

Undersøkelse av en ny topikal antimykotisk “liposom-i-hydrogel” legemiddelformulering med virkestoffet flukonazol

Optimalisering og karakterisering

Av
Kurt Jonny Johansen

Masteroppgave i farmasi

Våren 2014

Forskningsgruppe for Drug Transport and Delivery
Institutt for farmasi
Det helsevitenskapelige fakultet
Universitetet i Tromsø



**Undersøkelse av en ny topikal antimykotisk “liposom-i-hydrogel”
legemiddelformulering med virkestoffet flukonazol
Optimalisering og karakterisering**

Av
Kurt Jonny Johansen

MASTEROPPGAVE I FARMASI

Våren 2014

Veiledere:

Førsteamanuensis Ann Mari Holsæter
Stipendiat Sveinung G. Ingebrigtsen

FORORD

Oppgaven ble utført ved Drug Transport and Delivery research group, Institutt for Farmasi, ved Universitetet i Tromsø i tidsrommet oktober 2013 – mai 2014.

Først og fremst vil jeg takke min samboer Linda som har vist en stor tålmodighet og forståelse. Hun har i store perioder hatt en ekstra belastning med å ta ansvaret for våre to barn med alt det innebærer. Jeg vil også takke min mor Britt som ofte har stilt opp og hjulpet til med barna.

Jeg vil rette en stor takk til mine veiledere Førsteamanuensis Ann Mari Holsæter og Stipendiat Sveinung Gaarden Ingebrigtsen for faglige innspill og rettleiding underveis i prosjektet. De har hele tiden vært tilgjengelig for meg og hjulpet til, selv om jeg til tider har vært både masete og stresset.

Takk til Biotec Pharamacon ASA som bidro med sin bioaktive hydrogel “løselig-beta-glukan” (SBG) til dette forskningsprosjektet.

Til slutt må jeg takke resten av avdelingen med ansatte for godt miljø og faglige diskusjoner.

Tromsø, mai 2014
Kurt Jonny Johansen

Innholdsfortegnelse

LISTE OVER TABELLER	7
LISTE OVER FIGURER	8
SAMMENDRAG	9
FORKORTELSER	11
1 INTRODUKSJON	12
1.1 Huden	12
1.1.1 Hudens oppbygging.....	12
1.1.2 Hudens barriereegenskaper og hvordan forsere den med legemidler	13
1.2 Mykoser	16
1.2.1 Generelt om mykoser, årsaker og utbredelse.....	16
1.2.2 Dermatomykoser	16
1.2.3 Antimykotisk behandling	17
1.2.4 Bivirkninger og interaksjoner	18
1.2.5 Flukonazol	19
1.3 Huden som administrasjonssted	20
1.3.1 utfordringer ved dermal administrasjon	20
1.3.2 Konvensjonelle topikale antimykotiske doseringsformer	20
1.4 Hydrogeler	22
1.4.1 Generelt om hydrogeler	22
1.4.2 Løselig beta-glukaner	23
1.4.3 Liposomale hydrogeler.....	24
1.4.4 DAC i fremstilling av liposomer-i hydrogel.....	27
1.4.5 Liposomer og antimykotika (<i>In vivo</i> studier).....	29
2 FORMÅLET MED STUDIEN	31
2.1 Formål.....	31
3 MATERIALE OG METODE	32
3.1 Oversikter over materiale brukt i studien	32
3.1.1 Kjemikalier og reagenser.....	32
3.1.2 Programvarer	32
3.1.3 Instrumenter og utstyr.....	33
3.2 Metode	34
3.2.1 Fremstilling av VPGs.....	34
3.2.2 Størrelsesreduering av liposomer.....	36
3.2.3 Karakterisering av liposomstørrelse med PCS.....	38
3.2.4 Kvantifisering av flukonazol med HPLC.....	39

3.2.5	Inkorporeringseffektivitet av flukonazol i liposomer	39
3.2.6	Kvantifisering av fostfat fra fosfatidylkolin.....	40
3.2.7	Rekonstruering av hydrogel 2,5 % SBG	41
3.2.8	Teksturanalyse.....	43
3.2.9	Homogenitetsanalyse	45
3.2.10	Zetapotensial og pH	45
3.2.11	Hydrogel 2,5 % SBG med fritt flukonazol	46
3.2.12	<i>In vitro</i> frigjøringsstudie.....	46
4.	RESULTATER OG DISKUSJON	47
4.1	Metodeutvikling – fremstilling av liposomer-i hydrogel	47
4.1.2	Optimalisering av metode for fremstilling av lipidfilm	47
4.1.3	Optimalisering av liposomreduksjonsmetode med DAC	48
4.1.4	Optimalisering av liposomstørrelse ved variering av sentrifugeringstid.....	48
4.1.5	Inkorporeringseffektivitet og kvantifisering av FLZ	49
4.1.6	Metodeutvikling av teksturanalyse.....	52
4.2	Etablert metode.....	55
4.2.1	Optimalisering av SBG- formulering	55
4.2.2	Rekonstruering og teksturanalyse av hydrogel 2,5 % SBG.....	58
4.2.3	<i>In vitro</i> frigjøringsstudie	64
4.2.4	Inkorporeringseffektivitet av FLZ.....	65
4.2.5	Kvantifisering av fostfat fra fosfatidylkolin	65
4.2.6	Undersøkelse av Homogenitet av FLZ-i-SBG etter miksing med hjelp av DAC	67
4.2.7	Karakterisering av liposomstørrelse før og etter inkorporering i hydrogel	68
4.2.8	Zetapotensial og pH.....	69
5	KONKLUSJON	71
6	FREMTIDSPERSPEKTIV	72
6.	REFERANSELISTE.....	73
APPENDIKS	77
A.1	Homogen fordeling av FLZ i bacht A (SBG-LipFLZ)	77
A.2	Teksturanalyse av 2,5 % SBG	78
A.3	Teksturanalyse av 2,5 % SBG med 5 % GLY	79
A.4	Teksturanalyse av 2,5 % SBG med 10 % GLY.....	80
A.5	Teksturanalyse av 2,5 % SBG med 20 % GLY.....	81
A.6	Teksturanalyse av 2,5 % SBG med 10 % GLY og 10 % VPG.....	82
A.7	Sammendrag (Liposome Research Days)	83
A.8	SOP PCS	84

Liste over tabeller

Tabell 1. Antimykotika til utvortes bruk	21
Tabell 2. Kjemikalier og reagenser.	32
Tabell 3. Programvarer.....	32
Tabell 4. Instrumenter og utstyr.	33
Tabell 5. Sammensetting av ferdig VPG med FLZ (LipFLZ) og VPG uten FLZ (Lip0).....	36
Tabell 6. Sammensetninger av SBG-hydrogel (totalt 100 g)	42
Tabell 7. Diameter målt forLipFLZ etter ulike sentrifugeringstider med DAC	48
Tabell 8. Liposomstørrelse mål med PCS – sammenligning mellom Lip0 og LipFLZ	49
Tabell 9. PCS av reduseringsmetoder hvor det ikke ble benyttet DAC	49
Tabell 10. Teksturanalyse av SBG-lipFLZ (batch A) og SBG-Lip0 (batch B)	59
Tabell 11. Utbytte fosfatidylkolin til å danne liposom, og IE % for FLZ i liposomer	66
Tabell 12. Gjennomsnittlig størrelsesfordeling av liposomer	68
Tabell 13. Zetapotensial med av pH i springvann og i gel-formuleringene	69
Tabell 14. pH analyse av de ulike SBG gel komposisjonene.....	70

Liste over figurer

Figur 1. Tverrsnitt av huden og overhuden (3).....	12
Figur 2. Alternative ruter for transport av legemiddel gjennom hornlaget	14
Figur 3. Virkningsmekanisme for azolene:	18
Figur 4. Den kjemiske strukturen til flukonazol (triazol)	19
Figur 5. Strukturen til β 1-3/1-6 glukose fra gjær	23
Figur 6. Den kjemiske strukturen til fosfatidylkolin	25
Figur 7. Illustrasjon av vesikkeltypene.....	25
Figur 8. Illustrasjon av liposom med lipofil og hydrofil del	26
Figur 9. Illustrasjon av liposomer i hydrogel med deponering av legemiddel i hud	27
Figur 10. Illustrasjon av prinsippet med dual asymmetrisk sentrifugering (DAC)	29
Figur 11. Monteringsoppsettet for avdamping av etanol med hetteglass og nitrogen.....	35
Figur 12. Vesikulær fosfolipid gel (VPG).....	36
Figur 13. DAC'en (SpeedMixer DAC 150 FVZ) som ble benyttet i denne studien	37
Figur 14. M100-kopp og M40-kopp i beholder beregnet for DAC.....	42
Figur 15. Teksturapparatet TA.XT plus med tilhørende monteringsoppsett.....	43
Figur 16. M40 og DP-Koppene vi brukte til teksturanalyse.....	44
Figur 17. Forskjell i IE % i forhold til om det er brukt rotavapor kontra injeksjonsglass.....	50
Figur 18. Forskjell i IE % i forhold til reduksjonsteknikk.....	50
Figur 19. Illustrasjon av typisk teksturdiagram for SBG-hydrogelformulering	52
Figur 20. Cohesiveness med sammenligning av DP-kopp og M40-kopp	53
Figur 21. Adhesiveness med sammenligning av DP-kopp og M40-kopp	54
Figur 22. Sammenligning av cohesiveness av ulike SBG-formuleringer	56
Figur 23. Sammenligning av adhesiveness av ulike SBG-gel-formuleringer	56
Figur 24. Cohesiveness etter 2 timer av SBG-gel-formuleringene	57
Figur 25. Adhesiveness etter 2 timer av SBG-gel-formuleringer.....	57
Figur 26. Grafer som viser variasjonene mellom SBG- LipFLZ og SBG-Lip0.....	60
Figur 27. Sammenligning av cohesiveness (areal 1) og adhesiveness (areal 2).....	60
Figur 28. Utseende til SBG-LipFLZ og SBG-Lip0.....	61
Figur 29. Håndtest av hefteegenskapen til SBG-Lip0.....	62
Figur 30. Utseende til SBG-formuleringen før og etter tilsetning av VPG.....	62
Figur 31. Frigjøringsprofil med sammenligning mellom SBG-FLZ og SBG-LipFLZ	64
Figur 32. Den homogene fordelingen av FLZ for hver batch av SBG-LipFLZ.....	67

Sammendrag

Effektiv antifungal behandling er utfordrende og oppnå, og midler til systemisk bruk er forbundet med mange bivirkninger og interaksjoner. Lokal administrasjon er derfor å foretrekke. Målet for lokal dermal antimykotisk behandling er å maksimere deponeringen av legemiddel til huden, og samtidig unngå transdermal passasje med uønskete systemiske effekter, som bivirkninger og interaksjoner.

I denne oppgaven har vi undersøkt muligheten for å inkorporere det antimykotiske legemidlet flukonazol (FLZ) i liposomer for videre dispergering i en hydrogel dannet fra løselig beta-glukan (soluble beta-glucan (SBG)). For fremstillingen av denne liposome-i-hydrogel formuleringen (SBG-LipFLZ), ble en ny metode, nemlig "Dual Assymmetric Centrifugation" (DAC), benyttet. Første del av oppgaven innebar dermed å etablere og optimalisere metode for produksjon og karakterisering av SBG-LipFLZ og liposomene som inngikk i den (LipFLZ). DAC metoden tok utgangspunkt i tidligere publiserte resultater fra Massing et al (1), men vi ønsket å produsere større liposomer egnet til topikal anvendelse (200-300 nm). For å oppnå dette ble bl.a. ulike sentrifugeringstider prøvd ut (2, 5, 15 og 20 min), hvor 2 minutter ga ønsket liposomstørrelse. Liposomer uten FLZ (Lip0) ble også produsert som sammenligning. Og størrelsesanalyser ved bruk av PCS og analyse av tre ulike batcher viste at Lip0 hadde en noe større diameter ($258,5 \pm 0,7$ nm) enn LipFLZ ($224,7 \pm 4,2$ nm). Liposomene som ble størrelsesredusert ved DAC ble sammenlignet med tilsvarende liposomer fremstilt med bruk av sonikering og ekstrudering.

De tre størrelsesreduksjonsmetodene ga en FLZ-inkapsellering på mellom 21,9 og 27,6 %. DAC, sonikering og ekstrudering (0,4 μ m filter) ga en diameter på henholdsvis $224,7 \pm 4,2$ nm, $286,9 \pm 5,9$ nm og $375,9 \pm 27,8$ nm(1). På grunn av DAC-metodens flere fordeler og mulighet for å fremstille små mengder av liposomer på en skånsom måte, ble denne metoden brukt i videre studier. DAC erstattet også manuell røring ved sammenblanding av liposomer i SBG til den endelige formuleringen liposomer-i-hydrogel (SBG-LipFLZ), og 5 minutter ved maks hastighet (3540 rpm), ble valgt som betingelse for denne blandeprosessen. Tilfeldig prøvetaking fra liposom-i-hydrogel (SBG-LipFLZ) formuleringen fra 3 ulike batcher, viste at FLZ hadde en tilfredsstillende homogen fordeling i 3 av 3 batcher (< 2,7 % SD mellom 5 prøvepunkter). For å stabilisere SBG 2,5 %, ble det i tillegg til liposomer (Lip0 og LipFLZ) tilsatt ulike mengder glyserol (0,10 og 20 % v/v). Basert på visuell kontroll og undersøkelser

med teksturanalyse, ble 10 % (v/v) glyserol valgt for videre formuleringer. 2,5 % SBG med 10 % glyserol ble tilsatt fritt FLZ i samme konsentrasjon som tilstede i SBG-LipFLZ, og frigjøringsprofil av FLZ sammenlignet ved testing utført med Franz diffusion celler. Disse resultatene viser en ønsket forsinket frigjøring av FLZ ved tilsetning til SBG-hydrogel i form av liposomdispersjon sammenlignet med som fritt legemiddel. Dette er lovende med tanke på videre kliniske studier.

Forkortelser

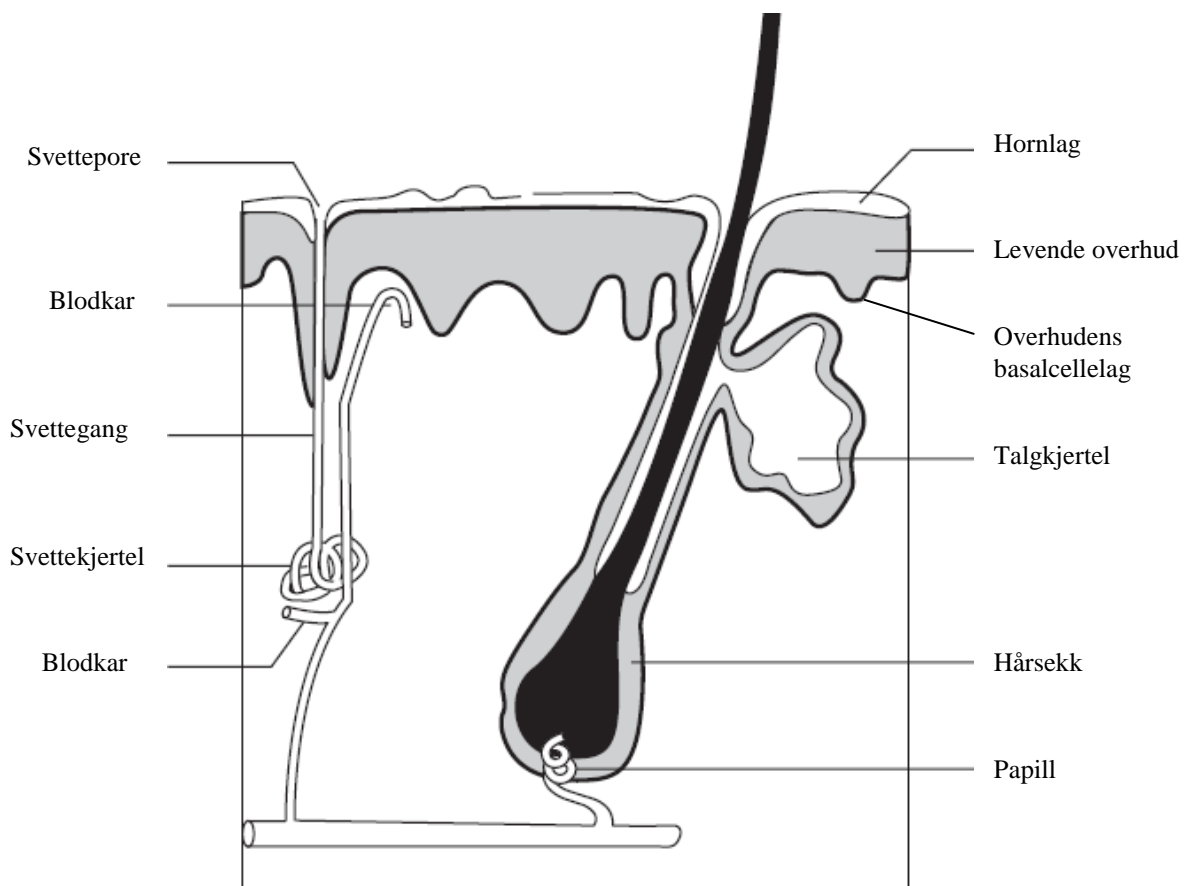
DAC	Dual Asymmetric Centrifugation
dH ₂ O	Destillert vann
DP-kopp	polyoxymetylen & Polymetylmetakrylat (Delrin & Perspex® – D&P)
EMV	Elastiske unilamellære vesikler
FLZ	Flukonazol
GLY	Glyserol
Lip0	Tomme liposomer uten virkestoff
LipFLZ	Liposomer med flukonazol
LUV	Store unilamellære vesikkler
M100-kopp	Low Density Polyetylen maks 100-kopp
M40-kopp	Low Density Polyetylen maks 40-kopp
MLV	Multilamellære vesikler
MVV	Multi Vesikulære vesikkler
PC	Phosphatidylcholine
PCS	Photon Correlation Spectroscopy
PG	Propylenglykol
PI	Polydispersitets Indeks
RP- HPLC	Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography
SBG	Soluble beta-glucan
SBG-Lip0	2,5 % SBG med 10 % GLY og 10 % Lip0 (Tomme liposomer uten virkestoff)
SBG-LipFLZ	2,5 % SBG med 10 % GLY og 10 % LipFLZ (Liposomer med flukonazol)
SUV	Små ubilamellære vesikkler
ULV	Unilamellære vesikler
VPG	Vesicular phospholipid gel

1 Introduksjon

1.1 Huden

1.1.1 Hudens oppbygging

Huden er kroppens største organ med omtrent 16 % av kroppsvekten til et voksent menneske. Hudens viktigste oppgave er å fungere som en barriere mot omverden og som organ for temperaturregulering. Det er vanlig å dele huden inn i tre lag; overhuden, lærhuden og underhuden. Overhuden kan igjen deles inn i to lag, hornlaget som er det ytterste laget og basalcellelaget (2) (Figur 1).



Figur 1. Tverrsnitt av huden og overhuden (3)

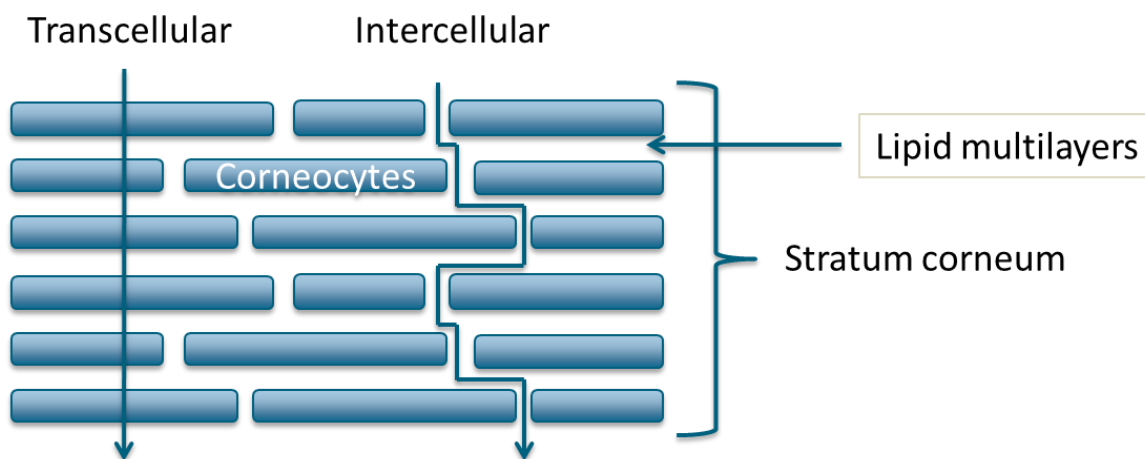
I basalcellelaget er det en konstant nydanning av keratinocytter som forflytter seg opp til hornlaget som i hovedsak består av døde keratinocytter, også kalt korneocytter. Tykkelsen på hornlaget varierer fra omkring 6 – 80 μm . Under denne forflytningen produserer keratinocytene keratin og utskiller ulike proteiner og lipider (4, 5). Keratin eller hornstoff er

en gruppe fiberproteiner som er hovedbestanddelen i overhud, negler og hår (5). Lærhuden og underhuden består blant annet av hårfollikler, talgkjertler, svettekjertler, nervefibre og kapillærer. Overhudens hornlag har en pH på omtrent 5,5. Hudens pH varierer imidlertid fra omkring 4 – 7 avhengig av lokalisasjon. Surhetsgraden minker normalt sett nedover i hudlagene, fra omkring 5 i hornlaget til omkring 7 i basallaget. Overhudens celler inneholder som nevnt keratin, i tillegg inneholder cellene blant annet fosfolipider og vann. Vanninnholdet i hornlaget varierer fra omkring 20 % til 70 % avhengig av den relative luftfuktigheten (6).

1.1.2 Hudens barriereegenskaper og hvordan forsere den med legemidler

Hudens barriereegenskaper påvirkes av mange faktorer som alder, ytre påvirkninger, hudsykdommer og sykdommer generelt. Disse faktorene påvirker blant annet hudens pH, fuktighet, fettinnhold, permeabilitet, mikroflora og temperatur. Hornlagets tykkelse er en viktig faktor for barrierefunksjonen, områdene på kroppen med tynnest hornlag har dårligere beskyttelse enn områder med tykt hornlag. Hornlagets lipofile og hydrofile egenskaper har også betydning for barriereegenskapene til huden, økende vanninnhold i hornlaget øker diffusjonen av både hydrofile og lipofile stoffer, mens økt fettinnhold øker diffusjonen av lipofile stoffer.

Transport av legemiddel gjennom hornlaget kan skje via hårsekker eller svettekjertler (engelsk: appendages), men siden disse utgjør en veldig liten andel av hudoverflaten (<0,1%), skjer det meste av transporten via transcellulær eller intercellulær diffusjon (Figur 2). Hvilke av disse veiene som dominerer er avhengig av legemidlets egenskaper. Diffusjonen begrenser seg til stoffets fordeling mellom lipofilt og vandig medium (log P), molekylmasse, pKa og polaritet (6). Dette betyr at ioniserte og sterkt polare stoffer ikke er i stand til å penetrere overhuden. Penetrasjon av ioniserbare stoffer er avhengig av stoffets pKa og hudens pH. Basiske stoffer med pKa høyere enn hornlagets pH vil kunne protoneres (ioniseres) og således ikke penetrere hornlaget. Mens sure stoffer med lavere pKa enn hudens hornlag vil kunne deprotoneres (ioniseres). I tillegg diffunderer heller ikke sterkt polare stoffer, samt store molekyler med en relativ molekylmasse over 500 Da (7).



Figur 2. Alternative ruter for transport av legemiddel gjennom hornlaget

Det benyttes flere ulike strategier til å forsere hudens barriere. Det mest vanlige er å benytte kjemiske tilsetninger i farmasøytiske preparater. Dette kan være vann, surfaktanter, alkoholer, fettsyrer, aminer med flere. Vann hydrerer celler i hornlaget som igjen øker diffusjonen av både lipofile og hydrofile substanser, mens surfaktanter kan øke diffusjonen i huden ved og ekstraherer vann fra huden. Alkoholer og fosfolipider påvirker lipidstrukturene i huden som kan øke diffusjonene av stoffer gjennom hornlaget. Alkoholer ekstraherer lipider fra hudcellene og øker den ekstracellulære lipidholdigheten, mens lipider øker lipidholdigheten i hornlaget ved å interageres med intracellulære lipider. Andre modifikatorer kan være propylen glykol som løser opp keratin, og urea påvirker lipidpakkingen og skaper diffusjonskanaler (3).

Transportveien for et legemiddel gjennom huden kan forklares som transcellulær eller intercellulær (også kalt paracellulær). Transcellulær mekanisme betyr at legemidlet transporteres gjennom cellene via ulike mekanismer. Mens intercellulær transport er passasje mellom cellene. Det er også antydnet at liposomer kan være i stand til å passere intercellulært, ved og "skvise" seg mellom cellene. En annen mulighet er når liposomet oppløses og liposomets lipider fungerer som en transportmekanisme for lipofile legemidler (8). Liposomet kan også konstrueres med en flytende kjerne av etanol som i tillegg ekstraherer lipider fra hudens celler. Elias, P.M. (1983) (9) foreslo en hypotese om "*Briks and Mortar*". Denne hypotesen går ut på at korneocytene fungerer som murstein mens dermale lipider fungerer som mørtel, og at sammensetningen av disse bestemmer permeabiliteten i huden. Lipidene holder korneocytene sammen og er en viktig faktor for barrierefunksjonen. En påvirkning av denne lipidsammensetningen kan ha betydning for penetrasjon av legemiddel inn i huden eller

gjennom huden. Ved mangel på lipider vil korneocytene ikke klebe seg like godt sammen og huden blir tørr, ru og flasse. Dette kan åpne for intercellulær passasje av legemidler og andre substanser ved at mellomrommet mellom cellene blir mer gjennomtrengelig.

