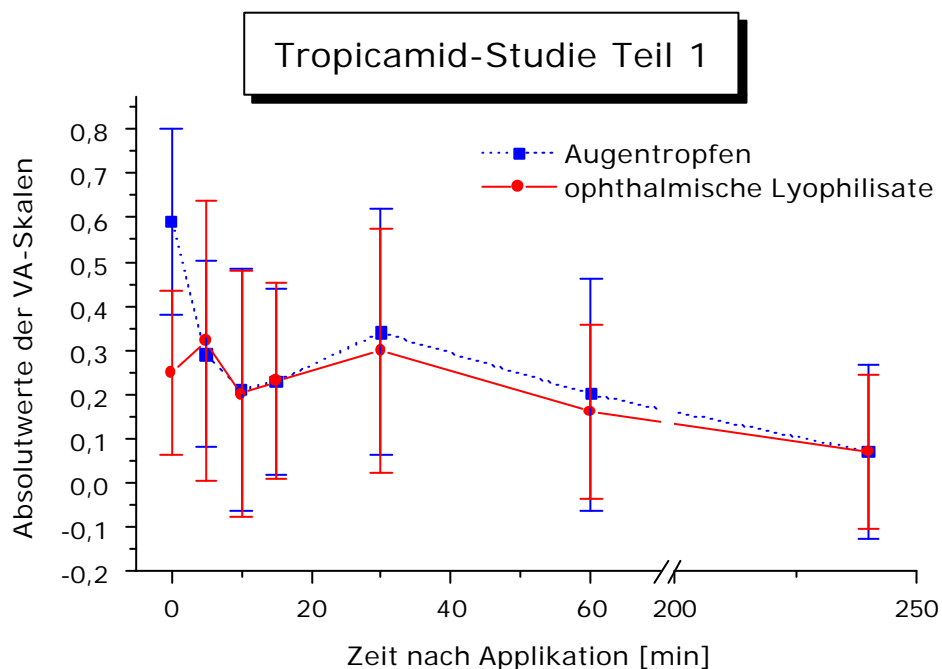


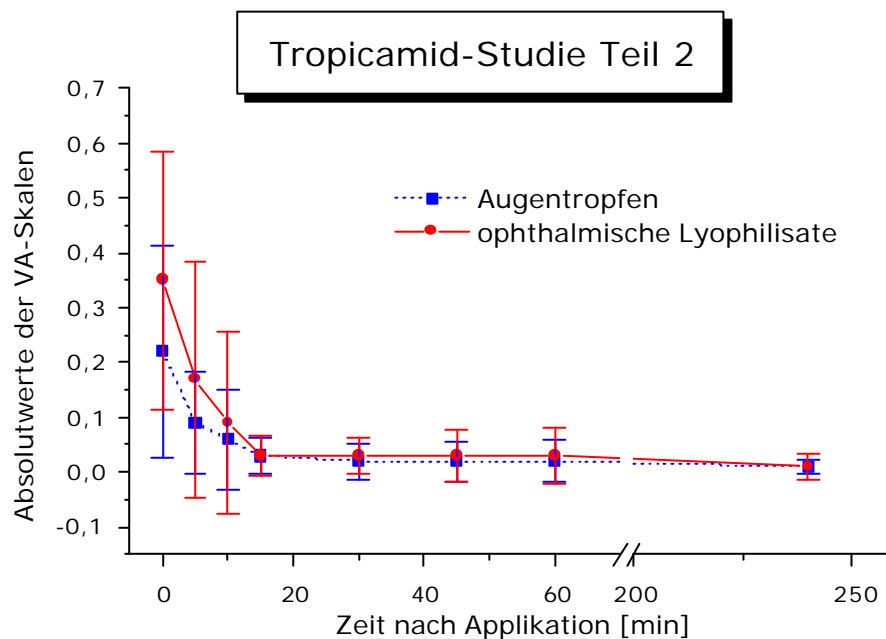
Abb.8.5.18: Mittelkurven der VA-Skalenauswertung
(Fehlerbalken: Standardabweichung, n=8)

Zu Beginn waren die Tropicamid-Tropfen im Vergleich zu den ophthalmischen Lyophilisaten auf HPMC-Basis schlechter verträglich. Im Verlauf der Studie glichen sich die beiden Produkte in ihrer Verträglichkeit jedoch immer mehr an. Der Wilcoxon-Rangsummen-Test ergab lediglich zum Zeitpunkt der Applikation einen statistisch signifikanten Unterschied (s. Anhang F). Die Unterschiede zu späteren Zeiten waren statistisch nicht signifikant bzw. eine Auswertung war identischer Reizscores nicht mehr möglich.

In vier Fällen tauchten Unstimmigkeiten zwischen der ersten und zweiten Frage auf (s. Abb. 8.4.6.). Diese Aussagen wurden nicht korrigiert, sondern so ausgewertet. Der Einfluß auf das Endresultat war jedoch gering.

Tropicamid-Testzubereitung 2

Polymer: Natriumhyaluronat / Mannitol



*Abb.8.5.19: Mittelkurven der VA-Skalenauswertung
(Fehlerbalken: Standardabweichung, n=10)*

Die Lyophilisate mit einer Kombination aus Mannitol mit Natriumhyaluronat waren tendenziell zu Beginn schlechter verträglich als das Referenzprodukt. Dieser Unterschied war jedoch in allen Fällen statistisch nicht signifikant bzw. eine Auswertung war aufgrund gleicher Reizscores nicht möglich (s. Anhang F).

Vergleicht man die Resultate (Test 1 und Test 2) miteinander, fällt auf, daß die Verträglichkeit der gleichen handelsüblichen Tropicamid-Tropfen von den Probandengruppen unterschiedlich bewertet wurde. Während bei der ersten Gruppe für die wäßrige Lösung zu Beginn der Applikation auf der VA-Skala im Durchschnitt ein Wert von 0,59 erhalten wurde, ergab sich in der zweiten Gruppe für Tropfen im Durchschnitt lediglich ein Wert von 0,22.

Im Vergleich dazu resultierte aus der ersten Lyophilisat-Rezeptur ein Anfangswert von 0,25, aus der zweiten einer von 0,35.

VA-Skalen liefern zwar gute Anhaltspunkte über Verträglichkeiten, aber die Aussage dieser Skalen sollte nicht überbewertet werden, da die Beurteilung von Empfindungen sehr subjektiv ist.

Verträglichkeit: Unerwünschte Nebenwirkungen

Sowohl die Test- als auch die Referenz-Zubereitungen riefen leichte Irritationen hervor. Der Zahlenwert gibt an, von wievielen Probanden die jeweilige Nebenwirkung genannt wurde.

Tropicamid-Testzubereitung 1

Polymer: HPMC E50

Nebenwirkungen	Augentropfen	Lyophilisat
Brennen	7	1
Sichtbeeinträchtigung	6	4
Kopfschmerzen	4	2
vermehrte Tränensekretion	3	2
Fremdkörpergefühl	0	3
leichtes Druckgefühl	0	2
klebriges Gefühl	0	1
Stechen	0	1
Kratzen	0	1
Schmerzen	1	0
Kältegefühl	1	0
Juckreiz	1	0

Tab.8.5.20: Aufgetretene Nebenwirkungen, Tropicamid-Studie Teil 1 (n=8)

Fast alle Probanden notierten unabhängig voneinander, daß nach der Instillation des Tropfens ein starkes Brennen auftrat, was in einem Fall sogar als Schmerz empfunden

wurde. Der pH-Wert der Tropfen lag mit 5,61 (s. Kap. 5) innerhalb des Bereiches, der von 99 % aller Personen als Reizung empfunden wird (s. Kap. 2.6.1.1.).

Lediglich ein Proband notierte dies nach der Applikation eines Lyophilisats.

Aufgrund des Wirkmechanismus von Tropicamid kam es zu einer Weitstellung der Pupille und damit zu einer Verschlechterung der Sicht. Unabhängig von der Zubereitung war dies die am häufigsten notierte Bemerkung (n=10).

Im Wesentlichen gelten die gleichen Aussagen wie in Kapitel 8.5.1.

Tropicamid-Testzubereitung 2

Polymer: (Natriumhyaluronat / Mannitol)

Nebenwirkungen	Augentropfen	Lyophilisat
Brennen	3	5
Sehbeeinträchtigung	2	3
vermehrte Tränensekretion	3	2
Fremdkörpergefühl	0	5
klebriges Gefühl	0	1
Juckreiz	0	1
leichtes Ziehen	0	1
leichtes Druckgefühl	1	1
Kältegefühl	1	0
Reizung	1	0

Tab.8.5.21: Aufgetretene Nebenwirkungen, Tropicamid-Studie Teil 2 (n=10)

Bei dieser Rezeptur wurde von jedem Zweiten der Kommentar vermerkt, daß das Lyophilisat kurz nach der Applikation ein Brennen verursachte und daß anfangs ein Fremdkörpergefühl eintrat. Allerdings ließ sich statistisch hinsichtlich der Verträglichkeit kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Zubereitungen nachweisen (s.o.).

Relative Amplituden-Kurven

Wie bei der vorangegangenen Studie wurde die Pupillenreaktion auf einen Lichtblitz gemessen und aufgezeichnet. Die Auswertung erfolgte analog.

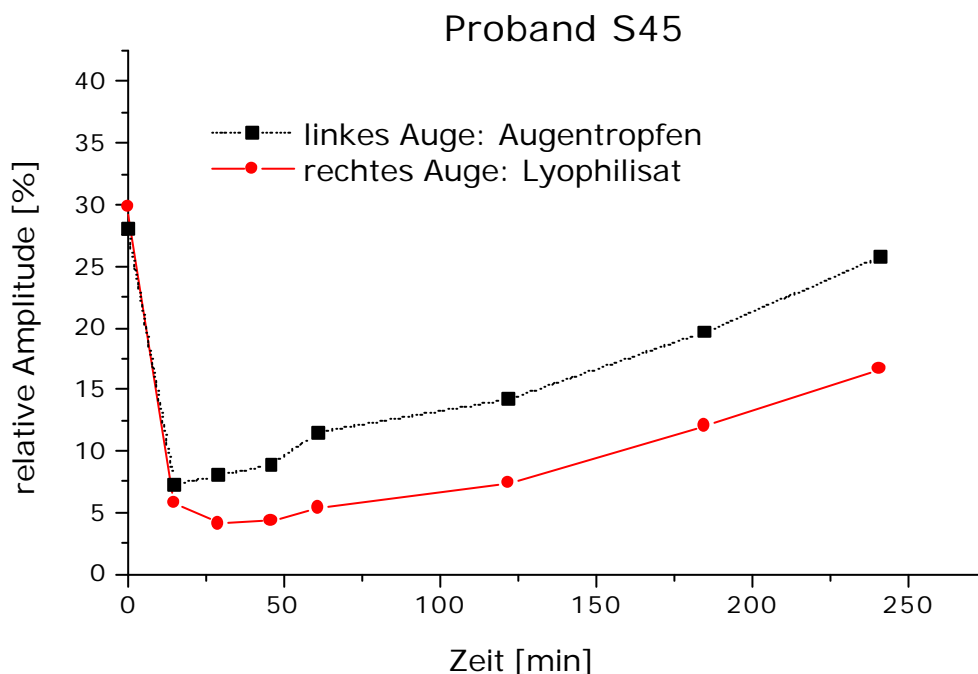
Tropicamid-Testzubereitung 1

Polymer: HPMC

Nur bei einem von acht Probanden (S45) war der mydriatische Effekt nach Lyophilisat-Applikation intensiver und hielt länger an als nach Applikation der Tropfen. Dies spiegelte sich auch in dem höheren AUC_{Ard} -Wert wieder (s. Tab.8.5.26.). In allen übrigen Fällen jedoch (n=7) war die Wirkung der Tropfen stärker.

Um Unterschiede zwischen den Zubereitungen zu erkennen, werden hier die Kurvenverläufe der relativen Amplitudenwerte von Proband S45 dargestellt, da es in diesem Beispiel zu einer fast vollständigen Ablösung des Lyophilisats kam.

Die übrigen Grafiken sind im Anhang G aufgeführt.

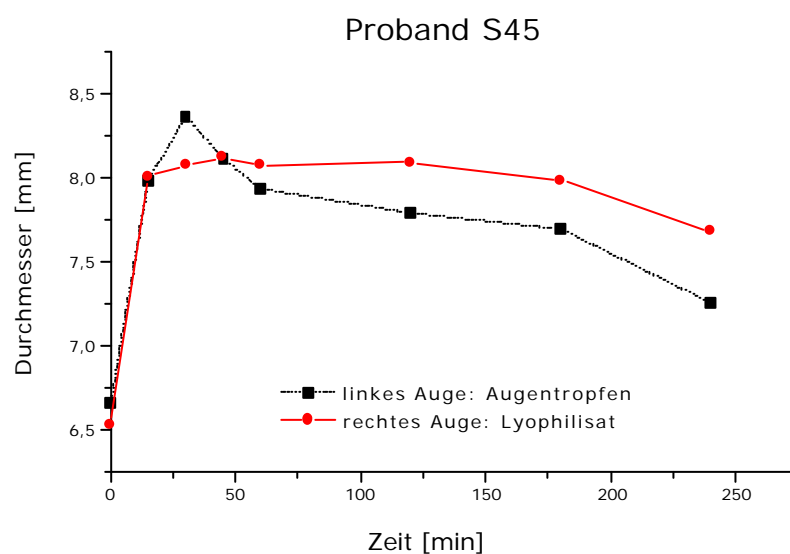


Tab.8.5.22: Verlauf der relativen Amplitudenwerte bei Proband S45 zu unterschiedlichen Zeiten nach der Applikation von Test- und Referenz-Zubereitung, Tropicamid-Studie, Teil 1

Da sich die relative Amplitude aus dem Verhältnis des Pupillendurchmessers zu Anfang und dem im Verlauf der Messung erreichten Minimalwert errechnet, ähnelt der Kurvenverlauf trotz entgegengesetzter pharmakologischer Wirkung des Arzneistoffes dem der Pilocarpin-Studie.

Nach Applikation der Zubereitungen erfolgte der Wirkungseintritt aus beiden Zubereitungen gleich schnell. Mit dem Lyophilisat konnte in diesem Fall allerdings eine Intensivierung und Verlängerung der Mydriasis erreicht werden. Photometrisch wurden bei diesem Probanden auf dem benutzten Trägerstreifen 5 µg (3,4 %, s. Tab. 8.5.32.) Tropicamid wiedergefunden, was bedeutet, daß 96,6 % zur Anwendung am Auge gelangten. Dieses Ergebnis wird durch Saettone [1982, 1984] bestätigt, der in seinen Artikeln veröffentlichte, daß ein der Zusatz von HPMC die Wirkung von Tropicamid verlängerte und verstärkte.

Bei der Darstellung der relativen Amplitude wird ein interessantes Phänomen nicht deutlich. Deshalb wurde bei diesem Probanden der Pupillendurchmesser über die Zeit aufgetragen, wobei nach der Applikation der Augentropfen ein schwaches Wirkungsmaximum beobachtet wurde, das anschließend wieder abfiel, während sich mit dem Lyophilisat ein allmählicher Kurvenverlauf ergab, der über einen längeren Zeitraum (über drei 3 Stunden) annähernd konstant blieb.



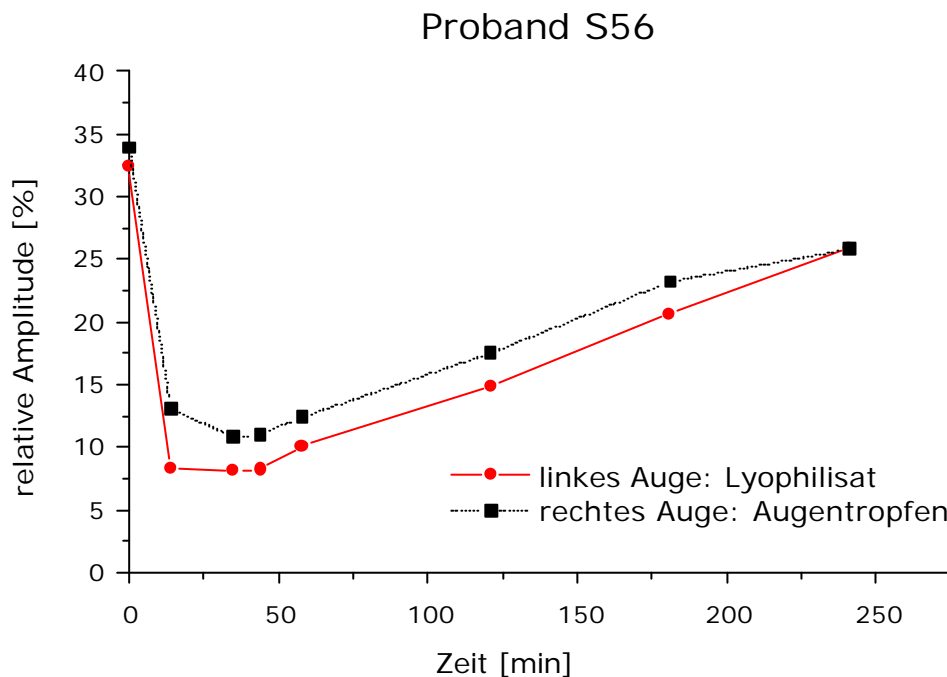
Tab.8.5.23: Verlauf der Pupillendurchmesser bei Proband S45 zu unterschiedlichen Zeiten nach der Applikation von Test- und Referenz-Zubereitung, Tropicamid-Studie, Teil 1

Da allerdings vergleichbare Ergebnisse aufgrund der geringen Probandenzahl nicht zur Verfügung stehen, muß offen bleiben, ob diese Beobachtung repräsentativ ist.

Tropicamid-Testzubereitung 2

Polymer: Natriumhyaluronat / Mannitol

Der folgende Wirkungsverlauf ist repräsentativ für die Mehrzahl der Probanden. Bei sechs der zehn Probanden war die Mydriasis nach der Lyophilisat-Applikation ausgeprägter.

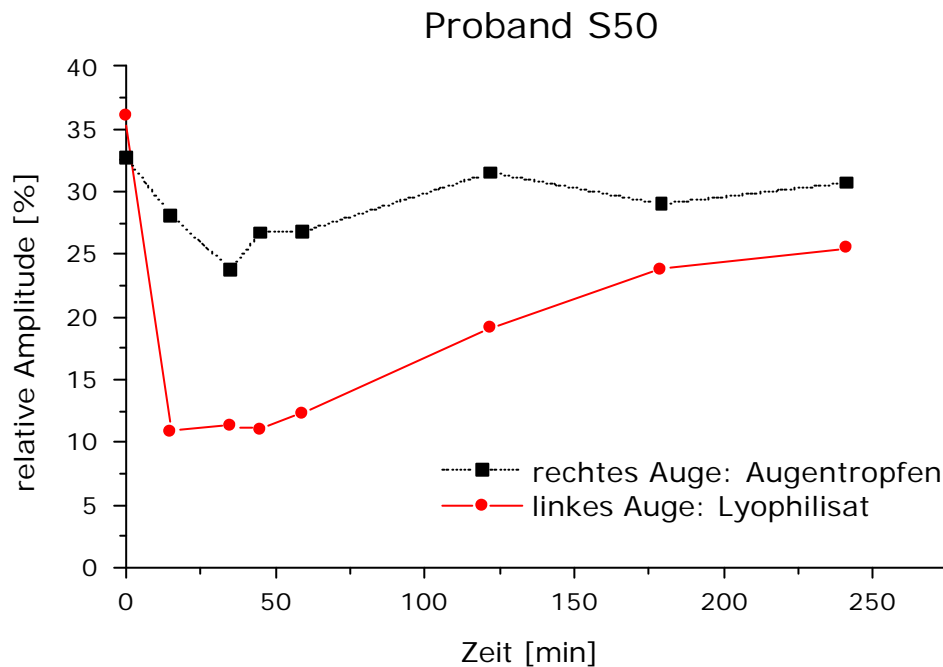


Tab.8.5.24: Verlauf der relativen Amplitudenwerte bei Proband S56 zu unterschiedlichen Zeiten nach der Applikation von Test- und Referenz-Zubereitung, Tropicamid-Studie, Teil 2

Auch in diesem Fall setzte die Mydriasis nach Applikation der beiden Zubereitungen gleich schnell ein. Ebenfalls konnte hier eine Verstärkung des Effektes durch das Lyophilisat erreicht werden. Photometrisch wurden auf dem benutzten Trägerstreifen nur noch 1 µg detektiert, was bedeutet, daß 99,5 % der Dosis zur Anwendung am Auge kamen (s. Tab. 8.5.33.).

In einem anderen Beispiel konnte gezeigt werden, daß Lyophilisat-Zubereitungen konventionellen Präparaten durchaus überlegen sein können. Proband S50 notierte bei der Applikation der Augentropfen keine Auffälligkeiten und stellte nach der Gabe des Trockengels ein leichtes Brennen fest. Abb. 8.5.25. zeigt jedoch, daß mit einer nicht als unangenehm empfundenen Augentropfengabe nicht automatisch eine gute Wirkung erreicht werden kann und ein Brennen nicht unbedingt pharmakologische Nachteile nach sich zieht.

Die Analytik zeigte, daß bei dieser Testperson die vollständige Dosis Tropicamid mit einem Ophthalmischen Lyophilisat appliziert werden konnte.



Tab.8.5.25: Verlauf der relativen Amplitudenwerte bei Proband S50 zu unterschiedlichen Zeiten nach der Applikation von Test- und Referenz-Zubereitung

Beschreibende Statistik der Zeit-Effekt-Kurven

Als Maß für die Intensität der mydritischen Wirkung wurde die Fläche unter den relativen Amplitudenkurven berechnet (s.a. Kap 8.5.1.).

Tropicamid-Testzubereitung 1

Polymer: HPMC E50

Proband	AUC_{Arel} Augentropfen [%·min]	AUC_{Arel} Lyophilisat [%·min]
S40	1.756	260
S41	5.350	890
S42	4.633	1.966
S43	4.050	772
S44	6.752	2.046
S45	2.879	4.902
S46	2.885	359
S47	3.043	2
Mittelwert	3.918	1.400
Standardabweichung	1.612	1.604
Variationskoeffizient [%]	41,2	114,6

Tab.8.5.26: AUC_{Arel} bei allen Probanden nach der Applikation von Test- und Referenz-Zubereitung, Tropicamid-Studie, Teil 1

Die Fläche unter den Effekt-Zeit-Kurven für die relativen Amplituden-Werte (s. Tab.8.5.28.) betrug in dieser Studie für die ophthalmischen Lyophilisate im Durchschnitt 1.400 %·min ($s \pm 1.604$ %·min) und 3.918 %·min ($s \pm 1.612$ %·min) für konventionelle Augentropfen. Die Standardabweichungen für beide Zubereitungen in etwa gleich, der Variationskoeffizient liegt bei den Trockenapplikatoren mit 114,6 % allerdings fast um ein Dreifaches höher als bei den Augentropfen mit 41,2 %.

Tropicamid-Testzubereitung 2

Polymer: Natriumhyaluronat / Mannitol

Proband	AUC_{Arel} Augentropfen [%·min]	AUC_{Arel} Lyophilisat [%·min]
S48	2.481	1.372
S49	3.796	3.030
S50	864	4.096
S51	3.471	1.520
S52	5.038	5.812
S53	3.012	4.399
S54	2.756	4.388
S55	1.230	2.664
S56	3.685	3.901
S57	5.435	2.056
Mittelwert	3.177	3.224
Standardabweichung	1.457	1.494
Variationskoeffizient [%]	45,9	46,6

Tab.8.5.27: AUC_{Arel} bei allen Probanden nach der Applikation von Test- und Referenz-Zubereitung, Tropicamid-Studie, Teil 2

Eine Änderung der Rezeptur und die Verwendung eines anderen PTFE-Trägers veränderten die Werte bezüglich der Bioverfügbarkeit von Tropicamid aus Lyophilisaten erheblich.

So betrug bei dem zweiten Teil der Studie (s. Tab. 8.5.27) die Fläche unter den Effekt-Zeit-Kurven für die relativen Amplituden-Werte im Durchschnitt 3.224 %-min ($s \pm 1.494$ %-min) für die ophthalmischen Lyophilisate und 3.177 %-min ($s \pm 1.457$ %-min) für konventionelle Augentropfen. Der Variationskoeffizient ist für beide Zubereitungen hier wieder in etwa gleich.

Bei den Augentropfen stimmt dieser Wert ebenfalls ungefähr mit dem aus dem ersten Teil der Studie überein.

Insofern könnte ein Variationskoeffizient von 40 bis 50 % bei der Applikation von Tropicamid-Augentropfen durchaus allgemein gültig zu sein. Da der Wert für Lyophilisate ebenfalls in diesem Bereich fällt, sind in diesem Beispiel die Lyophilisate mit den konventionellen Augentropfen in ihrer Wirkung vergleichbar.

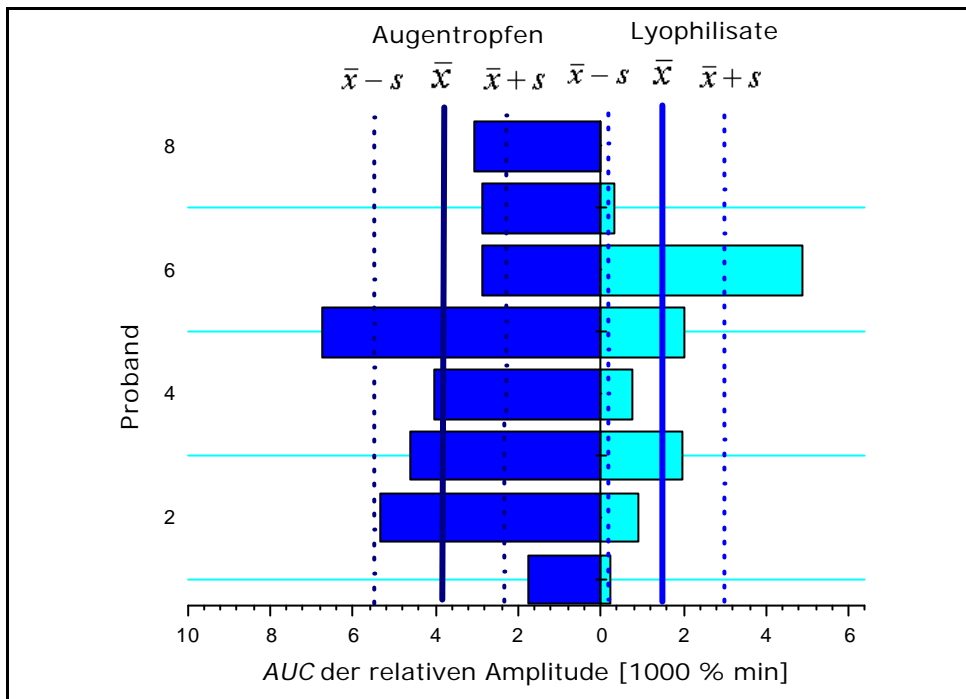


Abb.8.5.28: Gegenüberstellung von AUC_{Arel} bei allen Probanden nach der Applikation von Test- und Referenz-Zubereitung - Tropicamid-Studie Teil 1 (HPMC)

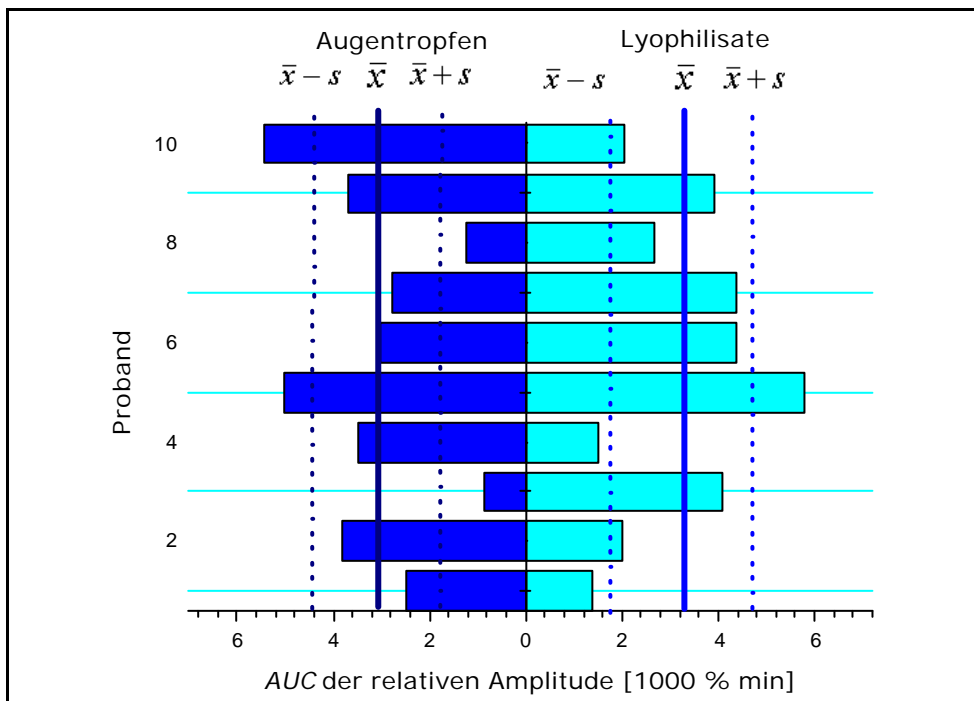


Abb.8.5.29: Gegenüberstellung von AUC_{Arel} bei allen Probanden nach der Applikation von Test- und Referenz-Zubereitung - Tropicamid-Studie Teil 2 (Natriumhyaluronat/Mannitol)

Varianzanalyse

Die AUC_{Arel} -Werte wurden mit einem ANOVA 'Two-factor-mixed-model' (Zweifaktorielles Modell mit festen und zufälligen Effekten, s.a. Kap. 8.4.1.) auf ihre Signifikanz geprüft. Die Berechnung ergab folgende Daten:

Tropicamid-Testzubereitung 1

Polymer: HPMC E50

Ursprung der Variabilität	df	SS	MS	F	Signifinz
Formulierung (fester Effekt)	1	25,13	25,13	10,98	$\alpha < 0,05$
Probanden (zufälliger Effekt)	7	20,40	2,91	1,27	-
Fehler (unerklärter Restfehler)	7	16,01	2,29		
Summe	15	61,54			

Tab.8.5.30: Varianzanalyse von AUC_{Arel} nach der Applikation von Test- und Referenz-Zubereitung, Teil 1 [nach Sokal, 1987]

df: Anzahl der Freiheitsgrade (degrees of freedom)

SS: Summe der Abweichungsquadrate (sum of squares)

MS: Mittleres Abweichungsquadrat (meansquares)

F: Prüfgröße (variance ratio)

Zwischen den beiden Zubereitungen wurde ein statistisch signifikanter Unterschied gefunden. Die Wirkung der konventionellen Augentropfen bezüglich der Pupillenreaktion war in dieser Studie signifikant stärker.

Tropicamid-Testzubereitung 2

Polymer: Natriumhyaluronat / Mannitol

Ursprung der Variabilität	df	SS	MS	F	Signifinz
Formulierung (fester Effekt)	1	1,11	1,11	0,005	-
Probanden (zufälliger Effekt)	9	2056,43	228,49	1,103	-
Fehler (unerklärter Restfehler)	9	1864,42	207,16		
Summe	19	3921,96			

Tab.8.5.31: Varianzanalyse von AUC_{Arel} nach der Applikation von Test- und Referenz-Zubereitung Teil 2 [nach Sokal, 1987]

Zwischen den beiden Zubereitungen konnte bei dem vorliegenden Stichprobenumfang statistisch kein signifikanter Unterschied gefunden werden. Die Präparate waren in ihrer Wirkung im Hinblick auf eine Mydriasis gleichwertig.

Analytik**Tropicamid-Testzubereitung 1**

Polymer: HPMC E50

Die Studie wurde im Block mit 8 Personen durchgeführt. Verwendet wurde hierbei eine einzige Charge Lyophilisate. Die photometrische Bestimmung des Tropicamids in fünf Lyophilisaten, die bei der Studie verwendet worden sind, ergab einen Mittelwert von 141,8 µg ($s \pm 6,98 \mu\text{g}$) mit einem Variationskoeffizienten von 4,79 %.

Nach der Studie wurden die Tropicamidrückstände auf den Trägern bei allen acht Probanden photometrisch bestimmt:

Proband	mittlerer Tropicamid-gehalt [µg]	Rückstand Tropicamid [µg]	appliziertes Tropicamid [µg]	Rückstand Tropicamid [%] der Dosis	appliziertes Tropicamid [%] der Dosis
S40	141,8	145,0	0,00	101,94	0,00
S41	141,8	131,0	10,80	92,37	7,63
S42	141,8	128,0	13,80	90,00	10,00
S43	141,8	134,0	7,80	94,26	5,74
S44	141,8	119,0	22,80	83,99	16,01
S45	141,8	5,0	136,80	3,38	96,62
S46	141,8	123,0	18,80	86,76	13,24
S47	141,8	140,0	1,80	98,63	1,37
Mittelwert	141,8	115,61	26,58	81,42	18,83
VK [%]	0	39,39	170,13	39,39	170,13

Tab.8.5.32: Photometrische Gehaltsbestimmung des nach der Applikation auf dem PTFE-Träger verbliebenen Tropicamids, VK: Variationskoeffizient

Bis auf einen Fall konnte bei dieser Studie bei allen Probanden nur sehr wenig Arzneistoff mit dem Trockengelapplikator an das Auge gebracht werden. Im Durchschnitt wurden 18,83 % bzw. nur 26,58 µg der vorgesehenen Dosis appliziert. 115,61 µg (81,42 % der Dosis) blieben im Schnitt auf den Trägern zurück. Angesichts der schiefen Verteilung ist der Median charakteristischer als das arithmetische Mittel. Für die Tropicamidrückstände beträgt der Median 129,5 µg (91,0 % der Dosis).

Tropicamid-Testzubereitung 2

Polymer: Natriumhyaluronat / Mannitol

Die Studie wurde im Block mit 10 Personen durchgeführt. Für alle Personen wurde dieselbe Charge verwendet. Die photometrische Bestimmung des Tropicamids in fünf Lyophilisaten, die bei der Studie verwendet worden sind, ergab einen Mittelwert von 120,0 µg ($s \pm 9,14 \mu\text{g}$) mit einem Variationskoeffizienten von 7,62 %.

