

## 4. DISKUSSION

Cyproteronacetat ist ein wichtiger Arzneistoff zur oralen Behandlung androgenabhängiger Hauterkrankungen bei Frauen. Bei Männern ist CPA aber wegen ungewünschten Nebenwirkungen in diesen Indikationen nicht indiziert. Eine lokale Applikation wäre sehr wünschenswert.

Da es in der Literatur keine Daten zu Metabolisierung von CPA in der Haut gibt, wurde als erstes die mögliche Spaltung von CPA in Cyproteron durch humane Hautzellen untersucht. Cyproteron wurde als Standard für HPLC benötigt und durch alkalische Hydrolyse hergestellt. Die Bindung von CPA und CP an den Androgenrezeptor wurde an GR+/29+ untersucht. Die antiandrogene Wirkung von CPA und RU 58841, einen potentiellen Arzneistoff zur Behandlung von Akne und androgenetische Alopezie und dessen Myristat-Prodrug sollte an Sebozytenzelllinie SZ95 verglichen werden.

Im Weiteren sollten Trägersysteme für eine topische Antiandrogentherapie entwickelt werden. CPA wurde in nano- und mikropartikuläre Systeme einarbeitet, charakterisiert und die Penetration/Permeation im Vergleich zur Creme bestimmt. Mit Nilrot-beladenen Partikeln konnte ein transfollikulärer Penetrationsweg gezeigt werden. Da das Stratum corneum offenbar jedoch die Hauptbarriere der Hautpenetration darstellt, galt es für eine genauere Risikoanalyse auch den Einfluss der defekten Hornschicht auf die Penetration zu untersuchen.

### 4.1 HPLC Analytik für CPA

Eine zuverlässige Analytik, die eine Identifizierung und Quantifizierung von CPA und seinem möglichen Metaboliten erlaubt, sollte etabliert werden. Erste Überlegung zur Einsetzung einer hoch sensitiven RIA Analytik erwiesen sich als schwer durchführbar, da CPA in radioaktivmarkierter Form nicht zur Verfügung steht.

HPLC Analytik ist zwar eine zeitlich aufwendigere und weniger sensitive Methode, hinsichtlich der Arbeitsicherheit und Kosten aber vom Vorteil. Anhand von Publikationen (Cannell et al., 1981; Frith and Phillipou, 1985; Valenta and Janisch, 2003; Yodo et al., 1988, Tab. 14), die Methoden zur Erfassung von CPA Konzentrationen in Plasma, Serum und Urin beschrieben, wurde eine HPLC Methode etabliert und validiert,

mit welcher der CPA-Gehalt in Zellen, Zellmedien und Hautextrakten zu quantifizieren ist. Eine isokratische Elution mit Acetonitril/Wasser (61:39) ergab eine sehr gute Trennung aller Substanzen. Der Einsatz von 19-Nortestosteron als interner Standard erwies sich als besonders vorteilhaft, da so das Auftreten der Störpeaks minimiert wurde und eine gute Selektivität und Spezifität erreicht werden konnte. Die Bestimmungs- und Nachweisgrenzen für CPA lagen dagegen höher als in Literatur üblich. Dennoch war die Methode für die Untersuchungen der kutanen Resorption ausreichend empfindlich. Die Parameter für Richtigkeit, Präzision und Wiederfindung entsprachen allen Anforderungen auf eine robuste Methode (Tab. 3). Unabhängig von dieser Arbeit veröffentlichte de Hassonville 2004 die Validierung einer HPLC-Methode, bei welcher der CPA Gehalt in der Haut mit einem ähnlichen Extraktions- und Analyseverfahren untersucht wird (de Hassonville et al., 2004).

Autor	Matrix	Fließmittel	Wellenlänge	LOD	LOQ
Frith (1985)	Humanplasma, Urin	Acetonitril/Wasser (65/35)	282 nm	20-40 nmol/ml	-
Yodo (1988)	Humanserum	Methanol/Acetonitril/Wasser (55/6/39)	284 nm	15 ng/ml	-
Valenta (2003)	Akzeptormedium (Propylenglykol/PBS 4/6)	Acetonitril/Wasser (40/60)	280 nm	-	-
De Hassonville (2004)	Humanhaut (Epidermis, Dermis)	Acetonitril/Wasser (42/60)	282 nm	10,1 ng/ml	33,3 ng/ml
Stecova (2006)	Humanhaut, Akzeptormedium (PBS+ 5 % BSA), Zellmedien	Acetonitril/ Wasser (61/39)	284 nm (CPA) 246 nm (19-NT)	160 ng/ml (Ethanol)	208 ng/ml (Ethanol)

Tab. 14: HPLC-Methoden zur Detektion und Quantifizierung von CPA in verschiedenen Matrices und deren Parameter (die Bestimmung von LOD und LOQ erfolgte aus Extrakten der entsprechenden Matrices oder aus Lösemittel).

