



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Einfluss von lysinhaltigen Liposomen auf die Hautpermeation eines Modellstoffes

zur Erlangung des akademischen Grades
Magister/a Pharmaciae (Mag.pharm.)
an der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Universität Wien

Verfasser/in: Daniela Elisabeth Spengler
Matrikelnummer: 0200468
Studienrichtung: Pharmazie (A449)
Begutachter: Ao. Univ.-Prof. Dr. Claudia Valenta

Wien, im Oktober 2008

Danksagung

Ich möchte mich ganz besonders bei Frau Ao. Univ.- Prof. Mag. Pharm. Dr. Claudia Valenta für die ausgezeichnete Betreuung, das angenehme Arbeitsklima und ihre Hilfsbereitschaft während meiner gesamten Diplomarbeit bedanken.

Mein Dank gilt Herrn Ao. Prof. Dr. Martin Kratzel für die Synthesen der Lysinderivate.

Insbesondere möchte ich mich bei meinen Eltern für die Ermöglichung eines sorgenfreien Studiums und ihre liebevolle Unterstützung bedanken.

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
2. Allgemeines	3
2.1. Die Haut	3
2.2. Penetrationsfördernde Stoffe	4
2.3. Zell Penetrierende Peptide	5
2.4. Liposomen	8
2.4.1. Charakteristik	8
2.4.2. Herstellung	9
2.4.3. Anwendung	10
2.4.4. Problematik	11
2.5. Fluconazol	12
2.5.1. Pharmakologie	12
2.5.2. Stoffeigenschaften	13
2.6. Lysin	15
3. Geräte	21
3.1. Hochdruckhomogenisator	21
3.2. Zetasizer	23
3.2.1. Zetapotential	23
3.2.2. Teilchengröße	25
3.3. Franz – Diffusionszelle	26
3.4. HPLC	28
4. Experimenteller Teil	29
4.1. Herstellung der Formulierung	29
4.1.1. Herstellung der Liposomen	29
4.1.2. Einarbeitung von Fluconazol	29
4.1.3. Zugabe der Lysinderivate	30

4.2. Physikalisch- chemische Charakterisierung	31
4.2.1. Teilchengröße	31
4.2.2. Zetapotential	31
4.2.3. Physikalische Stabilität	31
4.3. Analytik von Fluconazol mittels HPLC	32
4.3.1. Parameter	32
4.3.2. Methode	33
4.3.3. Eichgerade	33
4.4. Permeationsversuche	35
4.4.1. Versuchsanordnung und praktische Durchführung	35
5. Ergebnisse	37
5.1. Physikalische Stabilität	37
5.2. Diffusionsversuche	44
6. Diskussion	51
7. Zusammenfassung	55
8. Literaturverzeichnis	57
9. Anhang	61
10. Lebenslauf	73

1. Einleitung

Liposomale Formulierungen werden in der Dermopharmazie schon seit längerer Zeit gerne verwendet. Dies verdanken sie unter anderem ihrer toxikologischen Unbedenklichkeit und ihrer Verwendung als ausgezeichnete Transportvehikel für verschiedenste Arzneistoffe (1, 2, 3).

Am Beispiel von Estradiol konnte gezeigt werden, dass durch Einarbeitung penetrationsfördernder Stoffe in Liposomen, eine Steigerung der Wirkstoffpenetration erzielt werden konnte (4).

In den letzten Jahren haben auf dem Gebiet der Penetrationenhancer, so genannte Zell Penetrierende Peptide (CPPs), zunehmend an Bedeutung gewonnen, da sie in der Lage sind, den Transport von Makromolekülen durch biologische Membranen zu verbessern. Deshalb sind solche Peptide für viele verschiedene Bereiche von Interesse (5, 6).

Diese Peptide zeichnen sich durch hohe Anteile an Arginin oder Lysin aus. Bezüglich der topischen Anwendung wurde ein Argininoligomer erfolgreich für die Steigerung der Penetration von Cyclosporin eingesetzt. Damit werden für CPPs in der Dermopharmazie neue Möglichkeiten eröffnet (7).

Ziel der vorliegenden Diplomarbeit war, durch gleichzeitige Einarbeitung verschiedener Lysinderivate und eines Modellarzneistoffes in Liposomen, eine Verbesserung der Hautpermeation zu erreichen. Als Modell für CPPs wurden verschiedene Lysinderivate synthetisiert.

Zunächst sollte eine stabile, gut applizierbare, liposomale Formulierung entwickelt werden.

Als Modellarzneistoff wurde Fluconazol ausgewählt, da es sich gut in Liposomen einarbeiten ließ und ein durchaus relevantes Einsatzgebiet repräsentiert. In diese 1%igen fluconazolhaltigen Liposomen sollten nun die verschiedenen Lysinderivate in unterschiedlichen Mengen eingearbeitet werden und ihr Einfluss auf die physikalische Stabilität und die Hautdiffusion untersucht werden.

Getestet wurde der Effekt von Lysin-5, Lysin-7 und Lysin-9 sowie der Polypeptide A1 und A2. Die Oligo-Lysine und Polypeptide wurden in Konzentrationen von 10 und 20 Mol % in die jeweiligen Zubereitungen inkorporiert.

Durch den Vergleich der Fluconazoldiffusion aus Liposomen mit und ohne Lysinderivate sollte ein penetrationsfördernder Effekt bestätigt und quantifiziert werden. Zunächst sollen die allgemeinen Bedingungen bei einer Hautdiffusion beleuchtet werden.

2. Allgemeines

2.1. Die Haut

Die menschliche Haut ist aus mehreren übereinander liegenden Schichten aufgebaut. Dabei bildet die Epidermis, mit dem Stratum corneum, die äußerste Grenze. Darunter befindet sich die Dermis, gefolgt von der Subcutis. Schweißdrüsen, Talgdrüsen, Haare und Nägel sind als Hautanhangsgebilde in die Haut eingelagert. Auf der Hautoberfläche des Menschen befindet sich ein Fettfilm, der sich aus einem Gemisch abgestoßener, keratinisierter Hornzellen und den Ausscheidungs- bzw. Abcheidungsprodukten der Hornschicht, der Talg und Schweißdrüsen zusammensetzt (1).

Als Hauptpermeabilitätsbarriere der Haut fungiert die Hornschicht. Sie besteht aus ziegelsteinähnlich geschichteten Korneozyten, die in einem intrazellulären Lipidmörtel eingebettet sind. Diese Lipide gelten als hauptverantwortlich für die Barriereigenschaften der Hornhaut (1).

Im Gegensatz zu anderen biologischen Membranen ist die Lipidzusammensetzung des Stratum corneums nahezu frei von Phospholipiden. Sie besteht vorwiegend aus Ceramiden, Cholesterol, Fettsäuren und Cholesterolestern (2).

Die perkutane Wirkstoffpermeation kann auf Grund des strukturellen Aufbaus der Hornschicht nur auf zwei Wegen erfolgen (siehe Abb. 2.1.). Einerseits gibt es die intrazelluläre Passage, wobei sich die Wirkstoffe zwischen den Zellen hindurch bewegen. Andererseits können sie mittels transzellulärer Passage durch die Korneozyten und extrazelluläre Lipiddoppelschichten diffundieren.

Ob ein Wirkstoff den intrazellulären oder den transzellulären Weg bevorzugt hängt von seiner Löslichkeit, dem Verteilungskoeffizienten und dem Diffusionskoeffizienten ab (2).

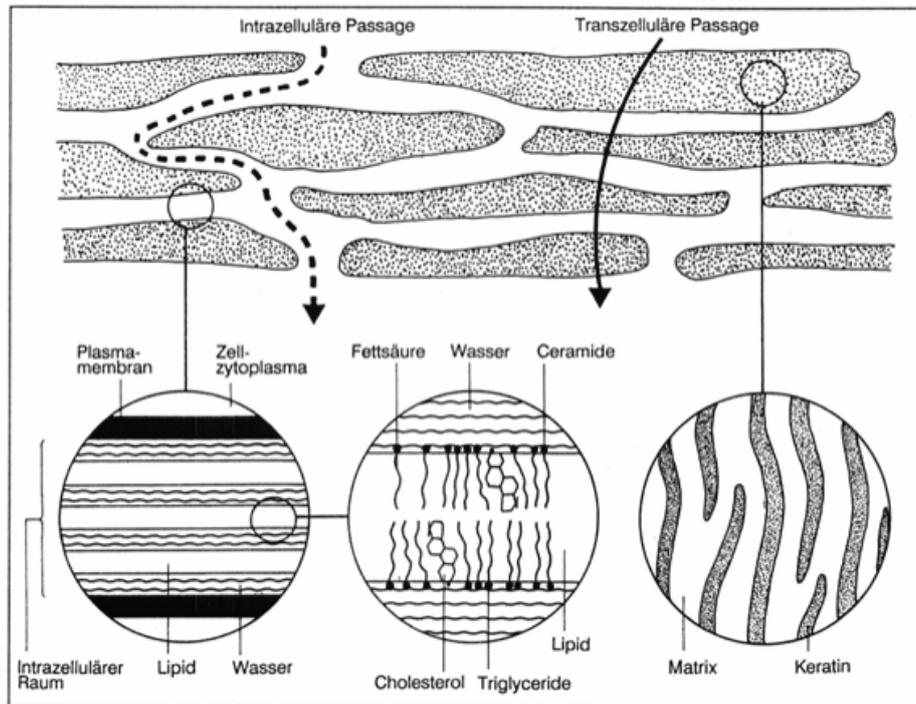


Abb. 2.1. Transportwege durch das Stratum corneum (2)

2.2. Penetrationsfördernde Stoffe

Das Ziel penetrationsfördernder Stoffe, auch Enhancer genannt, ist es die Barrierefunktion der Hornhaut herabzusetzen, um die Permeation und Penetration eines Arzneistoffes zu erhöhen bzw. zu beschleunigen.

Damit ein Stoff als Penetrationsenhancer geeignet ist muss er einer Reihe von Anforderungen entsprechen. Unter anderem sollte die Substanz reizlos, pharmakologisch unbedenklich und stabil sein. Außerdem ist ein hoher Grad an Wirksamkeit, sowie die optimale Verträglichkeit mit den übrigen Bestandteilen der Formulierung unbedingt notwendig. Von großer Bedeutung ist es auch, dass die Barrierefunktion der Haut nicht irreversibel zerstört wird, sondern sich nach Absetzen der Zubereitung möglichst rasch wieder regeneriert (1, 2, 3).

Penetrationsfördernde Stoffe erreichen ihre Wirkung auf drei verschiedene Arten. Zum einen können sie eine Änderung in der Struktur des Stratum corneums bewirken, indem sie mit den polaren Kopfgruppen der Lipide reagieren. Dadurch erleichtern sie die Diffusion polarer Substanzen.

Zum anderen kann es, durch eine Volumenerhöhung des chemisch nicht gebundenen Wassers zwischen den Bilayerschichten, zu einer Hydratation kommen. Dies führt zu einer Veränderung der Wirkstoffverteilung in der Hornhaut.

Eine weitere Möglichkeit ist die Einlagerung der Enhancer zwischen den Kohlenstoffketten der Lipide. Dadurch wird die Diffusion apolarer Moleküle gefördert.

Zu den zahlreichen Penetrationenhancern zählen unter anderem:

- Alkohole
- Sulfoxide
- Fettsäuren und Fettsäureester
- Polyole
- Amide
- Tenside
- Terpene
- Alkanone
- sowie organische Säuren (1, 3)

2.3. Zell Penetrierende Peptide (CPPs)

Bei den Zell Penetrierenden Peptiden, die auch oft als Protein Transduktions Domänen (PTDs) oder Membran Transduktions Domänen (MTDs) bezeichnet werden, handelt es sich um eine Klasse von kleinen Peptiden die meistens aus weniger als 30 Aminosäuren bestehen. Sie besitzen auf Grund ihrer Zusammensetzung kationische oder amphiphile Eigenschaften. Kationische CPPs besitzen häufig einen hohen Anteil an Lysin und Arginin. Die Besonderheit der CPPs liegt darin, dass sie in der Lage sind Markomoleküle, wie zum Beispiel Proteine und Oligo-Peptide, durch die Plasmamembran von Säugetierzellen zu transportieren. Diese galten lange wegen ihrer geringen Permeationsfähigkeit und ihres raschen Zerfalls als unbedeutend (5, 6, 7, 8).

Über den allgemeinen Wirkmechanismus der CPPs wird viel diskutiert. Zunächst ging man davon aus, dass es zur Ausbildung von Umkehrmizellen kommt. Genauer

gesagt wurden bei dem CPP Penetratin, Interaktionen zwischen seinen kationischen, tryptophanhaltigen Bereichen und der negativ geladenen Plasmamembran beobachtet. Es folgt eine, durch Tryptophan induzierte, Veränderung der Lipiddoppelschicht, von einer ausgedehnten zu einer hexagonalen Form. Dadurch kommt es zur Einstülpung in die Membran und zur Bildung von Umkehrmizellen. Die Mizelle nimmt das Peptid mit seiner Ladung in seinen hydrophilen Hohlraum auf und setzt anschließend seinen Inhalt in das Zytoplasma frei (8).

Später wurden zwei unterschiedliche Wege als sehr wahrscheinlich erachtet. Zum einen existiert die Möglichkeit der Transduktion. Sie ist energie- und rezeptorunabhängig und erfolgt entweder über das zuvor besprochene Prinzip der Umkehrmizellen oder mittels direkter Membranpenetration.

Zum anderen spielen endozytotische Vorgänge eine wichtige Rolle. Vor allem die Aktin abhängige Makropinozytose, die in allen Zellen in unterschiedlicher Häufigkeit vorhanden ist, bietet sich als Transportmechanismus an. Makropinozytose ermöglicht die Aufnahme von CPPs, die große Ladungen beinhalten.

Eine andere Hypothese geht davon aus, dass die Ladung der CPPs durch Vorhandensein von Gegenionen, die entweder amphiphil oder hydrophil sind, neutralisiert oder verändert werden kann. Es kommt zur Veränderung der Lipophilie und der Löslichkeit, wodurch die CPPs in die Lipiddoppelschicht eindringen können und so für die Membranpenetration sorgen. Beim Wiederaustritt aus der Membran kommt es zur Freisetzung ins Zytosol (5).

Am wahrscheinlichsten ist, dass CPPs in Abhängigkeit ihrer Ladung und den daraus resultierenden Eigenschaften, unterschiedliche Wege bevorzugen.

Mittlerweile existieren einige CPPs deren Eigenschaften sehr gut erforscht werden konnten. Zu den bekanntesten von ihnen zählen die abgeleiteten Peptide von:

Ursprung	Bezeichnung
HIV Transkriptionsfaktor	TAT
Homeodomäne des Drosophila melanogaster	Antp
HSV	VP22

Zell Penetrierende Peptide sind als Therapieansatz für verschiedenste Krankheiten von Interesse. Unter anderem wurden sie bereits erfolgreich in Mausmodellen zur Behandlung von Krebs, Schlaganfällen, Bluthochdruck und Entzündungen eingesetzt (6, 7).

Auch im Bereich entzündlicher Hauterkrankungen konnten bereits Erfolge erzielt werden. Cyclosporin A, das nach topischer Applikation nicht in der Lage ist, durch die Haut zu penetrieren und auf Grund der vielen Nebenwirkungen systemisch nur ungern eingesetzt wird, wurde mit einem Argininheptamer verknüpft. Dieses Heptaarginin-Cyclosporin A Peptid, auch R7-CsA bezeichnet, ist im Stande nach topischer Applikation in die Zellen der Epidermis und Dermis zu gelangen. In einem Mausmodell zur Therapie der Kontaktdermatitis konnte R7-CsA erfolgreich eingesetzt werden (6).

Eine andere Studie beschäftigte sich mit der Frage ob Magainin, ein aus dreiundzwanzig Aminosäuren bestehendes Peptid, das aus der Haut des afrikanischen Krallenfrosches isoliert wurde, in der Lage ist die Hautpermeabilität des Stratum corneums durch Störung der Lipidstruktur zu steigern. Magainin besitzt die Fähigkeit, Poren in die bakterielle Zellmembranen zu formen. Zwar konnte eine Steigerung der Penetration in die Hornhaut bestätigt werden, jedoch benötigt man zusätzlich einen chemischen Enhancer damit Magainin bis in die lebende Epidermis vordringen kann (9).

In der vorliegenden Diplomarbeit wurden penetrationsfördernde Effekte verschiedener Oligo-Lysine und Polypeptide untersucht.

Verwendete Peptide:

Kurzbezeichnung	Aminosäuresequenz	Molekulargewicht
Lysin-5	KKKKK	658 g/mol
Lysin-7	KKKKKKK	914 g/mol
Lysin-9	KKKKKKKKK	1171 g/mol
Polypeptid A1	KAKAKAK	744 g/mol
Polypeptid A2	KAAKAAK	687 g/mol

2.4. Liposomen

2.4.1. Charakteristik

Liposomen setzen sich aus einer hydrophilen und einer lipophilen Komponente zusammen. Als Hauptbestandteil enthalten sie Phospholipide, die, wenn sie mit Wasser in Kontakt kommen, spontan kugelförmige Vesikel ausbilden.

Mit Hilfe verschiedener Techniken, wie zum Beispiel der Extrusion, lassen sich aus den Vesikeln unterschiedliche Arten von Liposomen herstellen (3, 10).

Die Hülle der Liposomen kann aus einer oder mehreren Lipiddoppelschichten bestehen (Abb. 2.4.1.). Man unterscheidet daher zwischen unilamellaren (einschichtigen), oligolamellaren (aus wenigen Schichten bestehenden) und multilamellaren Liposomen (die aus mehreren Phospholipiddoppelschichten bestehen) (3).

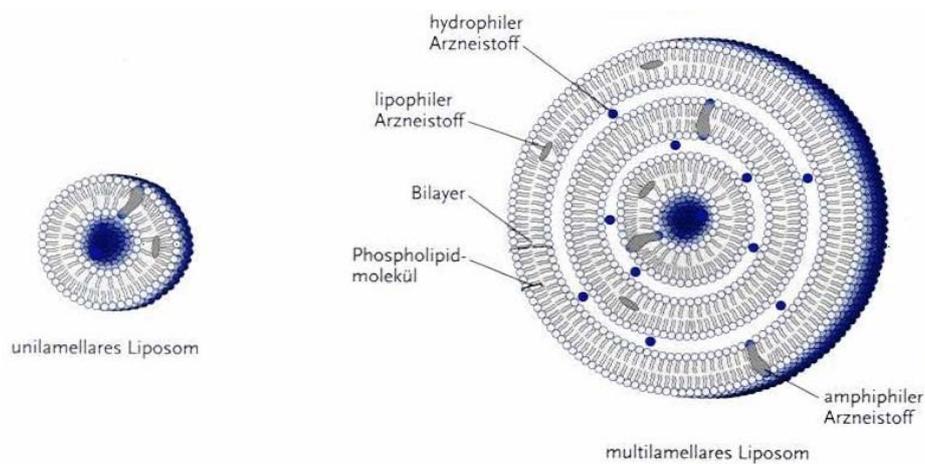


Abb. 2.4.1. Liposomen (3)

Weiters lassen sich die Liposomen anhand ihrer Größe einteilen:

- kleine unilamellare Vesikel (SUV) besitzen einen Durchmesser von 20 – 50 nm
- große unilamellare Vesikel (LUV) können Größen bis zu einigen μm erreichen

- bei den multilamellaren Liposomen (MLV) wechseln sich Phospholipiddoppelschichten mit wässrigen Schichten ab, sie können von 100 nm bis zu mehreren 1000 nm groß sein
- Größere Liposomen werden als multivesikuläre Liposomen (MVV) bezeichnet, da sie aus nebeneinander liegenden, eingeschlossenen Vesikeln bestehen (10, 11).

