



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Einfluss verschiedener Polypeptide auf die Hautpermeation eines Modellwirkstoffes aus liposomalen Formulierungen

angestrebter akademischer Grad

Magister/Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin / Verfasser:	Beatrice Grundtner
Matrikel-Nummer:	0047534
Studienrichtung /Studienzweig (lt. Studienblatt):	Pharmazie (A449)
Betreuerin / Betreuer:	Ao.Univ.-Prof. Dr. Claudia Valenta

Wien, im Dezember 2009

Danksagung

Ich möchte mich bei Frau Ao. Univ.Prof. Mag. Pharm. Dr. Claudia Valenta und ihrem Team für die hervorragende Betreuung und das angenehme Arbeitsklima bedanken.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Ao. Prof. Dr. Martin Kratzel für die Synthese der Lysinderivate bedanken.

Mein Dank gilt auch Markus Husa, der die NMR Untersuchungen durchgeführt hat.

Am Ende möchte ich mich bei meinem Freund Michael Racz und bei meinem Vater Franz Grundtner und meiner Stiefmutter Ilse Grundtner-Fend bedanken, die mich während meiner Studienzeit immer unterstützt haben und an meiner Seite standen, wenn es einmal schwierig wurde.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	5
2. ALLGEMEINES	7
2.1. Die Haut	7
2.2. Liposomen	8
2.3. Lysinderivate	10
2.4. Modellwirkstoffe	13
2.4.1. Aciclovir	13
2.4.2. Benzoessäure	15
2.4.3. Clioquinol	16
2.4.4. Diclofenac	18
2.4.5. Ketoprofen	20
2.4.6. Metronidazol	21
2.4.7. Salicylsäure	23
3. EXPERIMENTELLER TEIL	26
3.1. Formulierungen	26
3.1.1. Herstellung der Liposomen	26
3.1.1.1. Untersuchung auf Reinheit mit NMR	27
3.1.2. Einarbeitung der Wirkstoffe	27
3.1.3. Zugabe der Peptide	28
3.2. Physikalische Charakterisierung	28
3.2.1. Teilchengröße:	29
3.2.2. Zetapotential:	29
3.3. In-Vitro Hautpermeation	30
3.3.1. Aufbau der Franz-Zellen	30
3.3.2. Praktische Durchführung	31

3.4. Analytik von Aciclovir	33
3.4.1. Gehaltsbestimmung aciclovirhaltiger Proben mittels HPLC	33
3.4.2. Methode	33
3.4.3. Parameter.....	34
3.4.4. Eichgerade	34
4. ERGEBNISSE	36
4.1. Voruntersuchungen:	36
4.1.1. Waschvorgänge am Homogenisator	36
4.1.2. Auswahl des Wirkstoffes	40
4.2. Physikalische Stabilität:	42
4.2.1. Liposomen mit 1% Aciclovir	42
4.2.2. Formulierungen mit Lysin-5:	43
4.2.3. Formulierungen mit Lysin-7:	44
4.2.4. Formulierungen mit Lysin-9:	45
4.2.5. Formulierungen mit Polypeptid A1:	46
4.2.6. Formulierungen mit Polypeptid A2:	47
4.3. Diffusionsversuche	48
4.3.1. Formulierungen mit 1% Aciclovir:	48
4.3.2. Formulierungen mit Lysin-5:	49
4.3.3. Formulierungen mit Lysin-7:	50
4.3.4. Formulierungen mit Lysin-9:	51
4.3.5. Formulierungen mit Polypeptid A1:	52
4.3.6. Formulierungen mit Polypeptid A2:	53
5. DISKUSSION	54
6. ZUSAMMENFASSUNG	57

7. TABELLEN	59
7.1. Berechnung Mol%.....	59
7.2. Physikalische Stabilität	60
7.3. Diffusionsversuche.....	66
8. LITERATURVERZEICHNIS	72
9. LEBENSLAUF	75

1. Einleitung

Liposomen werden schon seit Jahren in kosmetischen Produkten verwendet. Auch im pharmazeutischen Bereich gewinnen sie als Wirkstoffträger immer mehr an Bedeutung [1]. Relevant für die Verwendung als Wirkstoffträger ist, dass sie Eigenschaften wie toxikologische Unbedenklichkeit aufweisen, sich sowohl lipophile als auch hydrophile Stoffe in sie einarbeiten lassen und sie große Mengen an Wirkstoff durch die intakte Haut transportieren können [2, 3, 4]. Weitere Vorteile einer liposomalen Verkapselung eines Arzneistoffes liegen darin, dass einerseits die Toxizität der Substanz verringert und andererseits die Wirkstoffpenetration gefördert werden kann [2, 5].

Im Bereich der Penetrationsförderer wurden Zell-penetrierende Peptide (CPP) untersucht. Sie zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an Arginin und Lysin aus und können den Transport von großen, biologisch aktiven Molekülen durch die Zellmembran verbessern [6].

In Studien konnte nachgewiesen werden, dass sich die Kombination von Cyclosporin mit einem Argininoligomer positiv auf die Hautpenetration auswirkt und dass die Wirkstoffpenetration von Estradiol erhöht werden konnte durch das Hinzufügen von penetrationsfördernden Stoffen in Liposomen [7, 8]. Dadurch wurden zwei Wege zur Förderung der Hautpenetration miteinander kombiniert, die einander sogar verstärkt haben.

In einer vorangegangenen Untersuchung wurde unter anderem die Wechselwirkung von ausgesuchten Lysinderivaten auf Liposomen dokumentiert und später wurde anhand von fluconazolhaltigen, liposomalen Formulierungen der positive Effekt von Lysinderivaten auf die Wirkstoffpenetration gemessen [9, 10].

Ziel der nun vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob dieser positive Effekt auch in Verbindung mit anderen Modellwirkstoffen nachgewiesen werden kann.

Dazu war es erforderlich einen geeigneten Modellwirkstoff zu finden, der sich in die Liposomen einarbeiten ließ. Aus einer Reihe von Wirkstoffen wurde Aciclovir ausgewählt. Anschließend wurden aciclovirhaltige Liposomen hergestellt. In diese Liposomen wurden

nun Lysin-5, Lysin-7, Lysin-9, Polypeptid A1 und Polypeptid A2 in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (10 Mol%, 20 Mol%) eingearbeitet. Danach sollte die physikalische Stabilität mittels Teilchengröße, Polydispersitätsindex (PDI) und Zetapotential überprüft werden. Abschließend sollte noch untersucht werden welchen Einfluss die Lysinderivate auf die Hautdiffusion von Aciclovir aufweisen.

2. Allgemeines

2.1. Die Haut

Die menschliche Haut wird in Epidermis (Oberhaut), Dermis (Lederhaut) und Subcutis (Unterhaut) unterteilt. Die Epidermis setzt sich aus dem Stratum corneum (Hornschicht), Stratum granulosum (Körnerschicht), Stratum spinosum (Stachelzellenschicht) und Stratum basale (Basalschicht) zusammen [11, 12].

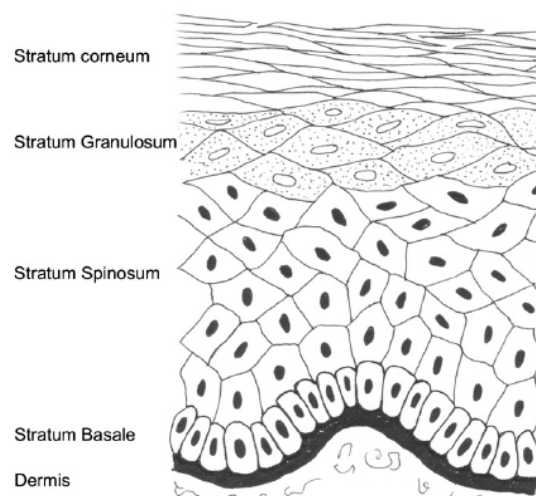


Abb. 2.1.1. Schematischer Aufbau der Epidermis [14]

Das Stratum corneum ist die Hauptbarriere für die Penetration von Wirkstoffen, die topisch appliziert werden [1, 11]. Die Hornschicht ist ähnlich einem „Ziegel-Mörtel“ Modell aufgebaut, wobei die Korneozyten („Ziegel“) in lamelläre Lipidschichten („Mörtel“) eingebettet sind und somit eine Barriere bilden, die den Körper vor Austrocknung schützt und das Eindringen von Fremdstoffen verhindert und so auch die Penetration von Wirkstoffen erschwert [1, 13, 14].

2.2. Liposomen

Liposomen sind kugelige Vesikel, die aus einer oder mehreren Lipiddoppelschichten (Bilayer) bestehen, die einen wässrigen Kern umhüllen [1, 2]. Sie sind toxikologisch unbedenklich, da sie sich aus biologisch verträglichen und leicht abbaubaren, natürlichen Materialien zusammensetzen [5].

Je nach Anzahl der Doppelschichten unterscheidet man zwischen oligo-, multi- und unilamellaren Liposomen, die auch weiters aufgrund ihrer Größe eingeteilt werden.

- **Small unilamellar vesicles (SUV)** bestehen nur aus einer Phospholipiddoppelschicht und haben einen Durchmesser zwischen 20 und 50 nm.

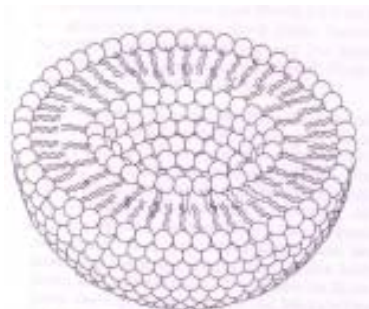


Abb. 2.2.1. Schnitt durch ein SUV [2]

- **Large unilamellar vesicles (LUV)** besitzen ebenfalls nur eine Doppelschicht, diese haben einen Durchmesser von über 50 nm.
- **Multilamellar large vesicles (MLV)** setzen sich aus mehreren konzentrisch angeordneten Phospholipiddoppelschichten zusammen und können somit eine Größe von 100 bis 1000 nm erreichen.

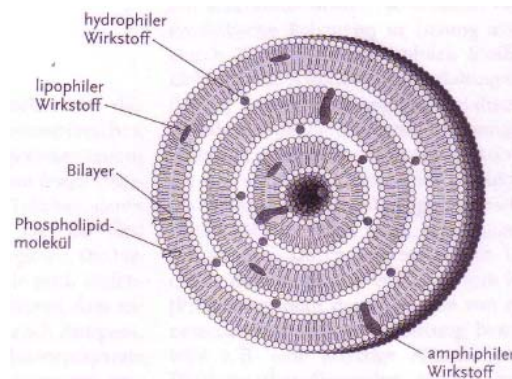


Abb. 2.2.2. Multilamellares Liposom [1]

- **Multivesicular vesicles** (MVV) sind die größten Liposomen. Sie setzen sich aus mehreren Vesikeln zu einem größeren zusammen [2, 15].

Liposomen werden schon seit langem in der Kosmetik eingesetzt. In den letzten Jahren sind Arzneimittel mit liposomaler Formulierung auf den Markt gekommen. Die sich durch eine bessere Verträglichkeit auszeichnen und dadurch, dass der Wirkstoff gezielter an seinen Wirkungsort gebracht werden kann. Dies hat zur Folge, dass Nebenwirkungen reduziert werden können. Liposomen werden sowohl topisch als auch parenteral angewendet [1].

Bei der topischen Applikation konnte noch nicht exakt nachgewiesen werden wie die Liposomen durch die Hornschicht transportiert werden. Man vermutet jedoch, dass sie mit den Lipiden des Stratum corneum interagieren und dabei ihre Strukturen zerstört werden. Ein Beweis für die Validität dieser Theorie ist das nicht mehr Vorhandensein intakter Vesikel in den tieferen Hautschichten [4]. Als bewiesen gilt die Annahme, dass die Basisliposomen selbst die Wirkstoffpenetration fördern, indem sie Einfluss auf den Hydratationszustand der Haut nehmen [1, 2, 11].

2.3. Lysinderivate

Lysin gehört zu den essentiellen, basischen Aminosäuren, die für den Aufbau von einigen Proteinen benötigt wird [16]. Diese Aminosäure hat hydrophile Eigenschaften, Ihre Seitenkette hat einen polaren Charakter und die Endgruppen sind bei neutralem pH positiv geladen [17].

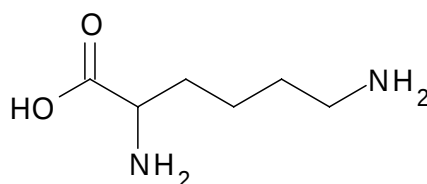


Abb. 2.3.1. Struktur von Lysin

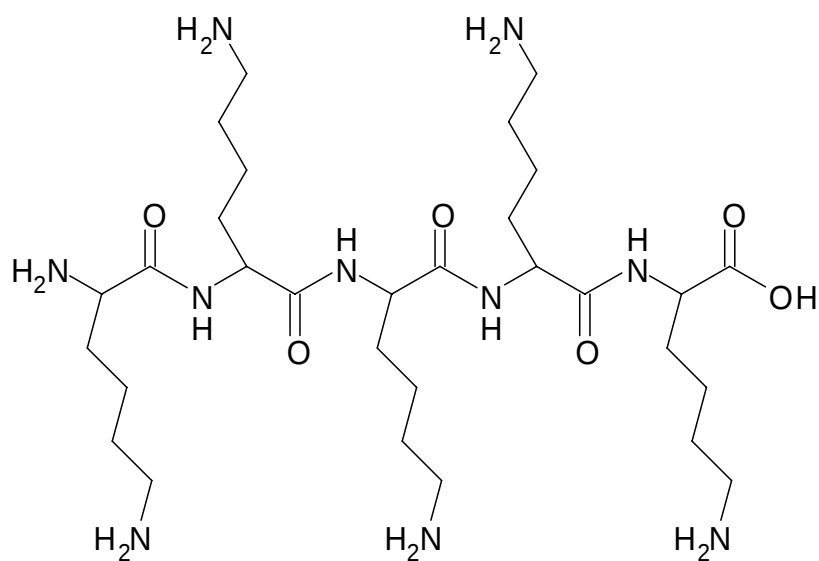
Die für diese Arbeit verwendeten Lysinderivate wurden mit der Festphasensynthese hergestellt.

Folgende Peptide wurden den Liposomen zugesetzt.

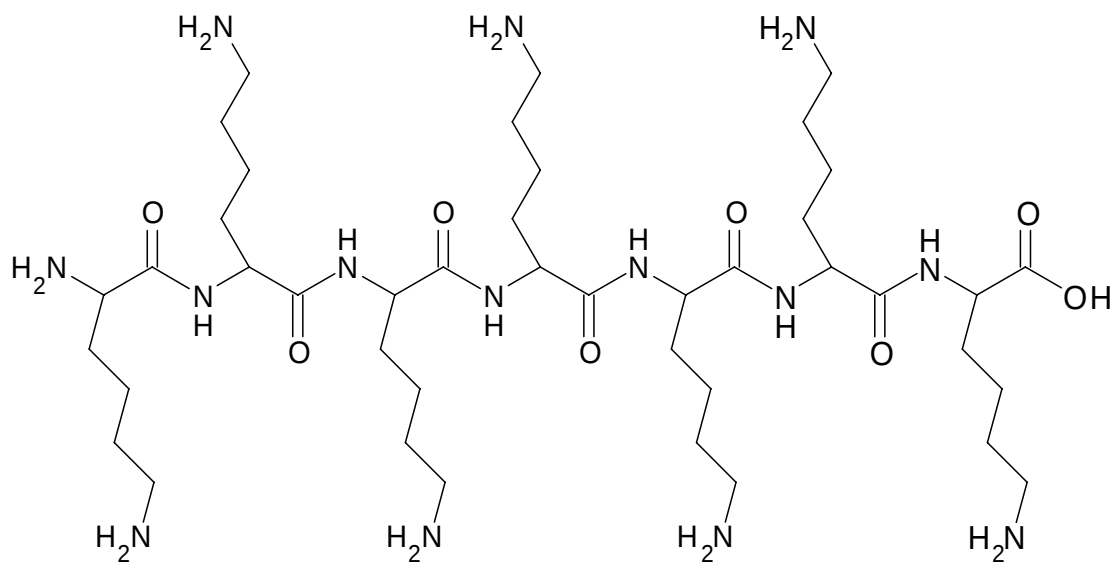
Peptid	Aminosäurezusammensetzung	
Lysin-5	KKKKK	Lys-Lys-Lys-Lys-Lys
Lysin-7	KKKKKKK	Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys
Lysin-9	KKKKKKKKK	Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys
Polypeptid A1	KAKAKAK	Lys-Ala-Lys-Ala-Lys-Ala-Lys
Polypeptid A2	KAAKAAK	Lys-Ala-Ala-Lys-Ala-Ala-Lys

Tab. 2.3.1. Aminosäurezusammensetzung der Lysin Derivate, Lysin (K), Alanin (A)

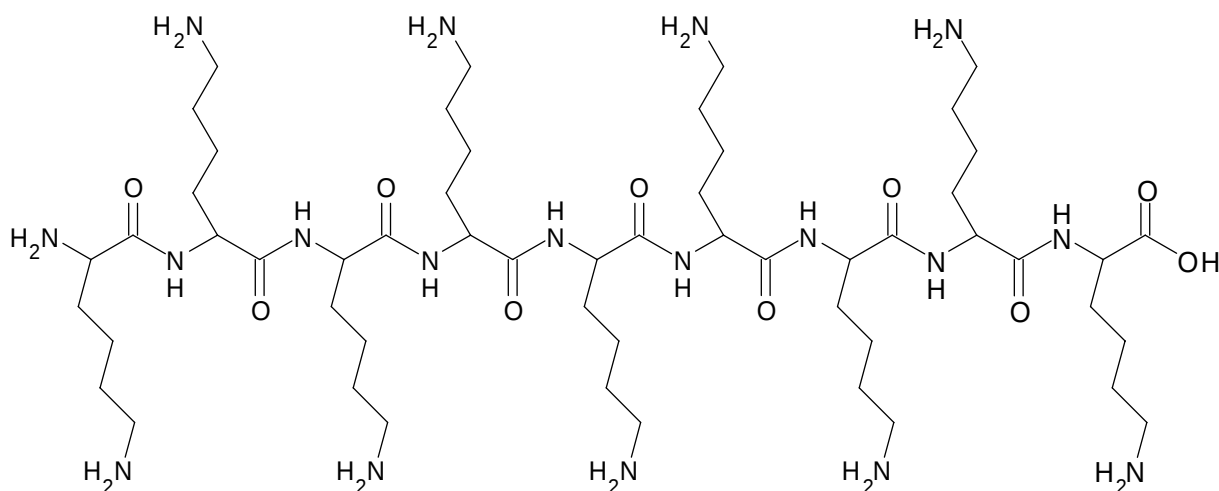
Lysin-5: MG 658 g/mol



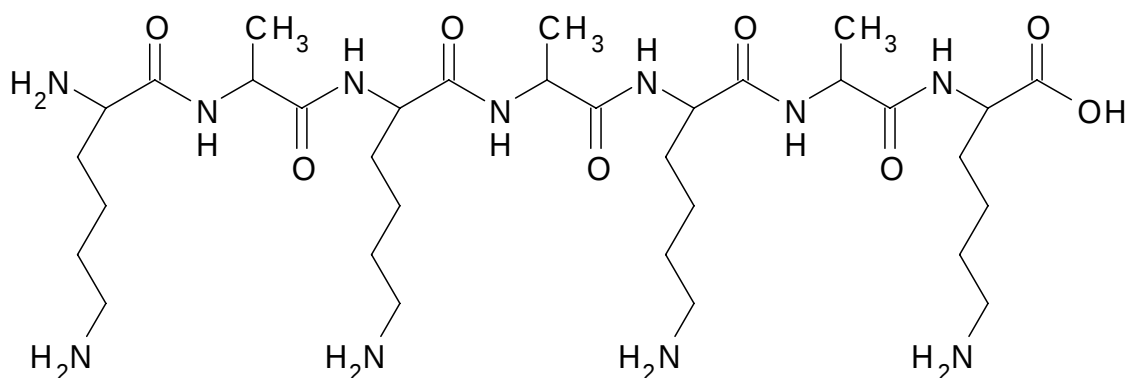
Lysin-7: MG = 914 g/mol



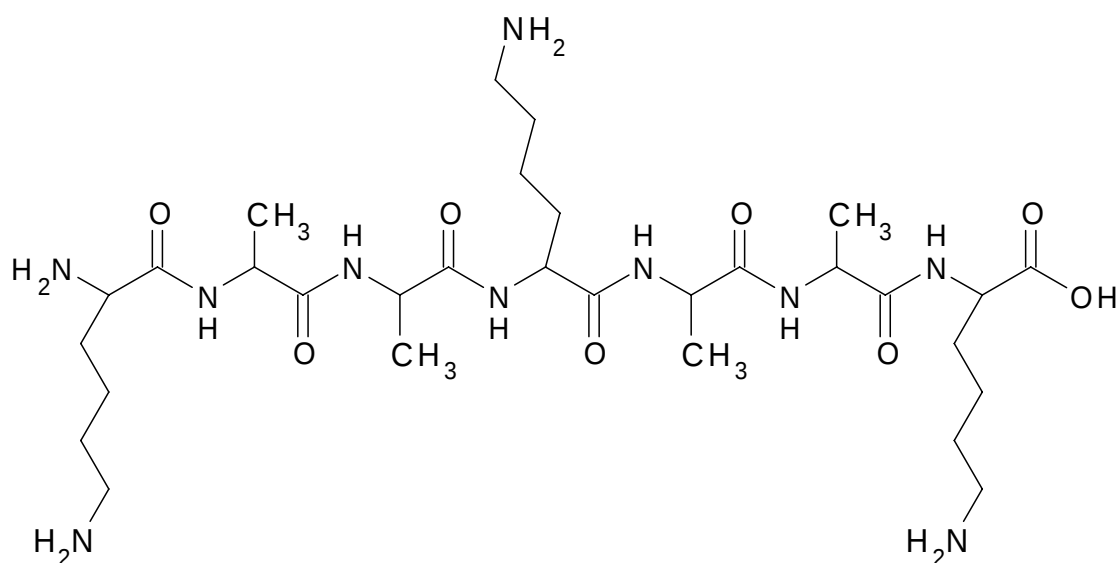
Lysin-9: MG = 1171 g/mol



Polypeptid A1: MG = 744 g/mol



Polypeptid A2: MG = 687 g/mol



2.4. Modellwirkstoffe

Als erstes wurden Basisliposomen (siehe Kapitel 3.1.1.) mit einer Reihe von Modellwirkstoffen beladen. Danach wurden die Teilchengröße und der Polydispersitätsindex (PDI) miteinander verglichen. Der PDI ist ein Maß für die Breite der Korngrößenverteilung. Jener Arzneistoff, der die höchste physikalische Stabilität aufwies, wurde für alle weiteren Versuche ausgewählt. (siehe Kapitel 4.1.2. Auswahl des Wirkstoffes)