## 4.2 CPA Spaltung und kutane Metabolisierung

CPA wird nach systemischer Gabe durch Leberhydroxylasen zu 15 $\beta$ -Hydroxy-CPA umgewandelt (Frith and Phillipou, 1985; Yodo et al., 1988). 15 $\beta$ -Hydroxy-CPA wird von manchen Autoren als für antiandrogene Wirkungen verantwortlich gesehen, da nach einer topischer CPA-Applikation die Sebosuppression weniger stark ist als bei systemischer Gabe. Der Einfluss des Vehikels auf den Wirkstofftransport wurde in dieser Studien allerdings nicht diskutiert (Luderschmidt et al., 1987). Mittels Radioimmunoassay wurde eine deutliche Besserung der Aknelässionen nach topischer Anwendung von CPA-haltigen Liposomen bei Frauen in einer Placebo-kontrollierten Studie gezeigt (Gruber et al., 1998). Daher ist die Wirksamkeit von nativen CPA wahrscheinlich.

Trotzdem gibt es bis jetzt keine Untersuchung, die sich mit einer kutanen Metabolisierung von CPA näher beschäftigt. Eine esteratische Spaltung durch humane Hautzellen (Keratinocyten, Fibroblasten) wurde bereits bei Glukokortikoiden (Gysler et al., 1999; Gysler et al., 1997) beschrieben. Auch die Sebozytenzelllinie SZ95 zeigt eine Esteraseaktivität, die zur Spaltung des RUM zu aktivem RU 58841 führt (Münster et al., 2005). Zur Identifizierung potenzieller Metaboliten durch HPLC wurde 15 $\beta$ -Hydroxy-CPA und das mögliche Spaltprodukt CP benötigt. Auf die Synthese des 15 $\beta$ -Hydroxy-CPA wurde hierbei auf Grund synthetischer Schwierigkeiten verzichtet, eine HPLC Identifizierung anhand von Retentionszeiten von Yodo et al. zeigt, dass im Gegensatz zu seinen Untersuchungen mit Humanserum in der Haut kein 15 $\beta$ -Hydroxy-CPA gebildet wird (Yodo et al., 1988). Für die Synthese des CP wurde CPA zunächst einer esteratischen Spaltung mit Schweineleberesterasen unterworfen. Da diese aber nicht zum gewünschten CP führte, wurde eine alkalische Hydrolyse eingesetzt und die Identität des entstandenen CP anhand von <sup>1</sup>H-NMR-Spektrometrie, C-H-N-Analyse und Massenspektrometrie bestätigt (Abb. 11, 12).

Nach 24 h Inkubation humanen von Fibroblasten, Keratinocyten und SZ95 waren in den Zellmedien sowie Zellextrakten keine Metaboliten nachweisbar. Nach 48 h und doppelter Zellzahl wurde ungf. 1 % des CP gefunden. Eine Beeinträchtigung der Zellvitalität durch CPA wurde mit dem MTT-Test ausgeschlossen. Auch nach der Applikation der CPA-haltigen Präparationen auf frische Humanhaut waren auf Chromatogrammen keine Spalt- oder Hydroxylierungsprodukte sichtbar. Dies steht im Einklang mit der Metabolisierung von Glucocorticoiden, bei denen nur eine Esterverbindung in der Position 21 und nicht

---

eine in der Position 17 des Steriodgerüsts einer Spaltung durch Esterasen der Haut unterliegt (Gysler et al., 1999). Eine topische CPA-Applikation sollte also nicht zu einer Umwandlung der Substanz in der Haut führen.

### 4.3 Pharmakodynamik von CPA und CP

**Rezeptorbindung.** Eine starke Bindung zum Androgenrezeptor ist ein entscheidender Faktor zur Entfaltung der antiandrogenen Wirkung. CPA hat eine hohe Affinität zum Androgenrezeptor. So wurde in Vorhautfibroblasten nur 5-10 mal schwächere Affinität zum AR gemessen als die des sehr stark bindenden DHT (Brown, Rothwell, 1981), Breiner et al. zeigte allerdings eine etwa 50 mal schwächere Bindung (Breiner et al., 1986). Zur Rezeptoraffinität von CP gibt es keine Angaben. In dieser Arbeit wurde die Affinität von CPA und CP zu Androgenrezeptor in einer murinen Fibroblastenzelllinie untersucht. Es ergaben sich folgende  $IC_{50}$  Werte:  $5\alpha$ -dihydrotestosteron 0,36 nM, CPA 63,8 nM und CP 442,5 nM (Abb. 15). Die CPA-Affinität zum AR bei GR+/29+ Zellen war also etwa 150-mal schwächer in Vergleich zu DHT, CP etwa 1500-mal. Diese Ergebnisse zeigen, dass CPA stark an dem Androgenrezeptor bindet, etwa ebenso potent wie von Breiner et al. beschrieben. Das auch in sehr geringen Mengen gebildete CP trägt dagegen nicht zur Wirksamkeit bei.

