

6. Zusammenfassung

Klinische Studien belegten für PC, einen nicht-halogenierten Prednisolon-Doppelester, im Vergleich zu dem equipotenten fluorierten Monoester BMV, ein niedrigeres Hautatrophierisiko. Zusätzlich konnte für PC nach Anwendung in einer Lipid-Nanodispersion eine erhöhte Aufnahme in die Epidermis erreicht werden, ohne dass gleichzeitig die PC-Menge im Korium anstieg. Ein solches Targeting erscheint für BMV noch wünschenswerter, weil damit das höhere Risikopotential gesenkt werden könnte. Deshalb sollte eine Lipid-Nanodispersion mit BMV entwickelt und die Penetration des Wirkstoffs in die Haut untersucht werden.

Zur Herstellung stabiler Lipid-Nanodispersionen war es zunächst erforderlich, für BMV die geeignete Lipidmatrix zu finden. Das Glucocorticoid muss eine ausreichende Löslichkeit in dem ausgewählten Lipid aufweisen, da diese eine wesentliche Voraussetzung für die Inkorporation in die Lipidmatrix darstellt. Hierzu wurden strukturell unterschiedliche Lipide hinsichtlich ihres Lösungsvermögens für BMV untersucht. Die ausgewählten Lipide unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung (Fettsäuren, Mono-, Di- und Triglyceridgehalt) und damit in ihrem Schmelzpunkt. Die Löslichkeit wurde sowohl im geschmolzenen Zustand als auch nach Rekristallisation des Lipids durch makroskopisches und mikroskopisches Betrachten bestimmt.

Die Löslichkeit von BMV in den reinen Triglyceriden Trilaurat (Dynasan[®] 112), Trimyrinat (Dynasan[®] 114), Tripalmitat (Dynasan[®] 116) und Tristearat (Dynasan[®] 118) war erwartungsgemäß nicht ausreichend. Auch Hartfett (Witepsol[®] E 85) erwies sich auf Grund des schlechten Lösungsverhaltens für BMV als ungeeignet, während in Imwitor[®] 900 (Glycerolpalmitat, -stearat), Monosteol[®] (Propylenglykolmonostearat) und Softisan[®] 601 (Glyceride der Palmitin- und Stearinsäure) sich BMV innerhalb von 10 Minuten vollständig auflöste. In Precirol[®] ATO 5 (Glycerolpalmitostearat), Geleol[®] (Glycerolmonostearat) und Compritol[®] 888 ATO (Glyceroltribehenat) war die Löslichkeit etwas geringer. Zur Herstellung von Lipidnanodispersionen wurden deshalb folgende Lipide eingesetzt: Compritol[®] 888 ATO, Geleol[®], Imwitor[®] 900, Monosteol[®], Precirol[®] ATO 5 und Softisan[®] 601. Als Vergleichszubereitung wurde eine NE mit Miglyol[®] 812 hergestellt. Ziel waren physikalisch stabile Nanodispersionen, als Zeitraum wurden 6 Monaten angestrebt. Zur Stabilisierung von