2.4.1. Aciclovir

Struktur:

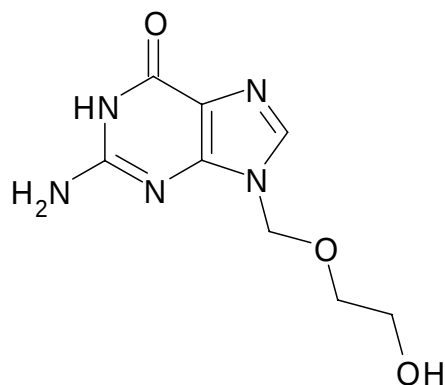
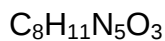


Abb. 2.4.1. Struktur von Aciclovir

Summenformel:



Synonym:

INN: Aciclovirum, 9-(2-Hydroxyethoxy)methyl-guanin; 2-Amino-1,9-dihydro-9-(2-hydroxyethoxy)methyl-6H-purin-6-on

Relative Molekülmasse:

225,21 g/mol

Löslichkeit:

schwer löslich in Wasser [18]

Log P = $-1,76 \pm 0,49$ (ACD Lab Version 10.00)

Pharmakologie:

Aciclovir ist ein Virustatikum das wirksam ist gegen Herpes simplex Viren und Varizella Zoster Viren. Der Wirkstoff ist ein Guanosin-Derivat, der in der virusinfizierten Zelle durch die viruscodierte Thymidinkinase zu einem Monophosphat phosphoryliert und durch wirtseigene Enzyme weiter zu einem Triphosphat umgewandelt wird. Das Aciclovir – Triphosphat wird durch die virale DNA-Polymerase in die Viren-DNA eingebaut und verhindert dadurch eine weitere Verknüpfung von Nucleotiden und unterbricht somit die Virusbiosynthese [18, 19].

Anwendung:

Orale und parenterale Anwendung von Aciclovir ist vor allem bei Herpes-simplex-Virusinfektionen bei immunsupprimierten und immunschwachen Personen von Bedeutung. Topisch wird Aciclovir häufig zur unterstützenden Therapie bei Herpes genitalis und Herpes labialis eingesetzt [12, 19].

Nebenwirkungen:

Aciclovir ist nephrotoxisch, da es in den Tubuli Kristalle bildet. Weiters kann es zu neurologischen und zu gastrointestinalen Störungen kommen. Aciclovir ist in der Schwangerschaft kontraindiziert [19].

Handelspräparate in Österreich: [20]

- ACICLOBENE „ratiopharm“ – Fieberblasencreme
- ACICLOBENE – Pulver zur Herstellung einer Infusionslösung
- ACICLOBENE – Tabletten
- ACICLOSTAD – Fieberblasencreme
- ACICLOSTAD – Tabletten
- ACICLOVIR „1A Pharma“ – Creme
- ACICLOVIR „1A Pharma“ – Tabletten
- ACICLOVIR „Genericon“ – Creme 5%
- ACICLOVIR „Genericon“ – Filmtabletten
- ACTIVIR plus Dimethicon – Fieberblasencreme
- HERPOMED 5% - Creme
- VIROMED – Tabletten
- XOROX – Augensalbe
- ZOVIRAX – Augensalbe 3%
- ZOVIRAX – Creme 5%
- ZOVIRAX – Filmtabletten
- ZOVIRAX – Saft
- ZOVIRAX – Trockensubstanz zur Infusionsbereitung

2.4.2. Benzoessäure

Struktur:

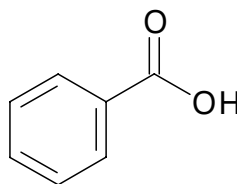


Abb. 2.4.2. Struktur von Benzoessäure

Summenformel:

$C_7H_6O_2$

Synonym:

INN: Acidum bezoicum

Relative Molekülmasse:

122,1 g/mol

Schmelzpunkt:

121-124 °C [18]

Löslichkeit:

Benzoessäure ist leicht löslich in Ethanol 90%, Ether, Chloroform und fetten Ölen, löslich in siedendem Wasser, aber jedoch nur wenig in kaltem Wasser [18].

Log P = 1,89 ± 0,21 (ACD Lab Version 10.00)

Anwendung:

Benzoessäure ist ein Antiseptikum und wird unter anderem auch als Konservierungsmittel für Lebensmittel verwendet [18].

Handelspräparate in Österreich: [20]

- SKINOREN – Creme 20%
- ACERBINE – Lösung
- ACERBINE – Salbe
- MYCOPOL – dermatologische Lösung
- OSA – Pflanzengel, Zahnungshilfe

2.4.3. Clioquinol

Struktur:

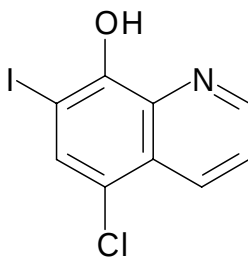


Abb. 2.4.3. Struktur von Clioquinol

Summenformel:

C₉H₅ClINO

Synonym:

INN: Chinoform, Chloriodochin, Iodochlorhydroxyquin; 5-Chlor-7-iod-8-chinolinol

Relative Molekülmasse:

305,52 g/mol

Schmelzpunkt:

172 °C [18]

Löslichkeit:

Clioquinol ist löslich im Verhältnis 1:43 in kochendem Ethanol, 1:28 in Chloroform, 1:170 in kalter Essigsäure, 1:13 in kochender Essigsäure und nahezu unlöslich in Wasser, kaltem Ethanol und Ether [18].

Log P = $3,73 \pm 0,83$ (ACD Lab Version 10.00)

Anwendung:

Das Antiseptikum Clioquinol hat antibakterielle und fungizide Wirkung und wird zur Hautdesinfektion und topisch als 3-10%ige Wundsalbe verwendet [12, 18].

Nebenwirkungen:

Bei hoher Dosierung kann es zu SMON-Krankheit führen, deswegen ist auch die Anwendung von Clioquinol bei Durchfallerkrankungen obsolet [12, 18].

Handelspräparate in Österreich: [20]

- BETNOVATE C – Creme
- BETNOVATE C – Salbe

2.4.4. Diclofenac

Struktur:

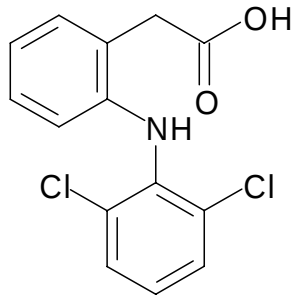
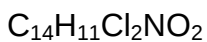


Abb. 2.4.4. Struktur von Diclofenac

Summenformel:



Synonym:

INN: 2(2, 6-Dichloranilino)phenyl-essigsäure

Relative Molekülmasse:

296,15 g/mol

Schmelzpunkt:

ca.285 °C [18]

Löslichkeit:

Diclofenac – Natrium ist nur wenig löslich in Wasser [18].

Log P = 4,06 ± 0,41 (ACD Lab Version 10.00)

Pharmakologie:

Diclofenac gehört zu der Gruppe der nicht-steroidalen Antiphlogistika, das sich leicht in entzündetem Gewebe anreichert und dort die Prostaglandinsynthese über die Blockade von COX-1 und verstärkt COX-2 stört. Durch die Hemmung der Biosynthese von Prostaglandinen wirkt Diclofenac sowohl analgetisch, antiphlogistisch, wie auch antipyretisch [12, 18, 19].

Anwendung:

Diclofenac ist ein häufig verwendetes nicht-steroidales Antiphlogistikum und Antirheumatikum. Es kann peroral, topisch und auch lokal in Form von Augentropfen angewandt werden [12, 19].

Nebenwirkungen:

Bei der Einnahme von Diclofenac kann es zu Ulcerationen und Blutungen im Gastrointestinal Trakt kommen. Ebenso kann es zu bronchospastischen, renalen und tokolytischen Effekten kommen [12, 18, 19].

Handelspräparate in Österreich: (Auszug) [20]

- AGILOMED 1% - Gel
- DEDOLOR DRS 100mg – Kapseln
- DEFLAMAT – Ampullen
- DEFLAMAT – Gel 2%
- DEFLAMAT – Kapseln
- DICLOBENE – Ampullen
- DICLOBENE – Filmtabletten
- DICLOBENE – Gel
- DICLOFENAC „Genericon“ – Ampullen
- DICLOFENAC „Genericon“ – Filmtabletten
- DICLOFENAC „Genericon“ – Gel 1%
- DICLOFENAC „Genericon“ – Zäpfchen
- DICLOFENAC „Sandoz“ – Ampullen
- DICLOFENAC „Sandoz“ – Filmtabletten
- DICLOFENAC – Natrium MIKA 4% Spray zur Anwendung auf der Haut
- DICLOSTAD – Ampullen
- DICLOSTAD – Filmtabletten
- DICLOSTAD – Gel 1%
- DICLOSTAD – Zäpfchen
- DIFENE 2% – Gel
- DOLPASSE – Infusionslösung
- FLECTOR EP – Pflaster
- VOLTADOL – Schmerzgel
- VOLTAREN – Emulgel-Gel
- VOLTAREN – Filmtabletten

- VOLTAREN – Zäpfchen
- VOLTAREN – Ophta – Augentropfen
- ARTHROTEC – Manteltabletten
- DICLOVIT – Kapseln
- DOLONEUROBION - Kapseln

2.4.5. Ketoprofen

Struktur:

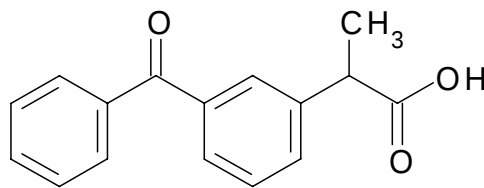
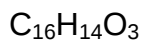


Abb. 2.4.5. Struktur von Ketoprofen

Summenformel:



Synonym:

INN: Ketoprofenum, 3-Benzoylhydratropasäure; 2-(3-Benzoylphenyl)propionsäure

Relative Molekülmasse:

254,29 g/mol

Schmelzpunkt:

94 °C [18]

Löslichkeit:

Ketoprofen ist leicht löslich in Aceton, Dichlormethan und Ethanol und fast unlöslich in Wasser [18].

Log P = 2,81 ± 0,33 (ACD Lab Version 10.00)

Pharmakologie:

Ketoprofen gehört ebenso wie Diclofenac zu den nicht-steroidalen Antirheumatika, es hemmt über COX-1 und COX-2 die Prostaglandinbiosynthese und wirkt dadurch sowohl antiphlogistisch als auch analgetisch [12, 18,].

Anwendung:

Ketoprofen wird als Antirheumatikum und Analgetikum eingesetzt und kann sowohl peroral als auch topisch appliziert werden [12, 18].

Nebenwirkungen:

Durch die Anwendung von Ketoprofen kann es zu Beschwerden im Gastrointestinal-Trakt kommen [12, 18].

Handelspräparate in Österreich: [20]

- FASTUM – Gel
- KETOSPRAY 10%
- PROFENID – Ampullen
- PROFENID – Gel 2,5%
- PROFENID – Kapseln
- PROFENID – Suppositorien
- PRONTOKET 5% – Spray

2.4.6. Metronidazol

Struktur:

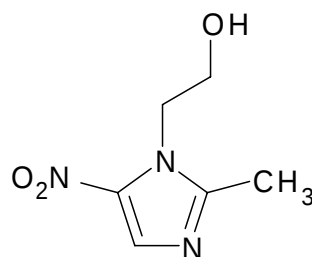


Abb. 2.4.6. Struktur von Metronidazol

Summenformel:

$C_6H_9N_3O_3$

Synonym:

INN: Metronidazolum, 2-(2-Methyl-5-nitro-1-imidazolyl)ethanol

Relative Molekülmasse:

171,2 g/mol

Schmelzpunkt:

159-163 °C [18]

Löslichkeit:

1 g Metronidazol löst sich in 100 ml Wasser, 0,5 g in 100 ml Ethanol und ist löslich in organischen Säuren [18].

Log P = $-0,01 \pm 0,30$ (ACD Lab Version 10.00)

Pharmakologie:

Das Chemotherapeutikum Metronidazol ist wirksam gegen anaerobe Bakterien z.B. gegen *Helicobacter pylori* und Protozoen wie z.B. *Trichomonas vaginalis* und *Entamoeba histolytica* [12, 18, 19].

Anwendung:

Metronidazol wird als Chemotherapeutikum oral zur Behandlung von *Helicobacter pylori* – Infektionen eingesetzt und auch bei Amöbenruhr. Die vaginale Applikation ist bei *Trichomonas vaginalis* – Infektionen indiziert [12, 18, 19].

Nebenwirkungen:

Durch die Anwendung von Metronidazol können Übelkeit, Kopfschmerzen und Schwindel auftreten [12, 18, 19].

Handelspräparate in Österreich: [20]

- ANAEROBEX – Filmtabletten
- ANAEROBEX – Suppositorien
- ARILINE – Vaginalzäpfchen
- METRONIDAZOL „Arcana“ – Kapseln
- METRONIDAZOL „Arcana“ – Filmtabletten
- METRONIDAZOL „Sandoz“ – Filmtabletten
- NIDAZEA – Gel
- ROZEK – Gel
- ROZEK – Lotion
- TRICHEX – Tabletten
- TRICHEX – Vaginalkapseln

2.4.7. Salicylsäure

Struktur:

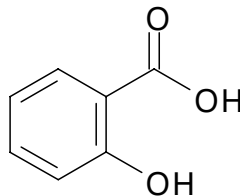


Abb. 2.4.7. Struktur von Salicylsäure

Summenformel:

$C_7H_6O_3$

Synonym:

INN: Acidum salicylicum, 2-Hydroxybenzoesäure

Relative Molekülmasse:

138,1 g/mol

Schmelzpunkt:

158-161 °C [18]

Löslichkeit:

Circa 2,2 g Salicylsäure sind in 1000 g Wasser löslich, aber es ist leicht löslich in Ethanol und Ether [18].

Log P = $2,06 \pm 0,25$ (ACD Lab Version 10.00)

Pharmakologie:

Salicylsäure wirkt unter anderem keratolytisch, bakteriostatisch und auch fungizid [12, 18].

Anwendung:

Salicylsäure wird häufig äußerlich zum Ablösen von Schuppen und Erweichung von Hornmaterial, gegen Warzen und auch als Antiseptikum verwendet. Zur innerlichen Anwendung als Antirheumatikum wird es nicht mehr eingesetzt, da es heute besser verträgliche Präparate am Markt gibt [12, 19].

Nebenwirkungen:

Bei der lokalen Anwendung von Salicylsäure kann es zu Dermatiden kommen.

Handelspräparate in Österreich: [20]

- MUNDISAL – Gel
- SALHUMIN – Sitzbad
- SQUAMASOL – Gel
- ACERBINE – Lösung
- ACERBINE – Salbe
- AKNICHTOL – Lotio
- ALGESAL – Creme
- ALPICORT – Haartinktur
- DERIVON – Creme
- DIPROSALIC – dermatologische Lösung
- DIPROSALIC – Salbe
- DOLOMETHONEURIN – Gel
- DOLOREX – Spray
- HUMAL – Bad
- LATESYL – Creme
- MOBILAT – Gel
- MOBILAT – Salbe

- MOBILISIN – Salbe
- PASTA Cool
- PILISON – dermatologische Lösung
- PYRALVEX – Lösung
- REPARIL – Gel
- RILFIT – Rheumasalbe
- SALHUMIN – Bad

3. Experimenteller Teil

3.1. Formulierungen

3.1.1. Herstellung der Liposomen

Für die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurden als Basisliposomen DPPC (Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-phosphocholin) Liposomen (Lipoid PC 16:0/16:0 DPPC der Firma Lipoid AG, Schweiz) verwendet.

Arbeitsvorschrift:

Zur Herstellung von 20 ml Liposomen mit einem Gehalt an 5% DPPC wird 19 g frisch destilliertes Wasser durch einen Membranfilter (Porenweite 0,22 µm) keimfiltriert und auf einer beheizbaren Magnetrührplatte in einem Becherglas auf 60 °C erwärmt. Danach wird 1 g DPPC zum Wasser gegeben und bei oben genannter Temperatur zugedeckt mit dem Magnetrührer gerührt. Sobald sich eine Lösung gebildet hat wird das Becherglas von der Heizplatte genommen, das Rührstäbchen entfernt und lässt es auf 40 °C abkühlen. Als nächsten Schritt wird die Formulierung 5 Minuten lang auf Stufe 2 mit dem Ultra-Turrax homogenisiert. Um die Liposomen weiter zu zerkleinern wird die vorhandene Zubereitung im Hochdruckhomogenisator bei 1100 bar 8 Minuten lang bearbeitet. Die Farbe der Formulierung sollte sich von milchig weiß zu opaleszierend verändern. Die fertigen Liposomen werden in einem sauberen Becherglas aufgefangen, mit Parafilm verschlossen und über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Tags darauf werden die Teilchengröße, der PDI und das Zetapotential bestimmt.

Hochdruckhomogenisator:

Für die Herstellung der Liposomen wurde der Homogenisator EmulsiFlex®-C3 von der Firma Avestin verwendet. Das Gerät hat ein Mindestprobenvolumen von 10 ml und kann einen Druck von 35 bis 2000 bar aufbauen. Dieser Hochdruckhomogenisator kann zur

Herstellung von Dispersionen, Emulsionen, Suspensionen und Liposomen eingesetzt werden [21].

