

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

*Wirkstoff-Trägersystem-Haut-Wechselwirkungen untersucht mit
konventionellen und innovativen Glucocorticoid-Trägersystemen*

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

Vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Peggy Schlupp

aus Berlin

Gutachter:

1. Priv.-Doz. Dr. Danker

2. Prof. Dr. R.H. Müller

3. Prof. Dr. A. Fahr

Datum der Promotion: 03.06.2012

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Einleitung und Zielsetzung	2
Methodik	3
<i>Herstellung und Charakterisierung der SLN</i>	<i>3</i>
<i>Freisetzungsexperimente und in vitro Untersuchungen zur kutanen Resorption ...</i>	<i>3</i>
Ergebnisse und Diskussion	4
<i>Vergleich konventioneller Prednicarbat-Formulierungen</i>	<i>4</i>
<i>Wirkstoff-Trägersystem-Interaktion</i>	<i>6</i>
<i>Vergleich von SLN und DAC-Basiscreme beladen mit verschiedenen GC</i>	<i>8</i>
Fazit	9
Literaturverzeichnis	11
Erklärung über Anteil an Publikationen	13
Ausgewählte Publikationen	14
<i>Drug release and skin penetration from solid lipid nanoparticles and a base cream: a systematic approach from a comparison of three glucocorticoids</i>	<i>15</i>
<i>In vitro skin absorption and drug release – a comparison of six commercial prednicarbate preparations for topical use</i>	<i>26</i>
<i>„Interaction of drug molecules with carrier systems as studied by preelectric spectroscopy and electron spin resonance</i>	<i>36</i>
Lebenslauf	44
Publikationsliste	46
Selbstständigkeitserklärung	49
Danksagung	50

Zusammenfassung

Die Haut bildet eine effektive Barriere gegen die Invasion von Fremdstoffen, limitiert aber auch die dermale Therapie, da nur ein sehr geringer Anteil des applizierten Wirkstoffes an den Wirkort gelangt. Trotz dieser Limitierung bietet die lokale Therapie von Dermatosen verschiedene Vorteile gegenüber der systemischen Behandlung, daher ist es ein wichtiges Anliegen der pharmazeutischen Forschung und Entwicklung, die kutane Resorption von Wirkstoffen zu erhöhen. Um dieses Ziel zu erreichen, werden verschiedenste Strategien verfolgt: Strukturoptimierung von Wirkstoffen, z.B. durch Pro-Drugs, Anwendung neuer physikalischer Verfahren, z.B. Iontophorese, oder die Entwicklung von neuen Trägersystemen. Lipidnanopartikel (Solid lipid nanoparticles, SLN) sind ein kolloidales Trägersystem, dessen Matrix aus festen Lipidpartikeln besteht, die in einer Wasserphase dispergiert sind. Der Einsatz von SLN wird für verschiedenste Applikationsarten untersucht und diskutiert [1, 2]. Ein Schwerpunkt liegt dabei auf der dermalen Applikation, da eine erhöhte kutane Resorption von Arzneistoffen für unterschiedlich zusammengesetzte SLN-Systeme im Vergleich zu konventionellen Systemen gezeigt werden konnte [3]. In dieser Arbeit liegt der Fokus auf der Wechselwirkung zwischen Wirkstoff, Trägersystem und Haut, um weitere Erkenntnisse über die kutane Resorption von Wirkstoffen und dem Einfluss des Trägersystems SLN zu erlangen. Im Rahmen dieser Studie wurden verschiedene konventionelle (Creme, Salbe und Fettsalbe) und innovative (SLN) Trägersysteme hinsichtlich ihres Einflusses auf die kutane Resorption von Glucocorticoiden untersucht. In einer Vergleichsstudie konnte gezeigt werden, dass die gewählte konventionelle Grundlage einen entscheidenden Einfluss auf die kutane Resorption des Glucocorticoids Prednicarbat hat, welche wahrscheinlich mit dem irritativen Potential der Grundlage und dessen Auswirkung auf die metabolische Aktivität der rekonstruierten humanen Epidermis im Zusammenhang steht. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass für Prednisolon und Prednicarbat, inkorporiert in SLN, ein epidermales Targeting möglich ist und SLN die kutane Wirkstoffaufnahme im Vergleich zur Basiscreme erhöhen. Durch Einsatz einer struktur-analogen Spinsonde (Cholestan*) und den Untersuchungen mittels Parelektrischer Spektroskopie, Elektronenspin-Resonanz Spektroskopie und Gefrierbruch-Transmissionselektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass SLN plättchenförmige Strukturen bilden und der Modellwirkstoff an der Oberfläche der Partikel assoziiert ist.

Einleitung und Zielstellung

Die Verbesserung der Arzneimitteltherapie ist ein stetes Anliegen in der pharmazeutischen Forschung und Entwicklung. Der Fokus der dermalen Therapie liegt neben der Optimierung der Wirkstoffe auf der Entwicklung und Charakterisierung von innovativen Trägersystemen, die die Bioverfügbarkeit erhöhen. Vor allem kolloidale Trägersysteme wie zum Beispiel Polymerpartikel, Liposomen sowie Mikro- und Nanoemulsionen und Lipidnanodispersionen (z.B. „solid lipid nanoparticles“, SLN) wurden intensiv untersucht [4]. SLN bestehen aus einer festen Lipidmatrix dispergiert in einer wässrigen Phase. Der feste Lipidkern kann Wirkstoffe vor unerwünschter Degradation schützen [5], der kolloidale Charakter des Trägersystems mit Teilchengrößen im Nanometerbereich ermöglicht einen verbesserten Wirkstofftransport in die Haut [6] und die Verwendung von physiologischen Lipiden ist für eine gute Verträglichkeit verantwortlich [7, 8]. Obwohl viele Publikationen die Vorteile und Grenzen der SLN aufzeigen, ist der Mechanismus, das heißt die Wechselwirkung zwischen Wirkstoff und Trägersystem sowie zwischen, Trägersystem und der Haut, noch nicht eindeutig geklärt.