Nanodispersionen ist der Zusatz eines Tensides unverzichtbar. Deshalb wurde der Einfluß unterschiedlicher Tenside untersucht (Poloxamer 188, Polysorbat 80, Lipoid S75 / Poloxamer 188, Natriumcholat / Poloxamer 188). Zusätzlich wurden die Anteile der Lipidphase (5, 10, 12,5, 15 und 30%) variiert. Kriterien zur Beurteilung der physikalischen Stabilität sind Veränderung der Partikelgrößen, Gelierung der Dispersionen und Rekristallisation des Wirkstoffs. Hierzu wurden mittels LD und PCS die Partikelgrößen einen Tag nach Herstellung bestimmt. Weitere Bestimmungen erfolgten nach einer Woche, einem Monat, 3 und 6 Monaten. Zusätzlich wurden die Dispersionen lichtmikroskopisch untersucht, um Aggregate oder Arzneistoff-Kristalle zu erfassen. Die Lipidnanodispersionen wurden bei 8°C gelagert. Bei Geleol[®] und Imwitor[®] 900 als Lipidkomponente gelierten die Dispersionen innerhalb eines Monats. Bereits wenige Tage nach der Herstellung waren lichtmikroskopisch Lipidpartikel im Mikrometer-Bereich und eine Phasentrennung zu erkennen. Der Einsatz anderer Tenside (Polysorbat 80) oder von Tensidmischungen (Lipoid S75 und Poloxamer 188) konnte diese Gelierung nicht verhindern. Mit Softisan[®] 601 wurden keine Partikel gebildet. DSC-Untersuchungen zeigten, dass die Schmelze nicht rekristallisierte, sondern eine unterkühlte Schmelze gebildet wurde. Die Beladung mit 0,25% BMV führte bei keinem der eingesetzten Lipide zu physikalisch stabilen Dispersionen. Die Erhöhung der Lipidphase auf 30% erleichterte den Einschluß von BMV, die Aggregationsneigung nahm aber mit steigender Lipidkonzentration deutlich zu. Als physikalisch stabil zeigten sich über einen Lagerungszeitraum von 3 Monaten folgende SLN-Dispersionen: Compritol 12,5%, Poloxamer 188 3%, BMV 0,1%; Compritol 15%, Poloxamer 5%, BMV 0,1%; Precirol 12,5%, Polysorbat 80 3%, BMV 0,1%; Precirol 15%, Polysorbat 80 5%, BMV 0,1%. Über einen Zeitraum von 6 Monaten erwiesen sich folgende SLN-Dispersionen als ausreichend stabil: Compritol 15%, Poloxamer 188 5%, BMV 0,1%; Precirol 15%, Polysorbat 80 5%, BMV 0,1%; Precirol 12,5%, Polysorbat 80 3%, BMV 0,1% (alle Aqua bidest ad 100%). Compritol-Lipiddispersionen wiesen größere Partikel auf als Precirol-basierte, ebenfalls war die Partikelgrößenverteilung bei Precirol geringer.

Durch Einarbeitung von Ceramiden und Cholestrol in die Matrix der Lipidpartikel sollte untersucht werden, ob die Affinität zum SC erhöht und damit eine Interaktion der Partikel mit der Haut erleichtert wird. Dies könnte zu einer gezielten Aufnahme des Wirkstoffs in die Epidermis führen. Deshalb wurden erste Versuche zur

Einarbeitung von Ceramiden und Cholesterol in die unterschiedlichen Lipidmatrices durchgeführt. Unter Beibehaltung des Anteils an Lipidphase (12,5%) wurden unterschiedliche Anteile des Lipides durch Ceramide (0,05, 0,1 und 0,25%) oder Cholesterol (0,05, 0,1, 0,25 und 0,5%) ersetzt. Es konnten physikalisch stabile Dispersionen mit Precirol und Miglyol unter Zusatz von Ceramiden hergestellt werden. Nach Einarbeitung des Wirkstoffs gelierten die Compritol-Dispersionen allerdings innerhalb von 2 Wochen. Über einen Zeitraum von 1 Monat stabile wirkstoffhaltige (BMV 0,1%) Lipiddispersionen wurden mit Miglyol und Precirol erhalten. Die Einarbeitung von Cholesterol sowie von Ceramiden und Cholesterol in wirkstofffreie Compritol-Partikel führte stets zur Gelierung der Dispersionen. Die Rezepturoptimierung muss also fortgesetzt werden.

Die Penetration von BMV in Human- und Schweinehaut wurde mit folgenden Lipid-Nanodispersionen untersucht:

Compritol 12,5%, Poloxamer 188 3%, Aq. dest. ad 100%; Precirol 12,5%, Polysorbat 80 3%, Aq. dest. ad 100%. Zusätzlich wurde eine NE (Miglyol 12,5%, Poloxamer 188 3%) eingesetzt. Alle Zubereitungen enthielten 0,1% BMV. Als Vergleich diente Betnesol® V-Creme. Die Ergebnisse zeigten eine verstärkte Aufnahme von BMV in Humanhaut, nicht aber in Schweinehaut aus den SLN-Dispersionen nach 6 Stunden im Vergleich zu NE und Creme. So ist die BMV-Penetration in die oberen Hautschichten (0-100, 100-200µm) aus Compritol-SLN um etwa den Faktor 3,5 erhöht. Der Effekt ist bei Applikation der Precirol-SLN mit dem Faktor 1,7 wesentlich geringer ausgeprägt. Eine gezielte Anreicherung von BMV kann jedoch im Gegensatz zu PC weder mit Compritol- noch mit Precirol-SLN beobachtet werden, das Wirkstoffverhältnis in den beiden untersuchten Hautschichten unterscheidet sich bei den genannten Zubereitungen nicht. Die Penetration aus der NE entspricht derjenigen aus der Creme. Der Zusatz von wirkstofffreien Lipid-Nanopartikeln zu der handelsüblichen Creme beeinflusst wie bei den Untersuchungen mit PC die BMV-Aufnahme nicht.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass mit Compritol-SLN mit BMV ein Targeting in den oberen Hautschichten nicht möglich ist, während dies mit PC beobachtet werden konnte. Eine Erklärung für das Ergebnis der Penetrationsuntersuchungen wurde mit Hilfe der PS gefunden, mit der die Verteilung des

