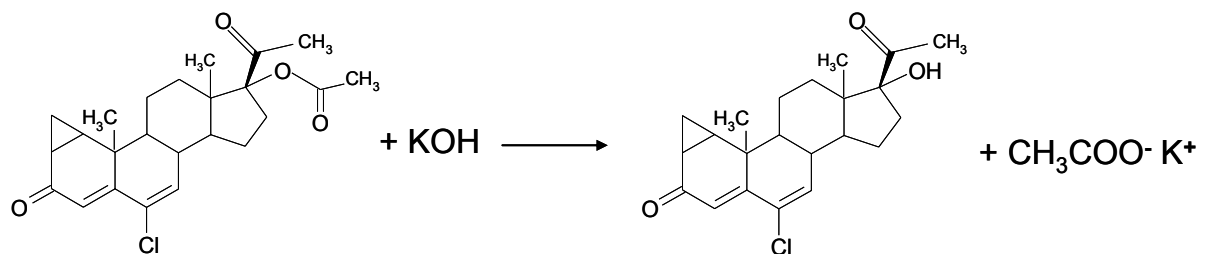


3. ERGEBNISSE

3.1 Herstellung von CPA

Herstellung von CP. Da der Ester CPA wie Glukokortikoide (Schäfer-Korting et al., 2005) nach topischer Applikation durch die Aktivität der humanen Hautesterasen einer Spaltung unterliegen könnte, wurde für die folgenden Experimente zur metabolischen Stabilität/Instabilität Cyproteron (CP) als Referenzsubstanz für die HPLC-Analyse benötigt. Diese Substanz ist kommerziell nicht verfügbar, deswegen wurde CP aus CPA hydrolytisch abgespalten.

Da weder nach 24 noch nach 48 h Inkubation mit Leberesterasen mittels Dünnschichtchromatographie eine Spaltung beobachtet werden konnte, wurde CPA in Gegenwart von Kaliumhydroxid und Methanol, wie in Material und Methoden beschrieben, zu CP umgesetzt.



Das Produkt wurde anhand von $^1\text{H-NMR}$ -Spektrometrie (Abb. 12), C-H-N-Analyse (Tab. 2) und Massenspektrometrie (Abb. 11) als Cyproteron identifiziert.

	Theoretisch	Gemessen
C	70,48	69,34
H	10,69	7,096
N	0	0

Tab. 2 : C-H-N-Analyse von CP. Angabe in % der gesamten Molekülmasse

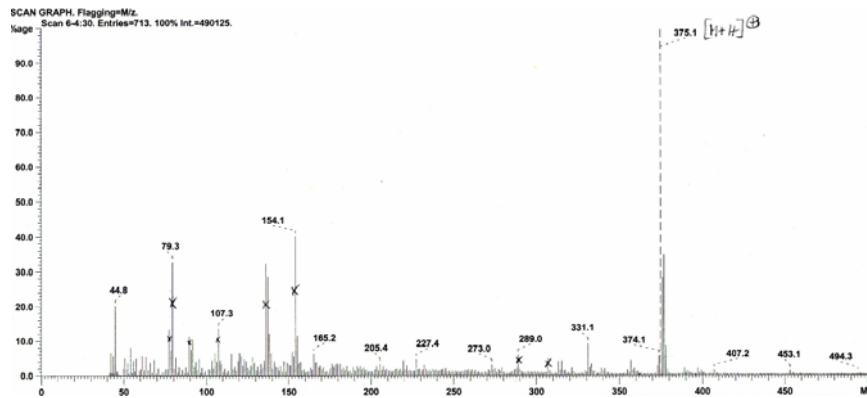


Abb. 11: Massenspektrum von Cyproteron

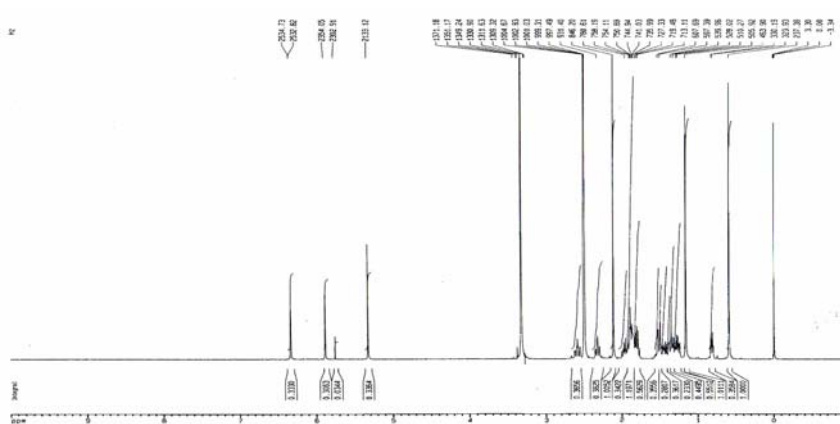


Abb. 12: ^1H -NMR-Spektrogramm von Cyproteron (aufgenommen in DMSO)

3.2 Entwicklung und Qualitätssicherung einer HPLC Analytik

Zur quantitativen Bestimmung von CPA (und CP) in der Haut wurde anhand von Literaturdaten eine HPLC Methode etabliert. Der Vorteil dieser Methode liegt in der Verwendung Internen Standards (19-NT). Durch Detektion der Substanzen (CPA, CP und 19-NT) bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen (246 und 284 nm) wird das Auftreten von Störpeaks aus den Matrices minimiert. Die Trennung dieser Stoffe gelingt mittels isokratischer Elution (Acetonitril/Wasser 61:39 v/v). Für die Analyse wurden die Proben mit 19-Nortestosteron versetzt. Es ergeben sich folgende Retentionszeiten: 19-NT 5,5 min; CP 7,3 min; CPA 11,5 min.

Selektivität und Spezifität. Diese HPLC Methode erlaubt eine vollständige Trennung der Substanzen. Die eindeutige Identifizierung wird durch Störpeaks aus Zellmedien oder Hauthomogenisat nicht eingeschränkt.

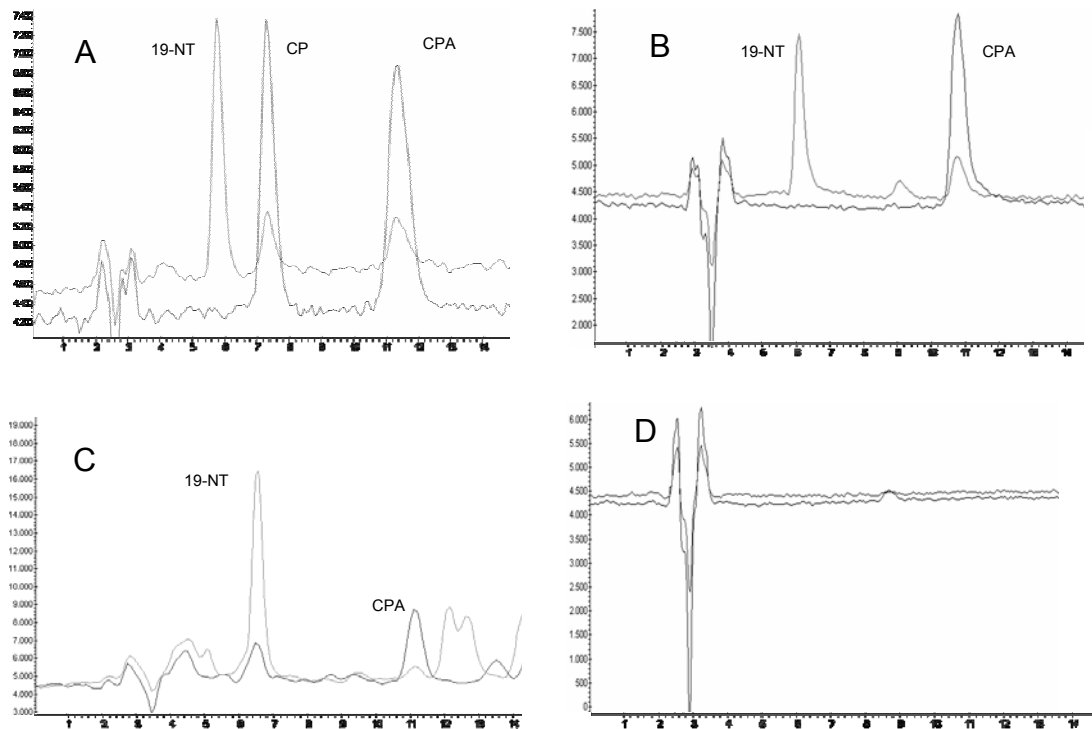


Abb. 13: Repräsentativer HPLC Chromatogramme: A: der Reinsubstanzen, B: CPA und 19-NT nach Extraktion aus dem Fibroblastenmedium, C: CPA und 19-NT nach Extraktion aus der Haut, D: Kontrolle ohne Substanz, die obere Linie entspricht der Absorption bei einer Wellenlänge von 246 nm, die untere Linie der Absorption bei 284 nm

Nachweis- und Bestimmungsgrenze. Die Nachweisgrenze von CPA liegt bei 160 ng/ml, von CP bei 180 ng/ml, die Bestimmungsgrenze bei 208 ng/ml (CPA), 230 ng/ml (CP). Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden in regelmäßigen Abständen wiederholt überprüft, es wurden gleiche Ergebnisse erzielt.

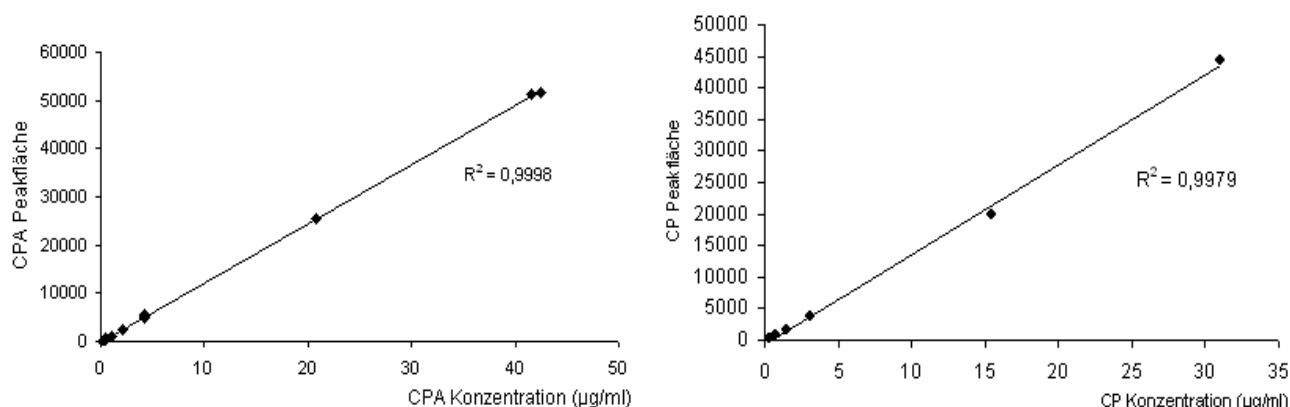


Abb. 14: Repräsentative Kalibrationskurven von CPA und CP

Richtigkeit. Zur Bestimmung der Übereinstimmung zwischen dem ermittelten Wert und einem als richtig angesehenen Wert wurden an sieben Tagen jeweils 3 CPA Standardlösungen (4,3 µg/ml, 8,6 µg/ml, 17,25 µg/ml) wie beschrieben quantifiziert. Alle Ergebnisse liegen unterhalb der vorgegebenen Abweichung von 15 %, beziehungsweise 20 % (Tab. 3).

Präzision. Die Ergebnisse zur Bestimmung der Präzision der Methode sind in der Tab. 3 dargestellt. Die Wiederholpräzision und die Zwischenpräzision wurden wie in Methoden beschrieben ermittelt. Die Werte liegen unterhalb der vorgeschriebenen Abweichung von nicht mehr als 15 % im Bereich der hohen Konzentrationen, beziehungsweise 20 % im Bereich der niedrigen Konzentrationen (U.S. department of health and humanservice 2001).