Liposomen dienen als Transportvehikel sowohl wasserlöslicher, als auch fettlöslicher Arzneistoffe. Hydrophile Substanzen werden der wässrigen Phase zugesetzt und lagern sich entweder im wasserhaltigen Innenvolumen oder in den wässrigen Zwischenschichten (siehe Abb. 2.4.1.) ein. Hydrophobe Stoffe arbeitet man in die Fettphase ein, wodurch sie in die Lipidschicht eingebaut werden (3, 10).

Als Ausgangssubstanzen für Liposomen werden vier verschiedene Arten von Phospholipiden verwendet:

- natürliche Phospholipide wie Lecithin oder Phosphatidylcholin
- modifizierte natürliche Phospholipide wie zum Beispiel hydriertes Phosphatidylcholin
- halbsynthetische Phospholipide durch Veränderung der Acylketten und
- vollsynthetische Phospholipide, diese besitzen zum Beispiel PEG oder Zuckerreste als nicht native Kopfgruppen (1).

2.4.2. Herstellung

Die Herstellung erfolgt mit Hilfe organischer Lösungsmittel, Verwendung von Detergenzien oder den Gebrauch mechanischer Verfahren.

Man stellt eine organische Lösung der Membranlipide her, trocknet diese und hydratisiert mit wässriger Puffer- oder Wirkstofflösung. Auf diese Weise entstehen MLV, die bei topischer Applikation nicht weiter zerkleinert werden müssen.

Für die parenterale Anwendung ist eine mechanische Zerkleinerung mittels Extrusion bzw. Hochdruckhomogenisation notwendig. Bei der Extrusion wird die Dispersion mit einem Druck von ca. 100 bar durch eine Polycarbonatmembran gepresst. Diese

besitzt eine Porengröße von 100 bis 200 nm, wodurch LUV entstehen. Durch den wesentlich höheren Druck von bis zu 1400 bar entstehen bei der Hochdruckhomogenisation SUV sowie LUV (10).

Es können aber auch Mischmizellen gebildet werden, indem man geeignete Detergenzien mit Phospholipiden und Cholesterol versetzt. Nach der Entfernung des Detergenz erhält man SUV oder LUV, deren Größe durch das jeweils verwendete Detergenz und die Geschwindigkeit der Detergenzentfernung gesteuert wird (10).

2.4.3. Anwendung

Liposomen werden sowohl in der Kosmetik als auch in der Pharmazie als Transportvehikel eingesetzt. Als Grund dafür gilt unter anderem ihre toxikologische Unbedenklichkeit, die durch ihre natürlichen Hauptbestandteile gewährleistet ist (12, 13).

Liposomen können als Depot fungieren und so für eine kontrollierte Wirkstofffreisetzung sorgen. Sie werden jedoch auch zur gezielten Organverteilung von Arzneistoffen und als Hilfsmittel zur verbesserten Wirkstoffaufnahme eingesetzt. Ihre Haupteinsatzgebiete sind die parenterale und topische Anwendung (1, 3, 10, 11, 12, 13).

Das erste Produkt mit Liposomen zur parenteralen Anwendung war Ambisome[®], eine Formulierung mit Amphotericin B. Dieses Antimykotikum wird zur Behandlung systemischer Mykosen eingesetzt und galt lange Zeit wegen seiner nephrotoxischen Wirkung als problematisch. Durch die neue Formulierung konnte die Verträglichkeit erheblich gesteigert werden.

Durch die liposomale Verkapselung der Zytostatika Daunorubicin (DaunoXome[®]) und Doxorubicin (Doxil[®]) konnte die Kardiotoxizität dieser Arzneistoffe fast vollständig beseitigt werden.

Alveofact[®] wird zur Behandlung des Atemnotsyndroms (IRDS) bei Frühgeborenen eingesetzt. Hierbei handelt es sich um eine liposomale Zubereitung die aus Rindersurfactant hergestellt wird. Dieses Präparat beinhaltet die wesentlichen Bestandteile des Lungensurfactant, der bei Frühgeborenen oft nicht vollständig entwickelt ist und daher intratracheal instilliert werden muss. Durch diese

Behandlungsmöglichkeit konnte die Sterblichkeit von Frühgeborenen deutlich gesenkt werden.

Weitere Anwendung finden Liposomen bei der Verkapselung von Röntgen- und Kontrastmitteln (3, 10, 11).

Bei der topischen Anwendung ist zu erwähnen, dass es noch keine eindeutigen Ergebnisse über die Penetrationstiefe der Liposomen gibt. Wahrscheinlich interagieren Liposomen mit den dort vorhandenen Lipiden des Stratum corneums. Dabei verlieren sie ihre Struktur. Deshalb sind intakte Liposomen in tieferen Hautschichten nicht nachweisbar. Allerdings gibt es auch Berichte über die Penetration intakter Liposomen, die mit Proteinen beladen waren (1).

Als gesichert gilt, dass Liposomen den Hydratationszustand der Haut verändern und dadurch die Wirkstoffpermeation verbessern können (10, 11).

Da schon die Applikation von Leerliposomen einen positiven Effekt auf die Hauthydratation ausübt, stand der kosmetische Gebrauch topischer Anwendungen lange Zeit im Vordergrund (1, 3, 10).

Mittlerweile werden Liposomen aber auch im pharmazeutischen Bereich eingesetzt. Das econazolhaltige Prevaryl[®] Lipogel war das erste, am Markt erhältliche, liposomale Dermatikum. Es wird zur Behandlung von Pilzkrankungen der Haut eingesetzt. Der Vorteil dieser Formulierung ist die höhere Wirkstoffkonzentration in der Haut, sowie die kürzere Behandlungsdauer gegenüber herkömmlichen Produkten (10, 11).

Zubereitungen mit Heparinen, wie zum Beispiel Hamametum[®] Creme oder HeparinPur[®] sind ebenfalls erhältlich. Sie werden bei Stauungen und Blutergüssen eingesetzt und zeigen gegenüber vergleichbaren Produkten eine verbesserte Mikrozirkulation in der Haut. Diese Wirkung lässt sich durch das Eindringen von Heparin in tiefere Hautschichten erklären (3, 10, 11).

2.4.4. Problematik

Problematisch erweist sich die begrenzte Haltbarkeit und Stabilität der Liposomen.

Bei leeren, bzw. mit lipophilen Wirkstoffen beladenen Liposomen, ist eine Autoklavierung durchaus möglich.

Für liposomale Zubereitungen, die hingegen hydrophile Wirkstoffe beinhalten ist diese Methode nicht anwendbar, da die hohen Temperaturen zu einer Fluidisierung der Membran führen, wodurch es zum Austritt der Substanzen kommt.

Hydrophile Arzneistoffe stellen aber auch bei normaler Lagerung ein Problem dar, weil sie aus den Liposomen austreten können. Dies kann jedoch durch eine Steigerung der Dichtheit der Membran verzögert werden, indem man Cholesterol oder hydrierte Phospholipide zusetzt.

Der Vorteil hydrierter Lipide ist, dass es zu keinen oxidativen Veränderungen kommt. Durch diese Zusätze tritt weniger als 10 % des Wirkstoffes, über einen Zeitraum von 6 Monaten aus den Liposomen aus (10).

Einige Probleme bezüglich der Stabilität können auch durch Gefriertrocknung der liposomalen Präparate beseitigt werden (10, 11).

2.5. Fluconazol

Fluconazol gehört zur Gruppe der Azolantimykotika, die zur Behandlung von Pilzinfektionen eingesetzt werden. Als erste Substanz dieser Gruppe kam Clotrimazol 1973 zum Einsatz. Anschließend folgte die Entwicklung zahlreicher Azole, so dass sie heute zu den wirksamsten und am häufigsten verordneten Antimykotika gehören (14, 15).

2.5.1. Pharmakologie

Das wirksame Prinzip aller Azolantimykotika beruht auf der Störung der Ergosterolbiosynthese. Genauer gesagt hemmen Azole das Cytochrom-P450-abhängige Enzym Lanosteroldemethylase, wodurch es zu einem Mangel an Ergosterol kommt. Als essentieller Bestandteil von Pilzen ist Ergosterol wichtig für die Fluidität und Funktion der Zellmembran.

Der Einbau falscher Sterole in die Membran verändert das Lipidmuster. Es kommt zu einer Veränderung der Fluidität sowie der Aktivität membrangebundener Enzyme, wie zum Beispiel der Chinitinsynthetase. Diese ist essentiell für das Zellwachstum und die Zellteilung von Pilzen (14, 15).

Azolantimykotika wirken hauptsächlich fungistatisch. Sie eignen sich nicht zur Behandlung akuter lebensbedrohlicher Pilzinfektionen, da ihre Wirkung erst langsam eintritt (15).

Antimykotisch wirksame Azolderivate lassen sich in lokal anwendbare Azole und Azole zur systemischen Anwendung einteilen.

Zu den lokal anwendbaren Azolen gehören Bifonazol, Croconazol, Econazol, Fenticonazol, Ketoconazol, Miconazol, Oxiconazol, Sertaconazol und Tioconazol.

Systemisch anwendbare Azole sind Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol und Posaconazol.

2.5.2. Stoffeigenschaften

Struktur

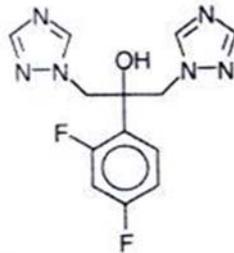


Abb. 2.5.1. Struktur von Fluconazol (15)

Summenformel

$C_{13}H_{12}F_2N_6O$

Synonym

INN: 2-(2,4-Difluorphenyl)-1,3-bis(1H-1,2,4-triazol-1-yl)-propan-2-ol

Relative Molekülmasse

306,3 g/mol

Schmelzpunkt

138-140 °C (16)

Fluconazol gehört, wie schon erwähnt, zur Gruppe der systemisch anwendbaren Azole. Charakteristisch für diese Gruppe ist, dass ihre Struktur einen Triazolring aufweist (siehe Abb. 2.5.1.). Lokal anwendbare Azole besitzen anstelle des Triazolringes einen Imidazolring (15).

Applikationsart

Fluconazol kann sowohl peroral als auch intravenös verabreicht werden.

Pharmakokinetische Eigenschaften

Die Resorption aus dem Gastrointestinaltrakt erfolgt rasch und fast vollständig. Fluconazol besitzt eine relativ niedrige Plasmaeiweißbindung von ca. 10 % und eine hohe Bioverfügbarkeit. Durch den Triazolring konnte die metabolische Stabilität verbessert werden, wodurch es zu einer langsameren Elimination kommt. Bezüglich der Elimination ist zu erwähnen, dass ca. 80 % des Fluconazols unverändert renal ausgeschieden werden. Fluconazol besitzt eine Halbwertszeit von etwa 30 Stunden.

Indikationen

Fluconazol wird vor allem zur Behandlung von Candida- und Kryptokokkeninfektionen eingesetzt. Bei der Therapie von AIDS-Patienten die an einer Kryptokokkenmeningitis erkrankt sind, konnten sehr gute Erfolge erzielt werden. Dies liegt an der guten Penetration des Fluconazols in den Liquorraum und der relativ langen Halbwertszeit.

Nebenwirkungen

Hauptsächlich kommt es zu gastrointestinalen Beschwerden, wie zum Beispiel Übelkeit und Erbrechen.

Interaktionen

Die gleichzeitige Anwendung von Antazida führt zu einer Erhöhung des pH-Wertes im Magen, wodurch die Resorption der Azole vermindert wird.

Weitere Interaktionen entstehen bei einer Kombination mit CYP_{3A4} Substraten, die eine geringe therapeutische Breite besitzen, wie Cyclosporin und Tacrolimus. Ihr Abbau wird durch die gleichzeitige Gabe von Azolantimykotika verzögert. Dadurch steigt ihre Nephro- und Hepatotoxizität.

Gleiches gilt auch für Chinidin, Cisaprid, Ergotamin, Terfenadin, Warfarin und einige Benzodiazepine.

Kontraindikation

Auf Grund der teratogenen Wirkung sind alle systemisch anwendbaren Azole in der Schwangerschaft kontraindiziert.

Resistenz

Bei der Behandlung immunsupprimierter Personen sind Resistenzen gegen Fluconazol aufgetreten. Diese sind zum einen durch Mutationen der Lanosteroldemethylase und zum anderen durch Effluxpumpen, die Fluconazol aktiv aus der Zelle transportieren, entstanden (14, 15, 17).

Handelspräparate in Österreich (18)

Diflucan	Kapseln und Infusionsflaschen
Difluzol	Kapseln
Fluconazol	Kapseln und Infusionsflaschen
Flucosept	Kapseln

Derzeit gibt es keine dermale Zubereitung mit Fluconazol.

2.6. Lysin

Struktur

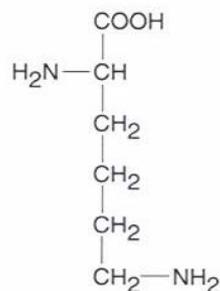


Abb. 2.6.1. Struktur von Lysin (19)

Summenformel



Synonyme

L-Lys; (S)- α , ϵ -Diaminocapronsäure; (S)-2, 6-Diaminohexansäure

One Letter Code: K

Three Letter Code: Lys

Relative Molekülmasse

146,2 g/mol

Schmelzpunkt

224 °C

Hydrophobizitätsgrad

-3,6

Isoelektrischer Punkt

9,74

Allgemeines

Lysin gehört zur Gruppe der essentiellen Aminosäuren, zu der beispielsweise auch Valin und Phenylalanin zählen. Sie ist die zweit hydrophilste Aminosäure nach Arginin und löst sich daher sehr gut in Wasser oder Alkohol. Weiters ist Lysin eine basische Aminosäure, mit zwei Amino-Gruppen von der sich eine in der Seitenkette und die andere am α -Carboxyl Kohlenstoff befindet (16, 20, 21, 22, 23, 24).

Vorkommen und täglicher Bedarf

Da essentielle Aminosäuren nicht vom Körper selbst synthetisiert werden können, müssen sie mit der Nahrung aufgenommen werden.

Lysin findet man vorwiegend in tierischen Proteinen. In Serumalbumin und Serumglobulinen, sowie in Laktalbumin sind hohe Konzentrationen an Lysin enthalten. Besonders reich an Lysin sind Parmesankäse, Thunfisch, Garnelen, Schweine- und Rinderfilet, sowie Sojabohnen und Erdnüsse.

Bei Erwachsenen beträgt der tägliche Bedarf an Lysin ca. 12-14 mg pro kg Körpergewicht. Kinder haben einen 3-fach höheren Bedarf von ca. 44 mg pro kg Körpergewicht (16, 20, 21, 22, 23, 24).

Wirkungen

Zum einen wird Lysin für den Aufbau von Proteinen benötigt und spielt daher eine wichtige Rolle bei der Bildung von Enzymen, Hormonen und Antikörpern, der Kollagensynthese und dem Wachstum. Zum anderen ist bekannt, dass es die Kalziumresorption erhöht und dessen renale Elimination reduziert. Dadurch ist auch erklärbar warum es bei Lysinmangel zu einer schlechteren Knochenheilung kommt.

Zur Säuerung des Organismus und des Harns kann Lysin Hydrochlorid, auf Grund seiner pH-neutralen Verstoffwechslung eingesetzt werden.

Lysin liegt mit einer Konzentration von ca. 190 $\mu\text{mol/l}$ im Plasma vor. Bei Hyperlysinämie und Lysinintoleranz sowie dem Reye-Syndrom kann es zu einem Anstieg der Plasmawerte kommen.

Lysin kann auf unterschiedliche Arten eliminiert werden.

- Entweder durch Proteinbiosynthese
- durch Dimerisierung zu Saccharopin
- durch Decarboxylierung zu Cadaverin
- oder durch Transaminierung zu α -Keto- ϵ -aminocapronsäure.

Der Abbau von Lysin in der Leber führt zur Bildung von Pipecolinsäure, die zu Acetoacetyl-CoA beziehungsweise Acetyl-CoA umgewandelt wird (21, 23).

Anwendung

Lysin wird bei Aminosäuregemischen zur parenteralen Ernährung zugesetzt. Als Hydrochlorid findet es bei metabolischer Alkalose und hyperchlorämischer Alkalose Anwendung. Weiters ist der Einsatz zur Prophylaxe und Therapie der Osteoporose vorstellbar (21).

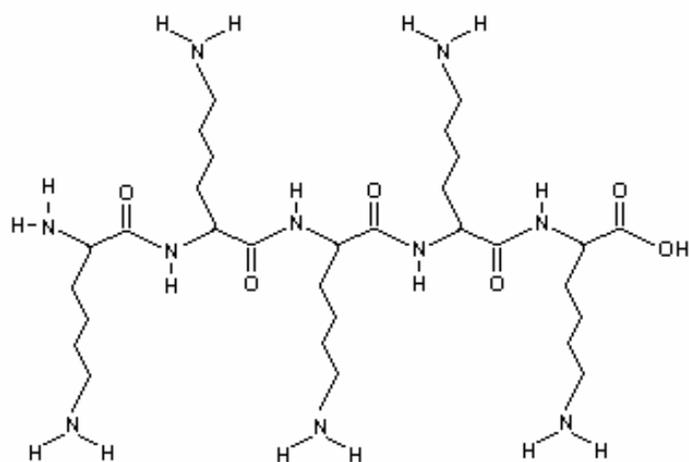
Bei Leberinsuffizienz und Acidose ist die Behandlung mit Lysin kontraindiziert (16).

Gewinnung

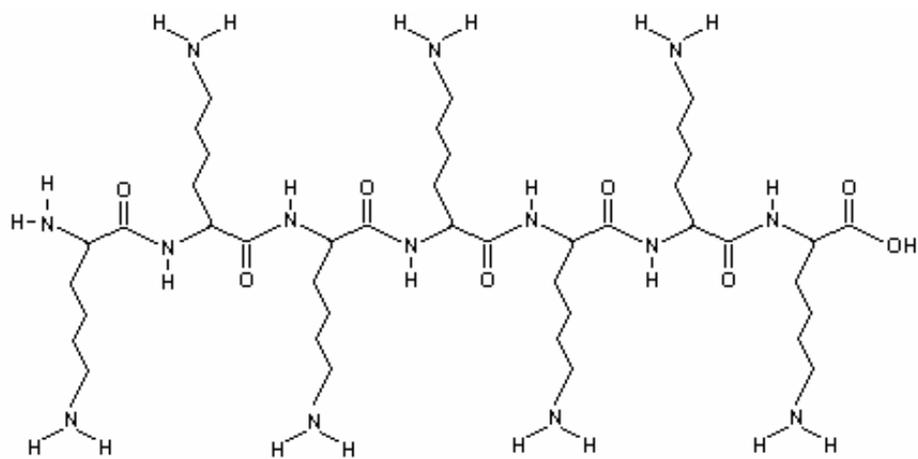
Lysin wird durch Fermentation der L-Lysin produzierenden Bakterien *Brevibacterium flavum* und *Cornebacterium glutamicum* gewonnen (21).