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Wirkstoff-Trägersystem-Interaktion sowie die Wechselwirkung der Trägersysteme mit der Zielstruktur Haut näher untersucht werden. Zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Trägersystem, Wirkstoff und Haut kamen sowohl Modellsubstanzen (Cholestansonde) als auch verschiedene Glucocorticoide (GC), die sich in ihren physikochemischen Eigenschaften (Lipophilie (LogP), Struktur und Molekulargewicht) unterscheiden zum Einsatz. GC sind das Mittel der ersten Wahl bei der Behandlung von Ekzemen. Der guten antiphlogistischen, antiallergischen und immunsuppressiven Wirkung der GC steht das Risiko einer Hautatrophie gegenüber. Durch den Einsatz von Trägersystemen könnte das Nutzen/Risiko-Verhältnis optimiert werden, z.B. durch die Steuerung eines epidermalen Targetings. Die Ergebnisse sollen neue Ansatzpunkte für eine verbesserte Glucocorticoidtherapie liefern.

Methodik

Herstellung und Charakterisierung der SLN

Die Herstellung der SLN erfolgte mittels Hochdruckhomogenisation bei Temperaturen oberhalb des Schmelzpunktes des eingesetzten Lipides. Standardmäßig wurden die SLN hinsichtlich Partikelgröße (Photonenkorrelationsspektroskopie und Laserdiffraktometrie), Kristallisationsgrad (Differential Scanning Calorimetry) sowie Rekristallisation von Wirkstoffmolekülen (Lichtmikroskopie) untersucht. Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurde für ausgewählte Trägersysteme eingesetzt, um Aussagen über die Partikelform zu treffen. Die Wirkstoff-Trägersystem-Interaktion wurde mit zwei voneinander unabhängigen physikalischen Methoden untersucht: der Polarisationsspektroskopie (PS) und der Elektronenspin-Resonanz Spektroskopie (ESR). Die PS ermöglicht eine Aussage über die Arzneistoff-Trägersystem-Interaktion, d.h. ob der Wirkstoff an der Partikeloberfläche assoziiert oder in die Partikelmatrix inkorporiert [9]. Die Kurvenverläufe von Dipoldichte und Dipolmobilität in Abhängigkeit der Wirkstoffkonzentration der beladenen SLN zeigen einen deutlichen Unterschied. Mit Hilfe der ESR ist eine Aussage über die Beweglichkeit des eingesetzten Modellwirkstoffes (struktur-analoge Spinsonde, Cholestan*) und somit über die unmittelbare Umgebung der Spinsonde möglich. Das Drei-Linienspektrum und die daraus ermittelte Rotationskorrelationszeit τ_R erlauben somit Rückschlüsse auf die Lokalisation des Modellstoffes im untersuchten Trägersystem.

Freisetzungsexperimente und in vitro Untersuchungen zur kutanen Resorption

Die Stofftransportvorgänge wurden an Diffusionszellen nach Franz durchgeführt [10]. Für die Freisetzungsuntersuchungen wurden künstliche Membranen (Cellulosenitrat- oder Polyamid-Membran) eingesetzt sowie biologische Membranen (rekonstruierte humane Epidermis (RHE) oder humane Vollhaut) für die *in vitro* Untersuchungen zur Bestimmung der kutanen Resorption. Der Versuchsaufbau war angelehnt an validierte Versuchsprotokolle [11-13]. Exzidierte Humanhaut ist die erste Wahl für kutane Resorptionsstudien, steht aber nur in begrenzter Menge aus Mammareduktionen oder Abdomenplastiken zur Verfügung. Um den Bedarf für die Forschung und Entwicklung zu decken, werden tierische Häute, hier vor allem Schweinehaut, und *in vitro* Hautmodelle eingesetzt. Hautmodelle wie die RHE werden auf der Basis von humanen

Keratinocyten gezüchtet. Während der Kultivierung bildet sich ein mehrschichtiges Gewebe, welches morphologisch gut mit der humanen Epidermis übereinstimmt [14]. Verschiedene RHE Modelle sind unter anderem für die Beurteilung von Phototoxizität und Hautirritation von Chemikalien sowie für die Bestimmung der kutanen Resorption [12] validiert. Die qualitative und quantitative Analytik der Wirkstoffe und deren Metaboliten oder Abbauprodukte in den Formulierungen und biologischen Proben erfolgt mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).

Ergebnisse und Diskussion

Der therapeutische Effekt bei der dermalen Therapie ist maßgeblich von drei Faktoren abhängig: dem Wirkstoff (Konzentration, Löslichkeit in der Grundlage, Penetrationsvermögen und Wirkintensität), der Haut (Hautareal und Hautzustand) und der Grundlage bzw. dem Trägersystem (Eigenwirkung, Penetrationsförderer, Freisetzung des Wirkstoffes) [15]. Die Optimierung des Zusammenwirkens dieser drei Faktoren ist eine komplexe Aufgabenstellung für die Entwicklung neuer Dermatika. Auf dem Gebiet der Trägersysteme lag der Fokus in den letzten zwanzig Jahren auf der Entwicklung und Charakterisierung von kolloidalen Trägersystemen wie zum Beispiel den Lipidnanopartikeln. Die erste Generation von Lipidnanopartikel, die SLN, wurden Anfang der 1990er Jahre entwickelt. Vergleichend zur Nanoemulsion (NE) besitzen SLN anstelle einer inneren Ölphase einen festen Lipidkern. Die relativ geringe Beladungskapazität der SLN sollte durch die Entwicklung der „Nanostructured Lipid Carriers“ (NLCs) verbessert werden. Der Lipidkern besteht bei diesen Trägersystemen aus einer Mischung von festen und flüssigen Lipiden.