Erwartete Konz. CPA (µg/ml)	Mittelwert der gemessenen Konz. (µg/ml)	Richtigkeit (%)	Wiederhol- präzision (%)	Zwischen- präzision (%)
17,25	18,612	7,8983	7,73	5,81
8,625	9,183	6,4709	4,73	7,35
4,3125	3,811	11,6253	5,70	5,13

Tab. 3: Qualitätsparameter der HPLC Methode

Wiederfindung. Da eine mögliche Bindung des CPA an die Bestandteile von Zellmedien, Zellen oder Haut die späteren Ergebnisse verfälschen könnte, wurde die Wiederfindungsrate von CPA (17,25 µg/ml) aus allen Matrices bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Tab. 4 zusammengefasst. Anhand der Wiederfindungsraten wurden die CPA-Mengen in den Proben aus Humanhaut, dem Akzeptormedium PBS+ 5 % BSA sowie PBS korrigiert.

Matrix	Gefundene CPA- Menge (%)
PBS	90,2 ± 4,4
PBS+ 5 % BSA	85,6 ± 4,61
Keratinocytenmedium (KGM)	94,4 ± 12,3
Fibroblastenmedium (FGM)	98,2 ± 2,0
Sebozytenmedium (SGM)	99,1 ± 13,7
Humanhaut	71,5 ± 15,4

Tab. 4: Wiederfindungsraten von CPA (17,25 µg/ml) aus PBS, Akzeptormedium (PBS+BSA 5 %), Zellmedien und Humanhaut (Mittelwerte ±SD, n=3)

Löslichkeit von CPA im Akzeptormedium. Eine niedrige Löslichkeit des lipophilen Wirkstoffes CPA im Akzeptormedium könnte die Permeationsraten in Hautversuchen stark senken. Um ein geeignetes Medium auszuwählen, wurde die Löslichkeit der Reinsubstanz CPA in PBS und PBS mit Zusatz von 5 % BSA wie unter 2.6.2 beschrieben untersucht. Für CPA in PBS ergab sich die Konzentration an gelösten CPA von 2,2 ± 0,3 µg/ml, in BPS mit 5 % BSA 23,4 ± 2,7 µg/ml. Da die Löslichkeit von CPA in PBS durch den Zusatz von 5 % BSA mehr als 10fach erhöht wurde, wurde 5 % BSA dem Akzeptormedium für alle Untersuchungen zur kutanen Resorption zugesetzt.

Die maximale Löslichkeit von CPA überstieg die in den Permeationsversuchen (3.6.1) gefundene CPA-Konzentration im Akzeptormedium um den Faktor 100. Daher wird die Menge des permeierten Wirkstoffes nicht durch Löslichkeitsprobleme beeinflusst.

3.3 Kutane Metabolisierung von CP

Humane Haut verfügt über Enzyme, die nach einer topischen Applikation den Wirkstoff umwandeln und so seine Wirkung stark beeinflussen können. Eine mögliche Metabolisierung von CPA wurde daher an humanen Vorhautfibroblasten, -keratinozyten und an der Sebozytenzelllinie SZ95 untersucht. Die Zellen wurden mit CPA (10^{-5} , 10^{-6} M) für 24 h inkubiert, Zellen und das Medium mit Chloroform extrahiert und auf das Auftreten von CP bzw. 15β -Hydroxy-CPA per HPLC untersucht. Da nach 24 h keine Metabolite nachweisbar waren, wurde die Inkubationszeit auf 48 h verlängert und die Zellzahl auf 2×10^5 pro Loch verdoppelt. Unter diesen Bedingungen wurde ungefähr 1 % des Wirkstoffes als CP gefunden.

Eine Beeinträchtigung der Zellvitalität durch CPA Lösungen und damit potentiell falsch-negative Resultate der Metabolisierung wurden mit dem MTT-Test ausgeschlossen. Es zeigte sich keine Beeinflussung der Zellvitalität durch CPA bei den untersuchten Zellen. Damit könnte bei allen weiteren Untersuchungen auf CPA fokussiert werden, sofern CP nicht erheblich stärker antiandrogen wirkt als die Muttersubstanz CPA.

3.4 Wirkung von CPA und CP an der Haut

3.4.1 Androgenrezeptorbindung bei GR+/29+ Zellen

Die Bindungsaffinitäten von CPA und CP in Vergleich zu DHT wurden in Ganzzellbindungsassays an GR+/29+ Zellen ermittelt (List et al., 1999). Zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten von CPA und CP, die nicht in radioaktiver Form zur Verfügung standen, diente die Verdrängung von ^3H -DHT (0,5 nM) vom Androgenrezeptor. Meßparameter war die nach Zusatz von DHT (0,05-5 nM), CPA (0,5 nM-10 μM) und CP (1 nM-150 μM) verbleibende Bindung von ^3H -DHT. Aus den Verdrängungskurven (Abb. 15) wurden die IC_{50} Werte entnommen, also Konzentrationen bei denen 50 % der Verdrängung stattfindet. CPA band ungefähr 150-fach schwächer (IC_{50} 63,8 nM), CP 1000-fach schwächer (IC_{50} 442,5 nM) als DHT (IC_{50} 0,36 nM) an dem Androgenrezeptor.

Die Rezeptorbindungsstudien zeigten, dass CP im Vergleich zu CPA nur eine sehr schwache Affinität zum Androgenrezeptor hat. Im Folgenden sollte die antiandrogene Wirkung der beiden Substanzen untersucht werden.

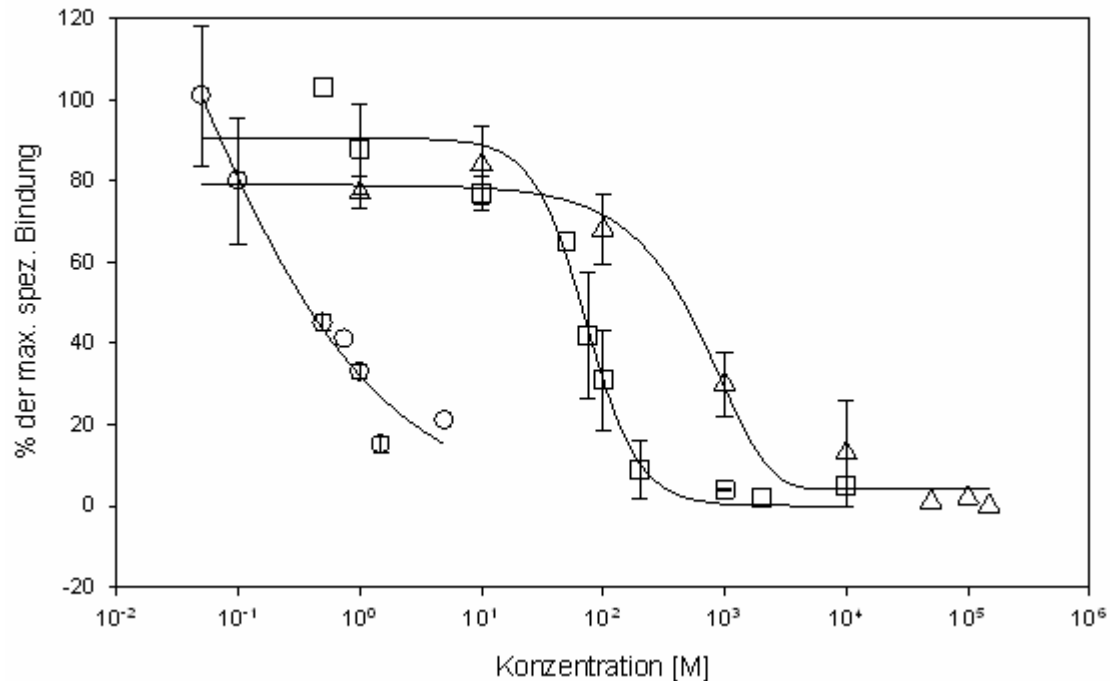


Abb. 15: Kompetitive Verdrängung von ³H-DHT (0,5 nM) vom Androgenrezeptor durch DHT (○), CPA (□) und CP (Δ), Mittelwerte aus vier Experimenten (je n=3).

3.4.2 Untersuchung zur antiandrogenen Wirkung an SZ95 Zellen

Antiandrogene binden an den nuklearen Androgenrezeptor und verdrängen kompetitiv 5 α -DHT. In Folge dessen kommt es u.a. zur Hemmung der Sebozytenproliferation. Die antiandrogenbedingte Wachstumshemmung von CPA und CP sowie vergleichend die des nichtsteroidal Antiandrogenen RU 58841 und seinen Prodrug RUM sollte an der Sebozytenzelllinie SZ95 anhand des Thymidineinbaus untersucht werden. SZ95 ist eine humane Sebozytenzelllinie, die in den wesentlichen Merkmalen mit den Eigenschaften der primären Sebozytenkultur übereinstimmt und sich zur Prüfung auf eine potenzielle Wirkung bei Akne eignet (Zouboulis et al., 1999).

Als erstes wurde eine Konzentration an 5 α -DHT gesucht, die eine signifikante Proliferation der SZ95 Zellen auslösen kann. Im FKS-freien Medium konnte jedoch kein

Einfluss von DHT auf das Zellwachstum festgestellt werden. Die Zellen zeigten 5 Tage nach Exposition gegenüber 5α -DHT (10^{-12} - 10^{-5} M) eine sehr schlechte Morphologie mit Zerfall der Zellkolonien und Zelltod und der Thymidineinbau schwankte erheblich.

Im weiteren wurde FKS-haltiges Medium eingesetzt, das die Inkubation über mehr als 14 Tage ermöglichte. Ein Einfluss des DHT auf das Zellwachstum konnte jedoch ebenfalls nicht beobachtet werden. Kälberserum (FKS) stellt eine komplexe Mischung von Serumproteinen, Wachstumsfaktoren und Hormonen dar, welche die Zellproliferation beeinträchtigen könnten (Rosenfield et al., 1998). Der Einsatz eines Aktivkohle behandeltes FKS führte allerdings zu keinem besseren Ergebnis (Abb. 16). Dennoch wurde für alle weiteren Zellversuche aktivkohlebehandeltes FKS eingesetzt.

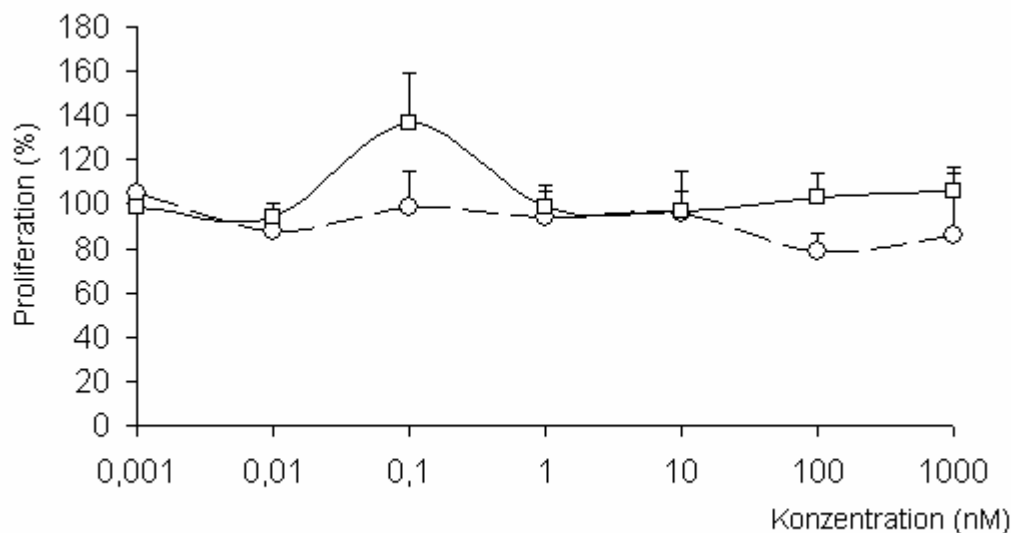


Abb. 16: Unveränderte Proliferation der Sebozytenzelllinie SZ95 (Einbau von Thymidin) unter dem Einfluss von 5α -DHT, in normalem FKS (○), in aktivkohlebehandeltem FKS (□) nach 16 Tagen, als 100 % wurde die Proliferation mit Lösungsmittel behandelten Zellen gesetzt (Mittelwert \pm SD, $n=5$)

Im Folgenden sollte eine Hemmung der (5α -DHT-abhängigen) Proliferation der SZ95 Zelllinie durch Antiandrogene mit dem Thymidinassay untersucht werden. Es wurden zwei Konzentrationen von DHT ausgewählt, die im vorherigen Experiment eine schwache Wachstumsförderung zeigten (10^{-10} M) bzw. in der Literatur als proliferationsfördernd beschrieben wurde (Zouboulis et al., 1999). Doch wurde die

Proliferation der Sebozytenzelllinie SZ95 weder durch 5α -DHT noch durch CPA, RU 58841 und RUM beeinflusst (Abb. 17).