Zusammenfassung

Wirkstoffs in der Lipidmatrix bzw. eine Assoziation des Wirkstoffs an der Partikeloberfläche erkannt werden kann. Hierbei zeigten sich deutliche Unterschiede in der Mobilität und Dichte von mit steigenden Konzentrationen von PC und BMV beladenen Lipid-Nanopartikeln (Dipole). Während PC bis zu einer Konzentration von 0,25% an der Partikeloberfläche assoziiert war, war dies mit BMV nur bis zu einer Konzentration von ca. 0,05% möglich. Eine 0,1% BMV-SLN-Zubereitung war also bereits mit Wirkstoff überladen.

Die Ergebnisse weisen also darauf hin, dass für eine gezielte Anreicherung von Wirkstoffen in bestimmten epidermalen Schichten eine Assoziation an der Trägeroberfläche eine wesentliche Voraussetzung darstellt. Eine schwächere Assoziation bzw. nur partielle Assoziation fördert jedoch bereits die Gesamtaufnahme in die Haut. Die strukturellen Eigenschaften eines Wirkstoff-Moleküls für eine Anlagerung an Oberflächen von Lipid-Nanopartikeln müssen deshalb zukünftig untersucht werden.

Summary

A nonhalogenated double ester of prednisolone, prednicarbate (PC) showed a lower risk of skin atrophy compared to the fluorinated monoester betamethasone 17-valerate (BMV) in clinical studies. Moreover, when PC was applied as solid lipid nanoparticles dispersion (SLN), a high absorption in the epidermis could have been realized without increasing the PC concentration in the corium. Such targeting effect is even more desirable for BMV, because this could decrease the higher risk potential of BMV. The goal was therefore the development of appropriated BMV-SLN. The BMV penetration behaviour in the skin to be examined. At first it was necessary to find the suitable lipid matrix for the production of a stable lipid nanodispersion. The glucocorticoid must exhibit a sufficient solubility in the selected lipid, since this is a fundamental prerequisite for the incorporation into the lipid matrix. Structurally different lipids were therefore examined regarding their ability to dissolve BMV. The selected lipids differed in their composition (fat acids, mono-, di-, and triglycerides content) showing different melting points. The BMV solubility was determined in the molten lipids and after their recrystallisation using microscopy technique.

The solubility of BMV in the pure Triglycerides trilaurin (Dynasan[®] 112), trimyristin (Dynasan[®] 114), tripalmitin (Dynasan[®] 116) and tristearin (Dynasan[®] 118) was not sufficient. Hard fat (Witepsol[®] E85) also proved to be not suitable due to low BMV solubility, while BMV dissolved completely within 10 minutes in Imwitor[®] 900 (Glyceryl stearate), Monosteol[®] (Palmitate/stearate of propylenglycol) and Softisan[®] 601 (Glyceride of palmitin- and stearin acid). In Precirol[®] ATO 5 (Glyceryl palmitostearate), Geleol[®] (Glyceryl monostearate) and Compritol[®] 888 ATO (Glyceryl behenate) the BMV solubility was somewhat lower compared to the lipids maintained before. For the production of BMV-lipid nanodispersions the following lipids were therefore used: Compritol[®] 888 ATO, Geleol[®], Imwitor[®] 900, Monosteol[®], Precirol[®] ATO 5 and Softisan[®] 601. An BMV-nanoemulsion using Miglyol[®] 812 was manufactured for comparison. The objective was the production of a BMV dispersion which showed physical stability over a period of 6 months. For the stabilization of nanodispersion the addition of an emulsifier is indispensable. Therefore the effect of different emulsifiers such as Poloxamer 188, Polysorbat 80, Lipoid S75/Poloxamer 188, Natriumcholal/Poloxamer 188 on particle stability was examined at varying lipid concentrations (5, 10, 12,5, 15 and 30%). Criteria for the evaluation of the physical