#### **Untersuchung der Wirkung von Androgenen und Antiandrogenen auf SZ95-Zellen.**

Androgene spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Akne. Sie sind bekannt für ihre Wirkungen auf die Sebozytenproliferation und Differenzierung, die zur vermehrten Talgproduktion führt (Zouboulis, 2004). Da Akne eine artspezifische Erkrankung ist, gibt es kein spezifisches Tiermodell (Nikkari, 1974). Mehrere Zellkulturmodelle aus isolierten primären Sebozyten wurden etabliert und dienen zur in vitro Untersuchungen (Kealey et al., 1986; Xia et al., 1989). Die Antwort dieser Zellen auf Androgene entspricht ihrer anatomischen Herkunft, die Proliferation unter DHT-Einfluss (Akamatsu et al., 1992) sowie eine dosisabhängige Proliferationshemmung durch Spironolacton (Akamatsu et al., 1993) und Retinoide (Zouboulis et al., 1991) sind belegt. Vom Nachteil ist aber die kurze Lebensdauer primärer Sebozyten, die sehr schnell unter intrazellulärer Fettakkumulation ausdifferenzieren und anschließend ruptieren. Eine immortalisierte Sebozytenzelllinie SZ95 wurde etabliert, die hinsichtlich der Zellmorphologie, der Expression von

Differenzierungs- und Androgenstoffwechselgenen, sowie Proliferationssteigerung nach DHT-Stimulation, sich wie primäre kultivierte Sebozyten verhält (Zouboulis et al., 1999). Für unsere in vitro Untersuchungen der antiandrogenen Eigenschaften von CPA, CP, RU 58841 und RUM wurde uns von Prof. Zouboulis diese Zelllinie freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Da Antiandrogene DHT von dem Androgenrezeptor kompetitiv verdrängen und so die Hemmung der Talgdrüseproliferation bewirken, wurde im ersten Schritt eine DHT Konzentration gesucht, die SZ95-Zellen zum Wachstum stimuliert. Der Einsatz FKS-freies Medium beeinträchtigte die Zellmorphologie und Zellviabilität erheblich. Im FKS-haltigen Medium proliferierten die Zellen bis zu 18 Tagen. Da im FKS enthaltene Faktoren wie TGF $\beta$  wachstumsinhibierend wirken können (Rosenfield et al., 1998), wurde auch ein mit Aktivkohle behandeltes FKS eingesetzt. Dies förderte allerdings bei einer DHT Konzentration von 0,1 nM das Wachstum nur geringfügig (Abb. 16) und eine Hemmung des Sebozytenwachstums durch Antiandrogene (CPA, CP, RU 58841, RUM) wurde nicht erreicht (Abb. 17). Ebenso konnte Chen et. al keinen regulatorischen Effekt auf die SZ95 Proliferation unter dem Einfluss von Testosteron, DHT und Dexamethason in der Konzentration  $10^{-6}$  M beobachten (Chen et al., 2003).

Diese Ergebnisse weisen daher entgegen unseren Erwartungen auf eine verminderte oder fehlende Expression des Androgenrezeptors hin. Auch wenn direkt nach der Immortalisierung der Sebozyten die mRNA für AR detektiert wurde (Fritsch et al., 2001), kann bei der weiteren Passagierung der Zelllinien diese Fähigkeit verloren gehen (Jat et al., 1991). Im Folgenden wurde daher diese Zelllinie auf Expression des Androgenrezeptors geprüft.

**Untersuchung zur Expression des Androgenrezeptors bei SZ95-Zellen.** Eine Rezeptorbindungsstudie zeigte nicht die erwartete Verdrängung des  $^3\text{H}$ -DHT durch DHT vom Androgenrezeptor (Abb. 19). Zudem ließ sich der Rezeptor nicht mittels PCR auf mRNA-Ebene nachweisen (Abb. 21). Ein direkter Nachweis des Rezeptors mittels WesternBlot misslang allerdings, da unser Antikörper nicht spezifisch genug war und an mehrere Proteine band (Abb. 20). Diese Ergebnisse lassen allerdings an der Expression des funktionsfähigen Androgenrezeptors in SZ95 Zelle erheblich zweifeln.