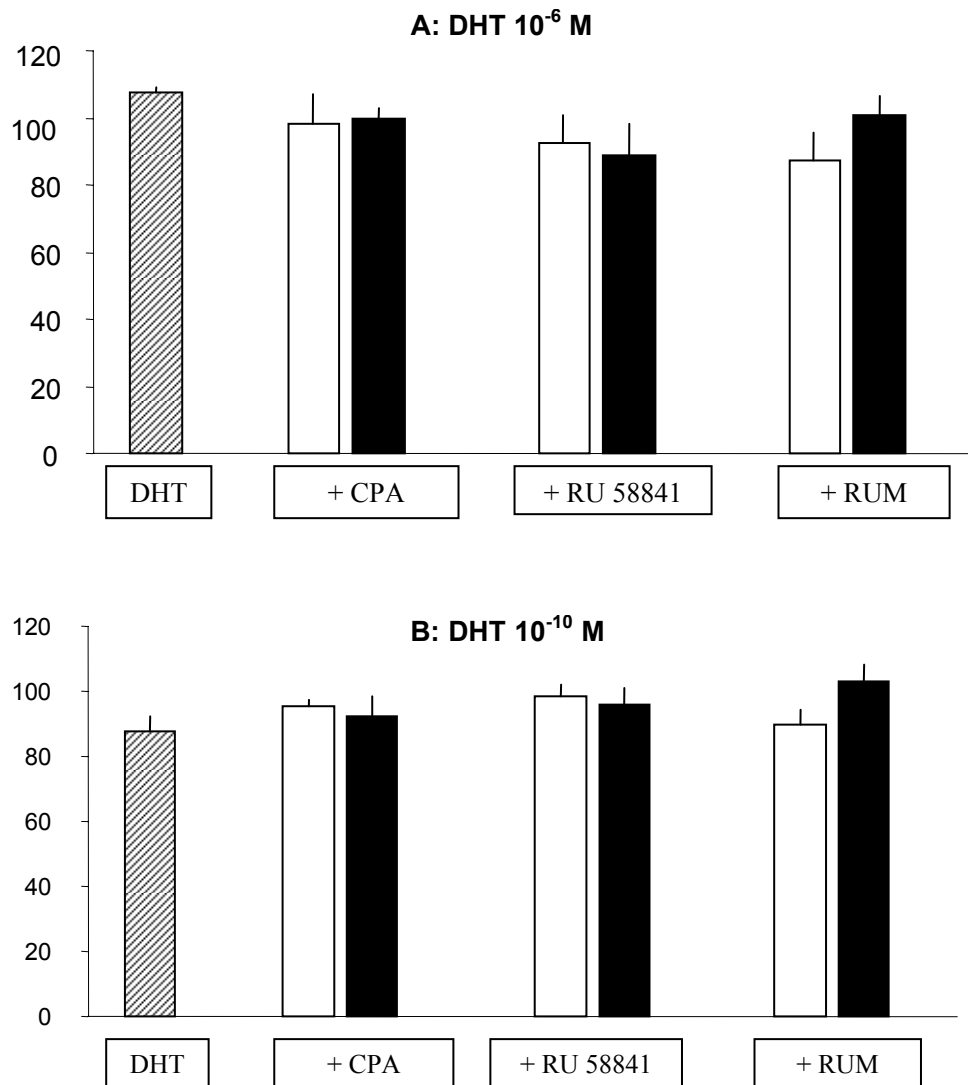


Abb. 17: Proliferation (%) der SZ95 Zelllinie unter dem Einfluss von DHT 10^{-6} M und 10^{-10} M (gestreifte Säule) und DHT plus Antiandrogene CPA, RU 58841 und RU 58841-myristat (RUM) 10^{-6} M (offene Säule) und 10^{-7} M (geschlossene Säule) nach 10-tägiger Inkubation (Mittelwert \pm SD aus drei Experimenten, je $n=3$).

3.4.3 Expression des Androgenrezeptors bei SZ95 Zellen

Die Unempfindlichkeit der Proliferation von SZ95 Zellen gegenüber Androgenen und Antiandrogenen weist darauf hin, dass androgenrezeptorabhängige Signalwege bei der Proliferation der Sebozytenzelllinie wenig bedeutsam sind. Mögliche Gründe dafür

könnten eine verminderte Expression des Androgenrezeptors oder eine Störung im Signalweg sein. Diese Hypothese wurde in einem Rezeptorbindungsassay, mittels Western Blot- und PCR-Analytik überprüft.

Rezeptorbindungstudie. In einem Verdrängungsexperiment sollte der IC_{50} -Wert von DHT bei SZ95 bestimmt werden.

SZ95 Zellen wurden in einer 24-Loch-Platte in SGM ausgesät und bis zur Konfluenz von 90-95 % inkubiert. Nach 2-3 Tagen wurde SBM zugegeben. Zur Ermittlung der Gesamtbindung des Tracers wurden die Zellen mit 3H -DHT in Konzentration von 0-8 nM zugesetzt. Die Ermittlung der unspezifischen Bindung erfolgte parallel durch Inkubation von 3H -DHT in Gegenwart eines 500-fachen Überschusses an unmarkiertem DHT. Die spezifische Bindung ergibt sich aus der Differenz der Gesamtbindung und der unspezifischen Bindung. Da beide Kurven fast deckungsgleich verlaufen (Abb. 18), konnte keine Dissoziationskonstante bestimmt werden. Dieses Ergebnis deutet auf einen Verlust der Expression des Androgenrezeptors hin.

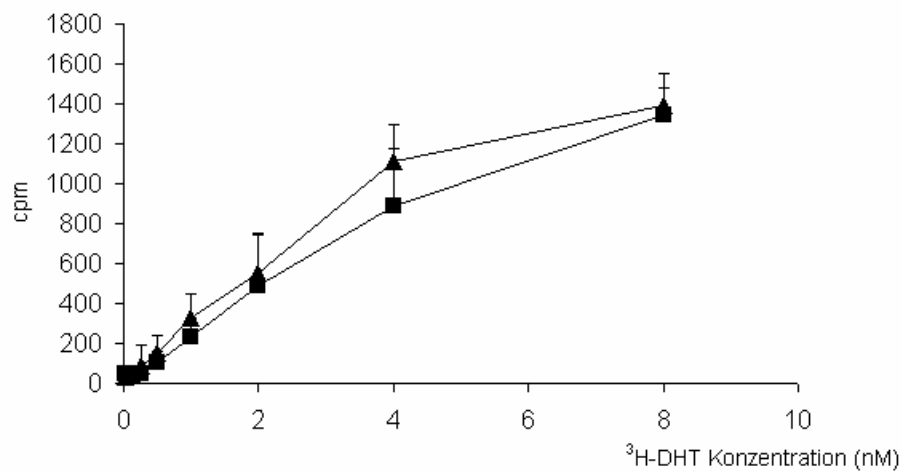


Abb. 18: Rezeptorbindung von 3H -DHT in SZ95 Zellen. Zur Ermittlung der Gesamtbindung (▲) wurden die Zellen mit steigenden Konzentrationen an 3H -DHT inkubiert. Zur Erfassung der unspezifischen Bindung (■) erfolgte ein Zusatz von 500fachem Überschuss an unmarkiertem DHT (Mittelwert \pm SD, $n=3$), doch die spezifische Bindung (Differenz Gesamtbindung- unspezifische Bindung) konnte daraus nicht errechnet werden.

Zur Bestätigung dieses Sachverhalts wurden die SZ95 Zellen mit ^3H -DHT in Konzentration von 4 nM in der Gegenwart von unmarkiertem DHT inkubiert. Eine Verdrängung fand nicht statt (Abb. 19).

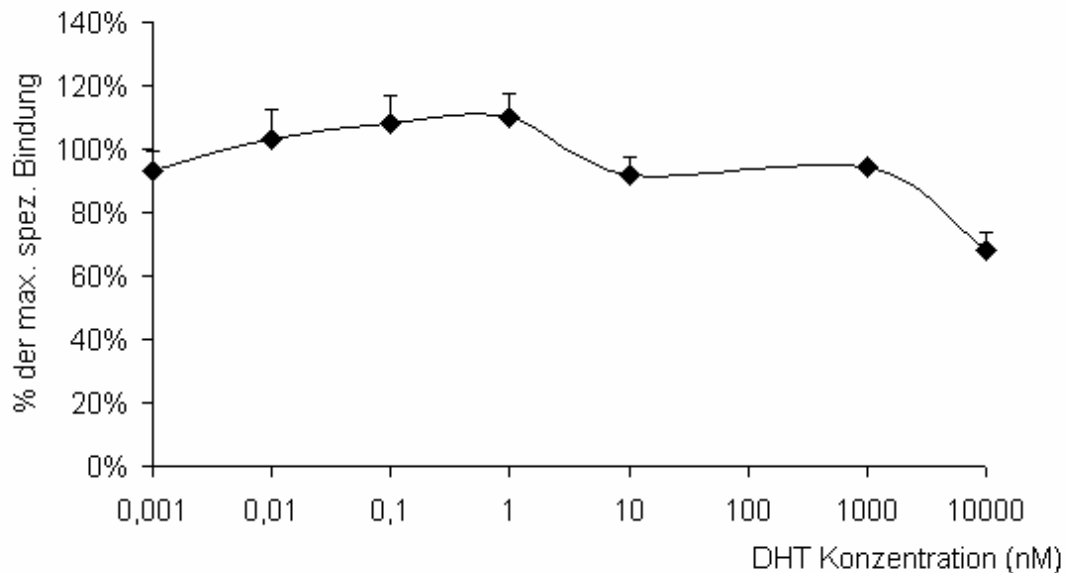


Abb. 19.: Versuch zur Verdrängung des ^3H -DHT (4 nM) vom Androgenrezeptor durch DHT (0,001-10000 nM), als Kontrolle (100 %) wurde ^3H -DHT ohne DHT gesetzt (Mittelwert \pm SD, $n=3$).

Zum direkten Nachweis des Androgenrezeptorproteins in der Sebozytenzelllinie SZ95 wurde die Western-Blot-Analytik gewählt. Als Positivkontrolle dienten GR+/29+ Zellen, als schwach exprimierende Kontrolle primäre humane Keratinozyten (Inui et al., 2000). Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden mit dem primären Antikörper markiert. Nach Bindung des Sekundärantikörpers sollte mittels Chemolumineszenz das AR-Protein sichtbar gemacht werden. Es gelang allerdings nicht, die Bande, die dem Molekulargewicht des Androgenrezeptors von 98 kDa entspricht, deutlich zu identifizieren. In dem gesuchten Bereich band unser Antikörper an mehrere Proteine, war also zu wenig spezifisch (Abb. 20).

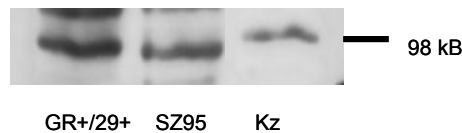


Abb. 20: Detektion von Androgenrezeptor bei SZ95 Zellen mittels WesternBlot. Als Positivkontrolle dienten GR+/29+ Zellen. Da unser Antikörper unspezifisch band, konnte die Präsenz bzw. Absenz vom AR nicht sicher festgestellt werden. Versuch wurde dreimal wiederholt und führte zu gleichen Ergebnissen.

Daher wurde nun mit der PCR Methode auf die Bildung der Androgenrezeptor-mRNA in SZ95 Zelllinie geprüft. Als Positivkontrolle dienten wiederum GR+/29+Zellen, als schwach exprimierende Kontrolle primäre Keratinozyten.

Es zeigte sich, dass unter diesen Zellkulturbedingungen SZ95 Zellen keine Androgenrezeptor-mRNA bilden. GR+/29+ Zellen zeigten eine starke Bildung, Keratinozyten –wie erwartet - keine (bzw. eine sehr schwache, Abb. 21).