Nach der Studie wurden die Tropicamidrückstände auf den Trägern bei allen zehn Probanden photometrisch bestimmt:

Proband	mittlerer Tropicamid-gehalt [µg]	Rückstand Tropicamid [µg]	appliziertes Tropicamid [µg]	Rückstand Tropicamid [%] der Dosis	appliziertes Tropicamid [%] der Dosis
S48	120,0	35,0	85,00	29,29	70,71
S49	120,0	98,0	22,00	81,87	18,13
S50	120,0	0,0	120,00	0,00	100,00
S51	120,0	2,0	118,00	2,01	97,99
S52	120,0	52,0	68,00	43,18	56,82
S53	120,0	n.a.*	n.a.*	n.a.*	n.a.*
S54	120,0	0,0	120,00	0,00	100,00
S55	120,0	3,0	117,00	2,50	97,50
S56	120,0	1,0	119,00	0,52	99,48
S57	120,0	6,0	114,00	4,99	95,01
Mittelwert	120,0	21,89	98,11	18,26	81,74
VK [%]	0	155,52	34,70	155,52	34,70

Tab.8.5.33: Photometrische Gehaltsbestimmung des nach der Applikation auf dem PTFE-Träger verbliebenen Tropicamids, VK: Variationskoeffizient

* n.a.: nicht auswertbar (Rückstand: 155 µg)

Bei dieser Studie konnten mit einer anderen Rezeptur und einem anderen PTFE-Träger die Effektivität des Applikatorsystems erheblich verbessert werden. In sechs Fällen gelang es, über 95 % der enthaltenen Dosis zu verabreichen.

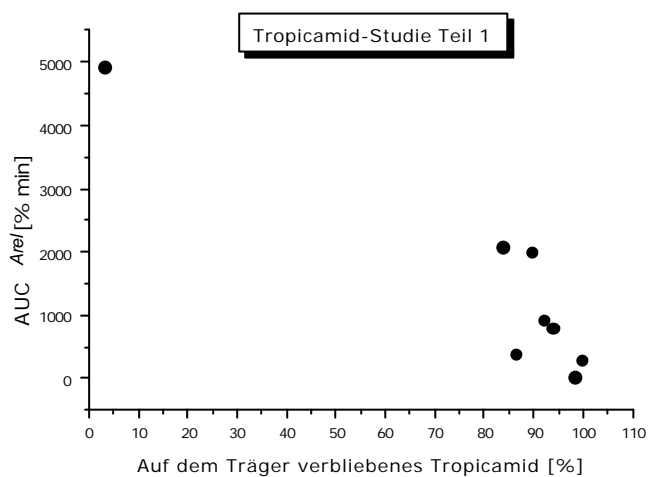
Bei Proband S53 wurde analytisch ein zu hoher Wert trotz starker Pupillenreaktion detektiert (s. Anhang H). Da bei diesen Bestimmungen nur ein Meßwert erhalten wurde, konnte die Messung nicht wiederholt werden.

Im Schnitt wurden auf den Trägern 21,89 µg Tropicamid bestimmt. Daraus kann geschlossen werden, daß 81,74 % bzw. 98,11 µg Arzneistoff am Auge appliziert worden ist.

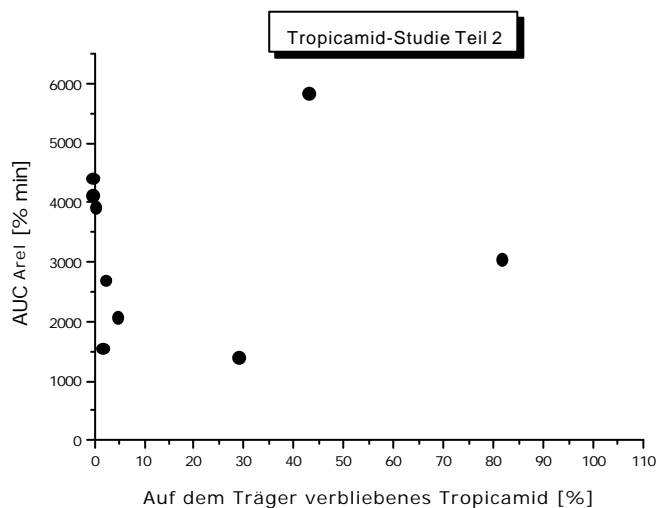
Zusammenhang zwischen abgelöster Menge Tropicamid und pharmakologischem Effekt

Ein Zusammenhang zwischen der aus Lyophilisaten zur Anwendung gelangten Menge Tropicamid und der Intensität des pharmakologischen Effektes ist bei beiden Studien nicht zu erkennen.

Dieses Ergebnis entspricht der Aussage in Kapitel 8.2.2.2., nach der bereits in sehr geringen Konzentrationen mit Tropicamid eine Mydriasis erzeugt werden kann. Danach ist auch mit höheren Konzentrationen keine Wirkungssteigerung zu erreichen.



*Tab.8.5.34:
Tropicamid-Testzubereitung 1
Polymer: HPMC E50
Zusammenhang zwischen
wiedergefundenem Tropicamid
und pharmakologischem Effekt*



*Tab.8.5.35:
Tropicamid-Testzubereitung
Polymer:
Natriumhyaluronat/Mannitol
Zusammenhang zwischen
wiedergefundenem Tropicamid
und pharmakologischem
Effekt*

Zusammenfassung

Alle tropicamidhaltigen Lyophilisate wurden im Vergleich zu konventionellen Augentropfen von den Versuchspersonen als genauso gut oder sogar besser verträglich beurteilt. Im ersten Teil der Studie konnte zum Zeitpunkt der Applikation der Augentropfen ein statistisch signifikanter Unterschied nachgewiesen werden, wobei die Augentropfen als unangenehmer beurteilt wurden.

Es zeigte sich, daß die Zusammensetzung des Lyophilisats und die Qualität des hydrophoben Trägers durchaus erheblichen Einfluß auf die Bioverfügbarkeit eines Arzneistoffes haben kann. Während im ersten Teil Ablösungsprobleme des Lyophilisats vom Träger dominierten (Polymer: HPMC E50) und nur in einem Fall die fast vollständige Dosis appliziert werden konnte, konnte dies durch eine andere Zusammensetzung des Trockengels (Natriumhyaluronat, Mannitol) und durch die Verwendung eines anderen PTFE-Materials wesentlich verbessert werden.

In diesem Fall waren die Ophthalmischen Lyophilisate den konventionellen Augentropfen gegenüber durchaus ebenbürtig. Hinsichtlich Wirkung und Verträglichkeit gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede.

8.5.3. Pilotstudie zur Pharmakokinetik von Fluorescein-Natrium bei Applikation am Auge in Form eines Lyophilisats im Vergleich zu konventionellen Augentropfen

Mit Hilfe der Fluorophotometrie (s.a. Kap. 8.3.4.) kann die Änderung der Fluorescein-Konzentration im vorderen Augenabschnitt in Abhängigkeit von der Zeit gemessen werden. In dieser Pilotstudie wurden die nach der Applikation von Lyophilisaten bzw. Augentropfen im Kammerwasser und in der Cornea erreichten Farbstoff-Konzentrationen bestimmt.

Zeit-Effekt-Kurven

Jedem Probanden wurden zwei unterschiedliche Präparate appliziert, wobei in allen Zubereitungen die gleiche Fluoresceinmenge (0,068 mg) enthalten war (s.a. Kap. 8.4.3.).

Das Applikationsschema sah folgendermaßen aus:

	linkes Auge	rechtes Auge
Proband 1	HPMC E50, 1,0 %	HPMC E4M, 0,5 %
Proband 2	HPMC E50 1,0 %	HPMC E4M, 0,5 %
Proband 3	HPMC E50 1,0 %	Augentropfen

Tab.8.5.36: Übersicht der applizierten Darreichungsformen

Die Konzentrationen im Kammerwasser und in der Cornea wurden für jedes Auge bei allen Probanden graphisch aufgetragen.

Proband 1

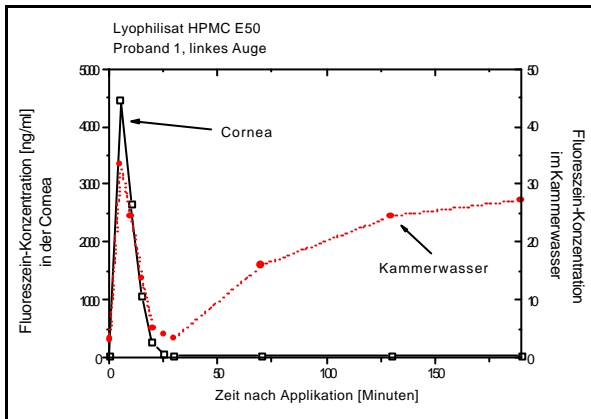


Abb.8.5.37: Fluorescein-Konzentrationen in Cornea und Kammerwasser nach Applikation eines Lyophilisats auf HPMC E50-Basis

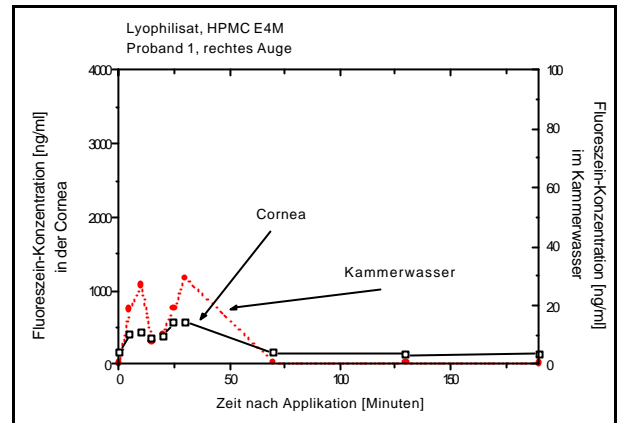


Abb.8.5.38: Fluorescein-Konzentrationen in Cornea und Kammerwasser nach Applikation eines Lyophilisats auf HPMC E4M-Basis

Proband 2

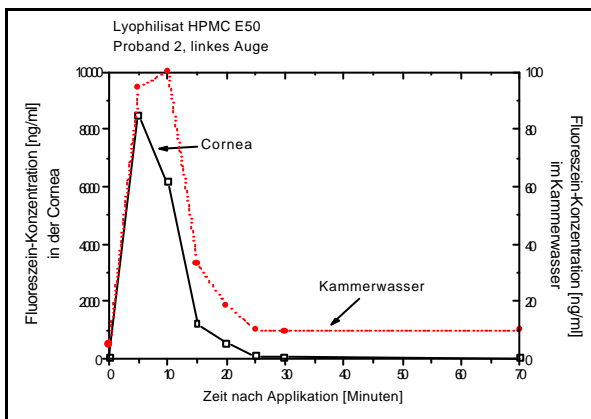


Abb.8.5.39: Fluorescein-Konzentrationen in Cornea und Kammerwasser nach Applikation eines Lyophilisats auf HPMC E50-Basis

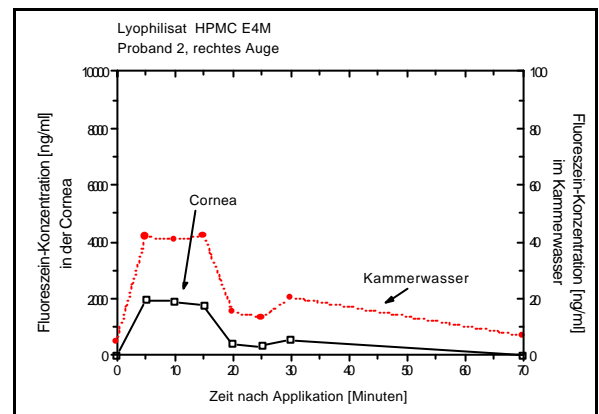


Abb.8.5.40: Fluorescein-Konzentrationen in Cornea und Kammerwasser nach Applikation eines Lyophilisats auf HPMC E4M-Basis

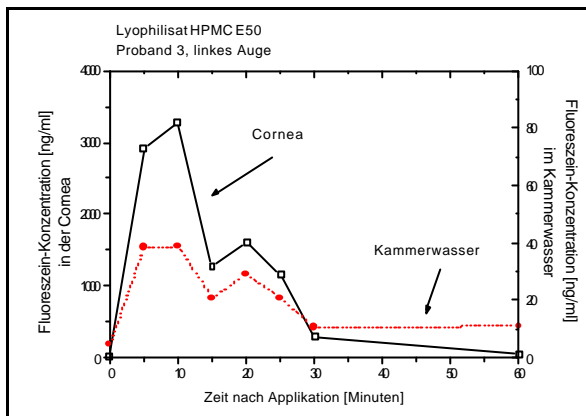
Proband 3

Abb.8.5.41: Lyophilisats auf HPMC E50-Basis
Applikation eines Lyophilisats auf HPMC E50-
Basis

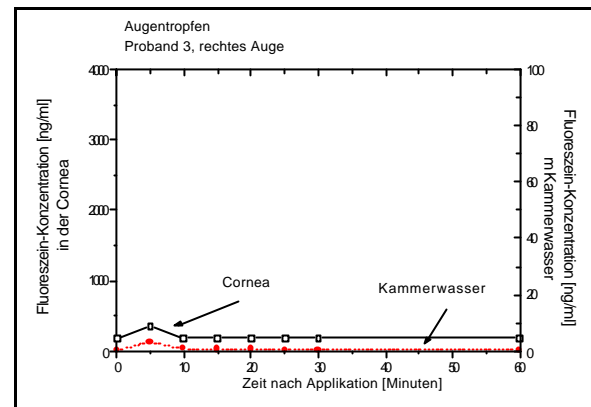


Abb.8.5.42: Fluorescein-Konzentrationen in
Cornea und Kammerwasser nach Applikation
eines Fluorescein-Augentropfens

Die Kammerwasserkonzentration stieg nach der Applikation von konventionellen Fluorescein-Augentropfen kaum an. Ebenso konnte auch in der Cornea nur für kurze Zeit ein geringer Anstieg der Wirkstoffkonzentration gemessen werden. Im Gegensatz dazu wurden mit den Lyophilisaten sowohl in der Cornea als auch im Kammerwasser hohe Fluorescein-Konzentrationen erzielt.

Tendenziell scheint ein Lyophilisat auf HPMC E50-Basis für hohe Wirkstoffkonzentrationen besser geeignet zu sein als eines auf HPMC E4M-Basis.

Um jedoch eine endgültige Aussage treffen zu können, ist eine größere Probandenzahl erforderlich.

Analytik

Auf keinem der benutzten PTFE-Träger konnten Fluorescein-Rückstände wiedergefunden werden. Folglich wurde die gesamte Wirkstoffmenge am jeweiligen Auge appliziert.

Zusammenfassung

Nach Applikation der Lyophilisate wurden in der Cornea und im Kammerwasser in allen Fällen hohe Konzentrationen gemessen, während sie nach der Applikation des Tropfens niedrig blieb.

Bei beiden Cellulose-Typen hafteten die Lyophilisate bei Lagerung ausreichend fest auf dem Träger und lösten sich bei Applikation im Gegensatz zu tropicamid- und pilocarpinhaltigen Lyophilisaten vollständig ab.

HPMC E50 und E4M bewährten sich als hydrophile Polymere in Kombination mit Fluorescein. Ob mit HPMC E50 gegenüber E4M eine intensivere Wirkung erzielt werden könnte, kann hier nicht geklärt werden. Diese Pilotstudie sollte nur Tendenzen zeigen.

Eine vollständige Studie mit 12 gesunden Probanden führten Dinslage et al. [2000] durch. Sie konnten bestätigen, daß die *AUC*, die Konzentrationen im Stroma und Kammerwasser nach Lyophilisat-Applikation während der ganzen Versuchszeit höher als nach Gabe konventioneller Augentropfen lagen. Die *AUC* ergab einen signifikanten Fluorescein-Anstieg nach 15 und 180 Minuten, die Stroma-Werte bei 15, 45, 60, 180 Minuten und alle gemessenen Kammerwasser-Konzentrationen (15, 30, 45, 60, 120, 180 Minuten) nach Lyophilisat-Applikation.

Die Fluorescein-Aufnahme aus Lyophilisaten war bis zu 34 mal höher als aus Augentropfen.

Diese erfolgreiche Applikation von Fluorescein-Lyophilisaten gibt Anlaß zu der Annahme, daß noch höhere Fluorescein-Konzentrationen auf diese Weise erfolgreich appliziert werden könnten. Eine in der Ophthalmologie gängige Methode zur Bestimmung der Abflußgeschwindigkeit des Kammerwassers, ist die nächtliche Applikation von insgesamt 6 Tropfen Fluorescein-Lösung über einen Zeitraum von 3 Stunden, die für Patient und Arzt aufwendig und unangenehm ist. Die einmalige Applikation eines 6-fach dosierten Fluorescein-Lyophilisats mit einem Depot-Effekt würde eine erhebliche Erleichterung für alle Beteiligten darstellen.

Eine Studie mit dieser Zielsetzung wird geplant.

D. ZUSAMMENFASSUNG

In der Vergangenheit wurde durch chemische, physikalische oder mechanische Maßnahmen immer wieder versucht, die Applikation am Auge zu vereinfachen und ein leicht applizierbares, vielseitig einsetzbares, hinsichtlich seiner Bioverfügbarkeit und Freisetzungskinetik für jeden Arzneistoff brauchbares System zu finden. Dabei zeigte sich jedoch, daß trotz jahrelanger Anstrengungen dieses Problem bisher immer noch nicht ganz zufriedenstellend gelöst werden konnte.

Die von Grunthal [1996] entwickelten und im Rahmen dieser Arbeit weiter untersuchten Lyophilisate bieten eine alternative, vielversprechende Behandlungsmöglichkeit für Erkrankungen des Auges.

Die Komponenten dieser Ophthalmischen Lyophilisate wurden näher charakterisiert, die Herstellbedingungen verbessert und Testsysteme zur Charaktisierung der Haftfestigkeit von Lyophilisaten auf ihren Trägern entwickelt. Die pharmakologische und pharmakokinetische Wirkung wurde in-vivo ermittelt.

Polymerlösungen

Die Viskositäten von HPMC E4M-Lösungen wurden durch Autoklavieren (120 °C / 2 bar / 15 min) und geringe Temperaturerhöhungen (20 °C / 30 °C) auf die Hälfte reduziert. Daher eignet sich der Vorgang der Autoklavierung nur bedingt zur Herstellung aseptischer Lyophilisate. Der Zusatz von Pilocarpinhydrochlorid kann die Viskosität ebenfalls erniedrigen.

Die Auftautemperatur wäßriger Lösungen um die 0 °C wurde durch Pilocarpinhydrochlorid (1,6 % (m/m)) und HPMC E4M (bis 20 % (m/m)) nur wenig beeinflusst. Die Unterkühlung der Lösungen sank mit zunehmendem Anteil der Zusätze.

Trägerfolien

Für die Anwendung am Auge erwiesen sich von den untersuchten PTFE-Folien nur ungesinterte Materialien als geeignet, wobei die Dicke der Folie eine untergeordnete Rolle spielte. Gesinterte Folien oder Kombinationen aus einer PTFE-Folie mit einem Filtermaterial stellten sich als unzweckmäßig heraus, da sie entweder scharfe Schnittkanten mit einem entsprechenden Verletzungspotential aufwiesen oder sich in

ihre Bestandteile auflösten. Nach einer Wärmebehandlung schrumpfte die netzartige Oberflächenstruktur einiger ungesinterter PTFE-Folien und verzog sich.

Geeignete hydrophobe Träger waren die Gore Preclude[®] Pericardial Membrane und ungesinterter PTFE-Band (3P GmbH). Die Foliendicke betrug 100 µm.

Herstellprozeß

Das bisherige Verfahren zur Dosierung von Polymerlösungen erwies sich wenig praktikabel für größere Chargenansätze und wurde verbessert. Anstatt einer Insulinspritze [Grunthal, 1996] wurde ein Dosiersystem von Eppendorf (Multipette) mit austauschbaren Aufsätzen verwendet. Die Dosiergenauigkeit wurde erhöht.

Im Vergleich zur Verteilung der Tropfenmassen bei Handelspräparaten (Pilomann[®] 1 % Augentropfen, Isopto[®] Pilocarpin 1 % Augentropfen, Pilocarpin ankerpharm 1 % Augentropfen) ergaben sich kleinere Variationskoeffizienten (Augentropfen: 5,5 % bis 23,3 %; Polymerlösung: 1,1 bis 1,2 %).

Zur Herstellung größerer Chargen wurde ein Gefäß mit Filter (Sterilbox) gefertigt, das bis zu 40 Trägerstreifen aufnehmen konnte und eine aseptische Herstellung gewährleistete. Der bisherige Chargenumfang betrug maximal 5 Lyophilisate.

Die Produkttemperatur konnte während des Einfrierprozesses nicht aufgenommen werden. Die Messung der Umgebungstemperatur in der Sterilbox lieferte jedoch gute Anhaltspunkte. Beim Einfrieren im Gefrierschrank (-30 °C) lag die Einfriereschwindigkeit zwischen 6 und 21 °C pro Minute. Einfrieren in Trockeneis (-79 °C) ergab Temperaturgradienten zwischen 29 und 48 °C pro Minute, in flüssigem Stickstoff (-196 °C) wurden zwischen 107 und 136 °C pro Minute erreicht. Auf dieser Basis wurden neue Einfrierzeiten bestimmt und auf 1 bis 15 Minuten reduziert.

Zur Gefriertrocknung gab Grunthal [1996] Prozeßzeiten von 3 bis 6 Stunden an. Anhand der Karl-Fischer-Titration und einer gravimetrischen Bestimmung konnte gezeigt werden, daß alle Lyophilisate in dem Gefriertrockner der Firma Christ (alpha 2-4) nach 80 Minuten Prozeßlaufzeit, gerechnet ab dem Einschalten der Vakuumpumpe, getrocknet waren. Bei dem Fabrikat von Leybold Heraeus (GT 2) war dies nach 90 Minuten der Fall. Um so geringe Wassermengen wie bei der

Restfeuchte eines Lyophilisats zu bestimmen, sind beide Methoden nicht ausreichend präzise.

Eine mikrobiologische Untersuchung der aseptischen Herstellungsschritte unter dem LAF zeigte kein Wachstum auf den Agarplatten.

Rezepturenentwicklung

Der Anteil kristalliner Arzneistoffe sollte den der verwendeten HPMC-Polymere möglichst nicht oder nur wenig überschreiten. Dadurch kann die halbkugelartige Form des Lyophilisates und Eigenschaften wie Haftfestigkeit und Lagerstabilität, die ein reines HPMC-Lyophilisat aufweist, erhalten werden.

Rasterelektronische Untersuchungen an Lyophilisaten zeigten, daß es beim Einfrieren der Lösung vom Boden aus zu einer Gefrierkonzentration an der Oberseite kam. Die leichte, poröse Struktur eines HPMC E4M-Lyophilisats (0,125 mg) war mechanisch nicht ausreichend stabil, daß dieses Gerüst auch bei Anwesenheit vieler Wirkstoffkristalle (0,40 mg) erhalten blieb.

Abhilfe wurde durch einen anderen HPMC-Typ (E50, 0,25 mg) mit niedrigerer Viskosität geschaffen werden. Durch den Einsatz höherer Konzentrationen konnte die Struktur der Xerogele auf diese Weise stabilisiert werden, ohne dabei zu viskose Polymerlösungen zu erhalten.

Der Einsatz wirkstoffhaltiger, nur aus Natriumhyaluronat als Polymer bestehende Lyophilisate, scheiterte ebenfalls an deren mangelhaften mechanischen Stabilität.

Verschiedene Cellulose-Qualitäten HPMC (E15, E50, E4M) HEMC (MH20, MH4000), HEC (H300, H4000) und andere Polymere (PVP (25, 90), Natriumhyaluronat, Mannitol) in unterschiedlichen Konzentrationen (0,5 bis 10 %) wurden auf ihre Eignung als hydrophile Gerüstbildner sensorisch untersucht. Daraus ergaben sich diverse Kriterien, die ein Lyophilisat erfüllen sollte.

Eine zu hohe Viskosität der Ausgangslösung (>800-1000 mPa·s) brachte Probleme beim Pipettieren und Dosisschwankungen mit sich. Zu niedrige Viskositäten allerdings führten zu instabilen Tropfen.

Lyophilisate mit einem niedrigen Polymergehalt (0,5 % in der Ausgangslösung) ließen sich zwar leicht applizieren, waren aber, wie das Beispiel Pilocarpinhydrochlorid / HPMC E4M zeigte, mechanisch nicht ausreichend stabil.

Lyophilisate mit einem hohen Polymergehalt (in der Regel > 3 - 5 % in der Ausgangslösung) waren zwar einerseits sehr stabil, andererseits jedoch so hart, daß sie nur schlecht oder gar nicht am Auge appliziert werden konnten (HEMC MH20: 0,50 mg, PVP 90: 1,75 mg, HEMC MH20: 0,75 mg, PVP 25: 2,50 mg pro Lyophilisat).

Mit steigender Polymerkonzentration nahm zu Beginn der Applikation das Fremdkörpergefühl zu. In Abhängigkeit von Polymertyp und Konzentration konnten unterschiedliche Verweilzeiten von 10 Minuten und 2 Stunden im Bindehautsack beobachtet werden. Die Möglichkeit einer Wirkstoffsteuerung durch Wahl eines entsprechenden Polymers könnte möglich sein.

Von den 19 untersuchten Lyophilisaten stellten sich nur 6 als potentiell geeignet heraus. Fünf wiesen eine Verweilzeit bis zu 15 Minuten auf, eines bis zu 60 Minuten. Ihr Verhalten in Kombination mit einem Arzneistoff wurde nicht untersucht.

Haftfestigkeit der Lyophilisate auf ihrem Träger

Bereits Grunthal [1996] stellte beim Ablösen der Lyophilisate Unterschiede fest, quantifizierte diese aber nicht. Mit einem selbstentwickelten Testsystem konnten die Einflüsse von Lagerzeit, Arzneistoffzugabe, Einfriertemperatur und Oberflächenstruktur der PTFE-Folie beschrieben werden. Das Lyophilisat wurde durch eine mit einem schmalen Schlitz versehene Vorrichtung gezogen, von seinem Träger abgestreift und es wurde die zum Ablösen erforderliche Gewichtskraft registriert.

Reine HPMC E4M-Lyophilisate (0,125 mg/Lyophilisat) waren gegenüber den oben erwähnten Einflüssen sehr robust, da sie sich überwiegend problemlos ablösen ließen. Der Zusatz von Pilocarpinhydrochlorid (0,40 mg/Lyophilisat), eine vierwöchige Lagerung dieser Lyophilisate oder die Verwendung autoklavierter PTFE-Folien führte in allen Fällen zu einer Verstärkung der Haftfestigkeit auf dem Träger.

Veränderungen der Oberflächenstrukturen von PTFE-Folien sollten zur besseren Ablösung von Lyophilisaten führen. Dieser sogenannte Lotus-Effekt konnte durch Prägen nicht realisiert werden. Die Prägestruktur auf dem Träger war zu grob. Dadurch wurde die Haftfähigkeit der untersuchten Lyophilisate auf dem Träger in drei von vier Fällen eher verstärkt. Bei diesem konnte die Haftung etwas verringert werden.

In flüssigem Stickstoff eingefrorene Lyophilisate konnten, unabhängig von ihrer Zusammensetzung, nur mit größerem Kraftaufwand abgelöst werden. Enthielten diese Lyophilisate Pilocarpinhydrochlorid, war eine Ablösung teilweise nicht mehr möglich.

Die Verwendung von Tropicamid (0,15 mg / Lyophilisat) anstelle von Pilocarpinhydrochlorid zeigte, daß die Haftfestigkeit zwar nicht in diesem Maße verstärkt wurde, aber die gleiche Tendenz bestand.

Mit Hilfe dieses Abstreifverfahrens sind gute Anhaltspunkte über die Haftung erhältlich. Lyophilisate, für deren Ablösung über 20 g erforderlich sind, lassen sich nicht mehr ohne Probleme am Auge abstreifen. Lyophilisate, die Werte unter 2 g ergeben, lassen sich nicht transportieren, da die Lyophilisate bereits bei leichten Erschütterungen vom Träger fallen können. Beide Erscheinungen sind unerwünscht.

Zur zusätzlichen Beurteilung des Abstreifverhaltens von Lyophilisaten wurde ein weiteres Testsystem entwickelt, bei dem das auf dem Träger befindliche Lyophilisat auf einer angefeuchteten Gelatine-Halbkugel abgestreift wurde. Der Rückstand auf dem PTFE-Träger wurde bestimmt.

Lyophilisate mit der Zusammensetzung 0,25 mg HPMC E50 und 0,30 mg Pilocarpinhydrochlorid konnten nur unvollständig abgestreift werden. Im Mittel wurden 0,237 mg Pilocarpinhydrochlorid auf den Trägern wiedergefunden.

Bei Lyophilisaten mit gleicher Zusammensetzung auf einer PTFE-Folie, die die Prägung aufwies, die als einzige im Vorversuch eine leichte Verminderung der Haftung zeigte, wurde die Ablösung leicht verbessert. Als Mittelwert wurde als Rückstand 0,197 mg des Wirkstoffes gefunden.

Bei Fluorescein-Lyophilisaten (0,250 mg HPMC E50, 0,075 mg Fluorescein-Natrium) wurden unter gleichen Versuchsbedingungen keine Rückstände auf dem Träger gefunden. Diese Lyophilisate hatten sich in allen Fällen vollständig abgelöst.

Konventionelle Augentropfen

Als Vergleich zu den in den klinischen Studien untersuchten Lyophilisaten wurden ebenfalls konventionelle, sich im Handel befindliche Augentropfen untersucht. Es handelte sich dabei um Pilomann[®] 1 % (Dr. Mann Pharma, Berlin), Isopto[®]-Pilocarpin 1 % (Alcon Pharma, Freiburg), Pilocarpin ankerpharm 1 % (Chauvin ankerpharm, Rudolstadt) und Mydriatikum Stulln[®] DU (Pharma Stulln).

Die pH-Werte der Präparate lagen zwischen pH 4,48 und 5,61 und damit unterhalb des schmerzfreien pH-Intervalls. Der Mittelwert der Tropfenmasse lag bei allen vier Präparaten zwischen 27 und 36 mg. Die Tonizitäten ergaben Werte zwischen 259 und 307 mOsmol/kg. Bei Isopto[®]-Pilocarpin konnte die Tonizität aufgrund der erhöhten Viskosität nicht mittels Halbmikroosmometer bestimmt werden.

Klinische Studien

In klinischen Studien wurden Verträglichkeit sowie pharmakologische bzw. pharmakokinetische Wirkung wirkstoffhaltiger Lyophilisate im Vergleich zu Augentropfen untersucht. Eingesetzt wurden pilocarpinhydrochlorid-, tropicamid- und fluoresceinnatriumhaltige Lyophilisate.

An 16 gesunden Probanden wurde die Verträglichkeit, die pharmakologische und die pharmakokinetische Wirkung pilocarpinhydrochloridhaltiger Lyophilisate (0,300 mg, HPMC E50 0,250 mg, auf PTFE-Dichtungsband) mit der von konventionellen Augentropfen verglichen. Anhand von Beurteilungsbögen wurde die Verträglichkeit bewertet. Die pharmakologische Wirkung wurde mittels Pupillenreaktion (Pupillographie) und Refraktionsänderung der Linse beurteilt. Zur Bestimmung der Pharmakokinetik wurde die Fläche der relativen Amplitudenkurve bestimmt.

Die Verträglichkeit der Lyophilisate ergab nach 10, 15, 30, 45 und 60 Minuten einen signifikanten Unterschied zwischen den Zubereitungen. Die Lyophilisate waren im Vergleich zu den aus Stabilitätsgründen bei pH 4,8 gepufferten Augentropfen besser verträglich. Etwa 70 % der Probanden notierten eine vermehrte Tränensekretion nach der Applikation der Augentropfen, keiner nach Lyophilisat-Applikation. Geringe Befindlichkeitsstörungen wurden vereinzelt notiert. Unter Augentropfen-Applikation trat bei einem Probanden ein Ziliarspasmus auf. 88 % der Probanden würden Pilocarpin-Lyophilisate als Applikationsform bevorzugen.

Die Zunahme der Brechkraft der Linsen unter Pilocarpineinfluß konnte mit Refraktometer nur unzureichend erfaßt werden. Aufgrund enger Pupillendurchmesser stieß das Gerät an seine Leistungsgrenze.

Aus der Änderung der Pupillendurchmesser im Verlauf der Zeit wurden die relativen Amplitudenkurven bestimmt und als Maß der Bioverfügbarkeit angesehen. Die Werte lagen im Mittel bei den Augentropfen höher (Augentropfen: 5.268 %-min, Lyophilisate: 2.016 %-min). Die Variationskoeffizienten beider Zubereitungen (72,7 % bzw. 69,8 %) waren jedoch vergleichbar.

Die Varianzanalyse ergab einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Bioverfügbarkeit der Zubereitungen. Die Wirkung der Augentropfen bezüglich der Pupillenreaktion war statistisch signifikant stärker.

Photometrisch wurde der Rückstand auf dem Träger bei 12 Personen nach der Applikation bestimmt. Im Mittel wurden 0,253 mg bzw. 0,273 mg Pilocarpinhydrochlorid wiedergefunden. Eine Korrelation zwischen der applizierten Wirkstoffmenge und der Intensität des pharmakologischen Effektes wurde nicht festgestellt. Eine Unterteilung in nicht pigmentierte (blaue) und pigmentierte (grüne, braune) Augen hinsichtlich deren Pupillenreaktionen war ebenfalls nicht aussagekräftig.

Die Bioverfügbarkeit der Lyophilisate in dieser Zusammensetzung war niedrig und ist noch verbesserungsbedürftig. Die individuelle Variabilität war bei beiden Zubereitungen gleich hoch.

An 8 gesunden Probanden wurden unter gleichen Kriterien tropicamidhaltige Lyophilisate (0,15 mg Tropicamid, HPMC E50 0,25 mg, auf PTFE-Dichtungsband) mit konventionellen Augentropfen verglichen. Die Verträglichkeit der Augentropfen war zum Zeitpunkt der Applikation statistisch signifikant besser. Sieben von acht Probanden notierten ein Brennen nach der Tropfen-Applikation. Etwa 30 % der Befragten gaben nach der Lyophilisat-Applikation ein Fremdkörpergefühl an.

Für die Flächen unter den relativen Amplitudenkurven ergaben sich für Lyophilisate 1.400 %-min und 3.918 %-min für Augentropfen. Der Variationskoeffizient für Lyophilisate betrug 114,6 %, für Augentropfen 41,2 %. Zwischen beiden Zubereitungen bestand ein signifikanter Unterschied (ANOVA).

Die Bestimmung des Arzneistoffrückstands auf dem PTFE-Träger ergab, daß im Mittel 0,116 mg Tropicamid wiedergefunden wurden. Im Durchschnitt wurden 18,8 %

der vorgesehenen Dosis appliziert. Der Median von Tropicamid auf PTFE betrug 0,130 mg (91 % der Dosis).

An 10 gesunden Probanden wurden unter gleichen Kriterien ebenfalls tropicamidhaltige Lyophilisate mit der gleichen Dosierung, aber mit einer anderen Polymerkombination und auf anderer Trägerqualität untersucht (0,15 mg Tropicamid, Natriumhyaluronat 0,125 mg, Mannitol 0,25 mg, ungesintertes PTFE-Band). Hinsichtlich der Verträglichkeit gab es keine signifikanten Unterschiede. Fremdkörpergefühl, Brennen und vermehrte Tränensekretion wurden bei beiden Zubereitungen notiert.

Für die Flächen unter den relativen Amplitudenkurven ergaben sich für Lyophilisate 3.224 %-min und 3177 %-min für Augentropfen. Der Variationskoeffizient für Lyophilisate betrug 46,6 %, für Augentropfen 45,9 %. Die Präparate waren hinsichtlich ihrer erreichten Mydriasis vergleichbar.