Etanol er kjent som penetrasjonsfremmende modifikatorer og har i *In vitro* studier vist å fungere som en penetrasjonsfremmer med dypere deponering av legemiddel i dyrehud (10). Dette kan forklares med at etanol løser opp lipidlaget mellom cellene, eller gjør "mørtelen" mindre klebrig. Resultatet blir at mellomrommet mellom korneocytene "mursteinene" blir mer gjennomtrengelig for intracellulær transport av legemidler og andre substanser. Det også antydnet en synergieffekt av etanol og lipider kan føre til økt penetrasjon av legemiddel (11). Lipider vil øke lipidholdigheten i hornlaget ved å interagere med intracellulære lipider, som igjen kan føre til at korneocytene kleber seg bedre sammen og reduserer muligheten for intracellulær transport av legemidler. En viktig faktor i denne sammenhengen er som nevnt legemidlets polaritet, størrelse, lipofile karakter og ladning. For best mulig penetrasjon av hornlaget bør legemiddelsubstansen blant annet være nøytral og ikke ioniseres ved kontakt med huden.

1.2 Mykoser

1.2.1 Generelt om mykoser, årsaker og utbredelse

Sopper er eukaryote organismer som kan forårsake sykdom hos mennesker og dyr. Mange sopparter er naturlig forekommende i jord, luft, vann og som en del av normalfloraen hos mennesker og dyr. Soppartene som har størst betydning for sykdom og plager hos mennesker kan deles inn tre grupper; gjærsopp, muggsopp og dimorfe arter. (12, 13). Soppinfeksjoner eller mykoser kan videre deles inn i overflatiske og invasive mykoser. Invasive mykoser kan oppstå ved at soppen penetrerer slimhinner eller hud, og det er som oftest i sammenheng med nedsatt immunforsvar. Overflatiske eller topikale mykoser kan affisere hud, slimhinner, hår eller negler. En ubalanse i den normale mikroflora kan gi oppblomstring av opportunistiske sopparter, slik som gjærsoppen *Candida albicans* (14, 15).

Mykoser er svært vanlig hos mennesker med en økende insidens. Det var i 2012 estimert at omtrent 40 millioner mennesker på verdensbasis lider av soppinfeksjoner (4, 16). Mykoser oppstår som oftest hos pasienter med nedsatt immunforsvar, enten på grunn av sykdom eller som følge av bruk av immunosuppressiva. Insidensen av invasive mykoser har økt sterkt de siste 20 årene som følge av et økt antall mennesker innen risikogruppen, som blant annet inkluderer pasienter som har humant immunsviktvirus (HIV), hematologisk kreftsykdom, brannså, brukere av innvendig medisinsk utstyr, eller personer som har utført organ- eller stamcelletransplantasjon. HIV-epidemien har bidratt til økt prevalensen av invasive mykoser, og regnes som en av hovedårsakene til at infeksjonene oppstår. Opptil 80 % av HIV-infiserte pasienter utviklet invasive mykoser (17). En økning i bruk av immunosuppressive legemidler kan også sees i sammenheng med økende insidens av mykoser.

1.2.2 Dermatomykoser

Dermatomykose er en overflatisk soppinfeksjon i hud, hår eller negler som kan inndeles i tre hovedgrupper; candidas, pityriasis versicolor og tinea. Candidas er soppinfeksjon som vanligvis forekommer i gastrointestinal kanalen og vaginalt. Candidas forårsakes av gjærsoppen *Candida albicans*, som kan smitte over til hud og negler. Pityriasis versicolor er en kronisk overflatisk soppinfeksjon med utslett som forårsakes av gjærsoppen *Malazessia furfur*. Tinea forårsakes i hovedsak dermatofyttene *Trichophyton*, *Microsporum* og *Epidermophyton*. Dermatofyttene livnærer seg av nydannet keratin som produseres av keratinocytter i overhudens basallag (14, 16). Tinea er en overflatisk soppinfeksjon i hud, hår

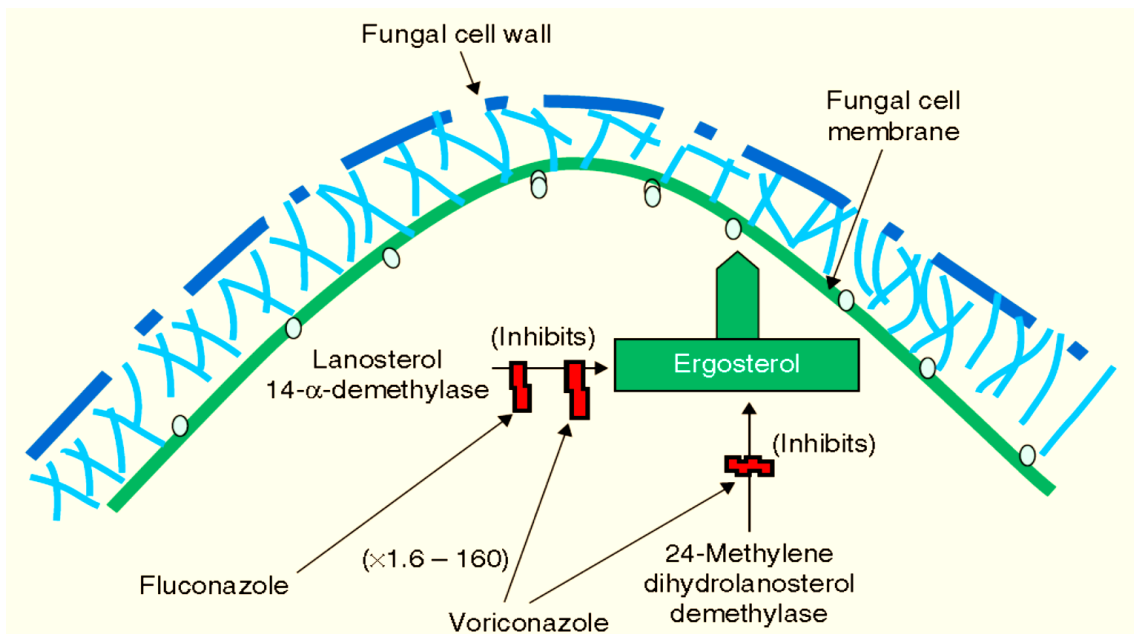
eller negler som i hovedsak forårsakes av soppene *Trichophyton*, *Microsporum* og *Epidermophyton*. Disse tre artene tilhører gruppen dermatofytter, som livnærer seg av nydannet keratin som produseres av keratinocytter i overhudens basallag. Dermatofyttene er den dominerende årsaken til overflatiske dermatomykose. De vanligste typene av dermatofytt infeksjon involverer hodebunnen (*tinea capitis*), føtter (*tinea pedis*), lyske (*tinea cruris*), negler (*tinea unguium* eller onkomykose) og typiske overflatiske hudinfeksjoner (*tinea corporis*) som involverer overhuden.

Mykoser i hud og negler er et vanlig globalt problem. Prevalensen av overflatiske mykoser viser at 20 – 25 % av verdens befolkning har hud mykoser. Utbredelsen av dermatomykoser varierer geografisk og har et bredt spekter av miljømessige og kulturelle faktorer. Utbredelsen av hudmykoser er større i tropiske områder enn ellers i verden, som har sammenheng med at dermatofytter trives i et varmt og fuktig miljø (18).

1.2.3 Antimykotisk behandling

Topikale mykoser kan behandles med antimykotika beregnet for systemiske eller lokal administrasjon. Systemisk behandling av lokale mykoser utføres når lokal behandling ikke gir tilfredsstillende resultater eller av andre grunner er uegnet. Andre årsaker kan være pasienter med nedsatt immunforsvar eller som er plaget med kronisk infeksjoner. Per i dag har vi fire klasser av antimykotika til systemisk bruk tilgjengelig, hvorav åtte midler er registrert i Norge. Virkningsmekanismen er noe forskjellig, men felles for de fleste antimykotiske legemidlene er at de hemmer soppens ergosterolsyntese som er essensiell for soppens membranfunksjon. Polyenene (Amfotericin B) virker ved å binde seg til ergosterol i soppens cellemembran og danner porer gjennom cellemembranen som så resulterer i et kontinuerlig tap av ioner fra cellen. Echinocandinene (kaspofungin, anidulafungin) virker ved å hemme β -1,3- glukansyntetase slik at β -1,3-D- glukosyl ikke dannes i celleveggen. Pyrimidin (5-flucytosin) hemmer soppens transkripsjon og translasjon ved å inkorporere seg inn i soppens DNA og RNA.

Det antimykotiske midlet vi har anvendt i vår studie er flukonazol (FLZ), og dette legemidlet tilhører azolene, samme klasse som virkestoffene virkonazol, itrakonazol og posakonazol. Azolene hemmer cytokrom P450 – avhengige enzymet 14- α -demetylase (CYP51) som fører til hemming av ergosterolsyntesen (Figur 3)(19-21).



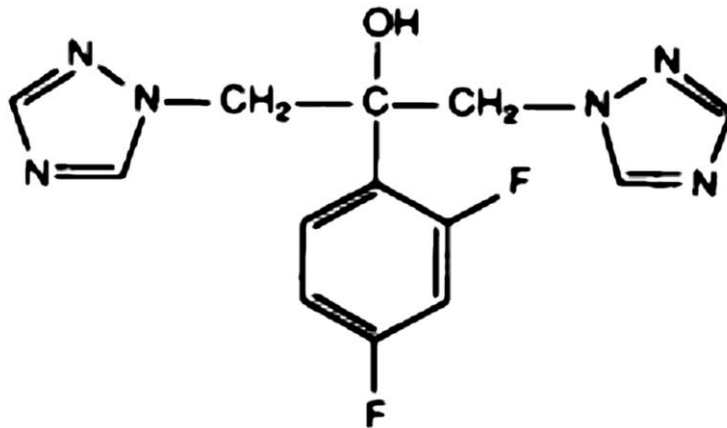
Figur 3. Virkningsmekanisme for azolene:
Å hemme 14- α -demetylase som fører til hemming av ergosterolsyntesen (21)

1.2.4 Bivirkninger og interaksjoner

Antimykotiske legemidler til systemisk bruk er forbundet med mange bivirkninger og interaksjoner, som hodepine, diarè, kvalme/oppkast og utslett. Azolene, og da særlig triazolet FLZ, har en kompleks interaksjonsproblematikk. Inhibering av enzymet cytokrom P450 3A4 påvirker nemlig metabolismen av en rekke legemidler. Bruk av FLZ kan blant annet inhibere metabolismen av warfarin, med påfølgende økt plasmakonsentrasjon og økt blødningsrisiko. Cytokrom P450 3A4 kan også indusere eller redusere plasmakonsentrasjonen til FLZ. Topikal anvendelse av FLZ for lokal virkning gir mulighet for å redusere disse systemiske bivirkninger med interaksjonsproblematikk, men lokale bivirkninger knyttet til applikasjonssted som svie, kløe, irritasjon og utslett kan likevel oppstå (19, 20, 22, 23)

1.2.5 Flukonazol

Flukonazol er et syntetisk fremstilt triazol (Figur 4) med bredspektret antimykotisk effekt, og som brukes mot de fleste soppinfeksjoner. FLZ er fremstilt som et systemisk aktivt triazol beregnet for topikale og systemiske soppinfeksjoner. Legemidlet er følgelig bare tilgjengelig som per orale og intravenøse formuleringer (24, 25).



Figur 4. Den kjemiske strukturen til flukonazol (triazol) (25)

FLZ fremstår som et hvitt krystallinsk pulver som er lettløselig i organiske løsemidler, og tungtløselig i vann (5 mg/mL). De to tirazolringene i FLZ medvirker til at legemidlet er mindre lipofilt sammenlignet med andre azoler (26). Den lave molekylvekta 306,27 g/mol, lav affinitet for plasmabinding og vannløselighet, gjør legemidlet tilgjengelig for oral eller intravenøs absorpsjon. FLZ har halveringstid på 25 timer som er betraktelig lengre sammenlignet med andre azoler (25). Den lange halveringstiden forenkler administrasjonen, ved at det kan administreres en dose per dag. Som nevnt tidligere, er legemidlet forbundet med en rekke legemiddelinteraksjoner, samt vanlige bivirkninger som kvalme, magesmerter, diaré, oppkast og hudutslett (24).

1.3 Huden som administrasjonssted

1.3.1 utfordringer ved dermal administrasjon

Hovedfordelen med dermal terapi er muligheten til å minimalisere bivirkninger og interaksjoner. Det finnes en rekke konvensjonelle antifungale formuleringer som krem, gel, og liniment. For mange av disse er det rapportert begrenset terapeutisk effekt, systemisk absorpsjon og hudirritasjon (27). Målet for dermal antimykotisk behandling er å maksimere deponeringen av legemiddel til huden, og samtidig unngå transdermal passasje med uønskete systemiske effekter, bivirkninger og interaksjoner. Ved antimykotisk behandling er det avgjørende at legemidlet passerer hornlaget med en tilstrekkelig konsentrasjon for å kunne utøve virkning (4, 28). For effektiv antifungal behandling må konsentrasjonen være over minimum hemmende konsentrasjon (MIC). I tillegg må MIC opprettholdes i tidsperioden som er nødvendig for effektiv behandling (28).

Til å øke permeabiliteten gjennom hornlaget benyttes ulike strategier. Mekanismene for økt diffusjon involverer følgende to hovedprinsipper: 1. Endre hudens kjemiske eller fysiske miljø. 2. Tilsetning av stoffer som fremmer diffusjonen/permeabilitet av legemidlet. Kjemiske modifikatorer i ulike formuleringer kan både øke eller hemme permeabiliteten gjennom hornlaget. Modifisering kan øke løseligheten av legemidlet i huden eller endre på hudens lipidstruktur, eller begge deler samtidig. Formuleringen bør heller ikke degradere eller på annen måte modifisere legemidlet på en slik måte at effekten opphører eller avtar. Mengde legemiddel som penetrerer hornlaget avgjøres blant annet av mengden oppløst legemiddel, kontakt med huden og formuleringens viskositet. utfordringen med hensyn til dette er å få en kontrollert frigjøring i overhudens basallag, og samtidig forhindre transdermal passasje med risiko for systemiske virkninger (3, 29).

1.3.2 Konvensjonelle topikale antimykotiske doseringsformer

Av antimykotika til utvortes bruk, finnes det tre hovedklasser (tabell 1). Azoler, pyrimidiner og alylaminer. Topikale legemidler er et generelt begrep og omfatter legemiddelformuleringer som kan appliseres i øye, nese, øre, rektum, vagina, hud og så videre. Begrepet kutan administrasjon begrenser seg til hud, negler og hår. Konvensjonelle topikale legemiddelformer omfatter krem, pudder, salver, sjampo, geler, pastaer, medisinsk neglelakk, skum, stifter, medisinsk plaster, liniment, hudspray med flere. I tabell 1 er det listet opp de topikale formuleringene som har markedsføringstillatelse i Norge (22).

Tabell 1. Antimykotika til utvortes bruk

Virkestoff	Legemiddelform	Generelle indikasjoner
Amorolfinhydroklorid ^c	Medisinsk neglelakk	Onkomykoser (dermatofytter)
Ciclopiroksolamin ^b	Sjampo	Seboreisk dermatitt i hodebunnen
Ciklopiroks ^b	Medisinsk neglelakk	Onkomykoser (dermatofytter)
Ekonazolnitrat ^a	Krem Pudder Vagitorie	Inflammatoriske mykoser Alle dermatomykoser Vaginal candidiasis
Ketokonazol ^a	Sjampo Krem	Seboreisk dermatitt i hodebunnen Seboreisk eksem/dermatitt
Klortrimazol ^a	Krem Vaginalkrem Vaginaltablett Vagitorie	Dermatomykoser Pityriasis versicolor Erythrasma ¹ Vaginal candidiasis
Mikonazolnitrat ^a	Krem	Dermatomykoser Pityriasis versicolor Erythrasma
Terbinafin ^c	Gel	Dermatomykoser Pityriasis versicolor
Terbinafinhydroklorid ^c	Hudspray Krem Liniment Tablett	Dermatomykoser Pityriasis versicolor

^aAzoler. ^bpyrimidiner. ^calylaminer.

¹ Erythrasma er en bakterieinfeksjon som også behandles med antibiotika, for eksempel erytromycin.

1.4 Hydrogeler

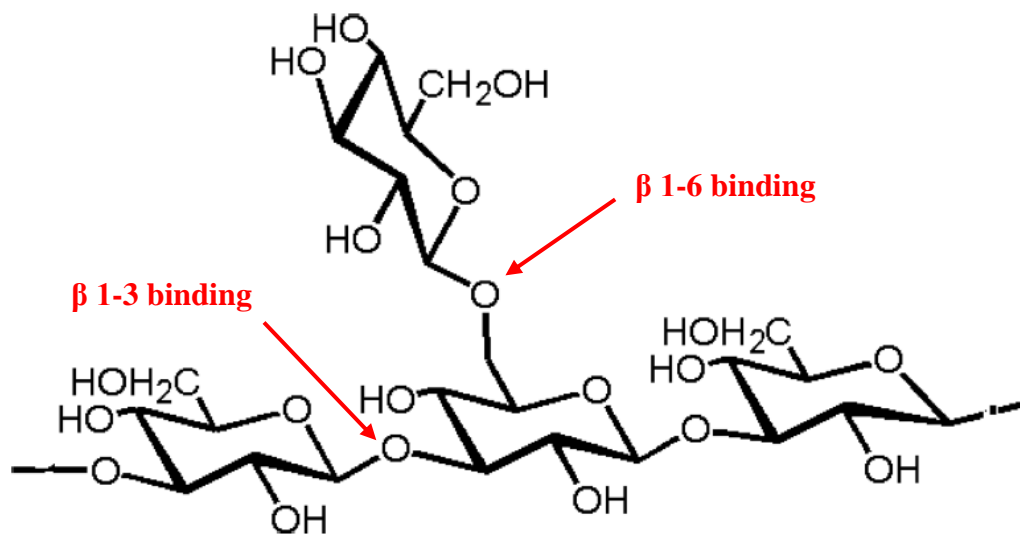
1.4.1 Generelt om hydrogeler

Hydrogeler består av tredimensjonale polymernetttverkstrukturer hvor vann er inkorporert i nettverket. Polymernettverkene holder vannet på plass og gir gelene deres karakteristiske fasthet. Forenklet dannes hydrogeler når vann tilsettes uløselig polymerer i tørr tilstand, som sveller til et bestemt volum (30). Det er vanlig å klassifisere hydrogeler på bakgrunn av hvilke type polymer som er benyttet som geldanner; naturlige, syntetiske eller semisyntetiske. Naturlige hydrogeler består av polymerstrukturer isolert fra naturen. Eksempler på slike strukturer kan være beta-glukaner som cellulose og chitosan (31). Carbopol er en hydrogel basert syntetisk akryliske og sure polymerer, som danner gel ved nøytralisering i vann (32). Hva som egner seg best av naturlig eller syntetiske hydrogeler avhenger blant annet av anvendelsen, eller egenskapene til strukturer som eventuelt er inkorporert i gelen. Naturlige hydrogeler fremheves som biokompatible, biologisk nedbrytbar og lite toksisk (30).

Hydrofile geler eller hydrogeler er vannbaserte og egner seg til applisering på blant annet fuktige hudpartier og lett lar seg vaske av. Hydrogel til dermatologisk bruk har flere fordeler og egenskaper sammenlignet med en del andre dermale produkter. Estetisk utseende og funksjonalitet er viktige egenskaper til dermale produkter beregnet for selvadministrering. Hydrogeler er vannbaserte og egner seg til applisering på blant annet fuktige hudpartier, og lett lar seg vaske av. Hydrogeler fremstår som brukervennlige ved å være lite klissete, avgir ikke flekker på klær, og er lett å påføre huden. I tillegg oppleves de som kjølede og mykgjørende (33). Det er en økt interesse for hydrogeler til sårforbinding, som har vist seg å kunne være nyttig til behandling av infiserte sår. Det høye vanninnholdet og evnen til å oppholde seg på huden over tid kan bidra til forbedret sårtilhealingen. Lav grenseflatespenning, høy molekyl- og oksygen permeabilitet samt god fuktighetsgivende- og mekaniske egenskaper, er viktige faktorer som bidrar til forbedret sårtilhealing (34). Dermal hydrogeler egner seg også som leveringssystem for legemidler ved å inkorporere ulike substanser i gelens tredimensjonale nettverk (matriks). Hydrogelens egenskap som et reservoar med legemiddel inkorporert i matriks fungerer ved forlenget frigjøring, som kan være fordelaktig med tanke på terapeutisk effekt (35).

1.4.2 Løselig beta-glukaner

Beta-glukaner (β -glukaner) er en utbredt type polysakkarider i naturen og finnes i planter, alger, bakterier, sopp og gjær. Naturlige β -glukaner isolert fra celleveggen til sopp og bakegjær er ikke vannløselig, men et makromolekyl bygget opp av druesukker, som er et monosakkarid med det kjemiske navnet D-glukose. Figur 5 illustrerer strukturen til β 1-3/1-6 glukan som består av D-glukose hektet sammen med β 1-3 bindinger til polysakkaridet β 1-3-D glukan, med sidegrener av tilsvarende polysakkarider bundet i posisjon β 1-6. Naturlige β 1-3/1-6 glukaner er ikke løselig i vann, og polymerstruktur stabilisert av intramolekylære hydrogenbindinger (36).



Figur 5. Strukturen til β 1-3/1-6 glukan fra gjær, som viser β 1-3 binding og sidegrener med β 1-6 binding (36)

Generelt anvendes beta-glukaner innenfor kosmetikk, kosttilskudd, mat og farmasøytisk industri blant annet som fortykningsmiddel, geledannende middel og til en rekke medisinske formål. Beta-glukan som polymerstruktur kan benyttes til å danne en tiksotrop hydrogel med et tredimensjonalt nettverk. I tillegg av å inneha egenskapene til hydrogel kan beta-glukan også påvirke patologiske tilstander på en positiv måte. Det er vist at β 1-3/1-6-glukan i seg selv kan være effektiv mot diabetisk fotsår, ved og stimulere til økt makrofagaktivitet (37). I tillegg til den generelle sårhelende egenskapen som hydrogelen besitter, vil det være mulig og ytterligere modifiseringer ved å inkorporere diverse legemiddelsubstanser etter ønsket formål.

For å kunne benytte β -glukaner til medisinske formål er man avhengig av å øke løseligheten. Det benyttes flere kjemiske modifikasjoner for å øke løseligheten til β 1-3/1-6 glukan fra sopp og gjær. Metodene går i hovedsak ut på derivatisering og depolymerisering av β 1-3 glukan strukturen samt å øke frekvensen av β 1-3 glukan sidekjerder. Ulempen med kjemiske derivater er at de kan påvirke den biologiske aktiviteten til β -glukan (36, 38).

Tromsø firmaet Biotec Pharmacon ASA, har utviklet en metode uten bruk av kjemiske modifikasjoner til å øke løseligheten til β 1-3/1-6 glukan, ekstrahert fra bakegjær (*Saccharomyces cerevisiae*). Firmaet har gitt produktet sitt navnet “soluble beta–glucan” (SBG) (39). SBG 2,5 % er vannløselig og kan rekonstrueres til en tiksotropisk hydrogel.

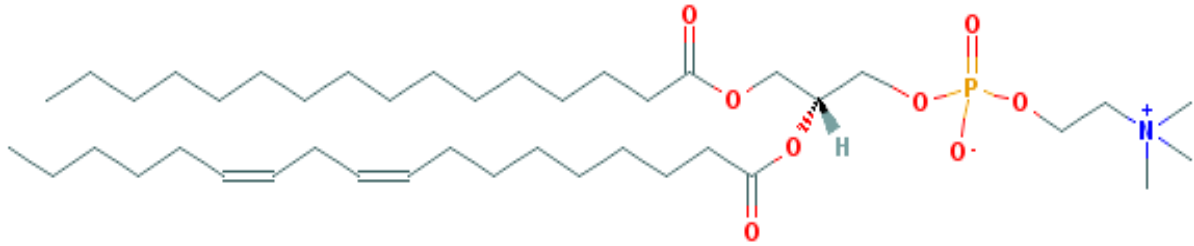
En fordel ved å benytte den bioaktive hydrogelen SBG er som nevnt forbedret sårtilhealing. Sår i sammenheng med dermatomykoser, spesielt med sprekkdannelse mellom tær er vanlig. Egenskapene til beta β 1-3/1-6 glukan i kombinasjon med antimykotisk behandling kan dermed være fordelaktig.

1.4.3 Liposomale hydrogeler

Liposomer

Liposomer er biologisk nedbrytbare nano-vesikler som kan benyttes til å innkapsle hydrofile legemidler i det vandige hulrommet, eller inkorporere lipofile legemidler i lipidmembranen. Strukturelle modifikasjoner i lipidsammensetningen kan ha til hensikt å endre på liposomets elastisitet, øke inkorporeringseffektiviteten eller minimalisere lekkasje av legemiddel. Strukturelle modifikasjoner og tilsetninger kan også gi en penetrasjonsforsterkende effekt i huden (40). Liposomer består i hovedsak av vann og fosfolipider, der fosfolipidene utgjør liposomets membran (Figur 7).