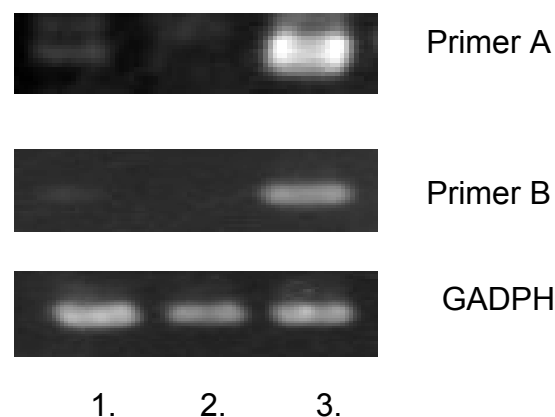


Abb. 21: PCR Analyse der mRNA-Expression des Androgenrezeptors in der Sebozytenzelllinie SZ95. Bande 1: Keratinozyten, Bande 2: SZ95, Bande 3 GR+/29+

3.5 Partikuläre Arzneistoffträger

3.5.1 Rezepturentwicklung

Solid Lipid Nanopartikel. SLN wurden mit den Lipiden Compritol[®] und Precirol[®] unter Zusatz von Poloxamer 188 (2,5 %) bzw. Polysorbat 80 (2,5 %) als stabilisierendes Tensid mittels Hochdruckhomogenisation hergestellt. Bei mit 0,1 % bzw. 0,05 % CPA-beladenen Compritol[®]-SLN wurden unter dem Mikroskop nach 2-3 Tagen Arzneistoffkristalle detektiert. Dagegen zeigten die Proben mit 10 % Precirol eine wesentlich bessere Stabilität. Kristallbildung und Veränderung der Konsistenz wurden erst nach 2 Wochen beobachtet. Als optimal erwies sich die CPA-Konzentration von 0,05 %. Die Verwendung von Polysorbat 20 mit Precirol[®] führte allerdings zu einer Gelierung der SLN-Dispersionen noch am Tag der Herstellung. Für Untersuchungen mit fluoreszenzmarkierten SLN wurden nilrotbeladene Partikel hergestellt. Alle untersuchten SLN-Rezepturen sind in Tab. 5 zusammengefasst.

Tensid	Lipid		Wirkstoff	Rekristallisation (innerhalb von 7 Tagen nach der Herstellung)
	Compritol [®] (%)	Precirol [®] (%)		
Poloxamer 188 2,5 %	10		0,05	+
	5		0,05	+
	10		0,1	+
	5		0,1	+
		10	0,05	-
		5	0,05	+
		10	0,1	+
		5	0,1	+
			Nilrot (%)	
			10	0,004
Polysorbat 80 2,5 %		10	0,05	-

Tab. 5: SLN Rezepturen

NLC Rezepturen. Da die Stabilität der CPA-beladenen SLN nicht zufriedenstellend war, sollte durch Zusatz von einem flüssigen Lipid die Löslichkeit von CPA in der Lipidphase erhöht und dadurch die Rekristallisation des Wirkstoffs vermieden werden. Als flüssige Lipide wurden Miglyol® 812 (NLC-M) und Ölsäure (NLC-O) eingesetzt.

Wie im Falle der SLN wurden in NLC-Proben mit Compritol® unter dem Lichtmikroskop nach 3 Tagen Wirkstoffkristalle beobachtet. Deswegen erfolgte die weitere Herstellung von NLC nur noch mit Precirol®. NLC mit Precirol® sind stabiler als SLN. Es wurde tatsächlich eine bessere Stabilität von 0,05 % CPA-beladenen NLC im Vergleich zu SLN erreicht. Die Rekristallisation des CPA erfolgte bei NLC-O erst 5 Wochen nach der Herstellung und die Konsistenz war über diesen Zeitraum unverändert. NLC-M Zubereitung war sogar noch nach 8 Wochen kristallfrei und flüssig. Miglyolhaltige NLC haben sich als stabil herausgestellt. In Tab. 6 sind alle hergestellten Rezepturen aufgeführt.

Tensid	Festes Lipid 8 %		Flüssiges Lipid 2 %		Wirkstoff (%)	Rekristallisation (innerhalb von 7 Tagen nach der Herstellung)
	Precirol®	Compritol®	Ölsäure	Miglyol		
Poloxamer 188 2,5 %					CPA	
		+		+	0,05	+
		+		+	0,1	+
	+			+	0,05	-
	+			+	0,1	+
		+	+		0,05	+
		+	+		0,1	+
	+		+		0,05	-
	+		+		0,1	+
						Nilrot (%)
					0,004	-
Polysorbat 80 2,5 %	+		+		0,05	-

Tab. 6: NLC Rezepturen

Mikropartikel. Mikropartikel wurden mit Precirol[®] und Precirol[®]/Ölsäure (8:2) hergestellt. Um eine optimale Partikelgröße zu erzeugen, wurden zunächst wirkstofffreie Zubereitungen 1, 3 und 5 min bei 8000, 9500 und 13500 Umdrehungen/Min mit einem Ultra-Turrax hergestellt. Mikropartikel mit Precirol[®] zeigten weder nach 7 noch nach 14 Tagen eine Rekristallisation. Der Zusatz von Ölsäure führte 1 Tag nach der Herstellung zur Verfestigung des Systems und die Entstehung von Kristallen wurde deswegen nicht weiter untersucht. Tab. 7 zeigt die Zusammensetzung der Mikropartikel-Zubereitungen.

Tensid	Festes Lipid Precirol (%)	Flüssiges Lipid Ölsäure (%)	Wirkstoff CPA (%)	Rekristallisation (innerhalb von 7 Tagen nach der Herstellung)
Poloxamer 188 2,5 %	10		-	-
	8	2	-	n.u.
	10		0,05	-
	8	2	0,05	n.u.

Tab. 7: Mikropartikel-Zubereitungen

Nanoemulsion. Zusätzlich wurden Nanoemulsionen hergestellt, wobei das feste Lipid durch Miglyol[®] 812 oder Ölsäure ersetzt wurde. Beide Zubereitungen waren physikalisch stabil, auch 4 Monate nach der Herstellung waren keine Kristalle unter dem Lichtmikroskop sichtbar. Die genaue Zusammensetzung ist in der Tab. 8 angegeben.

Tensid	Flüssiges Lipid 10 %		Wirkstoff (%)	Rekristallisation (innerhalb von 7 Tagen nach der Herstellung)
	Ölsäure	Miglyol	CPA	
Poloxamer 188 2,5 %		+	0,05	-
	+		0,05	-

Tab. 8: Nanoemulsionen Rezepturen

Creme. Für Penetrationsversuche wurde eine Vergleichszubereitung benötigt. Da keine halb feste CPA-haltige Zubereitung zur topischen Applikation im Handel verfügbar ist, wurde eine 0,05 % CPA-haltige Creme aus einer Basiscreme DAC (Cremor basalis) hergestellt.

In Hautversuchen wurden 0,05 % CPA-haltige SLN-Zubereitungen mit 10 % Precirol[®], NLC-O mit 10 % Precirol[®]/Ölsäure (8:2), NLC-M mit 10 % Precirol[®]/Miglyol 812 (8:2) und Mikropartikel mit 10 % Precirol[®] getestet, da die physikalisch stabil waren. Zusätzlich wurde die Nanoemulsion mit 10 % Miglyol und Creme als Vergleich eingesetzt. Alle Zubereitungen (bis auf Creme) wurden mit 2,5 % Poloxamer 188 stabilisiert.

3.5.2 Charakterisierung der partikulären Arzneistoffträgersystemen

Gehaltsbestimmung. Bei allen für Penetrationsversuche vorgesehenen Präparationen wurde der deklarierte Gehalt an CPA mittels HPLC überprüft. Abgesehen von der mikropartikulären Zubereitung lagen die CPA-Konzentrationen im Bereich von 99,75 ≤ 107,2 % (Tab. 9).

Präparation	Gefundene Menge (%)
Creme	106,7 ± 5,69
NE	99,5 ± 11,64
SLN	97,5 ± 11,32
NLC-O	102,7 ± 4,11
NLC-M	107,2 ± 5,06
MS	111,0 ± 2,58

Tab. 9: Gehaltsbestimmung (durchgeführt mit drei Chargen jeder Zubereitung, je n=3, Mittelwerte ± SD)

Größe und Größenverteilung der Nanopartikel. Alle nanopartikulären Zubereitungen (SLN, NLC-O, NLC-M, NE) zeigten Partikelgröße im Bereich zwischen 200-250 nm und einen Polydispersitätsindex zwischen 0,15 und 0,2. Bis zur Prüfung der Hautpenetration/-

permeation kam es zu keiner erkennbaren Veränderung der Partikelgröße durch Aggregation (Abb. 22).

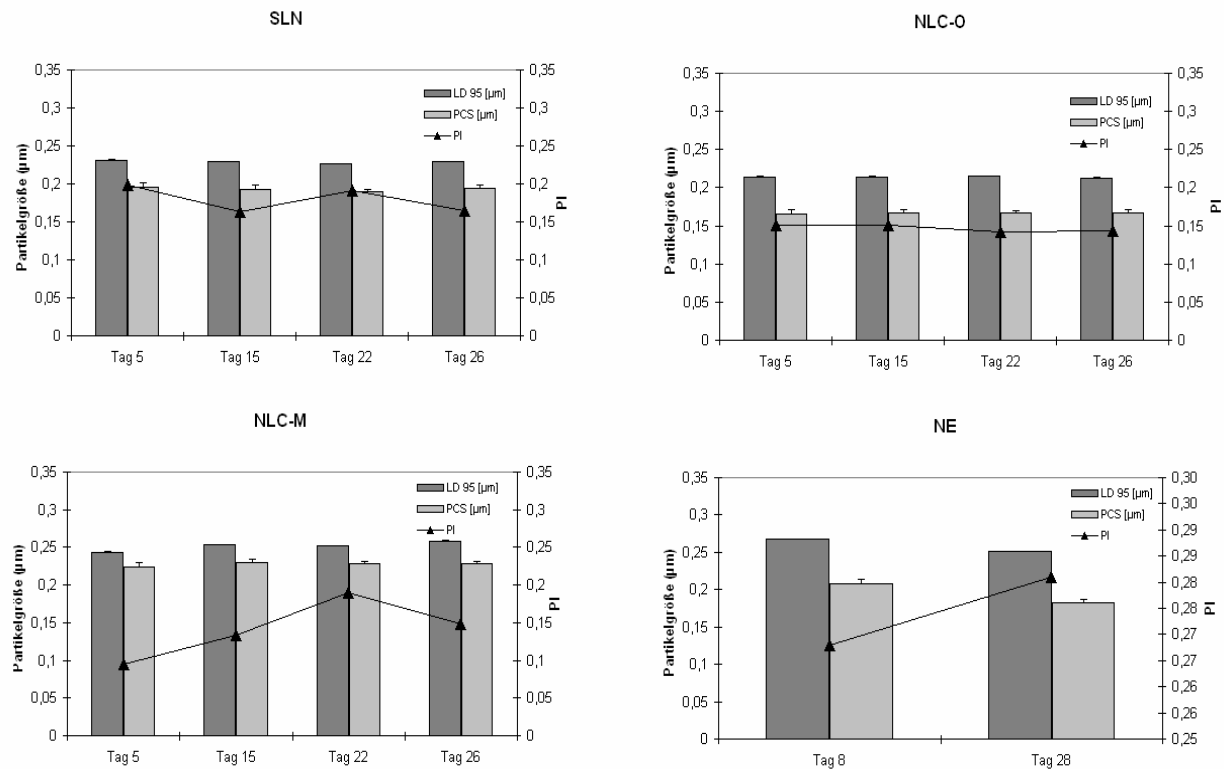


Abb. 22: Partikelgröße der Dispersionen, dargestellt ist der Partikeldurchmesser (PCS), Polydispersitätsindex (PI) und LD 95 % von jeweils einer Charge (\pm SD). Es wurden von jeder Zubereitung drei Chargen mit ähnlichen Ergebnissen untersucht

Größe und Größenverteilung der Mikropartikeln. Mikropartikel mit Precirol[®] zeigten eine Zeit- und Drehzahl-abhängige Partikelgröße (Abb. 23) mit einer unimodalen Partikelgrößenverteilung. Allerdings neigten Proben mit einer Partikelgröße ab $6 \mu\text{m}$ zu einer ausgeprägten Sedimentation und mussten daher vor jeder Messung kurz aufgeschüttelt werden. Zwei Wochen nach der Herstellung war die Partikelaggregation sehr stark ausgeprägt und die Partikelgröße lag zwischen 10 und $20 \mu\text{m}$.