Durch Scherkräfte und Druck werden die Liposomen im Hochdruck-Homogenisator zerkleinert und auf eine einheitliche Größe gebracht. Sowohl der Druck als auch die Verwendung eines Extruders kann die Größe der Vesikel beeinflussen [2, 15].



Abb. 3.1.1. EmulsiFlex®-C3 [21]

3.1.1.1. Untersuchung auf Reinheit mit NMR

Zur Überprüfung der Reinheit der hergestellten Liposomen wurde ein Bruker Avance DRX 600 NMR Spektrometer (Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Germany) mit einer Frequenz von 600.13 MHz für ^1H mit einem 5 mm Quadrupel Probenkopf (^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P) mit z-Achsen Gradientenspulen verwendet. Dazu wurden die zu untersuchenden Proben mit 10% D_2O hergestellt und vermessen.

3.1.2. Einarbeitung der Wirkstoffe

Es wurden Formulierungen mit einem Gehalt an 2,5% DPPC und 1% Wirkstoff hergestellt. Für 4 g einer Zubereitung wurde zunächst 0,04 g Wirkstoff mit frisch destilliertem, keimfiltriertem Wasser auf 2 g aufgefüllt. Zu dieser Lösung wurden 2 g Basisliposomen (5%) beigemischt. Die erhaltene Präparation wurde mit einem beheizbaren Magnetrührer über Nacht gerührt. Unmittelbar danach wurde die Teilchengröße, der PDI und das Zetapotential am Zetasizer bestimmt.

3.1.3. Zugabe der Peptide

Zuerst wurde eine Stammlösung mit den Lysinderivaten zubereitet. Hierbei wurden die Peptide in frisch destilliertem, keimfiltrierten Wasser gelöst und zur Lagerung bei -24 °C aufbewahrt. Vor Verwendung wurde dann die Stammlösung auf Raumtemperatur gebracht und danach den aciclovirhaltigen Liposomen in zwei verschiedenen Konzentrationen (10 Mol%, 20 Mol%) hinzugefügt. Dazu wurden die Formulierungen mit 1% Aciclovir in einem Wägegglas vorgelegt, die entsprechende Menge an Oligo-Lysinen bzw. Polypeptiden dazugegeben und über Nacht mit dem Magnetrührer gerührt.

3.2. Physikalische Charakterisierung

In einer vorangegangenen Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Basisliposomen über einen Zeitraum von 6 Wochen stabil bleiben [9]. Bei weiteren Untersuchungen wurden Formulierungen mit Fluconazol und Lysinderivaten auf ihre physikalische Stabilität überprüft, und es konnte festgestellt werden, dass die Zusätze einen Einfluss auf die Lagerstabilität hatten [10]. Nach dieser Vorlage wurde auch die physikalische Stabilität der Formulierungen mit Aciclovir überprüft.

Um relevante und aussagekräftige Ergebnisse zu bekommen wurden von jeder Formulierung drei Chargen hergestellt. Bei diesen wurden dann jeweils die Teilchengröße, der PDI und das Zetapotential bestimmt und dann daraus der Mittelwert berechnet. Die Zubereitungen wurden im Kühlschrank gelagert und vor dem Messen auf Raumtemperatur gebracht. Nach längerer Lagerung fiel ein kleiner Teil an Aciclovir aus. Bevor mit den Proben gearbeitet werden konnte, wurden sie eine Stunde lang mit einem Magnetrührer bei Raumtemperatur gerührt. Dadurch lagerte sich der präzipitierte Teil wieder an die Liposomen an. Danach wurden die Proben 1:100 mit destilliertem Wasser verdünnt und die Teilchengröße, PDI und das Zetapotential bestimmt.

Zetasizer:

Für die physikalische Charakterisierung wurde das Gerät ZetaSizer Nano ZS, von der Firma Malvern Instruments, UK verwendet. Dieses Gerät misst mithilfe der Photonenkorrelationsspektroskopie unter anderem die Partikelgröße, das Zetapotential und den PDI. Mittels oben genannter Parameter kann man Aussagen über die physikalische Stabilität treffen [22].

3.2.1. Teilchengröße:

Die Teilchengrößenverteilung wird über den Polydispersitätsindex (PDI) bestimmt. Liegen die Werte unter 0,2 hat man eine Dispersion mit relativ gleich großen Partikeln vorliegen. Ist der PDI größer als 0,5, hat man eine sehr große Verteilung. Das bedeutet, dass unterschiedlich große Teilchen in der untersuchten Probe vorhanden sind. Dieser Umstand beeinflusst die Aussagekraft der Ergebnisse im erheblichen Maße [23].

Durchführung:

Nach dem Verdünnen wurden 1 ml der Formulierungen in eine Einmalküvette gefüllt und mit dem Zetasizer die Teilchengröße und der PDI bestimmt. Anschließend wurden die ersten Messungen und die Diffusionsversuche durchgeführt. In weiterer Abfolge wurde jeden zweiten Tag über drei Wochen hindurch in oben genannter Art und Weise gemessen. Wenn die Teilchengröße stark anstieg oder der PDI den Wert 0,5 überschritt wurden diese Formulierungen nicht weiter vermessen.

3.2.2. Zetapotential:

Eine entscheidende Größe für die elektrostatische Stabilisierung disperser Systeme ist das Zetapotential [2]. Es ist das Potential eines diffundierten Teilchens und gibt Auskunft über die Abstoßung und Anziehung von Teilchen in dispersen Systemen [22, 24]. Durch die Höhe des Zetapotentials kann man auf die Oberflächenladungsdichte und die elektrostatische Abstoßung rückschließen. Ein niedriges Zetapotential, unabhängig von

dem Vorzeichen bedeutet eine Abnahme der Stabilität des dispersen Systems und umgekehrt [1].

Um das Zetapotential bestimmen zu können, wird die Partikelgeschwindigkeit der Probe gemessen und mithilfe mathematischer Gleichungen dann das Potential errechnet [24].

Durchführung:

Das Zetapotential wurde an den gleichen Tagen wie die Teilchengröße bestimmt. Dazu wurden ca. 2 ml der verdünnten Formulierung mittels einer Einmalspritze luftblasenfrei in spezielle Messzellen gefüllt und dann vermessen.

3.3. In-Vitro Hautpermeation

3.3.1. Aufbau der Franz-Zellen

Das gebräuchlichste Modell zur Bestimmung der Permeation von Wirkstoffen durch die Haut ist die Franz-Diffusionszelle. Die Zelle besteht aus einer doppelwandigen Glaskammer in die das Akzeptormedium gefüllt wird. Während des gesamten Versuches wird das Akzeptormedium mittels Magnetrührer gerührt. In die Zelle wird ein 1 cm² großes Stück Schweinehaut eingespannt, sodass die dermale Seite dem Akzeptormedium zugewandt ist. Die Haut wird dann mit einem Glasring und einer Metallklammer fixiert. Das Donormedium wird in den Glasring direkt auf die Haut appliziert und dann wird das System mit einem Deckglas verschlossen, um relativ konstante Hydratationsbedingungen zu erhalten [11].



Abb. 3.3.1. Aufbau der Franz-Diffusionszelle [11]

Die so zusammengebauten Zellen werden in ein Wasserbad, das konstant auf 32°C thermostabilisiert wird, auf eine Magnetührplatte gestellt. Aus dem Akzeptormedium werden in regelmäßigen Abständen die Proben gezogen und die entnommene Mediummenge wird durch frisches Medium ersetzt [25].

3.3.2. Praktische Durchführung

Für den Versuch wurden drei Chargen hergestellt. Die erste Charge bestand aus aciclovirhaltigen Liposomen, die als Referenzwert diente und die zwei weiteren Chargen enthielten Formulierungen mit Lysinzusätzen in 10 bzw. 20 Mol%iger Konzentration. Mit diesen wurden vier Parallelversuche angesetzt und am Ende mit dem Referenzwert verglichen.

Phosphatpuffer:

Als Akzeptormedium wurde ein Phosphatpuffer mit einem pH von 7,4 verwendet. Zur Herstellung des Puffers wurden 1,7 g Kaliumdihydrogenphosphat und 1,78 g Dinatriumhydrogenphosphat eingewogen und in destilliertem Wasser gelöst. Die Lösung wurde in einen 1000 ml Messkolben gefüllt und mit destilliertem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt. Danach wurde der pH mit Natronlauge bzw. mit einer verdünnten Phosphorsäure auf genau 7,4 eingestellt.

Präparation der Schweinehaut:

Für die Diffusionsversuche wurde porcine Haut mit einer Dicke von 1,1 mm verwendet. Zur Lagerung wurde die Haut gefroren. Vor Verwendung wurde die Haut aufgetaut und mit einem Skalpell in circa 1 cm² große Stücke geschnitten. Es war darauf zu achten, dass die Stücke eine gleichmäßige Dicke hatten.

Vorbereitung der Franz-Zellen:

Die Schweinehaut wird in die Zelle gespannt und mit der Metallklammer fixiert. Danach wird der untere Teil der Zelle mit 2 ml Phosphatpuffer befüllt und ein Magnetrührstäbchen hineingegeben. Es ist darauf zu achten, dass die Zelle dicht ist und kein Akzeptormedium austritt. Auf die Haut werden 0,5 ml der Formulierung aufgetragen und der obere Glasring mit einem Deckglas verschlossen.



Abb. 3.3.2. Zusammengesetzte Franz-Zelle im Wasserbad

Durchführung:

Der Versuch dauerte 10 Stunden, wobei alle zwei Stunden Proben gezogen wurden. Dabei wurde das komplette Akzeptormedium (2 ml) mit Hilfe einer Pasteurpipette aus der Franz-Zelle entnommen und durch neues Medium, das vorher auf 32°C erwärmt wurde, ersetzt.

Die entnommenen Proben wurden im Kühlschrank aufbewahrt und am nächsten Tag mittels HPLC der Gehalt an Aciclovir im Akzeptormedium bestimmt.

Auswertung:

Aus jeder Charge wurde von drei Zellen die Menge an Aciclovir ermittelt, die durch die Haut diffundiert ist. Daraus wurde der Mittelwert errechnet und sowohl in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ als auch in Prozent angegeben. Um die Chargen besser miteinander vergleichen zu können, wurden die Ergebnisse in einem Diagramm zusammengefasst, wobei die kumulativ diffundierte Menge des Arzneistoffes gegen die Zeit dargestellt wurde.

3.4. Analytik von Aciclovir

3.4.1. Gehaltsbestimmung aciclovirhaltiger Proben mittels HPLC

Analysiert wurden die Proben die beim Diffusionsversuch gezogen wurden. Dazu mussten sie vor der Analyse bei 12000 rpm 6 Minuten lang zentrifugiert werden, um etwaige Proteine, die sich von der porcinen Haut gelöst haben könnten, zu entfernen. Circa 1,5 ml vom Überstand wurde dann in HPLC-Vials gefüllt und jeweils 20 μl mittels Autosampler eingespritzt.

Nach der Analyse der Proben wurde der Gehalt mit Hilfe der Eichgerade und den ermittelten Peakflächen berechnet.

3.4.2. Methode

Mobile Phase:

Als mobile Phase wurde eine Mischung von 10% Methanol in Wasser verwendet.

Flussrate: 1ml pro Minute

Temperatur des Säulenofens: 40°C

Injektionsvolumen des Autosamplers: 20 μl

Wellenlänge der Detektion: 252 nm

Laufzeit: 10 Minuten

Retentionszeit: 4-5 Minuten

3.4.3. Parameter

Grundgerät: Perkin-Elmer 200 mit Säulenofen und Vierkanalpumpe

Autosampler: Perkin-Elmer ISS-200

Detektor: Perkin-Elmer Dioden Array

Säule: Nucleosil 100 C 18; 250 x 4 mm; 5 µm

Vorsäule: Nucleosil 100-5 C 18; 40 x 4 mm

Analysensoftware: Tatolchrom, Version 6.2.0.

3.4.4. Eichgerade

Zur Bestimmung der Eichgerade wurde zuerst eine Stammlösung mit 1 g Aciclovir in 1 ml Wasser hergestellt. Diese Lösung wurde dann im Verhältnis 1:2 verdünnt. Aus diesen Verdünnungen wurden dann jeweils circa 2 ml in Vials gefüllt und mittels HPLC der Gehalt bestimmt.

Verdünnungen	µg/ml	Peakfläche
Stammlösung	1000	nicht auswertbar
1:2	500	nicht auswertbar
1:4	250	16551548,45
1:8	125	8671968,85
1:16	62,5	4347553,04
1:32	31,25	2207954,85
1:64	15,625	1104794,97
1:128	7,8125	557905,00
1:256	3,90625	270271,14

Tab. 3.4.4.1. Verdünnungsreihe von Aciclovir zur Bestimmung der Eichgerade mittels HPLC

Geradengleichung: $y = 66485x + 91170$

Bestimmtheitsmaß: $R^2 = 0,9994$

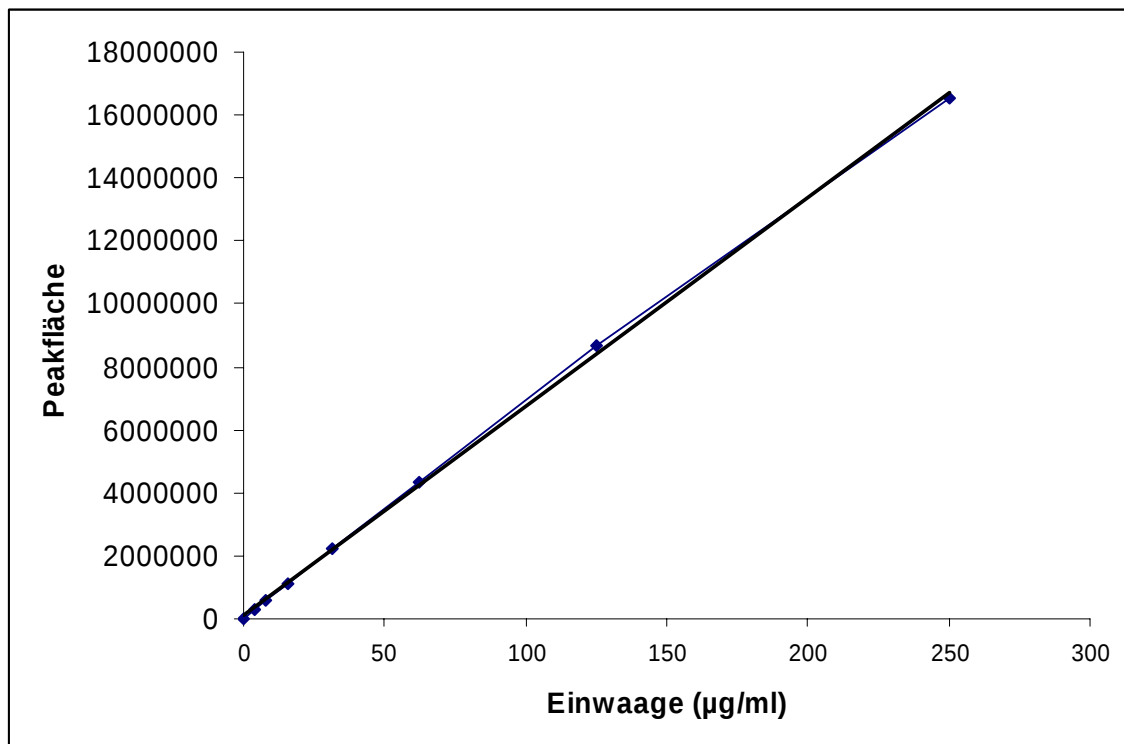


Abb. 3.4.1. Eichgerade von Aciclovir

Wie in der Abb. 3.4.1. ersichtlich, ist ein exzellenter linearer Zusammenhang mit einem Korrelationskoeffizient von 0,9994 gegeben.

4. Ergebnisse

4.1. Voruntersuchungen:

4.1.1. Waschvorgänge am Homogenisator

Mittels NMR wurde untersucht, ob die Waschvorgänge am Homogenisator ausreichend sind. Dazu wurde das Gerät mit der üblichen Prozedur, nämlich drei Durchgängen, indem je einmal Ethanol 70% und dann weitere zweimal mit destilliertem Wasser gereinigt. Zwischen den Durchgängen und am Ende wurde mit Druckluft der Homogenisator getrocknet. Danach wurde dann nur Wasser durch das Gerät gepumpt, das dann mittels NMR untersucht wurde. Das Ergebnis war, dass eine relevante Menge an Waschethanol (Ethanol 70%) nachweisbar war. Wie in Abb. 4.1.1. ersichtlich enthielt das untersuchte Wasser Ethanol.

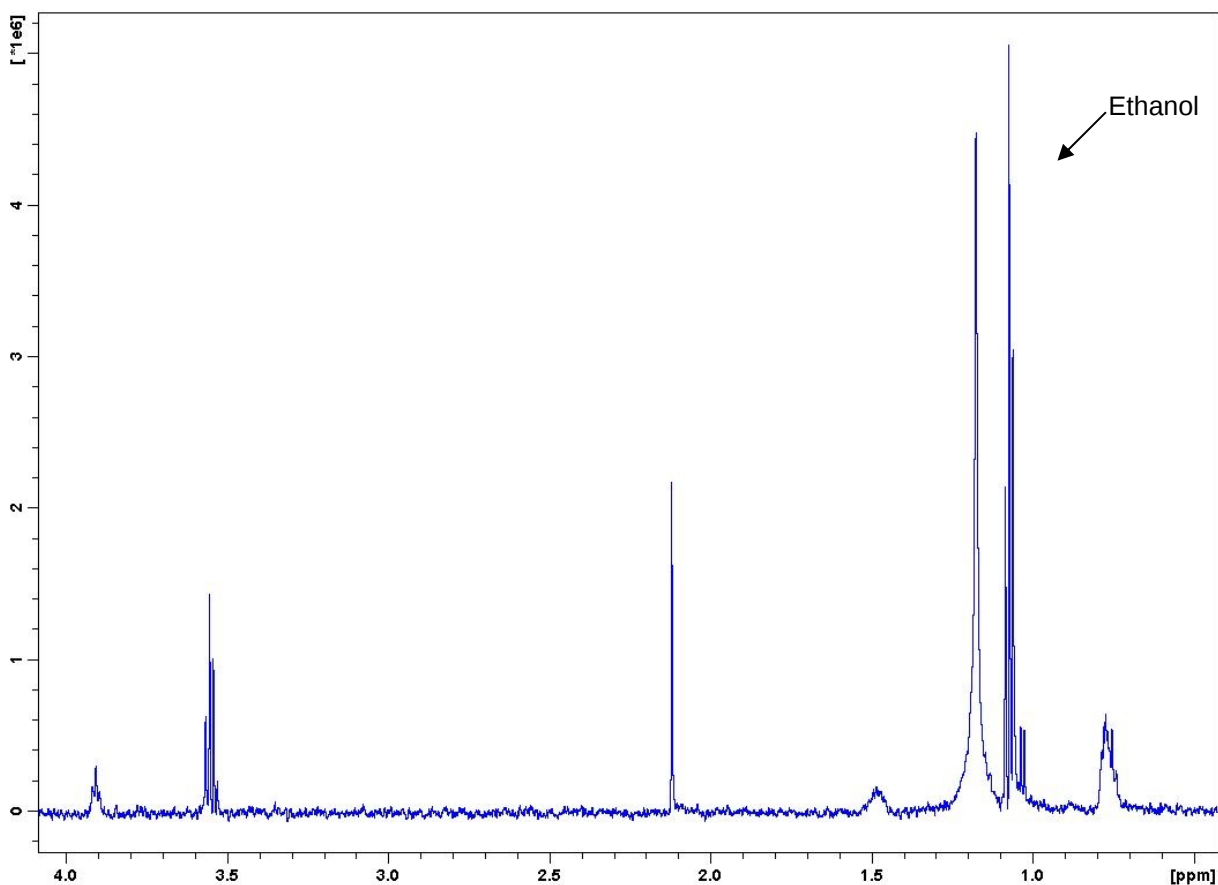


Abb. 4.1.1. NMR-Spektrum des Waschwassers mit hohem Gehalt an Ethanol

Dadurch dass Ethanol 70% im Homogenisator zurückblieb, wurden die Liposomen damit verunreinigt. (Abb. 4.1.2.)

