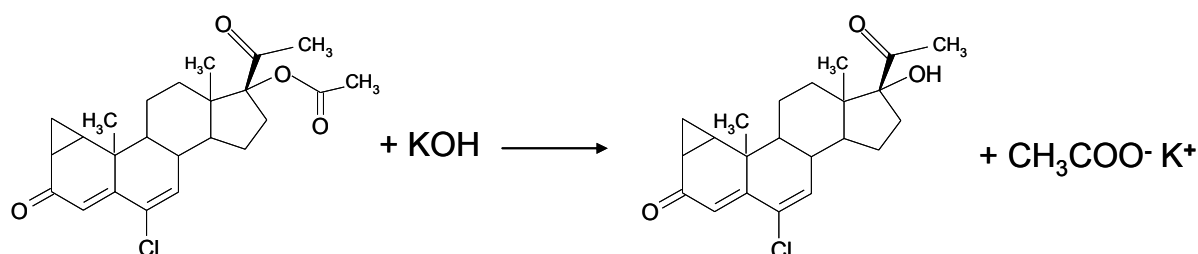


3. ERGEBNISSE

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 ^1H -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

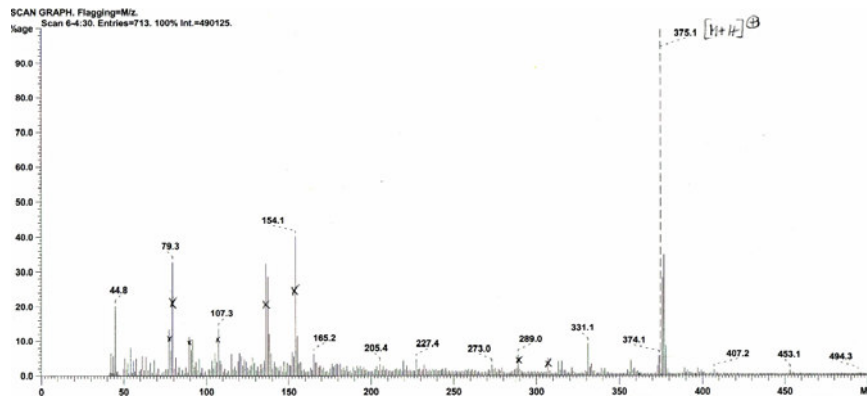
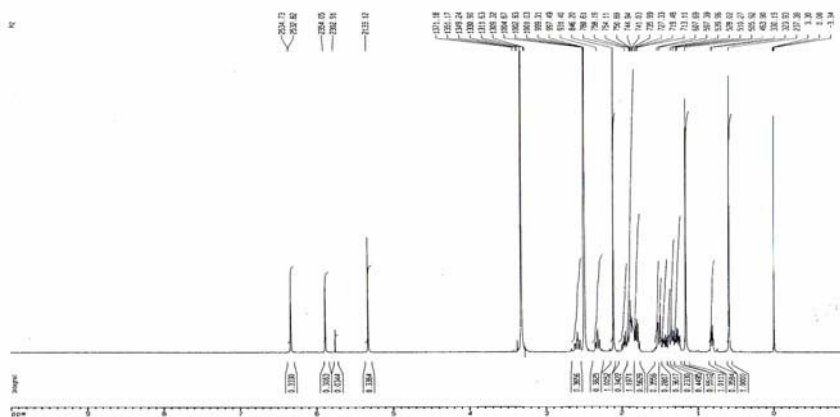


Abb. 11: Massenspektrum von Cyproteron

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.