Mikropartikel-Dispersionen mit Zusatz von Ölsäure zeigten noch am Tag der Herstellung (oder 1 Tag danach) eine sehr dickflüssige Konsistenz und mussten bei der Messung mit destilliertem Wasser verdünnt werden. Die Partikelgröße war von der Zeit bzw. der Drehzahl unabhängig, die Partikelgrößenverteilung lag im Bereich von 0 bis $200 \mu\text{m}$ (Daten nicht gezeigt).

Für weitere Untersuchungen wurden Mikropartikel mit dem Durchmesser von 6-7 μm (LD 95 %, 3 Min bei 8000 U/Min) mit 0,05 % CPA hergestellt (Zusammensetzung siehe Tab. 7).

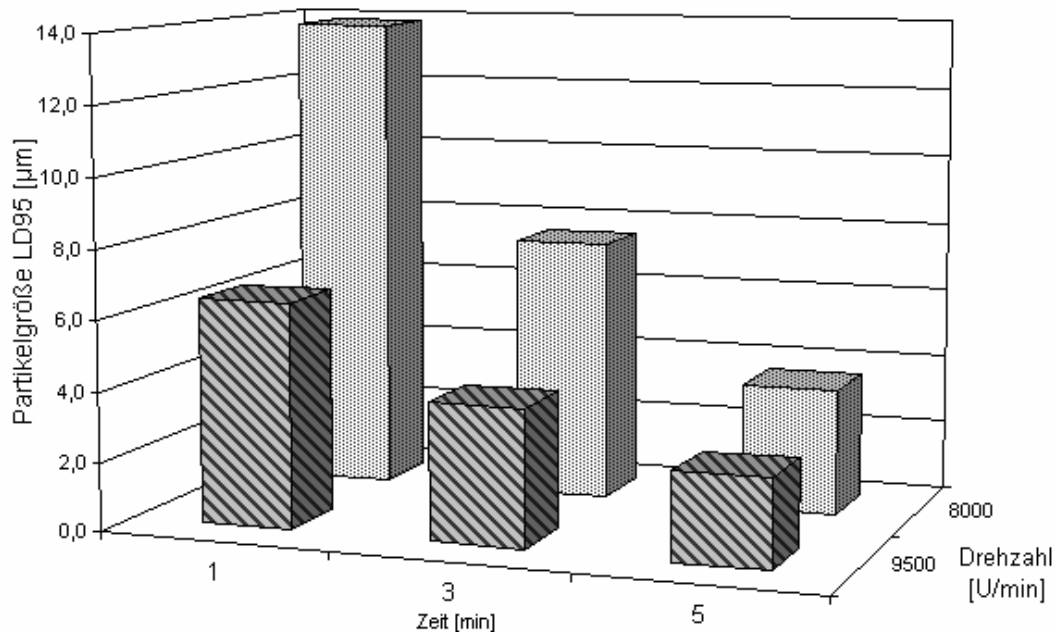


Abb. 23: Partikelgröße von wirkstofffreien Mikropartikeln mit 10 % Precirol[®] in Abhängigkeit von Zeit und Drehzahl 1 Tag nach der Herstellung ($n=3$, $SD \leq 1,76$)

Kristallinität. In thermoanalytischen Diagrammen sowohl von wirkstoffbeladenen SLN, NLC, MS als auch in den entsprechenden wirkstofffreien Zubereitungen ist ein Schmelzpeak von Precirol[®] zu erkennen, wodurch belegt wird, dass in den Zubereitungen feste Lipidpartikel vorliegen (Abb. 24).

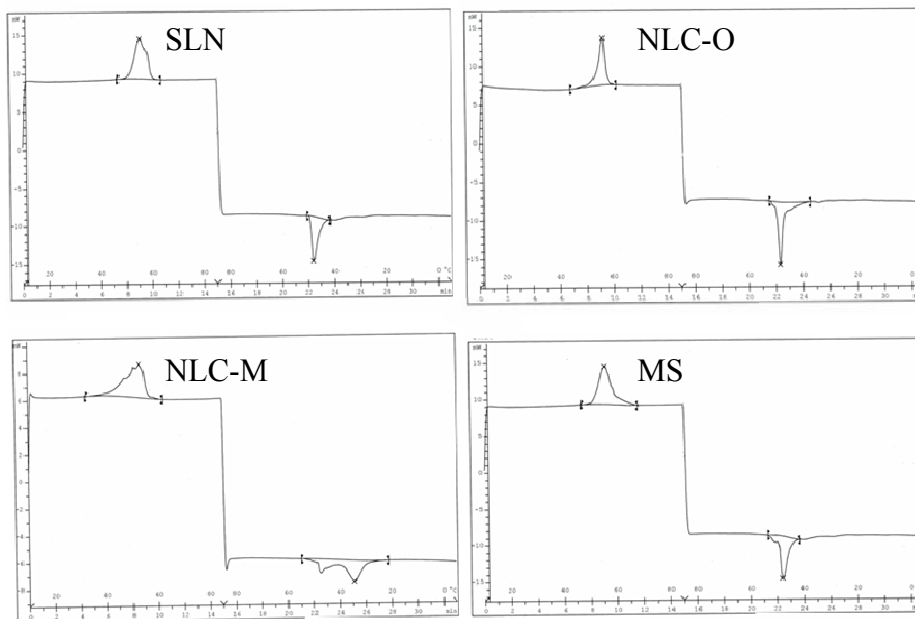


Abb. 24: DSC-Spektrum von precirolbasierten partikulären Zubereitungen beladen mit 0,05 % CPA

Prüfung auf Kristallisation und Rekristallisation. Lichtmikroskopische Bilder der SLN bzw. NLC-O Dispersion zeigten Rekristallisation des Wirkstoffes zwei bzw. vier Wochen nach der Herstellung, NLC-M waren bis zu acht Wochen nach der Herstellung kristallfrei. In der MS Zubereitung waren zwei Wochen nach der Herstellung keine CPA-Kristalle detektierbar, ab der zweiten Woche waren weitere Untersuchungen wegen einer starken Partikelaggregation nicht mehr möglich (Abb. 25).

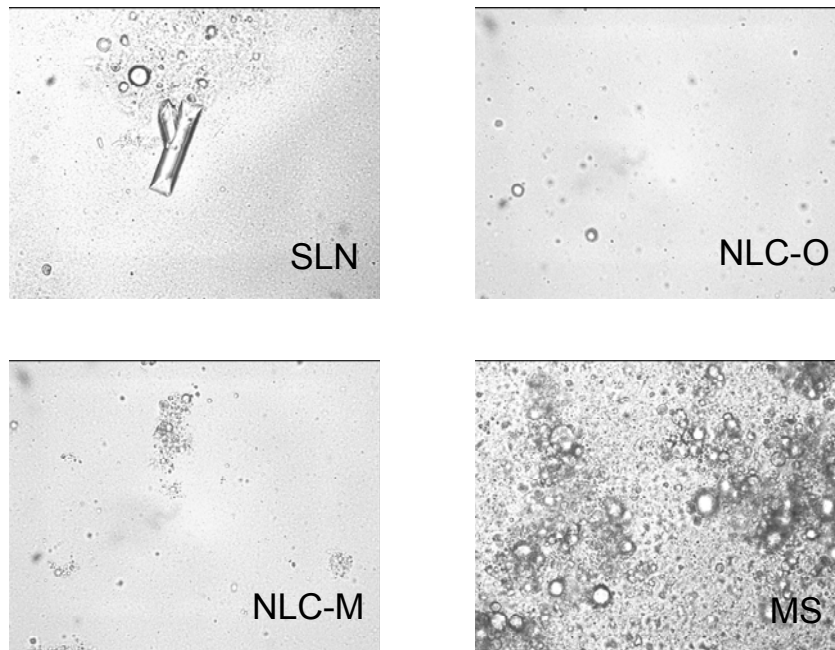


Abb. 25: Lichtmikroskopische Aufnahmen partikulären Zubereitungen (beladen mit 0,05 % CPA) 2 Wochen nach der Herstellung: SLN mit sichtbaren CPA-Kristallen, NLC-O, NLC-M und MS ohne Wirkstoffkristalle.

Phasentrennung. Um die Beladung der Lipidpartikel mit CPA zu untersuchen, wurden die festen Partikel von der Wasserphase mit einem Filter der Porenweite 0,22 μm abgetrennt. Durchschnittlich 0,42 % der eingesetzten CPA- Menge wurden im wässrigen Filtrat gefunden (Tab. 10). Dies deutet auf eine sehr hohe Beladung (evtl. > 99 %) bei allen geprüften Systemen hin.

Präparation	Gefundene Menge (%)
NE	0,83 \pm 0,27
SLN	0,52 \pm 0,05
NLC-O	0,45 \pm 0,08
NLC-M	0,20 \pm 0,03
MS	0,12 \pm 0,01

Tab. 10: CPA-Gehalt in der Wasserphase ermittelt bei jeweils drei Chargen (\pm SD) innerhalb von 7 Tagen nach der Herstellung

Rasterelektronenmikroskopie. Die REM-Aufnahmen zeigen die Struktur der NLC-O-Dispersion nach Entfernung des Wasseranteiles. Zu erkennen sind Partikel im Größenbereich von 300-600 nm (Abb. 26).

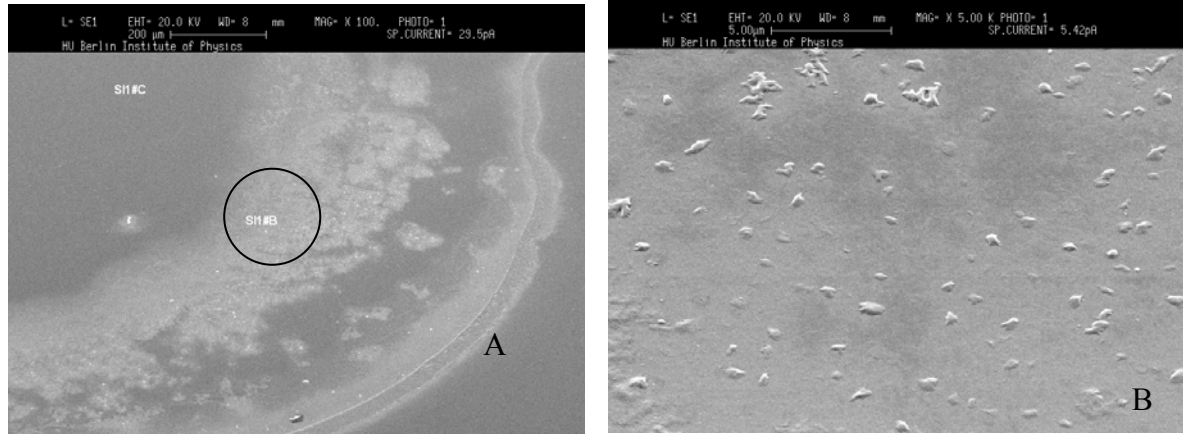


Abb. 26: REM Aufnahmen von NLC-O (Bild B zeigt den Ausschnitt aus dem Bild A)

Parelelektrische Spektroskopie. Die Interaktion zwischen dem Wirkstoff und den Partikeln wurde mittels Parelektrischer Spektroskopie untersucht. Es wurden vier partikuläre Systeme untersucht; SLN, NLC-O, NLC-M und MS. Innerhalb von zwei Jahren wurden bis zu drei Chargen pro Konzentration hergestellt und gemessen. Die konzentrationsabhängige Veränderung der Dipoldichte $\Delta\epsilon$ (c) und Beweglichkeit f_0 (c) ist in der Abb. 27 dargestellt. Niedrigere Werte der Beweglichkeit f_0 resultieren in entsprechend erhöhten $\Delta\epsilon$ Werte, daher kann Gleichartigkeit der Systeme als gegeben angesehen werden. Die leichte Abnahme der Beweglichkeit f_0 (c) mit steigender CPA-Konzentration und keinem Maximum bei den MS und NLC (NLC-M und NLC-O) Zubereitungen weist deutlich auf eine Inkorporation des CPA in der Lipidmatrix hin. Dagegen wird bei beiden Serien von unabhängig hergestellten SLN Zubereitung ein Maximum bei der Konzentration von 0,05 % gemessen, das kann als Adsorption des CPA an die Partikeloberfläche interpretiert werden.