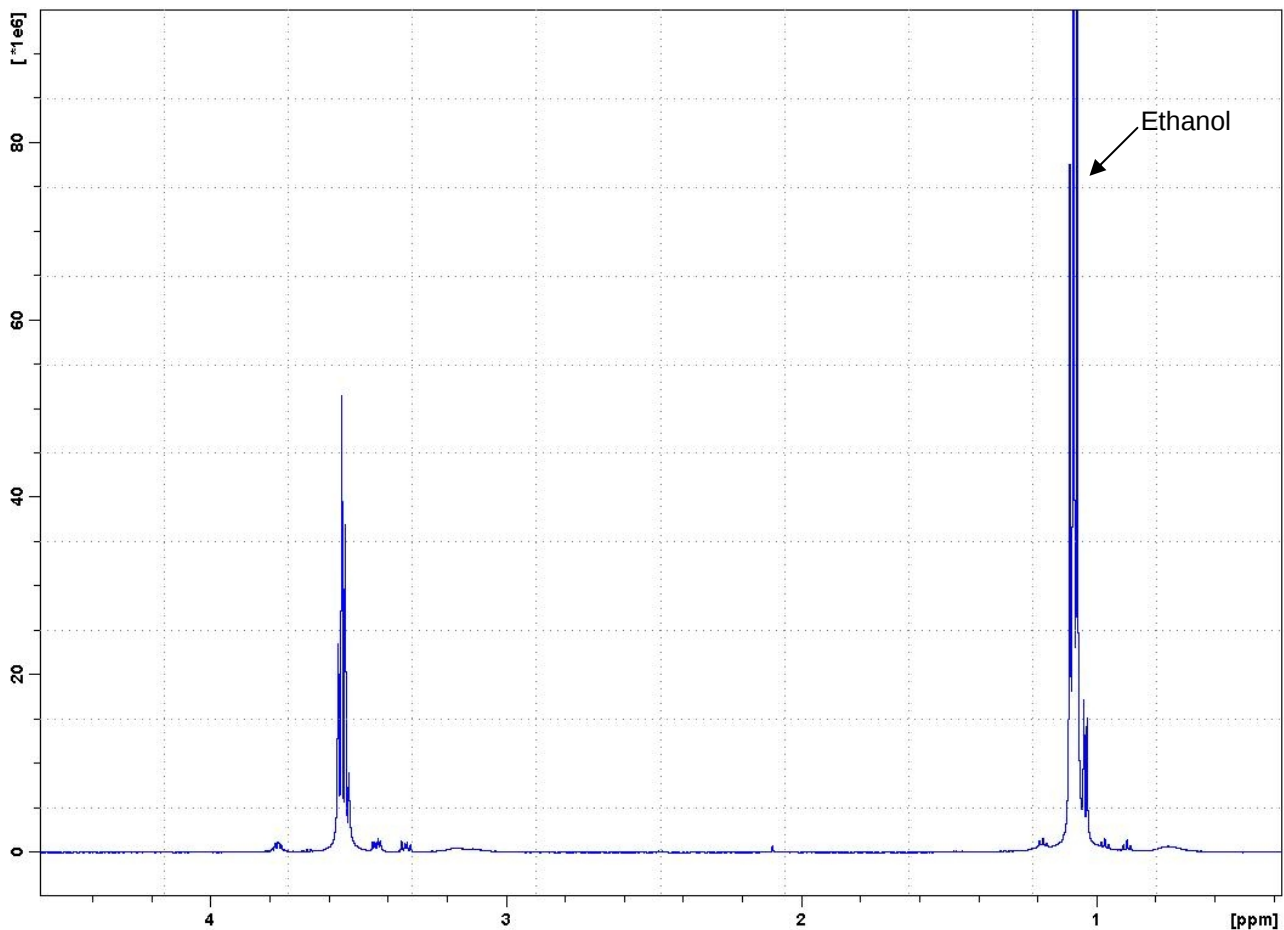


Abb. 4.1.2. NMR-Spektrum von Basisliposomen verschmutzt mit Ethanol

Nach mehreren unterschiedlichen Waschprozeduren hatte sich ergeben, dass der Ethanolgehalt auf ein Minimum reduziert werden konnte, wenn man direkt bevor man mit dem Homogenisator arbeitet, viermal mit heißem, destilliertem Wasser spült und dann für fünf Minuten Druckluft anlegt. Erst dann wurde die Probe homogenisiert. Zur weiteren Reinigung wurde dann zweimal mit Ethanol 70% und einmal mit heißem, destilliertem Wasser gespült. Danach wurde fünf Minuten lang mit Druckluft das Gerät getrocknet. Am Ende wurde nur noch mit destilliertem Wasser gespült und zwischendurch kurz Luft angelegt.

Aus der Abb. 4.1.3. kann man erkennen, dass nach dem Reinigen nach dem neuen Waschprotokoll nur noch eine geringe Menge an Waschethanol im Endprodukt enthalten war.

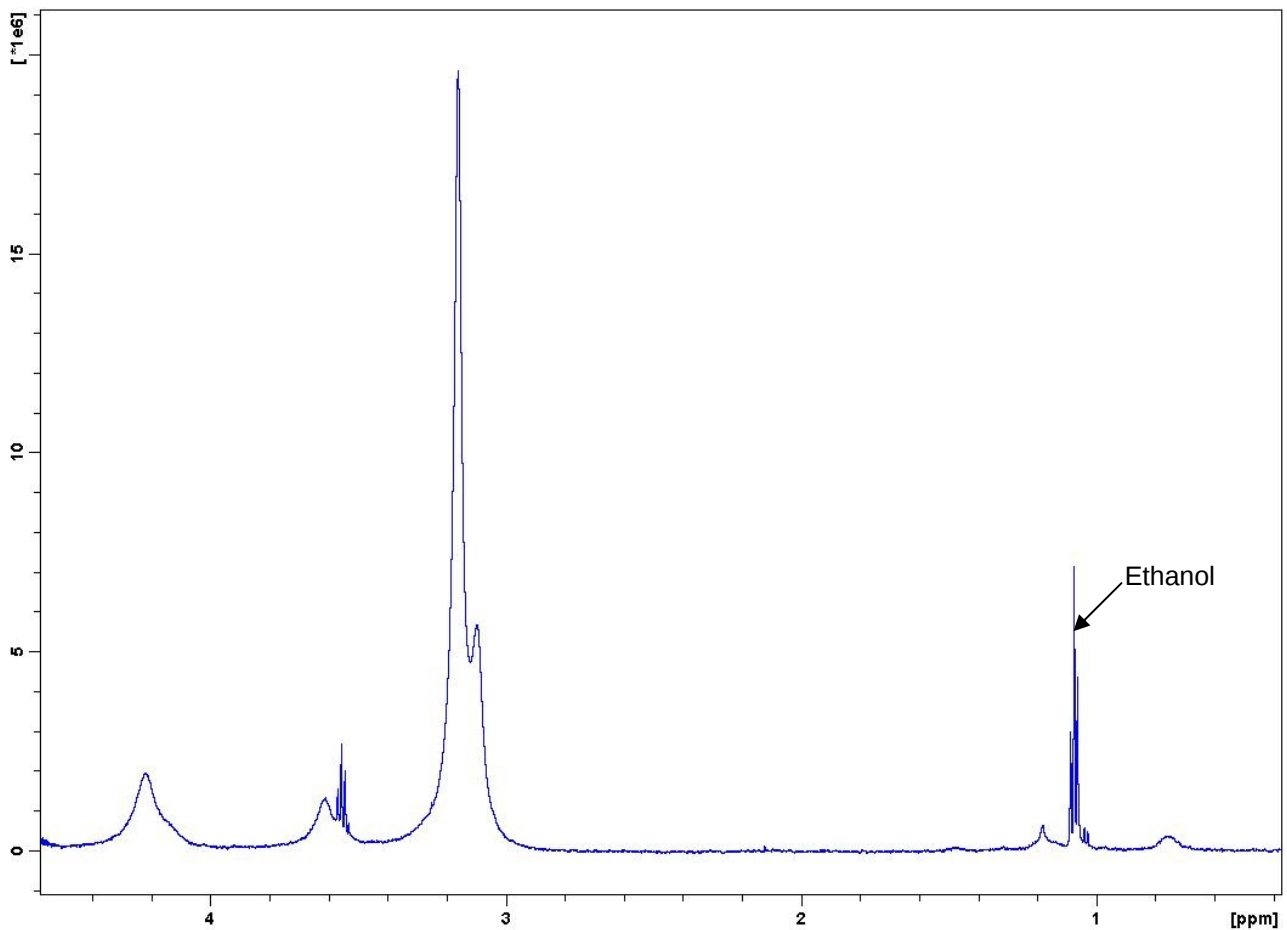


Abb. 4.1.3. NMR-Spektrum von Basisliposomen nach Reinigen des Homogenisators mit neuem Waschvorgang

In der Abb. 4.1.4. wurden die Spektren der verunreinigten Basisliposomen mit dem der saubereren Liposomen direkt miteinander verglichen. Dabei kann man erkennen, dass der Ethanolgehalt auf ein Minimum reduziert werden konnte.

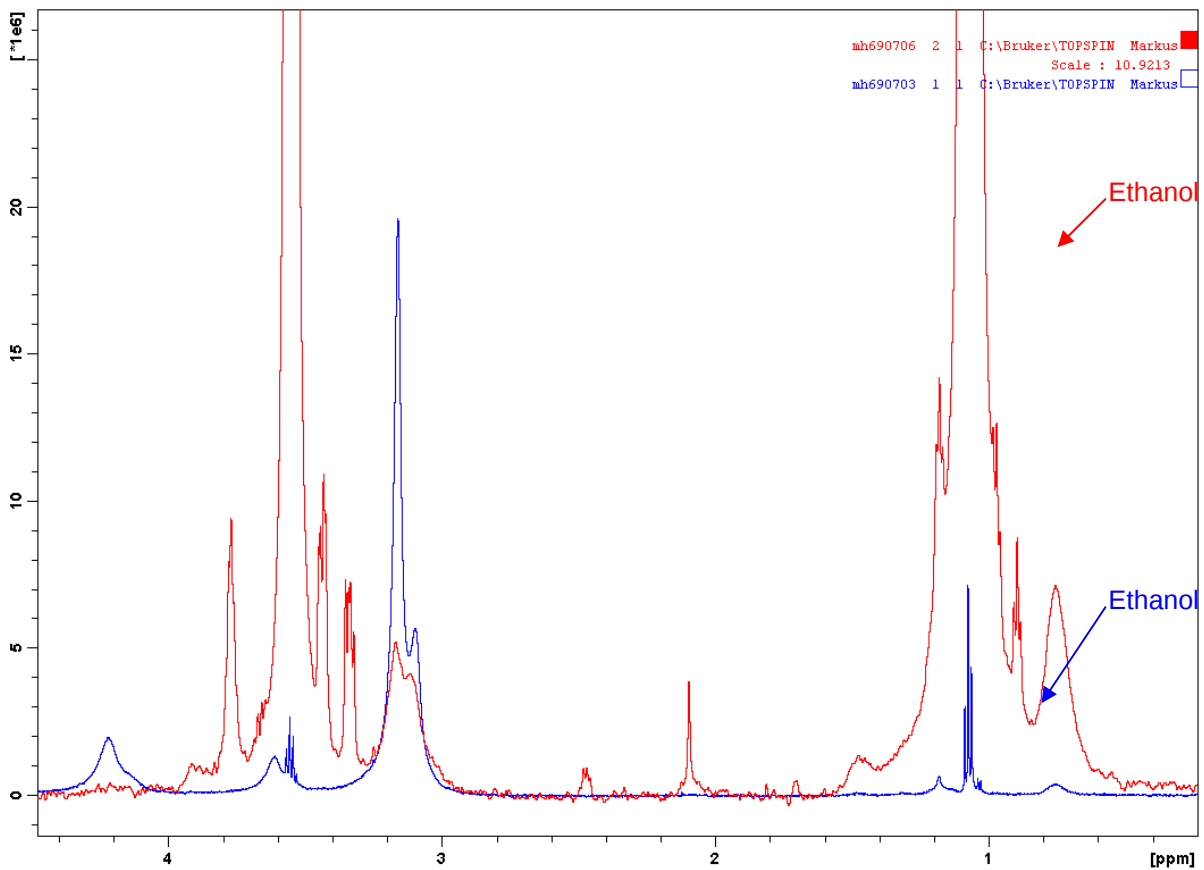


Abb. 4.1.4. NMR-Spektrum von Basisliposomen mit hohem Gehalt (rot) und mit niedrigem (blau) Gehalt an Ethanol.

4.1.2. Auswahl des Wirkstoffes

Um zu beurteilen welcher Arzneistoff sich am besten in Basisliposomen einarbeiten ließ und über einen Zeitraum von einer Woche stabil blieb, wurden unterschiedliche Formulierungen mit 1% Wirkstoff hergestellt (siehe Kapitel 3.1.2. Einarbeitung der Wirkstoffe) und danach visuell beurteilt.

Wirkstoff	Verkapselung	Niederschlag nach 1 Stunde	Teilchengröße (nm) Tag 1	Teilchengröße (nm) Tag 3	PDI Tag 1	PDI Tag 3
Aciclovir	+	-	87,15	108,51	0,171	0,157
Benzoessäure	+/-	+	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
Clioquinol	-	++	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
Diclofenac	+	-	81,62	82,05	0,188	0,202
Ketoprofen	+	+	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
Metronidazol	+	-	84,14	83,87	0,136	0,158
Salicylsäure	+/-	+	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.

Tabelle 4.1.1. Ergebnisse der Voruntersuchung für ausgewählte Modellwirkstoffe hinsichtlich ihrer liposomalen Verkapselung.

Es stellte sich heraus, dass Clioquinol am schlechtesten geeignet war, da es sich nicht in die Liposomen eingelagert hatte und eine Suspension entstand. Der Arzneistoff blieb als Niederschlag am Boden des Gefäßes und auch nach mehrstündigem Rühren zeigten sich keine Veränderungen. Daher wurde mit diesem Arzneistoff nicht weiter gearbeitet.

Benzoessäure, Ketoprofen und Salicylsäure ließen sich ebenfalls nicht verkapseln, da sich nach circa einer Stunde ein Niederschlag bildete. Daher wurden Formulierungen mit diesen Wirkstoffen nicht weiter vermessen.

Aciclovir, Metronidazol und Diclofenac hingegen ließen sich am besten verkapseln und blieben auch über einen längeren Zeitraum stabil. Nach einem Tag bildete sich zwar ein

Niederschlag, der sich aber nach einer Stunde rühren wieder in die Liposomen einarbeiten ließ. Aus diesen Formulierungen wurden am Tag der Herstellung und nach drei Tagen die Teilchengröße und der PDI gemessen. Somit konnte nunmehr die physikalische Stabilität bestimmt werden.

Der PDI der aciclovirhaltigen Liposomen sank geringfügig von 0,17 auf 0,15 und die Teilchengröße stieg von etwa 87 nm auf circa 109 nm.

Bei der Formulierung mit Metronidazol veränderte sich der PDI von 0,14 auf 0,16. Die durchschnittliche Teilchengröße betrug 84 nm.

Die Liposomen mit Diclofenac hatten am Herstellungstag einen PDI von 0,19 und am dritten Tag einen von 0,2. Die Teilchengröße dieser Formulierung veränderte sich kaum und blieb im Bereich von 82 nm.

Es zeigte sich, dass die Wirkstoffe Aciclovir, Diclofenac und Metronidazol sich für weitere Untersuchungen eignen. Da mit Aciclovir in vorangegangenen Arbeiten bereits Tests durchgeführt wurden, wurde dieser Arzneistoff für alle weiteren Untersuchungen ausgewählt.

4.2. Physikalische Stabilität:

Zur Überprüfung der physikalischen Stabilität wurden aus 3 Chargen der jeweiligen Formulierungen die Teilchengröße, der Polydispersitätsindex (PDI) und das Zetapotential über einen Zeitraum von 21 Tagen vermessen. Daraus wurde dann der Mittelwert berechnet, damit ein Diagramm erstellt und die Parameter miteinander verglichen werden konnten. Im Falle eines Überschreitens des PDI-Wertes von über 0,5 oder sprunghaften Anstiegs der Teilchengröße wurde die entsprechende Formulierung nicht mehr weiter vermessen.

4.2.1. Liposomen mit 1% Aciclovir

In der Abbildung 4.2.1. werden Basisliposomen mit aciclovirhaltigen Liposomen miteinander verglichen. Die Teilchengröße der Basisliposomen war am 1. Tag bei ca. 89 nm und nahm bis zum 21. Tag auf 87 nm ab. Durch die Einarbeitung von 1% Aciclovir stieg die Teilchengröße auf 95 nm an. Diese Formulierung blieb aber nur knappe zwei Wochen stabil, denn am 15. Tag überschritt der PDI den Wert 0,5 und die Teilchengröße betrug bereits 120 nm.

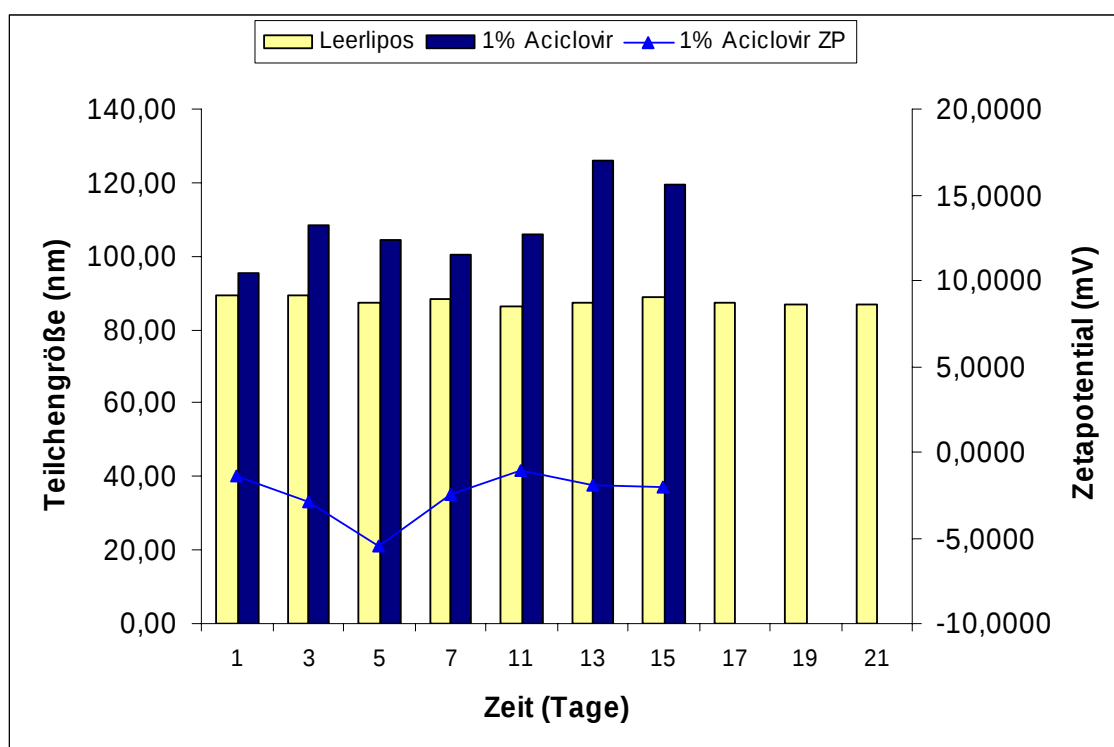


Abb. 4.2.1. Vergleich der Teilchengröße der Formulierungen mit 1% Aciclovir mit Liposomen

4.2.2. Formulierungen mit Lysin-5:

Nach Zugabe von Lysin-5 blieben die Formulierungen 3 Wochen lang stabil. Bei der Konzentration von 10 Mol% betrug die Teilchengröße 90 nm am ersten Tag und stieg bis zum 21. Tag auf 94 nm an. Über diese Zeitspanne hinweg schwankte der PDI zwischen 0,2 und 0,3, und das Zetapotential nahm von 13 mV auf 9 mV ab

In den Formulierungen mit 20 Mol% Lysin-5 nahm die Teilchengröße von 90 nm auf 95 nm zu und hatte ebenfalls einen PDI zwischen 0,2 und 0,3. Das Zetapotential war am 1. Tag bei 19 mV, und zeigte den niedrigsten Wert am 17. Tag bei 10 mV und erhöhte sich wieder auf 12 mV.