Die folgenden Untersuchungen von konventionellen und innovativen Trägersystemen, beladen mit Modellsubstanzen und GC, sollen Erkenntnisse zur Wechselwirkung zwischen den Wirkstoffen und dem Trägersystem sowie deren Interaktion mit der Zielstruktur Haut liefern.

Vergleich konventioneller Prednicarbat-Formulierungen

Drei verschiedene Prednicarbat (PC)-Formulierungen (0,25% PC; Creme, Salbe und Fettsalbe) sind kommerziell von zwei Anbietern (Innovator: Dermatop[®], Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, und Generika: Prednitop[®], Dermapharm AG) erhältlich. Prednicarbat ist ein nicht-halogeniertes GC, das sich durch eine gute antiphlogistische

Wirkung bei gleichzeitig geringer Atrophogenität auszeichnet [16]. Die qualitative Zusammensetzung der jeweiligen Formulierungen, z.B. Cremes, ist identisch. Der Einfluss der Grundlage auf die Wirkstofffreisetzung sowie die kutane Resorption (Penetration und Permeation) von PC an einem RHE wurde in „In vitro skin absorption and drug release - a comparison of six commercial prednicarbate preparations for topical use.“ von Lombardi Borgia et al. [17] untersucht. Versuche bezüglich der Stabilität und der lokalen Verträglichkeit, Viabilitäts-Test am RHE-Modell, wurden ergänzend durchgeführt. Die Freisetzungsuntersuchungen zeigten, dass PC am schnellsten aus der Salbe freigesetzt wird und weniger schnell aus der Creme (Reihenfolge der Freisetzung: Salbe > Fettsalbe > Creme); dieses Freisetzungsverhalten gilt für Generikum und Originalpräparat. Diese Freisetzung steht in Zusammenhang mit der Zusammensetzung bzw. der inneren Struktur der Formulierungen und der damit verbundenen Verteilung des PCs in der Grundlage steht. PC (LogP 3.8) liegt gelöst in der Fettsalbe (wasserfrei) und in der äußeren Phase der Salbe (Wasser-in-Öl (W/O)-Emulsion) vor und kann somit ungehindert durch die Membran an der Grenzfläche zwischen Formulierung und Freisetzungsmedium diffundieren. Die höhere thermodynamische Aktivität von PC in der Salbe erklärt deren Überlegenheit. Sowohl bei der Salbe als auch bei der Fettsalbe zeigt das Generikum eine höhere Freisetzung gegenüber dem Originalprodukt, was im Zusammenhang mit der beobachteten Synärese bei beiden Produkten und der damit verbundenen Umverteilung des PC stehen könnte. Die Cremes (Öl-in-Wasser (O/W)-Emulsion) der beiden Hersteller sind ähnlich in ihrem Freisetzungsverhalten, aber durch den Einschluss des PCs in der inneren Öl-Phase ist die PC-Freisetzung im Vergleich zu Salbe und Fettsalbe geringer.

Die Grundlagen von Dermatika können eine Eigenwirkung auf die Haut ausüben und somit die Bioverfügbarkeit eines Arzneistoffes beeinflussen. Daher wurde die Penetration und Permeation von PC aus den verschiedenen Formulierungen am RHE-Modell, Epi-606-X (MatTek Corp.) untersucht. In der Haut wird PC mittels Esterasen zu Prednisolon-17-ethylcarbonat (P17EC) hydrolysiert, das dann nicht-enzymatisch zu Prednisolon-21-ethylcarbonat (P21EC) und durch eine weitere enzymatische Hydrolyse zu Prednisolon (PD) umgewandelt wird [18]. Versuche an RHE-Modellen zeigten eine ähnliche metabolische Aktivität der Modelle [19]. Hauptmetabolite bei den Permeationsuntersuchungen (8 h) waren P17EC und P21EC und stimmen mit vorangegangenen Untersuchungen an RHE-Modellen anderer

Anbieter überein [18]. Während die Permeation von PC aus den Innovator-Formulierungen die gleiche Reihenfolge wie bei der Freisetzung zeigte (Reihenfolge Permeation: Salbe > Fettsalbe > Creme), waren die Unterschiede zwischen den drei Generika-Formulierungen äußerst gering. Im Vergleich waren die Innovator-Formulierungen deutlich permeabler. Nach Versuchsende wurde die Verteilung von PC und seiner Metaboliten in der RHE ermittelt. In der RHE wurde fast ausschließlich PC und P17EC detektiert. Auch hier zeigte sich die Überlegenheit der Innovator-Produkte, Salbe und Fettsalbe, gegenüber den entsprechenden Generika-Formulierungen. Die Penetration von PC aus den Cremes war annähernd gleich. Die Analyse der Metaboliten-Verteilung in der RHE deutete auf eine geringere metabolische Aktivität der Epidermis-Modelle bei Anwendung von Salbe und Fettsalbe des Generika-Herstellers. Die Testung der Hautverträglichkeit am RHE-Modell (EpidermTM Epi-200-X-HCF) über die Bestimmung der metabolischen Aktivität (MTT-Test), Messung der Adenylatkinase-Aktivität und der Freisetzung von Interleukin-1-alpha deckte keine signifikanten Unterschieden zwischen den Formulierungen auf. Die Stabilitätsuntersuchungen zeigten eine bis zu 3-fach höhere Tendenz zur Phasentrennung, z.B. durch Abscheidung von 2-Octyldodecanol, bei Salbe und Fettsalbe der Generika-Produkte im Vergleich zu den korrespondierenden Originalpräparaten.