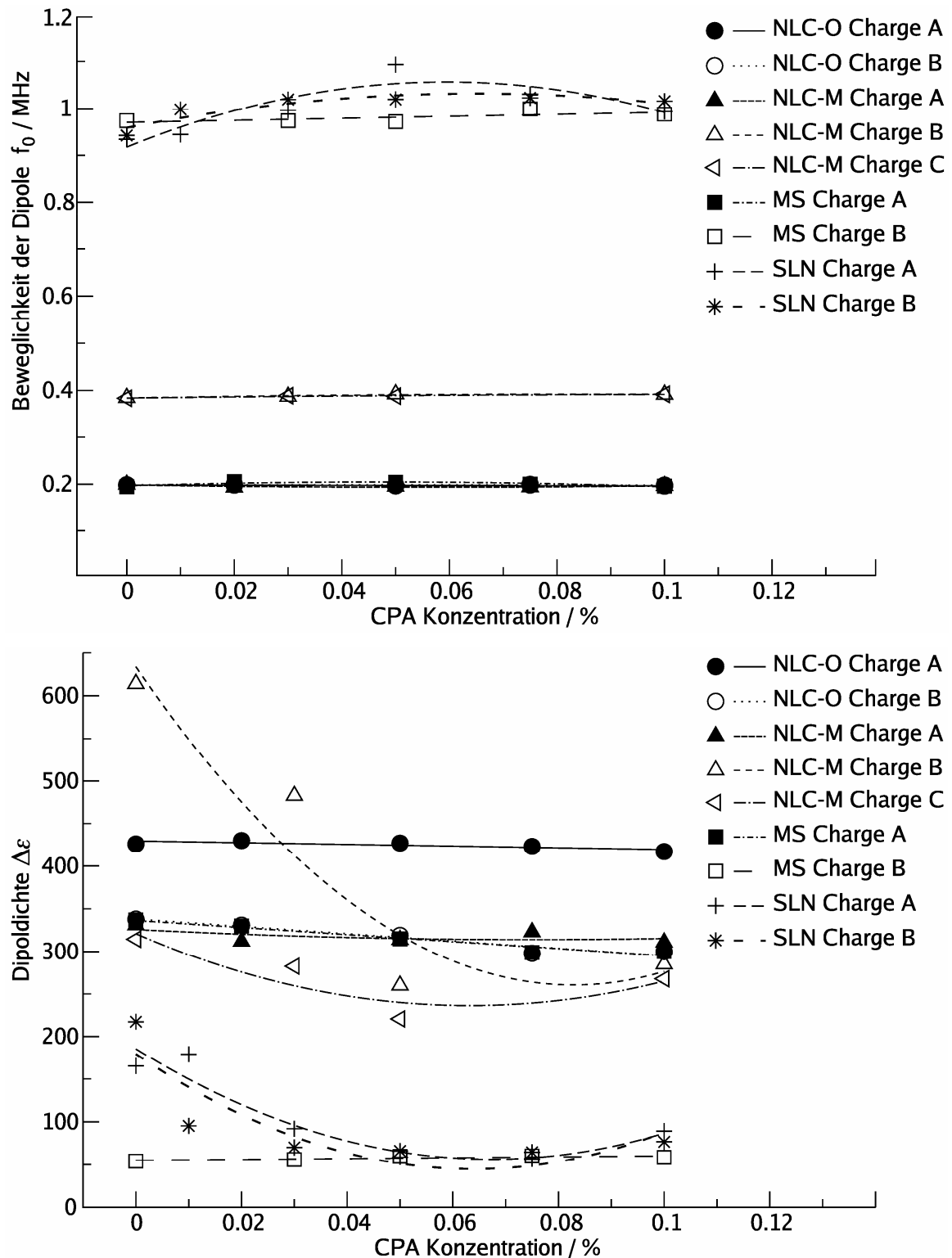


Abb. 27: Ergebnisse der Paralelektrischen Spektroskopie: Die von der CPA-Konzentration unbeeinflusste Dipolbeweglichkeit der NLC-O, NLC-M und MS Zubereitungen ist mit der Inkorporation von CPA in die Lipidmatrices erklärbar, parabolischer Verlauf der Kurven der SLN Präparation deutet auf Assoziation des CPA mit der Partikeloberfläche hin

3.6 Kutane Resorption

Das Antiandrogen CPA wird seit vielen Jahren in der systemischen Therapie der androgenetischen Alopezie und Akne der Frau eingesetzt. Unerwünschte Wirkungen schließen allerdings die Anwendung beim Mann aus, obgleich ein Antiandrogen vor allem beim Mann sehr gut wirksam sein sollte. Deshalb wäre es wünschenswert, eine topische Applikation zu entwickeln, die eine gute Aufnahme in die Haut bzw. in die Haarfollikel und in die Talgdrüse ermöglicht, ohne eine systemische Antiandrogenwirkung auszuüben.

Um die Beeinflussung der Hautpenetration/-permeation durch Trägersysteme mit unterschiedlicher Zusammensetzung und Partikelgröße zu untersuchen, wurden Versuche mit der Franz-Zell-Technik durchgeführt. Experimente mit CPA-beladenen Trägersystemen erfolgten an Humanhaut und vergleichende Tests mit Nilrotbeladenen Zubereitungen an der Haut des Schweineohrs (Lombardi Borgia et al., 2005).

Für diese Versuche wurden precirolhaltige SLN sowie NLC-Dispersionen mit Miglyol oder Ölsäure, eine Nanoemulsion und Mikropartikel ausgewählt. Die Zusammensetzung dieser Zubereitungen ist in Tab. 11 aufgeführt. Um den Einfluss der großen interindividuellen Variabilität der Hautaufnahme der einzelnen Spender zu verringern, wurde in jeder Versuchsserie gleichzeitig Basiscreme mit 0,05 % CPA als Standardzubereitung eingesetzt und die penetrierte Wirkstoffmenge aller Zubereitungen zu den mit der Basiscreme erhaltenen Ergebnissen ins Verhältnis gesetzt.

Zubereitung	Zusammensetzung
SLN	Precirol 10 % Poloxamer 188 2,5 %
NLC-O	Precirol 8 % Ölsäure 2 % Poloxamer 188 2,5 %
NLC-M	Precirol 8 % Miglyol 2 % Poloxamer 188 2,5 %
NE	Miglyol 10 % Poloxamer 188 2,5 %
MS	Precirol 10 % Poloxamer 188 2,5 %

Tab. 11: Zusammensetzung der SLN, NLC, NE und MS. Alle Zubereitungen enthalten 0,05 % CPA

3.6.1 Penetration und Permeation bei intakter Haut

Für in-vitro-Untersuchungen der kutanen Penetration und Permeation wird exzidierte Humanhaut bevorzugt, da die Barriere gegenüber der in vivo-Struktur prinzipiell gleich ist.

Erste Penetrationsversuche erfolgten an frischer Haut, die sofort nach der Operation für den Versuch eingesetzt wurde. So wurde nochmal überprüft, ob eine kutane Metabolisierung stattfindet, auch wenn diese in Untersuchungen an Zellkulturen nicht beobachtet wurde. Auch in frischer humaner Haut waren keine Spaltprodukte wie CP oder Oxidationsprodukte wie 15 β -OH-CPA nachweisbar.

Deshalb wurden die weiteren Versuche mit kryokonservierter Humanhaut durchgeführt, die gleiche Penetrationseigenschaften wie frische Haut aufweist (Bronaugh et al., 1986; Schreiber et al., 2005). Nach dem Versuch wurde die oberste Schicht des Stratum corneums mittels fünf Klebefilm-Abrissen entfernt. Von der restlichen Haut wurden acht 50 μ m-Schnitte angefertigt und in diesen sowie in den Klebefilm-Abrissen die Menge des penetrierten CPA mit Hilfe der HPLC bestimmt.

Die Penetrationsversuche zeigten eine signifikante Anreicherung von CPA nach der Applikation der SLN (4fache Menge im Vergleich zur Creme), NLC-O (2,7fach), MS (2,6fach) und NLC-M (1,9fach) in den ersten 100 μ m der Haut, die im Wesentlichen das Stratum corneum und lebende Epidermis umfasst (Tab. 13). Die CPA-Konzentrationen in der ersten Hautschicht nach der Applikation der Nanoemulsion unterschieden sich nicht wesentlich von den nach Applikation der Creme (1,4fache Anstieg). SLN führten zur signifikant ($p \leq 0,05$) höheren CPA-Konzentrationen relativ zur Creme im Vergleich zu allen anderen partikulären Zubereitungen mit Ausnahme der Mikropartikel. Ab der zweiten Schicht (100-200 μ m) sank die CPA-Menge bei allen untersuchten Präparationen. Eine bevorzugte Aufnahme in das Korium ist bei keiner Präparation erkennbar. Da der Lipidgehalt der partikulären Zubereitungen niedriger liegt als bei der Creme, die CPA-Penetration aus Creme und Nanoemulsion aber ähnlich verläuft, ist die bessere Aufnahme aus SLN und NLC, die den selben Lipidgehalt wie die NE aufwiesen, deren penetrationsfördernden Wirkung geschuldet. Die CPA-Konzentration in den obersten Schichten des Stratum corneum (bestimmt durch Extraktion der Klebefilm-Abrissen) nach der Applikation der NE und MS überstieg die CPA-Menge in der Schicht 0-100 μ m 2,8 bzw. 2,5mal. Dies deutet auf eine Wirkstoffdepotbildung in der obersten

Hornschicht hin. Nach der Applikation von Creme, SLN, NLC-O sowie NLC-M war die CPA-Menge in den Abrissen ebenso hoch wie in der Schicht 0-100 μm , während bei der Nanoemulsion und bei den Mikropartikeln deutlich mehr Wirkstoff in den Abrissen gefunden wurde. Dies schließt eine Überschätzung der penetrationsfördernden Wirkung durch Verschleppung von CPA aus der obersten Hornschicht in die Tiefe von 0-100 μm aus.

Die insgesamt penetrierten CPA-Mengen (bis in 300 μm) waren 1,56 % der applizierten Dosis bei SLN; 1,37 % bei NLC-O; 1,38 % bei NLC-M; 1,45 % bei NE; 1,02 % bei MS und 0,54 % bei der Creme (Tab. 12). Die CPA-Mengen in der Schicht 300-400 μm lagen teilweise unterhalb der Bestimmungsgrenze.

Der Zusatz des Penetrationsverstärkers Ölsäure hat keinen penetrationsfördernden Effekt gegenüber Miglyol[®] 812-haltigen NLC gezeigt. Die CPA Mengen in der Haut lagen bei beiden NLCs tendenziell sogar noch unter denjenigen aus ausschließlich festen Lipid gebildeten Partikeln. Dies gilt für die erste Hautschicht wie für die Gesamtpenetration in die Haut.

Präparation	% der applizierten Menge					
	0-100 μm	100-200 μm	200-300 μm	300-400 μm	Abrisse	Σ 0-300 μm
Creme	0,18 \pm 0,08	0,12 \pm 0,08	0,05 \pm 0,05	0,07 \pm 0,09	0,18 \pm 0,16	0,54
NE	0,34 \pm 0,19	0,94 \pm 0,05	0,05 \pm 0,05	0,05 \pm 0,05	0,96 \pm 0,58	1,45
SLN	0,65 \pm 0,35	0,16 \pm 0,08	0,11 \pm 0,06	0,08 \pm 0,04	0,64 \pm 0,46	1,56
NLC-O	0,55 \pm 0,26	0,14 \pm 0,07	0,13 \pm 0,14	0,08 \pm 0,04	0,53 \pm 0,49	1,37
NLC-M	0,51 \pm 0,18	0,18 \pm 0,10	0,14 \pm 0,06	0,19 \pm 0,17	0,55 \pm 0,16	1,38
MS	0,27 \pm 0,07	0,05 \pm 0,01	0,03 \pm 0,01	n.u.	0,67 \pm 0,36	1,02

Tab. 12: Absolute CPA-Penetration in die einzelnen Hauschichten, in den Klebefilm-Abrissen und gesamt bis in die Hauttiefe von 300 μm 6 h nach der Applikation von Creme, SLN, NLC-O, NLC-M und MS, (Mittelwert \pm SD, Creme n=7, SLN n=7, NLC-O n=5, NLC-M n=3, NE n=3 und MS n=2 Spender, pro Spender wurden 2-4 Hautproben untersucht)

Präparation	CPA-Penetration im Verhältnis zur Creme				
	0-100 μm	100-200 μm	200-300 μm	300-400 μm	Abrisse
NE	1,42 \pm 0,63	0,72 \pm 0,52	0,87 \pm 0,37	0,54 \pm 0,08	2,86 \pm 1,57
SLN	4,01 \pm 1,56	1,49 \pm 0,68	0,59 \pm 0,52	0,62 \pm 0,32	3,36 \pm 2,35
NLC-O	2,69 \pm 1,01	0,66 \pm 0,53	0,56 \pm 0,12	0,28 \pm 0,07	2,29 \pm 1,39
NLC-M	1,90 \pm 0,65	0,87 \pm 0,90	0,79 \pm 0,79	1,13 \pm 1,36	1,84 \pm 0,55
MS	2,62 \pm 0,79	0,77 \pm 0,52	0,75 \pm 0,03	n.u.	5,34 \pm 1,83

Tab. 13: CPA-Penetration in die einzelnen Hauschichten 6 h nach der Applikation von Lipiddispersionen im Verhältnis zur CPA-Penetration aus der Referenzcreme. Mittlere Verhältnisse (\pm SD) der Penetration aus den Lipiddispersionen relativ zum Mittelwert der Penetration aus der Creme in die Haut diesen Spenders (NE n=3, SLN n=7, NLC-O n=5, NLC-M n=3, MS n=2 Spender; pro Spender wurden 2-4 Hautproben untersucht).