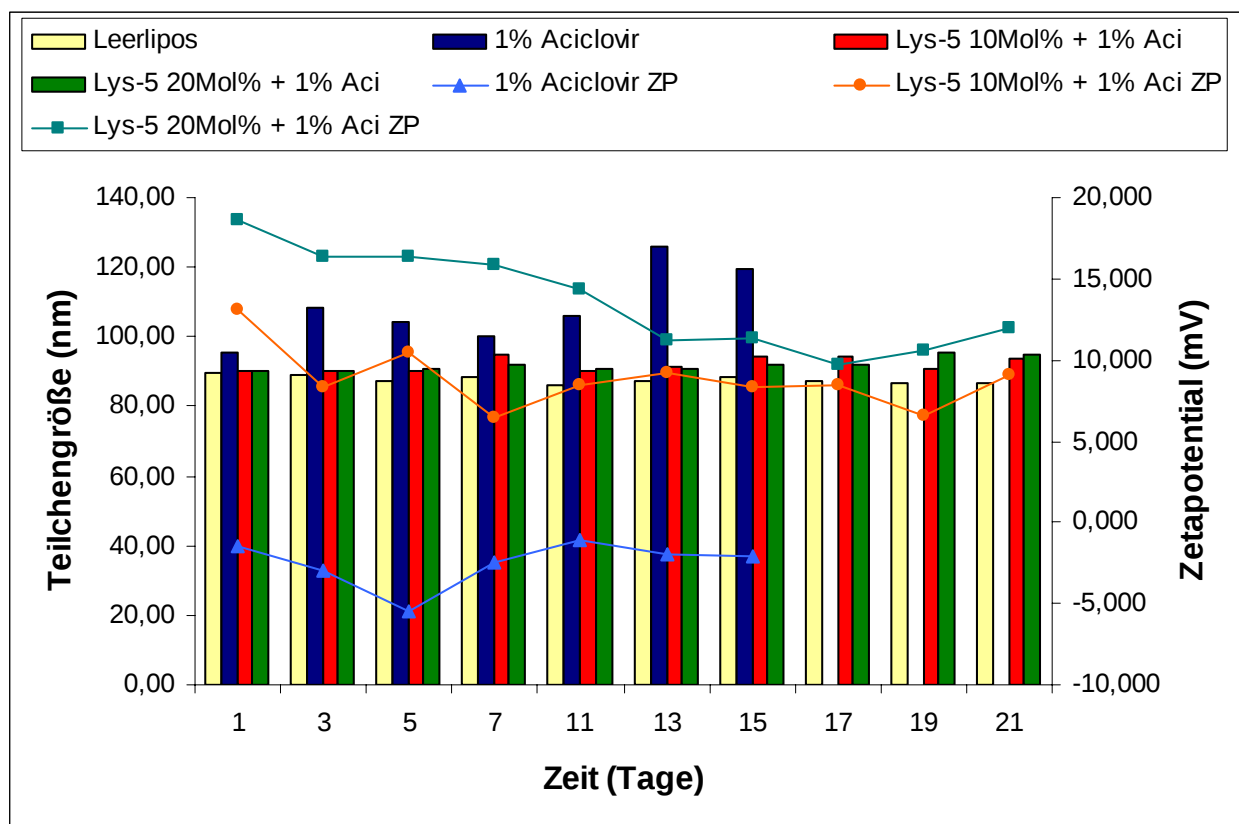


Abb. 4.2.2. Einfluss von Lys-5 auf die Teilchengröße und das Zetapotential der Formulierungen mit 1% Aciclovir

4.2.3. Formulierungen mit Lysin-7:

Nach der Einarbeitung von Lysin-7 in einer Konzentration von 10 Mol% betrug die durchschnittliche Größe 84 nm und vergrößerte sich bis zum 17. Tag zuerst auf 87 nm. Am 21. Tag waren die Teilchen 86 nm groß, wobei der PDI während dieser Zeit konstant unter 0,2 lag. Auch das Zetapotential blieb über drei Wochen relativ stabil. Die Werte lagen zwischen 20 und 22 mV.

Bei der 20 Mol%-igen Konzentration erreichten die Teilchen 85 nm bis 91 nm und auch hier blieb der PDI konstant unter 0,2. Bei diesen Formulierungen waren die Zetapotentiale nicht ganz so stabil wie bei jenen mit 10 Mol%-iger Konzentration. Hier betrug der niedrigste Wert 13 mV und der höchste 25 mV.

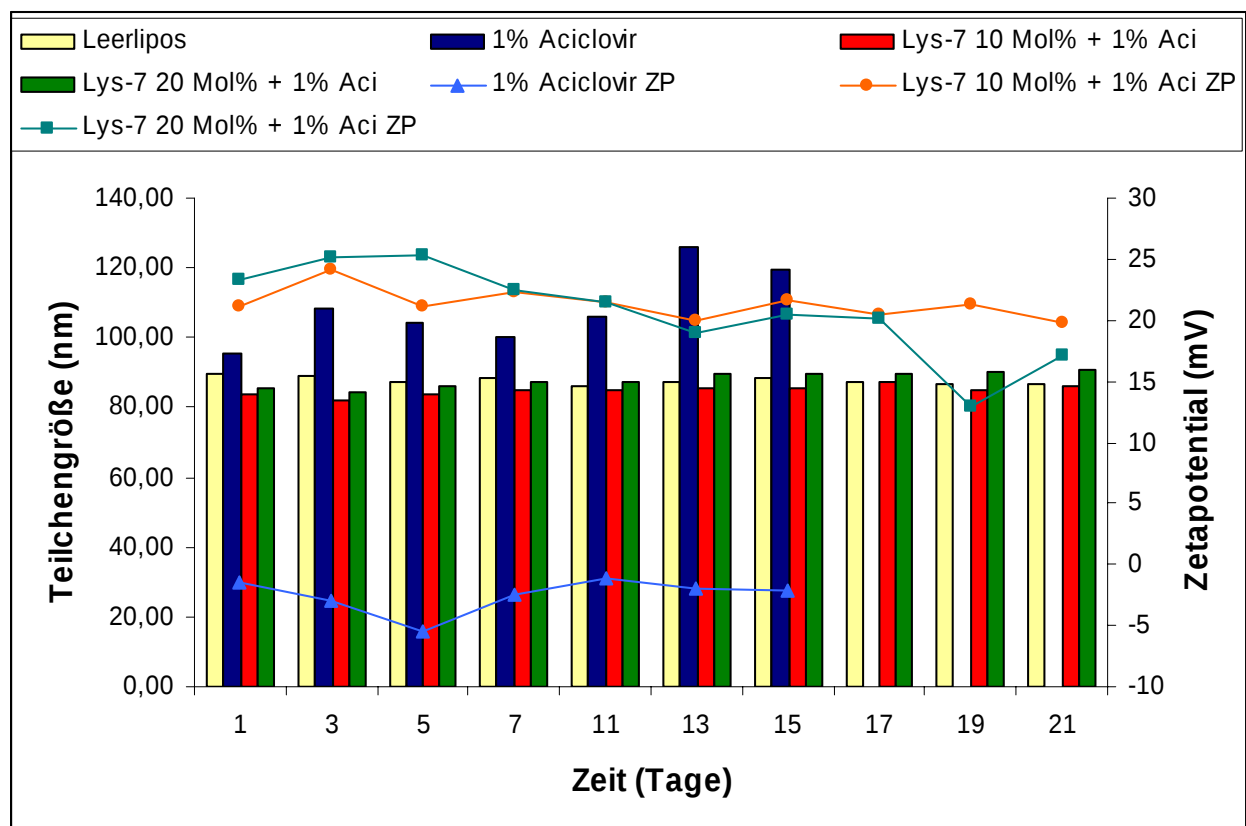


Abb. 4.2.3. Einfluss von Lysin-7 auf die Teilchengröße und das Zetapotential der Formulierungen mit 1% Aciclovir

4.2.4. Formulierungen mit Lysin-9:

Die aciclovirhältigen Liposomen mit 10 Mol% Lysin-9 hatten zu Beginn der Untersuchung eine Teilchengröße von 92 nm, die stieg auf 98 nm an und betrug am Ende 91 nm bei einem PDI von 0,2. In der ersten Woche schwankte das Zetapotential zwischen 18 und 21 mV und verringerte sich dann auf 14 mV.

Die Teilchen bei den Formulierungen mit 20 Mol% waren während der 21 Tage durchschnittlich 90 nm groß und der PDI auch konstant bei 0,16. Beim Zetapotential gab es hier Schwankungen zwischen 13 und 19 mV, wobei der höchste Wert am ersten Tag gemessen wurde und das Potential erst dann abnahm.

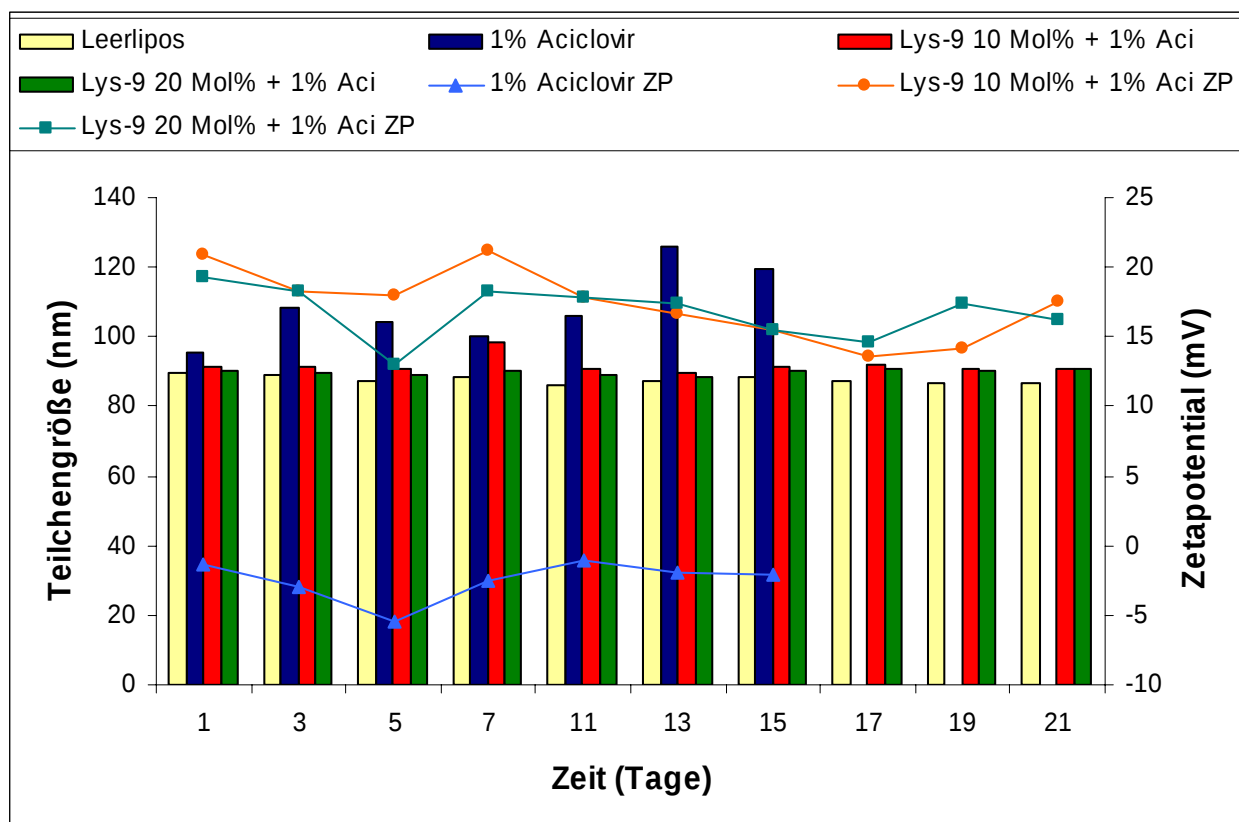


Abb. 4.2.4. Einfluss von Lysin-9 auf die Teilchengröße und das Zetapotential der Formulierungen mit 1% Aciclovir

4.2.5. Formulierungen mit Polypeptid A1:

Nach der Zugabe von Polypeptid A1 in einer Konzentration von 10 Mol% wurde eine Teilchengröße von 93 nm und ein PDI von 0,2 gemessen. Diese Werte änderten sich minimal während der drei Wochen. Hingegen blieb das Zetapotential die erste Woche stabil bei einem Wert von 13 mV. Allerdings traten in den folgenden Tagen Schwankungen zwischen 6 und 11 mV auf.

Auch bei einer 20 Mol%-igen Konzentration war der Durchmesser der Teilchen während der 21 Tage weitgehend stabil bei 99 nm, wobei der PDI von 0,2 auf 0,3 anstieg. Die Abbildung 4.2.5. lässt größere Schwankungen zwischen 17 und 23 mV erkennen, die in weiterer Folge konstant bei einem Wert um die 17 mV blieben.

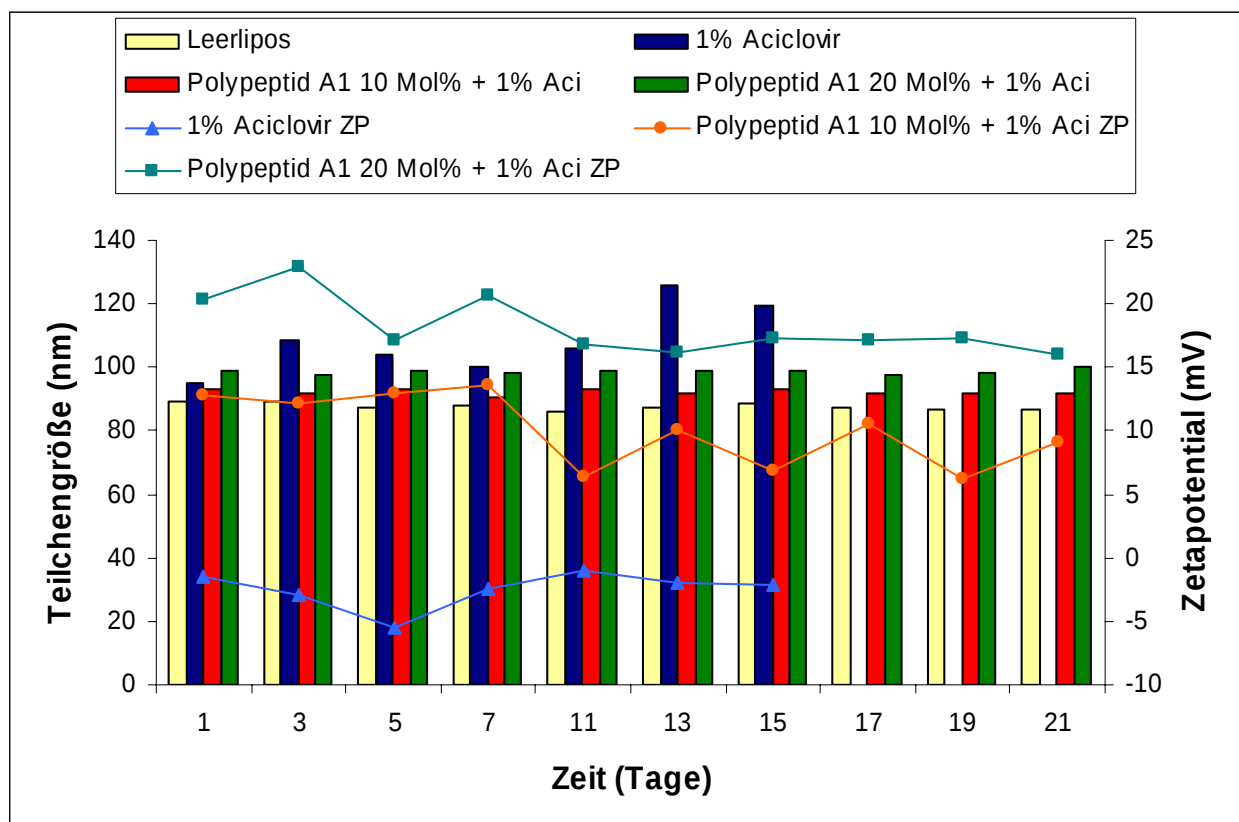


Abb. 4.2.5. Einfluss von Polypeptid A1 auf die Teilchengröße und das Zetapotential der Formulierungen mit 1% Aciclovir

4.2.6. Formulierungen mit Polypeptid A2:

Ebenso blieben die Formulierungen mit dem Polypeptid A2 über 3 Wochen stabil. Bei der Konzentration von 10 Mol% ergab die Messung am ersten Tag eine durchschnittliche Größe von 90 nm, stieg dann am 11. Tag auf 93 nm und blieb die letzte Woche konstant bei einem Wert von 89 nm. Der PDI war bis zum 11. Tag unverändert bei 0,2, die restliche Zeit schwankte der Wert zwischen 0,2 und 0,24.

Durch das Einarbeiten von 20 Mol% in die Liposomen erhielt man die größten Teilchen von allen untersuchten Formulierungen. Der Durchmesser lag im Bereich von 109 bis 113 nm, wobei der PDI bei 0,3 war. Das Zetapotential war am Anfang bei 24 mV und sank über den Zeitraum von drei Wochen auf einen Wert von 16 mV.

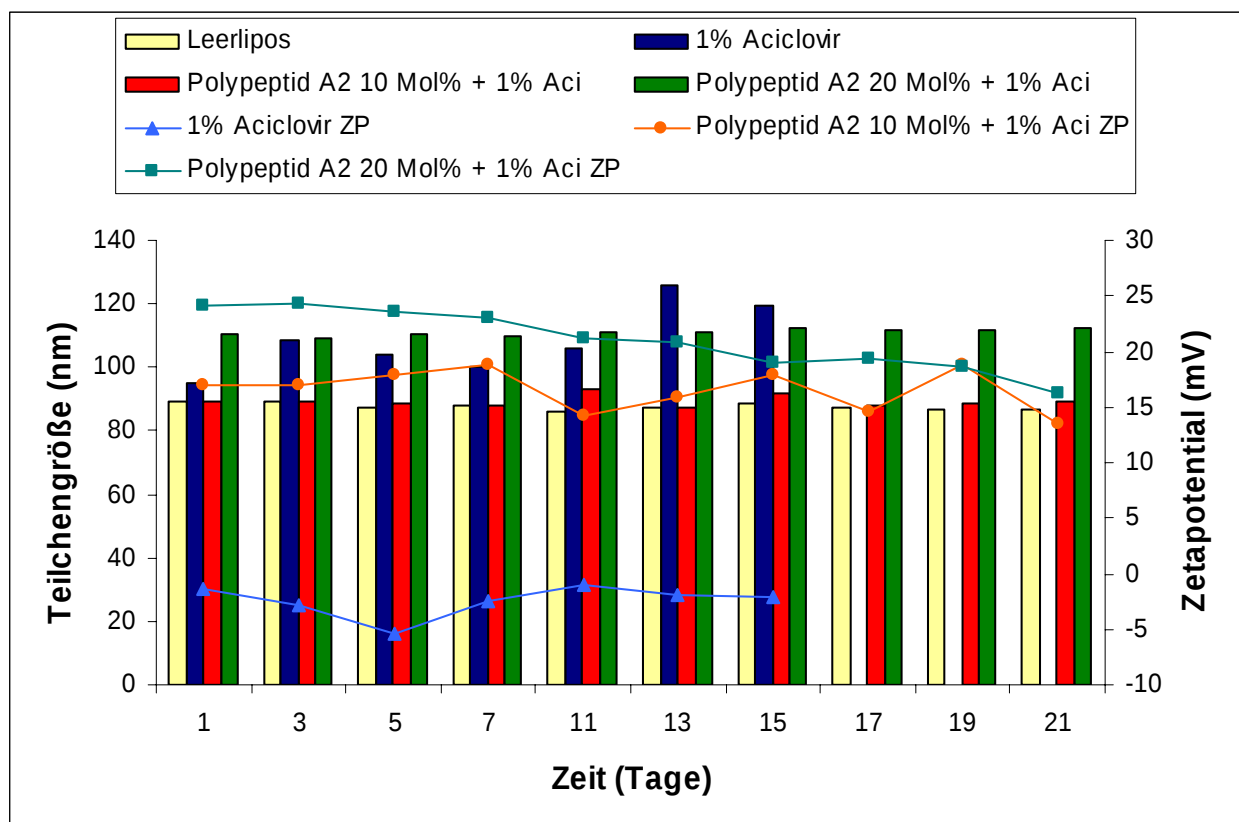


Abb. 4.2.6. Einfluss von Polypeptid A2 auf die Teilchengröße und das Zetapotential der Formulierungen mit 1% Aciclovir

4.3. Diffusionsversuche

4.3.1. Formulierungen mit 1% Aciclovir:

Als Referenzwert wurde zuerst die Hautpermeation von aciclovirhaltigen Liposomen ermittelt. Nach einer zweistündigen „lag time“ hat eine gleichmäßige Diffusion von Aciclovir durch die Haut stattgefunden. Es stellte sich heraus, dass nach 10 Stunden etwa 745 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ bzw. 15% der aufgetragenen Menge an Wirkstoff durch die Haut in das Akzeptormedium übergetreten waren.