Trotz qualitativ gleicher Zusammensetzung der jeweiligen Innovator und Generika Formulierungen zeigten sich deutlich Unterschiede in der Bioverfügbarkeit für Salbe und Fettsalbe. Während kurzkettige Alkohole die kutane Resorption erhöhen können [20], führten langkettige Alkohole wie 2-Octyldodecanol zu einer Verschlechterung der Indomethacin Penetration [21]. Auch könnte eine gestörte metabolische Aktivität der Hautmodelle, bei Anwendung von Salbe und Fettsalbe der Generika-Produkte, auf Grund von Formulierungsinstabilitäten eine Ursache sein. Während Hautmodelle, wie das hier verwendete RHE-Modell, für die Testung des irritativen Potentials von Chemikalien auf der Haut etabliert sind, scheint das Protokoll für die Testung von nur geringen Hautschädigungen nicht sensitiv genug zu sein.

Wirkstoff-Trägersystem-Interaktion

In der Veröffentlichung „Interaction of drug molecules with carrier systems as studied by parrlectric spectroscopy and electron spin resonance“ von Braem et al. [22] wird die Wirkstoff-Trägersystem-Wechselwirkung von SLN vergleichend zu NLC und NE mit Hilfe verschiedener physikalischer Messmethoden (PS, ESR und TEM) untersucht. Die

Cholestan*-Spinsonde wurde als Modellsubstanz eingesetzt. Der Lipidkern der SLN bestand aus Compritol®888 ATO (Glyceroldibehenat), die Ölphase der NE aus Miglyol®812 (Caprylic/Capric Triglyceride) und die dispergierte Phase der NLC aus einer Mischung von beiden Fetten.

Mittels PS ließ sich ein klarer Unterschied im Kurvenverlauf einerseits von NE und andererseits bei SLN und NLC verfolgen. Die NE zeigte ein klassisches Einstein-Debye Verhalten, das heißt sowohl Dipolmobilität als auch Dipoldichte zeigte einen linearen Verlauf in Abhängigkeit eingearbeiteten Colestan*-Konzentration. Dieser Kurvenverlauf weist auf einen vollständigen Einschluss des Arzneistoffs bzw. der Modellsubstanz in der NE hin. Demgegenüber konnte für SLN und NLC ein parabolischer Kurvenverlauf und somit eine Assoziation der Modellsubstanz an der Oberfläche der Partikel gezeigt werden. Mittels der ESR, einem zweiten unabhängigen Verfahren, konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Die Rotationskorrelationszeit der Cholestan-sonde in der NE ($\tau_R = 3,12$ ns) war vergleichbar mit der Rotationskorrelationszeit im reinen Miglyol®812 ($\tau_R = 3,07$ ns) und bei beiden Messungen wurde ein sauberes Drei-Linienspektrum erzeugt. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Cholestan-sonde in der dispersen Phase der NE (dem Miglyol®812) eingeschossen ist. Das Drei-Linienspektrum der NLC war leicht verbreitert, was auf eine geringere Mobilität der Cholestan-sonde im Vergleich zur NE hinweist. Die geringste Mobilität konnte bei den SLN detektiert werden, was nahelegt, dass der Modellwirkstoff in der festen Matrix eingeschlossen vorliegt bzw. fest an der Partikeloberfläche assoziiert ist. Reduktionsversuche der Cholestan*-Spinsonde mit Ascorbinsäure zeigten einen schnellen Abbau der Cholestan*-Spinsonde in der SLN-Formulierung. Der Einschluss der Cholestan*-Spinsonde in die feste Lipidmatrix der SLN und einem daraus folgenden Schutz vor Degradation ist somit nicht gegeben. Aus dem ESR-Spektrum der SLN konnten interessanter Weise zwei unterschiedliche Rotationskorrelationszeiten bzw. Mobilitäten für die Cholestan-sonde bestimmt werden. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Gefrierbruch-TEM, die eine plättchenförmige Struktur der SLN zeigte, können die zwei Mobilitäten der Cholestan*-Spinsonde der planen Oberfläche sowie dem Randbereich der Partikel zugeordnet werden. Die Aufnahmen der Gefrierbruch-TEM zeigten auch für die NLC eine plättchenförmige Struktur sowie eine eindeutig sphärische Struktur der NE. Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen der PS, ESR und TEM folgendes Modell für die Struktur der SLN erstellen: Die SLN bestehen aus einem festen Lipidkern dispergiert in der Wasserphase, zur Stabilisierung sind die

Lipidpartikel von einer Emulgatorschicht umgeben. Während des Rekrystallisierungsprozesses nach der Herstellung bilden sich plättchenförmige Partikel. Die Cholestan*-Spinsonde war an der Partikeloberfläche lokalisiert. Jores et al. [23] fand ähnliche Strukturen für die von ihr untersuchten Compritol®-SLN. Inwiefern dieses Modell auch auf SLN anderer Zusammensetzung übertragbar ist und welchen Einfluss das auf die kutane Resorption hat, muss in weiteren Experimenten geklärt werden. ESR und PS sind für die Untersuchung der Trägersystem-Wirkstoff-Interaktion ein wertvolles Instrument, wobei die PS den Vorteil besitzt, dass sie auf den Einsatz von Modellschubstanzen verzichten kann.