Die Bestimmung des Arzneistoffrückstandes auf dem PTFE-Träger ergab, daß im Mittel 0,022 mg Tropicamid wiedergefunden wurden. Im Durchschnitt wurden 81,74 % der vorgesehenen Dosis appliziert.

Ein Zusammenhang zwischen der aus Lyophilisaten zur Anwendung gelangten Menge Tropicamid und der Intensität des pharmakologischen Effektes ist bei beiden Studien nicht zu erkennen.

Durch eine Rezepturänderung konnte die Effektivität des Applikationssystems erhöht werden. Die Lyophilisate waren hinsichtlich ihrer Verträglichkeit und ihrer mydriatischen Wirkung mit den Augentropfen gleichwertig.

Bei 3 Probanden wurden in einer Pilotstudie mit einem Fluorophotometer nach der Applikation fluoresceinnatriumhaltiger Lyophilisate (0,068 mg Fluorescein-Natrium, HPMC E4M 0,125 mg bzw. HPMC E50 0,25 mg, ungesintertes PTFE-Band) die Fluorescein-Konzentrationen im vorderen Augenabschnitt untersucht. Augentropfen und Lyophilisate enthielten die gleiche Farbstoffdosis.

Während die einmalige Augentropfen-Applikation nur zu einem geringen Anstieg der Fluorescein-Konzentration im Kammerwasser und Cornea führte, wurden mit HPMC E50-Lyophilisaten Konzentrationsspitzen bis zum 20-fachen, mit HPMC E4M-Lyophilisaten bis zum 8-fachen dieses Wertes erreicht.

Um eine endgültige Aussage treffen zu können, ist eine größere Probandenzahl erforderlich. Auf allen benutzten Trägern konnten keine Wirkstoffrückstände detektiert werden.

Es konnte gezeigt werden, daß Ophthalmische Lyophilisate im Bereich der Mydriatika und Diagnostika durchaus eine Alternative zu konventionellen Augentropfen darstellen. Eine Rezepturoptimierung ist allerdings für jeden Wirkstoff durchzuführen. Durch die Wahl des Polymers und der Herstellbedingungen kann ein Depot-Effekt erreicht werden, eventuell sogar eine gesteuerte Wirkstofffreisetzung.

Die große Variationsmöglichkeit der Ausgangsstoffe eröffnet auch außerhalb der Ophthalmologie vielseitige Einsatzmöglichkeiten für Trägerlyophilisate. Weitere Anwendungen sind in den Bereichen der Zahn- und HNO-Heilkunde, Mund-Kiefer-Chirurgie, Allgemein- und Neurochirurgie, Neurologie und Gynäkologie vorstellbar. Anstelle der Tränenflüssigkeit würde das Lyophilisat mit Hilfe z.B. eines Wundsekretes oder anderer Körperflüssigkeiten rehydratisiert werden. Bei dem Einsatz wirkstoffhaltiger, bioabbaubarer Polymer-Zubereitungen würde auch hier der Arzneistoff über einen längeren Zeitraum ohne unverträgliche Rückstände freigesetzt werden können.

Zur Zeit wird an einem neuen, speziell zur Herstellung dieser Lyophilisate geeigneten Labor-Prototyp zur Gefriertrocknung gearbeitet, um minimale Prozeßzeiten zu erreichen. Dabei wurden alle Aspekte einer schneller Trocknung realisiert. Die Polymerlösungen werden mit Hilfe von flüssigem Stickstoff eingefroren und können innerhalb von 10 Minuten getrocknet werden. Alle Prozeßparameter können erfaßt und gesteuert werden. Die Resultate sind vielversprechend.

E. ANHANG

ANHANG A

Anwendung von Lyophilisaten

Wirkstofffreie Lyophilisate wurden durch Eigenapplikation am Auge auf ihr Applikationsverhalten, ihre Verträglichkeit und Verweildauer getestet. Die einzelnen Beobachtungen sind im Folgenden ausführlich aufgeleitet.

1. HPMC E15 2,0 %

Applikation: gut möglich, angenehm

Fremdkörpergefühl: gering, nicht unangenehm, leichtes Stechen

Ablauf:

- nach 10 s: Kaum Fremdkörpergefühl vorhanden, Lyophilisat klebt an weißer Bindehaut
- nach 90 s: an Bindehaut sichtbar
- nach 150 s: kein Fremdkörpergefühl mehr vorhanden
- nach 4 min: Geldepot auf Bindhaut sichtbar
- nach 7 min: Geldepot im Bindhautsack zu sehen

Klebriges Gefühl: nicht mehr vorhanden nach 7 Minuten

Sichtbehinderung: keine

Dauer: nach 15 min: nichts mehr am Auge zu finden

Reizerscheinungen: keine

2. HPMC E15 3,0 %

Applikation: gut möglich

Fremdkörpergefühl: ausgeprägt, intensiver stechender Schmerz

Ablauf:

- nach 20 s: stechendes Gefühl lässt nach, Lyophilisat klebt an weißer Bindehaut
- nach 16 min: Fremdkörpergefühl noch vorhanden
- nach 26 min: kein Fremdkörpergefühl mehr vorhanden

Klebriges Gefühl: nicht mehr vorhanden nach 10 Minuten

Sichtbehinderung: keine

Dauer: nach 30 min: nichts mehr am Auge zu finden

Reizerscheinungen: keine

3. HPMC E15 5,0 %

Applikation: gut möglich

Fremdkörpergefühl: ausgeprägt, intensiver stechender Schmerz

Ablauf:

- nach 4 min: stechendes Gefühl lässt nach, Lyophilisat klebt an weißer Bindehaut
- nach 40 min: Fremdkörpergefühl noch vorhanden

- nach 50 min: kein Fremdkörpergefühl mehr vorhanden

Klebriges Gefühl: nicht mehr vorhanden nach 10 Minuten

Sichtbehinderung: keine

Dauer: nach 50 min: nichts mehr am Auge zu finden

Reizerscheinungen: keine

4. HPMC E50 2,0 %

Applikation: gut möglich

Fremdkörpergefühl: leicht

Ablauf:

- nach 1 min: leichtes Fremdkörpergefühl noch vorhanden, Lyophilisat klebt an weißer Bindehaut
- nach 8 min: Fremdkörpergefühl noch vorhanden, Lyophilisat jedoch nicht mehr sichtbar
- nach 15 min: kein Gel sichtbar, kein Fremdkörpergefühl

Klebriges Gefühl: negativ

Sichtbehinderung: keine

Dauer: nach 15 min: nichts mehr am Auge zu finden

Reizerscheinungen: keine

5. HPMC E50 3,0 %

Applikation: gut möglich

Fremdkörpergefühl: stark, stechender Schmerz

Ablauf:

- Lyophilisat klebt an der Innenseite des Bindehautsacks
- nach 5 min: Fremdkörpergefühl noch vorhanden
- nach 10 min: unscharfes Sehen, kein Fremdkörpergefühl
- nach 22 min: klebt an der Lidkante

Klebriges Gefühl: negativ

Sichtbehinderung: zeitweise

Dauer: keine korrekte Aussage möglich, da Lyophilisat verrutschte und an der Lidkante klebte

Reizerscheinungen: keine

6. HPMC E4M 1,0 %

Applikation: gut möglich, angenehm

Fremdkörpergefühl: leicht

Ablauf:

- Lyophilisat liegt in Bindehautsack, angenehmer als auf der Bindehaut
- nach 1 min: trotz Augenrollen kein Fremdkörper mehr zu spüren
- nach 33 min: Geldepot sichtbar
- nach 60 min: Gel ist im Auge verrutscht, unscharfes Sehen

Klebriges Gefühl: negativ

Sichtbehinderung: zeitweise

Dauer: 70 Minuten, keine konkrete Aussage möglich, da Lyophilisat verrutscht ist

Reizerscheinungen: keine

7. HPMC E4M 1,5 %

Applikation: gut möglich, angenehm

Fremdkörpergefühl: leicht

Ablauf:

- Lyophilisat liegt in Bindehautsack, spürbar bei Augenrollen
- nach 6 min: bei Augenrollen kaum Fremdkörper zu spüren
- Lyophilisat liegt in Bindehautsack
- nach 12 min: weißliches Geldepot vorhanden
- nach 20 min: Lyophilisat ist fast vollständig rehydratisiert
- nach 60 min: Geldepot im Bindehautsack

Klebriges Gefühl: zeitweise nach wiederholtem Lidschlag

Sichtbehinderung: zeitweise

Dauer: 120 Minuten

Reizerscheinungen: keine

8. HEMC MH20 2,0 %

Applikation: unangenehm, aber noch möglich

Fremdkörpergefühl: ausgeprägt, Lyophilisat ist sehr hart, Stechen

Ablauf:

- Lyophilisat klebt an Lidkante
- nach 1 min: Fremdkörpergefühl noch vorhanden, erhöhter Tränenfluß, scheuerndes Gefühl, Sehbehinderung
- nach 7 min: Geldepot im Bindehautsack
- nach 12 min: kein Fremdkörpergefühl mehr
- nach 30 min: Geldepot ist herausgerutscht, klebt an Lidkante

Klebriges Gefühl: zeitweise

Sichtbehinderung: zeitweise

Dauer: mindestens 30 Minuten, korrekte Aussage nicht möglich, da Lyophilisat

Reizerscheinungen: keine

9. HEMC MH20 3,0 %

Applikation: nicht möglich, rutscht wiederholt aus dem Bindehautsack heraus, liegt auf Lidkante auf, rehydratisiert kaum, haftet nicht, Versuch abgebrochen

10. HEMC MH4000 1,0 %

Applikation: angenehm

Fremdkörpergefühl: gering

Ablauf:

- Lyophilisat klebt im Bindehautsack
- nach 3 min: kaum noch Fremdkörpergefühl
- kurzfristige Sichtbehinderung nach Blinzeln
- nach 10 min: Geldepot wandert auf der Oberfläche des Augapfels
- nach 13 min: Geldepot befindet sich im Bindehautsack
- nach 30 min: Geldepot ist herausgerutscht, klebt an Lidkante

Klebriges Gefühl: zeitweise

Sichtbehinderung: zeitweise

Dauer: 60 Minuten

Reizerscheinungen: keine

11. HEC H300 1,0 %

Applikation: angenehm

Fremdkörpergefühl: fast nicht vorhanden

Ablauf:

- Lyophilisat rehydratisiert sehr schnell, klebt im Bindehautsack
- erhöhte Tränenproduktion, permanent sehr feuchtes Auge
- Geldepot schwimmt auf der Augenoberfläche herum
- nach 15 min: Geldepot nicht mehr sichtbar

Klebriges Gefühl: negativ

Sichtbehinderung: keine

Dauer: 15 Minuten

Reizerscheinungen: keine

12. HEC H300 2,0 %

Applikation: angenehm

Fremdkörpergefühl: fast nicht vorhanden

Ablauf:

- Lyophilisat rehydratisiert sehr schnell, klebt im Bindehautsack
- erhöhte Tränenproduktion, permanent sehr feuchtes Auge
- nach 15 min: Geldepot nicht mehr sichtbar

Klebriges Gefühl: negativ

Sichtbehinderung: keine

Dauer: 15 Minuten

Reizerscheinungen: keine

13. HEC H4000 1,0 %

Applikation: angenehm

Fremdkörpergefühl: gering

Ablauf:

- Lyophilisat klebt im Bindehautsack

- zuerst trockenes Gefühl, danach erhöhte Tränenproduktion
- nach 12 min: Geldepot nicht mehr sichtbar

Klebriges Gefühl: negativ

Sichtbehinderung: keine

Dauer: 12 Minuten

Reizerscheinungen: keine

14. Natriumhyaluronat 0,5 %

Applikation: leicht

Fremdkörpergefühl: gering

Ablauf:

- nach 2-5 s: leichtes Fremdkörpergefühl
- haftet gut an der Bindehaut
- nach 90 s: leichtes Ziehen an Applikationsort, leicht erhöhte Tränenproduktion
- nach 10 min: kein Depot im Auge

Klebriges Gefühl: negativ

Sichtbehinderung: keine

Dauer: 10 Minuten

Reizerscheinungen: keine

15. Natriumhyaluronat 0,5 % mit Mannit 1,0 %

Applikation: leicht, sehr gut

Fremdkörpergefühl: nicht vorhanden

Ablauf:

- Lyophilisat löst sich sofort auf
- nach 10-15 s: leichtes lokales Brennen
- nach 90 s: Brennen hat aufgehört
- Geldepot im Bindehautsack
- nach 17 min: kein Depot im Auge

Klebriges Gefühl: negativ

Sichtbehinderung: keine

Dauer: 17 Minuten

Reizerscheinungen: keine

16. PVP 25 10,0 %

Applikation: nicht möglich, rutscht wiederholt aus dem Bindehautsack heraus, liegt auf der Lidkante, rehydratisiert dort langsam, klebt dort

17. PVP 90 2,0 %

Applikation: angenehm

Fremdkörpergefühl: gering

Ablauf:

- nach 2 min: kein Fremdkörpergefühl mehr vorhanden
- nach 10 min: Geldepot nicht mehr sichtbar

Klebriges Gefühl: negativ

Sichtbehinderung: keine

Dauer: 10 Minuten

Reizerscheinungen: keine

18. PVP 90 5,0 %

Applikation: möglich

Fremdkörpergefühl: leichtes Stechen

Ablauf:

- Lyophilisat klebt an der Bindehaut
- nach 7 min: nur noch leichtes Fremdkörpergefühl
- nach 17 min: Geldepot nicht mehr sichtbar

Klebriges Gefühl: negativ

Sichtbehinderung: keine

Dauer: 17 Minuten

Reizerscheinungen: keine

19. PVP 90 7,0 %

Applikation: schwierig, mußte öfters wiederholt werden, bis das Lyophilisat teilweise rehydratisiert war und klebrig war

Fremdkörpergefühl: gering, da bereits bei Applikation teilweise rehydratisiert

Ablauf:

- Geldepot im Bindehautsack, leichte Tränenproduktion

Klebriges Gefühl: negativ

Sichtbehinderung: keine

Dauer: 20 Minuten

Reizerscheinungen: keine

Anhang B

Informationsbogen und Einverständniserklärung der Studie

„Verträglichkeit und Verlauf pharmakologischer Effekte von Pilocarpin bei Applikation am Auge in Form eines Lyophilisats im Vergleich zu konventionellen Augentropfen bei gesunden Probanden“

Sehr geehrte Dame, sehr geehrter Herr!

Sie werden gebeten, an einer Studie teilzunehmen, in der die Wirksamkeit von Pilocarpin nach Applikation einer neuen Darreichungsform am Auge untersucht werden soll.

In Zusammenarbeit mit der Augenklinik der Universität Köln ist am Pharmazeutischen Institut, Bereich Pharmazeutische Technologie der Universität Bonn eine neue Zubereitung entwickelt worden, bei der die Augenarznei als Einzeldosis in unkonservierter, wasserfreier Form als gefriergetrockneter Tropfen vorliegt, der mit Hilfe eines weichen Kunststoffstreifens in den Bindehautsack eingebracht wird. Der Tropfen löst sich in der dort vorhandenen Tränenflüssigkeit sofort auf.

In dieser Studie soll festgestellt werden, inwieweit sich herkömmliche Augentropfen und die neue Arzneiform sowohl in ihrer Verträglichkeit am Auge als auch in ihrer pharmakologischen Wirkung voneinander unterscheiden bzw. wie die Anwendung beider Arzneiformen empfunden und vertragen wird.

Pilocarpin wird zur Senkung des Augeninnendrucks bei Glaukom-Patienten seit 120 Jahren eingesetzt. Es verursacht außerdem eine Verengung der Pupille (Miosis) und erhöht die Krümmung der Linse. Beide Effekte halten für einige Stunden an und können genau bestimmt werden, indem man die Veränderung des Pupillendurchmessers nach einem Lichtblitz und die Brechkraft der Linse mißt.

Die beiden bei der Studie eingesetzten Zubereitungen werden Ihnen von einem Augenarzt verabreicht. Sie sollen nach der Verabreichung Ihre Empfindungen auf einem vorbereiteten Fragebogen festhalten. Die Veränderungen der Pupille und die Brechkraft der Linse werden mittels technischer Geräte (Pupillograph, Autorefraktometer) in regelmäßigen Zeitabständen erfaßt.

Die Untersuchung umfaßt folgende Schritte:

1. Ausführliche Befragung zu Ihrer gesundheitlichen Vorgeschichte unter Berücksichtigung der Augen; eine augenärztliche Untersuchung vor Studienbeginn, um mögliche Risiken und Ausschlußkriterien zu ermitteln.
2. 10minütige Dunkeladaptation (Aufenthalt in einem abgedunkelten Raum)
3. Leermessung mit Pupillograph (Pupillenreaktion auf Lichtblitz)
4. Verabreichung der beiden Zubereitungen (je eine Zubereitung in jedes Auge) durch den die Studie leitenden Augenarzt.
5. Ausfüllen des Fragebogens zur Verträglichkeit der beiden Zubereitungen jeweils während der Applikation, 5min, 10min, 15min, 60min und 360min nach der Applikation
6. Messung mit Pupillograph nach voriger 10minütiger Dunkeladaptation und Autorefraktometer nach folgenden Zeitabständen: vor Versuchsbeginn eine Leermessung, dann nach 15min, 30min, 45min, 60min, 120min, 180min, 240min, 300min und 360min.
7. Augenärztliche Abschlußuntersuchung

Da die beiden eingesetzten Zubereitungen einen Arzneistoff enthalten (Pilocarpin), sind Nebenwirkungen nicht ausgeschlossen, die aufgrund der eingesetzten niedrigen Dosierungen jedoch sehr unwahrscheinlich sind.

- Sehstörungen (z.B. vorübergehende Akkomodationsstörungen; eine bereits vorhandene Kurzsichtigkeit kann für die Dauer des Versuchs kurzfristig verstärkt werden)
- Zu Beginn der Applikation kann es aufgrund des Wirkmechanismus von Pilocarpin (Ziliarmuskelspasmus) zu Kopfschmerzen im Bereich der Augenbrauen kommen, diese lassen allerdings nach kurzer Zeit wieder nach.
- Vermehrte Tränensekretion (selten)
- Kontaktallergie (selten)
- Augentrötung
- Bei Überdosierung werden folgende Reaktionen beobachtet: in Einzelfällen kann es zu folgenden Allgemeinreaktionen kommen: Übelkeit, Erbrechen, Tenesmen (Krämpfe der Schließmuskeln von Blase und Darm), Spasmen, Speichelfluß, Schwitzen, Bronchialspasmen, Lungenödem, Herzinsuffizienz, Blutdrucksteigerung, Muskelschwäche, verstärkter Harndrang. Eine Überdosierung ist ausgeschlossen.
- Das Führen eines Kraftfahrzeuges ist für die Dauer der Untersuchung und bis zu 2 Stunden nach Versuchsende untersagt

Schwangere sind von der Studie ausgeschlossen.

Geeignete Kontrazeptiva sind zu verwenden oder eine Schwangerschaft ist nach Befragung sicher auszuschließen.

Sie können jederzeit die Zustimmung zu Ihrer Teilnahme an der Studie zurückziehen, ohne daß Sie Nachteile befürchten müssen.

Sollten Änderungen im Ablauf der Studie notwendig sein, werden Sie vorher erneut um ihr Verständnis gebeten.

Sollten Auffälligkeiten oder unerwünschte Wirkungen auftreten, informieren Sie bitte umgehend den betreuenden Arzt.

Im Rahmen der Studie werden über Sie Daten erhoben und gespeichert, soweit dies zur wissenschaftlichen Auswertung notwendig ist. Diese Daten unterliegen der berufsständischen Schweigepflicht. Entsprechend dem Datenschutz werden Ihre Daten erst nach Anonymisierung gespeichert. Auch bei wissenschaftlichen Veröffentlichungen wird es nicht möglich sein, Ihre Daten zu identifizieren.

Eine Weitergabe nicht anonymisierter Daten an Dritte ist ausgeschlossen.

Für die Probanden besteht eine Versicherung nach §40 AMG (Probandenversicherung) über einen Betrag von 1 Million DM beim Gerling-Konzern in 50670 Köln, Friesenstr. 20-22, (Versicherungsschein-Nummer: 2/016/12/18/5180967/01, Tel-Nr.: 0221/144-7690) gegen alle Schäden, die durch Applikation oder andere Maßnahmen innerhalb der Untersuchung ausgelöst werden könnten. Zur Wahrung des Versicherungsschutzes dürfen die Teilnehmer während der Studie ohne Zustimmung des Prüfarztes keine weitere Studie beginnen. Möglicherweise eintretende Schäden sind umgehend dem Prüfarzt oder der Versicherung zu melden. Die Versicherungsunterlagen sind jederzeit beim Prüfarzt einsehbar.

Ich habe die Information über die Studie, ihren Ablauf und die möglichen Risiken gelesen und verstanden. Der Studienablauf und die mit der Studie verbundenen Risiken sind mir von

Herrn/Frau _____

in einem Aufklärungsgespräch zusätzlich erläutert worden.

Ich bin mit der Teilnahme an der Studie einverstanden.

Mir ist bekannt, daß ich jederzeit mein Einverständnis zur Teilnahme an dieser Studie zurückziehen kann, ohne daß ich Nachteile befürchten muß.

Köln, den _____

(Unterschrift)

Zusatzinformation für weibliche Probanden

Informationsbogen und Einverständniserklärung der Studie

„Verträglichkeit und Verlauf pharmakologischer Effekte von Pilocarpin bei Applikation am Auge in Form eines Lyophilisats im Vergleich zu konventionellen Augentropfen bei gesunden Probanden“

Sehr geehrte Dame !

Im Rahmen der Studie muß vor einer Teilnahme sicher ausgeschlossen werden, daß eine Schwangerschaft vorliegt, um jegliches Risiko für das ungeborene Kind zu vermeiden. Geeignete Kontrazeptiva sind zu verwenden oder eine Schwangerschaft ist nach Befragung sicher auszuschließen.

Hiermit bestätige ich, daß ich diese Information zur Kenntnis genommen habe und daß keine Schwangerschaft vorliegt.

Bonn, den _____

(Unterschrift)

Anhang C

Auswertung der Visual-Analog-Skalen der Pilocarpinstudie mit dem Wilcoxon-Rangsummentest

Der Test dient dem Vergleich gepaarter Meßwerte bei der gleichen Versuchseinheit [Immich, 1974]. Er gilt als verteilungsfreies Analogon zum t -Test. Es werden die Differenzen zwischen den Meßwertpaaren gebildet und mit Vorzeichen eingetragen. Die Absolutwerte der Differenzen werden in Ränge transformiert. Die Ränge der Differenzen mit der quantitativ niedrigeren Anzahl an Vorzeichen werden addiert. Die Summe ist die Prüfgröße.

Vorraussetzungen:

- Der Test setzt keine bestimmte Verteilung voraus (verteilungsfrei).
- Die Summe der Paare (ohne Nulldifferenzen) muß ≥ 6 sein.

Berechnung der Differenzen der VA-Skalen der Pilocarpin-Zubereitungen:

Bei Applikation, 5 Minuten und 10 Minuten nach der Applikation:

Proband	Zeit nach der Applikation 0 Minuten			Zeit nach der Applikation 5 Minuten			Zeit nach der Applikation 10 Minuten		
	LYO	AT	Differenz	LYO	AT	Differenz	LYO	AT	Differenz
S21	0,05	0,28	-0,23	0,10	0,05	0,05	0,03	0,03	0,00
S22	0,01	0,01	0,00	0,01	0,02	-0,01	0,03	0,03	0,00
S23	0,01	0,50	-0,49	0,00	0,30	-0,30	0,00	0,26	-0,26
S24	0,05	0,19	-0,14	0,06	0,16	-0,10	0,04	0,25	-0,21
S25	0,10	0,82	-0,72	0,03	0,51	-0,48	0,03	0,03	0,00
S26	0,32	0,92	-0,60	0,09	0,54	-0,45	0,26	0,47	-0,21
S27	0,14	0,31	-0,17	0,03	0,15	-0,12	0,18	0,31	-0,13
S28	0,24	0,55	-0,31	0,02	0,06	-0,04	0,01	0,03	-0,02
S29	0,48	0,64	-0,16	0,27	0,53	-0,26	0,69	0,53	0,16
S30	0,29	0,52	-0,23	0,23	0,00	0,23	0,03	0,31	-0,28
S31	0,12	0,68	-0,56	0,54	0,03	0,51	0,30	0,01	0,29
S32	0,77	0,10	0,67	0,05	0,41	-0,36	0,06	0,39	-0,33
S33	0,70	0,38	0,32	0,00	0,01	-0,01	0,06	0,06	0,00
S34	0,13	0,07	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	-0,05
S35	0,48	0,70	-0,22	0,09	0,01	0,08	0,00	0,01	-0,01
S36	0,23	0,24	-0,01	0,17	0,24	-0,07	0,03	0,13	-0,10
Mittelwert	0,26	0,43	-0,17	0,11	0,19	-0,08	0,11	0,18	-0,07
s	0,237	0,277	0,349	0,142	0,206	0,253	0,180	0,178	0,163
s_{rel}	92,22	64,03	200,03	134,42	108,92	304,74	164,93	98,43	227,21
Maximum	0,77	0,92	0,67	0,54	0,54	0,51	0,69	0,53	0,29
Minimum	0,01	0,01	-0,72	0,00	0,00	-0,48	0,00	0,01	-0,33
Spannweite	0,76	0,91	1,39	0,54	0,54	0,99	0,69	0,52	0,62
Varianz	0,056	0,076	0,122	0,020	0,042	0,064	0,033	0,032	0,027

Tab.C1: Auflistung der Reizscores und Berechnung der Differenzen

LYO: Lyophilisat

AT: Augentropfen

Berechnung der Differenzen der VA-Skalen der Pilocarpin-Zubereitungen:
15 Minuten, 30 Minuten und 45 Minuten nach der Applikation:

Proband	Zeit nach der Applikation 15 Minuten			Zeit nach der Applikation 30 Minuten			Zeit nach der Applikation 45 Minuten		
	LYO	AT	Differenz	LYO	AT	Differenz	LYO	AT	Differenz
S21	0,13	0,12	0,01	0,24	0,24	0,00	0,25	0,25	0,00
S22	0,03	0,03	0,00	0,03	0,03	0,00	0,03	0,03	0,00
S23	0,00	0,36	-0,36	0,01	0,21	-0,20	0,00	0,06	-0,06
S24	0,09	0,35	-0,26	0,07	0,18	-0,11	0,05	0,19	-0,14
S25	0,02	0,02	0,00	0,02	0,03	-0,01	0,01	0,02	-0,01
S26	0,05	0,33	-0,28	0,02	0,16	-0,14	0,05	0,51	-0,46
S27	0,28	0,37	-0,09	0,37	0,46	-0,09	0,19	0,27	-0,08
S28	0,00	0,02	-0,02	0,00	0,01	-0,01	0,00	0,00	0,00
S29	0,42	0,72	-0,30	0,16	0,76	-0,60	0,02	0,66	-0,64
S30	0,16	0,47	-0,31	0,00	0,44	-0,44	0,00	0,19	-0,19
S31	0,20	0,20	0,00	0,27	0,27	0,00	0,08	0,09	-0,01
S32	0,06	0,09	-0,03	0,00	0,25	-0,25	0,02	0,04	-0,02
S33	0,14	0,13	0,01	0,04	0,04	0,00	0,03	0,03	0,00
S34	0,00	0,05	-0,05	0,00	0,11	-0,11	0,00	0,01	-0,01
S35	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01
S36	0,00	0,06	-0,06	0,00	0,01	-0,01	0,00	0,01	-0,01
Mittelwert	0,10	0,21	-0,11	0,08	0,20	-0,12	0,05	0,15	-0,10
s	0,119	0,205	0,139	0,117	0,208	0,176	0,072	0,195	0,187
s_{rel}	119,11	98,58	128,69	150,95	103,73	143,11	156,49	132,26	184,56
Maximum	0,42	0,72	0,01	0,37	0,76	0,00	0,25	0,66	0,01
Minimum	0,00	0,01	-0,36	0,00	0,01	-0,60	0,00	0,00	-0,64
Spannweite	0,42	0,71	0,37	0,37	0,75	0,60	0,25	0,66	0,65
Varianz	0,014	0,042	0,019	0,014	0,043	0,031	0,005	0,038	0,035

Tab.C2: Auflistung der Reizscores und Berechnung der Differenzen

LYO: Lyophilisat

AT: Augentropfen

Berechnung der Differenzen der VA-Skalen der Pilocarpin-Zubereitungen:
60 Minuten und 360 Minuten nach der Applikation:

Proband	Zeit nach der Applikation 60 Minuten			Zeit nach der Applikation 360 Minuten		
	LYO	AT	Differenz	LYO	AT	Differenz
S21	0,15	0,16	-0,01	0,00	0,00	0,00
S22	0,03	0,03	0,00	0,02	0,02	0,00
S23	0,01	0,05	-0,04	0,00	0,00	0,00
S24	0,05	0,07	-0,02	0,02	0,02	0,00
S25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S26	0,04	0,23	-0,19	0,06	0,06	0,00
S27	0,15	0,32	-0,17	0,00	0,03	-0,03
S28	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S29	0,04	0,56	-0,52	0,00	0,00	0,00
S30	0,00	0,10	-0,10	0,00	0,02	-0,02
S31	0,08	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00
S32	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01
S33	0,05	0,04	0,01	0,00	0,00	0,00
S34	0,00	0,01	-0,01	0,00	0,00	0,00
S35	0,00	0,01	-0,01	0,00	0,00	0,00
S36	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Mittelwert	0,04	0,10	-0,07	0,01	0,01	0,00
s	0,050	0,152	0,136	0,016	0,017	0,009
s_{rel}	131,05	145,68	205,33	229,79	180,47	0,00
Maximum	0,15	0,56	0,01	0,06	0,06	0,01
Minimum	0,00	0,00	-0,52	0,00	0,00	-0,03
Spannweite	0,15	0,56	0,53	0,06	0,06	0,04
Varianz	0,002	0,023	0,019	0,000	0,000	0,000

Tab.C3: Auflistung der Reizscores und Berechnung der Differenzen

LYO: Lyophilisat

AT: Augentropfen

Berechnung der Signifikanz der Visual-Analog-Skalen-Differenzen bei Pilocarpin-Zubereitungen

Die zuvor berechneten Differenzen werden aufgelistet. Da positive Vorzeichen anzahlmäßig unterlegen sind, sollen diese summiert werden und als Prüfgröße dienen. Sie erhalten den Faktor '1', negative Differenzen der Faktor '0', Nulldifferenzen werden ausgeschlossen.

Die Differenzen werden unabhängig von ihrem Vorzeichen vom niedrigsten Wert zum höchsten sortiert und entsprechende Ränge vergeben. Die Ränge der positiven Werte werden addiert und mit der entsprechenden Prüfgröße aus der Tabelle verglichen.

Z_i : Differenz zwischen Lyophilisat und Augentropfen (LYO-AT)

Π_i : Multiplikationsfaktor

'0': negatives Vorzeichen, '1': positives Vorzeichen, '-': Nulldifferenz

R_i : Rangliste

Nullhypothese H_0 :

zwischen den Pilocarpin-Zubereitungen besteht kein signifikanter Unterschied auf dem Signifikanz-Niveau $\alpha = 0.05 \%$.