Et ofte benyttet fosfolipid til å fremstille liposomer er fosfatidylkolin (PC) fra soyabønner eller egg. Fosfatidylkolin er et naturlig fosfolipid som utvinnes ved tørking og dehydratisering av hydratisert råolje fra soyabønner eller egg (41). Fosfatidylkolin er et nøytralt lipid som består av en hydrofob hale og en hydrofil hodegruppe som består av glyserol, fosfat og kolingruppen (Figur 6).

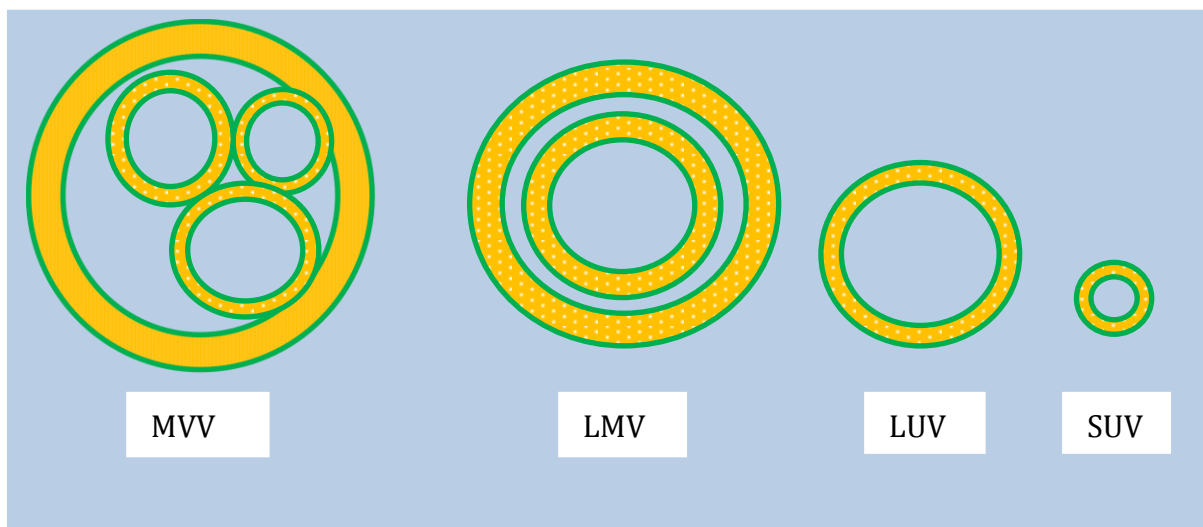


Figur 6. Den kjemiske strukturen til fosfatidylkolin (PubChem:97281-47-5)

Liposomer dannes ved at fosfolipidene orienterer seg med den hydrofile delen mot vannfase og den lipofile delen lengst mulig vekk fra vannfasen. Dette gjør at den lipofile delen på fosfolipidene vil orientere seg mot hverandre slik at de sammen danner et mer lipofilt miljø. Ved hydrering vil fosfatidylkolin spontant danne større multilamellære vesikler (MLV) og multivesikulære vesikler (MVV) (Figur 7). Liposomer blir vanligvis klassifisert på grunnlag av lipidsammensetning, størrelse og antall lameller (42).

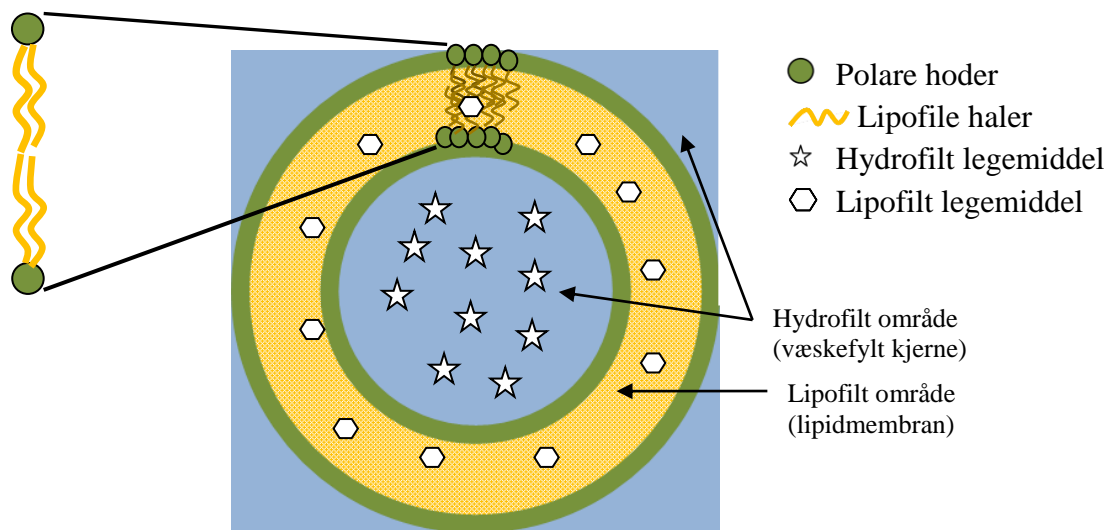
Klassifisering av liposomer på bakgrunn av antall lameller og størrelse:

- Små unilamellære vesikler (SUV) 25 – 50 nm i diameter (figur 7).
- Store unilamellære vesikler (LUV) 50 – 500 nm i diameter. (figur 7).
- Store multilamellære vesikler (LMV) 500 – 10 000 nm i diameter (figur 7).



Figur 7. Illustrasjon av vesikkeltypene

Figur 8 under illustrerer hvordan hydrofile legemidler kan innkapsles i det vandige hulrommet, og hvordan lipofile legemidler kan inkorporeres i lipidmembranen til liposomene



Figur 8. Illustrasjonen viser et liposom og hvordan lipofile legemidler kan inkorporeres i lipidmembranen, og hvordan hydrofile legemidler kan innkapsles i liposomets vandige kjerne. Illustrasjonen til venstre er et utsnitt fra lipidmembranen med lipidene orientert med de polare hodene mot vannfasen, og med de lipofile halene orientert mot hverandre.

Hva som bestemmer liposomets stabilitet og inkorporeringseffektivitet avgjøres blant annet av lipidsammensetningen. For eksempel benyttes propylen glykol (PG) for å gjøre liposomet mer elastisk, mens kolesterol benyttes for å øke inkorporeringseffektiviteten av lipofile legemidler, samtidig som det gir lipidmembranen en mer rigid struktur (43).

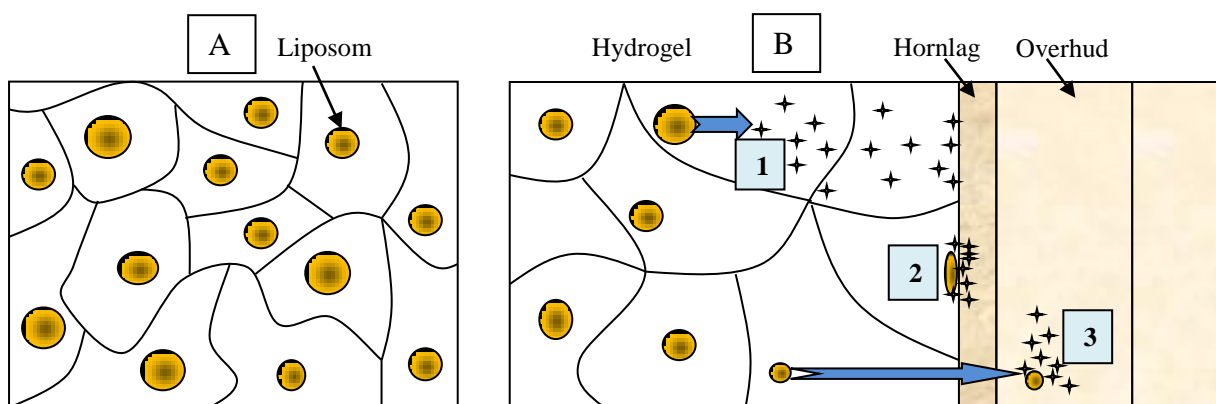
Hydrogel som vehikkel

Bruk av hydrogel som vehikkel har de reologiske egenskapene som trengs for å kunne forbedre lagringsstabiliteten til liposomer. Hydrogelens høye viskositet fungerer med å holde liposomene på plass i gelens matriks, og samtidig sikrer en homogen fordeling (44).

Stabiliteten forhindrer at liposomene aggregerer og beholder den opprinnelige størrelsen.

Liposomer administrert i form av en suspensjon er forventet å aggregerer med påfølgende ødeleggelse og uttørking på huden (45). En hydrogel vil bevare hudens fuktighet og gradvis frigi liposomer hel til huden og avsette legemidlet.

Hydrogel har vist seg å gi en vedvarende og forlenget frigivelse av legemiddel, som ytterligere kan forbedres ved å benytte liposmer (45). Det er foreslått flere mulige mekanismer for hvordan legemiddel frigis i en liposombasert hydrogel. Figur 9 illustrerer hvordan liposom tenkes inkorporert i hydrogelens matris, og mulige frigjøringsmekanismer av legemiddel fra liposom til hud. Frigjøring av legemiddel kan foregå som lekkasje fra liposom inne i gelen (Figur 9 B, mekanisme1) hvor legemidlet beveger seg mot huden i en bestemt hastighet. Den andre muligheten er at liposomet beveger seg til huden og avsetter legemidlet i huden (Figur 9 B, mekanisme 2), eller penetrerer huden og avsetter legemidlet i dypere hudlag (Figur 9 B, mekanisme 3) (35).



Figur 9. Illustrasjon av liposomer inkorporert i hydrogelens tredimensjonale polymerstruktur eller matris (A). **1- Frigjøring** av legemiddel fra liposom inne i gelens matris hvor legemidlene beveger seg mot hudens hornlag (B). **2 – Liposom** kommer i kontakt med hudens hornlag, går i oppløsning og frigjør legemiddel til hornlaget (B) **3- Liposomet** penetrerer hornlaget og frigjør legemiddel i dypere hudlag (B).

1.4.4 DAC i fremstilling av liposomer-i hydrogel

Vi har i denne oppgaven latt oss inspirere av Massing og hans medarbeidere (1) som i sin publikasjon har beskrevet dual asymmetric sentrifugering (DAC) som en rask og enkel metode for fremstilling av små mengder liposomer i en lukket beholder.

DAC skiller seg ut fra vanlig sentrifugering ved at prøvebeholderen går rundt sitt eget senter og i motsatt retning i forhold til sentrifugens hovedretning (Figur 10) (1). For å få en effektiv utnyttelse av de resulterende homogeniseringskreftene har det vist seg å være viktig at prøven klebes til prøveholderen, og dermed er viskøse formuleringer i form av mer konsentrerte liposomedispersjoner, såkalte vesikulære fosfolipidgeler (VPGs) egnede mellomprodukter i denne liposomfremstillingen. Det her nemlig viste seg at mer flytende liposomedispersjoner

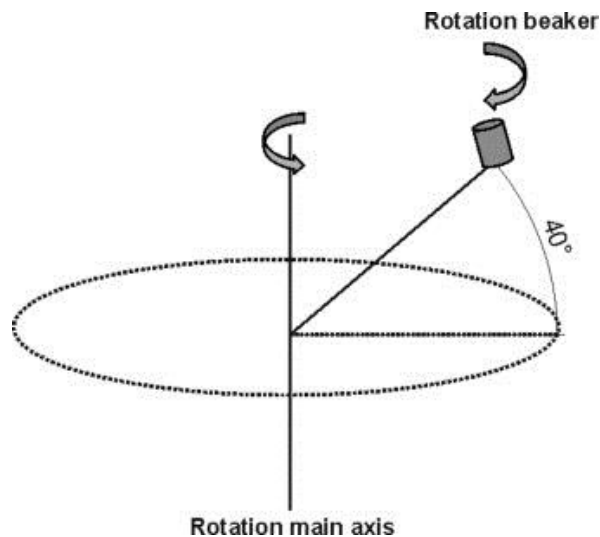
ikke får utnyttet homogeniseringskreftene påført gjennom den omvendte rotasjonen til prøveholderen. VPG er ikke en ekte gel, men har en konsistens som ligner gel eller salve (46).

For å øke homogeniseringskreftene av DAC ytterligere brukte også Massing et al (1) glasskuler. Å benytte DAC og injeksjonsglass til størrelsesreduksjon av vesikler er en forholdsvis ny metode studert av Massing et al (2008) (1). Studien tok for seg faktorer som kan ha innvirkning på vesikkelstørrelsen ved å benytte DAC. Lipidkonsentrasjon, sentrifugeringstid, sentrifugeringshastighet og mengde tilsatt glasskuler ble evaluert. Resultatene viste at vesikkelstørrelsen reduseres i takt med økt lipidkonsentrasjon, for så å flate ut når konsentrasjonen passerer ca. 40 %. En gradvis økning i sentrifugehastighet reduserte vesikkelstørrelsen for så å flate ut over 2500 rpm. Konsentrasjon glasskuler hadde også innvirkning på DAC tiden som er nødvendig for å redusere vesikkel størrelsen. For å få oppnå en effektiv størrelsesreduksjon, viste studien at det burde tilsettes minst 25 % glasskuler for å oppnå ønsket resultat. Jo større mengde glasskuler, jo mindre tid er nødvendig å bruke (1). Vesikkelstørrelsen reduseres ved at glasskulene utøver en skjærekraft mellom injeksjonsglassets vegg og lipidblanding, som i metoddelen er omtalt som en halvfast vesikulær fosfolipid gel (VPG).

Fordeler med DAC- metoden er at den er enkel og reproducerbar metode for størrelsesreduksjon av liposomer. Metoden kan i tillegg benyttes til å lage homogene blandinger av ulike substanser, eller en kombinasjon av både størrelsesreduksjon og homogenisering i en og samme operasjon. Metoden muliggjør det også mulig for fremstilling av liposomer under aseptiske forhold, ved at den kan foregå i lukket beholder.

En vesikkelstørrelse på om lag 200-300 nm betraktes som optimal størrelse for dermal administrasjon av legemiddel. Vesikler i dette størrelsesområde er forventet å gi størst deponering, og høyeste legemiddelkonsentrasjonen til dypere hudlag. Store vesikler ser ut til å gi en hurtigere frigjøring av legemiddel sammenlignet med mindre vesikler, noe som er uønsket av hensyn til forlenget legemiddelfrigivelse. Samtidig ser det ut til at store vesikler har større inkorporeringseffektivitet av legemiddel, som igjen kan være fordelaktig med tanke på utbytte og lokal effekt på virkestedet (45). Liposomene bør heller ikke være for små siden det øker muligheten for transdermal passasje av legemiddel, som igjen kan gi uønskete systemiske bivirkninger. Liposomer produsert med DAC tidligere har vært tiltenkt intravenøs administrasjon og dermed mindre enn det som er ideelt for topikal administrasjon.

Siden geler også har den ideelle viskøse konsistensen med tanke på å oppnå en effektiv blande-prosess i DAC var også tanken at DAC kunne brukes til å utføre innblanding av liposomer og andre tilsetningsstoffer i vår endelige topikale formulering, og erstatte manuell røring.



Figur 10. Illustrasjon av prinsippet med dual asymmetrisk sentrifugering (DAC) (1)

1.4.5 Liposomer og antimykotika (*In vivo* studier)

Hovedfordelene med liposomer som “delivery system” for antimykotiske midler som FLZ er muligheten for å løse tungtoppløselige legemidler, samt gi en forlenget og kontrollert legemiddelfrigjøring, en såkalt “sustained release effekt”. Liposomer kan i tillegg fungere som legemiddelreservoar, og gi en penetrasjonsmodifiserende effekt, samt beskytte legemidlet mot degradering. Liposomer vil med forlenget og kontrollert frigjøring redusere legemiddelkonsentrasjonen som trengs for å oppnå terapeutisk effekt (47).

Flukonazol (FLZ) i fast lipidnanopartikkel (SLN) har *in vivo* påvist forbedret antifungal effekt på hud hos albinrotter infisert med *C.albicans* (48). Liposomer har ikke samme strukturelle oppbygning som SLN, som mangler flytende fase. Uansett så kan SLN på sett og vis sammenlignes med liposomer ved at den innehar noenlunde de samme egenskaper med tanke på forlenget og kontrollert legemiddelfrigivelse. Studien tok for seg fire ulike komposisjoner av FLZ i SLN som ble sammenlignet med fritt FLZ i vandig løsning. Resultatene fra denne

studien viste at FLZ i SLN kan gi forbedret antifungal effekt sammenlignet med fritt FLZ i vanlig løsning. I samme studie ser det også ut til å være en sammenheng mellom penetrasjon, frigjøring, partikkelstørrelse for SLN, samt prosentvis inkorporeringseffektivitet (EE %). Høy inkorporeringseffektivitet ga lav penetrasjon gjennom huden, forlenget legemiddelfrigjøring. Optimalisering av partikkelstørrelse ser dermed ut til å være avgjørende for legemidlet antifungale effekt *in vitro* og *in vivo* (48).

Forbedret antifungal effekt med liposomer er også rapportert i en tilsvarende *in vivo* studie, med *C. albicans* infiserte albinorotter. I studien ble FLZ dispergert i gel sammenlignet med FLZ i SLN- i gel. Resultatene viste en signifikant forbedret antifungal effekt hos dyrene som fikk FLZ i SLN- i gel sammenlignet med fritt FLZ i gel (49).

Elastiske vesikler har også vist seg å være lovende. I en *in vivo* studie ble antifungal aktivitet mot dermatofyten *Microsporum* studert på hud til gris. Det ble benyttet griseofulvin innkapslet i elastiske multilamellære vesikler (MVV). Resultatene i studien viste at MVV sannsynligvis har evnen til å penetrere hornlaget, samt ned i hårsekkene. Placebogruppen hadde etter 10 dager fremdeles sopp i hårsekkene (50).

Størrelsen på liposomene kan også ha betydning for antifungal effekt. I et forsøk på å finne en optimal liposomstørrelse for frigjøring og deponering av legemiddel i huden, utførte Du Plessis et al. (1994) (51) en *in vitro* diffusjonsstudie. Målet var å undersøke hvilken rolle liposomstørrelsen hadde for penetrering og legemiddeldeponering i huden. Det ble benyttet fosfatidylkolin med kolesterol og sulfat inkorporert i lipidmembranen og liposomene var merket med cyklosporin-A. Resultatene viste at størrelsen på liposomene kan ha betydning og at det kan være en optimal størrelse. Studien gir imidlertid ikke et entydig svar på om partikkelstørrelsen har betydning på hvor dypt liposomene penetrer huden. Ved senere studier ble det konkludert med at SUV gir mindre deponering inn i huden enn LUV (52). Imidlertid avtok deponeringen når liposomene ble større, noe som også indikerer en optimal liposomstørrelse med tanke på deponering inn i huden.

2 Formålet med studien

2.1 Formål

Formålet med denne oppgaven har vært å utvikle en liposome-i-hydrogel formulering med det antimykotiske legemidlet flukonazol (FLZ) som aktiv ingrediens. Til å fremstille disse formuleringene ble “Dual asymmetric centrifugation” (DAC) valgt som metode, og første del av oppgaven har dermed vært å utvikle og optimalisere en egnet metode for fremstilling av liposomene, og for dispergering av liposomene og andre tilsetningsstoffer inn i hydrogelen ved bruk av DAC. Vi ønsket også å undersøke potensialet til løselig beta-glukan (2,5 % SBG) som hydrogel-vehikkel for vår formulering. Vår SBG-hydrogel-formuleringen skulle videre optimaliseres og/eller karakterisert med tanke på teksturegenskaper, homogen fordeling av FLZ, utseende og konsistens. Etter optimalisering av formuleringen ønsket vi å undersøke om liposomer-i-SBG-hydrogel gir forlenget og mer kontrollert frigivelse av FLZ sammenlignet med løst FLZ i SBG-hydrogel uten liposomer.

3 Materiale og metode

3.1 Oversikter over materiale brukt i studien

3.1.1 Kjemikalier og reagenser

Tabell 2. Kjemikalier og reagenser.

Kjemikalium/reagens	Produsent
0,22 % Ammoniummolybdat (tetrahydrat)	Merk KGaA, Tyskland
30 % Hydrogenperoksid	Merk KGaA, Tyskland
36,8 N svovelsyre	May & Baker LTD, Storbritannia
96 % Etanol	NMD A/S, Norge
Acetonitril	Sigma – Aldrich GmbH, Tyskland
Fiske & SubbaRow	Sigma – Aldrich GmbH, Tyskland
Fosfat standardløsning 0,65 mM	Sigma – Aldrich GmbH, Tyskland
Glyserol	Sigma- Aldrich GmbH, Tyskland
Metanol	Sigma – Aldrich GmbH, Tyskland
Propylenglykol	NMD A/S, Norge
Flukonazol	Sigma – Aldrich GmbH, Tyskland
Soya fosfatidylkolin (Lipoid S – 100)	Lipoid GmbH, Tyskland
Løselig beta - glukcan 2,5 % (2,5 %SBG)	Biotec Pharmacon, Tromsø, Norge

3.1.2 Programvarer

Tabell 3. Programvarer

Utstyr	Programvareversjon	Produsent
HPLC	Millennium	Waters, USA
PCS	C-370 V1.51	NICOMP Particle Sizer Systems, USA
Tekstur analyser	6.1.4.1	Stabile Micro Systems, Storbritannia
Titerplateleser	SoftMax Pro V5	Molecular Devices, USA
Zetasizer	6.01	Malvern Instruments, Storbritannia

3.1.3 Instrumenter og utstyr

Tabell 4. Instrumenter og utstyr.

Utstyr	Merke	Produsent
Analysevekt	Sartorius BP 211D	Sartorius DWS, USA
Analysevekt	Sartorius LP 620S	Sartorius DWS, USA
Asymmetrisk sentrifuge	SpeedMixer DAC 150 FVZ	Hauschild & Co KG, USA
Brune injeksjonsglass (100 ml)		Ardagh Glass Werk Bad Münders
Dynamisk laser defraktometer	Particle sizer modell 370	NICOMP Particle Sizer Systems, USA
Ekstruderingsfilter (0,4/0,8 µm)	Millipore®	Merck Millipore KGaA, Frankrike
Franz diffusions cells	Franz diffusions cells	PermeGear, USA
HPLC C-18 kolonne	Xterra®	Waters, USA
HPLC separasjonsmodul	Waters 2690	Waters, USA
HPLC-UV/VIS detektor	Waters 996	Waters, USA
LAF - benk	Biocap 189 2000	Erlac, Frankrike
Mikroskop	Axioskop® 40 pol	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Tyskland
Milli-Q filter (0,22 µm)	Millipak® 40	Merck Millipore KGaA, Frankrike
pH meter	Metrom 744 pH meter	Metrohm Nordic AS, Norge
Polyamidmembran	PAM 0.2 µm	Sartorius AG, Tyskland
Rotavapor	BÜCHI Rotavapor R-124	BUCHI Labortechnik AG, Sveits
Sonikator	Sonics VCX 500-220 V	Sonics & Materials, Inc, USA
Sprøytefilter (0,2 µm)	Acrodisc®	PALL Life Sciences, USA
Teksturanalyserer	TA XT Plus	Stable Micro Systems, Storbritannia
Titerplateleser	Spectra max 190	Molecular Devices, USA
Ultrasentrifuge	Beckman L8-70M	Beckman, USA
Vakumkontrollenhet	BÜCHI Vacuumcontroller B-721	BUCHI Labortechnik AG, Sveits
Vakumpumpe	BÜCHI Vacumpump V-500	BUCHI Labortechnik AG, Sveits
Vannbad	BÜCHI Waterbath B-480	BUCHI Labortechnik AG, Sveits
Varmeskapp	Fermaks TS856	Fermaks, Bergen, Norge
Zetasiser nanoseries	Folded capillary cells DTS 1060	Malvern Instruments, Storbritannia
Zetasizer	Nano-Z	Malvern Instruments, Storbritannia
Vortexer	Heidolph Reax Vortex Mixer	Thermo Fisher Scientific inc, USA

3.2 Metode

Liposomene ble fremstilt ved bruk av filmhydreringsmetoden. Lipidene og andre lipofile stoffer, som lipofile legemidler blir da først løst opp i organiske løsemiddel. Det organiske løsemidlet blir deretter fjernet ved avdampning, slik at det dannes en tynn lipidfilm, som skal danne lipidmembranen ved videre hydrering med buffer eller destillert vann (dH₂O). Etter hydrering dannes større liposomer (MLVs), som størrelsesreduert til ønsket størrelse. Vi har i hovedsak benyttet Dual Asymmetric Centrifugation (DAC) (SpeedMixer DAC 150 FVZ, Hauschild & Co KG, Tyskland) til dette, men mer etablerte metoder som filterekstrudering og probesonikering er også blitt utført for sammenligning med DAC-metoden.

3.2.1 Fremstilling av VPGs

Filmdannelse av lipidfilm ved avdampning av etanolen ble gjennomført ved bruk av to ulike metoder, avhengig av batchstørrelse ønsket; avdampning fra en rundkolbe ved bruk av rotavapor for større batcher, eller i hetteglass under en strøm av nitrogen for mindre batcher.