Vergleich von SLN und DAC-Basiscreme beladen mit verschiedenen GC

Untersuchungen von Santos Maia et al. [24] zeigten ein epidermales Targeting von mit PC-beladenen Compritol®-SLN. In einem weiteren Versuch konnte dies für BMV-beladene SLN nicht gezeigt werden [9]; ein Zusammenhang mit der unterschiedlichen Wirkstoff-Trägersystem-Wechselwirkung wurde hier angenommen. In „Drug Release and Skin Penetration from Solid Lipid Nanoparticles and a Base Cream: A Systematic Approach from a Comparison of Three Glucocorticoids“ von Schlupp et al. [25] werden drei verschiedene GC sowohl in SLN als auch in ein DAC-Basis-Creme (O/W-Emulsion) eingearbeitet und charakterisiert. Prednisolon (PD), der Diester PC und der Monoester Betamethason-17-valerat (BMV) unterscheiden sich unter anderem hinsichtlich ihrer Molmasse, der Struktur und ihrer Lipophilie.

Der Einfluss der Lipophilie und Struktur zeigt sich bereits bei der Herstellung. Die lipophileren GC BMV (LogP 3,98) und PC (LogP 3,82) waren besser in dem Lipid löslich als PD (LogP 1,69). Der stabile Einschluss von 0,1% PD in die SLN war nur für eine sehr begrenzte Zeit möglich. Bei SLN und Creme gleichermaßen erfolgte die Freisetzung von PD wesentlich schneller als bei PC und BMV (Reihenfolge der Freisetzung: PD >> PC > BMV). Aufgrund der höheren Viskosität und damit verbundenen langsameren Diffusionsgeschwindigkeit sowie der geringeren thermodynamischen Aktivität der GC durch den geringeren Wasseranteil in der Creme erfolgte die Wirkstofffreisetzung aus der Creme langsamer als aus den SLN. Die physikochemischen Eigenschaften der Wirkstoffe und der Aufbau der beiden Formulierungen erklären das Freisetzungsprofil, sowohl Creme als auch SLN sind durch eine lipophile dispergierte Phase charakterisiert. In Abhängigkeit ihres Verteilungskoeffizienten werden sich die GC zwischen den zwei Phasen verteilen. Das

weniger lipophile PD kann zu einem höheren Anteil in der äußeren Wasserphase vorliegen und somit die Membran an der Grenzfläche zwischen Formulierung und Akzeptormedium schneller passieren als die wesentlich lipophileren GC PC und BMV. PC und BMV werden sich bevorzugt in der Öl- bzw. Lipidphase anreichern und haben daher einen längeren Diffusionsweg zur Membran. Neben der Freisetzung wurde auch die Penetration der GC an exzidiertem humaner Haut untersucht. Mit der Creme zeigt sich nach sechs Stunden eine mehr als dreifach höhere Menge von PD in der Haut im Vergleich zu PC und BMV. Die Penetration der GC aus den SLN war bis zu 10-fach höher im Vergleich zu der Creme, aber nur geringe Unterschiede bestand hierbei zwischen den GC. Auffallend bei den Untersuchungen zur Penetration von Creme und SLN waren vor allem die Unterschiede zwischen den ersten 100 µm der Haut, hauptsächlich Epidermis, und den tieferen Hautschichten. Während bei den Cremes ein langsam abfallendes Penetrationsprofil zu beobachten war, zeigte sich bei den SLN eine deutliche Differenz zwischen den ersten und zweiten 100 µm der Haut. Im Vergleich zur Creme konnte für PD- und PC-SLN eine erhöhte Affinität zur Epidermis bestimmt werden. Demgegenüber konnte für BMV kein Unterschied bei der Verteilung des Wirkstoffes zwischen Epidermis und Dermis bei Creme und SLN festgestellt werden. Da mittels PS ein Einschluss der drei GC in die feste Lipidmatrix ermittelt wurde, konnte dies nicht den Unterschied im Penetrationsprofil zwischen PD- und PC-SLN im Vergleich zu den BMV-SLN erklären.

Die Ergebnisse bestätigen die Überlegenheit der SLN gegenüber der eingesetzten Creme beim Wirkstofftransport in die Haut. Durch vergleichende Prüfung von GC mit verschiedenen physikochemischen Eigenschaften konnte erstmals gezeigt werden, dass durch SLN als Trägersystem spezifische Unterschiede in der Gesamtpenetration entstehen. Ferner wurde erstmals gezeigt, dass das bei der Ekzembehandlung gewünschte epidermale Targeting von dem eingesetzten Wirkstoff beeinflusst wird.

Fazit

Die Untersuchungen zeigten, dass Diffusionsvorgänge für die Ergebnisse der Freisetzungsforschung von Wirkstoffen aus Dermatika bestimmend sind. Da Metabolismus und Wechselwirkung der Trägersysteme mit der Haut die kutane Resorption beeinflussen können, ist die Testung der Dermatika an Haut oder Hautmodellen unerlässlich. Die Beurteilung leichter Hautschädigungen durch die

Dermatika war, mit dem für Chemikalien etablierte Methode an RHE-Modellen, nicht möglich. Eine geeignete in vitro Methode zu Detektion auch geringer Hautschädigungen in der Präklinik ist, in Anbetracht auf die erzielten Ergebnisse, wünschenswert.