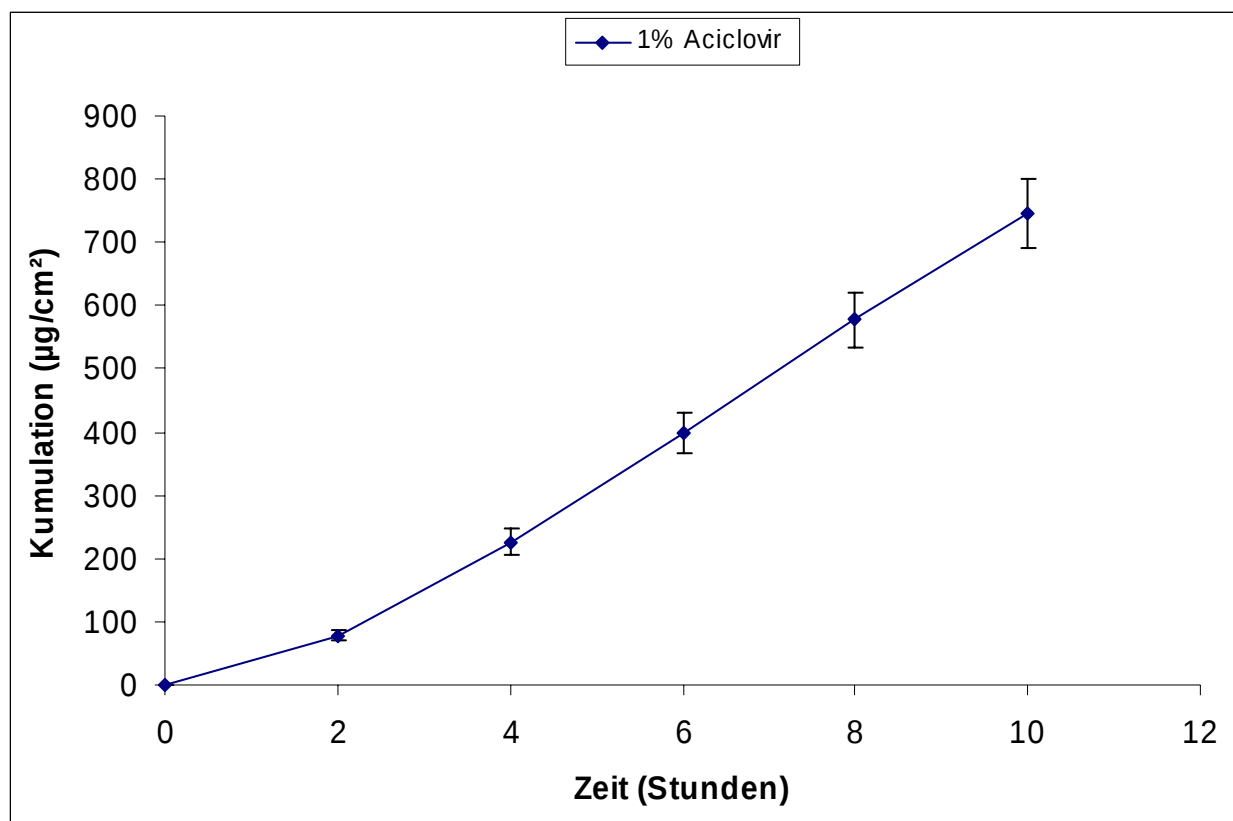


Abb. 4.3.1. Permeation einer Formulierung mit 1% Aciclovir

4.3.2. Formulierungen mit Lysin-5:

Bei der Formulierung mit Lysin-5 bei einer Konzentration von 10 Mol% waren 14% von dem Wirkstoff durch die Haut diffundiert.

Bei den Zubereitungen mit 20 Mol% Lysin-5 waren nach 10 Stunden 831 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, das entspricht 16% der aufgetragenen Menge, durch die Haut permeiert.

In Abb. 4.3.2. werden die Formulierungen mit Lysin-5 mit aciclovirhaltigen Liposomen verglichen. Darin erkennt man den Einfluss von Lysin-5 auf die Wirkstoffpenetration von Aciclovir. Bei der Konzentration von 10 Mol% kam es sogar zu einer Verminderung der Hautpermeation von Aciclovir. Hingegen durch eine Zugabe von 20 Mol% Lysin-5 konnte die Wirkstoffpenetration um das 1,12-fache gesteigert werden.

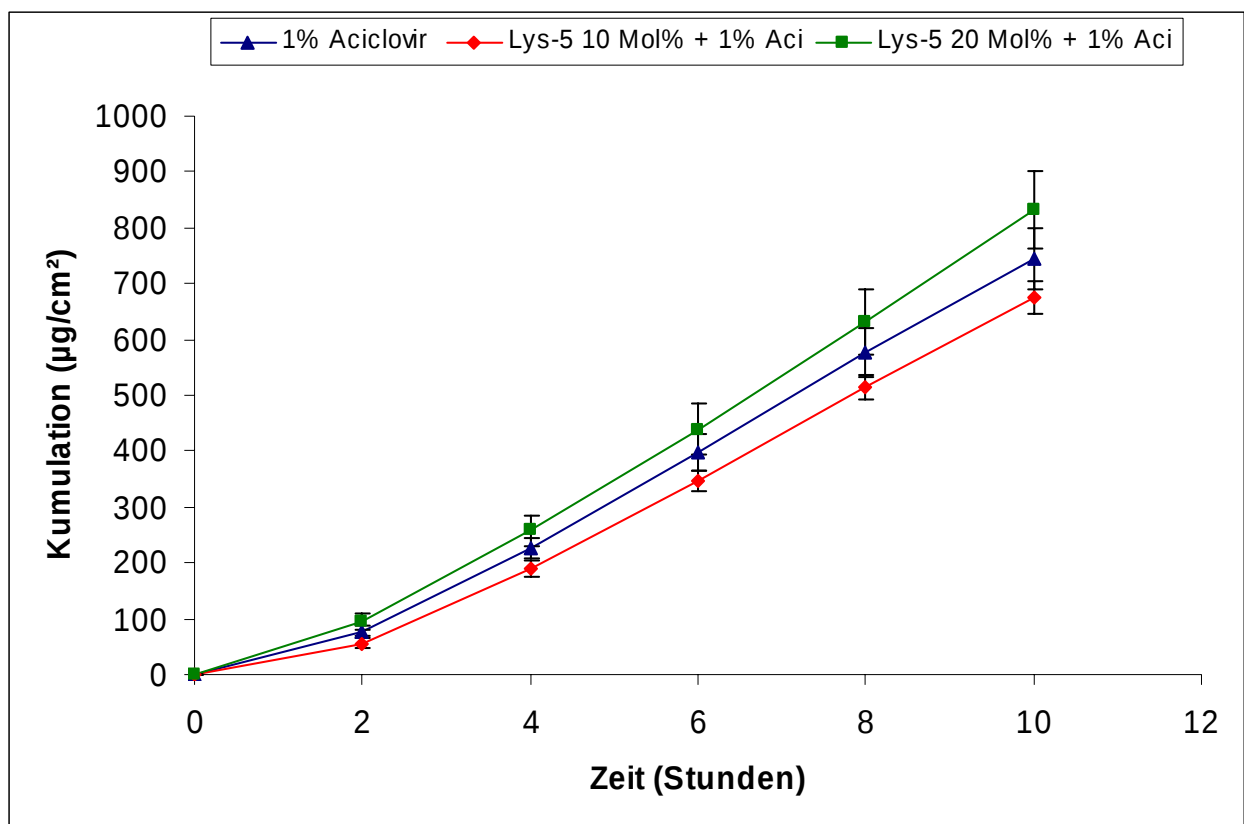


Abb. 4.3.2. Einfluss von Lysin-5 auf die Permeation der Formulierungen mit 1% Aciclovir

4.3.3. Formulierungen mit Lysin-7:

Der Zusatz von Lysin-7 führte bei beiden Konzentrationen zu einer Verminderung der Diffusion durch die Haut, verglichen mit der Wirkstoffpenetration von aciclovirhaltigen Liposomen.

Bei der Formulierung mit 10 Mol% und 20 Mol% von Lysin-7 waren nur circa 8% von der aufgetragenen Menge an Aciclovir durch die Haut diffundiert. Im Vergleich zum Referenzwert kam es hier zu einer Reduktion der Wirkstoffpenetration um fast 50%

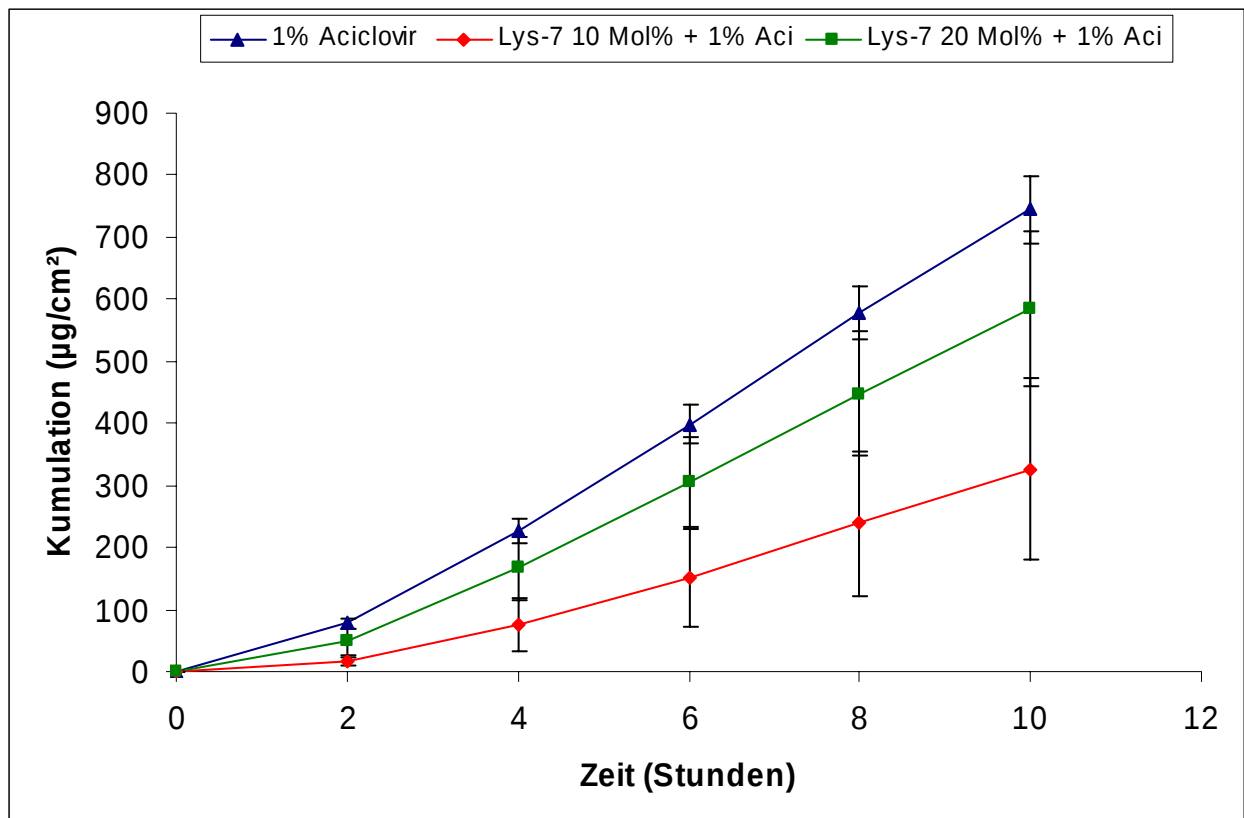


Abb. 4.3.3. Einfluss von Lysin-7 auf die Permeation der Formulierungen mit 1% Aciclovir

4.3.4. Formulierungen mit Lysin-9:

Auch der Zusatz von Oligopeptid Lysin-9 zeigte keine Verbesserung der Wirkstoffpenetration.

Bei der Konzentration von 10 Mol% Lysin-9 waren nur 8% vom aufgetragenen Wirkstoff durch die Haut diffundiert. Wohingegen durch das Einarbeiten von 20 Mol% fast 12% nach 10 Stunden in das Akzeptormedium übertraten.

Wie man in Abb. 4.3.4. sehen kann, kommt es sowohl bei 10 Mol%-iger als auch bei 20 Mol%-iger Zugabe von Lysin-9 zu einer Verringerung der Hautdiffusion.

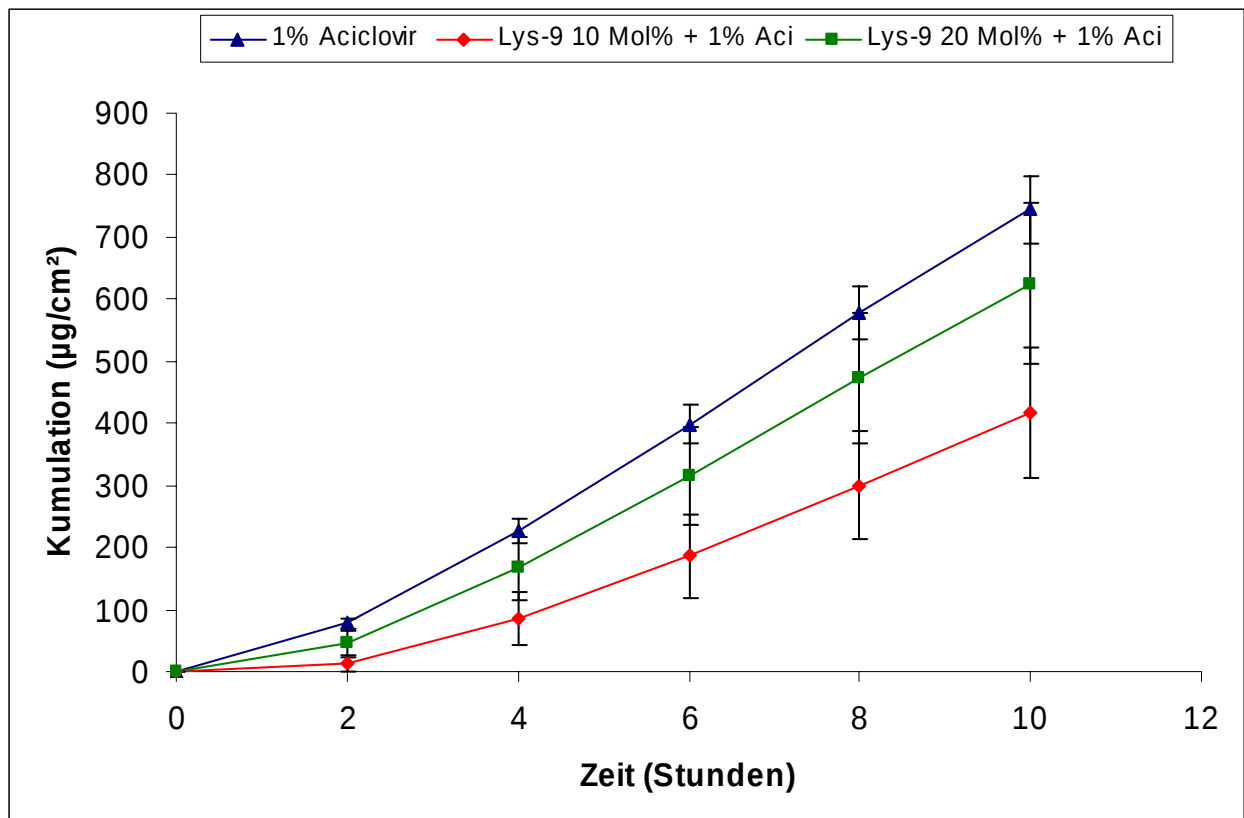


Abb. 4.3.4. Einfluss von Lysin-9 auf die Permeation der Formulierungen mit 1% Aciclovir

4.3.5. Formulierungen mit Polypeptid A1:

Bei den Formulierungen mit Polypeptid A1 kam es ebenfalls durch Zugabe zu einer Abnahme der Hautpermeation. Es konnten circa 8-9% der aufgetragenen Menge an Wirkstoff durch die Haut diffundieren.

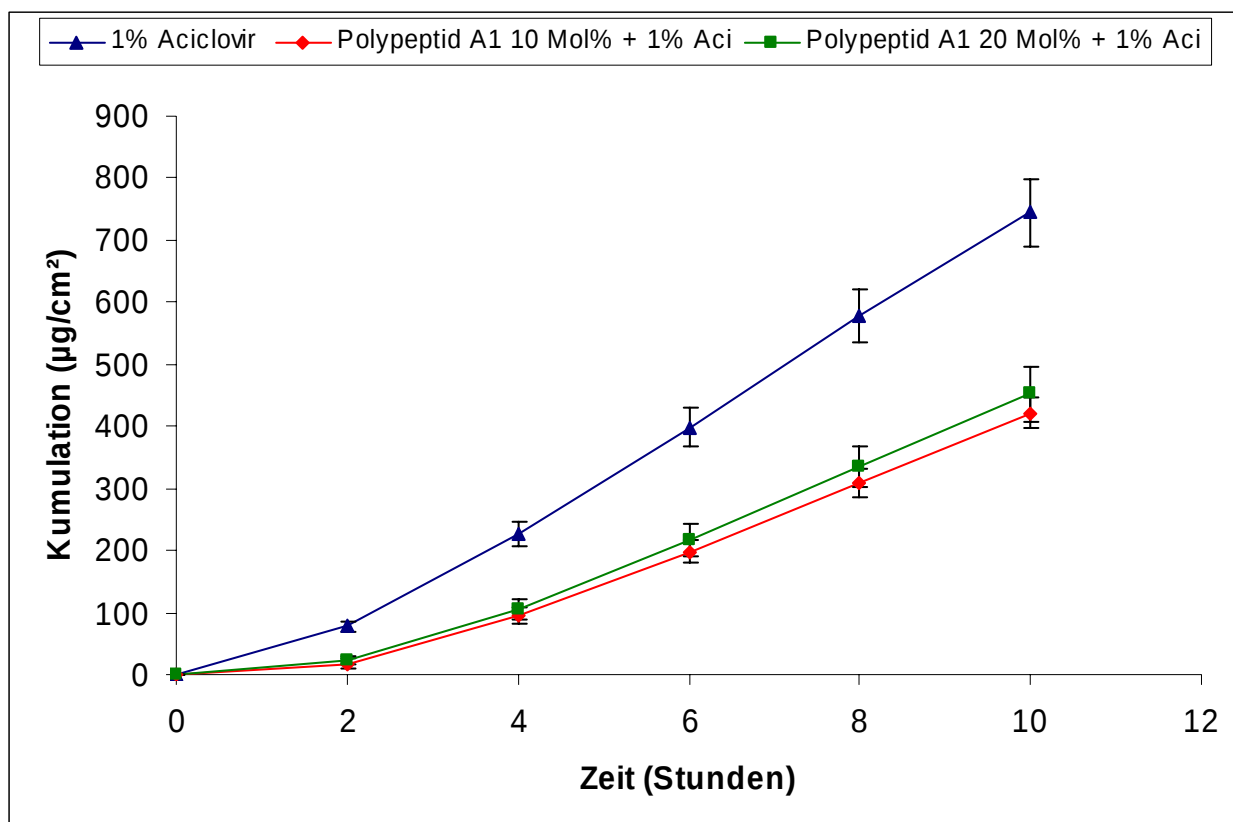


Abb. 4.3.5. Einfluss von Polypeptid A1 auf die Permeation der Formulierungen mit 1% Aciclovir

4.3.6. Formulierungen mit Polypeptid A2:

Ein Zusatz dieses Peptides verzögerte die Aciclovir Hautdiffusion im Vergleich zum Referenzwert.