---

#### 4.4 Rezepturentwicklung und Charakterisierung der partikulären Trägersysteme

Nach einer topischen Therapie androgenabhängiger Erkrankungen, die bei guter Wirksamkeit unerwünschte systemische Wirkungen verringert, wird seit langer Zeit gesucht. Cyproteronacetat ist ein starker Androgenrezeptorantagonist, der als Kandidat für die topische Behandlung von androgenetischer Alopezie, Akne und Hirsutismus in Betracht kommt. Über die dermale Aufnahme von CPA aus topischen Zubereitungen ist allerdings bisher nur wenig bekannt. Eine kontrollierte Permeation von CPA aus verschiedenen phospholipidhaltigen Formulierungen auf Schweinespalthaut (1 mm) konnte durch das Einarbeiten von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren ermöglicht werden (Valenta and Janisch, 2003). Gruber et al haben bei Applikation von CPA-haltigen Liposomen einen gleichen therapeutischen Effekt wie mit peroralen Therapie erzielt, gleichzeitig aber die CPA-Plasmakonzentration auf 1/10 reduziert (Gruber et al., 1998). Darüber hinaus wurden kubische Phasen aus Carrageenen mit CPA als vielversprechende transdermale Systeme beschrieben (Kahlig et al., 2005).

Lipid-Nanodispersionen stellen ein innovatives Trägersystem zur topischen Applikation dar. Sie werden mittels Heiß- oder Kalthomogenisation unter Ausschluss organischer Lösemittel hergestellt (Mehnert and Mäder, 2001). Auch andere Methoden stehen zur Verfügung, die die Herstellung besonders kleiner Partikel ermöglichen, allerdings ist hierfür der Einsatz organischer Lösemittel erforderlich (Hu et al., 2002). Mit Prednicarbat-beladenen SLN wurde im Vergleich zu einer Creme eine Anreicherung des Wirkstoffs in den oberen Hautschichten erreicht (Santos Maia et al., 2002). Im Gegensatz dazu war mit Betamethasonvalerat-beladenen Partikeln ein solches Targeting in die Epidermis nicht zu beobachten (Sivaramakrishnan et al., 2004). Dies wird nach bisherigem Kenntnisstand mit einer unzureichenden Assoziation von Betamethasonvalerat an die Partikeloberfläche erklärt (Sivaramakrishnan et al., 2004). Münster et al haben nach einer Applikation von mit Nilrot-beladenen und silbermarkierten SLN eine Aufnahme in den Haarfollikel beobachtet (Münster et al., 2005).

In dieser Arbeit sollte eine Rezeptur für CPA- beladene nano- und mikropartikuläre Träger entwickelt werden, die eine möglichst hohe Beladungskapazität und gleichzeitig eine ausreichende physikalische Stabilität aufweist. Der Einfluss dieser Trägersysteme

auf die CPA-Hautaufnahme sollte in Versuchen an exzidierter Humanhaut untersucht werden.

Ein häufig zu beobachtendes Problem der Lipid-Nanodispersionen ist eine physikalische Instabilität der Zubereitungen, die z.B. zur Auskristallisation des Wirkstoffs führt. Dies hängt insbesondere mit der Übersättigung der Lipidphase zusammen, eine Erhöhung des Lipidanteils in der Dispersion kann aber eine Gelierung des Systems verursachen (Freitas and Müller, 1999; Westesen and Siekmann, 1997). Durch den Zusatz eines flüssigen Lipids soll die Beladungskapazität und die Stabilität des Systems erhöht werden, diese „modifizierten Lipid-Nanopartikel“ werden als NLC bezeichnet (Müller et al., 2002).

In dieser Arbeit wurden zwei feste Lipide; Compritol<sup>®</sup> und Precirol<sup>®</sup> eingesetzt. Compritol<sup>®</sup> ist ein Ester des Glycerols mit Behensäure (C22) und besteht aus Mono- Di- und Triglyceriden. Neben der Behensäure sind noch Fettsäuren der Kettenlänge C16-C20 vorhanden. Precirol<sup>®</sup> ist ein Gemisch aus Glycerol-Palmitinsäure- und Stearinsäureestern und setzt sich aus Mono-, Di- und Triglyceriden des Glycerolpalmitats und -stearats zusammen.