Die Kombination von PS, ESR und TEM ermöglichte eine genaue Beschreibung der Struktur der SLN und deren Wechselwirkung mit dem Modellwirkstoff. Die beschriebenen Compritol[®]-SLN konnten durch plättchenförmige Partikel beschrieben werden, an deren Oberfläche der Modellwirkstoff (Cholestan*-Spinsonde) assoziiert war. In anderen Publikationen wurde gezeigt, dass SLN sowohl sphärisch [26] als auch plättchenförmige [23] Strukturen bilden können. Welche Faktoren die Partikelform beeinflussen, z.B. Herstellungsmethode oder Wahl des Lipides bzw. Emulgators, ist noch nicht endgültig geklärt. Die genaue Beschreibung des angewendeten Trägersystems ist wichtig für die Interpretation von Resorptionsstudien. Die Vergleichsuntersuchungen von Creme und SLN zeigen eine deutlich erhöhte kutane Resorption der GC bei Applikation der SLN. Des Weiteren konnten die Ergebnisse Hinweise auf eine spezifische Wechselwirkung der SLN mit Haut geben, welche zu einem epidermalen Targeting von PC und PD inkorporiert in Compritol[®]-SLN führte.

Die vorgestellten Ergebnisse machen deutlich, welchen ausgeprägten Einfluss ein Trägersystem auf die kutane Resorption und somit schlussendlich auf den Erfolg der dermalen Therapie haben kann. Bei der Wahl des geeignetsten Trägersystems sollte aber immer auch der Hautzustand berücksichtigt werden. Intensive Untersuchungen in den letzten 20 Jahren haben deutlich gemacht, dass SLN ein effizientes Trägersystem für die dermale Therapie darstellen. Dennoch bleiben einige Fragen offen. Um SLN gezielt in der dermalen Therapie einsetzen zu können, ist es notwendig, die Wechselwirkung zwischen Wirkstoff, Trägersystem und Haut zu steuern. Der Einfluss der Parameter wie Herstellungsmethode, Wahl der Lipidmischung und des Emulgators auf die Eigenschaften des Systems wie z.B. Partikelform und Einschlusseffizienz muss noch intensiver mittels standardisierter Methoden untersucht werden um ein reproduzierbares Ergebnis zu gewährleisten.

Literaturverzeichnis

1. Mehnert, W and Mäder, K, Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001. **47**(2-3): p. 165-196.
2. Müller, RH, Mäder, K, and Gohla, S, Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2000. **50**(1): p. 161-177.
3. Pardeike, J, Hommoss, A, and Müller, RH, Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *International Journal of Pharmaceutics*, 2009. **366**(1-2): p. 170-184.
4. Korting, HC and Schäfer-Korting, M, Carriers in the Topical Treatment of Skin Disease, in *Drug Delivery*, M. Schäfer-Korting, Editor 2010, Springer Berlin Heidelberg. p. 435-468.
5. Volkhard Jenning, SHG, Encapsulation of retinoids in solid lipid nanoparticles (SLN). *Journal of Microencapsulation*, 2001. **18**(2): p. 149-158.
6. Schäfer-Korting, M, Mehnert, W, and Korting, H-C, Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007. **59**(6): p. 427-443.
7. Weyenberg, W, Filev, P, Van den Plas, D, et al., Cytotoxicity of submicron emulsions and solid lipid nanoparticles for dermal application. *International Journal of Pharmaceutics*, 2007. **337**(1-2): p. 291-298.
8. Müller, RH, Rühl, D, Runge, S, et al., Cytotoxicity of Solid Lipid Nanoparticles as a Function of the Lipid Matrix and the Surfactant. *Pharmaceutical Research*, 1997. **14**(4): p. 458-462.
9. Sivaramakrishnan, R, Nakamura, C, Mehnert, W, et al., Glucocorticoid entrapment into lipid carriers - characterisation by parrlectric spectroscopy and influence on dermal uptake. *Journal of controlled release*, 2004. **97**(3): p. 493-502.
10. Franz, TJ, Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. *J Investig Dermatol*, 1975. **64**(3): p. 190-195.
11. OECD, Test No. 428: Skin Absorption: In Vitro Method, 2004.
12. Schäfer-Korting, M, Bock, U, Diembeck, W, et al., The Use of Reconstructed Human Epidermis for Skin Absorption Testing : Results of the Validation Study. *Altern Lab Anim*, 2008. **36**(2): p. 161-187.
13. CDER, Guidance for Industry: Nonsterile Semisolid Dosage Forms, 1997.
14. Netzlaff, F, Lehr, CM, Wertz, PW, et al., The human epidermis models EpiSkin®, SkinEthic® and EpiDerm®: An evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2005. **60**(2): p. 167-178.
15. Mayser, P and Grunder, K, Therapieprinzipien bei Hautkrankheiten. *Hautnah Dermatologie*, 1996. **12**(5): p. 332-342.
16. Luger, T, Loske, KD, Elsner, P, et al., Topische Dermatotherapie mit Glukokortikoiden – Therapeutischer Index. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 2004. **2**(7): p. 629-634.
17. Lombardi Borgia, S, Schlupp, P, Mehnert, W, et al., In vitro skin absorption and drug release - a comparison of six commercial prednicarbate preparations for topical use. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2008. **68**(2): p. 380-9.