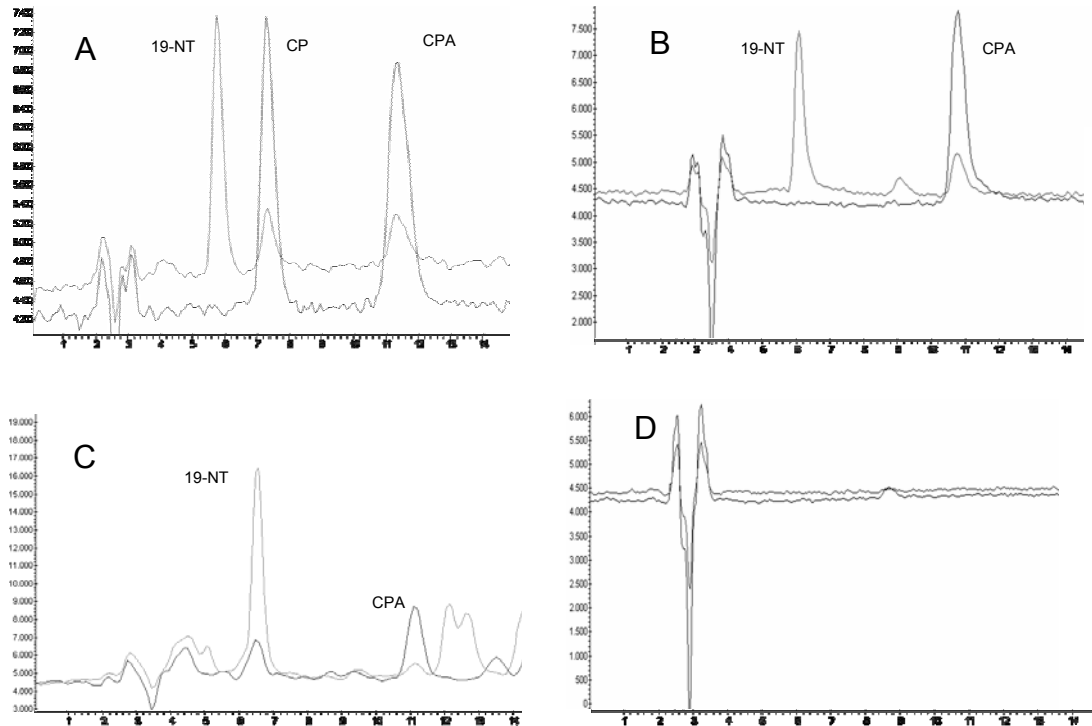


Abb. 13: Repräsentativer HPLC Chromatogramme: A: der Reinsubstanzen, B: CPA und 19-NT nach Extraktion aus dem Fibroblastenmedium, C: CPA und 19-NT nach Extraktion aus der Haut, D: Kontrolle ohne Substanz, die obere Linie entspricht der Absorption bei einer Wellenlänge von 246 nm, die untere Linie der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

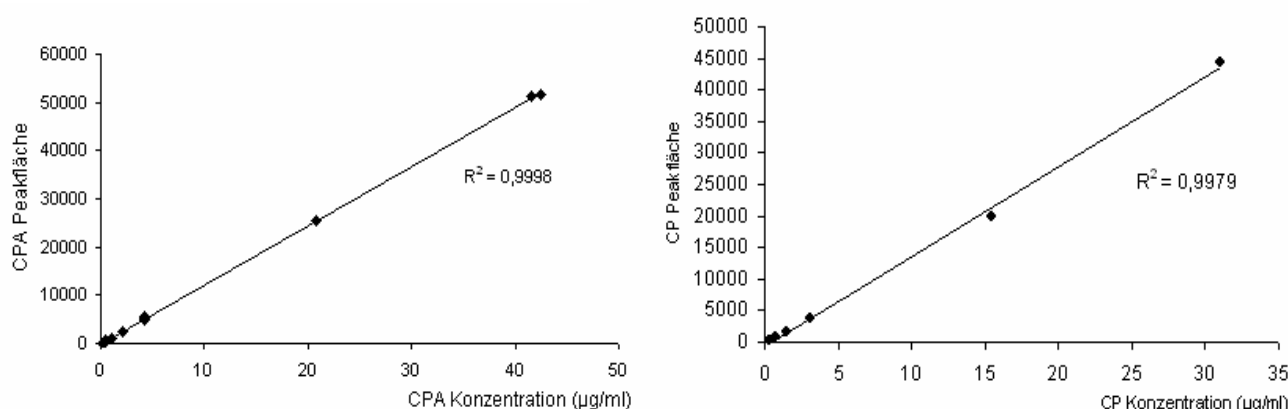


Abb. 14: Repräsentative Kalibrationskurven von CPA und CP

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 $2,2 \pm 0,3$ µg/ml, in BPS mit 5 % BSA $23,4 \pm 2,7$ 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.