0 Minuten (Tab.C4)

Proband	Z_i	Π_i	Sortieren			Berechnen
			Z_i	Π_i	R_i	
S21	-0,23	0	0,00	-	-	-
S22	0,00	-	0,01	0	1	0
S23	-0,49	0	0,06	1	2	2
S24	-0,14	0	0,14	0	3	0
S25	-0,72	0	0,16	0	4	0
S26	-0,60	0	0,17	0	5	0
S27	-0,17	0	0,22	0	6	0
S28	-0,31	0	0,23	0	7,5	0
S29	-0,16	0	0,23	0	7,5	0
S30	-0,23	0	0,31	0	9	0
S31	-0,56	0	0,32	1	10	10
S32	0,67	1	0,49	0	11	0
S33	0,32	1	0,56	0	12	0
S34	0,06	1	0,60	0	13	0
S35	-0,22	0	0,67	1	14	14
S36	-0,01	0	0,72	0	15	0

26

entspricht T^* für 0min

$n = 15$, $\alpha = 0.05$, tabellarische Prüfgröße $T(15, 0.05)$: 31

$T^* < T$: H_0 abgelehnt, **signifikanter** Unterschied

5 Minuten nach der Applikation (Tab.C5)

Proband			Sortieren			Berechnen
	Z_i	Π_i	Z_i	Π_i	R_i	
S21	0,05	1	0,00	-	-	-
S22	-0,01	0	0,01	0	1	0
S23	-0,30	0	0,01	0	2	0
S24	-0,10	0	0,04	0	3	0
S25	-0,48	0	0,05	1	4	4
S26	-0,45	0	0,07	0	5	0
S27	-0,12	0	0,08	1	6	6
S28	-0,04	0	0,10	0	7	0
S29	-0,26	0	0,12	0	8	0
S30	0,23	1	0,23	1	9	9
S31	0,51	1	0,26	0	10	0
S32	-0,36	0	0,30	0	11	0
S33	-0,01	0	0,36	0	12	0
S34	0,00	-	0,45	0	13	0
S35	0,08	1	0,48	0	14	0
S36	-0,07	0	0,51	1	15	15

34

entspricht T^* für 5 min $n = 15$, $\alpha = 0.05$, tabellarische Prüfgröße $T(15, 0.05)$: 31 $T^* > T$: H_0 nicht abgelehnt, kein **signifikanter** Unterschied**10 Minuten nach der Applikation (Tab.C6)**

Proband			Sortieren			Berechnen
	Z_i	Π_i	Z_i	Π_i	R_i	
S21	0,00	-	0,00	-	-	-
S22	0,00	-	0,00	-	-	-
S23	-0,26	0	0,00	-	-	-
S24	-0,21	0	0,00	-	-	-
S25	0,00	-	0,01	0	1	0
S26	-0,21	0	0,02	0	2	0
S27	-0,13	0	0,05	0	3	0
S28	-0,02	0	0,10	0	4	0
S29	0,16	1	0,13	0	5	0
S30	-0,28	0	0,16	1	6	6
S31	0,29	1	0,21	0	7,5	0
S32	-0,33	0	0,21	0	7,5	0
S33	0,00	-	0,26	0	9	0
S34	-0,05	0	0,28	0	10	0
S35	-0,01	0	0,29	1	11	11
S36	-0,10	0	0,33	0	12	0

17

entspricht T^* für 10 min $n = 12$, $\alpha = 0.05$, tabellarische Prüfgröße $T(12, 0.05)$: 18 $T^* < T$: H_0 abgelehnt, **signifikanter** Unterschied

15 Minuten nach der Applikation (Tab.C7)

Proband			Sortieren			Berechnen
	Z_i	Π_i	Z_i	Π_i	R_i	
S21	0,01	1	0,00	-	-	-
S22	0,00	-	0,00	-	-	-
S23	-0,36	0	0,00	-	-	-
S24	-0,26	0	0,01	1	2	2
S25	0,00	-	0,01	1	2	2
S26	-0,28	0	0,01	1	2	2
S27	-0,09	0	0,02	0	4	0
S28	-0,02	0	0,03	0	5	0
S29	-0,30	0	0,05	0	6	0
S30	-0,31	0	0,06	0	7	0
S31	0,00	-	0,09	0	8	0
S32	-0,03	0	0,26	0	9	0
S33	0,01	1	0,28	0	10	0
S34	-0,05	0	0,30	0	11	0
S35	0,01	1	0,31	0	12	0
S36	-0,06	0	0,36	0	13	0

6

entspricht T^* für 15 min $n = 13$, $\alpha = 0.05$, tabellarische Prüfgröße $T(13, 0.05)$: 22 $T^* < T$: Ho abgelehnt, **signifikanter** Unterschied**30 Minuten nach der Applikation (Tab.C8)**

Proband			Sortieren			Berechnen
	Z_i	Π_i	Z_i	Π_i	R_i	
S21	0,00	-	0,00	-	-	-
S22	0,00	-	0,00	-	-	-
S23	-0,20	0	0,00	-	-	-
S24	-0,11	0	0,00	-	-	-
S25	-0,01	0	0,00	-	-	-
S26	-0,14	0	0,01	0	2	0
S27	-0,09	0	0,01	0	2	0
S28	-0,01	0	0,01	0	2	0
S29	-0,60	0	0,09	0	4	0
S30	-0,44	0	0,11	0	5,5	0
S31	0,00	-	0,11	0	5,5	0
S32	-0,25	0	0,14	0	7	0
S33	0,00	-	0,20	0	8	0
S34	-0,11	0	0,25	0	9	0
S35	0,00	-	0,44	0	10	0
S36	-0,01	0	0,60	0	11	0

0

entspricht T^* für 30 min $n = 11$, $\alpha = 0.05$, tabellarische Prüfgröße $T(11, 0.05)$: 14 $T^* < T$: Ho abgelehnt, **signifikanter** Unterschied

45 Minuten nach der Applikation (Tab.C9)

Proband			Sortieren			Berechnen
	Z_i	Π_i	Z_i	Π_i	R_i	
S21	0,00	-	0,00	-	-	-
S22	0,00	-	0,00	-	-	-
S23	-0,06	0	0,00	-	-	-
S24	-0,14	0	0,00	-	-	-
S25	-0,01	0	0,01	0	3	0
S26	-0,46	0	0,01	0	3	0
S27	-0,08	0	0,01	0	3	0
S28	0,00	-	0,01	0	3	0
S29	-0,64	0	0,01	1	3	3
S30	-0,19	0	0,02	0	6	0
S31	-0,01	0	0,06	0	7	0
S32	-0,02	0	0,08	0	8	0
S33	0,00	-	0,14	0	9	0
S34	-0,01	0	0,19	0	10	0
S35	0,01	1	0,46	0	11	0
S36	-0,01	0	0,64	0	12	0

3

entspricht T^* für 45 min $n = 12$, $\alpha = 0.05$, tabellarische Prüfgröße $T(12, 0.05)$: 18 $T^* < T$: H_0 abgelehnt, **signifikanter** Unterschied**60 Minuten nach der Applikation (Tab.C10)**

Proband			Sortieren			Berechnen
	Z_i	Π_i	Z_i	Π_i	R_i	
S21	-0,01	1	0,00	-	-	-
S22	0,00	-	0,00	-	-	-
S23	-0,04	0	0,00	-	-	-
S24	-0,02	0	0,00	-	-	-
S25	0,00	-	0,00	-	-	-
S26	-0,19	0	0,00	-	-	-
S27	-0,17	0	0,01	0	2,5	0
S28	0,00	-	0,01	1	2,5	2,5
S29	-0,52	0	0,01	0	2,5	0
S30	-0,10	0	0,01	0	2,5	0
S31	0,00	-	0,02	0	5	0
S32	0,00	-	0,04	0	6	0
S33	0,01	1	0,10	0	7	0
S34	-0,01	0	0,17	0	8	0
S35	-0,01	0	0,19	0	9	0
S36	0,00	-	0,52	0	10	0

2,5

entspricht T^* für 60 min $n = 10$, $\alpha = 0.05$, tabellarische Prüfgröße $T(10, 0.05)$: 11 $T^* < T$: H_0 abgelehnt, **signifikanter** Unterschied

360 Minuten nach der Applikation (Tab.C11)

Proband			Sortieren			Berechnen
	Z_i	Π_i	Z_i	Π_i	R_i	
S21	0,00	-	0,00	-	-	-
S22	0,00	-	0,00	-	-	-
S23	0,00	-	0,00	-	-	-
S24	0,00	-	0,00	-	-	-
S25	0,00	-	0,00	-	-	-
S26	0,00	-	0,00	-	-	-
S27	-0,03	0	0,00	-	-	-
S28	0,00	-	0,00	-	-	-
S29	0,00	-	0,00	-	-	-
S30	-0,02	0	0,00	-	-	-
S31	0,00	-	0,00	-	-	-
S32	0,01	1	0,00	-	-	-
S33	0,00	-	0,00	-	-	-
S34	0,00	-	0,01	1	1	1
S35	0,00	-	0,02	0	2	0
S36	0,00	-	0,03	0	3	0

1

entspricht T^* für 360 min

$n = 3$, eine Auswertung ist nicht mehr möglich, da n zu klein ist.

Anhang D

Verlauf der Miosis (relative Amplitudenwerte) bei der Pilocarpinstudie

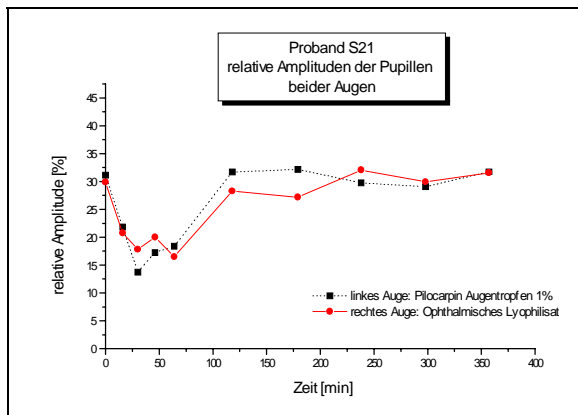


Abb.D1: Proband S21, Augenfarbe: blau mit Lyophilisat appliziert: keine Daten

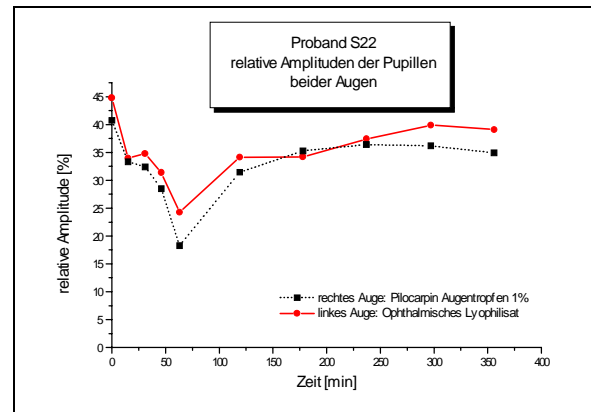


Abb.D2: Proband S22, Augenfarbe: braun mit Lyophilisat appliziert: keine Daten

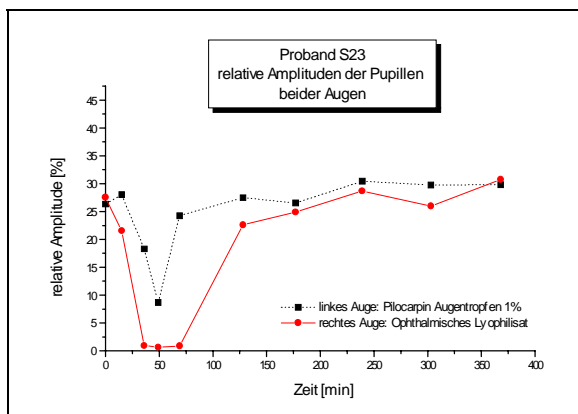


Abb.D3: Proband S23, Augenfarbe: blau mit Lyophilisat appliziert: keine Daten

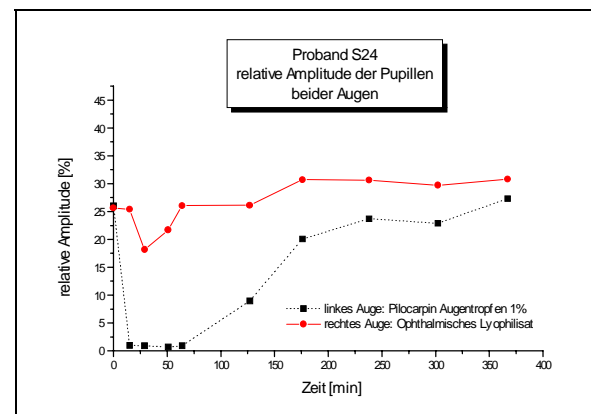


Abb.D4: Proband S24, Augenfarbe: braun mit Lyophilisat appliziert: keine Daten

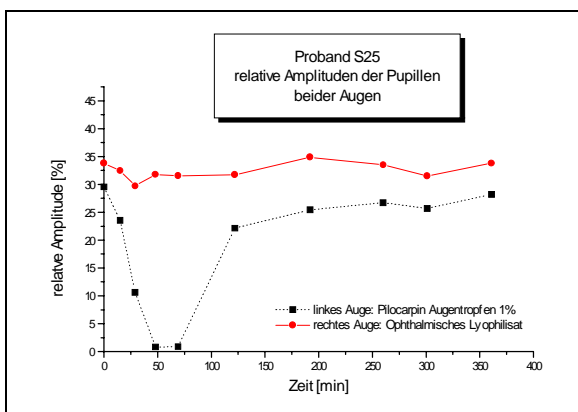


Abb.D5: Proband S25, Augenfarbe: grau-grün mit Lyophilisat appliziert: 16,29 %, 50,6 µg

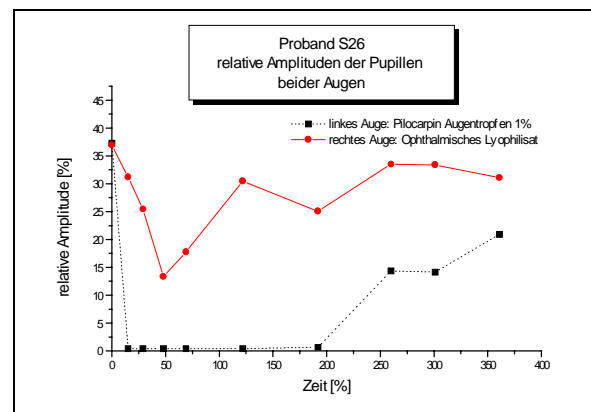


Abb.D6: Proband S26, Augenfarbe: braun mit Lyophilisat appliziert: 20,48 %, 63,6 µg

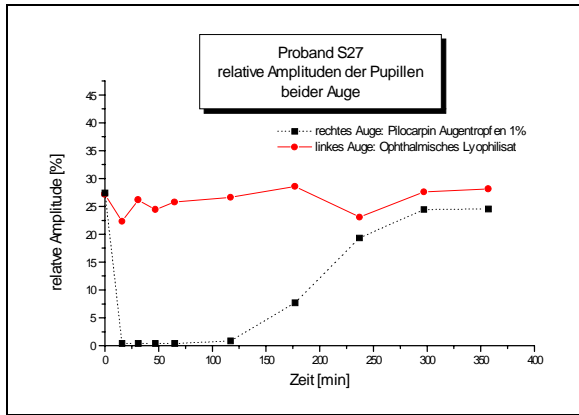


Abb.D7: Proband S27, Augenfarbe: braun-grün mit Lyophilisat appliziert: 17,26 %, 53,6 µg

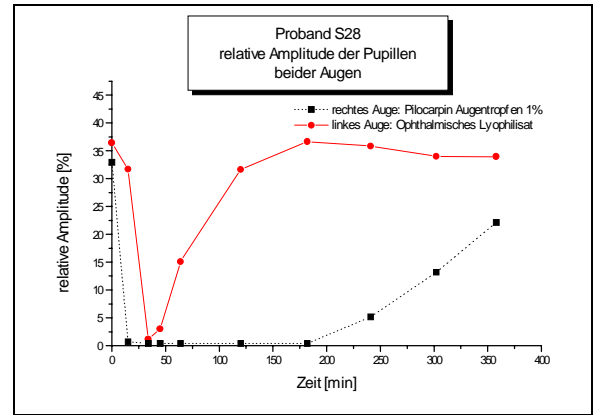


Abb.D8: Proband S28, Augenfarbe: blau mit Lyophilisat appliziert: 20,80 %, 64,6 µg

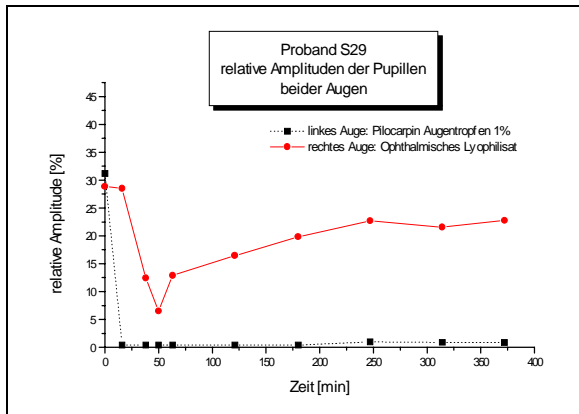


Abb.D9: Proband S29, Augenfarbe: blau mit Lyophilisat appliziert: 17,80 %, 60,2 µg

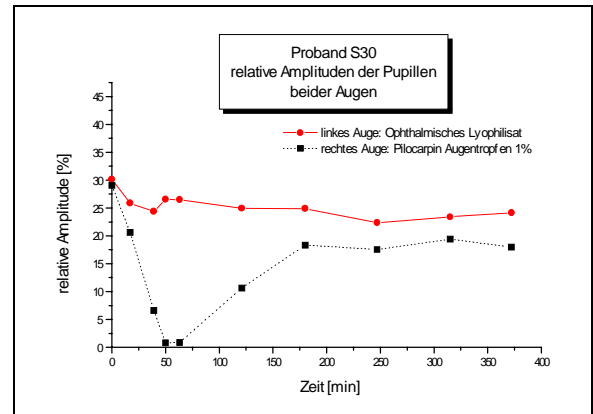


Abb.D10: Proband S30, Augenfarbe: braun mit Lyophilisat appliziert: 20,17 %, 68,2 µg

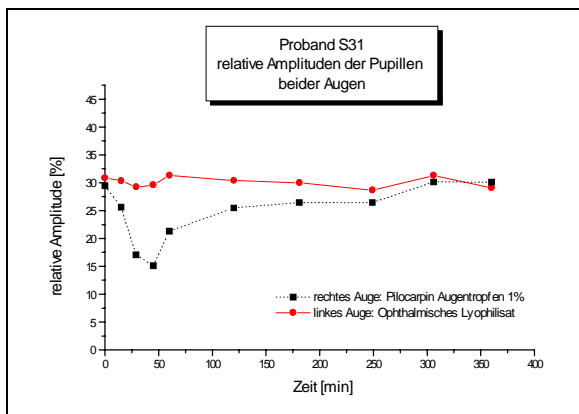


Abb.D11: Proband S31, Augenfarbe: blau-grün mit Lyophilisat appliziert: 7,75 %, 26,2 µg

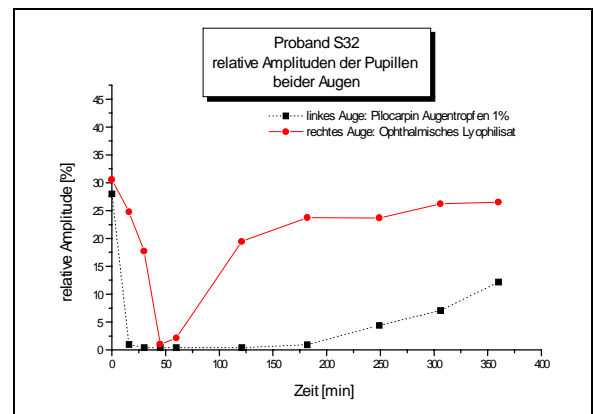


Abb.D12: Proband S32, Augenfarbe: braun-grün mit Lyophilisat appliziert: 18,39 %, 62,2 µg

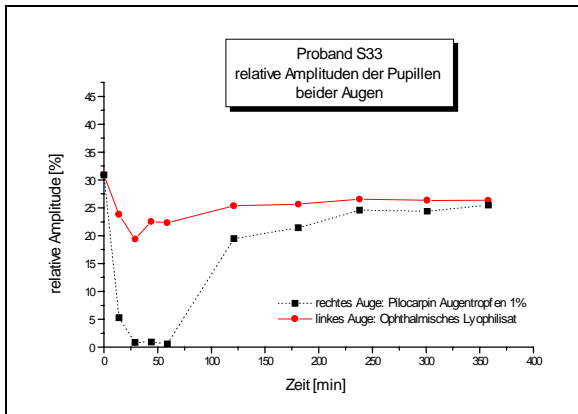


Abb.D13: Proband S33, Augenfarbe: blau mit Lyophilisat appliziert: 13,36 %, 45,2 μ g

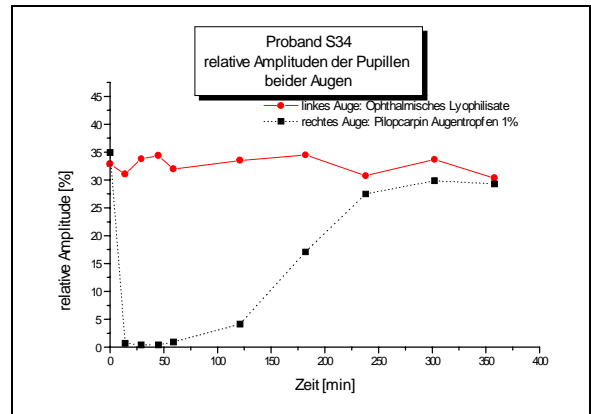


Abb.D14: Proband S34, Augenfarbe: blau mit Lyophilisat appliziert: 4,49 %, 15,2 μ g

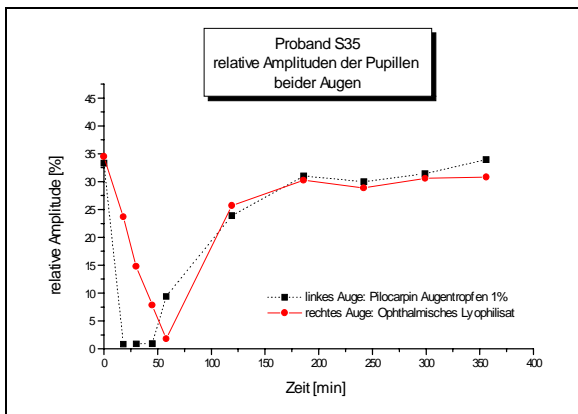


Abb.D15: Proband S35, Augenfarbe: blau mit Lyophilisat appliziert: 39,38 %, 133,2 μ g

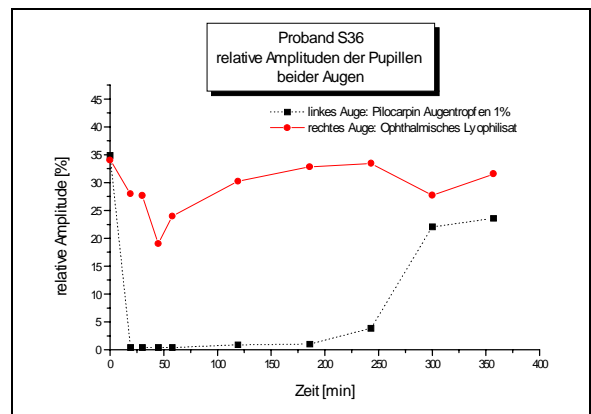


Abb.D16: Proband S36, Augenfarbe: blau mit Lyophilisat appliziert: 33,47 %, 113,2 μ g

Anhang E

Informationsbogen und Einverständniserklärung der Studie

„Verträglichkeit und Verlauf pharmakologischer Effekte von Tropicamid bei Applikation am Auge in Form eines Lyophilisats im Vergleich zu konventionellen Augentropfen bei gesunden Probanden“

Sehr geehrte Dame, sehr geehrter Herr!

Sie werden gebeten, an einer Studie teilzunehmen, in der die Wirksamkeit von Tropicamid nach Applikation einer neuen Darreichungsform am Auge untersucht werden soll.

In Zusammenarbeit mit der Augenklinik der Universität Köln ist am Pharmazeutischen Institut, Bereich Pharmazeutische Technologie der Universität Bonn eine neue Zubereitung entwickelt worden, bei der die Augenarznei als Einzeldosis in unkonservierter, wasserfreier Form als gefriergetrockneter Tropfen vorliegt, der mit Hilfe eines weichen Kunststoffstreifens in den Bindehautsack eingebracht wird. Der Tropfen löst sich in der dort vorhandenen Tränenflüssigkeit sofort auf.

In dieser Studie soll festgestellt werden, inwieweit sich herkömmliche Augentropfen und die neue Arzneiform sowohl in ihrer Verträglichkeit am Auge als auch in ihrer pharmakologischen Wirkung voneinander unterscheiden bzw. wie die Anwendung beider Arzneiformen empfunden und vertragen wird.

Tropicamid wird in der Augenheilkunde als Diagnostikum verwendet. Es verursacht eine Weitstellung der Pupille (Mydriasis). Der Effekt hält für wenige Stunden an und kann genau bestimmt werden, indem man die Veränderung des Pupillendurchmessers nach einem Lichtblitz mißt.

Die beiden bei der Studie eingesetzten Zubereitungen werden Ihnen von einem Augenarzt verabreicht. Sie sollen nach der Verabreichung Ihre Empfindungen auf einem vorbereiteten Fragebogen festhalten. Die Veränderungen der Pupille werden mit Hilfe eines technischen Gerätes (Pupillograph) in regelmäßigen Zeitabständen erfaßt.

Die Untersuchung umfaßt folgende Schritte:

1. Ausführliche Befragung zu Ihrer gesundheitlichen Vorgeschichte unter Berücksichtigung der Augen; eine augenärztliche Untersuchung vor Studienbeginn, um mögliche Risiken und Ausschlußkriterien zu ermitteln.
2. 10minütige Dunkeladaptation (Aufenthalt in einem abgedunkelten Raum)
3. Leermessung mit Pupillograph (Pupillenreaktion auf Lichtblitz)
4. Verabreichung der beiden Zubereitungen (je eine Zubereitung in jedes Auge) durch den die Studie leitenden Augenarzt.
5. Ausfüllen des Fragebogens zur Verträglichkeit der beiden Zubereitungen jeweils während der Applikation, 5min, 10min, 15min, 60min und 240min nach der Applikation
6. Messung mit Pupillograph nach voriger 10minütiger Dunkeladaptation nach folgenden Zeitabständen: vor Versuchsbeginn eine Leermessung, dann nach 15min, 30min, 45min, 60min, 120min, 180min und 240min.
7. Augenärztliche Abschlußuntersuchung

Da die beiden eingesetzten Zubereitungen einen Arzneistoff enthalten (Tropicamid), sind Nebenwirkungen nicht ausgeschlossen, die aufgrund der eingesetzten niedrigen Dosierungen jedoch sehr unwahrscheinlich sind.

Nebenwirkungen am Auge:

- Sehstörungen (z.B. vorübergehende Akkomodationsstörungen)
- Lichtempfindlichkeit

- Zu Beginn der Applikation kann es aufgrund des Wirkmechanismus von Tropicamid zu Kopfschmerzen im Bereich der Augenbrauen kommen, diese lassen allerdings nach kurzer Zeit wieder nach.
- Vermehrte Tränensekretion (selten)
- Kontaktallergie (selten)
- Augenrötung oder Brennen

Systemische Nebenwirkungen:

- Mundtrockenheit
- Rötung und Trockenheit der Haut
- erhöhte Temperatur
- Harnsperrre
- Kardiovaskuläre Effekte (z.B. Bradykardie (verlangsamter Herzschlag))
- Bei *Überdosierung* werden folgende Reaktionen beobachtet: in Einzelfällen kann es zu folgenden Allgemeinreaktionen kommen: Trockenheit von Haut und Schleimhäuten, Tachykardie (stark beschleunigte Herzstätigkeit), zentrale Erregung, motorische Unruhe, Krämpfe, Hyperthermie (Wärmestauung im Körper), bei hohen Dosen Koma und Atemlähmung.
Eine Überdosierung ist bei dieser Studie ausgeschlossen.
- Das Führen eines Kraftfahrzeuges ist für die Dauer der Untersuchung und bis zu 2 Stunden nach Versuchsende untersagt

Schwangere sind von der Studie ausgeschlossen.

Geeignete Kontrazeptiva sind zu verwenden oder eine Schwangerschaft ist nach Befragung sicher auszuschließen.

Sie können jederzeit die Zustimmung zu Ihrer Teilnahme an der Studie zurückziehen, ohne daß Sie Nachteile befürchten müssen.

Sollten Änderungen im Ablauf der Studie notwendig sein, werden Sie vorher erneut um ihr Verständnis gebeten.

Sollten Auffälligkeiten oder unerwünschte Wirkungen auftreten, informieren Sie bitte umgehend den betreuenden Arzt.

Im Rahmen der Studie werden über Sie Daten erhoben und gespeichert, soweit dies zur wissenschaftlichen Auswertung notwendig ist. Diese Daten unterliegen der berufsständischen Schweigepflicht. Entsprechend dem Datenschutz werden Ihre Daten erst nach Anonymisierung gespeichert. Auch bei wissenschaftlichen Veröffentlichungen wird es nicht möglich sein, Ihre Daten zu identifizieren.

Eine Weitergabe nicht anonymisierter Daten an Dritte ist ausgeschlossen.

Für die Probanden besteht eine Versicherung nach §40 AMG (Probandenversicherung) über einen Betrag von 1 Million DM beim Gerling-Konzern in 50670 Köln, Friesenstr. 20-22, (Versicherungsschein-Nummer: 2/016/12/18/5180967/01, Tel-Nr.: 0221/144-7690) gegen alle Schäden, die durch Applikation oder andere Maßnahmen innerhalb der Untersuchung ausgelöst werden könnten. Zur Wahrung des Versicherungsschutzes dürfen die Teilnehmer während der Studie ohne Zustimmung des Prüfarztes keine weitere Studie beginnen. Möglicherweise eintretende Schäden sind umgehend dem Prüfarzt oder der Versicherung zu melden. Die Versicherungsunterlagen sind jederzeit beim Prüfarzt einsehbar.

Ich habe die Information über die Studie, ihren Ablauf und die möglichen Risiken gelesen und verstanden. Der Studienablauf und die mit der Studie verbundenen Risiken sind mir von

Herrn/Frau _____

in einem Aufklärungsgespräch zusätzlich erläutert worden.

Ich bin mit der Teilnahme an der Studie einverstanden.

Mir ist bekannt, daß ich jederzeit mein Einverständnis zur Teilnahme an dieser Studie zurückziehen kann, ohne daß ich Nachteile befürchten muß.

Köln, den _____

(Unterschrift)

Anhang F

Auswertung der Visual-Analog-Skalen der Tropicamid-Studien mit dem Wilcoxon-Rangsummentest**Tropicamid-Studie Teil 1:****Berechnung der Differenzen der VA-Skalen der Tropicamid-Zubereitungen:**

Bei Applikation, 5 Minuten und 10 Minuten nach der Applikation:

Proband	Zeit nach der Applikation 0 Minuten			Zeit nach der Applikation 5 Minuten			Zeit nach der Applikation 10 Minuten		
	LYO	AT	Differenz	LYO	AT	Differenz	LYO	AT	Differenz
S40	0,23	0,18	0,05	0,05	0,04	0,01	0,00	0,00	0,00
S41	0,53	0,59	-0,06	0,50	0,50	0,00	0,49	0,49	0,00
S42	0,10	0,72	0,07	0,74	0,30	0,44	0,76	0,76	0,00
S43	0,42	0,69	-0,27	0,78	0,62	0,16	0,18	0,17	0,01
S44	0,14	0,40	-0,26	0,02	0,02	0,00	0,01	0,01	0,00
S45	0,43	0,58	-0,15	0,27	0,40	-0,13	0,07	0,13	-0,06
S46	0,11	0,67	-0,56	0,06	0,28	-0,22	0,06	0,09	-0,03
S47	0,03	0,86	-0,83	0,10	0,19	-0,09	0,02	0,02	0,00
Mittelwert	0,25	0,59	-0,25	0,32	0,29	0,02	0,20	0,21	-0,01
s	0,186	0,211	0,310	0,317	0,211	0,203	0,279	0,273	0,023
s_{rel}	74,85	35,92	-132,27	100,50	71,71	956,33	140,15	131,00	-232,99
Maximum	0,53	0,86	0,07	0,78	0,62	0,44	0,76	0,76	0,01
Minimum	0,03	0,18	-0,83	0,02	0,02	-0,22	0,00	0,00	-0,06
Spannweite	0,50	0,68	0,90	0,76	0,60	0,66	0,76	0,76	0,07
Varianz	0,035	0,044	0,096	0,100	0,044	0,041	0,078	0,075	0,001

Tab.F1: Auflistung der Reizscores und Berechnung der Differenzen

LYO: Lyophilisat

AT: Augentropfen

Bei den grau unterlegten Feldern handelt es sich um Werte, die der im Text formulierten Aussage der Probanden widersprechen.

**Berechnung der Differenzen der VA-Skalen der Tropicamid-Zubereitungen:
15 Minuten und 30 Minuten nach der Applikation:**

Proband	Zeit nach der Applikation 15 Minuten			Zeit nach der Applikation 30 Minuten		
	LYO	AT	Differenz	LYO	AT	Differenz
S40	0,10	0,10	0,00	0,20	0,14	0,06
S41	0,53	0,52	0,01	0,48	0,67	-0,19
S42	0,57	0,57	0,00	0,56	0,65	-0,09
S43	0,23	0,23	0,00	0,00	0,20	-0,20
S44	0,29	0,28	0,01	0,67	0,57	0,10
S45	0,00	0,04	-0,04	0,48	0,47	0,01
S46	0,03	0,07	-0,04	0,00	0,00	0,00
S47	0,06	0,06	0,00	0,03	0,03	0,00
Mittelwert	0,23	0,23	-0,01	0,30	0,34	-0,04
s	0,223	0,210	0,021	0,276	0,276	0,111
s_{rel}	98,52	89,97	-273,72	91,15	81,85	-285,85
Maximum	0,57	0,57	0,01	0,67	0,67	0,10
Minimum	0,00	0,04	-0,04	0,00	0,00	-0,20
Spannweite	0,57	0,53	0,05	0,67	0,67	0,30
Varianz	0,050	0,044	0,000	0,076	0,078	0,012

Tab.F2: Auflistung der Reizscores und Berechnung der Differenzen

LYO: Lyophilisat

AT: Augentropfen

**Berechnung der Differenzen der VA-Skalen der Tropicamid-Zubereitungen:
60 Minuten und 240 Minuten nach der Applikation:**

Proband	Zeit nach der Applikation 60 Minuten			Zeit nach der Applikation 240 Minuten		
	LYO	AT	Differenz	LYO	AT	Differenz
S40	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
S41	0,47	0,72	-0,25	0,50	0,56	-0,06
S42	0,43	0,44	-0,01	0,00	0,00	0,00
S43	0,05	0,08	-0,03	0,00	0,00	0,00
S44	0,27	0,26	0,01	0,03	0,03	0,00
S45	0,04	0,04	0,00	0,01	0,00	0,01
S46	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S47	0,02	0,02	0,00	0,02	0,00	0,02
Mittelwert	0,16	0,20	-0,04	0,07	0,07	0,00
s	0,198	0,262	0,088	0,174	0,197	0,024
s_{rel}	122,98	133,43	-250,48	248,73	266,79	-636,46
Maximum	0,47	0,72	0,01	0,50	0,56	0,02
Minimum	0,00	0,00	-0,25	0,00	0,00	-0,06
Spannweite	0,47	0,72	0,26	0,50	0,56	0,08
Varianz	0,039	0,069	0,008	0,030	0,039	0,001

Tab.F3: Auflistung der Reizscores und Berechnung der Differenzen

LYO: Lyophilisat

AT: Augentropfen

Berechnung der Signifikanz der Visual-Analog-Skalen-Differenzen bei Tropicamid-Zubereitungen

Z_i : Differenz zwischen Lyophilisat und Augentropfen (LYO-AT)

Π_i : Multiplikationsfaktor

'0': negatives Vorzeichen, '1': positives Vorzeichen, '-': Nulldifferenz

R_i : Rangliste

Selteneres Vorzeichen: (+)

Nullhypothese H_0 :

zwischen den Tropicamid-Zubereitungen besteht kein signifikanter Unterschied auf dem Signifikanz-Niveau $\alpha = 0.05$ %.

0 Minuten (Tab.F4)

Proband	Z_i	Π_i	Sortieren			Berechnen
			Z_i	Π_i	R_i	
S40	0,05	1	0,05	1	1	1
S41	-0,06	0	0,06	0	2	0
S42	0,07	1	0,07	1	3	3
S43	-0,27	0	0,15	0	4	0
S44	-0,26	0	0,26	0	5	0
S45	-0,15	0	0,27	0	6	0
S46	-0,56	0	0,56	0	7	0
S47	-0,83	0	0,83	0	8	0

4

entspricht T^* für 0min

$n = 8$, $\alpha = 0.05$, tabellarische Prüfgröße $T(8, 0.05)$: 6

$T^* < T$: H_0 abgelehnt, **signifikanter** Unterschied

5 Minuten nach der Applikation (Tab.F5)

Proband			Sortieren			Berechnen
	Z_i	Π_i	Z_i	Π_i	R_i	
S40	0,01	1	0,00	-	-	-
S41	0,00	-	0,00	-	-	-
S42	0,44	1	0,01	1	1	1
S43	0,16	1	0,09	0	2	0
S44	0,00	-	0,13	0	3	0
S45	-0,13	1	0,16	1	4	4
S46	-0,22	1	0,22	0	5	0
S47	-0,09	1	0,44	1	6	6

11

entspricht T^* für 5 min $n = 6$, $\alpha = 0.05$, tabellarische Prüfgröße $T(6, 0.05)$: 3 $T^* > T$: H_0 nicht abgelehnt, kein **signifikanter** Unterschied**10 Minuten nach der Applikation (Tab.F6)**

Proband			Sortieren			Berechnen
	Z_i	Π_i	Z_i	Π_i	R_i	
S40	0,00	-	0,00	-	-	-
S41	0,00	-	0,00	-	-	-
S42	0,00	-	0,00	-	-	-
S43	0,01	1	0,00	-	-	-
S44	0,00	-	0,00	-	-	-
S45	-0,06	0	0,01	1	1	1
S46	-0,03	0	0,03	0	2	0
S47	0,00	-	0,06	0	3	0

1

entspricht T^* für 10 min $n = 3$, Auswertung nicht möglich, da n zu klein ist.**15 Minuten nach der Applikation (Tab.F7)**

Proband			Sortieren			Berechnen
	Z_i	Π_i	Z_i	Π_i	R_i	
S40	0,00	-	0,00	-	-	-
S41	0,01	1	0,00	-	-	-
S42	0,00	-	0,00	-	-	-
S43	0,00	-	0,00	-	-	-
S44	0,01	1	0,01	1	1,5	1,5
S45	-0,04	0	0,01	1	1,5	1,5
S46	-0,04	0	0,04	0	3,5	0
S47	0,00	-	0,04	0	3,5	0

3

entspricht T^* für 15 min $n = 4$, Auswertung nicht möglich, da n zu klein ist.