Generell fremgangsmåte for fremstilling av liposomer ved bruk av “injeksjonsglassmetoden”:

Tre mL 96% etanol ble benyttet som oppløsningsmiddel, og tilsatt hetteglass sammen legemiddelet flukonazol (FLZ) (Sigma – Aldrich GmbH, Tyskland); 0 mg for fremstilling av “tomme liposomer” (Lip0), eller 20 mg for fremstilling av liposomer med legemiddel (LipFLZ), og 200 mg fosfatidylkolin (PC) (Lipoid S 100, Lipoid GmbH, Tyskland). Etter oppløsning av lipid og legemiddel ble etanolen avdampet fra hetteglasset ved romtemperatur med en nitrogenstrøm på 1 L/min i minst 2 timer, slik at det ble dannet en lipidfilm i bunnen av glasset. Denne lipidfilmen ble deretter hydrert ved tilsetning av 200 µL destillert vann (dH₂O) og 150 µL propylenglykol (PG) (NMD A/S, Norge), som ble mikset med vortexmikser (Heidolph Reax Vortex Mixer, Thermo Fisher Scientific Inc., USA) og satt i kjøleskap (4 °C) over natt til hydrering. Hydreringen med denne vannmengden danner en konsentrert liposomal dispersjon som kan betraktes som en halvfast vesikulær fosfolipid gel (VPG) (Figur 12).



Figur 11. Bildet viser monteringsoppsettet for avdamping av etanol under en strøm av nitrogengass i hetteglasset. Blandingen ble tilført nitrogen via en slange opp i injeksjonsglasset, som vist på figuren.

Figur 11 illustrerer oppsettet med hetteglass for avdamping av etanol med dannelse av lipidfilm i hetteglass. Nitrogen forhindrer at luft med vanndamp slipper til hygroskopiske væsker som etanol. For å fastslå når etanolen var 100 % fordampet ble injeksjonsglasset veid før avdampning og underveis med ½ times mellomrom. Det ble fastslått at etter 2 timer var 3 mL etanol 100 % fordampet. Denne metoden har begrensning ved at den egner seg best til små mengder, men til gjengjeld er enkel og relativt hurtig

Til å produsere større mengder VPG ble det benyttet 100 mL rundkolbe og rotavapor. Det ble benyttet samme ratio FLZ:PC som for injeksjonsglass, men en mindre mengde etanol 1:5 (w/v). Ved hydrering av lipidfilmen ble det også benyttet samme forhold mellom PC, dH₂O og PG, med ratio 1:1:0,75 (w/v/v).

Generell fremgangsmåte ved bruk av rotavapor:

Fosfatidylkolin både med og uten FLZ ble løst i etanol med ratio 1:5 (w/v) i en 100 mL rundkolbe. Etanolen ble avdampet i 2 timer på rotavapor (BUCHI Labortechnik AG, Sveits) med rundkolbe i vannbad på 40 °C, med vakuum innstilt på 100 mbar og rotasjon på 140 rpm. Etter 2 timer ble rundkolben hevet opp av vannbadet for ytterligere fordampning i minst 4 timer. Vakuum ble senket til 50 mbar og rotasjon satt til 100 rpm. Lipidfilmen ble tilsatt dH₂O og PG med nevnte ratio 1:1:0,75 (w/v/v), som ble mikset på vortexmikser og hydrert over natt i kjøleskap.



Figur 12. Bildet viser vesikulær fosfolipid gel (VPG) i en rundkolbe som er dannet etter hydrering.

Tabell 5. Prosentvis sammensetting (w/w) av ferdig VPG med FLZ (LipFLZ) og VPG uten FLZ (Lip0).

	Flukonazol (%)	Fosfatidylkolin (%)	Destillert vann (%)	Propylenglykol (%)
LipFLZ	3,51	35,1	35,1	26,32
Lip0		36,36	36,36	27,27

Tabell 5 angir er mengden i % vekt/vekt (w/w) som ble brukt til å fremstille henholdsvis LipFLZ og Lip0.

3.2.2 Størrelsesreduisering av liposomer

Det ble benyttet og evaluert følgende tre metoder for størrelsesreduisering av liposomer; dual asymmetrisk sentrifugering (DAC), filterekstrudering og probesonikering. Alle disse tre metodene er beskrevet under.

Størrelsesreduksjon av liposomer (homogenisering) ved bruk av DAC

Størrelsesreduksjon ved å benytte DAC var den primære målsetningen i denne studien ([Avsnitt 2](#)).

Det ble utført tester for størrelsesreduksjon av liposomer med ulike sentrifugeringstider. Målet var å oppnå en gjennomsnittlig størrelsesfordeling på liposomene rundt 200-300 nm. Dette ble testet med henholdsvis 570 mg VPG med FLZ og 550 mg VPG uten FLZ. Testene ble gjennomført ved å tilsette 25 % (w/w) glasskuler (diameter 1 mm) som beskrevet av

Massing et al 2008 (1). Prosent glasskuler er angitt i vekt/vekt (w/w) relativ til mengde VPG. Sentrifugeringstidene som ble testet var 20, 15, 5 og 2 min. Hastigheten ved sentrifugering ble satt til 2400 rpm for alle testene.

Sonikering

For å kunne redusere liposomstørrelsen ved bruk av sonikering ble først 570 mg halvfast VPG fortynnet med 9,8 mL dH₂O til en flytende liposomdispersjon (2 mg/ml PC). Dispersjonen ble sonikert med probesonikator (Sonics VCX 500-220 V, Sonics & Materials, Inc) i 20 sekunder ved 40 W. For å forhindre oppvarming av dispersjonen på grunn av varmeutvikling under sonikeringen ble hetteglasset med prøven i, plassert i et begerglass fylt med is under sonikeringen.

Ekstrudering

Samme fortynning av VPG ble utført før ekstrudering som for sonikering (over). Ekstruderingen ble gjennomført i to trinn. Først 10 ekstruderings med 0,8 µm filter (Merck Millipore KGaA, Frankrike) for deretter og ekstrudere 10 ganger med 0,4 µm filter (Merck Millipore KGaA, Frankrike).



Figur 13. Venstre: DAC'en (SpeedMixer DAC 150 FVZ) som ble benyttet i denne studien. **Høyre:** Injeksjonsglass montert med egnet innsats i sentrifugen

DAC – metode for fremstilling og størrelsesreduering av liposomer

Det ble også utført en test på om DAC alene var i stand til å danne VPG med inkorporert flukonazol i liposom, uten å benytte filmhydreringsmetoden. Metoden kan deles inn i tre trinn hvor det ble benyttet 100 mL injeksjonsglass i DAC. Første trinn var å danne en homogen blanding av 200 mg PC og 150 µL PG (w/v) som ble sentrifugert i 10 min ved 2400 rpm. Deretter ble 200 µL dH₂O tilsatt og sentrifugert 5 min med 2400 rpm, og VPG blandingen som ble satt til hydrering over natt i romtemperatur. Siste trinn var å inkorporere FLZ og redusere liposomstørrelsen. Det ble tilsatt 20 mg FLZ og 25 % glassperler til VPG som ble sentrifugert i 20 min ved 2400 rpm (i henhold til metoden til Massing et al, 2008 (1)).

3.2.3 Karakterisering av liposomstørrelse med PCS

Til å estimere liposomenes partikkelstørrelsesfordeling ble det benyttet dynamisk laser defraktometer eller photon correlation spectroscopy (PCS) (Particle sizer modell 370, NICOMP Particle Sizer Systems).

Prinsippet bygger på bestemmelse av fluktuasjoner i lysspredning forårsaket av kolloide partikler som utviser Brownske bevegelser. Partikkelstørrelsen korrelerer til partikkelens diffusjonskoeffisient som måles med laserlys. For å tilstrebe et støvfritt miljø ble bearbeidelsen av prøvene utført i LAF – benk (Biocap 189 2000, Erlac, Frankrike). Prøveglassene ble skylt minst tre ganger med dH₂O filtrert gjennom 0,2 µm sprøytefilter (PALL Life Sciences, USA). Deretter ble liposomdispersjonen fortynnet i PCS-prøveglassene med filtrert dH₂O til tellerfrekvensen for intensitet var 300 ± 50 KHz. Prøvene fikk såhvile 5 minutter i instrumentet før målingene ble startet. Hver måling ble gjort med tre paralleller. Brytningsindeksen var innstilt til $n = 1,333$ for flytende løsning og romtemperaturer ble registrert for å kunne registrere rett tettheten til prøvene. For det meste lå romtemperaturen på 23 °C som gir $\rho = 0,9325$. Parameterne ble registrert i programvaren (C-370 V1.51, NICOMP Particle Sizer Systems, USA) før måling i henhold til SOP ([appendiks A8](#))

3.2.4 Kvantifisering av flukonazol med HPLC

Det ble benyttet isokratisk eluering med mobilfase bestående av 20 % acetonitril (Sigma-Aldrich GmbH, Tyskland) og 80 % Milli-Q vann som var filtrert gjennom Millipak®40. 0,22 µm filter (Merck Millipore, Merck KGaA, Frankrike). Temperatur på mobilfasen ble satt til 30 C° med konstant elueringshastighet på 1 mL/min. Kolonne som ble benyttet var en XTerra® revers fase (RP) C-18 kolonne (5µm 3,9x150mm 1,8mL, Waters, USA), samt egnet forkolonne. Til hver standardløsning ble det injisert 3 ×20 µL i RP C-18 kolonnen. UV-deteksjon ble satt til 260 nm, analysetid til 6 min og en forsinkelse på 1 minutt mellom hver injeksjon.

Tillaging av standarder

Stamløsning med konsentrasjon på 2 mg/mL FLZ ble laget ved å løse 20 mg FLZ i 10 mL metanol. Det ble laget 3 paralleller av hver standardløsning med følgende konsentrasjoner: 10, 20, 40, 80, og 120 µg/mL. HPLC innstillingene for bestemmelse av standardkurve er beskrevet i avsnitter over

3.2.5 Inkorporeringseffektivitet av flukonazol i liposomer

For å bestemme hvor mye av legemidlet som befant seg i liposomene og hvor mye som var tilstede som fritt legemiddel benyttet vi ultrasentrifugering, hvor VPG med FLZ først ble fortynnet med 17,2 deler dH₂O til en liposomdispersjon. For eksempel 570 mg VPG fortynnet med 9,8 mL dH₂O til en FLZ konsentrasjon tilsvarende 2 mg/mL. Sentrifugalkrefter store nok til å samle alle liposomene i pellet gjør oss i stand til å skille mellom FLZ i liposomene og fritt legemiddel i supernatanten. FLZ ble kvantifisert ved hjelp av HPLC (metode beskrevet over) og resultatene ble justert for innhold av kvantifisert PL i supernatant, som sier noe om tilstedeværelse av små liposomer i supernatanten.

Ultrasentrifugering

1 mL liposomdispersjon ble ultrasentrifugert (Beckman L8-70M, Beckman, USA) i 1 time ved 40 000 rpm under vakuum og 10 °C. Supernatanten ble forsiktig pipettert ut fra sentrifugerørene, som ble fortynnet i metanol med en faktor på 20 ganger før kvantifisering av FLZ ved å benytte HPLC (avsnitt 3.2.4) . Liposomdispersjonen (totalprøve før ultrasentrifuging) ble fortynnet med metanol med en faktor på 50 før HPLC analyse.

Mengden av inkorporert FLZ i liposomer ble kalkulert som differansen mellom total mengde av FLZ i liposomdispersjonen før ultracentrifugering, og mengden fritt FLZ i supernatant. Utrening av inkorporeringseffektiviteten ble gjort ved bruk av Ligning 1 (under).

Ligning 1: $IE \% = (C_T - C_S) / (C_T) * 100$

Hvor C_T er total mengde FLZ i liposomdispersjonen, og C_S er fritt FLZ i supernatant.

3.2.6 Kvantifisering av fostfat fra fosfatidylkolin

Kvantifisering av fosfat fra fosfatidylkolin (PC) ble gjort etter metoden beskrevet av Grant R. Bartlett (53). Bølgelengden ble satt til 830 nm i titreplateleseren (Spectra max 190, Molecular Devices, USA). Hensikten er å estimere utbytte av lipid til liposomdannelse.

Tillaging av reagenser

- 10 N svovelsyre (H_2SO_4) - løsning ble laget ved å tilsette 16,308 mL 36,8 N H_2SO_4 (May & Baker LTD, Storbritannia) til 43,68 mL dH_2O under omrøring på isbad.
- Ammonium molybdat tetrahydrat ($(NH_4)_6 Mo_7 O_{24} \cdot 4 H_2O$): 0,22 % (Merk KGaA, Tyskland): 1,1 g $(NH_4)_6 Mo_7 O_{24} \cdot 4 H_2O$ ble fortynnet i 500 mL dH_2O (v/v)
- Fiske & SubbaRow (Sigma – Aldrich GmbH, Tyskland): 3 g Fiske & SubbaRow ble løst i 18,9 ml dH_2O til 15,87 % (w/v)

Tillaging av standarder

Standardløsningen ble tillaget fra 0,65 mM (0,20 $\mu g/ml$) kaliumdihydrogenfosfat (KH_2PO_4) stamløsning (Sigma – Aldrich GmbH, Tyskland). Stammløsningen (KH_2PO_4) ble fortynnet med dH_2O til ønsket konsentrasjon. Det ble laget 3 paralleller på å 1 mL av hver standardløsning med følgende konsentrasjoner: 0, 1, 3, 5, og 10 $\mu g/mL$. Fortynningene ble beregnet på følgende måte: $V_1 = (V_2 \times C_2) / C_1$. Hvor V_1 er volum stamløsning, V_2 er total volum av standardløsning, C_2 er konsentrasjon standardløsning og C_1 er konsentrasjon stamløsning. Mengde dH_2O som må benyttes blir da $V_1 - V_2$.

Prøveopparbeidelse

Supernatant ble fortynnet i dH₂O med en faktor på 500 ganger, og totalprøve av liposomdispersjon ble fortynnet i dH₂O med en faktor på 10 000 ganger. Det ble laget 3 paralleller av hver prøve à 1mL som ble overført til reagensrør. Følgende prosedyre ble utført for samtlige prøver og standardløsninger:

- 1) Tilsatt 500 µL 10 N H₂SO₄,
- 2) Reagensrør tildekket og satt i varmeskap ved 155 °C i 3 timer.
- 3) Tilsatt 2 dråper 30 % fosfatfri hydrogenperoksid (H₂O₂) (Merk KGaA, Tyskland)
- 4) Reagensene tildekket og satt i varmeskap på 155 °C i 1 ½ time.
- 5) Tilsatt 4,2 mL ammonium molybdat og 200 µL Fiske & SubbaRow.
- 6) Reagensrør tildekket og satt i varmeskap ved 100 °C i 7 min
- 7) Overført 200 µL fra hver prøve til brønner i titreplate

For hver tilsetning fra og med punkt 3 ble prøvene nedkjølt til romtemperatur.

Beregning av hvor mye lipider som går med til å danne liposomer:

Ligning 2: $C_P = C_T - C_S$

Ligning 3: $\text{Utbytte} = C_P / C_T * 100$

Hvor C_P er konsentrasjonen i pellet, C_T er den totale konsentrasjonen i totalprøve, og C_S er konsentrasjonen i supernatant

3.2.7 Rekonstruering av hydrogel 2,5 % SBG

Hydrogelen brukt i denne studien var 2,5 % SBG (med geldannende polymer β-1-3/1-6 glukanseløselig beta-glukan 2,5 %) produsert av Tromsø firmaet Biotec Pharmacon. For å få en homogen, anvendelig og stabil gelsstruktur er det nødvendig og rekonstruere SBG strukturen. Ved å benytte DAC vil SBG strukturen slites løs, samtidig som gelen varmes opp på grunn av friksjon, for så å reetablere en mer stabil gelstruktur.

Teksturegenskapene til SBG-gel alene og ulike mengder glyserol (Sigma- Aldrich GmbH, Tyskland) samt VPG (tabell 6). Formuleringene ble rekonstruert med totalt 100 g SBG-formulering i Low Density Polyetylen (LDPE) maks 100 kopp (**M100-kopp**), som ble kjørt 5 minutter i DAC ved 3540 rpm.

Tabell 6. Sammensetninger av SBG-hydrogel (totalt 100 g)

Sammensetning	SBG (g)	Glyserol (g)	VPG (g)	Totalt (g)
SBG 2,5 % alene	100			100
SBG 2,5 % med 5 % glyserol	95	5		100
SBG 2,5 % med 10 % glyserol	90	10		100
SBG 2,5 % med 20 % glyserol	80	20		100
SBG 2,5 % med 10 % glyserol og 10 % VPG	80	10	10	100

Etter rekonstruering av SBG i henhold til tabell 6, ble det overført henholdsvis à 30 g gel til hver av 3 LDPE - maks 40 kopper (M100-kopper) som ble analysert etter 2 timer. Figur 14 (under) viser en av plastkoppene som ble benyttet i DAC til å rekonstruere SBG og blande inn de ulike tilsetningene (tabell 6).



Figur 14. Til **venstre** i bildet vises en M100-kopp i beholder beregnet for DAC. Til **høyre** sees en M40-kopp i beholder beregnet for DAC

3.2.8 Teksturanalyse

Vår hydrogelen, brukt i denne studien, nemlig hydrogelen 2,5 % SBG ble analysert alene eller i kombinasjon med liposomer, glyserol eller begge deler. Hydrogelen ble karakterisert ved hjelp av teksturapparatet TA.XT Plus (Stabile Micro Systems, Storbritannia) (Figur 15). Metoden vi bruket for målingene tok utgangspunkt i tidligere beskrevet analysemetode av Hurler et al (34), men med en del justeringer. Hver analyse ble utført tre ganger for hver analysebetingelse eller apparat innstilling. Stempel vi brukte hadde en diameter på 40 mm diameter (figur 15, bilde til høyre). Teksturegenskapene ble testet med tanke på parameterne hardhet, cohesiveness og adhesiveness. Alle målinger ble utført ved romtemperatur og med samme innstillinger som beskrevet (under).



Figur 15. Venstre: teksturapparatet TA.XT plus med DP-kopp montert i tilhørende monteringsoppsett. **Høyre:** Kompresjonsstempelen på 40 mm i diameter som ble benyttet under analysene. Under kompresjonsstempelen sees diameteren til M40-kopp tegnet inn

Innstillingen som ble benyttet til teksturanalysene:

- Pretesthastighet: 1 mm/sek.
- Testhastighet: 3 mm/sek.
- Posttesthastighet: 3 mm/sek.
- Distanse: 5 mm
- Start posisjon: 15 mm for M40-kopp* og 25 mm for DP-kopp*
- Kalibrering ble gjort 5 minutter etter at stempelet var satt i startposisjon.

Mellom hver analyse ble notert temperatur, luftfuktighet og nettovekt av SBG gel i koppene.

Vurdering av alternative teksturkopper

Til teksturanalysen ble det testet om det var mulig å benytte alternativ teksturkopp til å utføre analysen. Hensikten med å prøve ut en alternativ prøveholder til den originale teksturkoppen (Delerin & Perspex (DP)* (Stabile Micro Systems, Storbritannia), forkortet **DP-kopp**, var at den alternative koppen, (Low Density Polyetylen (LDPE) maks 40 kopp)* forkortet **M40-kopp**, hadde en mindre diameter og dermed ville samme volum av prøve gi en lengre analysedistanse enn i originalkoppen. En annen fordel var at M40-koppen er tilpasset DAC-maskinen, og dermed kunne prøvene tilberedes i samme kopp som analysene ble gjort i, noe som er en stor fordel for analysen og med tanke på å unngå å overføre prøven til en ny beholder før analyse. Taksturanalyse er en analyse som krever relativt stor prøvevolum, noe vi var ute etter å minimere, uten at det skulle gå utover reproduserbarheten og påliteligheten til målingene. Indre diameter til DP-koppene er 50 mm, mens M40-koppene har en indre diameter på 45 mm. Maks 40 betyr at M40-koppen er dimensjonert for maksimalt å inneholde 40 gram prøve ved kjøring på DAC.



Figur 16. Koppene vi brukte til teksturanalyse. Til **venstre** i bildet er den alternative Low Density Polyetylen maks 40 (M40-koppen). Til **høyre** i bildet er den opprinnelige tilpassede teksturkoppen Delerin & Perspex koppen (DP-koppen)

For å kunne benytte M40-kopp til teksturapparatet var det nødvendig å gjøre noen modifikasjoner med tanke på monteringsoppsettet. Monteringsoppsettet ble modifisert ved å tegne M40-koppens diameter med senter som vist i figur 16.

Gel parameterne hardhet, cohesiveness og adhesiveness ble analysert i romtemperatur og under samme betingelser og innstillinger, bortsett fra startposisjon. Startposisjon ved bruk av DP-koppen var 25 mm og 15 mm for M40-koppen. For begge koppene ble teksturanalysen utført med tre repetisjoner, og med samme stempel på 40 mm i diameter. Det ble tillaget 2 x 100 g ren 2,5 % SBG gel i to M100-kopper, som ble blandet med DAC i 5 min ved 3540 rpm. Fra M100-koppene ble det overført henholdsvis à 30 g til 3 M40-kopper, og à 30 g til 3 DP-kopper. Analysene ble utført med tre repetisjoner for hver kopp etter 0, 1, 2, 4 og 8 timer.

3.2.9 Homogenitetsanalyse

Homogenisering av liposom-i-gel-formuleringen ble utført med DAC i 5 min ved 3540 rpm. Det ble tatt ut 100 mg prøve fra 5 ulike punkter i gelen som ble fortynnet med 10 mL HPLC mobilfase (Milli-Q vann:acetonitril (80:20 % v/v)). Kvantifiseringen av FLZ ble utført med HPLC som beskrevet i [avsnitt 3.2.4](#).

3.2.10 Zetapotensial og pH

Det ble målt zetapotensial av gel-formulering med og uten FLZ. Måling av zetapotensial ble utført med Zetasizer Nano Z (Malvern Instruments, Storbritannia). Av gel-formuleringene ble 20 µL fortynnet i 980 mL springvann (Svarhammervatnet, Kvaløya, Tromsø, Nord – Norge), som ble blandet med vortexer. Prøven ble injisert i Folded capillary cells DTS 1060 (Malvern Instruments, Storbritannia). Cellene ble før injisering skyllet med etanol, deretter med springvann. Målingene ble utført etter egen utarbeidet SOP i programvaren:

- Temp: 25 °C
- Equilibration time: 120 sek
- Minimum antall målinger: 15
- Maksimum antall målinger: 100
- Antall analyser: 3 paralleller

Gelens pH ble målt med Metrohm 744 pH meter (Metrohm Nordic AS, Norge) pH-meteret ble kalibrert i buffer, pH 4 og pH 7. Det ble utført tre paralleller med pH-målinger i gel-formuleringene. Det ble også målt pH i springvann, samt pH av SBG-gel alene og SBG-gel med 10 % glyserol.

3.2.11 Hydrogel 2,5 % SBG med fritt flukonazol

Til frigjøringsstudien ble t fritt FLZ dispergert i SBG-gel med 10 % glyserol. Flukonazol tilsvarende 70,2 mg ble løst i 2 g glyserol som ble mikset på vortexmikser. Av dette ble 1 g FLZ-i-glyserol dispergert i 9 g SBG-gel-formulering som ble mikset og homogenisert i 5 min med DAC ved 3540 rpm. Gelformuleringen stod over natt for å være sikker på at FLZ ble løst, og mikset på nytt i 5 min med DAC ved 3540 rpm.

3.2.12 *In vitro* frigjøringsstudie

In vitro frigjøring av FLZ fra SBG med fritt dispergert FLZ uten liposomer (SBG-FLZ) og SBG-formulering med flukonazol-i-liposom (SBG-LipFLZ) ble utført med Franz-diffusjonsceller (PermeGear, USA), volum 12 mL. Det ble brukt 0,2 µm polyamidmembraner (Sartorius polyamide membrane; Sartorius AG, Tyskland). Kamrene og øvrig utstyr ble vasket med metanol og dH₂O. Tre akseptorkammer ble fylt med HPLC mobilfase (Milli-Q vann:acetonitril (80:20 % v/v)). Trehundre mikroliter gel – formulering ble fordelt jevnt utover polyamidmembranen i hvert donorkammer. Donorkamrene og prøverør ble dekket med 3 lag parafilm. Det ble tatt ut et prøvevolum på 200 µL fra hvert akseptorkammer etter 10, 20, 30 min og etter 1, 2, 3, 4, 5 og 6 timer. Prøvevolumet ble erstattet med 200 µL mobilfase etter hver prøvetakning for å kompensere for volumtapet. Prøvene ble overført direkte til HPLC prøveglass for kvantifisering av frigjort FLZ på HPLC som beskrevet i [avsnitt 3.2.12](#).

4. Resultater og diskusjon

4.1 Metodeutvikling – fremstilling av liposomer-i hydrogel

I denne oppgaven har alle trinn i fremstilling av liposomer og videre innblanding i hydrogel vært gjenstand for optimalisering og tilpasning, noe som har utgjort en stor del av arbeidet som har vært utført på laboratoriet.

4.1.2 Optimalisering av metode for fremstilling av lipidfilm

I første omgang hadde vi håp om å kunne utelate det første trinnet med dannelse av lipidfilm, og vi forsøkte derfor å fremstille liposomer uten dette trinnet (ref metode). Resultatene fra dette forsøket viste imidlertid at vi fikk en veldig lav inkorporering av virkestoffet ($20,15 \% \pm 1,21$), noe som gjorde at vi gikk videre med en metode som inkluderte å danne en lipidfilm med tørking av lipider oppløst i organisk løsemiddel (etanol).