Mittels Festphasensynthese wurden für die Versuche folgende Lysinderivate hergestellt.

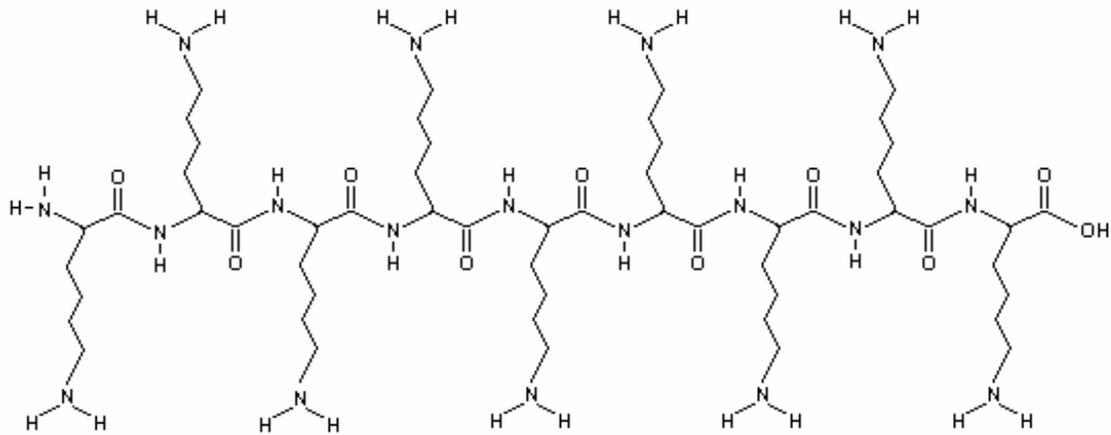
Lysin-5 MG: 658 g/mol



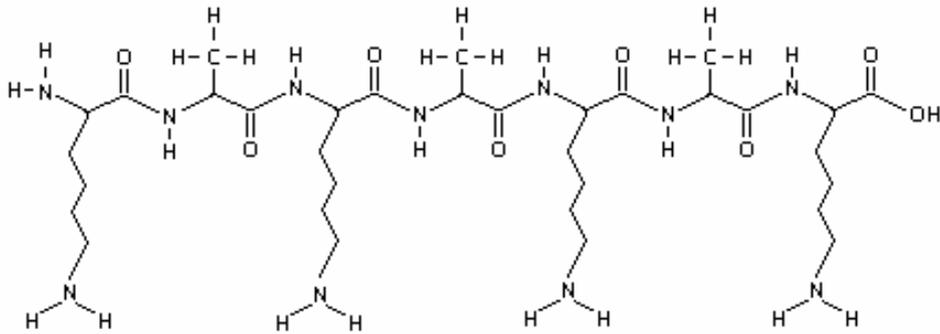
Lysin-7 MG: 914 g/mol



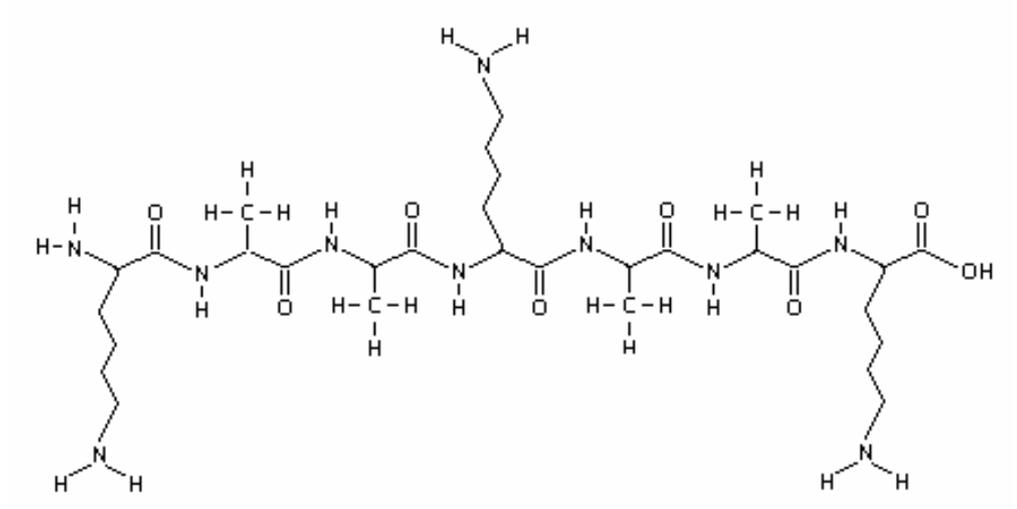
Lysin-9 MG: 1171 g/mol



Polypeptid A1 MG: 744 g/mol



Polypeptid A2 MG: 687 g/mol



3. Geräte

3.1. Hochdruckhomogenisator

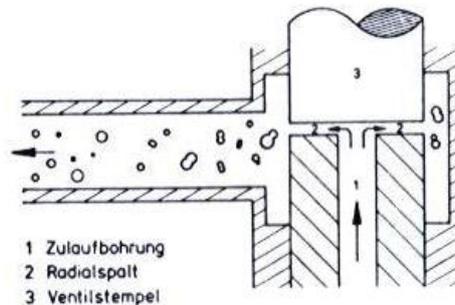


Abb. 3.1.1. Homogenisierkopf (27)

Seit dem Anfang des 20. Jahrhunderts wird die Hochdruckhomogenisation zur Herstellung stabiler Emulsionen verwendet. Ihre erste Anwendung fand sie im Bereich der Milchproduktion. Heute kommen Hochdruckhomogenisatoren in vielen Sparten der Industrie zum Einsatz. Auch auf dem Gebiet der pharmazeutischen Technologie werden sie häufig zur Herstellung von Emulsionen, Dispersionen und Liposomen eingesetzt (10, 25, 26).

Prinzipiell besteht der Hochdruckhomogenisator aus einer Kolbenhochdruckpumpe und einem Homogenisierkopf, der ein oder zwei Homogenisierdüsen beinhaltet.

Die Homogenisierdüse setzt sich, wie in Abb. 3.1.1. dargestellt, aus einem so genannten Ventilsitz und einem Ventilstempel zusammen. Der Ventilsitz ist ein unbewegliches Zulaufstück, das in seiner Mitte eine Bohrung besitzt. Der Ventilstempel befindet sich in einem geringen Abstand gegenüber dem Ventilsitz und kann mechanisch oder hydraulisch belastet werden. Dadurch entsteht ein verstellbarer Ringspalt, durch den die flüssigen Zubereitungen mit einem Druck von bis zu 1600 bar gepresst werden.

Die Mechanismen die für die Zerkleinerung während der Hochdruckhomogenisation verantwortlich gemacht werden, sind sehr komplex. Als hauptverantwortlich wird die Kavitation betrachtet. Kavitation entsteht, da die Flüssigkeit mit hohem Druck durch den engen Spalt gepresst wird. Dabei steigt der dynamische Druck der Flüssigkeit, während gleichzeitig der statische Druck fällt. Die Flüssigkeit beginnt zu siedeln wenn ihr statischer Druck unter den Dampfdruck sinkt. Es bilden sich Gasblasen, die nach Austritt aus dem Spalt, durch Anstieg des statischen Drucks, implodieren. Dabei

entstehen Kräfte, die in Form von Stoßwellen für die Zerkleinerung des zu homogenisierenden Gutes sorgen.

Der Homogenisierereffekt wird durch viele verschiedene Parameter beeinflusst.

Dazu zählen unter anderem

- Die Viskosität der dispersen Phase
- Homogenisierungsdruck und Durchgangszahl
- Sowie die Ausgangspartikelgröße (25, 26, 27).

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurde zur Herstellung der Liposomen der Homogenisator EmulsiFlex[®]-C3, der Firma Avestin, verwendet (Abb. 3.1.2.).

Er kann einen Arbeitsdruck von 35 bis 2000 bar erzeugen und verfügt über einen druckunabhängigen Durchsatz von 3 Liter pro Stunde. Sein Mindestprobenvolumen beträgt 10 ml. Hauptsächlich wird der EmulsiFlex[®]-C3 zur Herstellung von Emulsionen, Dispersionen, Liposomen aber auch für den Zellaufschluss verwendet (28).



Abb. 3.1.2. EmulsiFlex[®]-C3 (28)

3.2. Zetasizer

Bei einem Zetasizer handelt es sich um ein Gerät, das zur Charakterisierung disperser Systeme verwendet wird. Im Allgemeinen ermöglicht es Aussagen über die Teilchengröße, das Zetapotential und dadurch über die Stabilität der Zubereitungen. Die theoretischen Hintergründe sollen anschließend erläutert werden.

Für die vorliegenden Versuche wurde ein ZetaSizer Nano ZS der Firma Malvern Instruments, UK verwendet (Abb. 3.2.1.). Er ist in der Lage Partikelgröße, Zetapotential und Molekülmasse zu vermessen, von denen nur die ersten zwei Parameter für die Charakterisierung der hergestellten Formulierungen herangezogen wurden.



Abb. 3.2.1. Malvern ZetaSizer Nano ZS (29)

3.2.1. Zetapotential

Mit Hilfe des Zetapotentials lassen sich einerseits Aussagen über die physikalische Stabilität disperser Systeme treffen. Andererseits werden auch die Wechselwirkungen zwischen den Partikeln und dem umgebenden Medium sichtbar gemacht. Das zugrunde liegende Prinzip lässt sich anhand des Modells von Stern (Abb. 3.2.2.) erklären. Dieses beschäftigt sich mit den Eigenschaften von Partikeln in Elektrolytlösungen.

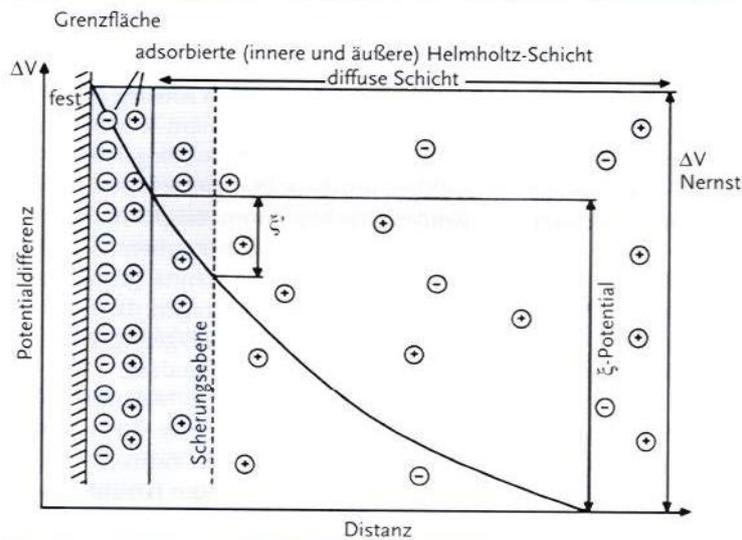


Abb. 3.2.2. Modell nach Stern (3)

In dispersen Systemen bildet sich, um dispergierte geladene Partikel, eine Schicht mit entgegengesetzt geladenen Ionen. Genauer gesagt kommt es zunächst zur Anlagerung von in der Regel negativ geladenen Ionen an der Grenzfläche der dispergierten Partikel. Man bezeichnet diese fixierte Monoschicht, als innere Helmholtzschicht. An diese lagert sich die äußere Helmholtzschicht an. Sie ist ebenfalls fixiert besteht jedoch aus positiv geladenen Ionen. Daher besitzt die äußere Schicht ein etwas weniger negatives Potential, auch als Stern Potential bezeichnet, als die innere Schicht.

Die äußere Helmholtzschicht ist nicht in der Lage die negative Ladung der inneren vollständig zu kompensieren. Es folgt die diffuse Schicht, die sowohl positive als auch negative Ladungen enthält. Die Konzentration an positiven Ionen nimmt ab, je größer die Entfernung zur Partikeloberfläche wird. Im Gegensatz dazu steigt die Konzentration der negativen Ionen an, bis schließlich ein Gleichgewicht erreicht wird. Das bedeutet, dass das Sternpotential in der diffusen Schicht gegen Null abfällt.

Innerhalb der diffusen Schicht sind die Ionen nicht fixiert sondern beweglich. Wenn sich ein Partikel, zum Beispiel durch die bei Diffusionsbewegungen entstehenden Reibungskräfte bewegt, kommt es zum Abstreifen von Teilen der diffusen Schicht. Das Teilchen ist dadurch nicht mehr neutral. Legt man eine elektrische Spannung an, wird das geladene Teilchen zur entgegengesetzt geladenen Elektrode geschleudert. Durch die Beschleunigung kommt es zur Erhöhung der Reibungskraft, wodurch mehr von der diffusen Schicht abgestreift wird.

Ionen, die fest an die Oberfläche der Partikel gebunden sind, können jedoch nicht abgestreift werden, und auch ein dünner Rest der diffusen Schicht bleibt erhalten. Dieser Rest wird als Scherungsebene bezeichnet. Zwischen der Scherungsebene und dem Ende der diffusen Schicht entsteht eine Potentialdifferenz, die als Zetapotential bezeichnet wird und gemessen werden kann (3, 10, 30).

Um das Zetapotential bestimmen zu können wird die Zubereitung in spezielle Messzellen, die in Abb. 3.2.3. dargestellt werden, luftblasenfrei eingefüllt. Mit Hilfe der Laser Doppler Anemometrie (LDA) wird die Partikelgeschwindigkeit bestimmt. Man schickt einen Laserstrahl durch die Messzelle, der durch die Partikel gestreut und anschließend detektiert wird. Die Frequenz des gestreuten Lichtes ist auf Grund des Dopplereffekts nicht mit der Frequenz des ursprünglichen Laserstrahls identisch. Das Ausmaß der Frequenzverschiebung hängt von der Partikelgeschwindigkeit ab. Über mathematische Gleichungen kann das Zetapotential errechnet werden (30).



Abb. 3.2.3. Messzellen zur Ermittlung des Zetapotentials (29)

3.2.2. Teilchengröße

Zur Vermessung der Partikelgrößen wurden unterschiedliche Messverfahren entwickelt, wie zum Beispiel der Coulter Counter, die Laserdiffraktometrie (LD) oder die Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS).

Der ZetaSizer Nano ZS verwendet zur Partikelgrößenbestimmung das Prinzip der PCS. Die zu untersuchende Formulierung wird in eine Küvette gefüllt und mit einem Laser bestrahlt. Es entsteht Streulicht, das zeitabhängige Intensitätsschwankungen aufweist. Diese kommen einerseits, auf Grund von Interferenzerscheinungen, und andererseits durch die vorherrschenden Brown'schen Molekularbewegungen in der Probe zustande.

Durch die Intensitätsschwankungen lassen sich Aussagen über die Partikelgröße treffen. Die Ursache dafür ist, dass die Diffusionsgeschwindigkeit für kleinere Partikel höher ist, als die größerer Partikel und dadurch unterschiedlich starke Intensitätsschwankungen entstehen.

Der ZetaSizer Nano ZS arbeitet zur Detektion mit einem Verfahren, das als Non Invasiv Backscatter Detektion (NIBC) bezeichnet wird. Hierbei erfolgt die Detektion des Streulichts, nicht wie bei den herkömmlichen Geräten in einem Winkel von 90 °, sondern bei 173 °, um die Messung höher konzentrierter Proben zu ermöglichen.

Der mittlere hydrodynamische Durchmesser, auch Z-Average bezeichnet, und der Polydispersitätsindex (PDI) sind die charakteristischen Endergebnisse einer PCS Messung, wobei der PDI ein Maß für die Breite der Teilchengrößenverteilung darstellt. Allgemein kann man sagen, dass bei einem PDI von 0,1 bis 0,2 eine enge und von 0,2 bis 0,5 eine breite Teilchengrößenverteilung vorliegt. Bei Werten über 0,5 sind die Ergebnisse nicht mehr aussagekräftig (31).

3.3. Franz-Diffusionszelle

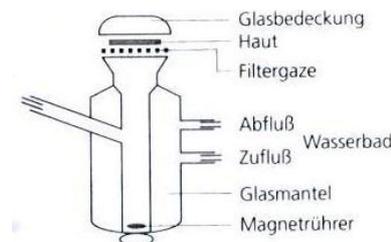


Abb. 3.3.1. Schematischer Aufbau der Diffusionszelle nach Franz (1)

Die in Abbildung 3.3.1. dargestellte Franz-Diffusionszelle ist das am häufigsten verwendete in-vitro Modell zur Untersuchung des dermalen Wirkstofftransports. Ihre Beliebtheit verdankt das Modell der Tatsache, dass nachgewiesen werden konnte, dass die Barriereigenschaften exzidiert Haut den in-vivo Bedingungen weitestgehend entsprechen.

Dieses in-vitro Modell zählt zu den Zweikompartimentensystemen, die dadurch gekennzeichnet sind, dass die gerührte Akzeptorflüssigkeit durch ein horizontal befestigtes Hautstück, vom ungerührten Donormedium getrennt wird.

Die herkömmliche Franz-Diffusionszelle setzt sich aus mehreren Bestandteilen zusammen, wobei die doppelwandige Glaskammer das Akzeptormedium enthält und temperierbar ist. Die Akzeptorflüssigkeit wird mit Hilfe eines Magnetstäbchens gleichmäßig gerührt. Auf die Glaskammer wird eine Filtergaze gelegt. Darüber positioniert man ein Hautstück so, dass seine dermale Seite dem Akzeptormedium zugewandt ist. Die epidermale Seite steht mit der Donorsubstanz in Kontakt. Zuletzt setzt man einen Glasring darauf, der durch eine Metallklammer fixiert wird (1).

Mittlerweile existieren auch modifizierte Franzzellen. Während dieser Arbeit wurden die in Abb. 3.3.2. dargestellten Diffusionszellen verwendet.

Im Wesentlichen besteht dieses Modell aus zwei Glasteilen und einer Metallklammer. Das Akzeptormedium sowie ein Magnetrührer befinden sich im unteren Glasteil. Durch das seitliche Röhrchen des Unterteils kann die Zelle befüllt und Proben können gezogen werden. Auf den Unterteil legt man ein Hautstück, das mit der epidermalen Seite nach oben zeigt. Dieses wird durch den Oberteil und die Metallklammer fixiert. In die zylinderartige Öffnung des oberen Glasteils trägt man die zu testende Formulierung auf.