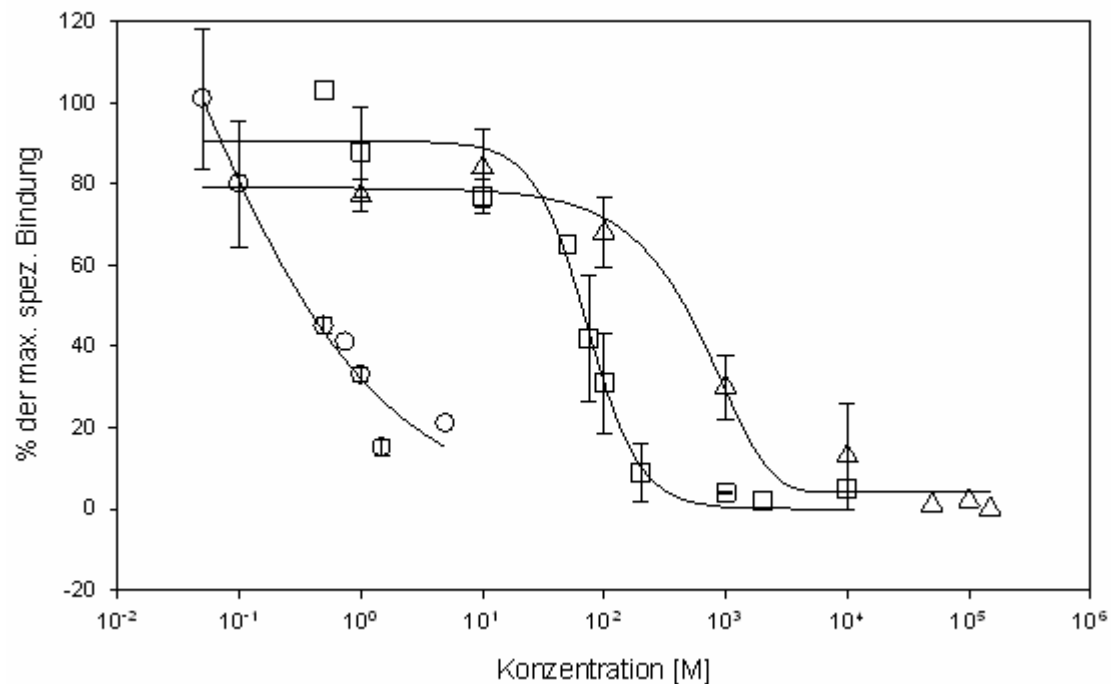


Abb. 15: Kompetitive Verdrängung von ^3H -DHT (0,5 nM) vom Androgenrezeptor durch DHT (○), CPA (□) und CP (Δ), Mittelwerte aus vier Experimenten (je $n=3$).

3.4.2 Untersuchung zur antiandrogenen Wirkung an SZ95 Zellen

Antiandrogene binden an den nuklearen Androgenrezeptor und verdrängen kompetitiv 5α -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 5α -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.