Ein 10 Mol%-iger Zusatz brachte eine nur halb so große Diffusion von Aciclovir durch die Haut.

Ebenso bei 20 Mol% Polypeptid A2 gab es eine Abnahme der Hautpermeation des Wirkstoffes. Circa 11% der aufgetragenen Menge an Aciclovir waren durch die Haut diffundiert.

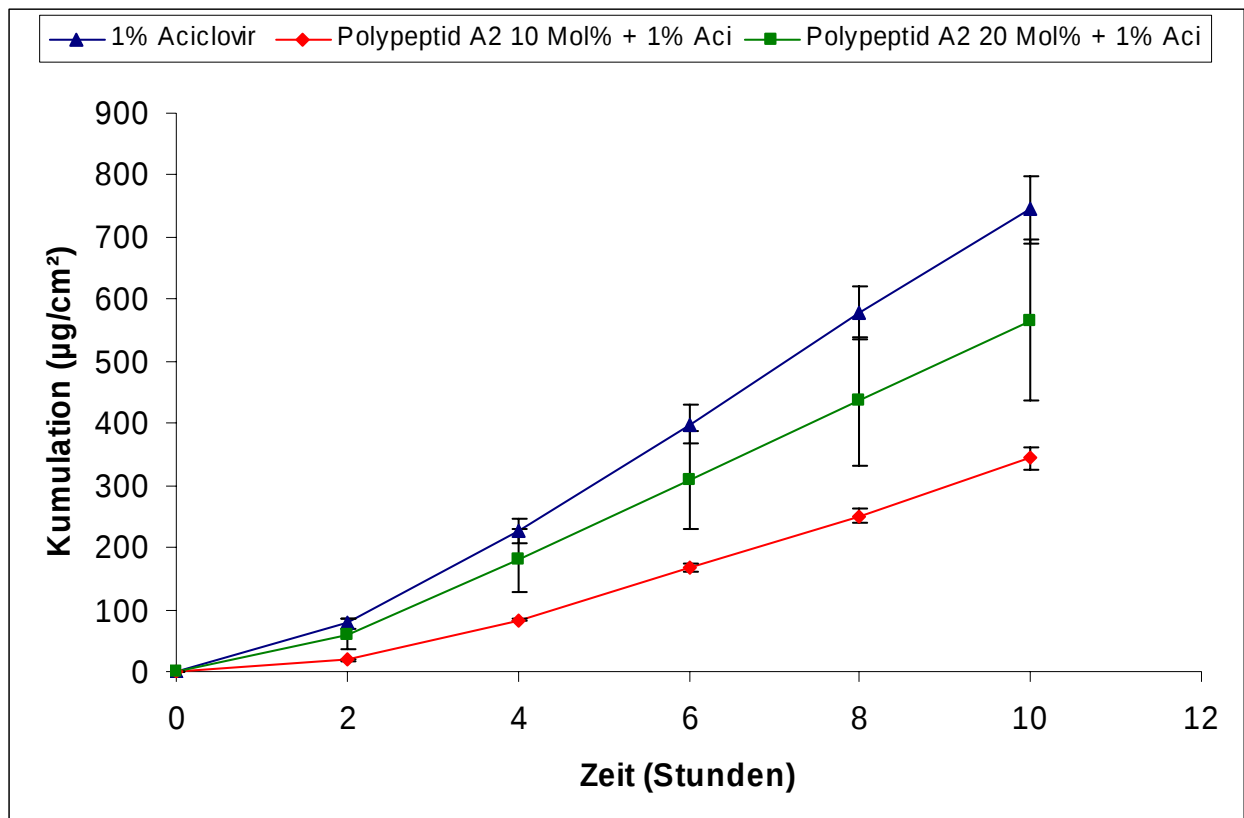


Abb. 4.3.6. Einfluss von Polypeptid A2 auf die Permeation der Formulierungen mit 1% Aciclovir

5. Diskussion

Durch die Entdeckung von Zell-penetrierenden Peptiden, die einen hohen Anteil an Arginin und Lysin aufweisen und die den Transport von Makromolekülen durch Membranen verbessern können, stellte sich die Frage, ob diese Peptide nicht eine Verbesserung der Wirkstoffpenetration bei topischer Anwendung bewirken könnten [26]. Hierfür wurde Cyclosporin mit einem Argininoligomer versetzt und dadurch konnte ein positiver Effekt bei der Penetration durch die Haut erzielt werden [7].

In einer vorangegangenen Diplomarbeit wurde der Effekt von verschiedenen Lysinderivaten auf die Diffusion von Natrium-Fluorescein durch die Haut untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Permeation verbessert werden konnte je mehr Lysin im Peptid enthalten war [27].

In einer weiteren Arbeit wurde der Effekt von Lysinderivaten auf die Hautpermeation von von fluconazolhaltigen Liposomen untersucht. Es wurden Formulierungen mit Lysin-5, Lysin-7, Lysin-9, Polypeptid A1 und Polypeptid A2 in zwei verschiedenen Konzentrationen hergestellt und deren Einfluss auf die physikalische Stabilität und die Hautpermeation untersucht. Dabei fand man heraus, dass Lysin-7 und Lysin-9 einen negativen Effekt auf die physikalische Stabilität hatten. Diese Formulierungen blieben nur eine Woche lang stabil.

Es stellte sich heraus, dass hinsichtlich der Penetration durch porcine Haut es zu einer Verbesserung bei fast allen verwendeten Peptiden kam, vor allem Lysin-9 in einer Konzentration von 20 Mol% und Polypeptid A2 in 10 und 20 Mol%-igen Konzentration zeigten hier den größten positiven Effekt. Im Fall von Polypeptid A2 wurde die Diffusion von Fluconazol sogar um fast das Doppelte gesteigert [10].

In der vorliegenden Arbeit sollte ebenfalls der Effekt von Lysinderivaten auf die Hautpermeation eines anderen Wirkstoffes zusätzlich untersucht werden, der hydrophiler als Fluconazol ist. Dafür wurden im ersten Schritt mehrere Modellwirkstoffe in Liposomen inkorporiert und ein Arzneistoff ausgesucht, der sich gut einarbeiten ließ und einige Zeit

stabil blieb. Aus diesen Untersuchungen ergaben sich Aciclovir, Diclofenac und Metronidazol als geeignete Kandidaten. Da schon Erfahrungen mit Aciclovir vorlagen, wurde dieser Arzneistoff ausgewählt und Formulierungen mit Aciclovir und den Lysinderivaten hergestellt.

Anhand der durchschnittlichen Teilchengröße, des PDI und des Zetapotentials wurde die physikalische Stabilität bestimmt. Während die aciclovirhaltigen Liposomen bereits nach zwei Wochen ungenügende Stabilität aufwiesen, kam es durch den Zusatz von Lysinderivaten zu einer Verbesserung der Stabilität. Da das Zetapotential bei allen polypeptidhaltigen Formulierungen umso höher ist, je mehr Peptid enthalten ist, kann man davon ausgehen, dass die einzelnen Partikelchen umhüllt wurden.

Die Wirkstoffpenetration von Aciclovir wurde mit Hilfe der Franz-Diffusionszelle bestimmt. Zum besseren Vergleich der Ergebnisse der in-vitro Hautpermeation der jeweiligen Formulierungen wurde der „Enhancingfaktor“ berechnet. (siehe Tabelle 5.1.) Dafür wurde die kumulative Menge an Aciclovir aus den Formulierungen mit den Lysinderivaten durch den Referenzwert dividiert. Wobei die Referenz den Faktor eins erhält.

Die im Rahmen dieser Studie durchgeführten Untersuchungen der Hautpermeation haben gezeigt, dass die Peptide nicht den erwarteten positiven Einfluss ausübten. Die Ergebnisse der Aciclovirdiffusion durch die Haut ergaben mit Ausnahme von Lysin-5 eine Retardierung. Ein möglicher Grund dafür könnte in der geringen Verkapselungsrate von Aciclovir in die Liposomen liegen (siehe Tab. 5.1.).

Hervorzuheben ist, dass es durch den Zusatz von Lysin-7 und Lysin-9 zu einer Verminderung der Wirkstoffpenetration von Aciclovir von fast 50% kam.

Formulierung	%	Faktor
1% Aciclovir	14,65	1,00
Lysin-5 10Mol%	13,93	0,95
Lysin-5 20Mol%	16,42	1,12
Lysin-7 10Mol%	7,61	0,52
Lysin-7 20Mol%	7,91	0,54
Lysin-9 10Mol%	8,34	0,57
Lysin-9 20Mol%	12,35	0,84
Polypeptid A1 10Mol%	8,29	0,57
Polypeptid A1 20Mol%	8,86	0,60
Polypeptid A2 10Mol%	7,04	0,48
Polypeptid A2 20Mol%	11,33	0,77

Tab. 5.1. Berechnung der Faktoren für die Auswirkung der Hautpermeation von Aciclovir

Während alle Lysinderivate im Falle von Fluconazol zu einer Steigerung der Hautdiffusion führten, bewirkten diese bei Aciclovir eine Verzögerung im Vergleich zur Kontrolle. Eine mögliche Ursache für diese Retardierung der Hautdiffusion liegt wahrscheinlich in der unterschiedlichen Löslichkeit und im unterschiedlichen Verteilungsverhalten von Aciclovir und Fluconazol. Während Fluconazol einen Log P von 0,5 aufweist, liegt dieser Wert für Aciclovir bei -1,76. Es ist daher wahrscheinlich, dass sich die innere kolloid-chemische Struktur der Zubereitungen aufgrund der Wirkstoffe signifikant unterscheidet.

Um diese Ergebnisse zu bestätigen, sollten weitere Untersuchungen mit Diclofenac und Metronidazol durchgeführt werden. Damit könnte überprüft werden, wie in diesen Fällen die Hautpermeation von den Lysinderivaten beeinflusst wird.

6. Zusammenfassung

In vorangegangenen Untersuchungen wurde gezeigt, dass sowohl die Einarbeitung von Wirkstoffen in Liposomen als auch der Zusatz von Zell-penetrierenden Peptiden die Hautpenetration fördern können [8].

Weiters wurden die Wechselwirkungen von Lysinderivaten auf Liposomen untersucht und in weiterer Folge der positive Effekt von Lysinderivaten auf die Wirkstoffpenetration aus fluconazolhaltige, liposomale Formulierungen durch die Haut gemessen [9, 10].

In der vorliegenden Arbeit sollte der Effekt von Lysinderivaten auf die physikalische Stabilität und auf die Hautpermeation eines Modellwirkstoffes aus liposomalen Formulierungen untersucht werden. Dafür wurde aus einer Reihe von Modellwirkstoffen Aciclovir ausgewählt und in Basisliposomen eingearbeitet. Danach wurden mit diesem Arzneistoff Formulierungen mit Lysin-5, Lysin-7, Lysin-9, Polypeptid A1 und Polypeptid A2 hergestellt.

Zur Beurteilung der physikalischen Stabilität wurden die Teilchengröße, der PDI und das Zetapotential bestimmt. Es stellte sich heraus, dass durch die Zugabe von Lysinderivaten die Stabilität erhöht werden konnte. Bei den aciclovirhaltigen Liposomen wurde nach circa 15 Tage der PDI größer und die Teilchengröße stieg sprunghaft an, woraus man erkennen konnte, dass die Zubereitung nicht mehr physikalisch stabil war. Der Zusatz von Lysinderivaten allerdings verbesserte die Stabilität, der PDI verkleinerte sich und das Zetapotential wurde größer. Diese Formulierungen blieben über den Zeitraum von drei Wochen stabil.

Die In-vitro Hautpermeation wurde mithilfe von Franz-Zellen durchgeführt. Dabei wurde ermittelt, wie viel Prozent der aufgetragenen Menge an Aciclovir nach 10 Stunden durch porcine Haut diffundierte. Als Referenz wurde die Formulierung mit den aciclovirhaltigen Liposomen genommen.

Bei diesen Untersuchungen stellte sich heraus, dass es bei den lysinhaltigen Formulierungen, mit Ausnahme von Lysin-5 in 20 Mol%-iger Konzentration, zu einer

Verminderung der Aciclovirdiffusion kam. Durch den Zusatz von Lysin-7 und Polypeptid A1 wurde die Wirkstoffpenetration sogar um 50% verringert.

Aus den Voruntersuchungen ergab sich, dass Diclofenac und Metronidazol sich ebenfalls gut in Liposomen einarbeiten ließen. Weiterführende Versuche mit diesen Substanzen wären von großer Relevanz, um zu überprüfen, welchen Effekt die Lysinderivate auf die Wirkstoffdiffusion haben.

7. Tabellen

7.1. Berechnung Mol%

Lysin Derivat	mg
Lysin-5 10 Mol%	6,72
Lysin-5 20 Mol%	13,45
Lysin-7 10 Mol%	9,34
Lysin-7 20 Mol%	18,68
Lysin-9 10 Mol%	11,97
Lysin-9 20 Mol%	23,93
Polypeptid A1 10 Mol%	7,60
Polypeptid A1 20 Mol%	15,20
Polypeptid A2 10 Mol%	7,02
Polypeptid A2 20 Mol%	14,04

Tab. 7.1. Gehalt an Lysin Derivaten in
Formulierungen mit 1% Aciclovir (3ml)

7.2. Physikalische Stabilität

Tage	Leerliposomen		1% Aciclovir	
	MW (nm)	STABW	MW (nm)	STABW
1	89,38	1,95	95,22	1,50
3	89,28	0,71	108,51	13,23
5	87,40	2,10	104,20	6,26
7	88,21	5,23	100,15	2,69
11	86,13	2,71	105,99	3,58
13	87,16	1,82	125,77	27,56
15	88,64	3,08	119,64	9,66

Tab. 7.2. Vergleich der Teilchengrößen von
Leerliposomen zu Liposomen mit 1% Aciclovir

Tage	Leerliposomen MW (nm) STABW		1% Aciclovir MW (nm) STABW		Lysin-5 10 Mol% MW (nm) STABW		Lysin-5 20 Mol% MW (nm) STABW	
1	89,38	1,95	95,22	1,50	90,21	1,13	90,10	1,50
3	89,28	0,71	108,51	13,23	90,30	1,97	90,03	1,80
5	87,40	2,10	104,20	6,26	90,31	0,65	90,58	1,80
7	88,21	5,23	100,15	2,69	95,01	1,98	91,83	2,32
11	86,13	2,71	105,99	3,58	90,14	0,97	90,53	1,35
13	87,16	1,82	125,77	27,56	91,48	2,66	90,85	1,47
15	88,64	3,08	119,64	9,66	94,45	5,20	92,14	2,07
17	87,36	2,31	n.g.	n.g.	94,09	1,12	92,07	1,77
19	86,70	3,23	n.g.	n.g.	90,63	1,80	95,52	2,25
21	86,65	3,07	n.g.	n.g.	93,95	4,40	94,80	3,93

Tab. 7.3. Einfluss von Lysin-5 in unterschiedlicher Konzentration auf die Teilchengröße der Formulierungen verglichen mit Basisliposomen und aciclovirhaltigen Liposomen

Tage	1% Aciclovir		Lysin-5 10 Mol%		Lysin-5 20 Mol%	
	MW (mV)	STABW	MW (mV)	STABW	MW (mV)	STABW
1	-1,43	1,02	13,13	2,33	18,59	3,22
3	-2,93	0,68	8,38	0,97	16,30	1,84
5	-5,48	2,35	10,51	1,81	16,38	2,33
7	-2,47	0,94	6,50	1,40	15,84	4,47
11	-1,08	1,29	8,40	1,60	14,39	2,66
13	-1,94	1,41	9,26	2,39	11,20	3,56
15	-2,06	1,25	8,31	1,03	11,31	0,69
17	n.g.	n.g.	8,47	0,86	9,70	0,79
19	n.g.	n.g.	6,61	0,93	10,54	1,25
21	n.g.	n.g.	9,05	0,61	12,00	2,41

Tab. 7.4. Einfluss von Lysin-5 in unterschiedlicher Konzentration auf das Zetapotential der Formulierungen verglichen mit aciclovirhaltigen Liposomen

Tage	Leerliposomen		1% Aciclovir		Lysin-7 10 Mol%		Lysin-7 20 Mol%	
	MW (nm)	STABW	MW (nm)	STABW	MW (nm)	STABW	MW (nm)	STABW
1	89,38	1,95	95,22	1,50	83,71	0,51	85,39	1,26
3	89,28	0,71	108,51	13,23	81,82	0,70	84,06	1,53
5	87,40	2,10	104,20	6,26	83,48	0,58	86,08	0,94
7	88,21	5,23	100,15	2,69	84,70	0,71	87,12	0,94
11	86,13	2,71	105,99	3,58	84,70	0,72	87,51	1,26
13	87,16	1,82	125,77	27,56	85,25	1,00	89,89	1,60
15	88,64	3,08	119,64	9,66	85,31	0,50	89,37	1,83
17	87,36	2,31	n.g.	n.g.	87,24	3,34	89,66	1,62
19	86,70	3,23	n.g.	n.g.	84,90	0,54	90,03	1,47
21	86,65	3,07	n.g.	n.g.	86,39	0,55	91,07	1,54

Tab. 7.5. Einfluss von Lysin-7 in unterschiedlicher Konzentration auf die Teilchengröße der Formulierungen verglichen mit Leerliposomen und aciclovirhaltigen Liposomen

Tage	1% Aciclovir		Lysin-7 10 Mol%		Lysin-7 20 Mol%	
	MW (mV)	STABW	MW (mV)	STABW	MW (mV)	STABW
1	-1,43	1,02	21,06	1,89	23,23	0,50
3	-2,93	0,68	24,10	3,34	25,11	0,81
5	-5,48	2,35	21,11	5,31	25,38	1,47
7	-2,47	0,94	22,24	2,14	22,50	1,19
11	-1,08	1,29	21,46	3,96	21,43	1,35
13	-1,94	1,41	19,93	3,92	19,03	1,47
15	-2,06	1,25	21,67	5,65	20,50	2,37
17	n.g.	n.g.	20,42	3,60	20,12	1,76
19	n.g.	n.g.	21,24	4,74	12,91	6,74
21	n.g.	n.g.	19,80	5,30	17,04	2,53

Tab. 7.6. Einfluss von Lysin-7 in unterschiedlicher Konzentration auf das Zetapotential der Formulierungen verglichen mit aciclovirhaltigen Liposomen

Tage	Leerliposomen		1% Aciclovir		Lysin-9 10 Mol%		Lysin-9 20 Mol%	
	MW (nm)	STABW	MW (nm)	STABW	MW (nm)	STABW	MW (nm)	STABW
1	89,38	1,95	95,22	1,50	91,59	2,38	90,18	1,64
3	89,28	0,71	108,51	13,23	91,19	1,91	89,68	1,85
5	87,40	2,10	104,20	6,26	90,75	1,82	89,22	1,00
7	88,21	5,23	100,15	2,69	98,23	8,31	89,94	1,78
11	86,13	2,71	105,99	3,58	90,78	2,27	88,85	1,72
13	87,16	1,82	125,77	27,56	89,88	2,41	88,59	1,65
15	88,64	3,08	119,64	9,66	91,41	2,50	90,19	1,54
17	87,36	2,31	n.g.	n.g.	91,91	2,81	90,85	1,37
19	86,70	3,23	n.g.	n.g.	90,82	2,50	90,02	1,59
21	86,65	3,07	n.g.	n.g.	90,93	2,68	90,75	1,44

Tab. 7.7. Einfluss von Lysin-9 in unterschiedlicher Konzentration auf die Teilchengröße der Formulierungen verglichen mit Leerliposomen und aciclovirhaltigen Liposomen