Das Volumen dieser Franz-Diffusionszellen umfasst zirka 2 ml. Um Verdunstungen der Zubereitungen zu vermeiden werden Deckgläser zur Abdichtung des oberen Glasteils verwendet. Die röhrenförmige Öffnung des Unterteils wird mit Hilfe von Alufolie verschlossen, um den Verlust von Puffer zu verhindern.

Die vorbereiteten Franz-Zellen wurden in ein Wasserbad auf eine Magnetrührplatte gestellt, die für die gleichmäßige Durchmischung des Akzeptormediums sorgte. Das Wasserbad wurde auf 32 °C temperiert und alle 2 Stunden wurden 200 µl Probe gezogen.

Durch Kenntnis der Wirkstoffkonzentration im Donormedium und der Analyse des Gehalts im Akzeptormedium, kann die penetrierte Wirkstoffmenge berechnet werden.



Abb. 3.3.2. Franz-Diffusionszelle in Einzelteilen und zusammengesetzt

3.4. HPLC

Die Hochleistungs-Flüssigchromatografie ist eine Weiterentwicklung der klassischen Säulenchromatografie. Bei der Säulenchromatographie wird die Trennsäule vertikal positioniert und das Elutionsmittel fließt auf Grund des hydrostatischen Drucks durch die mit stationärer Phase gefüllte Trennsäule. Die Trennleistung einer Säule ist von der Partikelgröße und der Dichte der Packung der stationären Phase abhängig.

Für die HPLC werden kürzere Trennsäulen, mit kleinen Partikeln und einer daraus entstehenden dichteren Packung verwendet. Sie erzielen eine wesentlich höhere Trennleistung, haben aber den Nachteil, dass die Schwerkraft nicht mehr ausreicht um das Elutionsmittel durch die Säule zu transportieren. Daher muss die mobile Phase mit Hilfe von Pumpen durch die Trennsäule befördert werden.

Im Wesentlichen besteht ein Hochleistungsflüssigkeitschromatograph aus

- einer Pumpe mit einem Vorratsgefäß für das Elutionsmittel
- dem Probenaufgabesystem
- der Trennsäule
- und einem Detektor

Aus dem Vorratsgefäß gelangt das Elutionsmittel mit Hilfe der Pumpe in das Probeneinlasssystem, wo die zu untersuchende Substanz injiziert wird. Dann gelangt das Gemisch in die Trennsäule und erreicht schließlich den Detektor. Man erhält ein charakteristisches Chromatogramm.

Die Hochleistungs-Flüssigchromatografie kann zur qualitativen und quantitativen Analyse, zur analytischen Trennung, aber auch für präparative Zwecke eingesetzt werden. Beinahe alle löslichen organischen, sowie anorganischen Arzneistoffe können, auf Grund der vielfältigen Kombinationsmöglichkeiten von stationärer und mobiler Phase, analysiert werden.

Kurze Analysenzeiten, die Möglichkeit der Bestimmung von Mengen bis in den Pikogrammbereich, hohe Trennleistungen sowie ihre Variationsmöglichkeiten machen die HPLC zu einer der am häufigsten angewandten Standardmethoden im pharmazeutischen Bereich (32, 33).

4. Experimenteller Teil

4.1. Herstellung der Formulierung

4.1.1. Herstellung der Liposomen

Die Herstellung der Liposomen erfolgte an Hand einer Rezeptur, die in einer vorangegangenen Arbeit, entwickelt wurde (34).

Arbeitsvorschrift:

Um 20 g Liposomen mit einem Gehalt von 5 % DPPC herzustellen, werden zunächst 19 g frisch destilliertes Wasser durch einen Membranfilter mit 0,22 µm Porenweite in ein Becherglas keimfiltriert und ein Magnetrührer hinzu gegeben. Das Wasser wird auf einer beheizbaren Magnetrührplatte auf 60 °C erhitzt und anschließend wird 1 g DPPC hinzu gegeben. Nachdem sich das DPPC vollständig gelöst hat wird gewartet bis die Lösung auf 40 °C abgekühlt ist. Danach wird das Magnetrührstäbchen entfernt und die Formulierung mittels Ultra-Turrax, auf Stufe zwei, 5 Minuten lang homogenisiert. Anschließend wird die Zubereitung sofort mittels Hochdruckhomogenisator weiterverarbeitet, indem sie 8 Minuten lang bei ca. 1100 bar durch das Gerät gepumpt wird. Die fertigen Liposomen werden in einem sauberen Becherglas aufgefangen, mit einem Parafilm verschlossen und über Nacht im Kühlschrank stehen gelassen. Am nächsten Tag werden die Teilchengröße und das Zetapotential der hergestellten Liposomen bestimmt. Für die Weiterverarbeitung werden die Liposomen, mit frisch destilliertem, keimfiltriertem Wasser, von einem 5%igen Gehalt an DPPC auf einen 2,5%igen Gehalt verdünnt.

4.1.2. Einarbeitung von Fluconazol

In jede Zubereitung wurde Fluconazol 1 % (g/g), in die Liposomen eingearbeitet.

Arbeitsvorschrift:

Dazu werden mit Hilfe einer Analysenwaage zunächst für jede Zubereitung 1,8 g der 5%igen DPPC Liposomen in einen 10 ml Rundkolben eingewogen und mit frisch destilliertem, keimfiltriertem Wasser auf 2,5 % verdünnt. Danach wird die

entsprechende Menge an Fluconazol berechnet und genau auf ein Kartenblatt eingewogen. Fluconazol wird zu den Liposomen in den Rundkolben gegeben. Die Rundkolben werden mit einem Stück Parafilm abgedichtet und mit Alufolie luftdicht verschlossen.

Anschließend werden die Kolben auf einer Rüttelplatte fixiert und in ein beheizbares Schüttelwasserbad gestellt. Bei einer Temperatur von 50 °C und 125 rpm werden die Kolben 12 Stunden lang geschüttelt.

Am Tag nach der Herstellung wurden die Teilchengrößen gemessen. Ein Anstieg der Teilchengrößen diente als Beweis für die erfolgreiche Verkapselung des Fluconazols.

4.1.3. Zugabe der Lysinderivate

Von jedem Oligo-Lysin und Polypeptid wurde eine Formulierung mit einer Endkonzentration von 10 Mol % und eine weitere mit einer Konzentration von 20 Mol % hergestellt.

Arbeitsvorschrift:

Zunächst werden die Oligo-Lysine und Polypeptide in destilliertem Wasser gelöst und bei -24 °C als Stammlösung gelagert. Bei Bedarf werden diese bei Zimmertemperatur aufgetaut. In Rundkolben, in denen sich bereits die entsprechenden Mengen an fluconazolhaltigen Liposomen befinden werden definierten Mengen an lysin- bzw. polypeptidhaltige, wässrige Stammlösungen zugegeben.

Anschließend werden die Rundkolben wieder mit Parafilm und Alufolie abgedichtet, auf der Rüttelplatte fixiert und über Nacht bei einer Temperatur von 32 °C und 140 rpm geschüttelt. Dadurch lagern sich die Peptide in die Liposomen ein.

Diese Liposomen wurden in weiterer Folge für die Diffusionsversuche verwendet.

4.2. Physikalisch- chemische Charakterisierung

4.2.1. Teilchengröße

Zur Vermessung der hergestellten Liposomen wurde der ZetaSizer Nano SZ verwendet.

Von den zu charakterisierenden liposomalen Formulierungen wurde jeweils 1 ml einer wässrigen 1:10 Verdünnung hergestellt, luftblasenfrei in eine Einmalküvette gefüllt und vermessen. Die erste Messung erfolgte am Tag der Fertigstellung, an dem auch die Diffusionsversuche angesetzt wurden. Von diesem Zeitpunkt an wurden die Zubereitungen jeden zweiten Tag, drei Wochen lang, auf die gleiche Weise vermessen. Für die Charakterisierung war vor allem wichtig, ob es zu signifikanten Veränderungen der Teilchengröße oder des PDI während des gesamten Beobachtungszeitraumes kam. Im Falle einer starken Veränderung der Teilchengröße bzw. eines Anstiegs des PDI über 0,5 ist davon auszugehen, dass die physikalische Stabilität der Formulierungen nicht mehr gegeben ist. Daher wurden Zubereitungen die einen PDI von 0,5 erreicht hatten nicht weiter vermessen.

4.2.2. Zetapotential

Durch Messung des Zetapotentials lassen sich Aussagen über die Stabilität disperser Systeme treffen. Die Zetapotentialmessung der einzelnen Formulierungen erfolgte immer an den gleichen Tagen wie die Teilchengrößenbestimmung. Auch hier wurde jeweils eine 1:10 Verdünnung luftblasenfrei in spezielle Messzellen gefüllt und anschließend vermessen.

Prinzipiell gilt, je höher das Zetapotential, unabhängig vom Vorzeichen, desto stabiler ist die Dispersion (30).

4.2.3. Physikalische Stabilität

Ein häufig auftretendes Problem bei Liposomen ist ihre ungenügende Lagerstabilität (siehe Kapitel 2.4.). In vorangegangenen Untersuchungen konnte eine ausreichende Stabilität von DPPC Liposomen ohne Wirkstoff und Zusätze, über 6 Wochen belegt werden (34).

Von großem Interesse bei der vorliegenden Arbeit war, wie sich die Einarbeitung eines Wirkstoffes, bzw. der einzelnen Oligo-Lysine und Polypeptide auf die Stabilität der liposomalen Zubereitungen auswirken würde.

Alle Formulierungen wurden im Kühlschrank aufbewahrt. Vor der Vermessung mit dem Zetasizer wurden sie auf Raumtemperatur angeglichen.

Ein Problem, das während der Lagerung im Kühlschrank auftrat war, dass Fluconazol in Form kleiner Nadeln ausfiel. Allerdings konnte sich der Wirkstoff nach halbstündiger Erwärmung am Schüttelwasserbad bei 45 °C wieder in die Liposomen einlagern, wie durch Messungen des Zetapotentials und der Teilchengröße gezeigt werden konnte. Möglicherweise wurde die Beladungskapazität der Liposomen überschritten, wodurch das überschüssige Fluconazol in Form von Nadeln auskristallisierte.

4.3. Analytik von Fluconazol mittels HPLC

4.3.1. Parameter

HPLC-Grundgerät:

Bei der verwendeten HPLC-Anlage handelt es sich um ein Perkin-Elmer 200 Grundgerät mit Säulenofen und Vierkanalpumpe.

Detektor:

Perkin-Elmer Dioden Array 235C

Autosampler:

Perkin-Elmer ISS-200

Säule:

Nucleosil 100 C 18; 250 x 4.0 mm; 5 µm

Vorsäule:

Nucleosil 100-5 C 18; 40 x 4,0 mm

Analysensoftware:

Tatolchrom, Version 6. 2. 0.

4.3.2. Methode

Mobile Phase:

Zur Herstellung der mobilen Phase wurde Phosphatpuffer pH-7 (siehe S. 32) mit Methanol in einem Verhältnis von 55:45 gemischt und mit 1 mmol Oktansulfonsäure versetzt.

Flussrate:

1ml pro Minute

Temperatur des Säulenofens:

55 °C

Injektionsvolumen:

20 µl

Durchschnittlicher Druck der HPLC:

2450 psi

Wellenlänge der Detektion:

270 nm

Durchschnittliche Retentionszeit:

4-5 Minuten

Laufzeit der Methode:

9 Minuten

4.3.3. Eichgerade

Für die Erstellung der Eichgerade von Fluconazol wurde eine Stammlösung hergestellt und davon ausgehend eine Verdünnungsreihe mit Methanol angefertigt.

Für die Stammlösung wurde 16,29 mg Fluconazol in einen 10 ml Messkolben eingewogen und mit Methanol auf 10 ml aufgefüllt. Anschließend erfolgten fünf Verdünnungsschritte im Verhältnis 1:2 mit Methanol. Je 1,5 ml der Stammlösung und der Verdünnungen wurden in Vials gefüllt und mittels HPLC analysiert.

Verdünnungen	Menge in µg/ml	Peakfläche
Stammlösung	1629,00	3261165,47
1:2	814,50	1656054,04
1:4	407,25	810436,63
1:8	203,63	411948,76
1:16	101,81	202898,56
1:32	50,91	99885,25

Tab. 4.3.3. Fluconazol-Verdünnungen zur Eichung mittels HPLC

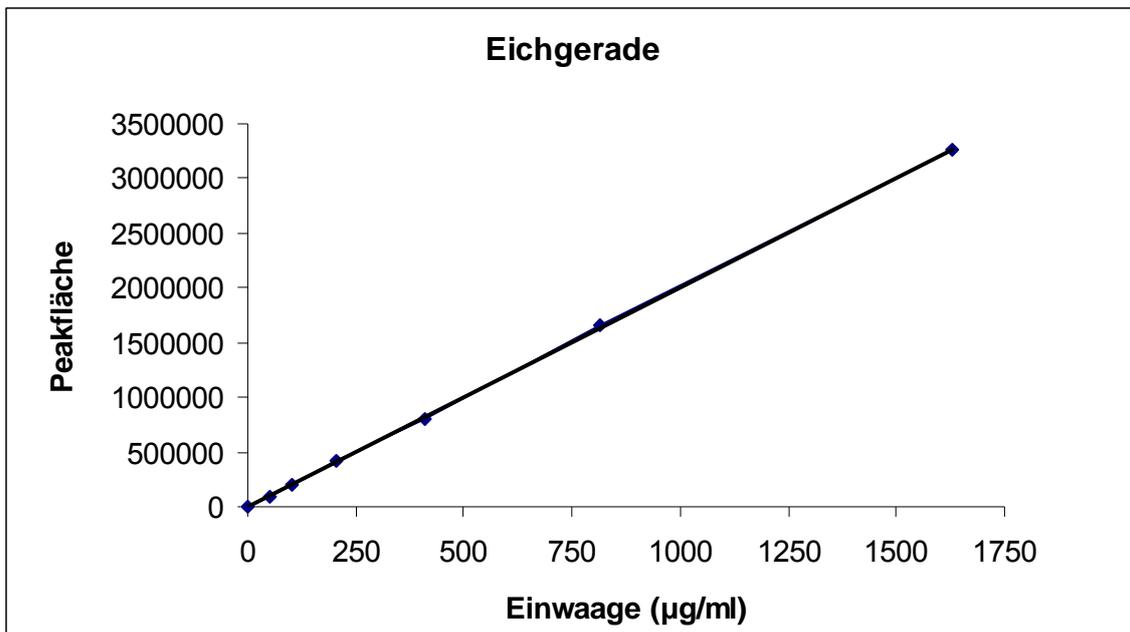


Abb. 4.3.3. Eichgerade Fluconazol

Geradengleichung: $y = 2006,5x + 1059,7$

Bestimmtheitsmaß: $R^2 = 0,9999$

Wie aus Abb. 4.3.3. ersichtlich, wurde eine lineare Abhängigkeit mit $R^2 = 0,9999$ erhalten.

4.4. Permeationsversuche

4.4.1. Versuchsanordnung und praktische Durchführung

Um heraus zu finden, inwieweit die verschiedenen Oligo-Lysine und Polypeptide einen Einfluss auf die Permeation von Fluconazol durch die Haut haben, wurden jeweils drei Chargen der liposomalen Formulierungen hergestellt. In die erste Charge wurde nur Fluconazol in 1%iger Konzentration eingearbeitet (Kontrolle). Die zweite und dritte Charge enthielten zusätzlich die entsprechenden Peptide in Konzentrationen von 10 Mol % bzw. 20 Mol %. Die erste Charge diente als Referenzwert im Vergleich zu den lysinhaltigen Präparationen.

Herstellung des Phosphatpuffers

Der Phosphatpuffer pH-7,4 wird hergestellt, indem 1,7 g Kaliumdihydrogenphosphat und 1,78 g Dinatriumhydrogenphosphat in destilliertem Wasser gelöst werden und in einem Messkolben auf 1000 g auffüllt wird. Anschließend wird mittels verdünnter Phosphorsäure bzw. Natronlauge der pH-Wert auf genau 7,4 mit Hilfe einer pH-Elektrode eingestellt. Der pH-Wert 7,4 ist notwendig um annähernd den physiologischen Bedingungen des Blutes zu entsprechen.

Vorbereitung der Schweinehaut

Aufgrund der ähnlichen Zusammensetzung von humaner und porciner Haut wurde Schweinehaut verwendet. Die Haut wurde mit dem Dermatome in 1,1 mm dicke Hautstreifen geschnitten und im gefrorenen Zustand aufbewahrt. Für die Versuche wurden diese Streifen aufgetaut, in ca. 1 cm² große Stücke geschnitten und in Franz-Diffusionszellen eingespannt.

Vorbereitung der Diffusionszellen

Mit jeder hergestellten Charge wurden vier Parallelversuche durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die in Kapitel 3.3. beschriebenen Diffusionszellen verwendet.

Die Versuchsdauer betrug jeweils 10 Stunden, wobei alle 2 Stunden je 200 µl Probe gezogen wurde und durch frischen Puffer ersetzt wurde.

Die Proben wurden in Eppendorfgläsern aufbewahrt und bei 11000 rpm 6 Minuten lang zentrifugiert, um Proteine, die sich eventuell aus der Schweinehaut gelöst hatten und die Analyse stören könnten, abzutrennen. Der Überstand wurde in spezielle HPLC-Vials pipettiert und in das HPLC-System eingespritzt. Anschließend wurden alle Proben mittels der in Kapitel 4.3.2. beschriebenen Methode analysiert.

Auswertung

Zur Auswertung der einzelnen Diffusionsversuche wurden Diagramme erstellt. In diesen wurde die kumulative Menge an permeierten Fluconazol sowohl in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, als auch in Prozent ermittelt. Dazu wurde für jede Charge der Mittelwert der Ergebnisse von jeweils drei Diffusionszellen errechnet. Die kumulative Fluconazolmenge (auf der y-Achse) wurde gegen die Zeit (auf der x-Achse) aufgetragen.

5. Ergebnisse

Die Ergebnisse sowohl der physikalischen Stabilität der Formulierungen, als auch die Ergebnisse der Diffusionsversuche werden in den folgenden Punkten vorgestellt.

Die Einzelwerte und Resultate aller Versuche, sind in fortlaufenden Tabellen im Anhang zusammengefasst.

5.1. Physikalische Stabilität

Um die physikalische Stabilität der liposomalen Formulierungen zu beurteilen, wurden Teilchengröße, Zetapotential und PDI ermittelt und verglichen.

Für die Ermittlung der Vergleichswerte der Leerliposomen und der fluconazolhaltigen Formulierungen, wurde der Durchschnitt von je drei Chargen ermittelt. Als charakteristischer Parameter für die Teilchengröße wurde der Z-Average herangezogen solange der PDI unter 0,2 lag.