**Nanopartikuläre Träger.** Die Beladung der SLN mit 0,1 % CPA erwies sich sowohl beim Einsatz von Compritol<sup>®</sup> als auch von Precirol<sup>®</sup> als instabil. Bei Compritol<sup>®</sup> waren nach 2-3 Tagen, bei Precirol<sup>®</sup> 5-7 Tage nach der Herstellung Wirkstoffkristalle im lichtmikroskopischen Bild erkennbar (Abb. 25). Erst bei der Konzentration von CPA von 0,05 % erwies sich eine precirolhaltige Formulierung 3 Wochen als stabil. Die bei den ersten Charge beobachtete Gelierung konnten durch Lagerung unter Lichtschutz bei 4 °C vermieden werden. Eine Woche nach der Herstellung zeigten mit 0,05 % CPA beladene SLN mit Compritol<sup>®</sup> auch eine Rekristallisation des Wirkstoffs. Deshalb wurde auf den Einsatz von Compritol<sup>®</sup> verzichtet. Durch den Einsatz von Polysorbat 80 als Tensid wurden BMV-beladene SLN (Precirol<sup>®</sup>) stabilisiert (Nakamura, 2004), dies gelang jedoch mit CPA-beladenen SLN nicht, es trat am Tag der Herstellung eine Verfestigung der Dispersion auf.

Über Schwierigkeiten bei der Herstellung von Lipid-Nanodispersionen mit einer für die Therapie ausreichender Wirkstoffbeladung wurde bereits mehrfach berichtet. Durch Veresterung des schlecht löslichen RU 58841 mit Myristinsäure zu RU 58841-myristat wurde die Einarbeitung in Precirol<sup>®</sup>-SLN ermöglicht (Münster et al., 2005). Die

Erhöhung der Beladungskapazität durch Mischung flüssiger und fester Lipide führte bei Retinol (Jenning, 1999) und Ciclosporin A (Radtke, 2002) zur langzeitstabilen NLC-Dispersionen. Durch den Zusatz von Miglyol wurde die kristalline Ordnung des festen Lipids teilweise oder vollständig aufgehoben und das Freisetzungsprofil maßgeblich beeinflusst (Radtke, 2002). Miglyol ist ein Triglycerid aus gesättigten Fettsäuren der Kettenlänge C8-C12 und dient als Vehikel für perorale Suspensionen, wird aber auch als Hautöl und Lösungsmittel verwendet (Fiedler, 1996). Durch die Einarbeitung von Miglyol in Precirol® steigt die CPA-Löslichkeit in der Lipidphase, was tatsächlich zur Stabilisierung des Systems bis zu 8 Wochen führte. Auch der Einsatz von Ölsäure führte zu einer besseren Stabilität im Vergleich zur entsprechenden SLN-Dispersion.

Alle Zubereitungen (SLN, NLC-M, NLC-O) zeigten eine enge Partikelgrößenverteilung (PI: 0,1-0,2), die mittlere Partikelgröße lag im Bereich zwischen 200 und 250 nm und blieb in dem untersuchten Zeitraum unverändert (Abb. 22).

**Mikropartikuläre Träger.** Mikropartikel auf der Basis von Lipiden wurden mittels Heißhomogenisation hergestellt. Durch die Herstellungsbedingungen (Zeit, Drehzahl) lässt sich die Partikelgröße gut steuern. Um einen ähnlichen Aufbau mit nanopartikulären Formulierungen zu gewährleisten, wurde ebenfalls 10 % Precirol® verwendet und 0,05 % CPA in die Lipidmatrix eingearbeitet. Die Mikropartikel waren stabil. Rekristallisation des Wirkstoffes fand nicht statt, allerdings kam es zu einer ausgeprägten Sedimentation, was die Applikation erschwert. Der Zusatz von Ölsäure führte zu einer schnellen Verfestigung der Dispersion und wurde deswegen nicht weiter verfolgt. Partikelgrößen lagen je nach Drehzahl und Zeit in dem Bereich zwischen 5 und 14 µm (Abb. 23). Es konnte gezeigt werden, dass mit einem Ultraturax eine enge Partikelgrößenverteilung mit unimodalem Verlauf erhalten werden kann. Für die Versuche wurde Präparation mit einer Partikelgröße von 6-7 µm ausgewählt.

**Lokalisation des Wirkstoffes.** Neben der Partikelgröße und Zusammensetzung der Partikel beeinflusst die Lokalisation des Wirkstoffes innerhalb des Partikels die Freisetzungskinetik. Bei Inkorporation des Wirkstoffes in die Lipidmatrix ist eine retardierte Freisetzung zu erwarten, eine Assoziation an der Oberfläche oder in oberflächennahen Bereichen bewirkt eine rasche Freisetzung („burst release“). Mit Tetracain- und Etomidat-beladenen SLN wurde ein burst release beobachtet (zur Muhlen

et al., 1998), im Gegensatz zu Prednisolon- und Clobetasol propionat-SLN, die nach einem kurzem burst release eine langsame über Tage bis Wochen dauernde Liberation zeigten (Hu et al., 2002).