I dette første trinnet endte vi opp med å bruke to ulike metoder, beskrevet i metodedelen, nemlig tørking av lipidfilm i hettelgass under en strøm av nitrogen, og bruk av rotavapor og en rundkolbe.

Generell fremgangsmåte for fremstilling av liposomer ved bruk av “injeksjonsglassmetoden”:

Ved fremstilling av lipidfilm med injeksjonsgassmetoden, ble brune 100 ml injeksjonsglass benyttet, lik de som passet inn i DAC-maskinen. Denne metoden ble dermed utviklet for å unngå å overføre lipider fra en større lipidfilm ved innveiling, og for å gjøre det mulig å utføre størrelsesreduksjon direkte fra hydrert lipidfilm uten fare for svinn og for å unngå usikkerhet i innveiling av små mengder prøvemateriale. Nitrogen forhindrer at luft med vandamp slipper til hygroskopiske væsker som etanol. For å fastslå når etanolen var 100 % fordampet ble injeksjonsglasset veid før avdampning og underveis med ½ times mellomrom. Det ble fastslått at etter 2 timer var 3 mL 96% etanol 100 % fordampet. Denne metoden har begrensning ved at den egner seg best til små mengder, men til gjengjeld er enkel og relativt hurtig. Rundkolbe og rotavapor var bedre egnet når det større prøvevolum var ønsket, og denne metoden ble derfor foretrukket når dette var tilfelle.

4.1.3 Optimalisering av liposomreduksjonsmetode med DAC

Det ble evaluert noen metoder for størrelsesreduksjon av liposomer med fokus på DAC-metoden. Metodene ble evaluert og sammenlignet med filterekstrudering og sonikering opp mot; 1) inkorporeringseffektivitet av FLZ, 2) liposomstørrelse, 3) hvor arbeidskrevende metodene var, og 4) reproduserbarhet.

4.1.4 Optimalisering av liposomstørrelse ved variering av sentrifugeringstid

Liposomene ble størrelsesreduert i injeksjonsglass ved å tilsette 25 % (w/w) glasskuler til VPG. Sentrifugehastigheten var satt til 2400 rpm. Det ble opparbeidet tre prøver fra hver VPG og alle prøver ble målt tre ganger på PCS. Resultatene i tabell 7, viser et gjennomsnitt av gaus-fordeling som ble målt. Alle målinger viste en Chi squared verdi $< 3,00$ som i henhold til instruksjon for denne maskinen er akseptabelt ([Appendiks A.3](#)). VPG blandinger som ble analysert bestod av LipFLZ formuleringer.

Tabell 7. Diameter målt for LipFLZ etter ulike sentrifugeringstider med DAC med ulike tidsintervaller (n=3)

DAC (min)	Størrelses – fordeling (nm) (gjennomsnitt ± S.A.)	PI (gjennomsnitt ± S.A.)
20	129,4 ± 3,6	0,187 ± 0,031
15	135,1 ± 0,7	0,163 ± 0,013
5	184,5 ± 2,1	0,173 ± 0,011
2	231,9 ± 3,9	0,226 ± 0,015

Resultatene i tabell 7 viser at størrelsesfordelingen reduseres med økende DAC-tid. Ønsket liposomstørrelse tilsvarende $250 \text{ nm} \pm 50$ ble oppnådd med en DAC-tid på 2 min.

Gjennomsnittlig størrelsesfordeling var på 231,9 nm hvor standardavviket (S.A.) utgjorde en varians på $\pm 1,68 \%$. Imidlertid ble polydispersitetsindeksen (PI) høyere ved økt liposomstørrelse og med redusert DAC-tid. Dette indikerer en mindre homogen fordelingen av den gjennomsnittlige størrelsesfordelingen på 231,9 nm.

Vi sammenlignet også VPGs med og uten virkestoff, og resultatene av dette er gjengitt i tabellen under.

Tabell 8. Liposomstørrelse målt med PCS – sammenligning mellom Lip0 og LipFLZ formuleringene etter sentrifugering i 2 min (n=3)

Type liposomer (DAC 2 min)	Størrelses – fordeling (nm) (gjennomsnitt ± S.A.)	PI (gjennomsnitt ± S.A.)
Lip0	258,5 ± 0,7	0,256 ± 0,007
LipFLZ	224,7 ± 4,2	0,253 ± 0,031

Resultatene i Tabell 8 gir en indikasjon på at FLZ inkorporerte i liposomer (LipFLZ) påvirker liposomstørrelsen ved redusert diameter (nm) sammenlignet med tomme liposomer (Lip0). Både LipFLZ og Lip0 ble kjørt 2 min ved hastighet = 2400 rpm i DAC med 25 % glassperler.

Tabell 9. PCS av reduseringsmetoder hvor det ikke ble benyttet DAC (n=3 ± S.A)

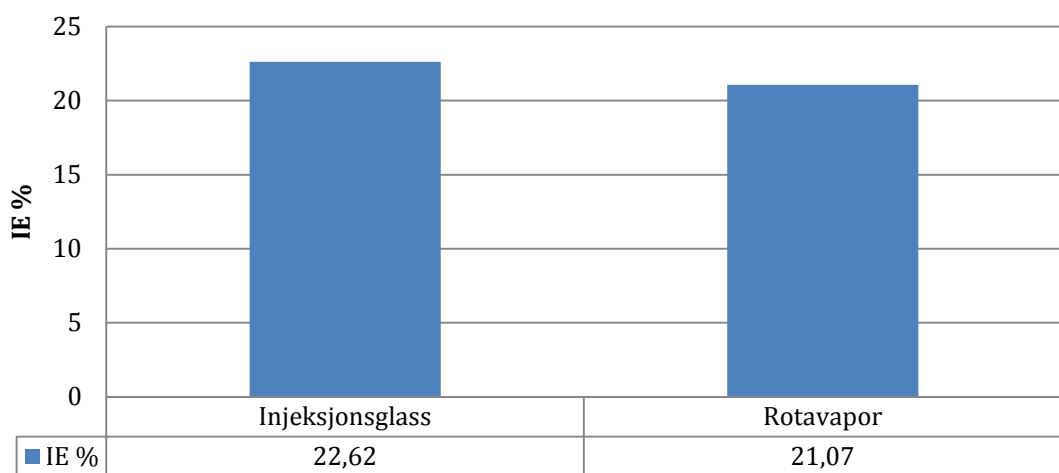
Reduserings - metoder	Størrelsesfordeling (nm) (gjennomsnitt ± S.A.)	PI (gjennomsnitt ± S.A.)
Ekstrudert 0,4 µm	375,9 ± 27,8	0,278 ± 0,027
Sonikert 20 sek	286,9 ± 5,9	0,251 ± 0,005

Tabell 9 gir en oversikt over størrelsesfordelingen og PI for de metodene som ikke ble redusert med DAC. Standardavviket for ekstruderte liposomer var på 27,8 %, noe som er relativt høyt. En mulighet for å få ned standardavviket er å ekstrudere i flere runder enn hva som ble gjort i denne studien med 10 runder.

4.1.5 Inkorporeringseffektivitet og kvantifisering av FLZ

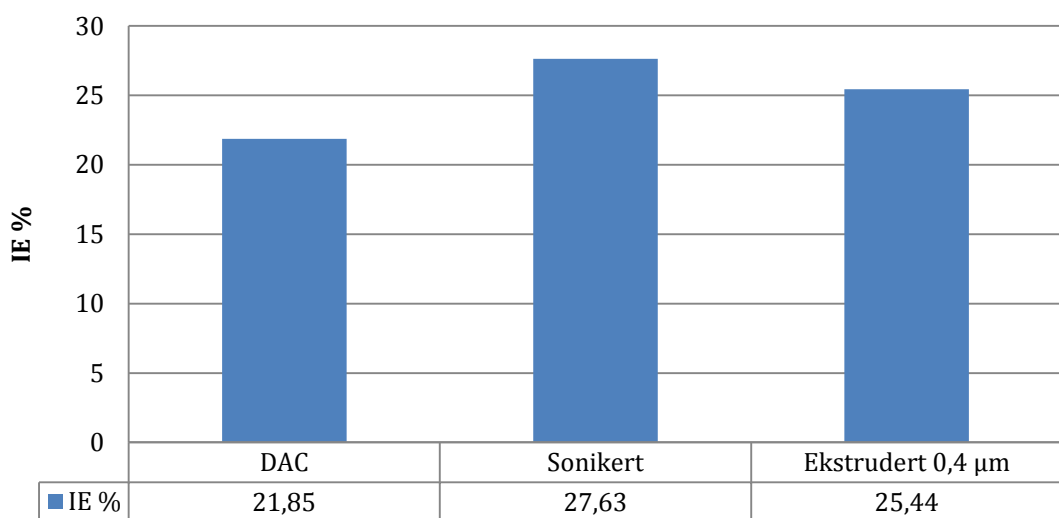
Inkorporeringseffektiviteten (IE %) av FLZ i liposomer ble analysert med HPLC

Standardkurven ble laget med FLZ konsentrasjonene 10, 20, 40, 80 og 120 µg/mL, kvadratet ble bestemt til R^2 0,9988. Filmhydreringsmetode ved å benytte injeksjonsglass egner seg best for produksjon av små mengder VPG, siden hetteglasset har mindre overflate sammenlignet med rundkolbe. Hetteglassene gjorde det enklere å hydrere lipidene her da hetteglassene kunne vortexmikses direkte. Liposomene ble prosessert med DAC uten å måtte overføre VPG'en til en annen beholder. I utgangspunktet skal det ikke ha noen betydning for IE % for om det velges injeksjonsglass eller rotavapor til avdampning av løsemiddel med dannelse av lipidfilm.



Figur 17. Forskjell i IE % i forhold til om det er brukt rotavapor kontra injeksjonsglass. For disse prøvene ble det brukt DAC som reduksjonsmetode (n=1)

Figur 17 viser IE % ved å benytte injeksjonsglass kontra rotavapor. Resultatene ga som forventet tilnærmet lik IE %. Måling ble utført for å illustrere at det ikke skal ha betydning for om det velges injeksjonsglass kontra rotavapor til avdampning av etanol.



Figur 18. Forskjell i IE % i forhold til reduksjonsteknikk (n=1)

Figur 18 illustrerer IE % i forhold til reduseringsmetodene som ble benyttet. Resultatene ble beregnet ut fra ligning 1 i metoddelen ([avsnitt 3.2.5](#)). Det ble justert for innhold av lipid i supernatanten, bestemt ved hjelp av fosfat-bestemmelse ([avsnitt 3.2.6](#)). Kvantifisering av fosfat fra fosfatidylkolin viste at utbytte fosfatidylkolin som var i pellet, og som gikk med til liposomdanneles var $98,02 \% \pm 0,54$ (n=3). Resultatene ble beregnet ut fra ligning 2 og 3 ([avsnitt 3.2.6](#)). Metoden som ble benyttet var fosfolipid analyse etter metoden til Gran R.

Bartlett (53). Metoden går ut på å bestemme mengden fosfat i en prøve som vil kunne indikere en tilsvarende mengde fosfolipider.

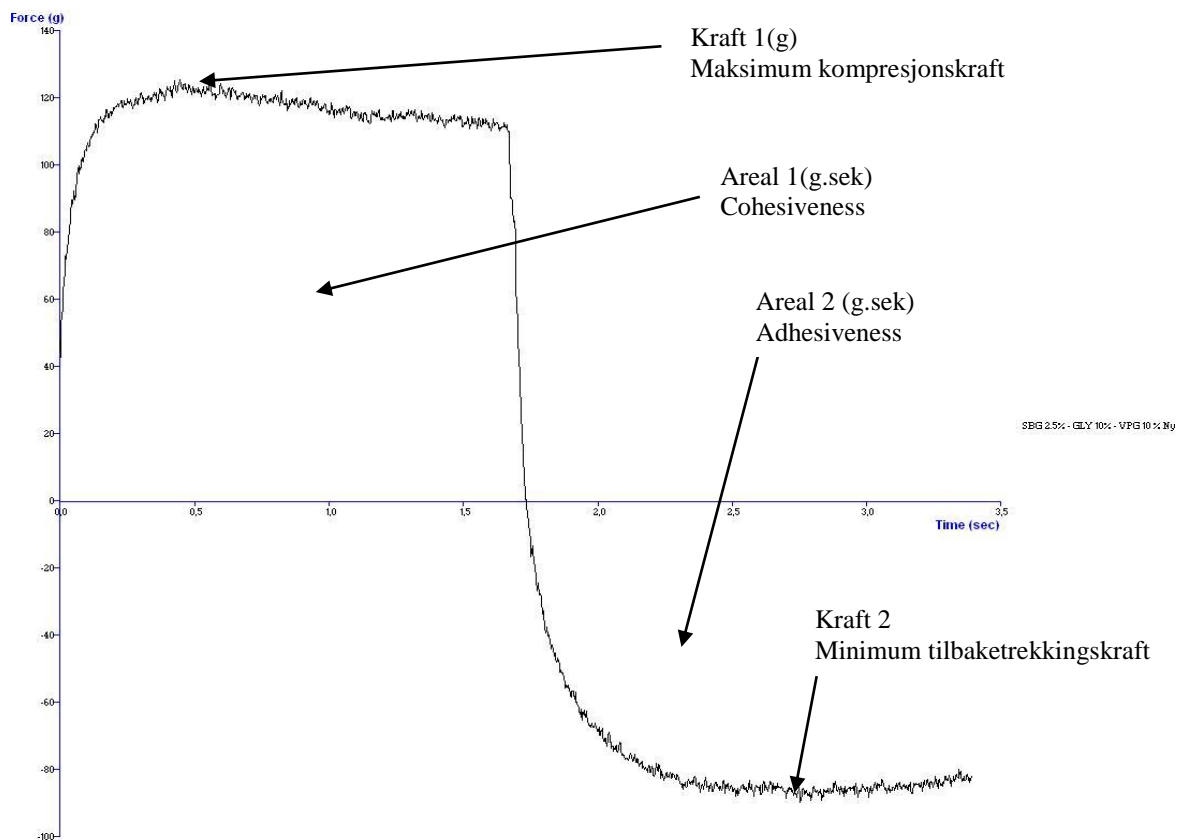
Disse resultatene baserer seg bare på en enkel fremstilling, men kan likevel si oss at inkapseleringen er i samme størrelsesorden for de tre metodene. For å kunne si noe om forskjeller måtte vi ha utvidet med flere paralleller.

Liposomstørrelsen kan ha betydning for mengden legemiddel som inkorporeres. Større liposomer med lik sammensetning forventes å gi en høyere IE % sammenlignet med mindre liposomer. Dette kan forklares ved noe inkorporert legemiddel vil frigjøres når større liposomer reduseres til mindre liposomer. I prosessen vil både inkorporert legemiddel og innkapslet legemiddel slippe fri når liposomets/vesikkelens lameller rives opp og reetablerer seg mindre liposomer. Sonikering ga en gjennomsnittlig størrelse på $286,9 \pm 5,9$ nm (Tabell 9) som ligger innenfor 250 ± 50 nm. Som en ser av Figur 18 så hadde sonikerte liposomer en inkorporering tilsvarende 27,63 %, noe som er fordelaktig med tanke på prinsippet bak å benytte liposomer til kontrollert frisetting av legemiddel. Men en ulempe med sonikering er at sonikeringsproben ofte frigir titanpartikler som forurenses prøven, noe som er uønsket. Det anses heller ikke å være en veldig skånsom metode og her er det ikke mulig å opparbeide prøven i en lukket beholder, siden ultralydproben må settes ned i prøven. Ekstruderte liposomer ga de største liposomene, og også størst spredning i partikkelstørrelse. Dette kunne muligens vært forbedret med å kjøre prøven flere ganger gjennom filteret. Dette er imidlertid en ganske arbeidskrevende metode og prøven må først kjøres gjennom filter med større filterporer for å unngå for stort motstand og trykk under filtreringen. I vårt tilfelle ble derfor prøvene først filtrert gjennom et $0,8 \mu\text{m}$ filtteri ganger før videre ekstrudering/filterering gjennom et $0,4 \mu\text{m}$ filter.

Kvantifisering av fosfat fra fosfatidylkolin ([avsnitt 3.2.6](#)) viste at utbytte fosfatidylkolin som gikk med liposomdannelse ble beregnet til $98,02 \% \pm 0,54$ ($n=3$). Metoden som ble benyttet var fosfolipid analyse etter metoden til Gran R. Bartlett (53). Metoden går ut på bestemme mengden fosfat i en prøve som vil kunne indikere en tilsvarende mengde fosfolipider.

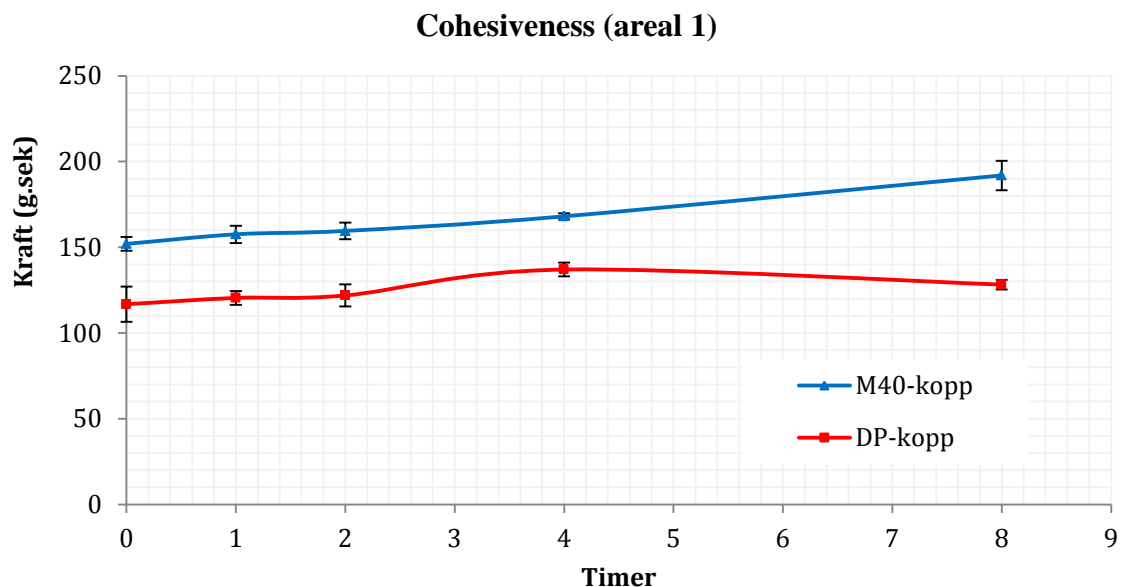
4.1.6 Metodeutvikling av teksturanalyse

Hydrogel formulert for dermal legemiddelapplikasjon fungerer som et legemiddelreservoar, som avgir legemiddel til virkestedet ved frigjøring av legemidlet fra gelen. Det viktig at gelen har god kontakt med huden for avgivelse av legemiddelsubstanser. Ideelt sett bør hydrogelen feste seg til huden uten å renne av, og samtidig ha et estetisk utseende. Gelens mekaniske karakteristikk kan settes i sammenheng med terapeutisk utkomme. Gelens mekaniske egenskaper kan karakteriseres med teksturegenskaper som klebrighet og gelens sammenhengende styrke. Cohesiveness (sammenhengende styrke) kan beskrives med kraften som trengs for å deformere gelen når proben beveger seg ned i gelen. Adhesiveness beskriver gelens klebrighet, og er den kraften proben bruker på å bevege seg opp fra gelen. Cohesiveness gir et uttrykk på gelens anvendbarhet, mens adhesiveness gir et uttrykk for gelens evne til å oppholde seg på huden (34). Figur 19 (under) illustrerer et typisk diagram for SBG-hydrogel med cohesiveness som arealet av positivt kraft versus tid (areal 1). Adhesiveness er arealet av negativ kraft versus tid (areal 2). Toppen for maksimum kompresjonskraft (kraft 1) og minimum tilbaketrekkingskraft (kraft 2) er også illustrert.



Figur 19. Illustrasjon av et typisk teksturdiagram for SBG-hydrogel-formulering. Diagrammet viser kraft (Y-akse) som funksjon av tid (X-akse).

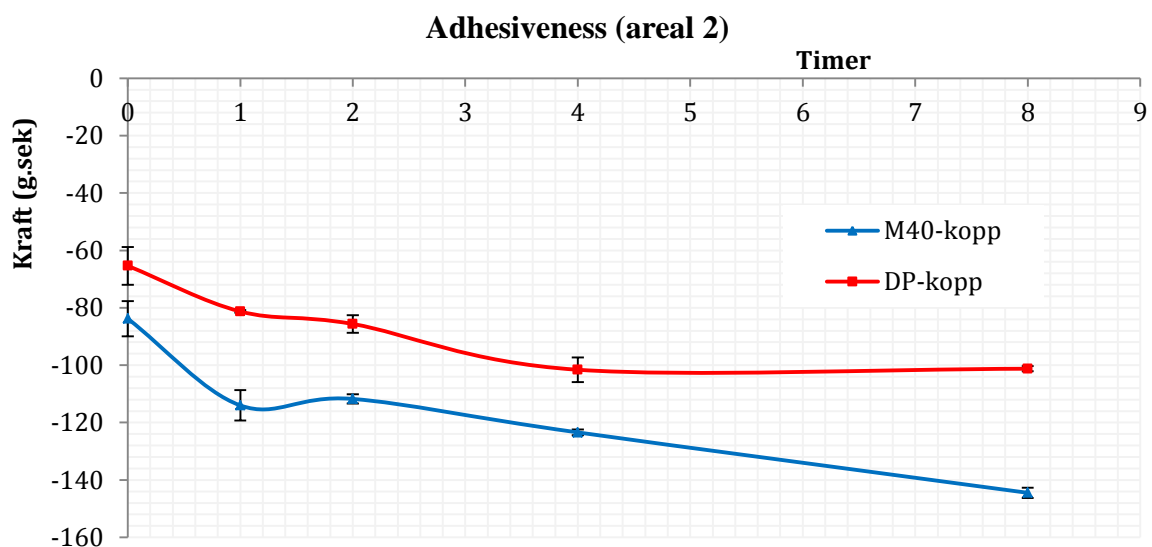
For å kunne etablere en enkel og reproducerbar metode ble to ulike teksturkopper testet. Hensikten var å etablere et tidspunkt for senere teksturanalyser hvor vi oppnår liten standardavvik for målingene og hvor den tiksotrope gelener ser ut til å ha stabilisert seg. Vi sammenlignet DP-kopper og M40-kopper med rekonstruert SBG 2,5 % uten noen tilsetningsstoffer. Etter at gelen var kjørt 5 min i DAC ved 3540 rpm ble gelen omrørt med skje. Årsaken til omrøringen etter at SBG-gelen var kjørt i DAC var problemer med at det dannet seg luftbobler under stemplet. Dette problemet viste seg senere å forsvinne ved tilsetning av glyserol og omrøring i gelen før den fikk stå og hvile før analysetidspunktene. Analysene ble utført rett etter DAC og omrøring, så etter 0, 1, 2, 4 og 8 timer med innstillinger som beskrevet i [avsnitt 3.2.8](#). Det ble utført 3 paralleller med 30 g gel i henholdsvis M40-kopper og DP-kopper.



Figur 20. Teksturanalyse av cohesiveness med sammenligning av DP-kopper og M40-kopp

Figur 20 viser at cohesiveness målt umiddelbart etter overføring til prøvekoppe (tid 0), og etter å ha fått stå urørt i 1 time med hvile (1 time), hvile nok en time (2 timer), videre hvile i to timer (4 timer) og deretter hvile i 4 timer (totalt 8 timer).

For tiksotrope geler vil en forvente at de trenger en viss tid på å “sette seg”, og at struktur og motstand i gel trenger en viss tid på å bli optimal. Fra tid 0 til tid 1 ville en dermed forvente en økt kraft målt, noe som svakt kan observeres her. Neste måling utført ved nok en times hvile skulle være lik den forrige målingen, og dette stemmer bra med resultatene vi fikk. Ved neste måling hadde gelene fått hvile i 2 timer, og en sterkere gel kunne forventes. Dette er også observert, og vi har en liten standardavvik mellom prøvene for begge koppene, noe vi også ønsker å oppnå i denne metodeutviklingen. Hva som skjer frem til det siste punktet, hvor prøvene har vært oppbevart totalt 8 timer i prøvekopene og har fått hvilt seg i 4 timer, er som forventet for M40-koppen, hvor en økt cohesiveness kan ses. I den andre koppen går imidlertid verdien ned, og det er overraskende. Muligens kan dette skyldes uforlikelighet til prøveholder eller en nedbrytning av gelstrukturen som skyldes andre grunner



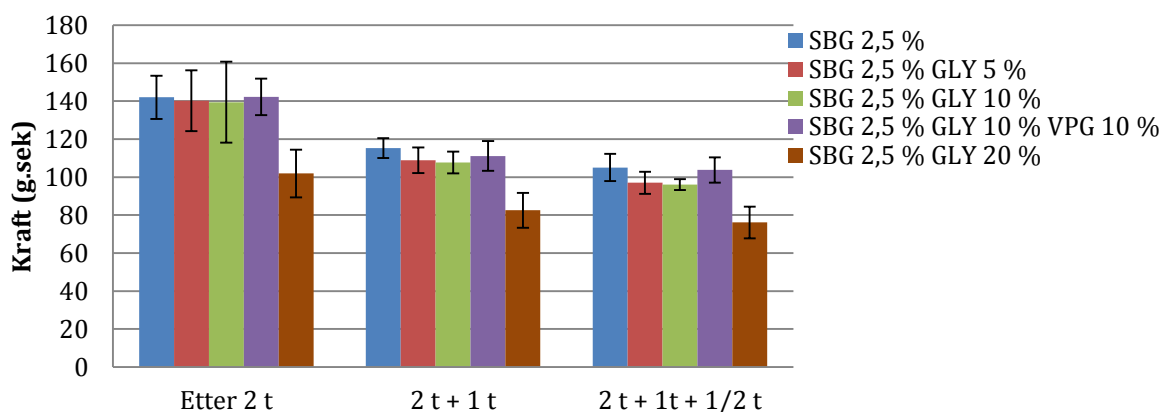
Figur 21. Teksturanalyse av adhesiveness med sammenligning av DP-kopper og M40-kopper kopper

Adhesiveness i figur 21 viser at koppene følger samme forløp som cohesiveness i figur 20, med unntak av et avvik etter 1 timer som kan skyldes en utilsiktet endring i M40-koppens posisjon. Som følge av dette kan proben ved tilbaketrekking ha vært i kontakt med M40-koppens vegg, som igjen vil øke kraften som trengs for å trekke proben opp. Analysetidspunkt skal også helst velges ut fra praktiske hensyn med tanke på selve analysen. Ut fra dette og basert på resultatene fra figur 20 og 21, ble det valgt å standardisere tekstureanalysen til å bli gjennomført etter 2 timers hvile i prøvekopene. Vi valgte også å bruke M40 kopperne, som ga høyere måleresultatene og dessuten gir oss mulighet til å forberede prøver i DAC direkte i prøvekopene.