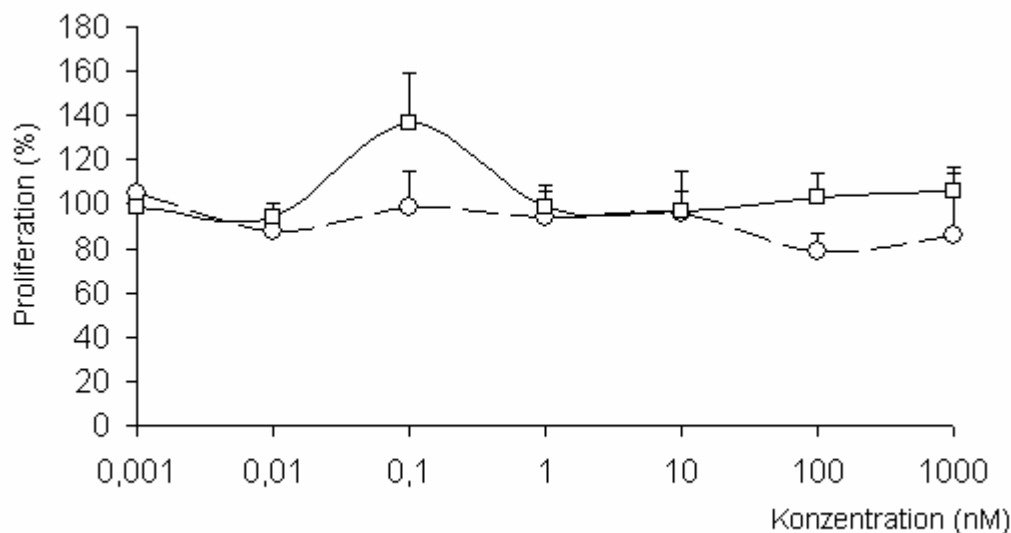


Abb. 16: Unveränderte Proliferation der Sebozytenzelllinie SZ95 (Einbau von Thymidin) unter dem Einfluss von 5α -DHT, in normalem FKS (○), in aktivkohlebehandeltem FKS (□) nach 16 Tagen, als 100 % wurde die Proliferation mit Lösungsmittel behandelten Zellen gesetzt (Mittelwert \pm SD, $n=5$)

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).