18. Gysler, A, Lange, K, Korting, HC, et al., Prednicarbate biotransformation in human foreskin keratinocytes and fibroblasts. *Pharmaceutical Research*, 1997. **14**(6): p. 793-7.
19. Gysler, A, Kleuser, B, Sippl, W, et al., Skin penetration and metabolism of topical glucocorticoids in reconstructed epidermis and in excised human skin. *Pharmaceutical Research*, 1999. **16**(9): p. 1386-91.
20. Williams, AC and Barry, BW, Penetration enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2004. **56**(5): p. 603-18.
21. Chien, YW, Xu, HL, Chiang, CC, et al., Transdermal controlled administration of indomethacin. I. Enhancement of skin permeability. *Pharmaceutical Research*, 1988. **5**(2): p. 103-6.
22. Braem, C, Blaschke, T, Panek-Minkin, G, et al., Interaction of drug molecules with carrier systems as studied by parrlectric spectroscopy and electron spin resonance. *Journal of Controlled Release*, 2007. **119**(1): p. 128-35.
23. Jores, K, Mehnert, W, Drechsler, M, et al., Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy. *Journal of Controlled Release*, 2004. **95**(2): p. 217-227.
24. Santos Maia, C, Mehnert, W, Schaller, M, et al., Drug Targeting by Solid Lipid Nanoparticles for Dermal Use. *Journal of Drug Targeting*, 2002. **10**(6): p. 489-495.
25. Schlupp, P, Blaschke, T, Kramer, KD, et al., Drug release and skin penetration from solid lipid nanoparticles and a base cream: a systematic approach from a comparison of three glucocorticoids. *Skin Pharmacology and Physiology*, 2011. **24**(4): p. 199-209.
26. Farboud, ES, Nasrollahi, SA, and Tabbakhi, Z, Novel formulation and evaluation of a Q10-loaded solid lipid nanoparticle cream: in vitro and in vivo studies. *International journal of nanomedicine*, 2011. **6**: p. 611-7.

Erklärung über Anteil an Publikationen

Publikation 1:

Schlupp, P, Blaschke, T, Kramer, KD, Höltje, HD, Mehnert, W und Schäfer-Korting, M, (2011)

“Drug release and skin penetration from solid lipid nanoparticles and a base cream: a systematic approach from a comparison of three glucocorticoids.”

Beitrag: 70%

Design und Durchführung der Experimente. Analyse und Diskussion der Daten. Selbstständiges Verfassen des Manuskriptes.

Publikation 2:

Lombardi Borgia, S, **Schlupp, P**, Mehnert, W und Schäfer-Korting, M, (2008)

“In vitro skin absorption and drug release – a comparison of six commercial prednicarbate preparations for topical use.”

Beitrag: 30%

Durchführung und Auswertung der Freisetzungsuntersuchungen. Durchführung der Analytik der Proben. Mitarbeit am Verfassen der Publikation.

Publikation 3:

Braem, C, Blaschke, T, Panek-Minkin, G, Herrmann, W, **Schlupp, P**, Paepenmüller, T, Müller-Goymann, C, Mehnert, W, Bittl, R, Schäfer-Korting, M und Kramer, KD, (2007)

„Interaction of drug molecules with carrier systems as studied by preelectric spectroscopy and electron spin resonance.”

Beitrag: 15%

Herstellung und Charakterisierung der Trägersysteme.

Ausgewählte Publikationen

Seite 15 – 25:

Schlupp, P, Blaschke, T, Kramer, KD, Höltje, HD, Mehnert, W und Schäfer-Korting, M, (2011), “Drug release and skin penetration from solid lipid nanoparticles and a base cream: a systematic approach from a comparison of three glucocorticoids.”

Seite 26 – 35:

Lombardi Borgia, S, **Schlupp, P**, Mehnert, W und Schäfer-Korting, M, (2008), “In vitro skin absorption and drug release – a comparison of six commercial prednicarbate preparations for topical use.”

Seite 36 – 43:

Braem, C, Blaschke, T, Panek-Minkin, G, Herrmann, W, **Schlupp, P**, Paepenmüller, T, Müller-Goymann, C, Mehnert, W, Bittl, R, Schäfer-Korting, M und Kramer, KD, (2007), „Interaction of drug molecules with carrier systems as studied by preelectric spectroscopy and electron spin resonance.”

Lebenslauf

Ein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

VERÖFFENTLICHUNGEN

- 05/2011 Journal of Dispersion Science and Technology
“Required HLB Determination of some pharmaceutical oils using submicron emulsions” T. Schmidts, P. Schlupp, A. Gross, D. Dobler, F. Runkel, accepted for publication
- 03/2011 International Journal of Pharmaceutics
“Protective Effect of Drug Delivery Systems against the Enzymatic Degradation of Dermally Applied DNAzyme” T. Schmidts, D. Dobler, S. von den Hoff, P. Schlupp, H. Garn, F. Runkel, 2011; 410: 75-82
- 01/2011 Journal of Skin Pharmacology and Physiology
“Drug Release and Skin Penetration from Solid Lipid Nanoparticles and a Base Cream: a Systematic Approach from a Comparison of three Glucocorticoids”, P. Schlupp, T. Blaschke, K.D. Kramer, H.D. Höltje, W. Mehnert, M. Schäfer-Korting, 2011; 24: 199-209
- 09/2010 Pharmazie
“Interaction of drug-carrier systems with targets – a study using atomic force microscopy”, T. Blaschke, T. Spangenberg, P. Schlupp, M. Dathe, W. Szcymczak, W. Mehnert, H.C. Korting, S. Thalhammer, H. Niehus, M. Schäfer-Korting, K.D. Kramer, 2010; 65(9): 657-664
- 04/2010 International Journal of Pharmaceutics
“Development of multiple W/O/W emulsions as dermal carrier system for oligonucleotides: Effect of additives on emulsion stability” T. Schmidts, D. Dobler, P. Schlupp, C. Nissing, H. Garn, F. Runkel, 2010; 398: 107-113
- 02/2008 European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics
"In vitro skin absorption and drug release - A comparison of six commercial prednicarbate preparations for topical use", S. Lombardi Borgia, P. Schlupp, W. Mehnert, M. Schäfer-Korting, 2008; 68: 380-389
- 05/2007 Journal of Controlled Release
"Interaction of drug molecules with carrier systems as studied by paelectric spectroscopy and electron spin resonance", C. Braem, T. Blaschke, G. Panek-Minkin, W. Herrmann, P. Schlupp, T. Paepenmuller, C. Müller-Goyman, W. Mehnert, R. Bittl, M. Schäfer-Korting and K.D. Kramer, 2007; 119: 128-135