Bisher steht keine Methode zur Verfügung, die eine eindeutige Lokalisation des Wirkstoffs im oder am Partikel ermöglicht. Zur Aufbau der NLC wurden drei Modelle beschrieben (siehe Einleitung). Der Aufbau gemäß Typ III konnte bei Retinol- sowie Cyclosporin A-beladenen NLC anhand von NMR-Messungen und Freisetzungsstudien wahrscheinlich gezeigt werden (Jenning et al., 2000a; Radtke, 2002). ESR-Messung (Elektronenspinrezonanzspektroskopie) von spingelabelten SLN und NLC weisen allerdings auf eine Anlagerung des Wirkstoffes bzw. von Öltröpfen an der Partikeloberfläche hin (Bunjes et al., 2001; Jores et al., 2003). Erste Untersuchungen mit nanopartikulären Trägern beladen mit Glucocorticoiden oder Nilrot zeigen allerdings, dass eine Aufklärung der Interaktion von Wirkstoff/Marker und Lipid mittels der PS gelingen könnte (Lombardi Borgia et al., 2005; Sivaramakrishnan et al., 2004).

**Parelektische Spektroskopie.** Diese Methode diente zur Aufklärung der Interaktion Wirkstoff-Partikel und des davon abhängigen Penetrationsverhalten von BMV- und PC-SLN. Der Targeting-Effekt bei PC-SLN wurde durch eine bessere Assoziation von PC mit der Oberfläche von Nanopartikeln erklärt, da keine Sättigung der Trägermoleküle mit den Wirkstoffmolekülen und daher keine Abnahme der Beweglichkeit  $f_0(c)$  festgestellt werden konnte. Die Resultate der PS von BMV-beladenen SLN zeigen dagegen bei einer BMV-Konzentration von 0,05 % ein Maximum  $f_0(c)$ , was als maximale Bedeckung der Trägeroberfläche interpretiert wurde. Bei einer 0,1 %igen SLN-Dispersion kristallisierte dagegen BMV aus in dem überladenen System (Sivaramakrishnan et al., 2004).

Die in dieser Arbeit untersuchten CPA-haltigen NLC-O, NLC-M, MS Zubereitungen zeigten eine geringfügige Abnahme der gemessenen Beweglichkeit  $f_0(c)$  mit steigender Arzneistoffkonzentration, was auf einen Masseneffekt, d.h. Einlagerung des CPA in die Trägermatrix deutlich hinweist (Abb. 27). Das beweist uns wieder, dass eine hoch lipophile Substanz in der (flüssigen) Lipidphase eingeschlossen wird, wenn sie in kleinen Mengen ( $\leq 1$  % des Lipidanteils) zum Lipid beigemischt wird (Lombardi Borgia et al., 2005). Die Ergebnisse lassen allerdings keinen Schluss zu, wo sich die Arzneistoffmoleküle innerhalb der Partikelmatrix der MS Zubereitung befinden.

Die SLN Zubereitung zeigten dagegen einen parabolischen Verlauf der gemessenen Beweglichkeit  $f_0$  (c) mit steigender Arzneistoffkonzentration. Dies zeigt eine Adsorption des Wirkstoffes an die Partikeloberfläche. Der geringe CPA-Anteil von nur 0,4 % in der hydrophilen Phase nach der Filtration unterstützt die bei diesen Konzentrationen ungehinderte Assoziation mit den Partikeln. (Tab. 10). Eine genaue Fehlerbetrachtung der PS-Ergebnisse findet sich in einer Arbeit zur Anwendung dieser Methode in der medizinischen Diagnostik (Blaschke et al. 2006): wir dürfen für  $f_0$  und für  $\Delta\epsilon$  von einem relativen Fehler von 2 % ausgehen. In wie weit die Zusammensetzung der Lipid- und Tensidchargen die Beweglichkeit und die Dipoldichte beeinflussen kann, ist noch nicht klar. Allerdings scheint sich der Trend zu bestätigen, dass eine Erhöhung des Tensidanteils zu einer Verringerung der Beweglichkeit  $f_0$  und zu einer Erhöhung der Dichte  $\Delta\epsilon$  der elektrischen Dipolmomente führt.