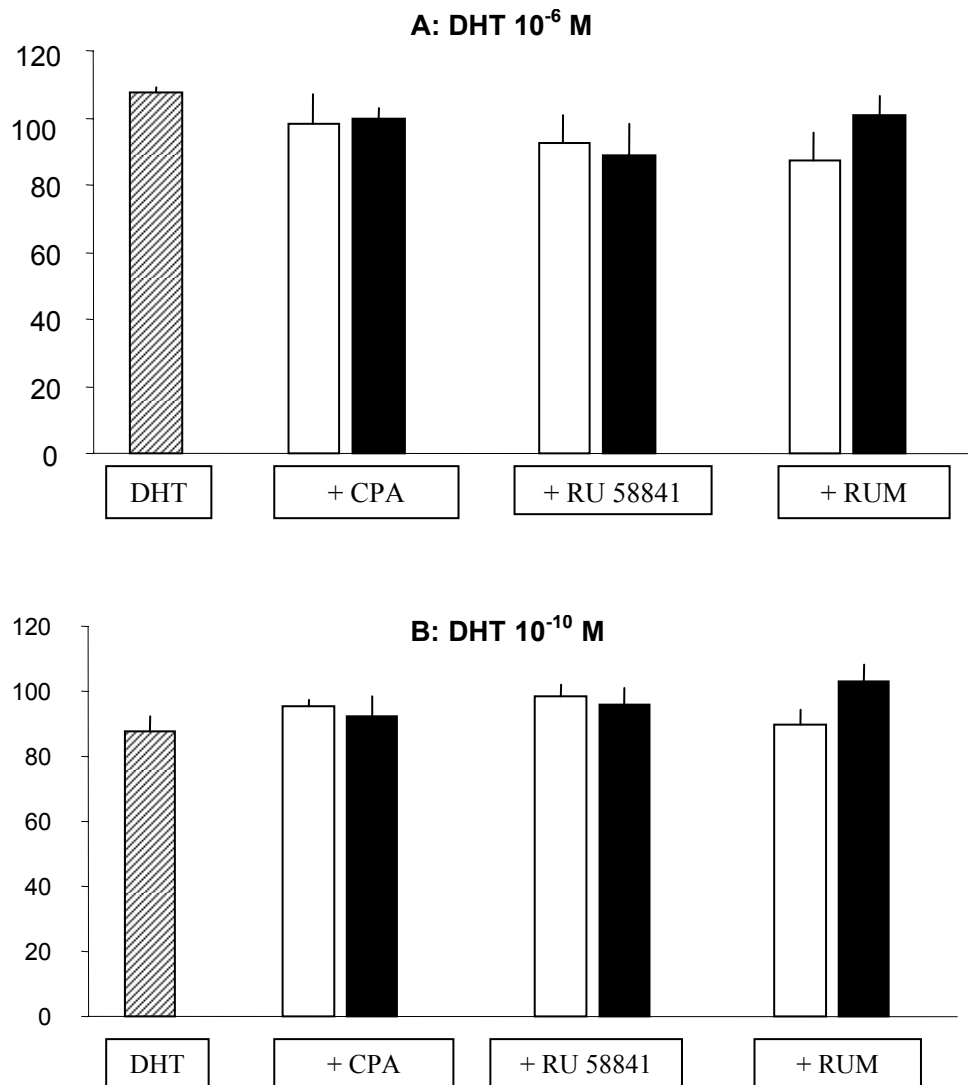


Abb. 17: Proliferation (%) der SZ95 Zelllinie unter dem Einfluss von DHT 10^{-6} M und 10^{-10} M (gestreifte Säule) und DHT plus Antiandrogene CPA, RU 58841 und RU 58841-myristat (RUM) 10^{-6} M (offene Säule) und 10^{-7} M (geschlossene Säule) nach 10-tägiger Inkubation (Mittelwert \pm SD aus drei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

Rezeptorbindungsstudie. 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.

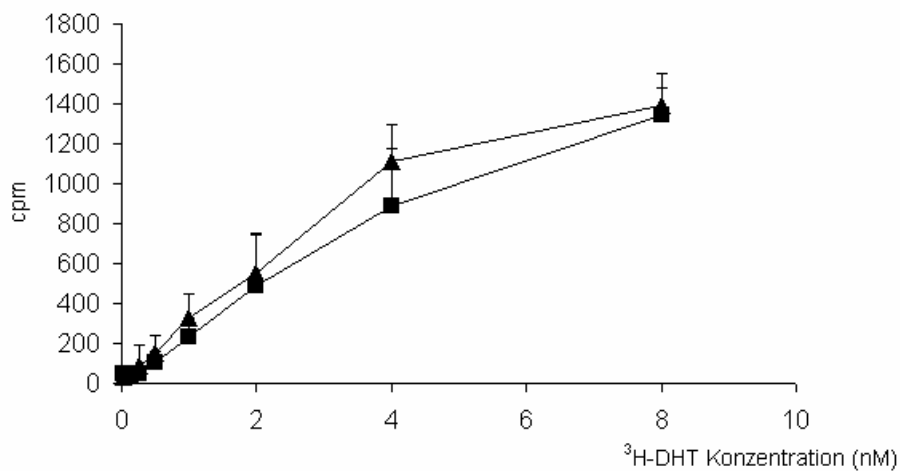


Abb. 18: Rezeptorbindung von 3H -DHT in SZ95 Zellen. Zur Ermittlung der Gesamtbindung (▲) wurden die Zellen mit steigenden Konzentrationen an 3H -DHT inkubiert. Zur Erfassung der unspezifischen Bindung (■) erfolgte ein Zusatz von 500fachem Überschuss an unmarkiertem DHT (Mittelwert \pm SD, $n=3$), doch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