30 Minuten nach der Applikation (Tab.F8)

Proband			Sortieren			Berechnen
	Z_i	Π_i	Z_i	Π_i	R_i	
S40	0,06	1	0,00	-	-	-
S41	-0,19	0	0,00	-	-	-
S42	-0,09	0	0,01	1	1	1
S43	-0,20	0	0,06	1	2	2
S44	0,10	1	0,09	0	3	0
S45	0,01	1	0,10	1	4	4
S46	0,00	-	0,19	0	5	0
S47	0,00	-	0,20	0	6	0

7

entspricht T^* für 30 min $n = 6$, $\alpha = 0.05$, tabellarische Prüfgröße $T(6, 0.05)$: 3 $T^* > T$: H_0 nicht abgelehnt, kein **signifikanter** Unterschied**60 Minuten nach der Applikation (Tab.F9)**

Proband			Sortieren			Berechnen
	Z_i	Π_i	Z_i	Π_i	R_i	
S40	0,00	-	0,00	-	-	-
S41	-0,25	0	0,00	-	-	-
S42	-0,01	0	0,00	-	-	-
S43	-0,03	0	0,00	-	-	-
S44	0,01	1	0,01	1	1,5	1,5
S45	0,00	-	0,01	0	1,5	0
S46	0,00	-	0,03	0	3	0
S47	0,00	-	0,25	0	4	0

1,5

entspricht T^* für 60 min $n = 4$, Auswertung nicht möglich, da n zu klein ist.**240 Minuten nach der Applikation (Tab.F10)**

Proband			Sortieren			Berechnen
	Z_i	Π_i	Z_i	Π_i	R_i	
S40	0,00	-	0,00	-	-	-
S41	-0,06	0	0,00	-	-	-
S42	0,00	-	0,00	-	-	-
S43	0,00	-	0,00	-	-	-
S44	0,00	-	0,00	-	-	-
S45	0,01	1	0,01	1	1	1
S46	0,00	-	0,02	1	2	2
S47	0,02	1	0,06	0	3	0

3

entspricht T^* für 240 min $n = 3$, eine Auswertung ist nicht mehr möglich, da n zu klein ist.

Tropicamidstudie Teil 2:**Berechnung der Differenzen der VA-Skalen der Tropicamid-Zubereitungen:**

Bei Applikation, 5 Minuten und 10 Minuten nach der Applikation:

Proband	Zeit nach der Applikation 0 Minuten			Zeit nach der Applikation 5 Minuten			Zeit nach der Applikation 10 Minuten		
	LYO	AT	Differenz	LYO	AT	Differenz	LYO	AT	Differenz
S48	0,53	0,05	0,48	0,52	0,11	0,41	0,24	0,02	0,22
S49	0,00	0,24	-0,24	0,00	0,08	-0,08	0,00	0,07	-0,07
S50	0,46	0,33	0,13	0,56	0,26	0,30	0,52	0,30	0,22
S51	0,18	0,09	0,09	0,09	0,09	0,00	0,01	0,00	0,01
S52	0,22	0,03	0,19	0,00	0,00	0,00	0,01	0,02	-0,01
S53	0,71	0,39	0,32	0,26	0,11	0,15	0,09	0,09	0,00
S54	0,09	0,04	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S55	0,63	0,48	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S56	0,42	0,04	0,38	0,07	0,00	0,07	0,01	0,00	0,01
S57	0,29	0,50	-0,21	0,20	0,22	-0,02	0,05	0,07	-0,02
Mittelwert	0,35	0,22	0,13	0,17	0,09	0,08	0,09	0,06	0,04
s	0,235	0,193	0,232	0,215	0,094	0,158	0,167	0,092	0,100
s_{rel}	66,56	87,98	173,32	126,41	107,70	189,82	180,07	161,44	276,91
Maximum	0,71	0,50	0,48	0,56	0,26	0,41	0,52	0,30	0,22
Minimum	0,00	0,03	-0,24	0,00	0,00	-0,08	0,00	0,00	-0,07
Spannweite	0,71	0,47	0,72	0,56	0,26	0,49	0,52	0,30	0,29
Varianz	0,055	0,037	0,054	0,046	0,009	0,025	0,028	0,008	0,010

Tab.F11: Auflistung der Reizscores und Berechnung der Differenzen

*LYO: Lyophilisat**AT: Augentropfen*

Berechnung der Differenzen der VA-Skalen der Tropicamid-Zubereitungen:
15 Minuten, 30 Minuten und 45 Minuten nach der Applikation:

Proband	Zeit nach der Applikation 15 Minuten			Zeit nach der Applikation 30 Minuten			Zeit nach der Applikation 45 Minuten		
	LYO	AT	Differenz	LYO	AT	Differenz	LYO	AT	Differenz
S48	0,04	0,03	0,01	0,02	0,02	0,00	0,01	0,01	0,00
S49	0,00	0,02	-0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S50	0,10	0,09	0,01	0,09	0,09	0,00	0,14	0,11	0,03
S51	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S52	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S53	0,06	0,04	0,02	0,06	0,04	0,02	0,04	0,04	0,00
S54	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S55	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S56	0,02	0,00	0,02	0,02	0,00	0,02	0,03	0,00	0,03
S57	0,07	0,07	0,00	0,06	0,06	0,00	0,08	0,05	0,03
Mittelwert	0,03	0,03	0,00	0,03	0,02	0,00	0,03	0,02	0,01
s	0,037	0,033	0,012	0,033	0,032	0,008	0,047	0,036	0,014
s_{rel}	126,39		293,45	132,33		210,819	155,56	173,08	161,02
Maximum	0,10	0,09	0,02	0,09	0,02	0,14	0,11	0,03	0,14
Minimum	0,00	0,00	-0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Spannweite	0,10	0,09	0,04	0,09	0,09	0,02	0,14	0,11	0,03
Varianz	0,001	0,001	0,000	0,001	0,001	0,000	0,002	0,001	0,000

Tab.F12: Auflistung der Reizscores und Berechnung der Differenzen

LYO: Lyophilisat

AT: Augentropfen

Berechnung der Differenzen der VA-Skalen der Tropicamid-Zubereitungen:
60 Minuten und 240 Minuten nach der Applikation:

Proband	Zeit nach der Applikation 60 Minuten			Zeit nach der Applikation 240 Minuten		
	LYO	AT	Differenz	LYO	AT	Differenz
S48	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
S49	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S50	0,14	0,12	0,02	0,00	0,00	0,00
S51	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S52	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S53	0,11	0,05	0,06	0,08	0,04	0,04
S54	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S55	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S56	0,03	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00
S57	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,00
Mittelwert	0,03	0,02	0,01	0,01	0,01	0,00
s	0,051	0,039	0,020	0,025	0,013	0,013
s_{rel}	171,41	203,77	184,08	279,38	253,86	316,23
Maximum	0,14	0,12	0,06	0,08	0,04	0,04
Minimum	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Spannweite	0,14	0,12	0,06	0,08	0,04	0,04
Varianz	0,003	0,001	0,000	0,001	0,000	0,000

Tab.F13: Auflistung der Reizscores und Berechnung der Differenzen

LYO: Lyophilisat

AT: Augentropfen

Berechnung der Signifikanz der Visual-Analog-Skalen-Differenzen bei Tropicamid-Zubereitungen

Z_i : Differenz zwischen Lyophilisat und Augentropfen (LYO-AT)

Π_i : Multiplikationsfaktor

'0': negatives Vorzeichen, '1': positives Vorzeichen, '-': Nulldifferenz

R_i : Rangliste

Selteneres Vorzeichen: (-)

Nullhypothese H_0 :

zwischen den Tropicamid-Zubereitungen besteht kein signifikanter Unterschied auf dem Signifikanz-Niveau $\alpha = 0.05$ %.

0 Minuten (Tab.F14)

Proband	Z_i	Π_i	Sortieren			Berechnen
			Z_i	Π_i	R_i	
S48	0,48	0	0,05	0	1	0
S49	-0,24	1	0,09	0	2	0
S50	0,13	0	0,13	0	3	0
S51	0,09	0	0,15	0	4	0
S52	0,19	0	0,19	0	5	0
S53	0,32	0	0,21	1	6	6
S54	0,05	0	0,24	1	7	7
S55	0,15	0	0,32	0	8	0
S56	0,38	0	0,38	0	9	0
S57	-0,21	1	0,48	0	10	0

13

entspricht T^* für 0min

$n = 10$, $\alpha = 0.05$, tabellarische Prüfgröße $T(10, 0.05)$: 11

$T^* > T$: H_0 nicht abgelehnt, kein **signifikanter** Unterschied

5 Minuten nach der Applikation (Tab.F15)

Proband	Z_i	Π_i	Sortieren			Berechnen
			Z_i	Π_i	R_i	
S48	0,41	0	0,00	-	-	-
S49	-0,08	1	0,00	-	-	-
S50	0,30	0	0,00	-	-	-
S51	0,00	-	0,00	-	-	-
S52	0,00	-	0,02	1	1	1
S53	0,15	0	0,07	0	2	0
S54	0,00	-	0,08	1	3	3
S55	0,00	-	0,15	0	4	0
S56	0,07	0	0,30	0	5	0
S57	-0,02	1	0,41	0	6	0

4

entspricht T^* für 5 min $n = 6, \alpha = 0.05$, tabellarische Prüfgröße $T(6, 0.05)$: 3 $T^* > T$: H_0 wird angenommen, kein **signifikanter** Unterschied**10 Minuten nach der Applikation (TabF16)**

Proband	Z_i	Π_i	Sortieren			Berechnen
			Z_i	Π_i	R_i	
S48	0,22	0	0,00	-	-	-
S49	-0,07	1	0,00	-	-	-
S50	0,22	0	0,00	-	-	-
S51	0,01	0	0,01	1	2	0
S52	-0,01	1	0,01	0	2	0
S53	0,00	-	0,01	1	2	2
S54	0,00	-	0,02	1	4	4
S55	0,00	-	0,07	0	5	0
S56	0,01	0	0,22	0	6,5	0
S57	-0,02	1	0,22	0	6,5	0

6

entspricht T^* für 10 min $n = 7, \alpha = 0.05$, tabellarische Prüfgröße $T(7, 0.05)$: 4 $T^* > T$: H_0 wird angenommen, kein **signifikanter** Unterschied

15 Minuten nach der Applikation (Tab.F17)

Proband	Z_i	Π_i	Sortieren			Berechnen
			Z_i	Π_i	R_i	
S48	0,01	0	0,00	-	-	-
S49	-0,02	1	0,00	-	-	-
S50	0,01	0	0,00	-	-	-
S51	0,00	-	0,00	-	-	-
S52	0,00	-	0,00	-	-	-
S53	0,02	0	0,01	0	1,5	0
S54	0,00	-	0,01	0	1,5	0
S55	0,00	-	0,02	1	4	4
S56	0,02	0	0,02	0	4	0
S57	0,00	-	0,02	0	4	0

4

entspricht T^* für 15 min $n = 5$, $\alpha = 0.05$, tabellarische Prüfgröße $T(5, 0.05)$: 1 $T^* > T$: H_0 wird angenommen, kein **signifikanter** Unterschied**30 Minuten nach der Applikation (Tab.F18)**

Proband	Z_i	Π_i	Sortieren			Berechnen
			Z_i	Π_i	R_i	
S48	0,00	-	0,00	-	-	-
S49	0,00	-	0,00	-	-	-
S50	0,00	-	0,00	-	-	-
S51	0,00	-	0,00	-	-	-
S52	0,00	-	0,00	-	-	-
S53	0,02	0	0,00	-	-	-
S54	0,00	-	0,00	-	-	-
S55	0,00	-	0,00	-	-	-
S56	0,02	0	0,02	0	1,5	0
S57	0,00	-	0,02	0	1,5	0

0

entspricht T^* für 30 min $n = 2$, Auswertung nicht möglich

45 Minuten nach der Applikation (Tab.F19)

Proband			Sortieren			Berechnen
	Z_i	Π_i	Z_i	Π_i	R_i	
S48	0,00	-	0,00	-	-	-
S49	0,00	-	0,00	-	-	-
S50	0,03	0	0,00	-	-	-
S51	0,00	-	0,00	-	-	-
S52	0,00	-	0,00	-	-	-
S53	0,00	-	0,00	-	-	-
S54	0,00	-	0,00	-	-	-
S55	0,00	-	0,03	0	2	0
S56	0,03	0	0,03	0	2	0
S57	0,03	0	0,03	0	2	0

0

entspricht T^* für 45 min $n = 3$, Auswertung nicht möglich**60 Minuten nach der Applikation (Tab.F20)**

Proband			Sortieren			Berechnen
	Z_i	Π_i	Z_i	Π_i	R_i	
S48	0,00	-	0,00	-	-	-
S49	0,00	-	0,00	-	-	-
S50	0,02	0	0,00	-	-	-
S51	0,00	-	0,00	-	-	-
S52	0,00	-	0,00	-	-	-
S53	0,06	0	0,00	-	-	-
S54	0,00	-	0,00	-	-	-
S55	0,00	-	0,02	0	1	0
S56	0,03	0	0,03	0	2	0
S57	0,00	-	0,06	0	3	0

0

entspricht T^* für 60 min $n = 3$, Auswertung nicht möglich

240 Minuten nach der Applikation (Tab.F21)

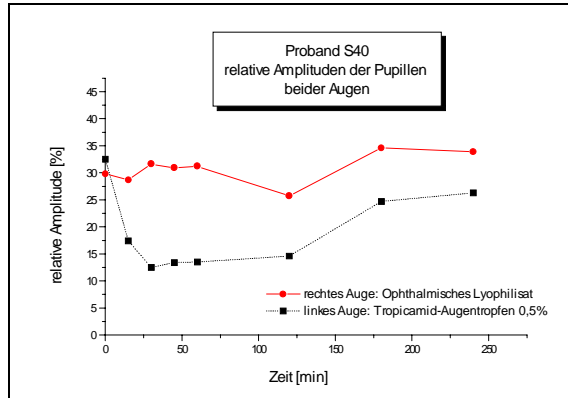
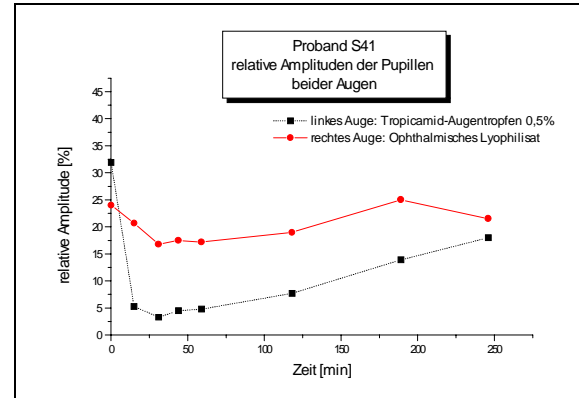
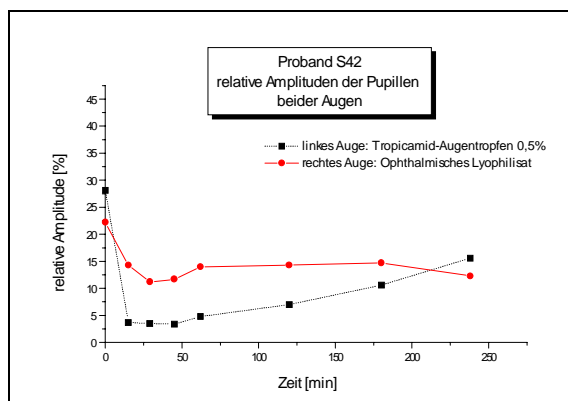
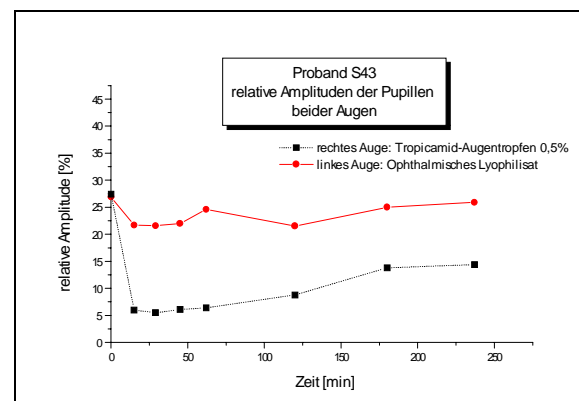
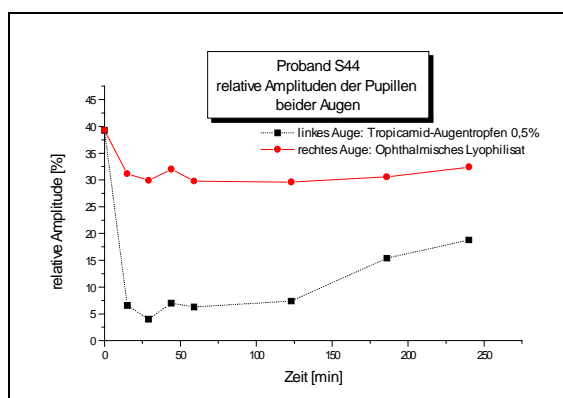
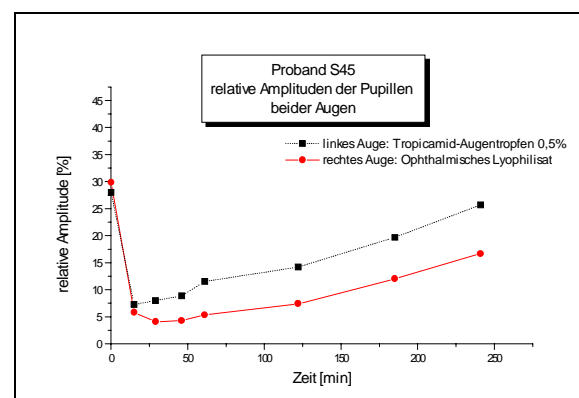
Proband			Sortieren			Berechnen
	Z_i	Π_i	Z_i	Π_i	R_i	
S48	0,00	-	0,00	-	-	-
S49	0,00	-	0,00	-	-	-
S50	0,00	-	0,00	-	-	-
S51	0,00	-	0,00	-	-	-
S52	0,00	-	0,00	-	-	-
S53	0,04	0	0,00	-	-	-
S54	0,00	-	0,00	-	-	-
S55	0,00	-	0,00	-	-	-
S56	0,00	-	0,00	-	-	-
S57	0,00	-	0,04	0	1	0

0

entspricht T^* für 240 min

$n = 1$, eine Auswertung ist nicht mehr möglich, da n zu klein ist.

Anhang G

Verlauf der Mydriasis (relative Amplitudenwerte) bei der Tropicamidstudie
- Teil 1 -Abb.G1: Proband S40, Augenfarbe: blau
mit Lyophilisat appliziert: 0,00 %, 0,0 µgAbb.G2: Proband S41, Augenfarbe: blau
mit Lyophilisat appliziert: 7,63 %, 10,8 µgAbb.G3: Proband S42, Augenfarbe: braun
mit Lyophilisat appliziert: 10,00 %, 13,8 µgAbb.G4: Proband S43, Augenfarbe: braun
mit Lyophilisat appliziert: 5,74 %, 7,8 µgAbb.G5: Proband S44, Augenfarbe: blau
mit Lyophilisat appliziert: 16,01 %, 22,8 µgAbb.G6: Proband S45, Augenfarbe: grün
mit Lyophilisat appliziert: 96,62 %, 136,8 µg

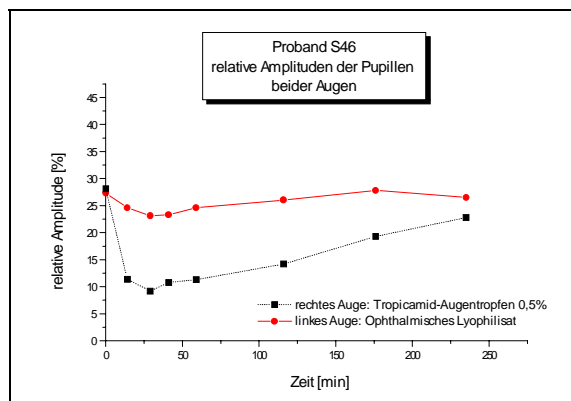


Abb.G7: Proband S46, Augenfarbe: braun
mit Lyophilisat appliziert: 13,24 %, 18,8 μ g

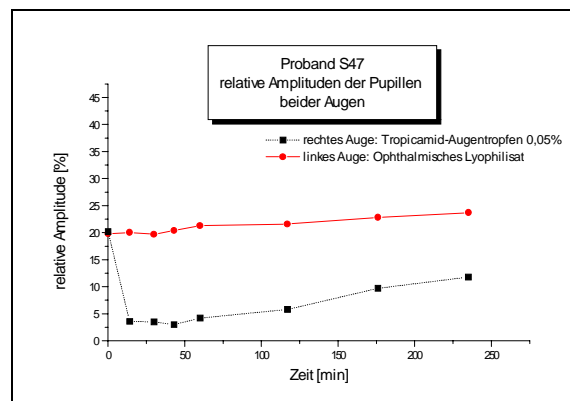


Abb.G8: Proband S47, Augenfarbe: blau
mit Lyophilisat appliziert: 1,37 %, 1,8 μ g

Anhang H

Verlauf der Mydriasis (relative Amplitudenwerte) bei der Tropicamidstudie - Teil 2 -

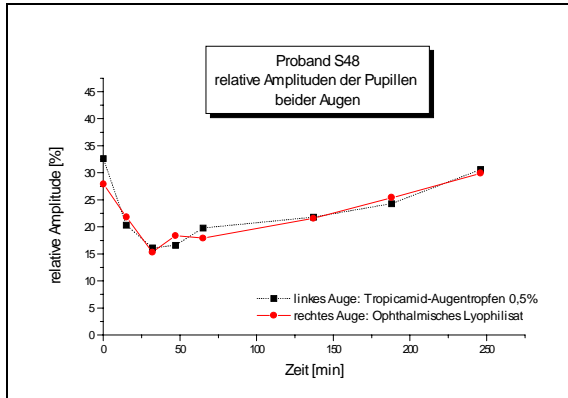


Abb.H1: Proband S48, Augenfarbe: blau
mit Lyophilisat appliziert: 70,71 %, 85,0 µg

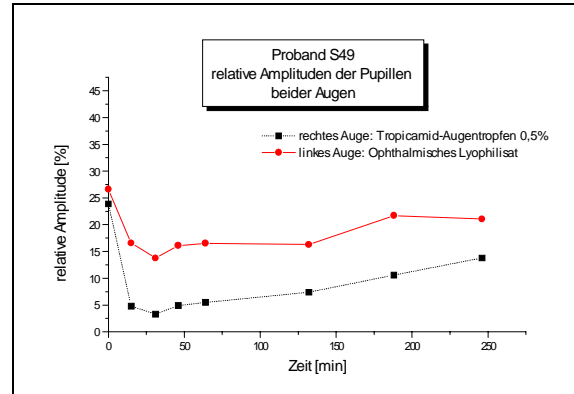


Abb.H2: Proband S49, Augenfarbe: grün-blau
mit Lyophilisat appliziert: 18,13 %, 22,0 µg

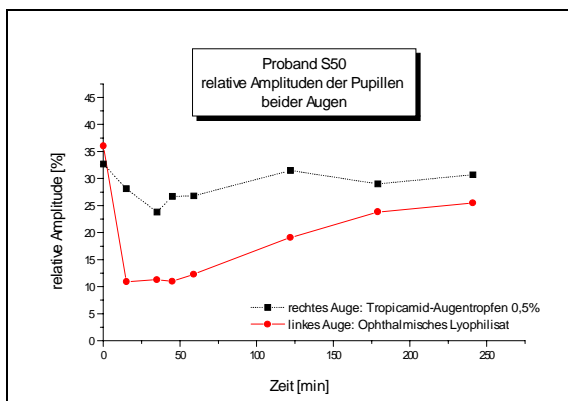


Abb.H3: Proband S50, Augenfarbe: grün
mit Lyophilisat appliziert: 100,00 %, 120,0 µg

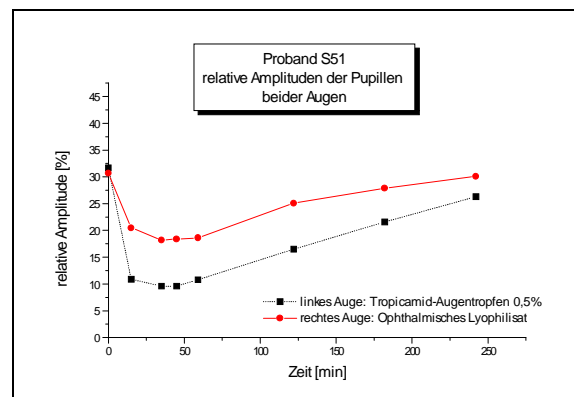


Abb.H4: Proband S51, Augenfarbe: grün
mit Lyophilisat appliziert: 97,99 %, 118,0 µg

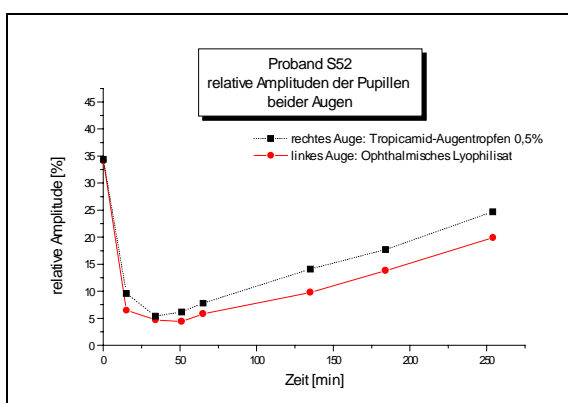


Abb.H5: Proband S52, Augenfarbe: grün-braun
mit Lyophilisat appliziert: 56,82 %, 68,0 µg

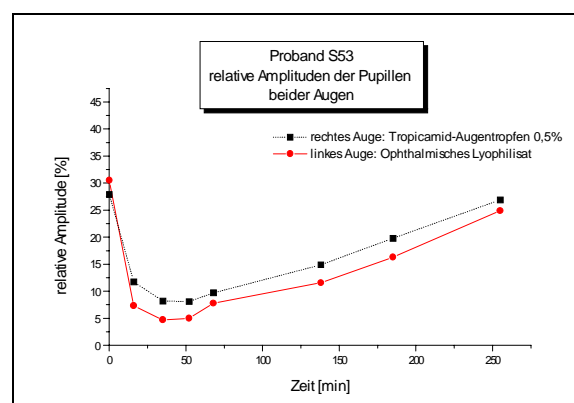


Abb.H6: Proband S53, Augenfarbe: grün
mit Lyophilisat appliziert: 0,00 %, 0,00 µg

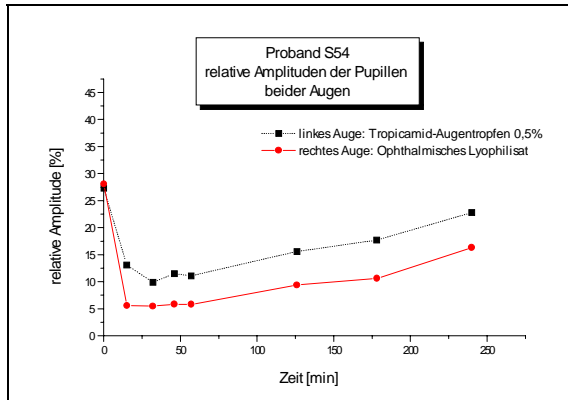


Abb.H7: Proband S54, Augenfarbe: blau-grün mit Lyophilisat appliziert: 100,00 %, 120,0 µg

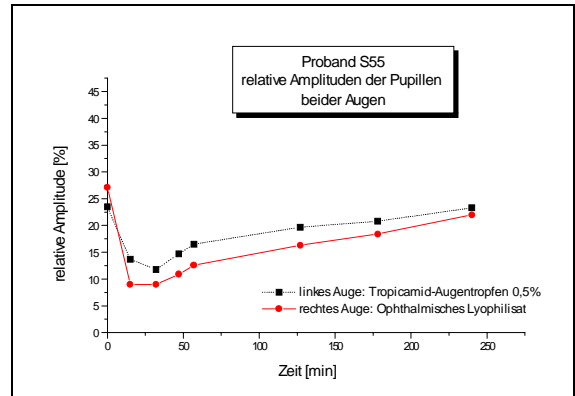


Abb.H8: Proband S55, Augenfarbe: blau mit Lyophilisat appliziert: 97,50 %, 117,0 µg

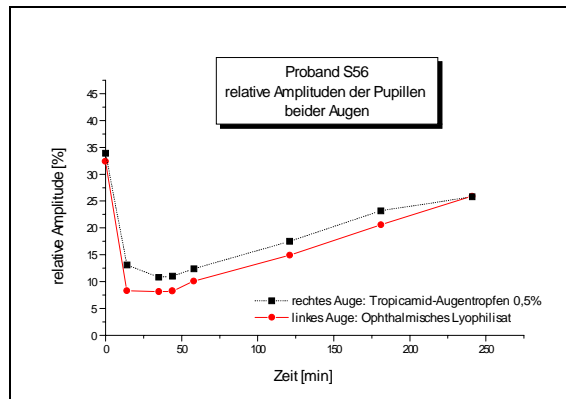


Abb.H9: Proband S56, Augenfarbe: braun mit Lyophilisat appliziert: 99,48 %, 119,0 µg

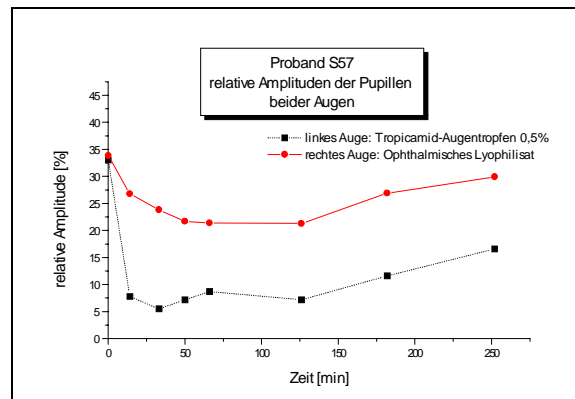


Abb.H10: Proband S57, Augenfarbe: grün-braun mit Lyophilisat appliziert: 95,01 %, 114,0 µg

Anhang I

Programm zur Messung und Speicherung von Wägedaten in variablen Zeitabständen

(Autor: S. Göbel, Meckenheim)

```

program WAACOM;

uses CRT,DOS,SERIAL;

type
    Masse_Typ          = string[20];
    Dateinamen_Typ     = string[12];

var
    I                  : integer;
    Zeichen,
    Key                : char;
    Datei              : text;
    Ende               : boolean;
    Eingabe            : string;
    Dateiname          : Dateinamen_Typ;
    Start_Stunde,
    Start_Minute,
    Start_Sekunde,
    Start_Hundertstel,
    Delta_Stunde,
    Delta_Minute,
    Delta_Sekunde      : word;
    Uebertrag,
    H,M,S,
    Anzahl,
    X,Y                : integer;
    Masse              : Masse_Typ;
{-----}
procedure Rahmen;
var I : integer;
begin
end;
{-----}
procedure Warte_auf_Zeitsignal;
var
    Stunde,Minute,Sekunde,Hundertstel      : word;
    Signal_Stunde,Signal_Minute,Signal_Sekunde : word;

begin
    GetTime(Start_Stunde,Start_Minute,Start_Sekunde,Start-Hundertstel);
    Signal_Sekunde:=Start_Sekunde+Delta_Sekunde;
    if Signal_Sekunde>59 then
        begin
            Signal_Sekunde:=Signal_Sekunde-60;
            Uebertrag:=1;
        end;
    else Uebertrag:=0;
    Signal_Minute:=Start_Minute+Delta_Minute+Uebertrag;
    if Signal_Minute>59 then
        begin
            Signal_Minute:=Signal_Minute-60;
            Uebertrag:=1;
        end
    end

```

```

else Uebertrag:=0;
Signal_Stunde:=Start_Stunde+Delta_Stunde+Uebertrag;
if Signal_Stunde>23 then
begin
    Signal_Stunde:=Signal_Stunde-24;
end;

write('nächste Wägung (Abbruch mit <e> →)');
X:=whereX;
Y:=whereY;

Key:=#0;
repeat
    GetTime(Stunde,Minute,Sekunde,Hundertstel);
    gotoxy(X,Y);
    write(Signal_Stunde-Stunde:2,':',Signal_Minute-Minute:2,':',Signal_Sekunde-
    Sekunde:2);
    if keypressed then Key:=readkey;
    if Key='e' then Ende:=true;
until ((Stunde=Signal_Stunde) and (Minute=Signal_Minute) and (Sekunde=Signal_Sekunde))
or Ende;
end;
{-----}
{-----}
procedure Initialisieren;
begin
    InitCom(Com1);
    SetProtocol(Com1,1200,7,1,Odd);
    ClearBuf(Com1);
end;
{-----}
procedure Tarieren;
begin
    ClearBuf(Com1);
    PutLine(Com1,#27+'T'+#13#10);
end;
{-----}
function Waegung : Masse_Typ;
begin
    ClearBuf(Com1);
    PutLine(Com1, #27+'P'+#13#10);
    Waegung:=GetLine(Com1);
    writeln(#7);
end;
{-----}
procedure Speichern(Text_Zeile : string);
begin
    assign(Datei,Dateiname);
    {$I-}
    append(Datei);
    {$I+}
    if IOResult<>0 then rewrite(Datei);
    writeln(Datei,l, ' ',Text_Zeile);
    close(Datei);
end;
{-----}
procedure Parameter_Eingabe(var Ho,Mi,Se,An : integer; var Na : Dateinamen_Typ)
var Eingabe : string;
begin
    clrscr;
    write('Zeitintervall Stunden → ');

```

```

    readln(Ho);
    write('Zeitintervall Minuten → ');
    readln(Mi);
    write('Zeitintervall Sekunden → ');
    readln(Se);
    writeln;
    write('Anzahl der Messungen → ');
    readln(An);
    writeln;
    write('Eingabe Dateiname → ');
    readln(Eingabe);
    Na:=copy(Eingabe,1,8)+'.Dat';
end;
{-----}
{Hauptprogramm}
{-----}
begin
    Initialisieren;
    Parameter_Eingabe(H,M,S,Anzahl,Dateiname);
    Speichern(Dateiname);

    Delta_Stunde:=H;
    Delta_Minute:=M;
    Delta_Sekunde:=S;

    writeln;
    write('Start Messung mit <Enter>');
    readln;
    clrscr;
    Ende:=false;
    I:=0;

    while (I <= Anzahl) and not Ende do
    begin

        Masse:=Waegung;
        gotoxy(1,Y);clreol;gotoxy(1,Y);
        writeln(I:3, '.Messung:',Masse);
        Speichern(Masse);

        writeln('Wiegen...');
        Warte_auf_Zeitsignal;
    end;

    writeln;
    writeln;
    write('Messungen beendet, weiter mit <Enter>');
    readln;

    ResetCom(Com1);
    writeln('Ende...');
end.
{-----}