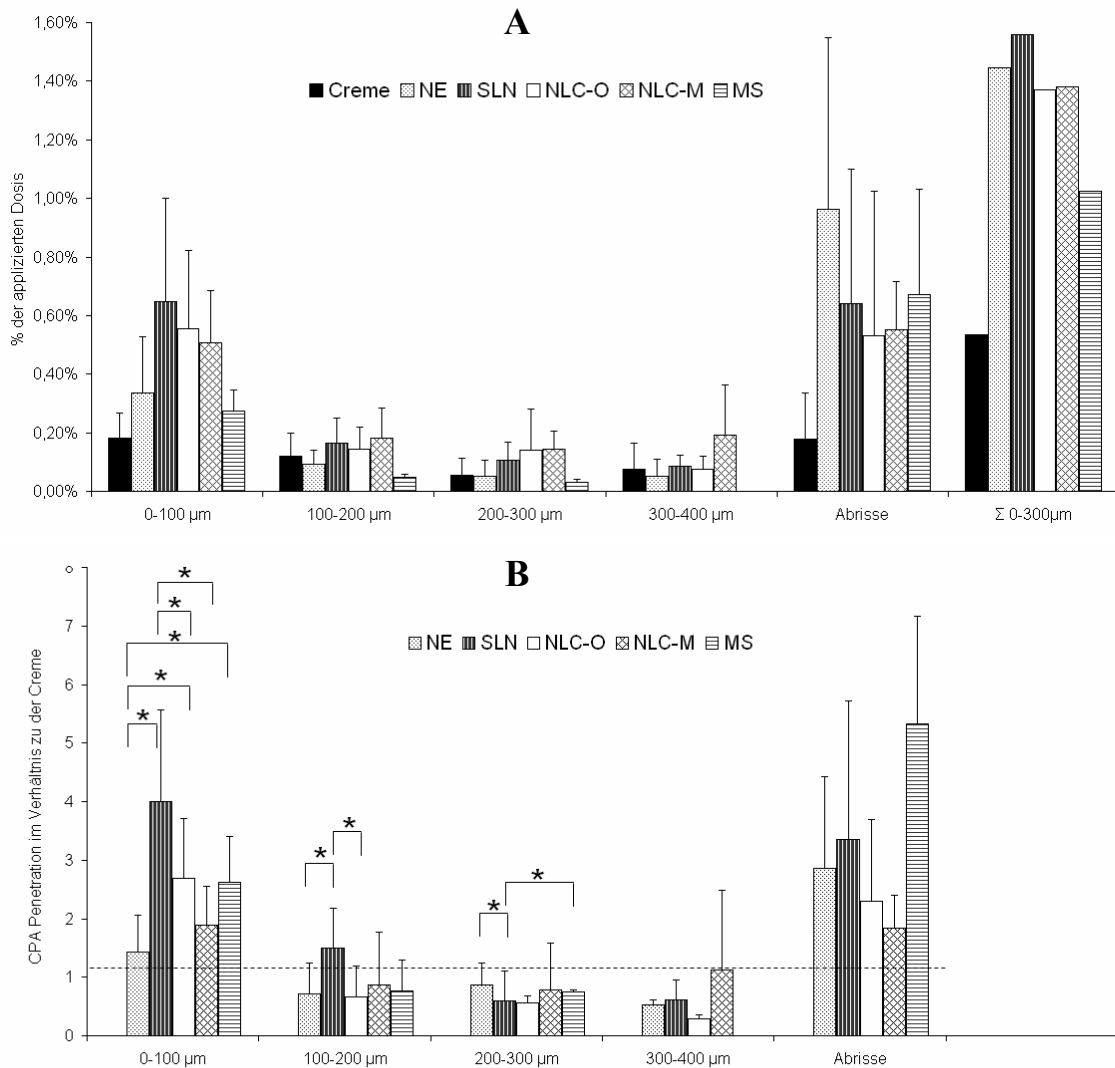


Abb. 28: CPA Penetration in humane Vollhaut 6 h nach der Applikation von SLN, NLC-O, NLC-M, MS und Creme. A: mittlere Penetration (% der applizierten Dosis, \pm SD) in den einzelnen Hautschichten, in 5 Klebefilmabrissen und gesamt bis 300 μ m Hauttiefe. B: mittlere Verhältnisse (\pm SD) der Penetration aus den Lipiddispersionen relativ zum Mittelwert der Penetration aus der Creme in jeweiligen parallelen Tests (Creme $n=7$, NE $n=3$, SLN $n=7$, NLC-O $n=5$, NLC-M $n=3$, MS $n=2$ Spender; pro Spender wurden 2-4 Hautproben untersucht). Signifikante Unterschiede der Penetrationsverhältnissen ($p \leq 0,05$) zwischen der ersten und zweiten Schicht wurden für jede Zubereitung mit Ausnahme von NLC-M festgestellt, in der Schicht 0-100 μ m zeigte sich auch eine Signifikanz der SLN, NLC-O, NLC-M und MS im Vergleich zur Creme, * signifikante Unterschiede der CPA-Verhältnissen relativ zur Creme zwischen den partikulären Zubereitungen innerhalb einer Hautschicht.

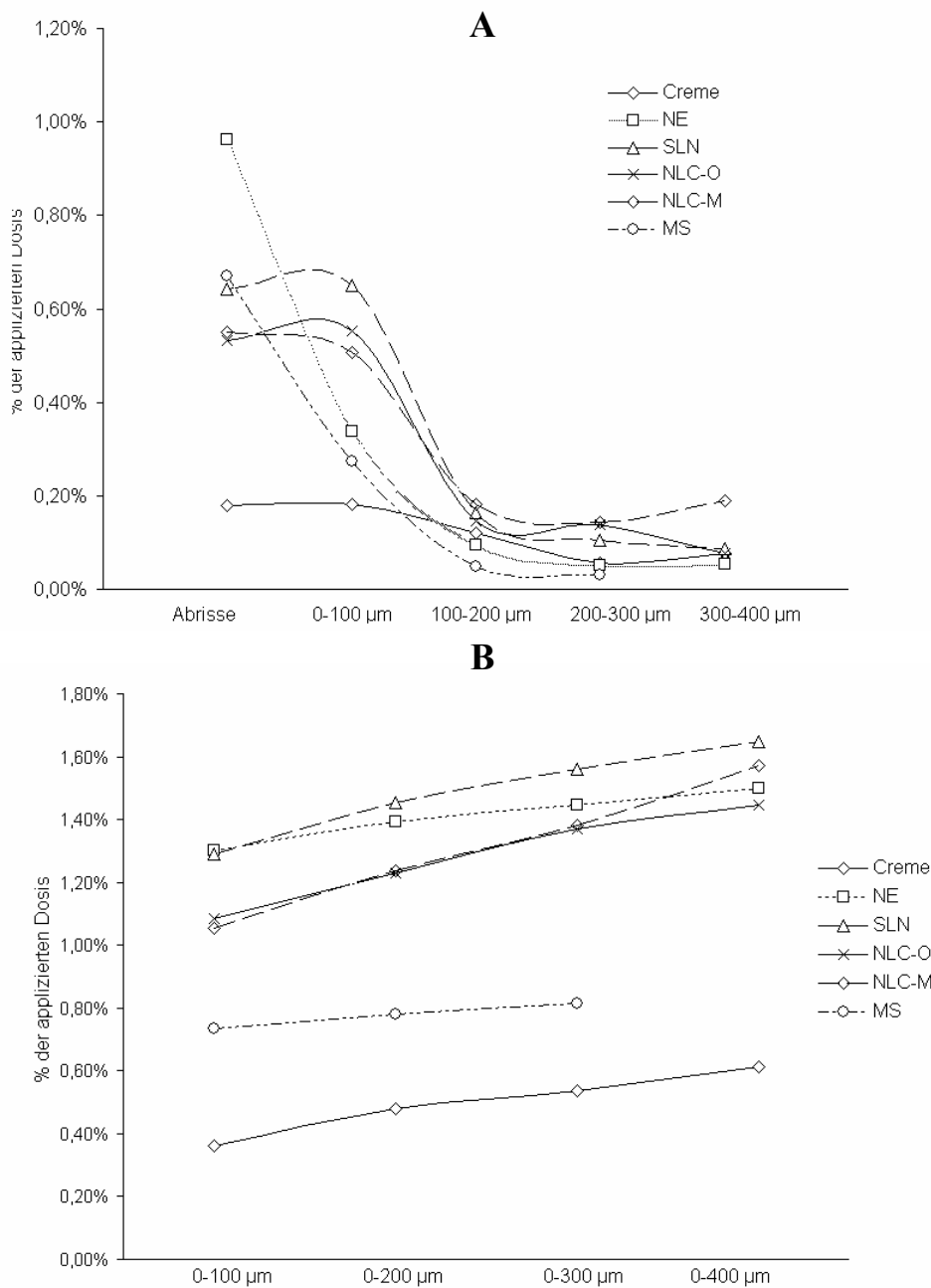


Abb. 29: CPA Penetration in humane Vollhaut 6 h nach der Applikation von SLN, NLC-O, NLC-M, MS und Creme. A: Penetrationsprofil, B: kumulative Darstellung

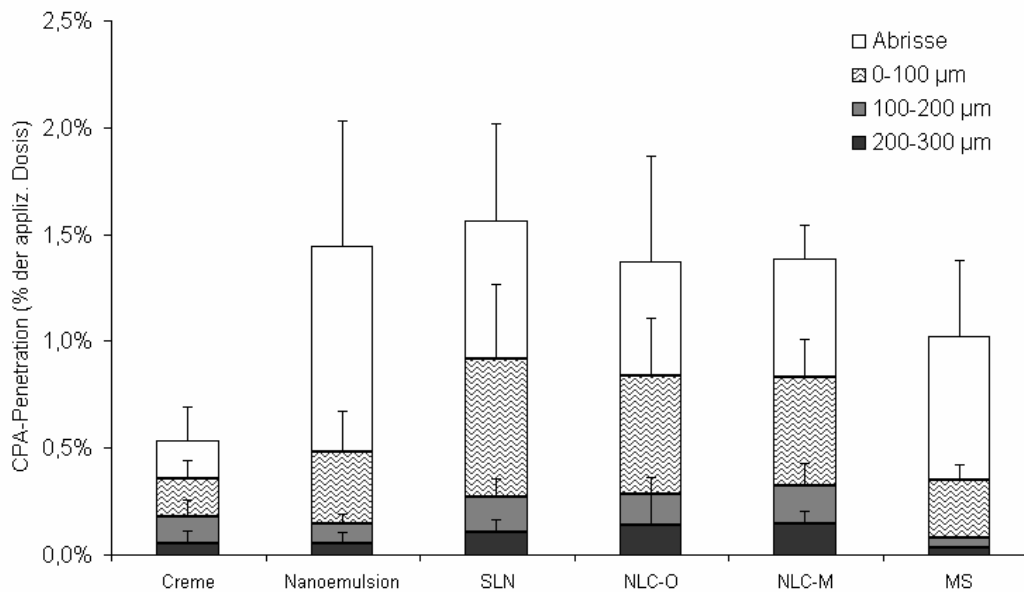


Abb. 30: CPA-Penetrationsprofile der einzelnen Zubereitungen 6 h nach der Applikation auf die Humanhaut.