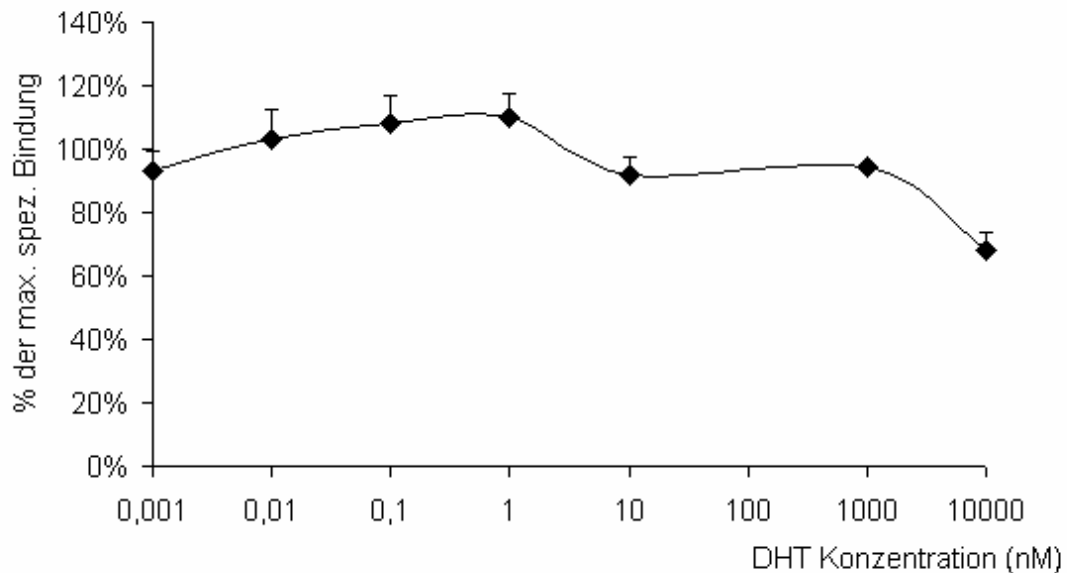


Abb. 19.: Versuch zur Verdrängung des ^3H -DHT (4 nM) vom Androgenrezeptor durch DHT (0,001-10000 nM), als Kontrolle (100 %) wurde ^3H -DHT ohne DHT gesetzt (Mittelwert \pm SD, $n=3$).

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 Chemoluminiszenz 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).

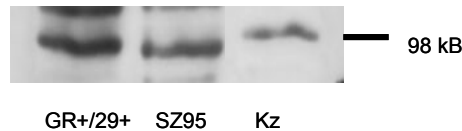


Abb. 20: Detektion von Androgenrezeptor bei SZ95 Zellen mittels WesternBlot. Als Positivkontrolle dienten GR+/29+ Zellen. Da unser Antikörper unspezifisch band, konnte die Präsenz bzw. Absenz vom AR nicht sicher festgestellt werden. Versuch wurde dreimal wiederholt und führte zu gleichen Ergebnissen.

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).

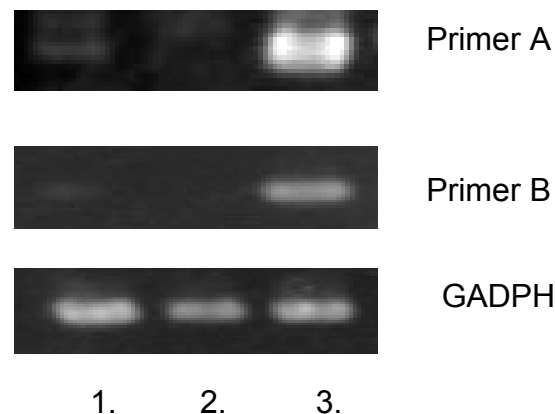


Abb. 21: PCR Analyse der mRNA-Expression des Androgenrezeptors in der Sebozytenzelllinie SZ95. Bande 1: Keratinozyten, Bande 2: SZ95, Bande 3 GR+/29+

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)
Poloxamer 188 2,5 %	Compritol® (%)	Precirol® (%)	CPA (%)	
	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)
Poloxamer 188 2,5 %	Precirol®	Compritol®	Ölsäure	Miglyol	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)
Poloxamer 188 2,5 %	Ölsäure	Miglyol	CPA	
		+	0,05	-
	+		0,05	-

Tab. 8: Nanoemulsionen Rezepturen