Tage	1% Aciclovir		Lysin-9 10 Mol%		Lysin-9 20 Mol%	
	MW (mV)	STABW	MW (mV)	STABW	MW (mV)	STABW
1	-1,43	1,02	20,89	2,27	19,32	2,62
3	-2,93	0,68	18,23	0,63	18,33	3,81
5	-5,48	2,35	17,96	2,15	12,92	3,45
7	-2,47	0,94	21,17	2,94	18,21	1,90
11	-1,08	1,29	17,84	1,31	17,84	1,63
13	-1,94	1,41	16,70	2,43	17,42	5,04
15	-2,06	1,25	15,48	1,74	15,42	2,01
17	n.g.	n.g.	13,53	0,96	14,61	2,46
19	n.g.	n.g.	14,16	1,78	17,42	2,67
21	n.g.	n.g.	17,58	1,31	16,16	2,61

Tab. 7.8. Einfluss von Lysin-9 in unterschiedlicher Konzentrationen auf das Zetapotential der Formulierungen verglichen mit aciclovirhaltigen Liposomen

Tage	Leerliposomen		1% Aciclovir		Polypeptid A1 10 Mol%		Polypeptid A1 20 Mol%	
	MW (nm)	STABW	MW (nm)	STABW	MW (nm)	STABW	MW (nm)	STABW
1	89,38	1,95	95,22	1,50	93,10	3,70	99,20	4,30
3	89,28	0,71	108,51	13,23	91,92	2,66	97,75	4,01
5	87,40	2,10	104,20	6,26	93,04	2,67	98,83	4,48
7	88,21	5,23	100,15	2,69	90,77	3,36	98,18	4,07
11	86,13	2,71	105,99	3,58	93,02	2,77	99,11	4,22
13	87,16	1,82	125,77	27,56	92,00	2,59	98,99	4,14
15	88,64	3,08	119,64	9,66	93,16	3,26	98,91	4,59
17	87,36	2,31	n.g.	n.g.	91,57	3,16	97,65	4,20
19	86,70	3,23	n.g.	n.g.	92,11	3,09	98,58	4,30
21	86,65	3,07	n.g.	n.g.	92,11	2,86	100,39	6,41

Tab. 7.9. Einfluss von Polypeptid A1 in unterschiedlicher Konzentration auf die Teilchengröße der Formulierungen verglichen mit Leerliposomen und aciclovirhaltigen Liposomen

Tage	1% Aciclovir		Polypeptid A1 10 Mol%		Polypeptid A1 20 Mol%	
	MW (mV)	STABW	MW (mV)	STABW	MW (mV)	STABW
1	-1,43	1,02	12,87	3,93	20,38	0,90
3	-2,93	0,68	12,15	1,83	22,83	2,61
5	-5,48	2,35	12,89	2,93	17,13	0,88
7	-2,47	0,94	13,68	1,70	20,60	1,31
11	-1,08	1,29	6,45	0,63	16,87	3,20
13	-1,94	1,41	10,09	2,97	16,13	1,99
15	-2,06	1,25	6,80	4,83	17,33	2,81
17	n.g.	n.g.	10,57	2,50	17,20	2,17
19	n.g.	n.g.	6,16	1,37	17,30	2,10
21	n.g.	n.g.	9,10	1,40	15,94	3,70

Tab. 7.10. Einfluss von Polypeptid A1 in unterschiedlicher Konzentration auf das Zetapotential der Formulierungen verglichen mit aciclovirhaltigen Liposomen

Tage	Leerliposomen		1% Aciclovir		Polypeptid A2 10 Mol%		Polypeptid A2 20 Mol%	
	MW (nm)	STABW	MW (nm)	STABW	MW (nm)	STABW	MW (nm)	STABW
1	89,38	1,95	95,22	1,50	89,56	1,77	110,49	11,74
3	89,28	0,71	108,51	13,23	89,02	4,91	109,12	12,29
5	87,40	2,10	104,20	6,26	88,66	1,23	110,31	12,98
7	88,21	5,23	100,15	2,69	87,84	1,11	109,80	12,25
11	86,13	2,71	105,99	3,58	93,14	7,60	111,08	12,25
13	87,16	1,82	125,77	27,56	87,47	0,86	111,23	12,78
15	88,64	3,08	119,64	9,66	92,10	6,40	112,69	14,48
17	87,36	2,31	n.g.	n.g.	87,71	0,92	111,46	14,71
19	86,70	3,23	n.g.	n.g.	88,83	1,40	111,85	16,45
21	86,65	3,07	n.g.	n.g.	88,95	1,31	112,33	16,68

Tab. 7.11. Einfluss von Polypeptid A2 in unterschiedlicher Konzentration auf die Teilchengröße der Formulierungen verglichen mit Leerliposomen und aciclovirhaltigen Liposomen

Tage	1% Aciclovir		Polypeptid A2 10 Mol%		Polypeptid A2 20 Mol%	
	MW (mV)	STABW	MW (mV)	STABW	MW (mV)	STABW
1	-1,43	1,02	16,96	3,17	24,11	1,38
3	-2,93	0,68	16,92	2,28	24,34	0,88
5	-5,48	2,35	17,86	2,70	23,53	1,34
7	-2,47	0,94	18,83	3,56	22,94	1,29
11	-1,08	1,29	14,28	3,16	21,18	1,03
13	-1,94	1,41	15,86	3,10	20,79	2,83
15	-2,06	1,25	17,90	4,17	18,93	1,53
17	n.g.	n.g.	14,61	3,43	19,33	3,36
19	n.g.	n.g.	18,74	5,12	18,59	3,32
21	n.g.	n.g.	13,53	4,07	16,16	2,57

Tab. 7.12. Einfluss von Polypeptid A2 in unterschiedlicher Konzentration auf das Zetapotential der Formulierungen verglichen mit aciclovirhaltigen Liposomen

7.3. Diffusionsversuche

Stunde	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	MW	STABW
0	0	0	0	0	0
2	87,78	70,91	75,39	78,03	8,74
4	248,00	209,68	221,40	226,36	19,64
6	432,10	369,55	392,13	397,93	31,67
8	623,76	537,80	570,47	577,35	43,39
10	803,10	695,20	735,54	744,61	54,52

Tab. 7.13. Permeation von Liposomen mit 1% Aciclovir in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Stunde	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	MW	STABW
0	0	0	0	0	0
2	1,73	1,41	1,47	1,54	0,17
4	4,89	4,18	4,30	4,45	0,38
6	8,51	7,36	7,62	7,83	0,61
8	12,29	10,71	11,09	11,36	0,83
10	15,82	13,84	14,29	14,65	1,04

Tab. 7.14. Permeation von Liposomen mit 1% Aciclovir in % (m/m)

Stunde	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	MW	STABW
0	0	0	0	0	0
2	45,21	62,17	62,23	56,54	9,81
4	172,14	200,49	197,14	189,93	15,49
6	327,63	362,53	354,97	348,38	18,36
8	488,75	534,34	520,87	514,65	23,42
10	645,02	699,49	680,69	675,06	27,67

Tab. 7.15. Permeation von Aciclovir unter dem Einfluss von 10 Mol% Lysin-5 in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Stunde	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	MW	STABW
0	0	0	0	0	0
2	0,93	1,29	1,29	1,17	0,21
4	3,53	4,15	4,09	3,92	0,34
6	6,71	7,50	7,36	7,19	0,42
8	10,01	11,05	10,80	10,62	0,54
10	13,21	14,46	14,11	13,93	0,64

Tab. 7.16. Permeation von Aciclovir unter dem Einfluss von 10 Mol% Lysin-5 in % (m/m)

Stunde	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	MW	STABW
0	0	0	0	0	0
2	86,07	110,99	84,46	93,84	14,88
4	244,14	290,57	238,04	257,59	28,73
6	421,74	490,70	404,91	439,12	45,46
8	611,13	697,54	584,57	631,08	59,07
10	828,45	900,89	762,58	830,64	69,18

Tab. 7.17. Permeation von Aciclovir unter dem Einfluss von 20 Mol% Lysin-5 in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Stunde	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	MW	STABW
0	0	0	0	0	0
2	1,72	2,16	1,68	1,85	0,27
4	4,88	5,66	4,73	5,09	0,50
6	8,42	9,56	8,04	8,68	0,79
8	12,21	13,59	11,61	12,47	1,01
10	16,55	17,55	15,15	16,42	1,20

Tab. 7.18. Permeation von Aciclovir unter dem Einfluss von 20 Mol% Lysin-5 in % (m/m)

Stunde	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	MW	STABW
0	0	0	0	0	0
2	8,74	14,92	23,17	15,61	7,24
4	28,38	91,34	104,62	74,78	40,73
6	60,05	190,41	205,40	151,95	79,94
8	103,44	298,42	313,18	238,35	117,06
10	157,96	402,72	416,93	325,87	145,59

Tab. 7.19. Permeation von Aciclovir unter dem Einfluss von 10 Mol% Lysin-7 in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Stunde	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	MW	STABW
0	0	0	0	0	0
2	0,22	0,28	0,43	0,31	0,11
4	1,59	1,72	1,94	1,75	0,18
6	3,40	3,58	3,81	3,60	0,20
8	5,47	5,61	5,80	5,63	0,17
10	7,53	7,57	7,73	7,61	0,10

Tab. 7.20. Permeation von Aciclovir unter dem Einfluss von 10 Mol% Lysin-7 in % (m/m)

Stunde	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	MW	STABW
0	0	0	0	0	0
2	59,85	24,12	62,36	48,78	21,39
4	193,66	112,00	197,06	167,57	48,16
6	342,84	218,70	352,54	304,69	74,63
8	498,44	331,78	514,21	448,14	101,08
10	646,32	440,12	665,21	583,88	124,86

Tab. 7.21. Permeation von Aciclovir unter dem Einfluss von 20 Mol% Lysin-7 in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Stunde	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	MW	STABW
0	0	0	0	0	0
2	0,81	0,33	0,84	0,66	0,29
4	2,63	1,51	2,67	2,27	0,66
6	4,66	2,95	4,78	4,13	1,02
8	6,77	4,48	6,97	6,07	1,38
10	8,78	5,94	9,01	7,91	1,71

Tab. 7.22. Permeation von Aciclovir unter dem Einfluss von 20 Mol% Lysin-7 in % (m/m)

Stunde	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	MW	STABW
0	0	0	0	0	0
2	5,31	8,12	28,87	14,10	12,87
4	56,46	66,07	133,43	85,32	41,94
6	139,27	156,57	262,89	186,24	66,94
8	239,12	260,29	401,20	300,20	88,10
10	345,44	365,79	538,44	416,56	106,05

Tab. 7.23. Permeation von Aciclovir unter dem Einfluss von 10 Mol% Lysin-9 in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Stunde	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	MW	STABW
0	0	0	0	0	0
2	0,11	0,16	0,58	0,28	0,26
4	1,15	1,31	2,66	1,71	0,83
6	2,83	3,11	5,25	3,73	1,32
8	4,85	5,17	8,01	6,01	1,74
10	7,01	7,27	10,75	8,34	2,09

Tab. 7.24. Permeation von Aciclovir unter dem Einfluss von 10 Mol% Lysin-9 in % (m/m)

Stunde	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	MW	STABW
0	0	0	0	0	0
2	51,19	22,05	63,97	45,74	21,49
4	184,61	109,79	204,87	166,42	50,08
6	349,22	226,94	374,22	316,79	78,81
8	520,95	352,84	545,31	473,03	104,80
10	689,09	476,19	711,30	625,52	129,81

Tab. 7.25. Permeation von Aciclovir unter dem Einfluss von 20 Mol% Lysin-9 in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Stunde	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	MW	STABW
0	0	0	0	0	0
2	1,02	0,43	1,25	0,90	0,42
4	3,69	2,15	4,01	3,29	0,99
6	6,98	4,45	7,33	6,25	1,57
8	10,41	6,92	10,68	9,34	2,10
10	13,77	9,34	13,93	12,35	2,60

Tab. 7.26. Permeation von Aciclovir unter dem Einfluss von 20 Mol% Lysin-9 in % (m/m)

Stunde	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	MW	STABW
0	0	0	0	0	0
2	10,49	16,95	25,26	17,57	7,41
4	81,51	94,14	110,60	95,42	14,59
6	179,82	196,99	218,55	198,46	19,41
8	288,04	305,52	333,29	308,95	22,82
10	399,39	417,29	448,42	421,70	24,81

Tab. 7.27. Permeation von Aciclovir unter dem Einfluss von 10 Mol% Polypeptid A1 in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Stunde	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	MW	STABW
0	0	0	0	0	0
2	0,21	0,33	0,49	0,34	0,14
4	1,64	1,83	2,16	1,87	0,26
6	3,61	3,82	4,27	3,90	0,33
8	5,79	5,93	6,50	6,07	0,38
10	8,02	8,10	8,75	8,29	0,40

Tab. 7.28 Permeation von Aciclovir unter dem Einfluss von 10 Mol% Polypeptid A1 in % (m/m)

Stunde	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	MW	STABW
0	0	0	0	0	0
2	30,28	17,16	19,31	22,25	7,04
4	125,52	94,26	98,74	106,17	16,90
6	246,50	199,40	204,13	216,68	25,94
8	373,98	312,20	318,86	335,01	33,91
10	502,45	423,59	430,97	452,34	43,55

Tab. 7.29. Permeation von Aciclovir unter dem Einfluss von 20 Mol% Polypeptid A1 in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Stunde	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	MW	STABW
0	0	0	0	0	0
2	0,59	0,34	0,38	0,44	0,14
4	2,45	1,84	1,95	2,08	0,33
6	4,81	3,89	4,02	4,24	0,50
8	7,30	6,10	6,29	6,56	0,65
10	9,81	8,27	8,50	8,86	0,83

Tab. 7.30. Permeation von Aciclovir unter dem Einfluss von 20 Mol% Polypeptid A1 in % (m/m)

Stunde	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	MW	STABW
0	0	0	0	0	0
2	16,6016	19,77	18,1215	18,16	1,58
4	83,9438	83,42	82,3558	83,24	0,81
6	173,7271	162,63	164,8588	167,07	5,87
8	263,7988	241,48	248,2876	251,19	11,44
10	364,0257	328,13	337,8663	343,34	18,56

Tab. 7.31. Permeation von Aciclovir unter dem Einfluss von 10 Mol% Polypeptid A2 in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Stunde	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	MW	STABW
0	0	0	0	0	0
2	0,34	0,41	0,37	0,37	0,03
4	1,72	1,71	1,69	1,71	0,02
6	3,56	3,34	3,37	3,43	0,12
8	5,40	4,96	5,08	5,15	0,23
10	7,46	6,75	6,92	7,04	0,37

Tab. 7.32. Permeation von Aciclovir unter dem Einfluss von 10 Mol% Polypeptid A2 in % (m/m)

Stunde	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	MW	STABW
0	0	0	0	0	0
2	67,75	80,31	32,73	60,26	24,66
4	190,93	223,96	122,49	179,13	51,75
6	323,92	377,71	224,41	308,68	77,78
8	453,07	529,53	324,37	435,66	103,68
10	587,13	685,23	426,88	566,41	130,42

Tab. 7.33. Permeation von Aciclovir unter dem Einfluss von 20 Mol% Polypeptid A2 in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Stunde	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	MW	STABW
0	0	0	0	0	0
2	1,35	1,61	0,65	1,21	0,50
4	3,81	4,50	2,44	3,58	1,05
6	6,47	7,59	4,47	6,17	1,58
8	9,04	10,63	6,46	8,71	2,10
10	11,72	13,76	8,51	11,33	2,65

Tab. 7.34. Permeation von Aciclovir unter dem Einfluss von 20 Mol% Polypeptid A2 in % (m/m)

8. Literaturverzeichnis

- [1] R. Voigt. Pharmazeutische Technologie. 10 Auflage, Deutscher Apothekerverlag Stuttgart 2005
- [2] K. Bauer, K-H. Frömmig, C. Führer. Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie. 8. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2006
- [3] Andrew S. Janoff. Liposomes, Rational Design. Dekker verlag New York 1999
- [4] M.A. Elsayed, O.Y. Abdallah, V.F. Naggar, N.M. Khalafallah: Lipid vesicles for skin delivery of drugs: Reviewing three decades of research. International Journal of Pharmaceutics 332 (2007) 1-16
- [5] A. Sharma, U.S. Sharma. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. International Journal of Pharmaceutics 154 (1997) 123-140
- [6] E.L. Snyder, S.F. Dowdy. Cell-Penetrating Peptides in Drug Delivery. Pharm. Res. 21 (2004) 389-393
- [7] L.B. Lopes, C. M. Brophy, E. Furnisch, 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] 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

- [9] Barbara Ranftl. Wechselwirkungen von Oligo-Lysinen mit DPPC Liposomen als Modellmembranen. Diplomarbeit Universität Wien 2009
- [10] Daniela Spengler. Einfluss von lysinhaltigen Liposomen auf die Hautpermeation eines Modellstoffes. Diplomarbeit Universität Wien 2008
- [11] R. Neubert, W. Wohlrab, W. Marsch. Dermatopharmazie, Vehikel-, Wirkstoffpharmakologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2001
- [12] E. Mutschler, G. Geisslinger, H.K. Koemer, M. Schäfer-Korting. Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 8. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2001
- [13] N. Rietbrock. Die Haut als Transportorgan für Arzneistoffe. Steinkopff Verlag Darmstadt 1997
- [14] R.R. Wickett, M.O. Visscher. Structur and function of the epidermal barrier. American Journal of Infection Control, Volume 34, Issue 10, Supplement 1, December 2006, Pages S98-S110
- [15] R.H. Müller, G.E. Hildebrand. Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen. 2. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1998
- [16] F. von Bruchhausen, G. Dannhardt, S. Ebel, A.W. Frahm, E. Hackenthal, U. Holzgraber. Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. 5. Auflage. Springer Verlag 1993
- [17] J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer. Biochemie. 5. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin 2003

- [18] Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch. 9. Auflage. Walter de Gruyter Berlin – New York 2004
- [19] K. Aktories, U. Förstermann, F.B. Hofmann, W. Forth. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 9. Auflage. Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag 2006
- [20] Austria Codex Fachinformation 2008/2009. Österreichische Apotheker – Verlagsgesellschaft mbH 2008
- [21] <http://www.avestin.com>, Oktober 2009
- [22] <http://www.malvern.com>, Oktober 2009
- [23] Kriekau Dennis. Abbaukinetik hydrolyseempfindlicher Arzneistoffe in parenteralen O/W-Emulsionen. Dissertation Universität Berlin 2006
- [24] H. Rainer, Müller. Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1996
- [25] Rosen, Mayer. Delivery System handbook for personal care and cosmetic products : Technology, Applications and Formulations. William Andrew Publishing New York 2005
- [26] L.N. Patel, J.L. Zero, W.C. Shen. Cellpenetrating peptides: Intercellular Pathways and Pharmaceutical Perspectives. Pharm. Res. 24 (2007) 1977-1992
- [27] Birgit Herbsthofer. Einfluss verschiedener Lysine auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein. Diplomarbeit Universität Wien 2008

9. Lebenslauf

Name: Beatrice Grundtner

Geburtsdatum: 25.6.1981

Name und Beruf der Eltern: Dr. Franz Grundtner, Facharzt für Psychiatrie und Neurologie
Anne Grundtner, geb. Bottard, Volksschullehrerin

Staatsbürgerschaft: Österreich

Familienstand: ledig

Schulbildung:

1987 bis 1991: Volksschule Neunkirchen,
Mühlfeldstraße 4, 2620 Neunkirchen, NÖ

1991 bis 2000: Bundesrealgymnasium Neunkirchen
Otto-Glöckel Weg 2, 2620 Neunkirchen, NÖ

2000: Matura, mit gutem Erfolg

Berufliche Tätigkeiten:

Juli 2004, August 2005, August 2006:
Ferialpraktikum in Apotheke „Zum heiligen Leopold“,
Holzplatz 8, 2620 Neunkirchen, NÖ

ab Juni 2006: für acht Wochenstunden angestellt in
„Internationalen Apotheke“, Kärntnerring 17, 1010 Wien

SS 2009: Tutorium für die Übungen zur Magistralen
Arzneimittelherstellung (Department für
Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie)

Sonstige Kenntnisse: Englisch, in Wort und Schrift