Wie aus der Abb. 5.1.1. hervorgeht, kann die Stabilität von Leerliposomen und liposomalen Formulierungen mit 1 % Fluconazol, 21 Tage lang gewährleistet werden. Die Teilchengröße der Leerliposomen beträgt am 1. Tag ca. 92 nm und nimmt in den folgenden 21 Tagen geringfügig bis auf etwa 95 nm zu. Bei der Einarbeitung von 1 % Fluconazol in Liposomen verringert sich ihr Durchmesser um durchschnittlich 6 nm. Auch ihre Teilchengröße nimmt im Verlauf der Messungen um ca. 4 nm zu. Das Zetapotential wurde nur für Liposomen, die 1 % Fluconazol enthalten ermittelt. Es liegt über den gesamten Zeitraum der Messungen bei 0 mV.

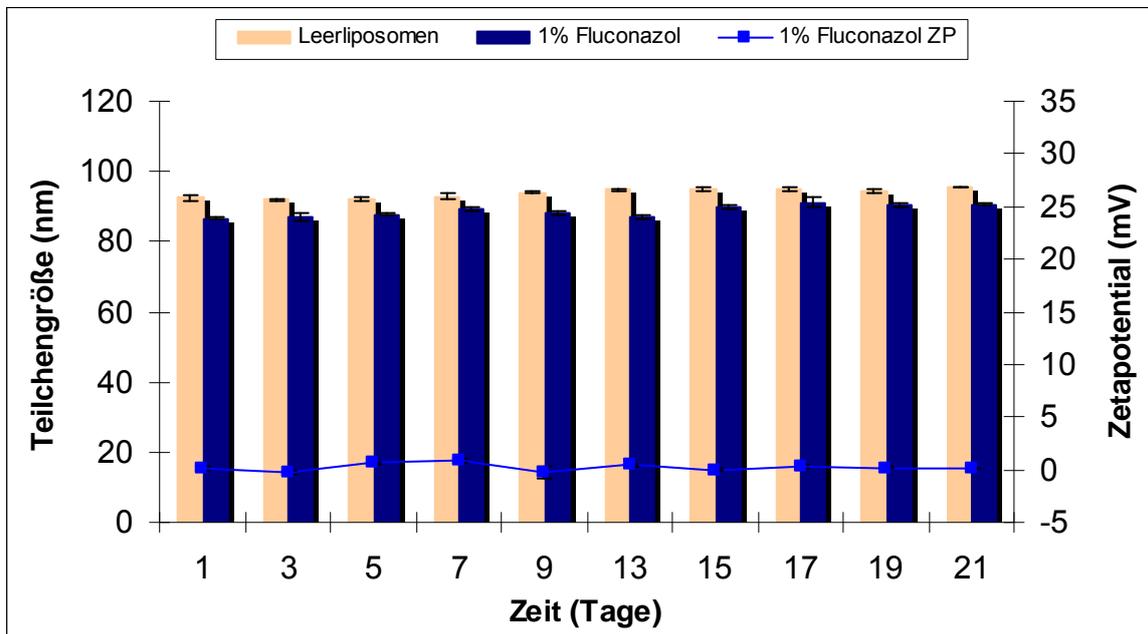


Abb. 5.1.1. Vergleich der Teilchengröße von Leerliposomen und Formulierungen mit 1 % Fluconazol, sowie Angaben über das Zetapotential

Formulierungen mit Lysin-5

Durch die Zugabe von Lysin-5, in 10 Mol %-iger Konzentration, erhält man am 1. Tag eine Teilchengröße von ca. 90 nm (siehe Abb. 5.1.2.). Anschließend steigt der Durchmesser an, bis er am 7. Tag etwa 114 nm erreicht. Der PDI erhöht sich auf 0,3 bis 0,4. Es folgt am 9. Tag eine Verringerung auf 50 nm und ab dem 13. Tag bis zum Ende der Messungen beträgt die Teilchengröße 40 nm, bei einem PDI von 0,1 bis 0,2.

Das Zetapotential unterliegt einigen Schwankungen. Zunächst misst es 18 mV, sinkt bis zum 9. Tag auf 8 mV ab, steigt kurzfristig wieder bis zu 15 mV an und bleibt für die letzten Tage zwischen 8 und 9 mV konstant.

Bei der Einarbeitung von 20 Mol % Lysin-5 steigt der Durchmesser auf 93 nm. Wie das Diagramm verdeutlicht, verringert sich die Teilchengröße bereits ab dem 3. Tag, bis sie nach 7 Tagen nur mehr die Hälfte des ursprünglichen Wertes beträgt. Dabei erreicht der PDI Werte von etwa 0,5. Daher wurden keine weiteren Messungen durchgeführt.

Das Zetapotential zeigt ähnliche Tendenzen. Am 1. Tag liegt es bei 30 mV, danach halbiert es sich bis zum 7. Tag.

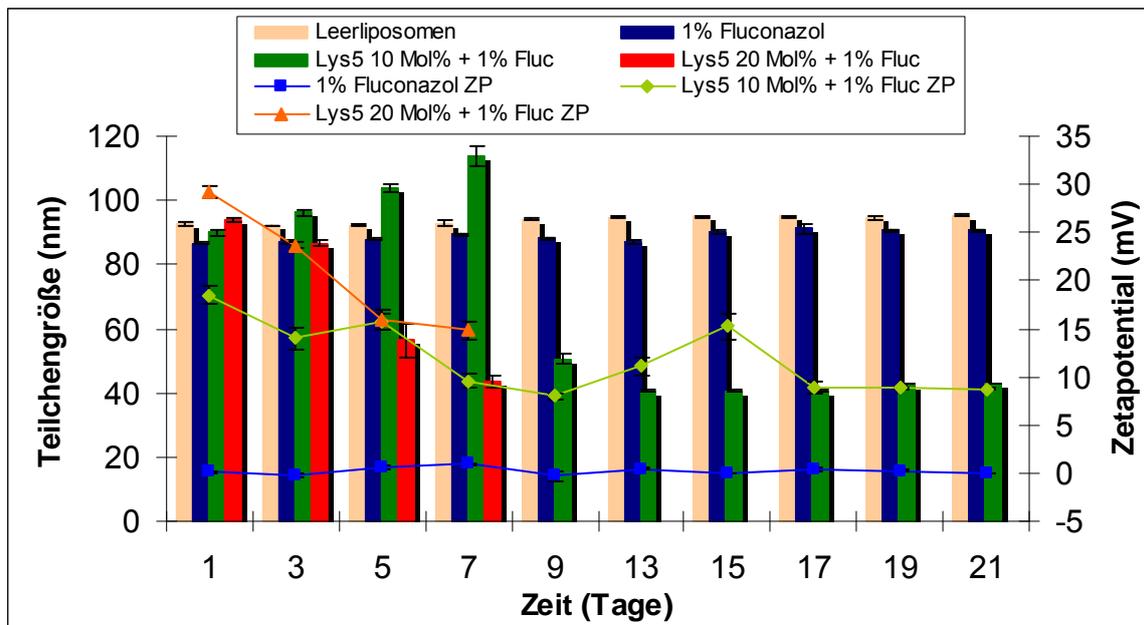


Abb. 5.1.2. Auswirkung von Lysin-5 in verschiedenen Konzentrationen auf die Teilchengröße und das Zetapotential der Formulierungen

Formulierungen mit Lysin-7

Im Vergleich zu den Formulierungen mit Lysin-5 erweisen sich die Zubereitungen mit Lysin-7 als weniger stabil. Wie in Abb. 5.1.3. zu sehen ist, erfolgt bei einem Gehalt von 10 Mol % Lysin-7, eine starke Abnahme der Teilchengröße von 91 nm auf 50 nm innerhalb von 5 Tagen, wobei der PDI einen Wert von 0,5 erreicht.

Das Zetapotential verringert sich in kleinerem Ausmaß von 25 mV auf 20 mV.

Bei einer Konzentration von 20 Mol % Lysin-7 beträgt die Teilchengröße am 1. Tag der Messung 61 nm und nimmt bis zum 7. Tag bis zu 44 nm ab. Auch hier übersteigt der PDI einen Wert von 0,5.

Das Zetapotential schwankt in den 7 Tagen der Messung zwischen 20 und 25 mV.

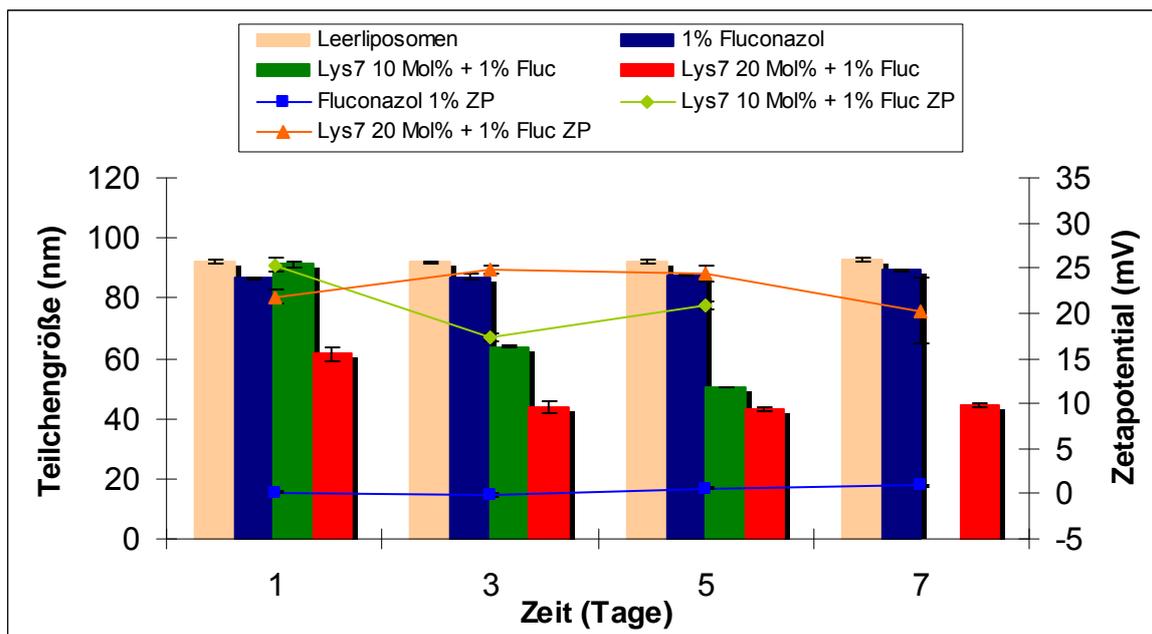


Abb. 5.1.3. Auswirkung von Lysin-7 in verschiedenen Konzentrationen auf die Teilchengröße und das Zetapotential der Formulierungen

Formulierungen mit Lysin-9

Lysin-9 hat ähnliche Auswirkungen auf die physikalische Stabilität liposomaler Formulierungen wie Lysin-7 (siehe Abb. 5.1.4.). Ein Gehalt von 10 Mol % zeigt eine Teilchengröße von ca. 50 nm, die sich vom 1. bis zum 7. Tag kaum verändert. Das Zetapotential liegt in dieser Zeit bei ungefähr 25 mV.

Eine Konzentration von 20 Mol % Lysin-9 hat zur Folge, dass der Teilchendurchmesser von 101 nm am 1. Tag, auf 48 nm am 5. Tag stark sinkt.

Über diesen Zeitraum beträgt das Zetapotential konstant ca.15 mV.

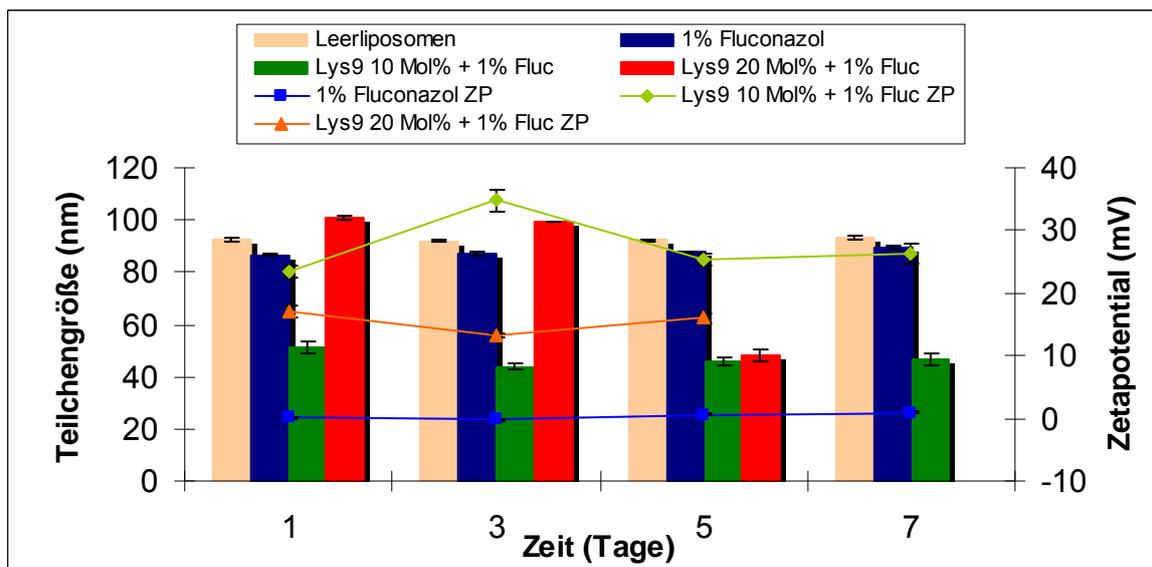


Abb. 5.1.4. Auswirkung von Lysin-9 in verschiedenen Konzentrationen auf die Teilchengröße und das Zetapotential der Formulierungen

Formulierungen mit Polypeptid A1

Der Einbau von Polypeptid A1 in die Liposomen bewirkt physikalisch deutlich stabilere Liposomen, als Oligo-Lysin-hältige Formulierungen (siehe Abb. 5.1.5.).

Eine Konzentration von 10 Mol % Polypeptid A1 erzeugt physikalisch stabile Formulierungen. Unmittelbar nach der Herstellung beträgt die Teilchengröße 86 nm und verändert sich bis zum 19. Tag der Beobachtung nur geringfügig. Nach dreiwöchiger Lagerung erhöht sich die Teilchengröße auf 153 nm und der PDI auf 0,5. Dieses Verhalten deutet auf eine Agglomeration der Teilchen hin.

Das Zetapotential schwankt stark. Während es am 1. Tag 27 mV erzielt, sinkt es bereits am 3. Tag auf 15 mV, zwischen dem 5. und 15. Tag liegt es zwischen 5 mV und 10 mV. Nach 17 bzw. 19 Tagen der Lagerung steigt es wieder auf 15 mV. Danach fällt das Zetapotential auf 6 mV.

Die physikalische Stabilität von Liposomen mit 20 Mol % Polypeptid A1 ist nur über einen sehr kurzen Zeitraum gegeben. Diese Liposomen besitzen am 1. Tag der Beobachtung eine Teilchengröße von 86 nm. Die Teilchengröße steigt bis zum 5. Tag auf 106 nm an. Das Zetapotential fällt in dieser Zeit von 23 mV auf 15 mV. Ein Einbau von 20 Mol % Polypeptid A1 in Liposomen erzeugt bereits nach 5 Tagen der Lagerung einen PDI von 0,5 und muss als physikalisch instabil beschrieben werden.

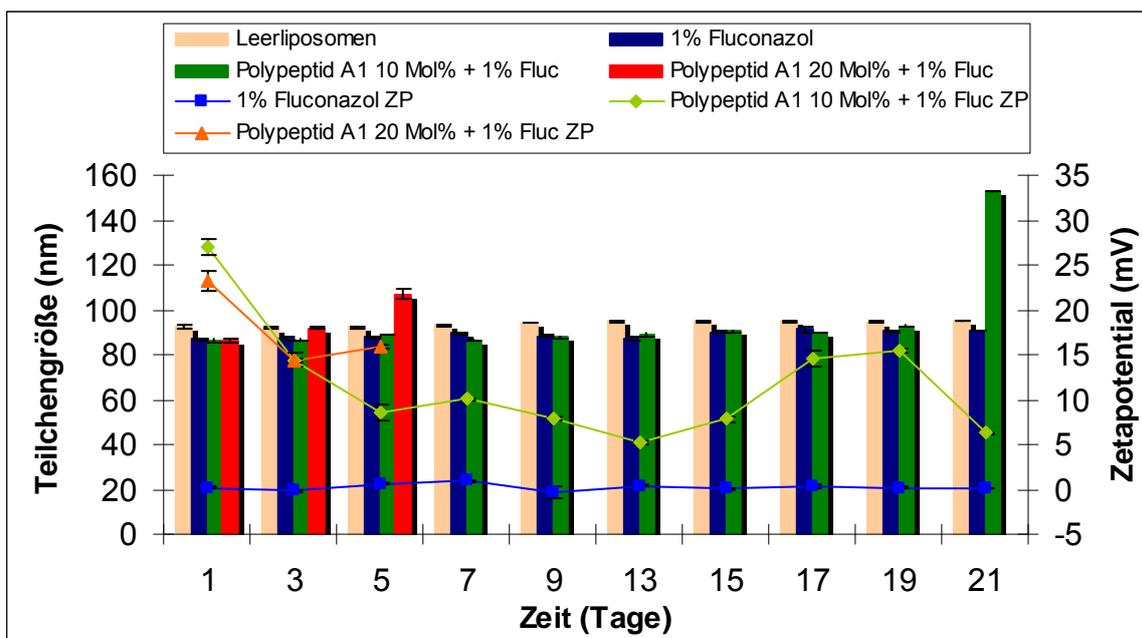


Abb. 5.1.5. Auswirkung von Polypeptid A1 in verschiedenen Konzentrationen auf die Teilchengröße und das Zetapotential der Formulierungen

Formulierungen mit Polypeptid A2

Eine Inkorporierung des Polypeptid A2 in liposomale Formulierungen bewirkte über den gesamten Lagerungszeitraum von 3 Wochen physikalisch stabile Liposomen.

Wie aus der Abb. 5.1.6. hervorgeht, ist sowohl eine Konzentration von 10 Mol %, als auch von 20 Mol % über 21 Tage messbar. Ein Gehalt von 10 Mol % zeigte eine Teilchengröße von 80 nm am 1. Tag, die am 5. Tag um 11 nm steigt, während sich der PDI von 0,1 auf 0,25 verändert. Am 7. Tag beträgt der Durchmesser ca. 50 nm und fällt weiter bis er am 13. Tag ca. 30 nm erreicht. In dieser Zeit reduziert sich der PDI Wert von 0,4 auf 0,2. In den letzten Tagen der Messung kommt es kaum zu Veränderungen, der PDI bleibt zwischen 0,1 und 0,2 und die Teilchengröße beträgt ca. 30 nm. Das Zetapotential hingegen nimmt kontinuierlich von 31 mV bis auf 15 mV ab.

Eine Konzentration von 20 Mol % an Polypeptid A2 in Liposomen führt dazu, dass sich die Teilchengröße über den gesamten Zeitraum der Messungen von 75 nm auf 33 nm verringert, wobei der PDI nie Werte von 0,25 übersteigt. Das Zetapotential nimmt, wie im Diagramm ersichtlich, von 31 mV am 1. Tag, bis 0 mV am 21. Tag kontinuierlich ab.