```

F SYMBOLE UND ABKÜRZUNGEN

Symbole

\bar{x}	Arithmetisches Mittel
\bar{A}	Mittelwert der Flächen
\dot{n}	zeitliche Ableitung der Teilchenzahldichte
r	absolute Dichte [g/cm ³]
n	kinematische Viskosität [mm ² /s]
s	Oberflächenspannung [mN/M]
q	Benetzungswinkel [°]
h	dynamische Viskosität [mPa·s]
a	fester Effekt
u	Hagenbach-Korrekturfaktor [s]
P	Multiplikationsoperator
a	Signifikanzniveau
s	Stoßquerschnitt
b	zufälliger Effekt
e_j	experimenteller Fehler
DR	Reizscoredifferenz
A_{ij}	Meßwert
$A_{post.min}$	nach dem Lichtblitz erreichter, minimaler Pupillendurchmesser [mm]
A_{prior}	zu Beginn der Messung bestehender Pupillendurchmesser [mm]
A_{rel}	relative Amplitude [%]
AUC_{Arel}	Fläche der relativen Amplitudenkurven
c	Konzentration [mol/l]
D	Diffusionskoeffizient [m ² /s ⁻¹]
dc/dt	Konzentrationsänderung in Abhängigkeit von der Zeit
dc/dx	Konzentrationsänderung in Abhängigkeit von der Strecke
df	Anzahl an Freiheitsgraden (degrees of freedom)
$div j_n$	Divergenz der Teilchenstromdichte
dm/dt	Änderung der Masse in Abhängigkeit von der Zeit
dP	Wahrscheinlichkeitsdichte
d_r	Schichtdicke (eines Lyophilisats) [cm]
F	Prüfgröße (kritischer Wert der F-Verteilung)
$grad n$	Gradient der Teilchenzahldichte
H_o	Nullhypothese
j_n	Teilchenstromdichte
K	gemessene Kraft [mN]
K	Kapillarspezifische Konstante [mm ² /s ²]
k	Konstante
K	Polymerkonstante
l	eingetragene Länge des Probanden auf der VA-Skala [cm]
l	mittlere freie Weglänge [m]
L_b	benetzte Länge [m]
l_{ges}	Gesamtlänge der VA-Skala [cm]
MS	Mittleres Abweichungsquadrat (mean squares)
N	Anzahl der Teilchen

n	Teilchenzahldichte
O	Oberfläche
p	Druck [bar]
q	Querschnitt
r	Radius [m]
R	Reizscore
R_i	Rangliste (i-tes Element einer geordneten Liste)
R_R	Reizscore der Referenz-Zubereitung
R_T	Reizscore der Test-Zubereitung
s	Standardabweichung
s^2	Varianz
SS	Summe der Abweichungsquadrate (sum of squares)
t	Durchflußzeit [s]
T	tabellarische Prüfgröße (kritischer Wert der t-Verteilung)
T	Temperatur [°C], [K]
T^*	berechneter Vergleichswert
t_r	Trocknungszeit (eines Lyophilisats) [h]
x	Wegstrecke [m]
x_i	Formulierung
x_i	Meßwert
x_j	Proband
z_i	Meßwert, Reizscore Differenz zwischen Lyophilisat und Augentropfen

Abkürzungen

A, B, C, D	Behandlungsschema
Abb.	Abbildung
ACh	Acetyl-Cholin
AGLMB	Arbeitsgemeinschaft der leitenden Medizinalbeamten der Bundesländer
AMG	Arzneimittelgesetz
AT	Augentropfen
AUC	Area under the Curve (Fläche unter der Kurve)
BAK	Benzalkoniumchlorid
BODI	Bioadhesive Ophthalmic Insert
BTM	Barometrische Temperaturmessung
bzw.	beziehungsweise
CA	Gefriertrockner Christ alpha 2-4
ca.	circa
CAP	Celluloseacetatphthalat
CMC	Carboxymethylcellulose-Natrium
CO	Cornea
CRF	Case Report Form
DDK	Dynamische Differenzkalorimetrie
DDS	Drug Delivery System
DSC	Differential-Scanning-Calorimetry
DTA	Differential-Thermoanalyse
EDO	Einzeldosis

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGDMA	Ethylenglycoldimethacrylat
EHEC	Ethylhydroxyethylcellulose
EVA	Ethylenvinylacetat
FDA	Food and Drug Administration
GCP	Good Clinical Practice
HEC	Hydroxyethylcellulose
HEMA	Poly-2-hydroxyethylmethacrylat
HEMC	Hydroxyethylmethylcellulose
HNO	Hals-Nasen-Ohren
HPC	Hydroxypropylcellulose
HPMC	Hydroxypropylmethylcellulose
IOP	Intra Ocular Pressure (Augeninnendruck)
IR	Infrarot
Kap.	Kapitel
KW	Kammerwasser
LAF	Laminar Air Flow
LH	Gefriertrockner Leybold Heraeus GT2
li	links
LUV	Large Unilamellar Vesicles
LYO	Lyophilisat
MC	Methylcellulose
MDO	Mehrdosisbehältnis
MLV	Multilamellar Vesicles
MT	Mini Tablets
MTL	Morgan Therapeutic Lens
NODS	New Ophthalmic Drug Delivery System
OR	Ophthalmic Rod
PA	Polyacrylamid
PAS	Polyacrylsäure
PBCA	Poly(butylcyanoacrylat)
PC	Personalcomputer
PVAL	Polyvinylalkohol
PVP	Polyvinylpyrrolidon, Povidon
R	Referenz
re	rechts
s.	siehe
s.a.	siehe auch
SME	Submikroemulsion
SODI	Soluble Ocular Drug Insert
SUV	Small Unilamellar Vesicles
T	Test
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
VA-Skala	Visual-Analog-Skala
VK	Variationskoeffizient
z.B.	zum Beispiel

G. LITERATURVERZEICHNIS

Abdou MAF: Luftkeimsammler RCS. Einsatzmöglichkeiten in medizinischen und nicht medizinischen Bereichen, *Ärztl Lab* 1979, 6:20-26

Abramson DH, Chang S, Coleman J, Smith ME: Pilocarpine-induced lens changes. An ultrasonic biometric evaluation of dose response, *Arch Ophthalmol* 1974, 92:464-469

Abramson DH, Chang S, Coleman J: Pilocarpine therapy in glaucoma - Effects on anterior lens chamber depth and lens thickness in patients receiving longterm therapy, *Arch Ophthalmol* 1976, 94:914-918

Abramson DH, Coleman DJ, Forbes M., Franzen LA: Pilocarpine, *Arch Ophthal* 1972, 87(6):615-620

Adler CA, Maurice DM, Paterson ME: The effect of viscosity on the vehicle on the penetration of Fluorescein into the human eye, *Exp Eye Res* 1971, 11(1):34-42

Adrian W: Über den Zusammenhang der spektralen Empfindlichkeit des Auges und der Pupillenkonstriktion, aus: Dodt E, Schrader KE (Hrsg.): *Die normale und die gestörte Pupillenbewegung*, S.43-51, Verlag J.F. Bergmann, München 1973

Alani SD: The ophthalmic rod: a new ophthalmic delivery system I, *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1990, 228:297-301

Alani SD: The ophthalmic rod: description of a disposable ophthalmic drug delivery device, *Acta Pharm Suec* 1978, 15:237-240

Alcon Pharma GmbH, Freiburg: Informationsblatt: Augentropfen richtig anwenden, Unkonservierte Augentropfen aus der Alcon SE-Einmaldosis/Augentropfen aus der Alcon Drop-Tainer-Flasche, Wie tropfe ich richtig?,

Allen LV: Preservative-free pilocarpine solution, *U.S. Pharmacist* 1994, 19(8):104-105

Alm A, Bill A, Young FA: The effects of pilocarpine and neostigmine on the blood flow through the anterior uvea in monkeys. A study with radioaktivly labelled microspheres, *Exp Eye Res* 1973, 15:31-36

Alza Pharmaceuticals, California: Ocusert - Pilo-20 and Pilo-40, ocular therapeutics systems, 1974

Ammar HO, El-Nahhas SA, Khalli RM: Cyclodextrins in acetazolamide eye drop formulations, *Pharmazie* 1998, 53(8):559-562

Amtech, Weinheim, Gerätebeschreibung

Apel P, Horsch W: Untersuchungen zur Vorbereitung der industriellen Produktion von Pilocarpin-Augentropfen, *Pharmazie* 1976, 31(9)

Apt L, Henrick A, Silverman LM: Patient compliance with use of topical ophthalmic corticosteroid suspensions, *Am J Ophthalmol* 1979, 87(2):210-214

Armaly MF, Rao KR: The effect of pilocarpine Ocusert with different release rates on ocular pressure, *Invest Ophthalmol* 1973, 12(7):491-496

Baeyer A: Über eine neue Klasse von Farbstoffen, *Berl Deutsch Chem Ges* 1871, 4:555-558

Banker GS, Rhodes CT: *Modern Pharmaceutics*, 2nd Edition, Chapt.14: Design and Evaluation of Ophthalmic Pharmaceutical Products, Marcel Dekker, New York 1990

- Bárány EH: The immediate effect on outflow resistance of intravenous pilocarpine in vervet monkey, *Invest Ophthalmol* 1967, 6:373-380
- Bárány EH: The mode of action of pilocarpine on outflow resistance in the eye of a primate, *Invest Ophthalmol* 1962, 1:713-727
- Bar-Ilan A, Neumann R: Basic considerations of ocular drug-delivery systems, aus: Textbook of Ocular Pharmacology (ed.: Zimmerman TJ et al.), Lippicott-Raven Publishers, Philadelphia, 1997
- Barrett TW: Solution Properties of Hyaluronic Acid, *Am Chem Society* 1981
- Barthlott, Wilhelm: Selbstreinigende Oberflächen von Gegenständen sowie Verfahren zur Herstellung derselben, Europäische Patentschrift EP 0 772 514 B1, Patenterteilung: 23.12.1998
- Bartlett JD, Wesson MD, Swiatoch J, Wooley T: Efficacy of a pediatric cycloplegic administered as a spray, *J Am Optom Assoc* 1993, 64:617-621
- Bauer KH, Frömming KH, Führer C: *Pharmazeutische Technologie*, 4. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1993
- Bawa R: Ocular Inserts, aus: Mitra AK (ed.): *Ophthalmic Drug Delivery Systems*, Drugs and the Pharmaceutical Sciences, Vol.58, Chapt.11, 1st Edition, Marcel Dekker, New York 1993
- Baydoun L, Müller-Goymann CC: Amphiphilic Starch as a new Excipient for Pharmaceutical Applications, *Proc. 3rd World Meeting APV/APGi*, Berlin 3/6 April 2000, 801-802
- Beck T, Langhage P: Auge und visuelles Sytem 1995, 51/52
- Bedienungsanleitung, Halbmikro-Osmometer, Typ ML, Wissenschaftlicher Gerätebau, Knauer, Nr. V7251, Version 1190
- Beilin M, Bar-Ilan A, Amselem S, Schwarz J, Yogev A, Neumann R: Ocular retention time of submicron emulsion (SME) and the miotic response to pilocarpine delivered in SME, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995, 36(4):S166; 805 [Abstract]
- Benavides JO, Satchell ER, Frantz KA: Efficacy of a mydriatic spray in the pediatric population, *Optom Vis Sci* 1997, 74(3):160-163
- Benedetto DA, Shah DO, Kaufmann HE: The instilled fluid dynamics and surface chemistry of polymers in the preocular tear film, *Invest Ophthalmol* 1975, 12:887-902
- Benjamin WJ, Hill RM: Human tears: osmotic characteristics, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983, 24(12):1624-1626
- Bikales NM, Segal L: *Cellulose and Cellulose Derivates*, Part V, Chapter XVII: Derivates of Cellulose, Section C: Ethers, Wiley-Interscience, New York 1980
- Bill A: Effects of atropine and pilocarpine on aqueous humor dynamics in cynomolgus monkeys, *Exp Eye Res* 1967, 6:120-125
- Blaug SM, Canada ATJr: Relationship of Viscosity, Contact Time and Prolongation of Action of Methylcellulose - Containing Ophthalmic Solutions, *Am J Hosp Pharm* 1965, 22(12):662-666
- Bloklandpack/Rowa Techniek, Ijesselstein, Niederlande: Drip-Aid
- Bloomfield SE, Miyata T, Dunn MW, Bueser N, Stenzel KH, Rubin AL: Soluble gentamicin ophthalmic inserts as a drug delivery system, *Arch Ophthalmol* 1978, 96:885-887

- Blumröder U: Spaltlampenuntersuchung: Unerschöpfliches Reservoir an diagnostischen Möglichkeiten, *Z prakt Augenheilkd* 1997, 18:433
- Bochot A, Mashhour B, Puisieux F, Couvreur P, Fattal E: Comparison of the ocular distribution of a model oligonucleotide after topical instillation in rabbits of conventional and new dosage forms, *J Drug Targeting* 1998, 6(4):309-313
- Borgmann H, Wurster W: Der Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen und Vehikel auf die Pilocarpin-Miosis - 1. Unterschiedliche Konzentrationen, *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1973, 163:44-50
- Borgmann H, Wurster W: Der Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen und Vehikel auf die Pilocarpin-Miosis - 2. Unterschiedliche Vehikel, *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1973, 63:51-56
- Borgmann H: Das Verhalten des Pupillendurchmessers in Dunkelheit nach verschieden langer Vorbelichtung, *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1967, 172:220-228
- Borgmann H: Grundlagen für eine klinische Pupillographie - I. Der Einfluß der Ausgangspupillenweite auf die Lichtreaktion, *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1972, 184:291-299
- Borgmann H: Grundlagen für eine klinische Pupillographie - II. Abhängigkeit des Pupillendurchmessers in Dunkelheit vom Lebensalter, *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1972, 184:300-308
- Bortz J: *Statistik für Sozialwissenschaftler*, 4.Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1993
- Brinchmann-Hansen O, Anmarkrud N: Pilocarpine Medication in open-angle glaucoma; A study using Pilocarpine Eyedrops and an Ocular Therapeutic System, *Acta Ophthalmol Scand* 1979, 57(1):55-62
- Brown IR, Dyer AE, Elowe IN, Staffer IE, Walker GC: The stability of pilocarpine hydrochloride in the presence of benzalkonium chloride and methylcellulose - 1. Physical, chemical and pharmacological considerations, *Canad J Pharm Sci* 1966, 5:22-26
- Brown RH, Hotchkiss ML, Davis EB: Creating Smaller Eyedrops by Reducing Eyedropper Tip Dimensions, *Am J Ophthalmol* 1985, 99:460-464
- Brown RH, Lynch MG: Drop size of commercial glaucoma medications -to the Editor- *Am J Ophthalmol* 1986, 102(5):673-674
- Brubaker RF, Maurice DM, McLaren JW: Fluorometry of the Anterior Segment, aus: Masters BR (ed.): *Noninvasive Diagnostic Techniques in Ophthalmology*, Chp. 15, Springer-Verlag New York, 1990
- Brubaker RF: Clinical evaluation of the circulation of aqueous humor, aus: Parrish RK (ed.): *Clinical Ophthalmologie*, Vol.3, Chapt.2, Lippincott, Philadelphia 1989
- Bruchhausen Von F, Dannhardt G, Ebel S, Frahm AW, Hackenthal E, Holzgrabe U, Keller K, Nürnberg E, Rimpler H, Schneider G, Surmann P, Wolf HU, Wurm G: *Hagers Handbuch, Stoffe P-Z*, 5. Auflage, Springer-Verlag
- Buckles RG: Biomaterials for drug delivery systems, *J Biomed Materials Res* 1983, 17:109-128
- Bucolo C, Mangiafico S, Spadaro A: Methylprednisolone delivery by Hyalobend corneal shields and its effect on rabbit ocular inflammation, *J Ocul Pharmacol Therap* 1996, 12(2):141-149

- Bundesminister für Jugend, Familie, Frauen und Gesundheit (1987): *Grundsätze für die ordnungsgemäße Durchführung der klinischen Prüfung von Arzneimitteln*. Bundesanzeiger 243:16617-16620, Editio Cantor Verlag (ed) 1991
- Bundgaard H, Hansen SH: Hydrolysis and epimerization kinetics of pilocarpine in basic aqueous solution as determined by HPLC, *Int J Pharm* 1982, 10:281-289
- Burgalassi S, Chetoni P, Saettone MF: Hydrogels for ocular delivery of pilocarpine: Preliminary evaluation in rabbits of the influence of viscosity and of drug solubility, *Eur J Pharm Biopharm* 1996, 42(6):385-392
- Burger A: DTA und DSC: Grundlagen, Methodik und Anwendung, *Pharm Unserer Zeit* 1982, 6:177-189
- Burstein NL: Preservative alteration of corneal permeability in humans and rabbits, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984, 25(12):1453-1457
- Busche S, Gramer E: Verbesserung der Augentropfenapplikation und Compliance bei Glaukompatienten. Eine klinische Studie, *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1997, 211(4):257-262
- Byk Gulden, Konstanz: Tips für Kontaktlinsenträger
- Camber O, Edman P, Gurny R: Influence of sodium hyaluronate on the miotic effect of pilocarpine in rabbits, *Curr Eye Res* 1987, 6(6):779-784
- Cameron P: *Good Pharmaceutical Freeze-Drying Practice*, Interpharm Press, USA, 1997
- Campbell FW, Boyd TAS: The use of sodium fluorescein in assessing the rate of healing in corneal ulcers, *Br J Ophthalmol* 1950, 34:545-549
- Capozza RC, Sendelbeck L, Balkenhohl WJ: Preparation and evaluation of a bioerodible naltrexone delivery system, aus: *Polymeric Delivery Systems: Midland Macromolecular Monographs*, Vol. 5, pp59:57-73, Gordon and Breach, New York 1978
- Carlfors J, Edsman K, Petersson R, Joernving K: Rheological evaluation of Gelrite in situ gels for ophthalmic use, *Eur J Pharm Sci* 1998, 6(2):113-119
- Cekic O, Batman C, Yasar Ü, Basci NE, Bozkurt A, Kayaalp SO: Penetration of ofloxacin in human aqueous and vitreous humors following oral and topical administration, *J Retinal Vitreous Diseases* 1998, 18(6):521-525
- Chastaing C, Rozier A, Plazonnet B, Grove J: Gelrite enhances the ocular penetration of pilocarpine in the pigmented rabbit, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995, 36(4):5159 [Abstract]
- Cheeks L, Green K, Stone RP, Riedhammer T: Comparative effects of pilocarpine in different vehicles on pupil diameter in albino rabbits and squirrel monkeys, *Curr Eye Res* 1989, 8(12):1251-1258
- Chetoni P, Bianchi M, Giannaccini B, Saettone MF, Conte U, Sangalli ME: Ocular mini-tablets for controlled release of timolol: evaluation in rabbits, *J Ocular Pharmacol Ther* 1996, 12(3):245-252
- Chetoni P, Di Colo G, Grandi M, Morelli M, Saettone MF, Darougbar S: Silicone rubber/hydrogel composite ophthalmic inserts: preparation and preliminary in vitro/in vivo evaluation, *Eur J Pharm Biopharm* 1998, 46:125-132
- Chrai SS, Makoid MC, Eriksen SP, Robinson JR: Drop size and initial dosing frequency problems of topically applied ophthalmic drugs, *J Pharm Sci* 1974, 63(3):333-338

- Chrai SS, Robinson JR: Ocular Evaluation of Methylcellulose Vehicle in Albino Rabbits, *J Pharm Sci* 1974, 63(8):1218-1223
- Christ Gefriertrocknungsanlagen, Firmeninformation, Stand: 1996
- Chung PH, Chin TF, Lach JL: Kinetics of the Hydrolysis of Pilocarpine in Aqueous Solution, *J Pharm Sci* 1970, 59(9):1300-1306
- Cibis GW, Campos EC, Aulhorn E: Pupillomotor latent period, *Vis Res* 1977, 17:737-738
- Claridge KG: The effect of topical pilocarpine on pulsatile ocular blood flow, *Eye* 1993, 7(Pt4):507-510
- Clarke GM, Jefferson GC, McBride RJ, Priestley GC: The cytotoxic activity of ophthalmic preservatives, *J Pharm Pharmacol* 1985, 37:63 [Suppl.]
- Clifford DB, Olney JW, Maniotis A, Collins RC, Zorumski CF: The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures, *Neuroscience* 1987, 23(3):953-968
- Coad CT, Osato MS, Wilhelmus KR: Bacterial contamination of eyedrop dispensers, *Am J Ophthalmol* 1984, 98:548-551
- Colorcon, Produktinformation
- Connors KA, Amidon GL, Stella VJ: *Chemical Stability of Pharmaceuticals, A Handbook for Pharmacists*, 2nd Edition, p.79, pp.675-685, John Wiley & Sons, 1986
- Danjo Y, Watanabe H, Tisdale AS, George M, Tsumura T, Abelson MB, Gipson IK: Alteration of Mucin in Human Conjunctival Epithelia in Dry Eye, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998, 39(13):2602-2609
- Davies NM, Farr SJ, Hadgraft J, Kellaway IW: Evaluation of mucoadhesive Polymers in Ocular Drug Delivery. II. Polymer-coated Vesicles, *Pharm Res* 1992, 9:1137-1144
- Davies NM, Kellaway IW, Greaves JL, Wilson CG: Advanced corneal delivery systems: liposomes, Chapter 14, aus: Mitra AK: *Ophthalmic Delivery Systems*, Drug and the Pharmaceutical Sciences, Vol.58, 1st Edition, Marcel Dekker, 1993
- De Marinis M, Fiacco F, Testa SR, Agnoli A: Pharmacological control of pupillary responses in humans, *New Trends in Clinical Neuropharmacology* 1990/n.4, 4:41-46
- De Rojas Silva MV, Rodríguez-Ares MT, Sánchez-Salorio M, Díaz MJL, Alvarez JC, Jato JLV, Tomé CC: Efficacy of subconjunctival cyclosporin-containing microspheres on keratoplasty rejection in the rabbit, *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1999, 237:840-847
- Deicke A: *Prüfung der Redispergierbarkeit von Suspensionen durch mechanische Modellierung eines repräsentativen manuellen Schüttelprofils*, Dissertationsschrift Bonn 1999
- Desai SD, Blanchard J: Evaluation of Pluronic F127-Based Sustained-Release Ocular Delivery Systems for Pilocarpine Using the Albino Rabbit Eye Modell, *J Pharm Sci* 1998, 87(10):1190-1195
- Desai SD, Blanchard J: In Vitro Evaluation of Pluronic F127-Based Controlled-Release Ocular Delivery Systems for Pilocarpine, *J Pharm Sci* 1998, 87(2):226-230
- Deshpande AA, Heller J, Gurny R: Bioreodible polymers for ocular drug delivery, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1998, 15(4):381-420
- Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft (DOG), Berufsverband der Augenärzte (BVA): *Das Glaukom (der grüne Star)*, 1985

- Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart: Augentropfen - Arbeitsschema zur Herstellung sterilfiltrierter, wäßriger Augentropfen,
- Diepold R, Kreuter J, Guggenbuhl P, Robinson JR: Distribution of poly-hexyl-2-cyano[3-¹⁴C]acrylate nanoparticles in healthy and chronically inflamed rabbit eyes, *Int J Pharm* 1989, 54:149-153
- Diepold R, Kreuter J, Himber J, Gurny R, Lee VHL, Robinson JR, Saettone MF, Schnaudigel OE: Comparison of different models for the testing of pilocarpine eyedrops using conventional eyedrops and a novel depot formulation (nanoparticles), *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1989, 227(2):188-193
- Diestelhorst M, Grunthal S, Süverkrüp R: Dry Drops: a new preservative-free drug delivery system, *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1999, 237:294-398
- Diestelhorst M, Kriegelstein GK: The ocular tolerability of a new ophthalmic drug delivery system (NODS), *Int Ophthalmol* 1994, 18(1):1-4
- Diestelhorst M, Kwon KA, Süverkrüp R: Dose uniformity of ophthalmic suspensions, *J Cataract Refract Surg* 1998, 24(5):672-677
- Diestelhorst M: Charakteristik und Diagnostik wichtiger Glaukomformen, *Pharm Ztg* 1991, 10:555-560
- Diestelhorst M: Glaukomtherapie mit Prostaglandin F₂- Derivaten, *Arzneimitteltherapie* 1998, 4:107-115
- Diestelhorst M: Medikamentöse und operative Therapie des Glaukoms, *Pharm Ztg* 1991, 11:623-626
- Diestelhorst M: Nutzen und Risiken von Konservierungsstoffen in wäßrigen Augentropfen, *Zeitschr prakt Augenheilkd* 1990, 11:230-234
- DIN 1306, Juni 1306, Dichte, Begriffe, Angaben
- DIN 13342, Juni 1976; Nicht-newtonsche Flüssigkeiten, Begriffe, Stoffgesetze
- DIN 1342, Teil 1, Oktober 1983; Viskosität, Rheologische Begriffe
- DIN 1342, Teil 2, Februar 1986; Viskosität, Newtonsche Flüssigkeiten
- DIN 19266, August 1979, pH-Messung, Standardpufferlösungen
- DIN 51005, August 1993, Thermische Analyse (TA), Begriffe
- DIN 51006, Oktober 1990, Thermische Analyse (TA), Thermogravimetrie (TG), Grundlagen
- DIN 51007, Juni 1994, Differenzthermoanalyse (DTA), Grundlagen
- DIN 51423 März 1975, Messung der Brechzahl mit dem Abbé-Refraktometer
- DIN 51550, Dezember 1978, Bestimmung der Viskosität, Allgemeine Grundlagen
- DIN 51562: Ubbelohde-Viskosimeter mit hängendem Kugelniveau zur Bestimmung der kinematischen Viskosität, Teil 1, Schottgeräte, Hofheim
- DIN 51757, April 1994, Bestimmung der Dichte
- DIN 53018, Teil 1, März 1976, Messung der dynamischen Viskosität newtonscher Flüssigkeiten mit Rotationsviskosimetern, Grundlagen

- DIN 53018, Teil 2, März 1976, Messung der dynamischen Viskosität newtonscher Flüssigkeiten mit Rotationsviskosimetern, Fehlerquellen und Korrekturen bei Zylinder-Rotationsviskosimetern
- DIN 53019, Teil 1, Mai 1980, Messung von Viskositäten und Fließkurven mit Rotationsviskosimetern mit Standardgeometrie, Normalausführung
- DIN 53214, Februar 1982, Bestimmung von Fließkurven und Viskositäten mit Rotationsviskosimetern
- DIN 53217, Teil 1, März 1991, Bestimmung der Dichte, Allgemeines und Übersicht der genormten Verfahren
- DIN 53217, Teil 2, März 1991, Bestimmung der Dichte, Pyknometer-Verfahren
- DIN 53217, Teil 3, März 1991, Bestimmung der Dichte, Tauchkörper-Verfahren
- DIN 53217, Teil 4, März 1991, Bestimmung der Dichte, Aräometer-Verfahren
- DIN 53217, Teil 5, März 1991, Bestimmung der Dichte, Schwingungsverfahren
- Dinslage S, Weichselbaum A, Süverkrüp R, Diestelhorst M: Fluorescein Lyophilisate - Pharmacokinetics of Fluorescein in the Human Anterior Segment. A Fluorophotometric Study, *Inv Ophthalmol Vis Sci* 2000, 41(4):S766 (4063) [Abstract]
- Doe EA, Campagna JA: Pilocarpine spray: an alternative delivery method, *J Ocular Pharmacol Ther* 1998, 14(1):1-4
- Dolder R, Skinner FS: *Ophthalmika; Pharmakologie, Biopharmazie und Galenik der Augenarzneimittel*, 4. Auflage, WVG mbH Stuttgart, 1990
- Dolder R: Weitere Augenpräparate, aus: Dolder R, Skinner FS: *Ophthalmika*, Kap. 3.9, WVG mbH Stuttgart, 1990
- Dormanns JAMA, Van Logten MJ: The effect of ophthalmic preservatives on corneal epithelium of the rabbit: a scanning electron microscopical study, *Toxicol Appl Pharmacol* 1982, 62:251-261
- Dr. Mann Pharma: Richtige Anwendung von Gel-EDOs
- Drance SM, Bensted M, Schulzer M: Pilocarpine and intraocular pressure - Duration of effectiveness of 4% and 8% pilocarpine instillation, *Arch Ophthalmol* 1974, 91(2):104-106
- Drischel H: Untersuchungen über die Dynamik des Lichtreflexes der menschlichen Pupille, *Plügers Arch* 1957, 264:145-168
- Duffner LR, Pflugfelder SC, Mandelbaum S, Childress LL: Potential contamination in fluorescein-anaesthetic solutions, *Am J Ophthalmol* 1990, 110:199-202
- Dunn DL, Scott BS, Dorsey ED: Analysis of pilocarpine and isopilocarpine in ophthalmic solutions by normal-phase high-performance liquid chromatography, *J Pharm Sci* 1981, 4:446-449
- Durmortier G, Zuber M, Chast F, Sandouk P, Chaumeil JC: Comparison between a thermoreversible gel and an insert in order to prolong the systemic absorption of morphine after ocular administration, *S.T.P. Pharm Sci* 1992, 2(1):111-117
- Duzman E, Quinn CA, Warman A, Warman R: One-month crossover trial comparing the intraocular pressure control of 3,4 % piloplex twice daily with 2,0 % pilocarpine four times daily, *Acta Ophthalmol Scand (Kopenh.)* 1982, 60(4): 613-621

- Editio Cantor Verlag (Hrsg.) (1991) *Klinische Arzneimittelprüfungen in der EG: Grundsätze für Standards der Guten Klinischen Praxis (GCP) bei der Durchführung von Studien mit Arzneimitteln am Menschen in der EG; EG-GCP-Note for guidance*. Editio Cantor Verlag, Aulendorf
- Edsman K, Carlfors J, Petersson R: Rheological evaluation of poloxamer as an in situ gel for ophthalmic use, *Eur J Pharm Sci* 1998, 6(2) 105-112
- Ehrenstein GW, Riedel G, Trawiel P: *Praxis der Thermischen Analyse von Kunststoffen*, Carl Hanser Verlag München, 1998
- Ellis PP, Riegel M: Influence of ophthalmic ointments on the penetration of pilocarpine drops, *J Ocular Pharmacol* 1989, 5(2):119-125
- Englmayr W: *Pilokarpin - Ein Jahrhundert in der Glaukomtherapie*, Dissertationsschrift, Köln 1981
- Eppendorf Applications 4/96, No.10, Einsatz von Pipettiersystemen im Labor, Dosiertechnik Nr.1
- Eppendorf Bionews 2/95
- Ermer E: Analytische Überprüfung handelsüblicher Pilocarpin-Augentropfen, *Pharm Ztg* 1975, 44:1771-1773
- Etter JC, Mayer JM: Biopharmacie des preparations ophthalmiques, *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1985, 186:417-420
- EUAB 1997, Europäisches Arzneibuch 1997, 3. Deutsche Ausgabe, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart
- Evers HD: Ophthalmika, *Wehrmedizin und Wehrpharmazie* 1991, 2:118-121
- Facts and Comparisons (ed), *Ophthalmic Drug Facts 1999*, Wolters Kluwer Company, St. Louis, Missouri
- Feiden K: Arzneimittelprüfrichtlinien, Loseblattsammlung, Bände 1-5, 15. Ergänzungslieferung, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 2000
- 1.54: Überwachung der klinischen Prüfung (AGLMB)
 - 2.66: Investigation of Bioavailability and Bioequivalence (European Community)
 - 2.90: Hinweise zu klinischen Prüfungen (Allgemeines)
 - 6.1: Grundsätze der Guten Laborpraxis (GLP)
 - 7.4: Guidelines for the Clinical Investigation of Antiglaucomatous Drugs (WHO-Richtlinie)
 - 8.2: Empfehlungen zur Ermittlung, Dokumentation, Erfassung und Bewertung unerwünschter Ereignisse im Rahmen der klinischen Prüfung von Arzneimitteln (im Auftrag der Sektion klinische Pharmakologie der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie)
 - 8.10: Verfahrensgrundsätze für medizinische Ethikkommissionen (AK medizinischer Ethik-Kommissionen in der BRD)
 - 9.1: Empfehlung für Ärzte, die in der biomedizinischen Forschung am Menschen tätig sind (Deklaration von Helsinki)
 - 9.15: Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit, Bioäquivalenz (APV-Richtlinie)
 - 9.21: Validierung und Umgebungskontrollen bei der aseptischen Herstellung (Komitee der Offiziellen Laboratorien und Dienststellen zur Kontrolle von Arzneimitteln und der Sektion Industrie-Apotheker, FIP)

- 10.20: Hinweise für die wichtigsten Vorschriften für Leiter klinischer Prüfungen und Prüfärzte (Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie e.V.)
- Feiden K: *Good Clinical Practice for Trials on Medicinal Products in the European Community*, Arzneimittelprüflinien, 2.Erg.lfg. 1992, WVG Stuttgart
- Fiedler HP: *Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzender Gebiete*, 2. Auflage, Editio Cantor Aulendorf, 1981
- File RR, Patton TF: Topically applied pilocarpine - Human pupillary response as a function of drop size, *Arch Ophthalmol* 1980, 98:112-115
- Finn-Aqua GmbH, FA: Grundlagen der Gefriertrocknung, AMSCO 00.03.01/02.92.50 GK
- Fiscella RG: Costs of glaucoma medications, *Am J Health Syst Pharm* 1998, 55(33):272-275
- Florey K: *Analytical Profiles of Drug Substances*, Academic Press Inc., Vol.12, 1983
- Florey K: *Analytical Profiles of Drug Substances*, Academic Press Inc., Vol.3, 1974
- Forrester JV, Dick AD, McMenamin P, Lee WR: *The Eye*, Basis Sciences in Practice, WB Saunders Company Ltd, London 1996
- François J, Hollwich F: *Augenheilkunde in Klinik und Praxis*, Band 1, 1.Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart 1977
- Frauch P: Anwendung der Augenpräparate, aus: Dolder R, Skinner FS: *Ophthalmika*, WVG Stuttgart 1990
- Frauch P: Die Tränenflüssigkeit, aus: Dolder R, Skinner FS: *Ophthalmika*, WVG Stuttgart, 1990
- Frauch P: Wäßrige Augenpräparate, aus: Dolder R, Skinner FS: *Ophthalmika*, WVG Stuttgart, 1990
- Fraunfelder FT, Grove JA: *Drug-induced Ocular Side Effects*, 4th Edition, Williams & Wilkins, Baltimore, 1996
- Freedman KA, Klein JW, Crosson CE: Beta-cyclodextrins enhance the bioavailability of pilocarpine, *Curr Eye Res* 1993, 12(7):641-647
- Fresta M, Panico AM, Bucolo C, Giannavola C, Puglisi G: Characterization and in-vivo ocular absorption of liposome-encapsulated acyclovir, *J Pharm Pharmacol* 1999, 51(5):565-576
- Friederich RL: The Pilocarpine Ocusert: A new drug delivery system, *Ann Ophthalmol* 1974, 6(12):1279-1284
- Furrer P, Mayer JA, Plazonnet B, Gurny R: Ocular tolerance of preservatives on the murine cornea, *Eur J Pharm Biopharm* 1999, 47:105-112
- Fyodorov SN, Moroz ZI, Kramskaya ZI, Bagrov SN, Amstislavskaya TS, Zolotarevsky AV: Complex medical treatment of endothelial epithelial corneal dystrophy with use of therapeutic collagen bandages, *Vestn Oftalmol* 1985, 101:33-36
- Gaasterland D, Kupfer C, Ross K: Studies of aqueous humor dynamics in man - IV. Effects of pilocarpine upon measurements in young normal volunteers, *Invest Ophthalmol* 1975, 14(11):848-853
- Gale R, Chandrasekaran SK, Swanson D, Wright J: Use of osmotically active therapeutic agents in monolith systems, *J Membr Sci* 1980, 7:319-331