Summary

instability were the change of the particle size, the gelation of the dispersion and the recrystallization of the drug. For this purpose the particle sizes were determined one day after their production using LD and PCS measurement. Further examinations took place after one week, one, three, and six months respectively. In addition the dispersions were examined with a light microscope for registration of aggregation and appearing drug crystals. The nanodispersions were stored at 8°C. Geleol[®] and Imwitor[®] 900 nanodispersions caused gel formation within one month. Already a few days after their production the dispersions showed lipid particle sizes of several micrometers and phase separation. The use of emulsifier (Polysorbat 80) or even the combination of emulsifiers (Lipoid S75 and Poloxamer 188) could not prevent this gelation. With Softisan[®] 601 no solid particles were formed. The loading of the nanodispersion with 0,25% BMV did not lead to a physical stability with any of the employed lipids. The increase of lipid phase up to 30% made the incorporation of BMV easier, but also showing an increased aggregation tendency in parallel. The following SLN dispersions proved to be stable over a period of three months: Compritol 12,5%, Poloxamer 188 3%, BMV 0,1%; Compritol 15%, Poloxamer 5%, BMV 0,1%; Precirol 12,5%, Polysorbat 80 3%, BMV 0,1%; Precirol 15%, Polysorbat 80 5%, BMV 0,1%. Over a period of six months the following SLN dispersions proved to be sufficiently stable: Compritol 15%, Poloxamer 188 5%, BMV 0,1%; Precirol 15%, Polysorbat 80 5%, BMV 0,1%; Precirol 12,5%, Polysorbat 80 3%, BMV 0,1% (all aqua bidest ad 100%). Precirol dispersions showed to have smaller particles than those based on Compritol also showing a smaller particle size distribution.

The hypothesis of an increased particle – skin interaction due to the incorporation of ceramid and cholesterol into the lipid matrix was tested. An intensified particle skin contact could result in a targeted delivery of the drug into the epidermis. Therefore preliminary experiments were carried out to incorporate ceramids and cholesterol into the different lipid matrixes. Under retention of the lipid fraction of 12,5%, different concentrations of lipids were replaced through ceramid (0,05, 0,1, and 0,25%) or cholesterol (0,05, 0,1, 0,25 and 0,5%). Physical stable ceramid containing dispersions could be produced on the Precirol and Miglyol basis, although the Compritol-dispersion caused gel formation within 2 weeks when the drug (BMV) was incorporated. Stable drug loaded (0,1% BMV) ceramid containing lipid dispersions were obtained only on the Miglyol and Precirol basis. The incorporation of cholesterol

or of ceramid/cholesterol mixtures into drug free Compritol-particles always resulted in gel formation. The composition must therefore be further optimized.

The penetration of BMV into human and pig skin was investigated using the following two lipid nanodispersions: Compritol 12,5%, Poloxamer 188 3%, aq. dest. ad 100%; Precirol 12,5%, Polysorbat 80 3%, aq. dest. ad 100%. Additionally a nanoemulsion NE (Miglyol 12,5%, Poloxamer 188 3%) was used. All formulations contained 0,1% BMV; Betnesol[®] V-cream was used as a reference. The results showed an increased absorption of the drug from the SLN-dispersion after 6 hours as compared with NE and cream in human skin, but not in pig skin. The BMV penetration from Compritol-SLN into the upper skin layers (0 - 100, 100 - 200 μ m) increased by a factor of about 3,5. This effect is substantially lower with Precirol-SLN, which only reached a factor of 1,7. However, in contrast to PC, a targeted enrichment of BMV can not be observed with both Compritol- and Precirol-SLN. The drug relation in the first and second skin layers did not differ in the tested formulations. The penetration from the NE corresponded to that of the cream. A conventional cream containing drug free lipid nanoparticles had no influence on the BMV penetration.

Taking together, it was not possible to target the upper skin layer using BMV-Compritol-SLN, while this could be achieved with PC-SLN. An explanation for the observed differences in the penetration behavior of the two formulations was found using parrlectric spectroscopy (PS). PS served to measure the distribution of the drug in the lipid matrix and/or its association on the particle surface. Significant differences were found in the mobility and density of the lipid nanoparticles (dipol) which were loaded with increasing concentrations of PC and BMV. While PC was attached to the particle surface up to a concentration of 0,25%, with BMV this was only possible up to about 0,05%. A 0,1% BMV-SLN formulation was therefore already overloaded with drug.

The results showed that the attachment to the carrier surface is a fundamental requirement for a targeted enrichment of drugs in certain epidermal layers. However, a weaker attachment and/or a partial association already promotes the total absorption into the skin. The structural properties of a drug molecule for its attachment to the particle surface must therefore be investigated in the future.