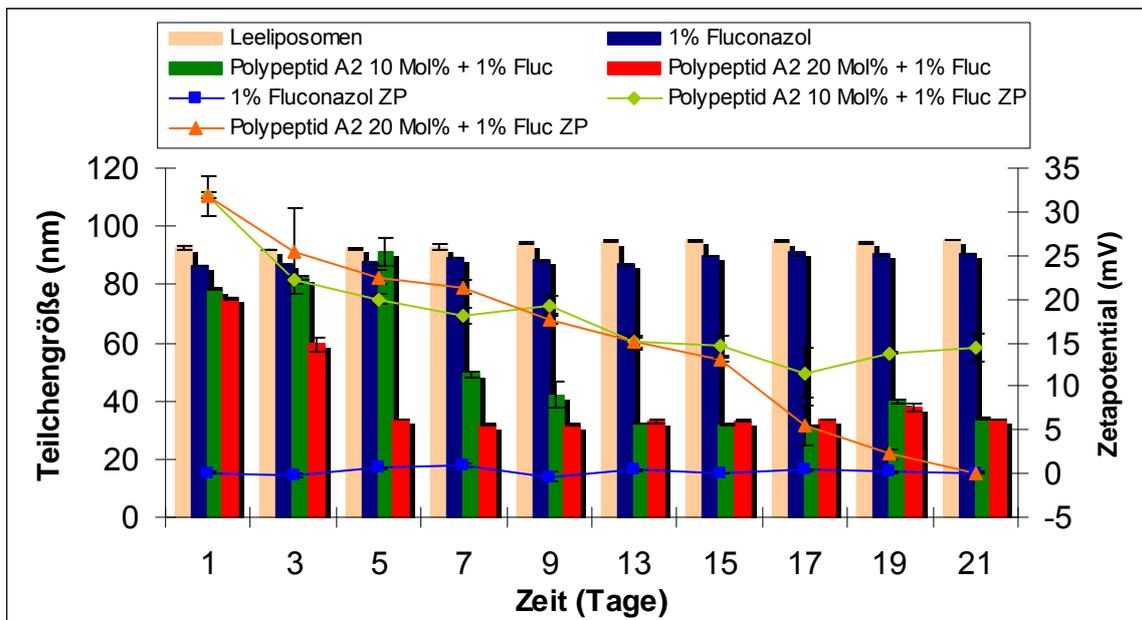


Abb. 5.1.6. Auswirkung von Polypeptid A2 in verschiedenen Konzentrationen auf die Teilchengröße und das Zetapotential der Formulierungen

5.2. Diffusionsversuche

Formulierungen mit 1 % Fluconazol

Wie schon erwähnt dienten 1%ige, fluconazolhaltige Liposomen als Kontrolle.

Wie in Abb. 5.2.1. dargestellt, konnte eine Wirkstoffpermeation von ca. 1270 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ bzw. 32 % der aufgetragenen Menge erreicht werden. Diese Werte wurden für alle Diffusionsversuche als Referenzwerte verwendet.

Die Kurve zeigt deutlich, dass erst nach einer zweistündigen ‚lag time‘ eine gleichmäßige Fluconazoldiffusion stattfand.

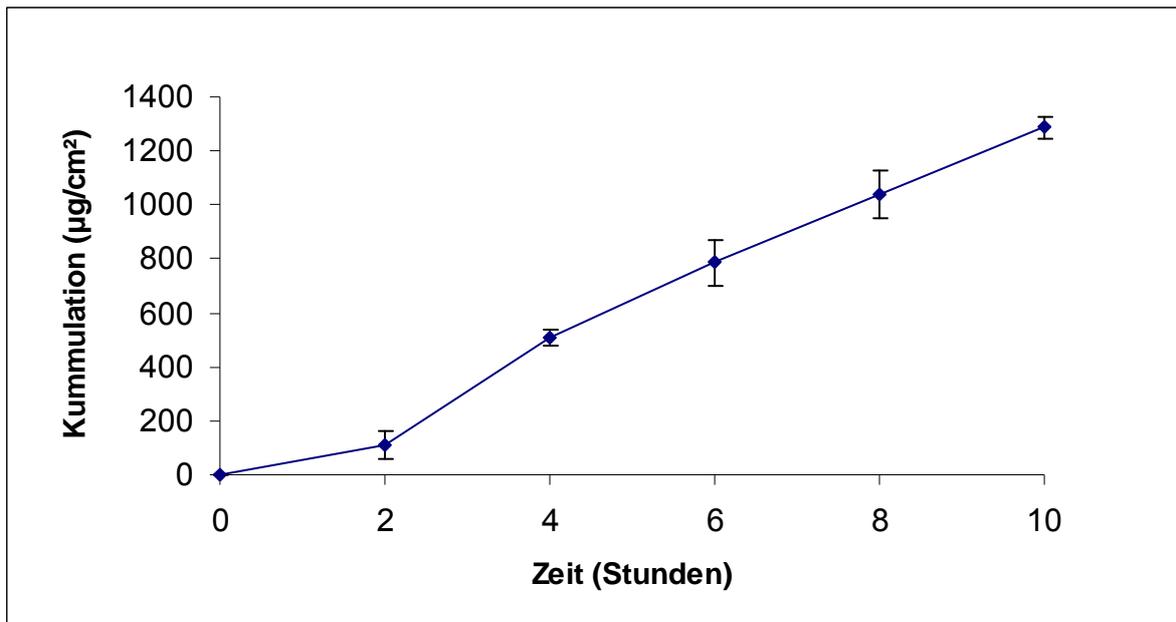


Abb. 5.2.1. Wirkstoffpermeation einer Formulierung von Liposomen mit 1 % Fluconazol in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Formulierungen mit Lysin-5

Abb. 5.2.2. zeigt den Einfluss von Lysin-5 in Konzentrationen von 10 und 20 Mol % auf die Diffusion von Fluconazol. Dabei ist klar ersichtlich, dass ein 10 Mol %-iger Zusatz von Lysin-5 eine 1,26-fache Steigerung der Hautpermeation bewirkte, während ein 20 Mol %-iger Zusatz des Peptides keinen Effekt zeigte.

Die graphische Darstellung der Fluconazoldiffusion lässt bei einer Zubereitung von Liposomen mit 10 Mol % Lysin-5 keine ‚lag time‘ erkennen.

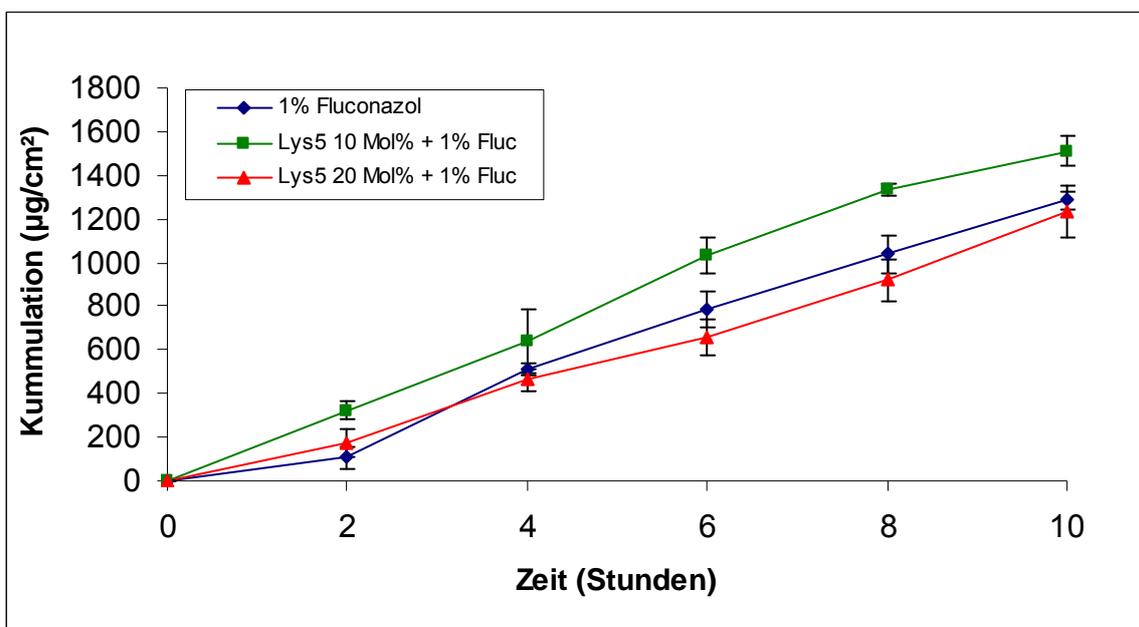


Abb. 5.2.2. Auswirkung von 10 bzw. 20 Mol % Lysin-5 auf die Permeation von Fluconazol in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Formulierungen mit Lysin-7

Bei den Formulierungen mit Lysin-7 ist der Trend, der schon bei Lysin-5-hältigen Zubereitungen beobachtet werden konnte, noch deutlicher zu sehen (siehe Abb. 5.2.3.).

Während der Zusatz von 20 Mol % Lysin-7 wieder keinen Effekt zeigte, bewirkte eine 10 Mol %-ige Zugabe eine deutliche Steigerung der Fluconazoldiffusion um das 1,18-fache.

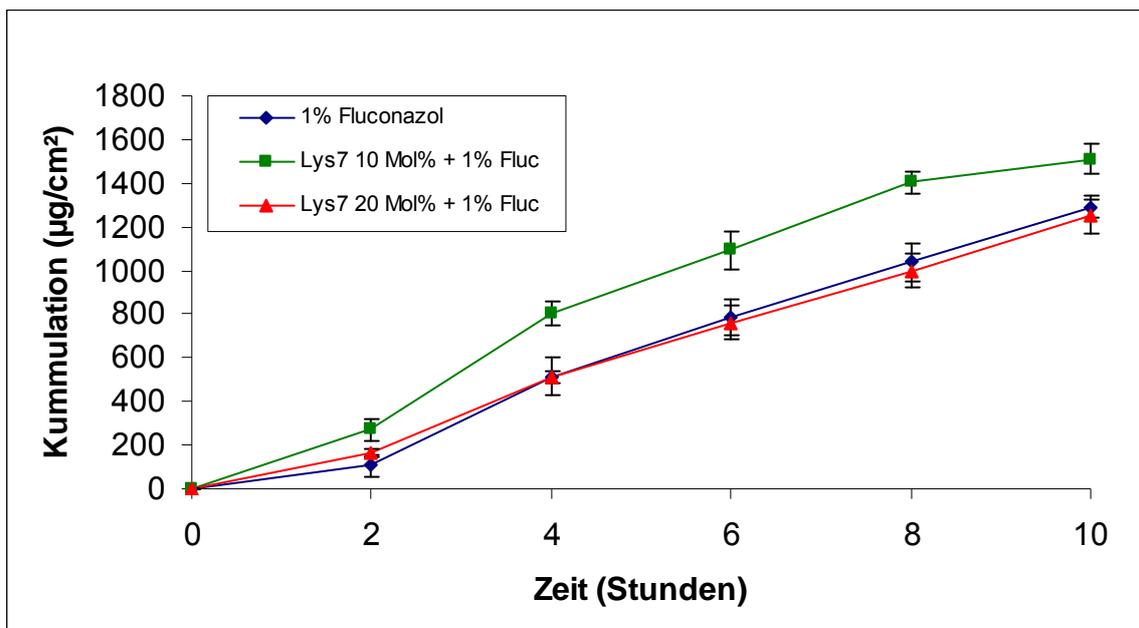


Abb. 5.2.3. Auswirkung von 10 bzw. 20 Mol % Lysin-7 auf die Permeation von Fluconazol in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Formulierungen mit Lysin-9

Im Fall der Formulierungen mit Lysin-9 konnte der Trend, der bei Lysin-5 und Lysin-7 festgestellt wurde, nämlich je höher die Peptidkonzentration desto geringer der Effekt auf die Fluconazolpermeation, nicht bestätigt werden. Im Gegenteil, ein 20 Mol %-iger Zusatz von Lysin-9 bewirkte eine Steigerung der Fluconazolpermeation um das 1,49-fache, während eine 10 Mol %-ige Zugabe keinen Effekt erzielte (siehe Abb. 5.2.4.).

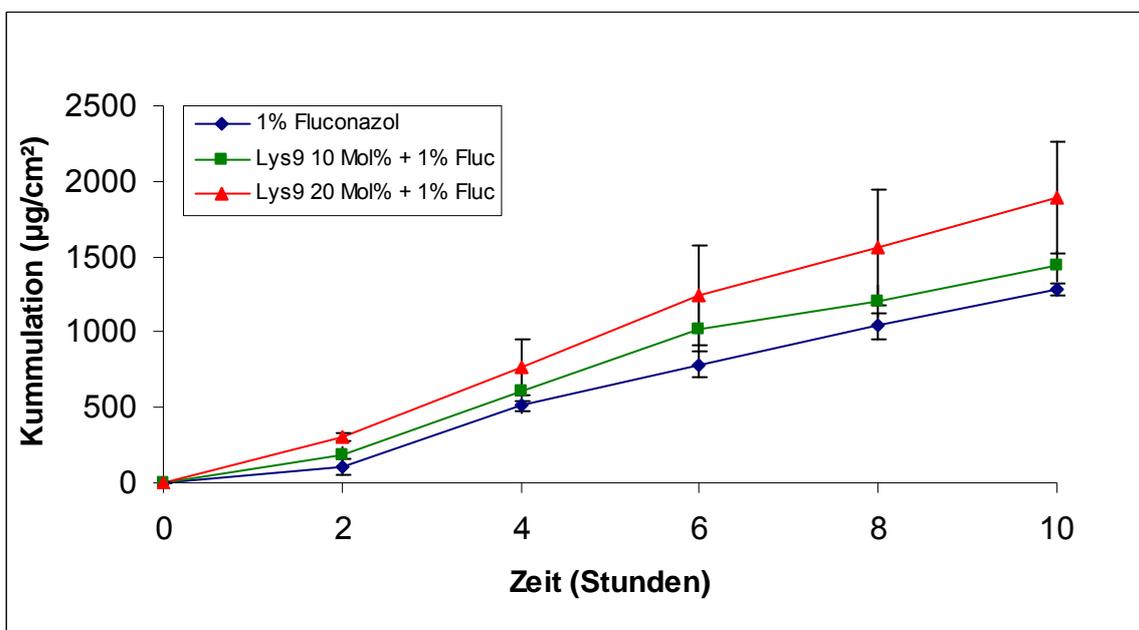


Abb. 5.2.4. Auswirkung von 10 bzw. 20 Mol % Lysin-9 auf die Permeation von Fluconazol in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Formulierungen mit Polypeptid A1

Die Einarbeitung von zwei Peptiden, von denen erwartet wurde, dass sie ebenfalls einen positiven Effekt auf die Fluconazolpenetration haben würden, zeigt im Fall des Polypeptid A1 keinen nennenswerten Effekt. Erst ab der achten Stunde der Diffusion konnte eine kleine Steigerung festgestellt werden. Wie in Abb. 5.2.5. dargestellt, unterscheidet sich die Fluconazoldiffusion aus Liposomen mit 10 Mol %-igen Zusatz von Polypeptid A1, nicht wesentlich von jenen mit 20 Mol %-igen Zusatz.

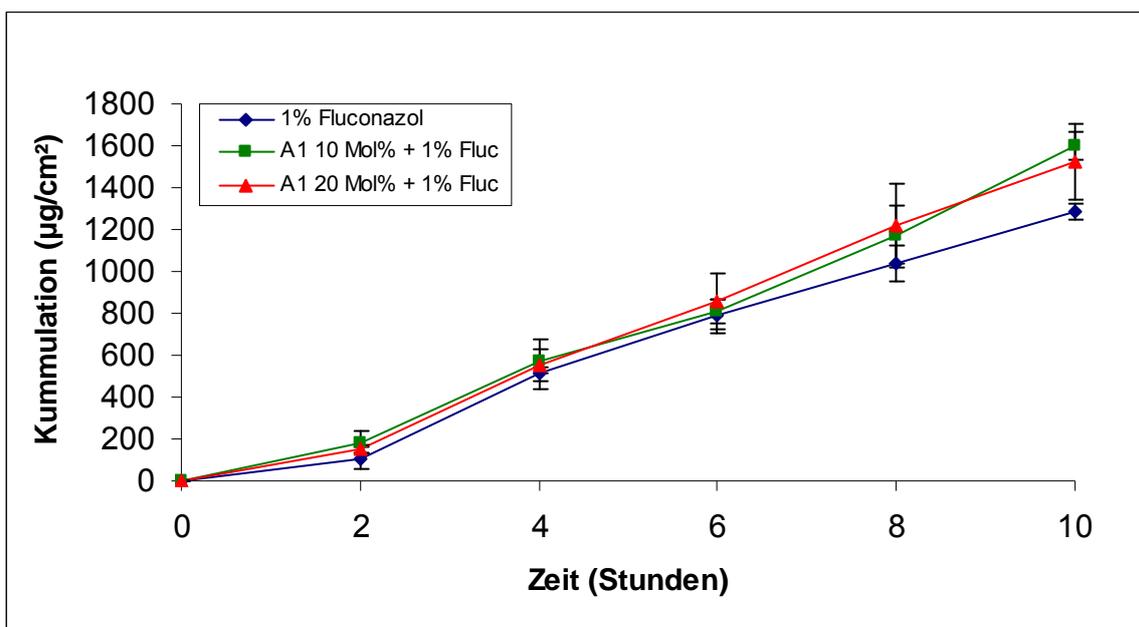


Abb. 5.2.5. Auswirkung von 10 bzw. 20 Mol % Polypeptid A1 auf die Permeation von Fluconazol in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Formulierungen mit Polypeptid A2

Hingegen bewirken die Formulierungen die das Polypeptid A2 enthielten, eine Steigerung der Fluconazoldiffusion um fast das Doppelte, unabhängig ob 10 Mol % oder 20 Mol % des Polypeptids in die Liposomen eingearbeitet wurden (siehe Abb. 5.2.6.).