- Garty N, Lusky M, Zalish M, Rachmiel R, Greenbaum A, Desatnik H, Neumann R, Howes JF, Melamed S: Pilocarpine in submicron emulsion formulation for treatment of ocular hypertension: a phase II clinical trial, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994, 35(4):2175 [Abstract]
- Gasset AR, Ishii Y, Kaufman HE: Cytotoxicity of ophthalmic preservatives, *Am J Ophthalmol* 1974, 78(1):98-105
- Gelatt KN, Mackay EO, Gelatt JK, Stengard-Ollies K, Aza J: Effects on intraocular pressure and pupil size in glaucomatous beagles after topical pilocarpine instilled standard (pH5) and buffer-tip (pH7) droptainers, *J Ocular Pharmacol Ther* 1997, 13(2):95-104
- Gerätebeschreibung Pupillograph CIP 900, Amtech GmbH, Weinheim, Deutschland
- Gerstenberger A, Marquardt R: Die Becherzeldichte unter Pilocarpineinfluß, *Fortschr Ophthalmol* 1986, 83(1):46-50
- Gibbs IS, Tuckerman MM: Formulation of a stable pilocarpine hydrochloride solution, *J Pharm Sci* 1974, 63(2):276-279
- Gnielinski V, Mersmann A, Thurner F: *Verdampfung, Kristallisation, Trocknung*, Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig/Wiesbaden, 1993
- Göber B, Timm U, Wendlandt S, Kraft R: Stabilität von Tropicamid, *Pharmazie* 1975, 30(9):610-611
- Goldmann H, Schmidt T: Über Applanationstonometrie, *Ophthalmol* 1957, 134:221
- Goldschmidt, AJW (Hrsg.): *Medizinische Statistik, Klinische Forschung: Von der Idee bis zum Ergebnis*, Springer-Verlag Berlin, 1996
- Goode S, Sanborn G: Modification for a smaller eyedrop, *Arch Ophthalmol* 1987, 105:458
- Grass GM, Robinson JR: Relationship of chemical structure to corneal penetration and influence of low-viscosity solution on ocular bioavailability, *J Pharm Sci* 1984, 73:1021-1027
- Greaves JL, Olejnik O, Wilson CG: Polymers and the precorneal tear film, *S.T.P. Pharma Sciences* 1992, 2(1):13-33
- Green K, Downs SJ: Ocular penetration of pilocarpine in rabbits, *Arch Ophthalmol* 1975, 93(11):1165-1168
- Green K, Tonjum A: Influence of various agents on corneal permeability, *Am J Ophthalmol* 1971, 72(5):897-905
- Green K: The role of surfactants as bactericides in topical drug delivery, *S.T.P. Pharma Sciences* 1992, 2(1):34-38
- Grierson I, Lee WR, Abraham S: Effects of pilocarpine on the morphology of the human outflow apparatus, *Br J Ophthalmol* 1978, 62:302-313
- Grunenberg A: Polymorphie und Thermoanalyse pharmazeutischer Stoffe, *Pharm Unserer Zeit* 1997, 26(5):225-231
- Grunthal S: *Dry Drops - Entwicklung und Prüfung eines Trockengel-Applikators zur Anwendung am Auge*, Dissertationsschrift, Bonn 1996
- Gunning FP, Greve EL, Bron AM, Bosc JM, Royer JG, George JL, Lesure P, Sirbat D: Two topical carbonic anhydrase inhibitors sezolamide and dorzolamide in Gelrite vehicle: a multiple-dose efficacy study, *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1993, 231(7):384-388

- Gurny R, Boye T, Ibrahim H: Ocular therapy with nanoparticulate systems for controlled drug delivery. *J Contr Rel* 1985, 2:353-361
- Gurtler F, Kaltsatos V, Boisramé B, Deleforge J, Gex-Fabry M, Balant LP, Gurny R: Ocular availability of gentamicin eye drop solution and a novel long acting bioadhesive ophthalmic drug insert, *Pharm Res* 1995, 12(11):1791-1795
- Gurtler F, Kaltsatos V, Boisramé B, Gurny R: Development of a Novel Soluble Ophthalmic Insert: Evaluation of Ocular Tolerance in Rabbits, *Eur J Pharm Biopharm* 1996, 42(6):393-398
- Haas JS, Merrill DL: The effect of methyl-cellulose on response to solutions of pilocarpine, *Am J Ophthalmol* 1962, 54(21)
- Halberg GP, Kelly SE, Morrone M: Drug delivery systems for topical ophthalmic medication, *Ann Ophthalmol* 1975, 7(9):1199-1204
- Hammer ME, Burch TG: Viscous corneal protection by sodium hyaluronate, chondroitin sulfate and methylcellulose, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984, 25(11):1329-1332
- Hansen AC: Compliance with topical pilocarpine treatment, *Am J Ophthalmol* 1986, 102(4):547
- Hardberger R, Hanna C, Boyd CM: Effects of drug vehicles on ocular contact time, *Arch Ophthalmol* 1975, 93:42-45
- Harris JE, Nordquist LT: The hydration of the cornea: I. Transport of water from the cornea, *Am J Ophthalmol* 1955, 40:100
- Haße A, Keipert S: Development and characterization of microemulsions for ocular application, *Eur J Pharm Biopharm* 1997, 43:179-183
- Havener WH: *Ocular Pharmacology*, 4. Auflage, St. Louis, Mosby, 1978
- Hecht G, Roehrs RE, Cooper ER, Hiddemen JW, Van Duzee BF: Design and evaluation of ophthalmic pharmaceutical products, aus: Banker GS, Rhodes CT: *Modern Pharmaceutics*, Chapt.14, 2nd Edition, Marcel Dekker, New York 1990
- Hehl EM, Beck R, Luthard K, Guthoff R, Drewelow B (eds.): Improved penetration of aminoglycosides and fluoroquinolones into the aqueous humour of patients by means of Acuvue contact lenses, *Eur J Clin Pharmacol* 1999, 55(4) 317-23
- Heilmann K, Sinz U: Ocusert, ein neuartiges Medikamententrägersystem für die Glaukombehandlung, *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1974, 165:519-524
- Heinzl S: Compliance und Non-Compliance, *Med Monatsschr Pharm* 1991, 14(5):129
- Herstellerzertifikat für Kapillarviskosimeter (nach DIN 55350, Teil 18)
- Hill JM, O'Callaghan RJ, Hobden JA, Kaufman HE: Corneal collagen shields for ocular delivery, aus: Mitra AK: *Ophthalmic Drug Delivery Systems*, Drugs and the Pharmaceutical Sciences, Vol. 58, Chapt.12, 1st Edition, Marcel Dekker, New York 1993
- Himmelstein KJ, Guvenir I, Patton TF: Preliminary Pharmacokinetic Model of Pilocarpine Uptake and Distribution in the Eye, *J Pharm Sci* 1978, 67(5):603-606
- Holden BA, Sweeney DF, Sanderson G: The minimum precorneal oxygen tension to avoid corneal edema, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984, 25(4):476-480
- Hollander M, Wolfe DA: *Nonparametric Statistical Methods*, John Wiley & Sons, 1973

- Hollwich F: *Augenheilkunde*, 11. Auflage, Thieme-Verlag, Stuttgart 1988
- Holly FJ: Formation and stability of the tear film, *Int Ophthalmol Clin* 1973, 13(1):73-96
- Holmberg C, Nilsson S, Singh SK, Sundelöf LO: Hydrodynamic and Thermodynamic Aspects of the SDS-EHEC-Water System, *J Phys Chem* 1992, 96:671-876
- Holmes P: Modes of entry, *Nursing Times* 1988, 84(12):34-36
- Hubbell HR, Noonan JS, Lee SB, Swaminathan A, Kaminski EA, Edelhauser HF: Scleral Permeability of Diclofenac released from an OcuFit SR[®] Drug Delivery Insert, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999, 40(4):S85 (452) [Abstract]
- Hughes PM, Mitra AK: Overview of Ocular Drug Delivery and Iatrogenic Ocular Cytopathologies, aus: Mitra AK (ed.): *Ophthalmic Drug Delivery Systems*, Drugs and the Pharmaceutical Sciences, Vol.58, Chapt.1, 1st Edition, Marcel Dekker, New York 1993
- Hui HW, Robinson JR: Ocular delivery of progesterone using a bioadhesive polymer, *Int J Pharm* 1985, 26:203-213
- Immich H: *Medizinische Statistik*, Eine Einführungsvorlesung, F.K. Schattauer Verlag GmbH, Stuttgart 1974
- Jacob M, Duru M, Duru C: Stabilité et dosage de la pilocarpine dans les collyres, *Pharm Acta Helv* 1981, 56(2):59-63
- Jahnke M: Luftkeimsammler in der mikrobiologischen Umgebungskontrolle, *Krankenhaus Pharmazie* 1999, 10:435-437
- Jani R, Gan O, Ali Y, Rodstrom R, Hancock S: Ion exchange resins for ophthalmic delivery, *J Ocul Pharmacol* 1994, 10(1):57-67
- Jankowska LM, Bar-Ilan A, Maren TH: The relations between ionic and non-ionic diffusion of sulfonamides across the rabbit cornea, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986, 27(1):29-37
- Järvinen K, Vartiainen E, Urtti A: Optimizing the systemic and ocular absorption of timolol from eye-drops, *S.T.P. Pharm Sci* 1992, 2(1):105-110
- Järvinen T, Suhonen P, Urtti A, Peura P: Bispilocarpic acid monoesters as prodrugs of pilocarpine: II. Physicochemical properties and kinetics of hydrolysis in aqueous solution, *Int J Pharm* 1992, 79:243-250
- Johnson DH, Kenyon KR, Epstein DL, VanBuskirk EM: Corneal changes during pilocarpine gel therapy, *Am J Ophthalmol* 1986, 101(1):13-15
- Jones AL, Keighley JE, Gold W, Good AM: Eye Drops-The hidden Poisson, *Scott Med J* 1996, 41(4): 110-112
- Jones BR, Anderson J, Fuglsang H: Effects of various concentrations of diethylcarbamazine citrate applied as eyedrops in onchocerciasis, and the possibilities of improved therapy from continuous non-pulsed delivery, *Br J Ophthalmol* 1978, 62:428-439
- Jones R: Do women and myopes have larger pupils? *Invest Ophthalmol* 1990, 31:1413-1415
- Kanski JJ, Spitznas M: *Lehrbuch der klinischen Ophthalmologie*, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1987
- Kass MA, Gordon M, Morley JrRE, Meltzer DW, Goldberg JJ: Compliance with topical Treatment, *Am J Ophthalmol* 1987, 103:188-193

- Kass MA, Hodapp E, Gordon M, Kolker AE, Goldberg I: Patient Administration of Eyedrops: Observation Part II, *Ann Ophthalmol* 1982, Sept., 889-894
- Kass MA, Meltzer DW, Gordon M, Cooper D, Goldberg J: Compliance with topical pilocarpine treatment, *J Ophthalmol* 1986, 101(5):515-523
- Kass MA, Meltzer DW, Gordon M: A Miniature Compliance Monitor for Eyedrop Medication, *Arch Ophthalmol* 1984, 102:1550-1554
- Kaufman HE: Neue Ansätze bei der topischen Medikamentenapplikation und der Behandlung des trockenen Auges, *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1993, 202(3):195-198
- Kaufmann PL: Aqueous humor outflow, aus: Zadunaisky JA, Davson H (eds): *Current topics in Eye Research* 1984, Vol.4, p.97, Academic Press, New York 1984
- Keipert S, Pergande G, Siebenbrodt I: Optimierte Ophthalmika, *Sci Pharm* 1991, 59(1):30
- Keipert S, Siebenbrodt I: Antiglaukomatosahaltige Ophthalmika mit prolongierter Wirkung auf Basis makromolekularer Hilfsstoffe - Teil 3: Optimierte, tropfbare Rezepturen auf Polyacrylatbasis, *Pharmazie* 1990, 45(8):594-599
- Keipert S: Etablierte und neue Konzepte zur Optimierung von Ophthalmika, *Pharm Ztg* 1994, 8:567-576
- Keller N, Moore D, Carper D, Longwell A: Increased corneal permeability induced by the dual effects of transient tear film acidification and exposure to benzalkonium chloride, *Exp Eye Res* 1980, 30:203-210
- Kelly JA, Molyneux PD, Smith SA, Smith SE: Relative bioavailability of pilocarpine from a novel ophthalmic delivery system and conventional eyedrop formulations, *Brit J Ophthalmol* 1989, 73:360-362
- Khoury AS, Fechtner RD, Zimmerman TJ, Willman MR: Latanoprost: A New Approach to the Treatment of Glaucoma, *Today's Therapeutic Trends* 14(4): 225-240
- Kim AI, Akers MJ, Nail SL: The Physical State of Mannitol after Freeze-Drying- Effects of Mannitol Concentration, Freezing Rate and a Noncrystallizing Cosolute, *J Pharm Sci* 1998, 87(8):931- 935
- King-Smith PE, Fink BA, Fogt N, Nichols KK, Hill RM: Further evidence that the thickness of the human tear film is about 3 μm , *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000, 41(4):S65 [Abstract]
- Kishida K, Otori T: A quantitative study on the relationship between transcorneal permeability of drugs and their hydrophobicity, *Jpn J Ophthalmol* 1980, 24:251-259
- Klein HZ, Lugo M, Shields MB, Leon J, Duzman E: A dose-response study of piloplex for duration of action, *Am J Ophthalmol* 1985, 99(1):23-26
- Klinke B: *Optimierung der Redispersierbarkeit von Dexamethason-Suspensions-Augentropfen*, Dissertationsschrift, Bonn 2000
- Klinke R, Silbernagel S: *Lehrbuch der Physiologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1994
- Kneer I, Höh H, Ruprecht KW: Neuerungen auf dem Gebiet der Konjunktiva 1991, *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1993, 203(6):380-383
- Kooner KS, Zimmerman TJ: The cost of antiglaucoma medication, *Ann Ophthalmol* 1987, 19:327-328
- Kovács P, Dévay A, Rácz I: Influence of auxiliary substances on the hydrolysis of pilocarpine hydrochloride, *Acta Pharm Technol* 1987, 33(2):91-96

- Koval R, Korczyn AD: Pilocarpine mydriasis in mice, *J Ocular Pharmacol* 1985, 1(2):169-176
- Krämer J, Siewert M, Voith G, Blume H: Verträglichkeit von Augentropfen-ein In-vitro-Vergleich, *Pharm Ztg* 1992, 30:2270-2274
- Krause K, Küchle HJ, Baumgart M: Vergleichende Untersuchungen über Pilocarpin-Gel und Pilocarpin-Augentropfen, *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1985, 187(3):178-183
- Kreiner CF: Physiologie des Tränenfilms, *Z prakt Augenheilkd* 1981, 2:161-173
- Kreuter J: Particulates (nanoparticles and microparticles), aus: Mitra AK: *Ophthalmic Drug Delivery Systems*, Drugs and the Pharmaceutical Sciences, Vol. 58, Chapt.13, 1st Edition, Marcel Dekker, New York 1993
- Kriegelstein GK, Schrems W: Zur medikamentösen Therapie des Chronischen Glaukoms mit Pilocarpin-Gel, *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1984, 185(6):509-514
- Krishnamoorthy R, Mitra AK: Mucoadhesive polymers in ocular drug delivery, aus: Mitra AK (ed.): *Ophthalmic Drug Delivery Systems*, Drugs and the Pharmaceutical Sciences, Vol. 58, Chapt.10, 1st Edition, Marcel Dekker, New York 1993
- Krohn DL: Flux of topical pilocarpine to the human aqueous, *Tr Am Ophth Soc* 1978, 76:502-527
- Kronfeld PC: Eserine and pilocarpine: our 100-year-old allies, *Surv Ophthalmol* 1970, 14:479-485
- Kruss B: Prozeß-Parameter und ihre Auswirkungen auf ihre Produktqualität, aus: Essig D, Oschmann R: *Lyophilisation*, Kap.5, WVG Stuttgart, 1993
- Kumar S, Himmelstein KJ: Modification of in situ gelling behavior of carbopol solutions by hydroxypropyl methylcellulose, *J Pharm Sci* 1995, 84(3):344-348
- Küttel D: Die Untersuchung der durch Solubilisierung hergestellten gesättigten und übersättigten Systeme, *Pharm Zentralhalle* 1967, 106(1):15-18
- Küttel D: Einige physikalische Konstanten wäßriger Tween-80-Lösungen, *Pharm Zentralhalle* 1967, 106(1):12-14
- Kwon K: *Schüttelintensität und Gleichförmigkeit der Dosierung von Suspensions-Augentropfen*, Dissertationsschrift, Bonn 1996
- Løfors KT, Høvdning G, Viksmoen L, Aasved H, Bergaust B, Bulie T: Twelve-hour IOP control obtained by a single dose of timolol/pilocarpine combination eye drops, *Acta Ophthalmol Scand* 1990, 68(3):323-326
- Lal A, Kataria V, Rajpal A, Khanna N: Pharmacodynamic effects of pilocarpine eye drop enhanced by decreasing ist volume of instillation, *Indian J Physiol Pharmacol* 1995; 39(3):267-270
- Lamberts DW: Solid Delivery Devices, *Int Ophthalmol Clin* 1980, 20(3):63-77
- LaMotte J, Grossman E, Hersch J: The efficacy of cellulosic ophthalmic inserts for treatment of dry eye, *J Am Optom Assoc* 1985, 56(4):298-302
- Larsen SS: Studies on stability of drugs in frozen systems - Stabilization of buffered pilocarpine eye-drops by freezing, *Dansk Tidsskr Farm* 1971, 45:317-319
- Lawrenson JG, Edgar DF, Gudgeon AC, Burns JM, Geraint M, Barnard NA: A comparison of the efficacy and duration of action of topically applied proxymetacaine using a novel

- ophthalmic delivery system versus eye drops in healthy young volunteers, *Brit J Ophthalmol* 1993, 77(11):713-715
- Lederer JrCM, Harold RE: Drop size of Commercial Glaucoma Medications, *Am J Ophthalmol* 1986, 101:691-694
- Lee CP, de Vruh RLA, Smithe PL: Selection of development candidates based on in vitro permeability measurements, *Adv Drug Deliv Rev* 1997, 23:47-62
- Lee H: Prolonged antibakteriell activity of a fluorescein-anaesthetic solution, *Arch Ophthalmol* 1972, 88:385-387
- Lee M, Hammarlund ER: Corneal Absorption of ophthalmic drugs, *J Pharm Sci* 1974, 63(5):721-724
- Lee VHL, Robinson JR: Mechanistic and quantitative evaluation of precorneal pilocarpine disposition in albino rabbits, *J Pharm Sci* 1979, 68(6):673-684
- Lee VHL, Robinson JR: Review: Topical Ocular Drug Delivery: Recent Developments and Future Challenges, *J Ocular Pharmacol* 1986, 2(1):67-108
- Lee VHL, Urrea PT, Smith RE, Schanzlin DJ: Ocular drug bioavailability for topically applied liposomes. *Surv Ophthalmol* 1985, 29(5):335-348
- Lee VHL: Minimizing the systemic absorption of topically applied ophthalmic drugs in rabbits, *S.T.P. Pharm Sci* 1992, 2(1):5-12
- Lee VHL: Review: New Directions in the Optimizing of Ocular Drug Delivery, *J Ocular Pharmacol* 1990, 6(2):157-164
- Lee YC, Millard J, Negvesky GJ, Butrus SI, Yalkowsky SH: Formulation and in-vivo evaluation of ocular insert containing phenylephrine and tropicamide 1999, *Int J Pharm* 1999, 182(1):121-126
- Lee YC, Simamora P, Yalkowsky SH: Systemic delivery of insulin via an enhancer-free ocular device, *J Pharm Sci* 1997, 86(12):1361-1364
- Lee YC, Yalkowsky SH: Ocular devices for the controlled systemic delivery of insulin: in vitro and in vivo dissolution, *Int J Pharm* 1999, 181(1):71-77
- Lemp MA, Holly FJ, Iwata S, Dohlman CH: The precorneal tear film, *Arch Ophthalmol* 1970, 83:89-94
- Lemp MA, Szymanski ES: Polymer adsorption at the ocular surface, *Arch Ophthalmol* 1975, 93(2):134-136
- Lerner LE, Polansky JR, Howes EL, Stern R: Hyaluronan in the Human Trabecular Meshwork, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997, 38(6):1222-1228
- Lesar T: Proper use of ophthalmic products: Method of administration affects the outcome, toxicity, and cost of ocular drug therapy, *J Am Pharm Assoc* 1996, NS36(12):704-706
- Letocha CE: Methods for Self-Administration of Eyedrops, *Ann Ophthalmol* 1985, 17(12):768-769
- Leydhecker W, Grehn F: *Augenheilkunde*, 25. Auflage, Springer-Verlag Berlin, 1993
- Leydhecker W, Krieglstein GK: *Untersuchungsmethoden des Auges*, Gustav-Fischer Verlag, Stuttgart 1981
- Leydhecker W: *Alles über grünen Star*, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1984

- Lin CP, Boehnke M: Influences of methylcellulose on corneal epithelial wound healing, *J Ocular Pharmacol Ther* 1999, 15(1):59-63
- Linn ML, Jones LT, Rate of lacrimal excretion of ophthalmic vehicles, *Am J Ophthalmol* 1968, 65(1):76-78
- Lippold: *Biopharmazie*, Arzneiformen zur Anwendung am Auge, 2.Auflage, WVG Stuttgart, 1981
- List PH, Hörhammer L, Roth HJ, Schmid W: *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis*, 7. Band, Arzneiformen und Hilfsstoffe, Teil B: Hilfsstoffe, 4. Ausgabe, Springer-Verlag Berlin, 1977
- Liu JHK, Kripke DF, Hoffman RE, Twa MD, Rex KM, Gupta N, Weinreb RN: Nocturnal Elevation of Intraocular Pressure in Young Adults, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998, 39(13):2707-2712
- Lockhart PB, Fox PC, Gentry AC, Acharya R, Norton HJ: Pilot-study of controlled release pilocarpine in normal subjects, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996, 82(5):517-524
- Loewenfeld IE: Pupillary changes related to age, aus: Thompson HS, Daroff R, Frisén L, Glaser JS, Sanders MD (ed.): *Topics in Neurophthalmology*, S.124-150, Williams and Wilkins, Baltimore 1979
- Longwell A, Birss S, Keller N, Moore D: Effect of Topically applied pilocarpine on tear film pH, *J Pharm Sci* 1976, 65(11):1654-1657
- Lowenstein O, Loewenfeld IE: Effect of physostigmine and pilocarpine on iris sphincter of normal man, *Arch Ophthalmol* 1953, 50:311-318
- Lowenstein O: The Argyll Robertsonpupillary syndrome, *Am J Ophthalmol* 1956, 42:105-121
- Lüdtke E, Darsow H, Pohloudek-Fabini R: Untersuchungen zur Stabilität von Thiomersal in Augentropfen, *Pharmazie* 1977, 32(2):99-100
- Ludwig A, Van Ooteghem M: The Influence of the Dropsizes on the Elimination of an Ophthalmic Solution from the Precorneal Area of Human Eyes, *Pharm Acta Helv* 1987, 62(2):56-60
- Ludwig A, Van Ooteghem M: Influence of viscolysers on the residence of ophthalmic solutions evaluated by slit lamp fluorophotometry, *S.T.P. Pharma Sciences* 1992, 2(1):81-87
- MacKee DL: Letter to the Editor: On an in vitro method of simulating drug release from viskous eye drops, *J Pharm Pharmacol* 1979, 31:872
- Macri FJ, Cevario SJ: The dual nature of pilocarpine to stimulate or inhibit the formation of aqueous humor, *Invest Ophthalmol* 1974, 13:617-619
- Maddox YT, Bernstein HN: An evaluation of the Bionite hydrophilic contact lens for use in a drug delivery system, *Ann Ophthalmol* 1972, 4(9):789-790
- Mädefessel-Herrmann K: Flüssigdosierung im Labor, *Nachr Chem Tech Lab* 1995, 43:67-80 [Suppl.]
- Maichuk YF: Ophthalmik drug inserts, *Invest Ophthalmol* 1975, 14(2):87-90
- Mair AE, Miller JHMcB: Effect of sterilization by autoclaving on the stability of eye drops of pilocarpinehydrochloride and physostigminesulphate, *J Clin Hosp Pharm* 1984, 9:217-224

- Makoid MC, Robinson JR: Pharmacokinetics of topically applied pilocarpine in the albino rabbit eye, *J Pharm Sci* 1979, 68(4):435-443
- March WF, Stewart RM, Mandell AI, Bruce LA: Duration of effect of pilocarpine gel, *Arch Ophthalmol* 1982, 100:1270-1271
- Maren TH, Jankowska L, Sanyal G, Edelhauser HF: The transcorneal permeability of sulphonamide carbonic anhydrase inhibitors and their effect on aqueous humor secretion, *Exp Eye Res* 1983, 36:457-480
- Martin EW: *Dispensing of Medication*, 7.Ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania 1971
- Martini LG, Embleton JK, Malcolmson RJ, Wilson CG: The use of small volume ocular sprays to improve the bioavailability of topically applied ophthalmic drugs, *Eur J Pharm Biopharm* 1997, 44:121-126
- Martola EL, Baum JL: Central and peripheral corneal thickness: A clinical study, *Arch Ophthalmol* 1968, 79(1):28-30
- Mastman GL, Blades EJ, Henderson JW: The total osmotic pressure of tears in normal and various pathological conditions, *Arch Ophthalmol* 1961, 65:509
- Matthäus W: Über thermoelektrische Messungen am menschlichen Auge, *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1961, 138:227-235
- Mattila MJ, Idänpään-Hikkilä JE, Takki S, *Farm Aikakuslehti* 1968, 10:205
- Maurice DM, Mishima S: Ocular pharmacokinetics, aus: Sears ML (ed.): *Pharmacology of the eye*, Chapt.2, Springer-Verlag, Berlin 1984
- Maurice DM: The movements of fluorescein and water in the cornea, *Am J Ophthalmol* 1960, 49:1011-1016
- Maurice DM: The tonicity of an eye drop and its dilution by tears, *Exp Eye Res* 1971, 11:30-33
- Maurice DM: The use of fluorescein in ophthalmological research, *Invest Ophthalmol* 1967, 6(5):464-477
- Mehta AC, Hart-Davies S, Bedford C: Stability of pilocarpine oral solution, *Hosp Pharm Pract* 1992, 2(11):726-728
- Melamed S, Kurtz S, Greenbaum A, Vered M, Garty, N: Effect of pilocarpine in sub-micron emulsion on intraocular pressure in healthy volunteers, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993, 34(4):926 [Abstract]
- Melis-Decerf C, Van Ooteghem M: An in vitro method simulating drug release from viscous eye drops in rabbit and man, *J Pharm Pharmacol* 1979, 31:12-15
- Merrill DL, Goldberg B, Zavell S: Bis-tropamide, a new parasympatholytic, *Curr Ther Res* 1960, 12:43-50
- Metrohm, Produktinformation
- Meyer HJ: Gefahren durch Ocusertbehandlung, *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1977, 171:584-586
- Mietz H, Niessen U, Krieglstein GK: The effect of preservatives and antiglaucomatous medication on the histopathology of the conjunctiva, *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1994, 232:561-565

- Miller D: Pressure of the lid on the eye, *Arch Ophthalmol* 1967, 78(3):328-330
- Miller SC, Donovan MD: Effect of poloxamer 407 gel on the miotic activity of pilocarpine nitrate in rabbits, *Int J Pharm* 1982, 12:147-152
- Mishima S, Maurice DM: In vivo determination of the endothelial permeability to fluorescein, *Acta soc Ophthalmol Jpn* 1971, 75:236-243
- Mishima S: Clinical pharmacokinetics of the eye, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981, 21(4):504-541
- Mitra AK, Mikkelsen TJ: Mechanism of transcorneal permeation of pilocarpine, *J Pharm Sci* 1988, 77(9):771-775
- Mitra AK: *Ophthalmic Drug Delivery Systems*, Drugs and the Pharmaceutical Sciences, Vol. 58, 1st Edition, Marcel Dekker, New York 1993
- Miyazaki S, Ishii K, Takada M: Use of fibrin film as a carrier for drug delivery: a long-acting delivery system for pilocarpine into the eye, *Chem Pharm Bull* 1982, 30(9):3405-3407
- Miyazaki T, Miyauchi S, Nakamura T, Takeshita S, Horie K: The effect of sodium hyaluronate on the growth of rabbit corneal epithelial cells in vitro, *J Ocular Pharmacol Ther* 1996, 12(4):409-415
- Molemans M, Maudgal PC, Missotten L: Hydroxypropylmethylcellulose in the treatment of the dry eye, *Bull Soc Belge Ophthal* 1982, 201:93-97
- Moses RA: Intraocular pressure, aus: Moses RA (ed.): *Adler's Physiology of the eye Clinical Application* 1981, Chapt.8, 7th Edition, Mosby, St.Louis 1981
- Mueller WH, Deardorff DL: Ophthalmic Vehicles: The Effect of Methylcellulose on the Penetration of Homatropine Hydrobromide Through the Cornea, *J Am Pharm Assoc* 1956, 45(5):334-341
- Müller RH, Hildebrand GE; (Keipert, S.); *Ophthalmika: etablierte Arzneiformen und neue Konzepte*, Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen, WVG Stuttgart 1997
- Müller-Lierheim WGK: Konservierung und Verträglichkeit von Augentropfen, *Pharm Ztg* 1994, 10:40-45
- Murgatroyd K: The Freeze-Drying Prozess, aus: Cameron P: *Good Pharmaceutical Freeze-Drying Practice*, Interpharm Press, USA, 1997
- Nadkarni SR, Yalkowsky SH: Controlled delivery of pilocarpine - 1. In vitro Characterization of Gelfoam[®] Matrices, *Pharm Res* 1993, 10(1):109-112
- Nagel H: Pipettenkalibration - ja, aber wie? *Labor Praxis* 1999, 1:36-37
- Naumann H: Biopharmazie der Augenarzneien, *Pharmazie* 1980, 35(12):814-817
- Negvesky GJ, Butrus SI, Ali Farah HA, Lee YC, Yalkowsky SH: Gelfoam disc ocular inserts for pupillary dilation in human eyes, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999, 40(4):S85 (453, B413) [Abstract]
- Neinhuis C: *Raster-elektronisch mikroskopische und chemische Untersuchung zur Bildung und Funktion epicularer Wachse sowie Grundlagen zur Biomechanik pflanzlicher Cuticeen*, Habilitationsschrift, Bonn Juni 1999
- Nelson MD, Bartlett JD, Corliss D, Karkkainen T, Voce M: Ocular tolerability of timolol in Gelrite in young glaucoma patients, *J Americ Optom Assoc* 1996, 67(11):659-663

- Nelson WL, Fraunfelder FT, Sills JM, Arrowsmith JB, Kuritsky JN: Adverse respiratory and cardiovascular events attributed to timolol administration, *Am J Ophthalmol* 1986, 102(5):606-611
- N.N: Augentropfenpräparate, *Pharm Ztg* 1992, PZ Service, 30:103-112
- N.N: Erblindungsursache Glaukom, *Dtsch Apoth Ztg* 1996, 136.Jhrg., Nr.25
- N.N: Stabilität versus Verträglichkeit, *Pharm. Ztg* 1999, 144.Jhrg., 38:51-52 (3041-3042)
- N.N: Welcher Dispenser ist der richtige? *LaborPraxis* 1998, 4:26-31
- Noack E: Neuartige Tropfflasche optimiert die topische Pilocarpinanwendung in Kombination mit Timolol bei Glaukom, *Apothekenmagazin* 1992, Sonderdruck, Juli/August
- Norn MS: Role of the vehicle in lokal treatment of the eye, *Acta Ophthalmol* 1964, 42:727-734
- Norton Pampus GmbH, Willich, Produktinformation, Die PTFE-Folien, Stand 12/97
- Nunes MA, Brochmann-Hanssen E: Hydrolysis and Epimerization kinetics of pilocarpine in aqueous solution, *J Pharm Sci* 1974, 63(5):716-721
- O'Brian CS, Swan KC: Carbaminocholine chloride in the treatment of glaucoma simplex, *AMA Arch Ophthalmol* 1942, 27:255-269
- Oechsner M, Keipert S: Polyacrylic acid/polyvinylpyrrolidone bipolymeric systems. I. Rheological and mucoadhesive properties of formulations potentially useful for the treatment of dry-eye-syndrome, *Eur J Pharm Biopharm* 1999, 47:113-118
- Oechsner M, Keipert S: Tränenersatzpräparate - Indikation, Zusammensetzung und Eigenschaften, *Pharm Ztg* 1997, Prisma, 2:76-83
- Olejník O, Weisbecker CA: Ocular Bioavailability of topical prednisolone, *Clin Ther* 1990, 12(1):2-11
- Olsen TW, Edelhauser HF, Lim JI, Geroski DH: Human Sceral Permeability, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995, 36(9):1893-1903
- Pabel HJ: *Arzneimittelgesetz*, 7.Auflage, 11.12.1998, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, 1999
- Park K, Robinson JR: Bioadhesive polymers as platforms for oral-controlled drug-delivery: method to study bioadhesion, *Int J Pharm* 1984, 19:107-127
- Park K, Shalaby WSW, Park H: *Biodegradable Hydrogels for Drug Delivery*, 1st Edition, Technomic Publishing Co., 1993
- Partilla T, Skinner FS, Dolder R: Technologie der Behältnisse, aus: Dolder R, Skinner FS: *Ophthalmika*, Kap.3.17, WVG Stuttgart 1990
- Patton TF, Francoeur M: Ocular bioavailability and systematic loss of topically applied ophthalmic drugs, *Am J Ophthalmol* 1978, 85(2):225-229
- Patton TF, Robinson JR: Ocular evaluation of polyvinyl alcohol vehicle in rabbits. *J Pharm Sci* 1975, 64(8):1312-1316
- Pavesio A, Renier D, Cassinelli C, Morra M: Anti-Adhesive Surfaces Through Hyaluronan Coatings, *Med Device Technol* 1997, Sept., 8:20-27
- Pergande G, Keipert S: Antiglaukomatosahaltige Ophthalmika mit prolongierter Wirkung auf Basis makromolekularer Hilfsstoffe - Teil 1: In vitro-Untersuchungen, *Pharmazie* 1990, 45(8):582-586