4.2 Etablert metode

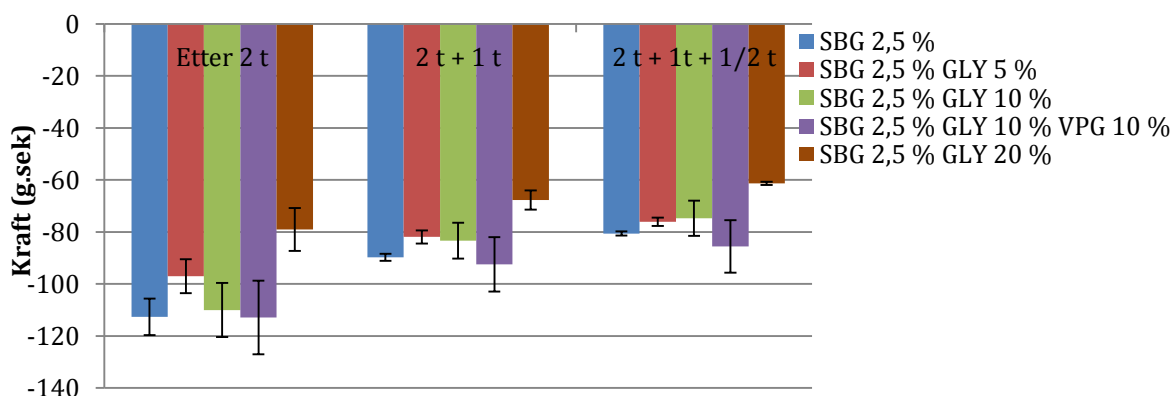
4.2.1 Optimalisering av SBG- formulering

SBG -gelens teksturegenskaper kan påvirkes ut fra en rekke faktorer, som temperatur polymerkonsentrasjon og ulike tilsetninger. Økt temperatur gjør gelen mer flytende, som igjen reduserer både cohesiveness og adhesiveness. Polymerkonsentrasjonen til SBG som har vært bukt i denne studien tilsvarer 2,5 % beta-glukan. Tilsetning av VPG og/eller glyserol vil nedsette gelens SBG konsentrasjon, som igjen kan ha betydning for teksturegenskapene. Glyserol (GLY) er kjent for å kunne modifisere hydrogelens egenskaper ved å kunne stabilisere gelen. GLY fungerer som et fuktighetsbevarende stoff i form av sin hygroskopiske karakter med binding til vann (34). For hvordan ulike mengder GLY og VPG påvirket gelens tekstur ble det utført analyser av 2,5 % SBG alene, som ble sammenlignet med ulike konsentrasjoner av GLY (0, 5 10 og 20 %). Det ble også gjort en analyse med 10 % GLY og 10 % VPG med FLZ i SBG hydrogel. –Disse formuleringene ble rekonstruert og homogenisert i 5 min i DAC ved 3540 rpm og rørt i. Gelen fikk så hvile i 2 time før første analyse. For å undersøke litt nærmere om det er noen forskjell i hvor raskt de ulike gelene gjenvinner gelstrukturen, ble hver av prøvekoppene analysert eller hvile først i 1 time, og deretter etter ½ times hvile. Det ble det laget tre paralleller med à 30 g i henholdsvis M40-kopp. De individuelle resultatene kan beskues i appendiks [A.2 – A.6](#) (tabell A2 - A6)



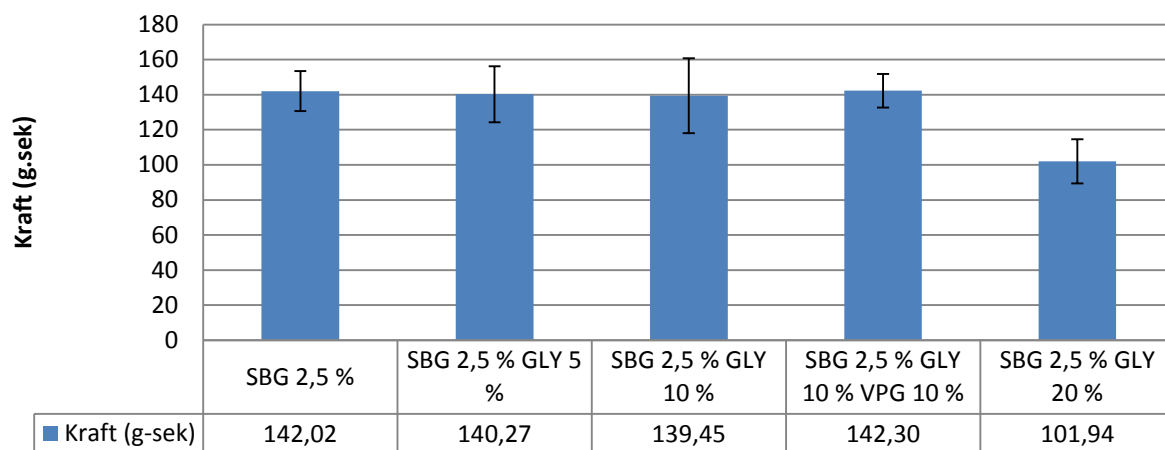
Figur 22. Sammenligning av cohesiveness (areal 1) av de ulike SBG-formuleringene

Figur 22 illustrerer sammenligningen av cohesiveness for de ulike gelformuleringene etter de ulike tidspunktene. Den totale SBG konsentrasjonen i gel-formuleringen på 2,5 % vil naturligvis reduseres etter økende mengde tilsetning.



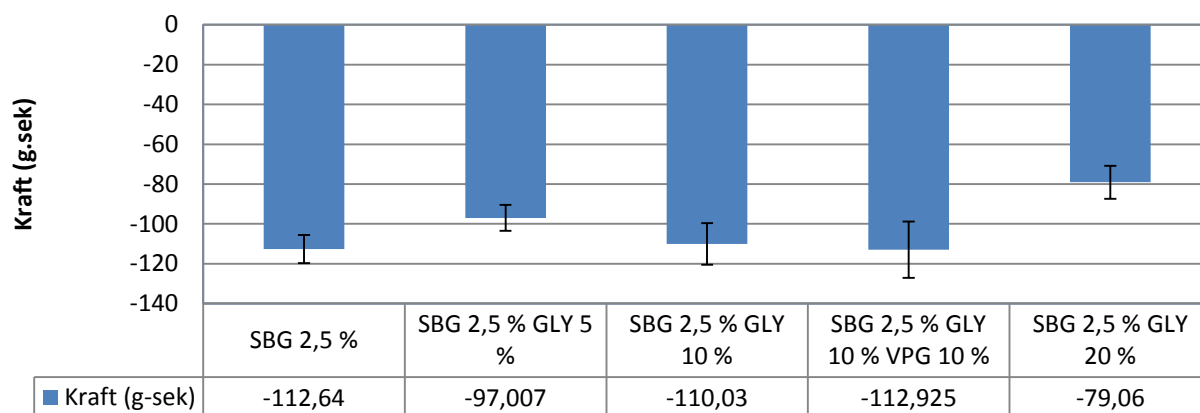
Figur 23. Sammenligning av adhesiveness (areal 2) av de ulike SBG-formuleringer

Figur 23 illustrerer sammenligningen av adhesiveness for de ulike gelformuleringene etter de ulike tidspunktene. De ulike formuleringene viser samme trend i relative målt cohesiveness og adhesiveness og samme relative forhold mellom verdiene uavhengig av måletidspunkt. tilsetning. Basert på disse resultatene, ble 2,5 % SBG med 10 % (w/w) glyserol og 10 % VPG valgt som optimal SBG-formuleringen til videre analyser.



Figur 24. Cohesivens (areal 1) etter 2 timer av de ulike SBG-formuleringene

Figur 24 viser sammenhengen for cohesivens for de ulike gel-formuleringene etter 2 timer. Det er ikke signifikant forskjell mellom 2,5 % SBG gel alene kontra 2,5 % SBG med 10 % GLY og 10 % VPG tilsatt.



Figur 25. Adhesivens (areal 2) etter 2 timer av de ulike SBG-formuleringene

Figur 25 som illustrerer adhesivens viser heller ikke signifikant forskjell mellom SBG- gel kontra SBG-gel tilsatt 10 % GLY og 10 % VPG.

4.2.2 Rekonstruering og teksturanalyse av hydrogel 2,5 % SBG

SBG-formuleringene bestod av; 2,5 % SBG med 10 % glyserol og 10 % VPG med LipFLZ (**SBG-LipFLZ**) og 2,5 % SBG med 10 % glyserol og 10 % VPG 10 % (**SBG-Lip0**).

Gel-formuleringene ble tillaget ved først å lage en grunnbase av 100 g 2,5 % SBG med 10 % glyserol i en M100-kopp som ble kjørt 5 min i DAC ved 3540 rpm. For å gjøre det lettere plukke ut glasskulene som var tilsatt VPG i injeksjonsglassene. Ble det til hvert injeksjonsglass med 570 mg størrelsesreduert VPG overført 4,43 g grunnbase med 2,5 % SBG med 10 % glyserol. Injeksjonsglasset med SBG-formuleringen ble blandet på godt vortexer før formuleringen ble overført fra injeksjonsglassene til M40-kopp uten glasskuler. Metoden med å plukke ut glasskuler med pinsett var imidlertid både tidkrevende og lite aseptisk. Etter hvert ble det med litt prøving og feiling benyttet en 5 mL pipette til å overføre SBG-formuleringen fra injeksjonsglasset til M40-koppen. Imidlertid så krever pipetteknikken litt øving, samtidig er det en fare for at en og annen glassperle kan bli med over til M40-koppen. For å være helt sikker ble det utført en visuell kontroll og eventuelle glasskuler ble plukket ut med pinsett (svært få glasskuler ble med over). Totalt 26,32 g av SBG-formuleringen fra injeksjonsglassene overført til M40-kopp som ble ad 30 g 2,5 % SBG med 10 % glyserol. SBG-formuleringen ble homogenisert med DAC i 5 min ved 3540 rpm. Rett etter DAC ble gelene rørt i med skje før den ble satt til hvile i 2 timer med påfølgende teksturanalyse.

For å få en SBG-formulering med tilsvarende 10 % VPG totalt i M40 koppen ble beregningene utført som vist under.

VPG konsentrasjonen i hvert injeksjonsglass med SBG og glyserol ble beregnet slik:

- Total mengde SBG-formulering; $0,570 + 4,43 \text{ g} = 5 \text{ g}$.
- VPG konsentrasjon; $(0,570/5 \text{ g}) * 100 \% = 11,4 \% \text{ (w/w)}$

Teoretisk mengde SBG-formulering som måtte overføres fra injeksjonsglassene til M40-koppene ble beregnet slik:

- Mengde SBG-formulering som ble overført; $(30 \text{ g} * 10 \%) / 11,4 \% = 26,32 \text{ g}$
- Kontroll av VPG konsentrasjon; $(26,32 \text{ g} * 11,4 \%) / 30 \text{ g} = 10 \% \text{ (w/w)}$

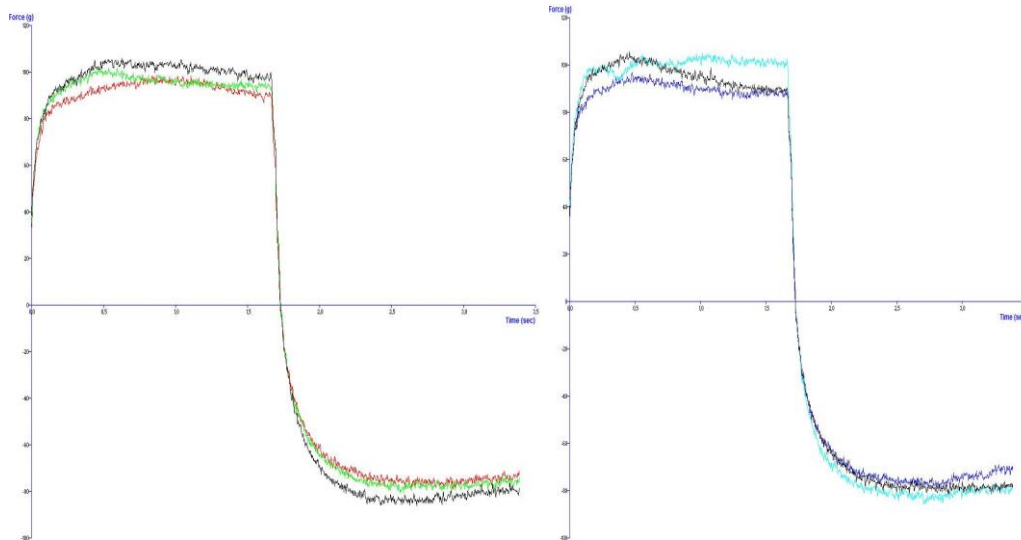
Teksturanalysene av SGB-formuleringene ble utført ved å benytte teksturapparatet TA.XT Plus. SBG-formuleringene ble analysert under de samme betingelser og innstillinger to timer etter DAC. Det ble benyttet M40-kopper med à 30 g SBG-formulering. For å avgjøre om FLZ

påvirker teksturegenskapen til formuleringen, ble foretatt teksturanalyse av SBG-LipFLZ og SBG-Lip0 for sammenligning. SBG-formuleringene ble komprimert med et stempel på 40 mm diameter, og mellom hver analyse ble notert temperatur, luftfuktighet og nettovekt av gel i M40-koppene. Innstillinger som ble benyttet for teksturanalyse av SBG-formuleringene i M40-kopper er de samme som beskrevet i metoddelen under [avsnitt 3.2.8](#).

Tabell 10. Teksturanalyse av SBG-LipFLZ (batch A) og SBG-Lip0 (batch B) (n=3)

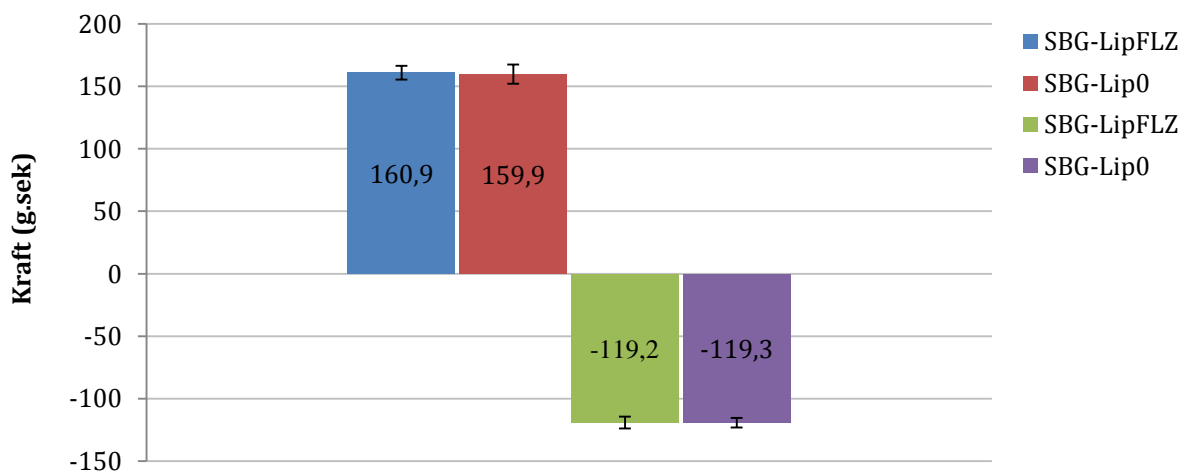
Batch A /analyse nr.	Kraft 1 (g)	Areal 1 (g.sek)	Kraft 2 (g)	Areal 2 (g.sek)
1A	101,728	160,185	-81,1	-117,549
2A	105,963	167,648	-86,312	-125,656
3A	98,797	154,839	-76,369	-114,28
Gj.snitt	102,163	160,891	-82,258	-119,162
S.A	2,942	5,253	2,953	4,782
V.K	2,879	3,265	-3,590	-40,013
Batch B /analyse nr.	Kraft 1 (g)	Areal 1 (g.sek)	Kraft 2 (g)	Areal 2 (g.sek)
1B	105,311	168,438	-85,877	-124,189
2B	105,854	160,142	-81,643	-119,087
3B	96,843	151,111	-79,363	-114,689
Gj.snitt	102,669	159,897	-82,294	-119,322
S.A	4,126	7,076	2,699	3,882
V.K	4,019	4,425	-3,253	-3,253
P-verdi	0,894	0,881	0,990	0,972

Tabell 10 viser to batcher av SBG 2,5 % med 10 % glyserol og 10 % tilsatt VPG. Batch A SBG-formulering med FLZ (SBG-LipFLZ), mens batch B er SBG-formulering uten FLZ (SBG-Lip0). Det er benyttet en student t-test (parret) for å bestemme signifikansnivået mellom de to batchene. T-testen viser at det ikke er signifikant forskjell mellom batch A og batch B ($P > 0,05$). En P-verdi over 0,05 indikerer at det er 95 % sannsynlighet for at FLZ ikke påvirker teksturegenskapen til SBG. Variasjonskoeffisienten (V.K) representerer hvor mange prosent standardavviket (S.A) utgjør i variasjon for gjennomsnittet. Målingene ble utført med tre paralleller for hver batch.



Figur 26. Illustrasjon som viser variasjonene mellom hver analyse av adhesivens og cohesivens. Til **venstre** i figuren er grafen for batch (A) (SBG- LipFLZ) og til **høyre** grafen for batch (B) (SBG-Lip0)

Figur 26 illustrer variasjonen mellom hver teksturanalyse for batch A og batch B. Variasjonen mellom teksturanalysene for hver batch vises i tabell 10 som S.A. og V.K.



Figur 27. Sammenligning av cohesivens (areal 1) og adhesivens (areal 2) mellom SBG-LipFLZ (batch A) og SBG-Lip0 (batch B) (n=3)

Figur 27 gir en grafisk illustrasjon for sammenhengen cohesivens og adhesivens mellom SBG-LipFLZ (batch A) og SBG-lip0 (batch B). Målingene er utført 2 timer etter DAC med M40-kopper. Som det kommer fram av tabell 27 var det ikke signifikant forskjell mellom de to formuleringene.

Lufttemperaturen under teksturanalysene varierte mellom 22,3 °C til 23,5 °C og luftfuktigheten var stabilt på rundt 17 %. Siden temperatur og luftfuktighet ikke utgjorde den store forskjellen mellom analysene, så ser det heller ikke ut for å ha påvirket resultatene nevneverdig. Tap av gel mellom hver analyse var i størrelsesorden omtrent 0,5 – 1 g. Dette hadde sannsynligvis heller ikke nevneverdig betydning for startposisjon til kompresjonsstempelet eller for analyseresultatene.

Som nevnt i [avsnitt 4.1.4](#) kan cohesiveness gi et uttrykk for hvor lett gelen den er å smøre på huden mens adhesiveness er et uttrykk for gelens evne til å oppholde seg på huden. Imidlertid er det vanskelig å sammenligne disse parameterne opp mot teksturanalyser av andre hydrogeler. Parameterne vil variere i forhold til oppsett/innstillinger, type gel og formuleringer. Teksturanalyse egner seg derfor bedre til å sammenligne gel av samme type og komposisjon under de samme betingelser og innstillinger. Gelèn bør feste seg til huden og ikke renne av og samtidig ha et estetisk utseende som motiverer til bruk. Figur 28 (under) viser utseendet til de to SBG- formuleringene SBG-LipFLZ og SBG-Lip0. Som bildet viser har de to SBG-gelene identisk utseende og fremstod som relativ flytende i konsistens.

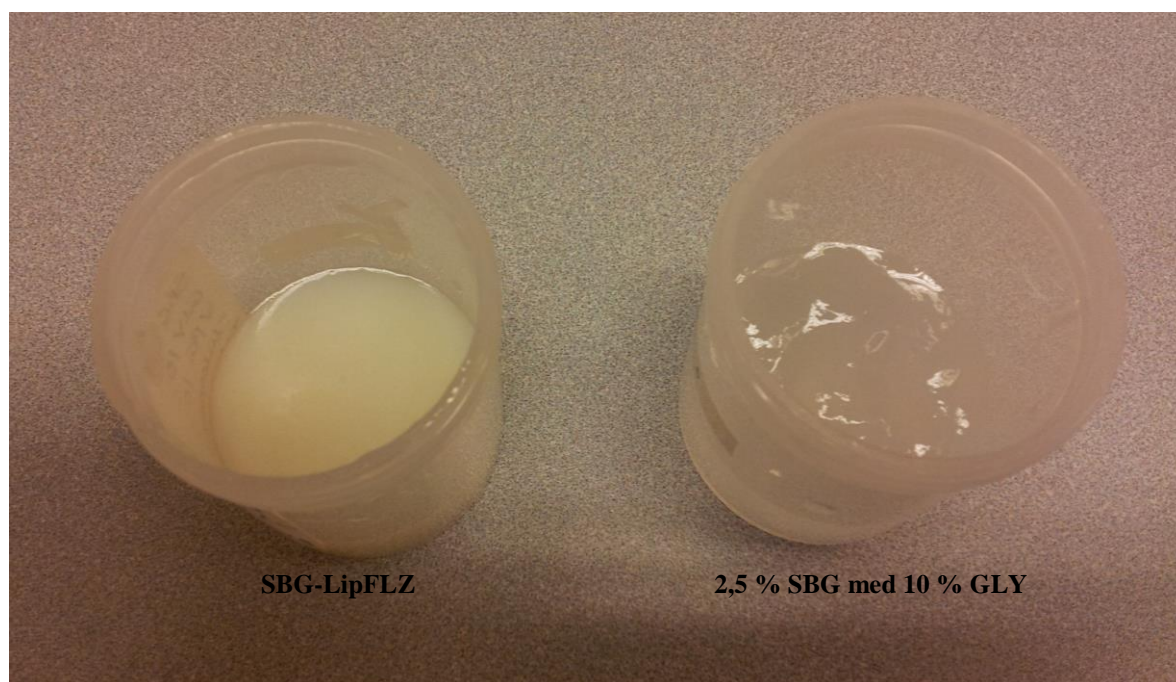


Figur 28. Venstre: SBG-LipFLZ. Høyre: SBG-Lip0

For å få svar på om vår liposombaserte SBG-formulering faktisk heftet seg til huden og ikke rant av ble SBG-formuleringen fysisk testet på hud. Figur 29 (under) viser SBG-Lip0 applisert på hud. Selv om gelen virket relativt tynnflytende i konsistens, heftet gelen seg godt til huden og rant ikke av. Gelen virket heller ikke klissete og var lett å vaske av med vann.



Figur 29. Fysikalsk testing av hefteegenskapen til SBG-Lip0



Figur 30. Utseende til SBG-formuleringen i M40-kopper før og etter tilsetning av VPG (liposomer). Til **venstre** i bildet vises utseende av formuleringen tilsatt VPG (SBG-LipFLZ), og til **høyre** vises 2,5 % SBG tilsatt 10 % GLY. Begge formuleringene er her blitt rekonstruert etter å ha blitt kjørt 5 min i DAC ved 3450 rpm.