#### 4.5 In-vitro-Untersuchung kutaner Penetration und Permeation

**Penetration und Permeation bei intakter Haut.** Untersuchungen an Humanhaut zeigten eine signifikante Anreicherung des Wirkstoffes in den ersten 0-100  $\mu\text{m}$  nach 6stündiger Applikation der SLN, NLC-O, NLC-M und MS im Vergleich zur Creme. Besonders gut war die Penetration aus der SLN-Zubereitung. Die CPA-Penetration aus der Nanoemulsion entsprach der Aufnahme aus der Creme. In der Hauttiefe von 100-200  $\mu\text{m}$  (bzw. 200-400  $\mu\text{m}$ ) wurden bei allen partikulären Formulationen ähnliche CPA-Mengen wie bei der Creme detektiert. Bei Applikation der nano- und mikropartikulären Zubereitung unterschieden sich die CPA-Mengen nicht von der nach Applikation der Creme. Insbesondere für die SLN ergab sich aber eine deutliche (4fache) Anreicherung gegenüber der Creme in der ersten Hautschicht, die die Epidermis und Teile des oberen Korium enthält (Abb. 28). Ein solcher Targeting-Effekt wurde schon bei PC-beladenen SLN beschrieben (Maia et al., 2000). Bei beiden Zubereitungen zeigte die Raman-Spektroskopie eine starke Assoziation (PC-SLN bzw. CPA-SLN) des Wirkstoffes. Diese Interaktion erscheint nach bisherigem Wissensstand Voraussetzung für ein kutanes Targeting. Aber auch bei der Applikation von NLC-O und MS war die CPA Konzentration in dem 1. Hautschnitt verglichen mit der Creme mindestens um das Doppelte erhöht.

NLC-Zubereitungen förderten die CPA Penetration in die Haut weniger stark als SLN. In dieser Arbeit wurde die NLC-Rezeptur modifiziert, in dem neben Miglyol auch Ölsäure als flüssige Phase eingesetzt wurde. Ölsäure ist als Penetrationenhancer bekannt und auf Grund einer guten Hautverträglichkeit für die topische Applikation geeignet. Die bessere Arzneistoffpenetration wird durch die Interaktion von Ölsäure mit den Stratum corneum-Lipiden erklärt, wobei maximale Effekte schon bei 5-10 % Ölsäure erreicht werden (Schneider et al., 1997). Der Einsatz der Ölsäure (20 % bezogen auf die Lipidphase) in unserer NLC-Dispersion brachte ebenso wie in den Untersuchungen mit einer Mikroemulsion (Schmalfuß et al., 1996) mit Diphenhydramin keinen Vorteil bezüglich der Penetration oder Permeation

Im Weiteren zeigte die Extraktion der Klebefilm-Abrisse eine starke Depotbildung in den obersten Schichten des Stratum corneum nach der Applikation der Nanoemulsion und Mikropartikel. Creme, SLN, NLC-O und NLC-M führten dagegen zu gleichen Wirkstoffmengen in den Klebefilm-Abrissen und in der Hautschicht 0-100 µm, was eine Überschätzung der penetrationsfördernden Wirkungen durch Verschleppung des CPA aus den obersten Hautschichten in die Schicht 0-100 µm ausschließt.

Wie bei Santos Maia et al. wurde auch in diesen Untersuchungen nach 24stündiger Applikation der SLN (bzw. NLC-O und NLC-M) eine höhere CPA-Konzentration im Akzeptormedium im Vergleich zur Creme beobachtet. Das könnte mit der Freisetzung aus dem Reservoir des Stratum corneums erklärt werden. Ein anderes Freisetzungsprofil zeigten Mikropartikel. Obwohl die CPA-Penetration aus Mikropartikeln um nur 1/3 geringer war als aus SLN, lag die Konzentration im Akzeptormedium nach 24 h Applikation von MS um 2/3 niedriger als bei SLN (Abb. 31). Dies steht mit der beschriebenen limitierten Abgabe aus der Hornschicht in Einklang. Da die Partikelgröße dieser Träger in unseren Untersuchungen bei 6 µm (LD 95 %) lag, kann vermutet werden, dass diese Partikel bei Aknepatienten zu einem großen Teil in die Haarfollikelöffnungen und nur zum Teil in die oberste Schicht des Stratum corneums penetrierten (Toll et al., 2004). Im Gegensatz dazu können die etwa 20fach kleinere Nanopartikel die Hautbarriere sowohl über den follikulären als auch über den transepidermalen Weg überwinden. Die Haarfollikel erlauben einem Aknemittel zudem den direkten Zugang zum Wirkort Talgdrüse.