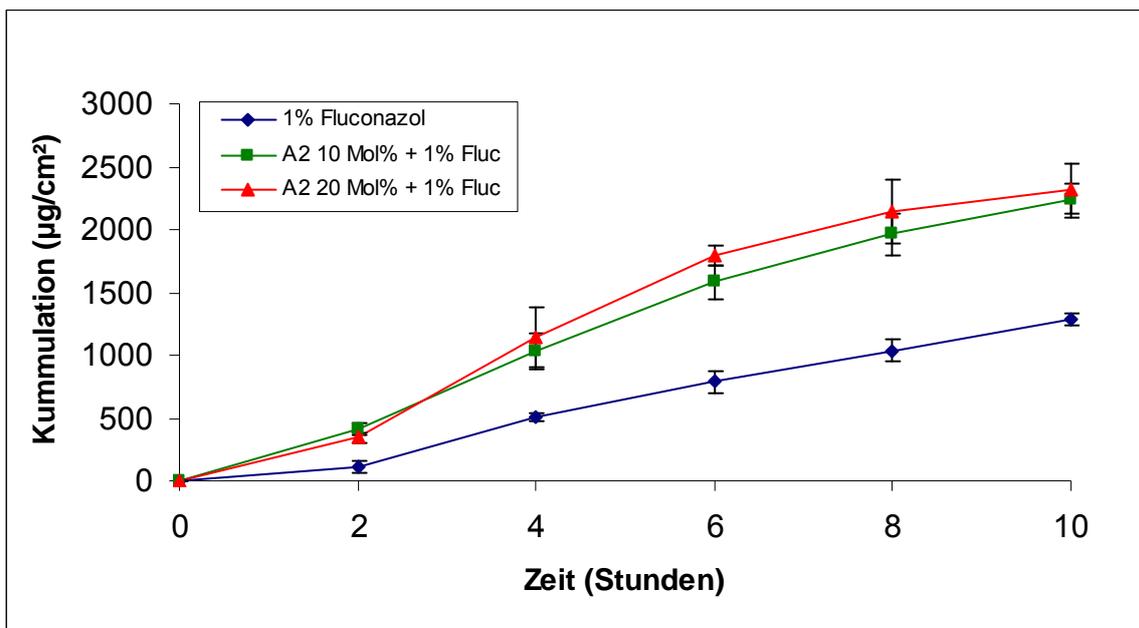


Abb. 5.2.6. Auswirkung von 10 bzw. 20 Mol % Polypeptid A2 auf die Permeation von Fluconazol in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

6. Diskussion

Schon in früheren Studien konnten durch Einarbeitung penetrationsfördernder Stoffe wie z.B. Ölsäure oder Limonen in Liposomen die Penetrationseigenschaften von Estradiol durch die Haut verbessert werden (4). Eine andere Forschungsgruppe erreichte durch Verwendung des porenformenden Peptides Magainin, eine Steigerung der Penetration in die Hornhaut (9).

In einer vorangegangenen wissenschaftlichen Arbeit am Department konnte bereits gezeigt werden, dass verschiedene Oligo-Lysine einen Effekt auf die Hautpermeation des Modellarzneistoffes Natrium-Fluorescein ausüben können. Zu diesem Zweck wurden Schweinehautstücke mit Lysin-3, Lysin-5 und Lysin-7, in unterschiedlichen Konzentrationen, 14 Stunden lang, imprägniert. Die imprägnierten Hautstücke wurden anschließend für Diffusionsversuche mit Natrium-Fluoresceinlösungen verwendet. Die Steigerung der Natrium-Fluoresceindiffusion war umso höher, je mehr Lysinbausteine im verwendeten Oligo-Peptid enthalten waren (35).

Eine weitere Arbeit beschäftigte sich mit den Wechselwirkungen verschiedener Lysinderivate mit DPPC Liposomen als Modellmembranen. In diese Liposomen wurden Lysin-5, Lysin-7, Lysin-9, Polypeptid A1 und A2 in verschiedenen Konzentrationen eingebaut. Mittels Differential Scanning Calorimetry (DSC) wurden die charakteristischen Phasenübergangstemperaturen untersucht und Thermokurven angefertigt.

Bei der DSC handelt es sich um eine thermoanalytische Methode. Dabei werden die zu vermessenden Proben und eine entsprechende Kontrolle, in spezielle Probengefäße gefüllt und unter Einhaltung eines Gradienten erwärmt. Auftretende Phasenübergänge sind genau erkennbar.

DPPC Liposomen weisen charakteristische Phasenübergangstemperaturen auf. Eine Inkorporierung von Substanzen kann diese Übergangstemperaturen zu höheren oder niedrigeren Werten verschieben. Daraus können in weiterer Folge Rückschlüsse auf Wechselwirkungen gezogen werden.

Eine thermoanalytische Untersuchung aller Peptide, die auch in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kamen ergab einerseits, dass alle Lysinderivate zu einer

Erhöhung der Phasenübergangstemperatur führten, ausser ein Zusatz von 10 Mol % Polypeptid A1, der eine Erniedrigung bewirkte.

Andererseits konnte nur bei der Zugabe von Lysin-9 und Polypeptid A2 eine signifikante Veränderung im Verlauf der Thermokurve beobachtet werden. Das Auftreten von Schulterbanden im Kurvenverlauf deutet eventuell darauf hin, dass es zu einer Veränderung der Fluidität der liposomalen Membran kommen könnte (34).

In der vorliegenden Arbeit werden die Liposomen nicht mehr als Modelmembran sondern als Arzneistoffabgabesystem für Fluconazol eingesetzt. Dabei ist es gelungen Liposomen herzustellen, die über einen Zeitraum von drei Wochen physikalisch stabil waren. Der Zusatz von Lysin-7 und Lysin-9 bewirkte eine deutliche Verringerung der physikalischen Stabilität.

Interessanterweise zeigte sich, dass bei Formulierungen in die Lysin-5 oder Polypeptid A2 eingearbeitet wurden, die Partikelgrößen mit zunehmender Lagerungsdauer kleiner wurden. Vorher milchig-trübe Liposomen wurden mit der Zeit transparent. Dieses kolloid-chemische Verhalten deutet eventuell auf eine Mizellbildung hin, bei der sowohl das eingeschlossene Fluconazol, als auch das jeweilige Lysinderivat solubilisiert werden könnten.

Im Hinblick auf die Hautdiffusion konnten fast bei allen eingesetzten Peptiden positive Effekte beobachtet werden. Zur besseren Verdeutlichung wurden für die Ergebnisse die entsprechenden ‚Enhancingfaktoren‘ errechnet (siehe Abb. 6.1). Dazu ermittelten wir die prozentuelle, kumulative Fluconazolmenge aller Formulierungen, die nach 10-stündiger Diffusion gemessen wurden und dividierten diese Werte durch die erhaltenen Werte der Kontrolle. Die so errechneten Faktoren geben an um das Wievielfache die Hautpermeation von Fluconazol durch Einbau der Lysinderivate nach 10 Stunden verbessert wurde.

Formulierung	%	Faktor
Fluconazol (Kontrolle)	32,19	1,0
Lys5 10 Mol %	40,63	1,26
Lys5 20 Mol %	31,30	0,97
Lys7 10 Mol %	37,88	1,18
Lys7 20 Mol %	31,36	0,97
Lys9 10 Mol %	35,53	1,10
Lys9 20 Mol %	47,91	1,49
A1 10 Mol %	40,48	1,26
A1 20 Mol %	38,81	1,21
A2 10 Mol %	57,42	1,78
A2 20 Mol %	58,57	1,82

Abb. 6.1. Berechnung der Faktoren für die Steigerung der Wirkstoffpenetration

Wie ersichtlich, zeigte sich die höchste Permeationssteigerung von Fluconazol bei Zugabe von Lysin-9 und Polypeptid A2.

Dabei handelt es sich um jene Lysinderivate, die in den DSC Versuchen Schulterbanden in der Thermokurve erkennen ließen. Allerdings kann auch nach Zugabe von 10 Mol % Lysin-5 und nach Zugabe von Polypeptid A1 eine Permeationssteigerung von Fluconazol beobachtet werden.

Auch die in die Liposomen eingearbeitete Peptidmenge übte einen Einfluss auf die Fluconazolpermeation aus. Bei Lysin-5 und Lysin-7 bewirkte ein Zusatz von 10 Mol % höhere Diffusionsquoten als der Zusatz von 20 Mol %.

Hingegen zeigte die Einarbeitung von Lysin-9 den umgekehrten Effekt. In diesem Fall permeierte umso mehr Fluconazol durch die Haut, je höher der Zusatz von Lysin-9 war.

Die Einarbeitung der Polypeptide A1 und A2 in Liposomen lässt bei der Fluconazoldiffusion nur einen kleinen Unterschied zwischen der Einarbeitung von 10 und 20 Mol % erkennen.

Abschließend soll noch mal betont werden, dass die Fluconazoldiffusion durch Inkorporierung von Polypeptid A2 fast um das Doppelte im Vergleich zu den Kontrollwerten gesteigert werden konnte.

7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte eine liposomale, fluconazolhaltige Zubereitung mit guter physikalischer Stabilität, über einen Zeitraum von drei Wochen, entwickelt werden.

Diese physikalische Stabilität, die anhand der Teilchengröße, des PDI und des Zetapotentials ermittelt wurde, konnte auch durch zusätzliche Inkorporierung der Lysin-derivate Lysin-5, Lysin-7, Lysin-9, Polypeptid A1 und Polypeptid A2 weitestgehend aufrecht erhalten werden.

Die Hautpermeation von Fluconazol wurde von allen Formulierungen mittels Standarddiffusionszellen, über einen Zeitraum von 10 Stunden gemessen. Als Hautmodell wurde porcine Haut verwendet.

Dabei zeigte sich, dass alle eingesetzten Lysin-derivate einen positiven Effekt in Abhängigkeit der eingesetzten Menge, auf die Fluconazolpermeation ausübten.

Während der Einsatz von 10 Mol % Lysin-5 und Lysin-7 eine etwa 20 %-ige Steigerung bewirkte, konnte durch Zusatz von 20 Mol % kein Effekt erreicht werden.

Den größten Einfluss auf die Fluconazolpermeation zeigte die Zugabe von Lysin-9 und Polypeptid A2, wobei Polypeptid A2 die höchste Fluconazoldiffusion bewirkte. Für diese Formulierungen konnte sogar eine Steigerung der Diffusion auf fast das Doppelte der Kontrolle erreicht werden.

Aber auch eine 20 Mol %-iger Zusatz von Lysin-9 bewirkte eine fast 50 %-ige Steigerung der Fluconazolpermeation.

In einer weiteren Untersuchung wäre es nun interessant zu testen, ob diese Peptide auch die Hautpermeation von anderen Arzneistoffen steigern können.

8. Literaturverzeichnis

- (1) R. Neubert, W. Wohlrab, W. Marsch. Dermatopharmazie, Vehikel- Wirkstoffe-Pharmakologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2001.
- (2) R. Niedner, J. Ziegenmeyer. Dermatika, Therapeutischer Einsatz, Pharmakologie und Pharmazie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1992.
- (3) R. Voigt. Pharmazeutische Technologie. 9. Auflage. Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart 2000.
- (4) G. M. M. El Maghraby, A. C. Williams, B. W. Barry. Interactions of surfactants (edge activators) and skin penetration enhancers with liposomes. International Journal of Pharmaceutics 276 (2004) 143-161.
- (5) L. N. Patel, J. L. Zaro, W. C. Shen. Cell Penetrating Peptides: Intracellular Pathways and Pharmaceutical Perspectives. Pharm. Res. 24 (2007) 1977-1992.
- (6) E. L. Synder, S. F. Dowdy. Cell Penetrating Peptides in Drug Delivery. Pharm. Res. 21 (2004) 389-393.
- (7) L. B. Lopes, C. M. Brophy, E. Furnish, C. R. Flynn, O. Sparks, Padmini Komalavilas, Lokesh Joshi, A. Panitch, M. V. L. B. Bentley. Comparative Study of the Skin Penetration of Protein Transduction Domains and a Conjugated Peptide. Pharm. Res. 22 (2005) 750-757.
- (8) M. Lindgren, M. Hällbrink, A. Prochiantz, Ü. Langel. Cell-Penetrating Peptides. TiPS 21 (2000) 99-103.
- (9) Yeu-Chun Kim, P. J. Ludovice, M. R. Prausnitz. Transdermal delivery enhanced by magainin pore-forming peptide. Journal of Controlled Release 122 (2007) 375-383.
- (10) K. H. Bauer, K-H. Frömmling, C. Führer. Lehrbuch der pharmazeutischen Technologie. 8. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2006.

- (11) R. H. Müller, G. E. Hildebrand. Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen. 2. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1998.
- (12) Andrew S. Janoff. Liposomes, rational design. Dekker Verlag New York 1999.
- (13) O. Braun – Falco, H. C. Korting, H. I. Maibach. Liposome Dermatics. Springer Verlag Berlin 1992.
- (14) E. Oberdisse, E. Hackenthal, K. Kuschinsky. Pharmakologie und Toxikologie. 3. Auflage. Springer Verlag 2002.
- (15) E. Mutschler, G. Geisslinger, H. K. Kroemer, P. Ruth, M. Schäfer-Korting. Arzneimittelwirkungen. 9. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2008.
- (16) Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch. 9. Auflage. Walter de Gruyter Berlin-New York 2004.
- (17) H. H. Wellhöner. Allgemeine und systematische Pharmakologie und Toxikologie. 6. Auflage. Springer Verlag.
- (18) Austria Codex Fachinformation 2007/2008. Österreichische Apotheker-Verlagsgesellschaft mbH Wien 2007.
- (19) Theodor Dingermann. Gentechnik, Biotechnik. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1999.
- (20) G. Löffler, P. E. Petrides, P. C. Heinrich. Biochemie und Pathobiochemie. 8. Auflage. Springer Medizin Verlag Heidelberg 2007.
- (21) F. von Bruchhausen, G. Dannhardt, S. Ebel, A. W. Frahm, E. Hackenthal, U. Holzgrabe. Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, Band 8 Stoffe E-O. 5. Auflage. Springer Verlag 1993.

(22) G. L. Zubay. Biochemie. Übersetzung der 4. Auflage. McGraw-Hill International (UK) Ltd. 2000.

(23) Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. 258. Auflage. Walter de Gruyter Berlin-New York 1998.

(24) http://www.novamex.de/nnb/aminosaeuren/am_lysine.html. November 2008.

(25) Yilmaz Erol. Entwicklung phytosphingosinhaltiger, positiv geladener Nanoemulsionen zur dermalen Applikation. Dissertation 2005.

(26) [http://www.niro-soavi.de/soavide/cmsresources.nsf/filenames/HDH_Grundlagen.pdf/\\$file/HDH_Grundlagen.pdf](http://www.niro-soavi.de/soavide/cmsresources.nsf/filenames/HDH_Grundlagen.pdf/$file/HDH_Grundlagen.pdf). November 2008.

(27) H. Asche, D. Essig, P.C. Schmidt. Technologie von Salben, Suspensionen und Emulsionen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1984.

(28) <http://www.avestin.com>. November 2008.

(29) <http://www.malvern.com>. November 2008.

(30) H. R. Müller. Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1996.

(31) Krickau Dennis. Abbaukinetik hydrolyseempfindlicher Arzneistoffe in parenteralen O/W-Emulsionen. Dissertation 2006.

(32) H. J. Roth, G. Blaschke. Pharmazeutische Analytik. 3. Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York 1989.

(33) G. Rücker, M. Neugebauer, G. G. Willems. Instrumentelle pharmazeutische Analytik. 3. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2001.

(34) Barbara Ranftl. Wechselwirkungen von Oligo-Lysinen mit DPPC Liposomen als Modellmembran. Diplomarbeit Universität Wien 2008.

(35) Birgit Herbsthofer. Einfluss verschiedener Lysine auf die Hautpermeation von Natrium-Fluorescein. Diplomarbeit Universität Wien 2008.

9. Anhang

9.1. Abkürzungen

CPPs	Cell penetrating peptides
DPPC	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DSC	Differential Scanning Calorimetry
HPLC	High Pressure Liquid Chromatographie
INN	International Nonproprietary Name
IRDS	Infant Respiratory Distress Syndrom
LUV	Large unilamellar vesicles
MLV	Multilamellar large vesicles
MTDs	Membran Transduction Domains
MVV	Multivesicular vesicles
n.g.	nicht gemessen
PEG	Polyethylenglykol (Macrogol)
PTDs	Protein Transduction Domains
rpm	Umdrehungen pro Minute
SUV	Small unilamellar vesicles

9.2. Tabellen

Physikalische Stabilität

Tage	Leerliposomen	1 % Fluconazol
1	92,45 ± 0,63	86,68 ± 0,43
3	91,97 ± 0,26	87,03 ± 0,90
5	92,29 ± 0,49	87,76 ± 0,36
7	92,89 ± 0,76	89,36 ± 0,46
9	94,07 ± 0,28	88,17 ± 0,38
13	94,73 ± 0,38	87,22 ± 0,64
15	95,01 ± 0,35	90,01 ± 0,47
17	94,92 ± 0,41	91,23 ± 1,41
19	94,34 ± 0,51	90,47 ± 0,45
21	95,39 ± 0,05	90,63 ± 0,23

Tab. 9.2.1. Vergleich der Teilchengröße von Leerliposomen mit fluconazolhaltigen Liposomen

Tage	Leerliposomen		1 % Fluconazol		Lysin-5 10 Mol %		Lysin-5 20 Mol %	
	MW (nm)	STABW	MW (nm)	STABW	MW (nm)	STABW	MW (nm)	STABW
1	92,45	0,63	86,68	0,43	89,88	0,70	93,94	0,64
3	91,97	0,26	87,03	0,90	96,20	0,87	86,73	1,02
5	92,29	0,49	87,76	0,36	103,73	1,04	56,29	5,41
7	92,89	0,76	89,36	0,46	113,80	3,15	43,64	1,71
9	94,07	0,28	88,17	0,38	50,64	1,30	n.g.	n.g.
13	94,73	0,38	87,22	0,64	40,70	0,26	n.g.	n.g.
15	95,01	0,35	90,01	0,47	40,59	0,30	n.g.	n.g.
17	94,92	0,41	91,23	1,41	40,68	0,29	n.g.	n.g.
19	94,34	0,51	90,47	0,45	42,09	0,57	n.g.	n.g.
21	95,39	0,05	90,63	0,23	42,93	0,23	n.g.	n.g.

Tab. 9.2.2. Einfluss von Lysin-5 in verschiedenen Konzentrationen auf die Teilchengröße der Formulierungen im Vergleich zu Leerliposomen und Liposomen mit 1 % Fluconazol

Tage	1 % Fluconazol		Lysin-5 10 Mol %		Lysin-5 20 Mol %	
	MW (mV)	STABW	MW (mV)	STABW	MW (mV)	STABW
1	0,13	0,11	18,43	0,95	29,22	0,32
3	-0,19	0,17	13,97	1,10	23,67	0,32
5	0,61	0,14	15,70	0,89	15,93	1,00
7	0,92	0,14	9,56	0,73	14,87	0,93
9	-0,34	0,57	8,00	0,26	n.g.	n.g.
13	0,43	0,11	11,07	0,95	n.g.	n.g.
15	0,02	0,02	15,23	1,31	n.g.	n.g.
17	0,37	0,17	8,94	0,59	n.g.	n.g.
19	0,21	0,07	8,86	0,08	n.g.	n.g.
21	0,07	0,00	8,77	0,12	n.g.	n.g.