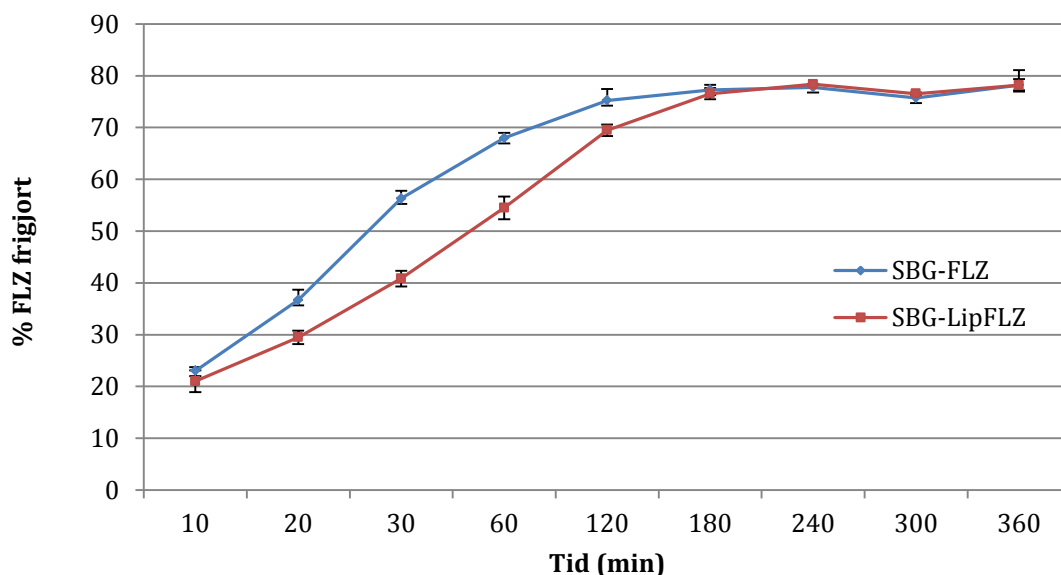
Figur 30 viser utseende til SBG-formuleringen i M40-kopper før og etter dispergering av liposomer. Under studien har vi fått en mistanke om interaksjon mellom polyetylen (M40 og M100-koppene) og SBG. Ved lagring i våre polyetylenkopper (M40 og M100) fikk SBG gelèn en plastlignende lukt når den ble lagret noen dager. Mistanken støttes av Biotec Pharmacon. Den mistenkte interaksjonen kan påvirke stabiliteten og inaktivere SBG. Siden vi benyttet polyetylenkoppene M40 og M100 til DAC og teksturundersøkelsene kan vi ikke se bort fra at gelèns egenskaper kan ha blitt påvirket. Etter denne observasjonen ble gelen lagret i gassflasker med skrukork. Alle undersøkelser av gelen i etablert metode hvor det var nødvendig å benytte polyetylenkoppene, ble utført med kortest mulig oppholdstid i koppene.

Adhesiveness defineres som et uttrykk for hvor godt en formulering oppholder seg på huden. Men det gir ikke noe entydig svar på hvor godt gelen faktisk hefter seg til huden. En vanlig metode er å måle hvor godt en formulering hefter seg til huden (bioadhesion). Metoden går ut på å måle kraften som trengs for å rive opp bindingen mellom en formulering og overflaten den er applisert på. Som overflate kan det for eksempel brukes hud fra gris for å etterligne hud fra menneske. Kraften som brukes for å løsrive formuleringen fra huden kan gi en indikasjon for hvor godt formuleringen hefter seg til huden (45).

Hydrogelens hefting til huden er en viktig faktor for å kunne maksimere deponering av legemiddel til huden. Hvor godt hydrogelen hefter seg til huden er ikke alene en avgjørende faktor. Hydrogelens evne til å frigi virkestoff, samt virkestoffets fysikalskkjemiske karakter har betydning for hvor godt legemidlet avsettes i huden. I tillegg kommer de ulike utfordringene med levende hud, som væskende sår, alder, variasjon i pH og tykkelse

4.2.3 *In vitro* frigjøringsstudie

Frigjøringsstudien ble utført med Franz-diffusjonsceller etter metode beskrevet i [avsnitt 3.2.12](#). Hensikten med studien var å gjøre en sammenligning av frigjøringsprofiler med FLZ fritt dispergert i hydrogel med FLZ-i-liposom dispergert i hydrogel. Hypotesen som skulle testes var om liposomer i hydrogel gir en vedvarende og forsinket frigjøring av virkestoff. Det ble laget 3 batcher av hver formulering hvor 300 µL ble applisert på 0,2 µm polyamidmembraner i tre donorkamre. Fra hvert donorkammer ble det tatt ut 200 µL prøve under gitte tidsintervaller som ble analysert på HPLC med 3 injeksjoner per prøve. Samtlige batcher med SBG-formulering hadde en FLZ konsentrasjon på 11,7 %. Batchene bestod av FLZ fritt dispergert i SBG-formulering (SBG-FLZ), og FLZ-i-VPG dispergert SBG-formulering (SBG-LipFLZ).



Figur 31. Frigjøringsprofil med sammenligning mellom flukonazol fritt dispergert i SBG-formulering (SBG-FLZ) og SBG-formulering med flukonazol-i-liposom (SBG-LipFLZ)

Figur 31 viser frigjøringsprofilen for SBG-FLZ (n=3) og SBG-LipFLZ (n=3).

Frigjøringsprofilen viser en vedvarende og forsinket frigjøring av FLZ for SBG-LipFLZ sammenlignet med SBG-FLZ. Forsinkelsen varer frem til 180 min for så å flate ut litt under 80 %. Etter 180 min nådde begge formuleringene et tilnærmedesvis samme toppunkt med et parallelt løp fram til 360 min. Den største forskjellen som ble registrert var på 15,37 % etter 30 min. Siden IE % bare var på 20,15 % ± 1,21, er det et klart bevis på at liposomer kan være effektiv med tanke på forlenget frigivelse av virkestoff. Frigjøringsstudien viser at SBG-gelen

i selv gir vedvarende og forlenget frigivelse som ytterligere ble forbedret ved å benytte liposomer. Dette er viktig bidrag for effektiv antifungal behandling med tanke på å opprettholde MIC i tidsperioden som er nødvendig for effektiv behandling.

4.2.4 Inkorporeringseffektivitet av FLZ

I denne studien valgte vi å fokusere på fremstillingsmetode, fremfor optimalisering av FLZ-inkorporeringen i liposomer. Men høy inkorporeringseffektivitet (IE) i kombinasjon med forlenget legemiddelfrigivelse ser ut til være viktige og avgjørende *In vivo* parametere for å oppnå MIC og effektiv antifungal behandling. IE avgjøres blant annet av lipidsammensetningen. For eksempel benyttes kolesterol for å øke inkorporeringen lipofile legemidler, samtidig som det gir lipidmembranen en mer rigid struktur.

Liposomene ble fremstilt etter metoden beskrevet i [avsnitt 3.2.1](#) “*Fremstilling av LipFLZ*”. LipFLZ som er en VPG ble kjørt i DAC før den ble fortynnet med dH₂O til en liposomdispersjon tilsvarende en FLZ konsentrasjon på 2 mg/mL. Av denne dispersjonen ble tatt ut en såkalt totalprøve som ble fortynnet i metanol med ratio 1:50, og prøve til ultrasentrifugering. Hensikten med ultrasentrifugeringen er å separere fritt FLZ fra inkorporert FLZ i liposom. Ultrasentrifugeringen separerte liposomene fra resten av løsningen ved at liposomene dannet pellet og resten av løsningen fremstod som en blank supernatant. Supernatanten ble forsiktig pipettert ut og fortynnet i metanol med ratio 1:20 før analyse i HPLC og kvantifisering av FLZ.

IE ble bestemt ved å kvantifisere FLZ i supernatant og totalprøve ble det benyttet HPLC etter metoden beskrevet i [avsnitt 3.2.5](#). IE % ble beregnet i følge [ligning 1](#).

4.2.5 Kvantifisering av fosfat fra fosfatidylkolin

Metoden som ble benyttet var etter Barlett assay (53) som går ut på å kvantifisere fosfat som et indirekte mål på mengden fosfolipider. Metoden ble brukt til å bestemme fosfolipidkonsentrasjonen i prøvene som ble brukt til å beregne hvor mye lipider som var gått med til å danne liposomer. Fosfolipid analysen er basert på en kolorimetrisk metode til å kvantifisere uorganisk fosfat. Kolorimetri (fargemåling) er en kvantitativ analysemetode hvor en kan bruke spektrofotometer til å måle mengden lys som absorberes i en prøve. Prinsippet

bygger på “Beers lov” som sier at absorpsjonen til en løsning er proporsjonal med konsentrasjonen til løsningen.

Den kjemiske modifikasjonen av fosfolipidet dannet en blå farge som varierte i styrke etter fosfatkonsentrasjonen. Modifikasjonen ble utført i flere trinn som i grove trekk gikk ut på følgende: Først ble fosfolipidet ødelagt ved å benytte svovelsyre som hydrolyserer fosfatet i fosfolipidet til uorganisk fosfat. Det uorganiske fosfatet ble så oksydert ved å tilsette hydrogenperoksid. Til slutt ble tilsatt til ammonium-molybdat som omdannet fosfatet til fosfo-molybdensyre som ble redusert med Fiske & Subbarow til et blåfarget kompleks av amino-naftyl-sulfonsyre. Denne forbindelse ble bestemt med å bruke spektrofotometer innstilt på $\lambda = 830$ nm.

Mengde fosfolipider (utbytte) som var gått med til å danne liposomer ble kalkulert som konsentrasjonen i pellet delt på konsentrasjon i totalprøve. Utregningen ble gjort ved bruk av ligning 2 og 3 (under)

$$\text{Ligning 2: } C_P = C_T - C_S$$

$$\text{Ligning 3: Utbytte} = CP / CT * 100$$

Hvor C_P er konsentrasjonen i pellet, C_T er den totale konsentrasjonen i totalprøve, og C_S er konsentrasjonen i supernatant

Fremgangsmåten for kvantifisering er beskrevet i [avsnitt 3.2.6](#). De eneste modifikasjonene under prøveopparbeidelsen var at supernatant ble fortynnet i dH₂O med en ratio på 1:250, og liposomdispersjonen med ratio 1:5000.

Tabell 11. Utbytte fosfatidylkolin til å danne liposom, og IE % for FLZ i liposomer (n=3)

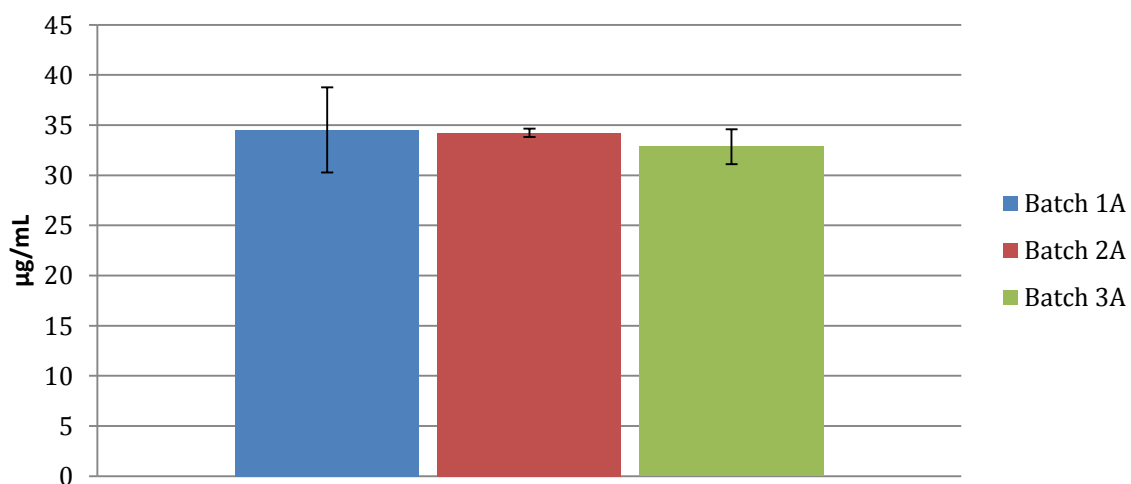
Liposom	Utbytte PC (%) ± S.A	IE % ± S.A
Lip0	94,79 ± 1,38	
LipFLZ	95,17 ± 0,52	20,15 ± 1,21
P-verdi	0,61	

Tabell 11 viser utbytte av fosfatidylkolin (PC) som har gått med til å danne liposom og IE % av FLZ i liposom (LipFLZ). Resultatene viser at det ble det dannet $\approx 94,8$ % liposomer i VPG med Lip0 resten befinner seg som frie lipider. Totalt ble det benyttet 36,36 % PC i VPG med Lip0 som igjen betyr at VPG med Lip0 inneholder omtrent 34,45 % liposomer og 1,9 % fritt PC. I VPG med LipFLZ ble det dannet $\approx 95,2$ % liposomer. Det ble benyttet 35,1 % PC som tilsvarer omtrent 33,42 % liposomer og 1,7 % fritt PC. Resultatene viser ingen signifikant forskjell i hvor mye liposomer som har gått med til å danne liposomer mellom Lip-FLZ og Lip0 ($P > 0,05$).

Resultatet i tabell 11 viser at LipFLZ hadde IE % tilsvarende $20,15 \pm 1,21$. I SBG-formuleringen (SBG-LipFLZ) befinner FLZ seg både som fritt legemiddel og som inkorporert i liposom. Konsentrasjonen SBG-LipFLZ er beregnet til totalt 11,7 % hvorav 20,15 % var inkorporert i liposomer. Dette betyr at andelen fritt FLZ i SBG-LipFLZ utgjorde 9,34 %.

4.2.6 Undersøkelse av Homogenitet av FLZ-i-SBG etter miksing med hjelp av DAC

For å oppnå en homogen fordeling av fritt FLZ og liposomer i SBG-formuleringen ble det benyttet M40-koppeer i DAC som beskrevet i metode under [avsnitt 3.2.9](#). For å undersøke om valgte betingelser for blandedprosessen var tilfredsstillende med tanke på homogenitet av prøvene, ble konsentrasjon av FLZ ble bestemt ved tilfeldig prøvetaking: Det ble tatt ut 100 mg prøve fra 5 ulike punker i hver SBG-formulering. Disse prøvene ble videre fortynnet med 10 mL HPLC-mobilfasen (vann:acetonitril (80:20 % v/v)) i målekolber. Hver prøve ble analysert med 3 injeksjoner i HPLC ([Avsnitt 3.3.5](#) og [3.2.9](#).)



Figur 32. Figuren viser den homogene fordelingen av FLZ for hver batch av SBG-LipFLZ

Figur 32 viser den homogene fordelingen av FLZ konsentrasjonen i hvert batch (SBG-LipFLZ). Resultatene viser at batch 2A har det mest homogene fordelingen med et S.A. tilsvarende 0,41. Batch 1A og 3A har en noe større spredning med henholdsvis S.A. = 4,3 og 1,7. Resultatene gir et noe usikker resultat om homogenisering med DAC bidrar til en homogen fordeling av FLZ og liposomer i SBG-formuleringene. Imidlertid viser resultatet i batch 1A en liten spredning i konsentrasjonen i de 5 punktene, noe som gir en indikasjon for at DAC kan ha bidratt til å homogenisere fritt FLZ og LipFLZ i gelen.

4.2.7 Karakterisering av liposomstørrelse før og etter inkorporering i hydrogel

Til å estimere liposomenes partikkelstørrelsesfordeling før og etter inkorporering i hydrogel, ble det benyttet PCS som beskrevet i metoden under [avsnitt 3.2.3](#). Lip0 og LipFLZ ble analysert både før og etter dispergering i SBG-formulering. Liposomene ble preparert ved bruk av filmhydreringsmetoden ved bruk av BÜCHI Rotavapor R-124 til å avdampe etanolsom beskrevet i metoden under [avsnitt 3.2.1](#).

Størrelsesredueringen ble utført ved å tilsette 25 % glassperler til 570 mg VPG i injeksjonsglass, som ble kjørt 2 min i DAC ved 2400 rpm. Det ble brukt samme fremgangsmåte til å preparere VPG med Lip0 og VPG med LipFLZ som beskrevet i metoden under [avsnitt 3.2.1](#).

Tabell 12. Gjennomsnittlig størrelsesfordeling av liposomer (n=3)

Liposomer før/etter dispergering i SBG gel	Gjennomsnitt størrelse (nm) (gjennomsnitt ± S.A)	PI (Gjennomsnitt ± S.A)
LipFLZ	220,0 ± 10,9	0,246 ± 0,036
SBG-LipFLZ	251,0 ± 16,7	0,314 ± 0,029
P-verdi	0,001	0,001
Lip0	269,0 ± 8,9	0,270 ± 0,028
SBG-Lip0	327,8 ± 52,5	0,394 ± 0,094
P-verdi	0,011	0,005

Tabell 12 Viser gjennomsnitt størrelsesfordelingen av liposomer med og uten FLZ, før og etter dispergering i SBG-formulering. Polydispersitetsindeksen (PI) er høyere for liposomer dispergert i SBG, noe som tyder på en mindre homogen fordeling av størrelsesfordelingen. PCS resultatene viser en signifikant forskjell i liposomstørrelse og PI etter dispergering i gel både for LipFLZ og Lip0 ($P < 0,05$).

Resultatene viser at LipFLZ får en lavere gjennomsnittlig størrelsesfordeling (nm) enn hva som er tilfelle for Lip0. Dette gir en indikasjon på at FLZ inkorporert i lipidmembranen bidrar til en lavere liposomstørrelse, enn for liposomene uten inkorporert FLZ. Både LipFLZ og Lip0 som ble størrelsesreduert i DAC under de samme betingelsene som beskrevet i starten av avsnittet. For SBG-LipFLZ var størrelsen 251 nm noe som er innenfor det som regnes for optimal størrelse med tanke på deponering av FLZ i huden. Økningen i P.I. kan gi en indikasjon på at liposomene i gel enten får et lag av SBG utenpå liposomet eller at liposomene aggregerer.

4.2.8 Zetapotensial og pH

Det ble målt zetapotensial og pH for samtlige batcher sombeskrevet i metoden under [avsnitt 3.2.10](#). For hver batch ble foretatt 3 målinger pH med kalibrert pH-meter.

Tabell 13. Zetapotensial med av pH i springvann og i gel-formuleringene (n=3)

SBG-formulering batch	Zetapotensial (mV) (Gjennomsnitt ± SA)	pH Springvann (Gjennomsnitt ± SA)	pH SBG-formulering (Gjennomsnitt ± SA)
Batch A (SBG-LipFLZ)	0,478 ± 0,217	6,657± 0,012	4,463± 0,033
Bacth B (SBG-Lip0)	0,865 ± 0,811	6,647± 0,009	4,397± 0,040
P-verdi	0,549	0,417	0,144

Resultatene i tabell 13 viser også at pH mellom de formuleringene så godt som identisk, noe som tyder på at FLZ ikke påvirker av gelens pH. Det ble også tatt pH av springvann som ble benyttet til å fortynne SBG-formuleringene som en kontroll.

Zetapotensiale for begge SBG-formuleringene ble som forventet tilnærmevis nøytral. Zetapotensialet bestemmes av liposomenes overflatespenning som kan gi en indikasjon på formuleringens stabilitet. Zetapotensialet og pH mellom de to formuleringene viser ikke signifikant forskjell ($P > 0,05$), noe som tyder på at FLZ i liposom ikke påvirker zetapotensialet. SBG-Lip0 ligger på $0,865 \pm 0,811$ mV og SBG-LipFLZ ligger på $0,478 \pm 0,217$ mV, noe som kan gi en ustabilitet. Optimalt burde zetapotensialet ha en negativ ladning, helst i området - 40 mV for å betraktes som stabil. Men dette har imidlertid størst betydning for emulsjoner, spesielt med lav viskositet. Et redusert zetapotensiale vil redusere

partikkelens frastøtingsevne, som igjen kan resultere i aggregering av partiklene. For hydrogeler regnes normalt dette ikke som et stort problem, siden gelens tredimensjonale nettverk er i stand til å holde dispergerte partikler i fast posisjon.

For effektiv dermal antimykotisk effekt er det avgjørende at legemidlet deponeres under hudens hornlag. Transporten skjer ved passiv diffusjon av nøytrale substanser enten som transcellulær eller paracellulær transport. Et nøytralt zetapotensial indikerer at hverken FLZ eller liposomene har ladning, noe som er ønskelig med tanke på deponering av FLZ i huden. Formuleringens pH ligger også i området for hudens pH som er mellom 4 – 7 avhengig av lokalisasjon. pH kan ha betydning for gelens hefteegenskap til huden, samt gelens evne til å frigi substanser fra matriks. Avviker gelens pH for mye fra hornlagets pH vil det kunne føre til at stoffer med lavere eller høyere pK_a en hornlagets pH kan ioniseres.

Tabell 14. pH analyse av de ulike SBG gel komposisjonene

Type SBG-formulering	pH
SBG-LipFLZ	4,46 ± 0,03
SBG-Lip0	4,40 ± 0,04
2,5 % SBG	4,14 ± 0,02
2,5 % SBG + 10 % GLY	3,86 ± 0,05

Resultatene i tabell 14 viser at 2,5 % SBG har en pH tilsvarende 4.14 ± 0.05 og at surheten øker når det tilsettes 10 % GLY. SBG-Lip0 og SBG-LipFLZ viser en økt pH. Både SBG-Lip0 og SBG-LipFLZ består av VPG med destillert vann med pH på 7,0, og som kan ha innvirkning på formuleringenes pH. Det må nevnes at både SBG-Lip0 og SBG-LipFLZ har 2,5 % SBG med 10 % GLY som grunnbase. Å kjenne til hydrogelens pH har betydning for om ulike tilsetninger vil kunne ioniseres når de dispergeres i gelen.

5 Konklusjon

Den bioaktive hydrogelen 2,5 % SBG har vist seg som et lovende liposombasert leveringssystem av virkestoffet flukonazol til huden. Frigjøringsstudien viser en forsinket frigjøring av FLZ fra vår liposombaserte SBG-formulering (SBG-LipFLZ) sammenlignet med som fritt FLZ dispergert i SBG-formuleringen (SBG-FLZ). Dette er ønskelige egenskaper som bidrar til en effektiv lokal dermal antimykotisk behandling. Resultatene fra frigjøringsstudien er også lovende med tanke på videre kliniske studier. DAC har vist seg å være et lovende verktøy for størrelsesreduisering av liposomer og sammenblanding av liposomer i SBG-formulering. Sammenblanding med DAC ga en tilfredsstillende homogen fordeling av virkestoffet flukonazol. Teksturegenskapene cohesiveness og adhesiveness til 2,5 % SBG viste ingen signifikant forskjell sammenlignet med vår liposombaserte SBG-formulering. Hydrogelen 2,5 % SBG og DAC som verktøy har vist seg å ha et potensiale for fremstilling av liposombasert hydrogel for dermal administrasjon.

6 Fremtidsperspektiv

Ettersom denne studien mangler stabilitetsstudier hadde det vært interessant at en eventuell senere studie fikk gjennomført akselererte stabilitetsstudier. Studiene kunne sett på hvordan teksturegenskapene forandret seg over tid, samt om lagring vil gi endret frigjøringsprofil av liposombasert SBG-gel. I en fremtidig stabilitetsstudie vil zetapotensiale og pH også være av interesse for å observere evt endringer i formuleringene under lagring. I tillegg hadde det vært interessant å teste Biotec Pharmacons Woulgan® Biogel med liposomer.

Formuleringen i denne studien kunne vært forbedret ved å benytte andre geldannende polymerer i tillegg til SBG. Både frigjøringsprofilen med kontrollert og forlenget frigivelse, og utfallet av antymykotisk dermal effekt. Ville sannsynlig bli forbedret med en optimalisering av inkorporeringseffektiviteten av virkestoff i liposomet.

6. Referanseliste

1. Massing U, Cicko S, Zirolì V. Dual asymmetric centrifugation (DAC)--a new technique for liposome preparation. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2008;125(1):16-24.
2. Hurler J. Improved burns therapy: A formulation development. Tromsø: Universitetet i Tromsø; 2013.
3. Kaushik D, Batheja P, Kilfoyle B, Rai V, Michniak-Kohn B. Percutaneous permeation modifiers: enhancement versus retardation. *Expert opinion on drug delivery*. 2008;5(5):517-29.
4. Güngör S, Sedef Erdal M, Aksu B. New Formulation Strategies in Topical Antifungal Therapy. *Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*. 2012;3:9.
5. Tombolato L, Novitskaya EE, Chen PY, Sheppard FA, McKittrick J. Microstructure, elastic properties and deformation mechanisms of horn keratin. *Acta biomaterialia*. 2010;6(2):319-30.
6. Barry BW. Transdermal drug delivery. In: Aulton ME, editor. *Aulton's Pharmaceutics, The Design and Manufacture of Medicines 3 utgave*. Philadelphia, USA: Churchill Livingstone Elsevier; 2007. p. 565 - 98.
7. Andrews SN, Jeong E, Prausnitz MR. Transdermal delivery of molecules is limited by full epidermis, not just stratum corneum. *Pharmaceutical research*. 2013;30(4):1099-109.
8. El Maghraby GM, Williams AC, Barry BW. Can drug-bearing liposomes penetrate intact skin? *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 2006;58(4):415-29.
9. Elias PM. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *The Journal of investigative dermatology*. 1983;80(1 Suppl):44s-9s.
10. Elsayed MM, Abdallah OY, Naggar VF, Khalafallah NM. PG-liposomes: novel lipid vesicles for skin delivery of drugs. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 2007;59(10):1447-50.
11. Touitou E, Dayan N, Bergelson L, Godin B, Eliaz M. Ethosomes - novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2000;65(3):403-18.
12. Faguy DM. Fungal pathogens: an overview. *Radiologic technology*. 2011;82(4):321-40.
13. Tuite NL, Lacey K. Overview of invasive fungal infections. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2013;968:1-23.
14. Norsk Legemiddelhandbok. Soppsykdommer i huden [lastet 2 desember 2013]. Tilgjengelig fra: <http://legemiddelhandboka.no/Terapi/20493?expand=1>.
15. Mekkawy A, Fathy M, EL-Shanawany S. Formulation and in vitro evaluation of fluconazole topical gels. *British Journal of Pharmaceutical Research*. 2013;3(3):20.