Die Wirkstoffmenge, die durch die Epidermis hindurch zu dermalen Blutgefäßen und damit in die systemische Blutzirkulation gelangt, ist für das Auftreten möglicher systemischer Nebenwirkungen sehr bedeutsam. Um dieses Risiko bei einer topischen Therapie abzuschätzen, wurden Permeationsversuche mit Spalthaut durchgeführt. Kryokonservierte Humanhaut wurde mit einem Dermatom auf 500 µm geschnitten und für 24 h in einer Franz-Diffusionszelle gegenüber der Präparation exponiert. Anschließend wurde die Haut 5-mal gestrippt und im Akzeptormedium die Menge des permeierten CPA untersucht. Die CPA-Mengen im Akzeptormedium lagen bei SLN 6,6mal, NLC-M 3,4-mal, NLC-O 2,5mal, MS 2,2mal höher als bei Creme (Abb. 31). Bei der Nanoemulsion zeigte sich eine ähnliche Permeation wie bei der Creme. Die CPA Mengen im Akzeptormedium (12 ml) lagen zwischen 0,03 - 2,2 µg (entspricht 0,0025-0,183 µg/ml), also deutlich unter der Löslichkeitsgrenze für CPA (23,4 µg/ml), die Permeation wurde daher durch das Löslichkeitsvermögen des Wirkstoffes nicht beeinflusst.

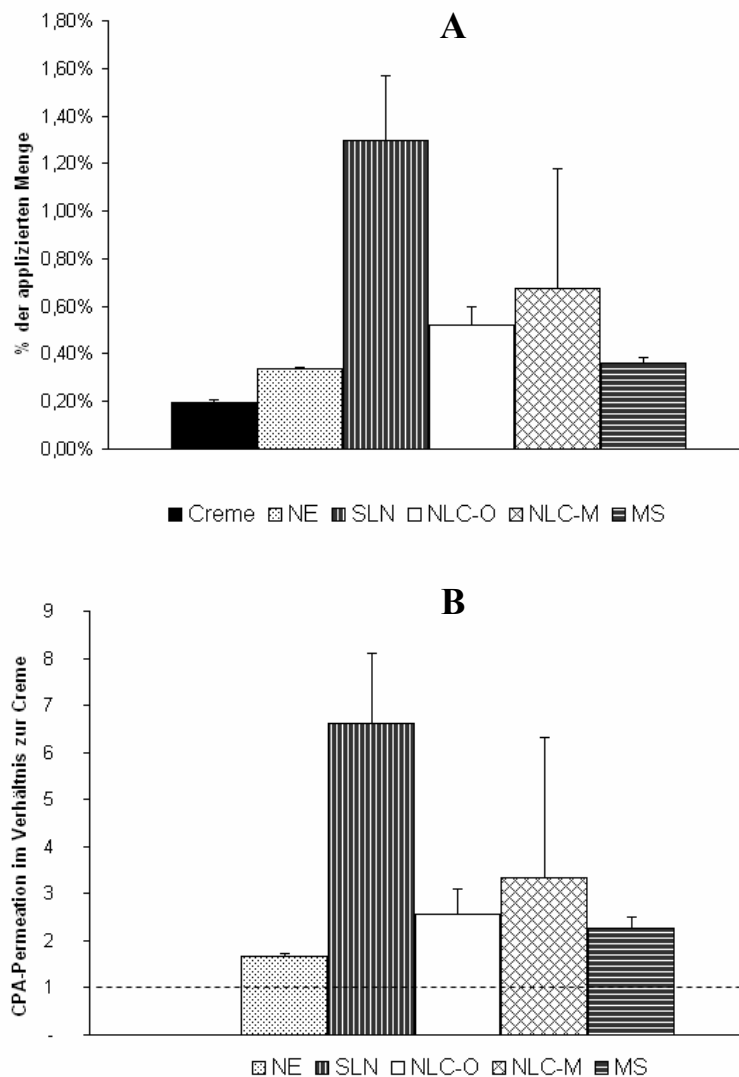


Abb. 31: CPA Permeation der humanen Spalthaut ($500 \mu\text{m}$) nach 24-stündiger Applikation von NE ($n=2$), SLN ($n=3$), NLC-O ($n=2$), NLC-M ($n=2$), MS ($n=2$) und Creme ($n=3$). A: mittlere Permeation (\pm SD), Abb. B: mittlere Verhältnisse (\pm SD) der Permeation aus den Lipiddispersionen relativ zum Mittelwert der Permeation aus der Referenzcreme über die Haut diesen Spenders (Creme, NE, NLC-O, NLC-M, MS $n=2$, SLN $n=2$ Spender, pro Spender wurden 2-4 Hautproben untersucht).

Die Ergebnisse der Penetrations-/Permeationsuntersuchungen weisen darauf hin, dass Nanopartikel-Dispersionen, vor allem aber SLN, den Wirkstoff in großen Mengen in die Epidermis transportieren, wo sich ein Depot bildet. Aus diesem Depot wird der Wirkstoff langsam abgegeben, was zu höheren CPA-Mengen im Akzeptormedium führt. So steigen nach 24 h die Permeationsraten im Vergleich zur Penetration in die ersten $100 \mu\text{m}$ nach 6

h bei SLN von 4 auf 6,6; bei NLC-M von 1,9 auf 3,4. Bei Mikropartikeln, NLC-O sowie bei der NE unterschieden sich Permeationsraten und Penetrationsraten weniger (von 2,7 auf 2,5 bzw. von 2,6 auf 2,8 und von 1,4 auf 1,6).

3.6.2 Penetration bei defekter Hornschicht

Die Gefahr einer systemischen Wirkstoffaufnahme kann bei kleineren Verletzungen der Hornschicht und Dermatosen steigen und dadurch negative Nebeneffekte einer Antiandrogentherapie verstärken. Bei schweren Hautverletzungen, die zu kompletter Entfernung der Stratum corneum führen, wie z.B. Hautverbrennungen mit Blasenbildungen, sollte man eine topische Applikation lipidhaltigen Zubereitungen meiden. In unseren in vitro Bedingungen wurden daher leichtere Defekte, die z.B. einer ekzematösen Entzündung ähneln oder durch z.B. Kratzen entstehen, simuliert. Dazu wurde die Haut vor dem Versuch 20-mal mit Klebefilm gestrippt. Mittels UV/VIS Spektrometrie wurde gezeigt, dass mit 20 Klebefilmabrissen etwa 66 % des Stratum corneum entfernt wurde (Jacobi et al., 2005). Als Kontrolle diente ungestrippte Haut derselben Spender. Eine signifikante Beeinflussung der Hautpenetration wurde in unserem Modell der defekten Hornschicht nicht festgestellt (Abb. 32). Alle applizierte Präparationen (Creme, SLN, NLC-O) zeigten eine annähernd gleiche Penetration in die defekte und intakte Haut. Dieser Befund schließt zudem eine erhebliche Speicherung von SLN in den äußeren Schichten des Stratum corneum aus.

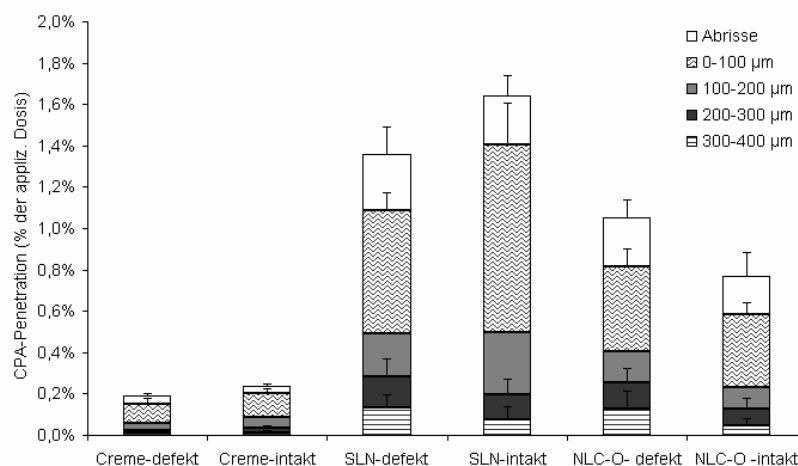


Abb. 32: Penetration bei defekter Hornschicht. CPA-Menge nach der 6 h Applikation der Creme, SLN und NLC-O auf gestrippte und ungestrippte Haut (n=3 Spender, pro Spender wurden 3 Hautproben untersucht, Mittelwert \pm SD)

3.6.3 Follikuläre Penetration

Die Penetration in die Haarfollikel wurde an Schweineohrenhaut untersucht, auf welche die Zubereitungen (Creme, SLN, NLC-O), beladen mit 0,004 % Nilrot, für 3 bzw. 6 Stunden aufgetragen wurden. Anschließend wurden die Haarfollikel mit der Cyanacrylatstripping-Technik entfernt. Unter einem Fluoreszenzmikroskop wurden jeweils 20 Haarfollikel betrachtet.

Bei allen Zubereitungen wurde eine starke Fluoreszenz beobachtet, die nach 6 h intensiver als nach 3 h war (Abb. 33). Dies weist darauf hin, dass der transfollikuläre Penetrationsweg für die kutane Aufnahme der untersuchten Zubereitungen eine bedeutsame Rolle spielt. Eine Quantifizierung der Intensität konnte aber nicht durchgeführt werden, da mit den entfernten Haarrollikeln im unterschiedlichen Ausmaß Teile der Haarwurzelscheide herausgerissen wurden und dadurch die Ergebnisse einer Nilrotanalytik verfälscht worden wären.

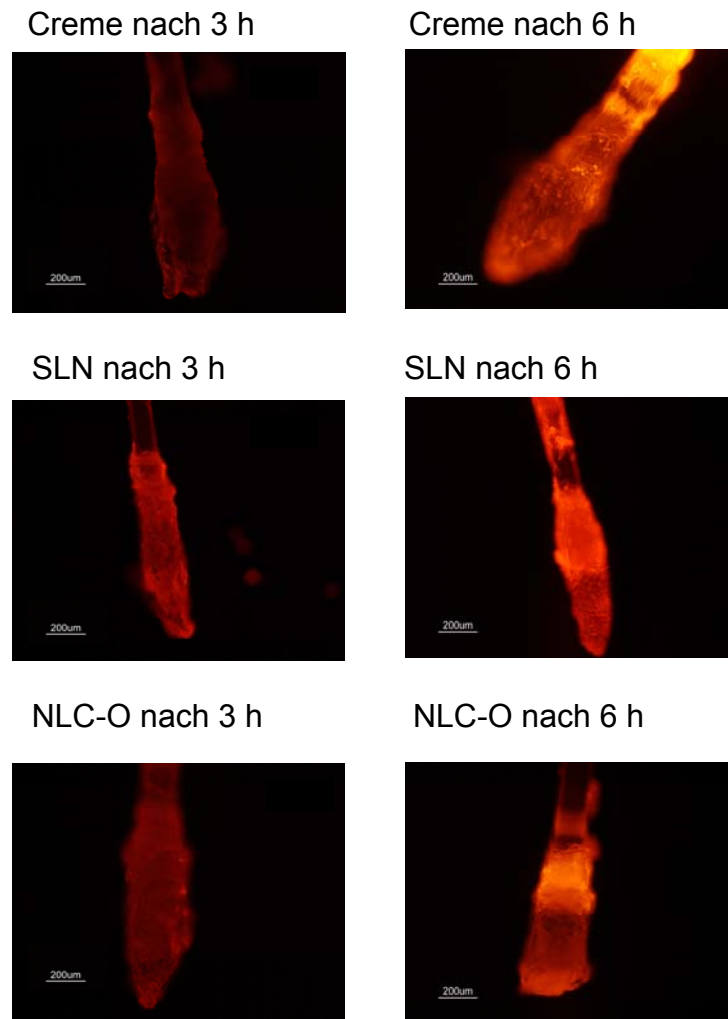


Abb. 33: Follikuläre Penetration nach 3- und 6- stündiger Applikation von nitrobeladener Creme, SLN und NLC-O-Dispersionen auf die Schweineohrenhaut (es wurde ein Versuch mit $n=2$ durchgeführt, aus jeder Hautprobe wurden 20 Haarfollikel entfernt und unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht, dargestellt sind jeweilsrepresentative Bilder).