Tab. 9.2.3. Einfluss von Lysin-5 in verschiedenen Konzentrationen auf das Zetapotential der Formulierungen im Vergleich zu Liposomen mit 1 % Fluconazol

Tage	Leerliposomen		1 % Fluconazol		Lysin-7 10 Mol %		Lysin-7 20 Mol %	
	MW (nm)	STABW	MW (nm)	STABW	MW (nm)	STABW	MW (nm)	STABW
1	92,45	0,63	86,68	0,43	91,25	0,96	61,33	2,57
3	91,97	0,26	87,03	0,90	63,92	0,40	43,80	1,85
5	92,29	0,49	87,76	0,36	50,41	0,27	43,14	0,58
7	92,89	0,76	89,36	0,46	n.g.	n.g.	44,49	0,41

Tab. 9.2.4. Einfluss von Lysin-7 in verschiedenen Konzentrationen auf die Teilchengröße der Formulierungen im Vergleich zu Leerliposomen und Liposomen mit 1 % Fluconazol

Tage	1 % Fluconazol		Lysin-7 10 Mol %		Lysin-7 20 Mol %	
	MW (mV)	STABW	MW (mV)	STABW	MW (mV)	STABW
1	0,13	0,11	25,37	0,75	21,80	0,78
3	-0,19	0,17	17,37	0,38	24,80	0,42
5	0,61	0,14	20,80	0,40	24,35	0,92
7	0,92	0,14	n.g.	n.g.	20,25	3,61

Tab. 9.2.5. Einfluss von Lysin-7 in verschiedenen Konzentrationen auf das Zetapotential der Formulierungen im Vergleich zu Liposomen mit 1 % Fluconazol

Tage	Leerliposomen		1 % Fluconazol		Lysin-9 10 Mol %		Lysin-9 20 Mol %	
	MW (nm)	STABW	MW (nm)	STABW	MW (nm)	STABW	MW (nm)	STABW
1	92,45	0,63	86,68	0,43	51,15	2,44	101,07	0,81
3	91,97	0,26	87,03	0,90	43,60	1,14	99,32	0,26
5	92,29	0,49	87,76	0,36	45,65	1,44	48,06	2,15
7	92,89	0,76	89,36	0,46	46,70	2,26	n.g.	n.g.

Tab. 9.2.6. Einfluss von Lysin-9 in verschiedenen Konzentrationen auf die Teilchengröße der Formulierungen im Vergleich zu Leerliposomen und Liposomen mit 1 % Fluconazol

Tage	1 % Fluconazol		Lysin-9 10 Mol %		Lysin-9 20 Mol %	
	MW (mV)	STABW	MW (mV)	STABW	MW (mV)	STABW
1	0,13	0,11	23,30	0,95	17,17	0,96
3	-0,19	0,17	34,80	1,70	13,23	0,23
5	0,61	0,14	25,33	0,90	15,97	0,71
7	0,92	0,14	26,27	1,50	n.g.	n.g.

Tab. 9.2.7. Einfluss von Lysin-9 in verschiedenen Konzentrationen auf das Zetapotential der Formulierungen im Vergleich zu Liposomen mit 1% Fluconazol

Tage	Leerliposomen		1 % Fluconazol		Polypept. A1 10 Mol %		Polypept. A1 20 Mol %	
	MW (nm)	STABW	MW (nm)	STABW	MW (nm)	STABW	MW (nm)	STABW
1	92,45	0,63	86,68	0,43	86,16	0,75	86,42	1,14
3	91,97	0,26	87,03	0,90	86,52	0,24	91,75	0,45
5	92,29	0,49	87,76	0,36	88,95	0,29	106,97	2,05
7	92,89	0,76	89,36	0,46	86,47	0,30	n.g.	n.g.
9	94,07	0,28	88,17	0,38	87,58	0,30	n.g.	n.g.
13	94,73	0,38	87,22	0,64	88,78	0,86	n.g.	n.g.
15	95,01	0,35	90,01	0,47	90,57	0,47	n.g.	n.g.
17	94,92	0,41	91,23	1,41	89,87	0,22	n.g.	n.g.
19	94,34	0,51	90,47	0,45	92,85	0,21	n.g.	n.g.
21	95,39	0,05	90,63	0,23	153,20	0,00	n.g.	n.g.

Tab. 9.2.8. Einfluss von Polypeptid A1 in verschiedenen Konzentrationen auf die Teilchengröße der Formulierungen im Vergleich zu Leerliposomen und Liposomen mit 1 % Fluconazol

Tage	1 % Fluconazol		Polypeptid A1 10 Mol %		Polypeptid A1 20 Mol %	
	MW (mV)	STABW	MW (mV)	STABW	MW (mV)	STABW
1	0,13	0,11	27,00	0,90	23,27	1,12
3	-0,19	0,17	14,39	0,76	14,37	0,15
5	0,61	0,14	8,64	0,90	15,80	0,20
7	0,92	0,14	10,06	0,06	n.g.	n.g.
9	-0,34	0,57	7,80	0,22	n.g.	n.g.
13	0,43	0,11	5,24	0,21	n.g.	n.g.
15	0,02	0,02	7,81	0,33	n.g.	n.g.
17	0,37	0,17	14,63	0,87	n.g.	n.g.
19	0,21	0,07	15,43	0,21	n.g.	n.g.
21	0,07	0,00	6,26	0,09	n.g.	n.g.

Tab. 9.2.9. Einfluss von Polypeptid A1 in verschiedenen Konzentrationen auf das Zetapotential der Formulierungen im Vergleich zu Liposomen mit 1 % Fluconazol

Tage	Leerliposomen		1 % Fluconazol		Polypept. A2 10 Mol %		Polypept. A2 20 Mol %	
	MW (nm)	STABW	MW (nm)	STABW	MW (nm)	STABW	MW (nm)	STABW
1	92,45	0,63	86,68	0,43	78,38	0,45	75,17	0,33
3	91,97	0,26	87,03	0,90	82,11	0,71	59,47	2,32
5	92,29	0,49	87,76	0,36	91,27	4,83	33,82	0,08
7	92,89	0,76	89,36	0,46	49,11	1,04	31,84	0,25
9	94,07	0,28	88,17	0,38	42,13	4,47	31,78	0,25
13	94,73	0,38	87,22	0,64	32,23	0,18	33,04	0,50
15	95,01	0,35	90,01	0,47	31,72	0,27	33,22	0,24
17	94,92	0,41	91,23	1,41	31,29	0,12	33,76	0,12
19	94,34	0,51	90,47	0,45	39,54	0,60	37,90	1,23
21	95,39	0,05	90,63	0,23	34,04	0,34	33,72	0,00

Tab. 9.2.10. Einfluss von Polypeptid A2 in verschiedenen Konzentrationen auf die Teilchengröße der Formulierungen im Vergleich zu Leerliposomen und Liposomen mit 1 % Fluconazol

Tage	1 % Fluconazol		Polypeptid A2 10 Mol %		Polypeptid A2 20 Mol %	
	MW (mV)	STABW	MW (mV)	STABW	MW (mV)	STABW
1	0,13	0,11	31,90	0,44	31,80	2,39
3	-0,19	0,17	22,20	0,44	25,50	4,96
5	0,61	0,14	19,97	0,60	22,50	0,79
7	0,92	0,14	18,07	0,91	21,37	0,87
9	-0,34	0,57	19,20	1,14	17,70	0,53
13	0,43	0,11	15,03	0,65	15,07	0,83
15	0,02	0,02	14,70	1,10	13,07	0,15
17	0,37	0,17	11,50	2,86	5,53	2,34
19	0,21	0,07	13,80	0,10	2,23	0,62
21	0,07	0,00	14,37	1,62	0,09	0,07

Tab. 9.2.11. Einfluss von Polypeptid A2 in verschiedenen Konzentrationen auf das Zetapotential der Formulierungen im Vergleich zu Liposomen mit 1 % Fluconazol

Diffusionsversuche

Stunde	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	MW	STABW
0	0	0	0	0	0
2	62,45	99,16	162,27	107,96	50,49
4	491,83	545,76	493,96	510,52	30,54
6	764,47	878,95	715,74	786,39	83,79
8	939,46	1106,54	1072,56	1039,52	88,30
10	1305,23	1239,26	1314,13	1286,21	40,90

Tab. 9.2.12. Wirkstoffpermeation einer liposomalen Formulierung mit 1 % Fluconazol
in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Stunde	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	MW	STABW
0	0	0	0	0	0
2	1,58	2,44	4,09	2,70	1,28
4	12,41	13,43	12,46	12,77	0,58
6	19,29	21,63	18,06	19,66	1,82
8	23,70	27,23	27,06	26,00	1,99
10	32,93	30,50	33,15	32,19	1,47

Tab. 9.2.13. Wirkstoffpermeation einer liposomalen Formulierung mit 1 % Fluconazol
in % (m/m)

Stunde	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	MW	STABW
0	0	0	0	0	0
2	281,94	367,72	316,59	322,09	43,15
4	601,55	800,24	512,07	637,95	147,49
6	1058,01	1099,17	937,46	1031,54	84,04
8	1346,21	1307,18	1357,72	1337,04	26,49
10	1435,84	1565,97	1532,40	1511,40	67,56

Tab. 9.2.14. Auswirkung von 10 Mol % Lysin-5 auf die Permeation von Fluconazol in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Stunde	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	MW	STABW
0	0	0	0	0	0
2	7,64	9,97	8,37	8,66	1,19
4	16,31	21,69	13,54	17,18	4,14
6	28,68	29,80	24,79	27,76	2,63
8	36,49	35,44	35,91	35,95	0,53
10	38,92	42,45	40,53	40,63	1,77

Tab. 9.2.15. Auswirkung von 10 Mol % Lysin-5 auf die Permeation von Fluconazol in % (m/m)

Stunde	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	MW	STABW
0	0	0	0	0	0
2	126,34	144,31	250,90	173,85	67,33
4	412,33	462,10	515,82	463,42	51,76
6	558,86	703,44	712,60	658,30	86,24
8	817,57	1006,00	941,04	921,54	95,71
10	1093,57	1322,63	1280,43	1232,21	121,91

Tab. 9.2.16. Auswirkung von 20 Mol % Lysin-5 auf die Permeation von Fluconazol in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Stunde	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	MW	STABW
0	0	0	0	0	0
2	3,30	3,58	6,38	4,42	1,70
4	10,75	11,46	13,12	11,78	1,21
6	14,58	17,45	18,12	16,72	1,88
8	21,32	24,96	23,93	23,40	1,87
10	28,52	32,81	32,56	31,30	2,41

Tab. 9.2.17. Auswirkung von 20 Mol % Lysin-5 auf die Permeation von Fluconazol in % (m/m)

Stunde	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	MW	STABW
0	0	0	0	0	0
2	222,71	257,92	328,22	269,61	53,72
4	820,88	745,99	849,73	805,53	53,55
6	1093,45	1009,45	1180,81	1094,57	85,68
8	1452,37	1405,83	1352,97	1403,72	49,73
10	1586,27	1492,21	1455,23	1511,24	67,56

Tab. 9.2.18. Auswirkung von 10 Mol % Lysin-7 auf die Permeation von Fluconazol in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Stunde	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	MW	STABW
0	0	0	0	0	0
2	5,58	6,47	8,22	6,76	1,34
4	20,58	18,70	21,30	20,19	1,34
6	27,41	25,31	29,60	27,44	2,15
8	36,41	35,24	33,92	35,19	1,24
10	39,76	37,41	36,48	37,88	1,69

Tab. 9.2.19. Auswirkung von 10 Mol % Lysin-7 auf die Permeation von Fluconazol in % (m/m)

Stunde	Zelle 1	Zelle 3	Zelle 3	MW	STABW
0	0	0	0	0	0
2	144,05	183,70	162,84	163,53	19,83
4	440,91	613,47	494,18	516,19	88,36
6	726,71	850,01	704,22	760,31	78,49
8	955,90	1088,40	957,06	1000,45	76,17
10	1154,60	1297,21	1307,58	1253,13	85,49

Tab. 9.2.20. Auswirkung von 20 Mol % Lysin-7 auf die Permeation von Fluconazol in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Stunde	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	MW	STABW
0	0	0	0	0	0
2	3,60	4,60	4,08	4,09	0,50
4	11,03	15,35	12,37	12,92	2,21
6	18,19	21,27	17,62	19,03	1,96
8	23,92	27,24	23,95	25,04	1,91
10	28,89	32,46	32,72	31,36	2,14

Tab. 9.2.21. Auswirkung von 20 Mol % Lysin-7 auf die Permeation von Fluconazol in % (m/m)

Stunde	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	MW	STABW
0	0	0	0	0	0
2	134,93	185,96	242,63	187,84	53,88
4	552,76	508,80	774,71	612,09	142,54
6	1102,87	830,10	1132,44	1021,80	166,68
8	1231,57	1088,36	1293,70	1204,54	105,31
10	1361,05	1403,15	1544,71	1436,30	96,21

Tab. 9.2.22. Auswirkung von 10 Mol % Lysin-9 auf die Permeation von Fluconazol in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Stunde	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	MW	STABW
0	0	0	0	0	0
2	3,28	4,64	6,05	4,65	1,38
4	13,44	12,68	19,31	15,15	3,63
6	26,82	20,69	28,23	25,25	4,01
8	29,95	27,13	32,25	29,78	2,56
10	33,10	34,98	38,50	35,53	2,74

Tab. 9.2.23. Auswirkung von 10 Mol % Lysin-9 auf die Permeation von Fluconazol in % (m/m)

Stunde	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	MW	STABW
0	0	0	0	0	0
2	326,93	298,36	280,18	301,83	23,56
4	962,29	730,75	608,33	767,12	179,76
6	1624,24	1090,52	1021,61	1245,46	329,84
8	2006,43	1370,33	1307,74	1561,50	386,59
10	2101,36	2104,47	1459,01	1888,28	371,76

Tab. 9.2.24. Auswirkung von 20 Mol % Lysin-9 auf die Permeation von Fluconazol in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Stunde	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	MW	STABW
0	0	0	0	0	0
2	8,43	7,50	7,04	7,66	0,71
4	24,80	18,36	15,29	19,48	4,86
6	41,87	27,41	25,67	31,65	8,89
8	51,72	34,44	32,86	39,67	10,46
10	54,16	52,89	36,67	47,91	9,75

Tab. 9.2.25. Auswirkung von 20 Mol % Lysin-9 auf die Permeation von Fluconazol in % (m/m)

Stunde	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	MW	STABW
0	0	0	0	0	0
2	195,06	125,44	226,49	182,33	51,71
4	564,70	518,51	634,20	572,47	58,24
6	763,65	786,24	876,35	808,74	59,63
8	1097,16	1099,21	1330,88	1175,75	134,35
10	1523,67	1611,60	1654,31	1596,53	66,61

Tab. 9.2.26. Auswirkung von 10 Mol % Polypeptid A1 auf die Permeation von Fluconazol in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Stunde	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	MW	STABW
0	0	0	0	0	0
2	4,95	3,18	5,74	4,62	1,31
4	14,32	13,15	16,08	14,52	1,48
6	19,36	19,94	22,22	20,51	1,51
8	27,82	27,87	33,75	29,81	3,41
10	38,63	40,86	41,95	40,48	1,69

Tab. 9.2.27. Auswirkung von 10 Mol % Polypeptid A1 auf die Permeation von Fluconazol in % (m/m)

Stunde	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	MW	STABW
0	0	0	0	0	0
2	173,44	139,63	148,42	153,83	17,54
4	496,73	697,24	476,16	556,71	122,13
6	830,70	1002,20	735,53	856,14	135,15
8	1107,33	1446,67	1094,88	1216,30	199,61
10	1571,69	1670,92	1323,17	1521,93	179,14

Tab. 9.2.28. Auswirkung von 20 Mol % Polypeptid A1 auf die Permeation von Fluconazol in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Stunde	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	MW	STABW
0	0	0	0	0	0
2	4,39	3,53	3,85	3,93	0,43
4	12,57	17,65	12,36	14,19	2,99
6	21,03	25,37	19,09	21,83	3,21
8	28,03	36,62	28,42	31,02	4,85
10	39,78	42,29	34,35	38,81	4,06

Tab. 9.2.29. Auswirkung von 20 Mol % Polypeptid A1 auf die Permeation von Fluconazol in % (m/m)

Stunde	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	MW	STABW
0	0	0	0	0	0
2	359,61	409,38	451,37	406,79	45,94
4	877,42	1114,76	1118,84	1037,01	138,22
6	1417,64	1653,50	1669,21	1580,12	140,93
8	1775,97	2021,65	2097,82	1965,15	168,20
10	2115,36	2301,80	2317,59	2244,91	112,48

Tab. 9.2.30. Auswirkung von 10 Mol % Polypeptid A2 auf die Permeation von Fluconazol in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Stunde	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	MW	STABW
0	0	0	0	0	0
2	9,12	10,38	11,74	10,41	1,31
4	22,24	28,26	29,09	26,53	3,74
6	35,94	41,92	43,40	40,42	3,95
8	45,02	51,25	54,55	50,27	4,84
10	53,63	58,35	60,26	57,42	3,42

Tab. 9.2.31. Auswirkung von 10 Mol % Polypeptid A2 auf die Permeation von Fluconazol in % (m/m)

Stunde	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	MW	STABW
0	0	0	0	0	0
2	303,39	354,93	370,26	342,86	35,03
4	1419,28	980,59	1013,03	1137,64	244,45
6	1695,82	1839,69	1833,04	1789,52	81,21
8	2153,74	1886,13	2400,55	2146,81	257,28
10	2312,88	2091,24	2530,56	2311,56	219,67

Tab. 9.2.32. Auswirkung von 20 Mol % Polypeptid A2 auf die Permeation von Fluconazol in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Stunde	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	MW	STABW
0	0	0	0	0	0
2	7,69	8,99	9,38	8,69	0,89
4	35,96	24,85	25,67	28,83	6,19
6	42,97	46,61	46,45	45,34	2,06
8	54,57	47,79	60,83	54,40	6,52
10	58,60	52,99	64,12	58,57	5,57

Tab. 9.2.33. Auswirkung von 20 Mol % Polypeptid A2 auf die Permeation von Fluconazol in % (m/m)

10. Lebenslauf

Name: Daniela Elisabeth Spengler

Geburtsdatum: 07. Jänner 1984

Name und Beruf der Eltern: Gertrude Spengler, gelernte Schneiderin
Hermann Spengler, kfm. Angestellter

Staatsbürgerschaft: Österreich

Familienstand: ledig

Schulbildung:

Volksschule:	1990 bis 1994;	1220 Wien, Esslinger Hauptstrasse 97
Hauptschule:	1994 bis 1998;	1220 Wien, Eibengasse 58
BORG:	1998 bis 2002;	1030 Wien, Landstrasser Hauptstrasse 70
	Juni 2002;	Matura, mit ausgezeichnetem Erfolg

Berufliche Tätigkeiten:

1999/2000/2001/2002/2003	Ferialpraktikum für den Zeitraum eines Monats als Bürokraft und im Service; Firma Listo Videofilm 1060 Wien, Gumpendorfer Strasse 132
Februar 2004 bis Oktober 2007	geringfügig beschäftigt in der Apotheke „Zum Feldmarschall Radetzky“
SS 2008/WS 2008/2009/ SS 2009	Tutorium für die Übungen zur Magistralen Arzneimittelherstellung (Department für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie)

Sonstige Kenntnisse:

Fremdsprachen	Englisch in Wort und Schrift, Grundzüge Spanisch
---------------	---