16. Dias MF, Quaresma-Santos MV, Bernardes-Filho F, Amorim AG, Schechtman RC, Azulay DR. Update on therapy for superficial mycoses: review article part I. *Anais brasileiros de dermatologia*. 2013;88(5):764-74.
17. Warnock DW. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Nihon Ishinkin Gakkai zasshi = Japanese journal of medical mycology*. 2007;48(1):1-12.
18. Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*. 2008;51 Suppl 4:2-15.
19. Dias MF, Bernardes-Filho F, Quaresma-Santos MV, Amorim AG, Schechtman RC, Azulay DR. Treatment of superficial mycoses: review - part II. *Anais brasileiros de dermatologia*. 2013;88(6):937-44.
20. Legemiddelverket. Preparatomtaler (SPC) Antimykotika til systemisk bruk 2014 [lastet 26 februar 2014]. Tilgjengelig fra: http://www.legemiddelverket.no/Legemiddelsoek/Sider/Legemidler_etter_omraade.aspx.
21. Yang W, Wiederhold NP, Williams RO, 3rd. Drug delivery strategies for improved azole antifungal action. *Expert opinion on drug delivery*. 2008;5(11):1199-216.
22. Legemiddelverket. Preparatomtaler (SPC) Fungicider til utvortes bruk 2014 [lastet 26 februar 2014]. Tilgjengelig fra: http://www.legemiddelverket.no/Legemiddelsoek/Sider/Legemidler_etter_omraade.aspx.
23. Kaur IP, Kakkar S. Topical delivery of antifungal agents. *Expert opinion on drug delivery*. 2010;7(11):1303-27.
24. Legemiddelverket. Preparatomtaler (SPC) Flukonazol [lastet 2 desember 2013]. Tilgjengelig fra: <http://www.legemiddelverket.no/Legemiddelsoek/Sider/Legemiddelvisning.aspx?pakningId=b7ec6c73-423f-4544-86db-504e4be28877>.
25. Fromtling RA. Overview of medically important antifungal azole derivatives. *Clinical microbiology reviews*. 1988;1(2):187-217.
26. Chem P. Fluconazole - Compound Summary (CID 3365): Medical Subject Headings; 2005 [lastet 29 november 2013]. Tilgjengelig fra: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=3365&loc=ec_rcs.
27. Gupta M, Goyal AK, Paliwal SR, Paliwal R, Mishra N, Vaidya B, et al. Development and characterization of effective topical liposomal system for localized treatment of cutaneous candidiasis. *Journal of liposome research*. 2010;20(4):341-50.
28. Wavikar P, Vavia P. Nanolipidgel for enhanced skin deposition and improved antifungal activity. *AAPS PharmSciTech*. 2013;14(1):222-33.
29. Otto A, du Plessis J, Wiechers JW. Formulation effects of topical emulsions on transdermal and dermal delivery. *International journal of cosmetic science*. 2009;31(1):1-19.
30. Kopecek J. HYDROGELS FROM SOFT CONTACT LENSES AND IMPLANTS TO SELF-ASSEMBLED NANOMATERIALS. *Journal of polymer science Part A, Polymer chemistry*. 2009;47(22):5929-46.

31. Kopecek J. Hydrogel biomaterials: a smart future? *Biomaterials*. 2007;28(34):5185-92.
32. Fresno Contreras MJ, Ramirez Dieguez A, Jimenez Soriano MM. Rheological characterization of hydroalcoholic gels--15% ethanol--of Carbopol Ultrez 10. *Farmaco (Societa chimica italiana : 1989)*. 2001;56(5-7):437-41.
33. Helal DA, EL-Rhman DA, Abdel-Halim SA, El-Nabarawi MA. Formulation and evaluation of fluconazole topical gel. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2012;4(5):7.
34. Hurler J, Engesland A, Poorahmary B, Skalko-Basnet N. Improved Texture Analysis for Hydrogel Characterization: Gel Cohesiveness, Adhesiveness, and Hardness. *Applied Polymer Science*. 2011;125(1):180–8.
35. Vanic Z, Skalko-Basnet N. Nanopharmaceuticals for improved topical vaginal therapy: can they deliver? *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2013;50(1):29-41.
36. Zekovic DB, Kwiatkowski S, Vrvic MM, Jakovljevic D, Moran CA. Natural and modified (1-->3)-beta-D-glucans in health promotion and disease alleviation. *Critical reviews in biotechnology*. 2005;25(4):205-30.
37. Zykova SN, Balandina KA, Vorokhobina NV, Kuznetsova AV, Engstad R, Zykova TA. Macrophage stimulating agent soluble yeast β -1/1,6-glucan as a topical treatment of diabetic and leg ulcers: A randomized, double blind, placebo-controlled phase II study. *Journal of Diabetes Investigation*. 2013;2(5):8.
38. Barsanti L, Passarelli V, Evangelista V, Frassanito AM, Gualtieri P. Chemistry, physico-chemistry and applications linked to biological activities of beta-glucans. *Natural product reports*. 2011;28(3):457-66.
39. Biotec Pharmacon ASA . Woulgan® Biogel [lastet 15 april 2014]. Tilgjengelig fra: <http://biotec.no/beta-glucans/woulgan-biogel/>.
40. Elmoslemany RM, Abdallah OY, El-Khordagui LK, Khalafallah NM. Propylene glycol liposomes as a topical delivery system for miconazole nitrate: comparison with conventional liposomes. *AAPS PharmSciTech*. 2012;13(2):723-31.
41. Liu D, Ma F. Soybean Phospholipids. 2011 Published October 28, 2011 under CC BY 3.0 license [lastet 7 desember 2013]. In: *Recent Trends for Enhancing the Diversity and Quality of Soybean Products* [Internett]. In Tech, [lastet 7 desember 2013]; [17]. Tilgjengelig fra: <http://www.intechopen.com/books/recent-trends-for-enhancing-the-diversity-and-quality-of-soybean-products/soybean-phospholipids>.
42. de Leeuw J, de Vijlder HC, Bjerring P, Neumann HA. Liposomes in dermatology today. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. 2009;23(5):505-16.
43. Mishra D, Hubenak JR, Mathur AB. Nanoparticle systems as tools to improve drug delivery and therapeutic efficacy. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2013;101(12):3646-60.

44. Hurler J, Zakelj S, Mravljak J, Pajk S, Kristl A, Schubert R, et al. The effect of lipid composition and liposome size on the release properties of liposomes-in-hydrogel. *International journal of pharmaceutics*. 2013;456(1):49-57.
45. Hurler J, Berg OA, Skar M, Conradi AH, Johnsen PJ, Skalko-Basnet N. Improved burns therapy: liposomes-in-hydrogel delivery system for mupirocin. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2012;101(10):3906-15.
46. Brandl M. Vesicular phospholipid gels. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2010;605:205-12.
47. Basnet P, Skalko-Basnet N. Nanodelivery systems for improved topical antimicrobial therapy. *Current pharmaceutical design*. 2013;19(41):7237-43.
48. Gupta M, Tiwari S, Vyas SP. Influence of various lipid core on characteristics of SLNs designed for topical delivery of fluconazole against cutaneous candidiasis. *Pharmaceutical development and technology*. 2013;18(3):550-9.
49. Gupta M, Vyas SP. Development, characterization and in vivo assessment of effective lipidic nanoparticles for dermal delivery of fluconazole against cutaneous candidiasis. *Chemistry and physics of lipids*. 2012;165(4):454-61.
50. Aggarwal N, Goindi S. Preparation and evaluation of antifungal efficacy of griseofulvin loaded deformable membrane vesicles in optimized guinea pig model of *Microsporum canis*--dermatophytosis. *International journal of pharmaceutics*. 2012;437(1-2):277-87.
51. Plessis Jd, Ramachandran C, Weiner N, Muller DG. The influence of particle size of liposomes on the deposition of drug into skin. *International Journal of Pharmaceutics* 1994;103:5.
52. Verma DD, Verma S, Blume G, Fahr A. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. *International journal of pharmaceutics*. 2003;258(1-2):141-51.
53. Barlett GR. Phosphorus Assay in Column Chromatography. *The Journal of Biological Chemistry*. 1959(234):466-8.

Appendiks

A.1 Homogen fordeling av FLZ i bacth A (SBG-LipFLZ)

Tabell A1. Homogen fordeling av FLZ i bacth A (SBG-LipFLZ)

Punkt nr		Bacth 1A (µg/mL)	Bacth 2A (µg/mL)	Bacth 3A (µg/mL)	Gj.snitt bacth A (µg/mL)
1	Gj. snitt	38,842	34,354	31,249	31,480
	S.A	0,141	0,147	0,583	
	V.K	0,490	0,429	1,865	
2	Gj. snitt	39,898	34,094	31,195	31,730
	S.A	0,309	0,335	0,251	
	V.K	1,034	0,983	0,804	
3	Gj. snitt	37,948	33,521	35,055	35,507
	S.A	0,105	0,274	0,361	
	V.K	0,277	0,816	1,029	
4	Gj. snitt	38,761	34,735	34,874	36,123
	S.A	0,366	0,145	0,492	
	V.K	0,945	0,417	1,411	
5	Gj. snitt	37,159	34,453	31,890	34,500
	S.A	0,187	0,219	0,446	
	V.K	0,502	0,635	1,399	

Tabell A1 viser gjennomsnitt konsentrasjonen i µg/mL for hvert punkt i hver bacth. V.K og S.A representerer verdiene i forhold til hvert punkt. Kolonnen til høyre er gjennomsnitt av hvert punkt for samtlige av de 3 bacthene.

A.2 Teksturanalyse av 2,5 % SBG

Tabell A2. Teksturanalyse av 2,5 % SBG-gel (n=3)

2,5 % SBG etter 2 t				
	Kraft 1 (g)	Areal 1 (g.sek)	Kraft 2 (g)	Areal 2 (g.sek)
Gj.snitt	92,462	147,016	-79,072	-112,644
S.A	7,148	11,408	5,216	7,036
V.K	7,730	7,760	-6,597	-6,246
2,5 % SBG etter 2 t + 1 t				
	Kraft 1 (g)	Areal 1 (g.sek)	Kraft 2 (g)	Areal 2 (g.sek)
Gj.snitt	75,453	115,337	-62,244	-89,770
S.A	5,645	5,192	0,800	1,356
V.K	7,482	4,502	-1,286	-1,511
2,5 % SBG etter 2 t + 1 t + ½ t				
	Kraft 1 (g)	Areal 1 (g.sek)	Kraft 2 (g)	Areal 2 (g.sek)
Gj.snitt	70,459	105,063	-56,490	-80,653
S.A	5,870	7,124	0,490	0,800
V.K	8,330	6,780	-0,867	-0,992

For hver teksturanalyse ble det gjort tre paralleller

Tabell A2 viser maksimum kompresjonskraft (kraft 1), cohesiveness (areal 1), minimum tilbaketrekningskraft (kraft 2) og adhesiveness (areal 2) for SBG 2,5 %. Verdiene er gjennomsnittet av 3 målinger med S.A. og V.A.

A.3 Teksturanalyse av 2,5 % SBG med 5 % GLY

Tabell A3. Teksturanalyse av 2,5 % SBG med 5 % GLY (n=3)

2,5 % SBG med 5 % GLY (w/w) etter 2 t				
	Kraft 1 (g)	Areal 1 (g.sek)	Kraft 2 (g)	Areal 2 (g.sek)
Gj.snitt	89,501	140,271	-69,016	-97,007
S.A	11,292	15,965	4,753	6,518
V.K	12,616	11,382	-6,887	-6,720

2,5 % SBG med 5 % GLY (w/w) etter 2 t + 1 t				
	Kraft 1 (g)	Areal 1 (g.sek)	Kraft 2 (g)	Areal 2 (g.sek)
Gj.snitt	71,332	108,868	-57,580	-81,940
S.A	5,592	6,726	1,413	2,505
V.K	7,840	6,178	-2,454	-3,057

2,5 % SBG med 5 % GLY (w/w) 2 t + 1 t + ½ t				
	Kraft 1 (g)	Areal 1 (g.sek)	Kraft 2 (g)	Areal 2 (g.sek)
Gj.snitt	63,443	97,011	-53,382	-76,070
S.A	3,526	5,887	0,843	1,595
V.K	5,557	6,069	-1,579	-2,097

For hver teksturanalyse ble det gjort tre paralleller

Tabell A3 viser maksimum kompresjonskraft (kraft 1), cohesiveness (areal 1), minimum tilbaketrekingskraft (kraft 2) og adhesiveness (areal 2) for SBG-formulering med 5 % GLY. Verdiene er gjennomsnittet av 3 målinger med S.A. og V.A.

A.4 Teksturanalyse av 2,5 % SBG med 10 % GLY

Tabell A4. Teksturanalyse av SBG-gel med 10 % GLY (n=3)

2,5 % SBG med 10 % GLY (w/w) etter 2 t				
	Kraft 1 (g)	Areal 1 (g.sek)	Kraft 2 (g)	Areal 2 (g.sek)
Gj.snitt	89,277	139,452	-76,575	-110,034
S.A	13,032	21,321	7,506	10,440
V.K	14,597	15,289	-9,802	-9,488

2,5 % SBG med 10 % GLY (w/w) etter 2 t + 1 t				
	Kraft 1 (g)	Areal 1 (g.sek)	Kraft 2 (g)	Areal 2 (g.sek)
Gj.snitt	72,513	107,689	-57,930	-83,357
S.A	5,502	5,793	4,639	6,922
V.K	7,588	5,379	-8,008	-8,305

2,5 % SBG med 10 % GLY (w/w) 2 t + 1 t + ½ t				
	Kraft 1 (g)	Areal 1 (g.sek)	Kraft 2 (g)	Areal 2 (g.sek)
Gj.snitt	65,276	96,086	-52,250	-74,777
S.A	3,495	2,842	4,521	6,766
V.K	5,353	2,958	-8,652	-9,048

For hver teksturanalyse ble det gjort tre paralleller

Tabell A4 viser maksimum kompresjonskraft (kraft 1), cohesiveness (areal 1), minimum tilbaeketrekningskraft (kraft 2) og adhesiveness (areal 2) for SBG-gel med 10 % GLY.

Verdiene er gjennomsnittet av 3 målinger med S.A. og V.A

A.5 Teksturanalyse av 2,5 % SBG med 20 % GLY

Tabell A5. Teksturanalyse av 2,5 % SBG med 20 % GLY (n=3)

2,5 % SBG med 20 % GLY (w/w) etter 2 t				
	Kraft 1 (g)	Areal 1 (g.sek)	Kraft 2 (g)	Areal 2 (g.sek)
Gj.snitt	65,059	101,941	-55,398	-79,059
S.A	7,602	12,568	5,172	8,270
V.K	11,685	12,329	-9,337	-10,461

2,5 % SBG med 20 % GLY (w/w) etter 2 t + 1 t				
	Kraft 1 (g)	Areal 1 (g.sek)	Kraft 2 (g)	Areal 2 (g.sek)
Gj.snitt	54,421	82,567	-47,509	-67,768
S.A	6,386	9,197	2,443	3,702
V.K	11,734	11,138	-5,141	-5,463

2,5 % SBG med 20 % GLY (w/w) 2 t + 1 t + ½ t				
	Kraft 1 (g)	Areal 1 (g.sek)	Kraft 2 (g)	Areal 2 (g.sek)
Gj.snitt	51,888	76,111	-42,914	-61,360
S.A	7,615	8,295	0,381	0,587
V.K	14,676	10,898	-0,888	-0,957

For hver teksturanalyse ble det gjort tre paralleller

Tabell A5 viser maksimum kompresjonskraft (kraft 1), cohesiveness (areal 1), minimum tilbaketrekingskraft (kraft 2) og adhesiveness (areal 2) for SBG-gel med 20 % GLY.

Verdiene er gjennomsnittet av 3 målinger med S.A. og V.A.

A.6 Teksturanalyse av 2,5 % SBG med 10 % GLY og 10 % VPG

Tabell A6. Teksturanalyse av 2,5 % SBG med 20 % GLY (n=3)

2,5 % SBG med 10 % GLY og 10 % VPG (w/w) etter 2 t				
	Kraft 1 (g)	Areal 1 (g.sek)	Kraft 2 (g)	Areal 2 (g.sek)
Gj.snitt	91,097	142,298	-76,837	-112,925
S.A	6,056	9,567	8,854	14,146
V.K	6,648	6,723	-11,523	-12,527

2,5 % SBG med 10 % GLY (w/w) etter 2 t + 1 t				
	Kraft 1 (g)	Areal 1 (g.sek)	Kraft 2 (g)	Areal 2 (g.sek)
Gj.snitt	70,973	111,111	-63,228	-92,455
S.A	4,839	7,852	6,210	10,447
V.K	6,818	7,066	-9,822	-11,299

2,5 % SBG med 10 % GLY og 10 % VPG (w/w) 2 t + 1 t + ½ t				
	Kraft 1 (g)	Areal 1 (g.sek)	Kraft 2 (g)	Areal 2 (g.sek)
Gj.snitt	67,174	103,751	-57,908	-85,560
S.A	4,837	6,667	6,087	10,095
V.K	7,200	6,426	-10,512	-11,799

For hver teksturanalyse ble det gjort tre paralleller

Tabell A6 viser maksimum kompresjonskraft (kraft 1), cohesiveness (areal 1), minimum tilbaketrekingskraft (kraft 2) og adhesiveness (areal 2) for SBG-formulering med 10 % GLY og 10 % VPG. Verdiene er gjennomsnittet av 3 målinger med S.A. og V.A.

Tabell A2 – A6 viser at gjennomsnittsverdiene ble redusert etter 2 timer pluss 1 t og ytterligere redusert etter 2 t pluss 1 t pluss ½ t. Dette er som forventet siden SBG-gelen er tiksotropisk og trenger til for å stabilisere gel-nettverket etter ytre påvirkning.

Variasjonskoeffisienten (V.K) representerer hvor mange prosent standardavviket (S.A) utgjør i variasjon for gjennomsnittet

A.7 Sammendrag (Liposome Research Days)

A NEW PREPARATION METHOD FOR PREPARATION OF LIPOSOMES-IN-HYDROGELS PRIMED FOR TREATMENT OF SKIN DISEASES

Sveinung Gaarden Ingebrigtsen, Kurt Jonny Johansen, Natasa Skalko-Basnet, Ann Mari Holsæter
Department of Pharmacy, Faculty of Health Sciences, University of Tromsø
Tromsø, Troms, NO-9037, Norway

Presenting author's e-mail address: sveinung.g.ingebrigtsen@uit.no

SUMMARY

A novel delivery system for liposomes in the bioactive hydrogel “soluble-beta-glucan” (SBG) was prepared by the help of Dual Asymmetric Centrifugation (DAC) for the first time. Liposomes containing fluconazole (FLZ) were in the desired size range for topical therapy (200-300 nm). The liposomes-in-hydrogel system exhibited the desired sustained release drug profile.

INTRODUCTION

To obtain suitable liposome formulations for topical application, a vehicle is needed to assure the desirable retention and adhesion of drug-loaded liposomes onto the skin. For this purpose, hydrogels are regarded as promising vehicles [1]. The hydrogel “soluble beta-glucan” (SBG) has caught our attention since it also promotes wound healing on its own [2]. Producing a liposome-in-hydrogel formulation includes several homogenization and mixing steps, which we have been able to perform in the same machine, namely a DAC 150 FVZ asymmetric centrifuge (Hauschild & Co KG, Germany). DAC utilizes a unique combination of two contra rotating movements of the sample-holder, which results in shear forces that efficiently homogenize and gives a size reduction of liposomes when produced in the form of a vesicular phospholipid gel (VPG) [3], here shown to be suitable for further dilution into liposome dispersion into hydrogels.

EXPERIMENTAL METHODS

Liposomes made of phosphatidylcholine (PC) containing FLZ were prepared using the film hydration method. The lipid film was hydrated with a mixture of distilled water and propylene glycol (PG) (ratio 1:1:0.75 w/v/v) forming a VPG. Size reduction of liposomes in the VPGs was performed by DAC at 2400 rpm for 2 minutes with the addition of 25% (w/w) glass beads as mixing aid. The liposome size was measured by photon correlation spectroscopy. Entrapment efficiency of FLZ was investigated by use of ultracentrifugation at $215578 \times g$ for 1 hour at 10 °C. For quantification of the free and liposomally entrapped FLZ, HPLC (C-18 column) with a UV/VIS-detector measuring at 260 nm was applied. DAC was also used for mixing liposomes and hydrogel (2.5% SBG) and other additives such as glycerol. Texture properties of the hydrogels were investigated using a texture analyzer. Drug release studies were performed with the optimized liposome-in-hydrogel formulation for comparison with free drug in the same hydrogel. For this Franz-diffusion cells, applying polyamide membranes as the barrier was applied.

RESULTS AND DISCUSSION

With the developed DAC-homogenization method, liposomes in the size range of 220.0 ± 10.9 nm and an entrapment efficiency of $20.2 \pm 1.2\%$ were obtained.

Texture analysis of the different liposomes-in-hydrogel formulation showed no significant difference between gels containing 0% or 10% (w/w) VPG. However, a significant change in the gels texture properties was observed when 20% (w/w) glycerol was added as compared to 0, 5, and 10%. Based on these results, 10% (w/w) glycerol was selected as optimal for this formulation and used in further studies. A sustained release of FLZ was observed from the optimized liposomes-in-hydrogel formulation SBG/glycerol/liposomes (ratio 80:10:10 w/w), compared to the release of free drug from hydrogel, containing 10% glycerol.

CONCLUSION

DAC has been proven to be a promising tool for preparing novel liposomes-in-hydrogel formulations for topical administration to the skin, assuring a desired liposome size distribution and a sustained drug release.

REFERENCES

1. Hurler, J., et al., *Improved burns therapy: Liposomes-in-hydrogel delivery system for mupirocin*. J. Pharm. Sci., 2012. **101**(10): p. 3906-3915.
2. Zykova, S.N., et al., *Macrophage stimulating agent soluble yeast β -1,3/1,6-glucan as a topical treatment of diabetic foot and leg ulcers: A randomized, double blind, placebo-controlled phase II study*. J. Diabetes Investigation, 2013. DOI: 10.1111/jdi.12165 (online version, before inclusion in an issue)
3. Massing, U., S. Cicko, and V. Ziroli, *Dual asymmetric centrifugation (DAC)—A new technique for liposome preparation*. J. Control. Release, 2008. **125**(1): p. 16-24.

A.8 SOP PCS

Size determination of liposomes by PCS

(Utarbeidet av Merete L. Skar)

The instrument and the LAF bench should be switched on 30 minutes before use. Place all the necessary equipment (see below) in the bench when you switch it on.

The following should be available in the LAF bench:

- Sample
- Solvent
- Test tube(s), sonicated in appropriate solvent
- Syringes, 5 ml and 1 ml
- Syringe filter 0.22 μm
- Needles (18G x 2", 1.2 mm x 50 mm)
- Lens tissue
- Beaker for waste

- Test tubes should be sonicated to loosen dust particles. Check whether the tube(s) fits into the instrument. Submerge them in filtrated solvent in a beaker and sonicate for 5-10 minutes.
- Rinse the sonicated tube three times with freshly filtered solvent (use 5 or 10 ml syringe with syringe filter and needle). Waste the first 2-3 ml from new filters.
- Add one drop of sample (use 1 ml syringe with needle) to the test tube, then add freshly filtered solvent to minimum 2/3 of total volume.
- Empty the sample syringe and use it to mix the sample by drawing the sample into the syringe and emptying the syringe in the test tube a few times.
- Make sure there are no bubbles in the test tube. Bubbles can easily be removed by touching them with the needle.
- Wipe of the tube with lens tissue and place the tube in the instrument. The reading in the display on the instrument should be within the range 250-350 KHz. If the intensity is outside this range, the concentration of the sample should be adjusted.
- The sample should preferably rest in the instrument for 5 minutes before the measurement starts.

Software

- Prepare your own folder for data files under C:\PCS\Data
- Access software via the icon "Nicomp PSS PCS"
- Most parameters can/should retain their default values. Check the following:
- *Particle Sizing > Control Menu*
 - > *Temperature*: set to room temperature
 - > *Liquid Viscosity*: consult the table on page 32 in Nicomp manual for aqueous solutions
 - > *Liquid Refractive Index*: 1.333 for aqueous solutions

- o > *Intensity Setpoint*: 300 KHz
- *Particle Sizing > AutoPrint/SaveMenu*
 - o *Browse*: select the correct folder for your data files. Give a file name on the format xxxxxxxx.001 (eight characters followed by “.001”)
 - o *Printout ID*: fill in information about your sample
 - o *No. Print/Save Cycles*: normally 3
 - o *Using Run Time*: long enough to collect 1000K data points (“Ch.1 Data” >1000), normally 5 – 60 minutes.
 - o *Clear Autocorrelator*: check
 - o *Print Result*: indicate whether you prefer printout of results directly after each cycle. Press “Printout Options” to choose your preferred layout.
 - o *Store Data On Disk*: check
- In order to start the measurement: click icon “G” in toolbar. If, when data collection has started, “Solid particle” is displayed in the upper right corner of the screen, click icon “Toggle Vesicle/Solid particle”.
- Evaluation of data:
 - o Your data fits with a Gaussian distribution when
 - Chi squared < 3.00
 - Base Adj < 0.05%
 - o Your data fits with a Nicomp distribution when:
 - Fit error < 1.5
 - Residual error < 10
 - o Variance (P.I.) = polydispersity index
 - The lower the value, the narrower is the size distribution
 - For hand extruded liposomes values in the range 0.3-0.4 are typical.
 - Values above 0.7 are not acceptable.
 - Note: value is not printed on all printout options