VORTRÄGE

- 01/2010 GD conference "Development and Regulatory Aspects of Topical Dermatics Today" in Bonn
"Optimizing conventional galenics: microemulsions as a paradigm"
- 05/2008 European Workshop on Particulate Systems 2008 in Berlin
"Solid lipid nanoparticles for improved skin uptake"
- 03/2008 Perspectives in Percutaneous Penetration 2008 in La Grande Motte (Frankreich)
"Comparison of conventional and nanoparticulate prednicarbate formulations"

POSTER

- 07/2010 Tag der Pharmazie an der FU Berlin
„Molecular Mechanisms of Enhanced Epidermal Wound Healing by Solid Lipid Nanoparticles“
- 03/2010 7th World Meeting on Pharmaceutic, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology in Valetta (Malta)
"Phase Diagram by Micro Plate Dilution (PDMPD) as a promising tool for microemulsion development"
- 09/2009 EuroNanoMedicine 2009 in Bled (Slowenien)
"Solid Lipid Nanoparticles (SLN) – an innovative carrier system for Sphingosine-1-phosphate"
- 09/2009 DPhG Jahrestagung in Jena
"Quantifizierung von Esteraseaktivität in humanen Keratinozyten und Fibroblasten"
- 10/2007 BMBF-Symposium Nanobiotechnologie
„Nanoderm-TS Nanopartikel Targeting-Systeme für die Dermatotherapie“
- 07/2007 37th annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society in Californien (USA)
"Loading to solid lipid nanoparticles (SLN) improves cutaneous uptake of glucocorticoides of widely varying lipophilicity"
- 10/2006 DPhG-Jahrestagung in Marburg
"Commercial and carrier-based prednicarbate formulations: drug release and in vitro skin absorption"

03/2005 GD Jahrestagung in Wien
"Nanostructured carriers for topical cyproterone acetate application to intact and stripped human skin"

11/2004 GD Symposium "Einsparung von Tierversuchen mit Humanhautmodellen" in Berlin
"Innovative drug carriers for topical therapy"

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Peggy Schlupp, dass die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Wirkstoff-Trägersystem-Haut-Wechselwirkungen untersucht an konventionellen und innovativen Glucocorticoid-Trägersystemen,“ von mir selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritte verfasst wurde, dass die Dissertation auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig an entsprechender Stelle in der Arbeit angegeben sind.

Gießen, den 27.09.2011

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand unter Anleitung von Frau Professor Dr. Monika Schäfer-Korting am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin. Auf meinem Weg zum Doktor haben mich eine Vielzahl von Menschen begleitet und unterstützt, denen ich hiermit danken möchte.

Zunächst möchte ich mich bei Frau Professor Dr. Monika Schäfer-Korting ganz herzlich für die Möglichkeit diese Arbeit in Ihrer Arbeitsgruppe anfertigen zu können bedanken. Ihre ständige Diskussionsbereitschaft, Motivationsfähigkeit und Förderung begeisterten mich für das wissenschaftliche Arbeiten.

Frau PD Dr. Kerstin Danker danke ich sehr herzlich für die Anfertigung des Gutachtens.

Bei Dr. Wolfgang Mehnert möchte ich mich ganz besonders bedanken. Die zahlreichen fachlichen und konstruktiven Diskussionen sowie die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit sind unbezahlbar.

Ich möchte mich bei allen Mitgliedern der Arbeitskreise von Frau Prof. Dr. M. Schäfer-Korting, Herrn Prof. Dr. B. Kleuser und Herrn Prof. Dr. R.H. Müller bedanken für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die gemeinsamen Unternehmungen.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Hannelore Gonska, Barbara Brüggener, Gabriele Roggenbuck-Kosch und Corinna Schmidt für Ihre Hilfsbereitschaft und das stets offene Ohr für Gespräche auch abseits der Arbeitswelt.

Bei Herrn Dr. Günther Weindl möchte ich mich vor allem für den fachlichen Austausch und die stete Hilfsbereitschaft, aber auch die gemeinsamen Unternehmungen bedanken.

Herrn Dr. Henrik Potteck kann ich den Dank für die gemeinsame Zeit im Büro mit zahlreichen informativen, kritischen und immer wieder lustigen Gesprächen nur zurückgeben. Let's Rock'n'Bowl!

Herrn Dr. Saša Nikolić danke ich ganz besonders für die vielen gemeinsamen Stunden und Tage in den Berliner Cafés und Restaurants. Die langen Wochenenden wurden durch Deine moralische Unterstützung und den Spaß bei der Arbeit sehr kurzweilig.