- Pergande G, Keipert S: Antiglaukomatosahaltige Ophthalmika mit prolongierter Wirkung auf Basis makromolekularer Hilfsstoffe - Teil 2: In vivo-Untersuchungen, *Pharmazie* 1990, 45(8):587-591
- Petersen H: *Grundlagen der Statistik und der statistischen Versuchsplanung*, Ecomed Verlagsgesellschaft mbH, 1991
- Pharmacia & Upjohn: Xalatan - latanoprost ophthalmic solution,
- Pharmacia & Upjohn: Xalatan - latanoprost solution 0,005%,
- Pharmazeutische Stoffliste, 10. Auflage, ABDATA Pharma-Daten-Service, Eschborn Taunus
- Pikal MJ, Lang JE, Shah S: Desolvation kinetics of cefamandole sodium methanolate: the effect of water vapor, *Int J Pharm* 1983, 17:237-262
- Pikal MJ, Roy ML, Shah S: Mass and Heat Transfer in Vial Freeze-Drying of Pharmaceuticals: Role of the Vial, *J Pharm Sci* 1984, 73(9):1224-1237
- Pikal MJ, Shah S, Roy ML, Putman R: The secondary drying stage of freeze drying: drying kinetics as a function of temperature and chamber pressure, *Int J Pharm* 1990, 60:203-217
- Pikal MJ, Shah S, Senior D, Lang JE: Physical Chemistry of Freeze-drying: Measurement of Sublimation Rates for Frozen Aqueous Solutions by a Microbalance Technique, *J Pharm Sci* 1983, 72(6):635-650
- Pikal MJ: Mass and Heat Transfer in Low Pressure Gases: Applications to Freeze-Drying, aus: Amidon GL, Lee PJ, Topp EM: *Transport Processes in Pharmaceutical Systems*, Chpt.16, Marcel Dekker, New York 1999
- Pillion DJ, Wang P, Yorks J, McCann P, Meezan E: Systemic absorption of insulin and glucagon applied topically to the eyes of rats and a diabetic dog, *J Ocular Pharmacol Ther* 1995, 11(3):283-295
- Pilocarpine, Pilocarpine Ocular System, Pilocarpine Hydrochloride, Pilocarpine Hydrochloride Ophthalmic Solution, Pilocarpine Nitrate, Pilocarpine Nitrate Ophthalmic Solution, USP 23, NF 18, (1995), 1226-1229
- Pilocarpinhydrochlorid, DAB 10, Grundlfg. 1991
- Pilocarpinhydrochlorid, Kommentar zum DAB 10, Grundlfg. 1991, 1.Lfg. 1993
- Pilocarpinhydrochlorid-Augentropfen 1% oder 2%, DAC 1986, 1.Ergänzung 89, NRF, 6.Ergänzung 89
- Pilocarpinnitrat, Kommentar zum DAB 10, Grundlfg. 1991, 4.Lfg. 1994
- Podos SM, Becker B, Asseff C, Hartstein J: Pilocarpine therapy with soft contact lenses, *Am J Ophthalmol* 1972, 73(3):336-341
- Pohloudek-Fabini R, Martin E, Gallasch V: Beitrag zur Stabilität von Tropicamidlösungen, *Pharmazie* 1982, 37(3):184-187
- Pollack IP, Quigley HA, Harbin TS: The ocusert pilocarpine system: advantages and disadvantages, *South Med J* 1976, 69(10):1296-1298
- Pollack SL, Hunt JS, Polse KA: Dose-reponse effects of tropicamide HCl, *Am J Optom Physiol Opt* 1981, 58:361-366
- Porst H, Kny L: Zur Stabilität von Pilocarpinhydrochlorid in Augentropfen, *Pharmazie* 1985, 40(1):23-29

- Prausnitz MR, Noonan JS: Permeability of Cornea, Sclera, and Conjunctiva: A Literature Analysis for Drug Delivery to the Eye, *J Pharm Sci* 1998, 87(12):1479-1488
- Prydal JI, Artal P, Woon H, Campbell FW: Study of human precorneal tear film thickness and structure using laser interferometria, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992, 33:2006-2011
- Pschyrembel W: Klinisches Wörterbuch, 256. Auflage, De Gruyter-Verlag, Berlin 1990
- Putcha L, Berens KL, Marshburn TH, Ortega HJ, Billica RD: Pharmaceutical use by astronauts on space shuttle missions, *Aviat Space Environ Med* 1999, 70(7):705-708
- Quickert MH: A fluorescein anaesthetic solution for applanation tonometry, *Arch ophthalmol* 1967, 77:734-739
- Quigley HA, Pollack IP: Intraocular pressure control with twice-daily pilocarpine in two vehicle solutions, *Ann Ophthalmol* 1977, 9(4):427-430
- Ramer RM, Gasset AR: Ocular Penetration of Pilocarpine: The Effect on Concentration on the Ocular Penetration of Pilocarpine, *Ann Ophthalmol* 1974, 6(11):1160-1162
- Ramer RM, Gasset AR: Ocular penetration of pilocarpine: the effect of pH on the ocular penetration of pilocarpine, *Ann Ophthalmol* 1975, 7(2):293-296
- Ramer RM, Gasset AR: Ocular penetration of pilocarpine: the effect on concentration on the ocular penetration of pilocarpine, *Ann Ophthalmol* 1974, 6(11):1160-1162
- Ramm B, Hofmann G: *Biomathematik und medizinische Statistik*, 3. Auflage, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1987
- Rangwala AT, Kalevar V: Clinical evaluation of methylcellulose as a tear substitute, *Ind J Ophthalmol* 1981, 28:183-187
- Rasmussen D, Luyet B: Contribution to the establishment of the temperature concentration curves of homogenous nucleation in solutions of some cryoprotective agents, *Biodynamica* 1970, 11(225):33-44
- Ravalico G, Baccara F, Bellavitis A: Refractive bifocal intraocular lens and pupillary diameter, *J Cataract Refract Surg* 1992, 18:594-597
- Records RE: *Eyebrows and eyelids*, aus: Tasman W, Jaeger EA (eds.): *Foundations of Clinical Ophthalmology*, Vol.2, Chapt.1, Lippincott, Philadelphia, 1989
- Reich B: Schnellauflösende Schmelztabletten durch Gefriertrocknung, *Krankenhauspharmazie* 1999, 7:297-300
- Reim M: *Augenheilkunde*, 4. Auflage, Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, 1993
- Reitz M: Variationen der Augen bei Säugetieren, *Pharm Ind* 1998, 60(5):98-99
- Rettkowski U, Keipert S: Influence of various Cyclodextrins on the Hydrolysis of Dipivefrine in corneal Epithelium, *Proc. 3rd World Meeting APV/APGI*, 3/6 April Berlin 2000, 813-814
- Richards RME, Suwanprakorn P, Neawbanij S, Surasdikul N: Preservation of fluorescein solutions against contamination with *Pseudomonas aeruginosa*, *J Pharm Pharmacol* 1969, 21(10):681-686
- Richardson MC, Bentley PH: A New Ophthalmic Delivery System, aus: Mitra AK (ed): *Ophthalmic Drug Delivery Systems*, Chpt.17, Marcel Dekker, New York 1993
- Riegelmann S: Pharmacokinetic factors affecting epidermal penetration and percutaneous absorption, *Clin Pharmacol Ther* 1974, 16(5):873-883

- Ripple PH: Pilocarpine isn't all that bad, *Trans Pa Acad Ophthalmol Otolaryngol* 1988, 40:719
- Robinson JR: Ocular Anatomy and Physiology relevant to Ocular Drug Delivery, aus Mitra AK (ed): *Ophthalmic Drug Delivery Systems*, Chapt.2, Marcel Dekker, New York 1993
- Robinson JR: *Ophthalmic Drug Delivery Systems*, American Pharmaceutical Association 1980, 28ff
- Rohlf FJ, Sokal RR: *Statistical Tables*, 3rd Edition, W.H. Freeman and Company, New York 1995
- Romaguera A: Einfache Kalibrierung von Mikroliterpipetten, *LaborPraxis* 1997, 12:69-72
- Rootman DS, Willoughby RP, Bindlish R: Continuous flow contact lens delivery of gentamicin to rabbit cornea and aqueous humor, *J Ocul Pharmacol* 1992, 8(4):317-323
- Roßmann H, Wesemann W: Veränderung der Konzentration von Pilocarpin-Augentropfen bei normaler Aufbewahrung, *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1986, 188(6):620-621
- Rote Liste 1997 und 2000, Rote Liste Service GmbH (Hrsg.), Frankfurt/Main, ECV (Editio Cantor Verlag GmbH) Aulendorf
- Rozier A, Mazuel C, Grove J, Plazonnet B: Gelrite: a novel, ion-activated, in-situ gelling polymer for ophthalmic vehicles. Effect on bioavailability of Timolol, *Int J Pharm* 1989, 57:163-168
- Rubinstein M: Delivering the Drug on Time, *Eur Pharm Rev* 1997, März:19-31
- Rupprecht H: Physikalisch-chemische Grundlagen der Gefriertrocknung, aus: Essig D, Oschmann R: *Lyophilisation*, S.13-38, WVG Stuttgart, 1993
- Saettone MF, Chetoni P, Torracca MT, Burgalassi S, Giannaccini B: Evaluation of muco-adhesive properties and in vivo activity of ophthalmic vehicles based on hyaluronic acid, *Int J Pharm* 1989, 51:203-212
- Saettone MF, Giannaccini B, Chetoni P, Galli G, Chiellini E: Vehicle effects in ophthalmic bioavailability: an evaluation of polymeric inserts containing pilocarpine, *J Pharm Pharmacol* 1984, 36:229-234
- Saettone MF, Giannaccini B, Delmonte G, Campigli V, Tota G, La Marca F. *Int J Pharm* 1988, 43:1-2, 67-76
- Saettone MF, Giannaccini B, Guiducci A, Savigny P: Semisolid ophthalmic vehicles. III. An evaluation of four organic hydrogels containing pilocarpine, *Int J Pharm* 1986, 31:261-270
- Saettone MF, Giannaccini B, Ravecca S, La Marca F, Tota G: Polymer effects on ocular bioavailability - the influence of different liquid vehicles on the mydriatic response of tropicamide in humans and in rabbits. *Int J Pharm* 1984, 20:187-202
- Saettone MF, Giannaccini B, Savigny P, Wirth A: The effect of different ophthalmic vehicles on the activity of tropicamide in man, *J Pharm Pharmacol* 1980, 32(7):519-521
- Saettone MF, Giannaccini B, Teneggi A, Savigny P, Tellini N: Vehicle effects on ophthalmic bioavailability: the influence of different polymers on the activity of pilocarpine in rabbit and man, *J Pharm Pharmacol* 1982, 34(7):464-466
- Saettone MF, Monti D, Torracca MT, Chetoni P: Mucoadhesive ophthalmic vehicles: evaluation of polymeric low-viscosity formulations, *J Ocul Pharmacol* 1994, 10(1):82-92

- Saettone MS, Bucci G, Speiser P: *Ophthalmic Drug Delivery, Biopharmaceutical, Technological and Clinical Aspects*, Fidia Research Series, Vol. 11, Springer Verlag 1987
- Samples JR: Pilocarpine gel, *Ophthalmol Clin North Am* 1989, 2:109-111
- Sasaki H, Igarashi Y, Nagano T, Nishida K, Nakamura J: Different effects of absorption promoters on corneal and conjunctival penetration of ophthalmic beta-blockers, *Pharm Res* 1995, 12(8):1146-1150
- Schalnus RW: *Die Fluorophotometrie des vorderen Augensegmentes*, Dissertationsschrift, Bonn 1988
- Scheer R: Mikrobiologische Qualität rezepturmäßig hergestellter Augentropfen, *Dtsch Apoth Ztg* 1987, 127.Jrg., 3:65-66
- Schober H: Sehschärfeprüfung und Refraktionsbestimmung, aus: François J, Hollwich F (Hrsg.): *Augenheilkunde in Klinik und Praxis*, Kap.4, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1977
- Schoenwald RD, Stewart P: Effect of particle size on ophthalmic bioavailability of dexamethasone suspensions in rabbits, *J Pharm Sci* 1980, 69(4):391-394
- Schwendinger J, Schaaf D: Haltbarkeits- und Herstellungsdaten deutscher Arzneimittel, 20. Auflage, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, 2000
- Sears ML: *Handbook of Experimental Pharmacology: Pharmacology of the Eye*, Vol.69, Springer-Verlag, Berlin 1984
- Sears ML: The Aqueous, aus: Moses RA (ed): *Adler's Physiology of the eye: Clinical Application*, Chapt.7, 7th Edition, Mosby, St.Louis 1981
- Sharir M: The History of Ocular Pharmacology, aus: Zimmerman TJ (ed.): *Textbook of Ocular Pharmacology*, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1997
- Shell JW: New systems for the ocular Delivery of drugs, aus: Johnson P, Lloyd-Jones JG (ed.): *Drug delivery systems: fundamentals and techniques*, Chapt.14, Ellis Horwood Ltd. GB-Chichester and VCH Verlagsgesellschaft mbH, D-Weinheim, 1987
- Shell JW: Pharmacokinetics of topically applied ophthalmic drugs, *Surv Ophthalmol* 1982, 26:207-219
- Siebenbrodt I, Keipert S: Poloxamer-Systeme als potentielle Ophthalmika, Teil 1: Viskose Polymerlösungen, *Pharm Ztg* 1992, 3-5:135-141
- Sieg JW, Robinson JR: Vehicle effects on ocular drug bioavailability I: Evaluation of fluorometholone. *J Pharm Sci* 1975, 64(6):931-936
- Sieg JW, Robinson JR: Vehicle effects on ocular drug bioavailability II: Evaluation of pilocarpine. *J Pharm Sci* 1977, 66(9):1222-1228
- Sieg JW, Robinson JR: Vehicle effects on ocular drug bioavailability III: Shear facilitated pilocarpine release from ointments, *J Pharm Sci* 1979, 68(6):724-728
- Sieg JW, Triplett JW: Precorneal Retention of topically instilled micronized particles -To the editor- *J Pharm Sci* 1980, 69(7):363-364
- Siepmann J, Kranz H, Bodmeier R, Peppas NA: HPMC-Matrices for Controlled Drug Delivery: A New Combining Diffusion, Swelling, and Dissolution Mechanisms and Predicting the Release Kinetics, *J Pharm Res* 1999, 16(11):1748-1756
- Sintzel MB, Bernatchez SF, Tabatabay C, Gurny R: Biomaterials in Ophthalmic Drug Delivery, *Eur J Pharm Biopharm* 1996, 42(6) 358-374

- Smolin G, Okumoto M, Feiler S, Condon D: Idoxuridine-liposome therapy for herpes simplex keratitis, *Am J Ophthalmol* 1981, 91:220-225
- Snibson GR, Greaves JL, Soper NDW, Tiffany JM, Wilson CG, Bron AJ: Ocular Surface Residence Times of Artificial Tear Solutions, *Cornea* 1992, 11(4):288-293
- Snyder C, Paugh JR: Rose bengal dye concentration and volume delivered via dye-impregnated paper strips, *Optom Vis Sci* 1998, 75(5):339-341
- Sokal RR, Rohlf FJ: *Biometry*, W.H Freeman and Company, 3rd Edition, New York, USA, 1995
- Sokal RR, Rohlf FJ: *Biostatistics*, W.H Freeman and Company, 2nd Edition, New York, USA, 1987
- Sokal RR, Rohlf FJ: *Introduction to Biostatistics*, 2nd Edition, W.H. Freeman and Company, New York, 1987
- Staak M, Weiser A: *Klinische Prüfung von Arzneimitteln, Methodik und Rechtsgrundlagen*, Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, 1978
- Stahl PH: *Feuchtigkeit und Trocknen in der pharmazeutischen Technologie*, Dr. Diedrich Steinkopff Verlag, Darmstadt 1980
- Steiger-Trippi K: Die Verwendung von viskositätserhöhenden Hilfsstoffen in der galenischen Pharmazie, *Scientia Pharmaceutica* 1958, Jg.26, H.2, 30.Juni, 109-126
- Steinbach H, Neubauer H: Handelsübliche Pilocarpinlösungen und ihre Haltbarkeit, Bericht über die Zusammenkunft der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft 1970, 70:557-562
- Stenbeck-Gjertz A, Ostholm I: Ointments for ophthalmic use, *Acta Ophthalmol* 1954, 32:405-423
- Stodtmeister R, Brenner J, Baur MP: Wirkung stabilisierter Pilocarpintropfen am menschlichen Auge, *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1977, 170:750-753
- Strasser G, Steinkogler FJ, Thaler A: Der Augenspiegel: Erste Erfahrungen mit einer Applikationshilfe für Augentropfen
- Stricker H: *Physikalische Pharmazie*, WVG Stuttgart 1991
- Strobel J: Zur lokalen Applikation von Indometacin zur Prostaglandinsynthesehemmung am Auge - Schüttelstudie, *Ophthalmologica* 1991, 202:43-47
- Sucker H; Fuchs P, Speiser P: *Pharmazeutische Technologie*, 1.Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1978
- Suhonen P, Järvinen T, Koivisto S, Urtti A: Different effects of pH on the permeation of pilocarpine and pilocarpine prodrugs across the isolated rabbit cornea, *Eur J Pharm Sci* 1998, 6:169-176
- Suhonen P, Järvinen T, Lehmuusaari K, Reunamäki T, Urtti A: Ocular Absorption and Irritation of Pilocarpine Prodrug Is Modified with Buffer, Polymer and Cyclodextrin in the Eyedrop, *Pharm Res* 1995, 12(4):529-533
- Suhonen P, Järvinen T, Lehmuusaari K, Reunamäki T, Urtti A: Rate control of ocular pilocarpine delivery with pipilocarpic acid diesters, *Int J Pharm* 1996, 127:85-94
- Süverkrüp R, Grunthal S, Diestelhorst M: Dry Drops: a new preservative-free drug delivery system, *Invest Ophthalmol Vis Res* 1997, 38(4):S143 [Abstract]

- Süverkrüp R, Grunthal S, Diestelhorst M: Darreichungsform zur äußerlichen Applikation und Verfahren zur Herstellung derselben, Deutsche Patentschrift DE 195 49 506 C2, Patenterteilung: 30.07.98
- Süverkrüp R, Grunthal S, Diestelhorst M: United States Patent: US 6.228.381 B1, Form of Administration for Applying Pharmaceutical Substances and Auxiliary Substances, and process for the preparation thereof, Date of Patent: 08.05.01
- Süverkrüp R, Weichselbaum A, Diestelhorst M: Pilocarpine Dry Drops: Miotic Effect and Discomfort upon Administration compared to Conventional Eyedrops, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999, 40(4):454 [Abstract]
- Swan KC, White NG: Corneal permeability - 1. Factors affecting penetration of drugs into the cornea, *Am J Ophthalmol* 1942, 25:1043-1058
- Swan KC: Use of methylcellulose in ophthalmology. *Arch Ophthalmol* 1945, 33:378-380
- Szabadi E, Bradshaw CM: Pupillary measures as markers of drug response, *Eur Neuropsychopharmacol* 1993, 3(3):317-319
- Taravella M, Stepp P, Young D: Collagen shield delivery of tobramycin to the human eye, *Clao J* 1998, 24(3):166-168
- Taravella MJ, Balentine J, Young D: Collagen shield delivery of ofloxacin to the human eye, *J Cataract Refract Surg* 1999, 25(4):562-565
- Terry JE, Janzen JL: Understand the side effects of glaucoma medications, *Rev Optom* 1997, Mai, keine Seitenangabe
- The Glaucoma Foundation, What You need to Know,
- The Glaucoma Foundation: You and Your Glaucoma Medication...A Guide to Placing Eyedrops in Your Eye,
- Thews G, Mutschler E, Vaupel P: *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*, WVG Stuttgart, 1989
- Thijssen HAC, Rulkens WH: Effect of freezing rate on rate of sublimation and flavour retention in freeze-drying, *International Institute of Refrigeration* (Comm. X, Lausanne 1969), S.99-114
- Thoma K: *Arzneimittelstabilität*, Werbe- und Vertriebsgesellschaft Deutscher Apotheker, Frankfurt 1978
- Thombre AG, Himmelstein KJ: Quantitative evaluation of topically applied pilocarpine in the precorneal area, *J Pharm Sci* 1984, 73(2):219-222
- Thomson HS: The pupil, aus: Moses RA (ed.): *Adler's Physiology of the eye: Clinical Application*, Chapt.12, 7th Edition, Mosby, St.Louis, 1981
- Thorburn W: The effect of a single dose of pilocarpine on the facility of aqueous outflow as estimated by use of a constant pressure technique, *Acta Ophthalmol Scand* 1974, 52(2):246-253
- Thorgeirsson E, Gudmundsdottir E, Stefanson E, Loftsson T, Sigurjonddottir JF: Randomly methylated beta-cyclodextrin in dexamethazone eye drop solution. Formulation and toxicology, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000, 41(4):S768 [Abstract]

- Ticho U, Blumenthal M, Zonis S, Gal A, Blank I, Mazor ZW: A clinical trial with Piloplex - a new long-acting pilocarpine compound: preliminary report, *Ann Ophthalmol* 1974, 11(4):555-61
- Ticho U, Blumenthal M, Zonis S, Gal A, Blank I, Mazor ZW: Piloplex, a new long-acting pilocarpine polymer salt. A: Long-term study, *Brit J Ophthalmol* 1979, 63(1):45-47
- Timm U, Göber B, Döhnert H, Pfeifer S: Zur Analytik und Stabilität von Tropicamid, *Pharmazie* 1977, 32(6):331-335
- Tojo K, Nakagawa K, Morita Y, Ohtori A: A pharmacokinetic model of intravitreal delivery of ganciclovir, *Eur J Pharm Biopharm* 1999, 47:99-104
- Törnquist G: Comparative studies of the effect of pilocarpine on the pupil and on the refraction in two species of monkey, *Invest Ophthalmol* 1964, 3:388-398
- Trautmann I: Polyvinyl als Vehikel für Augentropfen. *Dtsch Gesundheitswesen* 1967, 22(7):317-320
- Trolle-Lassen C: Investigations into the sensitivity of the human eye to hypo- and hypertonic solutions as well as solutions with unphysiological hydrogen ion concentrations, *Pharm Weekbl* 1958, 93:148-155
- U.S.Pharmacopeia (USP) 24, 2000, Rockville, Maryland, United States Pharmacopeial Convention, 1999
- Unlü N, Sumnu M, Hincal AA, *Acta Pharm Technol* 1988, 35:38
- Utschik H, Ludwig W: Definitionen und Abkürzungen in der Thermischen Analyse, *LABO September* 1997, S.10-18
- Van Ooteghem MM: Factors influencing the retention of ophthalmic solutions on the eye surface, aus: Saettone MS, Bucci G, Speiser P (eds.): *Ophthalmic Drug Delivery - Biopharmaceutical, Technological and Clinical Aspects*, Fidia Research Series, Vol.11, Springer Verlag, Berlin 1987
- Van Ooteghem: Oberflächenaktivität, aus Dolder R, Skinner FS: *Ophthalmika*, Kap. 3.5.4. WVG Stuttgart, 1990
- Van Santvliet L, Ludwig A: Influence of the dropper tip design and flexibility of the dropper bottle on the eye-drop delivery by healthy volunteers and elderly patients, *Proc. 3rd World Meeting APV/APGI, Berlin, 3/6 April 2000*, 807-808
- Van Santvliet L, Ludwig A: Dispensing Eye Drops from Flexible Plastic Dropper Bottles, Part 1: Influence of the packaging characteristics, *Pharm Ind* 1999, 61(1):92-96
- Van Santvliet L, Ludwig A: The influence of penetration enhancers on the volume instilled of eye drops, *Eur J Pharm Biopharm* 1998, 45:189-198
- Van Winden ECA, Crommelin DJA: Long term stability of freeze-dried, lyoprotected doxorubicin liposomes, *Eur J Pharm Biopharm* 1997, 43:295-307
- Vasantha R, Sehgal PK, Rao KP: Collagen ophthalmic inserts for pilocarpine drug delivery system, *Int J Pharm* 1988, 47:95-102
- Vogel H: *Gerthsen Physik*, 18.Auflage, Springer-Verlag Berlin 1995
- Von Bahr G: Measurements of the thickness of the cornea, *Acta Ophthalmol* 1948, 26:247
- Wade A, Weller PJ (ed.): *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 2nd Edition, American Pharmaceutical Association Washington, 1994

- Wagner E: Die Vorteile der Ocusert-Behandlung, *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1978, 173:370-374
- Waltman SR, Kaufman HE: Use of hydrophilic contact lenses to increase ocular penetration of topical drugs, *Invest Ophthalmol* 1970, 9(4):250-255
- Waltman SR, Patrowics TC: Effects of hydroxypropyl methylcellulose and polyvinyl alcohol on intraocular penetration of topical fluorescein in man, *Invest Ophthalmol* 1970, 9(12):96-970
- Wang ESN, Hammarlund ER: Corneal absorption reinforcement of certain mydriatics, *J Pharm Sci* 1970, 59(11):1559-1563
- Warwick R: The ocular parasympathetic nerve supply and its mesencephalic sources, *J Anat* 1954, 88:71
- Webster AR, Luff AJ, Canning CR, Elkington AR: The effect of pilocarpine on the glaucomatous visual field, *Brit J Ophthalmol* 1993, 77(11):721-5
- Weichselbaum A, Diestelhorst M, Süverkrüp R: DRY DROPS - In-Vivo-Prüfung eines neuen Applikationssystems für die Augenheilkunde, *Sitzungsbericht der 161. Versammlung des Vereins Rheinisch-Westfälischer Augenärzte* 1999, XXV:109-112
- Weichselbaum A, Dinslage S, Diestelhorst M, Süverkrüp R: A new drug delivery system for eyetreatment and diagnostics, *Inv Ophthalmol Vis Sci* 2000, 41(4):5767 [Abstract]
- Weichselbaum A, Dinslage S, Diestelhorst M, Süverkrüp R: Pupillary Reactions after Administration of Pilocarpine and Tropicamide in a new Lyophilized Dosage Form, *3rd international Symposium on Ocular Pharmacology and Pharmaceutics - ISOPP 2000*, p.57 [Abstract]
- Weichselbaum A, Dücker KA, Grunthal S, Diestelhorst M, Süverkrüp R: Dry Drops: small scale manufacturing and testing of a new ophthalmic delivery system, *Arch Pharm Pharm Med Chem* 1998, 331, 3.39, [Suppl.2]
- Weser C: Die Messung der Grenz- und Oberflächenspannung von Flüssigkeiten - eine Gesamtdarstellung für den Praktiker, *GIT Fachzeitschrift für das Laboratorium* 1980, 24:642-648 und 734-742, Sonderdruck, GIT Verlag Ernst Giebeler, Darmstadt
- Wesson MD, Bartlett JD, Swiatoch J, Woolley T: Mydriatic efficacy of a cycloplegic spray in the pediatric population, *J Am Optom Assoc* 1993, 64:637-640
- Widmann G, Riesen R: *Thermoanalyse, Anwendungen, Begriffe, Methoden*, Hüthig Buch Verlag Heidelberg, 3. Auflage, 1990
- Wiesend B: Qualitätsvergleich zu Pilocarpin-Augentropfen, *Pharm Ztg* 1988, 27:27-30
- Wilhelm H: Pupillenreaktionen-Pupillenstörungen, Verlag W. Kohlhammer Stuttgart, 1991
- Wilke K: Early effects of epinephrine and pilocarpine on the intraocular pressure and the episcleral venous pressure in the normal human eye, *Acta Ophthalmol* 1974, 52: 231-241
- Willemer H: Determination of Freezing and Freeze-Drying Data based on Light-Optical Micrographs and Electrical Resistance Measurements, *7th Intern. Freeze-Drying Cours, Lyon*, 1977
- Willemer H: Troubleshooting Lyophilization, *Pharm Technol Eur* 1999, May:15-22

- Wittaya-Areekul S, Nail SL: Freeze-Drying of tert-Butyl Alcohol/Water Cosolvent Systems: Effects of Formulation and Process Variables on Residual Solvents, *J Pharm Sci* 1998, 87(4):491-495
- Wollensack J, Kewitz H: 100 Jahre Pilocarpin in der Augenheilkunde, *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1976, 169:660-663
- Worakul N, Robinson JR: Ocular pharmacokinetics/pharmacodynamics, *Eur J Pharm Biopharm* 1997, 44:71-83
- Worthen DM, Zimmerman TJ, Wind CA: An evaluation of the pilocarpine Ocusert, *Invest Ophthalmol* 1974, 13(4):296-299
- www.eye-lys.de
- Yablonski ME, Zimmerman TJ, Wattman SR: A fluorophotometric study of the effect of topical timolol on aqueous humor dynamics, *Exp Eye Res* 1978, 27(2):135-142
- Yoshioka S, Aso Y, Shibazaki T, Uchiyama M: Stability of pilocarpine ophthalmic formulations, *Chem Pharm Bull* 1986, 34(10):4280-4286
- Zaki I, Fitzgerald P, Hardy JG, Wilson CG: A comparison of the effect of viscosity on the precorneal residence of solutions in rabbit and man, *J Pharm Pharmacol* 1986, 38:463-466
- Zaman M, McAllister M, Martini LG, Lawrence MJ: The physico-chemical and biological factors influencing bioadhesion, *Biopharm Eur* 1999, 9:52-60
- Zatloukal Z: Density of lyophilized ophthalmic lamellae. Part 1. Effect of the concentration of hpmc in hydrogel on the density of lyophilized xerogel, *Cesk Slov Farm* 1998, 47:276-278
- Zatloukal Z: Density of lyophilized ophthalmic lamellae. Part 2. Use of the correlogram of xerogel density, *Cesk Slov Farm* 1999, 48:72-74
- Zatloukal Z: Effect of pilocarpine chloride on the density of lyophilized xerogel of hpmc, *Cesk Slov Farm* 1996, 45:19-21
- Zatloukal Z: In vitro kinetics of release of pilocarpinium chloride from lyophilized ophthalmic lamellae without modifications of the releasing medium, *Cesk Slov Farm* 1997, 46:29-32
- Zatloukal Z: Lyophilized ophthalmic lamellae from hpmc, *Cesk Slov Farm* 1990, 39:433-435
- Zatloukal Z: Release of pilocarpine from lyophilized eye lamellae, *Cesk Slov Farm* 1990, 39:423-425
- Zatloukal Z: Statistical aspects of distribution of the density of lyophilized xerogel of hpmc, *Cesk Slov Farm* 1996, 45:67-70
- Zeimer RC: Assessment of Posterior Segment Transport by Vitreous Fluorophotometry, aus: Masters BR (ed.): Noninvasive Diagnostic Techniques in Ophthalmology, Chp. 15, Springer-Verlag New York, 1990
- Zimmer A, Mutschler E, Lambrecht G, Mayer D, Kreuter J: Pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects of an ophthalmic pilocarpine nano-particle-delivery-system, *Pharm Res* 1994, 11(10):1435-1442
- Zimmerman T: Pilocarpine, *Ophthalmol* 1981, 88(1):85-88
- Zimmermann TJ, Sharir M, Nardin GF, Fuqua M: Therapeutic index of pilocarpine, carbachol and timolol with nasolacrimal occlusion, *Am J Ophthalmol* 1992, 114(1):1-7
- Zöfel P: *Univariante Varianzanalysen*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1992

Zograbi G, Kontny MJ: The Interactions of Water with Cellulose- and Starch-Derived Pharmaceutical Excipients, *Pharm Res* 1986, 3(4):187-194

Zubereitungen am Auge, aus: DAC 1999/ NRF, 16. Erg. 1999, Kapitel 1.8, S.1-7

Ein ganz herzliches Dankeschö n außerdem an

- Dr. Sven Dinslage für die freundlicherweise zur Verfügung gestellten Photos und nette Zusammenarbeit bei den klinischen Studien.
- alle Probanden, die sowohl ihre wertvolle Freizeit als auch ihre gesunden Augen großzügig für die klinischen Studien zur Verfügung gestellt haben.
- Christina Piskorz für ihre rheologische und Kerstin Breitbach für ihre protokollarische Unterstützung.
- die Abteilung der Mikrobiologie der Universität Bonn für die freundliche und tatkräftige Unterstützung.
- Herrn Cremer für sämtliche elektronischen Hilfestellungen, die auch vor defekten Kaffeemaschinen nicht halt machten, und sein einfach unübertreffliches Pflaumenmus.
- Herrn Feldkeller für mechanisches Bauwerk jeder Art, was eigentlich immer schon 'gestern' hätte fertig sein sollen, die unermüdliche Realisierung neuer Ideen und seine aufregenden Geschichten aus Südamerika.
- Beate Klinke und Jörn Köhler, die im Dienste der Wissenschaft wie die Weltmeister tropfen und wiegen mußten.
- Beate besonderen Dank für die vielen anregenden Diskussionen während der gemeinsamen Zeit, daß sie ihr Wort mit 'B' noch einbringen durfte und daß wir vielleicht doch irgendwann wieder zusammen in Urlaub fahren.
- Andreas Grummel, der sich immer wieder gerne als Fotomodell 'Negativ-Beispiel' zur Verfügung stellte, obwohl kein weibliches Wesen jemals nach seiner Telefonnummer fragte.
- Markus Pander und Jens Säbel, die mehr als einmal meinen PC einschließlich der Daten retten mußten.
- Amadeus Weyand für seine (Un)Geduld während der ganzen Promotion und Großzügigkeit bezüglich meiner langjährigen, unaufhörlich fortschreitenden Annexion seiner sämtlichen Computer und diversen Zubehörs, was jetzt aber auch schon völlig veraltet ist ☺.
- Claudia Schieben für die aufopfernde und intensive Pflege meiner liebsten Freizeitbeschäftigung, die vielen (natürlich völlig unproblematischen) Ausritte in den Hunsrück und die spontane Versorgung mit Care-Paketen in Zeiten der Not.
- Nina Wolf und Sabine Täuber und allen Reiterfreunden, die ihre kostbare Zeit dafür aufbrachten, sich während diverser heißer Phasen sich um mein edles Roß zu kümmern.
- Mary Lou für die vielen Stunden, die ich sie versetzen mußte.
- einen kleinen, abgebrochenen Käfer (prust), der versuchte, die letzte Motivation zu aktivieren.
- alle hier Ungenannten, die an der Fertigstellung dieses Werks in irgendeiner Weise mitgewirkt haben.
- alle Kollegen, mit denen ich eine so schöne Zeit im Institut verbrachte, die ich nicht missen möchte.
- - last, but not least - meine Eltern, die mich jederzeit unterstützt haben und auf die immer Verlaß gewesen ist.