**Penetration bei defekter Hornschicht.** Diese Untersuchungen dienten zur Abschätzung der Aufnahme von CPA bei defekter Hornschichtbarriere, die zu vermehrten lokalen bzw. systemischen Nebenwirkungen führen könnte. Bislang erfolgten nur wenige vergleichende Untersuchungen zur kutanen Resorption bei intakter und defekter Hornschicht. Diese zeigen, dass die Hornschicht die Penetration von hydrophilen Substanzen deutlich stärker behindert als die von lipophilen Substanzen. Vollständiges Entfernen des Stratum corneum erhöhte die Penetration von 8-Methoxypsoralen ( $\log P$  1,93) bei Humanhaut nur auf das 3fache (Anigbogu et al., 1996), von Penciclovir ( $\log P$  - 2,03) aber auf das 1300-fache (Morgan et al., 2003). Die perkutane Resorption von Methylprednisolonaceponat ( $\log P$  4,01) *in vitro* aus einer O/W-Emulsion stieg bei 20maligem Strippen von Humanhaut auf das 30fache (Gunther et al., 1998). Auch in unseren Untersuchungen wurde als Modell für eine partiell defekte Barriere die Haut 20-mal gestrippt. Damit wurden etwa 66 % des Stratum corneum entfernt (Jacobi et al., 2005). Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede in der kutanen Penetration zwischen gestrippter und unbehandelter Haut festgestellt werden (Abb. 32). Zwar können Unterschiede in der Effizienz der Entfernung der Hornschicht nicht ausgeschlossen werden- sehr große Bedeutung sollte das Material des Klebefilms (Bashir et al., 2001), Intensität und die Dauer des Pressdruckes (Loffler et al., 2004), individuelle Variabilität der Spender (Dreher et al., 2005) und die anatomische Herkunft der Hautprobe (Loffler et al., 2004) besitzen. Wahrscheinlicher ist allerdings, dass die Freisetzung aus dem Träger bei partikulären Carrier und Creme die Resorption gleichermaßen bestimmt. Vor allem für die kutane Aufnahme aus der Creme scheint die Auflösung des dispergierten Wirkstoffes in den Hautlipiden der geschwindigkeitsbestimmende Schritt zu sein. Zudem sollte die geringe Adhäsion des partikulären Trägers an die Hautoberfläche reduzierter Barriere entgegenwirken.

**Follikuläre Penetration.** Wie bereits im Teil 1.5 beschrieben, ist der follikuläre Weg für die Penetration nano- und mikropartikulären Zubereitungen von großer Bedeutung. In dieser Arbeit sollte der Transport zum Haarfollikel untersucht werden, in dem Haarfollikel mit der Cyanacrylatstripping-Technik entfernt wurden. Da aber nach der Follikelisolierung nur sehr kleine Mengen an Material zur Verfügung stehen, kann keine HPLC Methode eingesetzt werden. Nitrobelade SLN, NLC-O und Creme wurden daher appliziert und die Intensität dieses Fluoreszenzfarbstoffes an jeweils 20 Follikeln

untersucht. Eine deutliche Zunahme der Intensität nach 6 h verglichen mit 3 h konnte bei allen Präparationen beobachtet werden, da aber viele Haarfollikel nicht vollständig entfernt wurden, war eine Quantifizierung nicht möglich. Um den follikulären Penetrationsweg zu verfolgen, sollten Methoden eingesetzt werden, die möglichst nicht invasiv und hoch selektiv sind. Mit Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) können in vivo solche Penetrationsprozesse sowie der Wachstum und Sebumexkretion jeden einzelnen Haarfollikel untersucht werden (Otberg et al., 2003). Auch die Zwei-Photonen Laser Scanning Fluoreszenz-Mikroskopie (TPLSM, König et al., 2006) könnte uns dank hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung erlauben, den follikulären Transportweg sichtbar zu machen (Denk et al., 1990).

### **4.6 Ausblick**

In dieser Arbeit wurde Cyproteronacetat bezüglich seiner pharmakokinetischen und – dynamischen Eigenschaften an Zellkulturen charakterisiert. Ferner wurden Arzneistoffträger für topische Applikation gesucht. Neben SLN erschienen mikropartikuläre Träger vielversprechend. Um den Nutzen dieser Träger besser beurteilen zu können, sollten weitere optische Methoden eingesetzt werden, die mit Hilfe farbstoffbeladener Partikel die Quantifizierung und genaue Lokalisation innerhalb des Haarfollikels ermöglichen. Die Einarbeitung dieser Träger in halbfeste Zubereitungen sollte zeigen, ob die Stabilität erhöht wird und die Effekte auf die Penetration/Permeation erhalten bleiben.

Da sich die Sebozytenzelllinie SZ95 auf Grund fehlender Androgenrezeptoren als ungeeignet für anti-/ androgene Untersuchungen gezeigt hat, muß -zumindest bis auf weiteres- an primären Sebozyten bzw. Zellen der dermalen Papille das Potential von Antiandrogenen getestet werden. Alternativ stehen das Hamsterflankenorgan, sowie der Stumpfschwanzmakakaffen als Tiermodelle zur Verfügung.

Der durch partikuläre Träger erzielte Targeting Effekt sollte auch mit anderen Wirkstoffgruppen möglich werden. Erstrebenswert erscheint ein Targeting vor allem auch bei der Behandlung von Hauttumoren mit Polymerasehemmstoffen.